



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Carrera de Ciencias Biológicas

TESIS DE LICENCIATURA

Estudio de genes tempranos regulados por la actividad de CRHR1

Ignacio Dellavalle
Directora: Dra. Susana Silberstein
Directora asistente: Dra. Micaela Silbermins

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

Marzo 2024

Desde chico mi vida se encuentra atravesada por la ciencia con mi padre farmacéutico y mi madre profesora de biología, sin embargo, no fue hasta la secundaria que elegí esta carrera. Siempre supe que lo mío no era la parte sociales de la ciencia por lo que elegí la modalidad de naturales cuando pude, no sabía bien que quería hasta que la Dra. Tachella nos enseñó un video de como se realizaban copias del RNA mediante RT-PCR, en ese momento fue que dije que eso era lo que yo quería hacer en un futuro, aún sin saber, que gran parte de mi tesis iba a recaer sobre esta misma técnica. Quería utilizar este espacio para agradecer a todos los que estuvieron junto a mí durante este trayecto haciendo que sea posible lograr lo que a continuación discutiré.

Bien debería empezar por mi familia, a mi padre que me permitió estudiar sin preocuparme por nada más que esto y siempre me apoyó aún en momentos de muchísimo estrés, a mi madre que se que le hubiese encantado poder charlar con alguien sobre los temas que tanto sabía, a ambos por criarme de manera ejemplar y siempre apoyarme. A mis hermanos por bancarme en la convivencia en momentos donde todo está tenso y siempre esperarme cuando llegaba tarde de cursar o del laboratorio.

Obviamente a mis amigos: Los grupos facultativos que tuve desde el principio de la facultad, como a los que me adoptaron en el camino y te permiten que todo lo que es el estrés sea más ameno. A los que conocí en el IBioBA que me adoptaron desde un primer momento y siempre estuvieron con un chiste, con un mate, con soluciones, es difícil que el ambiente laboral sea bueno más cuando hay tanta gente involucrada.

Claramente a mis amigos fuera del ámbito facultativo también, los que traía desde el pueblo, que me acompañaron siempre y me preguntaron como me estaba yendo aunque estoy seguro de que nunca entendieron, ni creo entienden todavía, que es realmente lo que estudio. Sin ellos nada podría haber sido posible, son mi cable a tierra cuando quiero pensar en alguna otra cosa.

A mi novia que me banco siempre que estuve estresado con fechas de entregas de documentación, de la tesis, de estudio y siempre me dijo que iba a llegar. No podría haberlo hecho sin ella.

A la educación, secundaria y universitaria, pública; gratuita y de calidad. A todos los que sientan que debo agradecerles y no lo hice, seguramente me esté olvidando de gente y sea injusto. Por eso estas líneas son para ellos.

A Susana, que me dió el espacio y la oportunidad para desarrollar la tesis y dar mis primeros pasos en esto que tanto me gusta. A Mica, que me tuvo toda la paciencia del mundo explicándome mil veces las mismas cosas y guiándome en algo que yo nunca había hecho cómo era estar adentro de un laboratorio. También a Karen que me enseñó muchas cosas del manejo del laboratorio y le estoy muy agradecido.

Por último no quiero olvidarme de Lionel Andrés Messi, por enseñarme de resiliencia y hacerme tan feliz durante tantos años y sobre todo aquel diciembre de 2022.

Gracias a todos.

ÍNDICE

RESUMEN.....	5
INTRODUCCIÓN.....	9
CRH y la respuesta al estrés.....	10
CRH y su familia de péptidos relacionados.....	12
Receptores de CRH.....	12
Mecanismos de señalización de CRH.....	14
Activación de ERK1/2 mediada por la señalización de CRHR1.....	14
Endocitosis y su rol en la señalización de CRHR1.....	15
Señalización no canónica mediada por -arrestina.....	16
Genes tempranos y su relevancia en la señalización neuronal.....	17
Análisis transcriptómicos para el estudio de la vía CRH-CRHR1.....	18
OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....	22
MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
1. Cultivo celular.....	25
1.1 Línea celular.....	25
1.2 Mantenimiento de las líneas celulares en cultivo.....	25
1.3 Congelamiento y descongelamiento de la línea celular utilizada.....	25
2. Estímulos e inhibidores.....	26
2.1 Estímulos.....	26
2.2 Inhibidores.....	26
3. Extracción y análisis de RNA a partir de extractos celulares.....	26
3.1 Preparación de extractos celulares.....	26
3.2 Extracción de RNA.....	26
3.3 Cuantificación de RNA.....	27
3.4 Análisis de la integridad del RNA.....	27
4. Transcripción reversa y PCR.....	28
4.1 Transcripción reversa.....	28
4.2 PCR en tiempo real o cuantitativa.....	28
4.3 Primers utilizados.....	29
5. Herramientas para el análisis de los datos obtenidos en la secuenciación de RNA.....	30
5.1 Análisis de RNA-Seq.....	30
5.2 GSEA (https://www.gsea-msigdb.org/gsea/index.jsp).....	31
5.3 Molecular Signatures Database.....	31
5.4 Enrichr (https://maayanlab.cloud/Enrichr/).....	32
5.5 Metascape (https://metascape.org/gp/index.html#/main/step1).....	33
RESULTADOS.....	34
Utilización de herramientas bioinformáticas para el análisis de la expresión génica.....	35
Análisis de la calidad del RNA-Seq y perfil transcripcional global.....	35
Análisis del perfil transcripcional generado por la acción de CRH.....	38

Análisis del perfil transcripcional generado por la acción de MK.....	50
Análisis del perfil transcripcional generado por la acción de Dyngo.....	54
Síntesis de los resultados más relevantes obtenidos en los análisis de los perfiles transcripcionales.....	58
Elección de genes de interés, diseño y puesta a punto de primers para validar los datos obtenidos en el análisis del RNA-Seq.....	62
PCRs cuantitativas de los diferentes genes regulados por CRH; MK; o la combinación de estos.	67
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	75
Conclusiones generales.....	80
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	82

RESUMEN

El sistema de CRH presenta un rol central en la respuesta al estrés al permitir la integración de las respuestas neuroendocrina, autonómica y comportamental para mantener la homeostasis en un organismo. Este sistema se caracteriza por funcionar como activador de la respuesta endocrina al regular el eje Hipotalámico-Hipofisario-Adrenal (HPA), así como por participar en distintos circuitos extra hipotalámicos como neuromodulador.

La hormona liberadora de corticotropina (CRH) se caracteriza por presentar alta afinidad con el Receptor acoplado a proteína G (GPCR), CRHR1. La activación de este receptor permite generar a nivel intracelular AMP cíclico (cAMP) como segundo mensajero, el cual es capaz de iniciar diferentes cascadas de señalización. Los GPCRs son mediadores de las respuestas celulares a una gran cantidad de estímulos, lo que los convierte en blanco de estudio de nuevos fármacos para el tratamiento de muchas patologías. Aunque inicialmente se creía que la internalización del receptor se limitaba al apagado de la señal mediante un cambio conformacional y asociación con diferentes proteínas, hoy en día hay evidencia que demuestra que los GPCRs son capaces de señalizar también desde compartimentos intracelulares luego de la internalización del receptor. En particular, se vio que CRHR1 es capaz de continuar señalizando desde endosomas.

Desregulaciones en la vía de señalización de CRH-CRHR1, a nivel hipocampal, se han asociado al desarrollo de trastornos de depresión y ansiedad. AKT es una proteína de la familia de las serin/treonin quinasas la cual regula una gran variedad de funciones celulares incluyendo la supervivencia, metabolismo y la angiogénesis. En trabajos anteriores de nuestro laboratorio se vio que CRH activa la vía de AKT y por bibliografía se sabe que la desregulación de la vía de AKT en el cerebro puede llevar a varios desórdenes neuropsiquiátricos y neurodegenerativos.

Existen genes los cuales se regulan inmediatamente luego de una estimulación neuronal por lo que son utilizados en bibliografía como marcadores de circuitos neuronales activados los cuales se denominan genes tempranos (IEGs) y tienen como función la respuesta biológica de manera rápida. Con el objetivo de estudiar el perfil de expresión de genes tempranos inducido por la activación de CRHR1, se estudiaron los mismos mediante la técnica de RNA-Seq luego de 1h de estímulo con CRH 10 nM en células de la línea neuronal hipocampal HT22 que expresan de manera estable CRHR1 (HT22-CRHR1).

Se vió que 372 genes se encontraban regulados por la acción de CRH de los cuales 299 se encontraban regulados positivamente mientras que 73 se encontraban regulados negativamente. Por otra parte, de los genes inducidos por CRH 24 eran regulados al inhibir AKT, y de estos, 22 se encontraban antagonizados. Por último, se utilizó el inhibidor de endocitosis Dyno-4a el cual, por la concentración tóxica ensayada, no permitió obtener información transcripcional sobre el efecto de la endocitosis.

Se observó que los genes regulados por CRH se encontraban enriquecidos en *clusters* de vías esperables para la regulación de esta hormona como neurogénesis o regulación de la diferenciación celular como también en *clusters* novedosos como la cascada de MAPK quinasas o las vías de AP1/ATF2.

Por último se pudo corroborar la regulación de IEGs conocidos como cFos o Ddit4 y otros que son IEGs novedosos regulados por CRH como Nr4a2 sobre los que se realizaron RT-qPCRs con el fin de validar la transcriptómica obtenida a partir del RNA-Seq.

Abstract

Study of immediate early genes regulated by CRHR1 from endosomal compartments.

The CRH system plays a central role in stress response by allowing the integration of neuroendocrine, autonomic and behavioral responses to maintain homeostasis in an organism. This system is characterized by functioning as an activator of the endocrine response by regulating the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal (HPA) axis, as well as participating in different extra-hypothalamic circuits as a neuromodulator.

Corticotropin-releasing hormone (CRH) is characterized by having high affinity for the G protein-coupled receptor (GPCR), CRHR1. The activation of this receptor allows cyclic AMP (cAMP) to be generated intracellularly as a second messenger, which is capable of initiating different signaling cascades. GPCRs are mediators of cellular responses to a large number of stimuli, which makes them a target for the study of new drugs for the treatment of many pathologies. Although initially it was believed that receptor internalization was limited to turning off the signal through a conformational change and association with different proteins, today there is evidence that demonstrates that GPCRs are capable of signaling also from intracellular compartments after receptor internalization. In particular, it was seen that CRHR1 is capable of continuing signaling from endosomes.

Deregulations in the CRH-CRHR1 signaling pathway, at the hippocampal level, have been associated with the development of depression and anxiety disorders. AKT is a protein of the serine/threonine kinase family which regulates a wide variety of cellular functions including survival, metabolism and angiogenesis. In previous work from our laboratory it was seen that CRH activates the AKT pathway and from literature it is known that deregulations in this pathway can lead to various neuropsychiatric and neurodegenerative disorders.

There are genes which are regulated immediately after neuronal stimulation, which is why they are used in the literature as markers of activated neuronal circuits, which are called immediate early genes (IEGs) and whose function is the rapid biological response. With the aim of studying the profile of immediate early genes induced by CRHR1 activation, an RNA-Seq was performed after 1 h of stimulation with 10nM CRH in cells of the hippocampal neuronal line HT22 that stably expresses CRHR1 (HT22-CRHR1).

It was seen that 372 genes were regulated by the action of CRH from which 299 were positively regulated while 73 were negatively regulated. On the other hand, of the genes induced by CRH 24 were regulated by inhibiting AKT and of these 22 were antagonized. Finally the endocytosis inhibitor Dyngo-4a was used but due to the toxic concentration tested it did not allow us to obtain transcriptional information on the effect of endocytosis.

It was observed that the genes regulated by CRH were enriched in clusters of pathways expected for the regulation of this hormone such as neurogenesis or regulation of cell differentiation as well as in novel clusters such as the MAPK kinase cascade or the AP1/ATF2 pathways.

Finally, it was possible to corroborate the regulation of known IEGs as Fos or Ddit4 and others that are novel IEGs regulated by CRH such as Nr4a2 on which RT-qPCRs were performed in order to validate the transcriptomics obtained from the RNA-Seq.

INTRODUCCIÓN

CRH y la respuesta al estrés

El término “estrés” se utiliza para definir toda situación en la cual se da una “respuesta no específica del organismo ante cualquier demanda que se le imponga” y el mismo fue primero utilizado por Hans Selye hacia 1946 (Selye, 1946). Sin embargo, hasta hoy en día el término sigue sin encontrar una definición precisa y hay un consenso en que la respuesta al estrés es activada tanto por estímulos externos como internos los cuales producen cambios bioquímicos, funcionales y comportamentales inmediatos y a largo plazo necesarios para la supervivencia del individuo.

Una visión más actual suma a esta definición los factores genéticos y plantea que el riesgo de enfermedad está determinado por la predisposición genética y los factores ambientales. Esto hace que el estrés surja como el factor ambiental más prominente involucrado en la etiología de los trastornos psiquiátricos lo cual lleva a que la comunidad científica se dedique a su estudio de manera extensa (Deussing & Chen 2018).

El mantenimiento de la homeostasis en presencia de un estímulo que genere un estrés, tanto del medio interno como el externo, requiere de la activación de varios sistemas en conjunto con el fin de disminuir el efecto de este y estabilizar el organismo. Al conjunto de todo estos procesos se los conoce como respuesta al estrés (Kloet *et al.*, 2005).

La respuesta al estrés puede estar mediada por una gran variedad de moléculas (neurotransmisores; péptidos y hormonas) las cuales dependen del estímulo y pueden actuar temporal y espacialmente diferenciadas. La existencia de esta multiplicidad de mecanismos interconectados es lo que le permite al organismo generar una respuesta coordinada tal que pueda adaptarse a un ambiente dinámico (Joëls & Baram, 2009).

La hormona liberadora de corticotropina (CRH por su nombre en inglés, *corticotropin releasing hormone*) es un péptido de 41 aminoácidos aislado por Vale y sus colaboradores en 1981 a partir de extractos hipotalámicos (Vale *et al.*, 1981). En este aislamiento se destacó su capacidad de estimular la secreción de ACTH lo cual genera una activación del principal sistema neuroendocrino de respuesta al estrés, el eje hipotalámico-hipofisario-adrenal (HPA, por sus siglas en inglés) el cual en mamíferos es uno de los principales sistemas que median la respuesta al estrés (Figura 1). Frente a un estímulo estresante las neuronas co-secretan CRH junto con otras hormonas lo cual lleva a la liberación de corticotropina y ACTH donde esta última actúa a nivel de la corteza adrenal estimulando la síntesis y liberación de cortisol (en humanos) o corticosterona (en roedores) los cuales son los glucocorticoides (GC) que median la respuesta final al estrés y ejercen un feedback negativo tanto a nivel de la hipófisis como hipotalámico tal que se cierre el sistema.

La acción de los GC puede darse a través de dos tipos de receptores: Los mineralocorticoides (MR), de mayor afinidad, y los receptores de glucocorticoides (GR) donde los primeros son importantes durante el comienzo de la respuesta mientras que la activación de los segundos es necesaria para la recuperación de la homeostasis, en las neuronas del sistema límbico (Kloet *et. al.*, 2005).

CRHR1 activation effects

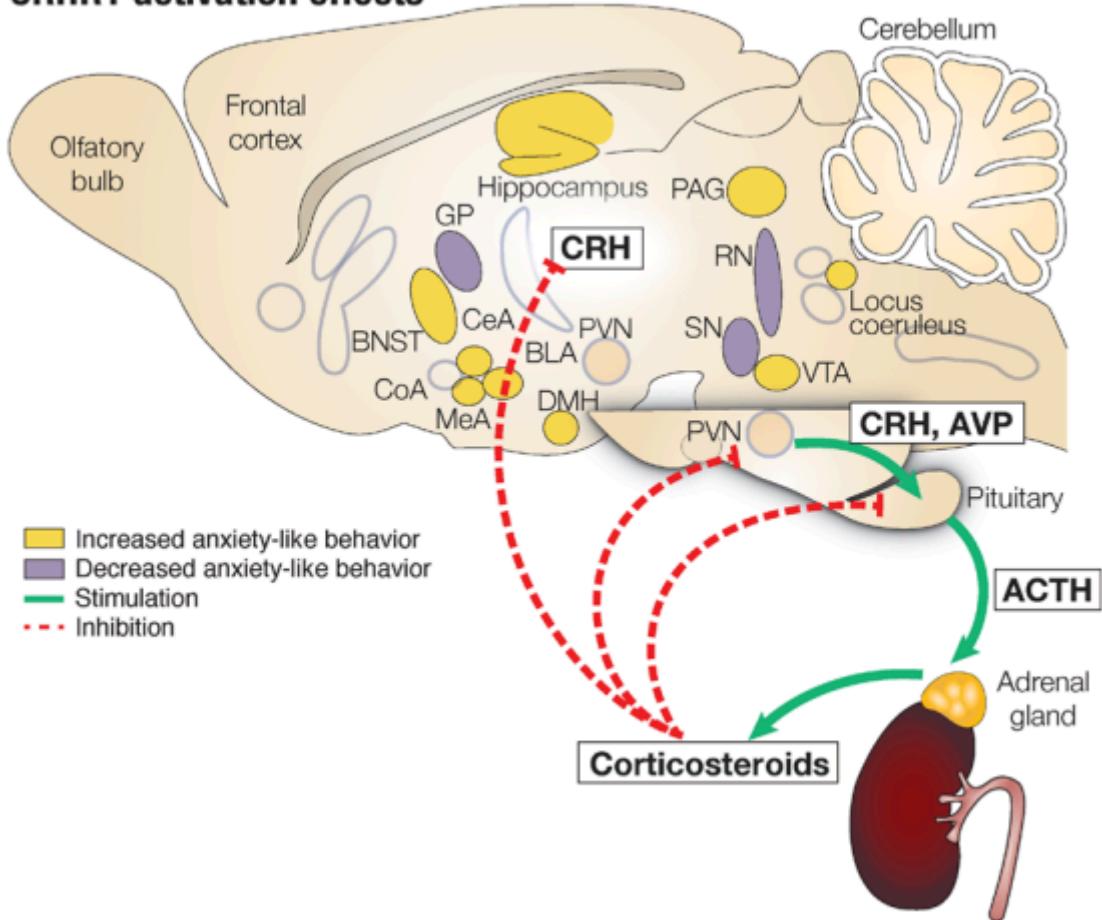


Figura 1. Eje HPA y la respuesta integrada al estrés.

CRH dirige la activación de la respuesta endocrina y comportamental frente al estrés a través del CRHR1. El eje HPA representa la principal respuesta endocrina. CRH es producida en las neuronas parvocelulares del núcleo paraventricular del hipotálamo y secretada al sistema porta para activar la síntesis de POMC en la hipófisis anterior y su procesamiento a ACTH, entre otros productos. ACTH estimula la secreción de Glucocorticoides (GC) -corticosterona en roedores y cortisol en humanos principalmente- desde la corteza adrenal. El sistema de CRH actúa a nivel del SNC, activando la respuesta conductual aguda frente al estrés *fight or flight*. La respuesta al estrés además tiene un componente más lento que promueve la adaptación y la recuperación de la homeostasis. *Tomado de Inda 2017, Endocrine Connections.* BLA, amígdala basolateral; BNST, núcleo del lecho de la estría terminal; CeA, núcleo central de la amígdala; CoA, núcleo cortical de la amígdala; DMH, hipotálamo dorsomedial; GP, globo pálido; MA, núcleo medial de la amígdala; PAG, periaqueductal gris; PVN, núcleo paraventricular del hipotálamo; RN, núcleo de rafe; SN, sustancia negra; VTA, área tegmental ventral.

Estudios recientes han demostrado que, además de su rol en el eje HPA, CRH tiene una actuación preponderante en la modulación de la respuesta hipocampal al estrés. El sistema límbico (hipocampo y amígdala extendida) participa del procesamiento de estímulos multimodales, el aprendizaje, la memoria y el comportamiento. En ratones a los cuales se les delecionó el receptor de CRH en estructuras límbicas se observó comportamiento ansioso (Müller *et al.*, 2003), y se describió además un rol del receptor en la neurogénesis del giro dentado independiente de su rol en los procesos mediados por estrés (Koutmani *et al.*, 2019).

Hoy en día se sabe que CRH tiene un papel principal en la respuesta al estrés al permitir la integración de las respuestas neuroendocrina, autonómica y comportamental para mantener la homeostasis en un organismo (*Arborelius et al., 1999*). Se ha visto que el mecanismo de señalización de CRH se encuentra desregulado en trastornos asociados al estrés como ansiedad y depresión (*Holsboer & Ising, 2010*).

CRH y su familia de péptidos relacionados

CRH es un péptido de 41 aminoácidos producto del clivaje proteolítico de un precursor de 192 aminoácidos en su extremo carboxilo-terminal, seguido de una amidación de dicho extremo (*Dautzenberg & Hauger, 2002*) (Figura 2-a). A su vez, CRH ha sido relacionado estructuralmente con otra familia de péptidos análogos denominados Urocortinas (UCNs). Donde UCN1, UCN2 y UCN3 son las que se expresan en mamíferos.

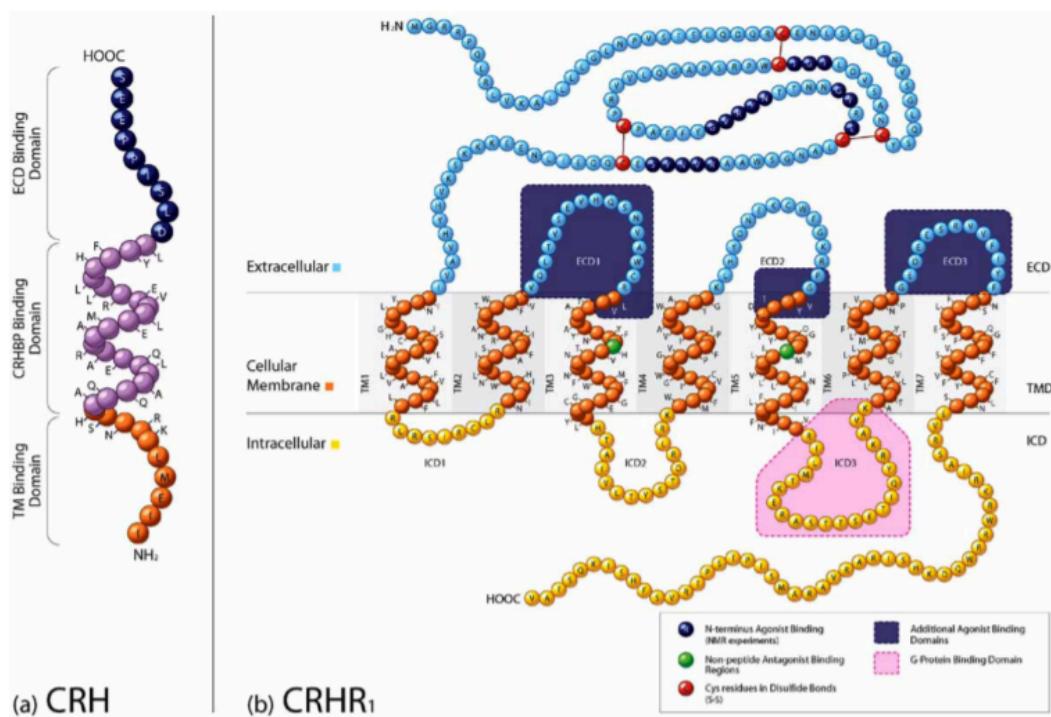


Figura 2. Estructura de CRH y el receptor CRHR1.

- Estructura del péptido de CRH con las diferentes regiones que entran en contacto con el receptor CRHR1.
- Estructura del GPCR CRHR1 en la que se observan los dominios extracelulares (ECD), transmembrana (TCD) e intracelulares (ICD). Se identifican cisteínas formando puentes di-sulfuros (rojo), regiones relevantes de unión al ligando (azul), sitios de unión de antagonistas no peptídicos (verde) y la región crítica para la transducción de señales por proteína G (rosa). Figura extraída de *Hemley et al., 2007*.

Receptores de CRH

CRH ejerce su acción a través de receptores de siete pasos transmembrana acoplados a proteína G (GPCR, por sus siglas en inglés) que son los responsables de la consecuente señalización celular. En

particular CRH presenta alta afinidad con el GPCR CRHR1 (*Bale & Vale, 2004*). Por otra parte, en cuanto a los péptidos relacionados a CRH, las UCNs: la UCN1 puede unirse con similar afinidad tanto a CRHR1 como a CRHR2 (el cual presenta un 70% de homología con CRHR1, aunque codificado en otro gen), mientras que UCN2 y UCN3 presentan mayor afinidad por CRHR2 (*Hillhouse & Grammatopoulos, 2006*).

CRHR1 presenta diferentes variables de *splicing* donde una sola es funcional (*Hemley, 2007*) y se denomina CRHR1 α , esta posee entre 415 y 420 aminoácidos, con 7 pasos transmembrana y 5 sitios de N-glicosilación (Figura 2-b).

La distribución de CRHRs es heterogénea a nivel del sistema nervioso central (SNC) (Figura 3). Por un lado, CRHR1 posee una amplia distribución, expresándose en el hipotálamo, en neuronas glutamatérgicas de la corteza y el hipocampo, en neuronas GABAérgicas del núcleo reticular talámico, el globo pálido y el septum, en neuronas dopaminérgicas de sustancia negra, pars compacta y área ventral tegmental y, en una menor proporción, en neuronas serotoninérgicas del núcleo de rafe (*Korosi & Baram, 2008; Refojo et al., 2011; J. Reul & Holsboer, 2002; Van Pett et al., 2000*), mientras que, la expresión de CRHR2 se restringe al hipotálamo, septum lateral, amígdala, rafe dorsal y estría terminal (*Korosi & Baram, 2008*). Esta diferencia de expresión entre los receptores a nivel del SNC podría estar vinculado a los diferentes efectos asociados al sistema de CRH (*Korosi & Baram, 2008; J. Reul & Holsboer, 2002*).

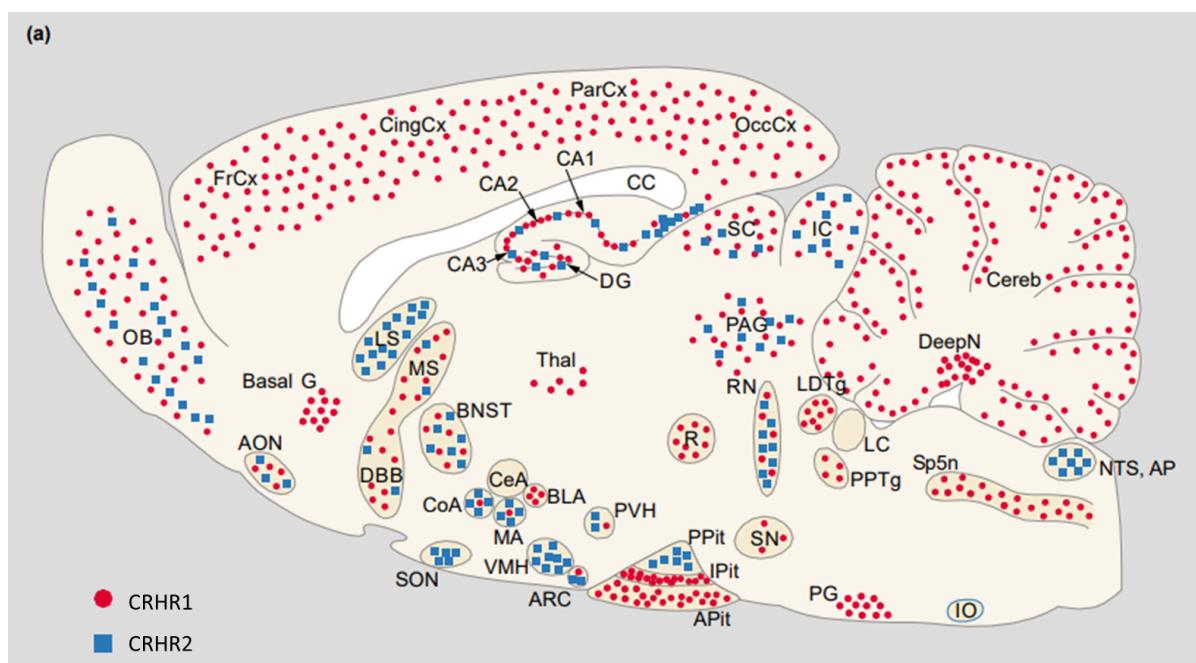


Figura 3. Distribución de los CRHRs en el SNC

Representación de la distribución de los CRHRs en un corte sagital de cerebro de ratón. Cada color representa un tipo de receptor (CRHR1=rojo; CRHR2=azul). Abreviaturas: AON, Núcleo olfatorio anterior; AP, área postrema; APit, pituitaria anterior; ARC, núcleo arcuato; Basal G, ganglio basal; BLA, amígdala basolateral; BNST, núcleo del lecho de la estría terminal; CA1-3, áreas CA1-3 del hipocampo; CC, cuerpo calloso; CeA, núcleo central amigdalino; Cereb, cerebelo; CingCx, corteza cingulada; CoA, núcleo cortical amigdalino; Deep N, núcleo profundo; DG, giro dentado; DBB, banda diagonal de Broca; FrCx, corteza frontal; IC, colículo inferior; IPit, parte intermedia de la glándula pituitaria; LC, locus ceruleus; LDTg, núcleo tegmental

laterodorsal; MA, amígdala medial; NTS, núcleo del tracto solitario; OB, bulbo olfatorio; OccCx, corteza occipital; ParCx, corteza parietal; PG, sustancia gris pontina; PPit, pituitaria posterior; PPTg, núcleo tegmental pedunculopontino; PVH, hipotálamo paraventricular; R, núcleo rojo; RN, núcleo de rafe; SC, colículo superior; SN, sustancia negra; SON, núcleo supraópitco; SP5n, núcleo espinal del trigémino; Thai, tálamo; VMH, núcleo hipotalámico ventromedial. Obtenido y modificado de *Reul et al.*, (2002).

Mecanismos de señalización de CRH

El receptor CRHR1 se encuentra acoplado a proteína G y su activación permite generar a nivel intracelular AMP cíclico (cAMP) como segundo mensajero, el cual es capaz de iniciar diferentes cascadas de señalización. Los GPCRs son los mediadores de las respuestas celulares a una gran cantidad de estímulos, por lo cual la transducción de señales río abajo de estos es dependiente de ligando y contexto celular (*Arzt & Holsboer, 2006*). Entre los componentes que se han observado asociados a las cascadas de señalización de CRH se incluyen EPACs, PKC, PKB/Akt, ERK1/2 y p38, así como otras moléculas como Ca²⁺, óxido nítrico sintasa, guanilil ciclase, prostaglandinas, kinasa Rho/RhoA y Fas/Fas ligando, demostrando la complejidad de las redes de transducción de señales *activadas por CRHR1* (*Hauger et al., 2006; Hillhouse & Grammatopoulos, 2006*).

Activación de ERK1/2 mediada por la señalización de CRHR1

Dependiendo del contexto celular, los CRHRs, son capaces de activar las MAP quinasas (MAPKs, del inglés *Mitogen Activated Protein Kinases*) ERK 1/2. ERK 1/2 están ampliamente distribuida en diversos tipos celulares y son reguladores centrales de los procesos moleculares involucrados en la plasticidad neuronal relacionada con el aprendizaje, la memoria y la respuesta al estrés (*Mazzucchelli & Brambilla, 2000; Thomas & Huganir, 2004*). Se ha establecido una relación entre la producción de cAMP y la activación de ERK 1/2 en sistemas neuroendocrinos o neuronales (*Holsboer, 2000; Kovalovsky et al., 2002; Van Kolen et al., 2010*).

Desregulaciones en la vía de señalización de CRH-CRHR1, a nivel hipocampal, se han relacionado al desarrollo de trastornos de depresión y ansiedad. Asimismo, se comprobó que el estrés crónico genera daños en las funciones hipocampales, la disminución en la plasticidad sináptica y alteraciones en la memoria (*Maras & Baram, 2012*). Por estas razones, comprender las vías de señalización de CRH-CRHR1 permitiría identificar posibles blancos terapéuticos para el tratamiento de las fisiopatologías vinculadas al estrés.

Nuestro grupo ha utilizado como modelo neuronal las células HT22-CRHR1 para comprender la vía de señalización de CRH-CRHR1 en la región hipocampal. Las células HT22 son una línea celular inmortalizada de hipocampo de ratón generada a partir de la línea celular HT-4, la cual a su vez fue generada a partir de un cultivo primario de hipocampo de ratón. Luego a partir de la línea HT22 se generaron clones estables que expresen el receptor 1 de CRH (CRHR1), dado que endógenamente no expresan ni este ni el receptor 2 de CRH (CRHR2) (Tesis Doctoral Bonfiglio, 2013), generando las células utilizadas durante todo el trabajo denominadas HT22-CRHR1.

Se ha evidenciado que el perfil de activación de ERK 1/2 es bifásico, con un primer pico entre los 3 y 6 minutos luego de la estimulación con CRH y una segunda fase que permanece activada hasta los 60 minutos desde la estimulación (*Bonfiglio et al., 2013*).

Activación de la vía de AKT

En trabajos recientes, realizados por nuestro grupo, se ha demostrado que la proteína AKT también se activa en respuesta al estímulo con CRH, dependiendo de cAMP y de la endocitosis del receptor (Tesis Doctoral dos Santos Claro, 2022). El estudio de la señalización de AKT ha demostrado que esta quinasa regula una gran variedad de procesos celulares en diferentes contextos debido a su capacidad de activar múltiples sustratos en paralelo, algunos de los cuales son nodos centrales de señalización. En neuronas, la señalización de AKT está involucrada en procesos como el crecimiento, la polaridad, la plasticidad sináptica y la conectividad por lo que su acción influencia el desarrollo y función cerebral (Brunet, 1999; Datta, 2000). También se vió que la desregulación de la vía de AKT en el cerebro puede llevar a varios desórdenes neuropsiquiátricos y neurodegenerativos (Lipton & Sahin, 2014).

Endocitosis y su rol en la señalización de CRHR1

Según el modelo clásico, la señalización mediada por proteína G ocurre desde la membrana plasmática y finaliza a través de un mecanismo que involucra la internalización del receptor. En células HT22-CRHR1 se observó que, aproximadamente a los 5 minutos del agregado de CRH, una cantidad significativa del receptor era internalizado y se mantenía constante por aproximadamente 30 minutos (*Inda et al., 2016*). Como se mencionó anteriormente, el modelo clásico de señalización mediado por proteína G plantea que la internalización del receptor genera un apagado del mismo, sin embargo, evidencias recientes llevaron a plantear un nuevo modelo en el que la endocitosis del receptor lleva a señalización desde compartimientos intracelulares (Figura 4) de esta manera la célula puede regular la duración y localización de eventos de señalización intracelulares (*Sigismund et al., 2012; von Zastrow & Sorkin, 2021*).

