

Tesis Doctoral

Caracterización de distintas fuentes de cAMP en la señalización del GPCR CRHR1

Inda, María Carolina

2017-03-15

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Inda, María Carolina. (2017-03-15). Caracterización de distintas fuentes de cAMP en la señalización del GPCR CRHR1. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Inda, María Carolina. "Caracterización de distintas fuentes de cAMP en la señalización del GPCR CRHR1". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2017-03-15.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Caracterización de distintas fuentes de cAMP en la señalización del GPCR CRHR1

Tesis presentada para optar al título de
Doctor de la Universidad de Buenos Aires
en el área de Ciencias Biológicas

Lic. María Carolina Inda

Directora de tesis: Dr. Susana Silberstein Cuña

Consejero de Estudios: Dr. Eduardo Arzt

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

Buenos Aires, 2017

Gracias Susana por la confianza y el apoyo para trabajar todos estos años. A mis compañeros de mesada actuales y pasados, gracias por la ayuda (experimental y no tanto) para hacer este trabajo. Como parte de la transición entre Exactas e IBioBA, gracias a los integrantes de los grupos vecinos por las discusiones y por colaborar con este proyecto. Gracias a mis amigos de la facultad y a mis amigas de Luján por poder contar con ellos siempre. A mi familia, gracias por estar todos los días y seguir bancándome en todas.

Caracterización de distintas fuentes de AMP cíclico involucradas en los mecanismos de señalización del GPCR CRHR1

Los receptores acoplados a proteína G (GPCRs) son los mediadores de las respuestas celulares a una gran cantidad de estímulos, así como también el blanco de muchas drogas terapéuticas. El rol clásico de los GPCRs es acoplar la unión de ligandos a la activación de proteínas G heterotriméricas, que a su vez regulan a múltiples proteínas efectoras. Recientemente se ha demostrado que los modos de señalización de los GPCR son mucho más complejos, involucrando también mecanismos independientes de proteínas G y señalización dependiente de la internalización del receptor.

La hormona liberadora de corticotropina (CRH) ejerce un rol clave en la respuesta integrada al estrés. Además de regular la activación del eje hipotálamo-pituitario-adrenal (HPA), CRH está ampliamente distribuida en el sistema nervioso central, donde funciona como un neuromodulador, integrando aspectos comportamentales y afectivos de la respuesta a estrés. Se ha demostrado que la desregulación de la acción de CRH a través de su receptor de alta afinidad, CRHR1, se encuentra involucrada en el desarrollo de estadios patológicos asociados al estrés como ansiedad y depresión.

CRHR1 es un GPCR de clase B, que al activarse principalmente se acopla a proteína Gs y lleva a un aumento del segundo mensajero AMP cíclico (cAMP) y la activación de múltiples vías de señalización. Es de particular interés la fosforilación de la MAPK ERK1/2, que induce la transcripción de *Pomc* para activar el eje HPA en corticotrofos, y se dispara en estructuras del cerebro asociadas a aspectos comportamentales de la respuesta a estrés frente a la estimulación con CRH.

Habíamos descripto previamente que CRHR1 activa mecanismos de señalización dependientes de proteína G y otros dependientes de la endocitosis del receptor. Estos dos componentes de respuesta pueden evidenciarse como dos fases diferentes de activación de ERK1/2 en la línea celular hipocampal murina HT22 transfectada establemente con CRHR1 (HT22-CRHR1). En este trabajo, nos focalizamos en la respuesta de cAMP mediada por CRHR1, utilizando métodos clásicos de biología molecular en combinación con biosensores basados en la transferencia de energía resonante de Förster (FRET) para estudiar por visualización dinámica de célula única los mecanismos de señalización de CRH.

En primer lugar demostramos que al estimular CRHR1, el aumento en los niveles de cAMP no sólo está mediado por las adenilil ciclasas transmembrana (tmACs) sino también por una

adenilil ciclasa soluble (sAC) en las células HT22-CRHR1. sAC es una fuente atípica de cAMP ya que es insensible a proteína G y es regulada por calcio y bicarbonato. Además, se ha reportado que sAC está presente en distintas localizaciones subcelulares, formando microdominios de señalización. La respuesta de cAMP a CRH también se encontró mediada tanto por tmAC como por sAC en la línea celular derivada de corticotrofos AtT20, pero no así en las células 3T3L1-CRHR1. Sin embargo, observamos que tanto en células HT22-CRHR1 como en AtT20, sAC no participa en la señalización de otros ligandos de GPCRs, como isoproterenol o PACAP38, respectivamente. Estos resultados indican que el rol de sAC en la transducción de señales de un GPCR depende del contexto celular y del receptor involucrado. La estimulación con CRH genera un aumento en los niveles de calcio intracelular, y al bloquear la respuesta de calcio se observó un patrón de cAMP y ERK1/2 en respuesta a CRH similar al que se obtiene al bloquear sAC. Esto sugiere que calcio es el activador de sAC río abajo de CRHR1.

Luego, nos propusimos caracterizar si ambas fuentes de cAMP contribuyen a un *pool* común de cAMP o si pueden identificarse roles particulares para cada adenilil ciclasa en la respuesta. Observamos que tanto tmACs como sAC participan en la fase aguda de activación de ERK1/2, pero que en la fase sostenida de fosfo-ERK1/2, dependiente de la internalización de CRHR1, sólo sAC está involucrada. Más aún, demostramos que el CRHR1 continúa generando cAMP desde estaciones endocíticas, y que es sAC la responsable de esta producción una vez internalizado CRHR1.

En conclusión, a través de la caracterización de los mecanismos moleculares activados por CRHR1, se hallaron nuevas evidencias que refuerzan el modelo emergente de señalización por GPCR en el que la respuesta de cAMP no ocurre exclusivamente a nivel de la membrana plasmática y donde sAC representa una fuente alternativa de cAMP regulada por GPCRs.

Palabras clave: CRH, GPCR, AMP cíclico, adenilil ciclasa soluble, señalización desde endosomas

Characterization of different cyclic AMP sources involved in the signaling mechanisms of the GPCR CRHR1

G protein-coupled receptors (GPCRs) are the mediators of cellular responses to a wide variety of stimuli, as well as the target of many therapeutic drugs. The classical role of GPCRs is to couple the binding of ligands to the activation of specific heterotrimeric G proteins, leading to the regulation of downstream effector proteins. Recently, it has been demonstrated that GPCR signaling is much more complex, including G protein-independent mechanisms and receptor internalization dependent signaling.

Corticotropin-releasing hormone (CRH) plays a critical role in the integrated stress response. Besides being the driver of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis, CRH is widely distributed in the central nervous system, where it functions as a neuromodulator, integrating affective and behavioral aspects of the stress response. It has been demonstrated that the dysregulation of CRH action through its high-affinity type 1 receptor (CRHR1) is crucial in the pathogenesis of stress-related affective disorders.

CRHR1 is a class B GPCR that, upon ligand activation, signals mainly by G_s coupling, leading to the increase of the second messenger cyclic AMP (cAMP) and the activation of multiple signaling cascades. Of particular interest is the phosphorylation of the MAPK ERK1/2, which is involved in the induction of *Pomc* transcription to activate the HPA axis in pituitary corticotrophs, and that is activated in specific brain structures related to behavioral aspects of the stress response upon CRH stimulation.

We have previously described that CRHR1 activates G protein-dependent and receptor endocytosis-dependent mechanisms. These two components of the response can be evidenced as two distinct phases of ERK1/2 activation in the mouse hippocampal cell HT22 stably transfected with CRHR1 (HT22-CRHR1). In this work, we focused on the cAMP response of CRHR1, using classical cell biology tools in combination with Förster resonance energy transfer (FRET)-based biosensors, to study CRH signaling mechanisms at the single cell level by live imaging.

First, we demonstrated that upon CRHR1 stimulation, cAMP level increase is not only mediated by transmembrane adenylyl cyclases (tmACs), but also by a soluble adenylyl cyclase (sAC) in HT22-CRHR1 cells. sAC is an atypical cAMP source, insensitive to G protein but regulated by bicarbonate and calcium. In addition, it has been reported that sAC is localized in different intracellular locations, generating particular signaling microdomains. cAMP response to CRH

was also found mediated by both tmACs and sAC in the corticotroph-derived cell line AtT20, but sAC was not involved in the response in 3T3L1-CRHR1 cells. However, we determined that in HT22-CRHR1 cells as well as AtT20 cells, sAC does not participate in the signaling pathway of other GPCR ligands such as isoproterenol or PACAP38, respectively. These results indicate that the role of sAC in the signal transduction of a GPCR depends on the cellular context and the receptor involved. CRH stimulation leads to a rise in intracellular calcium levels, and when the calcium response is blocked the cAMP and ERK1/2 pattern in response to CRH is similar to the one observed when sAC is blocked. This suggests that calcium is the activator of sAC downstream CRHR1.

Then, we aimed to characterize if both cAMP sources contribute to a common cAMP pool or if particular roles for each type of adenylyl cyclase may be identified in the response. We observed that both tmACs and sAC participate in the acute activation of ERK1/2, but in the sustained phospho-ERK1/2 phase only sAC is involved. Moreover, we demonstrated that CRHR1 continues to generate cAMP from endocytic stations, and that sAC is the enzyme responsible for this production once CRHR1 is internalized.

In conclusion, by characterizing the molecular mechanisms activated by CRHR1, we found new evidences that strengthen the emerging model of GPCR signaling in which the cAMP response does not occur exclusively at the plasma membrane and introducing the notion of sAC as an alternative source of cAMP.

Keywords: CRH, GPCR, cyclic AMP, soluble adenylyl cyclase, endosome-based signaling

Tabla de contenidos

Introducción	12
La señalización celular a través de los GPCRs	13
Mecanismo de activación de los GPCRs	14
Señalización no canónica: rol de las proteínas β -arrestinas	15
Señalización sostenida mediante GPCRs	16
Mecanismos involucrados en la señalización prolongada de GPCRs	18
La endocitosis como reguladora de los procesos celulares	20
El cAMP como segundo mensajero	23
La generación de cAMP por adenilil ciclasas	24
Adenilil ciclasas transmembrana	24
Adenilil ciclasa soluble	24
Microdominios de señalización	26
Métodos para medir cAMP	27
Mecanismos de señalización activados por cAMP	28
Activación de ERK1/2	28
Regulación transcripcional CREB	30
Proliferación y diferenciación	32
CRH y la respuesta a estrés	33
CRH y su familia de péptidos relacionados	34
Receptores de CRH	35
CRHR1 pertenece a la subfamilia de GPCRs de clase B	36
Fisiología de CRH	37
El eje hipotálamo-hipófisis-adrenal	37
Circuitos extrahipotalámicos	38
Rol de CRH en desórdenes psiquiátricos asociados a estrés	40
Mecanismos de transducción de señales activados por CRH	41
Señalización en corticorofos	43
Señalización en el SNC	43
Objetivos	47
Materiales y métodos	48
1 Líneas celulares	49
1.1 Mantenimiento de las líneas celulares en cultivo	50
2 Transfecciones transitorias de líneas celulares	50

2.1	Transfección de DNA.....	50
2.2	Transfección de siRNA	51
3	Cultivos primarios neuronales.....	52
3.1	Animales	52
3.2	Preparación y mantenimiento de cultivos primarios de hipocampo y corteza	53
3.3	Transfección con DNA de cultivos primarios	53
4	Detección de mRNAs por hibridación <i>in situ</i>	53
4.1	Secciones de cerebro	53
4.2	Hibridación <i>in situ</i> (ISH)	54
5	Estímulos y agentes farmacológicos	54
5.1	Agentes farmacológicos.....	55
6	Western blot.....	57
6.1	Preparación de los extractos celulares	57
6.2	Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE), electrotransferencia y revelado.....	57
6.3	Anticuerpos utilizados	58
7	Manejo de plásmidos	59
7.1	Clonados.....	61
7.1.1	Sensores de FRET.....	61
7.1.2	sAC-HA	61
7.1.3	Sondas para hibridación <i>in situ</i> de sAC	62
7.2	Preparación de bacterias competentes	63
7.3	Transformación bacteriana y aislamiento de plásmidos	63
7.4	Preparación de plásmidos a pequeña escala (mini-preparaciones)	64
7.5	Análisis de plásmidos por enzimas de restricción	64
7.6	Preparación de plásmidos a gran escala (maxi/mega-preparaciones).....	64
8	RNA, transcripción reversa y PCR.....	65
8.1	Purificación de RNA	65
8.2	Transcripción reversa	65
8.3	PCR de punto final	66
8.4	PCR en tiempo real o cuantitativa.....	66
8.5	<i>Primers</i> utilizados.....	67
9	Ensayos de Actividad Luciferasa	68
9.1	Preparación de extractos celulares.....	68
9.2	Determinación de la actividad luciferasa.....	68
9.3	Determinación de la actividad β -galactosidasa	68

10	FRET espectral para la determinación de cAMP y medición en simultáneo de cAMP y calcio	68
11	Determinación bioquímica de cAMP	70
12	Medición de calcio por indicadores fluorescentes	70
13	Análisis de la endocitosis de CRHR1 mediante citometría de flujo	71
14	Microscopía confocal y análisis de la localización subcelular de GFP-CRHR1	71
15	Análisis de los cambios morfológicos.....	72
16	Ensayo de migración por cierre de la herida	73
17	Ensayo de proliferación con cristal violeta	73
18	Ensayo de apoptosis	74
19	Análisis de la progresión del ciclo celular.....	74
20	Identificación de interactores de sAC	74
20.1	Optimización de la inmunoprecipitación de sAC ₁ -HA.....	74
20.2	Ensayos de Inmunoprecipitación de sAC ₁ -HA para identificación proteómica	75
20.3	Análisis proteómico por LC-ESI-MS/MS.....	75
20.4	Asignación por búsquedas en bases de datos.....	76
21	Tratamiento estadístico de los datos.....	77
	Resultados	78
	La activación de CRHR1 induce la diferenciación de las células HT22-CRHR1	79
	CRH estimula la diferenciación de la línea celular HT22-CRHR1	80
	CRH no interfiere con la viabilidad celular sino que induce un arresto del ciclo celular	82
	El suero antagoniza la diferenciación dependiente de CRH en células HT22-CRHR1	84
	CRH genera una respuesta de cAMP sostenida en células hipocampales	87
	Establecimiento de un método para medir la respuesta de cAMP en tiempo real y a nivel de célula única	87
	Biosensores basados en FRET para monitorear la respuesta de cAMP	87
	Optimización del método para estudiar la señalización de cAMP/PKA por sensores de FRET.....	88
	Respuesta de cAMP a CRH en HT22-CRHR1	89
	CRH y UCN1 activan la vía de cAMP/PKA de forma similar	90
	La activación de CRHR1 genera una respuesta sostenida de cAMP en cultivos primarios neuronales	91
	Múltiples fuentes de cAMP están involucradas en la respuesta a CRH	93
	sAC se identificó en un estudio proteómico de las proteínas asociadas a B-Raf.....	93

Expresión de sAC en el cerebro y distintas líneas celulares	95
Estrategias experimentales para diferenciar el rol de tmACs y sAC	97
La sAC está involucrada en la respuesta de cAMP río abajo de CRHR1 en células HT22-CRHR1	97
tmACs y sAC están implicadas en la inducción transcripcional de <i>c-fos</i> mediada por CRH	102
¿Participan las tmACs y sAC en cascadas de señalización diferentes?	103
La señalización de CRHR1 en otros contextos celulares	106
sAC está involucrada en la señalización de CRH en células AtT20	106
En la línea 3T3L1-CRHR1, sAC no participa de la respuesta de cAMP en la señalización de CRH .	109
Los efectores del cAMP generado por sAC	112
Tanto tmACs como sAC señalizan a través de PKA en respuesta a CRH en células HT22-CRHR1	112
Las proteínas EPACs están involucradas en ambas fases de activación de ERK1/2 en células HT22-CRHR1	113
En las células AtT20 CRH señala a través de PKA y EPACs	115
Los moduladores de sAC también regulan la respuesta de cAMP dependiente de CRH	116
CRH estimula un aumento de los segundos mensajeros cAMP y calcio	116
La respuesta de calcio regula la señalización de CRH	118
El activador de sAC, bicarbonato, es crítico para la señalización de CRH	120
CRHR1 genera cAMP una vez internalizado a través de la actividad de sAC	122
La endocitosis de CRHR1 es rápida	122
CRHR1 continúa señalizando a través de cAMP una vez internalizado	125
La actividad de sAC es esencial para la generación de cAMP dependiente de la endocitosis de CRHR1	127
Interactoma de sAC en las células HT22-CRHR1	133
Discusión	138
Conclusiones	139
Diferenciación de las células HT22-CRHR1 estimulada por CRH como estrategia para explorar las vías de señalización	140
CRH y UCN1 generan respuestas similares en células HT22-CRHR1	140
La activación de CRHR1 promueve la diferenciación de células HT22-CRHR1	142
Vías de señalización activadas en la diferenciación de HT22-CRHR1	143
sAC como una fuente alternativa de cAMP	145
Expresión de sAC en el cerebro	145
Función de sAC en el cerebro	146
sAC y su rol río abajo de GPCRs	147
sAC en la intersección de dos segundos mensajeros, calcio y cAMP	148
Adenilil ciclasas como organizadoras de microdominios	151

Direcciones futuras	151
La activación de CRHR1 conduce a una señalización prolongada.....	152
La endocitosis de CRHR1 es rápida.....	152
cAMP desde endosomas: resolución espacial de cAMP a través de sAC	153
Funciones específicas de la señalización desde endosomas	155
Perspectivas	156
Bibliografía	159
Anexo	176

Introducción

La señalización celular a través de los GPCRs

Para mantener la homeostasis, las células tienen la capacidad de percibir cambios en el ambiente externo y los organismos pluricelulares además tienen mecanismos que permiten la comunicación entre células mediante señales específicas. Asimismo, es fundamental que las células puedan adaptarse rápidamente a cambios en el medio externo y, en consecuencia, responder. Muchas patologías caracterizadas por un control inadecuado de la señalización celular demuestran que estas respuestas son esenciales. Gran cantidad de procesos fisiológicos importantes están gobernados por activación de receptores, que a su vez, regulan múltiples vías de señalización de acción coordinada y específica. Todas las células tienen sistemas transmembrana que comparten dos elementos básicos: un receptor capaz de reconocer las señales extracelulares y un efector que puede generar una respuesta intracelular dependiente del receptor.

De particular importancia en esta función son los receptores acoplados a proteína G, conocidos como GPCRs por sus siglas en inglés (*G protein-coupled receptors*). Los GPCRs son la familia de proteínas más grande del proteoma humano, con más de 800 miembros (~4% del genoma Lagerstrom y Schioth, 2008). Son uno de los componentes esenciales de las células eucariotas, siendo responsables de reconocer y responder a una amplia variedad de estímulos extracelulares entre los que se encuentran la mayoría de los neurotransmisores, las hormonas peptídicas, moléculas pequeñas, iones, lípidos y estímulos sensoriales. La diversidad de roles que cumplen los GPCRs junto con la evidencia de condiciones patológicas relacionadas a la señalización alterada por GPCRs, refuerzan la importancia biológica y clínica de esta familia de receptores. Se estima que los GPCRs son el blanco del 30-40% de las drogas actualmente en el mercado (Drews, 2000; Hopkins y Groom, 2002; Kumari *et al.*, 2015). Por lo tanto, entender la estructura y función de los GPCRs es fundamental para comprender los mecanismos involucrados en la señalización celular así como también para los programas de desarrollo de drogas.

Los GPCRs comparten una arquitectura de siete segmentos transmembrana y su topología determina que el extremo amino-terminal se ubique hacia afuera y el extremo carboxi-terminal hacia adentro de la célula. De acuerdo a la homología de secuencia, la familia de GPCRs puede ser clasificada en cinco clases – rodopsina (clase A); secretina y adhesión (clase B); glutamato (clase C); y *frizzled/taste receptor 2* (TAS2)-. Los receptores de clase A son los más abundantes en la mayoría de los organismos (el 80% de los GPCRs en humanos, Fredriksson y Schioth, 2005) y también los más estudiados, siendo el receptor β 2-adrenérgico (β 2AR) el sistema modelo para el estudio de la estructura, farmacología y señalización de los GPCRs (Rasmussen *et al.*, 2007; Rosenbaum *et al.*, 2009).

Mecanismo de activación de los GPCRs

Los GPCRs son proteínas dinámicas que pueden visitar muchos estados conformacionales. Los ligandos capaces de activar a los GPCR los estabilizan en una conformación activa, capaz de interactuar con la proteína G heterotrimérica -el complejo $G\alpha$, $G\beta$ y $G\gamma$ - , que estabiliza al GPCR aún más en la conformación activa (Figura 1). El GPCR unido al ligando estimula el intercambio de nucleótido GDP por GTP en la proteína $G\alpha$, que cambia la conformación de la misma permitiendo la disociación del complejo. Las subunidades son capaces de interactuar con distintas proteínas efectoras que regulan la producción de moléculas que actúan como segundos mensajeros, entre los que se encuentran el AMP cíclico (del inglés, cAMP), el calcio y diacilglicerol, que a su vez regulan otros componentes moleculares de la cascada de transducción de señales. Cuando $G\alpha$ hidroliza GTP a GDP, se inactiva permitiendo la reasociación con el complejo $G\beta\gamma$ (Rosenbaum *et al.*, 2009).

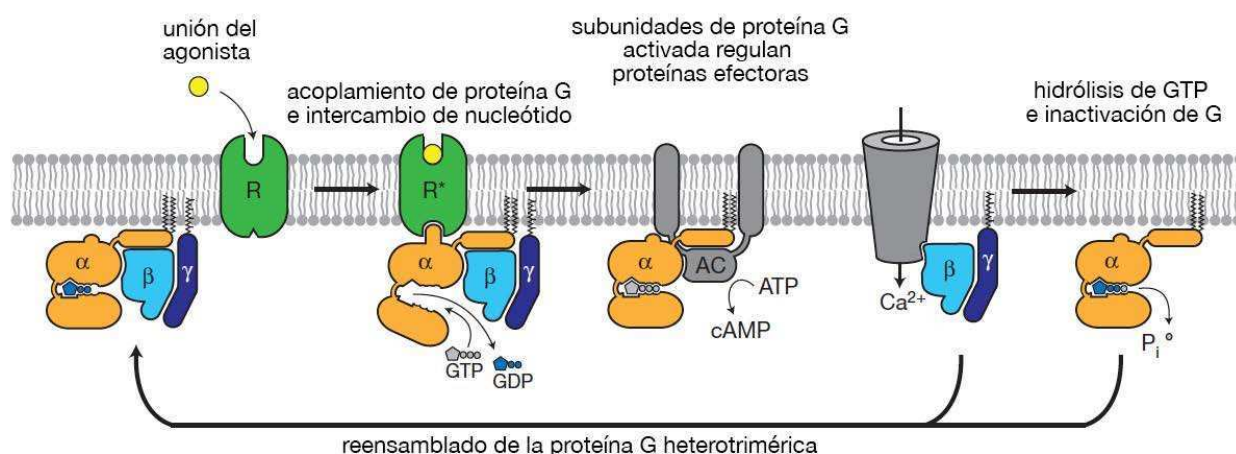


Figura 1 | Ciclo de activación de proteína G

La unión de un agonista extracelular al GPCR lleva a cambios conformacionales del receptor, permitiendo la unión de la proteína G heterotrimérica y el intercambio del nucleótido GDP por GTP, que favorece la disociación de la subunidad $G\alpha$ y el complejo $G\beta\gamma$. Las subunidades regulan las distintas proteínas efectoras. Luego de la hidrólisis de GTP a GDP en la subunidad $G\alpha$, el heterotrímico se reensambla, finalizando el ciclo de activación. Modificado de Rasmussen *et al.*, 2011.

La fosforilación de las colas citoplasmáticas del receptor, catalizada por las proteínas GRKs principalmente, favorece la unión de las proteínas β -arrestinas, que a su vez promueven la internalización del GPCR a los endosomas tempranos por un mecanismo dependiente de clatrina y dinamina (Moore *et al.*, 2007). La descripción de estos mecanismos llevó a establecer el concepto clásico de la endocitosis del GPCR como un mecanismo asociado a la desensibilización de la respuesta, ya que disminuye el número de receptores en la superficie

celular y se redistribuyen en compartimentos subcelulares donde se remueve el ligando. Una vez en los endosomas, los GPCR pueden reciclar rápidamente a la membrana plasmática, permitiendo la resensibilización, o ser transportados a lisosomas para su degradación.

Señalización no canónica: rol de las proteínas β -arrestinas

Dependiendo de la fuerza de la interacción entre el receptor y las β -arrestinas, los GPCRs suelen dividirse en dos clases: aquellos que tienen interacciones débiles, son internalizados transitoriamente y son reciclados a la membrana plasmática (por ejemplo, β 2AR, μ -opioide y los receptores de aminas), y una segunda clase que interacciona de forma más estable y tiene una internalización más sostenida en endosomas (por ejemplo, V2R y PTHR, Oakley *et al.*, 1999; Oakley *et al.*, 2000). La observación de que las β -arrestinas interaccionan con numerosos componentes de los mecanismos de señalización condujo a plantear la hipótesis de que los GPCRs pueden activar cascadas de fosforilación de forma independiente de las proteínas G, con las β -arrestinas actuando como adaptadores y andamiaje (*scaffold*) para la formación de complejos de señalización. Contribuciones de muchos grupos, especialmente del laboratorio de Lefkowitz, han demostrado que las proteínas MAP kinasas (MAPKs, del inglés *Mitogen Activated Protein Kinases*), como ERK1/2, pueden ser activadas por un mecanismo dependiente de las β -arrestinas que genera una fase tardía y más sostenida de señalización (Lefkowitz y Shenoy, 2005; Reiter *et al.*, 2012).

La localización subcelular de estos eventos ha sido menos clara. Hay evidencias de que las β -arrestinas activan a las vías tanto a nivel de la membrana plasmática (Terrillon y Bouvier, 2004) como en los endosomas (DeFea *et al.*, 2000a; DeFea *et al.*, 2000b; Tohgo *et al.*, 2002) sugiriendo que depende del tipo de receptor y de su interacción con las β -arrestinas. Aunque está establecido que las β -arrestinas son necesarias para la señalización sostenida ante la internalización, las β -arrestinas pueden actuar de forma opuesta a nivel de la membrana plasmática, habiendo ejemplos de receptores como el β 2AR en el que las β -arrestinas disminuyen la señalización desde la superficie celular, mientras que tienen un efecto estimulador para el PTHR (Wehbi *et al.*, 2013).

Las β -arrestinas interactúan con la cola carboxi-terminal fosforilada y con el *core* transmembrana del GPCR, siendo este sitio de unión también donde interactúa la proteína G. Por lo tanto, ha sido ampliamente considerado que las β -arrestinas estéricamente no permiten nuevos ciclos de activación de proteínas G (Shukla *et al.*, 2014; Szczepek *et al.*, 2014; Kang *et al.*, 2015), además de promover la unión de la maquinaria de endocitosis. Sin embargo, en trabajos recientes se ha progresado enormemente en el conocimiento de la función y estructura de las β -arrestinas y llevaron a cambiar cómo entendemos los mecanismos de señalización a

través de GPCRs (revisado en Pavlos y Friedman, 2016). Se ha establecido que, una vez que se disocian del receptor, las β -arrestinas permanecen en su conformación activa antes de regresar a su estado basal, sugiriendo la existencia de acciones independientes del receptor. Adicionalmente, se ha descrito que las β -arrestinas pueden dirigir la activación de las MAPK desde los hoyos de clatrina después de la disociación del GPCR activado, introduciendo el concepto de “activación a distancia”, además de la canónica “activación desde el complejo”. De esta manera se explica por ejemplo cómo ocurre la señalización vía β -arrestinas en GPCRs que interactúan poco con las β -arrestinas y casi no internalizan, como el β 1AR (Eichel *et al.*, 2016). Por otro lado, utilizando una versión modificada del receptor β 2AR, en que se reemplazó el extremo carboxi-terminal por el del V2R, que presenta una interacción más estable y duradera con las β -arrestinas, se observó que las β -arrestinas pueden unirse en una primera conformación tanto a la cola carboxi-terminal como al *core*, y luego sólo se une a la cola carboxi-terminal fosforilada, conformación que permite que el GPCR interactúe simultáneamente con la proteína Gs y las β -arrestinas en un “megaplex”, cuya arquitectura permite el intercambio GDP por GTP y la activación de la proteína G una vez internalizado el receptor (Thomsen *et al.*, 2016).

Señalización sostenida mediante GPCRs

Había sido asumido durante mucho tiempo que los GPCRs internalizados eran inactivos. Esta premisa fue construida a partir de evidencias experimentales y limitaciones técnicas. Se observó que el reclutamiento de las proteínas β -arrestina competía por el sitio de unión de la proteína G, terminando el ciclo. Además, las mediciones bioquímicas de los procesos dirigidos por los GPCR carecían de la resolución temporal y espacial necesaria para evidenciar aspectos que son consecuencia de la compartimentalización de los mecanismos. La introducción de sensores basados en la visualización permitieron estudiar en tiempo real y con mayor resolución los distintos estadios de los mecanismos de activación y tráfico de los GPCRs (ver más adelante). Utilizando estas estrategias experimentales, trabajos recientes han demostrado que los GPCRs internalizados permanecen activos y promueven una señalización prolongada (revisado en Irannejad y von Zastrow, 2014; Vilardaga *et al.*, 2014; Pavlos y Friedman, 2016).

La primera evidencia de señalización de GPCRs desde compartimientos intracelulares fue en levaduras, donde se identificó un complejo de señalización que incluye a la proteína $G\alpha$ y que media una fase tardía de señalización del GPCR Ste2p (Slessareva *et al.*, 2006). Estudios publicados en 2009 casi en simultáneo para los receptores de TSH (TSHR, Calebiro *et al.*, 2009) y PTH (PTHR, Ferrandon *et al.*, 2009) fueron las primeras evidencias de la existencia de señalización sostenida de GPCRs en células de mamíferos. Utilizando ratones transgénicos que expresan un biosensor basado en FRET para cAMP, Calebiro y colaboradores observaron que la

unión del ligando TSH en las células foliculares de la tiroides generaba una respuesta de cAMP prolongada y poco afectada por el lavado del ligando, solapada temporalmente con la endocitosis de TSHR. Se observó que TSHR internalizado colocalizaba con la proteína Gs y las adenilil ciclasas transmembrana (tmACs) en compartimientos endosomales (Calebiro *et al.*, 2009). En un trabajo posterior, el mismo grupo observó que la duración de la respuesta de cAMP excedía el tiempo necesario para la disociación el ligando y demostró que este mecanismo es dependiente del tipo celular (Werthmann *et al.*, 2012). Por otro lado, el grupo de Vilardaga utilizó sensores de FRET para cAMP en líneas celulares para estudiar los mecanismos moleculares responsables de la selectividad funcional de los ligandos endógenos de PTHR, PTH y el péptido relacionado PTHrP. Observaron que, aunque ambos ligandos aumentaban los niveles de cAMP intracelular, las cinéticas de las respuestas eran diferentes, observándose una respuesta sostenida para PTH mientras que la del PTHrP era más transitoria. Demostraron que la respuesta prolongada gatillada por PTH dependía de la internalización del receptor y hallaron que la proteína Gs y las tmACs co-localizan en endosomas. Estas observaciones fueron específicas para PTHR ya que no se observaron para β 2AR en las mismas células (Ferrandon *et al.*, 2009). En paralelo, otro estudio acerca del receptor de esfingosina S1P (S1PR1) extendió este nuevo modelo a la proteína G inhibitoria (Gi), ya que demostraron que la internalización del receptor y su tráfico por el trans-Golgi contribuían a la señalización dependiente de Gi mediada por la droga FTY720, agonista de S1PR1 (Mullershausen *et al.*, 2009).

Estos resultados fueron inesperados ya que no eran consistentes con el paradigma hasta entonces vigente de que el complejo GPCR-proteína G sólo era activo a nivel de la membrana plasmática. Así, estos trabajos sentaron las bases para construir un nuevo modelo donde la señalización del GPCR continúa una vez internalizado. Desde entonces ha sido reportado para otros GPCRs con distinto nivel de detalle mecanístico (Tabla 1). Es notable cómo en los últimos años se ha acumulado evidencia sobre la función de los endosomas promoviendo la señalización de los GPCRs, sugiriendo que es un mecanismo general más que una excepción, ya que se observa no sólo en ejemplos de GPCRs cuya respuesta es sostenida (PTHR, TSHR) si no también en casos en los que la respuesta es aguda (β 2AR, D2R).

Receptor	Ligando	Clase de GPCR	Proteína G	Referencia
PTHr	Hormona paratiroidea	B	Gs, Gq, Gi	(Ferrandon <i>et al.</i> , 2009; Feinstein <i>et al.</i> , 2011; Wehbi <i>et al.</i> , 2013; Gidon <i>et al.</i> , 2014)
TRHR	Hormona liberadora de tirotropina	A	Gs, Gq/11	(Calebire <i>et al.</i> , 2009; Werthmann <i>et al.</i> , 2012)
S1PR1	Esfingosina 1-fosfato	A	Gs, Gi/o	(Mullershausen <i>et al.</i> , 2009)
β 2AR	Isoproterenol	A	Gs	(Irannejad <i>et al.</i> , 2013; Tsvetanova y von Zastrow, 2014)
GLP1R	GIP (glucagon-like peptide)	B	Gs	(Kuna <i>et al.</i> , 2013)
PAC1	PACAP	B	Gs	(Merriam <i>et al.</i> , 2013)
V2R	Vasopresina	A	Gs	(Feinstein <i>et al.</i> , 2013)
D1R, D2R, D3R	Dopamina	A	Gs	(Kotowski <i>et al.</i> , 2011)

Tabla 1 | GPCRs en los que se ha observado señalización sostenida

Mecanismos involucrados en la señalización prolongada de GPCRs

El número creciente de GPCRs para los que se observa que la señalización es prolongada lleva a preguntarnos cuáles son los mecanismos involucrados en sostener y regular la activación de las vías de señalización una vez internalizados los receptores. La observación de que los niveles del segundo mensajero cAMP eran todavía elevados cuando el receptor ya había sido internalizado, llevó a proponer la hipótesis de que existía producción de cAMP desde complejos GPCR-ligando presentes en compartimientos endosomales. Experimentos demostrando la co-localización de la maquinaria de señalización en endosomas y las observaciones de que bloquear la endocitosis produce un efecto negativo en la duración de las respuestas fueron consistentes con esta idea (Feinstein *et al.*, 2011; Kotowski *et al.*, 2011; Feinstein *et al.*, 2013; Irannejad *et al.*, 2013).

Quizás el GPCR más estudiado sea el receptor β 2AR, que señala principalmente a través de Gs. Utilizando biosensores conformacionales basados en anticuerpos de dominio simple o

nanobodies, que reconocen de forma específica a la conformación activa de β 2AR o al intermediario catalítico libre de nucleótido de la proteína Gs, el grupo de Von Zastrow demostró de manera elegante que no sólo las formas activas del β 2AR o de Gs se encuentran a nivel de la membrana plasmática, sino también en endosomas tempranos una vez agregado el ligando. Estos resultados, en conjunto con la observación de una modesta pero significativa reducción en los niveles de cAMP al bloquear la endocitosis, sugieren que existen nuevos ciclos de activación de Gs y producción de cAMP desde endosomas (Irannejad *et al.*, 2013).

Sin embargo, es evidente que la mayor parte de los GPCRs para los que se tiene evidencia de la señalización sostenida son receptores de péptidos, que interactúan de manera más prolongada con las β -arrestinas. De los receptores clase B, el GPCR más estudiado es PTHR. Como todos los GPCRs, PTHR existe en distintas conformaciones estabilizadas por el tipo de ligando (agonista total, parcial o inverso) pero también por las proteínas de la cascada de señalización con las que interactúa. A través de aproximaciones farmacológicas y biofísicas se ha establecido que PTHR puede formar un complejo de elevada afinidad con PTH, aún en ausencia del acoplamiento a la proteína G, y que genera una respuesta sostenida mostrando ciclos de activación de Gs una vez internalizado. En contraste, PTHrP, el otro ligando nativo para PTHR que muestra una potencia similar en términos de ensayos de concentración-respuesta, forma complejos menos estables con el receptor y dependientes de proteína G, que se asemejan más al modelo canónico de señalización por GPCR, generando una respuesta más breve y a nivel de la membrana plasmática (Vilardaga *et al.*, 2014). Así, estos resultados sugieren que una conformación particular del receptor es necesaria para mantener la señalización una vez internalizado.

¿Cómo se regula la producción de cAMP desde endosomas? Es conocida la capacidad de las β -arrestinas de organizar complejos de señalización, como ha sido observado para la activación sostenida de ERK1/2. Trabajos del grupo de Vilardaga proponen un modelo de retroalimentación positiva, en el que la activación prolongada de ERK1/2 dependiente de β -arrestina inhibe a la fosfodiesterasa 4 (PDE4), llevando a una respuesta sostenida de cAMP (Feinstein *et al.*, 2011). Adicionalmente, se demostró la existencia del complejo ternario PTHR- β -arrestina-G $\beta\gamma$, que favorece la activación de Gs contribuyendo a la generación persistente de cAMP (Wehbi *et al.*, 2013). El efecto positivo de las β -arrestinas también ha sido reportado para la generación de cAMP dependiente del GPCR de clase A V2R (Gidon *et al.*, 2014). Estos resultados contribuyen a la construcción de un nuevo modelo de señalización donde las β -arrestinas actúan promoviendo (más que atenuando) los mecanismos de transducción de señales.

¿Qué mecanismos están involucrados en la finalización de la respuesta del GPCR desde endosomas? Trabajos recientes sugieren que son clave los mecanismos post-endocíticos que regulan el destino final del receptor (Irannejad y von Zastrow, 2014, Bowman *et al.*, 2016). Una vez endocitados, los receptores ingresan a una red elaborada y dinámica compuesta por diferentes compartimientos que maduran de endosomas tempranos a tardíos, caracterizados por el reclutamiento de distintas proteínas marcadoras y la acidificación del lumen. En general, los destinos posibles son la degradación a través de la vía lisosomal, el reciclado a la membrana plasmática o el transporte retrógrado a través de la red de trans-Golgi. La degradación produce una disminución del número de receptores mientras que los dos últimos procesos llevan a la resensibilización. En la determinación del destino final es crítico el ensamblaje de complejos en la superficie del endosoma. Estudios recientes para PTHR proponen que la terminación de la señalización a través de cAMP coincide con el desplazamiento de las β -arrestinas del complejo PTHR-PTH y el reclutamiento del retrómero, un componente de complejo multiproteico ASRT (siglas del inglés *actin-sorting nexin 27 (SNX)–retromer tubule*), que media el reciclado rápido a la membrana plasmática (Feinstein *et al.*, 2011). El rol clave del retrómero en la terminación de la señalización también fue descrito para V2R (Feinstein *et al.*, 2013). Además, se ha reportado que la acidificación del endosoma es necesaria para promover la disociación del complejo PTH-PTHR y la terminación de la señal, y que este proceso es regulado por una retroalimentación negativa en la que participan cAMP, PKA y la ATPasa vacuolar (Gidon *et al.*, 2014).

La endocitosis como reguladora de los procesos celulares

Más allá de que la endocitosis fue inicialmente descrita como un mecanismo celular sencillo para transportar moléculas desde la membrana plasmática, las evidencias acumuladas en los años recientes -difíciles de reconciliarse con esta visión tradicional- llevaron a la construcción de un nuevo paradigma de la endocitosis como un regulador maestro de la señalización celular (revisado en Sigismund *et al.*, 2012). Ya sea mediante la endocitosis constitutiva o la dependiente de ligando, una vez internalizados, los componentes de la membrana plasmática pueden ser reciclados o destinados a degradación. Como consecuencia de este proceso, la endocitosis constantemente remodela la composición de la superficie celular, permitiendo plasticidad en la respuesta al medio extracelular y el destino celular. El enorme impacto de la endocitosis en la homeostasis celular queda evidenciado por los múltiples mecanismos de internalización y la intrincada red intracelular de compartimientos membranosos que existen.

A Regulación de la señalización por endocitosis en la membrana plasmática

B Regulación de la señalización por las vías endocíticas

C Señalización desde endosomas

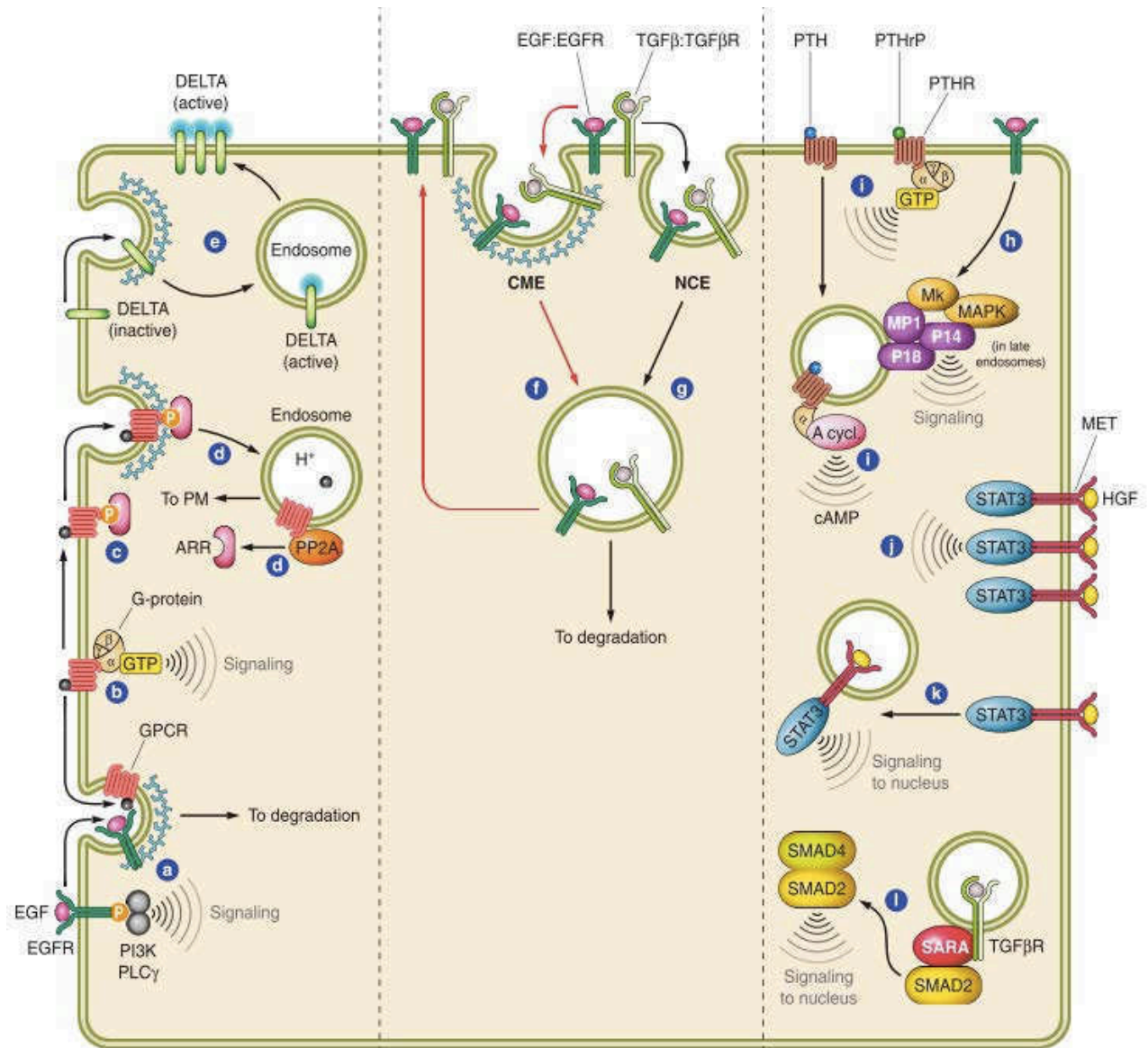


Figura 2 | La endocitosis controla la señalización a diferentes niveles

A. La endocitosis regula la señalización a nivel de la membrana plasmática. a, La endocitosis puede destinar los receptores a degradación, extinguiendo la señal. Aún en presencia de mecanismos de señalización desde endosomas, la endocitosis regula aquellos mecanismos que están restringidos a la formación de complejos exclusivamente en la membrana plasmática (b, c). Una vez internalizados, la acidificación de los endosomas provoca la disociación del ligando y la desfosforilación del receptor (d). Los mecanismos de reciclado permiten la reexposición del receptor a la superficie celular, y así, la resensibilización. El reciclado a regiones específicas de la membrana puede promover la señalización, así como también ciertas modificaciones postraduccionales en compartimentos endocíticos (e).

(continúa en la siguiente página)

B. Las distintas rutas endocíticas modulan la duración de la señal. Muchos receptores pueden ser internalizados por mecanismos dependientes (g, CME) o independientes de clatrina (f, NCE) y el destino del receptor a ser reciclado o ir a degradación depende del mecanismo de endocitosis.

C. Los endosomas actúan como plataformas de señalización. Las membranas de los endosomas tienen propiedades bioquímicas diferentes que pueden prolongar señales originadas en la membrana plasmática o generar una señal nueva y específica. Un ejemplo es la activación de ERK1/2 desde los adaptadores presentes en endosomas (h, ilustrado para receptores tirosina kinasa (RTKs), también para GPCRs con las β -arrestinas). Para el caso del GPCR PTHR se han descrito conformaciones diferentes del receptor asociadas a distintos ligandos y distinta residencia en endosomas (i). Los endosomas también pueden funcionar como estaciones intermedias para la propagación de la señal al núcleo, por ejemplo EGFR activado promueve la translocación de APPL1 al núcleo (no se muestra), o el factor de transcripción STAT3 activado por HGF (glucagón) (j, k) puede ser traslocado al núcleo mediante endosomas (k). Hay creciente evidencia de la especificidad de la señal desde endosomas, ejemplificado por la activación de SMAD2 dependiente de TGF β R mediada por el adaptador de endosomas SARA (l).

Tomado de Sigismund *et al.*, 2012.

Es indudable que la endocitosis es un mecanismo fundamental para la atenuación de las señales a largo plazo. Sin embargo, el trabajo de los últimos años lleva a proponer una relación mucho más compleja con los sistemas de transducción de señales, siendo un mecanismo que permite a la célula procesar las señales con cinéticas precisas y en sitios de acción definidos espacialmente, haciendo posible un ajuste fino de las respuestas biológicas (Figura 2). La endocitosis regula la señalización a nivel de la membrana plasmática y modula qué rutas intracelulares sigue el cargo una vez internalizado. Más aún, la evidencia creciente de que la señalización no ocurre exclusivamente en la membrana plasmática sino también en estaciones endocíticas revolucionó nuestra comprensión del proceso (Irannejad y von Zastrow, 2014). El concepto de señalización desde endosomas no se restringe a los GPCRs: que la endocitosis del receptor tirosina kinasa (RTK) EGFR era necesaria al menos para ciertas vías de señalización fue inicialmente propuesto por el laboratorio de Bergeron (Di Guglielmo *et al.*, 1994). Hoy, la relación bidireccional entre endocitosis y señalización parece ser un mecanismo general de distintas cascadas bioquímicas (Figura 2).

El cAMP como segundo mensajero

Earl Sutherland y Ted Rall descubrieron la molécula adenosina 3', 5'-monofosfato (comúnmente llamada cAMP) en 1958 por su rol mediando los efectos de epinefrina en la glicogenólisis (Berthet *et al.*, 1957; Sutherland y Rall, 1958). En los años siguientes se describió la actividad enzimática responsable de convertir ATP en cAMP (adenilil ciclasa, Sutherland *et al.*, 1962), así como su degradación (fosfodiesterasa, Butcher y Sutherland, 1962). Se estableció que estas actividades estaban ampliamente distribuidas y que mediaban la acción de múltiples hormonas (Murad *et al.*, 1962). A partir de estos resultados, se propuso al cAMP como un “segundo mensajero” en las acciones de las hormonas, siendo las hormonas los primeros mensajeros (Sutherland *et al.*, 1965; Sutherland y Robison, 1966, Figura 3).

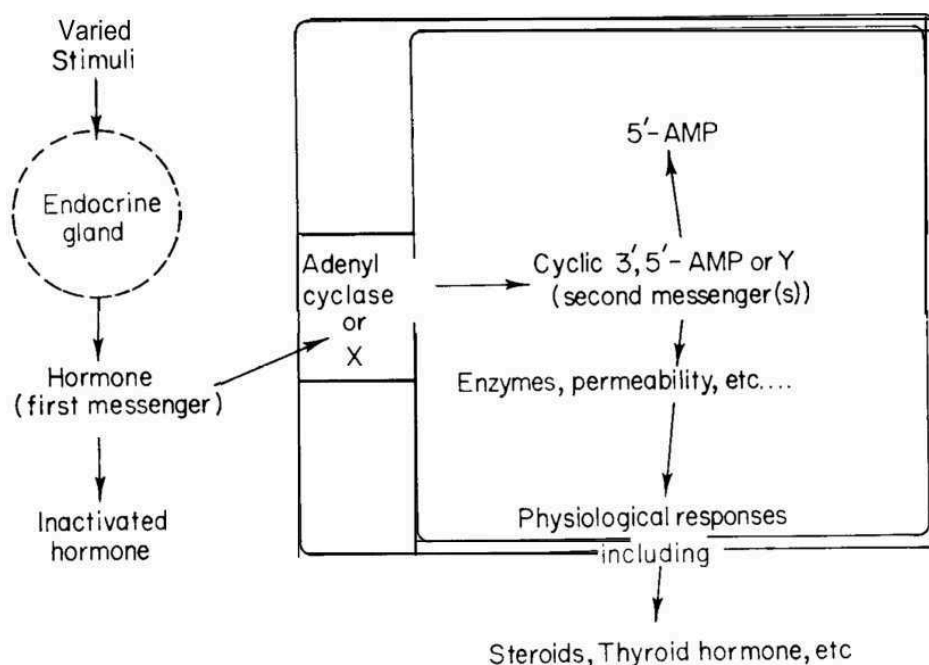


Figura 3 | Esquema tomado de Sutherland y Robison, 1966, para ilustrar el concepto de “segundo mensajero” propuesto para la función del cAMP en la vía de señalización de las hormonas por el grupo de Sutherland.

El entusiasmo respecto a la existencia de los segundos mensajeros deriva de la gran cantidad de procesos fisiológicos que regulan: son pocos los mecanismos en eucariotas no afectados por el cAMP. El primer efector de cAMP identificado fue la proteína kinasa A (PKA, Walsh *et al.*, 1968) una holoenzima formada por dos subunidades regulatorias que unen cAMP y dos subunidades catalíticas que fosforilan proteínas blanco en residuos serina y treonina. Mucho más recientemente se describieron los canales iónicos regulados por nucleótidos (CNGs, Fesenko *et al.*, 1985; Kaupp y Seifert, 2002) que se abren al unir cAMP o cGMP, y los intercambiadores de nucleótidos activados por cAMP (EPACs, de Rooij *et al.*, 1998; Kawasaki *et al.*, 1998) que al unir cAMP, catalizan el intercambio de GDP por GTP, y así la activación de

las proteínas G pequeñas Rap1 y Rap2. Siendo tantos los procesos regulados a través de sólo tres mediadores inevitablemente surge preguntarse cómo es posible que se logre un control selectivo y fino vía cAMP.

La generación de cAMP por adenilil ciclasas

Adenilil ciclasas transmembrana

Una respuesta parcial al interrogante de la especificidad de cAMP recae en la existencia de las múltiples enzimas adenilil ciclasas (AC), con diferente regulación y patrones de expresión. AC específicas han sido implicadas en procesos como secreción de insulina, memoria y aprendizaje, respuestas inmunológicas, etc. En mamíferos existen nueve adenilil ciclasas transmembrana (denominadas AC1-AC9 o tmACs por sus siglas en inglés) que están muy conservadas estructuralmente. Están formadas por un extremo amino-terminal variable, seguido por un dominio de 6 hélices transmembrana, un dominio catalítico C1, otro dominio de 6 hélices transmembrana y el dominio catalítico C2 hacia el carboxi-terminal. Sin embargo, presentan variaciones fuera de sus dos dominios transmembrana y catalíticos, lo que les confiere propiedades individuales. Las tmACs pueden ser moduladas por proteínas G (Gs, Gi, Gβγ) y muchos otros componentes (Tabla 2), y de esta manera pueden computar las actividades de muchas vías de señalización diferentes.

Adenilil ciclase soluble

Una fuente adicional de cAMP es la adenilil ciclase soluble (AC10 o sAC por sus siglas en inglés), descrita por primera vez en 1975 (Braun y Dods, 1975) aunque su estructura, regulación bioquímica y función fisiológica no se dilucidaron hasta que fue clonada en 1999 (Buck *et al.*, 1999). Hay un único gen para sAC que codifica para una proteína de 187 kDa, sin dominios transmembrana y con dos dominios catalíticos (C1 y C2) que presentan una conservación evolutiva mayor que las tmACs (Chen *et al.*, 2000). Se han identificado distintas variantes de sAC y se ha propuesto que son producto del uso de varios promotores y variantes de *splicing* alternativo (Jaiswal y Conti, 2001; Farrell *et al.*, 2008). Sin embargo, la validación de la existencia de las distintas variantes de sAC ha sido difícil por la falta de anticuerpos que las detecten de forma robusta en tejidos a excepción de testículo. Desde su purificación inicial en testículo, se observó una proteína de 48 kDa más activa que la variante de largo total (*full-length* o sAC_n, Gordeladze *et al.*, 1981; Gordeladze y Hansson, 1981), que más tarde se llamó sAC troncada (sAC_t). Esta isoforma podría generarse por proteólisis post-traducciona l o a partir de mRNAs generados por *splicing* alternativo que han sido clonados (Buck *et al.*, 1999; Jaiswal

y Conti, 2001). sAC_t está constituida casi exclusivamente por C1 y C2 y carece de una región regulatoria presente en el extremo amino-terminal.

Regulador		Adenilil ciclasa	Efecto
Proteína G	Gs	todas las tmACs	Estimulación
	Gi	AC1, AC3, AC5, AC6, AC8, AC9	Inhibición
	Gβγ	AC2, AC4	Estimulación
AC1, AC8		Inhibición	
Forskolina		tmACs excepto AC9	Estimulación
Kinasas	CaMKII	AC3	Inhibición
	CaMKIV	AC1	Inhibición
	PKA	AC5, AC6, AC8	Inhibición
	PKC	AC2, AC4, AC5, AC6, AC7	Estimulación
		AC6, AC9	Inhibición
Receptor tirosina kinasa	AC1, AC5, AC6	Estimulación	
RGS (<i>regulator of G-protein signaling</i>)		AC3, AC5, AC6	Inhibición
Calcio		AC1, AC8 (vía CaM)	Estimulación
		sAC (directamente)	Estimulación
		AC9 (vía calcineurina), AC5, AC6	Inhibición
Bicarbonato		sAC	Estimulación

Tabla 2 | Efecto de los distintos moduladores sobre la actividad de las AC (construido a partir de Cooper, 2003; Willoughby y Cooper, 2007).

sAC se ha encontrado distribuida en el citoplasma, pero también asociada a dominios de membrana (Zippin *et al.*, 2003), dentro del núcleo (Zippin *et al.*, 2004; Mardones *et al.*, 2008; Zippin *et al.*, 2010) y de la mitocondria (Acin-Perez *et al.*, 2009; Kumar *et al.*, 2009)

constituyendo microdominios de señalización caracterizados funcionalmente (revisado en Kamenetsky *et al.*, 2006).

La actividad de la sAC no es sensible a la acción de proteínas G heterotriméricas si no que es regulada por calcio, necesario para su actividad catalítica dado que aumenta su afinidad por el sustrato ATP-Mg²⁺, y por bicarbonato, que aumenta la tasa catalítica favoreciendo el intercambio entre productos y sustrato (Litvin *et al.*, 2003; Steegborn *et al.*, 2005; Kleinboelting *et al.*, 2014). Para sAC no se han identificado proteínas regulatorias o modificaciones post-traduccionales, pero existen evidencias de regulación intramolecular por el dominio amino-terminal (Kamenetsky *et al.*, 2006; Tresguerres *et al.*, 2011). Los mayores niveles de expresión se encuentran en testículo (Kornblihtt *et al.*, 1981; Buck *et al.*, 1999), donde juega un rol clave en la capacitación espermática, pero actualmente se considera que se expresa de forma ubicua en todos los tejidos (Stiles *et al.*, 2014), ya que fue encontrada en todos aquellos en donde fue examinado (Chen *et al.*, 2000; Farrell *et al.*, 2008). Sin embargo, determinar el rol de sAC en aquellos tejidos donde los niveles de expresión son bajos ha sido una dificultad experimental.

Microdominios de señalización

La hipótesis de microdominios de señalización, propuesta hace más de 30 años (Buxton y Brunton, 1983), considera la existencia de microambientes a nivel subcelular de regulación independiente. La identificación de la existencia de las fosfodiesterasas (PDEs, por sus siglas en inglés), enzimas que hidrolizan cAMP a 5'AMP y que actúan como barreras para la difusión y la comunicación cruzada entre microdominios (Calebiro *et al.*, 2010; Houslay, 2010), la descripción de la organización de complejos de señalización mediante proteínas de andamiaje y las nuevas metodologías que permiten estudiar la dinámica de cAMP con mayor resolución (ver más adelante) contribuyeron a adoptar este modelo de compartimentalización.

La existencia de microdominios ha sido demostrada a través del uso de sensores dirigidos a estructuras subcelulares o acoplados a efectores específicos (Bacskai *et al.*, 1993; Rich *et al.*, 2000; Zaccolo y Pozzan, 2002; DiPilato *et al.*, 2004). Quizás los trabajos más ilustrativos son los del laboratorio de Cooper, en los que acoplaron un sensor de cAMP a distintas adenilil ciclasas, revelando que, frente a un estímulo fisiológico, existen diferencias locales en las señales a distintas ACs. La movilización de calcio en respuesta a la hormona TRH genera un aumento de cAMP local dependiente de AC8, pero el cAMP a nivel global disminuye por la inhibición de AC5 y AC6, y la estimulación de PDE4. En contrast,e VIP genera un aumento global de cAMP en las mismas células dependiente de la proteína Gs y catalizado por AC5 y AC6, aunque AC8 casi no se activa frente a este estímulo (Wachten *et al.*, 2010).

La regulación de las ACs ejercida por el calcio es otro ejemplo paradigmático. Ha sido observado que, mientras que aumentos fisiológicos en la concentración intracelular de calcio modulan la actividad de distintas ACs, esas mismas enzimas no son afectadas cuando se incrementa el calcio de forma experimental usando ionóforos. Además, las ACs responden mejor a los cambios rápidos en calcio mediados por canales dependientes de voltaje en células excitables que a otras formas de entrada de calcio. Es posible que sea necesario que los incrementos de calcio sean en el dominio de las ACs (Tadross *et al.*, 2008; Willoughby *et al.*, 2012) y que sea crítica la tasa de aumento de calcio más que los niveles absolutos (Alvarez *et al.*, 2012).

Las ACs parecen ser eje fundamental de los microdominios de señalización, no sólo como productoras de cAMP sino también como plataformas de organización de complejos (para revisión, Cooper y Tabbasum, 2014). Se han descrito muchos interactores de las ACs que incluyen tanto proteínas blanco de cAMP como reguladores de la actividad de las ACs. Las más representadas son las proteínas de anclaje de la PKA (AKAPs por *A-kinase anchoring proteins*), que localizan a la PKA en sitios específicos dentro de la célula (Beene y Scott, 2007; Carnegie *et al.*, 2009; Dessauer, 2009). Estos complejos proteicos son dinámicos y específicos del contexto y el tipo celular.

Métodos para medir cAMP

El reconocimiento inicial de los segundos mensajeros como reguladores de gran cantidad de procesos celulares fue acompañado por el desafío experimental de cómo medir cAMP. En retrospectiva, múltiples conceptos instalados en el campo reflejaron las metodologías utilizadas (Beavo y Brunton, 2002). Los primeros estudios se focalizaron en cambios de estado estacionario de cAMP que regulan procesos metabólicos lentos. El ensayo inicial desarrollado por Sutherland, que dependía de la capacidad del cAMP de activar a la glucógeno fosforilasa a partir de un homogenato de hígado, fue el único disponible por más de 10 años. El desarrollo en 1970 de ensayos competitivos (un radioinmunoensayo, Steiner *et al.*, 1970 y otro de competencia de ^3H -cAMP por PKA, Gilman, 1970) hicieron mucho más accesible y reproducible la determinación de cAMP.

Los métodos tradicionales miden el cAMP producido por una muestra estática de gran cantidad de células en pocos puntos temporales, y han limitado experimental y conceptualmente la investigación en el rol celular de cAMP por no contar con la suficiente resolución espacial y temporal (Willoughby y Cooper, 2008). El concepto de compartimentalización, aunque inicialmente propuesto para cAMP, fue demostrado primero para el calcio aprovechando la disponibilidad de indicadores fluorescentes sensibles a calcio de gran afinidad (Tsien *et al.*,

1982), que revelaron cambios dinámicos y locales a nivel subcelular (Bootman y Berridge, 1995; Petersen *et al.*, 2005)

El soporte experimental a las hipótesis de microdominios para cAMP necesitó el desarrollo de sensores que permitieran monitorear al cAMP en tiempo real y a nivel celular. A partir de los esfuerzos experimentales de hacer *patching* de CNGs individuales (Kramer, 1990) o la microinyección de las subunidades de PKA marcadas con fluoróforos (Adams *et al.*, 1991), en los años siguientes se desarrollaron una gran cantidad de sensores genéticos que proveen mayor información espacial y temporal para el estudio de la dinámica de cAMP. Los sensores disponibles están basados en blancos de cAMP, incluyendo PKA, CNGs y EPACs, generalmente marcados con moléculas fluorescentes que permiten usar el fenómeno de transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET) o de transferencia de energía de resonancia de bioluminiscencia (BRET), mientras que otros basados en los CNGs utilizan métodos electrofisiológicos o indicadores de calcio para determinar cambios en los niveles de cAMP (para revisión, Willoughby y Cooper, 2008). Existe un continuo mejoramiento de sensores originales que generó biosensores de cAMP con mayor sensibilidad, rango dinámico y resolución espacio-temporal, siendo especialmente notables los avances en las sondas unimoleculares basadas en EPACs, que son hoy las más utilizadas. Frente a la gran cantidad de sensores con los que se cuenta actualmente, la elección del método depende de la pregunta que se desea abordar y el equipamiento disponible, ya que cada método presenta ventajas y desventajas a considerar.

Mecanismos de señalización activados por cAMP

La estimulación de los GPCRs acoplados a proteína Gs es el evento de señalización mejor caracterizado que lleva a un aumento intracelular de cAMP a través de la activación de tmACs. Desde su descubrimiento, se ha relacionado el cAMP con la regulación de las vías metabólicas ejercidas por hormonas, teniendo la PKA un rol protagónico. La evidencia acumulada durante décadas, hoy le otorga al cAMP un rol central en la biología celular ya que regula una gran cantidad de procesos por múltiples vías. Se describen a continuación algunas de las vías reguladas por cAMP de principal importancia en el contexto de esta Tesis.

Activación de ERK1/2

Teniendo en cuenta que se ha identificado un papel fundamental para las proteínas MAPK en el control de procesos como crecimiento, proliferación y diferenciación, y que se ha descrito que el cAMP también cumple un rol crítico en estos procesos, se ha estudiado la regulación de las MAPK ejercida por cAMP (Pearson *et al.*, 2001).

Las MAPKs fueron descubiertas a principios de la década del 80 como kinasas estimuladas por mitógenos capaces de fosforilar proteínas blanco en el motivo consenso mínimo Ser/Thr-Pro con preferencia en Pro en la posición -2 (Gonzalez *et al.*, 1991; Songyang *et al.*, 1996). Las MAPKs son activadas directamente por fosforilación, siendo necesaria la fosforilación dual de una tirosina y una treonina para activar la enzima (Lawrence *et al.*, 2008). Las vías de MAPK se componen de tres niveles de kinasas, en el que el módulo de MAPK se activa después de su fosforilación por una proteína kinasa kinasa activada por mitógenos (MAPKK), que a su vez es activada, por fosforilación, por una MAPKKK. Que la vía sea una cascada de fosforilación secuencial le otorga capacidad de amplificación de la señal inicial y una mayor integración con otras vías de señalización.

Hasta la fecha se han caracterizado seis diferentes grupos de MAPKs en mamíferos (Dhillon *et al.*, 2007) siendo ERK1 y ERK2 (del inglés por *extracellular signal-regulated kinases*) las más estudiadas (Rubinfeld y Seger, 2005). ERK1 y ERK2 son proteínas de 44 y 42 kDa respectivamente que comparten un 84% de identidad de secuencia. El módulo de señalización está constituido por Raf (A-Raf, B-Raf y C-Raf/Raf-1)-MEK1/2-ERK1/2. Poco se sabe acerca de las acciones específicas de cada isoforma, ya que ambas se expresan de forma ubicua y tienen la misma especificidad de sustrato. Transducen señales de una gran variedad de mitógenos, citoquinas, factores de diferenciación y hormonas, y regulan procesos biológicos que incluyen la proliferación celular, determinación de destino celular, morfogénesis y respuestas inmunes (Pearson *et al.*, 2001). La actividad desregulada de ERK1/2 está asociada a enfermedades como cáncer, desórdenes inflamatorios y enfermedades neurodegenerativas (Lawrence *et al.*, 2008; Tartaglia y Gelb, 2010).

ERK1/2 está ampliamente distribuido en el sistema nervioso central (SNC) y es de alta expresión en las zonas límbicas del cerebro como el hipocampo, la corteza prefrontal y amígdala basolateral (BLA), donde actúa como un regulador central de los procesos moleculares que median la plasticidad sináptica, comportamientos emocionales, el aprendizaje y la memoria (Thomas y Huganir, 2004; Davis y Laroche, 2006; Samuels *et al.*, 2009).

La activación de ERK1/2 mediada por RTKs fue la primera vía identificada y es la mejor estudiada. Los GPCRs también regulan a las MAPK pero los mecanismos son muy variados (Marinissen y Gutkind, 2001; Goldsmith y Dhanasekaran, 2007). Las cuatro clases de proteínas G descritas, Gs, Gi, Gq, G₁₂, regulan a las distintas MAPKs por distintas vías. Tanto la subunidad G α como el complejo G $\beta\gamma$ pueden modular a las MAPK de forma dependiente del contexto celular. En particular, las vías que integran el cAMP a ERK1/2 son complejas ya que cAMP puede regular positiva o negativamente a la cascada de MAPK (Stork y Schmitt, 2002) y

constituye un punto importante de diálogo cruzado o *crosstalk* con las vías activadas por los RTKs.

La primera evidencia de que Gs y cAMP pueden estar implicados en la regulación de ERK1/2, provino del estudio del oncogén *gsp* que codifica al mutante constitutivamente activo de Gs (Landis *et al.*, 1989; Lyons *et al.*, 1990). La caracterización funcional de estas mutantes demostró que la expresión ectópica de Gs puede estimular ERK1/2 en diferentes tipos celulares (Faure *et al.*, 1994). Se demostró que aumentos en cAMP pueden activar ERK1/2 en un mecanismo dependiente de la pequeña proteína G Rap1 y de la MAPKKK B-Raf (Vossler *et al.*, 1997; Wan y Huang, 1998; Wang *et al.*, 2006). Una de las vías por las que cAMP activa Rap-1 involucra a los EPACs, que son factores intercambiadores de nucleótido de guanina (GEFs por sus siglas en inglés) específicos para Rap1 (de Rooij *et al.*, 1998; Quilliam *et al.*, 2002; Bos, 2006). Se han identificado otros Rap1 GEFs involucrados en la activación de ERK1/2 (Enserink *et al.*, 2002). En particular se identificó que PKA puede activar al GEF C3G en un mecanismo dependiente de la fosforilación de Src (Schmitt y Stork, 2002; Obara *et al.*, 2004).

La pequeña G Ras también puede mediar la activación de ERK1/2 por cAMP, como ha sido demostrado en distintos sistemas celulares, incluyendo cultivos primarios neuronales (Ambrosini *et al.*, 2000) y múltiples líneas celulares (Busca *et al.*, 2000; Norum *et al.*, 2003; Norum *et al.*, 2005). Se ha observado que dependiendo del tipo celular, la activación de Ras involucra o no a PKA. Es interesante destacar que la vía Gs-cAMP también puede inhibir la activación de ERK1/2. Uno de los mecanismos descritos involucra la fosforilación de Raf-1 por PKA (Wu *et al.*, 1993). Por otra parte, también se ha identificado que la activación de Rap-1 por PKA lleva a la inhibición de ERK1/2 en células en las que B-Raf es minoritario como NIH3T3 (Bos, 1998; Stork y Schmitt, 2002).

Regulación transcripcional CREB

Ya a fines de 1960s se notó que el aumento en los niveles intracelulares de cAMP estaba asociado a la inducción de proteínas específicas (Wicks, 1969). Las bases moleculares se delinearon más tarde, identificando un elemento de respuesta a cAMP (CRE por *cAMP-response element*) de 8 pb -5'-TGACGTCA-3'- en el gen de la somatostatina (Montminy *et al.*, 1986). La purificación del factor de transcripción capaz de unirse a CRE, CREB (Montminy y Bilezikjian, 1987), seguida por la identificación de otros factores de la misma familia (ATF-1 y CREM, entre otros) sentaron las bases para comprender los mecanismos involucrados en los efectos transcripcionales de cAMP y sus efectos a largo plazo (Lonze y Ginty, 2002).

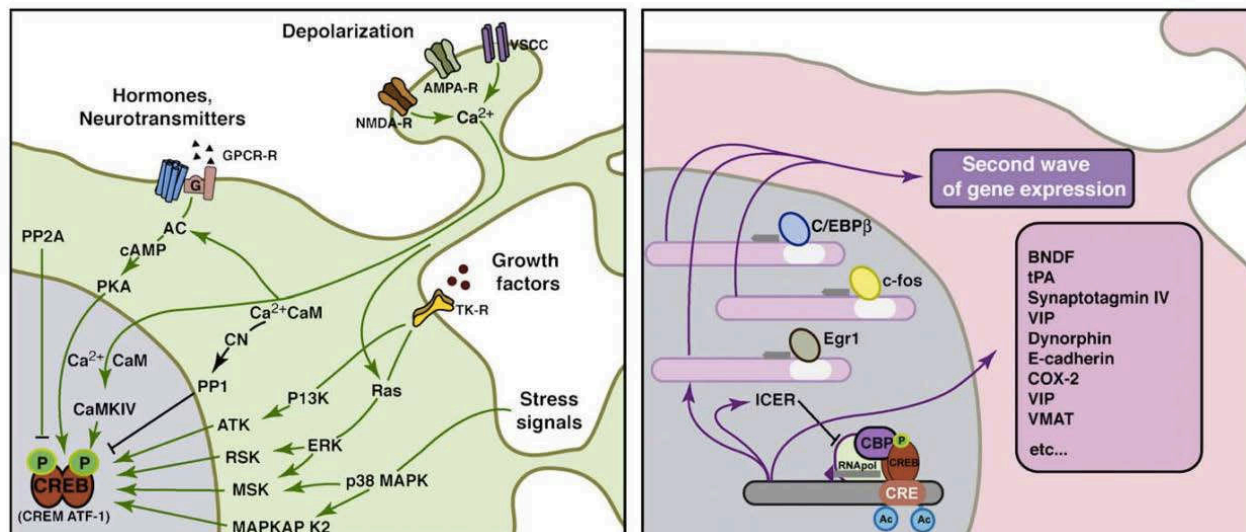


Figura 4 | Regulación de la activación de CREB

Distintas vías de señalización pueden activar a CREB, como GPCRs, RTKs, actividad neuronal, etc. La actividad de CREB como factor de transcripción regula la expresión génica de gran cantidad de blancos, que incluye muchos factores de transcripción, que a su vez median una segunda ola de regulación génica. Tomado de Benito y Barco, 2010.

Aunque inicialmente se identificó a CREB como un factor específico de la vía cAMP/PKA, se han descrito más de 300 estímulos capaces de actuar a través de CREB. CREB se activa mediante la fosforilación en Ser133 dependiente de quinasas de CREB que incluyen a PKA, quinasas dependientes de calcio/calmodulina (CaMKs), quinasas ribosomales S6, ERK1/2, AKT, etc (Figura 4). CREB se une a las secuencias de DNA blanco como dímero, ya sea homodímero o heterodímero con otros miembros de la familia. La dimerización ocurre a través del motivo cierre de leucinas (bZIP) presente en el extremo carboxi-terminal de la proteína, mientras que la unión al DNA está mediada por un dominio básico rico en lisinas y alaninas (Lonze y Ginty, 2002; Benito y Barco, 2010). La fosforilación en Ser133 de CREB es crucial para su función y le permite interactuar con coactivadores de la transcripción, como CBP y p300 (Mayr y Montminy, 2001). Sin embargo, la actividad de CREB y su especificidad como factor de transcripción puede ser modulada por otras modificaciones postraduccionales de CREB y sus coactivadores.

La activación de CREB da inicio a programas transcripcionales complejos y aún no se conocen los mecanismos que determinan la especificidad según el estímulo o el tipo celular. Los genes regulados por la familia CREB son cientos de genes heterogéneos y con funciones diversas, que van desde reguladores del metabolismo a la señalización y estructura celular (Lonze y Ginty, 2002). Algunos de estos genes son factores de transcripción y su inducción conduce a una segunda ola de expresión génica (Figura 4). CREB también activa mecanismos de retro-

alimentación negativa, por ejemplo mediante la inducción del represor ICER (Sassone-Corsi, 1995).

CREB es de expresión ubicua y estudios en sus funciones biológicas han demostrado su acción en una gran variedad de procesos tales como proliferación, diferenciación, respuestas adaptativas y regulación metabólica. Particular atención se le ha otorgado al rol de CREB en el aprendizaje y la memoria (Bourtchuladze *et al.*, 1994; Yin *et al.*, 1994; Bartsch *et al.*, 1995), siendo un factor en el que convergen varias vías de señalización dependientes de la actividad neuronal -el aumento de cAMP dependiente de GPCRs, el aumento de calcio por canales dependientes de voltaje o ligando, la activación de RTKs por factores de crecimiento- y que regula proteínas asociadas a la plasticidad celular –proteínas estructurales, receptores de neurotransmisores, componentes de señalización y adhesión- (Benito y Barco, 2010).

Proliferación y diferenciación

Años de investigación han llevado a apreciar el rol crítico del cAMP en la proliferación y diferenciación celular, siendo paradójica la capacidad de ejercer efectos opuestos según el tipo celular y el estímulo. El reporte inicial fue en ganglios sensoriales de embriones de pollo donde un aumento de cAMP promovía la elongación de axones (Roisen *et al.*, 1972). Desde entonces, gran cantidad de estudios han explorado la función de cAMP en la polarización celular, el crecimiento y la guía de los axones, y se ha demostrado que los niveles intracelulares de cAMP están relacionados con la capacidad neuritogénica de las neuronas (Cai *et al.*, 2001; Shewan *et al.*, 2002).

La diferenciación neuronal involucra una variedad de procesos celulares complejos además de cambios morfológicos, que incluyen el arresto en el crecimiento, cambios bioquímicos, un aumento en la excitabilidad eléctrica y la activación de programas de expresión génica específicos. El rol de CREB en estos procesos ha sido intensamente investigado, mientras que la dependencia de ERK1/2 en la diferenciación estimulada por cAMP parece ser dependiente del estadio o tipo celular (Grewal *et al.*, 1999; Grewal *et al.*, 2000; Patterson *et al.*, 2001; Vogt Weisenhorn *et al.*, 2001; Zanassi *et al.*, 2001).

En las líneas celulares PC12 -derivada de un feocromocitoma de rata- o Neuro-2a -que proviene de un neuroblastoma murino- la neuritogénesis está acompañada por un arresto en la proliferación celular. El uso de estos modelos celulares, especialmente las células PC12, ha sido importante para determinar cuáles son los mecanismos involucrados en la elongación de neuritas y cómo las vías de señalización pueden integrar la información de distintas señales extracelulares para promover una respuesta biológica común o distinta (Vaudry *et al.*, 2002).

En los modelos experimentales donde cAMP inhibe la proliferación celular, se han identificado mecanismos dependientes e independientes de ERK1/2. cAMP puede inhibir la proliferación celular sin inhibir ERK1/2 y hasta mediante la activación de ERK1/2. La acción antiproliferativa de cAMP a través del bloqueo de la activación de ERK1/2 mediada por factores de crecimiento ha sido ampliamente reportada. Por otra parte, el cAMP también puede estimular la proliferación celular a través de la activación de ERK1/2 en muchos modelos celulares (revisado en Stork y Schmitt, 2002).

CRH y la respuesta a estrés

Frente a estímulos del medio externo o interno que amenacen la homeostasis, todos los organismos han desarrollado una respuesta fisiológica que involucra la activación de muchos sistemas interconectados que inducen cambios comportamentales y fisiológicos con el objetivo de disminuir el riesgo de ese estímulo y recuperar rápidamente la homeostasis. El conjunto de estos procesos es lo que se conoce como respuesta a estrés (de Kloet *et al.*, 2005). Se han descrito una gran variedad de moléculas -mediadores de estrés- que se liberan en respuesta a un estímulo estresor y que generan efectos específicos, con características temporales y sitios de acción distintivos. Se propone que la existencia de múltiples mecanismos es lo que le otorga al organismo la capacidad de responder y adaptarse a un ambiente dinámico (Joels y Baram, 2009). Así como una adecuada respuesta es crítica para la supervivencia del organismo, la existencia de mecanismos que finalicen la respuesta también son clave ya que si la respuesta es excesiva o prolongada, el costo de reinstalar la homeostasis puede llevar a situaciones patológicas.

La hormona liberadora de corticotropina (CRH) como ligando endógeno ha existido y funcionado filogenéticamente aún antes de la evolución de los tetrápodos y teleósteos (Chang y Hsu, 2004). Tal conservación evolutiva sugiere que es un ingrediente esencial para el mantenimiento de la homeostasis. CRH es un péptido de 41 aminoácidos, aislado y caracterizado inicialmente por Vale y sus colaboradores a partir de extractos hipotalámicos por su capacidad de estimular la secreción de ACTH y, por lo tanto, activar el eje hipotálamico-hipofisario-adrenal (HPA), el principal sistema neuroendócrino de la respuesta a estrés (Spiess *et al.*, 1981). Ya desde su descripción inicial se anticipó que CRH podría ejercer funciones importantes en circuitos extrahipotalámicos. Hoy, CRH es considerado un componente maestro de la respuesta integrada a estrés, orquestrando una variedad de mecanismos que regulan aspectos comportamentales y fisiológicos de la respuesta (Figura 5). Más aún, la desregulación de los mecanismos asociados a la señalización por CRH están implicados en el desarrollo de

patologías asociadas al estrés como ansiedad y depresión (Holsboer y Ising, 2010).

