

© 2023 Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.

Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas, 26: 1-17, 2023.

<https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2023.572>

## Activación concertada de los receptores transmembranales: Repercusiones fisiológicas

Irene Lee-Rivera, Edith López y Ana María López Colomé\*

<sup>1</sup>Departamento de Neuropatología Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México. Circuito exterior s/n, Ciudad Universitaria, Alc. Coyoacán, Ciudad de México, 04510 México. E-mail: \*acolome@ifc.unam.mx.

### RESUMEN

Los estudios iniciales acerca de los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) sugerían que los mismos no interactúan con otro tipo de receptores, o bien lo hacen con miembros de su propia familia. Recientemente, este concepto ha cambiado, ya que existe evidencia cada vez más abundante, de que interactúan con otras clases de receptores, diversificando así sus funciones y su capacidad para responder a los estímulos del entorno. El proceso mediante el cual un receptor desencadena cascadas de señalamiento a partir de un segundo receptor, en ausencia de síntesis de proteínas, se ha denominado “transactivación”. En esta revisión se analiza la transactivación de algunos receptores transmembranales, los mecanismos intracelulares involucrados, y sus repercusiones fisiopatológicas, utilizando como ejemplo a los receptores activados por proteasas (PARs). Éstos fueron de los primeros receptores en los que se demostró este tipo de interacción, así como su participación en una gran variedad de procesos fisiológicos, debido a su capacidad para relacionarse con una gran variedad de proteínas de la membrana. La diversidad de funciones que deriva de las interacciones entre los receptores incrementa el nivel de complejidad de sus cascadas de señalamiento, y representan una gran oportunidad para el desarrollo de nuevos protocolos terapéuticos.

**Palabras clave:** GPCRs, Receptores activados por proteasas, transactivación, transducción de señales.

**Coordinated activation of cell surface receptors: physiological repercussions.**

### ABSTRACT

For a long time, G-protein-coupled receptors (GPCRs) were considered monomeric and only occasionally interacted with other receptors, mainly members of their own family. This concept has recently changed, and there is ever-growing evidence that this is not the case, thus diversifying their function and ability to respond to the environment. The process by which a membrane receptor triggers signaling pathways from a second one in the absence of protein synthesis is referred to as “transactivation”. This brief review will focus on the intracellular mechanisms and physio-pathological implications of the transactivation process, emphasizing its participation in the regulation of protease-activated receptors (PARs). These were among the first GPCRs for which receptor-receptor interaction was described, thus amplifying their function in a wide variety of tissues and contexts. This new level of molecular interrelation among receptors represents a great opportunity for the development of new therapeutic protocols.

**Keywords:** GPCRs, Protease-activated receptors, transactivation, signal transduction.

## INTRODUCCIÓN

**L**os receptores transmembranales son proteínas integrales de la membrana plasmática de las células, cuya función principal es comunicar las variaciones en el ambiente extracelular hacia el interior de la célula. Por medio de estas proteínas, las células pueden adaptarse a las condiciones cambiantes del entorno, e incluso transmitir señales para inducir cambios en las células vecinas. Entre las moléculas extracelulares que inducen estos cambios estructurales, se ha identificado hormonas, neurotransmisores, citocinas, factores de crecimiento, moléculas de adhesión o nutrientes que, al unirse a sus receptores en la membrana promueven cambios en la actividad metabólica de la célula. A este proceso de transmisión de señales hacia el interior de una célula, se le conoce como “transducción de señales” y es un proceso mediante el cual se activa una cascada de señalamiento que se inicia con proteínas asociadas al receptor y puede llegar hasta el núcleo para modificar la expresión de otras proteínas con las que la célula responde a los diferentes estímulos (Alberts et al., 2002).