Como se mencionó previamente, se ha evidenciado que el perfil de activación de ERK 1/2 es bifásico, con un primer pico entre los 3 y 6 minutos luego de la estimulación con CRH y una segunda fase activada hasta 60 minutos post- estimulación (*Bonfiglio et al., 2013*). Se ha probado que a nivel hipocampal existen al menos dos mecanismos distintos que median la activación de ERK 1/2, uno dependiente de la activación del receptor desde la membrana plasmática y de la proteína B-Raf y otro regulado por la internalización de CRHR1 y β-arrestina2 (*Bonfiglio et al., 2013*).

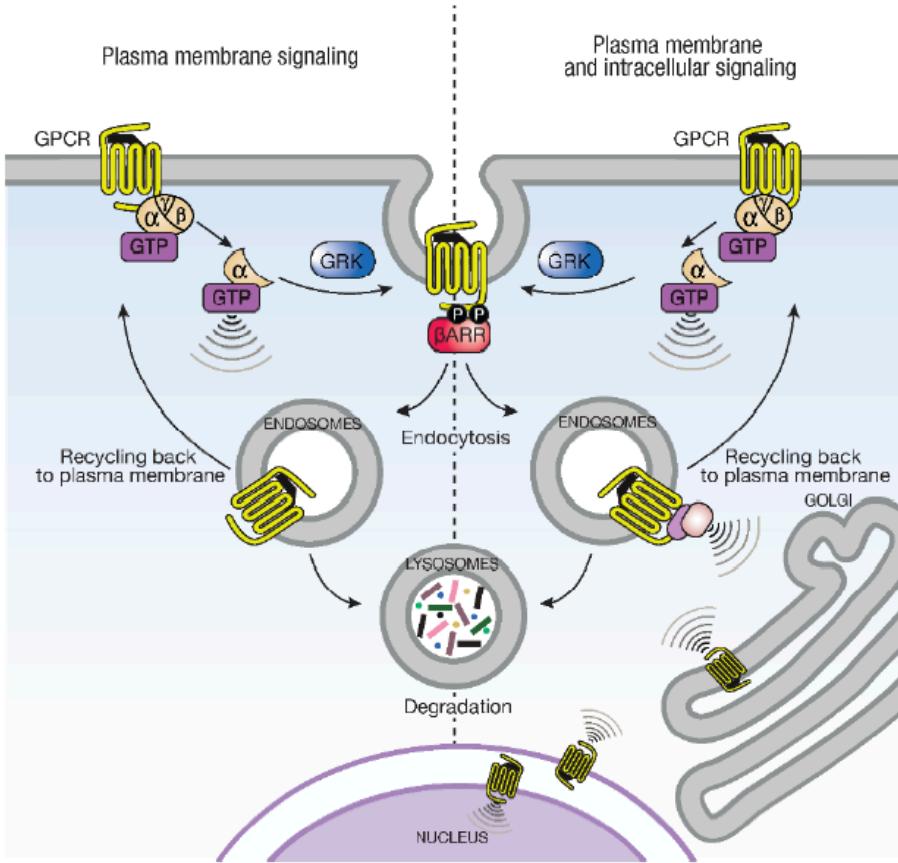


Figura 4. Señalización tras la activación de los GPCRs

Esquema que compara la señalización de los GPCRs activados desde membrana (izquierda), con la señalización que proviene tanto desde membrana como intracelularmente (derecha) donde para CRHR1 por ahora se ha descrito que es capaz de señalizar intracelularmente desde endosomas. En ambos casos se observa la internalización del receptor.

Inicialmente se consideraba que la endocitosis del receptor, en el que participa β-arrestina (βARR), se debía a un proceso de desensibilización de la respuesta a CRH, en el que los GPCRs se distribuían en compartimentos subcelulares para remover el ligando y ser reciclados al volver a membrana o degradarse mediante la acción de los lisosomas (Izquierda). Actualmente se sabe que el receptor internalizado puede continuar con la señalización desde los compartimentos intracelulares los cuales podrían contar con microdominios capaces de favorecer la emisión de señales (derecha). Extraído de Tesis Doctoral dos Santos Claro, 2022.

Señalización no canónica mediada por β-arrestina

Algunos estudios han identificado una interacción fuerte entre los GPCRs, como el receptor β-2 adrenérgico (β-2AR) o el receptor V2 de vasopresina (V2R), y las β-arrestinas favoreciendo una internalización estable del receptor y sostenida en el tiempo (R H Oakley et al., 1999; Robert H. Oakley et al., 2000). El hecho que existieran internalizaciones estables de estos receptores vinculadas a compartimentos endosomales, así como que β-arrestina fuera capaz de interactuar con otros componentes intracelulares como proteínas de andamiaje; MAPK o proteínas de tráfico celular, permitió plantear que dichos GPCRs continuaban señalizando luego de ya internalizados y que esta señalización era independientemente de la proteína G inicialmente activada desde membrana.

De esta forma, las β-arrestinas permitirían formar plataformas de señalización, donde estas funcionen como intermediarias para que se dé la interacción entre proteínas necesarias para la señalización con los GPCRs tal que pueda darse la misma. Dicha idea fue comprobada por algunos estudios con los receptores β-2AR y el receptor de cannabinoides humano (CB1R), en los que se demostró que proteínas MAPKs, como ERK1/2, pueden activarse mediante un mecanismo dependiente de las β-arrestinas en el que se produce una fase tardía y sostenida de señalización (Reiter et al., 2012).

A partir de estos resultados, los diferentes estudios realizados demostraron que la respuesta de algunos GPCRs, como el receptor V1a o el V2 de vasopresina como también receptores de angiotensina II de tipo 1a, puede ser activada desde la membrana o desde endosomas, dependiendo del tipo de receptor y de la interacción que tenga con las β-arrestinas (Terrillon & Bouvier, 2004; Tohgo et al., 2002)

CRHR1, siendo un GPCR, presenta este tipo de interacción donde la fosforilación de las colas citoplasmáticas mediada por las proteínas quinasas de los receptores acoplados a proteína G (GRKs, por sus siglas en inglés) permiten la unión de las β-arrestinas tal que el receptor es internalizado a endosomas tempranos en un mecanismo dependiente de dinamina y clatrina (Moore et al., 2007). Esto llevó a que estudios realizados en nuestro laboratorio demostraran que en células hipocampales HT22-CRHR1 el bloqueo de la endocitosis de CRHR1 mediado por el inhibidor Dyngo-4a redujo la activación de las cascadas de señalización dependientes de los niveles de cAMP, como ERK 1/2 y AKT (Inda 2017, Scientific Reports; dos Santos Claro, manuscrito) lo cual demuestra que, a nivel hipocampal, la señal inducida por la activación de CRHR1 continúa tras la internalización del receptor y depende de β-arrestinas.

Genes tempranos y su relevancia en la señalización neuronal.

La estimulación de las neuronas tiene como resultado respuestas las cuales pueden variar desde fracciones de segundos hasta horas o días. Entre las inmediatas, destaca la expresión rápida y transiente de genes cuyos mRNA poseen vida media corta denominados “inmediatos” (IEGs) (Robertson, 1992), los primeros IEGs fueron encontrados buscando genes relacionados con factores de crecimiento. Entre sus características principales se encuentra que los mismos tienen una expresión baja en células quiescentes la cual aumenta rápidamente luego de un estímulo, sin necesidad de la síntesis proteica y, la mencionada anteriormente, donde el tiempo de vida de estos mRNA es muy corto por lo que su regulación está muy controlada (Stiles et al, 2014, Bahrami & Drabløs 2016).

Además de por lo mencionado anteriormente, la relevancia de estos genes radica en que el *pool* de IEGs que se transcribe depende del estímulo fisiológico lo cual permitiría conferir especificidad de respuesta a la célula frente a diferentes estímulos (Dragunow, 1989) y que tienen un rol fundamental en diferentes procesos biológicos como lo es la respuesta al estrés, la diferenciación celular (Bahrami & Drabløs 2016), la sinapsis o la plasticidad neuronal (Das, 2023).

Más aún, estos genes, han sido ampliamente utilizados en el mapeo de redes neuronales (Kubik, 2007) y como señal de activación de estas (Yang, 2024; Choi, 2020).

Los IEGs pueden tener efectos a corto plazo ya que sus proteínas derivadas pueden propiciar segundas y terceras rondas de transcripción dado que cuentan con actividad de unión al ADN, algunas con dominios del tipo *zinc-finger*, y pueden tanto activar como reprimir directa e indirectamente la expresión de genes con una duración más prolongada denominados “Genes efectores tardíos” (Dragunow, 1989). Es por esto que hoy en día son considerados un tercer mensajero dado que se encuentran río abajo de la activación de segundos mensajeros (cAMP; Ca^{2+} ; P_i ; entre otros).

Por otra parte pueden contar con actividad a largo plazo donde un sostenimiento de la expresión de algunos IEGs, los cuales son proto-oncogenes, puede llevar a efectos en el crecimiento celular (Bahrami & Drabløs 2016) o a la generación de proteínas reguladoras del citoesqueleto ya que muchos codifican para este tipo de proteínas (Lee, 2016; Egbenya, 2023).

Se vió que una de las principales vías involucradas en la inducción de los genes tempranos es la vía de cAMP/PKA/CREB, la cual es una de las vías de señalización del sistema CRH (Ginty, 1991) y que la vía de MAPK/ERK, mediante la unión específica a activadores transcripcionales como SRF o la fosforilación de Elk-1, lleva a la activación de *enhancers* en cultivos primarios de neuronas de la corteza cerebral de ratones (Tyssowski, 2018).

Análisis transcriptómicos para el estudio de la vía CRH-CRHR1

En la actualidad existen métodos rápidos que permiten realizar un análisis transcripcional del RNA. Estos se conocen como “Secuenciación de Nueva Generación” (NGS, por sus siglas en inglés) y tienen la particularidad que permiten la secuenciación de grandes volúmenes de material genético en poco tiempo y a un costo relativamente bajo (Behjati & Tarpey, 2013).

Previamente en nuestro laboratorio se estudió la primera etapa de señalización río abajo de la activación de CRHR1. Con el objetivo de complementar dicha investigación mediante el estudio de la regulación de los IEGs río abajo de esta señalización, y estudiar el papel de la endocitosis en la respuesta transcripcional mediada por el sistema CRH-CRHR1, en trabajos anteriores del laboratorio se obtuvieron muestras las cuales se mandaron a secuenciar a fin de poder analizar el perfil de expresión de genes tempranos mediante la técnica de RNA-Seq. La técnica consiste en extraer RNA de las células, fragmentarlo y utilizarlo como molde en la generación de bibliotecas de DNA copia (cDNA). Estas bibliotecas se generan a partir de utilizar adaptadores en los extremos de cada fragmento de RNA que le permiten unirse al secuenciador según su complementariedad (Figura 5).

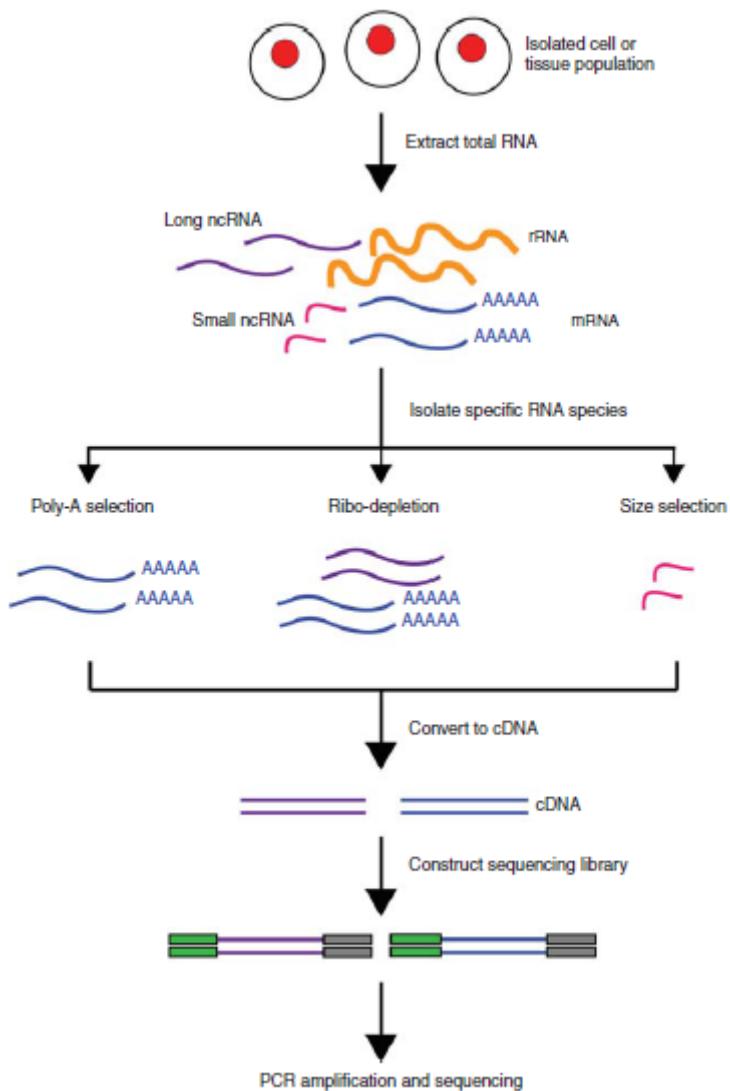


Figura 5. Detalle de la metodología a seguir al realizar un RNA-Seq

Esquema de la construcción de una biblioteca de RNA-Seq. El RNA total es extraído de células, el RNA mensajero (mRNA) se fragmenta y utiliza para generar los cDNAs los cuales se les agregan adaptadores que permitan la generación de una biblioteca. Por último las secuencias en las bibliotecas se alinean contra los genomas de referencia mediante herramientas bioinformáticas. Extraído de Kukurba, 2015.

Una vez obtenidas las bibliotecas de cDNA, se alinean sus lecturas a genomas de referencia y los resultados se analizan mediante herramientas bioinformáticas que permiten la comparación entre diferentes tratamientos y, mediante la expresión diferencial, evaluar los niveles de expresión de cada gen.

Las muestras se prepararon a partir de células HT22-CRHR1 bajo diferentes condiciones experimentales: Vehículo o estimulada con CRH, en presencia o ausencia del inhibidor de endocitosis Dyngo-4a (Dyngo) y en presencia o ausencia del inhibidor de AKT MK2206 (MK). Los controles de los experimentos realizados a partir del análisis de los perfiles de activación de proteínas efectoras de la vía de CRH-CRHR1, ERK1/2 y AKT, demostraron que tanto el estímulo como los inhibidores funcionaron correctamente (Figura 6). En la Figura 6-A se observa un aumento de la fosforilación de ERK 1/2 a los 5 y 10 minutos al bloquear la internalización con Dyngo comparando

con las células control debida, a que como se comentó anteriormente, se ha probado que a nivel hipocampal existen al menos dos mecanismos distintos que median la activación de ERK 1/2, uno dependiente de la activación del receptor desde la membrana plasmática y de la proteína B-Raf y otro regulado por la internalización de CRHR1 y β-arrestina2 (Bonfiglio *et al.*, 2013) por lo que al bloquear la endocitosis el receptor podría seguir señalizando desde membrana llevando a un aumento de esta proteína fosforilada.

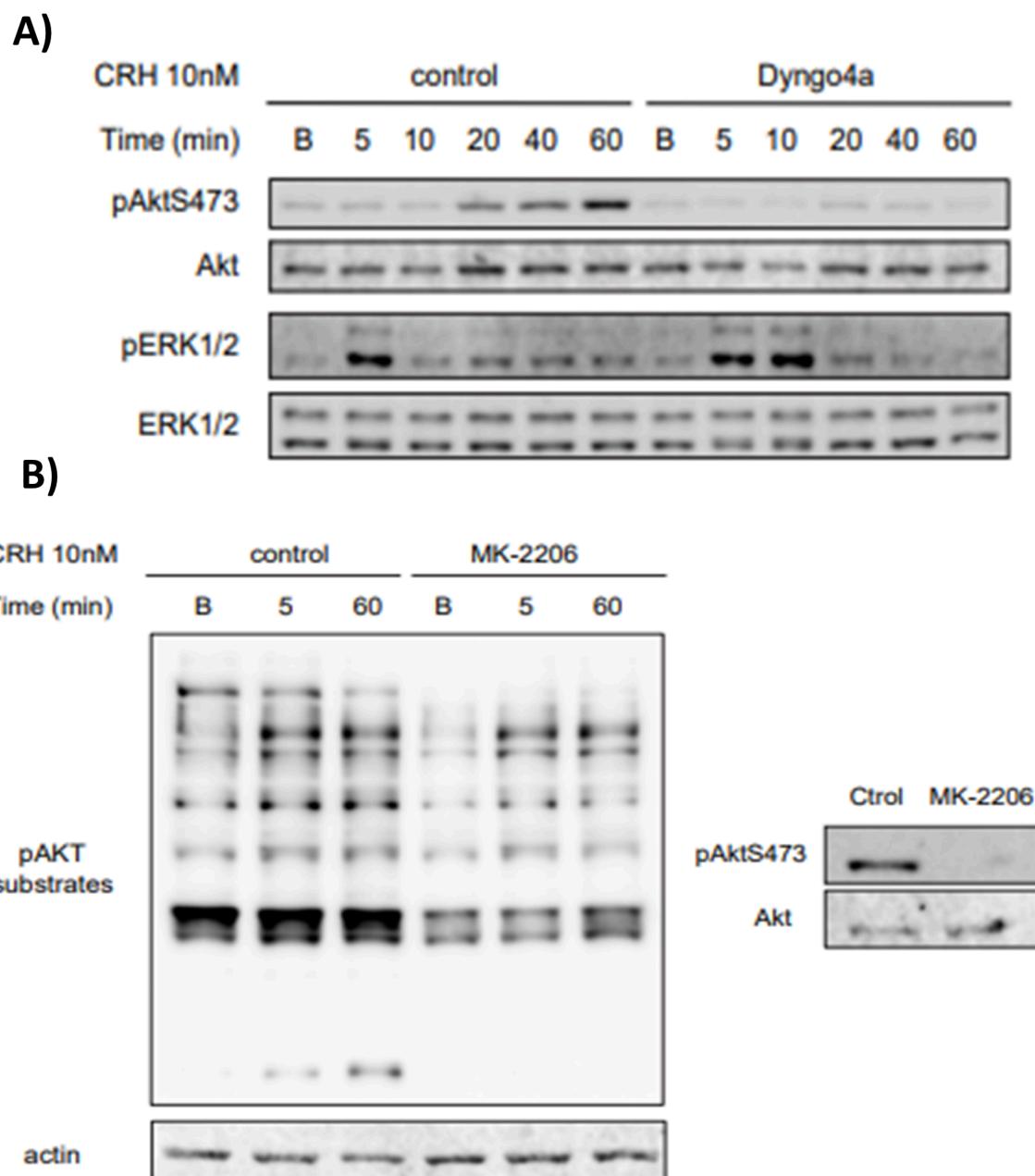


Figura 6. A) Perfil de activación de diferentes efectores de la vía CRH-CRHR1.

A) Células HT22-CRHR1 se preincubaron con el inhibidor de endocitosis Dyngo en concentración 30 μ M o el vehículo durante 20 minutos y posteriormente fueron estimuladas con CRH 10nM durante los tiempos indicados en cada columna. Los niveles de pAKT; AKT; pERK1/2 y ERK1/2 fueron determinados mediante *Immunoblotting*. B) Células HT22-CRHR1 se preincubaron con el inhibidor de AKT MK-2206 en concentración 10 μ M o el vehículo durante 20 minutos y posteriormente fueron estimuladas con CRH 10nM durante los

tiempos indicados en cada columna. Los niveles de pAKT; AKT; y los sustratos de pAKT fueron determinados mediante *Western Blot*. Manuscrito Paula dos Santos Claro.

OBJETIVOS E HIPÓTESIS

Estudios previos realizados por nuestro grupo demostraron que, en un contexto hipocampal, existe una señalización sostenida de CRHR1 basada en la separación espacial de las respuestas temporales y se realizó un RNA-Seq en el cual se estimula con CRH, se bloquea la endocitosis o la activación de AKT, una proteína efectora río abajo de la internalización del receptor, a fin de determinar las diferencias en expresión génica reguladas por cada paso.

La expresión de genes tempranos (IEGs) es rápida y selectivamente regulada en grupos específicos de neuronas del sistema nervioso central teniendo lugar, su inducción, en poblaciones neuronales sometidas a modificaciones de su plasticidad. Esto permite utilizar dichos genes como marcadores indirectos de la actividad neuronal.

Por todo esto, el objetivo general del trabajo consiste en estudiar el perfil de activación de los IEGs provocado por la señalización del sistema de CRH desde compartimientos intracelulares, mediado o no por AKT y su posible implicancia en las funciones hipocampales.

Concretamente, se propone:

- Identificar los IEGs y procesos biológicos regulados por la señalización de CRHR1.
- Evaluar si estas regulaciones ocurren como consecuencia de la señalización de CRHR1 desde compartimientos intracelulares y si AKT es un intermediario necesario de este proceso.
- Validar los distintos IEGs identificados.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cultivo celular

1.1 Línea celular

En el presente trabajo se utilizó la línea celular murina neuronal hipocampal HT22, transfectada de forma estable con el receptor CRHR1 de ratón (HT22-CRHR1).

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

HT22-CRHR1: Durante la tesis de licenciatura del Dr. Juan José Bonfiglio se generaron clones derivados de HT22 que expresan el receptor CRHR1 de ratón. Las células fueron transfectadas de forma estable con el vector de expresión del receptor de CRH de tipo I de ratón fusionado a un tag c-Myc en el N-terminal (pcADN3-c-Myc-mCRHR1 provisto por el Dr. Wolfgang Wurst –Instituto Max Planck de Psiquiatría, Munich, Alemania).

1.2 Mantenimiento de las líneas celulares en cultivo

Las líneas celulares fueron cultivadas en medio de mantenimiento compuesto por medio esencial mínimo de cultivo DMEM baja glucosa suplementado con 5% suero fetal bovino (SFB), 2mM de L-Glutamina, 100 U/ml de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomicina (Invitrogen) junto con el agente de selección Geneticina (G418, Gibco, Life Technologies) en concentración 200 μ g/ml para asegurar la presencia del receptor. Las líneas celulares fueron incubadas a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO_2 realizando pasajes cada 72-96 hs de una dilución 1:20 o 1:30.

Para el mantenimiento, así como para el plaqueo de las células para cada experimento, las células fueron lavadas con PBS y se digirieron las adhesiones que anclan las células a la placa en presencia de tripsina 1 min a 37°C.

1.3 Congelamiento y descongelamiento de la línea celular utilizada

Las células fueron congeladas en un medio el cual contenía 40% medio de mantenimiento DMEM baja glucosa; 10% DMSO y 50% SFB bajando su temperatura de manera gradual dónde en primer lugar se llevaron a -20°C, luego de una hora a -80°C y luego de un día, finalmente, en nitrógeno líquido a una temperatura de -195,8°C. Por otra parte, el descongelado, se realizó en medio esencial mínimo DMEM baja glucosa suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), 2mM de L-Glutamina, 100 U/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomicina (Invitrogen), incubandose a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO_2 .

2. Estímulos e inhibidores

2.1 Estímulos

CRH humano/rata (Bachem Biochemica) : En esta tesis se utilizaron dos concentraciones de CRH, 10 y 100 nM. Dosis recurrentes en bibliografía y utilizadas hace tiempo en nuestro laboratorio para caracterizar el sistema. El estímulo se realizó en OptiMEM y las células fueron tratadas según se indica más adelante.

2.2 Inhibidores

MK2206 (11593, Cayman): inhibidor alostérico de Akt1, 2 y 3 ($IC_{50} = 5, 12$ y 65 nM respectivamente). Concentración final utilizada $10\ \mu M$. A partir de ahora llamado MK.

Dyngo-4a (ab120689; Abcam): inhibidor específico de la actividad GTPasa de la dinamina, inhibe la endocitosis mediada por clatrina. Se utilizó una concentración final de $30\mu M$ para preincubar a las células HT22-CRHR1 durante 20 minutos previos al estímulo con CRH, manteniéndose durante el tiempo de estimulación. El vehículo utilizado fue DMSO. A partir de ahora llamado Dyngo.

3. Extracción y análisis de RNA a partir de extractos celulares

3.1 Preparación de extractos celulares

Los cultivos celulares de HT22-CRHR1 utilizados para la obtención de las muestras de RNA fueron sembrados en placas de 60 mm. Fueron lavados con PBS y hambreados durante 4 horas en OptiMEM.

Posteriormente se realizó una pre-incubación con el vehículo o los inhibidores durante 20 minutos. Una vez cumplido este tiempo las células fueron estimuladas con CRH y/o MK2206 o Dyngo-4a en OptiMEM durante 1 hora. Transcurrido el tratamiento las células se mantuvieron en hielo, se aspiró el medio y se las lavó con PBS frío, luego se procedió con la extracción de RNA para RT-qPCR o la tinción de las células con Trypan Blue.

3.2 Extracción de RNA.

La extracción de RNA se realizó para células en cultivo, a partir del método de extracción por Trizol Reagent (Invitrogen), según lo indica el fabricante. Específicamente las células fueron lisadas con el reactivo el cual permite mantener la integridad del RNA e inhibe la actividad RNasa de manera que se solubilicen los componentes celulares, luego fueron incubadas 5 min a temperatura ambiente para favorecer la disociación de complejos, pasado dicho tiempo se agregaron 200 μ l de cloroformo que permite la separación del homogenato en fases acuosa y orgánica. Posteriormente se incubó a temperatura ambiente durante 3 min y se centrifugó por 20 min a 12.000 xg a 4°C. El RNA, en la fase acuosa, se precipitó mediante el agregado de 500 μ l de isopropanol, incubación durante 10 min a temperatura ambiente y nuevamente fue centrifugado a 12.000 xg a 4°C por 10 min. Tras descartar el sobrenadante, se lavó el RNA con 1 ml de etanol 75% y posterior centrifugación durante 5 min a 7.500 xg a 4°C. Por último se descartó el sobrenadante de cada tubo, se dejaron secar los precipitados por 15 min a temperatura ambiente y se resuspendió el pellet en 20 μ l de agua MiliQ.

Las muestras fueron guardadas a -80°C hasta el momento de su uso.

3.3 Cuantificación de RNA

Las muestras fueron cuantificadas en el espectrofotómetro *NanoDropTM* Lite de Thermo *ScientificTM* a partir de 1 μ l de solución. Para evaluar la pureza de las muestras se tuvo en cuenta la relación A260/280, buscando que los valores sean mayores a 1,8 y preferentemente cercanos a 2,0, lo cual es indicativo de que la calidad del RNA extraído es alta y la muestra no está contaminada significativamente con proteínas. Dado el *NanoDrop* disponible, sólo pudo realizarse la comprobación de la contaminación con proteínas ya que el mismo no cuenta con la cuantificación de la relación A260/230 que evalúa la contaminación con solventes, particularmente, dado el tipo de extracción con trizol, fenol.

3.4 Análisis de la integridad del RNA

La integridad del RNA fue verificada a partir de la corrida de las muestras en un gel de agarosa al 2% el cual contaba con bromuro de etidio como agente revelador. Para la elaboración de dicho gel, se utilizaron 2,4 g de agarosa disueltos en 120 ml de un buffer de Tris-Borato-EDTA(TBE) RNAsa free y 16 μ l de bromuro de etidio, el cual se intercala entre las bases nitrogenadas lo que lleva a que su fluorescencia aumente casi 20 veces al ser expuesto a la luz ultravioleta (UV). Se sembró aproximadamente 1 μ g de RNA en un volumen final de 15 μ l (3 μ l de loading buffer, el cual contiene un colorante y glicerol para aportar densidad, y 11 μ l de H₂O), utilizando los mismos volúmenes para el marcador utilizado como referencia de la corrida la cual se realizó por 40 min a 120 V y visualizadas en un transiluminador UV.

4. Transcripción reversa y PCR

4.1 Transcripción reversa

Para la obtención de ADN copia (cADN) a partir de RNA, se utilizó la enzima transcriptasa reversa (MMLV, Promega). Se incubó durante 5 min a 65°C una solución con 1 μg de RNA con 2,5 μM de oligodTs en agua en un volumen final de 10 μl tal que permita la desnaturalización de la estructura terciaria del RNA y se unan los oligodTs, una vez transcurrido este tiempo la solución se pone rápidamente en hielo para evitar que vuelva a formarse la estructura más estable energéticamente. Luego se preparó la mezcla de reacción conteniendo 0,5 mM de dNTPs (mezcla equimolar de dATP, dTTP, dGTP y dCTP), 5 U de RNAsin (Promega), 100U de la enzima retrotranscriptasa MMLV-RT (Promega), 1X buffer MMVL-RT(Promega) y agua MiliQ hasta un volumen final de 10 μl . Se agregó la mezcla de reacción al tubo que contenía RNA alcanzando un volumen final de 20 μl y se incubó a 37°C durante 60 min de manera que pueda retrotranscribirse el RNA, por último se inactivó la enzima mediante incubación durante 5 min a 95°C.

4.2 PCR en tiempo real o cuantitativa

Las reacciones de RT-qPCR fueron realizadas en un volumen final de 25 μl con las muestras provenientes de células HT22-CRHR1. Como molde se utilizaron 5 μl de diluciones 1:6 de las reacciones de RT, donde a cada tubo se le agregó 20 μl de la mezcla de reacción la cual se preparó con 1X de buffer PCR sin $MgCl_2$; 0,5 μM de la mezcla de *primers* forward y reverse; 0,2 mM de dNTPs 25mM (mezcla equimolar de dATP, dTTP, dGTP y dCTP, Invitrogen); 0,75 U/ μl de enzima Taq ADN polimerasa (5U/ μl , PBL) y 3 o 4 mM de $MgCl_2$ según el par de *primers*. El seguimiento de la reacción se realizó mediante el agregado de 0,05 μl de Sybr Green 1:30000 (Roche) a la mezcla de reacción y c.s de H_2O MiliQ. La reacción fue llevada a cabo en el ciclador CFX96 touch real-time (BioRad).

Para cada par de primers diseñado se determinaron las condiciones óptimas de temperatura y concentración de magnesio que permitieran obtener buenos resultados. El programa utilizado fue, en todos los casos, 5 minutos a 95°C, 40 ciclos de 30s a 95°C, 30s a 60°C y 30s a 72°C, efectuándose la lectura de fluorescencia al finalizar cada ciclo, seguido de 1 minuto a 95°C para inactivar la enzima. En el caso de Aqp1 y cFos se realizó el mismo procedimiento sólo que se varió el paso de elongación siendo la misma a 58°C para Aqp1 y para cFos de 68°C. A su vez, se realizó una curva de disociación térmica (curva de melting) para evaluar la especificidad de la reacción y en cada medición se realizó una curva de calibración con diluciones al tercio seriadas a partir de una mezcla de los cDNA de las reacciones de RT a fin de evaluar la eficiencia de la reacción de PCR y cuantificar la cantidad relativa de molde en cada muestra.

Las cantidades relativas de molde de interés fueron normalizadas en cada caso a los valores obtenidos para el cDNA de *Hprt* (Gen *housekeeping*) mediante la realización de curvas de calibración.

4.3 *Primers* utilizados

Se utilizaron los *primers* detallados en la Tabla 1. Los mismos fueron diseñados utilizando el programa *Primer-Blast* (NIH), *Primer 3 Plus* (Whitehead Institute for Biomedical Research) o secuencias previamente reportadas en bibliografía. Se eligieron secuencias que hibridaran exones distintos de manera que amplifiquen el cDNA pero no el DNA genómico, cuyo producto de amplificación fuera de 70-200 pb aproximadamente y que los pares de primers posean alto contenido de GC (>50%), temperatura de *melting* (Tm) similar entre sí (<1°C de diferencia) y que no presentaran autocomplementariedad ni complementariedad entre sí, siempre que fuera posible.

Gen	Primer	Secuencia	Tamaño de amplicón (pb)	Concentración de Mg ⁺⁺ utilizada	T° de <i>anneling</i> (°C)
cFOS	Sense	ATCGGCAGA AGGGGCAAA GTAG	172	3	68
	Antisense	GCAACGCAG ACTTCTCATC TTCAAG			
Dusp5	Sense	GCACCACCC ACCTACACTA C	112	3	60
	Antisense	CCTTCTTCCC TGACACAGTC AAT			
Nr4a2	Sense	TGAGGGCTG CAAAGGTTTC T	148	4	60
	Antisense	AACCATCCCA ACAGCTAGG C			
Epha2	Sense	TGCAACAGTA CACGGAACA CT	101	3	60
	Antisense	AAGACGCAC			

		TCCGATCCTT TT			
Ddit4	Sense	CTTGTCGCA ATCTTCGCTG	70	3	60
	Antisense	TGGCTGCTAA GGTCCGAAT G			
Fosl2	Sense	GCCAAGTGT CGGAACCGT	149	4	60
	Antisense	CCGTGAGCC ACCAACATGA A			
Aqp1	Sense	AGGCTTCAAT TACCCACTGG A	124	4	58
	Antisense	GTGAGCACC GCTGATGTGA			
Hprt	Sense	ACAGGCCAG ACTTTGTTGG AT	150	4	60
	Antisense	ACTTGCGCTC ATCTTAGGCT T			

Tabla 1: Listado de secuencias de los *primers* empleados para el estudio transcripcional de diferentes genes de interés. En todos los casos se muestra el nombre del gen, las secuencias de cada *primer* en sentido 5' a 3', el tamaño del amplicón, la concentración de $MgCl_2$ utilizada y la temperatura de annealing de cada uno.

Los pares de *primers* fueron diseñados y analizados mediante *Primer-BLAST* y *Primer 3 Plus*. En la primera página se evaluó la especificidad; el %GC y la Tm mientras que en la segunda se evaluó la complementariedad intra y entre *primers*.

5. Herramientas para el análisis de los datos obtenidos en la secuenciación de RNA.

5.1 Análisis de RNA-Seq

A partir de una extracción de RNA se realizó un análisis de genes diferenciales. Para esto se secuenciaron lecturas de 101 pb en el secuenciador *Illumina platform*. Estas lecturas fueron

alineadas al genoma NCBI-108 de *Mus musculus*. Los controles de calidad, la preparación de las librerías, la secuenciación y el alineamiento fueron realizados por la empresa *Macrogen*. La licenciada Luciana Ant, bajo la dirección de la Dra. Patricia Saragüeta, del Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME) realizó el análisis de genes diferenciales del RNA-Seq utilizando el paquete Deseq2 y considerando significativamente diferentes entre tratamientos aquellos genes que presentan un promedio de *reads* mayores a 10 para todos los tratamientos; p-valor <0,01 y FC >1,5.

Se definieron subconjuntos de genes los cuales presentaran el mismo comportamiento frente a la regulación diferencial en los distintos tratamientos. Este agrupamiento permitió luego evaluar en qué procesos biológicos o mecanismos moleculares se encuentran involucrados estos genes mediante la utilización de GSEA y herramientas de análisis de solapamiento.