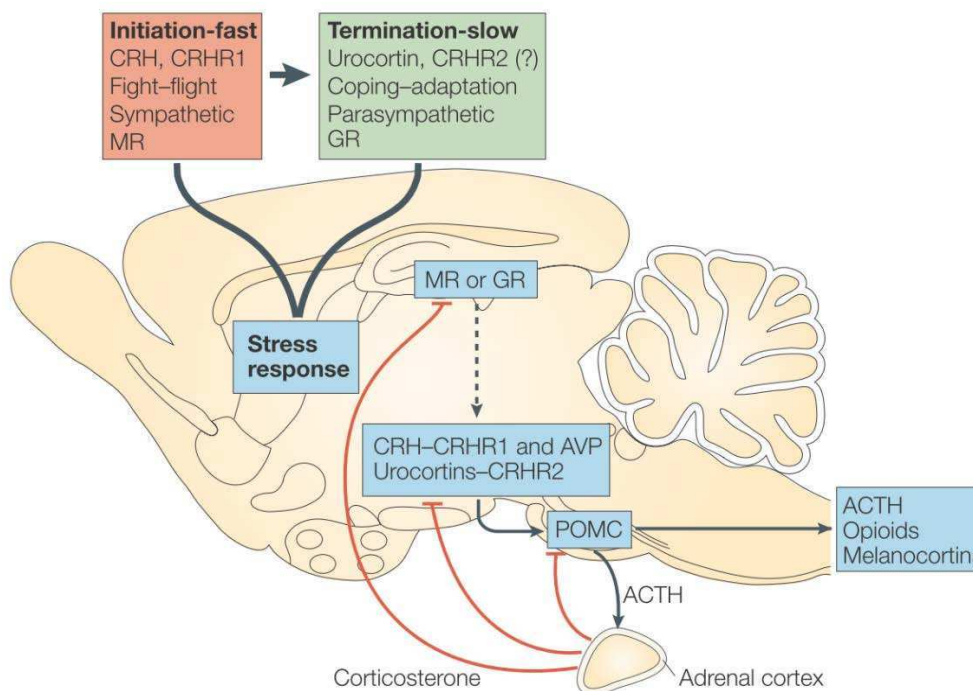


Figura 5 | CRH y la respuesta integrada al estrés

CRH dirige la activación de la respuesta endócrina y comportamental frente al estrés. El eje HPA representa la principal respuesta endócrina, regulado por CRH y arginina vasopresina (AVP) hipotalámicas que activan la síntesis de pro-opiomelanocortina (POMC) en la hipófisis anterior y su procesamiento a ACTH, entre otros productos. ACTH estimula la secreción de GC desde la corteza adrenal. A su vez, los GC ejercen una regulación negativa del eje HPA a través de los receptores MR. El sistema CRH/CRHR1 también actúa a nivel del SNC, activando la respuesta conductual aguda frente al estrés. La respuesta a estrés además tiene un componente más lento que promueve la adaptación y la recuperación de la homeostasis. Tomado de de Kloet *et al.*, 2005.

CRH y su familia de péptidos relacionados

CRH es un péptido de 41 aminoácidos generado a partir del clivado del extremo carboxi-terminal de un precursor de 192 aminoácidos (Dautzenberg y Hauger, 2002, Figura 6). Además de CRH, se ha identificado una familia de péptidos análogos: urocortina 1 (UCN1, Vaughan *et al.*, 1995), urocortina 2 (UCN2) y urocortina 3 (UCN3, Hsu y Hsueh, 2001) y dos péptidos que no se expresan en mamíferos, urotensina de peces y sauvagina de anfibios. Estos péptidos de entre 38 y 41 aminoácidos están estructuralmente relacionados y presentan cierta identidad de secuencia (26-54%, Dautzenberg y Hauger, 2002).

CRH está ampliamente distribuido en el SNC (Figura 7) y en la periferia (glándula adrenal, testículo, placenta, estómago, bazo, timo, piel), mientras que la expresión de las UCNs en el cerebro está más restringida, siendo más importante la presencia de las UCNs en los tejidos

periféricos (tracto gastrointestinal, testículo, corazón, timo, bazo e hígado, Dautzenberg y Hauger, 2002).

Receptores de CRH

CRH y sus péptidos relacionados ejercen su función a través de dos receptores GPCRs, CRHR1 y CRHR2 (Figura 6). Estos receptores están codificados por genes distintos, presentan una elevada homología a nivel de proteína (70% de identidad para los receptores humanos) y se han descrito múltiples variantes de *splicing* para ambos receptores. CRHR1 presenta muchas variantes aunque sólo una es funcional, CRHR1 α , que posee 415-420 aminoácidos con 7 dominios transmembrana y 5 sitios consenso de N-glicosilación, mientras que CRHR2 tiene tres variantes funcionales, α , β y γ , con diferencias principalmente en el extremo amino-terminal y su patrón de expresión en tejidos (Dautzenberg y Hauger, 2002; Grammatopoulos y Chrousos, 2002). La mayor divergencia de secuencia entre CRHR1 y CRHR2 se encuentra en los dominios extracelulares, particularmente en el amino-terminal (40% de identidad), ya que es la región involucrada en la unión a los ligandos. En contraste, los dominios intracelulares y transmembrana son muy conservados (80-85% de identidad). CRH se puede unir a ambos receptores pero con mayor afinidad a CRHR1, UCN1 se une con afinidad similar a ambos receptores, y UCN2 y UCN3 son considerados ligandos selectivos de CRHR2 (Hauger *et al.*, 2006).

La distribución de los receptores en tejidos ha ayudado a comprender cuáles son sus funciones (Figura 7). Ambos receptores se encuentran en el SNC, siendo CRHR1 más abundante. CRHR1 se distribuye en corteza, cerebelo, bulbo olfatorio, *medial septum*, hipocampo, amígdala e hipófisis. La expresión a nivel central de CRHR2 está principalmente restringida a *lateral septum* e hipotálamo, pero se encuentra en tejidos periféricos que incluyen corazón, pulmón, músculo esquelético, tracto gastrointestinal y vasculatura. Teniendo en cuenta el rol clave de CRH en la respuesta a estrés a través del eje HPA y la coordinación a nivel central, ha recibido especial atención la distribución de CRH, las UCN y sus receptores en el cerebro (Figura 7). Dada la falta de anticuerpos que detecten de manera específica a cada tipo de receptor, la determinación de los patrones de expresión fue realizada principalmente en estudios de hibridación *in situ* para detectar mRNAs y, más recientemente, mediante el uso de ratones reporteros (Henckens *et al.*, 2016).

Además de los receptores de membrana, existe una glicoproteína soluble de unión a CRH (CRH-BP) que en humanos se halla distribuida en el cerebro, hipófisis, placenta y plasma (Potter *et al.*, 1991). La función de CRH-BP aún es poco comprendida, pero se propone que

podría limitar la disponibilidad de ligando para los receptores, servir como un reservorio local o facilitar el transporte de los péptidos.

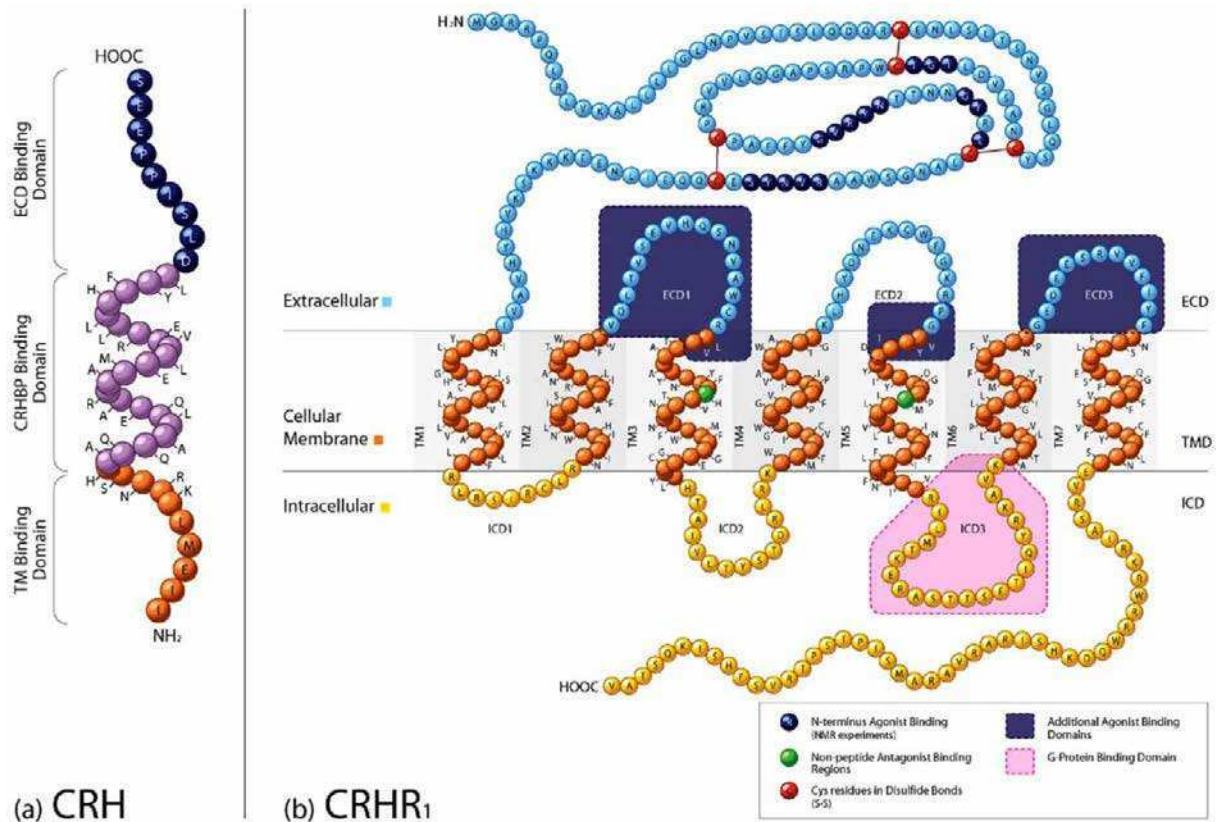


Figura 6 | Estructura de CRH y su receptor CRHR1

a, Estructura del péptido CRH en la que se pueden apreciar las distintas regiones de unión al receptor.

b, Estructura del GPCR CRHR1, en la que se observan los dominios extracelulares (ECD), transmembrana (TMD) e intracelulares (ICD) para ambos receptores, además de las cisteínas que establecen puentes disulfuro (rojo), regiones relevantes en la unión a ligando (azul), sitios de unión de antagonistas no peptídicos (verde) y región crítica para la transducción de señales por proteína G. Nótese el gran dominio extracelular en el amino-terminal, característico de los receptores de clase B.

Tomado de Hemley *et al.*, 2007.

CRHR1 pertenece a la subfamilia de GPCRs de clase B

Los receptores de CRH son GPCRs clase B, una subfamilia de 15 receptores. Los GPCR clase B se caracterizan por tener un extremo amino-terminal extracelular (ECD por *extracellular domain*) grande, con 6 cisteínas formando puentes disulfuro y una estructura terciaria conservada (Figura 6). El ECD es crítico para la unión del ligando: el extremo carboxi-terminal de CRH se une primero a ECD de CRHR1 y la región amino-terminal interactúa con un dominio juxtamembrana (*J-domain*), resultando en la activación del receptor (Pioszak *et al.*, 2008). Este

modelo de unión del ligando de dos dominios parece ser general para los GPCRs de clase B (Culhane *et al.*, 2015).

La clase B de los GPCR comprende a receptores de muchas hormonas peptídicas, como calcitonina, hormona paratiroidea, glucagón, GHRH, etc, que a su vez regulan un gran número de funciones fisiológicas. En 2013 se reportaron en simultáneo las estructuras cristalinas de los primeros dos GPCR clase B, CRHR1 (Hollenstein *et al.*, 2013) y el receptor de glucagón (GCGR, (Siu *et al.*, 2013), lo que representó un gran avance ya que esta clase de receptores son el potencial blanco terapéutico para una variedad de enfermedades como diabetes, osteoporosis, desórdenes afectivos, y aún persiste una gran dificultad para encontrar moléculas pequeñas que funcionen como agonistas. Las estructuras demostraron que el bolsillo de unión de los ligandos endógenos (sitio ortostérico) de estos receptores es más abierto que en los otros GPCRs, pero también mostraron que existen otros bolsillos secundarios que pueden actuar como sitios alostéricos para el diseño de drogas (Sexton y Wootten, 2013). Esto es clave teniendo en cuenta que la mayoría de los receptores de clase B responden a múltiples ligandos endógenos (como se comentó antes para PTHR) y por lo tanto hay un potencial agonismo sesgado que puede utilizarse para regular las respuestas fisiológicas (Wootten *et al.*, 2017).

Fisiología de CRH

El eje hipotálamo-hipófisis-adrenal

Se describió a CRH a partir de su capacidad de dirigir la activación del eje HPA, que constituye el principal sistema endócrino que se activa en respuesta a estrés en mamíferos. La integración a nivel del hipotálamo de estímulos sensoriales y viscerales por vías del tronco cerebral, y estresores psicogénicos por vías límbicas regula la secreción de CRH en el núcleo paraventricular. En los corticotrofos de la hipófisis, CRH induce la síntesis de pro-opiomelanocortina (POMC) y su procesamiento a corticotropina o ACTH que, a su vez, estimula la secreción de glucocorticoides desde la corteza de la glándula adrenal. La hormona arginina vasopresina (AVP), también expresada y secretada por el hipotálamo ante un estímulo estresor, actúa de forma sinérgica a CRH activando al eje HPA (Holsboer y Ising, 2010). Los glucocorticoides (GC), principalmente cortisol en primates y corticosterona en roedores, tienen múltiples funciones entre las que se destacan la regulación de los niveles metabólicos en adaptación al estrés y el mantenimiento del estado de alerta. A su vez, la función adaptativa del eje HPA depende de la regulación negativa que ejercen los GC, responsables de disminuir la actividad del eje a niveles basales. La función de los GC durante la respuesta a estrés es principalmente mediante el receptor de mineralocorticoides (MR), de mayor afinidad, mientras

que en la normalización de la homeostasis participa en mayor medida el receptor de glucocorticoides (GC, de Kloet *et al.*, 2005).

Circuitos extrahipotalámicos

CRH no sólo cumple su función como activador de la respuesta endócrina, sino que es clave como coordinador de muchos aspectos humorales y comportamentales de la respuesta integrada frente al estrés (Figura 5). Estudios anatómicos que revelaron que CRH estaba ampliamente distribuido en el SNC fuera del eje HPA, llevaron a postular que CRH regula otras funciones además de los aspectos endócrinos de la respuesta a estrés. Se observó que la administración intracerebroventricular de CRH tenía efectos autonómicos -funciones cardiovasculares y gastrointestinales- y promovía un comportamiento ansiogénico, además de promover la liberación de ACTH (Britton *et al.*, 1982; Sutton *et al.*, 1982; Koob y Bloom, 1985; Dunn y File, 1987). Estos efectos comportamentales asociados a la administración central de CRH persisten en animales en los que se eliminó la hipófisis, apoyando un rol extrahipotalámico de CRH (Eaves *et al.*, 1985).

Es importante destacar que, a diferencia de los neurotransmisores clásicos, CRH y su familia de péptidos relacionados, funcionan como neuroreguladores: no cambian el potencial de membrana *per se*, pero modifican la acción de un neurotransmisor ya sea aumentando o disminuyendo su efecto electrofisiológico, permitiendo un ajuste fino de la respuesta biológica (Gallagher 2008).

CRH modula la respuesta del sistema simpático regulando la liberación de noradrenalina a nivel del *locus coeruleus* y también coordinando el sistema nervioso simpático periférico y la médula adrenal (Brown *et al.*, 1982; Valentino *et al.*, 1993). Más aún, la función de CRH a nivel central contribuye a los aspectos comportamentales de la respuesta a estrés. A través de estrategias farmacológicas o el uso de modelos animales transgénicos generalmente se le ha atribuido un rol ansiogénico a la activación de CRHR1, mientras que la función de CRHR2 ha sido menos clara, siendo asociada muchas veces al cierre de la respuesta a estrés y la recuperación de la homeostasis. Sin embargo, el desarrollo de nuevas herramientas neurobiológicas en los últimos años, como la mutagénesis condicional, la manipulación con vectores virales y la optogenética, permitió conocer cuáles son los circuitos regulados por CRH y un estudio de las funciones de CRHR1 y CRHR2 en regiones específicas del cerebro. Se observó que tanto CRHR1 como CRHR2 modulan el comportamiento, pero que su efecto depende de la región del cerebro analizada y del tipo de neurona involucrada (revisado en Henckens *et al.*, 2016). Por ejemplo, ratones con delección específica de CRHR1 en neuronas glutamatérgicas mostraron un comportamiento menos ansioso y una reducción en la neurotransmisión en hipocampo y

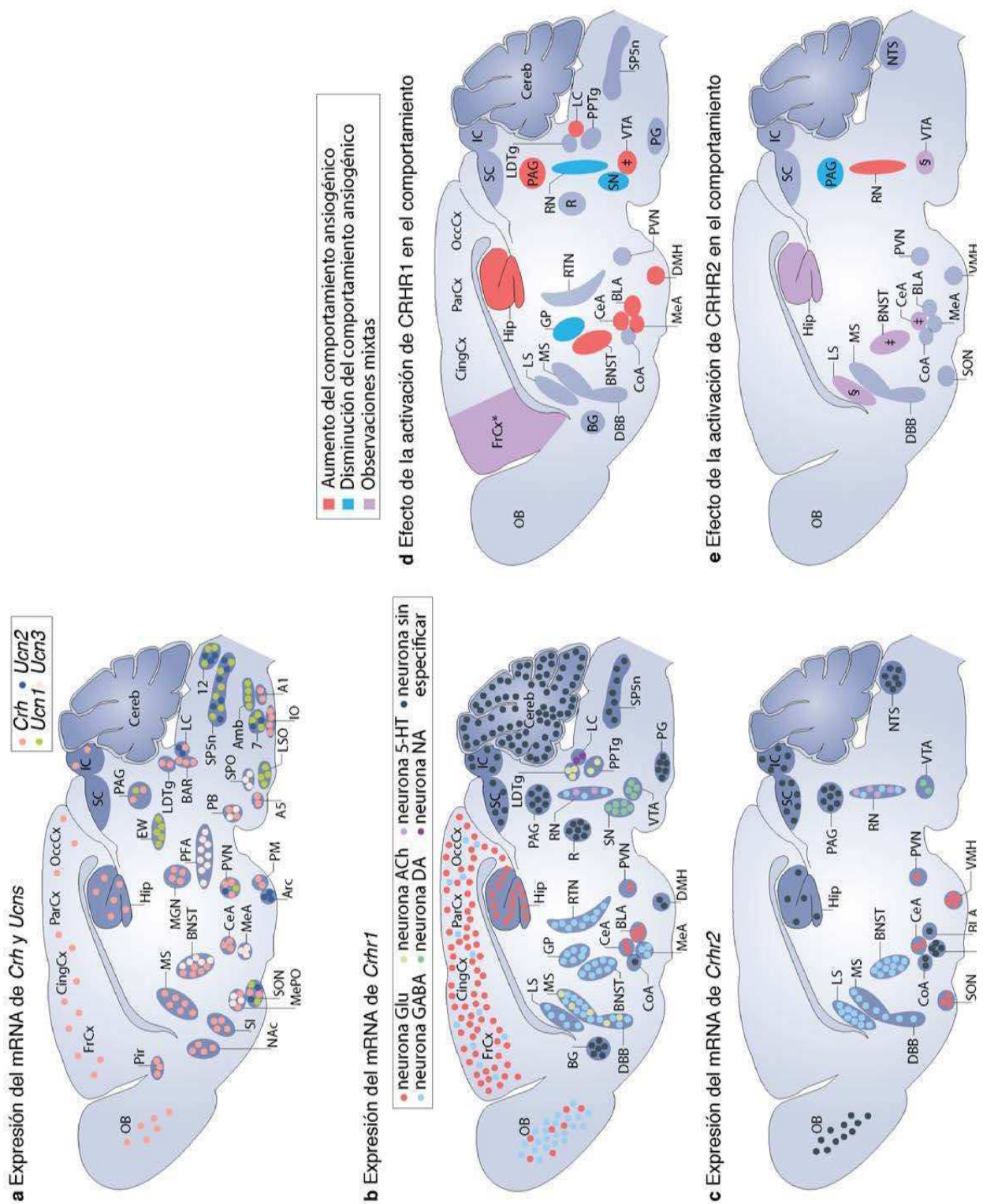


Figura 7 | Distribución y roles específicos de los péptidos y receptores de la familia de CRH en las distintas regiones del cerebro. Tomado de Henckens et al., 2016.

a, Representación esquemática de la distribución de los mRNAs de *Crh*, *Ucn1*, *Ucn2* y *Ucn3* en una sección sagital del cerebro en roedores. (continúa en la página siguiente)

b-c, Representación esquemática de la distribución de los mRNAs de *Crhr1* (b) y *Crhr2* (c) en los distintos tipos de neuronas en una sección sagital del cerebro en roedores.

d-e, Los efectos de la activación aguda de CRHR1 (d) o CRHR2 (e) en distintas regiones están ilustrados en la sección sagital del cerebro de roedores. *Efectos de CRHR1 parecen dependientes de la dosis. ‡Efectos del receptor parecen específicos de la sinapsis. §Efectos del receptor parecen dependientes de estrés o adicciones previas.

5-HT, 5-hidroxitriptamina (serotonina); 7, núcleo facial; 12, núcleo hipoglosal; A1, células A1 noradrenérgicas; A5, células A5 noradrenérgicas; ACh, acetilcolina; Amb, núcleo ambiguo; Arc, núcleo arcuato; BAR, núcleo de Barrington; BG, ganglios basales; BLA, amígdala basolateral; BNST, núcleo de la cama de la estría terminal; CeA, amígdala central; Cereb, cerebelo; CingCx, corteza cingulada; CoA, amígdala cortical; DA, dopamina; DBB, banda diagonal de Broca; DMH, hipotálamo dorsomedial; EW, núcleo de Edinger–Westphal; FrCx, corteza frontal; Glu, glutamato; GP, *globus pallidus*; Hip, hipocampo; IC, *colliculus* inferior; IO, oliva inferior; LC, *locus coeruleus*; LDTg, núcleo tegmental laterodorsal; LS, septo lateral; LSO, oliva lateral superior; MeA, amígdala medial; MePO, área preóptica medial; MGN, núcleo medial geniculado; MS, septo medial; NA, noradrenalina; NAc, *nucleus accumbens*; NTS, núcleo del tracto solitario; OB, bulbo olfatorio; OccCx, corteza occipital; PAG, sustancia gris periacueductal; ParCx, corteza parietal; PB, núcleo parabraquial nucleus; PFA, área perifornical; PG, *pons* gris; Pir, corteza piriforme; PM, núcleo premamilar del hipotálamo; PPTg, núcleo tegmental pedúnculo pontino; PVN, núcleo paraventricular del hipotálamo; R, núcleo rojo; RN, núcleo de raphe; RTN, núcleo reticular; SC, *colliculus* superior; SI, *substantia innominata*; SN, *substantia nigra*; SON, núcleo supraóptico; SP5n, núcleo trigeminoespinal; SPO, núcleo paraolivar superior; VMH, hipotálamo ventromedial; VTA, área ventral tegmental.

amígdala basolateral (BLA), mientras que la delección de CRHR1 en neuronas dopaminérgicas favoreció un comportamiento ansiogénico y disminuyó la liberación de dopamina desde la corteza prefrontal (Refojo *et al.*, 2011). Por lo tanto, la función concertada y antagónica de CRHR1 en distintos circuitos permitiría una respuesta balanceada frente al estresor. Los efectos diferentes de los receptores pueden atribuirse las funciones características de las distintas regiones cerebrales. Sin embargo, también se hallaron efectos distintos para CRHR1 y CRHR2 dentro de una misma región, sugiriendo la existencia de mecanismos más complejos de regulación. En este sentido, es muy poco lo que se conoce sobre la especificidad de vías de señalización que podrían ayudar a comprender los efectos locales de CRH.

Rol de CRH en desórdenes psiquiátricos asociados a estrés

Se ha observado que la desregulación del sistema CRH/CRHR1 está fuertemente relacionada con desórdenes psiquiátricos tales como ansiedad y depresión (de Kloet *et al.*, 2005; Joels y Baram, 2009). Estudios clínicos en pacientes psiquiátricos con depresión demostraron que la mayoría de los individuos analizados presentaba una sobre-estimulación del eje HPA (Holsboer, 1983; Gold *et al.*, 1984; Holsboer *et al.*, 1984; Holsboer *et al.*, 1986). Además, se observó que

CRH se encontraba elevado en el líquido cefalorraquídeo de pacientes deprimidos (Nemeroff *et al.*, 1984) y que las concentraciones se normalizaban luego de un tratamiento exitoso con antidepresivos (De Bellis *et al.*, 1993; Heuser *et al.*, 1998). En línea con lo anterior, en la corteza cerebral de víctimas de suicidio se registraron menores niveles de CRHRs, lo que se puede interpretar como la desensibilización del sistema frente a la abundancia de CRH (Nemeroff *et al.*, 1984). Los trabajos en modelos animales también apoyan el rol de CRH como regulador clave de desórdenes ligados al estrés.

Teniendo en cuenta que la depresión y los desórdenes ligados a estrés afectan al ~17% de la población y que las terapias disponibles actualmente presentan limitaciones, hay un interés en desarrollar nuevos fármacos. En particular, antagonistas de CRHR1 se han evaluado en ensayos clínicos como alternativas terapéuticas. Los resultados fueron promisorios en algunos ensayos y mostraron efectos dispares en otros, existiendo consenso en la necesidad de encontrar biomarcadores que permitan identificar a los pacientes que presenten desbalances en el sistema CRH/CRHR1 (Holsboer y Ising, 2008; Henckens *et al.*, 2016). Considerando la complejidad de los mecanismos involucrados en la respuesta a estrés, una mayor comprensión de las distintas vías involucradas y sus roles específicos contribuirán a utilizar de manera más eficiente las terapias hoy disponibles y a desarrollar nuevos tratamientos.

Mecanismos de transducción de señales activados por CRH

La vía de señalización principal para los CRHRs es el acoplamiento a proteína Gs, que resulta en un aumento de los niveles intracelulares de cAMP. Sin embargo, se ha observado que los CRHRs pueden acoplarse de manera promiscua a otras proteínas G, proteínas de andamiaje como las β -arrestinas, y varias proteínas de regulación del tráfico, lo que resulta en una amplia variedad de posibles vías de señalización y gran diversidad en las respuestas celulares que son dependientes del contexto celular, algo que es característico de los GPCRs clase B (Wootten *et al.*, 2017). Dado que los dominios intracelulares y transmembrana de CRHR1 y CRHR2 presentan elevada homología, en general se ha observado que utilizan mecanismos de señalización similares. En el contexto de esta Tesis, nos focalizaremos en las vías de señalización activadas por CRHR1.

La unión del ligando a CRHR1 promueve el cambio conformacional del receptor, aumentando la afinidad por la proteína Gs, que se acopla al tercer loop intracelular. La proteína Gs activada estimula la producción de cAMP a través de tmACs. En este sentido, se ha observado que, dependiendo del tejido y del tipo celular, CRHR1 puede, además de la vía de cAMP-PKA, activar otras cascadas de señalización (Arzt y Holsboer, 2006; Hillhouse y Grammatopoulos, 2006; Bonfiglio *et al.*, 2011a).

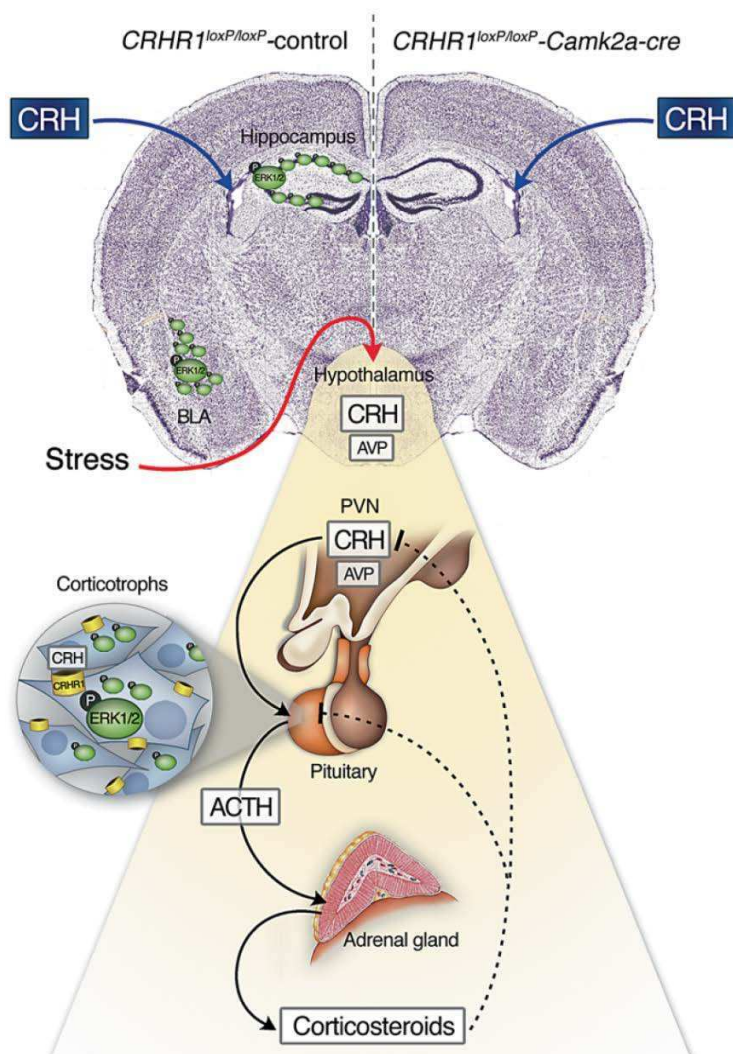


Figura 8 | Activación de las MAPK ERK1/2 en respuesta a CRH en el eje HPA y en áreas específicas del cerebro. CRH y AVP actúan sinérgicamente, dirigiendo la activación del eje HPA en respuesta a un estímulo estresor. La activación de CRHR1 en corticotrofos de la hipófisis anterior conduce a la activación de fosfo-ERK1/2, crítica para aumentar la expresión de POMC. Por otra parte, CRH está ampliamente distribuida en el SNC. La administración intracerebroventricular de CRH induce la activación específica de ERK1/2 en amígdala basolateral (BLA) y las áreas hipocámpales CA1-CA3. Estas estructuras están involucradas en el procesamiento de la información ambiental y en procesos cognitivos. En ratones KO condicionales para CRHR1 en cerebro anterior no se observa la activación de ERK1/2 en respuesta a CRH. Tomado de Bonfiglio et al., 2011a.

Grandes progresos en el conocimiento de los mecanismos de señalización de CRH a nivel molecular se consiguieron gracias al uso de líneas celulares. Se ha reportado que CRHR1 es capaz de acoplarse a otras proteínas G (Grammatopoulos et al., 2000) y en muchos sistemas se ha observado que también genera aumentos de calcio intracelular (Gutknecht et al., 2009; Bonfiglio et al., 2013) aunque los mecanismos descritos difieren según el modelo experimental (Hauger et al., 2006). Más aún, se ha descrito que CRHR1 puede activar también una variedad de vías intracelulares tales como EPACs, PKC, PLC PKB/Akt, y p38, así como también otras moléculas como óxido nítrico sintasa, guanilil ciclasa, prostaglandinas, Rho/RhoA kinasa, Fas/Fas ligando, Sonic Hedgehog y los factores de transcripción CREB, Elk-1 y Nur77 (Dautzenberg y Hauger, 2002; Grammatopoulos y Chrousos, 2002; Bonfiglio et al., 2011a). En particular, se ha descrito que CRH puede activar a ERK1/2 y que esta vía de señalización es crítica para su función biológica (Figura 8).

CRHR1 activado es fosforilado por las proteínas GRKs, habiéndose observado la participación de GRK2, GRK3 y GRK6 en distintos estudios (para revisión, Hauger *et al.*, 2006). Este proceso estimula el reclutamiento de las proteínas β -arrestina y la internalización del receptor. La actividad del receptor también puede ser modulada a través de interacciones establecidas a través del dominio PDZ presente en el extremo carboxi-terminal (Bender *et al.*, 2015). Se ha observado que la exposición prolongada a los ligandos puede regular el destino del receptor (Reyes *et al.*, 2008; Reyes *et al.*, 2014), pero los mecanismos implicados en la regulación de CRHR1 una vez internalizado aún no han sido explorados. La señalización selectiva dependiente de ligando ha sido sugerida para ligandos sintéticos (Beyermann *et al.*, 2007). Sin embargo, aún no se ha realizado una comparación sistemática de las vías activadas por los ligandos endógenos de CRHR1.

Señalización en corticotrofos

En los corticotrofos de la hipófisis, CRH estimula la producción de ACTH a partir del precursor POMC (Figura 8). Se ha utilizado a la línea celular derivada de corticotrofos de ratón AtT20 como modelo de estudio, ya que expresa de forma endógena CRHR1 (Peeters *et al.*, 2004). Se demostró que la activación de CRHR1 señala a través de la PKA y de la vía de las MAPKs para activar a los factores de transcripción Nurr77 y Nurr1, y aumentar la expresión de POMC. En ese sistema, la PKA dispara una vía de señalización independiente de calcio, y otra dependiente de la activación de canales de calcio dependientes de voltaje y de CaMKII. Ambos mecanismos convergen en la activación secuencial de Rap1 y B-Raf que llevan a la activación de ERK1/2 (Kovalovsky *et al.*, 2002). Más recientemente se ha reportado que los EPACs participan en la señalización de CRH en estas células (Van Kolen *et al.*, 2010).

Señalización en el SNC

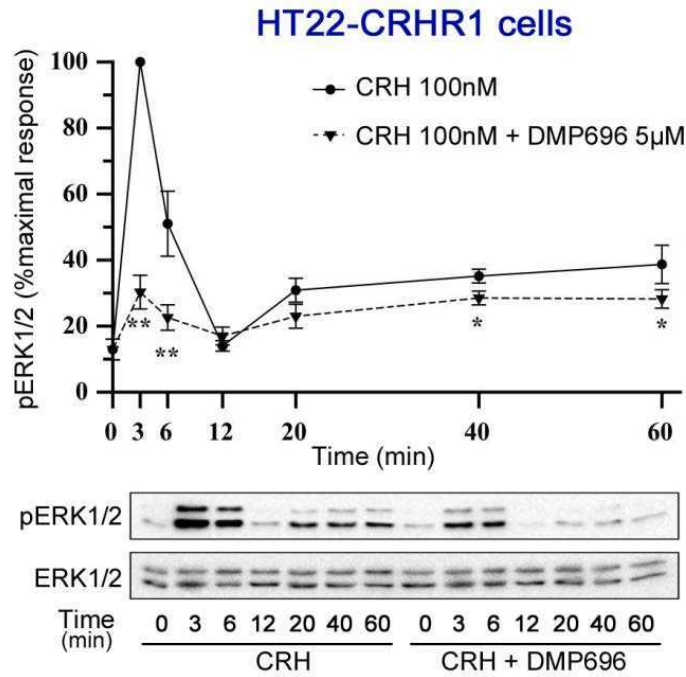
Estudios *in vivo* demostraron que en el cerebro, CRH activa ERK1/2 específicamente en áreas relacionadas con el procesamiento de la información ambiental y con aspectos comportamentales de la respuesta a estrés, como hipocampo y amígdala basolateral (Figura 8). En otras regiones, como el hipotálamo y núcleo central de la amígdala, involucradas en el procesamiento de la información visceral y la respuesta endócrina-autónoma al estrés, no se observó la activación de ERK1/2 en respuesta a CRH a pesar de formar parte del circuito central de CRH (Refojo *et al.*, 2005). Por otra parte, un trabajo de nuestro grupo analizó el efecto de la sobreexpresión de CRH en la activación de ERK1/2 utilizando una línea de ratones transgénicos que sobreexpresa CRH exclusivamente en estructuras límbicas. Se encontró que los niveles de fosfo-ERK1/2 en la amígdala de los animales sobreexpresores se encuentran disminuidos en

condiciones de estrés. Además, se observó una reducción significativa de los niveles de CRHR1, sugiriendo que este estímulo de estrés gatilla una internalización rápida del receptor de manera tal que los niveles de fosfo-ERK1/2 disminuyen en esas áreas (Silberstein *et al.*, 2009). Estos resultados sugieren que la vía de señalización de ERK1/2 es específica de estas estructuras e importante para comprender la acción de CRH en el SNC.

Dado el rol fundamental del hipocampo en la formación de memoria, aprendizaje y comportamiento (Fenoglio *et al.*, 2006), se le ha otorgado un papel fundamental en el desarrollo de patologías asociadas a estrés. CRH amplificaría el circuito excitatorio en el hipocampo (Aldenhoff *et al.*, 1983; Refojo *et al.*, 2011). Particularmente, se espera que la desregulación de CRH esté asociada a los déficits cognitivos observados en muchos pacientes con depresión severa (Berton y Nestler, 2006). Sin embargo, los mecanismos involucrados en la señalización de CRH en neuronas hipocampales no están claros.

Teniendo en cuenta que las vías de señalización de CRH/CRHR1 dependen del contexto celular (Arzt y Holsboer, 2006), en nuestro laboratorio se emprendió el estudio de los mecanismos asociados a la acción de CRH en neuronas hipocampales. Como sistema de estudio se utilizó a la línea hipocampal murina HT22, unas células ampliamente utilizadas como modelo neuronal (Li *et al.*, 1998; Aminova *et al.*, 2005; Luo y DeFranco, 2006; Liu *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2012). En células HT22 transfectadas de forma estable con CRHR1 (HT22-CRHR1), observamos que CRH produce una activación bifásica de ERK1/2 (Figura 9). Considerando la relevancia de B-Raf en células neuronales y su importancia en la activación de ERK1/2 mediada por cAMP, se estudió el rol de esta MAPKKK en la señalización de CRH. A través de un estudio proteómico se identificaron los interactores de B-Raf en células HT22-CRHR1 en condición basal (Bonfiglio *et al.*, 2011b) y estimulada con CRH. Se demostró que la activación temprana de ERK1/2 depende de B-Raf y de otras proteínas identificadas en los inmunoprecipitados de B-Raf, como las proteínas 14-3-3, PKA, Rap1 y MEK1/2. La segunda fase de activación de ERK1/2 depende de la internalización del receptor mediada por β -arrestina2. A su vez, ambas fases dependen de la acción de calcio y CaMKII (Bonfiglio *et al.*, 2013, Figura 9). Es interesante observar que varios interactores de B-Raf, cumplen un rol en la segunda fase de fosfo-ERK1/2, aunque esta etapa tardía no parece depender de B-Raf. Estos resultados ponen en evidencia la función de organizadores de complejos de señalización de la familia Raf, más allá de su rol de MAPKKK de la vía canónica de activación de ERK1/2.

a



b

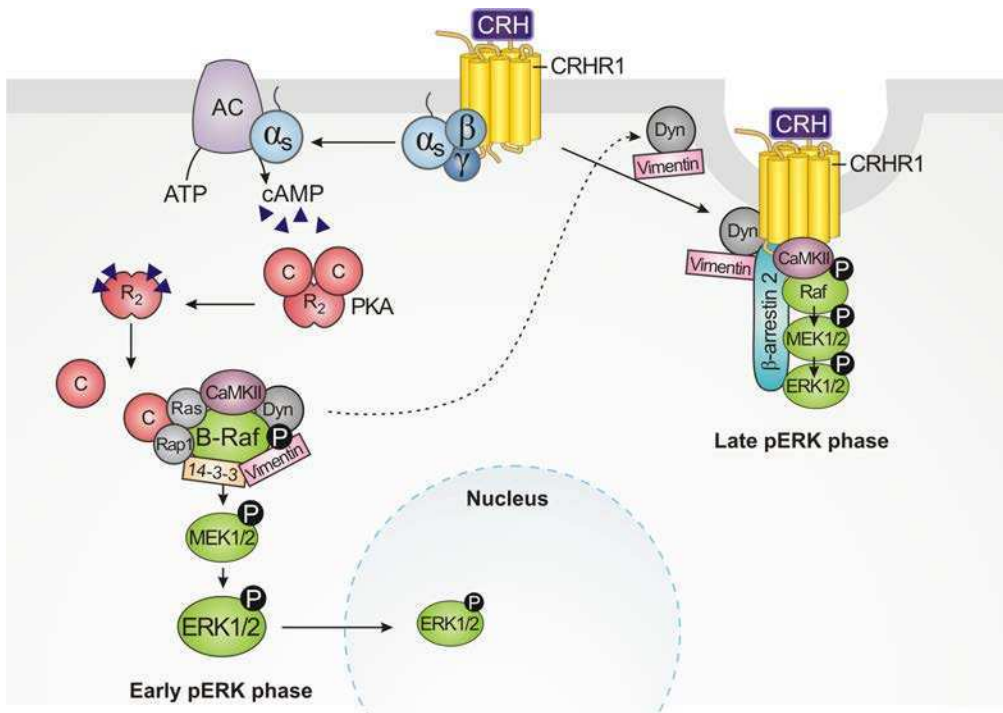


Figura 9 | Mecanismos moleculares involucrados en la activación bifásica de ERK1/2 gatillada por CRH en células hipocampales

a, Activación de ERK1/2 en respuesta a CRH en células HT22-CRHR1 con condiciones control y al preincubar con un antagonista específico de CRHR1, DMP696. Se muestra la señal de ERK1/2 fosforilado (pERK1/2) y total a distintos tiempos. Se grafica la respuesta como el máximo porcentaje de pERK1/2 (media ± SEM, n = 3).

b, Modelo propuesto para los mecanismos involucrados. Fase temprana: tras la activación de CRHR1 por CRH, la proteína G α_s acoplada estimula la adenilil ciclasa (AC) con el consecuente aumento de los niveles de cAMP intracelulares y la activación de la PKA. Además, CRH gatilla el ingreso de calcio

extracelular y la activación de la CaMKII. Las proteínas pequeñas Rap1 y Ras regulan la activación de B-Raf. Fase tardía: la unión de β -arrestina2 al receptor ocupado con agonista gatilla la internalización y el armado de un complejo de activación de las MAPKs, resultando en la activación de ERK1/2 en tiempos largos. Dinamina (Dyn) y vimentina, identificadas como interactores de B-Raf, participan en la internalización de las vesículas recubiertas de clatrina que contienen al CRHR1 unido a β -arrestina2. La CaMKII activada también está involucrada en esta segunda etapa, sugiriendo un rol en la internalización de CRHR1. El pERK1/2 generado por ambas vías es principalmente de localización citoplasmática, con escasa señal detectada en el núcleo. Modificado a partir de Bonfiglio *et al.*, 2013.

Objetivos

Nuestro **objetivo general** es identificar nuevos mecanismos moleculares involucrados en la señalización celular de CRH mediada por CRHR1 en el sistema nervioso central, donde CRH cumple un papel crucial en la respuesta frente al estrés y en el desarrollo de condiciones patológicas asociadas.

Considerando que los mecanismos de señalización activados por CRHR1 dependen del contexto celular, y que durante la respuesta a estrés CRH tiene un rol clave de CRH en el hipocampo, decidimos utilizar como modelo neuronal hipocampal a la línea celular HT22-CRHR1.

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

- Caracterizar el efecto de CRH en la diferenciación celular y analizar su relación con procesos biológicos como la proliferación y la expresión génica.
- Definir las características espaciales y temporales de la respuesta de cAMP río abajo de CRHR1 activado.
- Investigar el rol de las distintas fuentes de cAMP en la activación de vías de señalización relevantes para la función de CRH con énfasis en evaluar la existencia de microdominios de señalización.
- Estudiar la participación de distintas fuentes de cAMP en la señalización de CRHR1 a través del vínculo entre la generación de cAMP y la activación de ERK1/2.
- Comparar los mecanismos identificados en la señalización de CRH con los de otros GPCRs y en diferentes sistemas celulares para comprender la especificidad y la dependencia de contexto de los mecanismos identificados.

Materiales y métodos

1 Líneas celulares

En este trabajo se utilizaron las siguientes líneas celulares:

HT22: Esta línea celular corresponde a un subclon de la línea HT4, la cual deriva de un cultivo primario de hipocampo de ratón. Fue cedida generosamente por el Dr. Dietmar Spengler (Instituto Max Planck de Psiquiatría, Munich, Alemania). Durante la Tesis de Licenciatura del Lic. Juan José Bonfiglio por RT-PCR se determinó que esta línea celular no expresa niveles detectables del CRHR1 (Bonfiglio, 2008).

AtT20: Esta línea celular fue generada a partir de tumores de hipófisis secretoras de ACTH inducidos en ratones LAF-1 por Dr. Furth y colaboradores por irradiación en 1957, y luego establecida como línea celular. Estas células son ampliamente utilizadas como modelo de corticotrofos ya que expresan CRHR1 y secretan ACTH.

3T3L1: Esta línea celular fue establecida en 1962 por los Dr. Todaro y Green a partir de tejido embrionario de ratones Swiss y actualmente es un modelo muy utilizado de fibroblastos murinos. No expresan CRHR1.

A partir de ellas se generaron los siguientes clones estables:

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

3T3L1-CRHR1: Se generaron clones estables de la construcción c-Myc-mCRHR1 a partir de transfección de pcDNA3-c-Myc-mCRHR1 y la selección con geneticina 800 µg/ml. Después de 14 días de tratamiento con antibiótico las colonias se aislaron y se subcultivaron. Se verificó la expresión del receptor por RT-PCR y Western blot y se eligió un clon de expresión intermedia para trabajar. La funcionalidad de CRHR1 se describe en este trabajo.

Clones estables de los sensores de FRET: **HT22-CRHR1-ICUE3**; **HT22-CRHR1-Epac-S^{H187}**; **HT22-CRHR1-AKAR4**; **3T3L1-CRHR1-Epac-S^{H187}**

A partir de las construcciones ICUE3, AKAR4 y Epac-S^{H187}, los sensores se subclonaron en el plásmido pcDNA3.1/Zeo(+). Luego, se transfectaron en las células HT22-CRHR1 o 3T3L1-CRHR1 y se seleccionaron los clones estables con zeocina 100 µg/ml (Invitrogen). Después de 14 días de tratamiento con antibiótico las colonias se aislaron y se subcultivaron. Se

seleccionaron los clones con mayor nivel de fluorescencia analizando los distintos clones por citometría de flujo.

1.1 Mantenimiento de las líneas celulares en cultivo

Las líneas celulares fueron cultivadas en medio esencial mínimo de cultivo DMEM baja glucosa suplementado con bicarbonato de sodio 2,4 g/l, HEPES 2,2 g/l, suero fetal bovino (SFB) previamente deplegado por calor a 65°C durante 30 min (5% para HT22 y 3T3L1, 10% para AtT20), penicilina 100U/ml, estreptomomicina 100mg/ml, glutamina 4 mM. El medio de cultivo de los clones estables para CRHR1 también contiene el agente selectivo geneticina 200µg/ml para asegurar la presencia del receptor y los clones para ICUE3, Epac-S^{H187} y AKAR4, zeocina 50 µg/ml. Las líneas celulares fueron incubadas a 37°C en una atmósfera húmeda y 5% de CO₂. Las líneas se mantuvieron en crecimiento con pasajes cada 72-96hs de una dilución 1:10. Para el mantenimiento, así como para el plaqueo de las células para cada experimento, las células fueron lavadas con PBS y despegadas en presencia de tripsina 1 min a 37°C.

2 Transfecciones transitorias de líneas celulares

2.1 Transfección de DNA

Las células HT22-CRHR1, AtT20 y 3T3L1-CRHR1 fueron sembradas al 75% de confluencia. 24 h más tarde fueron transfectadas utilizando Lipofectamina y PLUS Reagent (Invitrogen) según instrucciones del fabricante.

Brevemente, para las células HT22-CRHR1 y 3T3L1-CRHR1 en una placa de 60 mm de diámetro, en un tubo de poliestireno se colocaron 4 µg de plásmido, 4 µl de PLUS Reagent y 250 µl de OptiMEM, y en otro, 15 µl de Lipofectamina, y 250 µl de OptiMEM, por placa. Para las células AtT20 en una placa de 60 mm de diámetro, en un tubo de poliestireno se colocaron 5 µg de plásmido, 5 µl de PLUS Reagent y 250 µl de OptiMEM, y en otro, 10 µl de Lipofectamina, y 250 µl de OptiMEM, por placa.

Transcurridos 15 min, se transfirieron 250 µl del tubo con Lipofectamina al tubo con DNA, se mezcló vigorosamente y se incubó por 15 min para que se formaran los complejos entre el polícatión y el DNA. Luego, se agregó la mezcla a la placa, previamente lavada con PBS para eliminar trazas de suero y con 2,5 ml de DMEM. Para las distintas placas, se escaló el procedimiento de forma proporcional. Se incubó a las células durante 3 h a 37°C y a 5%CO₂ para la transfección y luego se reemplazó el medio por medio completo. 24 h después de la transfección las células se sembraron en placas de 6 pocillos para los ensayos de Western Blot, de 12 pocillos para los ensayos de cambios morfológicos a la densidad adecuada de 24 pocillos

para los ensayos de microscopía. En general, los experimentos se realizaron 48 h después de la transfección.

Como control de transfección en general el plásmido de interés se co-transfectó con un vector de expresión de proteínas fluorescentes. Cuando se llevaron a cabo experimentos de visualización (*imaging*), sólo se analizaron las células co-transfectadas con el reportero fluorescente.

2.2 Transfección de siRNA

En este trabajo se utilizaron los siRNAs que se detallan en la Tabla 3. Todos los siRNAs fueron de 21 nucleótidos y con el dinucleótido $\tau\tau$ sobresaliendo hacia el 3'.

Blanco	siRNA	Proveedor
siRNA GL3 (si-control)	CUUACGCUGAGUACUUCGAtt	Invitrogen
siRNA sAC	AAUGUAUGGGCUUCAUGGAtt	Invitrogen
siRNA AC1	SMART pools de 4 siRNAs prediseñados	Thermo Fisher Scientific
siRNA AC8	SMART pools de 4 siRNAs prediseñados	Thermo Fisher Scientific
siRNA EPAC1	GGUCAAUUCUGCCGGUGAUtt CGACACCACAGGUUGGAAAAtt	Invitrogen
siRNA EPAC2	GCUGGUAGACUGGAUGAUAtt GCUAAUCUACCACACAUUUtt	Invitrogen

Tabla 3 | siRNAs utilizados en este trabajo para silenciar a distintas proteínas blanco. Se detalla la secuencia en los casos que se utilizaron siRNAs no comerciales.

Para las células HT22-CRHR1 y AtT20 los siRNAs se transfectaron utilizando Lipofectamina 2000 (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, para una placa de 60 mm de diámetro, en un tubo de polipropileno se colocó la masa de siRNA suficiente para alcanzar la concentración final de 50 nM final (9 μ l de la dilución 20 μ M) y 600 μ l de OptiMEM, y en otro, 9,75 μ l de Lipofectamina 2000 y 600 μ l de OptiMEM por placa. Transcurridos 5 min, se transfirieron 600 μ l del tubo con Lipofectamina 200 a cada tubo con siRNA, se mezcló vigorosamente y se incubó por 20 min para que se formaran los complejos entre el poli-cation y el RNA. Luego, se agregó la mezcla a la placa, previamente lavada con

PBS para eliminar trazas de suero y con 2,5 ml de OptiMEM. Se incubó a las células durante 6 h a 37°C y a 5% CO₂ para la transfección y luego se reemplazó el medio por medio completo. 72 h después de la transfección se realizaron los experimentos.

La eficiencia de los silenciamientos en general fue verificada por RT-q-PCR utilizando *primers* específicos y normalizando a los niveles de *Hprt* (ver más adelante). Se consideraron aquellos experimentos donde al menos se redujeron 65% los niveles de mRNA.

3 Cultivos primarios neuronales

3.1 Animales

Los ratones fueron criados en condiciones estándar de laboratorio (temperatura 22 ± 1°C, humedad 55% ± 5%) con comida y agua *ad libitum*. Su manejo y uso experimental fue realizado bajo las normas y protocolos aprobados de acuerdo con la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio del Gobierno de Bavaria (Alemania) y aprobados por el Comité de Cuidado y Uso animal del Instituto Max Planck de Psiquiatría (Munich, Alemania).

Los animales utilizados en este trabajo fueron:

- ratones *wild-type* CD1
- ratones *Crhr1*^{loxP/loxP}; *Nex-Cre* (CRHR1^{CKO-Glu}): son ratones *knock-out* condicionales para *Crhr1*, que tienen deletado *Crhr1* en las neuronas glutamatérgicas del cerebro anterior. El *locus Crhr1* está flanqueado por sitios loxP y la recombinasa *Cre* se expresa en heterocigosis bajo el promotor *Nex*, que sólo se expresa en las neuronas glutamatérgicas del cerebro anterior. Descrito en detalle en Refojo *et al.*, 2011.
- ratones *Crhr1*^{loxP/loxP}; *R26*^{CAG::LSLtdTomato/CAG::LSLtdTomato} (CRHR1^{CKO-Ctrl}; Ai9): ratones *knock-out* para *Crhr1* que además tienen el sistema reportero de tdTomato. El *locus Rosa26* se modificó con un promotor de expresión constitutiva y fuerte CAG seguido por un cassette Stop flanqueado por sitios loxP y el gen tdTomato. De esta manera sólo en las células donde se exprese la recombinasa *Cre*, se expresa la proteína fluorescente (Madisen *et al.*, 2010).
- embriones de la cruce de ratones *Crhr1*^{loxP/loxP}; *Nex-Cre* (CRHR1^{CKO-Glu}) y *Crhr1*^{loxP/loxP}; *R26*^{CAG::LSLtdTomato/CAG::LSLtdTomato} (CRHR1^{CKO-Ctrl}; Ai9) cuyos posibles genotipos son *Crhr1*^{loxP/loxP}; *R26*^{+CAG::LSLtdTomato}; *Nex-Cre* y *Crhr1*^{loxP/loxP}; *R26*^{+CAG::LSLtdTomato}. La preparación de cultivos primarios de neuronas a partir del pool de embriones resultó en

aproximadamente 50% de neuronas glutamatérgicas que expresan proteína fluorescente tdTomato y además tienen delecionado *Crhr1*.

3.2 Preparación y mantenimiento de cultivos primarios de hipocampo y corteza

Se prepararon cultivos neuronales hipocampales y corticales a partir de embriones de ratones CD1 (E17,5-E18,5). Brevemente, las madres se sacrificaron por sobredosis de isoflurano. Los embriones fueron extraídos rápidamente, se sacaron los cerebros y se aislaron el hipocampo o parte de la corteza en medio de disección (HBSS suplementado con HEPES 1M y glutamina 200 mM, penicilina 100U/ml y esptreptomicina 100mg/ml. Se disgregó el tejido con tripsina 0,25% por 15 min a 37°C y luego mecánicamente con una pipeta pasteur de vidrio con la punta pulida. Se cosecharon las células por centrifugación 5 min a 800g.

Las células fueron cultivadas en medio Neurobasal-A suplementado con B27 2%, GlutaMAX-I 0,5 mM (Gibco) incubadas a 37°C en una atmósfera húmeda y 5% de CO₂. Las células se sembraron sobre cubreobjetos previamente lavados con cloroformo y etanol absoluto y cubiertos con poli-D-lisina 50 µg/ml (Sigma) y laminina 5 µg/ml (Invitrogen).

3.3 Transfección con DNA de cultivos primarios

Las neuronas fueron transfectadas mediante el método de fosfato de calcio (Jiang y Chen, 2006). Brevemente, para las células sembradas en 4 pocillos de placas de 24 pocillos sobre cubreobjetos, se colocaron en un tubo eppendorf 37,5 µl de agua, 8 µg de plásmido y 12,5 µl de CaCl₂ 1M y se agregó lentamente mientras se vortexeaba 50 µl de *buffer* BBS (BES 50 mM, NaCl 280 mM y Na₂HPO₄ 1,5 mM). Luego, se completó con 900 µl de medio Neurobasal-A, se incubó a temperatura ambiente por 15 min y se agregó a las células. Una vez transcurridas 2 h, se reemplazó el medio de transfección por el medio condicionado que se había sacado previamente. En general, los experimentos se realizaron 48 h después de la transfección.

4 Detección de mRNAs por hibridación *in situ*

4.1 Secciones de cerebro

Los ratones adultos fueron sacrificados por sobredosis de isoflurano. Los cerebros fueron extraídos cuidadosamente y congelados en hielo seco rápidamente. Los cerebros congelados fueron cortados con un crióstato en secciones coronales de 20 µM de grosor que se montaron en portaobjetos SuperFrost Plus (Thermo Scientific). Como control positivo de sAC se utilizaron secciones de testículo procesados de la misma forma. Las rodajas se guardaron a -20°C hasta el momento de procesarlas.

Las muestras fueron pretratadas antes de la hibridación para aumentar la eficiencia y reducir la tinción no específica. Las secciones fueron fijadas con paraformaldehído 4%, lavadas con PBS y luego acetiladas con trietanolamina 0,1 M, ácido acético 0,25% para disminuir la unión de las sondas en el tejido. Luego, las secciones fueron deshidratadas. Todas las soluciones fueron autoclavadas y se les agregó dietilpirocarbonato (DEPC) para preservar el RNA de la acción de nucleasas.

4.2 Hibridación *in situ* (ISH)

Se utilizaron tres sondas que se hibridizan al mRNA de sAC (número de acceso en GenBank NM173029.3):

- ISH1: nucleótidos 3553-4482
- ISH2: nucleótidos 4560-5191
- ISH3: nucleótidos 1391-2210

En primer lugar, se realizó una PCR, utilizando *primers* que reconocen los sitios T7 y T3 flanqueando el inserto clonado en el pBlueScript II, que se usó como molde. Luego, se realizó una transcripción *in vitro* usando los productos de PCR como molde para generar las sondas radiactivas. Se utilizó la mezcla de rNTPs (rATP/rCTP/rGTP) y ³⁵S-tio-rUTP y las RNA polimerasas T7 o T3 para generar las sondas *sense* y *antisense*, respectivamente.

La hibridación fue realizada durante la noche con una concentración de sonda de 7×10^6 c.p.m./ml a 58°C en cámara húmeda. Al día siguiente, los portaobjetos fueron lavados a 64°C en una solución salina de sodio citrato (15 mM NaCl, 1,5 mM Na-citrato, pH 7,4) y 0,1 M DTT. Las muestras hibridadas fueron reveladas por autoradiografía.

5 Estímulos y agentes farmacológicos

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

- CRH humano/rata (Bachem Biochemica): Ligando del receptor GPCR CRHR1 (y CRHR2 con menor afinidad). Se realizaron curvas concentración-respuesta entre 0,01 nM y 1 μ M, y en general se eligió la concentración de trabajo 10 nM en las células HT22-CRHR1. Cabe destacar que las secuencias de CRH de ratón, de humano y de rata son idénticas.

- UCN1 (Bachem Biochemica): Ligando de los receptores CRHR1 y CRHR2. Concentración final utilizada 10 y 100 nM.
- Isoproterenol (Sigma): Reactivo cedido gentilmente por las Dr. A. Bruzzone and I.A. Lüthy. Ligando de los receptores GPCR β 1- y β 2-adrenérgicos. Concentración final utilizada 10 μ M.
- PACAP38 (*Pituitary adenylate cyclase-activating peptide*, Calbiochem): Ligando del receptor GPCR PAC1. Concentración final utilizada 100 nM.
- 8-CPT-cAMP (8-(4-clorofeniltio)-adenosina-3',5'-monofosfato; Sigma): análogo de AMPc permeable a la membrana celular y más resistente a fosfodiesterasas. Concentración final utilizada 50 μ M.
- Forskolina (Sigma): diterpenoide permeable obtenido de *Coleus forskohlii* que activa a las adenilato ciclasas transmembrana. Concentración final utilizada 10 μ M.
- Suero: cuando se utilizó como estímulo el suero, se preincubaron a las células en ausencia de suero por al menos 5 h y luego se agregó 5% SFB.

En aquellos experimentos donde se analizaron los niveles de fosfo-proteínas en respuesta a estímulos (ERK1/2, AKT, CREB), las células se hambreadon de suero en medio OptiMEM por al menos 5 h antes del estímulo. Cuando se evaluó la dependencia de la respuesta al bicarbonato, se prepararon medios 0 y 25 mM de bicarbonato con 25 mM HEPES para regular el pH. El pH de ambos medios fue ajustado a 7,4 con NaOH y HCl, se dejaron equilibrar en la incubadora por 30 min y se ajustaron nuevamente. Las células se hambreadon en medio sin suero sin bicarbonato o bicarbonato 25 mM por 6 h previo al estímulo con CRH.

5.1 Agentes farmacológicos

En todos los casos, se preincubó con los distintos agentes farmacológicos 15-30 min antes del estímulo y se dejaron durante el tiempo del estímulo. Las concentraciones utilizadas están dentro de los rangos recomendados por los fabricantes teniendo en cuenta la afinidad y toxicidad. La concentración empleada en muchos casos es la que se utilizó previamente en la literatura, aunque para algunos compuestos hubo que ponerla a punto para las células HT22-CRHR1. Como tratamiento control se utilizó el vehículo de los distintos compuestos.

- IBMX (3-isobutil,1-metilxantina, Sigma): inhibidor no específico de las fosfodiesterasas de cAMP y cGMP ($IC_{50} = 2-50 \mu$ M). Concentración final utilizada 500 nM.
- H89 (371962, Calbiochem): inhibidor permeable de PKA ($K_i = 48 \text{ nM}$). Inhibe otras kinasas sólo a concentraciones más elevadas de la utilizada: CaM kinaasa 2 ($K_i = 29.7 \mu$ M), casein kinaasa 1 ($K_i = 38.3 \mu$ M), kinaasa de la cadena liviana de miosina ($K_i = 28.3 \mu$ M).

- μM), proteína kinasa C ($K_i = 31.7 \mu\text{M}$) y ROCK-II ($\text{IC}_{50} = 270 \text{ nM}$). Concentración final utilizada $10 \mu\text{M}$.
- KT5720 (K3761; Sigma-Aldrich): inhibidor permeable de PKA ($K_i = 60 \text{ nM}$), que no tiene efecto sobre otras kinasas como PKC o PKG ($K_i > 2 \mu\text{M}$). Concentración final utilizada 700 nM .
 - RpcAMPS (1337; Tocris Bioscience): inhibidor permeable de PKA ($\text{IC}_{50} = 11\text{-}16 \mu\text{M}$) altamente específico. Concentración final utilizada $75 \mu\text{M}$.
 - ESI09 (SML0814; Sigma-Aldrich): inhibidor específico de EPAC1 ($\text{IC}_{50} = 3,2 \mu\text{M}$) y EPAC2 ($\text{IC}_{50} = 1,4 \mu\text{M}$), que no tiene efecto sobre PKA a concentración $25 \mu\text{M}$. Concentración final utilizada $5 \mu\text{M}$.
 - U0126 (662005; EMD Millipore): inhibidor permeable, específico de MEK1 ($\text{IC}_{50} = 72 \text{ nM}$) and MEK2 ($\text{IC}_{50} = 58 \text{ nM}$). No compite con ATP ni con ERK. Tiene efecto despreciable sobre otras kinasas como Abl, Cdk2, Cdk4, ERK, JNK, MEKK, MKK-3, MKK-4/SEK, MKK-6, PKC y Raf. Concentración final utilizada $10 \mu\text{M}$.
 - PD98059 (513000, Calbiochem): inhibidor permeable, específico de MEK1 ($\text{IC}_{50} = 2 \mu\text{M}$) y MEK2 ($\text{IC}_{50} = 50 \mu\text{M}$). Concentración final utilizada $10 \mu\text{M}$.
 - 2',5'-dideoxiadenosina (2',5'-ddA, 288104, Calbiochem): inhibidor permeable y no competitivo de las tmACs ($\text{IC}_{50} = 3 \mu\text{M}$). Se une al sitio P de la enzima, siendo mucho menor su afinidad por la sAC. Concentración final utilizada $50\text{-}100 \mu\text{M}$.
 - KH7 (3834, Tocris Bioscience): inhibidor específico de la sAC ($\text{IC}_{50} = 3 - 10 \mu\text{M}$ *in vivo*). Inerte hacia las tmACs *in vitro* y en cultivos celulares hasta concentraciones $300 \mu\text{M}$. Concentración final utilizada $7,5\text{-}15 \mu\text{M}$.
 - 2-hidroxiestradiol (2-HE, 13019; Cayman Chemical): inhibidor específico de sAC ($\text{IC}_{50} = 2 \mu\text{M}$ *in vitro*), que no tiene efecto sobre las tmACs hasta concentraciones $100 \mu\text{M}$. Concentración final utilizada $20\text{-}40 \mu\text{M}$.
 - DMP696: antagonista específico de CRHR1, cedido generosamente por el Dr. Hausch (Instituto Max Planck de Psiquiatría, Munich, Alemania). Concentración final utilizada $5 \mu\text{M}$.
 - DIDS (D3514; Sigma-Aldrich): bloqueante de los transportadores de aniones, incluidos los transportadores de bicarbonato. Se ha reportado recientemente que también puede inhibir directamente a sAC (Kleinboelting *et al.*, 2014). Concentración final utilizada $450 \mu\text{M}$.

- BAPTA-AM (B6769; Thermo Fisher Scientific): quelante permeable a la membrana celular, altamente selectivo para calcio respecto a magnesio. Concentración final utilizada 100 nM.
- EGTA (E3889; Sigma-Aldrich): quelante no permeable, selectivo para calcio respecto a magnesio. Concentración final utilizada 500 μ M.
- Dyngo-4a (dinamina; ab120689; Abcam): inhibidor específico de dinamina ($IC_{50} = 200-400$ nM *in vitro*). Inhibe la endocitosis ($IC_{50} = 5,5$ μ M).

6 Western blot

6.1 Preparación de los extractos celulares

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

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

Las muestras fueron resueltas en geles de poliacrilamida 8-12% desnaturalizantes en *buffer* Tris-Glicina-SDS (Tris 25 mM pH 8,3, glicina 192 mM, 0,1% SDS). Para la identificación de los tamaños moleculares, se utilizó el marcador de peso molecular Broad Precision Marker (BioRad). Se realizó la corrida electroforética hasta que cayó el frente de corrida. Una vez finalizada, en general se realizó la transferencia a membranas de nitrocelulosa de 0,45 μ m de poro a 100 V durante 1 h en *buffer* de transferencia (Tris 25 mM pH 8,3, glicina 192 mM, 20% metanol). Luego, se tiñeron transitoriamente las membranas con rojo Ponceau para corroborar la correcta transferencia de las proteínas a la membrana y comparar cualitativamente las masas sembradas en cada calle. Se incubaron las membranas durante 1 hora en agitación con solución de bloqueo Blocking Buffer (Li-Cor Biosystems) o TBS-Tween 0,05% (Tris 25 mM pH7,4, NaCl 150 mM, Tween-20 0,05%) con 5% m/v de leche descremada para bloquear el pegado inespecífico. Teniendo en cuenta que la leche tiene fosfatasa, para la inmunodetección de fosfoproteínas, la solución de bloqueo fue inactivada calentándola durante 1 h a 60°C.

La incubación con los anticuerpos primarios se llevó a cabo durante la noche a 4°C en agitación. Las diluciones de los anticuerpos fueron preparadas en la misma solución de bloqueo. Las

membranas fueron lavadas tres veces durante 10 min con TBS-Tween 0,05%. Luego, según el tipo de revelado elegido:

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

- Para revelar por fluorescencia, se incubó con el anticuerpo secundario de la especie apropiada acoplado a los fluoróforos IRDye700DX o IRDye800CW (Li-Cor Biosystems) en una dilución 1:6000-1:10000 en solución de bloqueo por 1 h a RT en agitación. Luego de tres lavados de 10 min con TBS-Tween 0,05% y un cuarto lavado con TBS, la unión de los anticuerpos fue detectada con el equipo Odyssey Fc Imaging System (Li-Cor Biosystems).

Las señales inmunoreactivas fueron analizadas de forma digital utilizando el programa ImageJ (NIH). Los niveles de fosfoproteínas fueron relativizados a los niveles de proteína total en la misma membrana.

6.3 Anticuerpos utilizados

Los anticuerpos primarios utilizados en este trabajo fueron:

- anti-sAC (R21, CEP Biotech)
- anti-c-Myc (9E10, sc-40, Santa Cruz Biotechnology)
- anti-fosfo-ERK1/2 (E-4, sc-7383, Santa Cruz Biotechnology)
- anti-total-ERK1/2, (9102, Cell Signaling)
- anti-fosfo-CREB (06-519, EMD Millipore)
- anti-total-CREB (9104, Cell Signaling)
- anti-fosfo-AKT (4058, Cell Signaling)
- anti-total-AKT (2920, Cell Signaling)
- anti-FLAG (F3165, Sigma-Aldrich)
- anti-HA (MMS-101R, Covance)
- anti- β -actina (sc-47778, Santa Cruz Biotechnology)
- anti-GAPDH (6C5, ab8245, Abcam)
- anti-ratón acoplado a IRDye700DX (Rockland)
- anti-conejo acoplado a IRDye700DX (Rockland)

- anti-ratón acoplado a IRDye800CW (Rockland)
- anti-conejo acoplado a IRDye800CW (Rockland)
- anti-ratón acoplado a HRP (170-6516, BioRad)
- anti-conejo acoplado a HRP (170-6515, BioRad)
- anti-ratón, acoplado al fluoróforo Alexa Fluor 488 (A21202, Molecular Probes)
- anti-conejo, acoplado al fluoróforo Alexa Fluor 488 (A21206, Molecular Probes)
- anti-conejo, acoplado al fluoróforo Alexa Fluor 555 (A31570, Molecular Probes)
- anti-ratón, acoplado al fluoróforo Alexa Fluor 647 (A21235, Molecular Probes)
- anti-conejo, acoplado al fluoróforo Alexa Fluor 647 (A21245, Molecular Probes)

7 Manejo de plásmidos

En este trabajo se utilizaron los plásmidos detallados en la Tabla 4.

Plásmido	Descripción	Origen
pBlueScript II SK (+)	Vector de clonado usado de forma estándar	Agilent
pcDNA3.1(+)/Zeo	Vector vacío de expresión en células eucariotas	Invitrogen
pSAC5.02	Vector de expresión de sAC _f de rata	Addgene (16077)
sAC _t -HA	Vector de expresión de sAC _t de rata con etiqueta HA en el extremo C terminal	Generado en este trabajo
pcDNA3-c-Myc-mCRHR1	Vector de expresión de CRHR1 de ratón con etiqueta c-Myc en el extremo N terminal	Dr. Wolfgang Wurst, Instituto Max Planck de Psiquiatría, Alemania
pcDNA3-myc-GFP-CRHR1	Vector de expresión de la proteína de fusión GFP-CRHR1 de ratón con etiqueta c-Myc en el extremo N terminal	Dr. Jan Deussing, Instituto Max Planck de Psiquiatría, Alemania
mCherry	Vector de expresión de la proteína fluorescente roja mCherry	Dr. Mario Rossi, Instituto de Investigación en Biomedicina de Buenos Aires, Argentina

Venus	Vector de expresión de la proteína fluorescente amarilla Venus	Dr. Takeharu Nagai, Research Institute for Electronic Science, Hokkaido University, Japón
mTurquoise	Vector de expresión de la proteína fluorescente cyan mTurquoise	Dr. Theodorus Gadella, Citología Molecular, Institute for Life Sciences, University of Amsterdam, Holanda
Cerulean	Vector de expresión de la proteína fluorescente cyan Cerulean	Dr. Mitkowski, Instituto Max Planck de Medicina Experimental, Alemania
mTurquoise2-EPAC-cp173Venus-Venus (Epac-S ^{H187})	Vector de expresión del biosensor de cAMP basado en FRET Epac-S ^{H187}	Dr. Kees Jalink, Departamento de Biología Celular, The Netherlands Cancer Institute, Holanda
ICUE3	Vector de expresión del biosensor de cAMP basado en FRET ICUE3	Dr. Jin Zhang, Departamento de Farmacología y Ciencias Moleculares, Johns Hopkins University, Estados Unidos
AKAR4	Vector de expresión del biosensor de la actividad de PKA basado en FRET AKAR4	Dr. Jin Zhang, Departamento de Farmacología y Ciencias Moleculares, Johns Hopkins University, Estados Unidos
REX-GECO1	Vector de expresión del sensor genético de calcio REX-GECO1	Dr. Robert Campbell, Departamento de Química, University of Alberta, Canadá
Dinamina-K44A	Vector de expresión de la mutante dominante negativa de Dinamina	Dr. Jeffrey L. Benovic, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Thomas Jefferson University, Estados Unidos
EPAC1	Vector de expresión de EPAC1 humano	Dr. Daniel L. Altschuler, Departamento de Farmacología y Química Biológica, University of Pittsburgh, Estados Unidos
N-EPAC	Vector de expresión del dominante negativo de EPACs	Dr. Daniel L. Altschuler, Departamento de Farmacología y Química Biológica, University of Pittsburgh, Estados Unidos

Tabla 4 | Listado de los plásmidos utilizados en este trabajo. Se detallan el nombre con el que se lo identifica, su descripción y de dónde se obtuvo.

7.1 Clonados

7.1.1 Sensores de FRET

Se subclonaron los sensores ICUE3 y AKAR4 en el plásmido pcDNA3.1(+)/Zeo. En ambos casos se digirieron los vectores originales y el vector destino con las enzimas BamHI y EcoRI. Se purificaron el inserto y el vector destino y se ligaron los fragmentos. Para el subclonado de Epac-S^{H187} en el plásmido pcDNA3.1(+)/Zeo, se digirieron el vector original y el vector destino con las enzimas XbaI y HindIII. Se purificaron el inserto y el vector destino y se ligaron los fragmentos. En ambos casos, una vez seleccionados los clones positivos, se chequearon por restricción las contrucciones.

7.1.2 sAC-HA

A partir del plásmido pSAC5.02 obtenido de Addgene, que codifica para la forma larga o *full length* de sAC (sAC_{fl}) de rata, se subclonaron la forma *full length* (sAC_{fl}) y la forma corta o troncada (sAC_t) a la que se les agregó la etiqueta HA al carboxi-terminal.

Primer	Secuencia
sense	ATTTGCGGCCCGCCACCATGAGTGCCCCGAAGG
antisense sAC _{fl}	TTGGGCCCTTAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTAGAAAGGATTGTCCAG
antisense sAC _t	TTGGGCCCTTAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTAACACGACACTTTCTCATTGAGG

Tabla 5 | Secuencias de los *primers* utilizados para amplificar por PCR las secuencias de sAC_{fl} y sAC_t a partir del plásmido pSAC5.02, y generar los sitios de restricción para poder clonarlas en pcDNA3.1(+)/Zeo.

Se amplificaron por PCR los 1608 aminoácidos o los primeros 468 aminoácidos en el caso de sAC_t (Tabla 5). La secuencia del epitope HA fue agregada en el *primer* reverse. Los *primers* además codificaban para los sitios de las enzimas de restricción ApaI y NotI, que fueron utilizados para insertar en el sitio de clonado múltiple del plásmido pcDNA3.1(+)/Zeo, previamente digerido y desfosforilado con la enzima SAP (Thermo Scientific). La ligación se realizó utilizando la enzima T4 DNA ligasa (Thermo Scientific) según las instrucciones del fabricante. Una vez realizado el clonado y purificados los clones positivos, se verificó por restricción y por secuenciación la correcta construcción.

Al transfectar estas construcciones en distintas líneas celulares pudo detectarse por Western blot utilizando anticuerpos contra HA una proteína de 48 kDa en el caso de sAC_t-HA. Sin embargo, no se pudo detectar en ninguna de las condiciones ensayadas la expresión de sAC_n-HA a pesar de que la construcción fue realizada con éxito. A partir de lo reportado por otros grupos y comunicaciones orales con ellos, se hipotetiza que la forma *full length* es poco estable y puede sufrir proteólisis post traduccional o que la sobreexpresión de esta forma es más difícil.

7.1.3 Sondas para hibridación *in situ* de sAC

Primers	Secuencia	Sitio para restricción
sonda ISH1 (947 pb)	<i>sense</i> GCGGGATCCCTGCTGAAATCTCTGACGAATG	BamHI
	<i>antisense</i> CAATGCGGCCCGCGGAGTAAAGTCCCAGGAGGAGT	NotI
sonda ISH2 (628 pb)	<i>sense</i> TGCGCTCGAGACGAAGAACCCCGACAGTTC	XhoI
	<i>antisense</i> CGCAAGCTTACAGATGTGAGGTGCCTGTG	HindIII
sonda ISH3 (819 pb)	<i>sense</i> TGCGCTCGAGTGGGATCGTTGGACACACTG	XhoI
	<i>antisense</i> GCGAAGCTTGGCATAGAGCGGATGAGCTT	HindIII

Tabla 6 | Secuencias de los *primers* utilizados para amplificar por PCR las secuencias de las sondas para realizar la ISH de sAC a partir de RNA total de ratón y generar los sitios de restricción para poder clonaras en pBlueScriptII SK (+).

Se diseñaron tres sondas para realizar la hibridación *in situ* de sAC en rodajas de cerebro de ratón. Una de las secuencias fue la que está utilizada en el banco de datos Allen Brain Atlas (www.brain-map.org). Las otras dos secuencias se diseñaron contra otras partes del mRNA teniendo en cuenta:

- La selección de regiones de baja homología entre el transcritto de sAC y otros genes.
- Que el largo óptimo de las sondas es entre 400 y 1200 nucleótidos.
- Que la sonda esté localizada en las 3000 pb más cercanas a la cola de poli A.

Se extrajeron testículos de un ratón, se homogeneizó con un Ultraturrax, se purificó RNA total y se generó cDNA. Se amplificaron por PCR las secuencias de las distintas sondas con los *primers* detallados en la Tabla 6. Los *primers* además codificaban para los sitios de las enzimas de restricción que fueron utilizados para insertar en el sitio de clonado múltiple del plásmido pBlueScriptII SK(+), previamente digerido y desfosforilado con la enzima SAP (Thermo Scientific). La ligación se realizó utilizando la enzima T4 DNA ligasa (Thermo Scientific) según las instrucciones del fabricante. Una vez realizado el clonado y purificados los clones positivos, se chequeó por restricción la correcta construcción.