Los receptores transmembranales se clasifican en 3 tipos: GPCRs (receptores acoplados a proteínas G), receptores con actividad enzimática (en gran parte, cinasas de tirosina o de serina/treonina), o receptores acoplados a canales iónicos. Los primeros, como su nombre lo indica, están unidos mediante su porción citoplásmica a proteínas pequeñas que tienen la capacidad de hidrolizar GTP (de ahí su nombre: proteínas G); y son éstas las que inician la cascada de señalamiento al interior de la célula. Por mucho tiempo se consideró que este tipo de receptores actuaba de manera autónoma, es decir, sin necesidad de interactuar con otros receptores del mismo tipo para comunicar señales al interior de la célula. Como veremos más adelante, este concepto está cambiando (Alberts et al., 2002).

Se ha demostrado que algunos GPCRs forman complejos constitutivos que consisten en subunidades monoméricas idénticas (homómeros) o distintas (heterómeros). El descubrimiento de la multimerización de GPCRs implica un nuevo nivel de diversidad en las cascadas de señalamiento desencadenadas, y aumenta los mecanismos que modulan la función de estos receptores tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. La heteromerización, es decir, la capacidad de interacción entre receptores de distinto tipo, podría ser responsable de la generación de receptores definidos farmacológicamente para los que hasta ahora no se ha identificado ningún gen (Bai, 2004).

Como ejemplo de la capacidad de los GPCRs de interactuar con otros tipos de receptores, abordaremos en esta revisión a los Receptores Activados por Proteasas (PARs por sus siglas en inglés). Estos receptores, como su nombre lo indica, se activan por proteasas extracelulares, principalmente la trombina

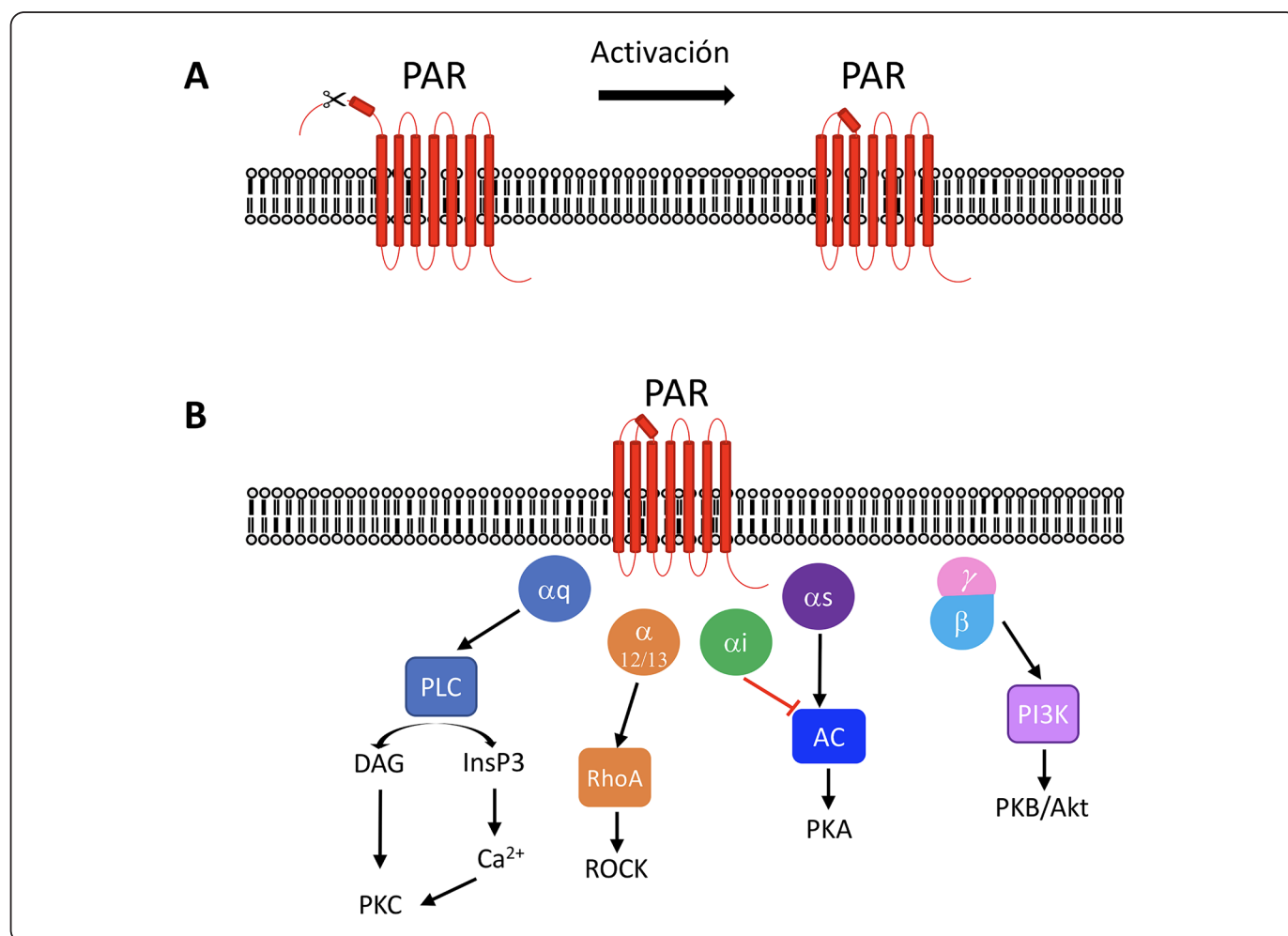
sanguínea, pero también por otras proteasas que cortan su extremo N-terminal para activarlos (Han & Nieman, 2020). Este corte desenmascara una nueva secuencia que actúa como ligando del mismo receptor (Figura 1A). Los PARs se expresan en la superficie de muchos tipos de células: neuronas, células del sistema inmune, miocitos, plaquetas, células endoteliales, fibroblastos, etc. (Peach et al., 2022). Estos receptores integran una pequeña familia de receptores acoplados a proteína G, que incluye a 4 miembros (PAR1-4) identificados por la similitud de su secuencia. Puesto que pueden ser activados por una gran variedad de proteasas, en contextos celulares muy diversos, que van desde la cascada de coagulación, hasta las proteasas del tracto digestivo, estos receptores están involucrados en procesos tan diversos como la inflamación, la hemostasis, la reparación tisular, el dolor y la progresión del cáncer (Ossovskaya & Bunnett, 2004); mismos que revisaremos a continuación.