5.2 GSEA (<https://www.gsea-msigdb.org/gsea/index.jsp>)

La herramienta GSEA (Gene Set Enrichment Analysis) reúne conjuntos de genes obtenidos a partir de publicaciones y bases de datos biomédicos o biológicos disponibles. De esta manera puede contrastarse un listado de genes específico, ordenado según su regulación, contra los conjuntos de genes o *clusters* de las bases de datos para evaluar si los genes más regulados en la lista de genes en estudio se haya enriquecido en genes de algunos de los conjuntos de las bases de datos. De esta manera, utilizando todos los genes expresados, se obtiene información sobre los genes regulados en ambos extremos de la lista.

Para realizar este análisis debe descargarse el software específico de GSEA, el mismo se obtiene ingresando a la página en la sección *Downloads* la cual presenta diferentes opciones según el sistema operativo con el cual se cuente. Una vez obtenida la aplicación la misma cuenta con diferentes opciones (e.g Load data; Run GSEA, etc.). Lo primero que se debe hacer al abrirla es cargar la lista de genes a evaluar en la sección “*Load data*” la cual puede estar en formato .txt mientras la estructura del archivo esté organizada de la manera que lo determina la documentación del programa, en este mismo sitio pueden cargarse también cuáles serán los tratamientos a comparar y las bases de datos, o plataformas de comparación si las mismas no estuvieran pre-cargadas y fueran necesarias.

Lo siguiente que debe realizarse es, en la sección “*Run GSEA*”, elegir los parámetros que se utilizarán para obtener el enriquecimiento deseado entre los cuales se encuentra la base de datos a utilizar para comparar; el número de permutaciones a realizar; la plataforma de secuenciación; e incluso el tamaño (cantidad de genes) máximo y mínimo que deben tener los *clusters* contra los cuales se realice la comparación.

Por último, una vez que se eligen los parámetros a utilizar, se aprieta la opción Run en el borde inferior derecho y el programa realiza el análisis generando una carpeta en el directorio de preferencia la cual cuenta con los resultados obtenidos.

5.3 Molecular Signatures Database

(<https://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/index.jsp>)

La herramienta Molecular Signature Database (MSigDB) compara una lista de genes con conjuntos de genes de bases de datos para evaluar si la lista se encuentra enriquecida en genes de alguno de los conjuntos. Este análisis se denomina “Análisis de solapamiento”. En este tipo de análisis se utiliza para la evaluación solo un *subset* de genes de interés.

Para obtener información sobre el subset de genes de interés se debe ingresar a la página y en primer lugar elegir el tipo de individuo contra el que se va a realizar el análisis pudiendo ser el mismo *mouse* o *human* ingresando en la sección “*Investigate*”. Luego se carga el listado de genes en la sección “Input Gene Identifiers” y se elige en el sector “Compute Overlaps” la biblioteca de *clusters* contra la cual se quiere comparar (Hallmarks; Canonical Pathways; Gene Ontology; etc).

Una vez que se selecciona la/s biblioteca/s contra la/s cual/es se quiere realizar la comparación, debajo de estas puede modificarse el número de *clusters* significativos que queremos que nos muestre; el q-valor de corte y el tamaño mínimo y máximo de los *clusters* a incluir en el análisis.

Por último se debe clickear en “*compute overlaps*” y se obtienen los resultados de los *clusters* enriquecidos en nuestros genes de interés.

Cabe destacar que en el caso de realizar el análisis en un animal (por ejemplo *human*) y haber obtenido los datos en otro (por ejemplo *mouse*) debe, en la sección “*Species of input identifiers*”, seleccionarse la opción que pertenezca al animal en el cual se realizó la obtención de los genes para que se consideren los genes ortólogos en la especie en la que se quiere comparar (en este caso sería “*Mouse (to be orthology-mapped)*”).

5.4 Enrichr (<https://maayanlab.cloud/Enrichr/>)

La herramienta Enrichr, al igual que MSigDB, reúne *clusters* de genes obtenidos de análisis realizados en diferentes publicaciones y bases de datos biomédicos o biológicos disponibles en línea. En esta plataforma puede realizarse un análisis de solapamiento entre un listado de genes de interés y *clusters* pre-cargados al igual que en la página MSigDB.

En este tipo de análisis, al igual que anteriormente, se utiliza para la evaluación solo de un *subset* de interés pero cuenta con bases diferentes a las de MSigDB ante las cuales realizar la evaluación. La herramienta también permite mediante la carga de un sólo gen obtener un listado de genes que se encuentren relacionados con este mediante co-concurrencia de manera de expandir la búsqueda y así evaluar este subset generado en la misma.

Para obtener información sobre un subset de genes de interés se debe ingresar a la página donde se accede automáticamente a la sección “*Analyze*”, en la cual se presenta un recuadro a la derecha el cual permite escribir los nombres de los genes de interés y presionando *Submit* realizar el análisis. La herramienta separa los resultados en diferentes secciones: Transcription, Pathways; Ontologies; Diseases/Drugs; Cell Types; entre otras. En cada sección se muestra el resultado de comparar el conjunto de genes de interés con los conjuntos de genes asociados a esa sección. Los resultados obtenidos de solapamiento con cada uno de los conjuntos de la sección se presentan ordenados de mayor a menor solapamiento según un ranking, el cual

es establecido mediante el p-valor indicado en cada barra al posarse sobre la misma. Este ranking puede ser modificado redistribuyendo los resultados al hacer click sobre cada representación obteniéndose rankings ordenados por diferentes variables (Ranking combinado; Clasificación basada en ranking). A su vez los resultados pueden ser presentados en diferentes formas como lo son tablas, cuadrículas u otras.

5.5 Metascape (<https://metascape.org/gp/index.html#/main/step1>)

La herramienta *Metascape* reúne bases de datos bioinformáticas y permite, a partir de una lista de genes de interés, analizar, al igual que MSigDB y Enrichr, el solapamiento entre estas. Para obtener información sobre una lista de genes, se ingresa a la página en la cual se ingresa la lista de genes a analizar y se selecciona en qué tipo de individuo (Humano; Ratón; Rata; etc.) se realizó el análisis y en cual se quiere analizar, luego se presiona *Express Analysis*. Una vez terminado el análisis debe seleccionarse *Analysis Report* la cual presenta los resultados en diferentes secciones de conjuntos de genes de la base de datos comparados contra el conjunto de interés: *Enriched Paths*; *Enriched GO's*; *Protein interaction network*; entre otros donde cada uno tiene una forma propia de presentación según lo que se está mostrando. En este tipo de análisis, al igual que anteriormente, se utiliza para la evaluación solo un *subset* de interés.

Esta herramienta al igual que las mencionadas anteriormente cuenta con *clusters* relacionados a procesos o pathways biológicos pero no así moleculares, además permite evaluar la información obtenida en, al igual que los anteriores, en *mouse* y *human* pero también en *rat* y *fish*.

RESULTADOS

Utilización de herramientas bioinformáticas para el análisis de la expresión génica

En esta sección se analizará el RNA-Seq obtenido para células HT22-CRHR1 estimuladas con CRH en concentración 10 nM y/o con los inhibidores MK, en concentración 10 μM , Dyngo, en concentración 30 μM , o sin estímulo (Vehículo). Previo a la estimulación de 1 hora se realizó una preincubación de 20 minutos con cada uno de los inhibidores o el vehículo. Las muestras de RNA se enviaron a la empresa Macrogen la cual realizó el cDNA y realizó un análisis del tipo *paired-end* de *mus musculus* frente al genoma de referencia NCBI_108 en una plataforma del tipo *Illumina*.

Cada una de las condiciones ensayadas (vehículo; CRH; MK; Dyngo o las combinaciones de estos CRH+MK o CRH+Dyngo) fue realizada por triplicado con su respectivo vehículo y CRH por lo que de las muestras de estos últimos se tienen 9 réplicas para cada uno.

La finalidad de este análisis es poder estudiar cuáles genes y de qué manera se están regulando frente a las diferentes condiciones ensayadas.

Análisis de la calidad del RNA-Seq y perfil transcripcional global.

En primer lugar, en la Figura 7 puede evaluarse la calidad de lecturas según lo enviado por la empresa que realizó la secuenciación del RNA. En la parte A de la misma se observa cómo tanto para las lecturas crudas como para aquellas las cuáles se les recortó el último tramo, el que posee más error en su lectura, en todas las réplicas se obtienen valores mayores al 95% del índice Q30 lo cual indica que no más de 1 de cada 1000 bases es errónea por lo cual se puede confiar en las lecturas realizadas. En concordancia se observa en la parte B de la figura un gráfico representativo de la calidad de las lecturas donde puede verse como la línea azul se encuentra siempre sobre la zona verde, aunque disminuye a medida que avanza en la secuenciación lo cual es esperable dado que al avanzar en la secuenciación aumenta el error, esto nuevamente habla de la buena calidad de las lecturas y lo confiable que son las mismas por lo que pueden ser tenidas en cuenta y trabajar con las mismas sin problema.

Para lograr esto, en primer lugar, se realizó un *heatmap* el cual se muestra en la Figura 8 que permite analizar la variabilidad entre tratamientos y dentro de cada réplica. Lo que se observa es que en todos los casos entre réplicas del mismo tratamiento se observa el mismo comportamiento, con la mayoría de los valores similares. En cuanto al análisis entre tratamientos se observa que los patrones obtenidos al tratar con Dyngo o con CRH+Dyngo son similares tanto entre réplicas como entre tratamientos y que los mismos no son similares a los obtenidos al tratar con vehículo, en el caso de Dyngo, o a tratar con CRH, en el caso de Dyngo+CRH, lo cual daría un indicio de que este inhibidor (Dyngo) tendría un efecto propio sobre las células.

Al realizar el mismo análisis pero para el inhibidor de AKT (MK) se observa que al tratar con este solo se obtiene un patrón similar al del vehículo, donde todas las réplicas se comportan de manera similar y que al comparar CRH+MK con CRH se observa un efecto más tenue en las columnas del primero respecto del vehículo que aquel que presenta CRH en su regulación respecto del vehículo. Por lo cual agregar este inhibidor al tratamiento con CRH tendría un efecto antagonizante pero no estaría teniendo un efecto propio en ausencia de la hormona.

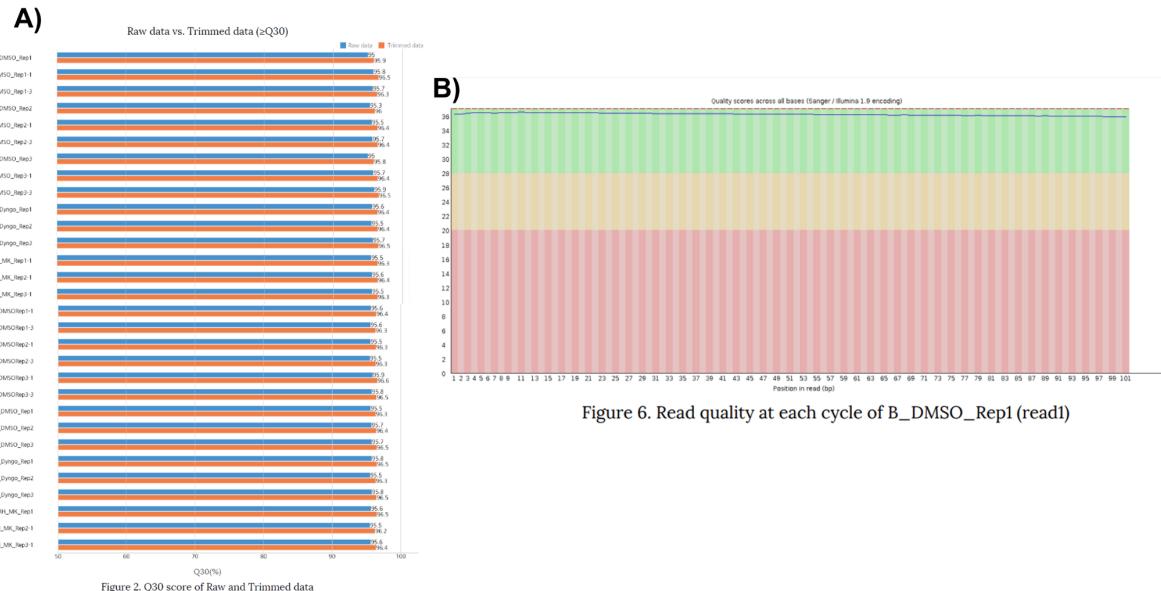


Figure 6. Read quality at each cycle of B_DMSO_Rep1 (read1)

Figura 7: A) Gráfico que muestra la calidad de las lecturas obtenidas en el RNA-Seq según la metodología Q30 B) Gráfico representativo de la calidad de lecturas obtenida.

Células HT22-CRHR1 fueron estimuladas con CRH en concentración 10 nM y/o con los inhibidores MK, en concentración 10 μM , Dyngo, en concentración 30 μM , o sin estímulo (Vehículo). Previo a la estimulación de 1 hora se realizó una preincubación de 20 minutos con cada uno de los inhibidores o el vehículo. Las muestras de RNA se enviaron a la empresa Macrogen la cual realizó el cDNA y realizó un análisis del tipo *paired-end* de *mus musculus* frente al genoma de referencia NCBI_108 en una plataforma del tipo *Illumina* dónde: A) Se presenta el índice Q30 (% de bases con un índice phred mayor que 30 (1 error cada 1000 bases)) de las lecturas crudas (azul) y las lecturas corregidas (naranja) y B) Se presenta un gráfico representativo de la calidad de lecturas obtenida donde el eje x presenta el par de bases; el eje y la calidad de la lectura; la línea azul la media de cada lectura en cada ciclo; la parte verde a buena calidad de lectura; la amarilla a calidad de lectura regular y la roja a mala calidad de lectura.

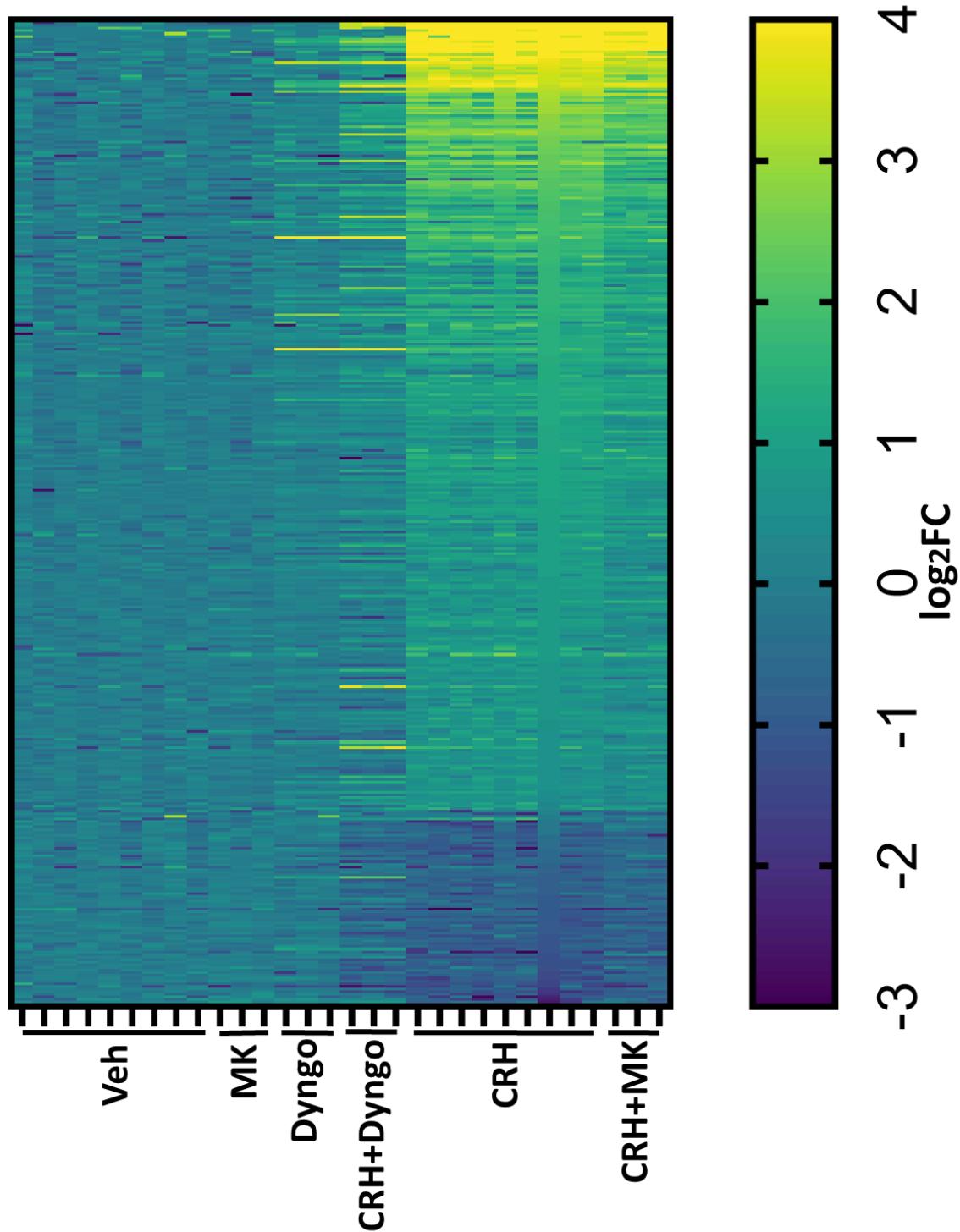


Figura 8: Heatmap de los genes regulados por CRH (372) con respecto al vehículo para las diferentes condiciones analizadas.

Células HT22-CRHR1 fueron estimuladas con CRH en concentración 10 nM y/o con los inhibidores MK, en concentración 10 μM , Dyngo, en concentración 30 μM , o sin estímulo (Vehículo). Previo a la estimulación de 1 hora se realizó una preincubación de 20 minutos con cada uno de los inhibidores. Cada tratamiento fue realizado tres veces, excepto vehículo y CRH que tienen 9 y cada réplica individual se gráfica en el heatmap. Los genes se encuentran graficados de mayor a menor regulación por la condición “CRH” respecto del vehículo.

Concretamente, respecto del vehículo se obtuvieron 372 genes regulados por CRH (Figura 8), 2 por MK, 43 por MK en presencia de CRH (CRH+MK), 33 por Dyngo y 465 por Dyngo en presencia de CRH (Dyngo+CRH). Sobre estas últimas 4 condiciones se ahondará en las secciones “Análisis del perfil transcripcional generado por la acción de MK” y “Análisis del perfil transcripcional generado por la acción de Dyngo”. El criterio utilizado a la hora de determinar que un gen se regula de manera diferencial es si presentan un promedio de *reads* mayores a 10 para todos los tratamientos; p-valor <0,01 y veces de cambio (FC) >1,5 con respecto a la condición analizada.

Análisis del perfil transcripcional generado por la acción de CRH.

Una vez corroborada la calidad del RNA-Seq quisimos estudiar cuáles son los genes diferencialmente expresados al estimular una hora con CRH en concentración 10 nM, para esto, realizamos un gráfico de volcán que permite evidenciar cuántos y qué tanto regulados están los genes con dicho tratamiento respecto de las condiciones con vehículo. Puede observarse, en la Figura 9, que hay 372 genes regulados por CRH a 1 hora los cuales se denominan genes tempranos (IEGs). De estos genes 299 se inducen (derecha) mientras que 73 genes se reprimen (izquierda). Se puede notar que la mayoría de los genes tempranos regulados por CRH son regulados positivamente y que estos presentan mayores veces de cambio y valores estadísticos más significativos que los regulados negativamente.

A su vez se evidencia la obtención de algunos genes los cuales son IEGs conocidos frente a otros estímulos como el caso de: Fos, Nr4a2, Nr4a3, Dusp5, entre otros; y algunos novedosos para CRH en este contexto neuronal hipocampal como el caso de Midn; EphA2 y Vdr.

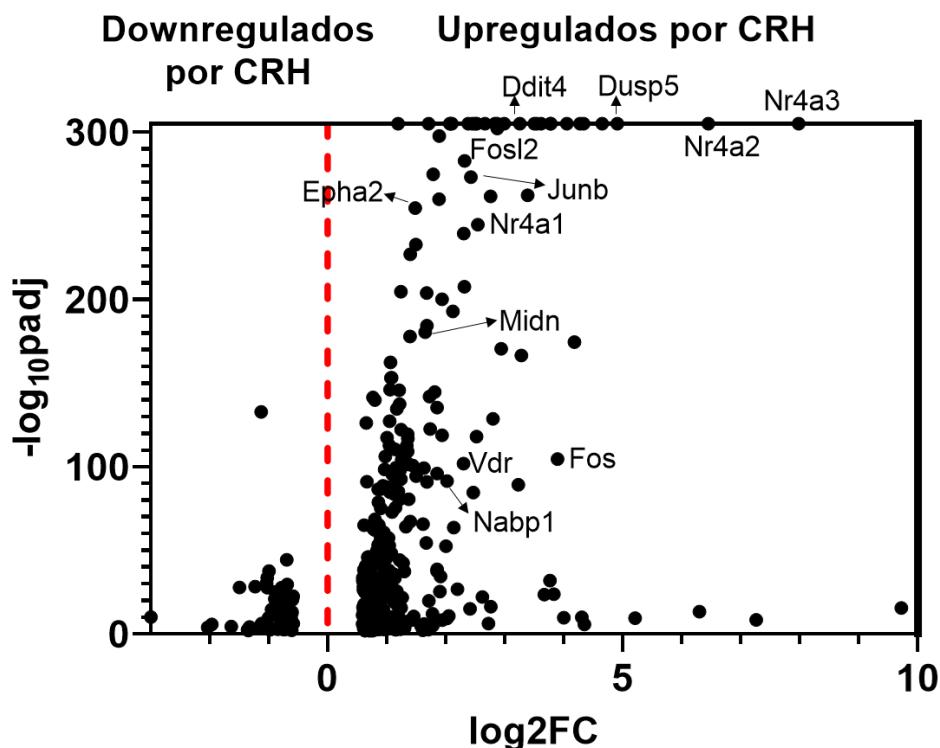
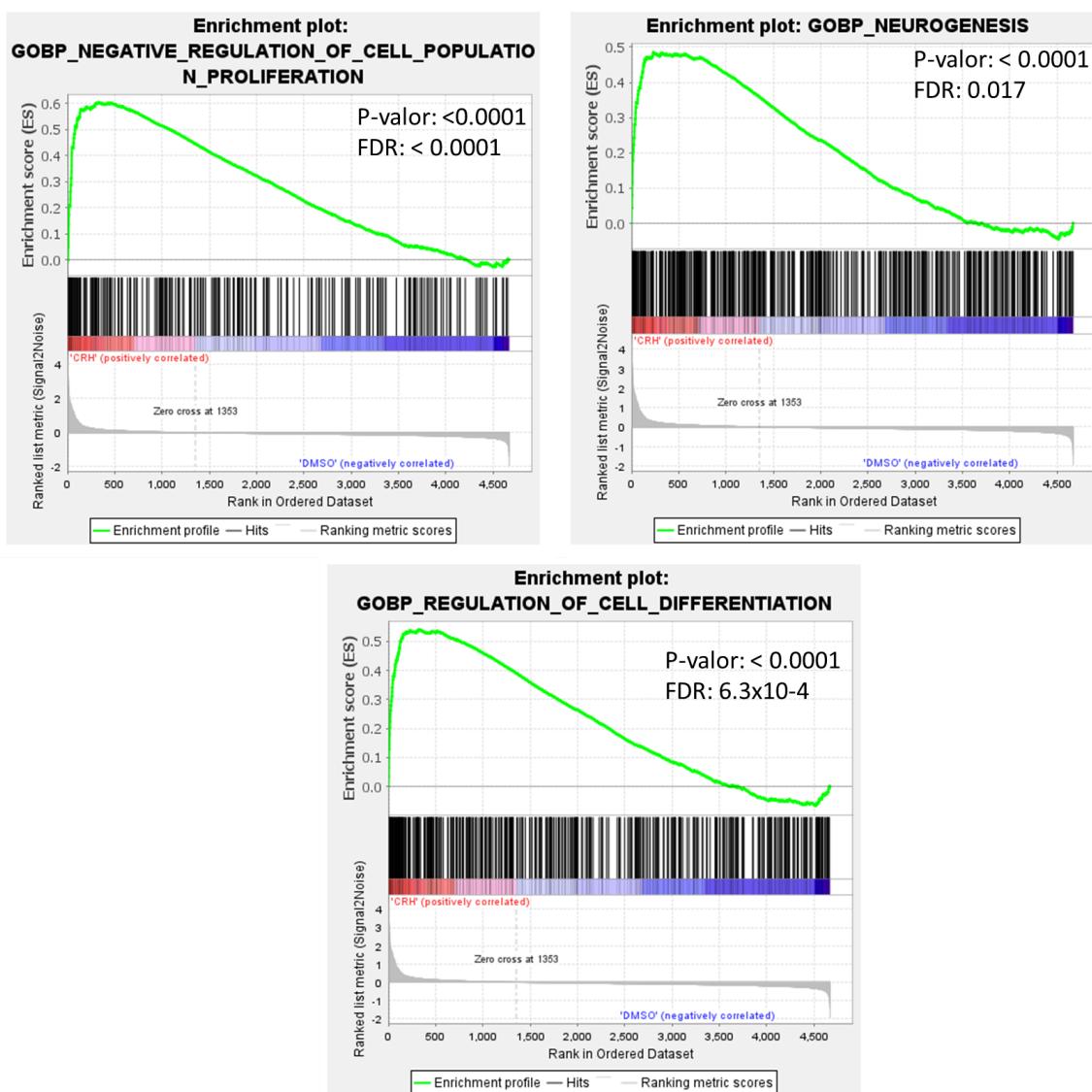


Figura 9: Volcano plot de los genes regulados por CRH.

Células HT22-CRHR1 estimuladas con CRH en concentración 10 nM (CRH) o con vehículo (Veh) durante 1 hora. Se grafican los 372 genes regulados diferencialmente para CRH con respecto al Veh según su p-valor y sus veces de cambio en la expresión (FC). Nombrados se encuentran genes anteriormente descritos como IEGs y otros que son novedosos.

Posteriormente se realizó el análisis sobre los genes regulados por CRH mediante el software GSEA el cual permite ver qué *clusters* se encuentran enriquecidos en los genes más regulados por dicho tratamiento generando los resultados presentados en la Figura 10 los cuales confirman que los genes regulados por el tratamiento con CRH se encuentran significativamente sobrerepresentados en *pathways* de neurogénesis, regulación de la proliferación celular, e incluso algunos que tienen que ver con genes los cuales cuentan con un motivo reconocido por CREB1 (CREB_Q2) o por ATF2 (CREBP1_Q2).



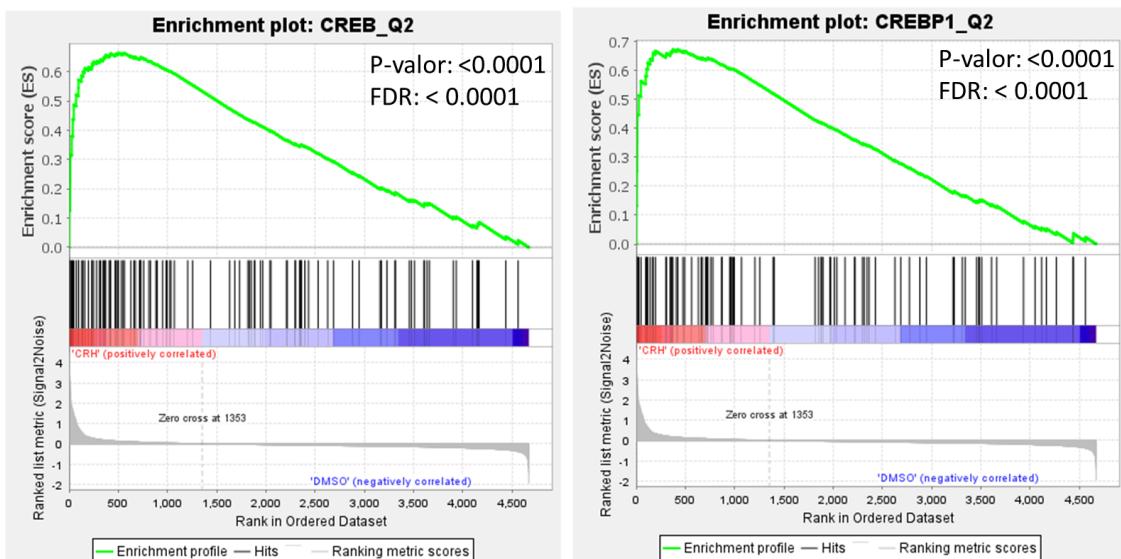


Figura 10: Presenta los *clusters* enriquecidos significativamente asociados a la regulación por CRH mediante el análisis de GSEA.

Células HT22-CRHR1 fueron pre-incubadas durante 20 minutos con vehículo y posteriormente estimuladas con CRH en concentración 10 nM durante 1 hora. Se grafican los pathways asociados a procesos regulados por CRH conocidos junto con su p-valor y FDR correspondiente.

Luego se realizó un análisis de solapamiento para los 372 genes regulados significativamente entre CRH y Veh. Para este análisis se utilizaron tres herramientas distintas: *Metascape*, *Enrichr* y la herramienta para análisis de solapamiento de la página de MSigDB. Todas ellas se usan a través de su página web, y cada una compara cuántos de los genes suministrados (en este caso los genes regulados por CRH) están contenidos dentro de los conjuntos de genes de sus respectivas bases de datos. Si los conjuntos de genes de sus bases de datos contienen más genes suministrados de los que contendrían frente a la misma cantidad de genes pero seleccionados al azar de todo el universo de genes, se considera que ese conjunto está enriquecido en los genes de interés, y se obtiene un valor estadístico asociado a ese enriquecimiento.

La primera herramienta utilizada fue *Metascape*. Para esto se tomaron los 372 genes regulados por CRH, tanto inducidos como reprimidos y se los evaluó mediante Metascape obteniéndose los resultados de la Figura 11 en la cual, si bien se observan algunos *pathways* esperados para la respuesta a CRH, señalados con flechas rojas, los mismos son muy generales.

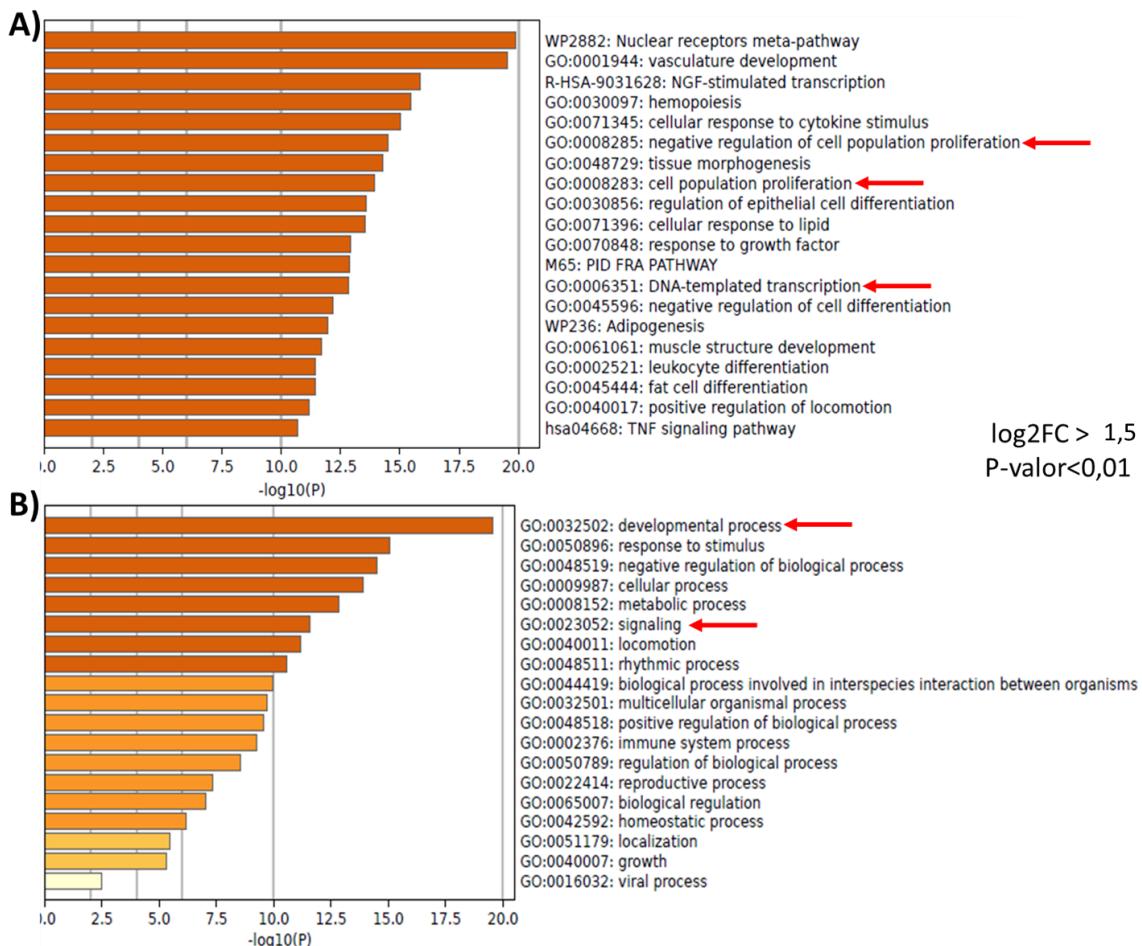


Figura 11: Perfiles transcripcionales enriquecidos en los genes regulados por la acción de CRH con la herramienta *Metascape*.

Células HT22-CRHR1 fueron estimuladas con CRH en concentración 10 nM durante 1 hora posterior a una pre-incubación de 20 minutos con vehículo. Se grafican los 20 *clusters* más enriquecidos ordenados según su p-valor (A) y los *clusters* de gene ontology (GO) más enriquecidos ordenados según su p-valor (B). Con flechas rojas se marcan algunos *pathways* los cuales eran esperables que se regulen por CRH.

Dado el problema de la generalidad comentada anteriormente, se decidió realizar un análisis con la herramienta *Enrichr* cuya base de datos cuenta con *clusters* de genes asociados a vías puntuales, resultando más informativos (Figura 12), en donde se observan resultados asociados a vías específicas como pueden ser los *clusters* asociados a NR4A2 (Regulador transcripcional de importancia en la diferenciación y mantenimiento de las neuronas dopamínergicas meso-encefálicas durante el desarrollo); NR4A3 (Mediador de la supervivencia de las neuronas mediante CREB y durante el desarrollo hipocampal, media la proliferación de vasculatura en el músculo liso, progenitores mieloides de células de tipo B y células pancreáticas); JUN (Subunidad del factor de transcripción AP1 compuesto también por FOS) y MAPK1/3 también denominadas ERK2 y ERK1, respectivamente, las cuales forman parte de las vías de señalización activadas por CRH.