7.2 Preparación de bacterias competentes

Se siguió el protocolo de transformación descrito por Sambrook (Sambrook *et al.*, 2001). Bacterias *Escherichia coli* cepa DH5 α fueron utilizadas como fuente de bacterias competentes. Para alcanzar la competencia, las bacterias fueron sembradas en una placa de LB-agar libres de antibiótico suficientemente diluidas como para obtener colonias individuales, e incubadas a 37°C por 16 h. Una colonia fue picada y crecida durante 16 h en 5 ml de medio LB en agitación (200 rpm, 37°C). Una vez alcanzada la saturación, se inocularon 200 ml del LB nuevo que se incubó en las mismas condiciones hasta alcanzar una densidad óptica de 0,5 medida a 600 nm para estimar el crecimiento del cultivo. Luego se centrifugó por 10 min a 3000 rpm y el *pellet* bacteriano se resuspendió en 100 ml de CaCl₂ 100 nM frío. La suspensión de bacterias se centrifugó nuevamente a 4°C por 10 min a 3000 rpm. El *pellet* fue resuspendido en 5ml de CaCl₂ 100 nM e incubado en hielo por 30 min. Posteriormente, 200 μ l de la suspensión de bacterias fueron alicuotadas en tubos eppendorf con el agregado de glicerol hasta alcanzar una concentración final del 15%. Finalmente, las bacterias fueron conservadas a -80°C.

7.3 Transformación bacteriana y aislamiento de plásmidos

Se siguió el protocolo de transformación descrito por Sambrook (Sambrook *et al.*, 2001) modificado a partir del original de Hanahan (Hanahan, 1983).

50 μ l de bacterias competentes DH5 α de eficiencia al menos $1 \cdot 10^6$ colonias/ml, almacenadas a -80°C fueron descongeladas lentamente en hielo granizado. Una vez descongeladas se agregaron entre 50 ng y 1 μ g de plásmido, y se las incubó 30min en hielo. Rápidamente, se les aplicó un shock térmico de 90 s a 42°C y nuevamente se las colocó en hielo. Luego, se agregaron 700 μ l de medio LB sin antibiótico durante 45-60 min a 37°C. Finalmente, se tomaron cantidades variables de bacterias en LB (entre 50-500 μ l), dependiendo de la calidad y cantidad inicial del plásmido y se plaquearon en placas de LB con el antibiótico correspondiente.

7.4 Preparación de plásmidos a pequeña escala (mini-preparaciones)

Se utilizó el método de Birnboim y Doly (Birnboim y Doly, 1979). Tubos de vidrio conteniendo 3ml de medio LB con el antibiótico de selección correspondiente fueron inoculados con bacterias provenientes de colonias individuales portadoras del plásmido de interés o de glicerol guardados. Los cultivos fueron crecidos por 16 h a 37°C en agitación a 200 rpm. Luego, 1,5 ml de cultivo fueron trasvasados a tubos tipo eppendorf y centrifugados a 2000 rpm, 5 min. El *pellet* celular fue resuspendido en 300 µl de P1 (Tris-HCl 50 mM pH 7,5; EDTA 10 mM) conteniendo RNasa A (50 µg/ml). Luego, 300 µl de P2 (NaOH 0,2 N; SDS 1%) fueron agregados, mezclados por inversión y mantenidos por 5 min a temperatura ambiente. Se agregaron 300 µl de P3 (KAcO 3 M pH 5, 2) fría, se incubó la mezcla en hielo durante 20 min y se centrifugó a 10000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente. 700 µl del sobrenadante fueron precipitados con un volumen de isopropanol, y el *pellet* se lavó con 1 ml de etanol 70%. El *pellet* finalmente se dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió en 20 µl de H₂O.

7.5 Análisis de plásmidos por enzimas de restricción

Todos los plásmidos utilizados en este trabajo fueron analizados mediante mapeo por enzimas de restricción para asegurar la utilización de los plásmidos correctos. Para ello varias mini-preparaciones de DNA plasmídico fueron verificadas simultáneamente. 2-3 µl de DNA plasmídico proveniente de minipreparaciones fue sometido a digestión por enzimas de restricción siguiendo el siguiente protocolo: 2-3 µl de DNA plasmídico, 2 µl de *buffer* de restricción, 0,5 U de la enzima de restricción elegida y H₂O hasta completar 20 µl de volumen final. Las mezclas fueron incubadas durante 2 h a 37°C. Luego las bandas obtenidas fueron resueltas mediante electroforesis en geles de agarosa de entre 0,6-2% en *buffer* TBE (Tris-HCl 25 mM, Ácido Bórico 100 mM; EDTA 10 mM, pH 8,0) con bromuro de etidio. El porcentaje final de agarosa de los geles fue determinado según el tamaño de las bandas esperadas. Finalmente, las bandas fueron observadas en un transiluminador UV y documentadas de forma digital.

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

Los plásmidos chequeados fueron sujetos a amplificaciones a gran escala para obtener una masa suficiente para los experimentos de transfecciones mediante el uso de columnas de afinidad (QIAGEN). Brevemente, 250 ml de medio LB con el antibiótico de selección adecuado, fueron inoculados con bacterias provenientes de colonias individuales portadoras del plásmido de interés o stock guardados con glicerol a -80°C. Los cultivos fueron crecidos por 16 h aproximadamente a 37°C en agitación a 200 rpm y luego cosechados por centrifugación (6000 g

por 15 min a 4°C). El *pellet* celular fue resuspendido en 10 ml de P1 (Tris-HCl 50 mM pH 7,5; EDTA 10 mM) con RNAsa A (50 µg/ml). Se lisaron las células por desnaturalización alcalina agregando 10ml de P2 (NaOH 0,2N; SDS 1%) y manteniendo por 5min a temperatura ambiente. Luego, se neutralizó el lisado con 10 ml de P3 (KAcO 3 M pH 5,2) helada, se incubó la mezcla en hielo durante 20 min y se centrifugó a 20000 g durante 10 min a 4°C. El sobrenadante fue filtrado en un embudo con gasa y volcado en una columna QIAGEN-tip 500 (para maxipreparaciones) o tip-2500 (para megapreparaciones). La columna fue eluida por gravedad y lavada dos veces con 30 ml de *buffer* de lavado QC. Finalmente, el DNA retenido en la columna fue eluído con 15 ml *buffer* de elución QF. El DNA del eluído fue precipitado con 0,7 volúmenes de isopropanol en tubos COREX y centrifugado a 15000 g. El DNA precipitado fue lavado dos veces con etanol 70% y el *pellet* fue secado al aire durante 20 min y resuspendido en H₂O. La calidad del DNA plasmídico se verificó por geles de agarosa y la concentración final se cuantificó por absorbancia con un Nanodrop (Thermo Scientific).

8 RNA, transcripción reversa y PCR

8.1 Purificación de RNA

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

8.2 Transcripción reversa

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

8.3 PCR de punto final

Todas las reacciones de PCR fueron realizadas en 25 μ l de volumen final. Se utilizaron 1-2 μ l de la reacción de RT que contiene el cDNA que actúa como molde de la reacción de PCR. A cada tubo de reacción se le agregaron: 2,5 μ l de *buffer* de PCR sin $MgCl_2$, 1-2 μ l de $MgCl_2$ 25 mM, 1 μ l de la dilución 10 μ M de la mezcla de *primers forward* y *reverse*, 0,5 μ l de dNTPs 10 mM (mezcla equimolar de dATP, dTTP, dGTP y dCTP, Invitrogen); 0,3 μ l de enzima Taq DNA polimerasa (5 U/ μ l, PBL); H_2O c.s.p. 25 μ l volumen final. Para las reacciones de clonado se utilizó la enzima Platinum Taq DNA polimerasa HiFi (Invitrogen).

Los programas utilizados fueron ajustados según los *primers* utilizados y el amplicón: 5 min a 95°C, 30-40 ciclos de 30 s a 95°C, 30 s a 55-68°C y elongación 68/72°C (1 min/kpb de producto). Los productos de PCR se analizaron en general por electroforesis en geles de agarosa con bromuro de etidio.

8.4 PCR en tiempo real o cuantitativa

Todas las reacciones de PCR en tiempo real (*real-time PCR*, qPCR) fueron realizadas en 25 μ l de volumen final de forma similar a las PCR de tiempo final. Como molde se utilizaron 5 μ l de una dilución 1:20-50 de la reacción de RT. El seguimiento de la reacción se llevó a cabo mediante el agregado de Sybr Green 1:30000 (Roche) a la mezcla de reacción, que se realizó en el ciclador CFX96 touch real-time (BioRad).

El programa que se utilizó en todos los casos fue el siguiente: 5min a 95°C, 40 ciclos de 15s a 95°C, 15s a 60-68°C y 15s a 72°C, efectuándose la lectura de la fluorescencia al finalizar cada ciclo. Se realizó una curva de disociación térmica (curva de *melting*) para evaluar la especificidad de la reacción. Además, para determinar que sólo existiera un producto de la reacción, alícuotas de los productos de qPCR fueron analizadas en geles de agarosa 1.5-2% teñidos con bromuro de etidio, corroborándose también la identidad del producto en función del tamaño esperado. Para cada uno de los productos analizados, se realizó una curva de temperatura de hibridación y de concentración de magnesio para determinar las condiciones óptimas de reacción. En cada experimento se realizó una curva de calibración con diluciones al medio seriadas a partir de una mezcla de los cDNA de las reacciones de RT, para evaluar la eficiencia de la reacción de PCR y estimar la cantidad inicial relativa de molde en cada muestra. Las cantidades relativas iniciales del producto de interés fueron normalizadas en cada caso a los valores obtenidos para el cDNA de *Hprt* por el método de Ct.

8.5 Primers utilizados

Se utilizaron los pares de *primers* detallados en la Tabla 7. Se diseñaron utilizando los programas Beacon Designer y Primer3, las bases de datos PrimerBank (Harvard University) o MousePrimerDepot (NIH) o secuencias previamente reportadas en bibliografía.

Primers		Secuencia	Tamaño amplicón
sAC	<i>sense</i>	CCTGCATCGCTGTCTGGTAT	102 pb
	<i>antisense</i>	GAACTGTCGGGGTTCTTCGT	
Ac1	<i>sense</i>	GTGGCCAGTCGGATGGATAG	119 pb
	<i>antisense</i>	TTCACGCTGACTTTGCCTCT	
Ac8	<i>sense</i>	ACGTCATCATCTTCGCTTCCA	150 pb
	<i>antisense</i>	AGTACTCTGGGTAGGAGCAGA	
Epac1	<i>sense</i>	TCTTACCAGCTAGTGTTCGAGC	223 pb
	<i>antisense</i>	AATGCCGATATAGTCGCAGATG	
Epac2	<i>sense</i>	TAAAAGGCCGTTGGAGCGAT	195 pb
	<i>antisense</i>	GCCAGGACAGCATACCAGTT	
c-fos	<i>sense</i>	ATCGGCAGAAGGGGCAAAGTAG	172 pb
	<i>antisense</i>	GCAACGCAGACTTCTCATCTTCAAG	
Crhr1	<i>sense</i>	GGGCCATTGGGAAACTTTA	109 pb
	<i>antisense</i>	ATCAGCAGGACCAGGATCA	
Hprt	<i>sense</i>	TGGGCTTACCTCACTGCTTTCC	139 pb
	<i>antisense</i>	CCTGGTTCATCATCGCTAATCACG	
β -actina	<i>sense</i>	TGACGGGGTCACCCACACTGTGCCCATCTA	663 pb
	<i>antisense</i>	CTAGAAGCATTTGCGGTGGACGATGGAGGG	

Tabla 7 | Listado de las secuencias de los *primers* empleados para el estudio transcripcional de diferentes genes de interés. En todos los casos se muestra el nombre del gen y las secuencias de cada *primer* en sentido 5' a 3'.

Los pares de *primers* fueron analizados utilizando el Primer-BLAST para evaluar su especificidad. En el caso de los *primers* utilizados para qPCR, se eligieron secuencias que hibridaran en exones distintos (Genome Browser, UCSD) y amplificaran productos entre 75-300 pb.

9 Ensayos de Actividad Luciferasa

9.1 Preparación de extractos celulares

Las células AtT20 fueron sembradas en placas de 48 pocillos y transfectadas con 0,3 μg *Pomc-Luc* y 0,1 μg RSV- β -galactosidasa. Después de 24 h, las células fueron preincubadas con los inhibidores correspondientes y estimuladas con CRH 100 nM por 6 h. Las células fueron lavadas con PBS y lisadas con 100 μl de Passive Lysis Buffer (Promega). Las muestras se guardaron a -80°C .

9.2 Determinación de la actividad luciferasa

Los lisados se descongelaron a temperatura ambiente, se trasvasaron a tubos eppendorf, y luego de una centrifugación de 10 min a 12000 g, 20 μl del sobrenadante fueron mezclados con 100 μl del kit Beetle-Juice (PJK). La actividad de luciferasa fue medida en un lector de placas.

9.3 Determinación de la actividad β -galactosidasa

Para normalizar por diferencias en la eficiencia de transfección y número total de células cosechadas durante la preparación de los extractos, en todos los casos se co-transfectó el plásmido de interés con un plásmido control con el gen de la β -galactosidasa bacteriana bajo el promotor constitutivo viral RSV. Brevemente, en placas de 96 pocillos (fondo plano) se colocaron, por pocillo, 100 μl de *buffer* β -gal ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 100 mM pH 7,4, MgCl_2 1 mM, β -mercaptoetanol 50 mM, Orto-nitrofenil-galactopiranosido (ONPG) 0,66 mg/ml), y 20 μl del lisado celular. Se incubó a 37°C hasta el desarrollo de color amarillo. Finalmente, se midió la absorbancia a 415 nm.

10 FRET espectral para la determinación de cAMP y medición en simultáneo de cAMP y calcio

Las células HT22-CRHR1, AtT20, o 3T3L1-CRHR1, expresando de forma estable o transitoria las proteínas fluorescentes o los sensores de FRET (ICUE3, AKAR4 y Epac-S^{H187}) o calcio (REX-GECO1) fueron sembradas en pocillos con fondo de vidrio. La adquisición de las imágenes se realizó en un microscopio confocal invertido LSM 710 (Zeiss), equipado con una platina automática, una cámara de incubación para controlar la temperatura y el CO_2 y un sistema Definite Focus (Zeiss) para mantener el foco a lo largo del experimento. Se utilizó el programa ZEN Black 2011 (Zeiss) para el control del microscopio. Se utilizó un objetivo de inmersión de agua 40X con corrección por temperatura (C-Apochromat NA 1.2) y se

adquirieron fotografías de 1024×1024 píxeles, 16 bits, tiempo de escaneo por píxel $3,15 \mu\text{s}$ y *pinhole* abierto ($600 \mu\text{m}$).

La determinación de los espectros de emisión de las proteínas fluorescentes Cerulean, mTurquoise2, Venus, y REX-GECO1 unido a calcio se realizó utilizando los láseres de 405 nm o 488 nm para excitar a la muestra y el modo de detección Lambda, usando el detector QUASAR de 32 canales, configurado con un ancho de canal de 9,7 nm.

Para los experimentos de FRET, las células se iluminaron con el láser de diodo de 405 nm (30 mW, 2% de potencia, ganancia 550-650) y un espejo dicróico de 405 nm. La emisión fue captada entre las longitudes de onda 413 y 723 nm, cada 15 s, durante el tiempo de duración de cada experimento. Para la medición en simultáneo de cAMP y calcio, las células expresando de forma estable Epac-S^{H187} se transfectaron de forma transitoria con REX-GECO1. Las células se iluminaron con el láser de argón de 448 nm (25 mW, 2,5% de potencia, ganancia 650) y un espejo dicróico de 458 nm. La emisión fue captada entre las longitudes de onda 463 y 723 nm, cada 5 s, durante 10 min. Se verificó en cada experimento que las imágenes no estuvieran saturadas.

Para la determinación de los espectros de emisión de referencia y para los experimentos se utilizó medio DMEM/F12 sin rojo fenol, para reducir la fluorescencia de fondo, y suplementado con HEPES 20 mM, para controlar mejor el pH durante el experimento. Las adquisiciones se realizaron a 37°C y 5% CO_2 . Aproximadamente 2,5 min después de iniciar el experimento, se agregó el estímulo correspondiente a la concentración indicada. En algunos casos, las células se preincubaron 15 min con distintos compuestos y en otros, los inhibidores se agregaron después del estímulo.

En los experimentos de FRET espectral, se utilizó la función *Linear unmixing* para la deconvolución espectral a partir de los espectros de emisión de referencia de los distintos fluoróforos. La cuantificación de las imágenes se realizó con el programa Fiji. Se sustrajo la señal de fondo y luego, se midieron a nivel de célula única las intensidades del dador y el aceptor de FRET o de REX-GECO1 para cada tiempo. El cociente FRET/dador o la intensidad de REX-GECO1 fue calculada y normalizada a los niveles basales, previo a la estimulación, de cada célula.

11 Determinación bioquímica de cAMP

Los ensayos de medición bioquímica de cAMP fueron realizados en el laboratorio del Dr. Carlos Davio (Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA, Argentina). Las células HT22-CRHR1 fueron sembradas en placas de 12 ó 24 pocillos al 80% de confluencia y hambreadas de suero con OptiMEM durante 18 h. Las células fueron preincubadas 30 min con los inhibidores indicados y luego estimuladas con CRH 100 nM en medio OptiMEM. Luego, las células fueron sometidas a una extracción realizada con etanol seguida de una centrifugación por 15 min a 3000 g. Los sobrenadantes se secaron y se resuspendieron en *buffer* Tris-HCl 50 mM, pH 7,4. La cantidad de cAMP se determinó por medio de un ensayo de competencia con [³H]cAMP para la PKA, tal como se ha descrito previamente (Copsel *et al.*, 2011). Los resultados se expresan como el porcentaje de estimulación con relación a la respuesta máxima. La curva estándar se llevó a cabo usando ocho cantidades de cAMP, desde 0,1 a 90 pmol. Se analizaron las muestras por duplicado provenientes de al menos tres experimentos independientes.

12 Medición de calcio por indicadores fluorescentes

Las células fueron plaqueadas en pocillos con fondo de vidrio al 70% de confluencia. Al día siguiente, se cargó a las células por 30-60 min en oscuridad con Fluo-4 AM 6 μ M (Molecular Probes) y Pluronic F-127 0.14% (Molecular Probes) en un *buffer* Krebs Ringer (20 mM HEPES, 136 mM NaCl, 4,7 mM KCl, 1 mM NaH₂PO₄, 1 mM MgSO₄, and 1 mM CaCl₂, pH 7,4). Se lavó el medio de carga y se colocó la placa en el microscopio de fluorescencia Axio Observer Z1 (Zeiss), equipado con una cámara CCD AxioCam HRm3 digital, el controlador de platina XY STEP SMC 2009, la cámara de incubación XLmulti S1 (D) y el módulo de temperatura XL S1 (D). La adquisición se controló con el programa Zen Blue 2011 (Zeiss) y se tomaron fotografías con el objetivo de aire 20X (Plan-Apochromat NA 0.8 M27) de 14-bits, excitando en el LED Colibri.2 470 nm (5% potencia) y el filtro 38HE, adquiriendo con una exposición de 50 ms cada 5 s durante 10 min.

Cuando se indica, las células fueron preincubadas con distintos compuestos durante el cargado del indicador fluorescente. Aproximadamente 30 s después del inicio de la adquisición, se estimularon las células con CRH a una concentración final de 100 nM. Las imágenes fueron analizadas con el programa Fiji (NIH). Los niveles de calcio se midieron como cambios en la intensidad de fluorescencia respecto del basal, y se presentan como $\Delta F/F_0$, donde F_0 es la fluorescencia basal (antes de la estimulación) y ΔF es el cambio en la fluorescencia alcanzado

con el estímulo respecto de la condición basal. Se cuantificaron 30 - 40 células elegidas al azar en cada campo.

13 Análisis de la endocitosis de CRHR1 mediante citometría de flujo

Se cuantificó la internalización del receptor inducida por el ligando mediante la determinación por citometría de flujo de c-Myc-CRHR1 presente en a nivel de la membrana plasmática en distintas condiciones. Dado que no se cuenta con anticuerpos robustos para CRHR1, se utilizó la marcación indirecta usando anticuerpos que reconocen la etiqueta c-Myc de la construcción y anticuerpos secundarios fluorescentes. Esta técnica fue previamente optimizada durante la Tesis de Licenciatura de la Lic. Paula dos Santos Claro (Dos Santos Claro, 2016).

Las células HT22-CRHR1 fueron sembradas en placas de 60 mm de diámetro. 24 h más tarde, se hambreadon 1 h en OptiMEM previo al pretratamiento con agentes farmacológicos o la estimulación. Una vez finalizado el tiempo de estimulación las células fueron lavadas con PBS frío y levantadas mecánicamente, favoreciendo el despegado de las células adherentes con PBS-EDTA 1 mM. Después de dos lavados con PBS, se incubaron 2×10^5 células por condición analizada durante 1 h a 4°C con PBS 10% SFB para reducir el pegado inespecífico de los anticuerpos. Se cosecharon las células por centrifugación y en el volumen residual se agregaron con 0,2 µg de anticuerpo anti c-Myc por 2 h en un baño de agua-hielo en el mismo medio de bloqueo. Se lavaron las células con PBS 1% SFB, en el volumen residual se agregó 1,4 µg del anticuerpo secundario anti-ratón Alexa 647 (Molecular Probes) y se incubó en oscuridad por 1 h en un baño de agua-hielo. Todas las soluciones utilizadas contienen azida sódica 0,01%.

En forma paralela se prepararon los correspondientes controles de autofluorescencia, de anticuerpo primario realizando la marcación en la línea parental HT22 y de anticuerpo secundario en muestras donde no se incubó con el anticuerpo primario. Para la adquisición de datos se empleó un equipo FACsCANTO II (BD Biosciences). Los datos se analizaron con el programa FlowJo (Tree Star).

14 Microscopía confocal y análisis de la localización subcelular de GFP-CRHR1

Las células HT22-CRHR1 se sembraron sobre cubreobjetos de vidrio. En los casos de GFP-CRHR1 o sAC_i-HA, las células fueron transfectadas de forma transitoria con el plásmido c-Myc-GFP-CRHR1 o sAC_i-HA y 24 h más tarde se sembraron en cubreobjetos de vidrio. Al día

siguiente de plaquearlas sobre los cubreobjetos, se preincubaron las células con los compuestos indicados y se estimularon por los tiempos correspondientes. Finalizado el tratamiento, las células se lavaron con PBS frío y se fijaron con paraformaldehído 4% durante 15 min a temperatura ambiente. Cuando fue necesario, se permeabilizaron las células con 0,01% de Tritón X-100 en PBS por 15 minutos a temperatura ambiente.

Para las inmunomarcaciones, se incubaron los cubreobjetos durante 2 h en cámara húmeda con la dilución de anticuerpo en medio de bloqueo (1:200 HA, optimizados previamente), seguido de tres lavados con PBS-Tween 0,05%. Luego se incubó durante una hora en cámara húmeda con los anticuerpos secundarios acoplados a Alexa Fluor 488 o 647 en una dilución 1:500. Se lavó nuevamente con PBS-Tween 0,05%, y se realizó la tinción con DAPI (1:3000). Por último los vidrios se montaron sobre portaobjetos utilizando el medio de montaje Mowiol. En todos los casos se realizaron los controles de autofluorescencia (sin anticuerpo), de secundario (sin anticuerpo primario) y de primario (con las HT22 parentales sin el epítopo c-Myc).

Las imágenes fueron adquiridas en un microscopio confocal LSM 710 (Zeiss) mediante el programa ZEN Black 2011. Se utilizaron los objetivos C-Apochromat 40x/1.2 o LD C-Apochromat 63X/1.15 de inmersión en agua y corrección por temperatura. Las imágenes fueron obtenidas a 1024×1024, 8 bit, tiempo de escaneo por píxel de 4,6 μ s. En cada caso, se analizaron entre 15 a 20 células seleccionadas de manera azarosa. Las imágenes fueron analizadas utilizando el programa ZEN Black 2011 y el Fiji.

15 Análisis de los cambios morfológicos

Las células se sembraron en placas de 12 o 24 pocillos a una confluencia de 40%. 24h más tarde, se lavaron con PBS y se trataron con los distintos agentes farmacológicos y/o se estimularon por el tiempo indicado en OptiMEM manteniendo las células a 37°C y 5% de CO₂. Se fotografiaron las células en campo claro utilizando un microscopio de fluorescencia Axio Observer Z1 (Zeiss), equipado con una cámara CCD AxioCam HRm3 digital, la cámara de incubación XLmulti S1 (D) y el módulo de temperatura XL S1 (D). La adquisición se controló con el programa Zen Blue 2011 (Zeiss) y se tomaron fotografías con el objetivo de aire 40X. Se tomaron al menos 10 fotografías por cada tratamiento, seleccionando los campos al azar.

La cuantificación se realizó mediante el *plugin* Simple Neurite Tracer, que se distribuye como parte del programa Fiji. De cada fotografía, se eligió cuantificar aquellas células que estuvieran poco superpuestas con otras, para poder medir correctamente las trayectorias. Se determinó el

largo de la neurita más larga y el diámetro de la célula en píxeles y luego se realizó el cociente. Para cada tratamiento, se midieron en total al menos 100 células de 10 campos distintos.

16 Ensayo de migración por cierre de la herida

Las células HT22-CRHR1 fueron sembradas en una placa de 24 pocillos y se las dejó crecer a confluencia. Se realizó una herida en la monocapa con un tip estéril, se lavó exhaustivamente y se cambió el medio a DMEM 1% SFB, para disminuir la tasa de proliferación, y en aquellas condiciones estimuladas, se agregó CRH. Cabe destacar que como las células no fueron hambreadas de suero la proliferación de las células es significativa durante el tratamiento.

Se tomaron fotografías de campo claro de las heridas cada 15 min durante 24 h un microscopio de fluorescencia Axio Observer Z1 (Zeiss), equipado con una cámara CCD AxioCam HRm3 digital, y la cámara de incubación XLmulti S1 (D) y el módulo de temperatura XL S1 (D) para mantener las condiciones de cultivo a 37°C y 5% de CO₂. La adquisición se controló con el programa Zen Blue 2011 (Zeiss) y se tomaron fotografías con el objetivo de aire 10X.

El cierre de la herida fue cuantificado utilizando un macro diseñado por la Lic. Fabiana Rossi (Instituto de Investigación en Biomedicina de Buenos Aires) para el programa Fiji que determina de forma automática el área ocupada por las células a lo largo del tiempo, que está determinada por el número de células y su migración.

17 Ensayo de proliferación con cristal violeta

Las células HT22-CRHR1 fueron sembradas en placas de 24 pocillos a una densidad del 25%. 24h más tarde, las células se trataron con los distintos agentes farmacológicos y/o se estimularon por el tiempo indicado en DMEM 1% SFB excepto que se indique diferente, manteniendo las células a 37°C y 5% de CO₂. Luego, se removió el medio de estimulación y las células se lavaron con PBS frío y se fijaron agregando metanol por 15 min. Se mantuvieron las muestras en PBS a 4°C hasta el momento de la tinción.

La tinción fue realizada agregando 200 µl de solución 0,5% de cristal violeta en agua por pocillo durante 15 min a temperatura ambiente. Las placas se lavaron con agua, se secaron y el cristal violeta remanente fue solubilizado agregando 200 µl de metanol por pocillo y agitando. Se transfirieron 100 µl de cada pocillo a un pocillo de una placa de 96 pocillos fondo plano y se midió la absorbancia a 595 nm en un lector de placas. Cada condición se hizo por triplicado en cada experimento.

18 Ensayo de apoptosis

Las células HT22-CRHR1 fueron sembradas en placas de 6 pocillos y 24 h más tarde, se estimularon durante 24 h con CRH 100 nM en OptiMEM. Luego, las células fueron lavadas con PBS, se tripsinizaron y se cosecharon por centrifugación. Como control positivo se utilizaron células HT22-CRHR1 que una vez cosechadas fueron incubadas durante 30 min a 60°C.

La apoptosis se determinó mediante la marcación de la fosfatidilserina expuesta con anexina V-PE y la exclusión del colorante vital 7-amino actinomicina (7-AAD) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (BD Biosciences). Brevemente, las células se resuspendieron en 100 μ l de *buffer* de unión (HEPES 0,1 M pH 7,4, NaCl 1,4 M, CaCl₂ 25 mM) y se incubaron durante 30 min con 5 μ l de anexina V-PE y 5 μ l de 7-AAD. Luego, se agregaron 400 μ l de *buffer* de unión y se analizó la fluorescencia por citometría de flujo (FACsCANTO II, BD Biosciences). Además, como controles para la compensación y la determinación de los cuadrantes se prepararon células no marcadas, células marcadas sólo con anexina V-PE y células marcadas sólo con 7-AAD. Los datos se analizaron con el programa FlowJo (Tree Star) para determinar la proporción de células apoptóticas.

19 Análisis de la progresión del ciclo celular

Las células HT22-CRHR1 fueron sembradas en placas de 6 pocillos y 24 h más tarde, se estimularon durante 24 h con CRH 100 nM en OptiMEM. Luego, las células fueron lavadas con PBS, se tripsinizaron y se cosecharon por centrifugación. Se fijaron las células agregando de a gotas etanol 70% frío. Se mantuvieron las muestras a -20°C hasta el marcado.

Para el marcado del contenido de DNA las células se lavaron con PBS y se tiñeron incubando con una solución de yoduro de propidio (50 μ g/ml yoduro de propidio y 50 μ g/ml RNAsa A) durante 30 min a temperatura ambiente. Se analizaron las muestras mediante citometría de flujo (FACsCANTO II, BD Biosciences). Los datos se analizaron con el programa FlowJo (Tree Star) para determinar la proporción de células en los distintos estadios del ciclo celular.

20 Identificación de interactores de sAC

20.1 Optimización de la inmunoprecipitación de sAC_t-HA

Las células HT22-CRHR1 fueron transfectadas con sAC_t-HA por 48 h y luego fueron estimuladas con CRH 100 nM en OptiMEM en aquellos casos donde se indica. Una vez

finalizado el tiempo de estimulación las células fueron lavadas con PBS frío y levantadas mecánicamente, con PBS-azida sódica 50 mM. Se cosecharon las células por centrifugación, se descartó el sobrenadante y el *pellet* se guardó a -80°C hasta que fue utilizado.

Se pusieron a punto las condiciones para que sAC_t-HA se solubilizara probando diferentes combinaciones de detergentes y protocolos. Los mejores resultados fueron obtenidos utilizando un *buffer* para la lisis TrisHCl 25 mM pH 7.5, EDTA 2 mM, NaCl 125 mM), al que se le agregó el cóctel de inhibidores de proteasas (Roche Molecular Biomedicals; 1:25), ortovanadato de sodio (Sigma; 8 mM) y PMSF (Sigma; 1 mM). Las muestras se disgregaron con una jeringa (3 veces con aguja 21G y 3 veces con aguja 27,5G) en hielo. Luego, se agregó el detergente NP40 a una concentración final 1%. Los extractos fueron lisados durante 1 h a 4°C en rotor giratorio y centrifugados 4 min a 6200 g a 4°C . El sobrenadante fue utilizado como *input*.

Los lisados celulares fueron incubados en agitación con 20 μl de proteína A acoplada a sefarosa al 20% durante 1 h a 4°C (clarificación o *pre-clear*). Luego, se descartó la resina, y se separó una alícuota como *input*. Los extractos fueron incubados en agitación con 1 μg de anticuerpo específico contra HA durante toda la noche a 4°C en agitación. Posteriormente fueron agregados 30 μl de proteína A acoplada a sefarosa al 20% y, tras una incubación en agitación de 2 h a 4°C , los inmunoprecipitados fueron lavados una vez con PBS frío. Los inmunoprecipitados se resuspendieron en *buffer* 2X Laemmli, las muestras fueron calentadas por 30 min a 60°C , se agregó el agente reductor DTT y se calentaron por 10 min adicionales a 85°C . Los *input*, los *output* y los inmunoprecipitados fueron analizados por ensayos de Western blot.

20.2 Ensayos de Inmunoprecipitación de sAC_t-HA para identificación proteómica

Para maximizar la identificación de proteínas que interactúan con sAC_t-HA, utilizamos tres placas de 10 cm de diámetro por condición. Las inmunoprecipitaciones se realizaron en un volumen final de 1400 μl y se agregaron 1 μg de anticuerpo anti-HA y 40 μl de proteína A acoplada a sefarosa al 20%. Los inmunoprecipitados fueron corridos en un gel de poliacrilamida con SDS 12%. Luego de la electroforesis, las proteínas se tiñeron con Coomassie Brilliant Blue siguiendo instrucciones del fabricante (BioRad) y escaneadas con el densitómetro GS-800 usando el programa PDQuest (BioRad).

20.3 Análisis proteómico por LC-ESI-MS/MS

El análisis se realizó en el laboratorio del Dr. Chris W. Turck (Instituto Max Planck de Psiquiatría, Munich, Alemania). Las distintas calles de gel se cortaron en 24 porciones iguales y se sometieron a la digestión con tripsina, siguiendo el protocolo que detallamos previamente (Bonfiglio *et al.*, 2011b). Resumidamente, cada fragmento de gel se destiñó tres veces con

acetonitrilo (ACN)/NH₄HCO₃ 25 mM, pH 8,5. Luego se secaron a temperatura ambiente, se rehidrataron con NH₄HCO₃ 25 mM y se las sometieron a un ambiente fuertemente reductor (DTT 10 mM durante 30 min a 56°C en oscuridad). Luego, habiendo quitado el sobrenadante, se agregó iodoacetamida (agente carboximetilante) 55 mM preparada en NH₄HCO₃ 25 mM. La reacción de carboxiamidometilación procedió durante 30 min a temperatura ambiente en oscuridad. Para la digestión enzimática se agregaron 200 ng de tripsina (en NH₄HCO₃ 20 mM a pH 8,5) a cada porción de gel. La reacción enzimática se llevó a cabo a 37°C durante la noche. Para detener la reacción enzimática, se agregó ácido acético 1% v/v. Después de la digestión, los péptidos se extrajeron por incubación con solución acuosa de ácido fórmico al 2%/ACN a temperatura ambiente durante 20 min y luego se sonicaron durante 5 min. El procedimiento de extracción se repitió dos veces. Los sobrenadantes se juntaron y finalmente se evaporaron (Savant Speedvac Plus SC210A; Thermo Scientific).

Los péptidos liofilizados fueron resuspendidos en 12 µl de ácido fórmico al 0,1% (en solución acuosa). Luego se colocaron 5 µl en una nanocolumna de sílica empaquetada RP-C18 (0,075 mm x 20 cm). La columna se lavó con 0,1% de ácido fórmico durante 10 min y se eluyó con un gradiente de 95% acetonitrilo/0,1% ácido fórmico a partir de 2% a 10% en 2 min, de 10 a 45% en 45 min, con un caudal de 200 nl/min utilizando el sistema nano LC-2D (Eksigent). El sistema fue acoplado en línea a un espectrómetro de masa LTQ-Orbitrap equipado con una fuente de nano spray (Thermo Fisher Scientific). El espectrómetro de masas fue operado en el modo de ion positivo, voltaje de pulverización de iones de 2kV, permitiendo el cambio automático, dependiente de los datos de adquisición, entre MS y MS/MS. Todas las adquisiciones fueron registradas en el analizador de masas del Orbitrap, con un intervalo de masas de m/z 380-1,600, con una resolución de 60.000 (a un relación m/z de 400). El análisis MS/MS de los tres iones peptídicos más intensos para cada adquisición se grabó en el analizador de masas LTQ.

20.4 Asignación por búsquedas en bases de datos

La identificación de las proteínas se consiguió mediante la búsqueda y comparación contra la base de datos SwissProt 15,3 (uniprot29.05.09), definiendo *Mus musculus* como especie taxonómica, tripsina como enzima mediante la cual se digirieron las proteínas, y permitiendo que un único sitio de escisión se hubiera omitido. La oxidación de metionina y la carboxiamidometilación de cisteína se establecieron como modificaciones dinámicas y estáticas, respectivamente. Las exactitudes de masa de los precursores y de los fragmentos iónicos se fijaron en 20 ppm y 0,7Da, respectivamente. Para la identificación de péptidos, se buscaron espectros MS/MS con el apoyo de Mascot 2.2. Los resultados con significancia mayor al 95%

fueron aceptados. La identificación de proteínas fueron considerados confiables cuando, al menos, 2 péptidos estaban presentes. Las tasas de falsos positivos de identificación se evaluaron en todos los datos utilizando una base de datos de proteínas aleatorio creado con el apoyo de un script decoy.pI (www.matrixscience.com).

21 Tratamiento estadístico de los datos

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

Resultados

La activación de CRHR1 induce la diferenciación de las células HT22-CRHR1

En el trabajo de mi Tesis de Licenciatura demostramos que la activación de CRHR1 por CRH es capaz de inducir cambios morfológicos en la línea celular neuronal hipocampal HT22, caracterizados por el crecimiento de neuritas (Inda, 2012). Se observó que el efecto neuritogénico de CRH ocurre en el rango de concentraciones 1-100 nM (Figura 10a), que está mediado por un aumento en los niveles de cAMP intracelular (Inda, 2012) y que el agregado de análogos permeables de cAMP como 8-CPT-cAMP también promueven el crecimiento de neuritas (Figura 10b).

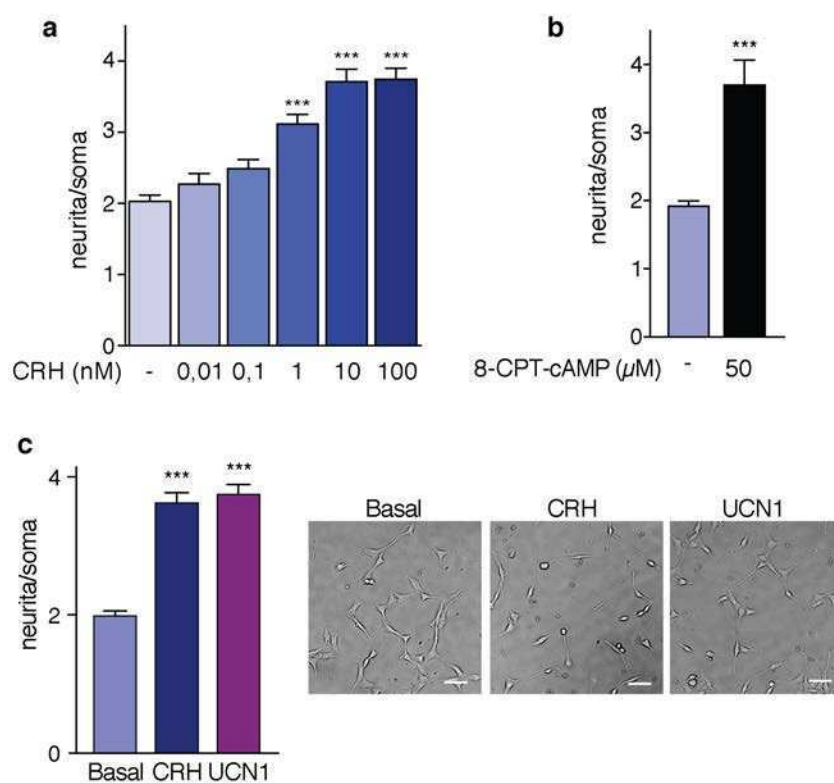


Figura 10 | Efecto neuritogénico de la activación de CRHR1

El crecimiento de neuritas en células HT22-CRHR1 fue analizado después de 20 h de estímulo como el cociente entre la neurita más larga y el diámetro del soma en cada célula. Datos: media \pm SEM (n = 3). ***, $p < 0,001$ respecto del basal por ANOVA de un factor de medidas repetidas y prueba *post hoc* de Tukey.

a-b, Las células fueron estimuladas con distintas concentraciones de CRH o con el análogo permeable de cAMP, 8-CPT-cAMP en OptiMEM.

c, Las células fueron estimuladas con CRH o UCN1 100 nM. Se muestra una fotografía representativa de cada tratamiento. Barra: 50 μ m.

Dado que CRH no es el único ligando endógeno de CRHR1, para determinar si el efecto neuritogénico dependía de un ligando particular de CRHR1, comparamos el cambio

morfológico disparado por CRH y UCN1, que también se une con alta afinidad al receptor. Los cambios morfológicos en las células HT22-CRHR1 en respuesta a CRH y a UCN1 fueron similares (Figura 10c). Al estimular las células tanto con CRH como con UCN1, la fosforilación del CREB en Ser133 también fue comparable en términos de la dependencia de la concentración de ligando, como en cuanto a la cinética de activación, observando en ambos casos la respuesta máxima luego de 30-40 min del agregado del estímulo (Figura 11).

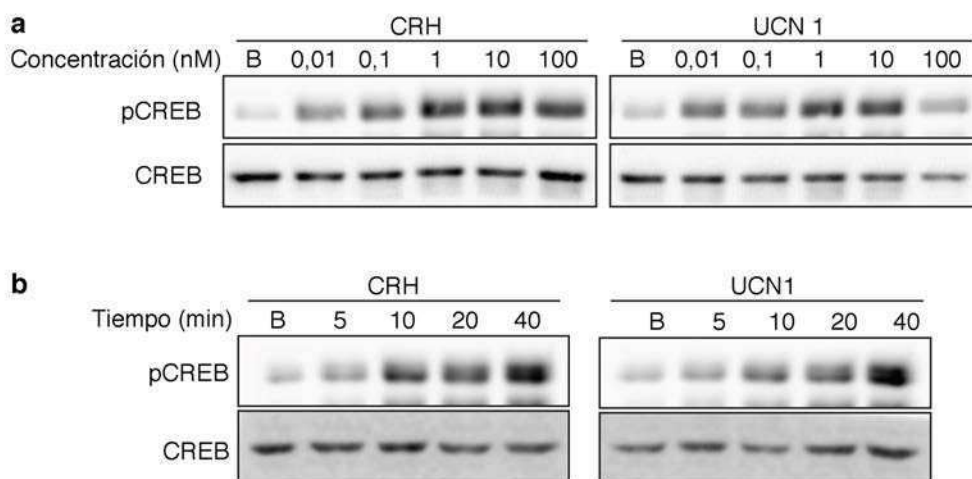


Figura 11 | Activación de CREB en respuesta a CRH y UCN1

Las células HT22-CRHR1 fueron estimuladas con CRH o UCN1 en OptiMEM por 40 min con las concentraciones indicadas (a) o por los tiempos indicados con 100 nM de ligando (b). Los niveles de CREB fosforilado (pCREB) y total fueron determinados por Western Blot.

CRH estimula la diferenciación de la línea celular HT22-CRHR1

El rol del cAMP en la regulación de la proliferación y la diferenciación celular ha sido el objeto de gran cantidad de estudios, siendo paradójica la capacidad del cAMP de aumentar la proliferación de algunos tipos celulares mientras que promueve la diferenciación celular de otros. Dado que la diferenciación neuronal es el resultado de múltiples y complejos mecanismos celulares, entre los que se incluyen los cambios morfológicos y el arresto de la proliferación, nos preguntamos si CRH también ejercía una regulación en la proliferación de las células HT22-CRHR1. Utilizamos dos estrategias para evaluar cambios en el número de células. En primer lugar, realizamos un ensayo de cierre de herida o *wound healing*. Se realizó una laceración en una monocapa de células HT22-CRHR1, para crear una superficie libre de células y luego se tomaron fotografías de campo claro con un microscopio para cuantificar a lo largo del tiempo el área cubierta por células. En este ensayo, el cierre de la herida es producto tanto de la motilidad celular como de la proliferación. Elegimos realizar el experimento a tiempos largos (24 h) y en

presencia de 1% suero fetal bovino (SFB) para que la proliferación celular fuera el componente más importante. Se observó que el área cubierta por células en presencia de CRH (10 y 100 nM) fue significativamente menor que en condiciones basales (Figura 12). Además, los cambios morfológicos inducidos por CRH fueron evidentes en las células del borde de la herida.

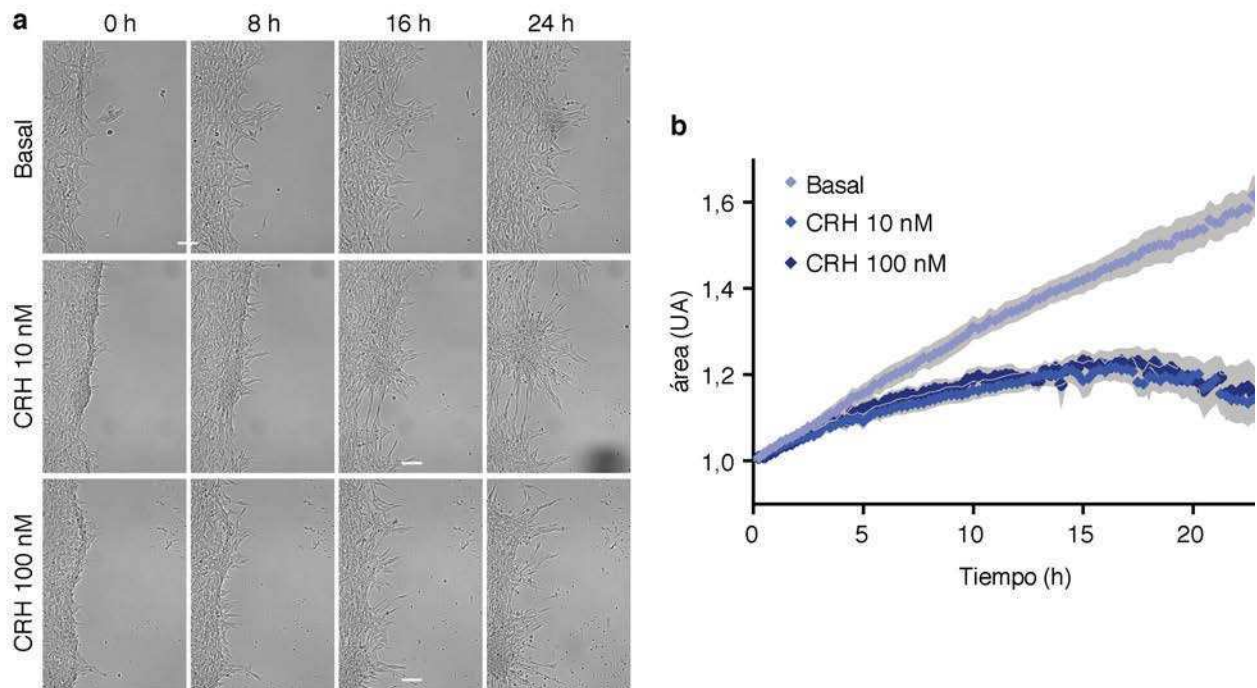


Figura 12 | Ensayo de cierre de herida

Una monocapa de células HT22-CRHR1 fue lacerada con un *tip* para generar un área libre de células. Luego, las células fueron estimuladas con CRH 10 o 100 nM en DMEM 1% SFB, y se obtuvieron fotografías en campo claro durante 24 h.

a, Se muestran fotografías representativas a distintos tiempos. Barra: 100 μ m.

b, Cuantificación del área ocupada por células en función del tiempo en cada tratamiento, respecto del tiempo 0. Datos: media \pm SEM, n = 8.

Como segunda aproximación, se utilizó un ensayo colorimétrico. El cristal violeta es un colorante que puede unirse a las proteínas y al DNA, y por lo tanto, brinda información sobre la cantidad de células adheridas a la placa. Se observó un menor número de células en los pocillos que fueron incubados por 48 h con distintas concentraciones de CRH (Figura 13). Más aún, un efecto similar fue observado cuando se incubó a las células con 8-CPT-cAMP. En línea con lo observado previamente, CRH y UCN1 redujeron de manera similar la proliferación de las células a lo largo del tiempo (Figura 14a).

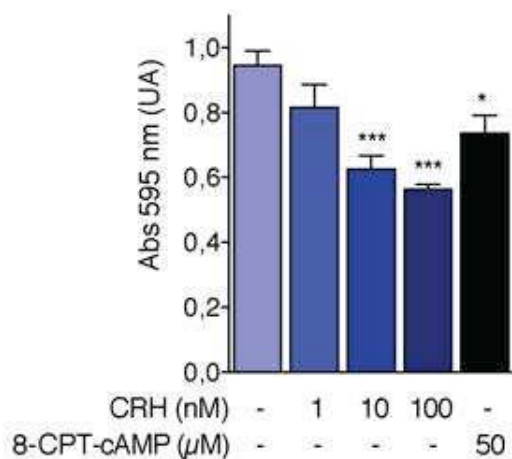


Figura 13 | Ensayo de tinción con cristal violeta

Las células HT22-CRHR1 fueron estimuladas con distintas concentraciones de CRH o con el análogo permeable de cAMP, 8-CPT-cAMP en DMEM 1% SFB por 48 h. Las células fueron fijadas y teñidas con cristal violeta. El colorante fue disuelto en metanol y se midió la absorbancia a 595 nm. Datos: media \pm SEM, n=3. *, p<0,05 ***, p<0,001 respecto del basal para cada condición por ANOVA de un factor, seguido por la prueba *post hoc* de Tukey.

Luego, comparamos el efecto de CRH en células cultivadas en ausencia o en presencia de suero. Mientras que fue claro el rol del suero como un agente proliferativo, CRH indujo el arresto de la proliferación en ambas condiciones (Figura 14b). Estos resultados indican que la activación de CRHR1 no sólo tiene un efecto neuritogénico sino que también induce el arresto de la proliferación en las células HT22-CRHR1. Además, estos procesos no parecen depender de la naturaleza del ligando, siendo similares los efectos observados para CRH y para UCN1. Se concluye de esta manera que tanto CRH como UCN1 estimulan cascadas de transducción de señales que promueven la diferenciación celular de la línea celular hipocampal HT22.

CRH no interfiere con la viabilidad celular sino que induce un arresto del ciclo celular

El efecto dependiente de CRHR1 en el número de células puede ser producto de la promoción activa de la apoptosis o del arresto del ciclo celular. Para distinguir entre estos dos escenarios, primero examinamos si CRH aumentaba la apoptosis determinando por citometría de flujo la unión de anexina V-PE y la tinción con 7-amino actinomicina (7-AAD). La apoptosis es un proceso caracterizado por ciertos cambios morfológicos, incluyendo la pérdida de la asimetría de la membrana plasmática, la condensación del citoplasma y el núcleo, y la fragmentación del DNA. Anexina V es una proteína que se une a fosfatidilserina con alta afinidad y que se utiliza como un marcador de apoptosis temprana, ya que la translocación de fosfatidilserina de la hemimembrana interna a la externa de la membrana plasmática es uno de los primeros eventos en las células apoptóticas. 7-AAD es un colorante vital que es excluido de las células con membranas intactas, mientras que permea aquellas células muertas o en estadios tardíos de la apoptosis. Se observó que el tratamiento con CRH no modificó de forma significativa el porcentaje de células viables, marcadas con anexina V o con la doble marca anexina V/7-AAD,

sugiriendo que es similar la proporción de células apoptóticas en condiciones basales o estimuladas (Figura 15a-b).

Por otra parte, se estudió si la activación de CRHR1 regula la progresión del ciclo celular. Se utilizó el colorante ioduro de propidio, que tiene afinidad por el DNA, para determinar el contenido de DNA en cada célula mediante la detección de fluorescencia por citometría de flujo y estudiar las subpoblaciones en los diferentes estadios del ciclo celular. En aquellas células HT22-CRHR1 estimuladas con CRH se observó una mayor proporción de células en el estadio G_0/G_1 (Figura 15c-d) indicando que CRH inhibe la progresión del ciclo celular. En conjunto, estos resultados indican que la activación de CRHR1 no sólo tiene un efecto neuritogénico en las células HT22-CRHR1, si no que además inhibe la proliferación celular mediante un arresto de las células en G_0/G_1 .

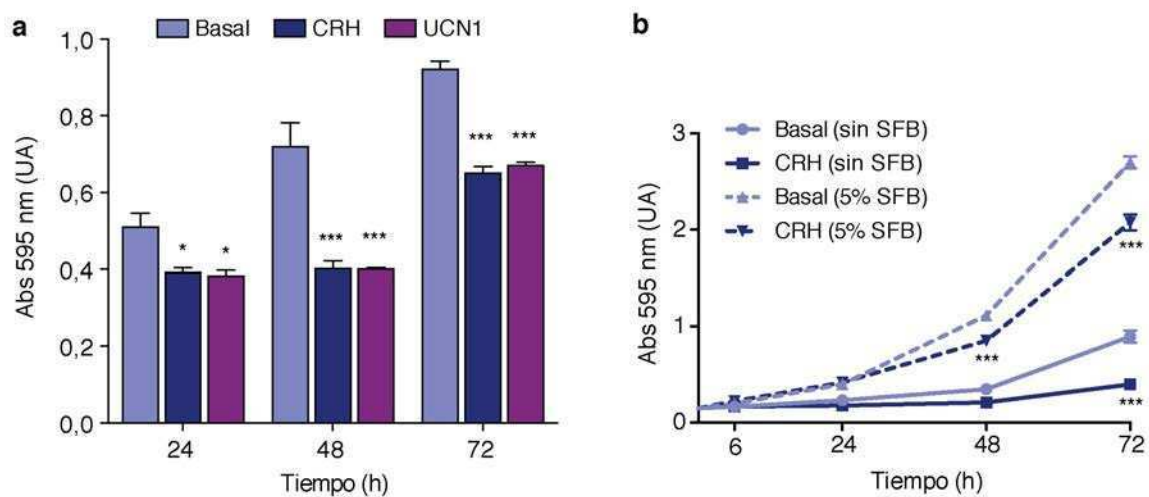


Figura 14 | Efecto de CRH, UCN1 y presencia de suero en el ensayo de tinción con cristal violeta

Las células HT22-CRHR1 fueron estimuladas por los tiempos indicados. Las células fueron fijadas y teñidas con cristal violeta. El colorante fue disuelto y se midió la absorbancia a 595 nm. Datos: media \pm SEM, $n = 3$. *, $p < 0,05$ ***, $p < 0,001$ respecto del basal para cada condición por ANOVA de un factor, seguido por la prueba *post hoc* de Tukey.

a, Se estimuló con CRH o UCN1 100 nM por los tiempos indicados.

b, Se estimuló con CRH 100 nM en DMEM libre de suero o en presencia de 5% SFB por los tiempos indicados.

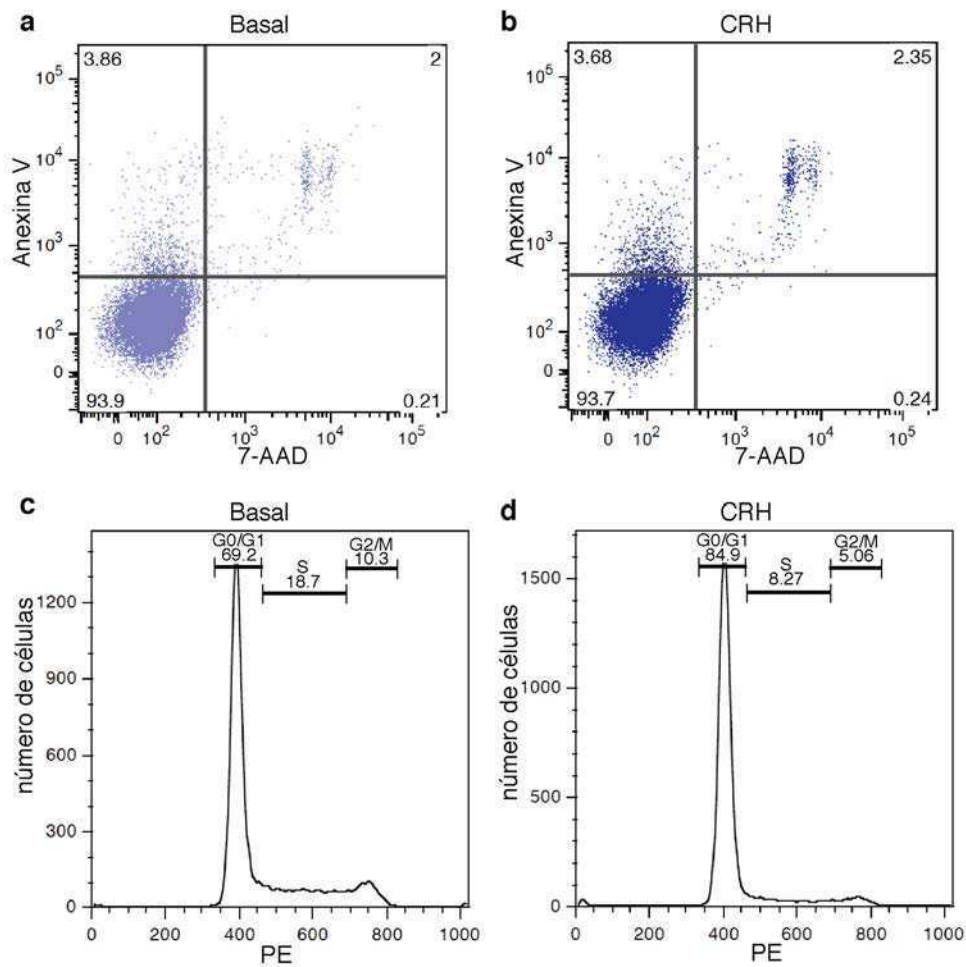


Figura 15 | Estudio de la apoptosis y la progresión del ciclo celular

Las células HT22-CRHR1 fueron incubadas en condiciones basales (a, c) o estimuladas con CRH 100 nM (b, d) por 24 hs en OptiMEM.

a-b, Las células se marcaron con anexina V y 7-AAD y la fluorescencia se midió por citometría de flujo para estudiar la apoptosis. Se muestra un diagrama de puntos representativo de tres experimentos independientes. Se indica el porcentaje de células en cada cuadrante.

c-d, Las células se tiñeron con ioduro de propidio y se determinó el contenido de DNA de cada célula y la progresión del ciclo celular. Se muestra un histograma representativo de tres experimentos independientes. En las cotas se indican el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular (G₀/G₁, S, G₂/M).

El suero antagoniza la diferenciación dependiente de CRH en células HT22-CRHR1

Luego, nos preguntamos si existía cierta relación entre el efecto de CRH y el de un estímulo proliferativo, como el suero. El suero es una mezcla compleja, en el que están presentes factores de crecimiento que no señalizan por la vía de cAMP (Stork y Schmitt, 2002). Observamos que

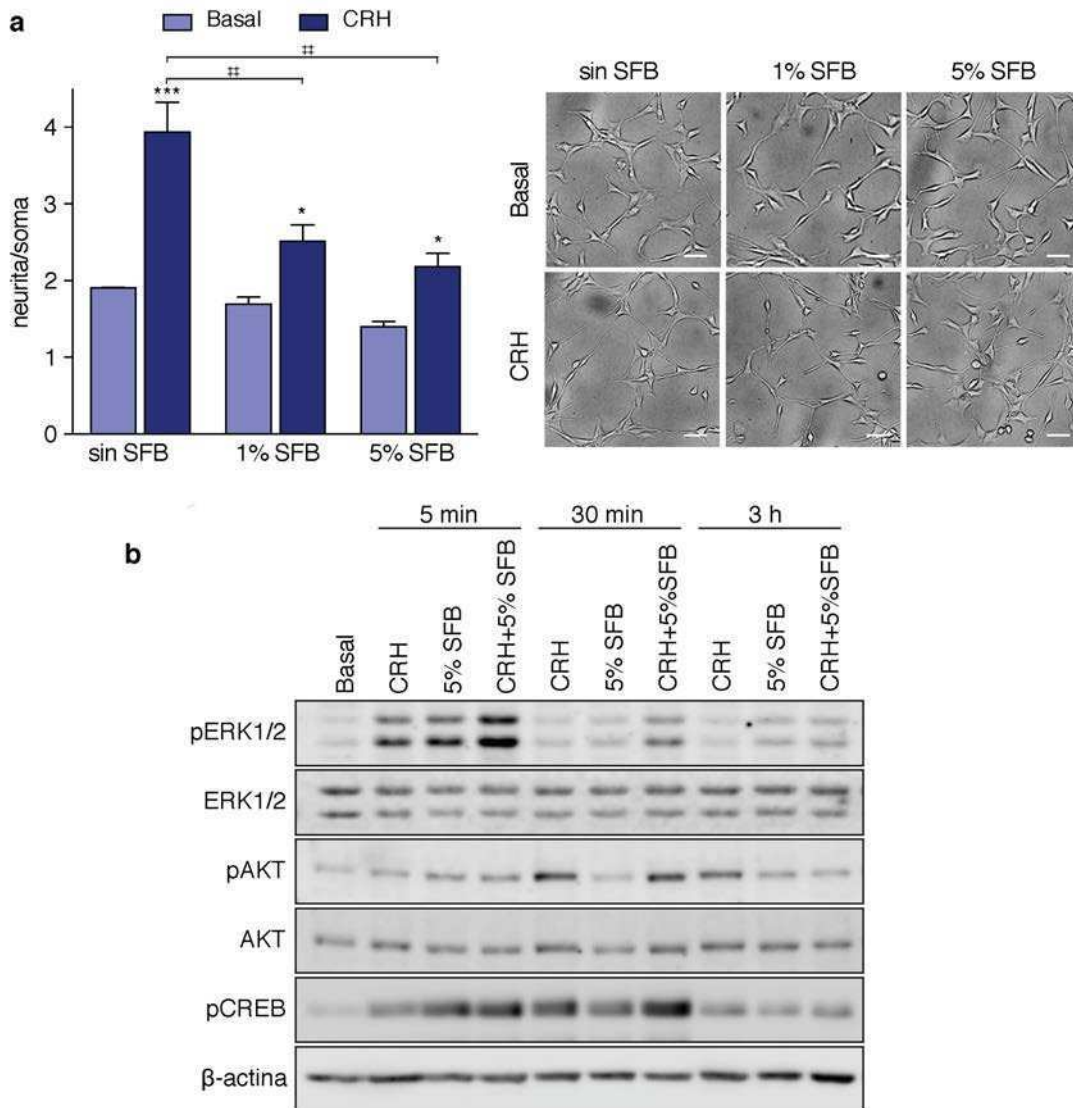


Figura 16 | Efecto neuritogénico y vías activadas por CRH y suero

a, El efecto neuritogénico de CRH 100 nM en células HT22-CRHR1 fue analizado en ausencia de suero, o en presencia de SFB 1% o 5%. Datos: media \pm SEM (n = 3). Se muestra una fotografía representativa de cada tratamiento. Barra: 50 μ m. Por ANOVA de dos factores de medidas repetidas y prueba *post hoc* de Sidak, se encontraron diferencias significativas para el tratamiento con CRH ($p=0,0005$) y de suero ($p=0,0024$) *, $p<0,05$ ***, $p<0,001$ respecto del basal, ††, $p<0,01$ entre los tratamientos indicados.

b, Las células HT22-CRHR1 fueron estimuladas con CRH 100 nM, SFB 5% o con la combinación de ambos tratamientos por los tiempos indicados. Se determinaron por Western blot los niveles de ERK1/2 fosforilado (pERK1/2) y total, AKT fosforilado (pAKT) y total, CREB fosforilado (pCREB) y β -actina.

la capacidad de CRH de inducir el crecimiento de neuritas en las células HT22-CRHR1 disminuyó cuando la estimulación se realizó en presencia de cantidades crecientes de suero fetal bovino (Figura 16a). Se ha observado que, en esta línea celular, una pequeña proporción de la población desarrolla neuritas en condiciones no estimuladas (Liu *et al.*, 2009; Inda, 2012). Es interesante notar que la presencia de suero también modificó la morfología basal de las células

(comparar tratamientos basales de la Figura 16a). Considerando que CRHR1 induce a diferenciación de las células HT22-CRHR1 y que el cAMP es crítico en este proceso, quisimos explorar algunos componentes moleculares clave río abajo. Analizamos por Western blot la activación de ERK1/2, AKT y CREB en respuesta a CRH, 5% suero y ambos estímulos en combinación (Figura 16b). CRH indujo una marcada fosforilación de ERK1/2 a tiempos cortos (5 min) y una menor respuesta 30 min y 3 h después de agregado el estímulo, de manera consistente con el perfil temporal observado previamente en esta línea celular (Bonfiglio *et al.*, 2013). Cuando el suero fue utilizado como estímulo, ERK1/2 también fue activado a tiempos cortos. Llamativamente, las respuestas de ERK1/2 fueron aditivas cuando se estimularon las células en simultáneo con CRH y suero, sugiriendo que cada estímulo activaría ERK1/2 a través de mecanismos diferentes. CRH estimuló la fosforilación de AKT a tiempos largos (30 min, 3h) mientras que el suero no tuvo un efecto detectable en esta vía de señalización a los tiempos analizados. Por último, CREB fue fosforilado en respuesta tanto a CRH como al suero luego de 5 y 30 min. Los niveles de fosfo-CREB fueron mayores al estimular con CRH y suero en simultáneo, nuevamente sugiriendo la existencia de mecanismos diferentes en cada caso. Así, es posible especular con la activación de CREB dependiente e independiente de cAMP en respuesta a CRH y suero, respectivamente, en células HT22-CRHR1.

Los mecanismos de señalización involucrados en la diferenciación son complejos y, aunque muchos componentes pueden ser comunes entre diferentes tipos celulares, diferencias notables también han sido identificadas. La línea celular PC12 es quizás el modelo celular mejor caracterizado respecto de las cascadas de señalización involucradas en el destino celular. En células PC12, la activación sostenida de ERK1/2 es necesaria para la diferenciación celular (Vaudry *et al.*, 2002) y la proporción entre las formas activadas de ERK1/2 y AKT es crítica para la decisión “todo o nada” entre proliferación y diferenciación (Chen *et al.*, 2012). Sin embargo, los resultados indican que en las células HT22-CRHR1, la activación sostenida de ERK1/2 no es suficiente para estimular cambios morfológicos, en línea con lo observado previamente que el efecto neuritogénico de CRH no depende de fosfo-ERK1/2, mientras que la neuritogénesis en respuesta a PDGF sí depende de la vía de ERK1/2 (Inda, 2012). Más aún, mientras que la estimulación de la vía PI3K/AKT inhibe la diferenciación de las células (Bang *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2012), esta vía promueve el crecimiento de neuritas en un contexto hipocampal (Shi *et al.*, 2003; Schwamborn y Puschel, 2004; Jaworski *et al.*, 2005).

CRH genera una respuesta de cAMP sostenida en células hipocampales

Establecimiento de un método para medir la respuesta de cAMP en tiempo real y a nivel de célula única

Teniendo en cuenta que el GPCR CRHR1 señala principalmente acoplado a la proteína Gs en la mayoría de los sistemas estudiados, la regulación del segundo mensajero cAMP es crítica para la función de CRH. De esta forma, nos propusimos establecer un método para poder monitorear los niveles intracelulares de cAMP en nuestro modelo celular HT22-CRHR1.

Biosensores basados en FRET para monitorear la respuesta de cAMP

Entre los sensores de cAMP disponibles, decidimos probar dos desarrollados por grupos diferentes, pero basados la misma estrategia. Básicamente, están compuestos por un dominio de unión a cAMP de las proteínas EPAC, que se encuentra flanqueado por las proteínas fluorescentes que funcionan como dador y aceptor de FRET. Cuando se une el cAMP al sensor, ocurre un cambio conformacional del dominio de EPAC, que modifica la eficiencia del FRET. Son sensores unimoleculares, que presentan una eficiencia de FRET, una relación señal/ruido y cinéticas mejores que los sensores desarrollados previamente.

El laboratorio del Dr. Kees Jalink, en el Netherlands Cancer Institute, ha desarrollado sensores que se basan en Epac1 truncado hacia el N-terminal (Epac1¹⁴⁹⁻⁸⁸¹), en el que se introdujeron las mutaciones T781A y F782A, para que sea catalíticamente inactiva, y Q270E para aumentar la afinidad por cAMP 2,5 veces (EC₅₀ 4μM). Además, como dador se utilizó mTurquoise2 que es más brillante y resistente al fotoblanqueo, y como aceptor un casete de dos Venus circularmente permutados en 173 (cp173Venus) en tándem. Este sensor de última generación se denomina Epac-S^{H187} (Klarenbeek *et al.*, 2015).

Por otra parte, el laboratorio de la Dr. Jin Zhang, en John's Hopkins University, ha desarrollado la serie ICUE, siendo ICUE3 el biosensor de última generación. Consiste en el Epac1¹⁴⁹⁻⁸⁸¹, flanqueado por el dador ECFP y el aceptor de Venus circularmente permutado en 194 (cp194Venus). Además, este laboratorio tiene la serie AKAR (*A-kinase activity reporter*) para monitorear la actividad kinasa de PKA, río abajo de cAMP (Allen y Zhang, 2006; Depry *et al.*, 2011). Consiste en un *switch* molecular compuesto por un dominio de unión a fosfoaminoácidos FHA1 ligado a una secuencia consenso sustrato para la PKA, flanqueado por el dador y aceptor de FRET, Cerulean y cp172Venus, respectivamente.

Optimización del método para estudiar la señalización de cAMP/PKA por sensores de FRET

Para realizar las mediciones de FRET de células vivas en tiempo real se optimizó el método teniendo en cuenta el equipamiento disponible en el laboratorio. Dado que el microscopio de epifluorescencia no dispone de una configuración adecuada de filtros para la medición de proteínas fluorescentes CFP e YFP, se eligió utilizar el microscopio confocal, usando el *pinhole* abierto, en el modo de adquisición espectral (detección Lambda, Broussard *et al.*, 2013), optimizando los distintos parámetros de la adquisición que permitan una medición lo suficientemente rápida, una calidad de imagen que no afecte la medición e intensidades de láseres que no fotoblanqueen la muestra de forma significativa en experimentos de hasta 1 h de duración. Por otra parte, se estableció cómo hacer de forma artesanal placas con fondo de vidrio, y se eligió DMEM sin rojo fenol 20 mM HEPES como medio de estimulación para disminuir la variación del pH durante el experimento.

Se transfectaron individualmente los vectores que codifican para sensores de FRET ICUE3, AKAR4 o Epac-S^{H187}, o las proteínas fluorescentes que funcionan como dador y aceptor en cada par (Venus, Cerulean, Turquoise) en células HT22-CRHR1. Se obtuvieron los espectros de fluorescencia de cada una de las proteínas por separado. Luego, se determinó el espectro de los sensores de FRET en condiciones basales y al estimular con forskolina. Una vez adquiridos, se realizó una deconvolución espectral con los espectros previamente establecidos para obtener los datos del dador y el aceptor de FRET a lo largo del experimento. Para el procesamiento de datos, se eligió utilizar el programa Fiji, determinando la intensidad media del dador y el aceptor de FRET en cada célula individual, estableciendo ROIs de forma manual en imágenes en las que se corrigió previamente el fondo (ver Materiales y métodos).

Utilizando forskolina como estímulo se logró detectar el cambio esperado en el fenómeno de FRET (una disminución en los sensores de cAMP, ICUE3 y Epac-S^{H187}, y un aumento en el de PKA, AKAR4). La relativización entre la señal del dador y el aceptor, y la normalización de los datos a los niveles basales permiten independizarse de diferencias producto de diferente eficiencia de transfección en cada célula. Sin embargo, por cuestiones prácticas (evitar transfectar regularmente las mismas construcciones y poder utilizar a todas las células para el análisis) y también para lograr una medición más reproducible evitando posibles artificios producto de distinto nivel de expresión de los sensores (asegurarse que se trabaja en el rango dinámico, que no hay saturación) se decidió establecer clones estables de las distintas construcciones. Las construcciones obtenidas están clonadas en vectores de expresión con

resistencia a antibiótico Geneticina (G418). Dado que los clones HT22-CRHR1 ya son resistentes a este antibiótico, se procedió al subclonado de las construcciones en el vector pcDNA3.1(+)/Zeo. Una vez obtenidos, se generaron líneas estables que sobreexpresan el receptor CRHR1 y cada uno de los sensores de FRET resistentes a G418 y Zeocina: HT22-CRHR1-ICUE3, HT22-CRHR1-AKAR4, HT22-CRHR1-Epac-S^{H187}. Por el análisis de fluorescencia con citometría de flujo se eligieron clones en base a una homogeneidad e intensidad de la señal.

Respuesta de cAMP a CRH en HT22-CRHR1

Se utilizaron los clones estables HT22-CRHR1-ICUE3 y HT22-CRHR1-Epac-S^{H187} para analizar la respuesta de cAMP inducida por CRH a nivel de célula única, sin el agregado de inhibidores de fosfodiesterasas (PDEs), en tiempo real. Ante el agregado de CRH, se produjo un aumento rápido en los niveles de cAMP que permanecieron elevados durante el experimento, ya sea utilizando ICUE3 o Epac-S^{H187} como sensores (Figura 17a). En ambos casos, el agregado de medio sin estímulo no modificó la fluorescencia, verificando que los cambios en la fluorescencia se deben al efecto de CRH (no mostrado). Teniendo en cuenta el mayor brillo y fotoestabilidad de Epac-S^{H187} respecto de ICUE3, se siguió utilizando este sensor en los experimentos subsiguientes.

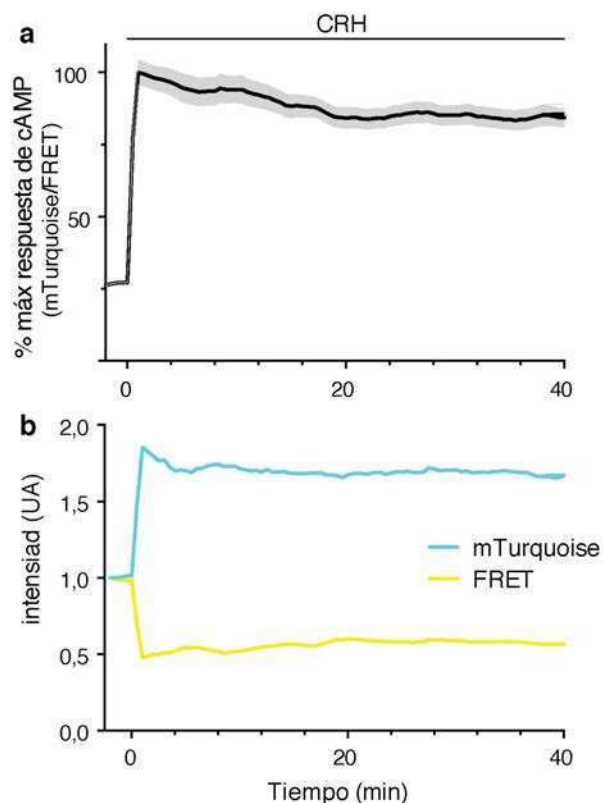


Figura 17 | Respuesta de cAMP medida con el sensor Epac-S^{H187} dependiente de CRH

Células HT22-CRHR1-Epac-S^{H187} fueron estimuladas a tiempo 0 con CRH 10 nM. Datos: media \pm SEM, n=16 células.

a, Respuesta de FRET (mTurquoise/FRET) del sensor Epac-S^{H187} relativo al máximo de la respuesta.

b, Cambios en la intensidad de fluorescencia del dador (mTurquoise2) y del aceptor (Venus) relativos al basal.

Llamativamente, los niveles de cAMP en respuesta a CRH permanecieron elevados por al menos 40 min (Figura 17a). La adición de CRH en el medio produjo una disminución de la emisión del aceptor (cp173Venus) y el correspondiente aumento en la emisión del dador (mTurquoise2, Figura 17b), confirmando que los cambios observados fueron causados por la reducción de FRET, que indica un aumento en los niveles citosólicos de cAMP. No se detectaron diferencias apreciables en las dinámicas subcelulares de la respuesta de FRET con el método de medición utilizado. Como control, se observó que el agregado de forskolina después de 2,5 min de CRH, produjo una disminución aún mayor de FRET, verificando que los sensores no están saturados (Figura 18).

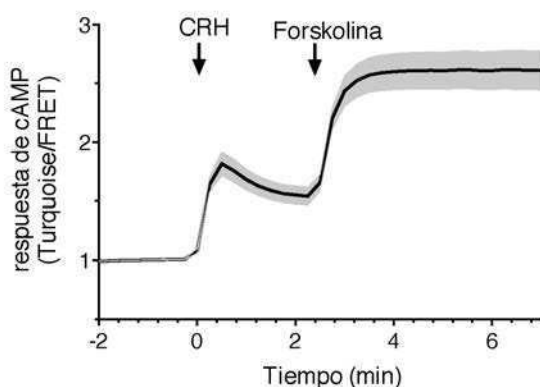


Figura 18 | Respuesta de cAMP medida con el sensor Epac-S^{H187} dependiente de CRH

Respuesta de FRET medida en células HT22-CRHR1-Epac-S^{H187} relativo a niveles basales. Las células fueron estimuladas a tiempo 0 con CRH 10 nM y 2 min después se agregó forskolina 10 μ M. Datos: media \pm SEM, n=11 células.

El hecho de que la respuesta de cAMP a CRH fuera sostenida en el tiempo, manteniéndose en niveles elevados aún en tiempos a los que el receptor CRHR1 está internalizado (30 min, Bonfiglio *et al.*, 2013) nos resultó interesante teniendo en cuenta que clásicamente se considera que la producción de cAMP está gobernada por la activación de las tmACs por las Gs, eventos que ocurren a nivel de la membrana plasmática en intervalos cortos luego del agregado del estímulo. Sin embargo, recientemente estas respuestas sostenidas de cAMP han sido reportadas para otros GPCRs.

CRH y UCN1 activan la vía de cAMP/PKA de forma similar

Nos preguntamos si la respuesta de cAMP generada por la activación de CRHR1 era distinta si se estimulaba al receptor con CRH o UCN1. Observamos que la respuesta para ambos ligandos era similar (Figura 19a). Con el objetivo de monitorear la actividad de PKA directamente, se utilizó el sensor basado en FRET, AKAR4, del que se generaron clones estables en las células HT22-CRHR1, como se describió previamente. También a nivel de PKA, las respuesta de CRH y UCN1 fueron indistinguibles (Figura 19b), lo que es consistente con efectos similares de ambos ligandos observados para el cambio morfológico y la proliferación. Habiendo observado

que el suero antagoniza el efecto neuritogénico de CRH, quisimos determinar si existía algún efecto del suero a nivel de la producción de cAMP. Observamos que la respuesta de cAMP dependiente de CRH no era afectada por la presencia de suero (Figura 19c), lo que sugiere que el diálogo cruzado entre las distintas cascadas de señalización ocurre río abajo del cAMP o a través de otros mecanismos de la cascada de transducción de señales. Además, verificamos que el suero no señala a través de la producción de cAMP o la activación de PKA (Figura 19a-b).