Los PARs interactúan tanto con los miembros de su propia familia, formando homodímeros o heterodímeros (Lin et al., 2013); así como con otros tipos de receptores en un proceso llamado “transactivación”. Este término se usa para referirse a “la activación de un receptor, que conduce rápidamente y en ausencia de síntesis de proteínas, a la estimulación de un segundo receptor en la membrana celular” (Little et al., 2011). En principio, un receptor puede transactivar a otro: Liberando directa o indirectamente el ligando de otro receptor; o cuando las cascadas de señalamiento detonadas por un receptor se entrecruzan con las de un segundo receptor, modulando positivamente su actividad intracelular, sin la participación de un ligando (Cattaneo et al., 2014). Es importante mencionar que este proceso es independiente de la síntesis de proteínas. Es decir, aquellos procesos que implican una demora de decenas de minutos o de horas para la síntesis *de novo* de factores de crecimiento o citocinas, y que son sensibles a cicloheximida o Actinomicina D, no se consideran como mecanismos de transactivación (Gieseler et al., 2013).

Dado el impacto potencial sobre los enfoques terapéuticos actuales y futuros, de este tipo de interacciones entre los receptores, en esta revisión nos centramos en algunos ejemplos de transactivación de los PARs, para evidenciar la complejidad del señalamiento a partir de GPCRs.