Por otra parte se realizó un tercer análisis de solapamiento utilizando la herramienta proporcionada por “Molecular Signature Database”, que cuenta con la misma base de datos de conjuntos de genes que GSEA. Al comparar contra la base de datos de “Gene Ontology” se obtiene

la Figura 13 en la cual se verifica que estos genes se encuentran Enriquecidos en *pathways* asociados a respuestas celulares conocidas de CRH como lo son la neurogénesis; la regulación de la diferenciación celular; la regulación de la proliferación celular; regulación del ciclo celular; entre otros lo cual sirve como validación ya que eran resultados esperables.

Por otro lado al utilizar las bases de datos “*Transcription factor targets*” y “*Canonical Pathways*” se obtienen los resultados de la Figura 14 donde puede observarse que los mismos son más moleculares y se obtiene resultados similares a los obtenidos mediante el análisis de *Enrichr* como puede ser: CREB_Q2 el cual hace referencia a genes los cuales cuentan con un motivo reconocido por CREB1 (NSTGACGTAANN), CREBP1CJUN_01 el cual hace referencia a genes con motivos reconocidos por Jun (TGACGTYA), MAPK3_TARGET GENES el cual hace referencia a genes con motivos reconocidos por MAPK3 u otros los cuales no aparecían en el análisis de *Enrichr* y resultan novedosos como son: CREBP1_Q2 o ATF3_Q6 que hacen referencia a genes con motivos de DNA reconocidos por ATF2 o ATF3 respectivamente e incluso genes pertenecientes a las vías de AP1 (PID_AP1_PATHWAY) o ATF2 (PID_ATF2_PATHWAY).

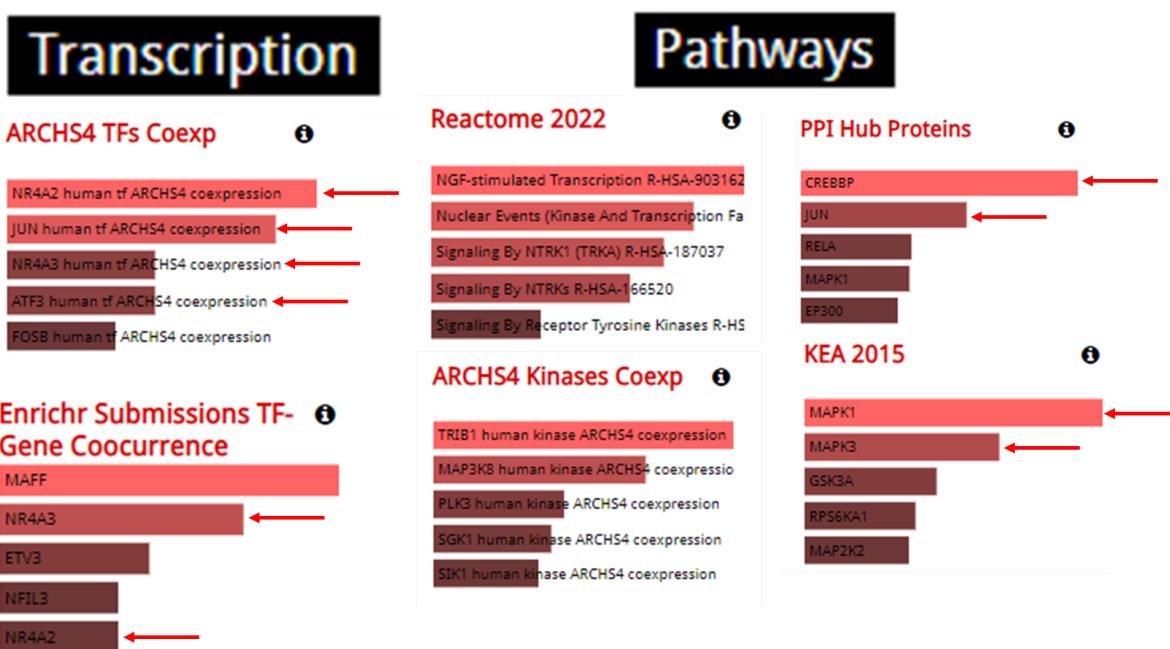


Figura 12: Perfiles transcripcionales Enriquecidos en los genes regulados por la acción de CRH mediante la utilización de *Enrichr*.

Células HT22-CRHR1 fueron estimuladas con CRH en concentración 10 nM durante 1 hora posterior a una pre-incubación de 20 minutos con vehículo. Se grafican los *clusters* más Enriquecidos ordenados según su p-valor y sólo para las bases que resultaron más informativas. Con flechas rojas se marcan los *clusters* de genes los cuales nos resultaron relevantes por el conocimiento previo sobre la señalización de CRH y porque aparecen *clusters* análogos también cuando se realiza el análisis con la herramienta de MSigDB (mostrado a continuación).

Gene Set Name [# Genes (K)]	Description	# Genes in Overlap (k)	k/K	p-value	FDRq-value
GOBP_REGULATION_OF_CELL_POPULATION_PROLIFERATION [1773]	Any process that modulates the frequency, rate or extent of cell proliferation. [GOC:jl]	85		1.53 e ⁻³⁸	9.68 e ⁻³⁵
GOBP_APOPTOTIC_PROCESS [1999]	A programmed cell death process which begins when a cell receives an internal (e.g. DNA damage) or external signal (e.g. an extracellular death ligand), and proceeds through a series of biochemical	86		1.7 e ⁻³⁵	3.07 e ⁻³²
GOBP_REGULATION_OF_CELL_DIFFERENTIATION [1726]	Any process that modulates the frequency, rate or extent of cell differentiation, the process in which	74		2.78 e ⁻³⁰	2.52 e ⁻²⁷
GOBP_NEGATIVE_REGULATION_OF_CELL_POPULATION_PROLIFERATION [744]	Any process that stops, prevents or reduces the rate or extent of cell	42		1.1 e ⁻²¹	3.18 e ⁻¹⁹
GOBP_POSITIVE_REGULATION_OF_CELL_DIFFERENTIATION [985]	Any process that activates or increases the frequency, rate or extent of cell differentiation. [GOC:go_curators]	45		1.47 e ⁻¹⁹	3.34 e ⁻¹⁷
GOBP_ENZYME_LINKED_RECEPTOR_PROTEIN_SIGNALING_PATHWAY [1002]	The series of molecular signals initiated by an extracellular ligand binding to a receptor on the surface of the target cell,	45		2.84 e ⁻¹⁹	6.22 e ⁻¹⁷
GOBP_REGULATION_OF_RESPONSE_TO_STRESS [1527]	Any process that modulates the frequency, rate or extent of a response to stress. Response to stress is a change in state or activity of a cell or an	54		2.37 e ⁻¹⁸	4.86 e ⁻¹⁶
GOBP_REGULATION_OF_INTRACELLULAR_SIGNALING_TRANSDUCTION [1684]	Any process that modulates the frequency, rate or extent of intracellular signal transduction. [GOC:dph, GOC:signaling, GOC:tb, GOC:TermGenie]	56		8.05 e ⁻¹⁸	1.57 e ⁻¹⁵
GOBP_REGULATION_OF_CELL_CYCLE [1064]	Any process that modulates the rate or extent of progression through the cell	44		1.56 e ⁻¹⁷	3.01 e ⁻¹⁵
GOBP_NEUROGENESIS [1965]	Generation of cells within the nervous system. [GO_REF:0000021, GOC:cls, GOC:curators, GOC:dgh, GOC:dph, GOC:jid]	54		9 e ⁻¹⁴	8.77 e ⁻¹²

Figura 13: Perfiles transcripcionales enriquecidos en los genes regulados por la acción de CRH mediante la realización del solapamiento con la herramienta de la página de MSigDB al utilizar la base de datos “Gene Ontology”.

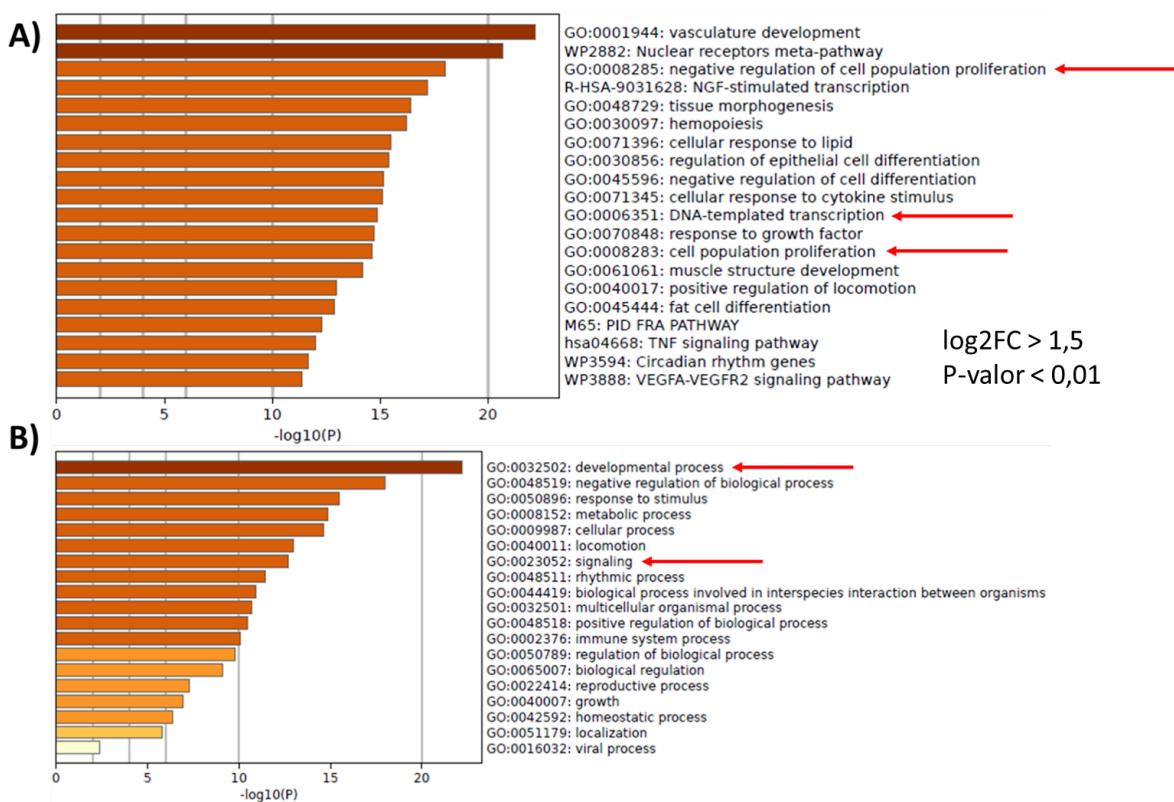
Células HT22-CRHR1 fueron pre-incubadas con el vehículo durante 20 minutos y luego estimuladas con CRH en concentración 10 nM durante 1 hora. El análisis se realizó frente a las base de datos “Gene ontology”. Se grafican los clusters asociados a procesos regulados por CRH junto con su p-valor y FDR correspondiente y otros valores proporcionados por el análisis como k/K que hace referencia a la cantidad de genes solapados entre aquellos de interés que nosotros proporcionamos y aquellos contenidos dentro del cluster evaluado y K hace referencia a los genes en el cluster evaluado. Con recuadros rojos se marcan clusters los cuales se asocian con procesos regulados por CRH los cuales nos parece importante resaltar.

Gene Set Name [# Genes (K)]	Description	# Genes in Overlap (k)	k/K	p-value	FDRq-value
CREBP1_Q2 [260]	Genes having at least one occurrence of the motif VGTGACGTMACN in the regions spanning 4 kb centered on their transcription starting sites [-2kb, +2kb]. This matches the ATF2 [GeneSymbol=ATF2] transcription factor binding site V\$CREBP1_Q2 (v7.4 TRANSFAC).	28	<div style="width: 100%;">██████████</div>	5.83 e ⁻²⁶	9.53 e ⁻²³
CREB_Q2 [269]	Genes having at least one occurrence of the motif NSTGACGTAANN in the regions spanning 4 kb centered on their transcription starting sites [-2kb, +2kb]. This matches the CREB1 [GeneSymbol=CREB1] transcription factor binding site V\$CREB_Q2 (v7.4 TRANSFAC).	24	<div style="width: 100%;">██████████</div>	1.87 e ⁻²⁰	1.15 e ⁻¹⁷
ATF3_Q6 [253]	Genes having at least one occurrence of the motif CBCTGACGTCANCS in the regions spanning 4 kb centered on their transcription starting sites [-2kb, +2kb]. This matches the ATF3 [GeneSymbol=ATF3] transcription factor binding site V\$ATF3_Q6 (v7.4 TRANSFAC).	22	<div style="width: 100%;">██████████</div>	1.32 e ⁻¹⁸	4.99 e ⁻¹⁶
CREBP1CJUN_01 [264]	Genes having at least one occurrence of the motif TGACGTYA in the regions spanning 4 kb centered on their transcription starting sites [-2kb, +2kb]. This matches the JUN [GeneSymbol=JUN], ATF2 [GeneSymbol=ATF2] transcription factor binding site V\$CREBP1CJUN_01 (v7.4 TRANSFAC).	19	<div style="width: 100%;">██████████</div>	1.01 e ⁻¹⁴	1.5 e ⁻¹²
PID_AP1_PATHWAY [70]	AP-1 transcription factor network	11	<div style="width: 100%;">██████████</div>	8.49 e ⁻¹³	9.26 e ⁻¹¹
PID_ATF2_PATHWAY [59]	ATF-2 transcription factor network	9	<div style="width: 100%;">██████████</div>	1.39 e ⁻¹⁰	9.87 e ⁻⁹
MAPK3_TARGET_GENES [109]	Genes containing one or more binding sites for UniProt:P27361 (MAPK3) in their promoter regions (TSS -1000,+100 bp) as identified by GTRD version 20.06 ChIP-seq harmonization.	10	<div style="width: 100%;">██████████</div>	2.19 e ⁻⁹	1.16 e ⁻⁷

Figura 14: Perfiles transcripcionales enriquecidos en los genes regulados por la acción de CRH mediante la realización de un análisis de solapamiento con la herramienta de la página de MSigDB al utilizar la base de datos “Canonical Pathways” y “Transcription factors targets”

Células HT22-CRHR1 fueron pre-incubadas durante 20 minutos con el vehículo y luego estimuladas con CRH en concentración 10 nM durante 1 hora. El análisis se realizó frente a las base de datos “*Canonical Pathways: PID gene sets*”; “*GTRD transcription factor targets*” y “*legacy transcription factors*”. Se grafican los *clusters* asociados a procesos regulados por CRH junto con su p-valor y FDR correspondiente y otros valores proporcionados por el análisis como k/K que hace referencia a la cantidad de genes solapados entre aquellos de interés que nosotros proporcionamos y aquellos contenidos dentro del *clusters* evaluado y K hace referencia a los genes en el *clusters* evaluado. El *cluster* llamado CREBP1CJUN_01 hace referencia a sitios de unión de ATF2.

Una vez corroborado que se obtienen *clusters* enriquecidos esperables según lo que se conoce del efecto de CRH al considerar todos los genes regulados por esta hormona en nuestros datos experimentales se prosiguió a realizar el mismo análisis separando según cada condición donde los inducidos (299 genes) enriquecen los mismos *clusters* y con valores estadísticos más significativos (Figura 15), mientras que para los reprimidos (73 genes) se obtienen p-valores muy altos, incluso no significativos (Figura 16). Se puede inferir entonces que los genes inducidos probablemente son los responsables de los enriquecimientos obtenidos.



C)

Gene Set Name [# Genes (K)]	Description	# Genes in Overlap (k)	k/K	p-value ?	FDRq-value ?
GOBP_APOPTOTIC_PROCESS [1965]	A programmed cell death process which begins when a cell receives an internal (e.g. DNA damage) or external signal (e.g. an extracellular death ligand), and proceeds through a series of biochemical events	81	 81	6.4 e ⁻⁴³	4.89 e ⁻³⁹
GOBP_REGULATION_OF_CELL_DIFFERENTIATION [1628]	Any process that modulates the frequency, rate or extent of cell differentiation, the process in which relatively unspecialized cells acquire specialized structural and functional features. [GOC:go_curators]	71	 71	6.99 e ⁻³⁹	2.67 e ⁻³⁵
GOBP_NEGATIVE_REGULATION_OF_CELL_POPULATION_PROLIFERATION [957]	Any process that stops, prevents or reduces the rate or extent of cell proliferation. [GOC:go_curators]	40	 40	4.2 e ⁻²¹	7.47 e ⁻¹⁹
GOBP_REGULATION_OF_CELL_CYCLE [1121]	Any process that modulates the rate or extent of progression through the cell cycle. [GOC:ai, GOC:dph, GOC:tb]	38	 38	4.67 e ⁻¹⁷	5.33 e ⁻¹⁵
GOBP_NEUROGENESIS [1715]	Generation of cells within the nervous system.	45	 45	6.5 e ⁻¹⁶	6.45 e ⁻¹⁴
CREBP1_Q2 [260]	Genes having at least one occurrence of the motif VGTGACGTMACN in the regions spanning 4 kb centered on their transcription starting sites [-2kb, +2kb]. This matches the ATF2 [GeneSymbol=ATF2] transcription factor binding site V\$CREBP1_Q2 (v7.4 TRANSFAC).	28	 28	5.83 e ⁻²⁶	2.17 e ⁻²³
CREB_Q2 [269]	Genes having at least one occurrence of the motif NSTGACGTANN in the regions spanning 4 kb centered on their transcription starting sites [-2kb, +2kb]. This matches the CREB1 [GeneSymbol=CREB1] transcription factor binding site V\$CREB_Q2 (v7.4 TRANSFAC).	24	 24	1.87 e ⁻²⁰	2.98 e ⁻¹⁸
CREBP1CJUN_01 [264]	Genes having at least one occurrence of the motif TGACGTYA in the regions spanning 4 kb centered on their transcription starting sites [-2kb, +2kb]. This matches the JUN [GeneSymbol=JUN], ATF2 [GeneSymbol=ATF2] transcription factor binding site V\$CREBP1CJUN_01 (v7.4 TRANSFAC).	19	 19	1.01 e ⁻¹⁴	4.17 e ⁻¹³

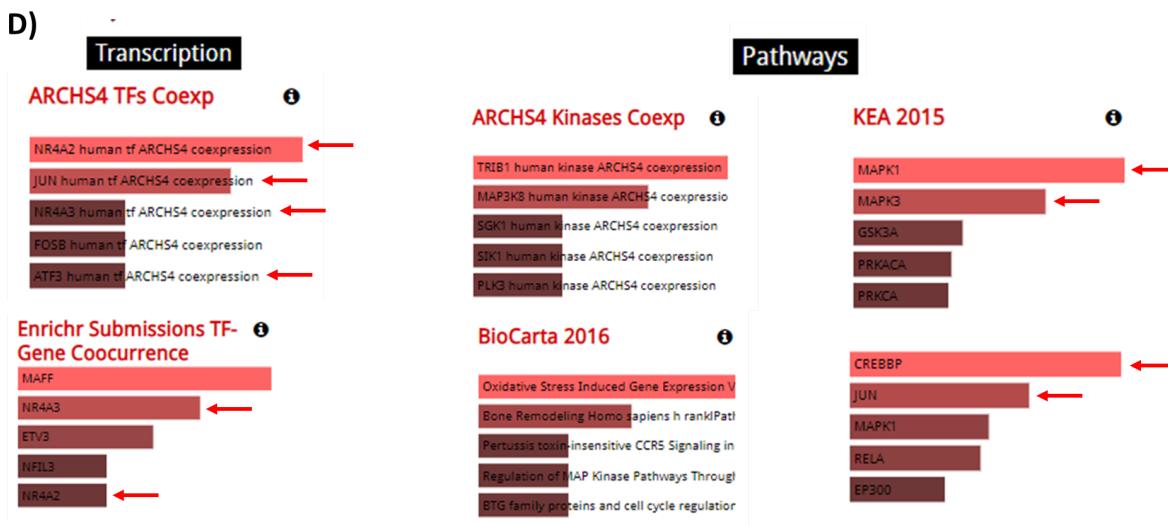
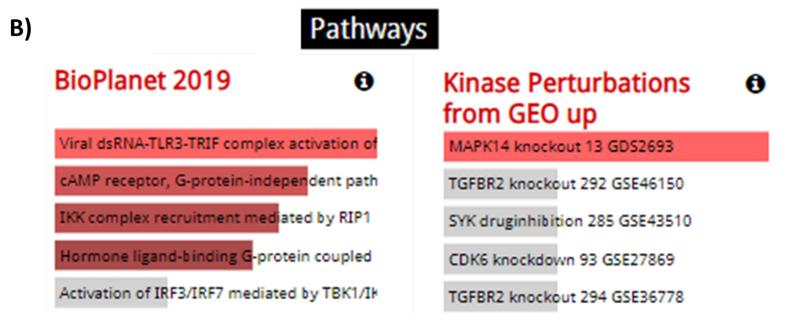
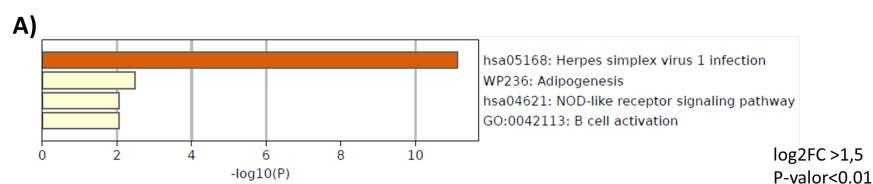


Figura 15: Perfiles transcripcionales enriquecidos en los genes inducidos (299) por la acción de CRH mediante la utilización de: A),B) Metascape, C) MsigDB y D) Enrichr.

Células HT22-CRHR1 fueron estimuladas con CRH en concentración 10 nM durante 1 hora posterior a una pre-incubación de 20 minutos con vehículo. Se grafican los 20 *clusters* más enriquecidos ordenados según su p-valor (A), los *clusters* de “*gene ontology*” (GO) más enriquecidos ordenados según su p-valor (B) obtenidos en el análisis de *Metascape*, los *clusters* más enriquecidos, ordenados según su p-valor, obtenidos utilizando la herramienta *Enrichr* y sólo para las bases que resultaron más informativas (C) y los *clusters* obtenidos frente a las bases de datos “*Gene ontology*”; “*Canonical Pathways: PID gene sets*” y “*Transcription factor targets*” de la herramienta MsigDB (D). Con flechas rojas se marcan *pathways* los cuales aparecían enriquecidos al utilizar todos los genes regulados por CRH. La herramienta MsigDB brinda además del p-valor asociado al solapamiento entre el *cluster* y nuestro subset de interés, su FDR correspondiente y otros valores proporcionados por el análisis como k/K que hace referencia a la cantidad de genes solapados entre aquellos de interés que nosotros proporcionamos y aquellos contenidos dentro del *clusters* evaluado y K hace referencia a los genes en el *clusters* evaluado. El *cluster* llamado CREBP1CJUN_01 hace referencia a sitios de unión de ATF2.



C)

Converted 73 submitted identifiers into 66 NCBI (Entrez) genes. Download symbol conversion report

Collections	# Overlaps Shown	# Gene Sets in Collections	# Genes in Comparison (n)	# Genes in Universe (N)
GO:BP	0	7647	66	42722

No overlaps found

Converted 73 submitted identifiers into 66 NCBI (Entrez) genes. Download symbol conversion report

Collections	# Overlaps Shown	# Gene Sets in Collections	# Genes in Comparison (n)	# Genes in Universe (N)
CP:PID	0	196	66	42722

No overlaps found

Converted 73 submitted identifiers into 66 NCBI (Entrez) genes. Download symbol conversion report

Collections	# Overlaps Shown	# Gene Sets in Collections	# Genes in Comparison (n)	# Genes in Universe (N)
TFT	3	1115	66	42722

Click the gene set name to see the gene set page. Click the number of genes [in brackets] to download the list of genes.

Color bar shading from light green to black, where lighter colors indicate more significant FDR q-values (< 0.05) and black indicates less significant FDR q-values (>= 0.05).

Save to: Text (as Tab separated values; *.tsv)

Gene Set Name [# Genes (K)]	Description	# Genes			
		in Overlap (k)	k/K	p-value	FDRq-value
CATTGTYY_SOX9_B1 [368]	Genes having at least one occurrence of the highly conserved motif M49 CATTGTYY in the regions spanning 4 kb centered on their transcription starting sites [-2kb, +2kb]. This matches the SOX9 [GeneSymbol=SOX9] transcription factor binding site V\$SOX9_B1 (v7.4 TRANSFAC).	6	■	2.31 e ⁻⁵	2.38 e ⁻²
ZNF768_TARGET_GENES [1362]	Genes containing one or more binding sites for UniProt:Q9H5H4 (ZNF768) in their promoter regions (TSS -1000,+100 bp) as identified by GTRD version 20.06 ChIP-seq harmonization.	10	■	4.37 e ⁻⁵	2.38 e ⁻²
IGLV5_37_TARGET_GENES [648]	Genes containing one or more binding sites for UniProt:A0A075B6J1 (IGLV5-37) in their promoter regions (TSS -1000,+100 bp) as identified by GTRD version 20.06 ChIP-seq harmonization.	7	■	6.42 e ⁻⁵	2.38 e ⁻²

Figura 16: Perfiles transcripcionales enriquecidos en los genes reprimidos (73) por la acción de CRH mediante la utilización de: A) Metascape, B) Enrichr y C) MsigDB.

Células HT22-CRHR1 fueron estimuladas con CRH en concentración 10 nM durante 1 hora posterior a una pre-incubación de 20 minutos con vehículo. Se grafican los *clusters* de “gene ontology” (GO) más enriquecidos ordenados según su p-valor (A) obtenidos en el análisis de *Metascape*, los *clusters* más enriquecidos, ordenados según su p-valor, obtenidos utilizando la herramienta *Enrichr* y sólo para las bases que resultaron más informativas (B) y los *clusters* obtenidos de “Gene Ontology”; “Canonical Pathways” y “Transcription factors” al utilizar la herramienta *MsigDB* (C). La herramienta *MsigDB* brinda además del p-valor asociado al solapamiento entre el *cluster* y nuestro subset de interés, su FDR correspondiente y otros valores proporcionados por el análisis como k/K que hace referencia a la cantidad de genes solapados entre aquellos de interés que nosotros proporcionamos y aquellos contenidos dentro del *clusters* evaluado y K hace referencia a los genes en el *clusters* evaluado.

Análisis del perfil transcripcional generado por la acción de MK.

Una vez que se corroboró el accionar de CRH en el perfil transcripcional de las células HT22-CRHR1 se prosiguió a realizar el mismo análisis para el inhibidor específico de AKT, MK2006 (MK). En primer lugar se estudió cuántos genes son regulados sólo por MK respecto del vehículo o por MK en presencia de CRH respecto del tratamiento con CRH, en la Figura 17 se muestra un *Venn Diagram* en el cual se comparan estas dos condiciones junto con la condición de los genes estimulados sólo por CRH respecto del vehículo. Puede verse que MK en presencia de CRH, respecto de CRH solo, regula diferencialmente 43 genes de los cuales un poco más de la mitad (24) son genes que se encuentran dentro de los regulados por CRH (372), aunque son apenas el 6% de los genes regulados por CRH. A su vez, sobre 22 de estos 24 genes MK presenta un efecto antagónico con respecto al efecto de CRH. Esto parecería indicar que, aunque pocos, algunos IEGs de CRH se encuentran regulados por la vía de AKT.

Por otra parte, MK respecto del vehículo, regula solo dos genes los cuales no se encuentran dentro de los 372 genes regulados por CRH ni de los 43 regulados por MK en presencia de CRH.



Figura 17: Venn Diagram presentando el número de genes regulados por CRH y MK respecto del vehículo, y CRH+MK respecto de CRH.

Células HT22-CRHR1 fueron pre-incubadas durante 20 minutos con el inhibidor de AKT MK2206 (MK) en concentración 10 μM o vehículo y posteriormente fueron estimuladas durante 1 hora con CRH en concentración 10 nM y/o el inhibidor MK en concentración 10 μM . Se grafican la cantidad de genes regulados por CRH y MK respecto del vehículo y los regulados diferencialmente entre las condiciones CRH y CRH+MK. Se muestra también la cantidad de genes compartidos por cada comparación.

Acto seguido se realizó un heatmap sobre los 22 genes antagonizados mencionados anteriormente, el cual se presenta en la Figura 18, ordenados de mayor a menor veces de cambio entre CRH y Veh. Se evaluó cuáles son los más regulados, la consistencia entre réplicas y cuáles presentan mayor expresión en las HT22-CRHR1 (observado en las cuentas crudas del RNA-Seq) como criterios para elegir genes de los que posteriormente se diseñaron *primers* para validar por RT-qPCR los

resultados del RNA-Seq. Se seleccionaron 6 (*Nr4a3*; *Dusp5*; *Vdr*; *Nabp1*; *Epha2* y *Midn*) los cuales cumplen con estas condiciones. Al mismo tiempo, se seleccionaron genes que se regulan con CRH y no con MK como: *cFOS*; *Ddit4*; *Nr4a2* y *Fosl2* como así también genes que no se regulan por la acción del estímulo ni la del inhibidor como *Aqp1*.

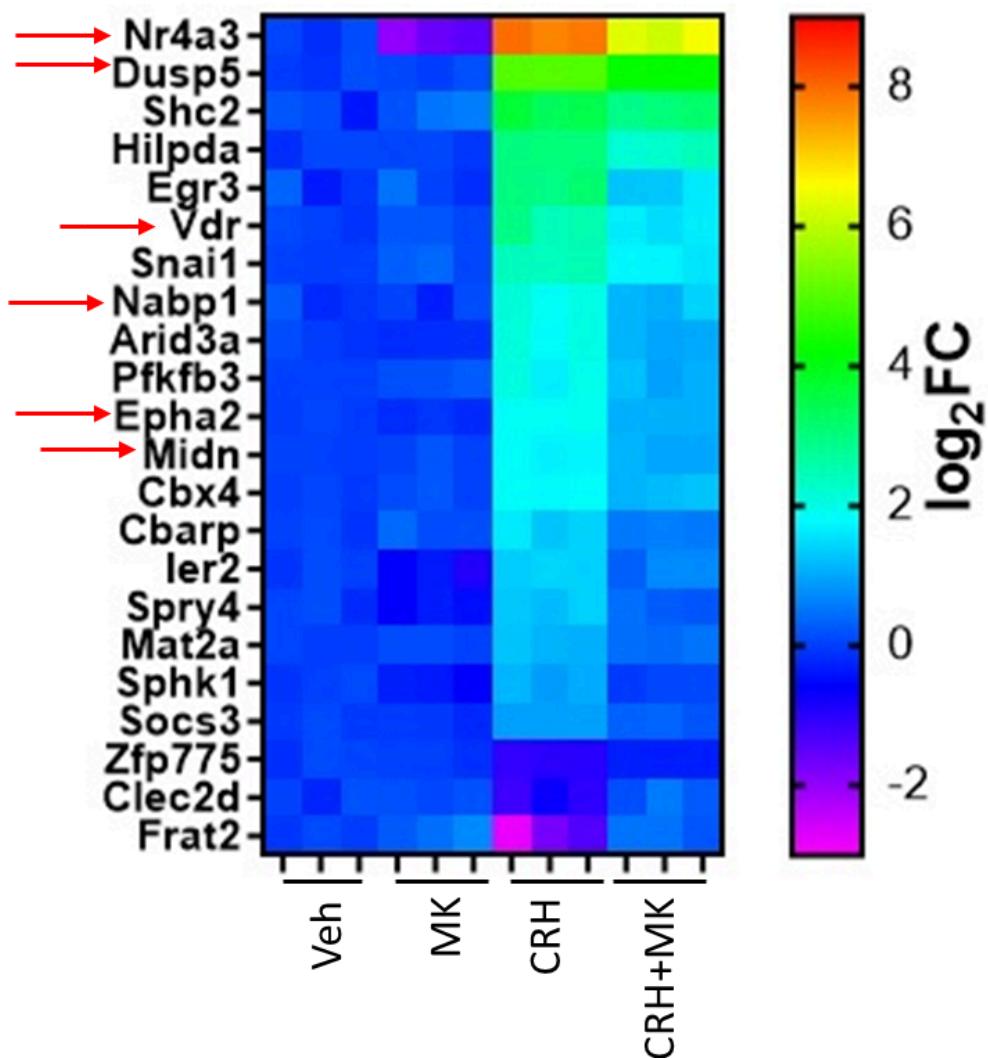


Figura 18: Heatmap de los genes que CRH inhibe o estimula y MK antagoniza dicho efecto.

Células HT22-CRHR1 fueron pre-incubadas durante 20 minutos con el inhibidor de AKT MK2206 (MK) en concentración 10 μ M o vehículo (Veh) y posteriormente fueron estimuladas durante 1 hora con CRH en concentración 10 nM y/o MK 10 μ M. Se grafican los genes que son antagonizados por MK frente a la acción de CRH ordenados según el log2FC de CRH respecto del vehículo. En flechas rojas se marcan aquellos seleccionados para diseñar *primers* (Consistencia entre réplicas, mayor regulación y expresión).

Posteriormente se realizó el análisis de solapamiento a través de la página *Metascape* para los genes regulados por MK obteniéndose *clusters* como la transcripción mediada por FOXO o el *pathway* de PID ATF2, los cuales se presentan en la Figura 19 aunque con p-valores poco significativos. Para comparar con el análisis realizado para los genes regulados por CRH, se prosiguió a evaluar el set de genes mediante la página de Enrichr, donde se obtuvieron los resultados de la Figura 20 en los cuales aparece, como anteriormente, FOXO y en particular uno de ellos asociado a

FOXO3, a su vez aparecen *pathways* asociados a estas proteínas. También se observa que aparece un *cluster* asociado a Nr4a2 el cual se encontraba regulado anteriormente por CRH, también MAPK3 (ERK1) la cual es un target de la vía de señalización por CRH y vías de señalización asociadas a las MAPKs.