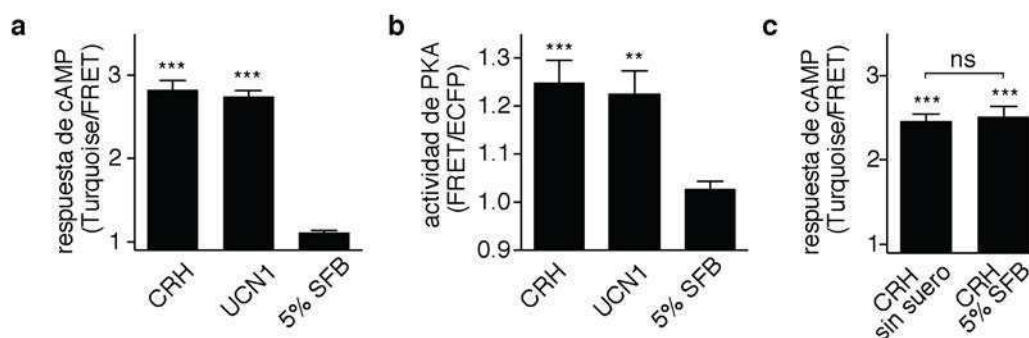


Figura 19 | Activación de la vía cAMP/PKA en respuesta a CRH, UCN1 y suero (SFB)

Los niveles de cAMP (a,c) y la actividad de PKA (b) fueron determinados en células HT22-CRHR1-Epac-SH¹⁸⁷ o HT22-CRHR1-AKAR4 respectivamente.

a-b, Las células fueron estimuladas con CRH o UCN1 100nM o SFB 5% en DMEM sin suero.

c, Las células fueron estimuladas con CRH en DMEM sin suero o con 5% SFB.

Las barras representan el cambio máximo de FRET observado respecto del basal ($t = 1$ min). Datos: media \pm SEM, 20–25 células de tres experimentos independientes. *, $p < 0,05$ ***, $p < 0,001$ respecto del basal en cada condición por ANOVA de un factor y prueba *post hoc* de Tukey.

La activación de CRHR1 genera una respuesta sostenida de cAMP en cultivos primarios neuronales

Nos propusimos estudiar la respuesta de cAMP dependiente de CRH utilizando cultivos primarios de neuronas. La distribución de la localización de los receptores CRHR1 y CRHR2 en el SNC ha sido estudiada principalmente a nivel de mRNAs ya que no se dispone de anticuerpos específicos para la detección de los receptores (Refojo *et al.*, 2011). En particular, la presencia de CRHR1 en el hipocampo ha sido ampliamente reportada, siendo su función esencial en los aspectos comportamentales de la respuesta a estrés (Refojo *et al.*, 2011). Sin embargo, son escasos los estudios de la activación de CRHR1 en cultivos primarios hipocampales o en rodajas de cerebro, quizás debido a los bajos niveles de expresión del receptor y las dificultades para sobreexpresarlo con éxito.

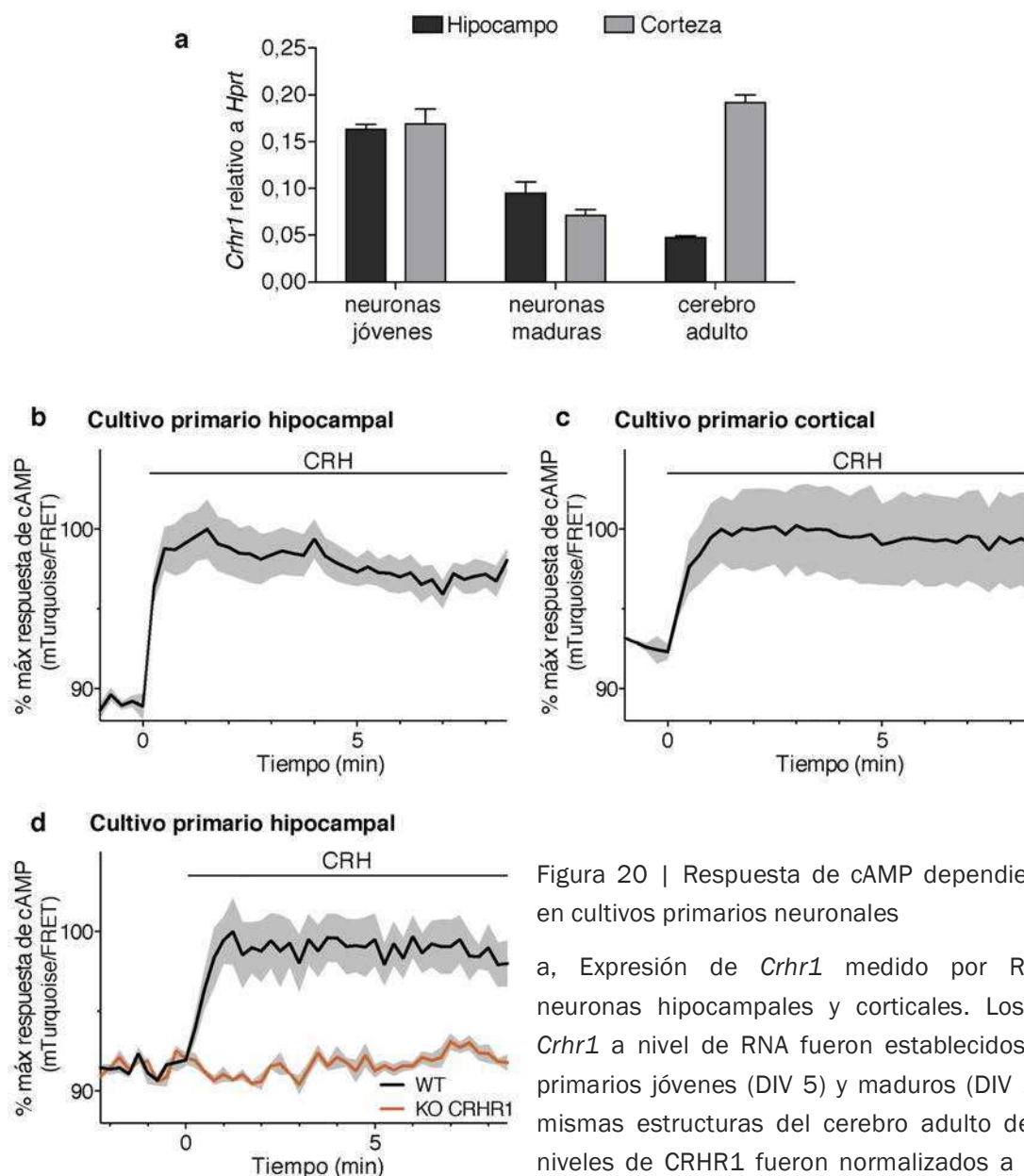


Figura 20 | Respuesta de cAMP dependiente de CRH en cultivos primarios neuronales

a, Expresión de *Crhr1* medido por RT-q-PCR en neuronas hipocampales y corticales. Los niveles de *Crhr1* a nivel de RNA fueron establecidos en cultivos primarios jóvenes (DIV 5) y maduros (DIV 12) y en las mismas estructuras del cerebro adulto de ratón. Los niveles de CRHR1 fueron normalizados a los de *Hprt*. Datos: media \pm SEM, n=3.

b-d, Respuesta de cAMP medidas en neuronas transfectadas con el sensor Epac-S^{H187}. Cultivos primarios neuronales hipocampales (b, d) o corticales (c) fueron estimuladas con CRH 100 nM. d, Los cultivos primarios se prepararon a partir de la cruce de ratones KO condicionales para CRHR1 y ratones reporteros tdTomato. La respuesta de cAMP fue medida en la población mixta de neuronas WT y KO (también expresan tdTomato) en el mismo campo. Las curvas son representativas de tres experimentos independientes. Datos: media \pm SEM, n=20-25 células.

En colaboración con el Dr. Jan Deussing, en el Instituto Max Planck de Psiquiatría, (Munich, Alemania) preparamos cultivos primarios neuronales a partir de hipocampo y corteza embrionales de ratón y se analizó la presencia de CRHR1 por la técnica de RT-PCR en tiempo real (RT-q-PCR). Se detectó la expresión de CRHR1 en los cultivos primarios a distintos tiempos de días *in vitro* (DIV, Figura 20), en línea con los antecedentes previos (Bender *et al.*,

2015). Además, CRHR1 fue hallado también en las mismas estructuras en el cerebro adulto de ratón.

Con el objetivo de medir la respuesta de cAMP generada por CRH, los cultivos primarios fueron transfectados de forma transitoria con la construcción Epac-S^{H187}. Tanto en neuronas corticales como en hipocampales, la adición de CRH generó una disminución en los niveles de FRET, evidenciando un aumento en los niveles de cAMP (Figura 20b-c). Notoriamente, la respuesta de cAMP fue sostenida por al menos 10 min después del agregado del estímulo, recapitulando la respuesta observada en las células HT22-CRHR1-Epac-S^{H187}.

Quisimos confirmar que la respuesta de FRET medida correspondiera específicamente a la activación de CRHR1. Con este objetivo, se cruzaron ratones KO condicionales para CRHR1, en los que CRHR1 está deletado específicamente en neuronas glutamatérgicas del cerebro anterior (*Crhr1^{loxP/loxP}; Nex-Cre -CRHR1^{CKO-Glu-}*, Refojo *et al.*, 2011), con ratones reporteros tdTomato (*Crhr1^{loxP/loxP}; R26^{CAG::LSLtdTomato/CAG::LSLtdTomato} -CRHR1^{CKO-Ctrl}; Ai9-*, Madisen *et al.*, 2010). Luego, preparamos cultivos primarios hipocampales utilizando los embriones de la cruce, juntando en una misma preparación las neuronas derivadas de embriones *Crhr1^{loxP/loxP}; R26^{+/CAG::LSLtdTomato}; Nex-Cre* y *Crhr1^{loxP/loxP}; R26^{+/CAG::LSLtdTomato}*. De esta forma, aproximadamente 50% de las neuronas glutamatérgicas no expresaban CRHR1 y simultáneamente estaban marcadas con el reportero tdTomato. Esto permitió medir la respuesta de cAMP ante el agregado de CRH en neuronas *wild-type* y KO para CRHR1 en el mismo campo del microscopio. Mientras que una respuesta de cAMP rápida y sostenida fue observada en las neuronas *wild-type*, no se detectó una respuesta apreciable en aquellas marcadas con tdTomato ante el estímulo con CRH (Figura 20d). Estos resultados indican que el fenómeno de FRET corresponde a una medición específica de los niveles de cAMP y además, que la acción de CRH es mediada exclusivamente por CRHR1. Cabe destacar que esto es consistente con la falta de detección de CRHR2 en los cultivos primarios en reportes previos (Bender *et al.*, 2015). Además, la observación de que el patrón de la respuesta de cAMP en cultivos primarios es similar a la detectada en las células HT22-CRHR1-Epac-S^{H187} apoya el uso de esta línea celular para el estudio de la señalización de CRHR1.

Múltiples fuentes de cAMP están involucradas en la respuesta a CRH sAC se identificó en un estudio proteómico de las proteínas asociadas a B-Raf

En el contexto de la Tesis Doctoral del Dr. Juan José Bonfiglio en nuestro laboratorio, se emprendió un análisis proteómico del interactoma de la MAPKKK B-Raf en colaboración con

los investigadores del Instituto Max Planck de Psiquiatría (Munich, Alemania), la Dra. Giuseppina Maccarrone y el Dr. Chris Turck (Bonfiglio *et al.*, 2011b; Bonfiglio, 2013). Se focalizó en la proteína B-Raf ya que cumple un rol crítico en la activación de la vía de las MAPK en el SNC y porque funciona como una proteína de andamiaje o *scaffold* para la organización de complejos de señalización (Bonfiglio *et al.*, 2011b).

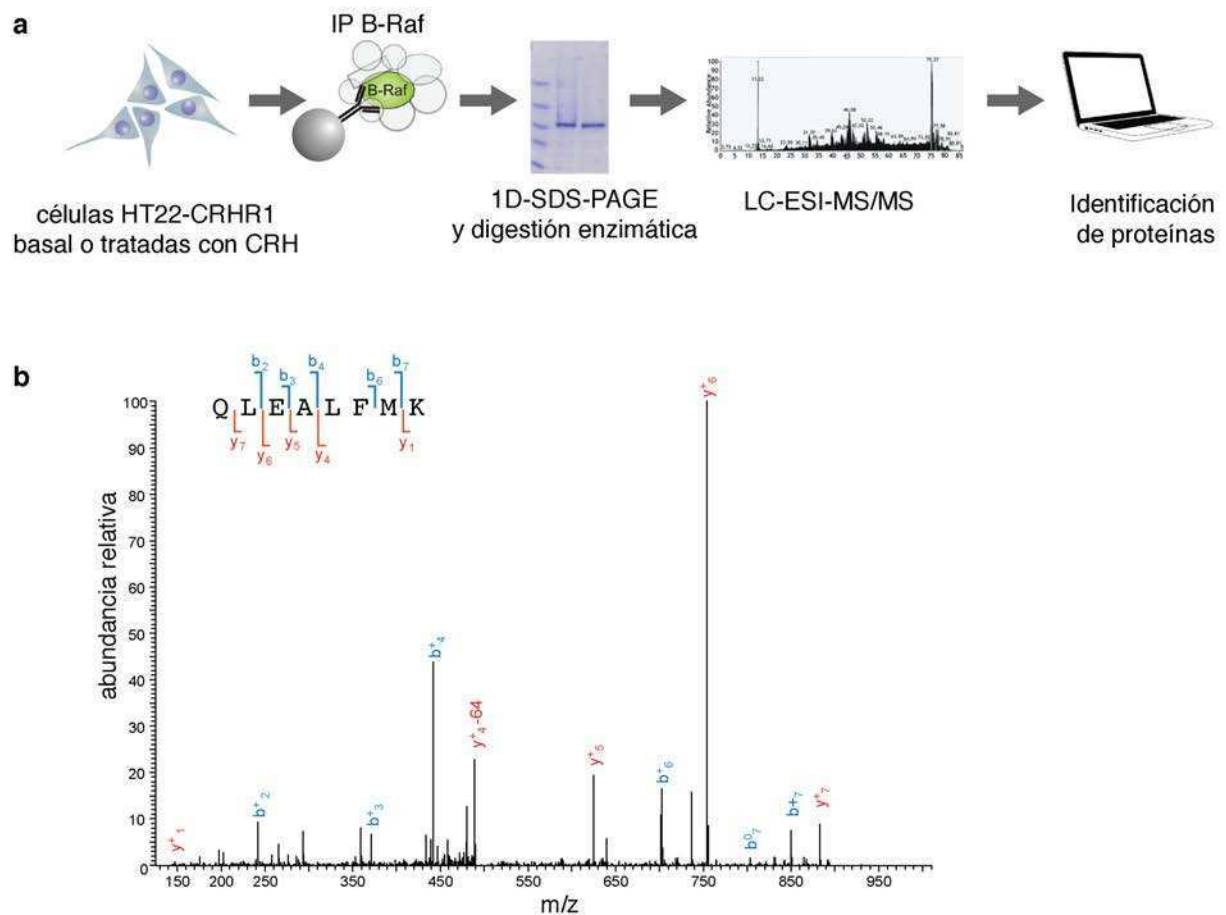


Figura 21 | Identificación de la adenilil ciclasa soluble (sAC)

a, Esquema de la estrategia llevada a cabo para identificar proteínas interactoras de B-Raf en células HT22-CRHR1

b, Espectro de ESI-MS/MS de la secuencia del péptido asignado a sAC. Se muestran los fragmentos iónicos b e y de la secuencia QLEALFMK (residuos 622-629).

A partir de extractos de células HT22-CRHR1 en condiciones basales o estimuladas con CRH por 4 o 9 min, se realizaron inmunoprecipitaciones de B-Raf, se resolvieron los extractos en un SDS-PAGE y las proteínas co-inmunoprecipitadas fueron identificadas por espectrometría de masa (digestión proteolítica en gel, LC-ESI-MS/MS, Figura 21a). Un grupo de las proteínas identificadas en este estudio ya ha sido estudiado en relación con su rol en la señalización de

CRH (Bonfiglio *et al.*, 2013). Nos pareció interesante un péptido que se asignó a la sAC (GI=227497594, NM_173029, Figura 21b). El mismo péptido fue identificado en las dos condiciones de estimulación con CRH y no en el basal, en múltiples experimentos.

Expresión de sAC en el cerebro y distintas líneas celulares

Estudios previos han reportado que sAC es una proteína de expresión ubicua pero poco abundante, a excepción de en testículo (Tresguerres *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2013). Además, la falta de anticuerpos comerciales robustos ha sido un obstáculo para el estudio de esta proteína.

Con el objetivo de investigar la expresión de sAC realizamos RT-PCR e identificamos que el mRNA de sAC estaba presente en el cerebro adulto de ratón y en distintas líneas celulares murinas, HT22-CRHR1, AtT20 y 3T3L1-CRHR1, (Figura 22a). Utilizando el anticuerpo monoclonal específico para sAC (R21), se detectó una banda de 48 kDa por Western blot en extractos crudos de HT22-CRHR1. Más aún, al transfectar un siRNA específico contra sAC murina, esa banda se redujo de forma proporcional a la concentración de siRNA transfectado, sugiriendo que se trata de una banda específica (Figura 22b). En función de estos resultados, confirmamos que sAC se expresa en las células HT22-CRHR1 e hipotetizamos que puede estar implicada en la señalización de CRH.

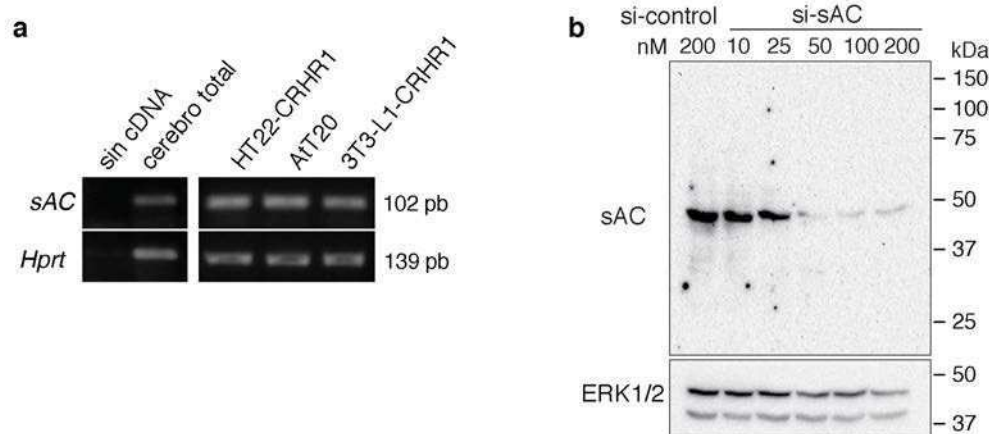


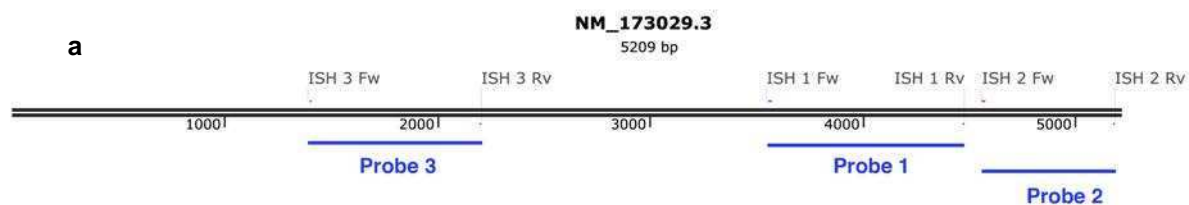
Figura 22 | Detección de sAC en cerebro y distintas líneas celulares murinas

a, La expresión de sAC fue detectada a nivel de mRNA por RT-PCR a partir de RNA de cerebro de ratón total y en distintas líneas celulares murinas utilizadas a lo largo de este trabajo.

b, Por Western blot se detectó la expresión a nivel de proteína de sAC, utilizando el anticuerpo monoclonal (R21), en extractos de células HT22-CRHR1 control y células transfectadas con distintas concentraciones de un siRNA específico contra sAC. Se utilizó ERK1/2 como control de carga.

A continuación quisimos estudiar cómo era la expresión de sAC en el cerebro de ratón en colaboración con el Dr. Jan Deussing. Con este objetivo seguimos dos estrategias

experimentales: la detección por hibridación *in situ* en rodajas de cerebro (ISH del inglés, *in-situ hybridization*) y por RT-q-PCR a partir de extractos de RNA.



b Sonda 1 específica para mRNA de sAC

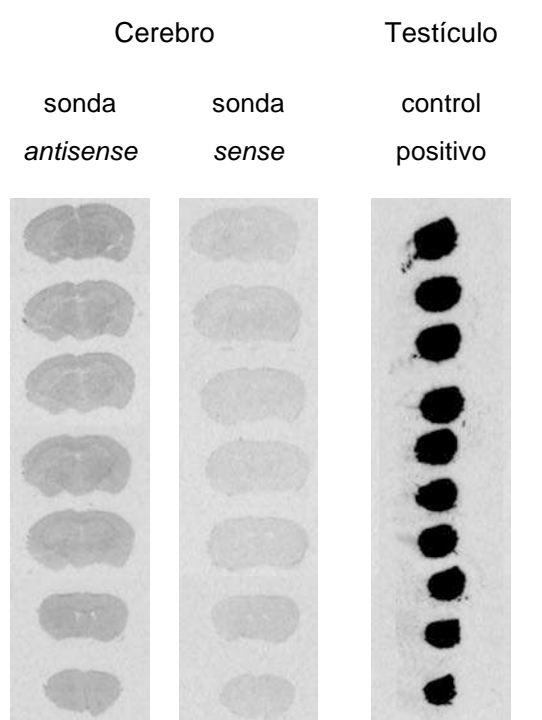
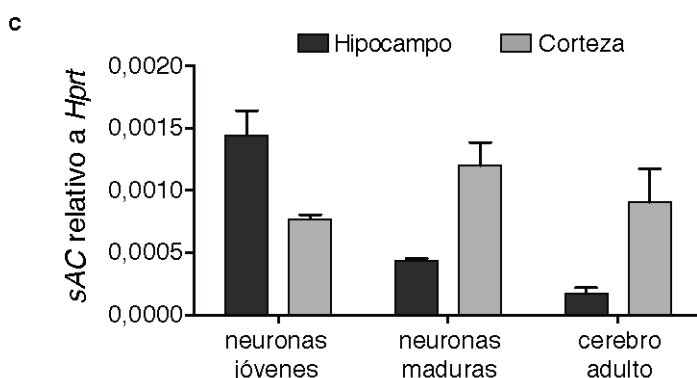


Figura 23 | Estudio de la expresión de sAC en cerebro de ratón

a, Esquema de las sondas utilizadas para detectar la expresión de sAC por ISH.

b, Autorradiografías representativas obtenidas para la sonda 1 en los experimentos de ISH en secciones coronales de cerebro adulto y testículo de ratón.

c, Expresión de sAC medido por RT-q-PCR en neuronas hipocampales y corticales. Los niveles de sAC a nivel de RNA fueron establecidos en cultivos primarios jóvenes (DIV 5) y maduros (DIV 12) y en las mismas estructuras del cerebro adulto de ratón. Los niveles de CRHR1 fueron normalizados a los de *Hprt*. Datos: media ± SEM, n=3.



Para realizar la ISH, se diseñaron tres sondas para detectar de manera específica el mRNA de sAC murina (Figura 23a). Se generaron por PCR a partir de RNA de testículo y los amplicones se clonaron en el plásmido pBluescript II SK (+). Luego, a partir de los plásmidos se generaron las sondas *sense* y *antisense* radiactivas de RNA marcadas con ³⁵S por transcripción *in vitro*. Se

hibridaron en rodajas de cerebro de ratón y se reveló por autoradiografía. Como control positivo se utilizaron rodajas de testículo. Aunque la señal de las tres sondas para sAC fue muy intensa en testículo, no se halló una distribución característica en cerebro. La sonda 1 fue la que mostró mejor señal en cerebro respecto de la sonda *sense* (control negativo), pero la marca se encontró distribuida de forma homogénea, no identificando por esta técnica regiones de mayor y menor expresión de sAC (Figura 23b).

De manera alternativa, se extrajo RNA de cultivos primarios neuronales de hipocampo y corteza o de esas mismas regiones en el cerebro adulto de ratón. Luego, se realizaron RT-q-PCR usando *primers* específicos contra sAC y *Hprt* (como control). Detectamos que el mRNA de sAC estaba presente tanto en los cultivos primarios embrionales como en el cerebro adulto en hipocampo y corteza, aunque en niveles bajos de expresión (Figura 23c).

Estrategias experimentales para diferenciar el rol de tmACs y sAC

Discernir los roles diferenciales de las distintas fuentes de cAMP, tmACs y sAC, no es una tarea trivial. Las tmAC presentan dos dominios de 6 pasos transmembrana, pero recientemente se ha demostrado que pueden señalizar no sólo desde la membrana plasmática sino también después de la internalización. Aunque la sAC no presenta segmentos transmembrana, la proteína se halla principalmente en la fracción particulada de los lisados celulares, como ha sido reportado previamente (Hess *et al.*, 2005) y también observado por nosotros en la línea HT22 (ver más adelante).

Por eso, existe un esfuerzo por diseñar inhibidores pequeños que presenten especificidad para poder diferenciar cada actividad enzimática (Bitterman *et al.*, 2013). En este trabajo hemos utilizado al inhibidor 2',5'-dideoxiadenosina (2',5'-ddA) y los inhibidores de sAC, 2-hidroxiestradiol (2-HE) y KH7. Otro criterio importante para diferenciar la acción de tmACs y sAC es cómo es su activación. Ambos tipos de enzimas difieren estructuralmente, siendo sAC insensible a los conocidos moduladores de tmACs, proteínas G y forskolina. Por otro lado, la sAC es activada directamente por calcio y por bicarbonato. Por último, la expresión de sAC endógena puede ser específicamente disminuida a través del uso de siRNAs.

La sAC está involucrada en la respuesta de cAMP río abajo de CRHR1 en células HT22-CRHR1

Habiendo identificado que sAC está presente en las células HT22-CRHR1, quisimos estudiar si esta ciclasa participaba en la generación de cAMP en respuesta a CRH. Con este objetivo, medimos los niveles intracelulares de cAMP con el sensor Epac-S^{H187} y utilizamos inhibidores específicos para las tmACs y sAC, 2',5'-ddA y 2-HE, respectivamente. No se utilizó el

inhibidor KH7 ya que esta molécula tiene fluorescencia intrínseca al irradiarla con 405 nM, con un espectro de emisión que solapa con la señal de dador de FRET, mTurquoise/Cerulean (Figura 24).

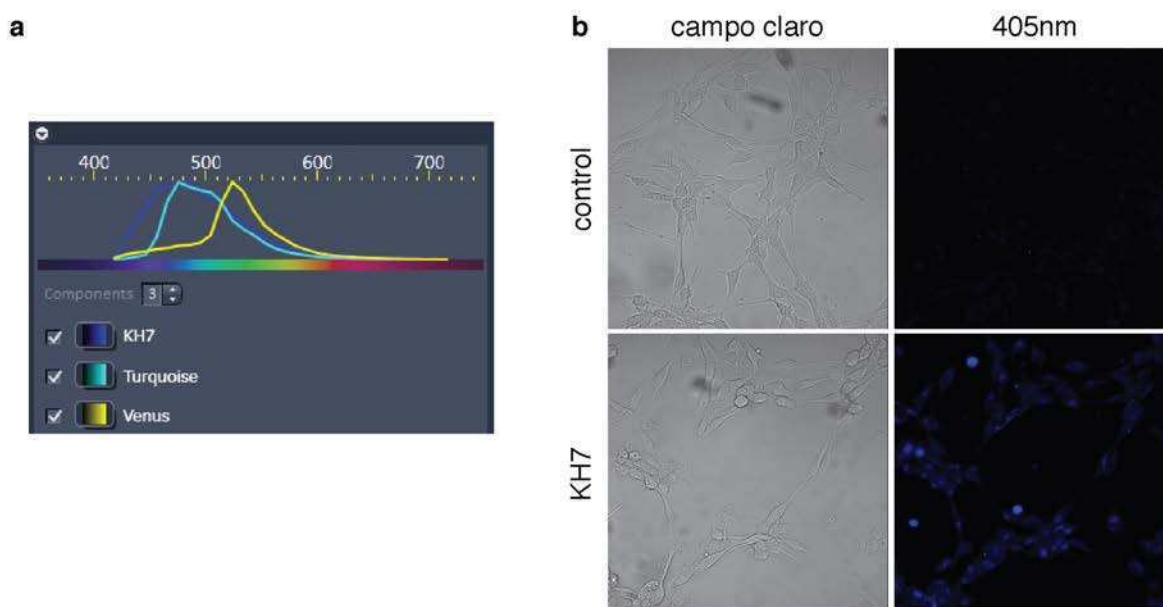


Figura 24 | El inhibidor de sAC KH7 presenta fluorescencia intrínseca que solapa con la del sensor Epac-SH187

a, Diagrama del espectro de emisión medido para KH7, mTurquoise (dador de FRET) y Venus (aceptor de FRET) al irradiar con 405 nm.

b, Fotografías en campo claro y de fluorescencia de células HT22-CRHR1 incubadas con DMSO (control) o KH7.

Cuando el inhibidor de tmACs 2',5'-ddA fue agregado durante la cinética de cAMP, 2,5 min después del estímulo con CRH, los niveles de cAMP fueron inhibidos ($p < 0,001$, respecto del control a $t = 5$ min) pero no fueron bloqueados completamente (Figura 25a). De manera interesante, cuando se agregó el inhibidor de sAC 2-HE, la respuesta de cAMP también fue inhibida de forma significativa ($p < 0,001$, respecto del control a $t = 5$ min, Figura 25a). La contribución de sAC a la respuesta de cAMP al estimular las células con CRH también fue evidenciada cuando se redujeron los niveles de sAC endógena a través del silenciamiento específico con un siRNA (Figura 25b).

Como control, se determinaron los niveles de cAMP por un método bioquímico, mediante la competencia con [^3H]cAMP por PKA. Cuando se preincubaron las células HT22-CRHR1 con

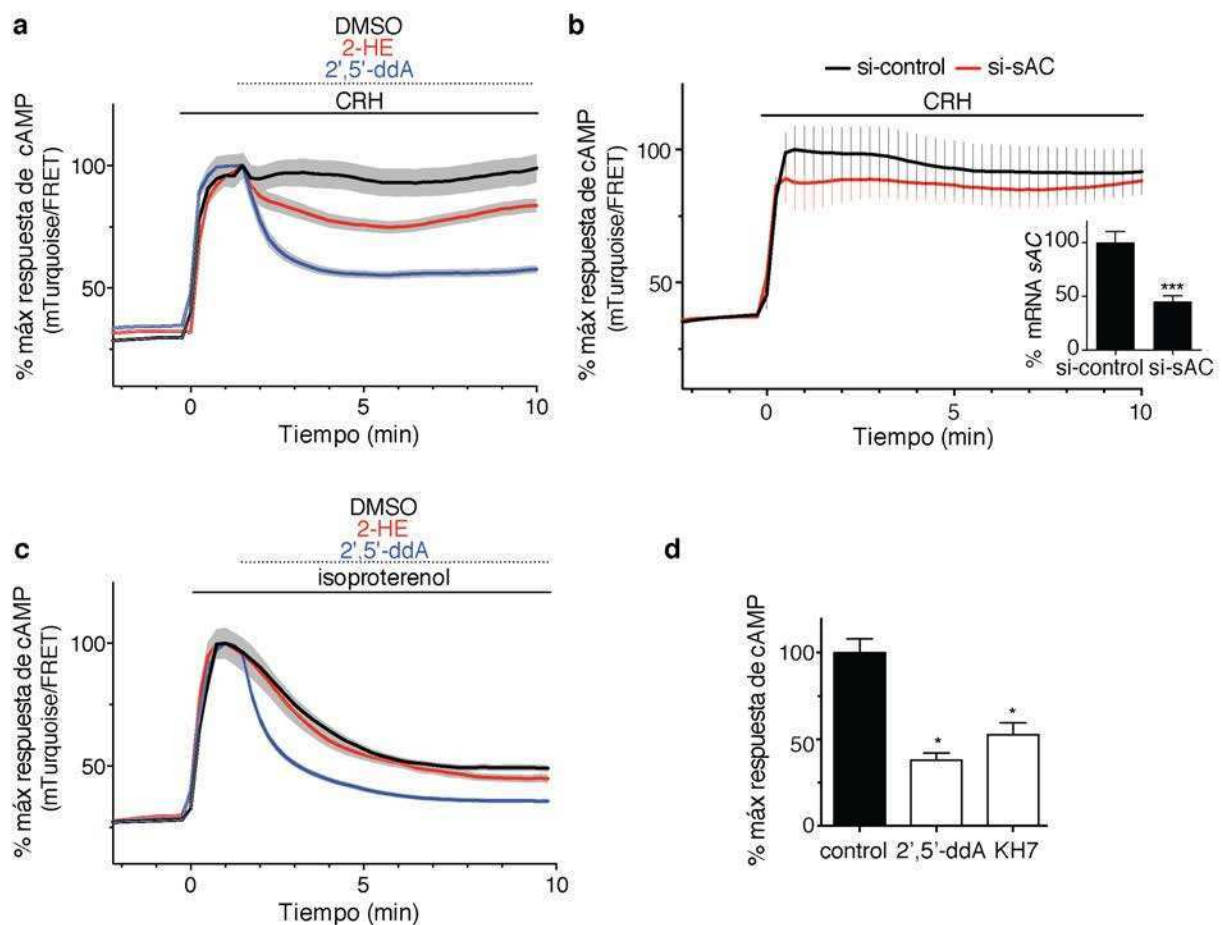


Figura 25 | La generación de cAMP en respuesta a CRH depende de tmACs y sAC

a-c, Respuesta de FRET medida en células HT22-CRHR1-Epac-S^{H187} relativo al máximo de la respuesta. Las células fueron estimuladas con CRH 10 nM (a, b) o isoproterenol 10 μ M (c) a tiempo 0. a, c, El vehículo o los inhibidores específicos de tmACs (2',5'-ddA 100 μ M) o sAC (2-HE 20 μ M) fueron agregados 1,5 min después del estímulo. Las curvas son representativas de 3 experimentos independientes. Datos: media \pm SEM, 20-25 células.

b, Las células fueron transfectadas con siRNA contra GL3 (control) o sAC 50 nM 72 h antes del experimento. En el recuadro se muestra la eficiencia del silenciamiento de sAC analizado por RT-q-PCR normalizado a HPRT (media \pm SEM, n = 3). ***, p < 0,001, por prueba t de Student.

d, Células HT22-CRHR1 fueron preincubadas con vehículo (control) o los inhibidores específicos de tmACs (2',5'-ddA 50 μ M) o sAC (KH7 7,5 μ M), y luego estimuladas con CRH 100 nM. Los niveles de cAMP fueron determinados mediante un ensayo de competencia con [³H]cAMP por la PKA, y expresados como el porcentaje de respuesta relativo a la máxima obtenida. Datos: media \pm SEM, n = 3. *, p < 0,05 por ANOVA de un factor y prueba *post hoc* de Tukey.

2',5'-ddA o con KH7, otro inhibidor de sAC, los niveles de cAMP en respuesta a CRH también disminuyeron significativamente respecto del control en presencia de ambos inhibidores (Figura

25d). Estos resultados indican que la sAC es una fuente de cAMP alternativa a las tmACs en las células HT22-CRHR1 en respuesta a CRH.

Luego, nos preguntamos si el rol de sAC era específico para la acción de CRH. Con ese objetivo, estudiamos la respuesta de cAMP mediado por isoproterenol, un ligando de los receptores β -adrenérgicos, que también se acoplan a proteína Gs. Al estimular con isoproterenol a las células HT22-CRHR1-Epac-S^{H187}, observamos un aumento en los niveles intracelulares de cAMP pero la cinética de la respuesta fue más transitoria que la obtenida para CRH (Figura 25c). La respuesta observada está de acuerdo con reportes previos para los ligandos de receptores β -adrenérgicos. Al investigar la participación de las distintas fuentes de cAMP en esta respuesta observamos que sólo el agregado del inhibidor de tmACs, 2',5'-ddA, produjo una disminución significativa en los niveles de cAMP ($p < 0,001$, con respecto al control y a 2-HE después de 5 min), mientras que no se detectaron diferencias cuando se agregó el inhibidor de sAC, 2-HE (Figura 25c). En conjunto, estos resultados demuestran que sAC está involucrada de manera específica en la respuesta de cAMP disparada por CRH en células HT22-CRHR1.

Los inhibidores utilizados han sido ampliamente probados *in vitro* y en otros sistemas celulares, habiendo seleccionado las concentraciones utilizadas en función de los trabajos previos. Haber observado efectos positivos de los inhibidores en la respuesta de CRH mientras que no se detectaron efectos de los mismos tratamientos utilizando otro estímulo también argumenta a favor de la especificidad de los compuestos.

Como una prueba adicional, quisimos determinar la especificidad y la capacidad para bloquear las actividades enzimáticas de tmACs y sAC de los inhibidores utilizados, 2',5'-ddA y 2-HE. Para esto, se midió la respuesta de cAMP generada por CRH o forskolina –activador exclusivo de las tmACs- en presencia de distintas concentraciones de los inhibidores en las células HT22-CRHR1. La respuestas de cAMP ante el estímulo con CRH o forskolina fueron casi idénticas en presencia de 2',5'-ddA, alcanzando ~50% de inhibición en la mayor concentración ensayada (200 μ M, Figura 26a). Por otra parte, concentraciones de hasta 40 μ M de 2-HE no tuvieron efecto sobre la respuesta de cAMP generada por forskolina, pero causaron una reducción de ~30% en los niveles estimulados por CRH (Figura 26b). Estos resultados confirman que concentraciones de 2',5'-ddA 100 μ M y 2-HE 20 μ M son suficientes para evaluar y discriminar la contribución de sAC y tmACS en los procesos de nuestro sistema experimental.

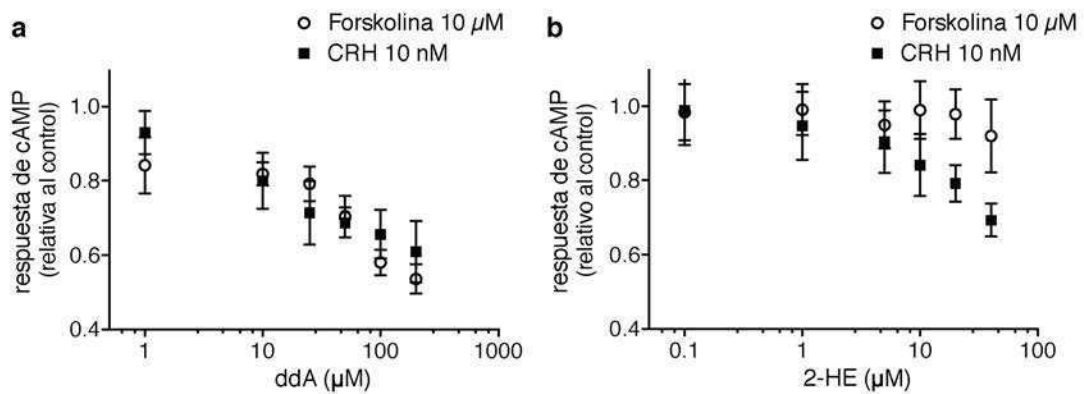


Figura 26 | Efecto de los inhibidores de tmACs y sAC sobre la respuesta de CRH y forskolina

Inhibición de la respuesta de cAMP disparada por CRH 10 nM o forskolina 10 μM en células HT22-CRHR1-Epac-SH¹⁸⁷ para las concentraciones indicadas de los inhibidores 2',5'-ddA (a) o 2-HE (b). Los valores representan el cambio de FRET 2,5 min después del agregado del inhibidor, relativo al valor en ausencia de inhibidores. Datos: media ± SEM, 15-20 células.

Finalmente, decidimos evaluar cómo era la respuesta de cAMP frente al estímulo CRH cuando se incubaba con los inhibidores de tmACs y sAC en simultáneo respecto de ambos tratamientos por separado. Se observó una reducción mayor de los niveles de cAMP al incubarse con ambos inhibidores juntos que por separado (Figura 27), apoyando aún más la idea de la participación de ambas fuentes de cAMP en la respuesta de CRH.

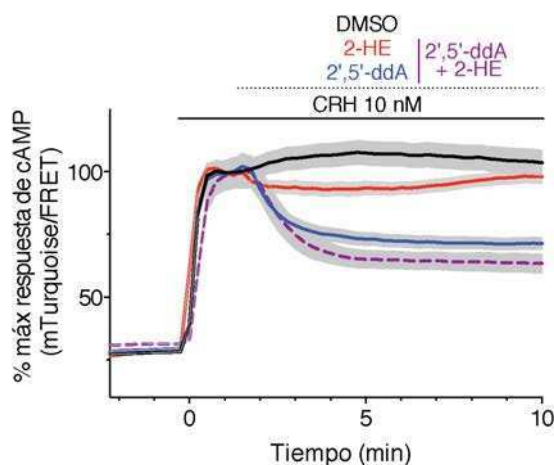


Figura 27 | Efecto de los inhibidores de tmACs y sAC juntos sobre la respuesta de cAMP dependiente de CRH

Las células HT22-CRHR1-Epac-SH¹⁸⁷ fueron estimuladas con CRH 10 nM a tiempo 0. El vehículo o los inhibidores específicos de tmACs (2',5'-ddA 100 μM) o sAC (2-HE 20 μM) fueron agregados 1,5 min después del estímulo. Se grafica la respuesta de cAMP medida en células únicas relativo al máximo de la respuesta. Las curvas son representativas de 3 experimentos independientes. Datos: media ± SEM, 20-25 células.

tmACs y sAC están implicadas en la inducción transcripcional de *c-fos* mediada por CRH

Hemos observado previamente que tanto las tmACs como sAC participan en la fosforilación en Ser133 de CREB (Inda, 2012). Además, hemos identificado que la fosforilación de CREB depende de la actividad de PKA, pero no de ERK1/2 (Inda, 2012) en las células HT22-CRHR1. CREB es un factor de transcripción que tiene funciones críticas en el SNC (Benito y Barco, 2010). La expresión de nuevos genes resulta clave para la transición entre respuestas a corto y largo plazo. La activación de los programas de transcripción son una parte esencial de la respuesta celular a la estimulación externa, regula múltiples procesos incluyendo el desarrollo de la arquitectura neuronal y el aprendizaje y memoria, y está alterado en muchos desórdenes neuronales (Benito y Barco, 2015).

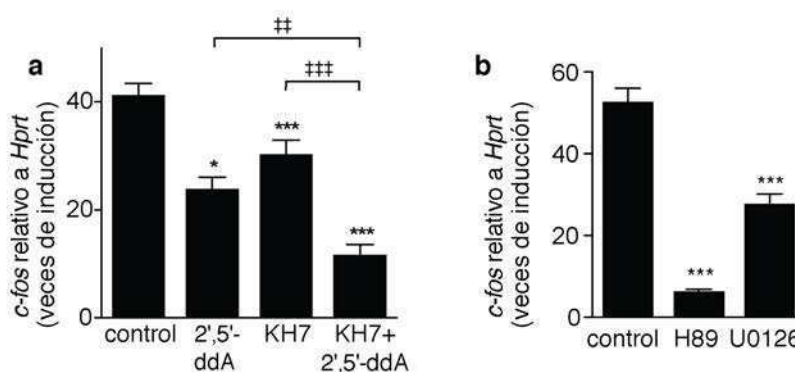


Figura 28 | Rol de tmACs y sAC sobre la inducción transcripcional de *c-fos* mediada por CRH

Expresión de *c-fos* inducido por CRH medido por RT-q-PCR en células HT22-CRHR1. Los niveles de *c-fos* fueron normalizados a los de *Hprt* y relativizados a los niveles en la condición basal de cada tratamiento.

a, Las células fueron preincubadas con el vehículo o los inhibidores específicos de tmACs (2',5'-ddA 100 μ M) o sAC (KH7 7,5 μ M).

b, Las células fueron preincubadas con el vehículo o los inhibidores específicos de PKA (H89 10 μ M) o MEK1/2 (U0126 10 μ M).

Datos: media \pm SEM, n=3. Por ANOVA de un factor y prueba *post hoc* de Tukey *, p<0,05 ***, p<0,001 respecto del control; ††, p<0,01, †††, p<0,001 entre los tratamientos indicados.

Nos preguntamos si la participación de ambas fuentes de cAMP a nivel de la fosforilación de CREB también era evidente a nivel de la regulación transcripcional dependiente de CRH. Con este objetivo analizamos la expresión del gen *c-fos*, uno de los genes de respuesta temprana más caracterizados en la respuesta mediada por la vía de cAMP. CRH produjo un fuerte aumento del nivel de mRNA de *c-fos* 1 h después de la estimulación de las células HT22-CRHR1, medido por RT-q-PCR (Figura 28a). La inducción de *c-fos* disminuyó significativamente cuando las células fueron preincubadas con el inhibidor de tmACs, 2',5'-ddA o con el inhibidor de sAC, KH7. La inhibición *c-fos* fue aún mayor cuando se incubaron las células con ambos inhibidores

en simultáneo (Figura 28a). Estos resultados refuerzan el modelo propuesto de que tanto las tmACs como la sAC son fuentes de cAMP que regulan la señalización celular en respuesta a CRH.

Adicionalmente, investigamos cómo la actividad de PKA y ERK1/2 regulaban a la expresión de *c-fos*. En presencia del inhibidor de PKA H89, la inducción de *c-fos* mediada por CRH fue despreciable (Figura 28b). Al inhibir la vía de ERK1/2 con el inhibidor de MEK1/2 U0126, la expresión de *c-fos* disminuyó parcialmente (Figura 28b). Esto indica que aunque ERK1/2 no está involucrado en la fosforilación de CREB, ERK1/2 sería necesario al menos parcialmente para los efectos transcripcionales de CRHR1/cAMP.

¿Participan las tmACs y sAC en cascadas de señalización diferentes?

Múltiples fuentes de cAMP pueden contribuir a un *pool* de cAMP común o cada una de ellas pueden actuar diferencialmente y generar respuestas celulares específicas. Habiendo establecido que, además de las tmACs, sAC es necesaria para la generación de cAMP en respuesta a CRHR1 activado por CRH, decidimos preguntar si los distintos tipos de ciclasas mediaban funciones específicas.

Hemos investigado previamente los mecanismos involucrados en la fosforilación de ERK1/2 río abajo de CRHR1, identificando la participación de mecanismos dependientes e independientes de proteínas G en las células HT22-CRHR1 (Bonfiglio *et al.*, 2013). Además, ya hemos determinado que la activación de ERK1/2 depende de los niveles de cAMP en este sistema. Por lo tanto, decidimos utilizar la activación de ERK1/2 como lectura para evaluar el rol de las distintas fuentes de cAMP en respuesta a CRH.

En primer lugar, utilizando inhibidores farmacológicos, se observó que la inhibición específica de tmACs con 2',5'-ddA atenuó solamente la fase temprana (5 min) de fosfo-ERK1/2 (Figura 29b), como hemos reportado previamente (Bonfiglio *et al.*, 2013). En contraste, los dos inhibidores de sAC, KH7 y 2-HE, redujeron los niveles de fosfo-ERK1/2 tanto en la primera como en la segunda fase de activación (5 y 30 min, Figura 29a-b). Más aún, cuando las células se incubaron con los inhibidores de tmACs y sAC en simultáneo, se observó una reducción más pronunciada de fosfo-ERK1/2 en la fase temprana al comparar con cada tratamiento por separado (Figura 29b).

Luego, evaluamos la activación de ERK1/2 mediada por CRH en células HT22-CRHR1 donde se redujeron los niveles endógenos de sAC transfectando el siRNA específico. En paralelo, se determinó la cinética de fosfo-ERK1/2 es respuesta a isoproterenol, que también presenta una respuesta bifásica de ERK1/2 en células HT22-CRHR1, similar a la descrita en las células

HEK293T (Shenoy *et al.*, 2006). El silenciamiento de sAC afectó significativamente los niveles de ambas fases de fosfo-ERK1/2 estimuladas por CRH (Figura 30a), de manera similar a lo observado utilizando inhibidores (Figura 29). Sin embargo, silenciar sAC no tuvo un efecto significativo en la activación de ERK1/2 mediada por isoproterenol (Figura 30b), en línea con lo observado midiendo cAMP (Figura 25c). En conjunto, estos resultados sugieren que sAC puede mediar procesos distintos que los de tmACs en la cascada de transducción de señales de CRHR1.

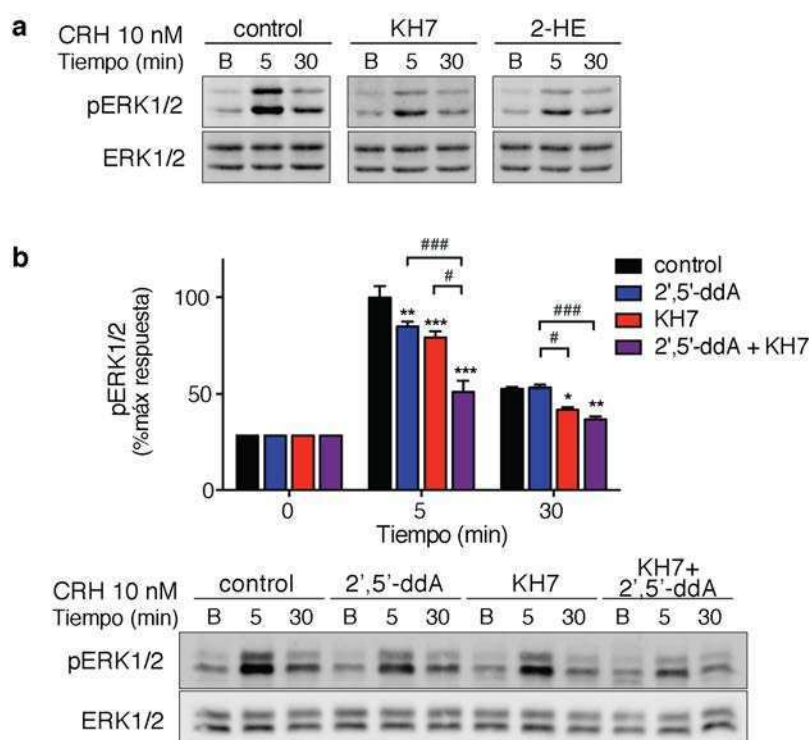


Figura 29 | Efecto de los inhibidores de tmACs y sAC sobre la respuesta de ERK1/2 dependiente de CRH
a, Las células HT22-CRHR1 fueron preincubadas con el vehículo o los inhibidores específicos de sAC (KH7 7,5 μ M o 2-HE 20 μ M) y estimuladas con CRH 10 nM.

b, Las células HT22-CRHR1 fueron preincubadas con el vehículo o los inhibidores específicos de tmACs (2',5'-ddA 100 μ M) o sAC (KH7 7,5 μ M o 2-HE 20 μ M) y estimuladas con CRH 10 nM.

Los niveles de ERK1/2 fosforilado (pERK1/2) y total se determinó por Western blot en los tiempos indicados. Los resultados se expresan como el porcentaje del máximo pERK1/2. Datos: media \pm SEM, n=4. Por ANOVA de dos factores con prueba *post hoc* de Tukey *, p < 0,05; **, p < 0,01; ***, p < 0,001 respecto al control, #, p < 0,05; ###, p < 0,01 entre los tratamientos indicados.

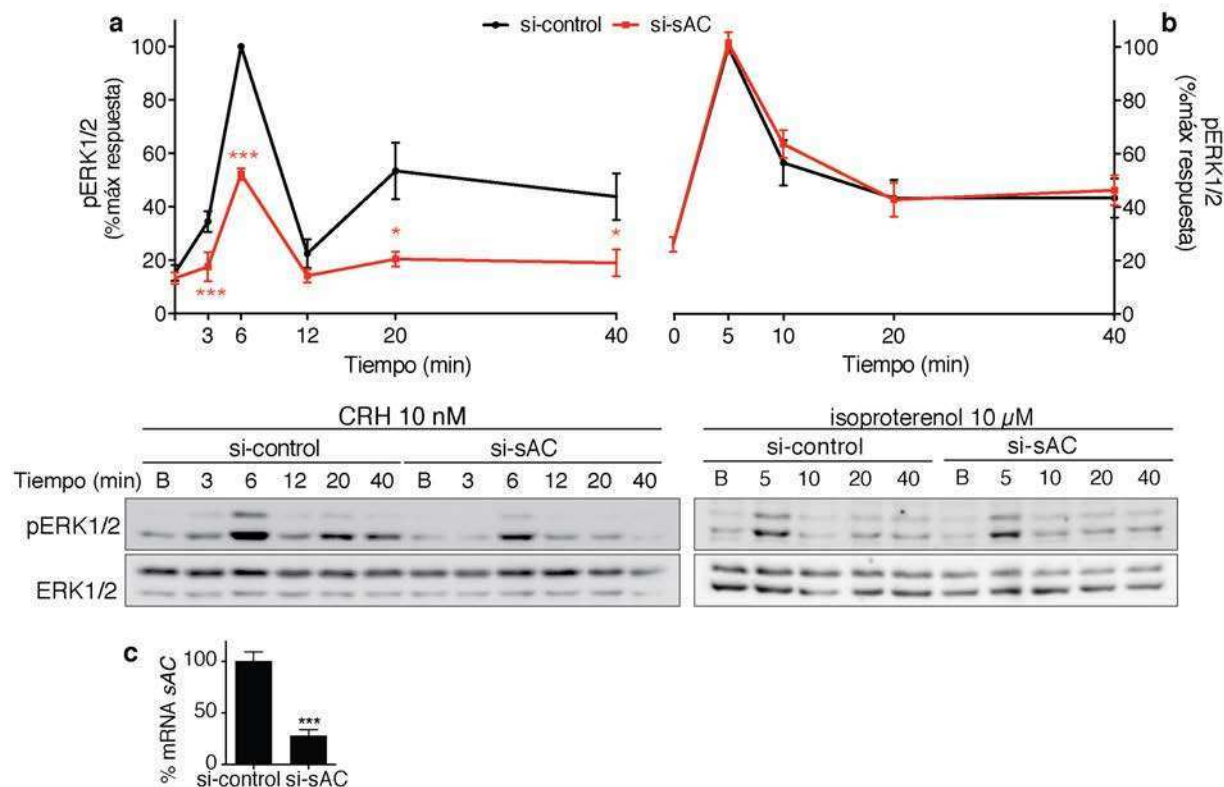


Figura 30 | La sAC participa en las fases temprana y tardía de pERK1/2 en respuesta a CRH y no a isoproterenol en células HT22-CRHR1

Las células HT22-CRHR1 fueron transfectadas con siRNA contra GL3 (control) o sAC por 72 h antes de estimularlas con CRH 10 nM (a) o isoproterenol 10 μM (b). Los niveles de ERK1/2 fosforilado (pERK1/2) y total se determinaron por Western blot en los tiempos indicados. Los resultados se expresan como el porcentaje del máximo pERK1/2. Datos: media ± SEM, n=3. Se realizó la prueba t de Student para cada tiempo; *, p < 0,05; ***, p < 0,001. c, La eficiencia del silenciamiento de sAC fue determinado por RT-qPCR normalizado a *Hprt* (media ± SEM, n = 3). ***, p < 0,001, por prueba t de Student.

sAC fue identificada en la búsqueda de interactores de la MAPKKK B-Raf. Es llamativo que, aunque la contribución de sAC es pequeña a nivel de la respuesta de cAMP estimulada por CRH, al evaluar su rol a nivel de la fosforilación de ERK1/2, su participación es más notoria. Podría hipotetizarse a partir de estos datos que el *pool* de cAMP generado por sAC cumple funciones específicas, por ejemplo, la activación de ERK1/2 o el efecto neuritogénico.

Dado que CRHR1 es un GPCR que suele acoplarse a Gs, la vía canónica de señalización involucra la generación de cAMP a nivel de la membrana plasmática mediada por tmACs, evidenciada en la fase temprana de fosfo-ERK1/2. El efecto de la inhibición o el silenciamiento de sAC sobre la fase tardía de fosfo-ERK1/2 revela que la activación de sAC es necesaria para esta fase de activación, que a su vez es dependiente de la endocitosis del receptor.

La señalización de CRHR1 en otros contextos celulares

sAC está involucrada en la señalización de CRH en células AtT20

El siguiente interrogante que buscamos responder fue determinar si sAC es un componente de la respuesta de CRHR1 sólo en el contexto neuronal hipocampal o si tenía un rol general en la función de este receptor. Con este fin, seleccionamos a la línea celular murina derivada de corticotrofos, AtT20 como un segundo escenario de relevancia fisiológica para CRH. Estas células presentan niveles endógenos tanto de CRHR1 (Peeters *et al.*, 2004) como de sAC (Figura 22a).

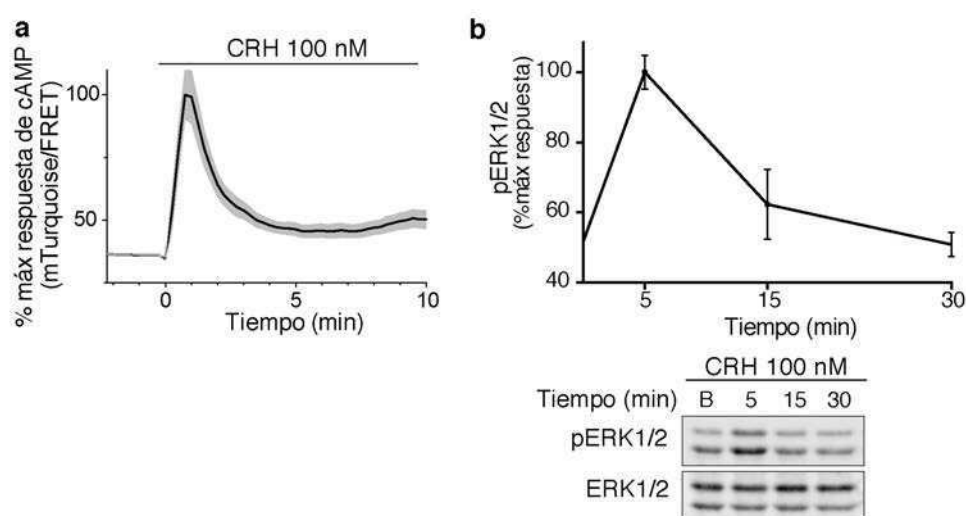


Figura 31 | CRH promueve el aumento de cAMP y la fosforilación de ERK1/2 en las células AtT20

a, Las células AtT20 fueron transfectadas con el sensor de cAMP Epac-S^{H187} y estimuladas a tiempo 0 con CRH 100 nM. Se grafica la respuesta de FRET medida en células únicas relativo al máximo de la respuesta. Datos: media \pm SEM, 5 células.

b, Las células AtT20 fueron estimuladas con CRH 100 nM por los tiempos indicados. Los niveles de ERK1/2 fosforilado (pERK1/2) y total se determinaron por Western blot. Los resultados se expresan como el porcentaje del máximo pERK1/2. Datos: media \pm SEM, n=3.

En primer lugar, a través de la transfección transitoria del sensor Epac-S^{H187} determinamos que CRH generó un aumento transitorio en los niveles de cAMP (Figura 31a), con una cinética diferente a la observada para los cultivos primarios neuronales y las células HT22-CRHR1. Además, como es típico de los sistemas neuroendócrinos, aumentos de cAMP conducen a la fosforilación de ERK1/2 en las células AtT20 (Van Kolen *et al.*, 2010; Emery *et al.*, 2013). La cinética de activación de ERK1/2 también fue diferente al perfil observado para las células HT22-CRHR1 (Figura 31b). En paralelo, se investigó la participación de sAC en la señalización de PACAP38, un ligando del GPCR de clase B PAC1, que también se acopla a Gs y que genera

un aumento transitorio de cAMP (Figura 32a) y un consecuente aumento en fosfo-ERK1/2 (Figura 32b) en células AtT20.

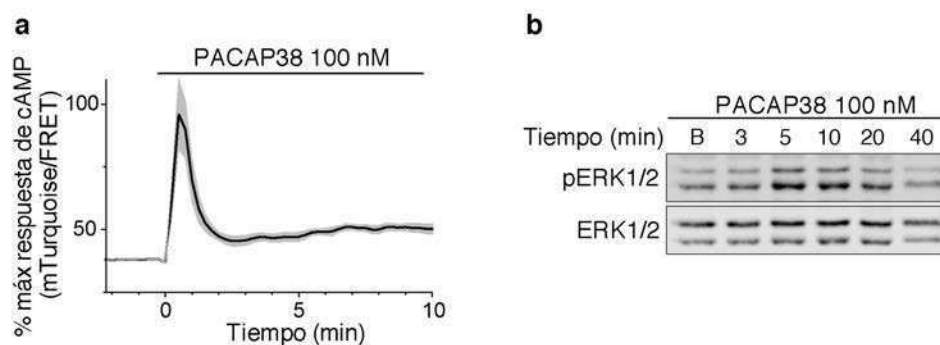


Figura 32 | PACAP38 promueve el aumento de cAMP y la fosforilación de ERK1/2 en las células AtT20

a, Las células AtT20 fueron transfectadas con el sensor de cAMP Epac-SH¹⁸⁷ y estimuladas a tiempo 0 con PACAP38 100 nM. Se grafica la respuesta de FRET medida en células únicas relativo al máximo de la respuesta. Datos: media \pm SEM, 5 células. b, Las células AtT20 fueron estimuladas con PACAP38 100 nM por los tiempos indicados. Los niveles de ERK1/2 fosforilado (pERK1/2) y total se determinaron por Western blot.

Se evaluó la participación de las distintas ciclasas en la cascada de señalización de CRH en células AtT20 utilizando la activación de ERK1/2 como lectura. Utilizando inhibidores farmacológicos, hallamos que tanto el inhibidor específico de tmACs, 2',5'-ddA, así como los dos inhibidores de sAC, 2-HE y KH7, disminuyeron la fosforilación de ERK1/2 estimulada por CRH (Figura 33a). Además, el silenciamiento específico de sAC también disminuyó los niveles de fosfo-ERK1/2 (Figura 33b). A diferencia de lo observado para CRH, el silenciamiento de sAC no tuvo efectos en la activación de ERK1/2 en respuesta a PACAP38 (Figura 33c). Esto indica que sAC es un componente específico de la señalización de CRHR1.

La función de CRH en las células corticotrofas de la hipófisis es clave para la activación del eje HPA. En particular, CRH estimula la inducción transcripcional del gen *Pomc*, que codifica para el precursor de ACTH. Buscamos evaluar si sAC estaba involucrada a nivel de la transcripción de *Pomc*. Con este objetivo, determinamos la inducción por CRH de la construcción reportera *Pomc*-Luc (Liu *et al.*, 1992) en presencia de los inhibidores de sAC, KH7 y 2-HE. Se observó que la actividad luciferasa en respuesta a CRH fue significativamente menor en las células donde sAC estaba inhibida respecto del control, mientras que no se observaron diferencias en la actividad basal (Figura 34). En conjunto, estos resultados son consistentes con la participación de sAC en la señalización de CRHR1 en un segundo escenario celular y sugieren un rol clave de sAC en la función de CRH.

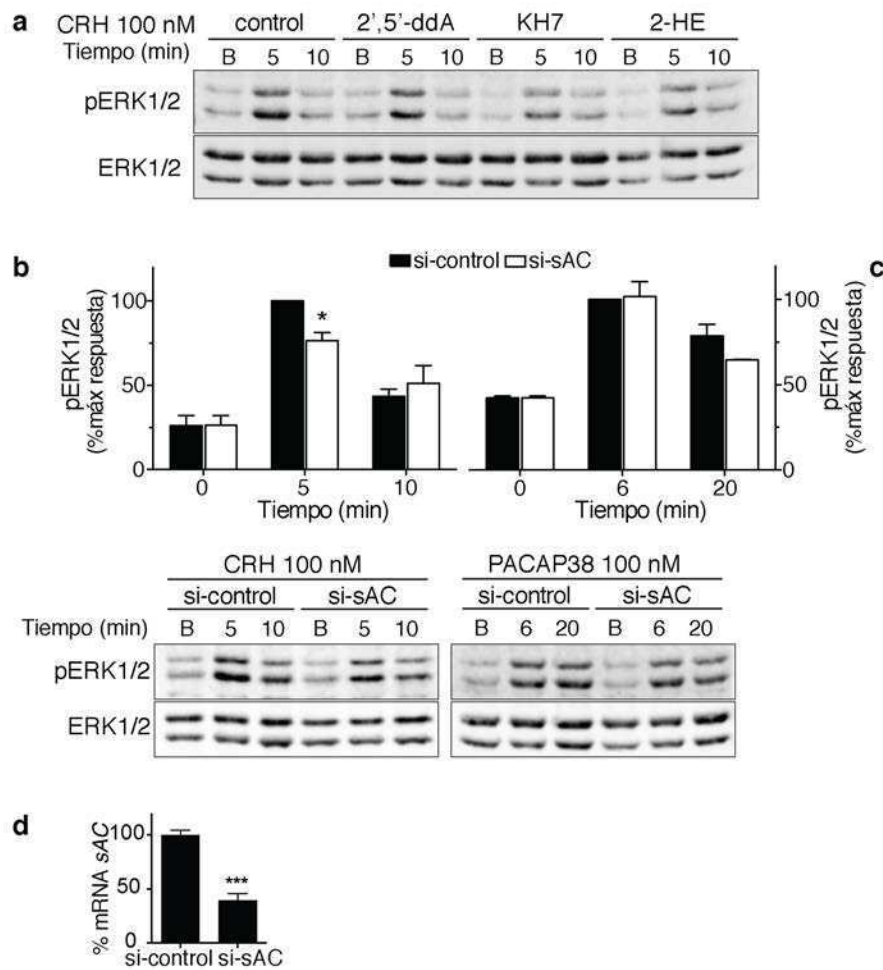


Figura 33 | La sAC participa en la fosforilación de ERK1/2 en respuesta a CRH y no a PACAP38 en células AtT20

a, Las células AtT20 fueron preincubadas con el vehículo o los inhibidores específicos de tmACs (2',5'-ddA 50 μ M) o sAC (KH7 7,5 μ M o 2-HE 10 μ M) y estimuladas con CRH 100 nM.

b-c, Las células AtT20 fueron transfectadas con un siRNA contra GL3 (control) o sAC por 72 h antes de estimularlas con CRH 100 nM (b) o PACAP38 100 nM (c). Los niveles de ERK1/2 fosforilado (pERK1/2) y total se determinaron por Western blot. Los resultados se expresan como el porcentaje del máximo pERK1/2. Se realizó la prueba t de Student para cada tiempo; *, p < 0,05; ***, p < 0,001. Datos: media \pm SEM, n=3. d, La eficiencia del silenciamiento de sAC fue determinado por RT-q-PCR normalizado a *Hprt* Datos: media \pm SEM, n = 3. ***, p < 0,001, por prueba t de Student.

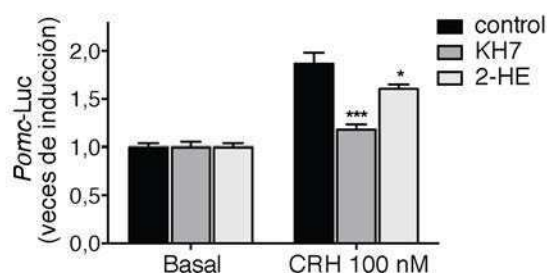


Figura 34 | La sAC está involucrada en la inducción transcripcional de *Pomc-Luc*

Las células AtT20, transfectadas con *Pomc-Luc* y β -gal, fueron preincubadas con el vehículo o los inhibidores de sAC, KH7 7,5 μ M o 2-HE 10 μ M, y estimuladas con CRH 100 nM. Se determinó la actividad Luciferasa y se relativizó a la actividad β -gal. Datos: media \pm SEM, n=4 de un experimento representativo de 3 experimentos independientes con resultados similares. Por ANOVA de dos factores con prueba *post hoc* de Tukey *, p < 0,05; **, p < 0,01; ***, p < 0,001 respecto al control.

En la línea 3T3L1-CRHR1, sAC no participa de la respuesta de cAMP en la señalización de CRH

Utilizamos la línea de fibroblastos de ratón 3T3L1 como un tercer contexto celular para explorar el rol de sAC, que se expresa de forma endógena (Figura 22a), en la señalización de CRH. Dado que las células 3T3L1 no expresan el receptor CRHR1, se generaron clones estables que expresan la construcción c-Myc-CRHR1, igual a la que expresan los clones HT22.

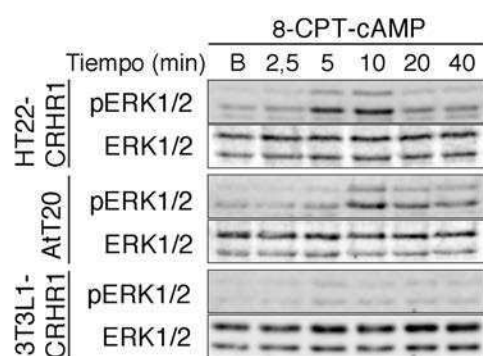


Figura 35 | Estudio de la fosforilación de ERK1/2 en respuesta a 8-CPT-cAMP

Las células HT22-CRHR1, AtT20 o 3T3L1-CRHR1 fueron tratadas con el análogo permeable de cAMP, 8-CPT-cAMP 50 μ M, por los tiempos indicados. Los niveles de ERK1/2 fosforilado (pERK1/2) y total fueron determinados por Western blot.

Seleccionamos esta línea celular ya que presenta características diferentes a los dos sistemas celulares usados previamente. Ha sido ampliamente establecido que existen contextos celulares en los que aumentos en los niveles de cAMP favorecen la activación de la vía de ERK1/2 y otros en los que cAMP inhibe esta misma vía (Stork y Schmitt, 2002). Al tratar las células HT22-CRHR1, AtT20 y 3T3L1-CRHR1 con el análogo permeable de cAMP, 8-CPT-cAMP, se observa que aumenta la fosforilación de ERK1/2 en las líneas HT22-CRHR1 y AtT20, pero no

en la 3T3L1-CRHR1 (Figura 35). Esto confirma que en las células 3T3L1-CRHR1 la activación de ERK1/2 no es regulada positivamente por cAMP, en línea con lo reportado previamente (Emery *et al.*, 2013) y a diferencia de lo que ocurre típicamente en los sistemas neuronales y neuroendócrinos.

En las células 3T3L1-CRHR1, la estimulación con CRH disparó la activación de las vías de ERK y de CREB (Figura 36a), confirmando que el receptor es funcional. Además, el agregado de CRH generó una respuesta sostenida de cAMP, medido con el sensor Epac-S^{H187} (Figura 37a).

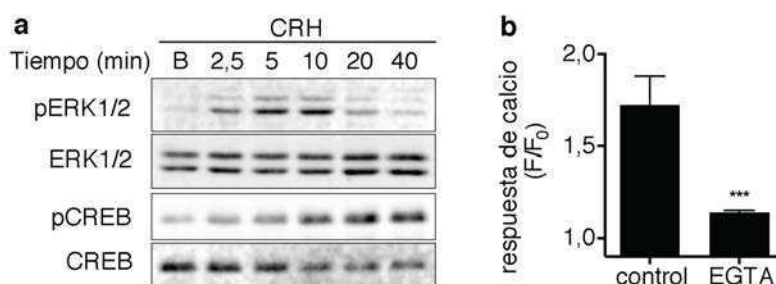


Figura 36 | Señalización mediante ERK1/2, CREB y calcio en respuesta a CRH en células 3T3L1-CRHR1

a, Las células 3T3L1-CRHR1 fueron estimuladas con CRH 100 nM por los tiempos indicados. Los niveles de ERK1/2 fosforilado (pERK1/2) y total, y CREB fosforilado (pCREB) y total fueron determinados por Western blot.

b, Las células 3T3L1-CRHR1 fueron cargadas con el indicador de calcio permeable Fluo-4-AM y preincubadas con el vehículo o el quelante de calcio EGTA 500 μ M. La respuesta de calcio mediada por CRH 100 nM fue determinada como el cambio de fluorescencia respecto del basal 15 s después de la estimulación. Media \pm SEM, n = 30. ***, p < 0,001, por prueba t de Student.

¿Participa sAC la señalización de CRHR1 en las células 3T3L1-CRHR1? Para responder esta pregunta decidimos evaluar el efecto de los distintos inhibidores de ciclasas en la respuesta de cAMP generada por CRH. Con este fin, se generaron clones estables del sensor Epac-S^{H187} en las células 3T3L1-CRHR1 (3T3L1-CRHR1-Epac-S^{H187}). Se observó que el agregado del inhibidor de tmACs, 2',5'-ddA, atenuó la respuesta de cAMP. Sin embargo, el agregado del inhibidor de sAC, 2-HE, no tuvo un efecto significativo sobre los niveles de cAMP (Figura 37a). Para descartar la posibilidad de que la falta de efecto fuera producto de niveles de expresión bajos de sAC en estas células, se repitió el experimento en células previamente transfectadas con la construcción sAC_r-HA, que es la isoforma más activa catalíticamente (Tresguerres *et al.*, 2011), obteniendo resultados similares (Figura 37b).

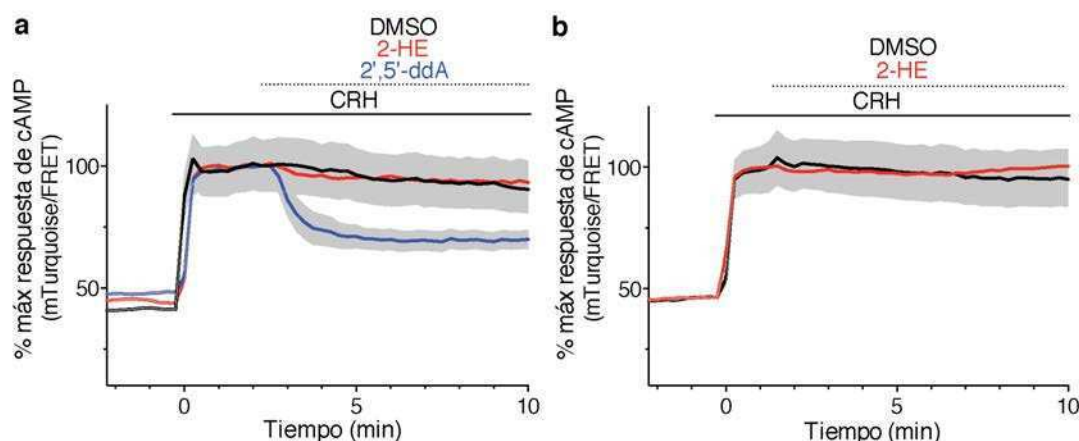


Figura 37 | Respuesta de cAMP mediada por CRH en células 3T3L1-CRHR1

Respuesta de FRET medida en células 3T3L1-CRHR1-Epac-SH¹⁸⁷ relativo al máximo de la respuesta. **b**, Las células fueron transfectadas por 48 h con sAC-HA. **a-b**, Las células fueron estimuladas con CRH 100 nM a tiempo 0. El vehículo o los inhibidores específicos de tmACs (2',5'-ddA 100 μ M) o sAC (2-HE 20 μ M) fueron agregados 1,5 min después del estímulo. Las curvas son representativas de 3 experimentos independientes. Datos: media \pm SEM, 20-30 células.

En muchos sistemas celulares la unión de CRH al receptor CRHR1 estimula un aumento de calcio intracelular (Kovalovsky *et al.*, 2002; Gutknecht *et al.*, 2009; Bonfiglio *et al.*, 2013). Dado que calcio es un activador de sAC (Jaiswal y Conti, 2003; Carlson *et al.*, 2007; Kleinboelting *et al.*, 2014), nos preguntamos si en las células 3T3L1-CRHR1 existía una respuesta de calcio dependiente de CRH. Para determinar los niveles de calcio se utilizó el indicador permeable Fluo-4-AM, que aumenta su fluorescencia cuando está unido al ion. Al agregar CRH, se midió una respuesta transitoria de calcio, que pudo ser bloqueada al preincubar las células con el quelante extracelular de calcio EGTA (Figura 36b), de manera similar a la respuesta de calcio observada para CRH en las células HT22-CRHR1 (Bonfiglio *et al.*, 2013).

En conclusión, a pesar de que las respuestas dependientes de CRH son comparables en las células HT22-CRHR1 y 3T3L1-CRHR1 en términos de las cinéticas de cAMP y calcio, sAC no parece estar involucrada en la generación de cAMP en la línea 3T3L1-CRHR1. Esto indica que la participación de sAC en la señalización de CRHR1 depende del contexto celular. Además, estos resultados en conjunto con las observaciones previas, permiten hipotetizar que existe cierta asociación funcional entre el *pool* de cAMP dependiente de sAC y la vía de ERK1/2.

Los efectores del cAMP generado por sAC

En siguiente lugar, nos propusimos explorar cuáles eran los efectores de cAMP río abajo de sAC. Se ha descrito que tanto PKA como los EPACs pueden mediar la activación de la vía de ERK1/2 (Kawasaki *et al.*, 1998). Por otra parte, se ha demostrado que el cAMP generado por sAC señala a través de PKA durante la capacitación espermática (Wertheimer *et al.*, 2013), la migración transendotelial de los leucocitos (Watson *et al.*, 2015) y en la vía estimulada por H₂O₂ en el epitelio de los bronquios (Ivonnet *et al.*, 2015), mientras que la vía sAC-EPAC-Rap1 ha sido relacionada con la proliferación celular en modelos de células tumorales de próstata y de mama (Flacke *et al.*, 2013; Appukuttan *et al.*, 2014; Onodera *et al.*, 2014).

Tanto tmACs como sAC señalizan a través de PKA en respuesta a CRH en células HT22-CRHR1

En las células HT22-CRHR1, hemos demostrado previamente que la inhibición de PKA con H89 reduce los niveles de fosfo-ERK a tiempos cortos, sin afectar la segunda fase de activación (Bonfiglio *et al.*, 2013). Se utilizaron otros inhibidores de PKA, KT5720 y RpcAMPS, usando concentraciones bajas de los compuestos para minimizar posibles efectos inespecíficos. Nuevamente, se observó una disminución en la activación en la fase temprana de fosfo-ERK1/2, sin afectar la fase tardía (Figura 38).

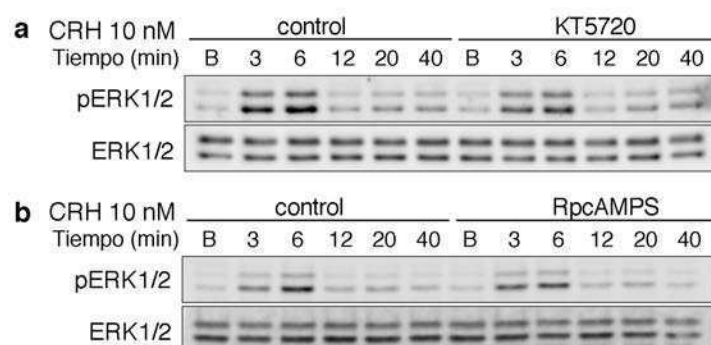


Figura 38 | La activación de la PKA participa en la primera fase de fosfo-ERK1/2 en respuesta a CRH en células HT22-CRHR1

Las células HT22-CRHR1 fueron preincubadas con vehículo o los inhibidores de PKA (a, KT5720 700 nM; b, RpcAMPS 75 μ M) y estimuladas con CRH 10 nM por los tiempos indicados. Los niveles de ERK1/2 fosforilado (pERK1/2) y total fueron determinados por Western blot.