## VIAS DE SEÑALAMIENTO INDUCIDAS POR LOS PARs

Los PARs activan múltiples vías de señalamiento que dependen tanto del contexto celular, como de las proteasas activadoras. Adicionalmente, es importante señalar que, debido a la metodología utilizada para estudiarlos, no es posible distinguir si las vías de señalamiento desencadenadas son generadas por un monómero o un multímero, a menos que los autores tengan como propósito original establecer esta distinción. Sin embargo, tomando esto en cuenta, y a modo de introducción, en general, las vías de señalamiento identificadas hasta ahora son las siguientes:



**Figura 1. Mecanismo de activación de los PARS.** Panel A. Los PARS se activan por el corte proteolítico de su extremo N-terminal que desenmascara al ligando. Panel B. Los PARS activan una gran variedad de vías de señalamiento dependiendo del tipo de subunidad de proteína G activada. Figura de elaboración propia.

Los PARS, como parte de la superfamilia de los GPCRs, están acoplados a través de su dominio citoplásmico a cuatro tipos de proteína G $\alpha$ : G $\alpha_{q/11}$  está involucrada en la activación de la Fosfolipasa C (PLC), que es responsable de la movilización de Ca<sup>2+</sup> de pozas intracelulares y la activación de la proteína cinasa C (PKC). G $\alpha_{i/o}$  inhibe a la adenilil ciclasa (AC), en tanto que G $\alpha_s$  la estimula. A su vez, los niveles del monofosfato cíclico de adenosina (cAMP) modulan a la proteína cinasa A (PKA). La activación de G $\alpha_{12/13}$  está relacionada con la remodelación del citoesqueleto a través de RhoA y su cinasa activadora ROCK. Adicionalmente, las proteínas G tienen otras dos subunidades,  $\beta$  y  $\gamma$ , que actúan conjuntamente para inducir la vía de la Fosfoinositol 3-cinasa (PI3K)/Proteína Cinasa B (Akt). Estas vías de señalamiento, a su vez, y dependiendo del contexto fisiológico de cada tipo celular y/o de la proteasa activadora, pueden modular la vía de las cinasas activadas por mitógenos (MAPK) (Peach et al., 2022)(Figura 1B).

### DIMERIZACIÓN DE LOS PARS

Antes de analizar la interacción de estos receptores con otros de distintas familias o subtipos, es importante mencionar que los PARS interactúan con miembros de su propia familia. En estudios iniciales las vías de señalamiento se caracterizaron sin considerar la posibilidad de multimerización, puesto que, la formación de complejos entre los GPCRs no se consideraba fisiológicamente relevante. Estudios más recientes, con el uso de diversas metodologías, han demostrado que PAR1, PAR2 y PAR4 son capaces de formar homodímeros (PAR1-PAR1, etc.) (Chen et al., 1994; de La Fuente et al., 2012; Seigny et al., 2011); sin embargo, la relevancia fisiológica de estos complejos no está clara aún. Por otra parte, la heterodimerización entre los PARS, así como su importancia fisiológica, ha sido bastante estudiada. El primer heterodímero caracterizado fue PAR3-PAR4. Este estudio surgió como una manera elegante de explicar cómo es que PAR3, que carece de cola citoplásmica

acoplada al señalamiento, podía ejercer una función en la activación plaquetaria en ratones. Este estudio es interesante porque normalmente PAR4 tiene baja afinidad por la trombina, pero su asociación con PAR3, le confiere mayor afinidad, es decir, estos receptores se activan con menores concentraciones de proteasa (Nakanishi-Matsui et al., 2000)

De manera similar, PAR4 se asocia con PAR1 en las plaquetas humanas. Sin embargo, esta interacción es bastante más complicada, ya que involucra al receptor de adenosina P2Y<sub>12</sub> (Covic et al., 2000; Holinstat et al., 2006; Shapiro et al., 2000) que se discutirá más adelante (Figura 5B). La activación, ya sea de hPAR1 o de hPAR4, es suficiente para desencadenar la secreción de difosfato de adenosina (ADP) y promover la agregación plaquetaria, a diferencia del heterodímero PAR4-PAR3 murino. PAR1 y PAR4 se acoplan eficientemente a la vía de señalización de G $\alpha_q$  en plaquetas y otros tipos de células (Covic et al., 2000). hPAR1, se activa a bajas concentraciones de trombina (1nM), y genera un pico rápido de salida de calcio de pozas intracelulares. En tanto que hPAR4, se activa a concentraciones mayores (30 nM), pero induce una salida sostenida de calcio. La coexpresión de hPAR1 aumenta la afinidad de hPAR4 por la trombina, aumentando, de esta manera, el intervalo de concentraciones a las que este receptor funciona. También cambia la forma de la curva de Ca<sup>2+</sup>, donde se observa un pico generado por PAR1, amplificado por la contribución de PAR4 (Covic et al., 2000). La activación del dímero PAR1-PAR4 induce, además, la hidrólisis de fosoinositidos, la fosforilación de ERK y activa a genes inmediatos tempranos (como fos) en células endoteliales microvasculares, además de inducir vasorrelajación en la aorta de ratón (Kataoka et al., 2003)(Figura 2A).