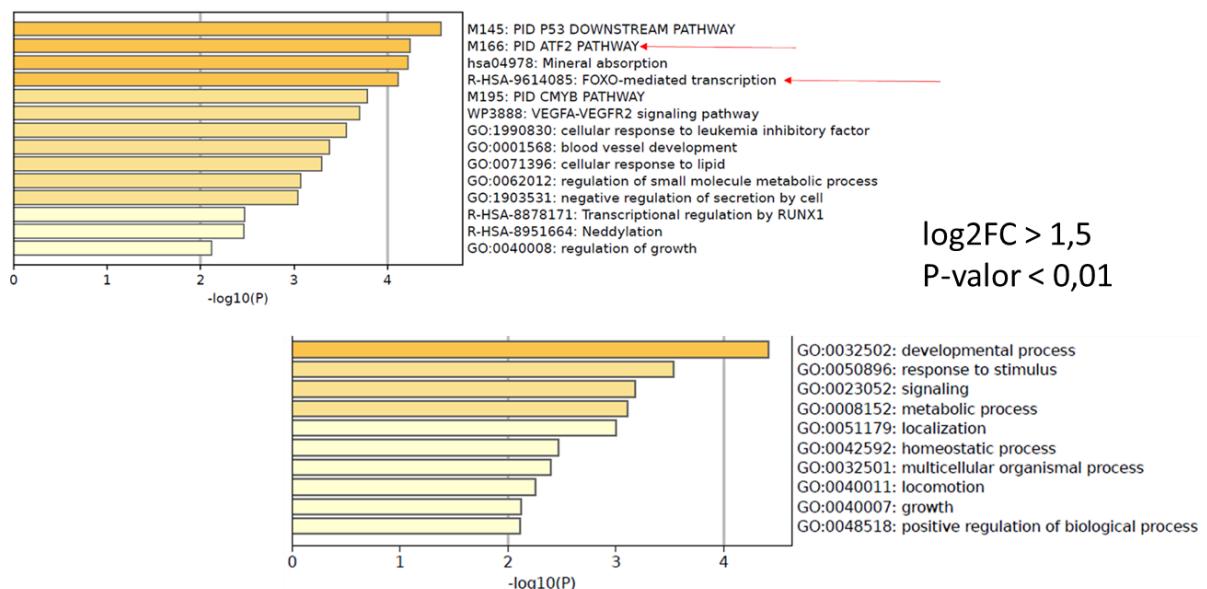


Figura 19: Perfiles transcripcionales enriquecidos en los genes regulados diferencialmente por la acción de MK en presencia de CRH respecto del tratamiento solo con CRH (43).

Células HT22-CRHR1 fueron pre-incubadas durante 20 minutos con el inhibidor de AKT MK2206 (MK) en concentración 10 μM o vehículo y fueron estimuladas durante 1 hora con CRH en concentración 10 nM y/o MK 10 μM . Se grafican los 20 *clusters* más enriquecidos ordenados según su p-valor (Superior) y los *clusters* de gene ontology (GO) más enriquecidos ordenados según su p-valor (Inferior). En flechas rojas se marcan aquellos *clusters* los cuales se discuten en el texto o que aparecen en otros análisis.

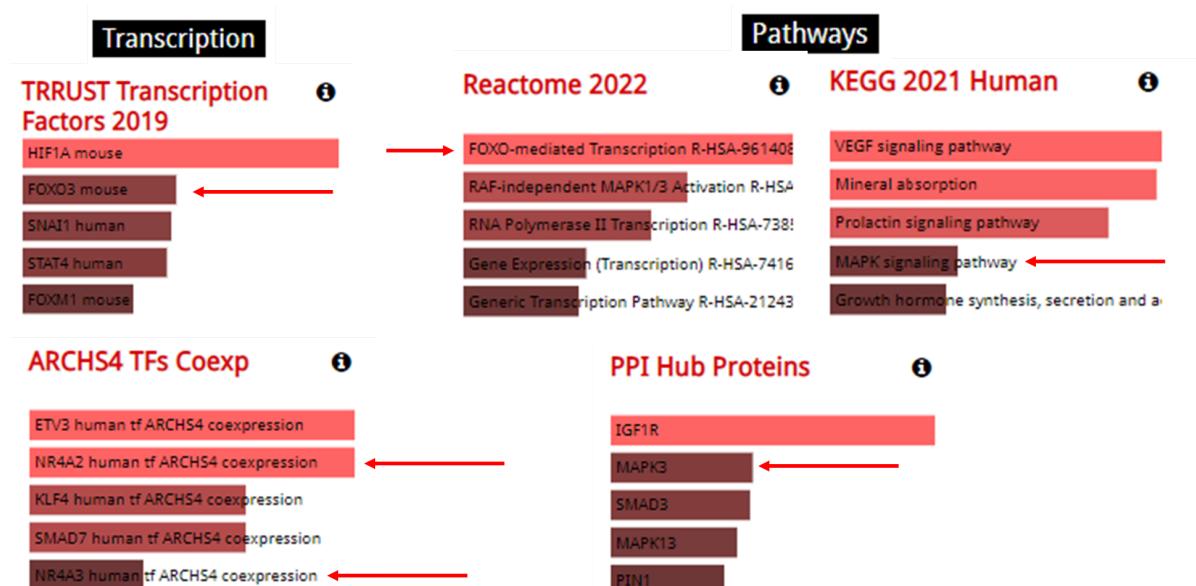


Figura 20: Perfiles transcripcionales enriquecidos en los genes regulados diferencialmente por MK en presencia de CRH respecto del tratamiento solo con CRH.

Células HT22-CRHR1 fueron pre-incubadas durante 20 minutos con el inhibidor de AKT MK2206 (MK) en concentración 10 μM o vehículo y fueron estimuladas durante 1 hora con CRH en concentración 10 nM y/o MK 10 μM . Se grafican los *clusters* más enriquecidos ordenados según su p-valor. Con flechas rojas se marcan los *clusters* los cuales se encontraban enriquecidos en los genes regulados por CRH o por aparecen enriquecidos también al realizar el análisis de *Metascape*.

Lo siguiente que se evaluó fue el análisis de solapamiento mediante la página de MSigDB para los genes antagonizados por MK obteniéndose los resultados de la Figura 21 donde se obtienen *clusters* asociados a procesos apoptóticos; regulación de actividad kinasa; regulación del ciclo celular; actividad de las MAPK; entre otros los cuales se enriquecen, también, en el análisis con todos los genes regulados por CRH, como se mostró en la Figura 13. Sin embargo, en este caso, los p-valores obtenidos resultan poco significativos.

Gene Set Name [# Genes (K)]	Description	# Genes in Overlap (k)	k/K	p-value	FDRq-value
GOBP_APOPTOTIC_PROCESS [1999]	A programmed cell death process which begins when a cell receives an internal (e.g. DNA damage) or external signal (e.g. an extracellular death ligand), and	12	12/1999	4.18 e ⁻⁷	1.33 e ⁻³
GOBP_VITAMIN_D_RECECTOR_SIGNALING_PATHWAY [10]	The series of molecular signals generated as a consequence of a vitamin D receptor binding to one of its physiological ligands. [GOC:BHF,	2	2/10	4.42 e ⁻⁵	2 e ⁻²
GOBP_ENZYME_LINKED_RECECTOR_PROTEIN_SIGNALING_PATHWAY [1002]	The series of molecular signals initiated by an extracellular ligand binding to a receptor on the surface of the target cell, where the receptor possesses catalytic	7	7/1002	5.86 e ⁻⁵	2.32 e ⁻²
GOBP_REGULATION_OF_KINASE_ACTIVITY [708]	Any process that modulates the frequency, rate or extent of kinase activity, the catalysis of the transfer of a phosphate group, usually from ATP, to a substrate molecule. [GOC:bf]	6	6/708	7.3 e ⁻⁵	2.49 e ⁻²
GOBP_CELLULAR_RESPONSE_TO_VITAMIN_D [13]	Any process that results in a change in	2	2/13	7.65 e ⁻⁵	2.49 e ⁻²
GOBP_REGULATION_OF_CELL_CYCLE [1064]	Any process that modulates the rate or extent of progression through the cell cycle. [GOC:ai, GOC:dph, GOC:tb]	7	7/1064	8.53 e ⁻⁵	2.52 e ⁻²
GOBP_PHOSPHORYLATION [1895]	The process of introducing a phosphate	9	9/1895	9.29 e ⁻⁵	2.68 e ⁻²
GOBP_RESPONSE_TO_VITAMIN_D [16]	Any process that results in a change in state or activity of a cell or an organism	2	2/16	1.17 e ⁻⁴	3.07 e ⁻²
GOBP_CELLULAR_RESPONSE_TO_VITAMIN [18]	Any process that results in a change in state or activity of a cell (in terms of movement, secretion, enzyme production, gene expression, etc.) as a result of a vitamin stimulus. [GOC:mah]	2	2/18	1.5 e ⁻⁴	3.39 e ⁻²
GOMF_MAP_KINASE_PHOSPHATASE_ACTIVITY [18]	Catalysis of the reaction: a phosphorylated MAP kinase + H ₂ O = a MAP kinase + phosphate. [GOC:mah, PMID:12184814, PMID:17208316]	2	2/18	1.5 e ⁻⁴	3.39 e ⁻²
GOBP_MAPK CASCADE [818]	An intracellular protein kinase cascade containing at least a MAPK, a MAPKK and	6	6/818	1.6 e ⁻⁴	3.57 e ⁻²

Figura 21: Perfiles transcripcionales enriquecidos en los genes regulados diferencialmente por la acción de MK en presencia de CRH respecto del tratamiento solo con CRH mediante el análisis de solapamiento utilizando la herramienta de MSigDB.

Células HT22-CRHR1 fueron pre-incubadas durante 20 minutos con el inhibidor de AKT MK2206 (MK) en concentración 10 μM o vehículo y fueron estimuladas durante 1 hora con CRH en concentración 10 nM y/o MK 10 μM . El análisis se realizó frente a la base de datos “Gene Ontology”. Se grafican los *clusters* enriquecidos en genes regulados diferencialmente por la acción de MK en presencia de CRH respecto del tratamiento con CRH solo, junto con su p-valor y FDR correspondiente y otros valores proporcionados por el análisis como k/K que hace referencia a la cantidad de genes solapados entre aquellos de interés que nosotros proporcionamos y aquellos contenidos dentro del *cluster* evaluado y K hace referencia a los genes en el *cluster* evaluado. Además aparece una pequeña descripción de cada *cluster* evaluado. Con recuadros

rojos se marcan los *clusters* los cuales aparecen también al realizar el análisis para los genes regulados por CRH.

Análisis del perfil transcripcional generado por la acción de Dyngo.

El último análisis que se realizó fue sobre el efecto del inhibidor de la endocitosis, Dyngo. Lo primero que se realizó fue ver cuántos genes se regulan sólo por la acción de Dyngo respecto del vehículo y por la acción de este en presencia de CRH respecto del tratamiento con CRH solo, los resultados se muestran en la Figura 22, donde se ve que se regulan significativamente 33 y 465 genes, respectivamente. A su vez puede observarse que sobre los 372 genes regulados por CRH más de la mitad presenta esta regulación alterada por Dyngo (204). Nuevamente, y como sucedió con MK, la mayoría de los genes para los cuales Dyngo altera la regulación de CRH son antagonizados (195).

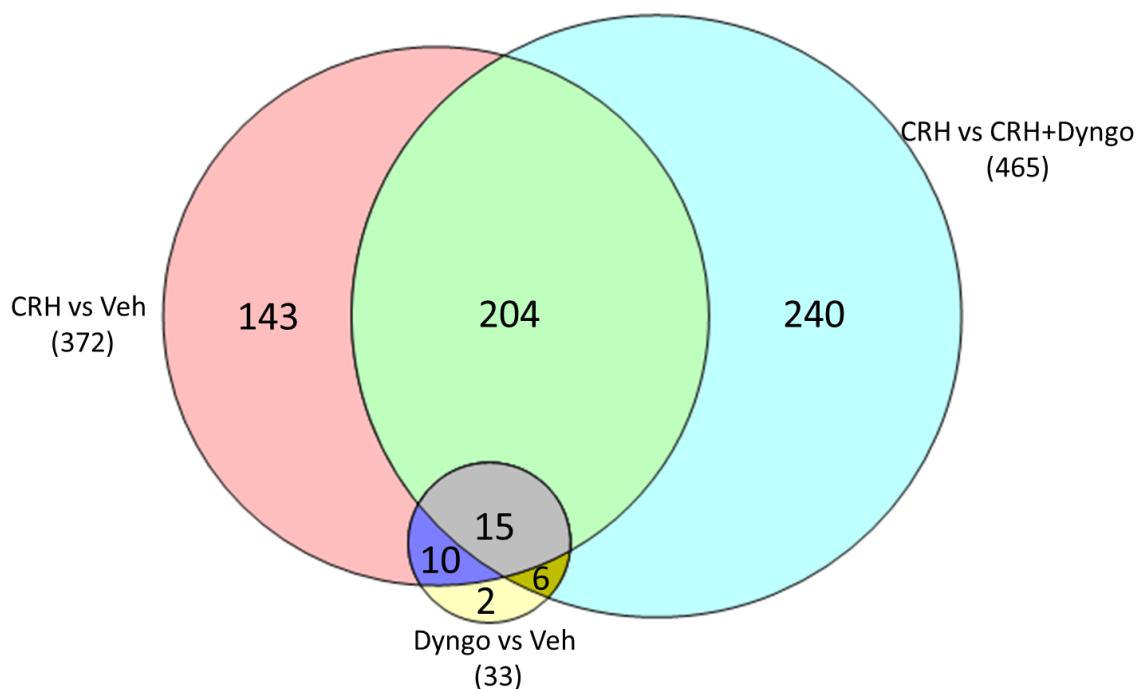


Figura 22: Venn Diagram presentando el número de genes regulados por CRH (372) y Dyngo (33) respecto del vehículo y de Dyngo+CRH (465) respecto de CRH solo.

Células HT22-CRHR1 fueron pre-incubadas durante 20 minutos con el inhibidor de endocitosis (Dyngo) en concentración 30 μM o vehículo (Veh) y fueron estimuladas durante 1 hora con CRH en concentración 10 nM y/o Dyngo 30 μM . Se grafica la cantidad de genes regulados por CRH y Dyngo respecto del vehículo y de Dyngo+CRH respecto de CRH solo, también se muestran cuántos se encuentran compartidos por cada condición.

Al igual que sobre los genes antagonizados por MK, se realizó un heatmap sobre los 195 genes antagonizados por Dyngo a fin de corroborar la buena consistencia entre réplicas y la regulación de los mismos. El mismo se presenta en la Figura 23.

Acto siguiente, se realizó la Figura 24, en la cual se pueden observar los 372 genes regulados por CRH en los tratamientos para CRH, Dyngo, Vehículo o CRH+Dyngo. Se observa que la presencia de

Dyngo impone un patrón transcripcional propio, en presencia o ausencia de CRH, y distinto de aquel que produce el estímulo con CRH.

Creíamos que, por lo discutido anteriormente (Figura 8) y lo mostrado en la Figura 24, Dyngo podía estar teniendo un efecto propio ya que su patrón de expresión de genes difiere del obtenido con el vehículo por lo que se realizó un pequeño ensayo morfológico el cual sus resultados se muestran en la Figura 25. Lo que se ve en esta es que las células tratadas con Dyngo se redondean y se levantan lo cual no se corresponde ni con lo observado para el vehículo ni mucho menos con CRH. Esta morfología es la que adoptan las HT22 frente a estrés agudo que lleva a las células a su muerte. Este patrón morfológico nos podría indicar que Dyngo podría estar teniendo un efecto a nivel transcripcional independiente de aquel que podría provocar únicamente la inhibición de la endocitosis y por tanto no podemos concluir que los resultados obtenidos en este RNA-Seq nos brinden información sobre la regulación que la endocitosis ejerce sobre la transcripción.

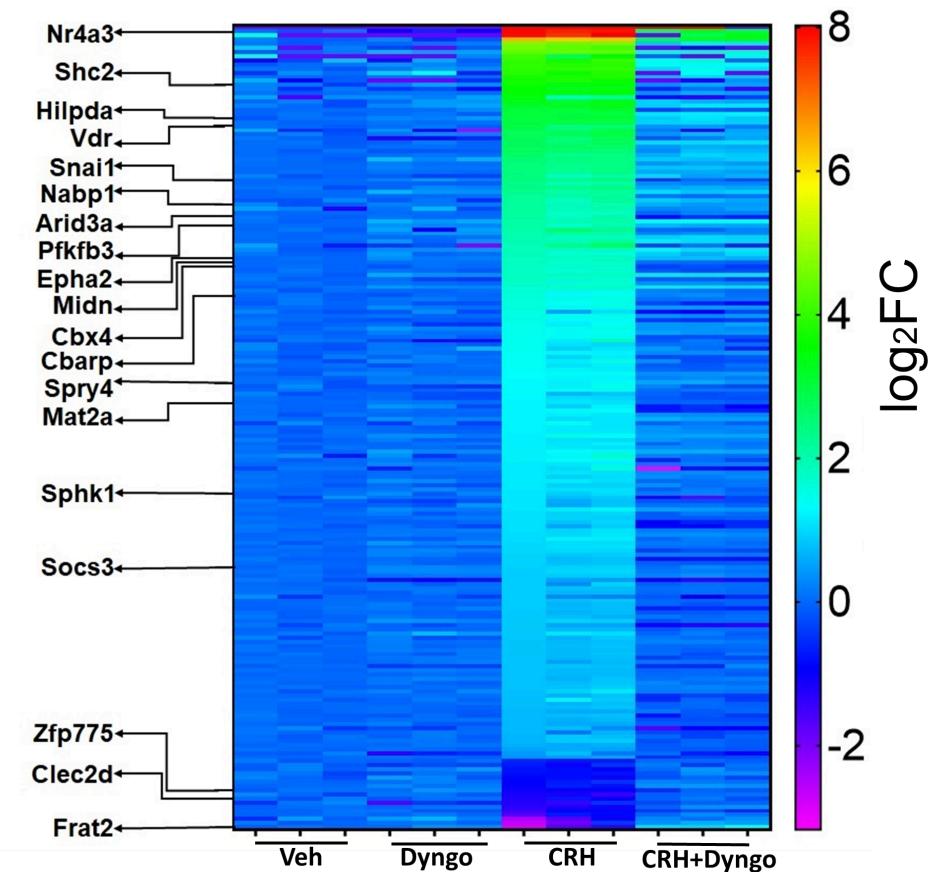


Figura 23: Heatmap de los genes que CRH inhibe o estimula y Dyngo antagoniza dicho efecto.

Células HT22-CRHR1 fueron pre-incubadas durante 20 minutos con el inhibidor de endocitosis (Dyngo) en concentración 30 μM o vehículo (Veh) y fueron estimuladas durante 1 hora con CRH en concentración 10 nM y/o Dyngo 30 μM . Se grafican los genes que son antagonizados por Dyngo frente a la acción de CRH ordenados según el log2FC. De los 195 genes, solo se marcan aquellos 19 genes los cuales son regulados tanto por Dyngo como por MK.

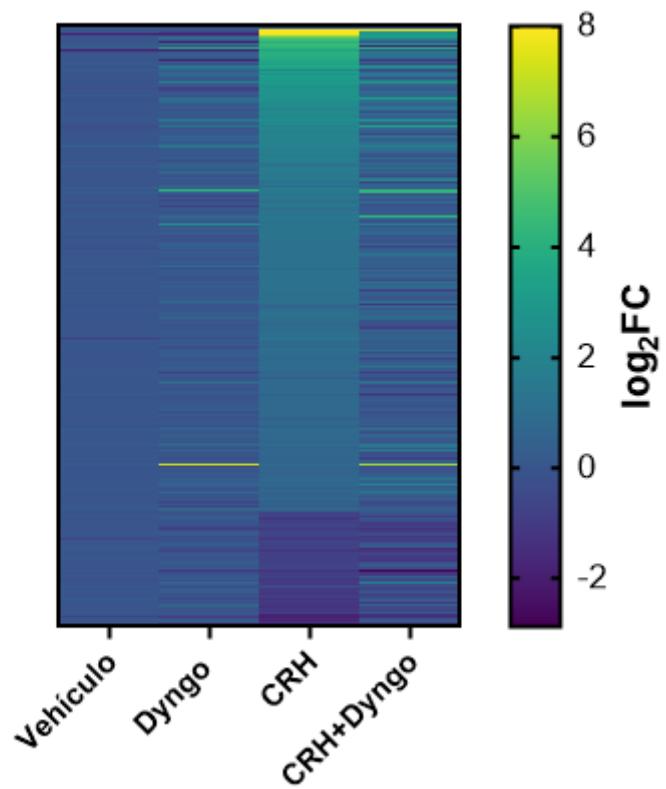


Figura 24: Heatmap de los 372 genes regulados por CRH comparados con el vehículo, Dyngo o CRH+Dyngo.
Células HT22-CRHR1 fueron pre-incubadas durante 20 minutos con el inhibidor de endocitosis (Dyngo) en concentración 30 μM o vehículo y fueron estimuladas durante 1 hora con CRH en concentración 10 nM y/o Dyngo 30 μM . Se grafican los genes que son regulados por CRH ordenados según el log2FC.

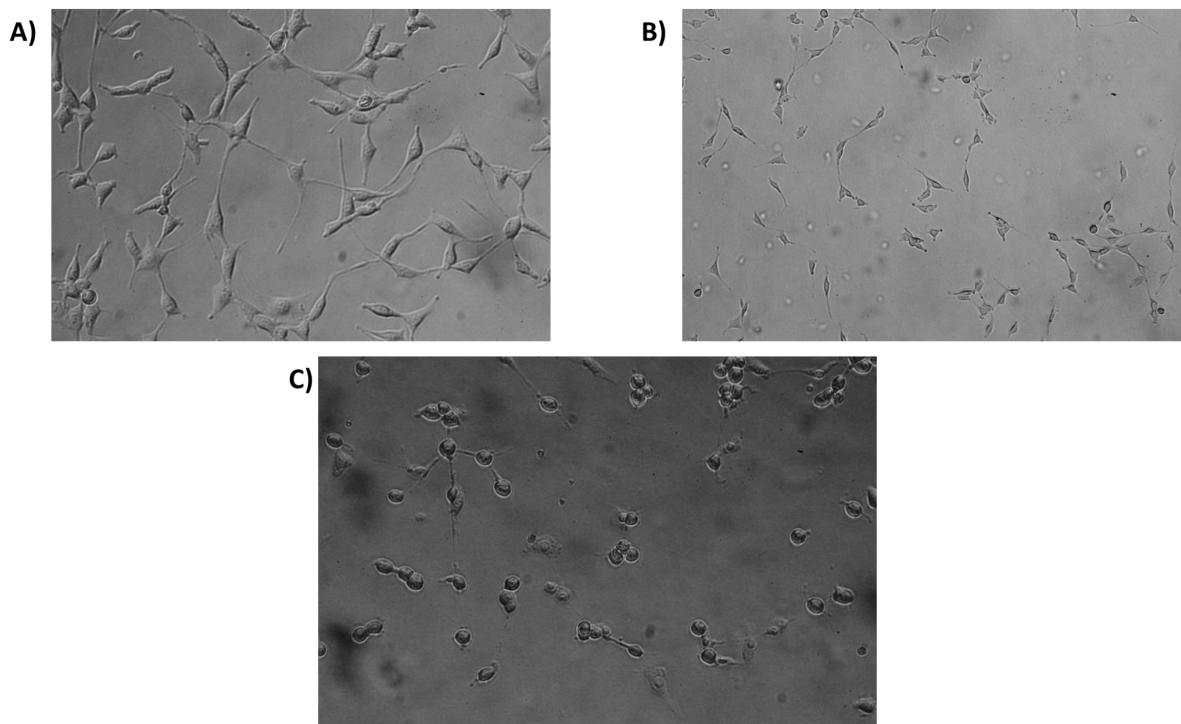


Figura 25: Imágenes de células tratadas con Vehículo (A); CRH 10 nM (B) o Dyngo 10 μM (C).

Células HT22-CRHR1 fueron pre-incubadas durante 20 minutos con el inhibidor de endocitosis (Dyngo) en concentración 10 μM o vehículo y fueron estimuladas durante 1 hora con CRH en concentración 10 nM y/o Dyngo 10 μM . Se muestran imágenes representativas de los resultados obtenidos para las mismas.

A continuación se realizó el análisis de solapamiento con Metascape y Enrichr para los 195 genes antagonizados por Dyngo. En las Figuras 26 y 27 se observa que se enriquecen los *clusters* los cuales también están enriquecidos en genes regulados por CRH como son los marcados con flechas, sin embargo, estos aparecen con un p-valor menor que cuando se realiza el análisis con estos genes. Esto puede deberse a que al ser la mitad de los genes regulados por CRH, siguen enriqueciendo significativamente muchos de los mismos *clusters*, sin embargo los p-valores son mayores porque no son específicamente los genes que enriquecen esos *clusters* sino que pareciera ser un subconjunto azaroso de los genes regulados por CRH en lo que concierne a los *clusters* evaluados, lo cual nos da idea de que la regulación de genes por Dyngo no es el factor determinante que enriquece estos *clusters*.

Por otro lado, también se obtienen otros *clusters* los cuales no se obtenían para los genes regulados por CRH como “regulation of DNA-binding transcription activity”; “regulation of apoptotic signaling pathway” o “apoptotic signaling pathway”, pero con bajos p-valores y además ninguno de ellos tiene relación específica con el efecto endocítico que se pretendía bloquear con Dyngo.

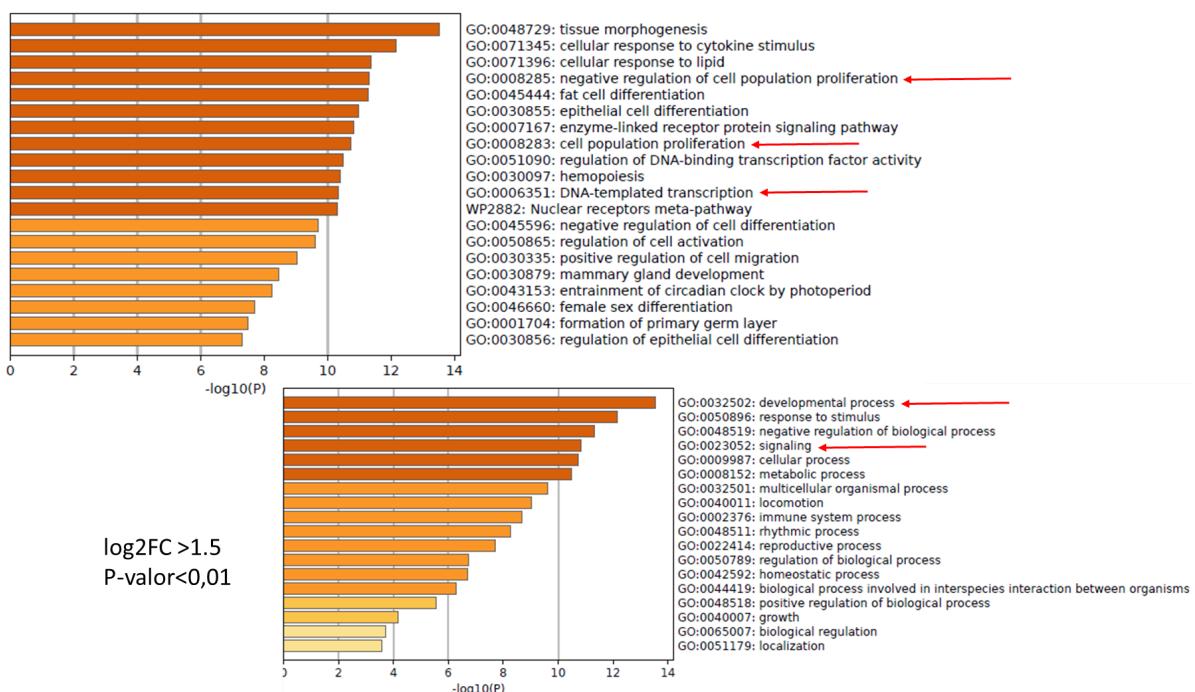


Figura 26: Resultados obtenidos para el análisis de Metascape de los 195 genes que son regulados por CRH y Dyngo antagoniza su acción.

Células HT22-CRHR1 fueron pre-incubadas durante 20 minutos con el inhibidor de endocitosis (Dyngo) en concentración 30 μM o vehículo y fueron estimuladas durante 1 hora con CRH en concentración 10 nM y/o Dyngo 30 μM . Se grafican los 20 *clusters* más enriquecidos ordenados según su p-valor (Superior) y los *clusters* de “gene ontology” (GO) más enriquecidos ordenados según su p-valor (Inferior). En flechas rojas se marcan aquellos *clusters* los cuales aparecen también en el análisis de los genes regulados por CRH.

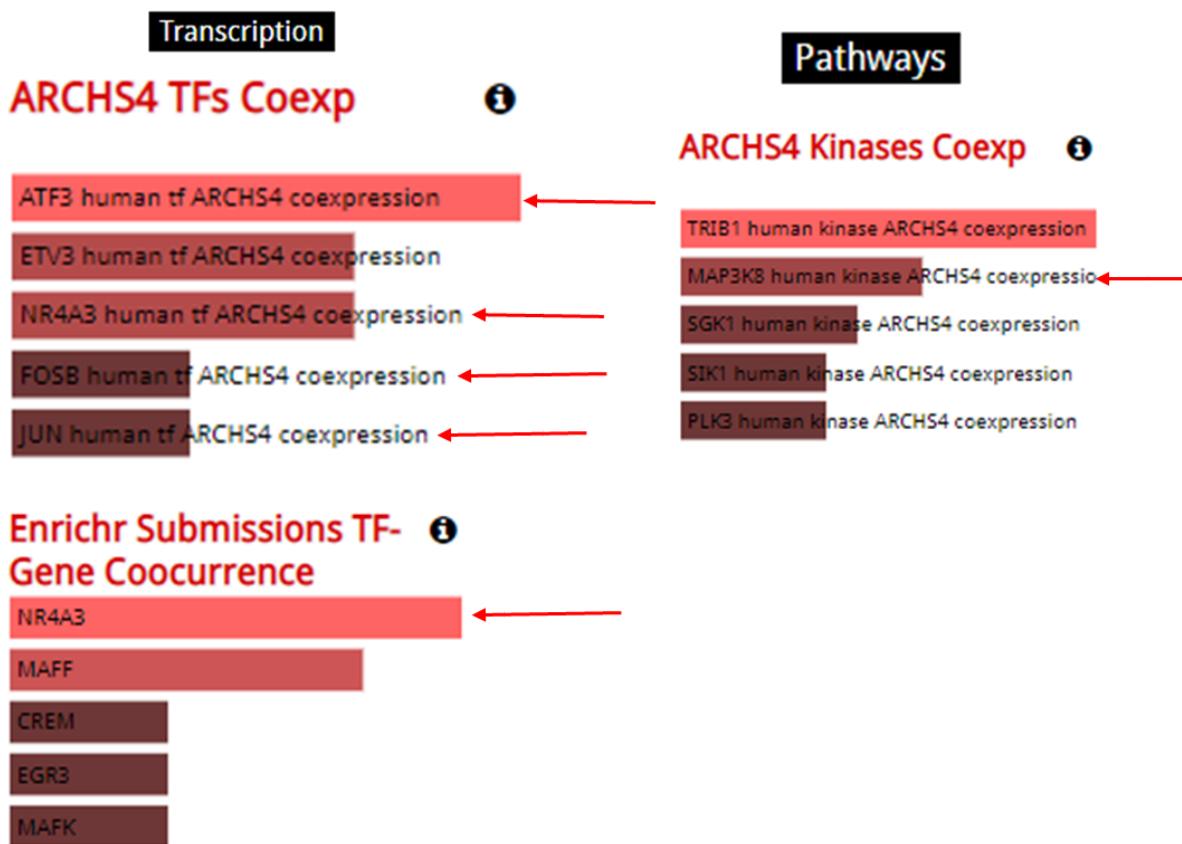


Figura 27: Resultados obtenidos para el análisis de Enrichr de los 195 genes que son regulados por CRH y Dyngo antagoniza su acción.

Células HT22-CRHR1 fueron pre-incubadas durante 20 minutos con el inhibidor de endocitosis (Dyngo) en concentración 30 μM o vehículo y fueron estimuladas durante 1 hora con CRH en concentración 10 nM y/o Dyngo 30 μM . Se muestran aquellas secciones en las cuales se obtuvieron resultados que aparecen también para los genes regulados por CRH. En flechas rojas se marcan aquellos *clusters* los cuales aparecían asociados a la regulación por CRH.

Síntesis de los resultados más relevantes obtenidos en los análisis de los perfiles transcripcionales.

Luego se realizó la Figura 28 en la cual se muestran diferentes *clusters* obtenidos mediante el análisis de GSEA y el de solapamiento por MsigDB para los diferentes subsets de genes: Regulados por CRH; inducidos por CRH; antagonizados por Dyngo y antagonizados por MK. Los *clusters* mostrados se eligieron ya sea porque sirvieron como validación del modelo (regulación de la diferenciación celular; neurogénesis) o porque aportan información novedosa sobre la regulación ejercida por CRH.

Lo que puede observarse en dicha figura es que los genes regulados por CRH enriquecen *clusters* asociados con genes involucrados en respuestas celulares conocidas en respuesta a CRH como la regulación de la diferenciación celular o la neurogénesis. Por otro lado, también se observan

clusters novedosos como genes asociados a la cascada de kinasas lo cual implicaría que hay un *feedback loop* en el cual la acción de CRH, mediada en parte por kinasas, genera que se transcriben genes asociados con esta vía. También se observa que hay genes regulados por el factor de transcripción AP1, un complejo formado generalmente por proteínas de las familias de Jun y Fos, dos conocidos IEGs. ATF2, una proteína que también puede formar parte del complejo AP1, también regula genes que aparecen enriquecidos. Otros conjuntos de genes enriquecidos son aquellos que poseen sitios de unión para ATF2 (CREBP1_Q2) o para CREB1 (CREB_Q2), donde su secuencia consenso de unión es muy similar entre sí siendo VGTGACGTMACN y NSTGACGTAANN, respectivamente. CREB es un conocido efecto de la vía canónica de señalización de CRH.

Al realizar el análisis de solapamiento, en particular con los genes inducidos por CRH se obtienen valores estadísticos más significativos, a pesar de tratarse de menos genes que todos aquellos regulados por CRH, lo cual da la idea de que estos genes serían los involucrados en enriquecer las vías observadas anteriormente. Por otra parte al realizar el análisis con los genes antagonizados por Dyngo se obtiene que estos se encuentran enriquecidos en estas vías pero con valores estadísticos considerablemente menos significativos por lo que el tratamiento con Dyngo no parecería estar afectando particularmente estos *clusters*.

Por último al analizar los resultados obtenidos para los genes regulados por MK se ve que solo se encuentran enriquecidos en aquellos asociados con la cascada de MAPK y en aquellos con sitios de unión para ATF2 y CREB1, aunque con un p-valor mayor, y esto puede deberse a que son muy pocos los genes que se regulan por la acción de MK.