Con el objetivo de monitorear la actividad de PKA directamente, se utilizaron las células HT22-CRHR1-AKAR4, que expresan de forma estable el sensor AKAR4. La estimulación de células HT22-CRHR1-AKAR4 con CRH produjo un aumento rápido y sostenido de FRET, que indica la fosforilación del sensor por PKA y que fue bloqueado rápidamente cuando se agregó el

inhibidor H89 (Figura 39a). Luego, evaluamos si la actividad de PKA dependía de las distintas ciclasas utilizando los inhibidores. Observamos que la preincubación tanto con 2',5'-ddA como con 2-HE redujeron significativamente la activación de PKA mediada por CRH (Figura 39b). De esta manera, concluimos que el cAMP generado por tmACs y sAC contribuye a la actividad de PKA en estas células. Teniendo en cuenta que ambos tipos de ciclasas afectan la primera fase de fosfo-ERK1/2, que es la fase sensible a PKA, estos resultados son consistentes.

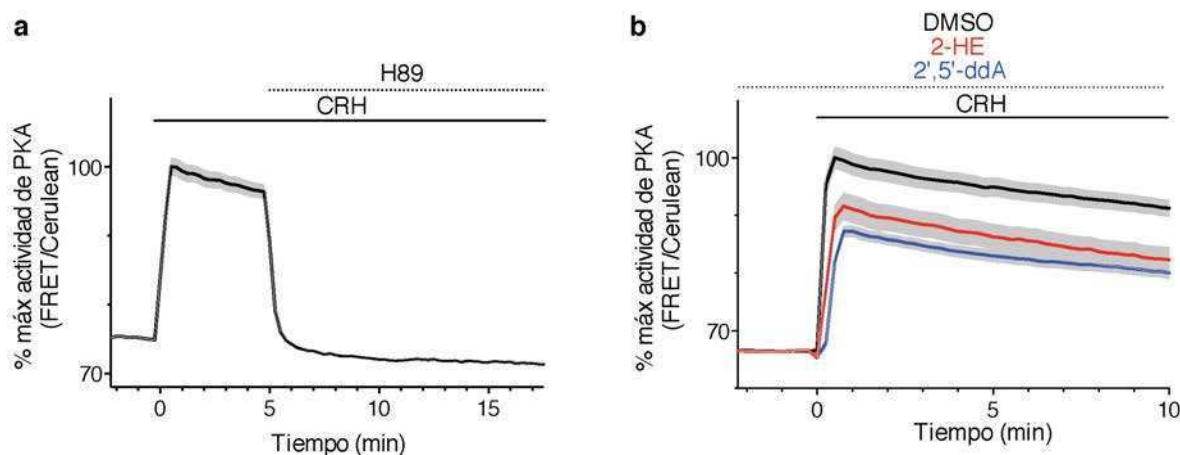


Figura 39 | Las tmACs y sAC están involucradas en la activación de la PKA mediada por CRH

Respuesta de FRET medida en células HT22-CRHR1-AKAR4 relativo al máximo de la respuesta.

a, Las células fueron estimuladas con CRH 10 nM y se agregó el inhibidor de PKA H89 10 μM cuando se indica.

b, Las células fueron preincubadas con vehículo, el inhibidor de tmACs (2',5'-ddA 100 μM) o el inhibidor de sAC (2-HE 20 μM) y estimuladas a tiempo 0 con CRH 10 nM. Las curvas son representativas de 3 experimentos independientes. Datos: media ± SEM, 20-30 células.

Las proteínas EPAC están involucradas en ambas fases de activación de ERK1/2 en células HT22-CRHR1

Para investigar si las proteínas EPAC participan en la señalización de CRH se utilizaron distintas estrategias experimentales. Por RT-q-PCR se determinó que las células HT22-CRHR1 expresan EPAC1 y EPAC2 (ver más adelante, Figura 41). En primer lugar, se utilizó el compuesto ESI09, que ha sido identificado como un inhibidor específico de EPAC1 y EPAC2. Aunque se ha reportado que ESI09 puede inducir la agregación no específica de proteínas (Rehmann, 2013), se ha descripto más recientemente que concentraciones por debajo de los 20 μM no tienen un efecto sobre la desnaturalización proteica o la unión inespecífica (Zhu *et al.*, 2015), y se utilizó una concentración de 5 μM. La preincubación de las células HT22-CRHR1 con ESI-09 redujo fuertemente la activación de ERK1/2 tanto en la primera como en la segunda fase (Figura 40a).

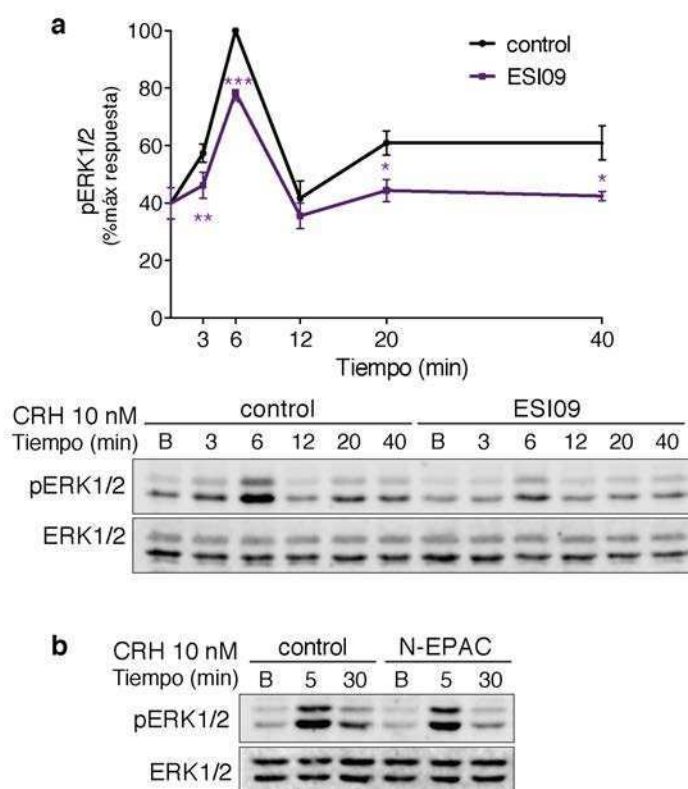


Figura 40 | Rol de las proteínas EPAC en la fosforilación de ERK1/2 en respuesta a CRH en células HT22-CRHR1

a, Las células HT22-CRHR1 fueron preincubadas con vehículo o el inhibidor de EPACs (ESI09 5 μ M) y estimuladas con CRH 10 nM por los tiempos indicados. Los niveles de ERK1/2 fosforilado (pERK1/2) y total fueron determinados por Western blot. Los resultados se expresan como el porcentaje del máximo pERK1/2. Se realizó la prueba *t* de Student para cada tiempo. Datos: media \pm SEM, n=3; *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.

b, Las células HT22-CRHR1 fueron transfectadas con el dominante negativo N-EPAC y estimuladas con CRH 10 nM por los tiempos indicados. Los niveles de ERK1/2 fosforilado (pERK1/2) y total fueron determinados por Western blot.

Por otra parte, se utilizaron métodos genéticos para bloquear la acción de los EPACs. Se ha desarrollado una construcción que funciona como un dominante negativo de la acción de los EPACs (N-EPAC, Hochbaum *et al.*, 2008). Está compuesto por el fragmento N-terminal de EPAC1 e incluye el dominio DEP (por las iniciales de *Disheveled*, *Eg110*, *Pleckstrin*) responsable del anclaje de estas proteínas en la membrana plasmática y el sitio de unión a cAMP, pero que no tiene actividad catalítica. La transfección de N-EPAC disminuyó la fosforilación de ERK1/2 en respuesta a CRH tanto a tiempos cortos como a tiempos largos (Figura 40b). Finalmente, el silenciamiento por siRNAs de EPAC1 y EPAC2 por separado también redujo los niveles de fosfo-ERK1/2 modestamente (Figura 41). El impacto pequeño del silenciamiento de los EPACs puede deberse a la actividad residual de estas proteínas.

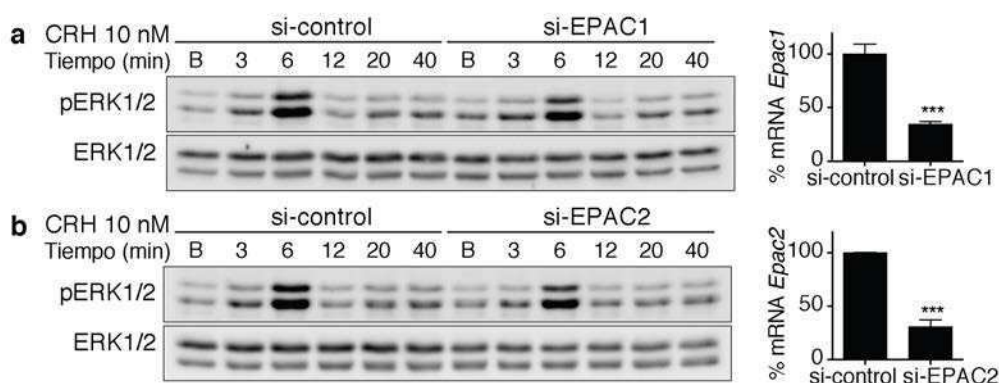


Figura 41 | Rol de las EPACs en la fosforilación de ERK1/2 en respuesta a CRH en células HT22-CRHR1. Las células HT22-CRHR1 fueron transfectadas con siRNA contra GL3 (control), EPAC1 (a) o EPAC2 (b) por 72 h antes de estimularlas con CRH 10 nM por los tiempos indicados. Los niveles de ERK1/2 fosforilado (pERK1/2) y total se determinaron por Western blot en los tiempos indicados. En el panel de la derecha en cada caso se muestra la eficiencia del silenciamiento de *Epac1* y *Epac2* por RT-q-PCR normalizado a *Hprt* (media \pm SEM, n = 3). ***, p < 0,001, por prueba t de Student.

En conjunto, estos resultados indican que las vías activadas por el cAMP en respuesta a CRH involucran a las proteínas EPAC además de PKA. Además, haber observado que al bloquear los EPACs se ve afectada la fase tardía de fosfo-ERK1/2, sugiere nuevamente que la señalización por cAMP de alguna manera está relacionada con los mecanismos de transducción de señales dependientes de la endocitosis de CRHR1.

En las células AtT20 CRH señala a través de PKA y EPACs

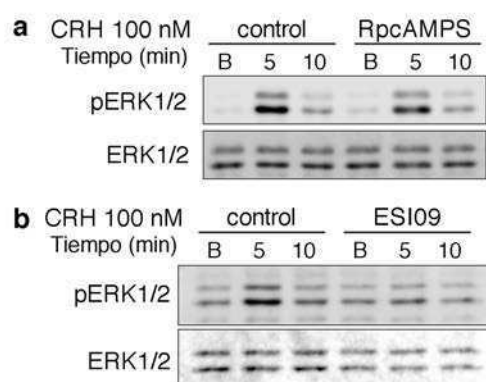


Figura 42 | Participación de los efectores de cAMP, PKA y EPACs, en la señalización de CRH en células AtT20

Las células AtT20 fueron preincubadas con vehículo, el inhibidor de PKA (a, RpcAMPS 75 μ M) o el inhibidor de EPAC (b, ESI09 10 μ M) y estimuladas con CRH 100 nM por los tiempos indicados. Los niveles de ERK1/2 fosforilado (pERK1/2) y total fueron determinados por Western blot.

En la línea celular AtT20 también buscamos determinar cuáles eran los efectores de cAMP involucrados en la acción de CRH. La activación de ERK1/2 en respuesta a CRH fue ligeramente disminuida en presencia del inhibidor de PKA RpcAMPS (Figura 42a). Por otra parte, el inhibidor de los EPACs ESI-09 produjo una reducción mayor en los niveles de fosfo-ERK1/2 dependientes de CRH (Figura 42b), en línea con reportes previos que identifican a los

EPACs como principales efectores de cAMP río abajo de CRHR1 en células AtT20 (Van Kolen *et al.*, 2010). Estos resultados indican que también en las células AtT20, los aumentos de cAMP dependientes de CRHR1 pueden activar tanto a PKA como a los EPACs.

Los moduladores de sAC también regulan la respuesta de cAMP dependiente de CRH

A diferencia de las tmACs que son reguladas principalmente por proteínas G, la actividad enzimática de sAC depende de calcio y bicarbonato. Nos propusimos estudiar cómo afectaban la respuesta de CRH los moduladores de sAC en las células HT22-CRHR1 con el fin de caracterizar aún más la función de sAC en la señalización de CRH y explorar cómo puede ser el mecanismo de activación de sAC estimulada por CRHR1.

CRH estimula un aumento de los segundos mensajeros cAMP y calcio

En el laboratorio hemos estudiado las respuestas de calcio a través del uso de indicadores químicos fluorescentes, como el Fluo4-AM. Estos métodos de visualización de los niveles de calcio son los más sensibles y cuantitativos. Sin embargo, en los últimos años se han realizado esfuerzos en desarrollar y optimizar sensores genéticos para medir calcio, ya que permiten visualizar las respuestas de calcio en subpoblaciones celulares o en localizaciones subcelulares específicas y evitan métodos invasivos para cargar las células con los indicadores. Además, se han desarrollado sensores que se excitan y emiten a diferentes longitudes de onda, creando una paleta de sensores que funcionan en distintos rangos del espectro. Esto permite, por ejemplo, monitorear la respuesta de calcio en conjunto con un sensor de FRET basado en la transferencia entre CFP y YFP como es habitual, a diferencia de los indicadores fluorescentes tradicionales que tienen rangos más amplios pero en general solapan con el sensor de FRET.

Dos clases de sensores genéticos de calcio han sido desarrollados, aquellos basados en FRET, como los del tipo camaleon (Miyawaki *et al.*, 1997), y otros basados en la proteína de unión a calcio calmodulina (CaM) y la región de unión a CaM de la cadena liviana de la miosina, fusionada al extremo carboxilo y amino-terminal de variantes permutadas circularmente de proteínas fluorescentes, que aumentan su fluorescencia cuando tienen calcio unido. En particular, en este trabajo utilizamos el sensor REX-GECO1 (Wu *et al.*, 2014) que está basado en la proteína fluorescente roja mApple y funciona a longitudes de onda mayores que el sensor Epac-S^{H187}.

A continuación, buscamos monitorear de manera simultánea las respuestas de los segundos mensajeros cAMP y calcio. Utilizamos las células HT22-CRHR1-Epac-S^{H187} transfectadas de

manera transitoria con REX-GECO1. Observamos que la estimulación con CRH produjo un aumento rápido y sincronizado de ambos segundos mensajeros, pero con perfiles diferentes (Figura 43). Los niveles de calcio intracelular aumentaron de forma pronunciada ante el agregado del estímulo y volvieron a niveles basales después de 60 s, una cinética muy similar a la observada por el método de indicadores químicos (Bonfiglio *et al.*, 2013). En contraste, los niveles de cAMP también aumentaron rápidamente, alcanzando su máximo ligeramente después que el calcio, pero se mantuvieron sostenidas durante el tiempo del experimento. Cabe destacar que el incremento de ambos segundos mensajeros está solapado temporalmente, permitiendo considerar la posibilidad de que exista algún tipo de diálogo cruzado.

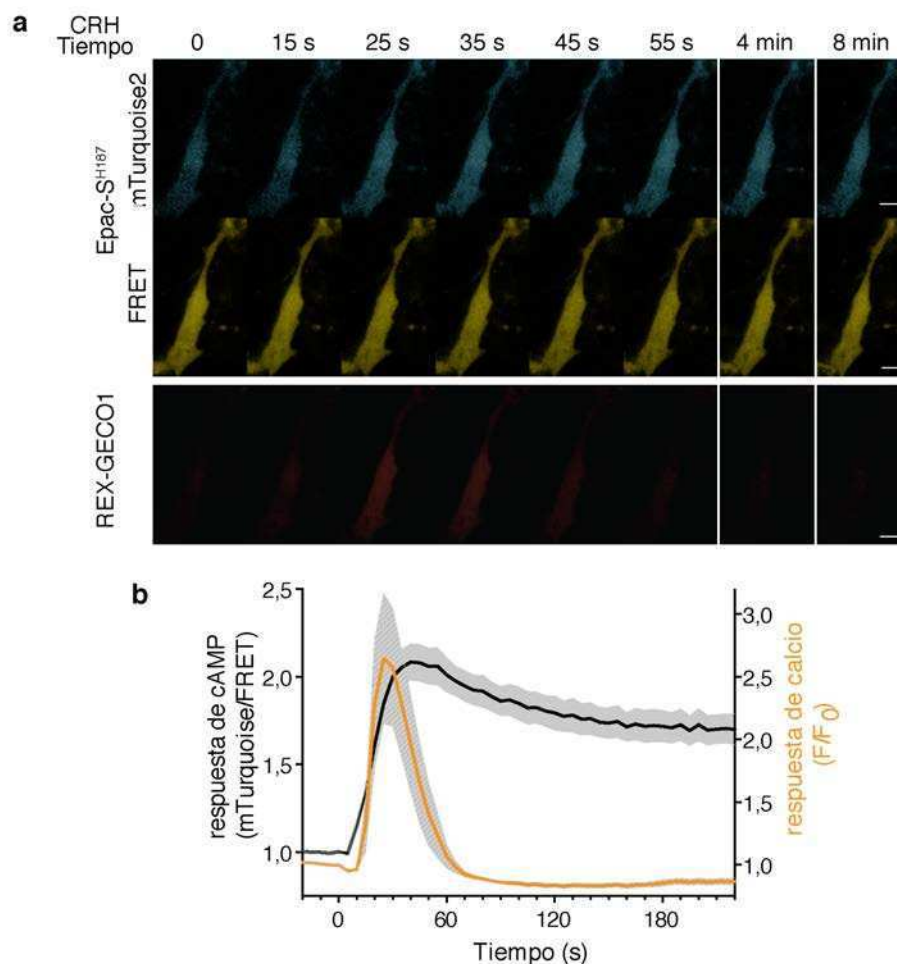


Figura 43 | Respuesta de los segundos mensajeros cAMP y calcio dependiente de CRH en las células HT22-CRHR1

Las células HT22-CRHR1 fueron co-transfectadas con el sensor de cAMP, Epac-S^{H187}, y de calcio, REX-GECO1, y estimuladas con CRH 100 nM por los tiempos indicados. a, Se muestran imágenes representativas para cada señal. Barra: 5 μ M. b, Se grafican los cambios en el fenómeno de FRET (curva negra) y de la fluorescencia de REX-GECO1 (curva naranja) en función del tiempo. Datos: media \pm SEM, 14 células.

La respuesta de calcio regula la señalización de CRH

Hemos observado que el aumento de calcio mediado por CRH es crítico para la fosforilación de ERK1/2 en las células HT22-CRHR1 (Bonfiglio *et al.*, 2013). El agregado del quelante permeable de calcio BAPTA-AM, que anula completamente el incremento de calcio (Bonfiglio *et al.*, 2013), produjo una disminución de los niveles de fosfo-ERK1/2 en respuesta a CRH tanto en la primera como en la segunda fase (Figura 44). Nos llamó la atención que el perfil de fosfo-ERK1/2 obtenido en presencia del quelante de calcio era reminiscente de aquellos obtenidos al bloquear la actividad de sAC farmacológica (Figura 29) o genéticamente (Figura 30).

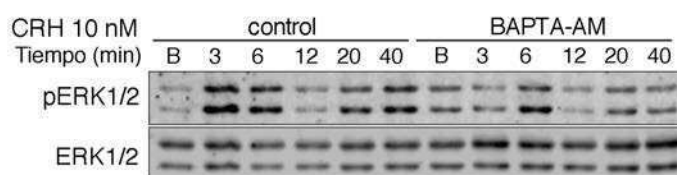


Figura 44 | La respuesta de calcio regula la activación de ERK1/2 dependiente de CRH

Las células HT22-CRHR1 fueron preincubadas con vehículo o el quelante intracelular de calcio BAPTA-AM 5 μ M y estimuladas con CRH 10 nM por los tiempos indicados. Los niveles de ERK1/2 fosforilado (pERK1/2) y total fueron determinados por Western blot.

sAC no es la única adenilil ciclasa regulada positivamente por calcio. Dos tmACs, AC1 y AC8 también son estimuladas por calcio a través de un mecanismo dependiente de CaM (Willoughby y Cooper, 2007). Buscamos investigar el rol de estas dos tmACs en la respuesta de ERK1/2 mediada por CRH. El silenciamiento específico de AC1 por siRNAs afectó solamente la primera fase de fosfo-ERK1/2 (Figura 45a). Por otra parte, no logramos detectar niveles apreciables de AC8 en estas células ni un efecto significativo del siRNA específico contra esta tmAC. Estos resultados son consistentes con la reducción de fosfo-ERK1/2 exclusivamente en la primera fase al incubar las células con el inhibidor general de las tmACs 2',5'-ddA (Bonfiglio *et al.*, 2013, Figura 45b).

Si la respuesta de calcio mediada por CRH fuera crítica para la activación de sAC, se esperaría un menor aumento de cAMP estimulado por CRH cuando está bloqueado el incremento de calcio. Para probar esta hipótesis, comparamos la respuesta de cAMP dependiente de CRH en las células HT22-CRHR1-Epac-S^{H187} preincubadas con el quelante de calcio permeable BAPTA-AM respecto de condiciones control. Notablemente, los niveles de cAMP estimulados por CRH fueron menores en presencia de BAPTA-AM (Figura 46a). Como un control adicional, el experimento también se realizó preincubando las células con el quelante extracelular de calcio EGTA, ya que sabemos que en las células HT22-CRHR1 el aumento de calcio corresponde a un

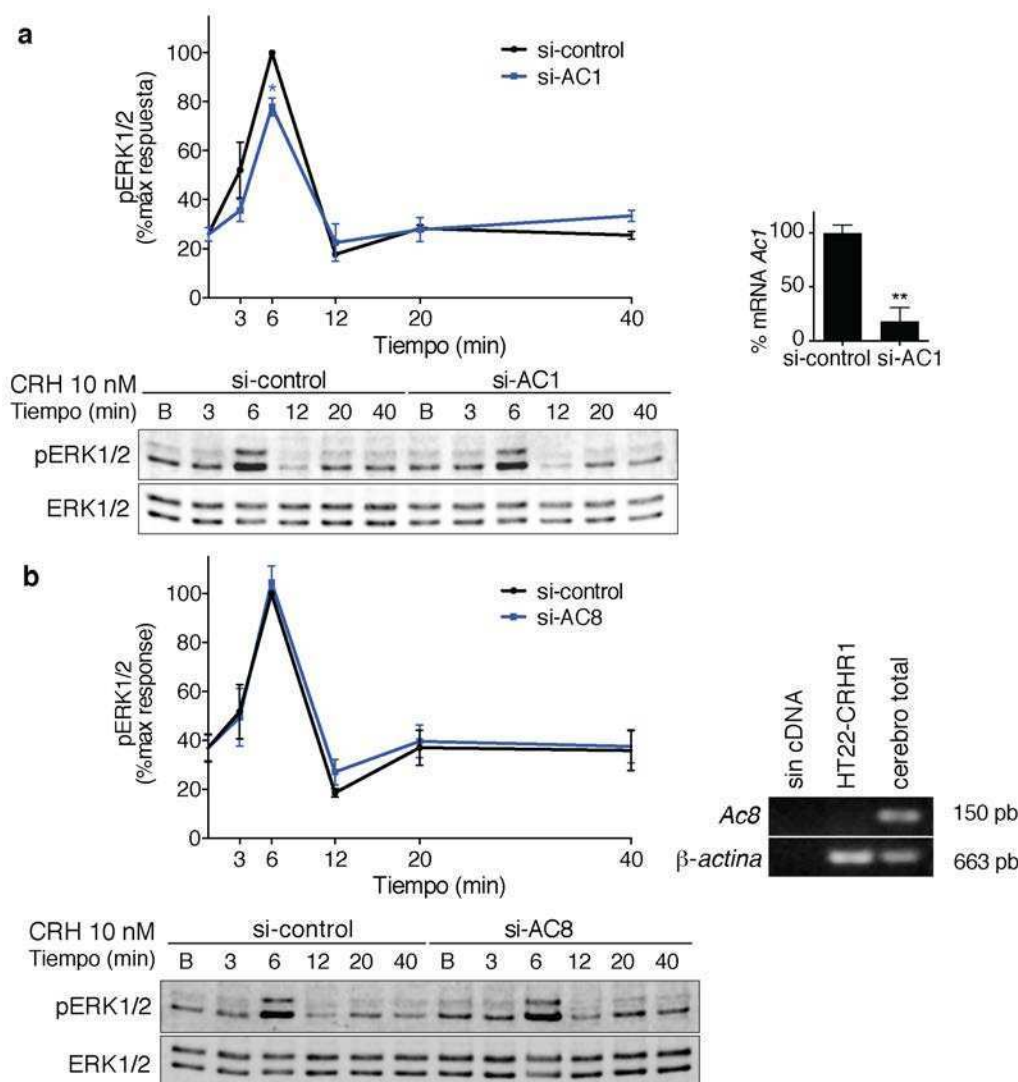


Figura 45 | La tmAC sensible a calcio AC1 participa en la primer fase de fosfo-ERK1/2 en respuesta a CRH

Las células HT22-CRHR1 fueron transfectadas con siRNA contra GL3 (control), AC1 (a) o AC8 (b) por 72 h antes de estimularlas con CRH 10 nM por los tiempos indicados. Los niveles de ERK1/2 fosforilado (pERK1/2) y total se determinaron por Western blot. Los resultados se expresan como el porcentaje del máximo pERK1/2. Se realizó la prueba *t* de Student para cada tiempo; *, $p < 0,05$. Datos: media \pm SEM, $n=3$. a, En el panel de la derecha se muestra la eficiencia del silenciamiento de *Ac1* RT-q-PCR normalizado a *Hprt* (media \pm SEM, $n = 3$). **, $p < 0,01$, por prueba *t* de Student. b, En el panel de la derecha se muestra la expresión de *Ac8* por RT-PCR en células HT22-CRHR1 y en extracto de cerebro. Se utilizó *β-actina* como control de carga.

influjo desde el medio extracelular, y por lo tanto este tratamiento también anula la respuesta de calcio dependiente de CRH (Bonfiglio *et al.*, 2013). Los niveles de cAMP estimulados por CRH en presencia de EGTA fueron similares a la condición con BAPTA-AM (Figura 46a), inferiores a los del control. Estos resultados sugieren que la respuesta de cAMP depende, al menos parcialmente, de un mecanismo dependiente de calcio.

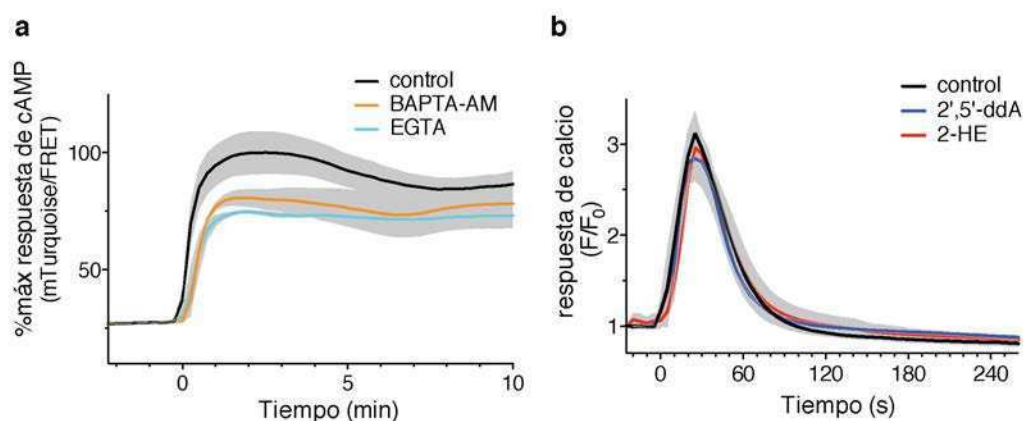


Figura 46 | La respuesta de cAMP mediada por CRH depende de los niveles de calcio en las células HT22-CRHR1

a, Las células HT22-CRHR1-Epac-SH¹⁸⁷ fueron preincubadas con vehículo, el quelante de calcio permeable BAPTA-AM 5 μ M, o el quelante extracelular de calcio EGTA 500 μ M, y estimuladas a tiempo 0 con CRH 100 nM. Respuesta de FRET medida en células únicas relativo al máximo de la respuesta. Datos: media \pm SEM, n=3. **b**, Las células HT22-CRHR1 fueron cargadas con el indicador de calcio permeable Fluo-4-AM y preincubadas con vehículo, el inhibidor de tmACs (2',5'-ddA 100 μ M) o el inhibidor de sAC (2-HE 20 μ M) y estimuladas a tiempo 0 con CRH 100 nM. La respuesta de calcio fue determinada como el cambio de fluorescencia respecto a niveles basales. Media \pm SEM, n = 3.

De manera alternativa, nos preguntamos si la respuesta de calcio dependía de los niveles de cAMP. Para esto, medimos los niveles de calcio usando el indicador fluorescente Fluo-4-AM en ausencia o presencia de los inhibidores de tmACs y sAC. La respuesta de calcio mediada por CRH fue similar en condiciones control, en presencia de 2',5'-ddA o 2-HE (Figura 46b), indicando que el calcio no depende del aumento de cAMP en respuesta a la activación de CRHR1.

Es interesante destacar que haber observado que la respuesta de calcio no depende de las tmACs, indirectamente sugiere que la entrada de calcio no depende de la subunidad α de la Gs, pudiendo estar el complejo $\beta\gamma$ u otras proteínas G involucradas. Además, que el aumento de calcio, necesario para la activación de sAC, no esté río abajo de la activación de las tmAC es consistente con la existencia de mecanismos que dependen de sAC pero no de tmAC.

El activador de sAC, bicarbonato, es crítico para la señalización de CRH

El anión bicarbonato ejerce una regulación directa sobre los dominios catalíticos de sAC (Stegborn *et al.*, 2005; Kleinboelting *et al.*, 2014). Cabe destacar que sAC es el único componente de cascadas de transducción de señales sensible a bicarbonato descrito. A continuación buscamos investigar si el bicarbonato tenía algún efecto sobre la señalización de CRH, utilizando la activación de ERK1/2 como lectura en las células HT22-CRHR1.

La concentración de bicarbonato en el medio usado para cultivar las células y realizar los experimentos mostrados fue 25 mM, que es la concentración habitualmente encontrada *in vivo*. Para evidenciar el efecto del bicarbonato, comparamos la respuesta de ERK1/2 cuando la estimulación con CRH se realizaba en el medio control (25 mM bicarbonato) respecto de un medio sin bicarbonato. Como el $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ es uno de los sistemas *buffer* en los medios de cultivo, se utilizó HEPES exclusivamente para regular el pH, se incubó previamente en la atmósfera con 5% CO_2 y se ajustó cuidadosamente el pH para evitar la existencia de artificios. Se preincubaron las células por 6 h en presencia o ausencia de bicarbonato previo a la estimulación con CRH. La activación de ERK1/2 estimulada por CRH fue drásticamente disminuida en las condiciones libres de bicarbonato respecto del control (Figura 47a). Más aún, la segunda fase de activación de ERK1/2 fue casi anulada en la condición sin bicarbonato.

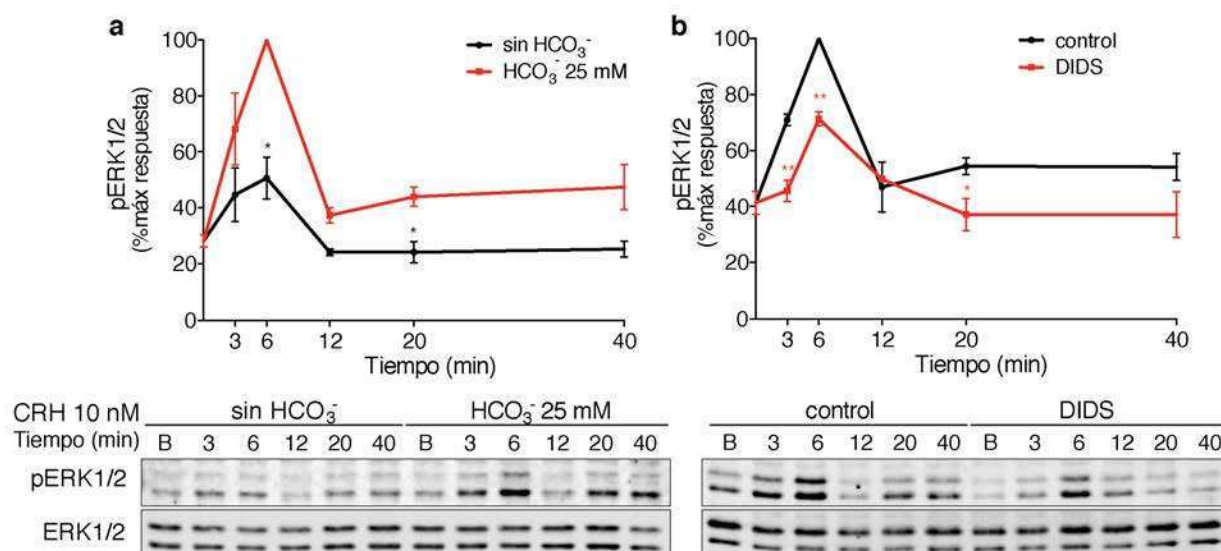


Figura 47 | La señalización de CRH depende de bicarbonato

a, Las células HT22-CRHR1 fueron estimuladas con CRH 10 nM por los tiempos indicados en medio DMEM sin HCO_3^- o con HCO_3^- 25 mM. **b**, Las células HT22-CRHR1 fueron preincubadas con el bloqueante DIDS y estimuladas con CRH 10 nM por los tiempos indicados. **a-b**, Los niveles de ERK1/2 fosforilado (pERK1/2) y total se determinaron por Western blot. Los resultados se expresan como el porcentaje del máximo pERK1/2. Datos: media \pm SEM, $n=3$. *, $p < 0,05$ **, $p < 0,01$, por prueba t de Student.

La superfamilia de transportadores de bicarbonato está compuesta por los transportadores de Na^+ acoplados a HCO_3^- y los intercambiadores aniónicos, por ejemplo los intercambiadores $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ (Boron, 2001). La mayoría de estos transportadores pueden ser bloqueados con el derivado de estilbenos DIDS, que ha sido utilizado para modular los niveles de bicarbonato y así, la actividad de sAC (Choi *et al.*, 2012). Más recientemente, se demostró que DIDS también

puede inhibir a sAC directamente por competencia con HCO_3^- (Kleinboelting *et al.*, 2014). Analizamos la activación de ERK1/2 en respuesta a CRH en presencia de DIDS. Observamos que los niveles de fosfo-ERK1/2 en la primera fase fueron significativamente menores y la segunda fase se inhibió casi totalmente respecto de las condiciones control (Figura 47b). Este patrón fue similar al observado cuando se bloqueó la actividad de sAC, apoyando nuevamente la existencia de sAC como un mecanismo sensible a bicarbonato que participa en la activación de ambas fases de ERK1/2 en respuesta a CRH.

En conjunto, estos resultados son consistentes con la participación de sAC como una fuente alternativa de cAMP río abajo de CRHR1, regulada por calcio y por bicarbonato. Además, por distintas estrategias experimentales, ya sea bloqueando directamente a sAC o modificando su actividad a través de sus moduladores, estos resultados indican que la señalización por cAMP no sólo está involucrada en la primera fase de fosforilación de ERK1/2, sino que además participa en la segunda fase, que a su vez, depende de la endocitosis del receptor en las células HT22-CRHR1.

CRHR1 genera cAMP una vez internalizado a través de la actividad de sAC

Hemos descripto que una vez activado con CRH, el receptor CRHR1 es internalizado y permanece en compartimientos endocíticos por al menos 30 min (Bonfiglio *et al.*, 2013). Más aún, hemos demostrado que la internalización del receptor y la proteína β -arrestina2 regulan la fase tardía de fosforilación de ERK1/2 en respuesta a CRH (Bonfiglio *et al.*, 2013). Teniendo en cuenta los resultados hasta aquí mostrados en este trabajo y recientes reportes para otros GPCRs, nos preguntamos si la vía del cAMP depende de la endocitosis del receptor y en ese caso, cuál es el rol de sAC.

La endocitosis de CRHR1 es rápida

En primer lugar, buscamos estudiar cuantitativamente cómo era la internalización de CRHR1 inducida por su estimulación. Dado que no existen anticuerpos que reconozcan de manera específica al receptor CRHR1 (Refojo *et al.*, 2011), se utilizó el *tag* c-Myc para detectarlo. Por la marcación indirecta del receptor en muestras sin permeabilizar y su medición por citometría de flujo (puesta a punto previamente en el laboratorio, dos Santos Claro, 2016), se cuantificaron los receptores en membrana a distintos tiempos después de estimular con CRH (Figura 48). Observamos que CRH promovió la rápida internalización del receptor: una fracción significativa estaba ya internalizada a los 5 min después del estímulo y permaneció constante

por al menos 30 min. En cuanto a la fracción de receptor internalizado, observamos una disminución del 20-30% de marca en la superficie celular, que es superior a lo observado en otros sistemas (Dunn *et al.*, 2016). Llamativamente, la cinética de internalización de CRHR1 se encontró solapada temporalmente con aquella de la respuesta de cAMP (Kotowski *et al.*, 2011; Bonfiglio *et al.*, 2013).

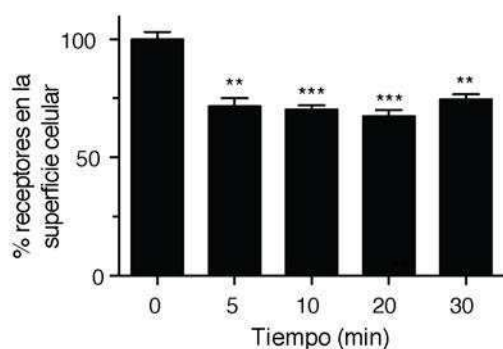


Figura 48 | CRH induce la rápida endocitosis del receptor CRHR1

Células HT22-CRHR1 fueron estimuladas con CRH 10 nM y la internalización de CRHR1 a los tiempos indicados fue determinada por citometría de flujo, marcando el tag c-Myc por inmunofluorescencia indirecta. La fluorescencia a tiempo 0 fue definida como 100%. Datos: media \pm SEM, $n = 4$, 10.000 células/condición. ***, $p < 0,001$; **, $p < 0,01$ respecto del basal por ANOVA de un factor y prueba *post hoc* de Tukey.

Como otra lectura del tráfico del receptor CRHR1 utilizamos la construcción GFP-CRHR1. En células HT22 transfectadas de forma transitoria con GFP-CRHR1, la estimulación con CRH genera un perfil de fosforilación de ERK1/2 similar al observado en los clones HT22-CRHR1 (no mostrado). En condiciones basales, se observó la marca de GFP principalmente a nivel de la membrana plasmática. Después de 30 min de estimulación con CRH, aparecieron cúmulos o *clusters* de fluorescencia en el citoplasma (Figura 50, paneles superiores), de manera similar a lo detectado utilizando la inmuno-marcación indirecta con c-Myc (Bonfiglio *et al.*, 2013).

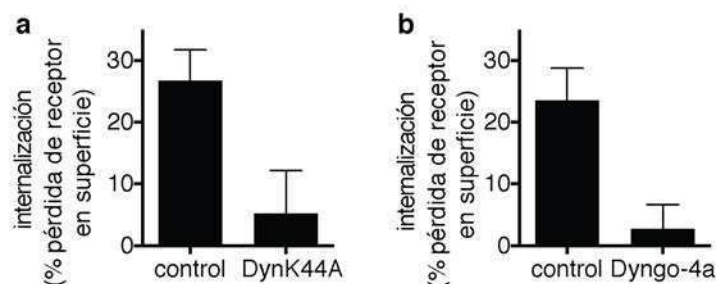


Figura 49 | Bloqueo de la internalización de CRHR1 con el dominante negativo DynK44A y el inhibidor Dyngo-4a

Las células HT22-CRHR1 fueron transfectadas con pcDNA3 (control) o DynK44A (a) o preincubadas con vehículo o Dyngo-4a 30 μ M (b). Las células se estimularon con CRH 100 nM por 30 min y se determinó la pérdida en la fluorescencia en cada tratamiento por citometría de flujo, marcando el tag c-Myc por inmunofluorescencia indirecta. Datos: media \pm SEM, $n = 3$, 10.000 células/condición, cada condición por duplicado.

El hecho de haber observado que tanto la primera como la segunda fase de fosfo-ERK1/2 eran afectadas cuando la actividad de sAC era inhibida o silenciada, nos condujo a postular que la endocitosis de CRHR1 y la actividad de sAC podían ser procesos funcionalmente relacionados. Para evaluar esta hipótesis, buscamos contar con métodos para interferir con la endocitosis del receptor. La endocitosis de CRHR1 es sensible a la función de la proteína GTPasa dinamina (Bonfiglio *et al.*, 2013), responsable de la escisión de las vesículas recientemente formadas de la membrana plasmática. Así, utilizamos dos estrategias experimentales que interfieren con la función de dinamina para inhibir la internalización del receptor: una genética a través de la sobreexpresión del mutante y dominante negativo de dinamina DynK44A, que es deficiente en la unión e hidrólisis de GTP (Herskovits *et al.*, 1993); otra, farmacológica, utilizando el inhibidor específico de última generación Dyngo-4 (McCluskey *et al.*, 2013). Por citometría de flujo observamos que la internalización de CRHR1 inducida por CRH pudo ser bloqueada de forma eficiente y similar tanto con el mutante DynK44A como con el inhibidor Dyngo-4a (Figura 49). En paralelo, utilizando la construcción GFP-CRHR1 también observamos que la formación de cúmulos intracelulares de receptor en respuesta a CRH fue inhibida tanto con el tratamiento de DynK44A como de Dyngo-4a respecto de las condiciones control, sin observarse cambios en el estado basal (Figura 50).

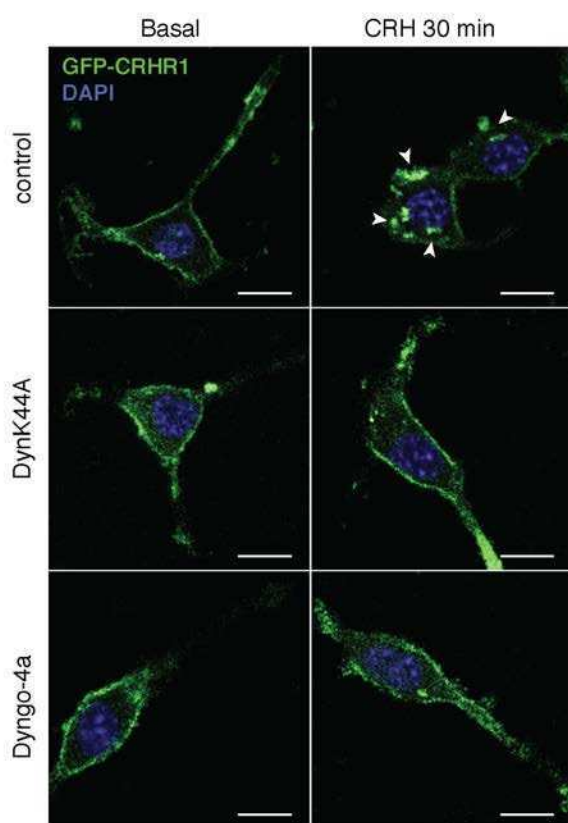


Figura 50 | Internalización de GFP-CRHR1 inducido por CRH y efecto del bloqueo de la endocitosis

Las células HT22-CRHR1 fueron transfectadas con GFP-CRHR1 y se analizó la localización subcelular de la fluorescencia en células preincubadas con vehículo, co-transfectadas con DynK44A o preincubadas con Dyngo-4a 30 μ M, en condiciones basales o estimuladas con CRH 100 nM por 30 min. Se muestran imágenes representativas de cada tratamiento. Las flechas indican *clusters* de GFP internalizado después de 30 min de estímulo en condiciones control. Barra: 5 μ M.

CRHR1 continúa señalizando a través de cAMP una vez internalizado

Luego, nos preguntamos si la internalización de CRHR1 afecta de alguna forma la respuesta de cAMP. Con este objetivo, medimos la cinética de los niveles de cAMP estimulados por CRH en las células HT22-CRHR1-Epac-S^{H187} previamente transfectadas con el mutante DynK44A o preincubadas con Dyngo-4a. En ambos casos, observamos que al inhibir la endocitosis, los niveles de cAMP inducidos por CRH disminuían. Cabe destacar que el incremento inicial de cAMP no pareció afectado, alcanzando un máximo de respuesta similar. Sin embargo, a partir de 3,5-5 min después del estímulo, los niveles de cAMP fueron significativamente menores en las células donde la endocitosis fue inhibida respecto de las condiciones control (Figura 51a,c).

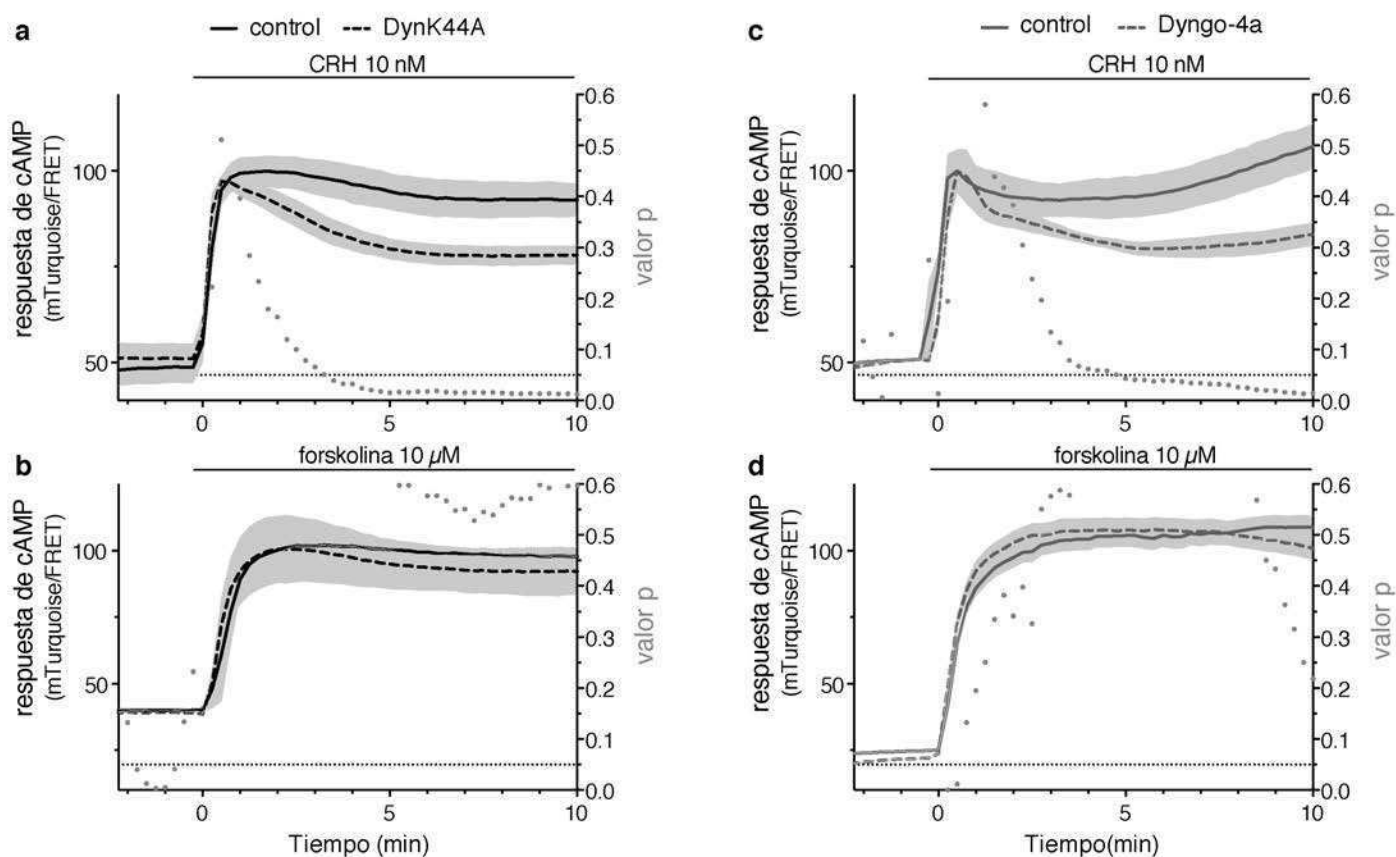


Figura 51 | La respuesta de cAMP mediada por CRH depende de la endocitosis en células HT22-CRHR1

Las células HT22-CRHR1-Epac-S^{H187} fueron estimuladas a tiempo 0 con CRH 10 nM (a, c) o forskolina 10 μM (b, d). a-b, Las células fueron transfectadas con pcDNA3 (control) o DynK44A 48 h antes de la estimulación. c-d, Las células fueron preincubadas con vehículo o Dyngo-4a 30 μM. a-d, Respuesta de FRET en células únicas relativo al máximo de la respuesta. Datos: media ± SEM, n = 4. Se realizó la prueba t de Student para cada tiempo. Se grafican los valores p (puntos grises) y p=0,05 se indica con la línea punteada.

Nuevamente, la escala temporal donde se observó un efecto de los tratamientos es consistente con la dinámica de internalización rápida del receptor (Figura 48).

Como control medimos cómo era la respuesta de cAMP estimulada por forskolina en células HT22-CRHR1-Epac-S^{H187} en las que la endocitosis fue bloqueada ya sea por DynK44A o Dyngo-4a. En estos casos, no se observaron diferencias significativas entre las células control y las tratadas (Figura 51b,d), confirmando que los tratamientos utilizados no afectan la activación directa de tmACs y que el efecto de la inhibición de la endocitosis sobre los niveles de cAMP requieren la activación de las vías de señalización a través del receptor.

Adicionalmente, nos preguntamos si el bloqueo de la internalización del receptor también afectaba la respuesta de calcio mediada por CRH. El aumento de calcio medido a través del indicador Fluo-4 en células control y transfectadas con el mutante DynK44A fue similar (Figura 52). Por lo tanto, la disminución observada en los niveles de cAMP cuando la internalización está afectada no puede atribuirse a cambios en la respuesta de calcio dependiente de CRH.

Recientemente se ha descrito que el GPCR de clase B PTHR continúa señalizando a través de cAMP una vez internalizado (Feinstein *et al.*, 2011). En este caso, se ha propuesto un mecanismo que depende de la interacción del receptor con las proteínas β -arrestina y la activación prolongada de ERK1/2. Por lo tanto, buscamos determinar si para CRHR1 también era necesaria la fosforilación de ERK1/2 para la respuesta de cAMP dependiente de CRH en células HT22-CRHR1. Al incubar células con el inhibidor de MEK1/2 U0126 se anula completamente la fosforilación de ERK1/2 mediada por CRH (Figura 53a). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas a nivel de la respuesta de cAMP (Figura 53b), indicando que la generación de cAMP no depende de fosfo-ERK1/2 en nuestro sistema.

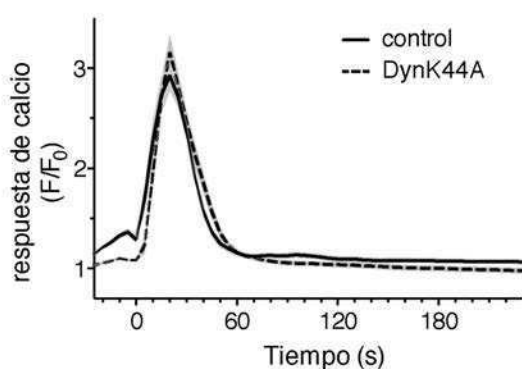


Figura 52 | La respuesta de calcio mediada por CRH no depende de la endocitosis en células HT22-CRHR1

Las células HT22-CRHR1 fueron transfectadas con pcDNA3 (control) o DynK44A 48 h antes del experimento. Las células fueron cargadas con el indicador de calcio permeable Fluo-4-AM y estimuladas a tiempo 0 con CRH 100 nM. La respuesta de calcio fue determinada como el cambio de fluorescencia respecto a niveles basales. Datos: media \pm SEM, n = 3.

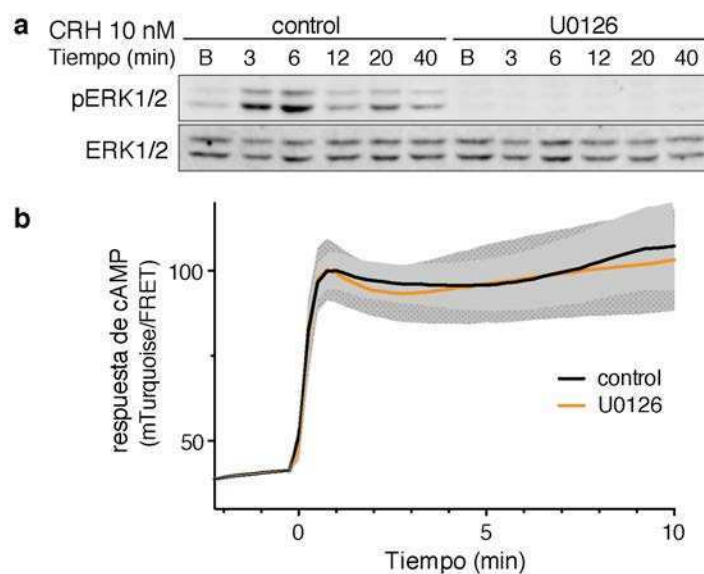


Figura 53 | La activación de ERK1/2 no regula la respuesta de cAMP mediada por CRH

a, Las células HT22-CRHR1 fueron preincubadas con vehículo o el inhibidor de MEK1/2 U0126 10 μ M, y estimuladas con CRH 10 nM. Los niveles de ERK1/2 fosforilado (pERK1/2) y total se determinaron por Western blot en los tiempos indicados.

b, Respuesta de FRET en células únicas HT22-CRHR1-Epac-S^{H187} preincubadas con vehículo o U0126 10 μ M, y estimuladas con CRH 10 nM, relativo al máximo de la respuesta. Datos: media \pm SEM, n = 4.

En conjunto, estos resultados indican que la endocitosis del receptor afecta negativamente la respuesta de cAMP estimulada por CRH. Es importante notar que a través del uso del sensor Epac-S^{H187} se miden los niveles de cAMP a un determinado tiempo, que corresponde al balance entre la producción de cAMP por las adenilil ciclasas y su degradación por fosfodiesterasas (PDEs). La disminución en los niveles de cAMP a tiempos largos cuando se bloquea la endocitosis puede responder a una menor actividad de las adenilil ciclasas, a una mayor actividad de las PDEs, o a ambos procesos en simultáneo. De hecho, al incubar las células HT22-CRHR1-Epac-S^{H187} con el inhibidor general de PDEs, IBMX, se produce un rápido aumento en los niveles de cAMP en ausencia de estímulo (no mostrado). Esto indica que las PDEs son enzimas activas y que es el balance entre las actividades de las adenilil ciclasas y las PDEs lo que determina los niveles de cAMP en un determinado momento.

La actividad de SAC es esencial para la generación de cAMP dependiente de la endocitosis de CRHR1

¿Existe generación de cAMP una vez internalizado CRHR1? ¿Participa la SAC en este proceso? Hemos observado que el receptor es internalizado con una dinámica que está solapada temporalmente con la generación de cAMP y que los niveles de cAMP son menores al bloquear

la endocitosis del receptor. Por otra parte, observamos que el silenciamiento o la inhibición de sAC directa o a través de sus moduladores no sólo afectan la primera fase de activación de ERK1/2 sino también la fase tardía de fosfo-ERK1/2, que es sensible a la internalización del receptor. Dado que existe una correlación entre la actividad de sAC y la señalización del receptor internalizado, nos propusimos demostrar si efectivamente son procesos que están relacionados funcionalmente.

Una posible explicación a los resultados obtenidos puede ser que la activación de sAC fuera necesaria para la internalización de CRHR1. Para evaluarlo, investigamos si la internalización de CRHR1 era afectada al inhibir sAC. Por citometría de flujo, observamos que el perfil temporal de la internalización de receptor era similar en células HT22-CRHR1 control y en aquellas tratadas con 2-HE (Figura 54a). A través del análisis por microscopía de fluorescencia de la distribución de GFP-CRHR1 tampoco encontramos diferencias entre los tratamientos (Figura 54b). Esto sugiere que la internalización del receptor no depende de la actividad de sAC.

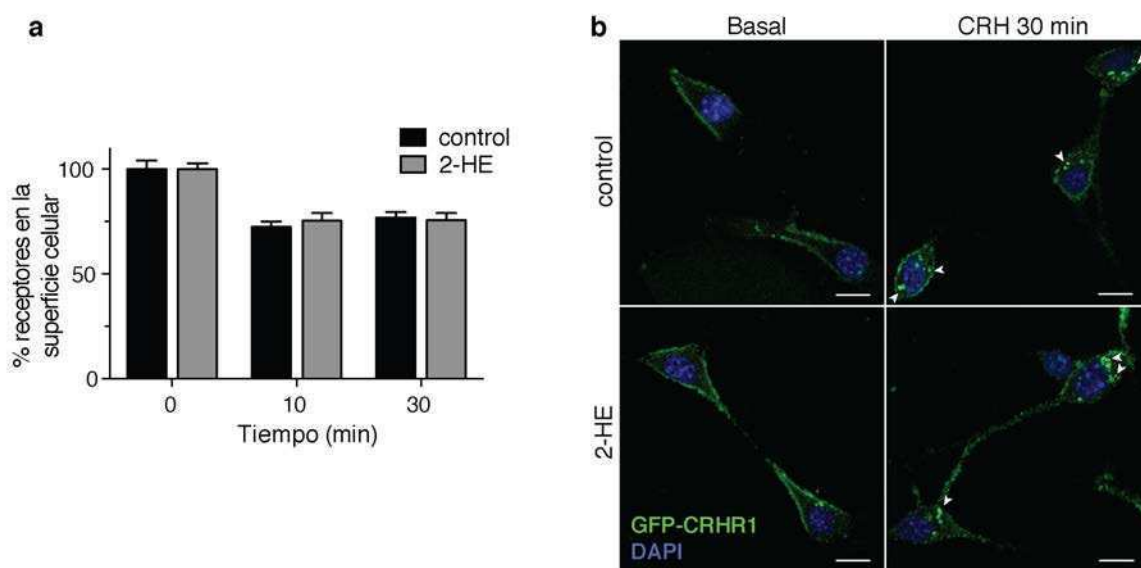


Figura 54 | La internalización de CRHR1 no depende de sAC

a, Las células HT22-CRHR1 fueron preincubadas con vehículo o el inhibidor de sAC 2-HE 20 μ M, y estimuladas con CRH 100 nM. La internalización de CRHR1 a los tiempos indicados fue determinada por citometría de flujo, marcando el tag c-Myc por inmunofluorescencia indirecta. La fluorescencia a tiempo 0 fue definida como 100%. Datos: media \pm SEM, n = 4, 10.000 células/condición.

b, Las células HT22-CRHR1 fueron transfectadas con pcDNA3 (control) o GFP-CRHR1 y se analizó la localización subcelular de la fluorescencia en condiciones basales o estimuladas con CRH 100 nM por 30 min. Se muestran imágenes representativas de cada tratamiento. Las flechas indican *clusters* de GFP internalizado después de 30 min de estímulo en condiciones control. Barra: 5 μ M.

Para estudiar los mecanismos de señalización activados por CRHR1 nos hemos focalizado en las respuestas de calcio, cAMP y fosfo-ERK1/2 en células HT22-CRHR1. Los patrones temporales de cada una son diferentes, aunque puede haber mecanismos comunes que regulen cada uno de esos procesos. El incremento de calcio inducido por CRH retorna a niveles basales 1 min después del estímulo (Figura 43). Al contrario, las respuestas de cAMP y fosfo-ERK1/2 son mucho más sostenidas en el tiempo, detectando niveles elevados de cAMP (Figura 17a) y la activación de ERK1/2 (Figura 30a) al menos 40 min después del agregado de CRH. Sin embargo, el aumento de cAMP es muy rápido mientras que la fosforilación de ERK1/2 alcanza su máximo a los 3-6 min. A su vez, aunque inhibir la endocitosis del receptor afecta tanto a la respuesta de cAMP como a la de ERK1/2, su efecto es evidente a los 3,5 min después del estímulo a nivel de cAMP pero recién a los 20 min a nivel de ERK1/2.

En este sentido, quisimos explorar qué ocurría con la respuesta de cAMP a tiempos que son relevantes a nivel de la respuesta de ERK1/2. Ya hemos demostrado que los niveles de cAMP continúan elevados por al menos 40 min luego del estímulo (Figura 17). Por cuestiones prácticas, en la mayoría de los experimentos se analizaron los primeros 10 min de la respuesta de cAMP dependiente de CRH. Quisimos determinar si el efecto de la endocitosis de CRHR1 era evidente a nivel de cAMP hasta los 20 min después del agregado de CRH, cuando es detectable a nivel de fosfo-ERK1/2. Observamos que el menor nivel de cAMP en las células HT22-CRHR1-Epac-S^{H187} transfectadas con el mutante DynK44A respecto de aquellas control empieza a detectarse en los primeros minutos de la respuesta y continúa detectándose al menos después de 20 min de estímulo (Figura 55a). Estos resultados indican que el análisis de los primeros 5-10 min de la respuesta de cAMP es suficiente para evaluar el efecto de la endocitosis del receptor, aunque se necesita un intervalo mayor de tiempo para evidenciarlo utilizando fosfo-ERK1/2 como lectura.

Otro aspecto a tener en cuenta para estudiar este mecanismo es que, aunque es posible detectar la internalización de CRHR1, una fracción considerable del receptor sigue siendo detectado a nivel de la membrana plasmática (Figura 48, Figura 50). Dado que en nuestro diseño experimental los agonistas se agregan al medio y permanecen durante el experimento (no es un pulso de estimulación), las respuestas medidas después de los ~5 min de CRH pueden no sólo depender de los receptores ya internalizados si no también de la estimulación a nivel de la membrana plasmática. A tiempos posteriores tampoco podemos descartar la contribución de receptores que reciclen en ese período del ensayo a la membrana plasmática desde compartimientos intracelulares.

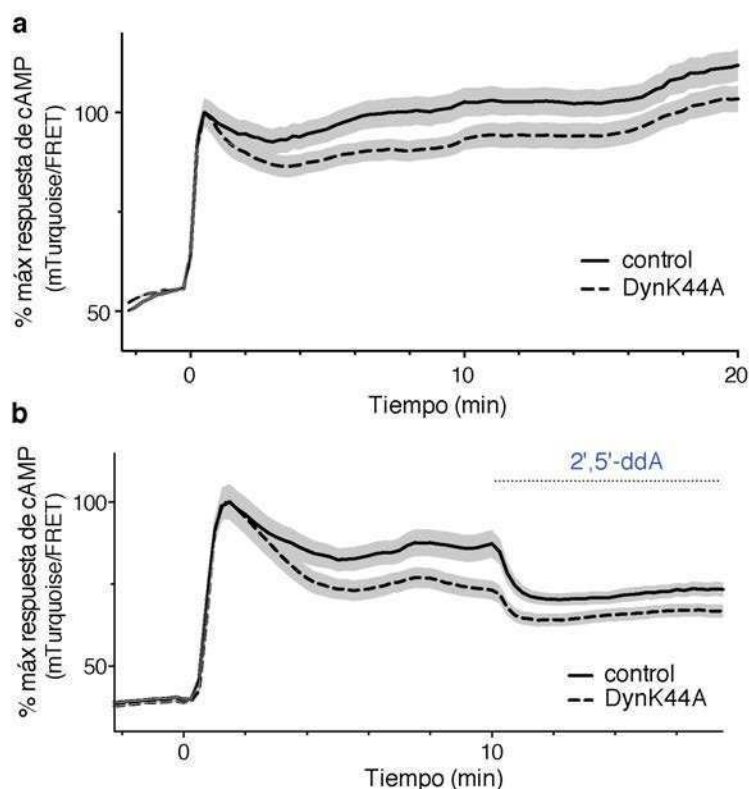


Figura 55 | Efecto de la endocitosis sobre la respuesta de cAMP dependiente de CRH a tiempos largos

a-b, Las células HT22-CRHR1-Epac-S^{H187} fueron transfectadas con pcDNA3 (control) o DynK44A+mCherry 48 h previo a la estimulación. La población mixta de células se estimuló con CRH 10 nM a tiempo 0. Respuesta de FRET en células únicas relativo al máximo de la respuesta para cada tratamiento. Datos: media \pm SEM, n = 15-20 células. b, Se agregó el inhibidor de tmACs 2',5'-ddA 100 μ M al tiempo indicado.

Los experimentos de *washout* (pulso y lavado del estímulo) no nos permitieron eliminar de manera reproducible y constante en las réplicas experimentales al ligando, y sabemos que concentraciones muy bajas de CRH son suficientes para inducir una respuesta de cAMP. Por otra parte, no contamos con un método para inhibir específicamente a las adenilil ciclasas que se encuentren en un determinado compartimiento celular, asociadas a la membrana plasmática o en compartimientos intracelulares.

A fin de investigar si había generación de cAMP una vez internalizado CRHR1, y en ese caso, cuál era la fuente involucrada, estudiamos la respuesta de cAMP combinando los inhibidores de las adenilil ciclasas con el bloqueo de la endocitosis. Las células HT22-CRHR1-Epac-S^{H187} fueron transfectadas con un vector vacío o con el mutante DynK44A (en conjunto con un plásmido fluorescente mCherry, que emite en el rojo). Luego, ambos tipos de células fueron mezcladas para poder tratarlas con inhibidores, estimularlas con CRH y analizarlas en el mismo

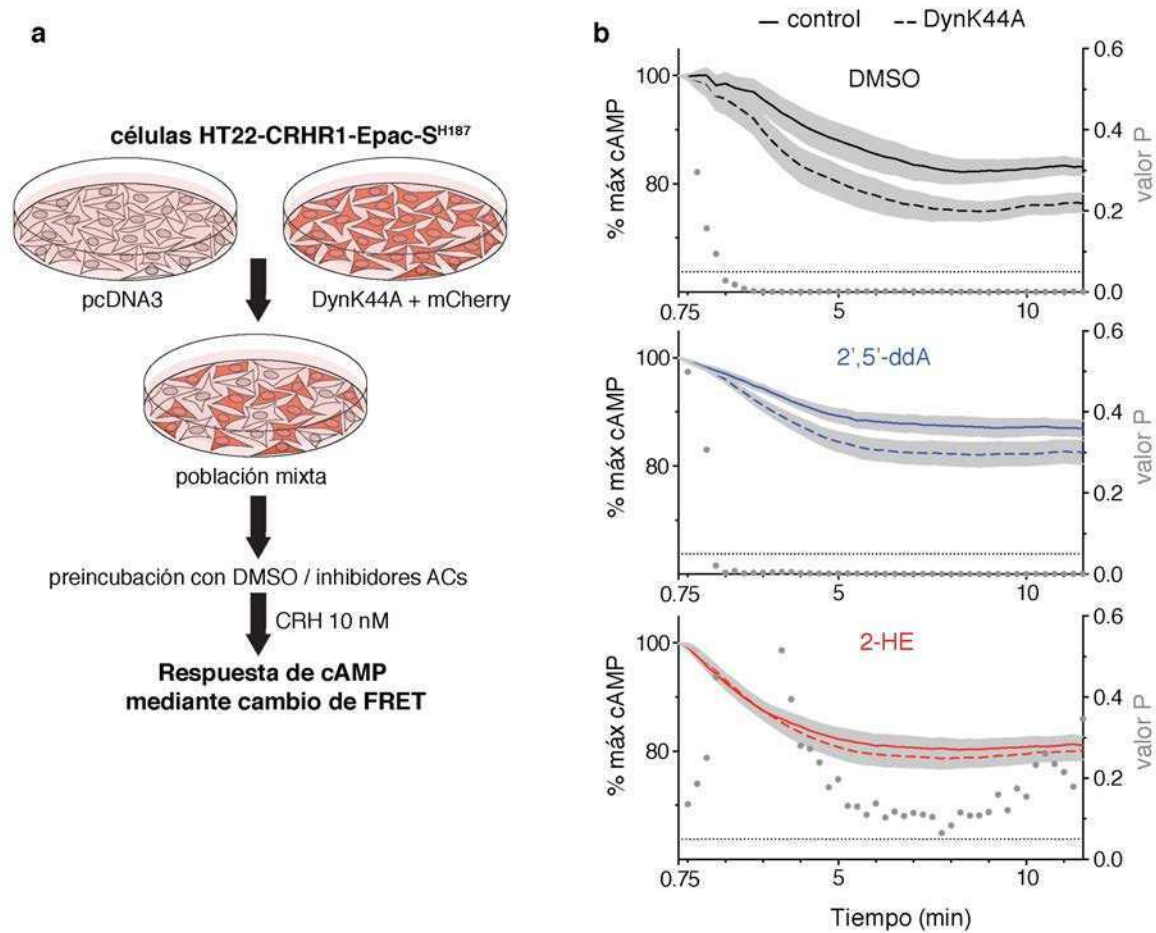


Figura 56 | sAC es crítica para el cAMP generado desde endosomas en respuesta a CRH

a, Esquema representativo del diseño experimental. Las células HT22-CRHR1-Epac-S^{H187}, transfectadas con pcDNA3 (control) o DynK44A+mCherry 48 h previo a la estimulación, fueron preincubadas con vehículo, el inhibidor de tmACs (2',5'-ddA 100 μ M) o el inhibidor de sAC (2-HE 20 μ M) y estimuladas con CRH 10 nM.

b, Respuesta de FRET en células únicas. La respuesta de cAMP se expresa como el porcentaje de la máxima señal de FRET obtenido en cada condición ensayada después de la estimulación. Datos: media \pm SEM, n = 7. Se realizó la prueba *t* de Student para cada tiempo. Se grafican los valores p (puntos grises) y $p=0,05$ se indica con la línea punteada.

campo del microscopio (Figura 56a). Se analizó cómo variaban los niveles de cAMP una vez alcanzado el máximo de la respuesta (\sim 45 s después de agregar de CRH) en cada una de las condiciones. Cuando las células fueron estimuladas en presencia del vehículo o del inhibidor de tmACs 2',5'-ddA, los niveles de cAMP disminuyeron más rápido en las células transfectadas con DynK44A en comparación con las células control vecinas (Figura 56b). Sin embargo, en presencia del inhibidor de sAC 2-HE, los perfiles de cAMP de las células control y DynK44A fueron similares (Figura 56b). Esto sugiere que al inhibir sAC se perdió el efecto de la

endocitosis del receptor a nivel de cAMP, es decir, que el componente que depende de la endocitosis, depende de la actividad de sAC.

Decidimos estudiar cuál era el efecto del agregado del inhibidor de las tmACs 2',5'-ddA 10 min después de estimular con CRH, cuando la fracción de CRHR1 endocitada ya es significativa y constante. Los niveles de cAMP disminuyeron con el inhibidor, demostrando que las tmACs siguen activadas 10 min después del estímulo (Figura 55b). Más aún, la reducción en los niveles de cAMP también se detectó en células donde la endocitosis está inhibida y después del agregado de 2',5'-ddA, continuaron siendo evidentes las diferencias entre las células control y aquellas con la endocitosis inhibida. Estos resultados indican que *pool* de cAMP producido por las tmACs no es crítico para la fase tardía de ERK1/2, aunque aún estén activas a tiempos largos. Además, el efecto de la endocitosis siguió siendo evidente en presencia del inhibidor de tmACs sugiriendo que no corresponden al mismo mecanismo de señalización.

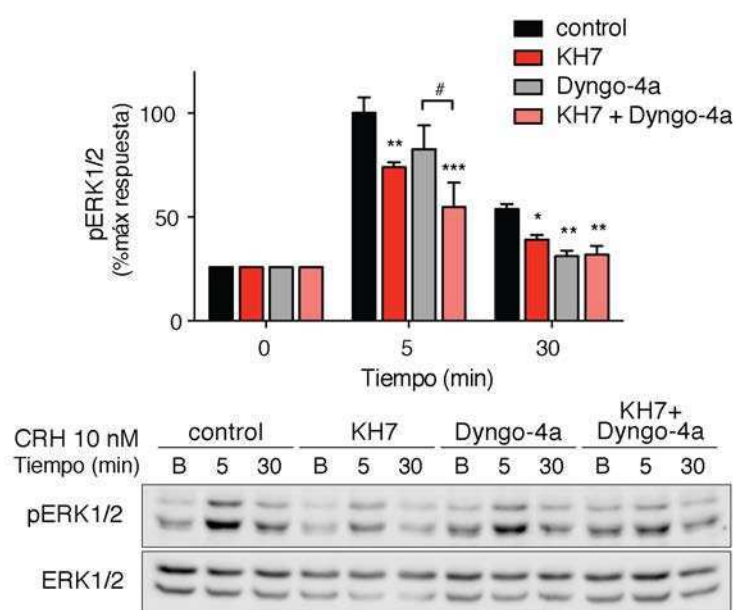


Figura 57 | Rol de sAC y la endocitosis sobre la fosforilación de ERK1/2 en respuesta a CRH

Las células HT22-CRHR1 fueron preincubadas con el vehículo, el inhibidor específico de sAC (KH7 7,5 μ M) o el inhibidor de endocitosis (Dyngo-4a 30 μ M) y estimuladas con CRH 10 nM. Los niveles de ERK1/2 fosforilado (pERK1/2) y total se determinaron por Western blot en los tiempos indicados. Los resultados se expresan como el porcentaje del máximo pERK1/2. Datos: media \pm SEM, n=4. Por ANOVA de dos factores con prueba *post hoc* de Tukey *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$ respecto al control, #, $p < 0,05$ entre los tratamientos indicados.

Finalmente, decidimos evaluar a nivel de la activación de ERK1/2 dependiente de CRH el efecto combinado de inhibir la actividad de sAC y bloquear la endocitosis. Como hemos mostrado previamente (Figura 29), en presencia del inhibidor de sAC KH7 la activación de

ERK1/2 es menor a tiempos cortos y largos de estimulación respecto de las condiciones control (Figura 57). Por otra parte, el inhibidor de dinamina Dyngo-4a disminuyó significativamente la fase tardía de fosfo-ERK1/2 (Figura 57), en línea con lo reportado previamente con el mutante DynK44A (Bonfiglio *et al.*, 2013). La inhibición simultánea de sAC y de la endocitosis generó una reducción en la primera fase de fosfo-ERK1/2 respecto del tratamiento con Dyngo-4a solo, indicando que sAC participa en la activación de ERK1/2 a tiempos cortos. Notablemente, ambos tratamientos, ya sea por separado o en combinación, redujeron la fase tardía de fosfo-ERK1/2 con similar magnitud, sugiriendo que la actividad de sAC y la endocitosis están involucrados en el mismo mecanismo de señalización que es crítico para la segunda fase de activación de ERK1/2.

Interactoma de sAC en las células HT22-CRHR1

Los resultados de este trabajo le asignan un rol a sAC como fuente alternativa de cAMP en la cascada de transducción de señales de CRH, con funciones biológicas específicas. Consideramos que realizar un estudio sistemático de las proteínas que interactúan con sAC contribuirá a entender cómo es el complejo de señalización de sAC. Dada la falta de anticuerpos robustos que detecten sAC, decidimos generar las proteínas sAC_t o sAC_n con la etiqueta de fusión HA. La sobreexpresión de la forma sAC_n-HA no se logró en las células HT22-CRHR1, por lo que continuamos trabajando con sAC_t-HA. Cabe destacar que la forma truncada de sAC es la que se detecta con mayores niveles endógenos en estas células (Figura 22).

En línea con los reportado por otros grupos (Stiles *et al.*, 2014), sAC_t-HA fue detectada en distintas localizaciones subcelulares por inmunofluorescencia (Figura 58a) y mayoritariamente en fracciones membranosas al realizar una lisis suave de las células (Figura 58b). El tratamiento con carbonato de sodio (pH 11) convierte las vesículas en láminas lipídicas y disrumpe las interacciones entre proteínas aunque las interacciones proteína-lípido y la bicapa lipídica permanecen intactas. El tratamiento de las muestras con carbonato de sodio solubilizó a sAC_t-HA, de forma consistente con la ausencia de segmentos transmembrana en su secuencia (Figura 58b).

Luego, se optimizaron las condiciones para solubilizar sAC_t-HA e inmunoprecipitarla (ver Materiales y métodos). Como una primera aproximación para conocer las proteínas que interactúan con sAC realizamos la inmunoprecipitación de sAC_t-HA y el análisis por espectrometría de masa de las proteínas co-inmunoprecipitadas en células HT22-CRHR1 en condiciones basales y estimuladas con CRH por 30 min, siguiendo un esquema similar al

utilizado para B-Raf (Figura 21a) en colaboración con el Dr. Chris Turck y la Dra. Giuseppina Maccarrone del Instituto Max Planck de Psiquiatría (Munich, Alemania). Se identificaron una gran cantidad de proteínas (más en la muestra basal que en la estimulada) utilizando como criterio de corte un puntaje Mascot¹ mayor a 80 y haber identificado al menos dos péptidos distintos. La lista completa de proteínas se presenta en el Anexo.

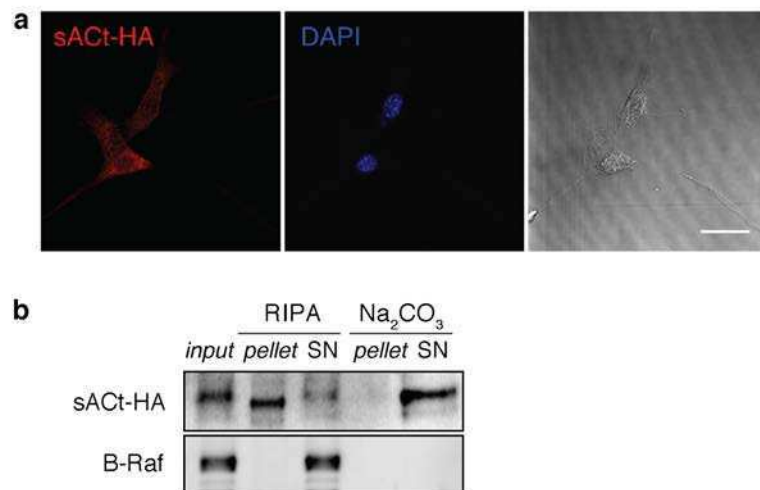


Figura 58 | Localización subcelular de de sACT_T-HA en células HT22-CRHR1

a, La distribución subcelular de sACT_T-HA fue estudiada por inmunofluorescencia utilizando anticuerpo primario anti-HA y anticuerpo secundario acoplado a Alexa647, y los núcleos se tiñeron con DAPI. Se tomaron fotografías con el microscopio confocal. Barra: 10 μM.

b, Por Western blot se detectó sACT_T-HA usando un anticuerpo anti-HA en distintas fracciones a partir de células HT22-CRHR1: lisado completo (*input*), fracción membranosa (*pellet*) y soluble del lisado con RIPA, y fracción membranosa y soluble del *pellet* tratado con carbonato de sodio. Se utilizó BRaf como control de proteína citosólica.