El heterodímero PAR1-PAR2, ha sido muy estudiado en el endotelio vascular y el sistema circulatorio. En este caso, el corte del extremo N-terminal de PAR1 por la trombina, le confiere la capacidad de unirse y activar a un PAR2 cercano. Este mecanismo de activación en *trans*, genera una respuesta de señalización distinta de la inducida individualmente por PAR1 o PAR2. La idea de que el corte de PAR1 desenmascare una secuencia-ligando que pueda unirse para activar a un receptor de tipo PAR2 vecino, se basó en estudios en los que se observó que un péptido agonista que mimetiza la secuencia del ligando generado al cortar PAR1, activa PAR2 con una potencia similar a la del péptido agonista nativo de PAR2 examinado en el mismo sistema (Blackhart et al., 1996). La interacción de PAR1 con PAR2 ha sido confirmada mediante técnicas como la coimmunoprecipitación, FRET (Transmisión de energía de resonancia o transferencia de energía de resonancia de Förster), y BRET (Transmisión de energía de resonancia bioluminiscente) (Kaneider et al., 2007a; Lin & Trejo, 2013). Los PARs regulan la función vascular en condiciones normales y patológicas (Alberelli & de Candia, 2014). La sepsis es una respuesta

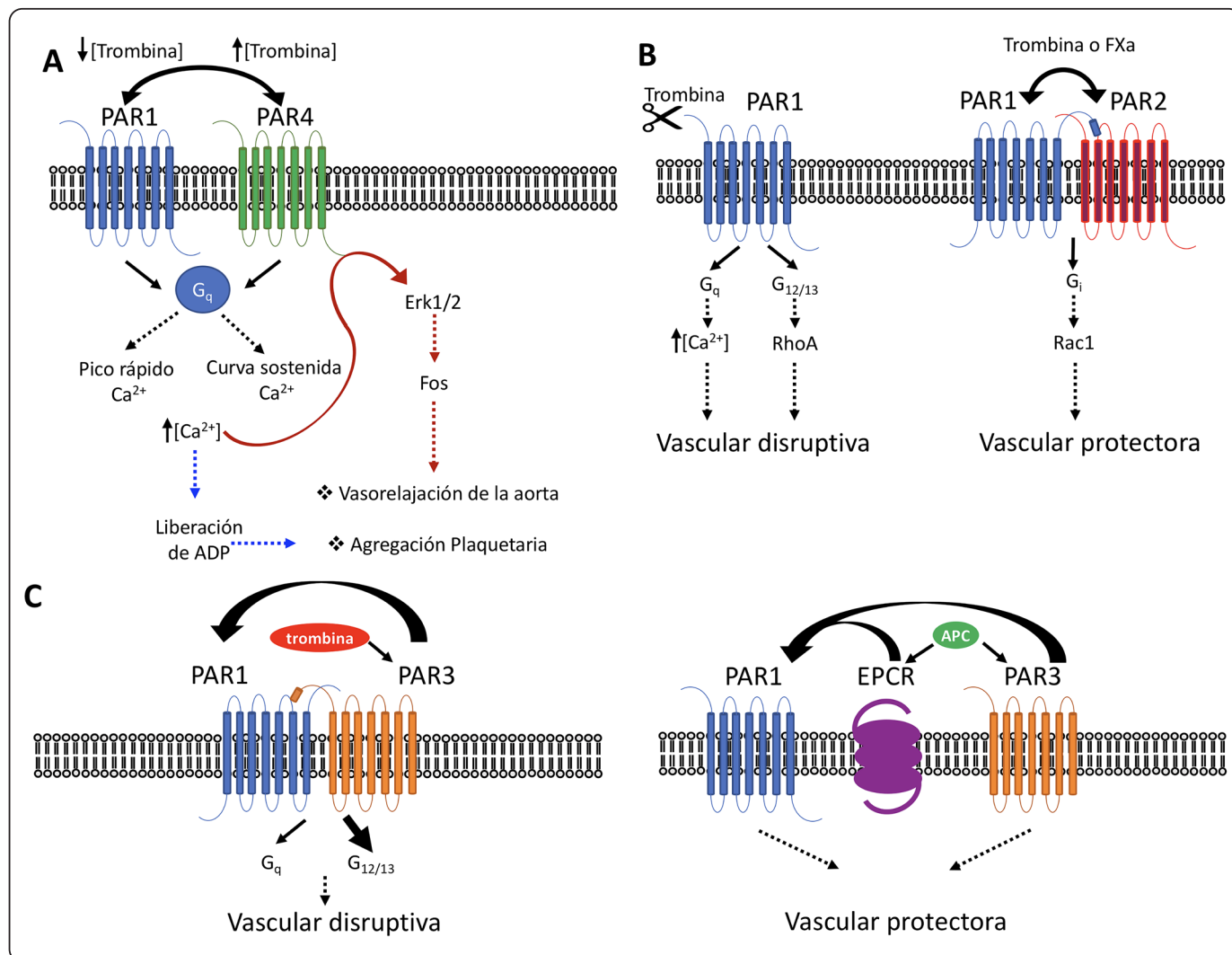
inflamatoria sistémica caracterizada, entre otras cosas, por una coagulación exacerbada. En estas condiciones patológicas, la señalización de PAR1 cambia de vascular disruptiva a protectora como consecuencia del aumento de la expresión de PAR2 inducida por los mediadores inflamatorios, que se generan en las etapas tempranas de este proceso (Alberelli & de Candia, 2014). Las