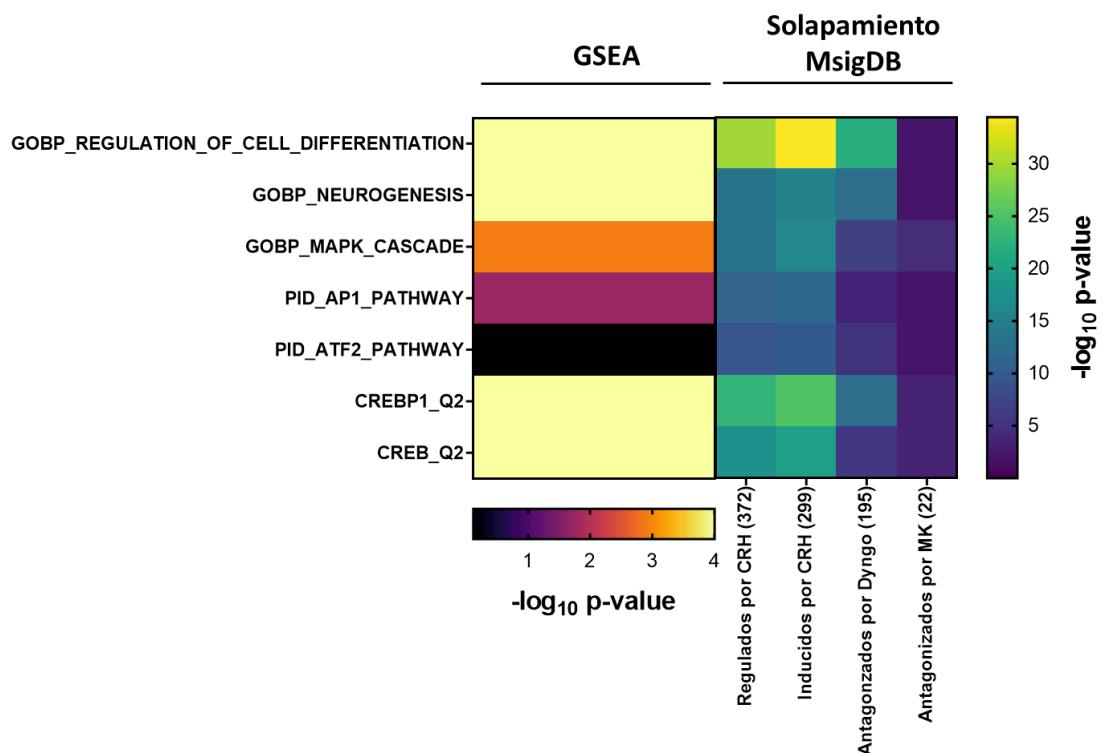


Figura 28: Heatmap de los *clusters* enriquecidos por los genes regulados por CRH; inducidos por CRH; antagonizados por Dyngo o antagonizados por MK obtenidos mediante la herramienta MsigDB o GSEA.

Células HT22-CRHR1 fueron pre-incubadas durante 20 minutos con el inhibidor de endocitosis (Dyno) en concentración 30 μM ; el inhibidor de AKT MK2206 (MK) en concentración 10 μM o vehículo y fueron estimuladas durante 1 hora con CRH en concentración 10 nM; Dyno 30 μM y/o MK 10 μM . Se presentan *clusters* asociados a funciones conocidas de CRH y otros novedosos y se los compara para los distintos subsets de genes. El *cluster* llamado CREBP1_Q2 hace referencia a sitios de unión de ATF2.

Por último, el mismo análisis puede realizarse tanto para Metascape como para Enrichr donde los resultados obtenidos se muestran en la Figura 29 y puede verse que en ambos casos la mayoría de los *clusters* que se encuentran enriquecidos al utilizar todos los genes regulados por CRH, mejoran su p-valor al utilizar sólo los genes regulados positivamente por este. De igual manera no parece haber una regulación específica dada por Dyno frente a estos *clusters* y que muchos de estos *clusters* no se encuentran enriquecidos al evaluar los genes antagonizados por MK, esto debido a que los mismos son muy pocos y habría que seguir investigando.

Cabe reparar en que, como se viene mencionando, se encuentran enriquecidos *clusters* de señalización de MAPK; ATF; JUN; FOS; regulación de la proliferación celular; regulación de la diferenciación celular en la mayoría de los casos.

De igual manera, los clusters enriquecidos en el análisis de *Metascape* se encuentran todos entre los 100 *clusters* más enriquecidos excepto “developmental process” que se encuentra dentro de los GO más enriquecidos mientras que los que se enriquecen en *Enrichr* se encuentran en la base de datos “ARCHS4 TFs Coexp” en el caso de “Nr4a2/Nr4a3 human ARCHS4 coexpression”; en “TRUSS Transcription Factors 2019” en el caso de “Jun/Fos mouse” ambas bases de datos en la solapa “Transcription” mientras que “MAPK signaling pathway” se encuentra en “KEGG 2021 Human” y “Jun”; “MAPK1” y “MAPK3” en “PPI Hub Proteins” donde estas últimas bases de datos se encuentran en la solapa “Pathways”.

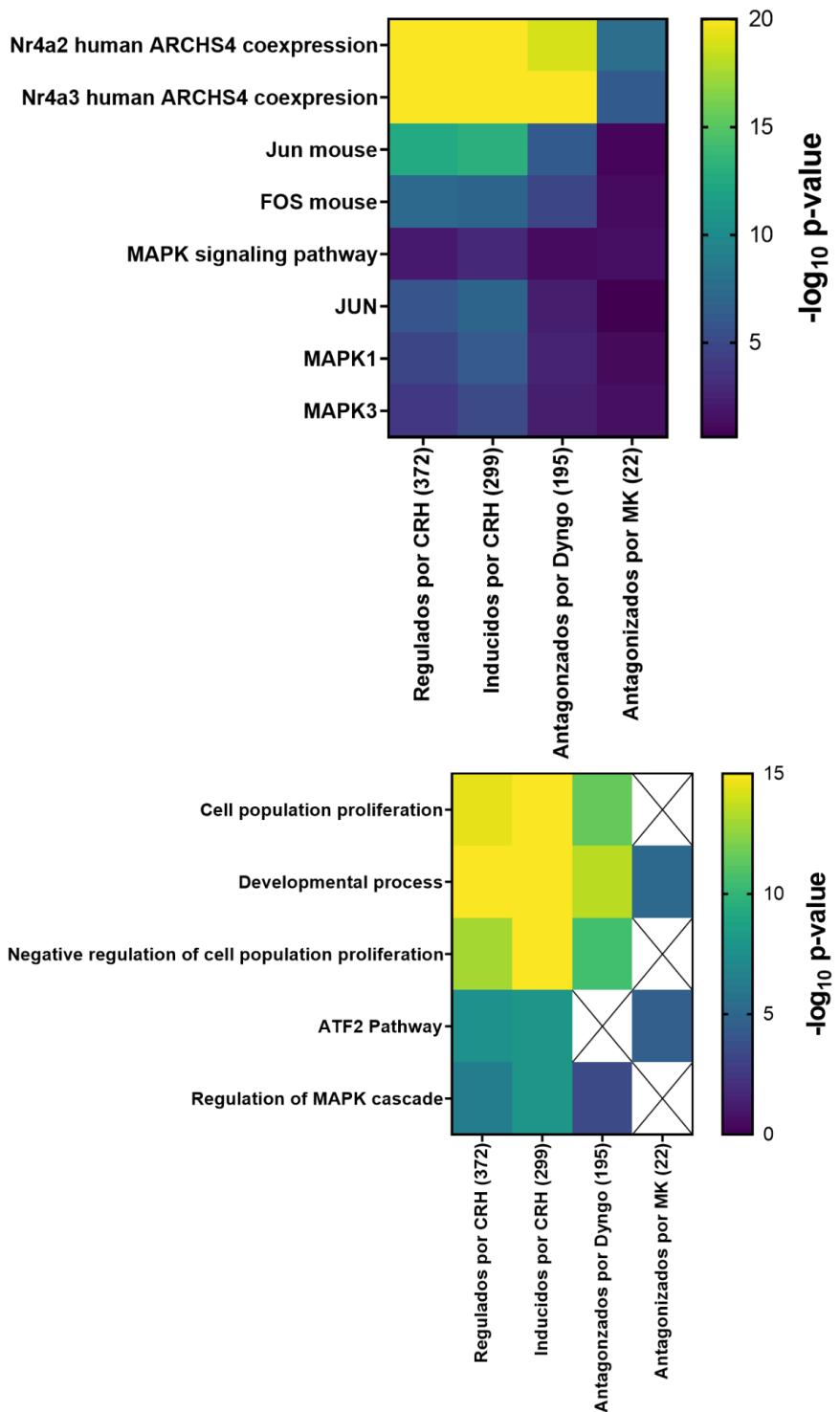


Figura 29: Heatmap de los *clusters* enriquecidos por los genes regulados por CRH; inducidos por CRH; antagonizados por Dyngo o antagonizados por MK en la plataforma Enrichr (Superior) o Metascape (Inferior).

Células HT22-CRHR1 fueron pre-incubadas durante 20 minutos con el inhibidor de endocitosis (Dyngo) en concentración 30 μM ; el inhibidor de AKT MK2206 (MK) en concentración 10 μM o vehículo y fueron estimuladas durante 1 hora con CRH en concentración 10 nM; Dyngo 30 μM y/o MK 10 μM . Se presentan *clusters* asociados a funciones conocidas de CRH y otros novedosos y se los compara para los distintos subsets de genes. Los nombres de los *clusters* son los que aparecen en las bases de datos de cada página. Las cruces

corresponden a aquellas bases de datos que no aparecieron enriquecidas en los análisis ya que se encontraban fuera de los 100 *clusters* más enriquecidos.

Elección de genes de interés, diseño y puesta a punto de primers para validar los datos obtenidos en el análisis del RNA-Seq.

Una vez obtenidos los resultados anteriores se eligieron genes de los regulados por CRH con respecto al vehículo, CRH+MK con respecto a CRH o no regulados, con la finalidad de diseñar *primers*, los cuáles fueron luego puestos a punto y así poder validar estos resultados. Como se mencionó anteriormente, el criterio utilizado para elegir sobre cuáles genes realizar las qPCRs fue que: tengan veces de cambio mayores a 2, las réplicas sean consistentes entre sí y que presenten alta expresión en las células HT22-CRHR1. Entre los genes seleccionados se encuentran: Nr4a2; Ddit4; Fos y Fosl2 (Regulados por CRH de manera significativa frente al vehículo pero no por CRH+MK frente a CRH); EphA2 y Dusp5 (Regulados de manera significativa CRH frente al vehículo y por CRH+MK frente a CRH) y Aqp1, un gen el cual no varía en ninguna condición.

Para la puesta a punto de cada *primer*, se evaluó cada uno a una temperatura de *annealing* de 60°C con concentraciones de 3 o 4 mM de Mg^{2+} . En la Figura 30, se observan los resultados obtenidos para el gen Ddit4 donde al utilizar una concentración 3 mM de Mg^{2+} se observan picos inespecíficos más suaves en la curva de *melting* que con la concentración de 4 mM de Mg^{2+} . Aunque los mismos no generan un empeoramiento de la curva de calibración ya que con la concentración 4 mM de Mg^{2+} que tiene los picos inespecíficos mayores se obtiene una pendiente, la cual habla de la eficiencia de la reacción , mayor (3,116 vs 3,056) y cercana al 100% teórico (3,3) y un R^2 mejor (0,9924 vs 0,9894), dicha curva es menos confiable. Si se contaran con muestras con baja expresión o las mismas se degradasen, los picos inespecíficos podrían ser mayores llevando a una disminución de la especificidad por lo que, dado que no hay una gran diferencia entre ambas curvas de calibración, se eligió como concentración de trabajo 3 mM de Mg^{2+} para Ddit4.

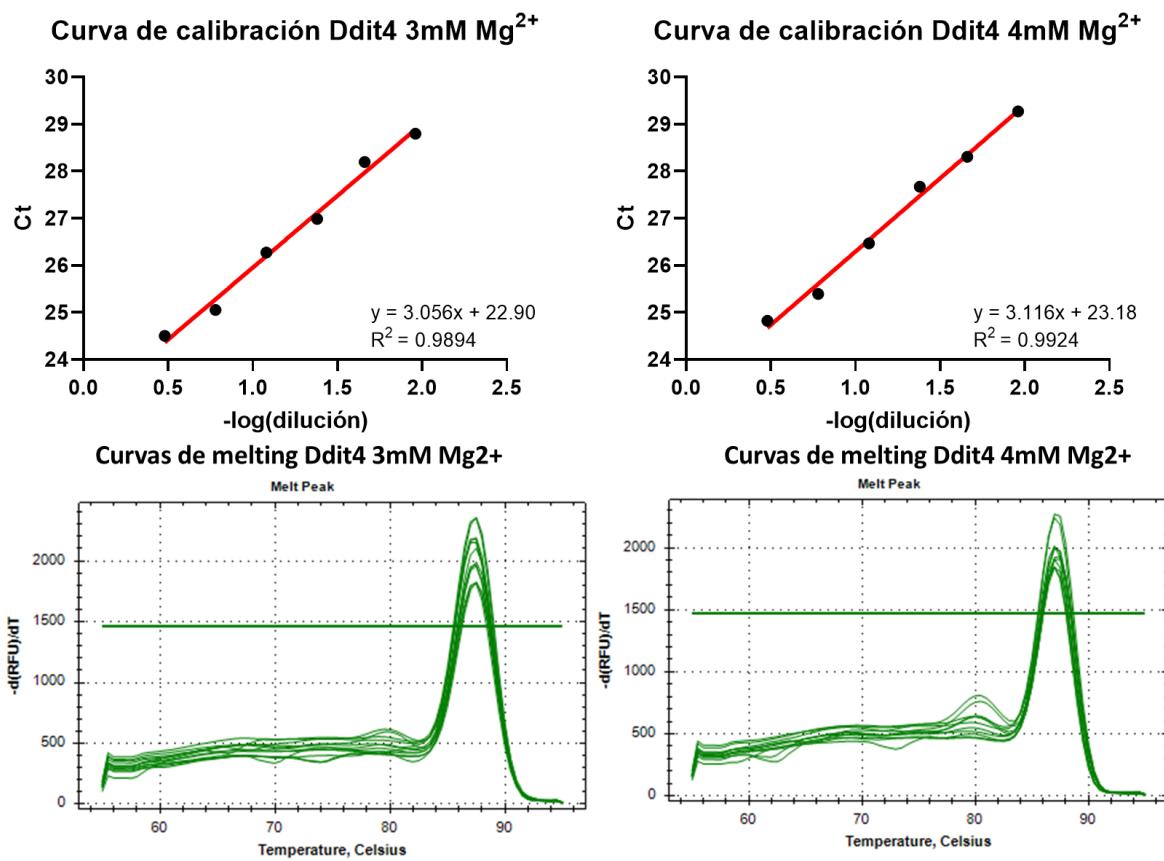


Figura 30: Curvas de calibración y de melting obtenidas para Ddit4 al utilizar 3 o 4 mM de Mg²⁺.

Células HT22-CRHR1 fueron estimuladas durante 1 hora con CRH en concentración 10 nM, con el RNA extraído a partir de estas se realizaron diluciones seriadas al tercio para la realización de las curvas de calibración. En el caso de utilizar 3 mM de Mg²⁺ se obtuvo un rango de diluciones cuantificables desde 1/3 hasta 1/92 abarcando desde el Ct 24,5 hasta el 28,8 y desde la dilución 1/3 hasta la 1/92 lo cual abarca un rango de Ct que va desde 24,82 hasta 29,27 con 4 mM de Mg²⁺ para este gen.

Otro par de *primers* que se pusieron a punto fueron los pertenecientes al gen de Fosl2, como se muestra en la Figura 31, al utilizar la concentración 3mM de Mg²⁺ se obtienen Cts los cuales no permiten la generación de una curva ya que no siguen una relación lineal por presentar dos picos de melting de manera que no resulta cuantificable. En este sentido, al utilizar la concentración 4 mM de Mg²⁺ se puede obtener una curva de calibración la cual tiene un R² de 0,95 y una pendiente de 2,781 y al evaluar los picos de melting obtenidos se observa que los mismos pertenecen todos a la misma temperatura, específica para el par de *primers*, y no hay inespecíficos por lo que se utiliza esta concentración de Mg²⁺ como la adecuada.

Este mismo procedimiento se realizó para Nr4a2; Dusp5 y EphA2 y se muestran curvas representativas obtenidas de los mismos en la Figura 32 para las condiciones óptimas seleccionadas (60°C con 4, 3 y 3 mM de Mg²⁺ respectivamente).

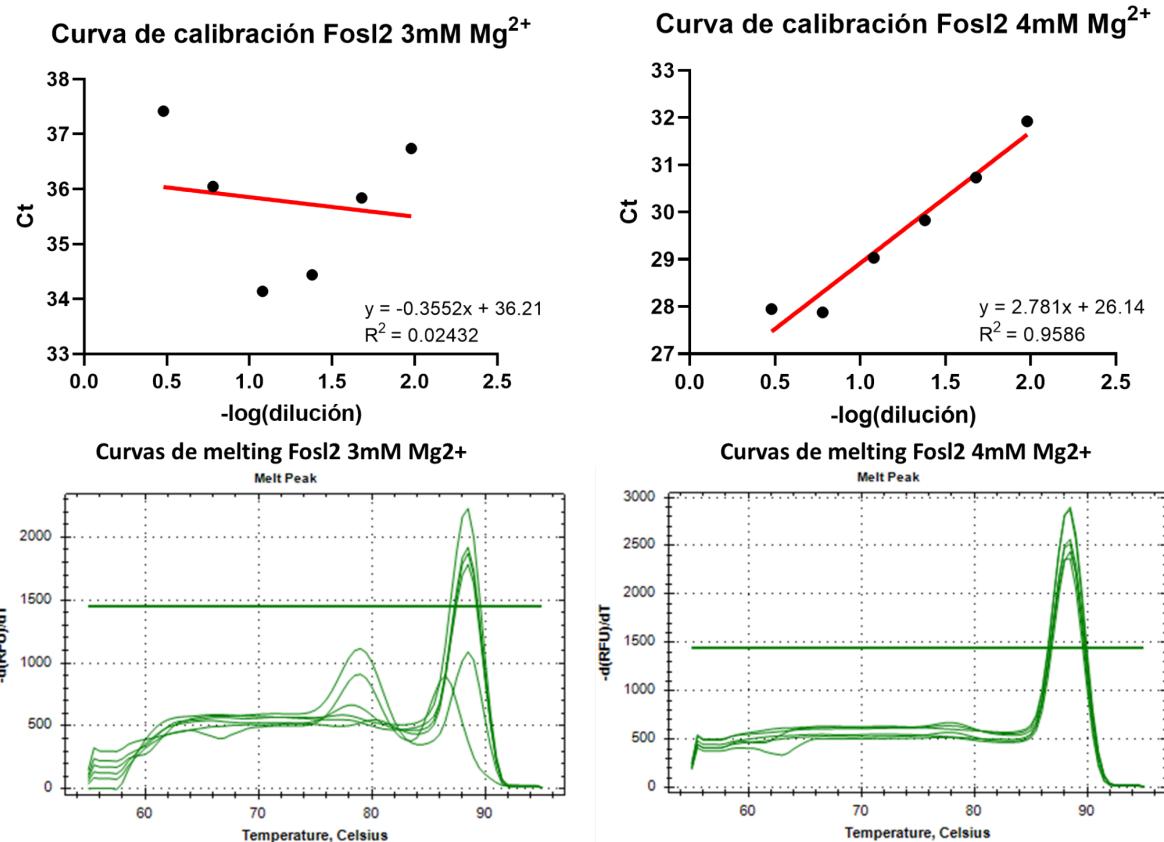


Figura 31: Curvas de calibración y de *melting* obtenidas para Fosl2 al utilizar 3 o 4 mM de Mg²⁺.

Células HT22-CRHR1 fueron estimuladas durante 1 hora con CRH en concentración 10 nM, con el RNA extraído a partir de estas se realizaron diluciones seriadas al tercio para la realización de las curvas de calibración. En el caso de utilizar 3 mM de Mg²⁺ no se pudo obtener un rango de diluciones cuantificables como si con 4 mM de Mg²⁺ siendo el mismo desde la dilución 1/3 hasta la 1/92 lo cual abarca un rango de Ct que va desde 27,95 hasta 31,92 para este gen.

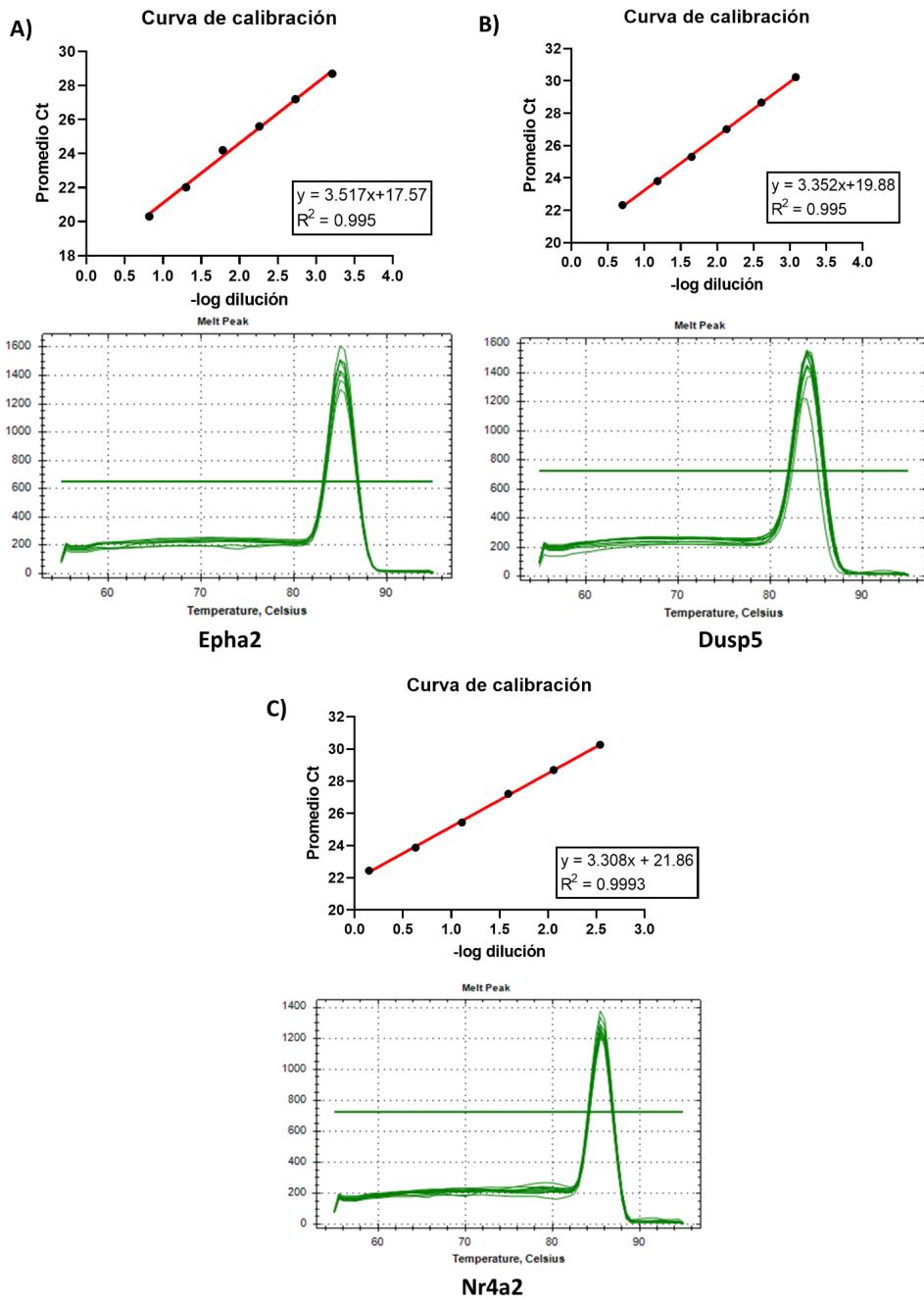


Figura 32: Curvas de calibración y de melting representativas obtenidas para Eph2, Dusp5 y Nr4a2.

Células HT22-CRHR1 fueron estimuladas durante 1 hora con CRH en concentración 10 nM, con el RNA extraído a partir de estas se realizaron diluciones seriadas al tercio para la realización de las curvas de calibración. En el caso de Eph2 se obtiene un rango de cuantificación desde la dilución 1/3 hasta la 1/729 pudiendo cuantificar desde el Ct 20,31 hasta el 28,69 (A) mientras que para Dusp5 se obtiene el mismo rango de cuantificación de diluciones pudiendo medir desde el Ct 22,32 hasta el 30,24 (B). En ambos casos se utilizó una concentración 3mM de Mg^{2+} . Por otra parte, al evaluar Nr4a2 se obtuvo un rango de cuantificación desde la dilución 1/3 a la 1/2187 permitiendo medir desde un Ct de 22,44 hasta 30,26 (C). Para este gen se utilizó una concentración 4 mM de Mg^{2+} .

cFos era, junto con Nr4a1, Arc y Egr1, uno de los pocos IEGs ya conocido río abajo de CRHR1 de manera que ya era utilizado en nuestro laboratorio, aunque con una temperatura de annealing de

68°C y 4 mM de Mg^{2+} (En la Figura 33 se muestra una de las mejores curvas de calibración obtenidas para este gen). Sin embargo, la expresión de cFos en las HT22-CRHR1 es muy baja (Figura 34) y esto generaba curvas las cuales contaban con muchos picos inespecíficos que permitían obtener curvas con rango de cuantificación limitado. Es por esto que se decidió, gracias a los datos del RNA-Seq que proporcionaron nuevos candidatos posibles, obtener mejores IEGs para realizar las mediciones.

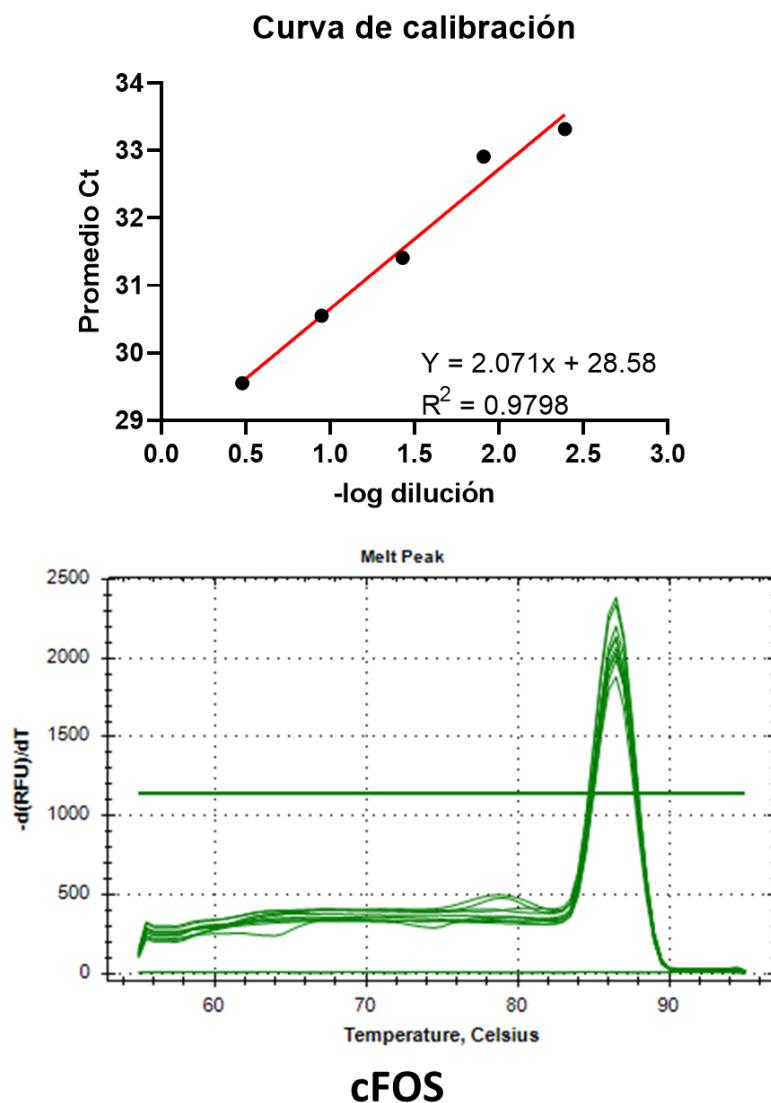


Figura 33: Curvas de calibración (Superior) y de *melting* (Inferior) representativa obtenida para cFOS.

Células HT22-CRHR1 fueron estimuladas durante 1 hora con CRH en concentración 10 nM, con el RNA extraído a partir de estas se realizaron diluciones seriadas al tercio para la realización de las curvas de calibración. Para este gen se obtuvo un rango de cuantificación desde la dilución 1/3 a la 1/48 permitiendo medir desde un Ct de 29,55 hasta 33,32.

Cabe destacar que además de estos *primers*, se utilizaron los de HPRT (utilizado como *housekeeping*) y Aqp1. Los mismos ya se encontraban puestos a punto por lo que se utilizaron las condiciones de Mg^{2+} y temperatura de *annealing* que se estaban utilizando anteriormente, siendo

4 mM de Mg^{2+} y 60°C para HPRT; mientras que para Aqp1 las condiciones son 3 mM de Mg^{2+} y 58°C.

Por último, también se intentó poner a punto genes (Nr4a3; Vdr; Nabp1 y Midn) los cuáles no daban buenas curvas a 60°C por lo que se realizaron gradientes de temperaturas, hallando su temperatura óptima, pero los mismos al tener baja expresión (Figura 34) se decidió, finalmente, optar por los de mayor expresión mencionados anteriormente. Si bien se observa que Midn presenta una buena expresión este fue descartado ya que se priorizaron *primers* con mayor variación en la expresión entre el vehículo y CRH (Figura 18) y a su vez no se lograron optimizar las condiciones que permitan obtener un amplicón utilizable por RT-qPCR, quizás debido a que presentan complementariedad moderadamente alta entre e intra *primers*.

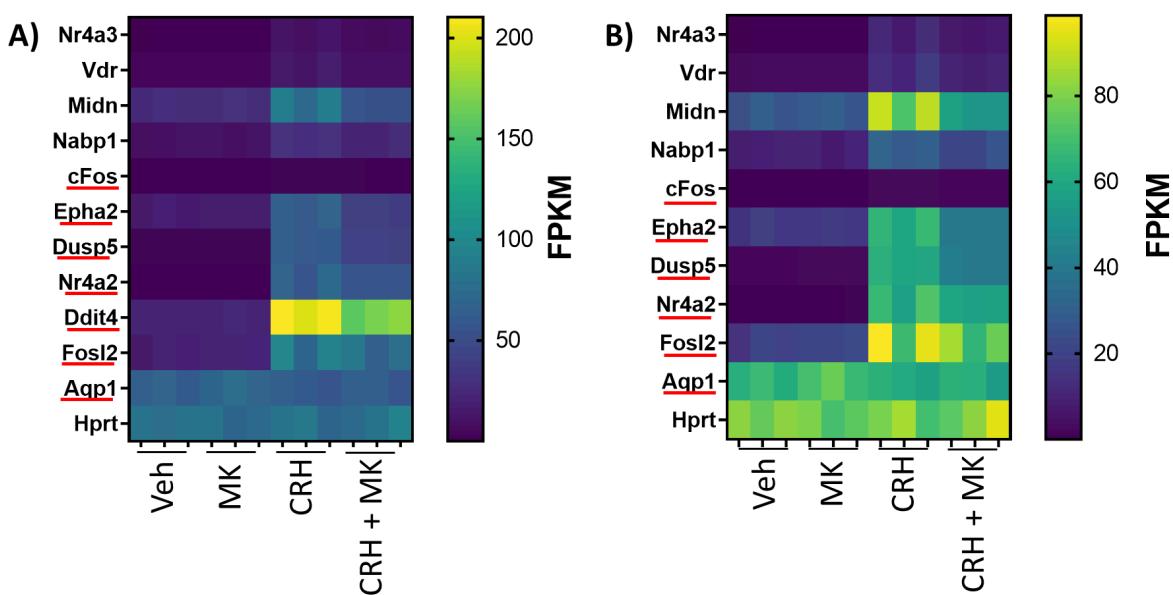


Figura 34: Nivel de expresión (cuentas) en células HT22-CRHR1 de los genes que se midieron o intentaron medir por RT-qPCR con (A) y sin (B) Ddit4.

Células HT22-CRHR1 fueron pre-incubadas durante 20 minutos con el inhibidor de AKT MK2206 (MK) en concentración 10 μM o vehículo (Veh) y posteriormente fueron estimuladas durante 1 hora con CRH en concentración 10 nM y/o MK 10 μM . Se grafican los genes que son antagonizados por MK frente a la acción de CRH. Se comparan aquellos genes regulados por CRH que se intentó ponerlos a punto con un gradiente de temperatura frente a aquellos que lograron ponerse a punto a 60°C (subrayados en rojo), excepto Aqp1 que fue puesto a punto a 58°C.

PCRs cuantitativas de los diferentes genes regulados por CRH; MK; o la combinación de estos.

Una vez puestos a puntos los diferentes *primers* el siguiente paso realizado fue corroborar los resultados obtenidos mediante el RNA-Seq. Para esto se realizaron diferentes experimentos con el fin de tener varias réplicas independientes, siempre con las mismas condiciones, de las cuales se detallarán los resultados obtenidos a continuación.

En primer lugar se evaluaron EphA2 y Dusp5 dos genes que en el RNA-Seq presentaban un aumento significativo con CRH el cual era antagonizado por la acción de MK en presencia de CRH (CRH+MK). En la Figura 35 se observa, a la izquierda, los valores de expresión obtenidos para Dusp5 en el RNA-Seq donde con CRH aumentó aproximadamente 30 veces con respecto al vehículo y al utilizar CRH+MK se revierte este efecto observándose una disminución respecto de CRH, la cual es significativa, donde la expresión de CRH+MK no llega a ser 20 veces mayor que el vehículo. Al examinar los resultados obtenidos mediante RT-qPCR, derecha de la figura, lo que se ve es que en primer lugar el aumento de la expresión con CRH es menor llegando a ser aproximadamente 12 veces con respecto al vehículo y que si bien se observa una tendencia a la disminución al evaluar CRH+MK la misma no es significativa, con este número de réplicas independientes, con respecto a CRH como sucedía anteriormente, en este caso la media de esta condición se encuentra en aproximadamente 9 veces de aumento con respecto a la condición “vehículo”.

Es importante notar que tanto en las diferentes réplicas del RNA-Seq como en las de la qPCR la condición MK tiene una media cercana a 1 y no tiene diferencias significativas con respecto al vehículo (Veh) lo cual habla de que esta condición por sí sola no genera un efecto.