Dado que todavía no contamos con repeticiones los resultados aquí presentados son preliminares. Es importante destacar que la identificación proteómica realizada de esta manera es cualitativa y no cuantitativa (como lo son otros métodos como el SILAC). Entre la muestra basal y estimulada el ~80% de las proteínas fueron comunes (Figura 59, datos totales en el

¹ Habitualmente, para identificar proteínas se utiliza el método de *fingerprint* (huella digital), mediante el cual se comparan los picos de un péptido incógnita con una base de datos patrón ya conocida. Este es el proceso de comparación del espectro de masas con la información almacenada en bases de datos de secuencias conocidas, como Swiss-Prot o nr-GenBank. Para ello existen motores de búsqueda como Mascot que ordenan las proteínas identificadas asignándoles puntos en función del número de coincidencias.

Anexo). Realizamos un análisis de las proteínas identificadas utilizando la base de datos Gene Ontology, que es una de las más utilizadas para clasificar la función biológica de los genes y las proteínas basándose en el uso de términos (*GO terms*). Utilizando el programa DAVID (NIH), se realizó un análisis de enriquecimiento en el que se busca qué términos biológicos de la base de datos están sobre-representados en el conjunto de proteínas analizado respecto del genoma total. En particular, realizamos la clasificación de las proteínas en las categorías Componente celular (Figura 60a) y Proceso biológico (Figura 60b). Presentamos los términos biológicos que mostraron un mayor número de proteínas y un mayor enriquecimiento (se presenta el valor p de *test* de Fischer utilizado), destacando algunos términos de relevancia para los resultados de este trabajo.

Cabe destacar que sAC había sido identificada en el análisis de proteínas co-inmunoprecipitadas con B-Raf en estas mismas células. B-Raf no fue identificada, pero sí se identificaron las proteínas 14-3-3, que desempeñan un papel central en el proceso de activación de la familia Raf (Tzivion *et al.*, 1998). Además de las 14-3-3, otras proteínas de interés que se identificaron tanto en el análisis de B-Raf como de sAC_t-HA incluyen: IQGAP1, que se une a Cdc42 y está involucrada en la neuritogénesis; vimentina, una proteína de citoesqueleto que también cumple roles en la señalización de CRH (Bonfiglio *et al.*, 2013), NEDD4, una E3 ubiquitin-ligasa encontrada en complejos de señalización con pequeñas proteínas G y reguladora de la arborización neuronal (Donovan y Poronnik, 2013); moesina, que pertenece a la familia de ezrina (proteína que se halló formando un complejo con sAC, Watson *et al.*, 2015) y que puede funcionar como AKAP (Deming *et al.*, 2015) y regulador del citoesqueleto (Ivetic y Ridley, 2004); HSP90, proteínas del citoesqueleto, entre muchas otras. Además se identificó tanto en condiciones basales como estimuladas a la proteína piruvato kinasa (PKM) que previamente se describió como interactora de sAC (Onodera *et al.*, 2014).

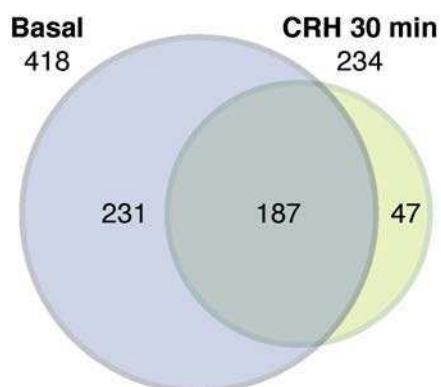


Figura 59 | Diagrama de las proteínas identificadas en la co-inmunoprecipitación de sAC_t-HA por espectrometría de masa. Se presenta el número de proteínas en condiciones basales y estimuladas (30 min CRH), junto el número de proteínas comunes o exclusivas de cada condición. El listado completo se encuentra en el Anexo.

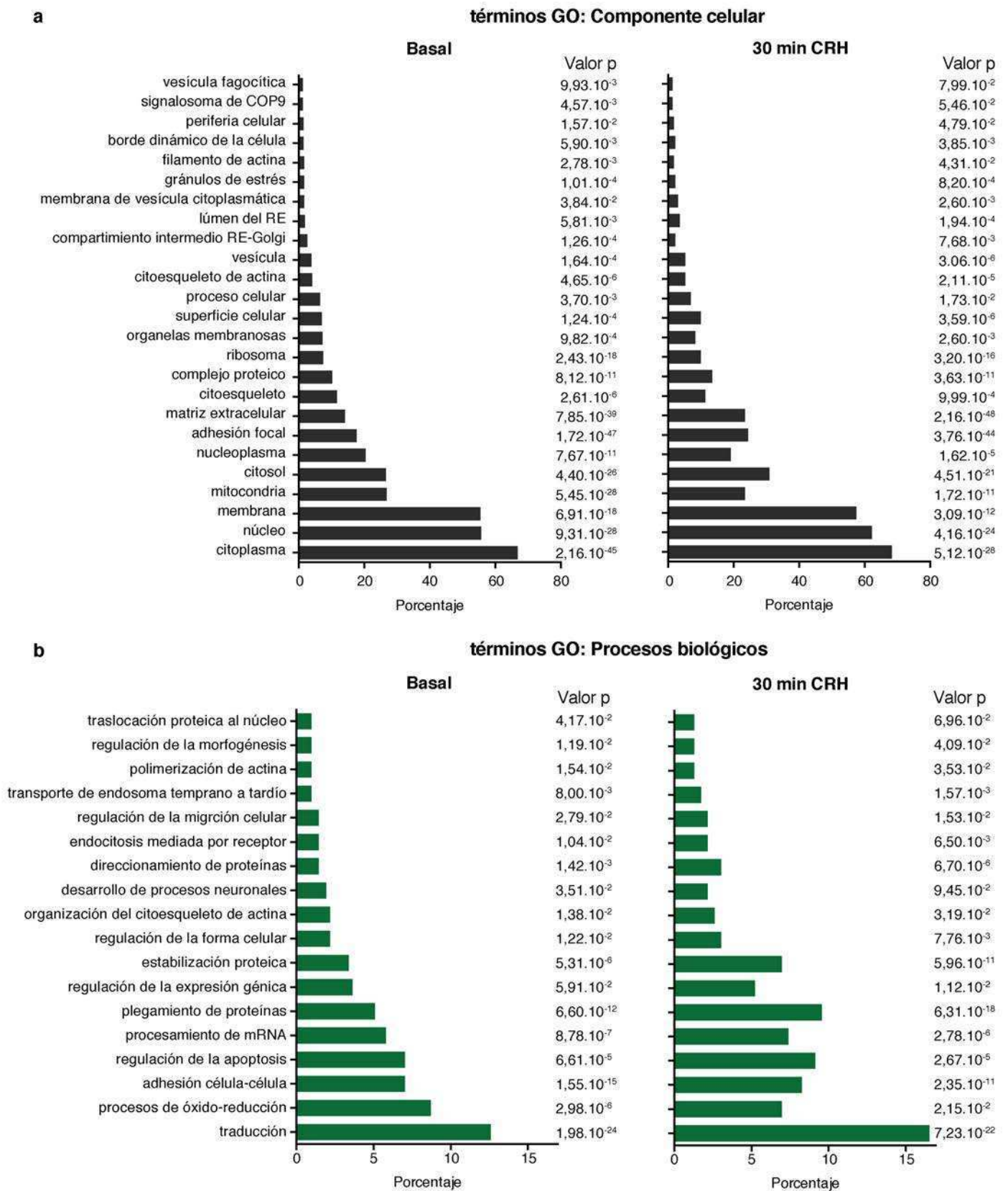


Figura 60 | Análisis de enriquecimiento en términos biológicos de Gene Ontology (GO terms). Las proteínas identificadas fueron anotadas y clasificadas de acuerdo a componentes celulares (a) o procesos biológicos (b). Se presentan las categorías más abundantes y las más relevantes en el

contexto de este trabajo. Se presenta el porcentaje de proteínas de cada término biológico y el valor p del test de Fischer utilizado para evaluar el enriquecimiento de cada categoría.

En el contexto de este trabajo queremos destacar que se encontraron numerosas proteínas involucradas en la formación y en tráfico de vesículas, como clatrina, AP-2, ARF3, subunidades del coatómero, TMED10 y muchas proteínas GTPasas RAB que son características de endosomas (tempranos -RAB5c, RAB14- y tardíos, RAB7a). En condiciones basales también se identificaron a la proteínas del retrómetro VPS29 y VPS35.

Se identificaron proteínas implicadas en la regulación del citoesqueleto y en la formación de procesos neuronales -por ejemplo, subunidades del complejo remodelador de actina Arp2/3, Cofilina, RAC1, CDC42- (Figura 60b). También proteínas implicadas en el direccionamiento de proteínas a distintos destinos celulares -importinas y exportinas al núcleo, complejo TOM a mitocondria- (Figura 60b), lo que es consistente con haber identificado proteínas de distintas organelas (Figura 60a) y está en línea con la descripción de la función de sAC en distintas localizaciones subcelulares (Tresguerres *et al.*, 2011).

En conclusión, consideramos que los resultados preliminares obtenidos son auspiciosos respecto de utilizar la inmunoprecipitación de sAC seguida de identificación por espectrometría de masa de las proteínas co-inmunoprecipitadas para estudiar la función de sAC no sólo en condiciones basales si no también identificar complejos de señalización involucrados en la función de CRH.

Para los futuros experimentos consideramos utilizar anticuerpos covalentemente unidos a la resina para poder evitar la separación de las muestras por electroforesis en un gel y poder hacer la digestión proteolítica en el eluido de la inmunoprecipitación directamente. También evaluamos la posibilidad de realizar experimentos de manera cuantitativa por la técnica de SILAC.

Discusión

Conclusiones

Los principales hallazgos de este trabajo se resumen y listan a continuación:

- La activación de CRHR1, ya sea mediada por CRH como por UCN1, promueve la diferenciación de la línea celular HT22-CRHR1, inhibiendo la proliferación celular y favoreciendo el crecimiento de neuritas.
- CRH y UCN1 aumentan los niveles de cAMP, activan la PKA y fosforilan CREB de manera similar en las células HT22-CRHR1.
- CRH genera un aumento de cAMP intracelular rápido y sostenido en cultivos primarios de neuronas hipocampales y corticales, y las células HT22-CRHR1. El patrón temporal de esta respuesta es distinto al observado para otros estímulos en las mismas células HT22-CRHR1, como isoproterenol -agonista de β 2AR-, o de CRH en otros contextos celulares, como la línea celular AtT20.
- La respuesta de cAMP estimulada por CRH depende de las tmACs pero también de sAC, como una fuente alternativa, en dos contextos celulares relevantes para la función fisiológica de CRH, las células HT22-CRHR1 y AtT20. En los mismos sistemas experimentales, la señalización de otros agonistas de GPCRs que estimulan cAMP no involucró a sAC (isoproterenol en HT22-CRHR1 y PACAP38, ligando de PAC1, en AtT20).
- No se observó la participación de sAC en la señalización de CRH en la línea celular 3T3L1-CRHR1. Esto es consistente con reportes previos que indican una gran dependencia de los mecanismos de señalización de CRH del contexto celular.
- En las células HT22-CRHR1 la existencia de dos fuentes de cAMP se evidencia en la activación de ERK1/2, CREB y la inducción transcripcional de *c-fos*.
- Utilizando la fosforilación de ERK1/2 dependiente de CRH como lectura, en células HT22-CRHR1 se observó que el cAMP generado por tmACs y sAC puede participar en mecanismos de señalización diferentes: ambas fuentes regulan la fase temprana de activación de ERK1/2, mientras que sólo sAC está involucrada en la fase sostenida de fosfo-ERK1/2.
- En las células HT22-CRHR1 y AtT20, el cAMP generado en respuesta a CRH utiliza como efectores tanto a PKA como a EPACs para activar a ERK1/2. El cAMP dependiente de sAC señala tanto por PKA como por EPACs.

- La respuesta de cAMP estimulada por CRH es dependiente del aumento intracelular transitorio de calcio, también estimulado por CRH. En contraste, la respuesta de calcio no es afectada por inhibidores de tmACs o sAC.
- A nivel de la activación de ERK1/2, el bloqueo de sAC o de la respuesta de calcio tiene efectos similares (disminución de ambas fases de activación) cuando se estimulan células HT22-CRHR1 con CRH. En contraste, las tmACs estimulables por calcio sólo regulan la primer fase de fosforilación. Esto sugiere que el aumento de calcio es crítico para la activación de sAC en respuesta a CRH.
- La presencia de bicarbonato, un activador exclusivo de sAC, es esencial para la respuesta de ERK1/2 dependiente de CRH en células HT22-CRHR1.
- En células HT22-CRHR1, la endocitosis de CRHR1 estimulada por CRH es rápida.
- La endocitosis de CRHR1 contribuye a la respuesta de cAMP dependiente de CRH.
- La función de sAC, y no la de las tmACs, es crítica para el componente de la respuesta de cAMP y ERK1/2 dependiente de la endocitosis.

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo, esquematizamos los mecanismos identificados en las Figura 61, Figura 62 y Figura 63.

Diferenciación de las células HT22-CRHR1 estimulada por CRH como estrategia para explorar las vías de señalización

Durante mi Tesis de Licenciatura observamos que CRH promovía la extensión de neuritas en células HT22-CRHR1. Nos propusimos caracterizar cómo era el cambio morfológico y qué componentes moleculares estaban implicados en este proceso. En ese trabajo, determinamos que las actividades de tmACs y sAC eran necesarias para la fosforilación de CREB. Sin embargo, demostramos que el cAMP generado por sAC era crítico para este mecanismo, que depende de la activación de PKA y no de ERK1/2 (Inda, 2012). En el presente estudio decidimos profundizar en los mecanismos moleculares de la acción de CRH a partir de esos resultados previos.

CRH y UCN1 generan respuestas similares en células HT22-CRHR1

Una de las preguntas que quisimos abordar fue si existía cierta especificidad de ligando, teniendo en cuenta que es característico de muchos receptores GPCRs de clase B (Wootten *et al.*, 2017) y son pocos los estudios en los que ha realizado una comparación entre los agonistas de CRHR1. Teniendo en cuenta que CRH y UCN1 son los ligandos de mayor afinidad para

CRHR1, se compararon sus respuestas en las células HT22-CRHR1. Observamos que a nivel de la respuesta de cAMP, la activación de PKA (Figura 19) y la fosforilación de CREB (Figura 11) ambos ligandos presentaron respuestas similares tanto en magnitud como en el patrón temporal. También fueron indistinguibles los efectos a largo plazo para CRH y UCN1, observando un efecto neuritogénico (Figura 10) y un arresto de la proliferación (Figura 14, ver más adelante) similares entre estímulos.

La generación de ligandos sesgados hacia determinadas vías de señalización es uno de los objetivos de la farmacología de GPCRs actual (Rajagopal *et al.*, 2010). Existen ejemplos, como el PTHR, donde los ligandos endógenos generan diferentes respuestas mediante la activación del mismo receptor (Villardaga *et al.*, 2014). Existe un trabajo en el que se ha descrito que la fosforilación de CREB en respuesta a UCN1 ocurre a través de un mecanismo que involucra a G β γ y ERK1/2 mientras que CRH no activa esta vía (Stern *et al.*, 2011). Sin embargo, en ese trabajo no lograron detectar un aumento de cAMP en respuesta a CRH/UCN1 ni la dependencia de PKA de fosfo-CREB, por lo que podría ser una vía característica de ese sistema experimental. En neuronas hipocampales y corticales hemos demostrado que CRH genera aumentos de cAMP con características similares a las de las células HT22-CRHR1 (Figura 20). El estudio de los componentes moleculares activados río abajo del cAMP es muy difícil ya que en cultivos primarios embrionarios los niveles basales de ERK1/2 y CREB activados son altos. Por otra parte, en otros reportes en los que se han comparado los efectos de CRH y UCN1 no se han encontrado diferencias significativas (Swinny *et al.*, 2004; Goukko *et al.*, 2013; Pozzoli *et al.*, 2015).

Considerando que CRH y UCN1 tienen un patrón de expresión en el cerebro único, sólo solapado de forma parcial (Figura 7), las diferencias funcionales entre ambos ligandos *in vivo* pueden resultar de la activación de CRHR1 en distintos circuitos del cerebro (Henckens *et al.*, 2016). Por otra parte, teniendo en cuenta que, a diferencia de CRH, UCN1 tiene una afinidad similar por CRHR1 y por CRHR2, pueden surgir diferencias a partir de la activación de distintos receptores. En este sentido, consideramos que es esencial avanzar en la caracterización de las vías de señalización de CRHR2 a la luz de que la función conjunta de ambos receptores es crítica para la respuesta a estrés integral y las patologías asociadas. Quizás a través de una activación diferencial de las vías de señalización pueda comprenderse cómo es posible que CRHR1 y CRHR2 tengan efectos diferentes en el comportamiento según la región analizada (Henckens *et al.*, 2016, Figura 7).

La activación de CRHR1 promueve la diferenciación de células HT22-CRHR1

La diferenciación celular es un proceso que no sólo incluye cambios morfológicos sino también un arresto en la proliferación (Vaudry *et al.*, 2002). Además de promover el crecimiento de neuritas, ¿regula CRH la proliferación celular? Observamos que la activación de CRHR1 redujo significativamente la proliferación de esta línea celular (Figura 13-Figura 14) a través del arresto de la progresión del ciclo celular (Figura 15). Además, demostramos que el efecto neuritogénico de CRH puede ser antagonizado por un estímulo que promueve la proliferación como el suero (Figura 16).

Estudios previos que han explorado el rol de CRHR1 como regulador de la proliferación y la diferenciación celular indican que el efecto de CRHR1 no es general sino específico según el estadio de diferenciación y el contexto celular. Se ha reportado un efecto anti-proliferativo de CRH en células de neuroblastoma SK-N-SH (Pozzoli *et al.*, 2015), y en líneas celulares tumorales derivadas de corticotrofos, endometrio y mama (Melzig, 1994; Graziani *et al.*, 2007; Jin *et al.*, 2014; Stuhr *et al.*, 2014), mientras que se ha descrito que CRH favorece la proliferación en modelos de cáncer de piel y gástricos (Arbiser *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2013). CRH promovió la proliferación de progenitores neuronales (Koutmani *et al.*, 2013) y reguló el crecimiento de distintos tipos de células de la piel (Slominski *et al.*, 2006).

Los antecedentes respecto del rol de CRH como modulador de la arquitectura neuronal también son controversiales. CRH generó el crecimiento de neuritas en un mecanismo dependiente de PKA y ERK1/2 en la línea celular CATH.a derivada de *locus coeruleus*, en cultivos organotípicos de *locus coeruleus* y en células de Purkinje de rodajas de cerebelo (Cibelli *et al.*, 2001; Swinny *et al.*, 2004; Swinny y Valentino, 2006), pero redujo la arborización dentrítica de neuronas en desarrollo en el hipocampo (Chen *et al.*, 2004). CRH aumentó el número de espinas dendríticas en rodajas de cerebelo (Gounko *et al.*, 2013) mientras que afectó negativamente a las espinas finas en rodajas de hipocampo (Chen *et al.*, 2010).

Las diferencias observadas entre nuestros resultados y antecedentes previos pueden ser producto de los distintos modelos experimentales empleados así como de las condiciones de estimulación. Nosotros nos hemos interesado en utilizar el cambio morfológico de las células HT22-CRHR1 como un bioensayo para estudiar los mecanismos de señalización de CRHR1 (Inda, 2012). Sería imprudente considerar una relevancia fisiológica directa de estudios en líneas celulares establecidas. Sin embargo, este tipo de aproximación permite realizar experimentos moleculares y celulares que serían mucho más complicados *in vivo*, y las células HT22-CRHR1 mantienen características fundamentales de la respuesta de cAMP (Figura 20) y ERK1/2 (Refojo *et al.*,

2005; Bonfiglio *et al.*, 2013) dependiente de CRH. Por lo tanto, consideramos que el efecto neuritogénico y anti-proliferativo de CRH y UCN1 a través de la activación de CRHR1 en este sistema celular provee información valiosa a un tópico que aún es objeto de investigación. Debido a que el establecimiento de la conectividad entre neuronas es crítico para la función del cerebro, se ha propuesto que la acción de CRH como modulador de la plasticidad sináptica y las redes neuronales durante el desarrollo y en patologías asociadas a estrés podría explicar los efectos a largo plazo de la respuesta a estrés (Brunson *et al.*, 2003). Futuros estudios que evalúen la regulación ejercida por CRHR1 de las proteínas de la familia RhoGTPasas y cambios en la dinámica del citoesqueleto son necesarios para entender el rol de CRH como modulador de la arquitectura neuronal (Tojima *et al.*, 2011).

Vías de señalización activadas en la diferenciación de HT22-CRHR1

Una pregunta fundamental de la transducción de señales es cómo distintos mecanismos de señalización comunes a distintos sistemas son capaces de integrar señales de un estímulo dado para generar un efecto biológico determinado. El estudio de las vías de señalización que dirigen el destino celular ha sido fundamental para establecer muchos de los conceptos hoy ampliamente aceptados, dado que están involucradas rutas bioquímicas complejas, que van desde respuestas muy cortas (aumento de calcio) hasta procesos de largo plazo (cambios morfológicos y en el programa de expresión génica, Vaudry *et al.*, 2002).

En función de los resultados del presente trabajo en conjunto con resultados previos del laboratorio (Inda, 2012; Bonfiglio *et al.*, 2013), proponemos un modelo para representar los mecanismos involucrados en la diferenciación de células HT22-CRHR1 estimulados por CRH, donde se evidencia una compleja red de señalización (Figura 61). La estimulación con CRH conduce a un aumento de cAMP a través de la activación de tmACs y sAC. Ambas fuentes de cAMP pueden mediar la activación de PKA, de ERK1/2 y de CREB. Sin embargo, la activación de ERK1/2 no es crítica para la fosforilación de CREB ni para el crecimiento de neuritas en este sistema (Inda, 2012), lo que sugiere que las vías de ERK1/2 y CREB están funcionalmente aisladas. Además, el *pool* de PKA dependiente de sAC es el fundamental para el efecto neuritogénico de CRH (Inda, 2012; Inda *et al.*, 2016).

Por otro lado, ERK1/2 es esencial para los cambios morfológicos dependientes de PDGF en estas células pero no es necesario para el efecto de CRH (Inda, 2012). Más aún, un estímulo proliferativo como el suero induce una activación de ERK1/2 similar a la disparada por CRH, pero cumple un rol opuesto al de CRH respecto de la diferenciación celular (Figura 16). La activación prolongada de ERK1/2 es suficiente para la diferenciación en células derivadas de

feocromocitoma PC12 (Vaudry *et al.*, 2002). Sin embargo, los resultados obtenidos en PC12 no son extrapolables a células hipocampales.

Además, en este trabajo nos preguntamos cómo es la integración de las distintas vías de señalización a nivel de la regulación transcripcional. Elegimos estudiar la inducción de *c-fos* ya que es un gen clásico de la vía cAMP/PKA y es característico de respuestas neuronales (Benito y Barco, 2015). Es interesante notar que ambas fuentes de cAMP regulan *c-fos*, así como también las vías de CREB y ERK1/2 (Figura 28).

En conclusión, en este modelo celular hipocampal podemos identificar múltiples vías de señalización dependientes de cAMP en la misma célula, algunas dependientes entre sí y otras aisladas: vía dependiente de tmAC/sAC-PKA -primera fase de fosfo-ERK1/2-; vía dependiente de sAC, independiente de PKA -fase tardía de fosfo-ERK1/2-; vía dependiente de tmAC/sAC-PKA, independiente de fosfo-ERK1/2 -activación de CREB-; vía dependiente de sAC-PKA, independiente de ERK1/2 -crecimiento de neuritas-; vía dependiente de tmACs/sAC-PKA-ERK1/2 -inducción transcripcional de *c-fos*-.

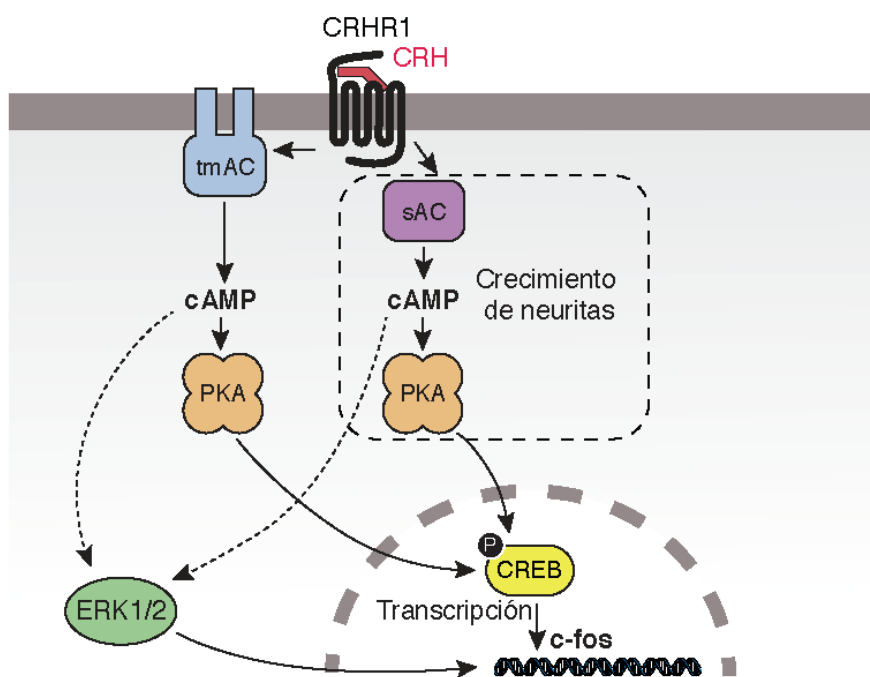


Figura 61 | Modelo propuesto para las vías de señalización activadas por CRHR1 involucradas en la diferenciación celular

La estimulación de CRHR1 genera cAMP a través de tmACs y sAC, que a su vez puede activar a la PKA y promueve la fosforilación de ERK1/2 y CREB. La actividad de sAC es esencial para la neuritogénesis, un proceso dependiente de PKA pero no de ERK1/2. La activación de CREB no depende de ERK1/2 en este sistema. Tanto ERK1/2 como CREB participan en la inducción transcripcional de *c-fos*.

sAC como una fuente alternativa de cAMP

En este trabajo, demostramos que la activación de CRHR1 genera una respuesta de cAMP que no sólo depende de las canónicas tmACs si no también de sAC en dos contextos fisiológicamente relevantes para la acción de CRH. Dado que los fenotipos detectados para el primer ratón KO de sAC era la infertilidad en machos y dislipidemia (Esposito *et al.*, 2004; Xie *et al.*, 2006), y que los niveles de sAC (mRNA y proteína) en tejidos somáticos son muy bajos, durante mucho tiempo se consideró que la función de sAC estaba restringida al testículo, donde presenta los mayores niveles de expresión y cumple una función crítica en la fertilidad masculina, siendo esencial para la movilidad y la capacitación espermática (Hess *et al.*, 2005). Sin embargo, hoy sAC se considera de expresión ubicua, habiendo sido hallada en múltiples tejidos (Mittag *et al.*, 1993; Sinclair *et al.*, 2000; Geng *et al.*, 2005; Han *et al.*, 2005; Halm *et al.*, 2010), incluido el cerebro (Chen *et al.*, 2013). Además, se han detectado isoformas somáticas de sAC, que sólo tienen el segundo dominio catalítico y que no han sido eliminadas en el primer ratón KO de sAC (Farrell *et al.*, 2008). Se han reportado funciones de sAC en múltiples tejidos incluyendo riñones, páncreas, tracto digestivo, tejido óseo, vías respiratorias, sistema inmune y sistema nervioso (para revisión, Tresguerres *et al.*, 2011).

Expresión de sAC en el cerebro

A partir de la caracterización de las vías de señalización activadas por CRH, describimos a sAC como fuente de cAMP en las células derivadas de neuronas hipocampales, HT22-CRHR1 y la línea celular derivada de corticotrofos, AtT20. Además, pudimos detectar la expresión de sAC a nivel de mRNA en hipocampo y corteza de cerebro adulto así como también en cultivos primarios neuronales preparados a partir de esas estructuras (Figura 23). Evaluamos la expresión de sAC en otras líneas celulares, como 3T3L1-CRHR1 y Neuro-2a, detectándola por RT-PCR (Figura 22, Inda, 2012). Por lo tanto, nuestros resultados son consistentes con una expresión ubicua de sAC, que permite considerar que cumple funciones en tejidos somáticos. Es importante destacar, sin embargo, que los niveles de expresión a nivel de mRNA fueron bajos en todos los casos, en línea con lo reportado previamente (Farrell *et al.*, 2008; Corredor *et al.*, 2012; Stiles *et al.*, 2014). La falta de anticuerpos robustos que detecten sAC en otros tejidos además de testículo y que no haya una caracterización bioquímica completa de cuáles son las isoformas que se expresan dificultan su estudio.

El grupo de Levin y Buck investigó la expresión de sAC en el cerebro utilizando la técnica de inmunohistoquímica, y detectó la expresión de sAC en neuronas de cerebelo, hipocampo y córtex cerebral (Chen *et al.*, 2013). La señal detectada se perdió cuando utilizaron secciones de

ratones KO para sAC (tanto en el primer ratón KO, deficiente en el primer dominio catalítico C1, como un ratón de segunda generación que no tiene el segundo). Con el objetivo de explorar si era posible estudiar el patrón de expresión en distintas regiones del cerebro, en este trabajo utilizamos una estrategia alternativa, a través de la hibridación *in situ*. Esta técnica permite una mayor resolución y es ampliamente utilizada para estudiar la expresión génica en el campo de la neurobiología. En las bases de datos públicas disponibles, como el Allen Brain Atlas (Lein *et al.*, 2007), no se había detectado una expresión significativa de sAC en el cerebro, pero buscamos realizar ajustes en el protocolo para sensibilizar su detección y utilizar más de una sonda para detectar el mRNA.

A través de la hibridación *in situ* no fue posible determinar un patrón de expresión característico para sAC en el cerebro (Figura 23). Existen antecedentes de genes cuya expresión en el cerebro es muy baja y de distribución homogénea, lo que representa una dificultad para su detección. Por ejemplo, para el receptor purinérgico P2X7, que es considerado un potencial blanco farmacológico para enfermedades neurodegenerativas, se desarrollaron ratones KO para verificar que esa señal homogénea era específica y desarrollar ratones transgénicos que permiten la expresión condicional del gen en regiones específicas para determinar su función (Metzger *et al.*, 2016). Consideramos que es importante que se lleven a cabo este tipo de estudios en el caso de sAC para comprender su contribución en tejidos como el cerebro.

Función de sAC en el cerebro

Nuestros resultados indican que sAC tiene funciones en la transducción de señales de CRHR1 en dos líneas celulares, una neuronal, HT22-CRHR1, y otra neuroendócrina, AtT20. No es el primer reporte que destaca la función de sAC en contextos celulares neuronales (para revisión, Stiles *et al.*, 2014). sAC ha sido involucrada en el crecimiento de axones y la elaboración del cono de crecimiento en respuesta a netrina-1 en neuronas ganglionares (Wu *et al.*, 2006). No se observaron alteraciones en esta función en el ratón KO C1 (Moore *et al.*, 2008), sugiriendo la existencia de mecanismos redundantes o la existencia de otras isoformas de sAC en este ratón (Farrell *et al.*, 2008). También en neuronas ganglionares sAC favoreció la viabilidad y el crecimiento axonal en respuesta a la actividad eléctrica (Corredor *et al.*, 2012). Además, sAC se expresa también en astrocitos y se ha reportado que participa en el acoplamiento metabólico entre neuronas y astrocitos (Choi *et al.*, 2012).

Se ha propuesto que sAC participa en los mecanismos de señalización de neurotrofinas, que involucran la activación de RTKs y la señalización mediada por interacciones entre proteínas y cascadas de fosforilación en general. En neuronas de cerebelo se observó que el crecimiento

axonal inducido por la neurotrofina BDNF depende de sAC (Martinez *et al.*, 2014). Utilizando como modelo a las células derivadas de feocromocitoma PC12 se ha propuesto que sAC media la activación de Rap1 (Stessin *et al.*, 2006) y cambios morfológicos (Young *et al.*, 2008) dependiente de la neurotrofina NGF. Existe evidencia creciente de que el cAMP regula la acción de las neurotrofinas que estimulan cambios morfológicos en neuronas (Huang y Reichardt, 2003; Stiles *et al.*, 2014). Estas observaciones sugieren que sAC podría ser una fuente atípica de cAMP en estas vías de señalización. Más aún, consideramos que es importante profundizar el estudio de sAC en neuronas teniendo en cuenta que en células excitables se observa una correlación entre el influjo de calcio por actividad eléctrica y los niveles de cAMP detectados (ver más adelante).

sAC y su rol río abajo de GPCRs

El rol de sAC en la transducción de señales de GPCRs aún no ha sido suficientemente explorado y hay pocas evidencias hasta ahora. En la mucosa del colon, la epinefrina activa a los receptores β 1AR y β 2AR para regular la secreción transitoria de Cl^- y la secreción sostenida de K^+ . Se observó que β 2AR señala a través de tmACs para aumentar de forma transitoria cAMP y así, la secreción de Cl^- . En contraste, la secreción sostenida de K^+ requiere la estimulación de β 1AR y β 2AR, que lleva a la estimulación de sAC y un aumento de cAMP más sostenido (Halm *et al.*, 2010). Por otra parte, en células del epitelio bronquial la estimulación de los receptores GPCRs EP1 y EP4 lleva a la activación de las tmACs, lo que regula al canal de Cl^- de la fibrosis quística (CFTR). Se describió que existe un mecanismo de amplificación de la señal: las tmAC llevan a la activación de EPACs, que median la movilización de calcio, lo que activa a sAC, la cual activa aún más al CFTR a través de PKA (Ivonne *et al.*, 2015).

En este trabajo, describimos la participación de sAC como una fuente alternativa de cAMP a las tmACs en la señalización de CRHR1, en un mecanismo que es dependiente del aumento de calcio y que lleva a la activación de PKA y EPACs (Figura 62). Es interesante que tanto en el trabajo de Halm y colaboradores, como en la señalización de CRH, se destaca el rol de sAC en la parte sostenida de la respuesta. Los mecanismos de activación de sAC parecen ser variables; por ejemplo, CRH estimula la entrada de calcio por influjo en las células HT22-CRHR1 mientras que en las células de epitelio, es la movilización de calcio desde reservorios intracelulares lo que activa a sAC. Siendo tan pocos los trabajos que han indicado un rol de sAC en la señalización de GPCRs aún es difícil comprender si existen mecanismos comunes involucrados. También es importante destacar que la participación de sAC es dependiente del contexto celular. Como estudiamos en este trabajo, sAC participa en la señalización de CRH en

células HT22-CRHR1 (Figura 25, Figura 30) y AtT20 (Figura 33), y no en células 3T3L1-CRHR1 (Figura 37). En línea con lo anterior, la señalización del β 1AR- β 2AR involucra a la sAC en la mucosa de colon, pero isoproterenol no activa a sAC en las células HT22-CRHR1 o en rodajas de cerebro (Choi *et al.*, 2012).

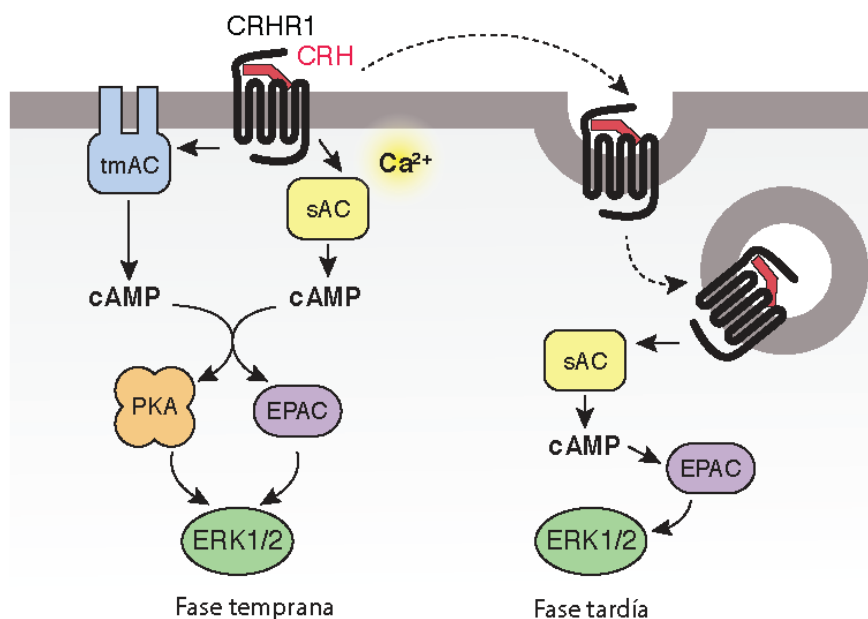


Figura 62 | Modelo propuesto para las vías de señalización activadas por CRHR1 involucradas en la activación de ERK1/2

CRHR1 activado a nivel de la membrana plasmática genera un aumento de cAMP y calcio intracelular. Tanto las tmACs -dependientes de proteína G- como sAC -dependiente de calcio- participan en la generación de cAMP, que a través de PKA y EPACs regulan la fosforilación temprana de ERK1/2. La internalización de CRHR1 lleva a una activación sostenida de ERK1/2, dependiente de sAC y EPAC.

sAC en la intersección de dos segundos mensajeros, calcio y cAMP

La regulación es uno de los aspectos que distinguen a sAC respecto de las tmACs. Se ha demostrado que sAC es activada directamente por bicarbonato, que aumenta la tasa catalítica favoreciendo el intercambio del producto por nuevo sustrato ATP, y calcio, que estabiliza al sustrato en el sitio activo (Kleinboelting *et al.*, 2014). Debido a la modulación ejercida por bicarbonato, sAC es considerada un sensor de $CO_2/HCO_3^-/pH$. Se ha demostrado que es crítica la activación de sAC por bicarbonato en procesos celulares dependientes de la concentración de bicarbonato en fluidos -capacitación espermática (Hess *et al.*, 2005), transporte iónico en epitelios y endotelios (Pastor-Soler *et al.*, 2003), etc- o de la actividad metabólica que genera CO_2/HCO_3^- -acoplamiento metabólico de astrocitos y neuronas (Choi *et al.*, 2012), síntesis de ATP mitocondrial (Acin-Perez *et al.*, 2009).

En otros sistemas como neutrófilos (Han *et al.*, 2005) y células β del páncreas (Ramos *et al.*, 2008) sAC se activa por aumentos de calcio. En los trabajos en los que se reportó una función de sAC en neuronas se hipotetizó que el activador era el calcio (Wu *et al.*, 2006; Corredor *et al.*, 2012). Nuestros resultados en las células HT22-CRHR1 sugieren un mecanismo de activación de sAC dependiente de la respuesta de calcio disparada por CRH. Observamos que la respuesta de cAMP dependiente de CRH es menor en presencia de un quelante de calcio (ya sea permeable –BAPTA-AM- o no –EGTA-). Ambas fases de fosfo-ERK1/2 se reducen en presencia de BAPTA-AM, al tratar las células con un inhibidor de sAC (KH7 o 2-HE), o silenciar sAC, mientras que el tratamiento con un inhibidor de tmACs (2',5'-ddA) o el silenciamiento de AC1 o AC8 no afecta la segunda fase de fosfo-ERK1/2.

Es notable que las cinéticas de las respuestas de calcio y cAMP estimuladas por CRH son muy diferentes en células HT22-CRHR1 (Figura 43). La respuesta de calcio es transitoria, retornando a niveles basales después de 1 min de estímulo, como es típico de aumentos de calcio mediados por influjo. En contraste, los niveles de cAMP permanecen elevados superados 40 min de estímulo (Figura 17). El aumento de calcio al inicio de la respuesta es crítico para la fosforilación de ERK1/2 a los 20-40 min de estimulación (Figura 44). La activación de sAC por calcio es un mecanismo que permite explicar cómo ocurre el acoplamiento entre distintos niveles e intervalos temporales de la cascada de transducción. Previamente hemos descrito otro mecanismo para explicar la dependencia de la segunda fase de fosfo-ERK1/2 a la respuesta de calcio a través de CaMKII (Bonfiglio *et al.*, 2013). La dependencia o interregulación de estos dos mecanismos deberán abordarse en futuros estudios.

Un aspecto a resaltar es que el aumento de calcio dependiente de CRH no se vio afectado por inhibidores de tmACs o sAC (Figura 46). Esto es consistente con la observación de que tmACs o sAC pueden regular mecanismos de forma independiente: por ejemplo, el crecimiento de neuritas y la segunda fase de fosforilación de ERK1/2 dependen de forma crítica de sAC. Estos efectos independientes no serían posibles en el escenario alternativo de que la entrada de calcio y la activación de sAC fueran dependientes de las tmACs. Por otro lado, este resultado es llamativo teniendo en cuenta que la vía predominante de señalización propuesta para CRHR1 es la activación de la proteína Gs, cuya principal acción es la generación de cAMP a través de tmACs. ¿Qué mecanismos regulan la entrada de calcio? Previamente, hemos determinado que el aumento de calcio en respuesta a CRH se da por influjo desde el medio extracelular y que la vía de PLC no estaría involucrada al menos a nivel de ERK1/2 (Bonfiglio *et al.*, 2013). ¿Qué canales están involucrados?, ¿está regulado por el complejo $\beta\gamma$ de la proteína G?, ¿otras

proteínas G activan la entrada de calcio? Futuros estudios sobre los mecanismos que regulan la entrada de calcio son esenciales. En células AtT20, donde sAC también participa en la fosforilación de ERK1/2 río abajo de CRHR1, previamente se ha demostrado que CRH estimula un aumento de calcio mediado por canales dependientes de voltaje de tipo L (Luini y Axelrod, 1985; Kovalovsky *et al.*, 2002).

Gran cantidad de procesos celulares son controlados por los segundos mensajeros cAMP y calcio. Se ha propuesto que la localización subcelular y la dinámica de esas respuestas, sumado a la forma en que las vías de señalización del cAMP y el calcio interactúan entre sí “codifican” las señales que permiten una regulación fina y específica de los procesos (Zaccolo y Pozzan, 2003; Dunn *et al.*, 2006; Ni *et al.*, 2011; Tojima *et al.*, 2011). En este sentido, se ha demostrado que la dinámica del calcio y de cAMP son críticas para determinar procesos a largo plazo en células excitables, como neuronas (Fukuchi *et al.*, 2005; Nagappan y Lu, 2005), y también en células no excitables (Bruce *et al.*, 2003). Uno de los puntos fundamentales para esta integración es la presencia de adenilil ciclasas reguladas por calcio. Intensa investigación se ha focalizado en comprender cómo oscilaciones de calcio regulan los niveles de cAMP y así, las respuestas biológicas, permitiendo apreciar la complejidad de las redes de señalización (Willoughby y Cooper, 2007; Cooper y Tabbasum, 2014). En muchos casos, los roles específicos de las tmACs inhibidas por calcio, AC5 y AC6, como de las tmACs activadas por calcio, AC1 y AC8 han sido dilucidados. Sin embargo, en otros estudios se han utilizado metodologías que no logran evaluar de manera precisa cuál es la fuente de cAMP involucrada. En este sentido, es imprescindible incluir a sAC en futuros estudios considerando que tiene características únicas: puede estar en localizaciones subcelulares mucho más diversas que las tmACs (Tresguerres *et al.*, 2011) y es estimulable por calcio, como AC1 y AC8, pero es la única activable por calcio de forma directa y no a través de calmodulina (CaM). A modo de ilustración, en este trabajo y en el de Corredor y colaboradores (Corredor *et al.*, 2012), se reportaron la existencia de mecanismos mediados por sAC y de los que no participaban AC1 ni AC8.

Finalmente, la existencia de métodos modernos que permiten la visualización de los niveles intracelulares de calcio y cAMP en simultáneo y con suficiente resolución, sumado a la posibilidad de dirigirlos a poblaciones celulares o localizaciones subcelulares específicas, son herramientas fundamentales que ayudarán a comprender cómo estas dos vías de señalización están interrelacionadas y regulan múltiples procesos celulares a corto y largo plazo.

Adenilil ciclasas como organizadoras de microdominios

Nuestros resultados sugieren que, aunque en términos absolutos la contribución de sAC a los niveles globales de cAMP es minoritaria, el cAMP generado por esta fuente tiene roles particulares en la respuesta biológica, como ya ha sido descrito para otras ciclasas en el paradigma emergente de microdominios de acción (Cooper y Tabbasum, 2014). Se ha observado que sAC puede estar presente en distintas localizaciones subcelulares, dirigiendo microdominios de señalización específicos (Tresguerres *et al.*, 2011)

¿Cómo está sAC integrada en complejos de señalización particulares? Un reporte reciente identificó a sAC formando un complejo con ezrina, que funciona como un AKAP, cumpliendo un rol crítico en la función de CD99 para la migración leucocitaria (Watson *et al.*, 2015). Consideramos que un estudio exhaustivo de las interacciones de sAC permitirá conocer más sobre cuál es su función para la señalización de CRHR1 y en general para la función celular, y además comprender cómo se regula su activación, cómo se logra la restricción espacial del *pool* de cAMP generado por sAC y cuáles son las proteínas efectoras.

En este sentido cabe destacar que se está empezando a reconocer un papel crítico de las AC no simplemente como productoras de cAMP sino como verdaderas organizadoras de complejos de señalización (Cooper y Tabbasum, 2014). Se han descrito una gran cantidad de proteínas interactuando con las AC, entre las que se encuentran AKAPs, fosfatasa, canales de calcio, proteínas del citoesqueleto, etc. Más aún, trabajos en los que se comparó el efecto sobre la función cardíaca de eliminar completamente una AC (ratón KO para AC6) e introducir una variante catalíticamente inactiva (knock-in de AC6 mutante) (Tang *et al.*, 2010; Gao *et al.*, 2011; Gao *et al.*, 2013) sugieren fuertemente que las AC pueden funcionar como proteínas organizadoras de complejos de señalización.

Direcciones futuras

En los últimos años se han realizado grandes avances en la comprensión de cómo la señalización mediada por cAMP está altamente organizada y compartimentalizada dentro de la célula. Trabajos recientes han demostrado que sAC es una fuente de cAMP alternativa a las canónicas tmAC, con características únicas y que regula mecanismos celulares en múltiples tejidos. Las metodologías clásicas para estudiar la señalización de cAMP no consideraban el concepto de señalización en microdominios. Por ejemplo, muchas funciones han sido atribuidas a las tmACs a partir de observaciones realizadas en experimentos con forskolina, el activador de las tmAC. Sin embargo, los aumentos de cAMP generados por forskolina no son fisiológicos en magnitud y sobrepasan la compartimentalización que existe frente a un estímulo fisiológico.

El uso de inhibidores farmacológicos específicos, el silenciamiento de las distintas ACs y la modulación de los activadores de las ACs son herramientas poderosas y complementarias que permitirán investigar la existencia de más de una fuente de cAMP en otros sistemas y profundizar en el conocimiento de los mecanismos involucrados.

La activación de CRHR1 conduce a una señalización prolongada

Han pasado 25 años desde la descripción de la endocitosis de los GPCRs activada por ligando (von Zastrow y Kobilka, 1992), durante los que han explorado en detalle los mecanismos implicados en la regulación y el tráfico. Sin embargo, el concepto de que la endocitosis puede regular vías de señalización canónicas de GPCRs es reciente. En trabajos previos reportamos que la internalización de CRHR1 y las β -arrestinas contribuyen a la activación de ERK1/2 (Bonfiglio *et al.*, 2013). Los resultados de este trabajo demuestran que la endocitosis de CRHR1 en células HT22-CRHR1 contribuye a la respuesta de cAMP, en línea con el paradigma emergente de que los GPCRs pueden generar cAMP desde estaciones endocíticas (Vilardaga *et al.*, 2014). Más aún, los resultados de este trabajo permiten proponer un nuevo mecanismo que contribuiría al establecimiento de una resolución espacial y temporal de los efectos de cAMP, a través de fuentes del nucleótido diferencialmente involucradas en cada una de las etapas de señalización (Figura 63).

La endocitosis de CRHR1 es rápida

Dado que la detección de CRHR1 endógeno no es posible por la falta de anticuerpos que reconozcan al receptor de forma sensible y específica (Refojo *et al.*, 2011), la expresión de formas acopladas a un *tag* ha sido utilizada para el estudio de la internalización de CRHR1. Nos focalizamos en la línea celular HT22-CRHR1 como modelo de estudio. Monitoreando la internalización de CRHR1 dependiente de ligando a través de la citometría de flujo encontramos que a los 5 min de estímulo ya hay una reducción del número de receptores en la membrana plasmática, que permanece más o menos constante por al menos 30 min (Figura 48).

En células HEK293 y neuronas corticales se reportó que la internalización de CRHR1 ya era significativa a los 10 min del estímulo (Holmes *et al.*, 2006). Además, trabajos nuestros y de otros grupos han observado que a los 30 min de estimulación, una porción significativa del receptor se encuentra en compartimientos endocíticos (Holmes *et al.*, 2006; Bonfiglio *et al.*, 2013), sugiriendo que los mecanismos de reciclado no restauran al menos de manera significativa la cantidad de CRHR1 en la membrana plasmática durante ese intervalo de tiempo.

En trabajos donde se estudió a la endocitosis como mecanismo de desensibilización, se observó que las cinéticas de internalización y resensibilización (medida como recuperación de la respuesta al estímulo) son dependientes del tipo celular, alcanzándose una resensibilización total 1-2 h post-estímulo en corticotrofos o HEK293, mientras que en células de neuroblastoma IMR-31 o retinoblastoma Y79 recién 24 h después (Hauger *et al.*, 1997; Teli *et al.*, 2005; Hauger *et al.*, 2006). El control del destino de CRHR1 internalizado así como los aspectos temporales de la resensibilización y la vida media del receptor en nuestro sistema celular serán aspectos importantes que deberán abordarse en futuros estudios.

Considerando que la endocitosis de CRHR1 es rápida, nos preguntamos si este mecanismo además de modular procesos más tardíos, como la segunda fase de fosfo-ERK1/2 (20-40 min, Bonfiglio *et al.*, 2013), podía regular procesos que ocurrieran en intervalos de tiempo corto.

cAMP desde endosomas: resolución espacial de cAMP a través de sAC

Mediante el análisis de la respuesta de cAMP dependiente de CRH en células HT22-CRHR1 demostramos que la endocitosis del receptor contribuye a la generación de cAMP: los niveles globales de cAMP son menores al bloquear la internalización (Figura 51). Cabe destacar que al observar la respuesta de cAMP, los tiempos en los que se observan menores niveles de cAMP son consistentes con la cinética de internalización de CRHR1 (Figura 48). CRH estimula no sólo un aumento de cAMP sino también un aumento de calcio casi en simultáneo (Figura 43). Sin embargo, la endocitosis no parece afectar la respuesta de este otro segundo mensajero (Figura 52).

¿En qué magnitud contribuye la endocitosis a los niveles globales de cAMP? La fracción de cAMP que depende de la endocitosis es significativa y parecida entre experimentos donde se usan distintos métodos para bloquear la endocitosis, pero representa menos del 50% de los niveles de cAMP 10 min después de agregado el estímulo (Figura 51). Sin embargo, nuestros resultados indican que ese *pool* de cAMP regula funciones biológicas específicas, por ejemplo, la fase sostenida de activación de ERK1/2 (Figura 29Figura 30). Esto indica que existen mecanismos que le otorgan resolución espacial a la señalización de CRHR1. Cabe destacar que la fracción de la respuesta dependiente de la internalización del receptor está en línea con lo reportado para algunos GPCRs como PTHR (Ferrandon *et al.*, 2009) o V2R (Feinstein *et al.*, 2013) y es superior a las diferencias reportadas para otros como el β 2AR (Irannejad *et al.*, 2013).

Nos propusimos investigar cuál era el mecanismo de señalización de CRHR1 desde estaciones endocíticas. En primer lugar, observamos que mecanismos reportados para PTHR (Feinstein *et*

al., 2011) no parecerían estar involucrados en este caso: la generación de cAMP sostenida no depende de la fosforilación de ERK1/2 (Figura 53). Considerando la existencia de dos fuentes de cAMP (Figura 25Figura 27) y los resultados indicando que la función de sAC era crítica para la segunda fase de ERK1/2 (Figura 29Figura 30) evaluamos la contribución de las tmAC y sAC al cAMP dependiente de la endocitosis. Notablemente, al inhibir sAC se pierde el componente de la respuesta de cAMP dependiente de la endocitosis mientras que al inhibir las tmACs aún se detecta (Figura 56). Además, la segunda fase de ERK1/2 depende de la función de sAC y la endocitosis del receptor, pero ambos mecanismos no son aditivos si no que actúan sobre la misma vía (Figura 57). Dado que la inhibición de sAC no afecta la endocitosis de CRHR1 (Figura 54), estos resultados apoyan un modelo en el que la función de sAC es crítica para la señalización desde endosomas (Figura 62Figura 63).

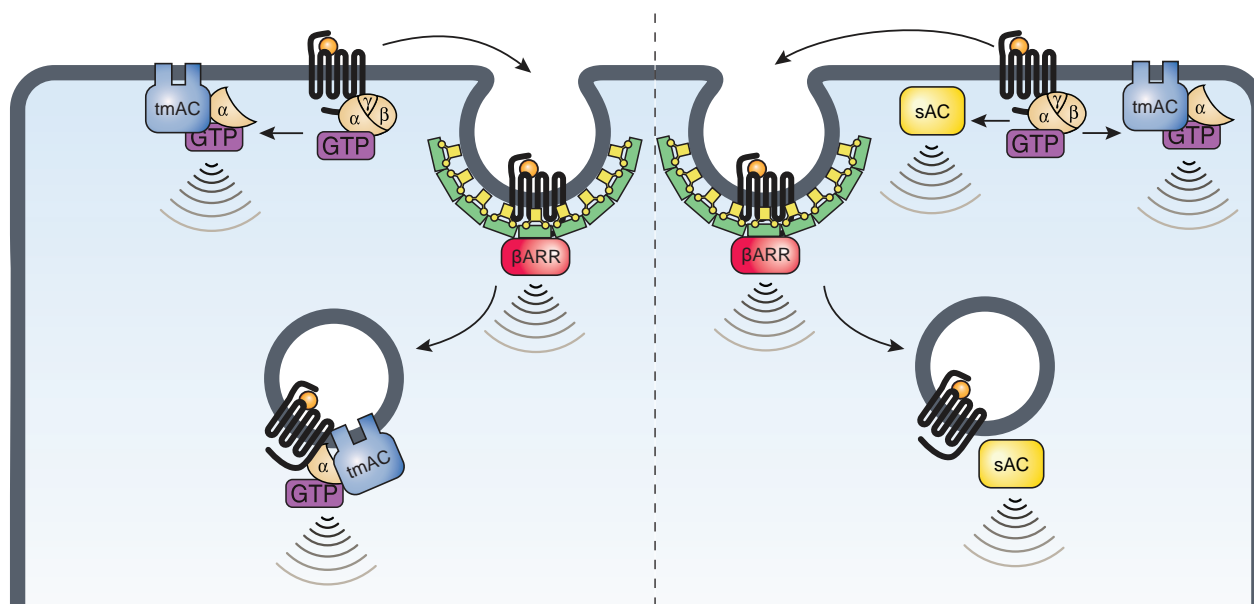


Figura 63 | Un nuevo mecanismo para la generación sostenida de cAMP dependiente de GPCR

Se ha demostrado para varios GPCRs que puede haber nuevos ciclos de activación de proteína G a nivel de endosomas, que llevan a una estimulación tardía de las tmACs (izquierda). Los resultados de este trabajo permiten proponer que la resolución espacial de la señalización de CRHR1 puede lograrse a través de una fuente de cAMP alternativa, sAC (derecha).

Es importante destacar que sAC participa en ambas fases de fosforilación de ERK1/2 (Figura 29Figura 30) por lo que no sería una fuente de cAMP que dependa exclusivamente de la internalización de CRHR1. Nuestros resultados indican que los mecanismos de endocitosis de

CRHR1 y generación de cAMP por sAC están funcionalmente acoplados, aunque no sabemos si sAC se encuentra en un complejo de señalización en el endosoma (Ver sección anterior). En este sentido, cabe destacar que ya existen antecedentes de señalización de GPCRs “a distancia” (Eichel *et al.*, 2016). En cuanto al rol de las tmAC en la señalización sostenida, podemos concluir que en tiempos en los que CRHR1 ya ha sido internalizado, las tmACs siguen estando activas (Figura 55). Sin embargo, su actividad no es crítica para la producción de cAMP desde endosomas (Figura 56) o para la fase sostenida de ERK1/2 (Figura 57).

En este trabajo no hemos investigado cuál es el rol de las β -arrestinas en la generación de cAMP dependiente de CRH. Considerando que las β -arrestinas son necesarias para la fase sostenida de ERK1/2 dependiente en las células HT22-CRHR1 (Bonfiglio *et al.*, 2013) y cumplen un papel clave para la generación de cAMP sostenida por PTHR (Feinstein *et al.*, 2011), hipotetizamos que pueden ser un componente del mecanismo de producción de cAMP dependiente de CRHR1 y serán evaluadas en futuros estudios.

En conclusión, en este trabajo demostramos que CRHR1 continúa generando cAMP una vez endocitado y proponemos un mecanismo en el que la existencia de dos fuentes alternativas de cAMP contribuye a la diversificación de las vías de señalización activadas por CRH: tanto tmACs como sAC participan en la fase aguda de ERK1/2 mientras que sólo sAC es crítica para la activación sostenida de ERK1/2 (Figura 62). Este nuevo mecanismo se suma a los mecanismos previos propuestos para explicar la señalización sostenida de GPCRs (Figura 63).

Funciones específicas de la señalización desde endosomas

¿Cuál es el significado funcional de la existencia de señalización desde endosomas? Esta es una pregunta fundamental que recién ha comenzado a contestarse. Las evidencias acumuladas hasta el momento sugieren dos efectos principales de las vías dependiente de estaciones endocíticas. En primer lugar, la señalización desde endosomas le confiere control temporal a la respuesta celular. Ha sido ampliamente reportado que este mecanismo extiende la duración de la respuesta, y se ha observado que permite el sostenimiento de la respuesta aún cuando se quita el ligando. Las manifestaciones río abajo de estos efectos temporales restan por ser explorados, pero se han descrito respuestas fisiológicas que dependen del intervalo de activación (Calebiro *et al.*, 2009; Ferrandon *et al.*, 2009; Lohse y Calebiro, 2013). Los efectos temporales también son importantes en las acciones terapéuticas de drogas (Mullershausen *et al.*, 2009). Otros estudios indican que la señalización desde endosomas provee un control espacial de la respuesta celular. Por ejemplo, la inhibición de la endocitosis redujo la magnitud de la inducción transcripcional de un amplio repertorio de genes dependientes de cAMP incluyendo al gen

PCK1, que codifica para la fosfo-enolpiruvato carboxikinasa 1, que controla la glucogenólisis (Tsvetanova y von Zastrow, 2014). El efecto de la endocitosis sobre la inducción de PCK1 no correlacionó con los cambios globales en el nivel de cAMP si no que estuvo asociado a la reducción en la fosforilación de CREB (Tsvetanova y von Zastrow, 2014). Por lo tanto, estos resultados sugieren que estos mecanismos pueden conferir control espacial sobre las vías de señalización río abajo. Para evaluar esta hipótesis, en grupo de von Zastrow desarrolló una estrategia optogenética: la adenilil ciclasa fotoactivable, derivada de bacterias (bPAC) fue ingenierizada para dirigirse a membrana plasmática o endosomas y se observó que la bPAC de endosomas fue mucho más eficiente para inducir la transcripción dependiente de cAMP (Tsvetanova y von Zastrow, 2014).

En las células HT22-CRHR1 la endocitosis del receptor es clave para la fosforilación sostenida de ERK dependiente de CRH (Bonfiglio *et al.*, 2013, Figura 57), habiendo observado diferencias en la localización subcelular de cada *pool* de ERK1/2. Esto está en línea con reportes de varios GPCRs en los que se estableció un rol de las proteínas β -arrestinas en la señalización del receptor, siendo la vía de las MAPK la más estudiada en este sentido (Rajagopal *et al.*, 2010). ¿Qué significan las dos fases de fosfo-ERK1/2? A pesar del gran entusiasmo desde el punto de vista farmacológico en desarrollar ligandos sesgados que señalicen preferencialmente por un mecanismo u otro, es un aspecto pendiente el comprender si hay funciones celulares que pueden ser moduladas de forma diferencial. Los resultados de este trabajo apoyan un modelo en el que un determinado GPCR utiliza vías de señalización diversificadas y reguladas en espacio y tiempo. La identificación de sAC como una fuente de cAMP río abajo de un GPCR podría aportar complejidad adicional considerando que sAC se ha descrito en distintas localizaciones subcelulares regulando microdominios particulares de señalización (por ejemplo ver Sample *et al.*, 2012). Aún resta determinar si los efectos observados *in vitro* para la fosforilación de ERK1/2 son relevantes para la función biológica de CRHR1 u otro GPCR o si aún pueden ser mejor evidenciados en un contexto más fisiológico.

Perspectivas

Siendo crecientes las evidencias que apoyan la existencia de mecanismos de señalización de GPCRs una vez internalizados además de la canónica activación de vías a nivel la membrana plasmática, surgen muchas preguntas a ser exploradas a futuro. Como se describió antes, el significado biológico de la activación desde endosomas es una pregunta central de la que se conoce muy poco, sobre todo en modelos celulares nativos o tejidos. Otro aspecto importante es determinar si más de un mecanismo puede operar en endosomas o si existe cierta especificidad

dada por el receptor, el contexto celular o el tipo de endosomas. Es notable que, a pesar de que no son tantos los GPCRs en los que se ha dilucidado este mecanismo, no parecen ser los mismos componentes moleculares los involucrados. Por otra parte, un punto fundamental a estudiar es cómo se termina la señalización del GPCR si no es sólo a través de la endocitosis.

En particular para la señalización de CRHR1 resultará interesante investigar cuál es el destino celular del receptor una vez endocitado y si la señalización es afectada. No se conocen mucho los mecanismos involucrados y pueden ser muy relevantes teniendo en cuenta observaciones en modelos de estrés, en los que los niveles del receptor en membrana y el tráfico podrían estar alterados (Henckens *et al.*, 2016). Analizar el rol del complejo del retrómero en la terminación de la señal, como ha sido demostrado para PTHR (Pavlos y Friedman, 2016), es un paso fundamental. También, estudiar qué componentes celulares están implicados en el reciclado o degradación del CRHR1 puede ser muy interesante considerando evidencias recientes de compartimientos vesiculares específicos en los que ocurre la señalización del β 2AR desde endosomas (Bowman *et al.*, 2016). Un análisis del perfil transcripcional regulado por CRH en distintas condiciones experimentales a través de técnicas de alto rendimiento (*high-throughput*) quizás permita comprender cómo están diversificados los mecanismos de señalización y cuál es su relevancia fisiológica.

La dependencia de la respuesta respecto del contexto celular también es un aspecto interesante a explorar. Por ejemplo, para TSHR se ha observado que el rol de la endocitosis depende del contexto celular (Werthmann *et al.*, 2012). Las respuestas de cAMP en las células HT22-CRHR1 y 3T3L1-CRHR1 son similares, mientras que en AtT20 es transitoria. Sin embargo, tanto en AtT20 como en HT22-CRHR1 se identificó a sAC como una fuente alternativa de cAMP mientras que en 3T3L1-CRHR1, no. La existencia de una generación más prolongada de cAMP no pareciera ser producto de la sobreexpresión de CRHR1 ya que fue también observada en cultivos primarios neuronales de hipocampo y corteza. Ya se ha descrito que la endocitosis también puede regular procesos agudos, no sólo aquellos sostenidos (Kotowski *et al.*, 2011) ¿Participa la endocitosis de la generación de cAMP dependiente de CRH en corticotrofos? ¿Es sAC un componente fundamental de la señalización de CRHR1 *in vivo* en circuitos cerebrales? ¿Qué mecanismos tienen en común la señalización de CRHR1 y CRHR2? Son todas preguntas que aguardan ser contestadas.

En este sentido, cabe destacar que el sistema de CRH, sus péptidos y receptores asociados aún no cuenta con las herramientas experimentales que sí están disponibles para otros sistemas mucho más estudiados y hay muchas características del sistema que aún no han sido exploradas.

Creemos que el desarrollo de estas herramientas será esencial para avanzar con el estudio de este sistema. Queremos destacar que una de las ventajas del uso de técnicas basadas en la visualización para el estudio de procesos celulares es que son menos invasivas que las técnicas bioquímicas y por lo tanto es más sencillo adaptarlas para sistemas experimentales de mayor relevancia fisiológica, como rodajas de cerebro o incluso el cerebro *in vivo* (Kerr y Denk, 2008). Quizás este tipo de aproximaciones experimentales contribuyan a tender vínculos entre las áreas de la señalización celular y la neurobiología que muchas veces abordan problemas comunes desde enfoques complementarios. Finalmente, consideramos que el estudio de los mecanismos de señalización de CRHR1 no sólo contribuirán a entender qué componentes moleculares son clave para la respuesta integral a estrés y la identificación de potenciales blancos terapéuticos en situaciones patológicas asociadas, sino también permitirá describir mecanismos que sean utilizados por otros miembros de la familia de GPCRs.

Bibliografía

- Acin-Perez, R., E. Salazar, M. Kamenetsky, J. Buck, L.R. Levin, y G. Manfredi. 2009. Cyclic AMP produced inside mitochondria regulates oxidative phosphorylation. *Cell Metab.* 9:265-76. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2009.01.012>.
- Adams, S.R., A.T. Harootunian, Y.J. Buechler, S.S. Taylor, y R.Y. Tsien. 1991. Fluorescence ratio imaging of cyclic AMP in single cells. *Nature.* 349:694-7. <http://dx.doi.org/10.1038/349694a0>.
- Aldenhoff, J.B., D.L. Gruol, J. Rivier, W. Vale, y G.R. Siggins. 1983. Corticotropin releasing factor decreases postburst hyperpolarizations and excites hippocampal neurons. *Science.* 221:875-7. <http://dx.doi.org/>.
- Allen, M.D., y J. Zhang. 2006. Subcellular dynamics of protein kinase A activity visualized by FRET-based reporters. *Biochem Biophys Res Commun.* 348:716-21. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.07.136>.
- Alvarez, L., L. Dai, B.M. Friedrich, N.D. Kashikar, I. Gregor, R. Pascal, y U.B. Kaupp. 2012. The rate of change in Ca(2+) concentration controls sperm chemotaxis. *J Cell Biol.* 196:653-63. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.201106096>.
- Ambrosini, A., S. Tininini, A. Barassi, G. Racagni, E. Sturani, y R. Zippel. 2000. cAMP cascade leads to Ras activation in cortical neurons. *Brain Res Mol Brain Res.* 75:54-60. <http://dx.doi.org/>.
- Aminova, L.R., J.C. Chavez, J. Lee, H. Ryu, A. Kung, J.C. Lamanna, y R.R. Ratan. 2005. Prosurvival and prodeath effects of hypoxia-inducible factor-1alpha stabilization in a murine hippocampal cell line. *J Biol Chem.* 280:3996-4003. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M409223200>.
- Appukuttan, A., J.P. Flacke, H. Flacke, A. Posadowsky, H.P. Reusch, y Y. Ladilov. 2014. Inhibition of soluble adenylyl cyclase increases the radiosensitivity of prostate cancer cells. *Biochim Biophys Acta.* 1842:2656-63. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.09.008>.
- Arbiser, J.L., K. Karalis, A. Viswanathan, C. Koike, B. Anand-Apte, E. Flynn, B. Zetter, y J.A. Majzoub. 1999. Corticotropin-releasing hormone stimulates angiogenesis and epithelial tumor growth in the skin. *J Invest Dermatol.* 113:838-42. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1523-1747.1999.00760.x>.
- Arzt, E., y F. Holsboer. 2006. CRF signaling: molecular specificity for drug targeting in the CNS. *Trends Pharmacol Sci.* 27:531-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tips.2006.08.007>.
- Bacskai, B.J., B. Hochner, M. Mahaut-Smith, S.R. Adams, B.K. Kaang, E.R. Kandel, y R.Y. Tsien. 1993. Spatially resolved dynamics of cAMP and protein kinase A subunits in Aplysia sensory neurons. *Science.* 260:222-6. <http://dx.doi.org/>.
- Bang, O.S., E.K. Park, S.I. Yang, S.R. Lee, T.F. Franke, y S.S. Kang. 2001. Overexpression of Akt inhibits NGF-induced growth arrest and neuronal differentiation of PC12 cells. *J Cell Sci.* 114:81-88. <http://dx.doi.org/>.
- Bartsch, D., M. Ghirardi, P.A. Skehel, K.A. Karl, S.P. Herder, M. Chen, C.H. Bailey, y E.R. Kandel. 1995. Aplysia CREB2 represses long-term facilitation: relief of repression converts transient facilitation into long-term functional and structural change. *Cell.* 83:979-92. <http://dx.doi.org/>.
- Beavo, J.A., y L.L. Brunton. 2002. Cyclic nucleotide research -- still expanding after half a century. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3:710-8. <http://dx.doi.org/10.1038/nrm911>.
- Beene, D.L., y J.D. Scott. 2007. A-kinase anchoring proteins take shape. *Curr Opin Cell Biol.* 19:192-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ceb.2007.02.011>.
- Bender, J., M. Engholm, M.S. Ederer, J. Breu, T.C. Moller, S. Michalakis, T. Rasko, E.E. Wanker, M. Biel, K.L. Martinez, W. Wurst, y J.M. Deussing. 2015. Corticotropin-Releasing Hormone Receptor Type 1 (CRHR1) Clustering with MAGUKs Is Mediated via Its C-Terminal PDZ Binding Motif. *PLoS One.* 10:e0136768. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0136768>.
- Benito, E., y A. Barco. 2010. CREB's control of intrinsic and synaptic plasticity: implications for CREB-dependent memory models. *Trends Neurosci.* 33:230-40. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tins.2010.02.001>.
- Benito, E., y A. Barco. 2015. The neuronal activity-driven transcriptome. *Mol Neurobiol.* 51:1071-88. <http://dx.doi.org/10.1007/s12035-014-8772-z>.

- Berthet, J., T.W. Rall, y E.W. Sutherland. 1957. The relationship of epinephrine and glucagon to liver phosphorylase. IV. Effect of epinephrine and glucagon on the reactivation of phosphorylase in liver homogenates. *J Biol Chem.* 224:463-75. <http://dx.doi.org/>.
- Berton, O., y E.J. Nestler. 2006. New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. *Nat Rev Neurosci.* 7:137-51. <http://dx.doi.org/10.1038/nrn1846>.
- Beyermann, M., N. Heinrich, K. Fechner, J. Furkert, W. Zhang, O. Kraetke, M. Bienert, y H. Berger. 2007. Achieving signalling selectivity of ligands for the corticotropin-releasing factor type 1 receptor by modifying the agonist's signalling domain. *Br J Pharmacol.* 151:851-9. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjp.0707293>.
- Birnboim, H.C., y J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7:1513-23. <http://dx.doi.org/>.
- Bitterman, J.L., L. Ramos-Espiritu, A. Diaz, L.R. Levin, y J. Buck. 2013. Pharmacological distinction between soluble and transmembrane adenylyl cyclases. *J Pharmacol Exp Ther.* 347:589-98. <http://dx.doi.org/10.1124/jpet.113.208496>.
- Bonfiglio, J.J. 2008. Mecanismos moleculares de la señalización celular mediada por la hormona CRH a través de su receptor CRHR1. Universidad de Buenos Aires.
- Bonfiglio, J.J. 2013. Mecanismos moleculares involucrados en la señalización celular de la hormona CRH en el sistema nervioso central. Universidad de Buenos Aires.
- Bonfiglio, J.J., C. Inda, D. Refojo, F. Holsboer, E. Arzt, y S. Silberstein. 2011a. The corticotropin-releasing hormone network and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: molecular and cellular mechanisms involved. *Neuroendocrinology.* 94:12-20. <http://dx.doi.org/10.1159/000328226>.
- Bonfiglio, J.J., C. Inda, S. Senin, G. Maccarrone, D. Refojo, D. Giacomini, C.W. Turck, F. Holsboer, E. Arzt, y S. Silberstein. 2013. B-Raf and CRHR1 internalization mediate biphasic ERK1/2 activation by CRH in hippocampal HT22 Cells. *Mol Endocrinol.* 27:491-510. <http://dx.doi.org/10.1210/me.2012-1359>.
- Bonfiglio, J.J., G. Maccarrone, C. Rewerts, F. Holsboer, E. Arzt, C.W. Turck, y S. Silberstein. 2011b. Characterization of the B-Raf interactome in mouse hippocampal neuronal cells. *J Proteomics.* 74:186-98. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2010.10.006>.
- Bootman, M.D., y M.J. Berridge. 1995. The elemental principles of calcium signaling. *Cell.* 83:675-8. <http://dx.doi.org/>.
- Boron, W.F. 2001. Sodium-coupled bicarbonate transporters. *JOP.* 2:176-81. <http://dx.doi.org/>.
- Bos, J.L. 1998. All in the family? New insights and questions regarding interconnectivity of Ras, Rap1 and Ral. *EMBO J.* 17:6776-82. <http://dx.doi.org/10.1093/emboj/17.23.6776>.
- Bos, J.L. 2006. Epac proteins: multi-purpose cAMP targets. *Trends Biochem Sci.* 31:680-6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibs.2006.10.002>.
- Bourtchuladze, R., B. Frenguelli, J. Blendy, D. Cioffi, G. Schutz, y A.J. Silva. 1994. Deficient long-term memory in mice with a targeted mutation of the cAMP-responsive element-binding protein. *Cell.* 79:59-68. <http://dx.doi.org/>.
- Bowman, S.L., D.J. Shiwardski, y M.A. Puthenveedu. 2016. Distinct G protein-coupled receptor recycling pathways allow spatial control of downstream G protein signaling. *J Cell Biol.* 214:797-806. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.201512068>.
- Braun, T., y R.F. Dods. 1975. Development of a Mn-2+-sensitive, "soluble" adenylyl cyclase in rat testis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 72:1097-101. <http://dx.doi.org/>.
- Britton, D.R., G.F. Koob, J. Rivier, y W. Vale. 1982. Intraventricular corticotropin-releasing factor enhances behavioral effects of novelty. *Life Sci.* 31:363-7. <http://dx.doi.org/>.
- Broussard, J.A., B. Rappaz, D.J. Webb, y C.M. Brown. 2013. Fluorescence resonance energy transfer microscopy as demonstrated by measuring the activation of the serine/threonine kinase Akt. *Nat Protoc.* 8:265-81. <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2012.147>.
- Brown, M.R., L.A. Fisher, J. Spiess, C. Rivier, J. Rivier, y W. Vale. 1982. Corticotropin-releasing factor: actions on the sympathetic nervous system and metabolism. *Endocrinology.* 111:928-31. <http://dx.doi.org/10.1210/endo-111-3-928>.

- Bruce, J.I., S.V. Straub, y D.I. Yule. 2003. Crosstalk between cAMP and Ca²⁺ signaling in non-excitabile cells. *Cell Calcium*. 34:431-44. <http://dx.doi.org/>.
- Brunson, K.L., Y. Chen, S. Avishai-Eliner, y T.Z. Baram. 2003. Stress and the developing hippocampus: a double-edged sword? *Mol Neurobiol*. 27:121-36. <http://dx.doi.org/10.1385/mn:27:2:121>.
- Buck, J., M.L. Sinclair, L. Schapal, M.J. Cann, y L.R. Levin. 1999. Cytosolic adenylyl cyclase defines a unique signaling molecule in mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96:79-84. <http://dx.doi.org/>.
- Busca, R., P. Abbe, F. Mantoux, E. Aberdam, C. Peyssonnaud, A. Eychene, J.P. Ortonne, y R. Ballotti. 2000. Ras mediates the cAMP-dependent activation of extracellular signal-regulated kinases (ERKs) in melanocytes. *EMBO J*. 19:2900-10. <http://dx.doi.org/10.1093/emboj/19.12.2900>.
- Butcher, R.W., y E.W. Sutherland. 1962. Adenosine 3',5'-phosphate in biological materials. I. Purification and properties of cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase and use of this enzyme to characterize adenosine 3',5'-phosphate in human urine. *J Biol Chem*. 237:1244-50. <http://dx.doi.org/>.
- Buxton, I.L., y L.L. Brunton. 1983. Compartments of cyclic AMP and protein kinase in mammalian cardiomyocytes. *J Biol Chem*. 258:10233-9. <http://dx.doi.org/>.
- Cai, D., J. Qiu, Z. Cao, M. McAtee, B.S. Bregman, y M.T. Filbin. 2001. Neuronal cyclic AMP controls the developmental loss in ability of axons to regenerate. *J Neurosci*. 21:4731-9. <http://dx.doi.org/>.
- Calebiro, D., V.O. Nikolaev, M.C. Gagliani, T. de Filippis, C. Dees, C. Tacchetti, L. Persani, y M.J. Lohse. 2009. Persistent cAMP-signals triggered by internalized G-protein-coupled receptors. *PLoS Biol*. 7:e1000172. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pbio.1000172>.
- Calebiro, D., V.O. Nikolaev, y M.J. Lohse. 2010. Imaging of persistent cAMP signaling by internalized G protein-coupled receptors. *J Mol Endocrinol*. 45:1-8. <http://dx.doi.org/10.1677/jme-10-0014>.
- Carlson, A.E., B. Hille, y D.F. Babcock. 2007. External Ca²⁺ acts upstream of adenylyl cyclase SACY in the bicarbonate signaled activation of sperm motility. *Dev Biol*. 312:183-92. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.09.017>.
- Carnegie, G.K., C.K. Means, y J.D. Scott. 2009. A-kinase anchoring proteins: from protein complexes to physiology and disease. *IUBMB Life*. 61:394-406. <http://dx.doi.org/10.1002/iub.168>.
- Chang, C.L., y S.Y. Hsu. 2004. Ancient evolution of stress-regulating peptides in vertebrates. *Peptides*. 25:1681-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.peptides.2004.05.022>.
- Chen, J., J. Martinez, T.A. Milner, J. Buck, y L.R. Levin. 2013. Neuronal expression of soluble adenylyl cyclase in the mammalian brain. *Brain Res*. 1518:1-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2013.04.027>.
- Chen, J.Y., J.R. Lin, K.A. Cimprich, y T. Meyer. 2012. A two-dimensional ERK-AKT signaling code for an NGF-triggered cell-fate decision. *Mol Cell*. 45:196-209. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2011.11.023>.
- Chen, Y., R.A. Bender, K.L. Brunson, J.K. Pomper, D.E. Grigoriadis, W. Wurst, y T.Z. Baram. 2004. Modulation of dendritic differentiation by corticotropin-releasing factor in the developing hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101:15782-7. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0403975101>.
- Chen, Y., M.J. Cann, T.N. Litvin, V. Iourgenko, M.L. Sinclair, L.R. Levin, y J. Buck. 2000. Soluble adenylyl cyclase as an evolutionarily conserved bicarbonate sensor. *Science*. 289:625-8. <http://dx.doi.org/>.
- Chen, Y., C.S. Rex, C.J. Rice, C.M. Dube, C.M. Gall, G. Lynch, y T.Z. Baram. 2010. Correlated memory defects and hippocampal dendritic spine loss after acute stress involve corticotropin-releasing hormone signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107:13123-8. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1003825107>.
- Choi, H.B., G.R. Gordon, N. Zhou, C. Tai, R.L. Rungta, J. Martinez, T.A. Milner, J.K. Ryu, J.G. McLarnon, M. Tresguerres, L.R. Levin, J. Buck, y B.A. MacVicar. 2012. Metabolic communication between astrocytes and neurons via bicarbonate-responsive soluble adenylyl cyclase. *Neuron*. 75:1094-104. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2012.08.032>.
- Cibelli, G., P. Corsi, G. Diana, F. Vitiello, y G. Thiel. 2001. Corticotropin-releasing factor triggers neurite outgrowth of a catecholaminergic immortalized neuron via cAMP and MAP kinase signalling pathways. *Eur J Neurosci*. 13:1339-48. <http://dx.doi.org/>.
- Cooper, D.M. 2003. Regulation and organization of adenylyl cyclases and cAMP. *Biochem J*. 375:517-29. <http://dx.doi.org/10.1042/bj20031061>.
- Cooper, D.M., y V.G. Tabbasum. 2014. Adenylate cyclase-centred microdomains. *Biochem J*. 462:199-213. <http://dx.doi.org/10.1042/BJ20140560>.

- Copsel, S., C. Garcia, F. Diez, M. Vermeulem, A. Baldi, L.G. Bianciotti, F.G. Russel, C. Shayo, y C. Davio. 2011. Multidrug resistance protein 4 (MRP4/ABCC4) regulates cAMP cellular levels and controls human leukemia cell proliferation and differentiation. *J Biol Chem.* 286:6979-88. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M110.166868>.
- Corredor, R.G., E.F. Trakhtenberg, W. Pita-Thomas, X. Jin, Y. Hu, y J.L. Goldberg. 2012. Soluble adenylyl cyclase activity is necessary for retinal ganglion cell survival and axon growth. *J Neurosci.* 32:7734-44. <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5288-11.2012>.
- Culhane, K.J., Y. Liu, Y. Cai, y E.C. Yan. 2015. Transmembrane signal transduction by peptide hormones via family B G protein-coupled receptors. *Front Pharmacol.* 6:264. <http://dx.doi.org/10.3389/fphar.2015.00264>.
- Dautzenberg, F.M., y R.L. Hauger. 2002. The CRF peptide family and their receptors: yet more partners discovered. *Trends Pharmacol Sci.* 23:71-7. <http://dx.doi.org/>.
- Davis, S., y S. Laroche. 2006. Mitogen-activated protein kinase/extracellular regulated kinase signalling and memory stabilization: a review. *Genes Brain Behav.* 5 Suppl 2:61-72. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1601-183X.2006.00230.x>.
- De Bellis, M.D., P.W. Gold, T.D. Geraciotti, Jr., S.J. Listwak, y M.A. Kling. 1993. Association of fluoxetine treatment with reductions in CSF concentrations of corticotropin-releasing hormone and arginine vasopressin in patients with major depression. *Am J Psychiatry.* 150:656-7. <http://dx.doi.org/>.
- de Kloet, E.R., M. Joels, y F. Holsboer. 2005. Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat Rev Neurosci.* 6:463-75. <http://dx.doi.org/10.1038/nrn1683>.
- de Rooij, J., F.J. Zwartkruis, M.H. Verheijen, R.H. Cool, S.M. Nijman, A. Wittinghofer, y J.L. Bos. 1998. Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature.* 396:474-7. <http://dx.doi.org/10.1038/24884>.
- DeFea, K.A., Z.D. Vaughn, E.M. O'Bryan, D. Nishijima, O. Dery, y N.W. Bunnett. 2000a. The proliferative and antiapoptotic effects of substance P are facilitated by formation of a beta -arrestin-dependent scaffolding complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:11086-91. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.190276697>.
- DeFea, K.A., J. Zalevsky, M.S. Thoma, O. Dery, R.D. Mullins, y N.W. Bunnett. 2000b. beta-arrestin-dependent endocytosis of proteinase-activated receptor 2 is required for intracellular targeting of activated ERK1/2. *J Cell Biol.* 148:1267-81. <http://dx.doi.org/>.
- Deming, P.B., S.L. Campbell, J.B. Stone, R.L. Rivard, A.L. Mercier, y A.K. Howe. 2015. Anchoring of protein kinase A by ERM (ezrin-radixin-moesin) proteins is required for proper netrin signaling through DCC (deleted in colorectal cancer). *J Biol Chem.* 290:5783-96. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M114.628644>.
- Depry, C., M.D. Allen, y J. Zhang. 2011. Visualization of PKA activity in plasma membrane microdomains. *Mol Biosyst.* 7:52-8. <http://dx.doi.org/10.1039/c0mb00079e>.
- Dessauer, C.W. 2009. Adenylyl cyclase--A-kinase anchoring protein complexes: the next dimension in cAMP signaling. *Mol Pharmacol.* 76:935-41. <http://dx.doi.org/10.1124/mol.109.059345>.
- Dhillon, A.S., S. Hagan, O. Rath, y W. Kolch. 2007. MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene.* 26:3279-90. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1210421>.
- Di Guglielmo, G.M., P.C. Baass, W.J. Ou, B.I. Posner, y J.J. Bergeron. 1994. Compartmentalization of SHC, GRB2 and mSOS, and hyperphosphorylation of Raf-1 by EGF but not insulin in liver parenchyma. *EMBO J.* 13:4269-77. <http://dx.doi.org/>.
- DiPilato, L.M., X. Cheng, y J. Zhang. 2004. Fluorescent indicators of cAMP and Epac activation reveal differential dynamics of cAMP signaling within discrete subcellular compartments. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:16513-8. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0405973101>.
- Donovan, P., y P. Poronnik. 2013. Nedd4 and Nedd4-2: ubiquitin ligases at work in the neuron. *Int J Biochem Cell Biol.* 45:706-10. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2012.12.006>.
- Dos Santos Claro, P.A. 2016. Rol del complejo Gβγ en la señalización del CRHR1 en un modelo neuronal hipocámpal. Universidad de Buenos Aires.
- Drews, J. 2000. Drug discovery: a historical perspective. *Science.* 287:1960-4. <http://dx.doi.org/>.
- Dunn, A.J., y S.E. File. 1987. Corticotropin-releasing factor has an anxiogenic action in the social interaction test. *Horm Behav.* 21:193-202. <http://dx.doi.org/>.

- Dunn, H.A., H.S. Chahal, F.A. Caetano, K.D. Holmes, G.Y. Yuan, R. Parikh, B. Heit, y S.S. Ferguson. 2016. PSD-95 regulates CRFR1 localization, trafficking and beta-arrestin2 recruitment. *Cell Signal*. 28:531-40. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellsig.2016.02.013>.
- Dunn, T.A., C.T. Wang, M.A. Colicos, M. Zaccolo, L.M. DiPilato, J. Zhang, R.Y. Tsien, y M.B. Feller. 2006. Imaging of cAMP levels and protein kinase A activity reveals that retinal waves drive oscillations in second-messenger cascades. *J Neurosci*. 26:12807-15. <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3238-06.2006>.
- Eaves, M., K. Thatcher-Britton, J. Rivier, W. Vale, y G.F. Koob. 1985. Effects of corticotropin releasing factor on locomotor activity in hypophysectomized rats. *Peptides*. 6:923-6. <http://dx.doi.org/>.
- Eichel, K., D. Jullie, y M. von Zastrow. 2016. beta-Arrestin drives MAP kinase signalling from clathrin-coated structures after GPCR dissociation. *Nat Cell Biol*. 18:303-10. <http://dx.doi.org/10.1038/ncb3307>.
- Emery, A.C., M.V. Eiden, T. Mustafa, y L.E. Eiden. 2013. Rapgef2 connects GPCR-mediated cAMP signals to ERK activation in neuronal and endocrine cells. *Sci Signal*. 6:ra51. <http://dx.doi.org/10.1126/scisignal.2003993>.
- Enserink, J.M., A.E. Christensen, J. de Rooij, M. van Triest, F. Schwede, H.G. Genieser, S.O. Doskeland, J.L. Blank, y J.L. Bos. 2002. A novel Epac-specific cAMP analogue demonstrates independent regulation of Rap1 and ERK. *Nat Cell Biol*. 4:901-6. <http://dx.doi.org/10.1038/ncb874>.
- Esposito, G., B.S. Jaiswal, F. Xie, M.A. Krajnc-Franken, T.J. Robben, A.M. Strik, C. Kuil, R.L. Philipsen, M. van Duin, M. Conti, y J.A. Gossen. 2004. Mice deficient for soluble adenylyl cyclase are infertile because of a severe sperm-motility defect. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101:2993-8. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0400050101>.
- Farrell, J., L. Ramos, M. Tresguerres, M. Kamenetsky, L.R. Levin, y J. Buck. 2008. Somatic 'soluble' adenylyl cyclase isoforms are unaffected in Sacy tm1Lex/Sacy tm1Lex 'knockout' mice. *PLoS One*. 3:e3251. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0003251>.
- Faure, M., T.A. Voyno-Yasenetskaya, y H.R. Bourne. 1994. cAMP and beta gamma subunits of heterotrimeric G proteins stimulate the mitogen-activated protein kinase pathway in COS-7 cells. *J Biol Chem*. 269:7851-4. <http://dx.doi.org/>.
- Feinstein, T.N., V.L. Wehbi, J.A. Ardura, D.S. Wheeler, S. Ferrandon, T.J. Gardella, y J.P. Vilardaga. 2011. Retromer terminates the generation of cAMP by internalized PTH receptors. *Nat Chem Biol*. 7:278-84. <http://dx.doi.org/10.1038/nchembio.545>.
- Feinstein, T.N., N. Yui, M.J. Webber, V.L. Wehbi, H.P. Stevenson, J.D. King, Jr., K.R. Hallows, D. Brown, R. Bouley, y J.P. Vilardaga. 2013. Noncanonical control of vasopressin receptor type 2 signaling by retromer and arrestin. *J Biol Chem*. 288:27849-60. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M112.445098>.
- Fenoglio, K.A., K.L. Brunson, y T.Z. Baram. 2006. Hippocampal neuroplasticity induced by early-life stress: functional and molecular aspects. *Front Neuroendocrinol*. 27:180-92. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yfrne.2006.02.001>.
- Ferrandon, S., T.N. Feinstein, M. Castro, B. Wang, R. Bouley, J.T. Potts, T.J. Gardella, y J.P. Vilardaga. 2009. Sustained cyclic AMP production by parathyroid hormone receptor endocytosis. *Nat Chem Biol*. 5:734-42. <http://dx.doi.org/10.1038/nchembio.206>.
- Fesenko, E.E., S.S. Kolesnikov, y A.L. Lyubarsky. 1985. Induction by cyclic GMP of cationic conductance in plasma membrane of retinal rod outer segment. *Nature*. 313:310-3. <http://dx.doi.org/>.
- Flacke, J.P., H. Flacke, A. Appukuttan, R.J. Palisaar, J. Noldus, B.D. Robinson, H.P. Reusch, J.H. Zippin, y Y. Ladilov. 2013. Type 10 soluble adenylyl cyclase is overexpressed in prostate carcinoma and controls proliferation of prostate cancer cells. *J Biol Chem*. 288:3126-35. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M112.403279>.
- Fredriksson, R., y H.B. Schioth. 2005. The repertoire of G-protein-coupled receptors in fully sequenced genomes. *Mol Pharmacol*. 67:1414-25. <http://dx.doi.org/10.1124/mol.104.009001>.
- Fukuchi, M., A. Tabuchi, y M. Tsuda. 2005. Transcriptional regulation of neuronal genes and its effect on neural functions: cumulative mRNA expression of PACAP and BDNF genes controlled by calcium and cAMP signals in neurons. *J Pharmacol Sci*. 98:212-8. <http://dx.doi.org/>.

- Gao, M.H., N.C. Lai, T. Tang, T. Guo, R. Tang, B.J. Chun, H. Wang, N.N. Dalton, J. Suarez, W.H. Dillmann, y H.K. Hammond. 2013. Preserved cardiac function despite marked impairment of cAMP generation. *PLoS One*. 8:e72151. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0072151>.
- Gao, M.H., T. Tang, N.C. Lai, A. Miyanohara, T. Guo, R. Tang, A.L. Firth, J.X. Yuan, y H.K. Hammond. 2011. Beneficial effects of adenylyl cyclase type 6 (AC6) expression persist using a catalytically inactive AC6 mutant. *Mol Pharmacol*. 79:381-8. <http://dx.doi.org/10.1124/mol.110.067298>.
- Geng, W., Z. Wang, J. Zhang, B.Y. Reed, C.Y. Pak, y O.W. Moe. 2005. Cloning and characterization of the human soluble adenylyl cyclase. *Am J Physiol Cell Physiol*. 288:C1305-16. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpcell.00584.2004>.
- Gidon, A., M.M. Al-Bataineh, F.G. Jean-Alphonse, H.P. Stevenson, T. Watanabe, C. Louet, A. Khatri, G. Calero, N.M. Pastor-Soler, T.J. Gardella, y J.P. Vilardaga. 2014. Endosomal GPCR signaling turned off by negative feedback actions of PKA and v-ATPase. *Nat Chem Biol*. 10:707-9. <http://dx.doi.org/10.1038/nchembio.1589>.
- Gilman, A.G. 1970. A protein binding assay for adenosine 3':5'-cyclic monophosphate. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 67:305-12. <http://dx.doi.org/>.
- Gold, P.W., G. Chrousos, C. Kellner, R. Post, A. Roy, P. Augerinos, H. Schulte, E. Oldfield, y D.L. Loriaux. 1984. Psychiatric implications of basic and clinical studies with corticotropin-releasing factor. *Am J Psychiatry*. 141:619-27. <http://dx.doi.org/>.
- Goldsmith, Z.G., y D.N. Dhanasekaran. 2007. G protein regulation of MAPK networks. *Oncogene*. 26:3122-42. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1210407>.
- Gonzalez, F.A., D.L. Raden, y R.J. Davis. 1991. Identification of substrate recognition determinants for human ERK1 and ERK2 protein kinases. *J Biol Chem*. 266:22159-63. <http://dx.doi.org/>.
- Gordeladze, J.O., D. Andersen, y V. Hansson. 1981. Physicochemical and kinetic properties of the Mn²⁺-dependent adenylyl cyclase of the human testis. *J Clin Endocrinol Metab*. 53:465-71. <http://dx.doi.org/10.1210/jcem-53-3-465>.
- Gordeladze, J.O., y V. Hansson. 1981. Purification and kinetic properties of the soluble Mn²⁺-dependent adenylyl cyclase of the rat testis. *Mol Cell Endocrinol*. 23:125-36. <http://dx.doi.org/>.
- Gounko, N.V., J.D. Swinny, D. Kalicharan, S. Jafari, N. Corteen, M. Seifi, R. Bakels, y J.J. van der Want. 2013. Corticotropin-releasing factor and urocortin regulate spine and synapse formation: structural basis for stress-induced neuronal remodeling and pathology. *Mol Psychiatry*. 18:86-92. <http://dx.doi.org/10.1038/mp.2012.43>.
- Grammatopoulos, D.K., y G.P. Chrousos. 2002. Functional characteristics of CRH receptors and potential clinical applications of CRH-receptor antagonists. *Trends Endocrinol Metab*. 13:436-44. <http://dx.doi.org/>.
- Grammatopoulos, D.K., H.S. Randeve, M.A. Levine, E.S. Katsanou, y E.W. Hillhouse. 2000. Urocortin, but not corticotropin-releasing hormone (CRH), activates the mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway in human pregnant myometrium: an effect mediated via R1alpha and R2beta CRH receptor subtypes and stimulation of Gq-proteins. *Mol Endocrinol*. 14:2076-91. <http://dx.doi.org/>.
- Graziani, G., L. Tentori, A. Muzi, M. Vergati, G. Tringali, G. Pozzoli, y P. Navarra. 2007. Evidence that corticotropin-releasing hormone inhibits cell growth of human breast cancer cells via the activation of CRH-R1 receptor subtype. *Mol Cell Endocrinol*. 264:44-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2006.10.006>.
- Grewal, S.S., D.M. Fass, H. Yao, C.L. Ellig, R.H. Goodman, y P.J. Stork. 2000. Calcium and cAMP signals differentially regulate cAMP-responsive element-binding protein function via a Rap1-extracellular signal-regulated kinase pathway. *J Biol Chem*. 275:34433-41. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M004728200>.
- Grewal, S.S., R.D. York, y P.J. Stork. 1999. Extracellular-signal-regulated kinase signalling in neurons. *Curr Opin Neurobiol*. 9:544-53. [http://dx.doi.org/10.1016/S0959-4388\(99\)00010-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0959-4388(99)00010-0).
- Gutknecht, E., I. Van der Linden, K. Van Kolen, K.F. Verhoeven, G. Vauquelin, y F.M. Dautzenberg. 2009. Molecular mechanisms of corticotropin-releasing factor receptor-induced calcium signaling. *Mol Pharmacol*. 75:648-57. <http://dx.doi.org/10.1124/mol.108.050427>.
- Halm, S.T., J. Zhang, y D.R. Halm. 2010. beta-Adrenergic activation of electrogenic K⁺ and Cl⁻ secretion in guinea pig distal colonic epithelium proceeds via separate cAMP signaling pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 299:G81-95. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpgi.00035.2010>.

- Han, H., A. Stessin, J. Roberts, K. Hess, N. Gautam, M. Kamenetsky, O. Lou, E. Hyde, N. Nathan, W.A. Muller, J. Buck, L.R. Levin, y C. Nathan. 2005. Calcium-sensing soluble adenylyl cyclase mediates TNF signal transduction in human neutrophils. *J Exp Med.* 202:353-61. <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20050778>.
- Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol.* 166:557-80. <http://dx.doi.org/>.
- Hauger, R.L., F.M. Dautzenberg, A. Flaccus, T. Liepold, y J. Spiess. 1997. Regulation of corticotropin-releasing factor receptor function in human Y-79 retinoblastoma cells: rapid and reversible homologous desensitization but prolonged recovery. *J Neurochem.* 68:2308-16. <http://dx.doi.org/>.
- Hauger, R.L., V. Risbrough, O. Brauns, y F.M. Dautzenberg. 2006. Corticotropin releasing factor (CRF) receptor signaling in the central nervous system: new molecular targets. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 5:453-79. <http://dx.doi.org/>.
- Hemley, C.F., A. McCluskey, y P.A. Keller. 2007. Corticotropin releasing hormone--a GPCR drug target. *Curr Drug Targets.* 8:105-15. <http://dx.doi.org/>.
- Henckens, M.J., J.M. Deussing, y A. Chen. 2016. Region-specific roles of the corticotropin-releasing factor-urocortin system in stress. *Nat Rev Neurosci.* 17:636-51. <http://dx.doi.org/10.1038/nrn.2016.94>.
- Herskovits, J.S., C.C. Burgess, R.A. Obar, y R.B. Vallee. 1993. Effects of mutant rat dynamin on endocytosis. *J Cell Biol.* 122:565-78. <http://dx.doi.org/>.
- Hess, K.C., B.H. Jones, B. Marquez, Y. Chen, T.S. Ord, M. Kamenetsky, C. Miyamoto, J.H. Zippin, G.S. Kopf, S.S. Suarez, L.R. Levin, C.J. Williams, J. Buck, y S.B. Moss. 2005. The "soluble" adenylyl cyclase in sperm mediates multiple signaling events required for fertilization. *Dev Cell.* 9:249-59. <http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2005.06.007>.
- Heuser, I., G. Bissette, M. Dettling, U. Schweiger, U. Gotthardt, J. Schmider, C.H. Lammers, C.B. Nemeroff, y F. Holsboer. 1998. Cerebrospinal fluid concentrations of corticotropin-releasing hormone, vasopressin, and somatostatin in depressed patients and healthy controls: response to amitriptyline treatment. *Depress Anxiety.* 8:71-9. <http://dx.doi.org/>.
- Hillhouse, E.W., y D.K. Grammatopoulos. 2006. The molecular mechanisms underlying the regulation of the biological activity of corticotropin-releasing hormone receptors: implications for physiology and pathophysiology. *Endocr Rev.* 27:260-86. <http://dx.doi.org/10.1210/er.2005-0034>.
- Hochbaum, D., K. Hong, G. Barila, F. Ribeiro-Neto, y D.L. Altschuler. 2008. Epac, in synergy with cAMP-dependent protein kinase (PKA), is required for cAMP-mediated mitogenesis. *J Biol Chem.* 283:4464-8. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.C700171200>.
- Hollenstein, K., J. Kean, A. Bortolato, R.K. Cheng, A.S. Dore, A. Jazayeri, R.M. Cooke, M. Weir, y F.H. Marshall. 2013. Structure of class B GPCR corticotropin-releasing factor receptor 1. *Nature.* 499:438-43. <http://dx.doi.org/10.1038/nature12357>.
- Holmes, K.D., A.V. Babwah, L.B. Dale, M.O. Poulter, y S.S. Ferguson. 2006. Differential regulation of corticotropin releasing factor 1alpha receptor endocytosis and trafficking by beta-arrestins and Rab GTPases. *J Neurochem.* 96:934-49. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03603.x>.
- Holsboer, F. 1983. Prediction of clinical course by dexamethasone suppression test (DST) response in depressed patients - physiological and clinical construct validity of the DST. *Pharmacopsychiatry.* 16:186-91. <http://dx.doi.org/10.1055/s-2007-1019496>.
- Holsboer, F., A. Gerken, U. von Bardeleben, W. Grimm, H. Beyer, O.A. Muller, y G.K. Stalla. 1986. Human corticotropin-releasing hormone in depression--correlation with thyrotropin secretion following thyrotropin-releasing hormone. *Biol Psychiatry.* 21:601-11. <http://dx.doi.org/>.
- Holsboer, F., y M. Ising. 2008. Central CRH system in depression and anxiety--evidence from clinical studies with CRH1 receptor antagonists. *Eur J Pharmacol.* 583:350-7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.12.032>.
- Holsboer, F., y M. Ising. 2010. Stress hormone regulation: biological role and translation into therapy. *Annu Rev Psychol.* 61:81-109, C1-11. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.psych.093008.100321>.
- Holsboer, F., U. Von Bardeleben, A. Gerken, G.K. Stalla, y O.A. Muller. 1984. Blunted corticotropin and normal cortisol response to human corticotropin-releasing factor in depression. *N Engl J Med.* 311:1127. <http://dx.doi.org/10.1056/nejm198410253111718>.
- Hopkins, A.L., y C.R. Groom. 2002. The druggable genome. *Nat Rev Drug Discov.* 1:727-30. <http://dx.doi.org/10.1038/nrd892>.

- Houslay, M.D. 2010. Underpinning compartmentalised cAMP signalling through targeted cAMP breakdown. *Trends Biochem Sci.* 35:91-100. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibs.2009.09.007>.
- Hsu, S.Y., y A.J. Hsueh. 2001. Human stresscopin and stresscopin-related peptide are selective ligands for the type 2 corticotropin-releasing hormone receptor. *Nat Med.* 7:605-11. <http://dx.doi.org/10.1038/87936>.
- Huang, E.J., y L.F. Reichardt. 2003. Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu Rev Biochem.* 72:609-42. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.biochem.72.121801.161629>.
- Inda, C. 2012. Mecanismos moleculares involucrados en los cambios morfológicos inducidos por la hormona CRH en neuronas hipocámpales. Universidad de Buenos Aires.
- Inda, C., P.A. Dos Santos Claro, J.J. Bonfiglio, S.A. Senin, G. Maccarrone, C.W. Turck, y S. Silberstein. 2016. Different cAMP sources are critically involved in G protein-coupled receptor CRHR1 signaling. *J Cell Biol.* 214:181-95. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.201512075>.
- Irannejad, R., J.C. Tomshine, J.R. Tomshine, M. Chevalier, J.P. Mahoney, J. Steyaert, S.G. Rasmussen, R.K. Sunahara, H. El-Samad, B. Huang, y M. von Zastrow. 2013. Conformational biosensors reveal GPCR signalling from endosomes. *Nature.* 495:534-8. <http://dx.doi.org/10.1038/nature12000>.
- Irannejad, R., y M. von Zastrow. 2014. GPCR signaling along the endocytic pathway. *Curr Opin Cell Biol.* 27:109-16. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ceb.2013.10.003>.
- Ivetic, A., y A.J. Ridley. 2004. Ezrin/radixin/moesin proteins and Rho GTPase signalling in leucocytes. *Immunology.* 112:165-76. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2567.2004.01882.x>.
- Ivonnet, P., M. Salathe, y G.E. Conner. 2015. Hydrogen peroxide stimulation of CFTR reveals an Epac-mediated, soluble AC-dependent cAMP amplification pathway common to GPCR signalling. *Br J Pharmacol.* 172:173-84. <http://dx.doi.org/10.1111/bph.12934>.
- Jaiswal, B.S., y M. Conti. 2001. Identification and functional analysis of splice variants of the germ cell soluble adenylyl cyclase. *J Biol Chem.* 276:31698-708. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M011698200>.
- Jaiswal, B.S., y M. Conti. 2003. Calcium regulation of the soluble adenylyl cyclase expressed in mammalian spermatozoa. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:10676-81. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1831008100>.
- Jaworski, J., S. Spangler, D.P. Seeburg, C.C. Hoogenraad, y M. Sheng. 2005. Control of dendritic arborization by the phosphoinositide-3'-kinase-Akt-mammalian target of rapamycin pathway. *J Neurosci.* 25:11300-12. <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2270-05.2005>.
- Jiang, M., y G. Chen. 2006. High Ca²⁺-phosphate transfection efficiency in low-density neuronal cultures. *Nat Protoc.* 1:695-700. <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2006.86>.
- Jin, L., J. Chen, L. Li, C. Li, C. Chen, y S. Li. 2014. CRH suppressed TGFbeta1-induced Epithelial-Mesenchymal Transition via induction of E-cadherin in breast cancer cells. *Cell Signal.* 26:757-65. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellsig.2013.12.017>.
- Joels, M., y T.Z. Baram. 2009. The neuro-symphony of stress. *Nat Rev Neurosci.* 10:459-66. <http://dx.doi.org/10.1038/nrn2632>.
- Kamenetsky, M., S. Middelhaufe, E.M. Bank, L.R. Levin, J. Buck, y C. Steegborn. 2006. Molecular details of cAMP generation in mammalian cells: a tale of two systems. *J Mol Biol.* 362:623-39. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2006.07.045>.
- Kang, Y., X.E. Zhou, X. Gao, Y. He, W. Liu, A. Ishchenko, A. Barty, T.A. White, O. Yefanov, G.W. Han, Q. Xu, P.W. de Waal, J. Ke, M.H. Tan, C. Zhang, A. Moeller, G.M. West, B.D. Pascal, N. Van Eps, L.N. Caro, S.A. Vishnivetskiy, R.J. Lee, K.M. Suino-Powell, X. Gu, K. Pal, J. Ma, X. Zhi, S. Boutet, G.J. Williams, M. Messerschmidt, C. Gati, N.A. Zatsepin, D. Wang, D. James, S. Basu, S. Roy-Chowdhury, C.E. Conrad, J. Coe, H. Liu, S. Lisova, C. Kupitz, I. Grotjohann, R. Fromme, Y. Jiang, M. Tan, H. Yang, J. Li, M. Wang, Z. Zheng, D. Li, N. Howe, Y. Zhao, J. Standfuss, K. Diederichs, Y. Dong, C.S. Potter, B. Carragher, M. Caffrey, H. Jiang, H.N. Chapman, J.C. Spence, P. Fromme, U. Weierstall, O.P. Ernst, V. Katritch, V.V. Gurevich, P.R. Griffin, W.L. Hubbell, R.C. Stevens, V. Cherezov, K. Melcher, y H.E. Xu. 2015. Crystal structure of rhodopsin bound to arrestin by femtosecond X-ray laser. *Nature.* 523:561-7. <http://dx.doi.org/10.1038/nature14656>.
- Kaupp, U.B., y R. Seifert. 2002. Cyclic nucleotide-gated ion channels. *Physiol Rev.* 82:769-824. <http://dx.doi.org/10.1152/physrev.00008.2002>.

- Kawasaki, H., G.M. Springett, N. Mochizuki, S. Toki, M. Nakaya, M. Matsuda, D.E. Housman, y A.M. Graybiel. 1998. A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1. *Science*. 282:2275-9. <http://dx.doi.org/>.
- Kerr, J.N., y W. Denk. 2008. Imaging in vivo: watching the brain in action. *Nat Rev Neurosci*. 9:195-205. <http://dx.doi.org/10.1038/nrn2338>.
- Klarenbeek, J., J. Goedhart, A. van Batenburg, D. Groenewald, y K. Jalink. 2015. Fourth-generation epac-based FRET sensors for cAMP feature exceptional brightness, photostability and dynamic range: characterization of dedicated sensors for FLIM, for ratiometry and with high affinity. *PLoS One*. 10:e0122513. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0122513>.
- Kleinboelting, S., A. Diaz, S. Moniot, J. van den Heuvel, M. Weyand, L.R. Levin, J. Buck, y C. Steegborn. 2014. Crystal structures of human soluble adenylyl cyclase reveal mechanisms of catalysis and of its activation through bicarbonate. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 111:3727-32. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1322778111>.
- Koob, G.F., y F.E. Bloom. 1985. Corticotropin-releasing factor and behavior. *Fed Proc*. 44:259-63. <http://dx.doi.org/>.
- Kornblihtt, A.R., M.M. Flawia, D. de Mendoza, G. Glikin, R. Farias, y H.N. Torres. 1981. Association of triiodothyronine binding activity to soluble adenylate cyclase in testicular preparations. *Mol Cell Biochem*. 36:23-7. <http://dx.doi.org/>.
- Kotowski, S.J., F.W. Hopf, T. Seif, A. Bonci, y M. von Zastrow. 2011. Endocytosis promotes rapid dopaminergic signaling. *Neuron*. 71:278-90. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2011.05.036>.
- Koutmani, Y., P.K. Politis, M. Elkouris, G. Agrogianis, M. Kemerli, E. Patsouris, E. Remboutsika, y K.P. Karalis. 2013. Corticotropin-releasing hormone exerts direct effects on neuronal progenitor cells: implications for neuroprotection. *Mol Psychiatry*. 18:300-7. <http://dx.doi.org/10.1038/mp.2012.198>.
- Kovalovsky, D., D. Refojo, A.C. Liberman, D. Hochbaum, M.P. Pereda, O.A. Coso, G.K. Stalla, F. Holsboer, y E. Arzt. 2002. Activation and induction of NUR77/NURR1 in corticotrophs by CRH/cAMP: involvement of calcium, protein kinase A, and MAPK pathways. *Mol Endocrinol*. 16:1638-51. <http://dx.doi.org/>.
- Kramer, R.H. 1990. Patch cramming: monitoring intracellular messengers in intact cells with membrane patches containing detector ion channels. *Neuron*. 4:335-41. <http://dx.doi.org/>.
- Kumar, S., S. Kostin, J.P. Flacke, H.P. Reusch, y Y. Ladilov. 2009. Soluble adenylyl cyclase controls mitochondria-dependent apoptosis in coronary endothelial cells. *J Biol Chem*. 284:14760-8. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M900925200>.
- Kumari, P., E. Ghosh, y A.K. Shukla. 2015. Emerging Approaches to GPCR Ligand Screening for Drug Discovery. *Trends Mol Med*. 21:687-701. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molmed.2015.09.002>.
- Kuna, R.S., S.B. Girada, S. Asalla, J. Vallentyne, S. Maddika, J.T. Patterson, D.L. Smiley, R.D. DiMarchi, y P. Mitra. 2013. Glucagon-like peptide-1 receptor-mediated endosomal cAMP generation promotes glucose-stimulated insulin secretion in pancreatic beta-cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 305:E161-70. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpendo.00551.2012>.
- Lagerstrom, M.C., y H.B. Schioth. 2008. Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*. 7:339-57. <http://dx.doi.org/10.1038/nrd2518>.
- Landis, C.A., S.B. Masters, A. Spada, A.M. Pace, H.R. Bourne, y L. Vallar. 1989. GTPase inhibiting mutations activate the alpha chain of Gs and stimulate adenylyl cyclase in human pituitary tumours. *Nature*. 340:692-6. <http://dx.doi.org/10.1038/340692a0>.
- Lawrence, M.C., A. Jivan, C. Shao, L. Duan, D. Goad, E. Zaganjor, J. Osborne, K. McGlynn, S. Stippec, S. Earnest, W. Chen, y M.H. Cobb. 2008. The roles of MAPKs in disease. *Cell Res*. 18:436-42. <http://dx.doi.org/10.1038/cr.2008.37>.
- Lefkowitz, R.J., y S.K. Shenoy. 2005. Transduction of receptor signals by beta-arrestins. *Science*. 308:512-7. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1109237>.
- Lein, E.S., M.J. Hawrylycz, N. Ao, M. Ayres, A. Bensinger, A. Bernard, A.F. Boe, M.S. Boguski, K.S. Brockway, E.J. Byrnes, L. Chen, L. Chen, T.M. Chen, M.C. Chin, J. Chong, B.E. Crook, A. Czaplinska, C.N. Dang, S. Datta, N.R. Dee, A.L. Desaki, T. Desta, E. Diep, T.A. Dolbeare, M.J. Donelan, H.W. Dong, J.G. Dougherty, B.J. Duncan, A.J. Ebbert, G. Eichele, L.K. Estin, C. Faber, B.A. Facer, R. Fields, S.R. Fischer, T.P. Fliss, C. Frensley, S.N. Gates, K.J. Glattfelder, K.R. Halverson, M.R. Hart, J.G. Hohmann, M.P. Howell, D.P. Jeung, R.A. Johnson, P.T. Karr, R. Kawal, J.M. Kidney, R.H. Knapik, C.L. Kuan, J.H. Lake,

- A.R. Laramee, K.D. Larsen, C. Lau, T.A. Lemon, A.J. Liang, Y. Liu, L.T. Luong, J. Michaels, J.J. Morgan, R.J. Morgan, M.T. Mortrud, N.F. Mosqueda, L.L. Ng, R. Ng, G.J. Orta, C.C. Overly, T.H. Pak, S.E. Parry, S.D. Pathak, O.C. Pearson, R.B. Puchalski, Z.L. Riley, H.R. Rockett, S.A. Rowland, J.J. Royall, M.J. Ruiz, N.R. Sarno, K. Schaffnit, N.V. Shapovalova, T. Sivasay, C.R. Slaughterbeck, S.C. Smith, K.A. Smith, B.I. Smith, A.J. Sodt, N.N. Stewart, K.R. Stumpf, S.M. Sunkin, M. Sutram, A. Tam, C.D. Teemer, C. Thaller, C.L. Thompson, L.R. Varnam, A. Visel, R.M. Whitlock, P.E. Wahnoutka, C.K. Wolkey, V.Y. Wong, *et al.* 2007. Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. *Nature*. 445:168-76. <http://dx.doi.org/10.1038/nature05453>.
- Li, Y., P. Maher, y D. Schubert. 1998. Phosphatidylcholine-specific phospholipase C regulates glutamate-induced nerve cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95:7748-53. <http://dx.doi.org/>.
- Litvin, T.N., M. Kamenetsky, A. Zarifyan, J. Buck, y L.R. Levin. 2003. Kinetic properties of "soluble" adenylyl cyclase. Synergism between calcium and bicarbonate. *J Biol Chem*. 278:15922-6. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M212475200>.
- Liu, B., G.D. Hammer, M. Rubinstein, M. Mortrud, y M.J. Low. 1992. Identification of DNA elements cooperatively activating proopiomelanocortin gene expression in the pituitary glands of transgenic mice. *Mol Cell Biol*. 12:3978-90. <http://dx.doi.org/>.
- Liu, J., L. Li, y W.Z. Suo. 2009. HT22 hippocampal neuronal cell line possesses functional cholinergic properties. *Life Sci*. 84:267-71. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2008.12.008>.
- Lohse, M.J., y D. Calebiro. 2013. Cell biology: Receptor signals come in waves. *Nature*. 495:457-8. <http://dx.doi.org/10.1038/nature12086>.
- Lonze, B.E., y D.D. Ginty. 2002. Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. *Neuron*. 35:605-23. <http://dx.doi.org/>.
- Luini, A.G., y J. Axelrod. 1985. Inhibitors of the cytochrome P-450 enzymes block the secretagogue-induced release of corticotropin in mouse pituitary tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 82:1012-4. <http://dx.doi.org/>.
- Luo, Y., y D.B. DeFranco. 2006. Opposing roles for ERK1/2 in neuronal oxidative toxicity: distinct mechanisms of ERK1/2 action at early versus late phases of oxidative stress. *J Biol Chem*. 281:16436-42. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M512430200>.
- Lyons, J., C.A. Landis, G. Harsh, L. Vallar, K. Grunewald, H. Feichtinger, Q.Y. Duh, O.H. Clark, E. Kawasaki, H.R. Bourne, y et al. 1990. Two G protein oncogenes in human endocrine tumors. *Science*. 249:655-9. <http://dx.doi.org/>.
- Madisen, L., T.A. Zwingman, S.M. Sunkin, S.W. Oh, H.A. Zariwala, H. Gu, L.L. Ng, R.D. Palmiter, M.J. Hawrylycz, A.R. Jones, E.S. Lein, y H. Zeng. 2010. A robust and high-throughput Cre reporting and characterization system for the whole mouse brain. *Nat Neurosci*. 13:133-40. <http://dx.doi.org/10.1038/nn.2467>.
- Mardones, P., J.F. Medina, y R.P. Elferink. 2008. Activation of cyclic AMP Signaling in Ae2-deficient mouse fibroblasts. *J Biol Chem*. 283:12146-53. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M710590200>.
- Marinissen, M.J., y J.S. Gutkind. 2001. G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. *Trends Pharmacol Sci*. 22:368-76. <http://dx.doi.org/>.
- Martinez, J., A.M. Stessin, A. Campana, J. Hou, E. Nikulina, J. Buck, L.R. Levin, y M.T. Filbin. 2014. Soluble adenylyl cyclase is necessary and sufficient to overcome the block of axonal growth by myelin-associated factors. *J Neurosci*. 34:9281-9. <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1434-14.2014>.
- Mayr, B., y M. Montminy. 2001. Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2:599-609. <http://dx.doi.org/10.1038/35085068>.
- McCluskey, A., J.A. Daniel, G. Hadzic, N. Chau, E.L. Clayton, A. Mariana, A. Whiting, N.N. Gorgani, J. Lloyd, A. Quan, L. Moshkanbaryans, S. Krishnan, S. Perera, M. Chircop, L. von Kleist, A.B. McGeachie, M.T. Howes, R.G. Parton, M. Campbell, J.A. Sakoff, X. Wang, J.Y. Sun, M.J. Robertson, F.M. Deane, T.H. Nguyen, F.A. Meunier, M.A. Cousin, y P.J. Robinson. 2013. Building a better dynasore: the dyngo compounds potently inhibit dynamin and endocytosis. *Traffic*. 14:1272-89. <http://dx.doi.org/10.1111/tra.12119>.
- Melzig, M.F. 1994. Corticotropin releasing factor inhibits proliferation of AtT-20 cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 30A:741-3. <http://dx.doi.org/>.

- Merriam, L.A., C.N. Baran, B.M. Girard, J.C. Hardwick, V. May, y R.L. Parsons. 2013. Pituitary adenylate cyclase 1 receptor internalization and endosomal signaling mediate the pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-induced increase in guinea pig cardiac neuron excitability. *J Neurosci.* 33:4614-22. <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4999-12.2013>.
- Metzger, M.W., S.M. Walsler, F. Aprile-Garcia, N. Dedic, A. Chen, F. Holsboer, E. Arzt, W. Wurst, y J.M. Deussing. 2016. Genetically dissecting P2rx7 expression within the central nervous system using conditional humanized mice. *Purinergic Signal*10.1007/s11302-016-9546-z.
- Mittag, T.W., W.B. Guo, y K. Kobayashi. 1993. Bicarbonate-activated adenylyl cyclase in fluid-transporting tissues. *Am J Physiol.* 264:F1060-4. <http://dx.doi.org/>.
- Miyawaki, A., J. Llopis, R. Heim, J.M. McCaffery, J.A. Adams, M. Ikura, y R.Y. Tsien. 1997. Fluorescent indicators for Ca²⁺ based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature.* 388:882-7. <http://dx.doi.org/10.1038/42264>.
- Montminy, M.R., y L.M. Bilezikjian. 1987. Binding of a nuclear protein to the cyclic-AMP response element of the somatostatin gene. *Nature.* 328:175-8. <http://dx.doi.org/10.1038/328175a0>.
- Montminy, M.R., K.A. Sevarino, J.A. Wagner, G. Mandel, y R.H. Goodman. 1986. Identification of a cyclic-AMP-responsive element within the rat somatostatin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83:6682-6. <http://dx.doi.org/>.
- Moore, C.A., S.K. Milano, y J.L. Benovic. 2007. Regulation of receptor trafficking by GRKs and arrestins. *Annu Rev Physiol.* 69:451-82. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.physiol.69.022405.154712>.
- Moore, S.W., K. Lai Wing Sun, F. Xie, P.A. Barker, M. Conti, y T.E. Kennedy. 2008. Soluble adenylyl cyclase is not required for axon guidance to netrin-1. *J Neurosci.* 28:3920-4. <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0547-08.2008>.
- Mullershausen, F., F. Zecri, C. Cetin, A. Billich, D. Guerini, y K. Seuwen. 2009. Persistent signaling induced by FTY720-phosphate is mediated by internalized S1P1 receptors. *Nat Chem Biol.* 5:428-34. <http://dx.doi.org/10.1038/nchembio.173>.
- Murad, F., Y.M. Chi, T.W. Rall, y E.W. Sutherland. 1962. Adenyl cyclase. III. The effect of catecholamines and choline esters on the formation of adenosine 3',5'-phosphate by preparations from cardiac muscle and liver. *J Biol Chem.* 237:1233-8. <http://dx.doi.org/>.
- Nagappan, G., y B. Lu. 2005. Activity-dependent modulation of the BDNF receptor TrkB: mechanisms and implications. *Trends Neurosci.* 28:464-71. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tins.2005.07.003>.
- Nemeroff, C.B., E. Widerlov, G. Bissette, H. Walleus, I. Karlsson, K. Eklund, C.D. Kilts, P.T. Loosen, y W. Vale. 1984. Elevated concentrations of CSF corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in depressed patients. *Science.* 226:1342-4. <http://dx.doi.org/>.
- Ni, Q., A. Ganesan, N.N. Aye-Han, X. Gao, M.D. Allen, A. Levchenko, y J. Zhang. 2011. Signaling diversity of PKA achieved via a Ca²⁺-cAMP-PKA oscillatory circuit. *Nat Chem Biol.* 7:34-40. <http://dx.doi.org/10.1038/nchembio.478>.
- Norum, J.H., K. Hart, y F.O. Levy. 2003. Ras-dependent ERK activation by the human G(s)-coupled serotonin receptors 5-HT₄(b) and 5-HT₇(a). *J Biol Chem.* 278:3098-104. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M206237200>.
- Norum, J.H., T. Methi, R.R. Mattingly, y F.O. Levy. 2005. Endogenous expression and protein kinase A-dependent phosphorylation of the guanine nucleotide exchange factor Ras-GRF1 in human embryonic kidney 293 cells. *FEBS J.* 272:2304-16. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.04658.x>.
- Oakley, R.H., S.A. Laporte, J.A. Holt, L.S. Barak, y M.G. Caron. 1999. Association of beta-arrestin with G protein-coupled receptors during clathrin-mediated endocytosis dictates the profile of receptor resensitization. *J Biol Chem.* 274:32248-57. <http://dx.doi.org/>.
- Oakley, R.H., S.A. Laporte, J.A. Holt, M.G. Caron, y L.S. Barak. 2000. Differential affinities of visual arrestin, beta arrestin1, and beta arrestin2 for G protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors. *J Biol Chem.* 275:17201-10. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M910348199>.
- Obara, Y., K. Labudda, T.J. Dillon, y P.J. Stork. 2004. PKA phosphorylation of Src mediates Rap1 activation in NGF and cAMP signaling in PC12 cells. *J Cell Sci.* 117:6085-94. <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.01527>.
- Onodera, Y., J.M. Nam, y M.J. Bissell. 2014. Increased sugar uptake promotes oncogenesis via EPAC/RAP1 and O-GlcNAc pathways. *J Clin Invest.* 124:367-84. <http://dx.doi.org/10.1172/JCI63146>.

- Pastor-Soler, N., V. Beaulieu, T.N. Litvin, N. Da Silva, Y. Chen, D. Brown, J. Buck, L.R. Levin, y S. Breton. 2003. Bicarbonate-regulated adenylyl cyclase (sAC) is a sensor that regulates pH-dependent V-ATPase recycling. *J Biol Chem.* 278:49523-9. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M309543200>.
- Patterson, S.L., C. Pittenger, A. Morozov, K.C. Martin, H. Scanlin, C. Drake, y E.R. Kandel. 2001. Some forms of cAMP-mediated long-lasting potentiation are associated with release of BDNF and nuclear translocation of phospho-MAP kinase. *Neuron.* 32:123-40. <http://dx.doi.org/>.
- Pavlos, N.J., y P.A. Friedman. 2016. GPCR Signaling and Trafficking: The Long and Short of It. *Trends Endocrinol Metab*10.1016/j.tem.2016.10.007.
- Pearson, G., F. Robinson, T. Beers Gibson, B.E. Xu, M. Karandikar, K. Berman, y M.H. Cobb. 2001. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev.* 22:153-83. <http://dx.doi.org/10.1210/edrv.22.2.0428>.
- Peeters, P.J., H.W. Gohlmann, I. Van den Wyngaert, S.M. Swagemakers, L. Bijmens, S.U. Kass, y T. Steckler. 2004. Transcriptional response to corticotropin-releasing factor in AtT-20 cells. *Mol Pharmacol.* 66:1083-92. <http://dx.doi.org/10.1124/mol.104.000950>.
- Petersen, O.H., M. Michalak, y A. Verkhratsky. 2005. Calcium signalling: past, present and future. *Cell Calcium.* 38:161-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ceca.2005.06.023>.
- Pioszak, A.A., N.R. Parker, K. Suino-Powell, y H.E. Xu. 2008. Molecular recognition of corticotropin-releasing factor by its G-protein-coupled receptor CRFR1. *J Biol Chem.* 283:32900-12. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M805749200>.
- Potter, E., D.P. Behan, W.H. Fischer, E.A. Linton, P.J. Lowry, y W.W. Vale. 1991. Cloning and characterization of the cDNAs for human and rat corticotropin releasing factor-binding proteins. *Nature.* 349:423-6. <http://dx.doi.org/10.1038/349423a0>.
- Pozzoli, G., M.L. De Simone, E. Cantalupo, C. Cenciarelli, L. Lisi, A. Boninsegna, C. Dello Russo, A. Sgambato, y P. Navarra. 2015. The activation of type 1 corticotropin releasing factor receptor (CRF-R1) inhibits proliferation and promotes differentiation of neuroblastoma cells in vitro via p27(Kip1) protein up-regulation and c-Myc mRNA down-regulation. *Mol Cell Endocrinol.* 412:205-15. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2015.05.004>.
- Quilliam, L.A., J.F. Rebhun, y A.F. Castro. 2002. A growing family of guanine nucleotide exchange factors is responsible for activation of Ras-family GTPases. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 71:391-444. <http://dx.doi.org/>.
- Rajagopal, S., K. Rajagopal, y R.J. Lefkowitz. 2010. Teaching old receptors new tricks: biasing seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Drug Discov.* 9:373-86. <http://dx.doi.org/10.1038/nrd3024>.
- Ramos, L.S., J.H. Zippin, M. Kamenetsky, J. Buck, y L.R. Levin. 2008. Glucose and GLP-1 stimulate cAMP production via distinct adenylyl cyclases in INS-1E insulinoma cells. *J Gen Physiol.* 132:329-38. <http://dx.doi.org/10.1085/jgp.200810044>.
- Rasmussen, S.G., H.J. Choi, D.M. Rosenbaum, T.S. Kobilka, F.S. Thian, P.C. Edwards, M. Burghammer, V.R. Ratnala, R. Sanishvili, R.F. Fischetti, G.F. Schertler, W.I. Weis, y B.K. Kobilka. 2007. Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature.* 450:383-7. <http://dx.doi.org/10.1038/nature06325>.
- Rasmussen, S.G., B.T. DeVree, Y. Zou, A.C. Kruse, K.Y. Chung, T.S. Kobilka, F.S. Thian, P.S. Chae, E. Pardon, D. Calinski, J.M. Mathiesen, S.T. Shah, J.A. Lyons, M. Caffrey, S.H. Gellman, J. Steyaert, G. Skinotits, W.I. Weis, R.K. Sunahara, y B.K. Kobilka. 2011. Crystal structure of the beta2 adrenergic receptor-Gs protein complex. *Nature.* 477:549-55. <http://dx.doi.org/10.1038/nature10361>.
- Refojo, D., C. Echenique, M.B. Muller, J.M. Reul, J.M. Deussing, W. Wurst, I. Sillaber, M. Paez-Pereda, F. Holsboer, y E. Arzt. 2005. Corticotropin-releasing hormone activates ERK1/2 MAPK in specific brain areas. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:6183-8. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0502070102>.
- Refojo, D., M. Schweizer, C. Kuehne, S. Ehrenberg, C. Thoeringer, A.M. Vogl, N. Dedic, M. Schumacher, G. von Wolff, C. Avrabos, C. Touma, D. Engblom, G. Schutz, K.A. Nave, M. Eder, C.T. Wotjak, I. Sillaber, F. Holsboer, W. Wurst, y J.M. Deussing. 2011. Glutamatergic and dopaminergic neurons mediate anxiogenic and anxiolytic effects of CRHR1. *Science.* 333:1903-7. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1202107>.
- Rehmann, H. 2013. Epac-inhibitors: facts and artefacts. *Sci Rep.* 3:3032. <http://dx.doi.org/10.1038/srep03032>.

- Reiter, E., S. Ahn, A.K. Shukla, y R.J. Lefkowitz. 2012. Molecular mechanism of beta-arrestin-biased agonism at seven-transmembrane receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 52:179-97. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.010909.105800>.
- Reyes, B.A., D.A. Bangasser, R.J. Valentino, y E.J. Van Bockstaele. 2014. Using high resolution imaging to determine trafficking of corticotropin-releasing factor receptors in noradrenergic neurons of the rat locus coeruleus. *Life Sci.* 112:2-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2014.07.017>.
- Reyes, B.A., R.J. Valentino, y E.J. Van Bockstaele. 2008. Stress-induced intracellular trafficking of corticotropin-releasing factor receptors in rat locus coeruleus neurons. *Endocrinology.* 149:122-30. <http://dx.doi.org/10.1210/en.2007-0705>.
- Rich, T.C., K.A. Fagan, H. Nakata, J. Schaack, D.M. Cooper, y J.W. Karpen. 2000. Cyclic nucleotide-gated channels colocalize with adenylyl cyclase in regions of restricted cAMP diffusion. *J Gen Physiol.* 116:147-61. <http://dx.doi.org/>.
- Roisen, F.J., R.A. Murphy, M.E. Pichichero, y W.G. Braden. 1972. Cyclic adenosine monophosphate stimulation of axonal elongation. *Science.* 175:73-4. <http://dx.doi.org/>.
- Rosenbaum, D.M., S.G. Rasmussen, y B.K. Kobilka. 2009. The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature.* 459:356-63. <http://dx.doi.org/10.1038/nature08144>.
- Rubinfeld, H., y R. Seger. 2005. The ERK cascade: a prototype of MAPK signaling. *Mol Biotechnol.* 31:151-74. <http://dx.doi.org/10.1385/MB:31:2:151>.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, y T.M.C.A.L.M.C.S.H.L.P. Maniatis, NY, Vol. 1, 2, 3 (1989). 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*.
- Sample, V., L.M. DiPilato, J.H. Yang, Q. Ni, J.J. Saucerman, y J. Zhang. 2012. Regulation of nuclear PKA revealed by spatiotemporal manipulation of cyclic AMP. *Nat Chem Biol.* 8:375-82. <http://dx.doi.org/10.1038/nchembio.799>.
- Samuels, I.S., S.C. Saitta, y G.E. Landreth. 2009. MAP'ing CNS development and cognition: an ERKsome process. *Neuron.* 61:160-7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2009.01.001>.
- Sassone-Corsi, P. 1995. Transcription factors responsive to cAMP. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 11:355-77. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.cb.11.110195.002035>.
- Schmitt, J.M., y P.J. Stork. 2002. PKA phosphorylation of Src mediates cAMP's inhibition of cell growth via Rap1. *Mol Cell.* 9:85-94. <http://dx.doi.org/>.
- Schwamborn, J.C., y A.W. Puschel. 2004. The sequential activity of the GTPases Rap1B and Cdc42 determines neuronal polarity. *Nat Neurosci.* 7:923-9. <http://dx.doi.org/10.1038/nn1295>.
- Sexton, P.M., y D. Wootten. 2013. Structural biology: meet the B family. *Nature.* 499:417-8. <http://dx.doi.org/10.1038/nature12413>.
- Shenoy, S.K., M.T. Drake, C.D. Nelson, D.A. Houtz, K. Xiao, S. Madabushi, E. Reiter, R.T. Premont, O. Lichtarge, y R.J. Lefkowitz. 2006. beta-arrestin-dependent, G protein-independent ERK1/2 activation by the beta2 adrenergic receptor. *J Biol Chem.* 281:1261-73. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M506576200>.
- Shewan, D., A. Dwivedy, R. Anderson, y C.E. Holt. 2002. Age-related changes underlie switch in netrin-1 responsiveness as growth cones advance along visual pathway. *Nat Neurosci.* 5:955-62. <http://dx.doi.org/10.1038/nn919>.
- Shi, S.H., L.Y. Jan, y Y.N. Jan. 2003. Hippocampal neuronal polarity specified by spatially localized mPar3/mPar6 and PI 3-kinase activity. *Cell.* 112:63-75. <http://dx.doi.org/>.
- Shukla, A.K., G.H. Westfield, K. Xiao, R.I. Reis, L.Y. Huang, P. Tripathi-Shukla, J. Qian, S. Li, A. Blanc, A.N. Oleskie, A.M. Dosey, M. Su, C.R. Liang, L.L. Gu, J.M. Shan, X. Chen, R. Hanna, M. Choi, X.J. Yao, B.U. Klink, A.W. Kahsai, S.S. Sidhu, S. Koide, P.A. Penczek, A.A. Kossiakoff, V.L. Woods, Jr., B.K. Kobilka, G. Skiniotis, y R.J. Lefkowitz. 2014. Visualization of arrestin recruitment by a G-protein-coupled receptor. *Nature.* 512:218-22. <http://dx.doi.org/10.1038/nature13430>.
- Sigismund, S., S. Confalonieri, A. Ciliberto, S. Polo, G. Scita, y P.P. Di Fiore. 2012. Endocytosis and signaling: cell logistics shape the eukaryotic cell plan. *Physiol Rev.* 92:273-366. <http://dx.doi.org/10.1152/physrev.00005.2011>.

- Silberstein, S., A.M. Vogl, D. Refojo, S.A. Senin, W. Wurst, F. Holsboer, J.M. Deussing, y E. Arzt. 2009. Amygdaloid pERK1/2 in corticotropin-releasing hormone overexpressing mice under basal and acute stress conditions. *Neuroscience*. 159:610-7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.01.014>.
- Sinclair, M.L., X.Y. Wang, M. Mattia, M. Conti, J. Buck, D.J. Wolgemuth, y L.R. Levin. 2000. Specific expression of soluble adenylyl cyclase in male germ cells. *Mol Reprod Dev*. 56:6-11. [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(200005\)56:1%3C6::AID-MRD2%3E3.0.CO;2-M](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(200005)56:1%3C6::AID-MRD2%3E3.0.CO;2-M).
- Siu, F.Y., M. He, C. de Graaf, G.W. Han, D. Yang, Z. Zhang, C. Zhou, Q. Xu, D. Wacker, J.S. Joseph, W. Liu, J. Lau, V. Cherezov, V. Katritch, M.W. Wang, y R.C. Stevens. 2013. Structure of the human glucagon class B G-protein-coupled receptor. *Nature*. 499:444-9. <http://dx.doi.org/10.1038/nature12393>.
- Slessareva, J.E., S.M. Routt, B. Temple, V.A. Bankaitis, y H.G. Dohlman. 2006. Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase Vps34 by a G protein alpha subunit at the endosome. *Cell*. 126:191-203. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2006.04.045>.
- Slominski, A., B. Zbytek, M. Zmijewski, R.M. Slominski, S. Kauser, J. Wortsman, y D.J. Tobin. 2006. Corticotropin releasing hormone and the skin. *Front Biosci*. 11:2230-48. <http://dx.doi.org/>.
- Songyang, Z., K.P. Lu, Y.T. Kwon, L.H. Tsai, O. Filhol, C. Cochet, D.A. Brickey, T.R. Soderling, C. Bartleson, D.J. Graves, A.J. DeMaggio, M.F. Hoekstra, J. Blenis, T. Hunter, y L.C. Cantley. 1996. A structural basis for substrate specificities of protein Ser/Thr kinases: primary sequence preference of casein kinases I and II, NIMA, phosphorylase kinase, calmodulin-dependent kinase II, CDK5, and Erk1. *Mol Cell Biol*. 16:6486-93. <http://dx.doi.org/>.
- Spiess, J., J. Rivier, C. Rivier, y W. Vale. 1981. Primary structure of corticotropin-releasing factor from ovine hypothalamus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 78:6517-21. <http://dx.doi.org/>.
- Steegborn, C., T.N. Litvin, L.R. Levin, J. Buck, y H. Wu. 2005. Bicarbonate activation of adenylyl cyclase via promotion of catalytic active site closure and metal recruitment. *Nat Struct Mol Biol*. 12:32-7. <http://dx.doi.org/10.1038/nsmb880>.
- Steiner, A.L., C.W. Parker, y D.M. Kipnis. 1970. The measurement of cyclic nucleotides by radioimmunoassay. *Adv Biochem Psychopharmacol*. 3:89-111. <http://dx.doi.org/>.
- Stern, C.M., J. Meitzen, y P.G. Mermelstein. 2011. Corticotropin-releasing factor and urocortin I activate CREB through functionally selective Gbetagamma signaling in hippocampal pyramidal neurons. *Eur J Neurosci*. 34:671-81. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1460-9568.2011.07812.x>.
- Stessin, A.M., J.H. Zippin, M. Kamenetsky, K.C. Hess, J. Buck, y L.R. Levin. 2006. Soluble adenylyl cyclase mediates nerve growth factor-induced activation of Rap1. *J Biol Chem*. 281:17253-8. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M603500200>.
- Stiles, T.L., M.S. Kapiloff, y J.L. Goldberg. 2014. The role of soluble adenylyl cyclase in neurite outgrowth. *Biochim Biophys Acta*. 1842:2561-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.07.012>.
- Stork, P.J., y J.M. Schmitt. 2002. Crosstalk between cAMP and MAP kinase signaling in the regulation of cell proliferation. *Trends Cell Biol*. 12:258-66. <http://dx.doi.org/>.
- Stuhr, L.E., E.T. Wei, y R.K. Reed. 2014. Corticotropin-releasing factor reduces tumor volume, halts further growth, and enhances the effect of chemotherapy in 4T1 mammary carcinoma in mice. *Tumour Biol*. 35:1365-70. <http://dx.doi.org/10.1007/s13277-013-1186-0>.
- Sutherland, E.W., I. Oye, y R.W. Butcher. 1965. The Action of Epinephrine and the Role of the Adenyl Cyclase System in Hormone Action. *Recent Prog Horm Res*. 21:623-46. <http://dx.doi.org/>.
- Sutherland, E.W., y T.W. Rall. 1958. Fractionation and characterization of a cyclic adenine ribonucleotide formed by tissue particles. *J Biol Chem*. 232:1077-91. <http://dx.doi.org/>.
- Sutherland, E.W., T.W. Rall, y T. Menon. 1962. Adenyl cyclase. I. Distribution, preparation, and properties. *J Biol Chem*. 237:1220-7. <http://dx.doi.org/>.
- Sutherland, E.W., y G.A. Robison. 1966. The role of cyclic-3',5'-AMP in responses to catecholamines and other hormones. *Pharmacol Rev*. 18:145-61. <http://dx.doi.org/>.
- Sutton, R.E., G.F. Koob, M. Le Moal, J. Rivier, y W. Vale. 1982. Corticotropin releasing factor produces behavioural activation in rats. *Nature*. 297:331-3. <http://dx.doi.org/>.

- Swinny, J.D., F. Metzger, I.J.-P. J, N.V. Gounko, A. Gramsbergen, y J.J. van der Want. 2004. Corticotropin-releasing factor and urocortin differentially modulate rat Purkinje cell dendritic outgrowth and differentiation in vitro. *Eur J Neurosci.* 19:1749-58. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1460-9568.2004.03279.x>.
- Swinny, J.D., y R.J. Valentino. 2006. Corticotropin-releasing factor promotes growth of brain norepinephrine neuronal processes through Rho GTPase regulators of the actin cytoskeleton in rat. *Eur J Neurosci.* 24:2481-90. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.05129.x>.
- Szczepek, M., F. Beyriere, K.P. Hofmann, M. Elgeti, R. Kazmin, A. Rose, F.J. Bartl, D. von Stetten, M. Heck, M.E. Sommer, P.W. Hildebrand, y P. Scheerer. 2014. Crystal structure of a common GPCR-binding interface for G protein and arrestin. *Nat Commun.* 5:4801. <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms5801>.
- Tadross, M.R., I.E. Dick, y D.T. Yue. 2008. Mechanism of local and global Ca²⁺ sensing by calmodulin in complex with a Ca²⁺ channel. *Cell.* 133:1228-40. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2008.05.025>.
- Tang, T., N.C. Lai, H.K. Hammond, D.M. Roth, Y. Yang, T. Guo, y M.H. Gao. 2010. Adenylyl cyclase 6 deletion reduces left ventricular hypertrophy, dilation, dysfunction, and fibrosis in pressure-overloaded female mice. *J Am Coll Cardiol.* 55:1476-86. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jacc.2009.11.066>.
- Tartaglia, M., y B.D. Gelb. 2010. Disorders of dysregulated signal traffic through the RAS-MAPK pathway: phenotypic spectrum and molecular mechanisms. *Ann N Y Acad Sci.* 1214:99-121. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05790.x>.
- Teli, T., D. Markovic, M.A. Levine, E.W. Hillhouse, y D.K. Grammatopoulos. 2005. Regulation of corticotropin-releasing hormone receptor type 1alpha signaling: structural determinants for G protein-coupled receptor kinase-mediated phosphorylation and agonist-mediated desensitization. *Mol Endocrinol.* 19:474-90. <http://dx.doi.org/10.1210/me.2004-0275>.
- Terrillon, S., y M. Bouvier. 2004. Receptor activity-independent recruitment of betaarrestin2 reveals specific signalling modes. *EMBO J.* 23:3950-61. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.emboj.7600387>.
- Thomas, G.M., y R.L. Huganir. 2004. MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci.* 5:173-83. <http://dx.doi.org/10.1038/nrn1346>.
- Thomsen, A.R., B. Plouffe, T.J. Cahill, 3rd, A.K. Shukla, J.T. Tarrasch, A.M. Dosey, A.W. Kahsai, R.T. Strachan, B. Pani, J.P. Mahoney, L. Huang, B. Breton, F.M. Heydenreich, R.K. Sunahara, G. Skiniotis, M. Bouvier, y R.J. Lefkowitz. 2016. GPCR-G Protein-beta-Arrestin Super-Complex Mediates Sustained G Protein Signaling. *Cell.* 166:907-19. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2016.07.004>.
- Tohgo, A., K.L. Pierce, E.W. Choy, R.J. Lefkowitz, y L.M. Luttrell. 2002. beta-Arrestin scaffolding of the ERK cascade enhances cytosolic ERK activity but inhibits ERK-mediated transcription following angiotensin AT1a receptor stimulation. *J Biol Chem.* 277:9429-36. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M106457200>.
- Tojima, T., J.H. Hines, J.R. Henley, y H. Kamiguchi. 2011. Second messengers and membrane trafficking direct and organize growth cone steering. *Nat Rev Neurosci.* 12:191-203. <http://dx.doi.org/10.1038/nrn2996>.
- Tresguerres, M., L.R. Levin, y J. Buck. 2011. Intracellular cAMP signaling by soluble adenylyl cyclase. *Kidney Int.* 79:1277-88. <http://dx.doi.org/10.1038/ki.2011.95>.
- Tsien, R.Y., T. Pozzan, y T.J. Rink. 1982. Calcium homeostasis in intact lymphocytes: cytoplasmic free calcium monitored with a new, intracellularly trapped fluorescent indicator. *J Cell Biol.* 94:325-34. <http://dx.doi.org/>.
- Tsvetanova, N.G., y M. von Zastrow. 2014. Spatial encoding of cyclic AMP signaling specificity by GPCR endocytosis. *Nat Chem Biol.* 10:1061-5. <http://dx.doi.org/10.1038/nchembio.1665>.
- Tzivion, G., Z. Luo, y J. Avruch. 1998. A dimeric 14-3-3 protein is an essential cofactor for Raf kinase activity. *Nature.* 394:88-92. <http://dx.doi.org/10.1038/27938>.
- Valentino, R.J., S.L. Foote, y M.E. Page. 1993. The locus coeruleus as a site for integrating corticotropin-releasing factor and noradrenergic mediation of stress responses. *Ann N Y Acad Sci.* 697:173-88. <http://dx.doi.org/>.
- Van Kolen, K., F.M. Dautzenberg, K. Verstraeten, I. Royaux, R. De Hoogt, E. Gutknecht, y P.J. Peeters. 2010. Corticotropin releasing factor-induced ERK phosphorylation in AtT20 cells occurs via a cAMP-dependent mechanism requiring EPAC2. *Neuropharmacology.* 58:135-44. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2009.06.022>.
- Vaudry, D., P.J. Stork, P. Lazarovici, y L.E. Eiden. 2002. Signaling pathways for PC12 cell differentiation: making the right connections. *Science.* 296:1648-9. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1071552>.

- Vaughan, J., C. Donaldson, J. Bittencourt, M.H. Perrin, K. Lewis, S. Sutton, R. Chan, A.V. Turnbull, D. Lovejoy, C. Rivier, y et al. 1995. Urocortin, a mammalian neuropeptide related to fish urotensin I and to corticotropin-releasing factor. *Nature*. 378:287-92. <http://dx.doi.org/10.1038/378287a0>.
- Vilardaga, J.P., F.G. Jean-Alphonse, y T.J. Gardella. 2014. Endosomal generation of cAMP in GPCR signaling. *Nat Chem Biol*. 10:700-6. <http://dx.doi.org/10.1038/nchembio.1611>.
- Vogt Weisenhorn, D.M., L.J. Roback, J.H. Kwon, y B.H. Wainer. 2001. Coupling of cAMP/PKA and MAPK signaling in neuronal cells is dependent on developmental stage. *Exp Neurol*. 169:44-55. <http://dx.doi.org/10.1006/exnr.2001.7651>.
- von Zastrow, M., y B.K. Kobilka. 1992. Ligand-regulated internalization and recycling of human beta 2-adrenergic receptors between the plasma membrane and endosomes containing transferrin receptors. *J Biol Chem*. 267:3530-8. <http://dx.doi.org/>.
- Vossler, M.R., H. Yao, R.D. York, M.G. Pan, C.S. Rim, y P.J. Stork. 1997. cAMP activates MAP kinase and Elk-1 through a B-Raf- and Rap1-dependent pathway. *Cell*. 89:73-82. <http://dx.doi.org/>.
- Wachten, S., N. Masada, L.J. Ayling, A. Ciruela, V.O. Nikolaev, M.J. Lohse, y D.M. Cooper. 2010. Distinct pools of cAMP centre on different isoforms of adenylyl cyclase in pituitary-derived GH3B6 cells. *J Cell Sci*. 123:95-106. <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.058594>.
- Walsh, D.A., J.P. Perkins, y E.G. Krebs. 1968. An adenosine 3',5'-monophosphate-dependant protein kinase from rabbit skeletal muscle. *J Biol Chem*. 243:3763-5. <http://dx.doi.org/>.
- Wan, Y., y X.Y. Huang. 1998. Analysis of the Gs/mitogen-activated protein kinase pathway in mutant S49 cells. *J Biol Chem*. 273:14533-7. <http://dx.doi.org/>.
- Wang, Z., T.J. Dillon, V. Pokala, S. Mishra, K. Labudda, B. Hunter, y P.J. Stork. 2006. Rap1-mediated activation of extracellular signal-regulated kinases by cyclic AMP is dependent on the mode of Rap1 activation. *Mol Cell Biol*. 26:2130-45. <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.26.6.2130-2145.2006>.
- Watson, R.L., J. Buck, L.R. Levin, R.C. Winger, J. Wang, H. Arase, y W.A. Muller. 2015. Endothelial CD99 signals through soluble adenylyl cyclase and PKA to regulate leukocyte transendothelial migration. *J Exp Med*. 212:1021-41. <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20150354>.
- Wehbi, V.L., H.P. Stevenson, T.N. Feinstein, G. Calero, G. Romero, y J.P. Vilardaga. 2013. Noncanonical GPCR signaling arising from a PTH receptor-arrestin-Gbetagamma complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 110:1530-5. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1205756110>.
- Wertheimer, E., D. Krapf, J.L. de la Vega-Beltran, C. Sanchez-Cardenas, F. Navarrete, D. Haddad, J. Escoffier, A.M. Salicioni, L.R. Levin, J. Buck, J. Mager, A. Darszon, y P.E. Visconti. 2013. Compartmentalization of distinct cAMP signaling pathways in mammalian sperm. *J Biol Chem*. 288:35307-20. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M113.489476>.
- Werthmann, R.C., S. Volpe, M.J. Lohse, y D. Calebiro. 2012. Persistent cAMP signaling by internalized TSH receptors occurs in thyroid but not in HEK293 cells. *FASEB J*. 26:2043-8. <http://dx.doi.org/10.1096/fj.11-195248>.
- Wicks, W.D. 1969. Induction of hepatic enzymes by adenosine 3',5'-monophosphate in organ culture. *J Biol Chem*. 244:3941-50. <http://dx.doi.org/>.
- Willoughby, D., y D.M. Cooper. 2007. Organization and Ca²⁺ regulation of adenylyl cyclases in cAMP microdomains. *Physiol Rev*. 87:965-1010. <http://dx.doi.org/10.1152/physrev.00049.2006>.
- Willoughby, D., y D.M. Cooper. 2008. Live-cell imaging of cAMP dynamics. *Nat Methods*. 5:29-36. <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth1135>.
- Willoughby, D., M.L. Halls, K.L. Everett, A. Ciruela, P. Skroblin, E. Klussmann, y D.M. Cooper. 2012. A key phosphorylation site in AC8 mediates regulation of Ca(2+)-dependent cAMP dynamics by an AC8-AKAP79-PKA signalling complex. *J Cell Sci*. 125:5850-9. <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.111427>.
- Wootten, D., L.J. Miller, C. Koole, A. Christopoulos, y P.M. Sexton. 2017. Allosteric and Biased Agonism at Class B G Protein-Coupled Receptors. *Chem Rev*. 117:111-138. <http://dx.doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00049>.
- Wu, J., A.S. Abdelfattah, L.S. Miraucourt, E. Kutsarova, A. Ruangkittisakul, H. Zhou, K. Ballanyi, G. Wicks, M. Drobizhev, A. Rebane, E.S. Ruthazer, y R.E. Campbell. 2014. A long Stokes shift red fluorescent Ca²⁺-indicator protein for two-photon and ratiometric imaging. *Nat Commun*. 5:5262. <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms6262>.

- Wu, J., P. Dent, T. Jelinek, A. Wolfman, M.J. Weber, y T.W. Sturgill. 1993. Inhibition of the EGF-activated MAP kinase signaling pathway by adenosine 3',5'-monophosphate. *Science*. 262:1065-9. <http://dx.doi.org/>.
- Wu, K.Y., J.H. Zippin, D.R. Huron, M. Kamenetsky, U. Hengst, J. Buck, L.R. Levin, y S.R. Jaffrey. 2006. Soluble adenylyl cyclase is required for netrin-1 signaling in nerve growth cones. *Nat Neurosci*. 9:1257-64. <http://dx.doi.org/10.1038/nn1767>.
- Xie, F., M.A. Garcia, A.E. Carlson, S.M. Schuh, D.F. Babcock, B.S. Jaiswal, J.A. Gossen, G. Esposito, M. van Duin, y M. Conti. 2006. Soluble adenylyl cyclase (sAC) is indispensable for sperm function and fertilization. *Dev Biol*. 296:353-62. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.05.038>.
- Yang, S., W. Liu, J. Wen, M. Zhu, y S. Xu. 2013. Corticotropin releasing hormone is correlated with tumorigenesis of gastric cancer. *Cancer Invest*. 31:167-71. <http://dx.doi.org/10.3109/07357907.2013.771269>.
- Yin, J.C., J.S. Wallach, M. Del Vecchio, E.L. Wilder, H. Zhou, W.G. Quinn, y T. Tully. 1994. Induction of a dominant negative CREB transgene specifically blocks long-term memory in *Drosophila*. *Cell*. 79:49-58. <http://dx.doi.org/>.
- Young, J.J., A. Mehdi, L.L. Stohl, L.R. Levin, J. Buck, J.A. Wagner, y A.M. Stessin. 2008. "Soluble" adenylyl cyclase-generated cyclic adenosine monophosphate promotes fast migration in PC12 cells. *J Neurosci Res*. 86:118-24. <http://dx.doi.org/10.1002/jnr.21458>.
- Zaccolo, M., y T. Pozzan. 2002. Discrete microdomains with high concentration of cAMP in stimulated rat neonatal cardiac myocytes. *Science*. 295:1711-5. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1069982>.
- Zaccolo, M., y T. Pozzan. 2003. cAMP and Ca²⁺ interplay: a matter of oscillation patterns. *Trends Neurosci*. 26:53-5. <http://dx.doi.org/>.
- Zanassi, P., M. Paolillo, A. Feliciello, E.V. Avvedimento, V. Gallo, y S. Schinelli. 2001. cAMP-dependent protein kinase induces cAMP-response element-binding protein phosphorylation via an intracellular calcium release/ERK-dependent pathway in striatal neurons. *J Biol Chem*. 276:11487-95. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M007631200>.
- Zhao, Z., R. Lu, B. Zhang, J. Shen, L. Yang, S. Xiao, J. Liu, y W.Z. Suo. 2012. Differentiation of HT22 neurons induces expression of NMDA receptor that mediates homocysteine cytotoxicity. *Neurol Res*. 34:38-43. <http://dx.doi.org/10.1179/1743132811y.0000000057>.
- Zhu, Y., H. Chen, S. Boulton, F. Mei, N. Ye, G. Melacini, J. Zhou, y X. Cheng. 2015. Biochemical and pharmacological characterizations of ESI-09 based EPAC inhibitors: defining the ESI-09 "therapeutic window". *Sci Rep*. 5:9344. <http://dx.doi.org/10.1038/srep09344>.
- Zippin, J.H., P.A. Chadwick, L.R. Levin, J. Buck, y C.M. Magro. 2010. Soluble adenylyl cyclase defines a nuclear cAMP microdomain in keratinocyte hyperproliferative skin diseases. *J Invest Dermatol*. 130:1279-87. <http://dx.doi.org/10.1038/jid.2009.440>.
- Zippin, J.H., Y. Chen, P. Nahirney, M. Kamenetsky, M.S. Wuttke, D.A. Fischman, L.R. Levin, y J. Buck. 2003. Compartmentalization of bicarbonate-sensitive adenylyl cyclase in distinct signaling microdomains. *FASEB J*. 17:82-4. <http://dx.doi.org/10.1096/fj.02-0598fje>.
- Zippin, J.H., J. Farrell, D. Huron, M. Kamenetsky, K.C. Hess, D.A. Fischman, L.R. Levin, y J. Buck. 2004. Bicarbonate-responsive "soluble" adenylyl cyclase defines a nuclear cAMP microdomain. *J Cell Biol*. 164:527-34. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200311119>.