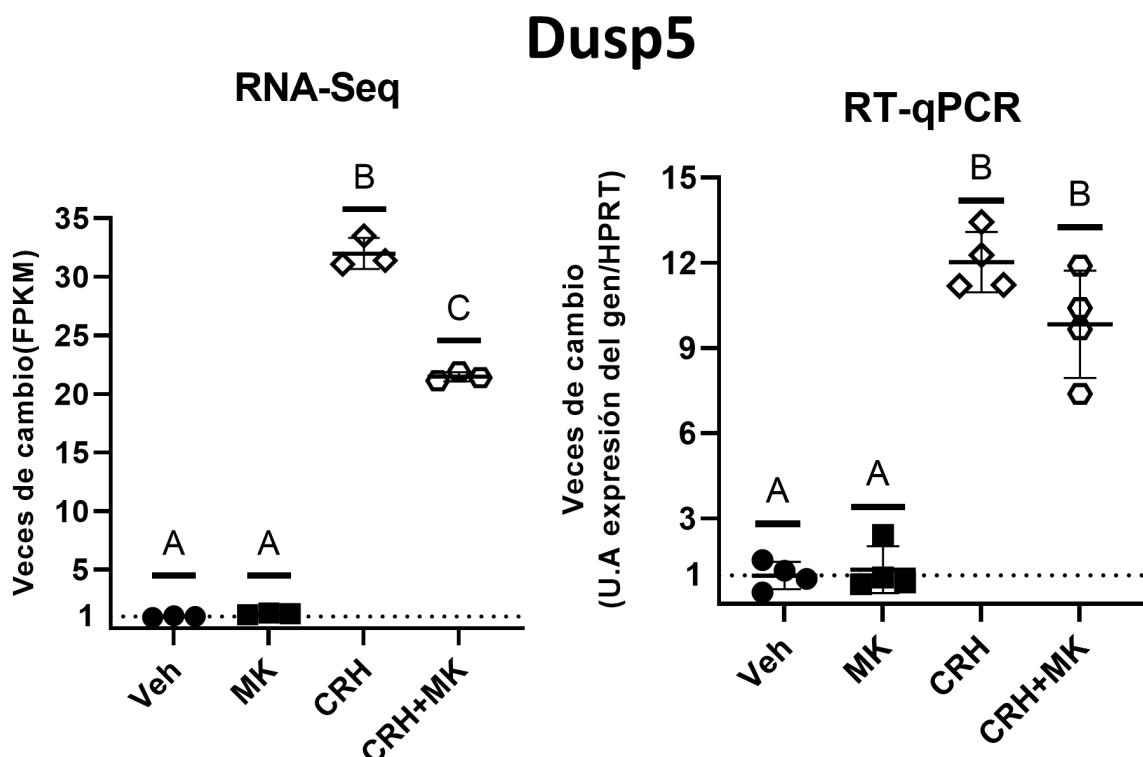


Figura 35: Niveles de mRNA de Dusp5 obtenidos mediante RNA-Seq (Izquierda) o RT-qPCR (Derecha).

Células HT22-CRHR1 fueron pre-incubadas durante 20 minutos con el inhibidor de AKT MK2206 (MK) en concentración 10 μM o vehículo (Veh) y posteriormente fueron estimuladas durante 1 hora con CRH en concentración 10 nM y/o MK 10 μM . Los niveles de mRNA fueron medidos mediante RNA-Seq (Izquierda) y se grafican como *media $\pm SD$, N = 3* o mediante RT-qPCR (Derecha) y se grafican como *media $\pm SD$, N = 4* donde el RNA-Seq se utilizaron los FPKM, normalizados al realizar el análisis estadístico Deseq2 por profundidad de secuenciación y cantidad de muestra inicial, entre otros factores, y luego por la expresión del vehículo y las RT-qPCR fueron normalizadas a la expresión de HPRT y del vehículo. La significancia de la

variación fue evaluada mediante Deseq2 en el caso del RNA-Seq o mediante ANOVA de un factor con prueba *post hoc* de Bonferroni para los datos obtenidos mediante RT-qPCR donde p -valor < 0,0001. El eje Y corresponde a las veces de cambio en la expresión con respecto al vehículo en FPKM o unidades arbitrarias (U.A) según sea el RNA-Seq o las RT-qPCRs respectivamente.

Por otra parte al analizar Eph2, en la Figura 36, a la izquierda nuevamente se obtiene un aumento significativo con respecto a la condición vehículo con CRH el cual es de aproximadamente 4 veces y una disminución, significativa, bajo la condición de CRH+MK hasta una media cercana a 2,5 veces de expresión con respecto a la condición vehículo. Al examinar la parte derecha en la cual se encuentran los resultados obtenidos para la qPCR puede notarse que nuevamente se obtiene un aumento significativo de la expresión por la acción de CRH con respecto al vehículo pero vuelve a ser menor a los valores obtenidos para el RNA-Seq donde la media se encuentra en aproximadamente 3 y se observa el descenso en la expresión bajo la condición de CRH+MK la cual tiene una media cercana a 2 y en este caso no es significativa esta disminución lo cual puede deberse al valor atípico cercano a 3 que se obtiene y genera un aumento del desvío estándar que no permite obtener la significancia. Nuevamente al observar la condición MK se ve que su media, en ambos estudios, se encuentra cercana a 1 y que no tiene diferencias significativas con respecto al vehículo lo cual nuevamente da idea de que el inhibidor no tiene un efecto *per se*.

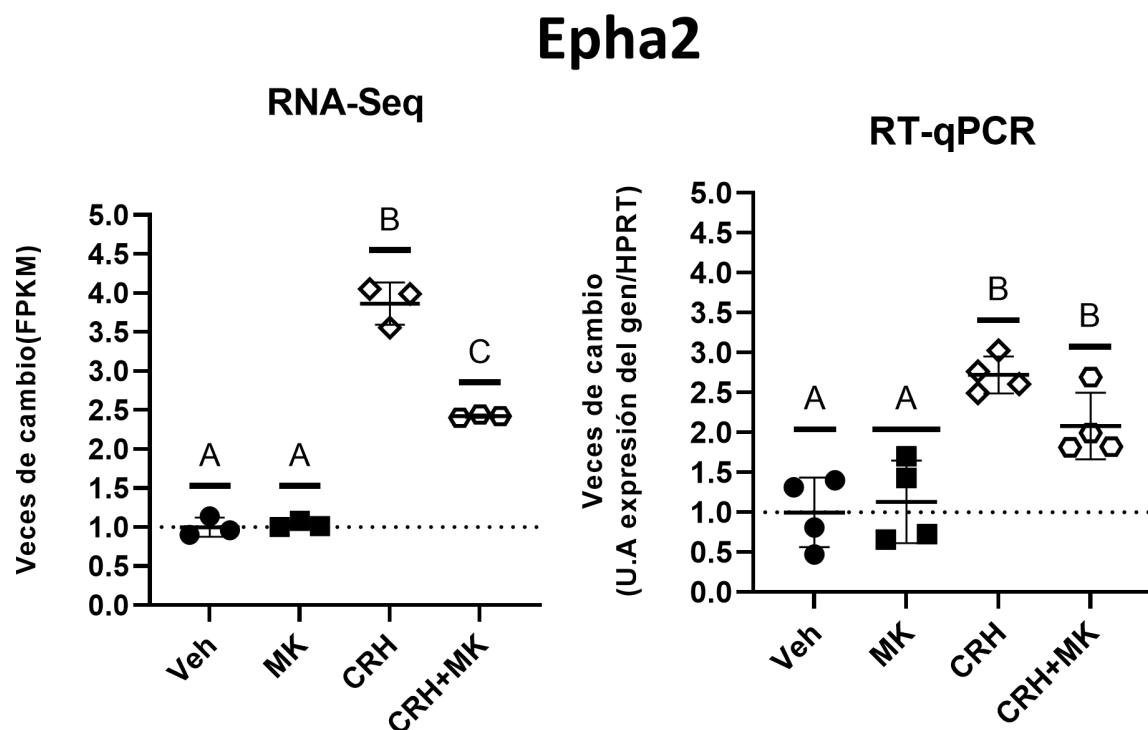


Figura 36: Niveles de mRNA de Eph2 obtenidos mediante RNA-Seq (Izquierda) o RT-qPCR (Derecha).

Células HT22-CRHR1 fueron pre-incubadas durante 20 minutos con el inhibidor de AKT MK2206 (MK) en concentración 10 μ M o vehículo y posteriormente fueron estimuladas durante 1 hora con CRH en concentración 10 nM y/o MK 10 μ M. Los niveles de mRNA fueron medidos mediante RNA-Seq (Izquierda) y se grafican como *media* \pm *SD*, $N = 3$ o mediante RT-qPCR (Derecha) y se grafican como *media* \pm *SD*, $N = 4$ donde el RNA-Seq se utilizaron los FPKM, normalizados al realizar el análisis estadístico por profundidad de secuenciación y cantidad de muestra inicial entre otros factores, y luego por la expresión del vehículo y las RT-qPCR fueron normalizadas a la expresión de HPRT y del vehículo. La significancia de la variación fue

evaluada mediante Deseq2 en el caso del RNA-Seq o mediante ANOVA de un factor con prueba *post hoc* de Bonferroni para los datos obtenidos mediante RT-qPCR donde *p*-valor < 0,0001. El eje Y corresponde a las veces de cambio en la expresión con respecto al vehículo en FPKM o unidades arbitrarias (U.A) según sea el RNA-Seq o las RT-qPCRs respectivamente.

El siguiente gen evaluado fue Nr4a2. El mismo presentaba, como se observa en la parte izquierda de la Figura 37, un aumento significativo cercano a 90 veces con respecto al vehículo con la condición CRH y un descenso no significativo al utilizar CRH+MK teniendo una media cercana a 80 veces de expresión con respecto al vehículo. Al realizar las qPCRs para corroborar esto se observa que nuevamente se obtienen valores de expresión menores donde la condición CRH llega a aumentar aproximadamente 50 veces con respecto al vehículo mientras que al evaluar que sucede al agregar MK (CRH+MK) se da una disminución hasta aproximadamente 45 veces de expresión con respecto a la condición “vehículo” la cual es significativa con respecto a CRH. Que de significativo el descenso cuando al evaluar el RNA-Seq no lo hacía, puede deberse a que en este hay un dato atípico, con un valor de aproximadamente 77, el cual genera un aumento del desvío estándar de manera que no pueda llegar a un valor que permita significancia.

Por último cabe destacar, que nuevamente en ambos experimentos la condición del inhibidor solo, sin el estímulo presenta una media cercana a 1 la cual no presenta diferencias significativas con el vehículo sirviendo nuevamente como control de que el mismo no tiene efecto propio.

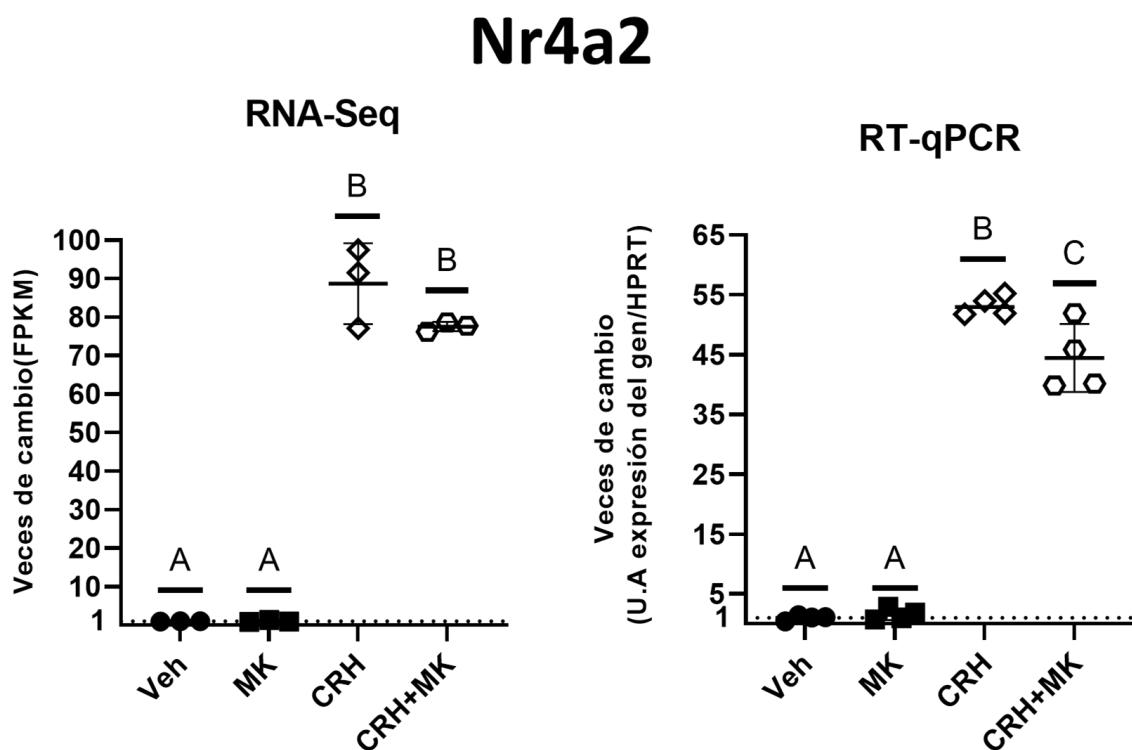


Figura 37: Niveles de mRNA de Nr4a2 obtenidos mediante RNA-Seq (Izquierda) o RT-qPCR (Derecha)..

Células HT22-CRHR1 fueron pre-incubadas durante 20 minutos con el inhibidor de AKT MK2206 (MK) en concentración 10 μ M o vehículo y posteriormente fueron estimuladas durante 1 hora con CRH en concentración 10 nM y/o MK 10 μ M. Los niveles de mRNA fueron medidos mediante RNA-Seq (Izquierda) y se grafican como *media* \pm *SD*, N = 3 o mediante RT-qPCR (Derecha) y se grafican como *media* \pm *SD*, N = 4 donde el RNA-Seq se utilizaron los FPKM, normalizados al realizar el análisis estadístico por profundidad de

secuenciación o cantidad de muestra inicial entre otros factores, y luego por la expresión del vehículo y las RT-qPCR fueron normalizadas a la expresión de HPRT y del vehículo. La significancia de la variación fue evaluada mediante Deseq2 en el caso del RNA-Seq o mediante ANOVA de un factor con prueba *post hoc* de Bonferroni para los datos obtenidos mediante RT-qPCR donde p-valor < 0,01. El eje Y corresponde a las veces de cambio en la expresión con respecto al vehículo en FPKM o unidades arbitrarias (U.A) según sea el RNA-Seq o las RT-qPCRs respectivamente.

En el mismo sentido se evaluó el gen Ddit4, según los datos obtenidos por el RNA-Seq (Figura 38 izquierda) el mismo aumentaba su nivel de expresión de manera significativa en aproximadamente 10 veces con respecto al vehículo pero al utilizar el inhibidor en presencia del estímulo (CRH+MK), si bien se observa una tendencia al descenso del nivel de expresión, esta no es significativa con respecto a CRH aun teniendo su media en aproximadamente 7,5. Por otra parte al evaluar los resultados obtenidos por qPCR, derecha de la figura, se observa nuevamente un aumento con CRH menor al obtenido en el RNA-Seq donde su media se encuentra en aproximadamente 7 y es significativo con respecto al vehículo. Por otra parte al aplicar MK en presencia de CRH se observa un descenso, en este caso significativo con respecto a CRH solo, donde su media se encuentra en aproximadamente 3. En este caso no hay valores atípicos que extiendan el desvío estandar que no permitan obtener un p-valor significativo para el RNA-Seq pero puede deberse a que el análisis utilizado (Deseq2) al realizar miles de tests estadísticos considera que la probabilidad de falsos positivos es alta y corrige acorde, por lo que se necesita de un descenso mayor para obtener un p-valor ajustado tal que permita generar esta significancia.

Nuevamente al aplicar MK solo en ambos casos, se obtiene que su media se encuentra aproximadamente en 1 y no tiene diferencias significativas con respecto al vehículo.

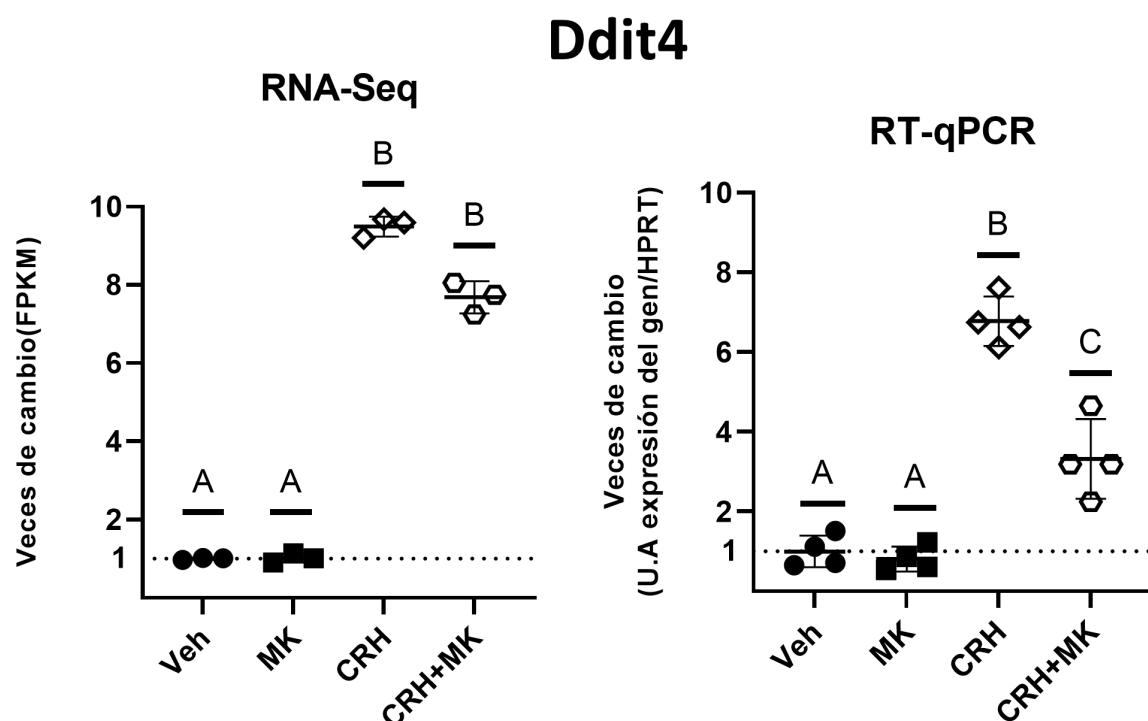


Figura 38: Niveles de mRNA de Ddit4 obtenidos mediante RNA-Seq (Izquierda) o RT-qPCR (Derecha).
Células HT22-CRHR1 fueron pre-incubadas durante 20 minutos con el inhibidor de AKT MK2206 (MK) en concentración 10 μ M o vehículo y posteriormente fueron estimuladas durante 1 hora con CRH en

concentración 10 nM y/o MK 10 μ M. Los niveles de mRNA fueron medidos mediante RNA-Seq (Izquierda) y se grafican como *media* \pm *SD*, N = 3 o mediante RT-qPCR (Derecha) y se grafican como *media* \pm *SD*, N = 4 donde el RNA-Seq se utilizaron los FPKM, normalizados al realizar el análisis estadístico por profundidad de secuenciación o cantidad de muestra inicial entre otros factores, y luego por la expresión del vehículo y las RT-qPCR fueron normalizadas a la expresión de HPRT y del vehículo. La significancia de la variación fue evaluada mediante Deseq2 en el caso del RNA-Seq o mediante ANOVA de un factor con prueba *post hoc* de Bonferroni para los datos obtenidos mediante RT-qPCR donde p-valor < 0,0001. El eje Y corresponde a las veces de cambio en la expresión con respecto al vehículo en FPKM o unidades arbitrarias (U.A) según sea el RNA-Seq o las RT-qPCRs respectivamente.

El próximo gen evaluado fue cFOS, en la Figura 39 puede observarse cómo tanto en el caso del RNA-Seq (izquierda) como la qPCR (derecha) se obtiene un aumento de la expresión del mismo al tratar las células con CRH el cual es significativo con respecto al vehículo, aumentando en ambos casos de manera similar en casi 15 veces. En ninguno de los dos casos se obtiene una diferencia significativa al aplicar el inhibidor en presencia del estímulo y esto puede deberse en el caso de las PCRs a la gran variabilidad de los valores obtenidos, debido a que los picos de melting obtenidos no son tan buenos generando una eficiencia de la curva menor aumentando la incertidumbre de cada medición, lo cual no permite ni siquiera ver una tendencia.

Por último, destacar nuevamente, que al aplicar el inhibidor solo su media se encuentra aproximadamente en 1 y no se obtienen diferencias significativas lo cual sirve como control de que el mismo no tiene efecto intrínseco que genere interpretaciones erróneas.

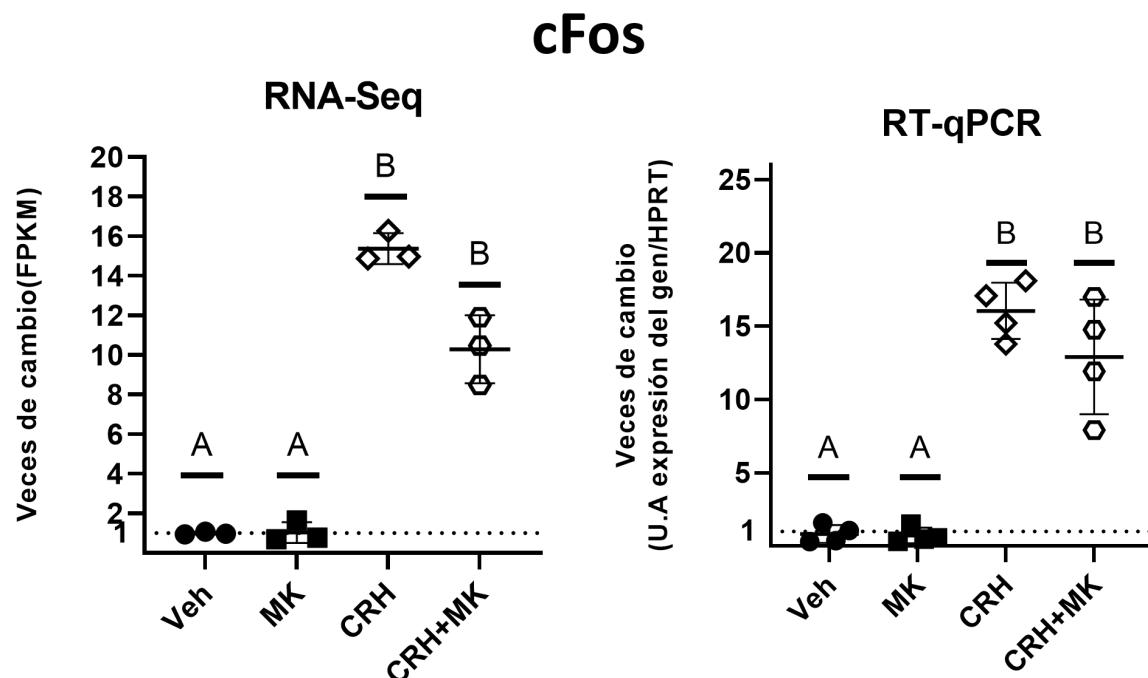


Figura 39: Niveles de mRNA de cFOS obtenidos mediante RNA-Seq (Izquierda) o RT-qPCR (Derecha).
Células HT22-CRHR1 fueron pre-incubadas durante 20 minutos con el inhibidor de AKT MK2206 (MK) en concentración 10 μ M o vehículo y posteriormente fueron estimuladas durante 1 hora con CRH en concentración 10 nM y/o MK 10 μ M. Los niveles de mRNA fueron medidos mediante RNA-Seq (Izquierda) y se grafican como *media* \pm *SD*, N = 3 o mediante RT-qPCR (Derecha) y se grafican como *media* \pm *SD*, N = 4

dónde el RNA-Seq se utilizaron los FPKM, normalizados al realizar el análisis estadístico por profundidad de secuenciación o cantidad de muestra inicial entre otros factores, y luego por la expresión del vehículo y las RT-qPCR fueron normalizadas a la expresión de HPRT y del vehículo. La significancia de la variación fue evaluada mediante Deseq2 en el caso del RNA-Seq o mediante ANOVA de un factor con prueba *post hoc* de Bonferroni para los datos obtenidos mediante RT-qPCR dónde p -valor < 0,0001. El eje Y corresponde a las veces de cambio en la expresión con respecto al vehículo en FPKM o unidades arbitrarias (U.A) según sea el RNA-Seq o las RT-qPCRs respectivamente.

Uno de los últimos genes evaluados fue Fosl2, cuyos resultados se presentan en la Figura 40. En la parte izquierda, correspondiente a los resultados obtenidos del RNA-Seq se observa un aumento significativo con respecto al vehículo tanto con CRH como con CRH+MK la cual tendría una tendencia a disminuir con esta última, sin embargo, no pueden obtenerse p -valores significativos para la misma. Por otra parte al evaluar las réplicas obtenidas mediante qPCR puede advertir que si bien tanto la media del tratamiento con CRH como la del tratamiento con CRH+MK aumentan con respecto al vehículo, 4 y 2,5 respectivamente, en ningún caso se obtienen diferencias significativas con respecto a la condición vehículo como tampoco se obtiene para CRH+MK con respecto a CRH y en todos puede deberse a que hay una gran variabilidad entre réplicas la cual genera que se obtengan resultados tan dispares los cuales no permitan obtener un p -valor significativo.

Para este gen en el caso de MK se observa, aunque con un dato atípico en el caso de las réplicas de qPCR, que los datos obtenidos se encuentran alrededor de 1 por lo que no presentan diferencias significativas con respecto al vehículo y por lo tanto no tiene un efecto propio el inhibidor.

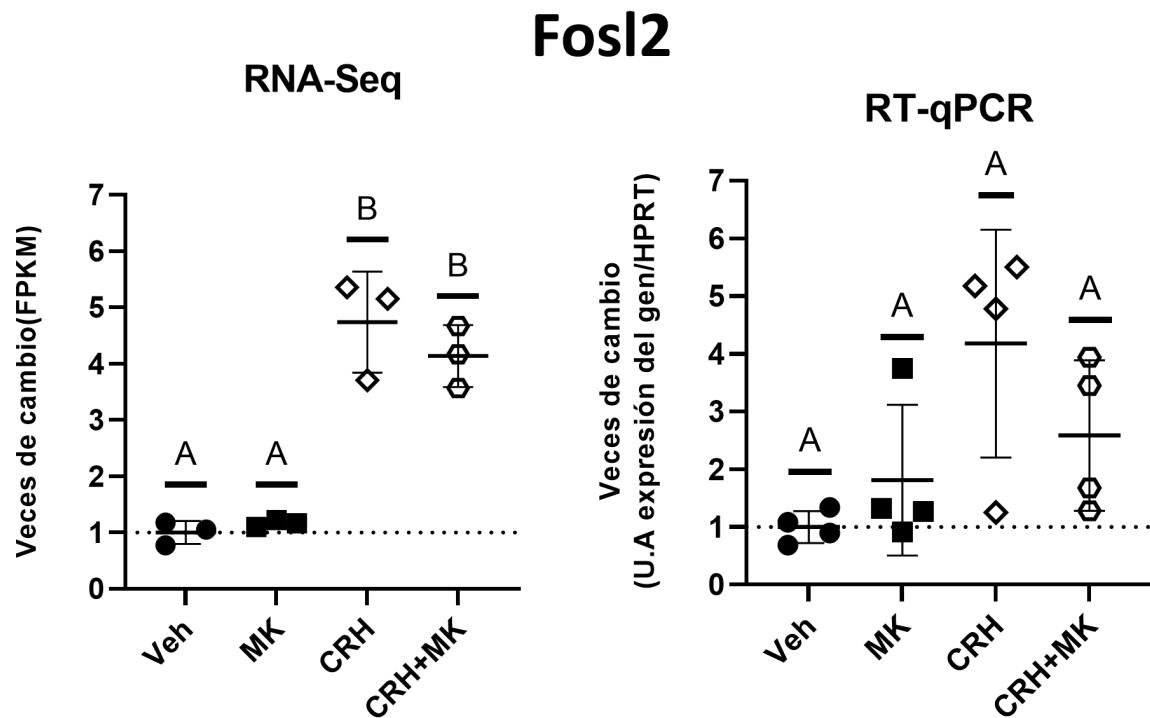


Figura 40: Niveles de mRNA de Fosl2 obtenidos mediante RNA-Seq (Izquierda) o RT-qPCR (Derecha). Células HT22-CRHR1 fueron pre-incubadas durante 20 minutos con el inhibidor de AKT MK2206 (MK) en concentración 10 μ M o vehículo y posteriormente fueron estimuladas durante 1 hora con CRH en concentración 10 nM y/o MK 10 μ M. Los niveles de mRNA fueron medidos mediante RNA-Seq (Izquierda) y se

grafican como *media* \pm *SD*, N = 3 o mediante RT-qPCR (Derecha) y se grafican como *media* \pm *SD*, N = 4 donde el RNA-Seq se utilizaron los FPKM, normalizados al realizar el análisis estadístico por profundidad de secuenciación o cantidad de muestra inicial entre otros factores, y luego por la expresión del vehículo y las RT-qPCR fueron normalizadas a la expresión de HPRT y del vehículo. La significancia de la variación fue evaluada mediante Deseq2 en el caso del RNA-Seq o mediante ANOVA de un factor con prueba *post hoc* de Bonferroni para los datos obtenidos mediante RT-qPCR donde p-valor < 0,0001. El eje Y corresponde a las veces de cambio en la expresión con respecto al vehículo en FPKM o unidades arbitrarias (U.A) según sea el RNA-Seq o las RT-qPCRs respectivamente.

El último gen analizado fue Aqp1, particularmente en este puede observarse como tanto mediante el RNA-Seq como por qPCR no se obtienen diferencias significativas con respecto al vehículo con ninguno de los tratamientos y donde todas sus medias se encuentran cercanas a 1, el valor medio del vehículo.

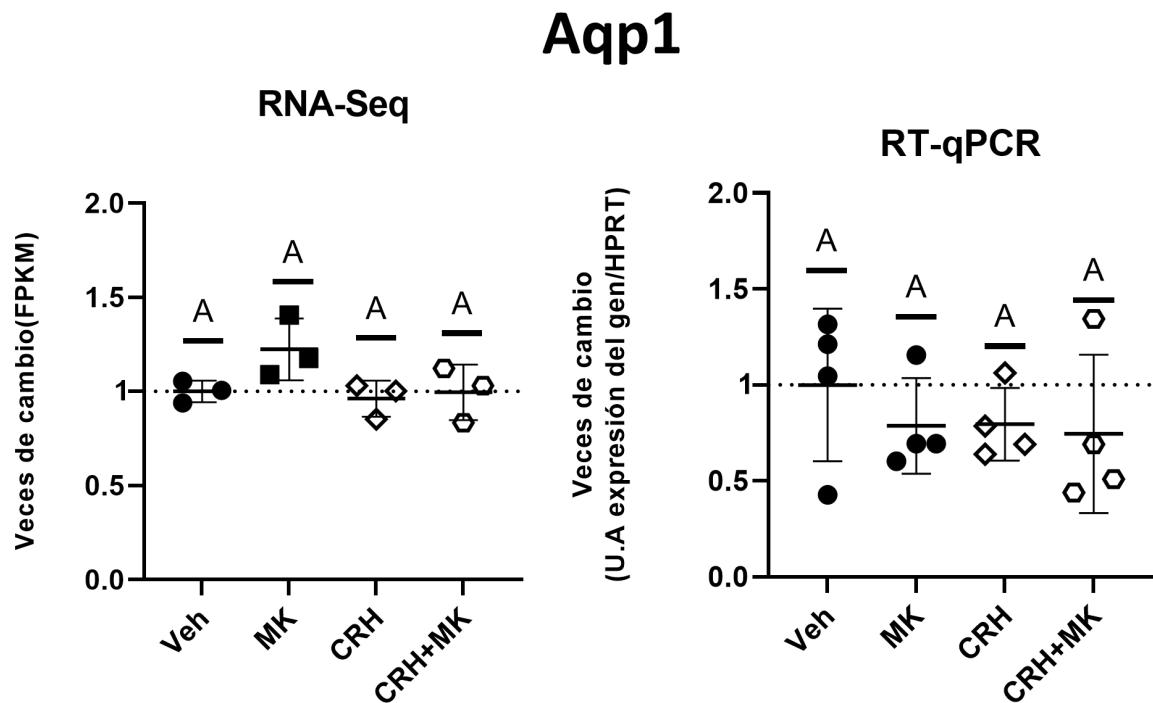


Figura 41: Niveles de mRNA de Aqp1 obtenidos mediante RNA-Seq (Izquierda) o RT-qPCR (Derecha).
 Células HT22-CRHR1 fueron pre-incubadas durante 20 minutos con el inhibidor de AKT MK2206 (MK) en concentración 10 μ M o vehículo y posteriormente fueron estimuladas durante 1 hora con CRH en concentración 10 nM y/o MK 10 μ M. Los niveles de mRNA fueron medidos mediante RNA-Seq (Izquierda) y se grafican como *media* \pm *SD*, N = 3 o mediante RT-qPCR (Derecha) y se grafican como *media* \pm *SD*, N = 4 donde el RNA-Seq se utilizaron los FPKM, normalizados al realizar el análisis estadístico por profundidad de secuenciación o cantidad de muestra inicial entre otros factores, y luego por la expresión del vehículo y las RT-qPCR fueron normalizadas a la expresión de HPRT y del vehículo. La significancia de la variación fue evaluada mediante Deseq2 en el caso del RNA-Seq o mediante ANOVA de un factor con prueba *post hoc* de Bonferroni para los datos obtenidos mediante RT-qPCR donde p-valor > 0,9999. El eje Y corresponde a las veces de cambio en la expresión con respecto al vehículo en FPKM o unidades arbitrarias (U.A) según sea el RNA-Seq o las RT-qPCRs respectivamente.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La hormona liberadora de corticotropina (CRH) destaca por su capacidad de estimular la secreción de ACTH lo cual genera una activación del principal sistema neuroendocrino de respuesta al estrés, el eje hipotalámico-hipofisario-adrenal (HPA, por sus siglas en inglés) el cual en mamíferos es uno de los principales sistemas que median la respuesta al estrés.

Hoy en día se sabe que CRH tiene un papel principal en la respuesta al estrés al permitir la integración de las respuestas neuroendocrina, autonómica y comportamental para mantener la homeostasis en un organismo (*Arborelius et al, 1999*). Se ha visto que el mecanismo de señalización de CRH se encuentra desregulado en trastornos asociados al estrés como ansiedad y depresión (*Holsboer & Ising, 2010*). En trabajos anteriores de nuestro laboratorio se vió que CRH activa la vía de AKT (Tesis Doctoral dos Santos Claro, 2022).

Frente a la estimulación neuronal, destaca la expresión rápida y transiente de genes cuyos mRNA poseen vida media corta denominados “inmediatos” (IEGs) (*Robertson, 1992*). Entre sus características principales se encuentra que los mismos tienen una expresión baja en células quiescentes la cual aumenta rápidamente luego de un estímulo, sin necesidad de la síntesis proteica y el tiempo de vida de estos mRNA es muy corto por lo que su regulación está muy controlada (Stiles et al, 2014, Bahrami & Drabløs 2016).