Anexo

Tabla A | Proteínas identificadas en la co-inmunoprecipitación de sAC₁-HA en células HT22-CRHR1. Se muestra el ID de Uniprot

Proteínas comunes a ambas condiciones
<p>HNRPK, RL22, C1TM, RAB7A, CLH1, HNRPF, UBQL2, PPIA, NUCL, COF1, SYEP, ANXA2, IMB1, TCPA, HS90A, RS13, ADT2, HS90B, DHB4, CH60, ROA3, FUMH, RS14, RS3, GSTA4, FLNB, EIF3E, K1C14, TCPH, RB11A, YBOX1, ENPL, FAS, GBLP, NPM, IGKC, ATPB, PGK1, SPB6, RTN4, ANXA1, UBA1, SPA3K, BTF3, GALK1, MOES, PEBP1, PSMD2, PGAM1, PCNA, MYH10, LDHA, IDHP, 1433Z, PA2G4, GRP78, EIF3A, EF1G, RL31, TRFE, EF1A1, RL7A, VDAC1, ALDOA, ANXA5, PHB, STRAP, EWS, GRP75, PSD11, RLA0, CLIC1, SERA, FLNC, PSA1, TALDO, ACTN4, MIC60, QCR2, SF3A1, LEG3, RSSA, KV5A3, TCPD, CH10, EF2, FLNA, GELS, PRDX1, IGHG3, RAB1B, LMNA, 1433G, IQGA1, PDIA3, AATM, RL11, G3P, TBB5, SET, IF1AX, IGG2B, PURB, 1433B, KPYM, FUBP2, ROA2, HNRPU, ATPO, SERPH, RL40, VIME, LEG1, GANAB, NDKB, SFPQ, RS7, ALBU, MTAP, CO1A2, ACTN1, MDHM, PLEC, RS4X, RAB5C, VDAC2, PDIA1, ANXA3, ACADS, MYH9, RS3A, THIL, 1433E, PABP1, HNRPM, PROF1, HSP7C, RAC1, HVM21, FINC, NACA, A2M, KV2A7, EFTU, RL12, ENOA, ML12B, K1C10, ANXA4, A1AT3, IF4A1, VINC, PRDX2, RS9, LRC59, RL23A, TERA, CO3, HSP74, CISY, TCPZ, SERC, HVM51, RS11, PARK7, GNAI2, IGHG1, AK1A1, NEDD4, ACON, SND1, MAP4, EIF3B, PSA4, MYOF, IGHM, EF1D, PHB2, MCM2, MYO1C, IF2A, PCBP1, H4, K2C1, SYVC, ACADL, QCR1</p>
Proteínas sólo identificadas en condiciones basales
<p>PSMD6, THIC, PTH2, RS6, PARP1, SCMC1, VA0D1, HDGF, SAE1, K1C42, SURF4, P5CS, PURA2, RL18A, UGGG1, COPB, PPIC, KAD2, DCPS, HVM36, RPN2, CAPZB, TAGL2, SEPT2, SFXN3, TOM22, DDX46, RL7, CBX3, RL10L, SLK, HEM2, CAZA2, GLU2B, IPYR, TIF1B, NAA50, SFXN1, TEBP, DCAKD, TOM34, RS5, CAPG, ATP5H, K1C15, PSB2, PA24A, RL9, RAB1A, SEC63, ESTD, NSF1C, KV3A3, HEMO, FXR1, RL17, MCM3, SYLC, MPCP, CNN3, ARPC3, RL15, PRS10, TRXR1, UBP2L, P5CR2, KAD1, GDIR1, ACOT9, HCDH, LDHB, ETFA, CAN2, AIMP2, PTBP1, EIF3D, CNBP, IPO5, STIP1, PSME3, OST48, LPPRC, MCM4, XPO1, BAX, RS10, MDHC, CALX, IPO7, RAN, ITB1, SKP1, RAB14, PGM1, VPS35, SDHA, APOA1, NASP, CD81, RAP1A, CRKL, MARE1, LASP1, HYOU1, RS17, ARF3, ARC1B, ARP2, TADBP, LMNB1, H2A1H, CSK21, CAZA1, K2C5, HXK1, COX2, ATPG, VIGLN, AT5F1, NAA15, CSN7A, KV5A6, BZW1, RFC2, OTUB1, UBE2K, PSDE, DDX3X, EIF3F, NEB2, PSMD7, FUS, NCPR, FXR2, PSB5, MY18A, SRPRB, ECHA, NB5R3, 2AAA, TNPO1, SRC8, RL18, TOP2A, RD23B, H12, TPM3, PSA, PSB1, PRS6B, THIM, VPS29, ROA1, OAT, SRSF1, U520, CAPR1, HVM30, TBA1B, GSTP1, PSB4, EIF3C, OPA, PDC6I, MTCH2, HNRH1, NT5C, G3BP1, SCOT1, RAB8A, RAB2A, MCM5, CKAP4, TXNL1, SRSF3, TCEA1, PSA7, ROAA, DNLI1, SNAA, M2OM, XPO2, PSMD1, SPTB2, MCM7, GBB1, ACACA, UBP5, ERP44, FETUA, 1433F, GDIB, ATPA, HSPB8, EPS8, PP1A, CMC1, TMEDA, AP2A2, ITA3, PSA2, DC1I2, CYB5B, C1TC, TPM4, PPID, CDC42, PUR9, EIF3K, IF2B2, PDLI1, AL1L2, RIR1, MLEC, ACTBL, ETFB, TLN1, GCAM, ACTB, IDH3A, KTHY, G6PD1, PDXK, RL5, FPPS, IF4G2, ACLY, VPS25, PLAK, TIM50, PCBP2</p>
Proteínas sólo identificadas en condiciones estimuladas
<p>PSB6, 1433T, AT1A2, H3C, H13, IF4G1, TPIS, K22E, H2B1C, PUF60, RL6, CALR, 6PGD, TCPQ, GCAA, PPIB, K2C6A, RS19, MBB1A, H2A2C, RL8, ACTG, COR1C, RS18, DDX17, TBA1C, F10A1, RS16, TCPG, DNJA1, AT2B1, TXND5, RL27, ALDR, SAHH, OLA1, MATR3, LAP2A, TBB4B, UAP1L, FMR1, KV3A8, NOMO1, RUVB2, EIF3L, RPN1, HS105</p>

Tabla B | Proteínas identificadas en la co-inmunoprecipitación de sAC_T-HA en células HT22-CRHR1 en condición basal

Uniprot ID	Proteína	Peso	Mascot Score	Número de péptidos	Cobertura de secuencia (%)
MYH9_MOUSE	Myosin-9	226.2	4308.5 (M:4308.5)	88	48.1
HS90B_MOUSE	Heat shock protein HSP 90-beta	83.2	3692.6 (M:3692.6)	43	56.5
HS90A_MOUSE	Heat shock protein HSP 90-alpha	84.7	2457.8 (M:2457.8)	34	49.7
FLNA_MOUSE	Filamin-A	281	2166.8 (M:2166.8)	46	29.8
ENPL_MOUSE	Endoplasmin	92.4	2141.9 (M:2141.9)	30	45.8
GRP78_MOUSE	78 kDa glucose-regulated protein	72.4	2113.4 (M:2113.4)	30	54.8
ALBU_MOUSE	Serum albumin	68.6	2051.8 (M:2051.8)	42	66.6
EF2_MOUSE	Elongation factor 2	95.3	1965.2 (M:1965.2)	24	43.5
ANXA2_MOUSE	Annexin A2	38.7	1800.9 (M:1800.9)	28	59.3
VIME_MOUSE	Vimentin	53.7	1759.4 (M:1759.4)	36	78.1
HSP7C_MOUSE	Heat shock cognate 71 kDa protein	70.8	1757.6 (M:1757.6)	33	65.8
FLNC_MOUSE	Filamin-C	290.9	1713.7 (M:1713.7)	37	23.3
ACTB_MOUSE	Actin, cytoplasmic 1	41.7	1713.7 (M:1713.7)	26	66.9
FLNB_MOUSE	Filamin-B	277.7	1705.4 (M:1705.4)	40	28.9
IGHG1_MOUSE	Ig gamma-1 chain C region secreted ...	35.7	1617.9 (M:1617.9)	17	54.6
TERA_MOUSE	Transitional endoplasmic reticulum ...	89.3	1581.2 (M:1581.2)	27	41.8
MYH10_MOUSE	Myosin-10	228.9	1510.8 (M:1510.8)	31	23.7
ANXA1_MOUSE	Annexin A1	38.7	1478.0 (M:1478.0)	22	57.5
ENOA_MOUSE	Alpha-enolase	47.1	1439.5 (M:1439.5)	24	67.5
MDHM_MOUSE	Malate dehydrogenase, mitochondrial	35.6	1393.3 (M:1393.3)	20	64.8
PLEC_MOUSE	Plectin	533.9	1326.5 (M:1326.5)	39	12
ACTN4_MOUSE	Alpha-actinin-4	104.9	1301.5 (M:1301.5)	20	30.7
ALDOA_MOUSE	Fructose-bisphosphate aldolase A	39.3	1289.0 (M:1289.0)	19	64
CH60_MOUSE	60 kDa heat shock protein, mitochondon...	60.9	1269.2 (M:1269.2)	27	68.6
IGHM_MOUSE	Ig mu chain C region	49.9	1165.9 (M:1165.9)	16	37.9
G3P_MOUSE	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrog...	35.8	1102.0 (M:1102.0)	19	71.2
GELS_MOUSE	Gelsolin	85.9	1062.2 (M:1062.2)	17	39.7

ACTN1_MOUSE	Alpha-actinin-1	103	1049.8 (M:1049.8)	18	25.2
PRDX1_MOUSE	Peroxiredoxin-1	22.2	1033.4 (M:1033.4)	18	49.7
TRFE_MOUSE	Serotransferrin	76.7	1024.4 (M:1024.4)	18	37.4
KPYM_MOUSE	Pyruvate kinase PKM	57.8	1015.0 (M:1015.0)	28	56.5
FINC_MOUSE	Fibronectin	272.4	998.6 (M:998.6)	25	19.1
GRP75_MOUSE	Stress-70 protein, mitochondrial	73.4	971.4 (M:971.4)	20	42
LMNA_MOUSE	Prelamin-A/C	74.2	925.7 (M:925.7)	22	43.6
TBA1B_MOUSE	Tubulin alpha-1B chain	50.1	909.0 (M:909.0)	15	52.5
UBA1_MOUSE	Ubiquitin-like modifier-activating ...	117.7	899.3 (M:899.3)	19	28.4
1433Z_MOUSE	14-3-3 protein zeta/delta	27.8	874.2 (M:874.2)	14	58.4
PDIA3_MOUSE	Protein disulfide-isomerase A3	56.6	851.8 (M:851.8)	22	47.9
CLH1_MOUSE	Clathrin heavy chain 1	191.4	840.9 (M:840.9)	21	18.7
RL9_MOUSE	60S ribosomal protein L9	21.9	835.0 (M:835.0)	12	70.3
1433E_MOUSE	14-3-3 protein epsilon	29.2	817.4 (M:817.4)	14	63.1
IGKC_MOUSE	Ig kappa chain C region	11.8	801.6 (M:801.6)	10	93.4
PGK1_MOUSE	Phosphoglycerate kinase 1	44.5	792.0 (M:792.0)	15	53.2
EF1A1_MOUSE	Elongation factor 1-alpha 1	50.1	785.8 (M:785.8)	14	40.7
NUCL_MOUSE	Nucleolin	76.7	769.5 (M:769.5)	16	24.9
ACON_MOUSE	Aconitate hydratase, mitochondrial	85.4	766.9 (M:766.9)	13	22.4
FAS_MOUSE	Fatty acid synthase	272.3	739.8 (M:739.8)	20	12.9
TBB5_MOUSE	Tubulin beta-5 chain	49.6	700.4 (M:700.4)	15	49.3
LDHA_MOUSE	L-lactate dehydrogenase A chain	36.5	683.1 (M:683.1)	12	40.7
IF4A1_MOUSE	Eukaryotic initiation factor 4A-I	46.1	682.0 (M:682.0)	14	45.1
MOES_MOUSE	Moesin	67.7	674.2 (M:674.2)	13	29.3
ACTBL_MOUSE	Beta-actin-like protein 2	42	672.3 (M:672.3)	11	34
SPA3K_MOUSE	Serine protease inhibitor A3K	46.8	667.5 (M:667.5)	14	37.8
HSP74_MOUSE	Heat shock 70 kDa protein 4	94.1	660.2 (M:660.2)	15	27.3
VDAC1_MOUSE	Voltage-dependent anion-selective c...	32.3	634.6 (M:634.6)	11	58.1
SERPH_MOUSE	Serpin H1	46.5	618.8 (M:618.8)	10	36.2
RS3_MOUSE	40S ribosomal protein S3	26.7	613.6 (M:613.6)	13	58.4
IGHG3_MOUSE	Ig gamma-3 chain C region	43.9	611.3 (M:611.3)	12	42.5

ATPO_MOUSE	ATP synthase subunit O, mitochondri...	23.3	603.0 (M:603.0)	9	48.8
ANXA5_MOUSE	Annexin A5	35.7	590.5 (M:590.5)	10	42
RLA0_MOUSE	60S acidic ribosomal protein P0	34.2	590.2 (M:590.2)	9	39.4
RTN4_MOUSE	Reticulon-4	126.5	577.6 (M:577.6)	10	17.1
RS7_MOUSE	40S ribosomal protein S7	22.1	573.4 (M:573.4)	13	69.1
ANXA4_MOUSE	Annexin A4	35.9	565.8 (M:565.8)	7	26
TCPD_MOUSE	T-complex protein 1 subunit delta	58	544.0 (M:544.0)	15	50.1
IQGA1_MOUSE	Ras GTPase-activating-like protein ...	188.6	543.4 (M:543.4)	14	15.3
MTAP_MOUSE	S-methyl-5'-thioadenosine phosphory...	31	542.4 (M:542.4)	9	41.7
K1C10_MOUSE	Keratin, type I cytoskeletal 10	57.7	539.0 (M:539.0)	9	11.9
PUR9_MOUSE	Bifunctional purine biosynthesis pr...	64.2	515.7 (M:515.7)	12	34.8
A2M_MOUSE	Pregnancy zone protein	165.7	505.4 (M:505.4)	13	13.9
PGAM1_MOUSE	Phosphoglycerate mutase 1	28.8	492.4 (M:492.4)	7	43.7
GCAM_MOUSE	Ig gamma-2A chain C region, membran...	43.9	487.1 (M:487.1)	9	34.7
RAB14_MOUSE	Ras-related protein Rab-14	23.9	474.7 (M:474.7)	7	56.7
NAA15_MOUSE	N-alpha-acetyltransferase 15, NatA ...	100.9	473.3 (M:473.3)	8	11.2
IMB1_MOUSE	Importin subunit beta-1	97.1	470.8 (M:470.8)	7	10.7
ACLY_MOUSE	ATP-citrate synthase	119.7	465.7 (M:465.7)	11	15.5
PPIA_MOUSE	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase...	18	459.5 (M:459.5)	10	61
MCM7_MOUSE	DNA replication licensing factor MC...	81.2	453.2 (M:453.2)	9	16.8
IGG2B_MOUSE	Ig gamma-2B chain C region	44.2	445.9 (M:445.9)	8	29.7
CALX_MOUSE	Calnexin	67.2	443.0 (M:443.0)	7	15.9
RSSA_MOUSE	40S ribosomal protein SA	32.8	440.8 (M:440.8)	7	41.4
PDIA1_MOUSE	Protein disulfide-isomerase	57	433.4 (M:433.4)	12	36.9
MYOF_MOUSE	Myoferlin	233.2	432.9 (M:432.9)	12	8.7
K1C14_MOUSE	Keratin, type I cytoskeletal 14	52.8	431.2 (M:431.2)	8	18
PHB_MOUSE	Prohibitin	29.8	429.5 (M:429.5)	6	34.2
PRDX2_MOUSE	Peroxiredoxin-2	21.8	426.6 (M:426.6)	6	31.8
HNRPU_MOUSE	Heterogeneous nuclear ribonucleopro...	87.9	424.9 (M:424.9)	9	21.6
1433B_MOUSE	14-3-3 protein beta/alpha	28.1	419.3 (M:419.3)	7	28.9
GBLP_MOUSE	Receptor of activated protein C kin...	35.1	419.3 (M:419.3)	8	41

C1TM_MOUSE	Monofunctional C1-tetrahydrofolate ...	105.7	419.2 (M:419.2)	11	16
FUBP2_MOUSE	Far upstream element-binding protei...	76.7	416.6 (M:416.6)	8	17.2
RS3A_MOUSE	40S ribosomal protein S3a	29.9	407.2 (M:407.2)	9	34.8
TCPZ_MOUSE	T-complex protein 1 subunit zeta	58	405.2 (M:405.2)	12	32.2
EF1D_MOUSE	Elongation factor 1-delta	31.3	401.1 (M:401.1)	9	44.5
NPM_MOUSE	Nucleophosmin	32.5	401.0 (M:401.0)	5	21.6
EIF3B_MOUSE	Eukaryotic translation initiation f...	91.3	395.3 (M:395.3)	7	18.4
TAGL2_MOUSE	Transgelin-2	22.4	391.1 (M:391.1)	6	40.2
TCPA_MOUSE	T-complex protein 1 subunit alpha	60.4	390.9 (M:390.9)	13	36.9
K1C15_MOUSE	Keratin, type I cytoskeletal 15	49.1	388.3 (M:388.3)	8	7.5
AATM_MOUSE	Aspartate aminotransferase, mitocho...	47.4	384.2 (M:384.2)	9	27.9
PSA2_MOUSE	Proteasome subunit alpha type-2	25.9	380.3 (M:380.3)	6	35.5
LRC59_MOUSE	Leucine-rich repeat-containing prot...	34.9	375.3 (M:375.3)	8	36.8
VDAC2_MOUSE	Voltage-dependent anion-selective c...	31.7	374.3 (M:374.3)	8	37.6
PSB1_MOUSE	Proteasome subunit beta type-1	26.4	370.4 (M:370.4)	7	37.1
ROA2_MOUSE	Heterogeneous nuclear ribonucleopro...	37.4	368.4 (M:368.4)	8	39.1
PHB2_MOUSE	Prohibitin-2	33.3	366.9 (M:366.9)	8	31.8
THIL_MOUSE	Acetyl-CoA acetyltransferase, mitoc...	44.8	365.8 (M:365.8)	7	19.8
1433G_MOUSE	14-3-3 protein gamma	28.3	364.2 (M:364.2)	8	34.4
VPS35_MOUSE	Vacuolar protein sorting-associated...	91.7	359.3 (M:359.3)	7	12.3
ROA3_MOUSE	Heterogeneous nuclear ribonucleopro...	39.6	358.5 (M:358.5)	6	22.4
RAB7A_MOUSE	Ras-related protein Rab-7a	23.5	357.7 (M:357.7)	7	43.5
PSMD2_MOUSE	26S proteasome non-ATPase regulator...	100.1	356.2 (M:356.2)	9	15.7
IF2A_MOUSE	Eukaryotic translation initiation f...	36.1	355.0 (M:355.0)	6	22.9
MIC60_MOUSE	MICOS complex subunit Mic60	83.8	355.0 (M:355.0)	4	6.7
TCPH_MOUSE	T-complex protein 1 subunit eta	59.6	354.3 (M:354.3)	10	29.4
RL17_MOUSE	60S ribosomal protein L17	21.4	353.5 (M:353.5)	6	35.9
PCBP2_MOUSE	Poly(rC)-binding protein 2	38.2	351.3 (M:351.3)	7	29.3
A1AT3_MOUSE	Alpha-1-antitrypsin 1-3	45.8	350.5 (M:350.5)	10	32.3
AT5F1_MOUSE	ATP synthase F(0) complex subunit B...	28.9	350.3 (M:350.3)	6	27.3
HVM21_MOUSE	Ig heavy chain V region M511	13.6	344.2 (M:344.2)	5	47.5

RL5_MOUSE	60S ribosomal protein L5	34.4	340.1 (M:340.1)	8	36
RL12_MOUSE	60S ribosomal protein L12	17.8	336.5 (M:336.5)	7	58.8
SERC_MOUSE	Phosphoserine aminotransferase	40.4	333.5 (M:333.5)	8	33.2
UBQL2_MOUSE	Ubiquilin-2	67.3	333.1 (M:333.1)	5	14.6
MCM3_MOUSE	DNA replication licensing factor MC...	91.5	329.6 (M:329.6)	6	15.5
FPPS_MOUSE	Farnesyl pyrophosphate synthase	40.6	328.9 (M:328.9)	5	24.6
HNRPK_MOUSE	Heterogeneous nuclear ribonucleopro...	50.9	327.8 (M:327.8)	10	28.1
1433F_MOUSE	14-3-3 protein eta	28.2	320.6 (M:320.6)	5	19.5
TLN1_MOUSE	Talin-1	269.7	318.9 (M:318.9)	9	7.5
SND1_MOUSE	Staphylococcal nuclease domain- cont...	102	316.4 (M:316.4)	8	12.3
ECHA_MOUSE	Trifunctional enzyme subunit alpha,...	82.6	315.0 (M:315.0)	5	9.7
RL23A_MOUSE	60S ribosomal protein L23a	17.7	314.6 (M:314.6)	7	33.3
KV2A7_MOUSE	Ig kappa chain V-II region 26-10	12.3	313.4 (M:313.4)	4	42.5
PCBP1_MOUSE	Poly(rC)-binding protein 1	37.5	311.0 (M:311.0)	5	24.7
EF1G_MOUSE	Elongation factor 1-gamma	50	308.5 (M:308.5)	7	17.2
ATP5H_MOUSE	ATP synthase subunit d, mitochondri...	18.7	308.2 (M:308.2)	6	54
PDC6I_MOUSE	Programmed cell death 6- interacting...	96	306.8 (M:306.8)	4	7.7
NASP_MOUSE	Nuclear autoantigenic sperm protein	83.9	306.0 (M:306.0)	9	20.3
LEG3_MOUSE	Galectin-3	27.5	303.5 (M:303.5)	5	28
RAB1A_MOUSE	Ras-related protein Rab-1A	22.7	301.3 (M:301.3)	7	50.7
RAN_MOUSE	GTP-binding nuclear protein Ran	24.4	301.0 (M:301.0)	4	39.8
NCPR_MOUSE	NADPH-cytochrome P450 reductase	77	300.6 (M:300.6)	5	10.8
SERA_MOUSE	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	56.5	300.3 (M:300.3)	8	20.6
SYVC_MOUSE	Valine--tRNA ligase	140.1	299.4 (M:299.4)	6	7.4
HYOU1_MOUSE	Hypoxia up-regulated protein 1	111.1	299.4 (M:299.4)	6	16.5
IDHP_MOUSE	Isocitrate dehydrogenase [NADP], mi...	50.9	298.5 (M:298.5)	6	15.9
NACA_MOUSE	Nascent polypeptide-associated comp...	23.4	297.9 (M:297.9)	6	32.6
COF1_MOUSE	Cofilin-1	18.5	295.6 (M:295.6)	5	44
NAA50_MOUSE	N-alpha-acetyltransferase 50	19.4	295.3 (M:295.3)	8	48.5
SF3A1_MOUSE	Splicing factor 3A subunit 1	88.5	292.6 (M:292.6)	5	10.4
SPB6_MOUSE	Serpin B6	42.6	289.9 (M:289.9)	6	24.1

ATPB_MOUSE	ATP synthase subunit beta, mitochond...	56.3	288.0 (M:288.0)	6	21.6
ROA1_MOUSE	Heterogeneous nuclear ribonucleopro...	34.2	286.9 (M:286.9)	6	20.6
SYEP_MOUSE	Bifunctional glutamate/proline--tRN...	170	286.7 (M:286.7)	7	7.3
BTF3_MOUSE	Transcription factor BTF3	22	285.9 (M:285.9)	6	51.5
ETFA_MOUSE	Electron transfer flavoprotein subu...	35	285.4 (M:285.4)	5	25.2
CKAP4_MOUSE	Cytoskeleton-associated protein 4	63.7	284.3 (M:284.3)	8	19.8
K2C1_MOUSE	Keratin, type II cytoskeletal 1	65.6	282.9 (M:282.9)	4	5.2
NSF1C_MOUSE	NSFL1 cofactor p47	40.7	282.7 (M:282.7)	6	25.7
ML12B_MOUSE	Myosin regulatory light chain 12B	19.8	282.6 (M:282.6)	6	51.7
HEM2_MOUSE	Delta-aminolevulinic acid dehydrata...	36	279.4 (M:279.4)	4	26.1
C1TC_MOUSE	C-1-tetrahydrofolate synthase, cyto...	101.1	275.3 (M:275.3)	5	7
CLIC1_MOUSE	Chloride intracellular channel prot...	27	275.2 (M:275.2)	5	32.8
STIP1_MOUSE	Stress-induced-phosphoprotein 1	62.5	272.8 (M:272.8)	8	21.7
NEDD4_MOUSE	E3 ubiquitin-protein ligase NEDD4	102.6	270.3 (M:270.3)	6	13.5
SAE1_MOUSE	SUMO-activating enzyme subunit 1	38.6	270.3 (M:270.3)	5	24.3
GSTA4_MOUSE	Glutathione S-transferase A4	25.5	270.1 (M:270.1)	6	32.9
YBOX1_MOUSE	Nuclease-sensitive element-binding ...	35.7	270.0 (M:270.0)	6	37.3
GANAB_MOUSE	Neutral alpha-glucosidase AB	106.8	268.4 (M:268.4)	7	14.9
K2C5_MOUSE	Keratin, type II cytoskeletal 5	61.7	266.5 (M:266.5)	5	9.3
RL40_MOUSE	Ubiquitin-60S ribosomal protein L40	14.7	265.2 (M:265.2)	5	38.3
SRSF3_MOUSE	Serine/arginine-rich splicing facto...	19.3	263.8 (M:263.8)	4	25.6
ADT2_MOUSE	ADP/ATP translocase 2	32.9	261.9 (M:261.9)	6	29.9
RL11_MOUSE	60S ribosomal protein L11	20.2	261.5 (M:261.5)	6	41
PSB4_MOUSE	Proteasome subunit beta type-4	29.1	258.9 (M:258.9)	5	30.7
K1C42_MOUSE	Keratin, type I cytoskeletal 42	50.1	258.6 (M:258.6)	5	12.8
TIF1B_MOUSE	Transcription intermediary factor 1...	88.8	258.2 (M:258.2)	7	23.9
AK1A1_MOUSE	Alcohol dehydrogenase [NADP(+)]	36.6	258.2 (M:258.2)	4	14.2
LPPRC_MOUSE	Leucine-rich PPR motif-containing p...	156.5	258.0 (M:258.0)	5	4.5
PSB5_MOUSE	Proteasome subunit beta type-5	28.5	257.9 (M:257.9)	6	22.3
EIF3A_MOUSE	Eukaryotic translation initiation f...	161.8	257.9 (M:257.9)	9	9.4
BAX_MOUSE	Apoptosis regulator BAX	21.4	254.3 (M:254.3)	5	30.2

PROF1_MOUSE	Profilin-1	14.9	253.7 (M:253.7)	5	43.6
MLEC_MOUSE	Malectin	32.3	253.4 (M:253.4)	4	14.8
HXK1_MOUSE	Hexokinase-1	108.2	252.0 (M:252.0)	7	9.5
TCEA1_MOUSE	Transcription elongation factor A p...	33.9	251.6 (M:251.6)	5	19.6
CAZA1_MOUSE	F-actin-capping protein subunit alp...	32.9	251.4 (M:251.4)	4	26.2
RAP1A_MOUSE	Ras-related protein Rap-1A	21	249.5 (M:249.5)	6	27.2
HNRPM_MOUSE	Heterogeneous nuclear ribonucleopro...	77.6	249.0 (M:249.0)	8	16.6
PARP1_MOUSE	Poly [ADP-ribose] polymerase 1	113	248.6 (M:248.6)	5	7
VINC_MOUSE	Vinculin	116.6	247.8 (M:247.8)	7	9.5
IF1AX_MOUSE	Eukaryotic translation initiation f...	16.5	245.1 (M:245.1)	5	41
PCNA_MOUSE	Proliferating cell nuclear antigen	28.8	244.5 (M:244.5)	5	34.9
PEBP1_MOUSE	Phosphatidylethanolamine-binding pr...	20.8	243.0 (M:243.0)	3	32.6
RS9_MOUSE	40S ribosomal protein S9	22.6	242.7 (M:242.7)	5	19.1
PSMD1_MOUSE	26S proteasome non-ATPase regulator...	105.7	240.6 (M:240.6)	6	10.2
PSA_MOUSE	Puromycin-sensitive aminopeptidase	103.3	239.7 (M:239.7)	4	6.1
GNAI2_MOUSE	Guanine nucleotide-binding protein ...	40.5	239.5 (M:239.5)	6	21.1
STRAP_MOUSE	Serine-threonine kinase receptor- as...	38.4	236.8 (M:236.8)	4	22.6
PTBP1_MOUSE	Polypyrimidine tract-binding protei...	56.4	236.1 (M:236.1)	5	22
THIC_MOUSE	Acetyl-CoA acetyltransferase, cytos...	41.3	235.8 (M:235.8)	4	16.1
IDH3A_MOUSE	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subu...	39.6	233.7 (M:233.7)	4	14.8
RS11_MOUSE	40S ribosomal protein S11	18.4	233.0 (M:233.0)	6	32.3
ESTD_MOUSE	S-formylglutathione hydrolase	31.3	232.1 (M:232.1)	4	33.7
GDIB_MOUSE	Rab GDP dissociation inhibitor beta	50.5	232.1 (M:232.1)	6	20.7
CO3_MOUSE	Complement C3	186.4	232.0 (M:232.0)	7	7
NDKB_MOUSE	Nucleoside diphosphate kinase B	17.4	231.6 (M:231.6)	5	38.8
PABP1_MOUSE	Polyadenylate-binding protein 1	70.6	229.0 (M:229.0)	7	14.2
DDX3X_MOUSE	ATP-dependent RNA helicase DDX3X	73.1	226.8 (M:226.8)	5	9.4
TOM22_MOUSE	Mitochondrial import receptor subun...	15.5	225.8 (M:225.8)	4	46.5
SET_MOUSE	Protein SET	33.4	225.2 (M:225.2)	4	18
EIF3K_MOUSE	Eukaryotic translation initiation f...	25.1	225.1 (M:225.1)	4	23.9
RL7A_MOUSE	60S ribosomal protein L7a	30	223.9 (M:223.9)	6	21.8

TXNL1_MOUSE	Thioredoxin-like protein 1	32.2	223.4 (M:223.4)	4	28.4
VPS29_MOUSE	Vacuolar protein sorting-associated...	20.5	222.8 (M:222.8)	3	16.5
RPN2_MOUSE	Dolichyl-diphosphooligosaccharide-- ...	69	218.2 (M:218.2)	5	12.8
ROAA_MOUSE	Heterogeneous nuclear ribonucleopro...	30.8	217.3 (M:217.3)	5	22.5
TMEDA_MOUSE	Transmembrane emp24 domain-containi...	24.9	217.3 (M:217.3)	4	21.9
ETFB_MOUSE	Electron transfer flavoprotein subu...	27.6	216.9 (M:216.9)	3	18.4
SCOT1_MOUSE	Succinyl-CoA:3-ketoacid coenzyme A ...	56	216.6 (M:216.6)	7	27.1
PSA1_MOUSE	Proteasome subunit alpha type-1	29.5	215.4 (M:215.4)	5	27.8
ATPA_MOUSE	ATP synthase subunit alpha, mitocho...	59.7	213.2 (M:213.2)	3	9
EFTU_MOUSE	Elongation factor Tu, mitochondrial	49.5	212.6 (M:212.6)	4	15.7
GSTP1_MOUSE	Glutathione S-transferase P 1	23.6	212.2 (M:212.2)	5	30
RAB5C_MOUSE	Ras-related protein Rab-5C	23.4	211.9 (M:211.9)	3	21.8
RAB1B_MOUSE	Ras-related protein Rab-1B	22.2	211.9 (M:211.9)	5	39.8
PPIC_MOUSE	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase...	22.8	211.7 (M:211.7)	5	28.8
EIF3C_MOUSE	Eukaryotic translation initiation f...	105.5	211.2 (M:211.2)	5	6.9
RIR1_MOUSE	Ribonucleoside-diphosphate reductas...	90.2	211.1 (M:211.1)	4	11.6
PARK7_MOUSE	Protein deglycase DJ-1	20	210.4 (M:210.4)	5	38.1
UBP2L_MOUSE	Ubiquitin-associated protein 2-like	116.7	210.3 (M:210.3)	6	11.9
SFPQ_MOUSE	Splicing factor, proline- and gluta...	75.4	208.5 (M:208.5)	5	11.6
CAPR1_MOUSE	Caprin-1	78.1	203.0 (M:203.0)	6	13.6
HNRH1_MOUSE	Heterogeneous nuclear ribonucleopro...	49.2	202.4 (M:202.4)	4	15.4
CDC42_MOUSE	Cell division control protein 42 ho...	21.2	201.4 (M:201.4)	4	26.7
CAPZB_MOUSE	F-actin-capping protein subunit bet...	31.3	200.4 (M:200.4)	3	12.3
MCM2_MOUSE	DNA replication licensing factor MC...	102	199.4 (M:199.4)	5	8
APOA1_MOUSE	Apolipoprotein A-I	30.6	197.5 (M:197.5)	4	19.7
UGGG1_MOUSE	UDP-glucose:glycoprotein glucosyltr...	176.3	197.1 (M:197.1)	5	5.7
H4_MOUSE	Histone H4	11.4	196.8 (M:196.8)	5	35
CBX3_MOUSE	Chromobox protein homolog 3	20.8	195.2 (M:195.2)	4	24
KAD1_MOUSE	Adenylate kinase isoenzyme 1	21.5	194.5 (M:194.5)	2	17.5
PSB2_MOUSE	Proteasome subunit beta type-2	22.9	193.8 (M:193.8)	2	16.9
CNN3_MOUSE	Calponin-3	36.4	193.5 (M:193.5)	4	16.4

HEMO_MOUSE	Hemopexin	51.3	193.2 (M:193.2)	4	13.3
LDHB_MOUSE	L-lactate dehydrogenase B chain	36.5	193.1 (M:193.1)	4	18.9
SFXN3_MOUSE	Sideroflexin-3	35.4	193.1 (M:193.1)	3	18.1
RL18A_MOUSE	60S ribosomal protein L18a	20.7	193.1 (M:193.1)	5	22.2
RS4X_MOUSE	40S ribosomal protein S4, X isoform	29.6	192.6 (M:192.6)	4	14.1
MYO1C_MOUSE	Unconventional myosin-1c	121.9	191.6 (M:191.6)	5	6.6
FUS_MOUSE	RNA-binding protein FUS	52.6	190.6 (M:190.6)	4	13.9
SRC8_MOUSE	Src substrate cortactin	61.2	190.4 (M:190.4)	4	8.4
PSMD7_MOUSE	26S proteasome non-ATPase regulator...	36.5	190.1 (M:190.1)	4	23.7
CYB5B_MOUSE	Cytochrome b5 type B	16.3	189.6 (M:189.6)	3	40.4
ARPC3_MOUSE	Actin-related protein 2/3 complex s...	20.5	189.5 (M:189.5)	4	22.5
HVM30_MOUSE	Ig heavy chain V-III region ABE-47N	12.7	189.3 (M:189.3)	4	34.5
TRXR1_MOUSE	Thioredoxin reductase 1, cytoplasmic...	67.1	188.5 (M:188.5)	6	19.4
QCR1_MOUSE	Cytochrome b-c1 complex subunit 1, ...	52.8	188.5 (M:188.5)	4	11.9
MPCP_MOUSE	Phosphate carrier protein, mitochondria...	39.6	186.9 (M:186.9)	4	17.1
RS14_MOUSE	40S ribosomal protein S14	16.3	185.6 (M:185.6)	5	31.8
DCAKD_MOUSE	Dephospho-CoA kinase domain-containing...	26.5	185.1 (M:185.1)	5	22.5
FUMH_MOUSE	Fumarate hydratase, mitochondrial	54.3	184.2 (M:184.2)	5	18.3
QCR2_MOUSE	Cytochrome b-c1 complex subunit 2, ...	48.2	184.1 (M:184.1)	4	14.8
M2OM_MOUSE	Mitochondrial 2-oxoglutarate/malate...	34.1	183.6 (M:183.6)	4	15.9
SLK_MOUSE	STE20-like serine/threonine-protein...	141.4	183.2 (M:183.2)	5	6.8
G3BP1_MOUSE	Ras GTPase-activating protein-binding...	51.8	183.1 (M:183.1)	5	19.4
PA24A_MOUSE	Cytosolic phospholipase A2	85.2	182.6 (M:182.6)	3	7.1
ACOT9_MOUSE	Acyl-coenzyme A thioesterase 9, mitochondrial...	50.5	181.9 (M:181.9)	5	13.9
RL7_MOUSE	60S ribosomal protein L7	31.4	178.4 (M:178.4)	4	15.6
PDXK_MOUSE	Pyridoxal kinase	35	178.2 (M:178.2)	4	17.3
PGM1_MOUSE	Phosphoglucomutase-1	61.4	177.8 (M:177.8)	5	13.9
PA2G4_MOUSE	Proliferation-associated protein 2G...	43.7	177.5 (M:177.5)	5	19.8
GLU2B_MOUSE	Glucosidase 2 subunit beta	58.8	177.2 (M:177.2)	3	6.5
FXR1_MOUSE	Fragile X mental retardation syndrome...	76.2	176.9 (M:176.9)	5	10
MARE1_MOUSE	Microtubule-associated protein RP/E...	30	176.6 (M:176.6)	3	25

HNRPF_MOUSE	Heterogeneous nuclear ribonucleopro...	45.7	176.6 (M:176.6)	3	12
SKP1_MOUSE	S-phase kinase-associated protein 1	18.7	176.4 (M:176.4)	3	38.7
PSD11_MOUSE	26S proteasome non-ATPase regulator...	47.4	175.9 (M:175.9)	5	13.7
IPYR_MOUSE	Inorganic pyrophosphatase	32.6	175.4 (M:175.4)	2	10.7
AIMP2_MOUSE	Aminoacyl tRNA synthase complex-int...	35.4	175.3 (M:175.3)	3	24.1
LEG1_MOUSE	Galectin-1	14.9	175.1 (M:175.1)	3	31.9
TNPO1_MOUSE	Transportin-1	102.3	174.8 (M:174.8)	4	6
TALDO_MOUSE	Transaldolase	37.4	174.2 (M:174.2)	5	16.6
THIM_MOUSE	3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondr...	41.8	173.7 (M:173.7)	5	22.7
SEPT2_MOUSE	Septin-2	41.5	173.2 (M:173.2)	3	15.5
MCM4_MOUSE	DNA replication licensing factor MC...	96.7	172.3 (M:172.3)	5	10.6
RAC1_MOUSE	Ras-related C3 botulinum toxin subs...	21.4	171.7 (M:171.7)	4	17.2
DC112_MOUSE	Cytoplasmic dynein 1 intermediate c...	68.4	171.0 (M:171.0)	3	12.7
CAN2_MOUSE	Calpain-2 catalytic subunit	79.8	170.8 (M:170.8)	2	5.6
RAB2A_MOUSE	Ras-related protein Rab-2A	23.5	170.8 (M:170.8)	3	19.8
XPO1_MOUSE	Exportin-1	123	170.7 (M:170.7)	4	7.2
DHB4_MOUSE	Peroxisomal multifunctional enzyme ...	79.4	170.3 (M:170.3)	3	4.6
CO1A2_MOUSE	Collagen alpha-2(I) chain	129.5	170.3 (M:170.3)	4	6
ACADL_MOUSE	Long-chain specific acyl-CoA dehydr...	47.9	170.2 (M:170.2)	4	13.3
PSDE_MOUSE	26S proteasome non-ATPase regulator...	34.6	170.0 (M:170.0)	4	22.6
MAP4_MOUSE	Microtubule-associated protein 4	117.4	169.0 (M:169.0)	4	8.9
RAB8A_MOUSE	Ras-related protein Rab-8A	23.7	168.1 (M:168.1)	4	23.2
PSME3_MOUSE	Proteasome activator complex subuni...	29.5	167.3 (M:167.3)	3	15.4
UBP5_MOUSE	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrola...	95.8	167.0 (M:167.0)	3	6.9
EWS_MOUSE	RNA-binding protein EWS	68.4	166.2 (M:166.2)	3	8.1
PRS10_MOUSE	26S protease regulatory subunit 10B	44.1	165.5 (M:165.5)	4	15.2
CH10_MOUSE	10 kDa heat shock protein, mitochon...	11	164.7 (M:164.7)	4	37.3
TOM34_MOUSE	Mitochondrial import receptor subun...	34.3	164.1 (M:164.1)	4	19.7
VIGLN_MOUSE	Vigilin	141.7	163.9 (M:163.9)	4	4.9
EIF3F_MOUSE	Eukaryotic translation initiation f...	38	163.1 (M:163.1)	4	16.1
CMC1_MOUSE	Calcium-binding mitochondrial carri...	74.5	163.1 (M:163.1)	5	11.7

ITB1_MOUSE	Integrin beta-1	88.2	163.0 (M:163.0)	3	6
CISY_MOUSE	Citrate synthase, mitochondrial	51.7	162.7 (M:162.7)	4	10.1
XPO2_MOUSE	Exportin-2	110.4	162.1 (M:162.1)	4	4.3
PSA4_MOUSE	Proteasome subunit alpha type-4	29.5	160.7 (M:160.7)	4	20.7
SDHA_MOUSE	Succinate dehydrogenase [ubiquinone...	72.5	158.9 (M:158.9)	4	9.6
RL10L_MOUSE	60S ribosomal protein L10-like	24.5	157.6 (M:157.6)	2	18.2
OST48_MOUSE	Dolichyl-diphosphooligosaccharide-- ...	49	156.8 (M:156.8)	3	13.2
ACACA_MOUSE	Acetyl-CoA carboxylase 1	265.1	156.3 (M:156.3)	5	3.2
RS5_MOUSE	40S ribosomal protein S5	22.9	156.0 (M:156.0)	4	22.1
HDGF_MOUSE	Hepatoma-derived growth factor	26.3	155.3 (M:155.3)	3	32.5
P5CR2_MOUSE	Pyrroline-5-carboxylate reductase 2	33.6	154.6 (M:154.6)	3	12.5
ANXA3_MOUSE	Annexin A3	36.4	154.4 (M:154.4)	3	10.5
LMNB1_MOUSE	Lamin-B1	66.7	150.0 (M:150.0)	3	8.7
U520_MOUSE	U5 small nuclear ribonucleoprotein ...	244.4	149.1 (M:149.1)	5	3.9
RS17_MOUSE	40S ribosomal protein S17	15.5	148.0 (M:148.0)	4	44.4
NT5C_MOUSE	5'(3')-deoxyribonucleotidase, cytos...	23.1	147.9 (M:147.9)	3	30
SURF4_MOUSE	Surfeit locus protein 4	30.4	147.8 (M:147.8)	3	16.4
OAT_MOUSE	Ornithine aminotransferase, mitocho...	48.3	147.5 (M:147.5)	3	12.8
H2A1H_MOUSE	Histone H2A type 1-H	13.9	147.4 (M:147.4)	3	22.7
TIM50_MOUSE	Mitochondrial import inner membrane...	39.8	147.3 (M:147.3)	2	9.3
P5CS_MOUSE	Delta-1-pyrroline-5-carboxylate syn...	87.2	147.0 (M:147.0)	4	6.5
RL31_MOUSE	60S ribosomal protein L31	14.5	146.8 (M:146.8)	4	36
ODPA_MOUSE	Pyruvate dehydrogenase E1 component...	43.2	145.3 (M:145.3)	4	16.4
OTUB1_MOUSE	Ubiquitin thioesterase OTUB1	31.3	145.3 (M:145.3)	3	16.6
SYLC_MOUSE	Leucine--tRNA ligase, cytoplasmic	134.1	144.3 (M:144.3)	3	5.7
2AAA_MOUSE	Serine/threonine-protein phosphatas...	65.3	143.7 (M:143.7)	4	11
H12_MOUSE	Histone H1.2	21.3	142.2 (M:142.2)	2	7.1
TADBP_MOUSE	TAR DNA-binding protein 43	44.5	139.8 (M:139.8)	3	15.2
CAZA2_MOUSE	F-actin-capping protein subunit alp...	32.9	137.9 (M:137.9)	3	21
G6PD1_MOUSE	Glucose-6-phosphate 1- dehydrogenase...	59.2	137.6 (M:137.6)	4	12.8
CNPB_MOUSE	Cellular nucleic acid-binding prote...	19.6	137.0 (M:137.0)	2	16.9

BZW1_MOUSE	Basic leucine zipper and W2 domain-...	48	136.2 (M:136.2)	4	14.6
CAPG_MOUSE	Macrophage-capping protein	39.2	135.6 (M:135.6)	3	9.7
KV5A3_MOUSE	Ig kappa chain V-V region K2	12.6	134.4 (M:134.4)	3	27.8
SRPRB_MOUSE	Signal recognition particle recepto...	29.6	134.2 (M:134.2)	2	12.3
PURA2_MOUSE	Adenylosuccinate synthetase isozyme...	50	133.8 (M:133.8)	3	12.7
FXR2_MOUSE	Fragile X mental retardation syndro...	73.7	132.6 (M:132.6)	2	4
ARF3_MOUSE	ADP-ribosylation factor 3	20.6	132.0 (M:132.0)	4	32.6
PSMD6_MOUSE	26S proteasome non-ATPase regulator...	45.5	129.2 (M:129.2)	3	10.5
HVM51_MOUSE	Ig heavy chain V region AC38 205.12	12.9	128.9 (M:128.9)	2	28
EPS8_MOUSE	Epidermal growth factor receptor ki...	91.7	128.5 (M:128.5)	2	4.3
KV5A6_MOUSE	Ig kappa chain V-V region L6	13	127.4 (M:127.4)	2	20
RS6_MOUSE	40S ribosomal protein S6	28.7	126.6 (M:126.6)	3	16.1
UBE2K_MOUSE	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 K	22.4	126.4 (M:126.4)	2	13
RB11A_MOUSE	Ras-related protein Rab-11A	24.4	126.3 (M:126.3)	3	13.4
GDIR1_MOUSE	Rho GDP-dissociation inhibitor 1	23.4	126.0 (M:126.0)	2	15.2
ARP2_MOUSE	Actin-related protein 2	44.7	125.4 (M:125.4)	3	12.9
AP2A2_MOUSE	AP-2 complex subunit alpha-2	104	124.8 (M:124.8)	2	3
IF4G2_MOUSE	Eukaryotic translation initiation f...	102	124.8 (M:124.8)	2	3.5
SFXN1_MOUSE	Sideroflexin-1	35.6	122.5 (M:122.5)	2	14.3
PPID_MOUSE	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase...	40.7	121.0 (M:121.0)	3	10
PP1A_MOUSE	Serine/threonine-protein phosphatas...	37.5	120.9 (M:120.9)	2	8.2
SNAA_MOUSE	Alpha-soluble NSF attachment protei...	33.2	120.8 (M:120.8)	2	7.8
KAD2_MOUSE	Adenylate kinase 2, mitochondrial	26.5	120.5 (M:120.5)	3	17.6
DDX46_MOUSE	Probable ATP-dependent RNA helicase...	117.4	120.3 (M:120.3)	3	3.8
COX2_MOUSE	Cytochrome c oxidase subunit 2	26	120.1 (M:120.1)	2	14.5
RD23B_MOUSE	UV excision repair protein RAD23 ho...	43.5	119.1 (M:119.1)	3	12
RL15_MOUSE	60S ribosomal protein L15	24.1	118.7 (M:118.7)	2	12.3
TPM3_MOUSE	Tropomyosin alpha-3 chain	33	118.6 (M:118.6)	3	13.7
PURB_MOUSE	Transcriptional activator protein P...	33.9	118.5 (M:118.5)	3	12.3
TEBP_MOUSE	Prostaglandin E synthase 3	18.7	116.2 (M:116.2)	3	13.1
SPTB2_MOUSE	Spectrin beta chain, non-erythrocyt...	274.1	115.7 (M:115.7)	3	2.1

ATPG_MOUSE	ATP synthase subunit gamma, mitocho...	32.9	115.7 (M:115.7)	2	8.1
CSK21_MOUSE	Casein kinase II subunit alpha	45.1	114.2 (M:114.2)	2	6.4
MDHC_MOUSE	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	36.5	114.1 (M:114.1)	2	7.8
HCDH_MOUSE	Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenas...	34.4	113.8 (M:113.8)	3	18.8
MTCH2_MOUSE	Mitochondrial carrier homolog 2	33.5	113.6 (M:113.6)	2	12.2
VPS25_MOUSE	Vacuolar protein-sorting-associated...	20.7	112.8 (M:112.8)	2	30.7
PTH2_MOUSE	Peptidyl-tRNA hydrolase 2, mitochon...	19.5	112.2 (M:112.2)	2	18.8
RFC2_MOUSE	Replication factor C subunit 2	38.7	111.8 (M:111.8)	2	7.4
TOP2A_MOUSE	DNA topoisomerase 2-alpha	172.7	110.2 (M:110.2)	2	1.4
IPO5_MOUSE	Importin-5	123.5	110.2 (M:110.2)	3	5.1
PLAK_MOUSE	Junction plakoglobin	81.7	109.6 (M:109.6)	3	6.3
AL1L2_MOUSE	Mitochondrial 10-formyltetrahydrofo...	101.5	107.9 (M:107.9)	2	3.4
PRS6B_MOUSE	26S protease regulatory subunit 6B	47.4	107.0 (M:107.0)	3	12.4
CSN7A_MOUSE	COP9 signalosome complex subunit 7a	30.2	106.5 (M:106.5)	2	9.5
ACADS_MOUSE	Short-chain specific acyl-CoA dehyd...	44.9	106.4 (M:106.4)	2	7.5
IF2B2_MOUSE	Insulin-like growth factor 2 mRNA-b...	65.5	106.1 (M:106.1)	2	4.2
MY18A_MOUSE	Unconventional myosin-XVIIIa	232.6	105.2 (M:105.2)	3	2.3
RS10_MOUSE	40S ribosomal protein S10	18.9	105.2 (M:105.2)	3	18.8
VA0D1_MOUSE	V-type proton ATPase subunit d 1	40.3	103.9 (M:103.9)	2	8.8
RS13_MOUSE	40S ribosomal protein S13	17.2	103.7 (M:103.7)	3	16.6
TPM4_MOUSE	Tropomyosin alpha-4 chain	28.5	103.6 (M:103.6)	2	8.5
ERP44_MOUSE	Endoplasmic reticulum resident prot...	46.8	103.6 (M:103.6)	2	7.9
GALK1_MOUSE	Galactokinase	42.3	102.4 (M:102.4)	2	7.9
PSA7_MOUSE	Proteasome subunit alpha type-7	27.8	102.1 (M:102.1)	2	13.3
NEB2_MOUSE	Neurabin-2	89.5	101.5 (M:101.5)	2	6
HVM36_MOUSE	Ig heavy chain V region 441	12.9	101.1 (M:101.1)	2	23.3
ITA3_MOUSE	Integrin alpha-3	116.7	101.1 (M:101.1)	3	4.7
RL18_MOUSE	60S ribosomal protein L18	21.6	100.8 (M:100.8)	3	18.1
CRKL_MOUSE	Crk-like protein	33.8	100.8 (M:100.8)	2	14.2
KTHY_MOUSE	Thymidylate kinase	23.9	100.6 (M:100.6)	2	10.8
SCMC1_MOUSE	Calcium-binding mitochondrial carri...	52.9	100.0 (M:100.0)	3	9.5

NB5R3_MOUSE	NADH-cytochrome b5 reductase 3	34.1	99.6 (M:99.6)	3	13
FETUA_MOUSE	Alpha-2-HS-glycoprotein	37.3	99.4 (M:99.4)	2	13
COPB_MOUSE	Coatomer subunit beta	107	97.3 (M:97.3)	3	5.2
SEC63_MOUSE	Translocation protein SEC63 homolog	87.8	94.3 (M:94.3)	2	5.3
DCPS_MOUSE	m7GpppX diphosphatase	39	92.6 (M:92.6)	2	11.2
SRSF1_MOUSE	Serine/arginine-rich splicing facto...	27.7	92.4 (M:92.4)	2	12.9
CD81_MOUSE	CD81 antigen	25.8	92.1 (M:92.1)	2	18.2
ARC1B_MOUSE	Actin-related protein 2/3 complex s...	41	89.2 (M:89.2)	2	8.3
EIF3D_MOUSE	Eukaryotic translation initiation f...	63.9	88.4 (M:88.4)	2	7.5
GBB1_MOUSE	Guanine nucleotide-binding protein ...	37.4	86.6 (M:86.6)	2	5.9
MCM5_MOUSE	DNA replication licensing factor MC...	82.3	85.3 (M:85.3)	2	3.5
LASP1_MOUSE	LIM and SH3 domain protein 1	30	85.3 (M:85.3)	2	9.5
EIF3E_MOUSE	Eukaryotic translation initiation f...	52.2	84.6 (M:84.6)	2	6.3
DNLI1_MOUSE	DNA ligase 1	102.2	84.3 (M:84.3)	2	3.6
RL22_MOUSE	60S ribosomal protein L22	14.7	84.2 (M:84.2)	2	19.5
KV3A3_MOUSE	Ig kappa chain V-III region MOPC 70	11.9	83.6 (M:83.6)	2	30.6
PDLI1_MOUSE	PDZ and LIM domain protein 1	35.8	83.3 (M:83.3)	2	8.9
IPO7_MOUSE	Importin-7	119.4	82.6 (M:82.6)	2	2.7
HSPB8_MOUSE	Heat shock protein beta-8	21.5	81.6 (M:81.6)	2	9.7

Tabla C | Proteínas identificadas en la co-inmunoprecipitación de sAC_t-HA en células HT22-CRHR1 estimuladas con CRH 100 nM por 30 min

Uniprot ID	Proteína	Peso molecular (kDa)	Mascot Score	Número de péptidos	Cobertura de secuencia (%)
MYH9_MOUSE	Myosin-9	226.2	3160.1 (M:3160.1)	67	36.8
PLEC_MOUSE	Plectin	533.9	2399.1 (M:2399.1)	56	14
FLNA_MOUSE	Filamin-A	281	1991.0 (M:1991.0)	39	22.6
HS90B_MOUSE	Heat shock protein HSP 90-beta	83.2	1562.9 (M:1562.9)	31	44.2
VIME_MOUSE	Vimentin	53.7	1520.1 (M:1520.1)	28	59.4
FLNC_MOUSE	Filamin-C	290.9	1511.7 (M:1511.7)	30	16.7
ACTG_MOUSE	Actin, cytoplasmic 2	41.8	1363.3 (M:1363.3)	22	57.6
HSP7C_MOUSE	Heat shock cognate 71 kDa protein	70.8	1345.5 (M:1345.5)	24	40.6
FLNB_MOUSE	Filamin-B	277.7	1245.8 (M:1245.8)	29	16.5
HS90A_MOUSE	Heat shock protein HSP 90-alpha	84.7	1241.0 (M:1241.0)	24	34.2
GRP78_MOUSE	78 kDa glucose-regulated protein	72.4	1196.8 (M:1196.8)	22	40.5
ALBU_MOUSE	Serum albumin	68.6	1127.9 (M:1127.9)	19	35.5
MYH10_MOUSE	Myosin-10	228.9	1074.7 (M:1074.7)	26	14.7
ANXA2_MOUSE	Annexin A2	38.7	1043.6 (M:1043.6)	21	48.4
CH60_MOUSE	60 kDa heat shock protein, mitochondr...	60.9	1029.8 (M:1029.8)	18	40
KPYM_MOUSE	Pyruvate kinase PKM	57.8	982.3 (M:982.3)	20	46.1
ENOA_MOUSE	Alpha-enolase	47.1	954.3 (M:954.3)	18	52.8
MDHM_MOUSE	Malate dehydrogenase, mitochondrial	35.6	882.5 (M:882.5)	19	60.4
IGHM_MOUSE	Ig mu chain C region	49.9	828.6 (M:828.6)	15	38.8
GRP75_MOUSE	Stress-70 protein, mitochondrial	73.4	798.2 (M:798.2)	15	26.1
IGHG1_MOUSE	Ig gamma-1 chain C region secreted ...	35.7	759.2 (M:759.2)	14	49.7
LMNA_MOUSE	Prelamin-A/C	74.2	747.0 (M:747.0)	14	25.1
ALDOA_MOUSE	Fructose-bisphosphate aldolase A	39.3	735.6 (M:735.6)	15	48.1
ENPL_MOUSE	Endoplasmic reticulum protein	92.4	723.1 (M:723.1)	16	22.4
ANXA1_MOUSE	Annexin A1	38.7	713.9 (M:713.9)	13	44.5
PGK1_MOUSE	Phosphoglycerate kinase 1	44.5	686.7 (M:686.7)	14	47
EF2_MOUSE	Elongation factor 2	95.3	663.8 (M:663.8)	16	23.3
PRDX1_MOUSE	Peroxiredoxin-1	22.2	609.6 (M:609.6)	14	49.7
PDIA3_MOUSE	Protein disulfide-isomerase A3	56.6	602.5 (M:602.5)	11	23.2
TERA_MOUSE	Transitional endoplasmic reticulum ...	89.3	580.9 (M:580.9)	15	28.2
NUCL_MOUSE	Nucleolin	76.7	559.9 (M:559.9)	12	19.5
PPIA_MOUSE	Peptidyl-prolyl cis-trans	18	535.2 (M:535.2)	9	57.3

isomerase...					
ACTN4_MOUSE	Alpha-actinin-4	104.9	519.6 (M:519.6)	10	14.1
TBB5_MOUSE	Tubulin beta-5 chain	49.6	484.1 (M:484.1)	11	25.9
EF1A1_MOUSE	Elongation factor 1-alpha 1	50.1	482.8 (M:482.8)	10	27.5
G3P_MOUSE	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrog...	35.8	461.1 (M:461.1)	9	28.8
IGG2B_MOUSE	Ig gamma-2B chain C region	44.2	455.4 (M:455.4)	8	23
1433Z_MOUSE	14-3-3 protein zeta/delta	27.8	449.7 (M:449.7)	10	36.3
IF4A1_MOUSE	Eukaryotic initiation factor 4A-I	46.1	440.8 (M:440.8)	11	32.3
UBA1_MOUSE	Ubiquitin-like modifier-activating ...	117.7	437.3 (M:437.3)	11	15.9
FAS_MOUSE	Fatty acid synthase	272.3	423.9 (M:423.9)	12	5.6
K1C10_MOUSE	Keratin, type I cytoskeletal 10	57.7	422.1 (M:422.1)	7	10.7
MOES_MOUSE	Moesin	67.7	411.5 (M:411.5)	11	19.9
TBB4B_MOUSE	Tubulin beta-4B chain	49.8	390.1 (M:390.1)	9	21.6
ACON_MOUSE	Aconitate hydratase, mitochondrial	85.4	386.8 (M:386.8)	10	14.2
ACTN1_MOUSE	Alpha-actinin-1	103	377.9 (M:377.9)	9	10.9
TBA1C_MOUSE	Tubulin alpha-1C chain	49.9	366.6 (M:366.6)	7	24.5
TCPZ_MOUSE	T-complex protein 1 subunit zeta	58	357.3 (M:357.3)	8	18.1
LDHA_MOUSE	L-lactate dehydrogenase A chain	36.5	356.8 (M:356.8)	8	26.2
TALDO_MOUSE	Transaldolase	37.4	349.7 (M:349.7)	6	19.6
RS11_MOUSE	40S ribosomal protein S11	18.4	348.0 (M:348.0)	9	50
TCPA_MOUSE	T-complex protein 1 subunit alpha	60.4	345.6 (M:345.6)	9	19.2
TRFE_MOUSE	Serotransferrin	76.7	339.0 (M:339.0)	8	12.5
H4_MOUSE	Histone H4	11.4	338.4 (M:338.4)	6	42.7
HSP74_MOUSE	Heat shock 70 kDa protein 4	94.1	337.4 (M:337.4)	7	10.5
IGKC_MOUSE	Ig kappa chain C region	11.8	330.6 (M:330.6)	5	46.2
FINC_MOUSE	Fibronectin	272.4	329.6 (M:329.6)	9	6.1
TCPH_MOUSE	T-complex protein 1 subunit eta	59.6	322.6 (M:322.6)	10	24.8
K2C1_MOUSE	Keratin, type II cytoskeletal 1	65.6	317.9 (M:317.9)	5	5.2
RS18_MOUSE	40S ribosomal protein S18	17.7	312.2 (M:312.2)	7	34.2
H2B1C_MOUSE	Histone H2B type 1-C/E/G	13.9	305.6 (M:305.6)	5	38.1
GCAA_MOUSE	Ig gamma-2A chain C region, A allele...	36.4	305.4 (M:305.4)	7	30
K1C14_MOUSE	Keratin, type I cytoskeletal 14	52.8	296.3 (M:296.3)	6	14.7
RLA0_MOUSE	60S acidic ribosomal protein P0	34.2	293.1 (M:293.1)	6	24.9
MYOF_MOUSE	Myoferlin	233.2	291.9 (M:291.9)	7	4
RS3_MOUSE	40S ribosomal protein S3	26.7	289.0 (M:289.0)	7	32.5
SERA_MOUSE	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	56.5	288.2 (M:288.2)	7	17.3
H2A2C_MOUSE	Histone H2A type 2-C	14	287.6 (M:287.6)	6	36.4
EF1D_MOUSE	Elongation factor 1-delta	31.3	287.5 (M:287.5)	8	33.8
NDKB_MOUSE	Nucleoside diphosphate kinase B	17.4	284.1 (M:284.1)	5	40.1
EF1G_MOUSE	Elongation factor 1-gamma	50	283.4 (M:283.4)	7	16.5
RS3A_MOUSE	40S ribosomal protein S3a	29.9	281.8 (M:281.8)	7	22.7
ANXA5_MOUSE	Annexin A5	35.7	279.4 (M:279.4)	6	21.3
IMB1_MOUSE	Importin subunit beta-1	97.1	279.3 (M:279.3)	6	8.6
1433E_MOUSE	14-3-3 protein epsilon	29.2	274.4 (M:274.4)	6	21.2
ATPB_MOUSE	ATP synthase subunit beta,	56.3	271.8 (M:271.8)	7	19.1

mitochon...					
SPA3K_MOUSE	Serine protease inhibitor A3K	46.8	260.3 (M:260.3)	7	21.1
IGHG3_MOUSE	Ig gamma-3 chain C region	43.9	257.5 (M:257.5)	6	18.1
1433G_MOUSE	14-3-3 protein gamma	28.3	257.0 (M:257.0)	5	15.8
CISY_MOUSE	Citrate synthase, mitochondrial	51.7	256.8 (M:256.8)	5	9.7
ROA2_MOUSE	Heterogeneous nuclear ribonucleopro...	37.4	255.6 (M:255.6)	5	19.8
SERPH_MOUSE	Serpin H1	46.5	250.3 (M:250.3)	5	15.6
RSSA_MOUSE	40S ribosomal protein SA	32.8	249.4 (M:249.4)	4	22
HNRPU_MOUSE	Heterogeneous nuclear ribonucleopro...	87.9	248.7 (M:248.7)	5	7.1
EIF3B_MOUSE	Eukaryotic translation initiation f...	91.3	246.0 (M:246.0)	5	11.3
IQGA1_MOUSE	Ras GTPase-activating-like protein ...	188.6	243.6 (M:243.6)	6	4.8
RL7A_MOUSE	60S ribosomal protein L7a	30	240.5 (M:240.5)	6	23.3
ANXA4_MOUSE	Annexin A4	35.9	240.1 (M:240.1)	4	12.2
HVM21_MOUSE	Ig heavy chain V region M511	13.6	237.7 (M:237.7)	6	43.4
KV2A7_MOUSE	Ig kappa chain V-II region 26-10	12.3	232.9 (M:232.9)	2	31
THIL_MOUSE	Acetyl-CoA acetyltransferase, mitoc...	44.8	231.1 (M:231.1)	6	19.3
SFPQ_MOUSE	Splicing factor, proline- and gluta...	75.4	227.0 (M:227.0)	6	9.2
PROF1_MOUSE	Profilin-1	14.9	224.7 (M:224.7)	5	45
MTAP_MOUSE	S-methyl-5'-thioadenosine phosphory...	31	223.8 (M:223.8)	4	18.4
RS14_MOUSE	40S ribosomal protein S14	16.3	223.5 (M:223.5)	5	31.1
RL12_MOUSE	60S ribosomal protein L12	17.8	222.3 (M:222.3)	4	33.3
K22E_MOUSE	Keratin, type II cytoskeletal 2 epi...	70.9	221.7 (M:221.7)	4	4.5
TCPD_MOUSE	T-complex protein 1 subunit delta	58	221.2 (M:221.2)	7	19.7
IDHP_MOUSE	Isocitrate dehydrogenase [NADP], mi...	50.9	220.7 (M:220.7)	6	15.7
CLH1_MOUSE	Clathrin heavy chain 1	191.4	217.6 (M:217.6)	6	4.4
UAP1L_MOUSE	UDP-N-acetylhexosamine pyrophosphor...	56.6	217.3 (M:217.3)	6	12.8
COF1_MOUSE	Cofilin-1	18.5	210.9 (M:210.9)	3	27.1
HS105_MOUSE	Heat shock protein 105 kDa	96.3	210.2 (M:210.2)	4	5.9
ADT2_MOUSE	ADP/ATP translocase 2	32.9	210.1 (M:210.1)	5	16.8
A2M_MOUSE	Pregnancy zone protein	165.7	209.3 (M:209.3)	5	3.6
QCR2_MOUSE	Cytochrome b-c1 complex subunit 2, ...	48.2	206.0 (M:206.0)	3	9.7
H3C_MOUSE	Histone H3.3C	15.3	205.1 (M:205.1)	3	19.9
RAB7A_MOUSE	Ras-related protein Rab-7a	23.5	205.0 (M:205.0)	5	31.4
1433B_MOUSE	14-3-3 protein beta/alpha	28.1	202.8 (M:202.8)	5	20.3
MYO1C_MOUSE	Unconventional myosin-Ic	121.9	202.6 (M:202.6)	4	5.3
1433T_MOUSE	14-3-3 protein theta	27.8	202.1 (M:202.1)	4	22.9
ML12B_MOUSE	Myosin regulatory light chain 12B	19.8	201.1 (M:201.1)	4	23.8
C1TM_MOUSE	Monofunctional C1-tetrahydrofolate ...	105.7	200.2 (M:200.2)	7	9.1
PRDX2_MOUSE	Peroxiredoxin-2	21.8	196.9 (M:196.9)	5	31.3
PDIA1_MOUSE	Protein disulfide-isomerase	57	194.5 (M:194.5)	3	6.5
GSTA4_MOUSE	Glutathione S-transferase A4	25.5	194.1 (M:194.1)	4	19.4
K2C6A_MOUSE	Keratin, type II cytoskeletal	59.3	193.4 (M:193.4)	4	5.8

6A					
PHB_MOUSE	Prohibitin	29.8	192.8 (M:192.8)	4	18.8
RL23A_MOUSE	60S ribosomal protein L23a	17.7	192.8 (M:192.8)	4	29.5
PSA1_MOUSE	Proteasome subunit alpha type-1	29.5	192.6 (M:192.6)	4	16.7
RB11A_MOUSE	Ras-related protein Rab-11A	24.4	192.4 (M:192.4)	5	23.1
NPM_MOUSE	Nucleophosmin	32.5	191.3 (M:191.3)	3	14
SYEP_MOUSE	Bifunctional glutamate/proline--tRN...	170	191.1 (M:191.1)	4	3.4
FUBP2_MOUSE	Far upstream element-binding protei...	76.7	190.6 (M:190.6)	5	9.6
TCPG_MOUSE	T-complex protein 1 subunit gamma	60.6	190.6 (M:190.6)	6	10.8
CLIC1_MOUSE	Chloride intracellular channel prot...	27	188.6 (M:188.6)	5	36.5
GELS_MOUSE	Gelsolin	85.9	188.3 (M:188.3)	4	9.9
ATPO_MOUSE	ATP synthase subunit O, mitochondri...	23.3	186.7 (M:186.7)	4	16.9
6PGD_MOUSE	6-phosphogluconate dehydrogenase, d...	53.2	185.3 (M:185.3)	5	13.9
RUVB2_MOUSE	RuvB-like 2	51.1	184.8 (M:184.8)	5	12.7
PCNA_MOUSE	Proliferating cell nuclear antigen	28.8	184.4 (M:184.4)	4	25.3
RS4X_MOUSE	40S ribosomal protein S4, X isoform	29.6	184.4 (M:184.4)	5	17.9
PHB2_MOUSE	Prohibitin-2	33.3	180.4 (M:180.4)	5	16.4
KV5A3_MOUSE	Ig kappa chain V-V region K2	12.6	178.5 (M:178.5)	3	27.8
SF3A1_MOUSE	Splicing factor 3A subunit 1	88.5	178.2 (M:178.2)	4	8.7
RL40_MOUSE	Ubiquitin-60S ribosomal protein L40	14.7	176.6 (M:176.6)	5	38.3
LEG3_MOUSE	Galectin-3	27.5	176.4 (M:176.4)	5	25.8
KV3A8_MOUSE	Ig kappa chain V-III region PC 3741...	12.1	175.6 (M:175.6)	2	26.1
PA2G4_MOUSE	Proliferation-associated protein 2G...	43.7	175.6 (M:175.6)	5	16
UBQL2_MOUSE	Ubiquilin-2	67.3	175.3 (M:175.3)	4	8.8
H13_MOUSE	Histone H1.3	22.1	173.8 (M:173.8)	4	17.6
NACA_MOUSE	Nascent polypeptide-associated comp...	23.4	173.6 (M:173.6)	2	13.5
AATM_MOUSE	Aspartate aminotransferase, mitocho...	47.4	171.9 (M:171.9)	4	13
ROA3_MOUSE	Heterogeneous nuclear ribonucleopro...	39.6	169.8 (M:169.8)	2	8.4
GBLP_MOUSE	Receptor of activated protein C kin...	35.1	168.2 (M:168.2)	4	14.2
PPIB_MOUSE	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase...	23.7	167.3 (M:167.3)	4	19.9
PSA4_MOUSE	Proteasome subunit alpha type-4	29.5	166.9 (M:166.9)	4	17.6
GNAI2_MOUSE	Guanine nucleotide-binding protein ...	40.5	165.7 (M:165.7)	4	14.4
FUMH_MOUSE	Fumarate hydratase, mitochondrial	54.3	165.5 (M:165.5)	4	12.8
RL6_MOUSE	60S ribosomal protein L6	33.5	165.2 (M:165.2)	4	13.9
RS13_MOUSE	40S ribosomal protein S13	17.2	164.8 (M:164.8)	4	23.8
DDX17_MOUSE	Probable ATP-dependent RNA helicase...	72.4	164.4 (M:164.4)	3	6
LRC59_MOUSE	Leucine-rich repeat-containing prot...	34.9	164.4 (M:164.4)	4	11.1
RAB1B_MOUSE	Ras-related protein Rab-1B	22.2	163.6 (M:163.6)	4	22.4

TCPQ_MOUSE	T-complex protein 1 subunit theta	59.5	162.5 (M:162.5)	5	11.1
SYVC_MOUSE	Valine--tRNA ligase	140.1	161.1 (M:161.1)	4	4.6
PCBP1_MOUSE	Poly(rC)-binding protein 1	37.5	161.1 (M:161.1)	4	16.3
HNRPK_MOUSE	Heterogeneous nuclear ribonucleopro...	50.9	158.8 (M:158.8)	4	11.7
RL11_MOUSE	60S ribosomal protein L11	20.2	158.3 (M:158.3)	3	20.2
VDAC2_MOUSE	Voltage-dependent anion-selective c...	31.7	157.2 (M:157.2)	3	14.2
PEBP1_MOUSE	Phosphatidylethanolamine-binding pr...	20.8	156.6 (M:156.6)	3	28.3
SAHH_MOUSE	Adenosylhomocysteinase	47.7	155.3 (M:155.3)	4	10.2
PUF60_MOUSE	Poly(U)-binding-splicing factor PUF...	60.2	155.0 (M:155.0)	4	11.3
EIF3E_MOUSE	Eukaryotic translation initiation f...	52.2	153.8 (M:153.8)	4	8.3
AT2B1_MOUSE	Plasma membrane calcium-transportin...	134.7	153.4 (M:153.4)	3	3.3
YBOX1_MOUSE	Nuclease-sensitive element-binding ...	35.7	152.4 (M:152.4)	5	28.9
RAC1_MOUSE	Ras-related C3 botulinum toxin subs...	21.4	151.3 (M:151.3)	4	17.2
CO1A2_MOUSE	Collagen alpha-2(I) chain	129.5	150.1 (M:150.1)	4	5.4
RTN4_MOUSE	Reticulon-4	126.5	148.8 (M:148.8)	4	7.7
HNRPM_MOUSE	Heterogeneous nuclear ribonucleopro...	77.6	148.5 (M:148.5)	3	5.6
LAP2A_MOUSE	Lamina-associated polypeptide 2, is...	75.1	148.3 (M:148.3)	4	9.2
IF1AX_MOUSE	Eukaryotic translation initiation f...	16.5	147.1 (M:147.1)	3	18.1
IF2A_MOUSE	Eukaryotic translation initiation f...	36.1	145.8 (M:145.8)	3	14.3
SND1_MOUSE	Staphylococcal nuclease domain-cont...	102	143.7 (M:143.7)	4	5.8
EFTU_MOUSE	Elongation factor Tu, mitochondrial	49.5	143.5 (M:143.5)	3	10
MATR3_MOUSE	Matrin-3	94.6	140.9 (M:140.9)	3	5.8
RL27_MOUSE	60S ribosomal protein L27	15.8	139.1 (M:139.1)	3	20.6
TXND5_MOUSE	Thioredoxin domain-containing prote...	46.4	138.6 (M:138.6)	4	13.9
CALR_MOUSE	Calreticulin	48	138.6 (M:138.6)	4	12.7
HNRPF_MOUSE	Heterogeneous nuclear ribonucleopro...	45.7	137.2 (M:137.2)	3	11.8
EWS_MOUSE	RNA-binding protein EWS	68.4	135.0 (M:135.0)	2	5.8
VDAC1_MOUSE	Voltage-dependent anion-selective c...	32.3	134.7 (M:134.7)	3	17.2
NEDD4_MOUSE	E3 ubiquitin-protein ligase NEDD4	102.6	133.7 (M:133.7)	4	8.8
RS9_MOUSE	40S ribosomal protein S9	22.6	132.3 (M:132.3)	4	15.5
MBB1A_MOUSE	Myb-binding protein 1A	151.9	131.1 (M:131.1)	3	3.2
RL31_MOUSE	60S ribosomal protein L31	14.5	131.1 (M:131.1)	3	26.4
COR1C_MOUSE	Coronin-1C	53.1	130.6 (M:130.6)	2	5.5
SERC_MOUSE	Phosphoserine aminotransferase	40.4	129.3 (M:129.3)	3	8.4
SET_MOUSE	Protein SET	33.4	126.7 (M:126.7)	3	11.1
MAP4_MOUSE	Microtubule-associated protein 4	117.4	125.9 (M:125.9)	2	2.3
QCR1_MOUSE	Cytochrome b-c1 complex subunit 1, ...	52.8	125.2 (M:125.2)	2	4.4
F10A1_MOUSE	Hsc70-interacting protein	41.6	123.9 (M:123.9)	3	7.8

LEG1_MOUSE	Galectin-1	14.9	123.1 (M:123.1)	3	25.9
AT1A2_MOUSE	Sodium/potassium-transporting ATPas...	112.1	123.0 (M:123.0)	2	3.2
ACADL_MOUSE	Long-chain specific acyl-CoA dehydr...	47.9	121.9 (M:121.9)	2	4.7
RS19_MOUSE	40S ribosomal protein S19	16.1	121.5 (M:121.5)	3	17.2
ALDR_MOUSE	Aldose reductase	35.7	121.2 (M:121.2)	3	9.2
PSMD2_MOUSE	26S proteasome non-ATPase regulator...	100.1	121.2 (M:121.2)	3	4.5
PURB_MOUSE	Transcriptional activator protein P...	33.9	119.3 (M:119.3)	2	12
SPB6_MOUSE	Serpin B6	42.6	119.2 (M:119.2)	2	4.8
TPIS_MOUSE	Triosephosphate isomerase	32.2	119.2 (M:119.2)	3	12.7
EIF3L_MOUSE	Eukaryotic translation initiation f...	66.6	116.2 (M:116.2)	2	6.4
PGAM1_MOUSE	Phosphoglycerate mutase 1	28.8	115.7 (M:115.7)	2	13.8
CH10_MOUSE	10 kDa heat shock protein, mitochond...	11	114.5 (M:114.5)	2	23.5
DHB4_MOUSE	Peroxisomal multifunctional enzyme ...	79.4	113.1 (M:113.1)	2	3.4
IF4G1_MOUSE	Eukaryotic translation initiation f...	176	111.2 (M:111.2)	3	3.4
MIC60_MOUSE	MICOS complex subunit Mic60	83.8	111.1 (M:111.1)	3	5.8
PABP1_MOUSE	Polyadenylate-binding protein 1	70.6	110.5 (M:110.5)	3	5.8
RS16_MOUSE	40S ribosomal protein S16	16.4	107.8 (M:107.8)	2	12.3
RL22_MOUSE	60S ribosomal protein L22	14.7	107.5 (M:107.5)	2	19.5
AK1A1_MOUSE	Alcohol dehydrogenase [NADP(+)]	36.6	106.8 (M:106.8)	3	11.1
BTF3_MOUSE	Transcription factor BTF3	22	106.7 (M:106.7)	2	12.7
ANXA3_MOUSE	Annexin A3	36.4	106.6 (M:106.6)	3	10.5
MCM2_MOUSE	DNA replication licensing factor MC...	102	106.5 (M:106.5)	2	2.8
RAB5C_MOUSE	Ras-related protein Rab-5C	23.4	102.8 (M:102.8)	2	12
ACADS_MOUSE	Short-chain specific acyl-CoA dehyd...	44.9	100.7 (M:100.7)	3	9.2
EIF3A_MOUSE	Eukaryotic translation initiation f...	161.8	99.9 (M:99.9)	2	2
CO3_MOUSE	Complement C3	186.4	99.1 (M:99.1)	3	2.8
HVM51_MOUSE	Ig heavy chain V region AC38 205.12	12.9	99.1 (M:99.1)	2	28
PARK7_MOUSE	Protein deglycase DJ-1	20	98.8 (M:98.8)	2	7.4
RL8_MOUSE	60S ribosomal protein L8	28	98.6 (M:98.6)	2	10.5
NOMO1_MOUSE	Nodal modulator 1	133.3	98.2 (M:98.2)	2	2.5
FMR1_MOUSE	Synaptic functional regulator FMR1	68.9	97.4 (M:97.4)	2	3.4
RPN1_MOUSE	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--...	68.5	96.7 (M:96.7)	3	6.1
PSB6_MOUSE	Proteasome subunit beta type-6	25.4	96.4 (M:96.4)	2	8.8
GANAB_MOUSE	Neutral alpha-glucosidase AB	106.8	95.7 (M:95.7)	2	3.4
STRAP_MOUSE	Serine-threonine kinase receptor-as...	38.4	91.8 (M:91.8)	2	8.6
RS7_MOUSE	40S ribosomal protein S7	22.1	91.5 (M:91.5)	2	10.3
GALK1_MOUSE	Galactokinase	42.3	89.6 (M:89.6)	2	7.9
DNJA1_MOUSE	DnaJ homolog subfamily A member 1	44.8	87.9 (M:87.9)	2	6.3
PSD11_MOUSE	26S proteasome non-ATPase regulator...	47.4	86.1 (M:86.1)	2	4.5

VINC_MOUSE	Vinculin	116.6	85.4 (M:85.4)	2	2.1
OLA1_MOUSE	Obj-like ATPase 1	44.7	84.0 (M:84.0)	2	5.1
A1AT3_MOUSE	Alpha-1-antitrypsin 1-3	45.8	83.9 (M:83.9)	2	4.4

Lic. María Carolina Inda

Dr. Susana Silberstein Cuña

You made it there somehow

You're a big girl now