Además, la relevancia de estos genes, radica en que el *pool* de IEGs que se transcribe depende del estímulo fisiológico lo cual permitiría conferir especificidad de respuesta a la célula frente a diferentes estímulos (Dragunow, 1989) y que tienen un rol fundamental en diferentes procesos biológicos como lo es la respuesta al estrés, la diferenciación celular (Bahrami & Drabløs 2016), la sinapsis o la plasticidad neuronal (Das, 2023).

El objetivo general del trabajo consistió en estudiar el perfil de activación de los IEGs provocado por la señalización del sistema de CRH desde compartimientos intracelulares, mediado o no por AKT y su posible implicancia en las funciones hipocampales. Concretamente, la identificación de IEGs y procesos biológicos regulados por la señalización de CRHR1 desde compartimientos intracelulares, evaluando el papel de AKT y la validación de los distintos IEGs identificados.

Uno de los mayores problemas al que tuve que enfrentarme durante la realización de la tesis fue la concentración del inhibidor de endocitosis utilizada. Dado que se quería corroborar los datos obtenida por el RNA-Seq comenzamos utilizando una concentración 30 μM del mismo, la cual fue elegida ya que la misma se utilizó en el laboratorio para la realización de los experimentos de señalización (Inda, 2016).

Sin embargo, luego nos percatamos mediante la observación de la morfología de las células (Figura 25) durante la realización de los ensayos que la misma era diferente a la obtenida al tratar con el vehículo, y que se levantaban mucho lo cual genera un indicio de muerte celular. Algo similar se podía notar al observar que la presencia de Dyngo impone un patrón transcripcional propio, en presencia o ausencia de CRH, y distinto de aquel que produce el estímulo con CRH (Figura 24). Por esto es que los resultados obtenidos podrían estar brindando información sobre la regulación transcripcional que experimentan las células frente al estímulo con Dyngo al margen de la inhibición de la endocitosis. Por consiguiente, el análisis bioinformático del RNA-Seq no revelaría resultados

sobre el efecto de la endocitosis en las HT22-CRHR1 sino sobre otro efecto no estudiado y no contemplado dentro de los objetivos de esta tesis.

Por desgracia cuando nos dimos cuenta de esto ya no era posible realizar un nuevo RNA-Seq. Tuvimos intención de realizar una curva de concentraciones tal que permita evaluar la viabilidad celular para establecer una nueva concentración de trabajo con Dyno que no ejerciera efectos no deseados sobre las células. Esto se intentó realizar con Trypan Blue pero las células muertas se levantaban tanto que se generaban una subestimación de las mismas y por los tiempos no se logró poner a punto esto o probar con otra técnica como podría ser citometría de flujo. La concentración adecuada sería aquella que genere una inhibición de la endocitosis, observando proteínas que se encuentren río abajo de esta como puede ser la inhibición de la fosforilación de AKT o incluso ERK que su fosforilación aumenta a los 5 minutos de estímulo con CRH donde si se inhibiera la endocitosis se seguiría dando esta señalización desde membrana y aumentaría la fosforilación de la misma a tiempos cortos como se observa en la Figura 6-A, pero que no presente el efecto nocivo que encubra el efecto de la inhibición de la endocitosis. Aunque esta concentración no serviría para corroborar el RNA-Seq podría utilizarse como punto de partida para evaluar si la endocitosis tiene un efecto sobre la regulación de IEGs los cuales ahora sabemos se encuentran regulados por CRH.

Otro de los problemas que surgió durante el proceso fue que varios de los genes que más se regulaban por la acción de MK tenían baja expresión (Figura 34) por lo que la puesta a punto de sus *primers* resultó difícil, al punto que no se pudo realizar y hubo que tomar genes que, si bien presentaban menor FC, contaban con buena expresión ya que sino no iba a ser factible la realización de las siguientes qPCRs, esto fue el caso de IEGs novedosos como Midn y Vdr que al intentar poner a punto sus *primers* no se lograron conseguir curvas de *melting* consistentes por la baja expresión de los mismos.

A partir de los datos de RNA-Seq pudo obtenerse varios resultados novedosos. En particular se hallaron 372 IEGs regulados por CRH a una hora de tratamiento en células HT22-CRHR1, donde la mayoría de ellos (299) se encontraban inducidos. Entre estos se hallaban algunos genes los cuales ya son IEGs conocidos frente a otros estímulos como por ejemplo cFos; Nr4a2 o Dusp5 y algunos los cuales a nuestro entender no estaban descritos previamente como genes tempranos como el caso de EphA2; Midn y Vdr.

Mediante la utilización de diferentes herramientas bioinformáticas las cuales cuentan con diferentes bases de datos pudimos observar que los genes regulados por CRH se encontraban enriquecidos en genes relacionados con neurogénesis, la regulación de la diferenciación celular, la regulación de la proliferación celular y regulación del ciclo celular (Figuras 10 , 11 y 13), entre otros. En las HT22-CRHR1 nuestro grupo describió previamente (Inda2017, Scientific Reports) que frente al estímulo con CRH las células redondean el soma y alargan las neuritas indicando diferenciación celular hacia neuronas, la disminución de la proliferación celular mediante cristal violeta y la acumulación de células en las fases G_0/G_1 del ciclo celular mediante citometría de flujo. Más aún, otros autores (Koutmani, 2019) observaron un incremento en la señal del marcador específico de neuronas Tuj1 por microscopía de fluorescencia al tratar células madre neuronales de hipocampo adulto con CRH. Dado que los procesos celulares enriquecidos en los resultados del RNA-Seq coinciden con las respuestas fisiológicas y morfológicas observadas en estas mismas células y en

otro modelo de neuronas hipocampales frente al mismo estímulo, consideramos que la obtención de dichos resultados representa una validación del análisis realizado sobre el RNA-Seq, lo cual nos permite avanzar sobre los aspectos moleculares desconocidos. Es interesante notar que si bien se encuentra enriquecimiento en *clusters* esperables y utilizando las mismas concentraciones de CRH que la bibliografía, esto ocurre a distintos tiempos, donde los IEGs se transcriben casi inmediatamente luego del estímulo por lo que la regulación transcripcional de las respuestas de destino celular podría estar sucediendo casi de inmediato luego del estímulo.

A su vez se obtuvo enriquecimiento en motivos de DNA reconocidos por CREB1 (p-valor: $1,87 \times 10^{-20}$); Jun (p-valor: 1×10^{-14}); ATF2 (p-valor: $5,83 \times 10^{-26}$) o ATF3 (p-valor: $1,32 \times 10^{-18}$) e incluso genes pertenecientes a las vías de AP1 (p-valor: $8,49 \times 10^{-13}$); ATF2 (p-valor: $1,39 \times 10^{-10}$) o MAPK3 (p-valor: $2,19 \times 10^{-9}$) mediante los análisis de GSEA y de solapamiento con las herramientas Enrichr y MsigDB (Figuras 10, 12, 14 y 28). Los p-valores presentados en este párrafo corresponden a aquellos obtenidos mediante el análisis de solapamiento con MSigDB. Estos resultados moleculares novedosos para este sistema resultaron robustos a los dos análisis diferentes realizados y a los dos diferentes compendios de bases de datos moleculares utilizadas.

El mismo análisis se realizó para los genes regulados por MK obteniéndose enriquecimiento en *clusters* como: transcripción mediada por FOXO o el *pathway* de PID ATF2 con p-valores cercanos a 1×10^{-4} (Figura 19). Al realizar el análisis mediante el software de Enrichr se obtuvieron también *pathways* asociados a FOXO con un p-valor de $3,69 \times 10^{-4}$ (Figura 20). Del mismo modo, se observa que aparecen *clusters* asociados a Nr4a2 con un p-valor: $2,092 \times 10^{-7}$ los cuales se encontraban regulados asimismo por CRH o las vías de señalización asociadas a las MAPKs y específicamente el *pathway* de MAPK3 (ERK1) con un p-valor de $3,28 \times 10^{-2}$. La vía de ERK1 se encuentra regulada por AMP cíclico luego del estímulo con CRH en estas células, lo cual ha sido muy estudiado en nuestro laboratorio mediante *Western Blot* (Inda, 2016). Sin embargo todos estos resultados presentan p-valores poco significativos, dado por la poca cantidad de genes que regula esta droga en las condiciones ensayadas lo cual no permite obtener un mejor enriquecimiento.

De los genes regulados por CRH, MK ejercía un efecto sobre el 6% de estos (24) donde la mayor parte se encontraban antagonizados y tan solo dos tenían un efecto potenciador al aplicar MK en presencia de CRH (Figura 17). Estos resultados indicarían que aunque AKT pareciera ser capaz de mediar la regulación de algunos IEGs en respuesta a CRH, la acción de AKT en esta regulación no es predominante sino que pareciera haber vías alternativas que median esta respuesta. De estos 22 genes se seleccionaron 7 que contaban con réplicas consistentes y regulación considerable con respecto al vehículo para finalmente quedarse con 2 (Dusp5 y EphA2) que contaban con buena expresión (Figura 18).

Uno de los primeros genes que se evaluó fue cFOS. Este gen ya era utilizado en el laboratorio dado que es un conocido IEG frente a amplia variedad de estímulos y que junto con Egr1, Nr4a1 y Arc eran, a nuestro entender, los únicos IEGs conocidos en respuesta a CRH hasta que se realizara y analizara el RNA-Seq en nuestro laboratorio (Bepari, 2012; Covington, 2010).

Este sirve como validación del modelo ya que se conocía su comportamiento frente al estímulo con CRH, siendo el mismo un aumento en su inducción entre CRH y vehículo de aproximadamente 40 veces frente a las mismas condiciones experimentales de concentración y tiempo (Inda2017, *Scientific Reports*), se pudo corroborar lo esperado, donde en primer lugar en el RNA-Seq aumenta de manera significativa el mismo al tratar con CRH con respecto al vehículo y se observa una tendencia a la disminución, no significativa, al tratar con CRH+MK (Figura 39). A su vez en las RT-qPCR se observó el mismo efecto al tratar con CRH siendo un aumento significativo de su expresión y una tendencia a la disminución pero no significativa al utilizar el inhibidor de AKT.

Luego se evaluaron los dos genes que cumplían con los criterios para la selección que elegimos y que eran antagonizados, en el RNA-Seq, al aplicar MK los cuales son Dusp5 y EphA2.

Dusp5 es una proteína fosfatasa la cual inactiva sus quinasas blanco, regula negativamente miembros de las MAPK asociadas con la proliferación y diferenciación celular y se expresa en una gran variedad de tejidos con mayor medida en páncreas y cerebro (*Genecards*). En el análisis de RNA-Seq de este gen se vió que se obtenía un aumento significativo de la expresión del mismo al estimular con CRH el cual era revertido, también de manera significativa, al utilizar MK en presencia de CRH, en las RT-qPCR solo pudo corroborarse el aumento significativo con CRH y no el descenso con MK, aunque se ve una tendencia, ya que el tratamiento de CRH+MK presenta una gran variabilidad lo cual hace que no se obtenga un p-valor significativo al menos con este número de réplicas independientes (Figura 35).

Por su parte EphA2 es un receptor tirosina quinasa el cual media el desarrollo celular en el sistema nervioso y regula negativamente la vía de ERK, este receptor se encuentra altamente expresado en neuronas proyectadas (*Genecards*). Al evaluar los resultados obtenidos en el RNA-Seq para este gen se observó que hay un aumento significativo de la expresión al tratar con CRH y una represión al tratar con CRH+MK, por su parte en las RT-qPCR puede apreciarse que se observa el aumento significativo de la expresión con CRH y una tendencia a la disminución al aplicar el inhibidor de AKT en presencia del estímulo ya que hay un valor atípico el cual aumenta el desvío estándar tal que no se obtiene un p-valor menor al límite establecido (Figura 36).

A su vez estos dos genes (Dusp5 y EphA2) resultaron ser, hasta lo que sabemos, IEGs novedosos de CRH ya que no se encontraban descritos anteriormente bajo esta condición, por lo menos en el contexto neuronal hipocampal.

Acto seguido se midió la expresión de Fosl2, miembro de la familia de FOS el cual puede dimerizar al igual que cFOS con Jun formando el factor de transcripción AP1 (Ren, Y, 2024; Ding, M, 2023) involucrado en la señalización por CRH. El mismo tenía una tendencia similar a cFOS en el RNA-Seq donde aumentaba significativamente con CRH y disminuye pero no de manera significativa al tratar con CRH+MK, para este gen no pudo corroborarse lo obtenido ya que no se obtuvieron diferencias significativas con respecto al vehículo ni al tratar con CRH ni al tratar con CRH+MK debido a la variabilidad de los resultados obtenidos lo cual puede deberse a que el mismo era uno de los que contaba con más baja expresión por lo que cualquier variación mínima en el experimento llevaría a explicar la variabilidad obtenida (Figura 40).

De igual manera se evaluó Nr4a2, un receptor nuclear que actúa como factor de transcripción el cual si bien se encontraba regulado de manera diferencial por CRH con respecto al vehículo y se observaba una baja al tratar con CRH+MK esta última no era significativa, ya que en muchos de los análisis bioinformáticos se obtuvieron resultados relacionados a este factor de transcripción. Se pudo corroborar el aumento significativo con CRH y, de manera que se corroboró lo obtenido en el RNA-Seq, y a su vez, se obtuvo una disminución significativa al utilizar la combinación de CRH+MK (Figura 37).

Uno de los últimos genes que medimos su expresión fue Ddit4. El mismo regula el crecimiento, la proliferación y la supervivencia celular mediante la inhibición de la vía de mTOR en la cual se encuentra involucrada la proteína AKT lo cual lleva a una inhibición de la diferenciación neuronal y el crecimiento de neuritas (*Genecards*). Los datos analizados del RNA-Seq de este gen arrojaron que el mismo se encuentra inducido en presencia de CRH y que si bien hay una tendencia al descenso en presencia del inhibidor de AKT, la misma no es significativa aún no teniendo solapamiento entre los intervalos de confianza para los mismos lo cual puede deberse a que se necesite un descenso mayor de la expresión del gen para que sea significativo. Por otra parte, al realizar las RT-qPCR se observa, al igual que en el RNA-Seq, el aumento significativo en su expresión al tratar con CRH y, en este caso, sí se obtuvo un descenso significativo en su expresión al tratar con MK (Figura 38).

Por último se realizó el análisis sobre Aqp1, un gen perteneciente a una aquaporina el cual debería mantenerse inalterado en todas las condiciones. Efectivamente este comportamiento se observa tanto para el RNA-Seq como para las RT-qPCRs donde no hay aumentos significativos en ningún tratamiento para el gen en cuestión, dando la idea de que el experimento se realizó de manera correcta (Figura 41).

Es interesante notar cómo en las RT-qPCRs se observa mayor variabilidad entre réplicas que en el RNA-Seq. Esto debido a que las réplicas en el caso de las RT-qPCRs fueron realizándose a lo largo de los meses que duró la tesis mientras que las réplicas del RNA-Seq fueron realizadas todas durante el mismo mes en una única tanda por experimento, explicando esta diferencia observada.

Conclusiones generales

En resumen, se hallaron 372 IEGs que se encontraban regulados por la acción de CRH de los cuales 299 se encontraban inducidos mientras que 73 se encontraban reprimidos. Se pudo validar el modelo ya que estos IEGs se encontraban enriquecidos en *clusters* de vías esperables para la regulación de CRH como neurogénesis o regulación de la diferenciación celular pero también se hallaron *clusters* novedosos como la cascada de MAPK quinasas o las vías de AP1/ATF2.

Por otra parte, al inhibir AKT, de los genes inducidos (299) 24 eran regulados y de estos, 22 se encontraban antagonizados. AKT parece estar mediando, parcialmente, la respuesta transcripcional temprana de CRH aunque parecería haber otras vías involucradas en dicha regulación.

De igual manera, se utilizó un inhibidor de endocitosis el cual, por la concentración tóxica ensayada, no permitió obtener información transcripcional sobre el efecto de la endocitosis.

Por último se pudo corroborar la regulación de genes inmediatamente tempranos (IEGs) conocidos como cFos; o Dusp5 y otros que son IEGs novedosos regulados por CRH como EphA2 o Nr4a2 sobre los que se realizaron RT-qPCRs con el fin de validar la transcriptómica obtenida a partir del RNA-Seq.

Lo mencionado anteriormente permite seguir aportando información sobre IEGs conocidos como también ampliar el panorama, por lo menos conocido por nosotros, con respecto a genes que podrían comportarse de esta manera y no haber sido descritos con anterioridad frente a la hormona de CRH. La nueva información obtenida ofrece la posibilidad de investigar nuevas señalizaciones hasta ahora desconocidas río abajo de CRH en el contexto de neuronas hipocampales.

El sistema de señalización de CRH tiene un papel fundamental en la respuesta al estrés y en ciertas enfermedades donde se lo ha visto desregulado, por esto creemos que es fundamental su comprensión y estudio. Los resultados presentados en la presente tesis generarán un aporte al conocimiento del mismo abriendo el panorama a nuevos blancos sobre los cuales poder desarrollar posibles estudios posteriores.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Arborelius, L., Owens, M. J., Plotsky, P. M., & Nemeroff, C. B. (1999). The role of corticotropin-releasing factor in depression and anxiety disorders. *The Journal of endocrinology*, 160(1), 1–12. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1600001>
2. Arzt, E., & Holsboer, F. (2006). CRF signaling: molecular specificity for drug targeting in the CNS. *Trends in pharmacological sciences*, 27(10), 531–538. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2006.08.007>
3. Bahrami, S., & Drablos, F. (2016). Gene regulation in the immediate-early response process. *Advances in biological regulation*, 62, 37–49. <https://doi.org/10.1016/j.jbior.2016.05.001>
4. Behjati, S., & Tarpey, P. S. (2013). What is next generation sequencing?. *Archives of disease in childhood. Education and practice edition*, 98(6), 236–238. <https://doi.org/10.1136/archdischild-2013-304340>
5. Bepari, A. K., Sano, H., Tamamaki, N., Nambu, A., Tanaka, K. F., & Takebayashi, H. (2012). Identification of optogenetically activated striatal medium spiny neurons by Npas4 expression. *PloS one*, 7(12), e52783. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052783>
6. Bonfiglio, Juán José. Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires (2013). Mecanismos moleculares involucrados en la señalización celular de la hormona CRH en el sistema nervioso central.
7. Bonfiglio, J. J., Inda, C., Senin, S., Maccarrone, G., Refojo, D., Giacomini, D., Turck, C. W., Holsboer, F., Arzt, E., & Silberstein, S. (2013). B-Raf and CRHR1 internalization mediate biphasic ERK1/2 activation by CRH in hippocampal HT22 Cells. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 27(3), 491–510. <https://doi.org/10.1210/me.2012-1359>
8. Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M. J., Lin, M. Z., Juo, P., Hu, L. S., Anderson, M. J., Arden, K. C., Blenis, J., & Greenberg, M. E. (1999). Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell*, 96(6), 857–868. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80595-4](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80595-4)
9. Choi, J. E., Kim, J., & Kim, J. (2020). Capturing activated neurons and synapses. *Neuroscience research*, 152, 25–34. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2019.12.020>
10. Covington HE 3rd, Lobo MK, Maze I, Vialou V, Hyman JM, Zaman S, LaPlant Q, Mouzon E, Ghose S, Tamminga CA, Neve RL, Deisseroth K, Nestler EJ. Antidepressant effect of optogenetic stimulation of the medial prefrontal cortex. *J Neurosci*. 2010 Dec 1;30(48):16082–90. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1731-10.2010. PMID: 21123555; PMCID: PMC3004756.
11. Curley DE, Webb AE, Sheffler DJ and Haass-Koffler CL (2021) Corticotropin Releasing Factor Binding Protein as a Novel Target to Restore Brain Homeostasis: Lessons Learned From Alcohol Use Disorder Research. *Front. Behav. Neurosci.* 15:786855. doi: 10.3389/fnbeh.2021.786855

12. Das, S., Lituma, P. J., Castillo, P. E., & Singer, R. H. (2023). Maintenance of a short-lived protein required for long-term memory involves cycles of transcription and local translation. *Neuron*, 111(13), 2051–2064.e6. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2023.04.005>
13. Datta, S. R., Katsov, A., Hu, L., Petros, A., Fesik, S. W., Yaffe, M. B., & Greenberg, M. E. (2000). 14-3-3 proteins and survival kinases cooperate to inactivate BAD by BH3 domain phosphorylation. *Molecular cell*, 6(1), 41–51.
14. Dautzenberg, F. M., & Hauger, R. L. (2002). The CRF peptide family and their receptors: yet more partners discovered. *Trends in pharmacological sciences*, 23(2), 71–77. [https://doi.org/10.1016/s0165-6147\(02\)01946-6](https://doi.org/10.1016/s0165-6147(02)01946-6)
15. de Kloet, E. R., Joëls, M., & Holsboer, F. (2005). Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nature reviews. Neuroscience*, 6(6), 463–475. <https://doi.org/10.1038/nrn1683>
16. Deussing, J. M., & Chen, A. (2018). The Corticotropin-Releasing Factor Family: Physiology of the Stress Response. *Physiological reviews*, 98(4), 2225–2286. <https://doi.org/10.1152/physrev.00042.2017>
17. Ding, M., Huang, W., Liu, G., Zhai, B., Yan, H., & Zhang, Y. (2023). Integration of ATAC-Seq and RNA-Seq reveals FOSL2 drives human liver progenitor-like cell aging by regulating inflammatory factors. *BMC genomics*, 24(1), 260. <https://doi.org/10.1186/s12864-023-09349-7>
18. dos Santos Claro, P. A. Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires (2022). Mecanismos moleculares de acción del sistema CRH/CRHR1: activación de la vía de Akt en un contexto neuronal.
19. Dragunow, M., Currie, R. W., Faull, R. L., Robertson, H. A., & Jansen, K. (1989). Immediate-early genes, kindling and long-term potentiation. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 13(4), 301–313. [https://doi.org/10.1016/s0149-7634\(89\)80066-1](https://doi.org/10.1016/s0149-7634(89)80066-1)
20. Egbenya, D. L., Hussain, S., Lai, Y. C., Anderson, A. E., & Davanger, S. (2023). Synapse-specific changes in Arc and BDNF in rat hippocampus following chronic temporal lobe epilepsy. *Neuroscience research*, 191, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2022.12.006>
21. Emery, A. C., Eiden, M. V., Mustafa, T., & Eiden, L. E. (2013). Rapgef2 connects GPCR-mediated cAMP signals to ERK activation in neuronal and endocrine cells. *Science signaling*, 6(281), ra51. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2003993>
22. Ginty, D. D., Glowacka, D., Bader, D. S., Hidaka, H., & Wagner, J. A. (1991). Induction of immediate early genes by Ca²⁺ influx requires cAMP-dependent protein kinase in PC12 cells. *The Journal of biological chemistry*, 266(26), 17454–17458.
23. Hauger, R. L., Risbrough, V., Brauns, O., & Dautzenberg, F. M. (2006). Corticotropin releasing factor (CRF) receptor signaling in the central nervous system: new molecular targets. *CNS & neurological disorders drug targets*, 5(4), 453–479. <https://doi.org/10.2174/187152706777950684>

24. HANS SELYE, THE GENERAL ADAPTATION SYNDROME AND THE DISEASES OF ADAPTATION, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, Volume 6, Issue 2, 1 February 1946, Pages 117–230, <https://doi.org/10.1210/jcem-6-2-117>
25. Hemley, C. F., McCluskey, A., & Keller, P. A. (2007). Corticotropin releasing hormone--a GPCR drug target. *Current drug targets*, 8(1), 105–115. <https://doi.org/10.2174/138945007779315542>
26. Hillhouse, E. W., & Grammatopoulos, D. K. (2006). The molecular mechanisms underlying the regulation of the biological activity of corticotropin-releasing hormone receptors: implications for physiology and pathophysiology. *Endocrine reviews*, 27(3), 260–286. <https://doi.org/10.1210/er.2005-0034>
27. Holsboer F. (2000). The corticosteroid receptor hypothesis of depression. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 23(5), 477–501. [https://doi.org/10.1016/S0893-133X\(00\)00159-7](https://doi.org/10.1016/S0893-133X(00)00159-7)
28. Holsboer, F., & Ising, M. (2010). Stress hormone regulation: biological role and translation into therapy. *Annual review of psychology*, 61, 81–C11. <https://doi.org/10.1146/annurev.psych.093008.100321>
29. Inda, C., Dos Santos Claro, P. A., Bonfiglio, J. J., Senin, S. A., Maccarrone, G., Turck, C. W., & Silberstein, S. (2016). Different cAMP sources are critically involved in G protein-coupled receptor CRHR1 signaling. *The Journal of cell biology*, 214(2), 181–195. <https://doi.org/10.1083/jcb.201512075>
30. Inda, C., Bonfiglio, J. J., Dos Santos Claro, P. A., Senin, S. A., Armando, N. G., Deussing, J. M., & Silberstein, S. (2017). cAMP-dependent cell differentiation triggered by activated CRHR1 in hippocampal neuronal cells. *Scientific reports*, 7(1), 1944. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02021-7>
31. Inda, C., Armando, N. G., Dos Santos Claro, P. A., & Silberstein, S. (2017). Endocrinology and the brain: corticotropin-releasing hormone signaling. *Endocrine connections*, 6(6), R99–R120. <https://doi.org/10.1530/EC-17-0111>
32. Joëls, M., & Baram, T. Z. (2009). The neuro-symphony of stress. *Nature reviews. Neuroscience*, 10(6), 459–466. <https://doi.org/10.1038/nrn2632>
33. Korosi, A., & Baram, T. Z. (2008). The central corticotropin releasing factor system during development and adulthood. *European journal of pharmacology*, 583(2-3), 204–214. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.11.066>
34. Koutmani, Y., Gampierakis, I. A., Polissidis, A., Ximerakis, M., Koutsoudaki, P. N., Polyzos, A., Agrogiannis, G., Karaliota, S., Thomaidou, D., Rubin, L. L., Politis, P. K., & Karalis, K. P. (2019). CRH Promotes the Neurogenic Activity of Neural Stem Cells in the Adult Hippocampus. *Cell reports*, 29(4), 932–945.e7. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.09.037>
35. Kovalovsky, D., Refojo, D., Liberman, A. C., Hochbaum, D., Pereda, M. P., Coso, O. A., Stalla, G. K., Holsboer, F., & Arzt, E. (2002). Activation and induction of NUR77/NURR1 in corticotrophs by CRH/cAMP: involvement of calcium, protein

- kinase A, and MAPK pathways. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 16(7), 1638–1651. <https://doi.org/10.1210/mend.16.7.0863>
36. Kubik, S., Miyashita, T., & Guzowski, J. F. (2007). Using immediate-early genes to map hippocampal subregional functions. *Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 14(11), 758–770. <https://doi.org/10.1101/lm.698107>
37. Kukurba, K. R., & Montgomery, S. B. (2015). RNA Sequencing and Analysis. *Cold Spring Harbor protocols*, 2015(11), 951–969. <https://doi.org/10.1101/pdb.top084970>
38. Lee, S., Kang, S., Kim, J., Yoon, S., Kim, S. H., & Moon, C. (2016). Enhanced expression of immediate-early genes in mouse hippocampus after trimethyltin treatment. *Acta histochemica*, 118(7), 679–684. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2016.09.001>
39. Lindl, K. Tesis de Licenciatura, Universidad de Belgrano (2022). La señalización de CRHR1 y el rol de la endocitosis en la regulación transcripcional de células hipocampales.
40. Maras, P. M., & Baram, T. Z. (2012). Sculpting the hippocampus from within: stress, spines, and CRH. *Trends in neurosciences*, 35(5), 315–324. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2012.01.005>
41. Mazzucchelli, C., & Brambilla, R. (2000). Ras-related and MAPK signalling in neuronal plasticity and memory formation. *Cellular and molecular life sciences : CMSL*, 57(4), 604–611. <https://doi.org/10.1007/PL00000722>
42. Minatohara K, Akiyoshi M and Okuno H (2016) Role of Immediate-Early Genes in Synaptic Plasticity and Neuronal Ensembles Underlying the Memory Trace. *Front. Mol. Neurosci.* 8:78. doi: 10.3389/fnmol.2015.00078
43. Moore, C. A., Milano, S. K., & Benovic, J. L. (2007). Regulation of receptor trafficking by GRKs and arrestins. *Annual review of physiology*, 69, 451–482. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.69.022405.154712>
44. Müller, M. B., Zimmermann, S., Sillaber, I., Hagemeyer, T. P., Deussing, J. M., Timpl, P., Kormann, M. S., Droste, S. K., Kühn, R., Reul, J. M., Holsboer, F., & Wurst, W. (2003). Limbic corticotropin-releasing hormone receptor 1 mediates anxiety-related behavior and hormonal adaptation to stress. *Nature neuroscience*, 6(10), 1100–1107. <https://doi.org/10.1038/nn1123>
45. Oakley, R. H., Laporte, S. A., Holt, J. A., Barak, L. S., & Caron, M. G. (1999). Association of beta-arrestin with G protein-coupled receptors during clathrin-mediated endocytosis dictates the profile of receptor resensitization. *The Journal of biological chemistry*, 274(45), 32248–32257. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.45.32248>
46. Oakley, R. H., Laporte, S. A., Holt, J. A., Caron, M. G., & Barak, L. S. (2000). Differential affinities of visual arrestin, beta arrestin1, and beta arrestin2 for G protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors. *The Journal of*

- biological chemistry*, 275(22), 17201–17210.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M910348199>
47. Refojo, D., Schweizer, M., Kuehne, C., Ehrenberg, S., Thoeringer, C., Vogl, A. M., Dedic, N., Schumacher, M., von Wolff, G., Avrabortos, C., Touma, C., Engblom, D., Schütz, G., Nave, K. A., Eder, M., Wotjak, C. T., Sillaber, I., Holsboer, F., Wurst, W., & Deussing, J. M. (2011). Glutamatergic and dopaminergic neurons mediate anxiogenic and anxiolytic effects of CRHR1. *Science (New York, N.Y.)*, 333(6051), 1903–1907. <https://doi.org/10.1126/science.1202107>
48. Reiter, E., Ahn, S., Shukla, A. K., & Lefkowitz, R. J. (2012). Molecular mechanism of β-arrestin-biased agonism at seven-transmembrane receptors. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 52, 179–197. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.010909.105800>
49. Reul, J. M., & de Kloet, E. R. (1985). Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation. *Endocrinology*, 117(6), 2505–2511. <https://doi.org/10.1210/endo-117-6-2505>
50. Ren, Y., Xu, Y., Wang, Z., Wang, Y., Zhang, J., Li, Z., Chen, Y., Go, W., Javed, M. T., & Li, Q. (2024). Molecular cloning, biological description, and functional analysis of Ajfos transcription factor in pathogen-induced *Apostichopus japonicus*. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP*, 276, 109814. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2023.109814>
51. Robertson H. A. (1992). Immediate-early genes, neuronal plasticity, and memory. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire*, 70(9), 729–737. <https://doi.org/10.1139/o92-112>
52. Sigismund, S., Confalonieri, S., Ciliberto, A., Polo, S., Scita, G., & Di Fiore, P. P. (2012). Endocytosis and signaling: cell logistics shape the eukaryotic cell plan. *Physiological reviews*, 92(1), 273–366. <https://doi.org/10.1152/physrev.00005.2011>
53. Stiles, T. L., Kapiloff, M. S., & Goldberg, J. L. (2014). The role of soluble adenylyl cyclase in neurite outgrowth. *Biochimica et biophysica acta*, 1842(12 Pt B), 2561–2568. <https://doi.org/10.1016/j.bbadi.2014.07.012>
54. Terrillon, S., & Bouvier, M. (2004). Receptor activity-independent recruitment of betaarrestin2 reveals specific signalling modes. *The EMBO journal*, 23(20), 3950–3961. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600387>
55. Thomas, G. M., & Huganir, R. L. (2004). MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. *Nature reviews. Neuroscience*, 5(3), 173–183. <https://doi.org/10.1038/nrn1346>
56. Tohgo, A., Pierce, K. L., Choy, E. W., Lefkowitz, R. J., & Luttrell, L. M. (2002). beta-Arrestin scaffolding of the ERK cascade enhances cytosolic ERK activity but inhibits ERK-mediated transcription following angiotensin AT1a receptor stimulation. *The Journal of biological chemistry*, 277(11), 9429–9436. <https://doi.org/10.1074/jbc.M106457200>

57. Tyssowski, K. M., DeStefino, N. R., Cho, J. H., Dunn, C. J., Poston, R. G., Carty, C. E., Jones, R. D., Chang, S. M., Romeo, P., Wurzelmann, M. K., Ward, J. M., Andermann, M. L., Saha, R. N., Dudek, S. M., & Gray, J. M. (2018). Different Neuronal Activity Patterns Induce Different Gene Expression Programs. *Neuron*, 98(3), 530–546.e11. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.04.001>
58. Vale, W., Spiess, J., Rivier, C., & Rivier, J. (1981). Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. *Science (New York, N.Y.)*, 213(4514), 1394–1397. <https://doi.org/10.1126/science.6267699>
59. Van Kolen, K., Dautzenberg, F. M., Verstraeten, K., Royaux, I., De Hoogt, R., Gutknecht, E., & Peeters, P. J. (2010). Corticotropin releasing factor-induced ERK phosphorylation in AtT20 cells occurs via a cAMP-dependent mechanism requiring EPAC2. *Neuropharmacology*, 58(1), 135–144. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2009.06.022>
60. Van Pett, K., Viau, V., Bittencourt, J. C., Chan, R. K., Li, H. Y., Arias, C., Prins, G. S., Perrin, M., Vale, W., & Sawchenko, P. E. (2000). Distribution of mRNAs encoding CRF receptors in brain and pituitary of rat and mouse. *The Journal of comparative neurology*, 428(2), 191–212. [https://doi.org/10.1002/1096-9861\(20001211\)428:2<191::aid-cne1>3.0.co;2-u](https://doi.org/10.1002/1096-9861(20001211)428:2<191::aid-cne1>3.0.co;2-u)
61. von Zastrow, M., & Sorkin, A. (2021). Mechanisms for Regulating and Organizing Receptor Signaling by Endocytosis. *Annual review of biochemistry*, 90, 709–737. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-081820-092427>
62. Yang, D., Wang, Y., Qi, T., Zhang, X., Shen, L., Ma, J., Pang, Z., Lal, N. K., McClatchy, D. B., Seradj, S. H., Leung, V. H., Wang, K., Xie, Y., Polli, F. S., Maximov, A., Gonzalez, O. C., de Lecea, L., Cline, H. T., Augustine, V., Yates, J. R., 3rd, ... Ye, L. (2024). Phosphorylation of pyruvate dehydrogenase inversely associates with neuronal activity. *Neuron*, S0896-6273(23)00974-1. Advance online publication. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2023.12.015>