señales iniciales de PAR1 están mediadas por Ca<sup>2+</sup> y por la activación de RhoA (Komarova et al., 2007); mientras que la interacción con PAR2 activa a G $\alpha_i$  y a Rac1 para promover la protección de la barrera endotelial (Feistritzer et al., 2005; Kaneider et al., 2007b). Estos hallazgos demuestran que la señalización del heterodímero PAR1-PAR2 difiere de la del protómero PAR1 (Figura 2B).

Por otra parte, Shi et al., (2004) demostró que la trombina estimula la movilidad de las células de melanoma humano a través de la activación del dímero PAR1-PAR2 (Shi et al., 2004). Congruente con lo anterior, la activación de este dímero también aumenta la migración de las células de cáncer de próstata (Shi et al., 2004).

De manera similar a lo que ocurre con los heterodímeros PAR1-PAR2, la dimerización de PAR1 con PAR3 puede tener efectos protectores o disruptores en el epitelio vascular dependiendo de la proteasa involucrada en la activación. La trombina induce un incremento en la permeabilidad vascular, ya que la interacción de PAR1 con PAR3, favorece el acoplamiento de PAR1 con G $\alpha_{13}$ , lo que, a su vez, promueve la disfunción de la barrera endotelial. Por otra parte, la proteasa anticoagulante “proteína activada C” (aPC) ejerce un efecto protector en estas células ya sea por activar a PAR3 directamente, o bien, a través de la interacción con el receptor endotelial de la proteína C (EPCR), que en conjunto con PAR1 induce un mecanismo citoprotector tanto en el endotelio vascular (Burnier & Mosnier, 2013; McLaughlin et al., 2007), como en podocitos murinos (Figura 2C). En este caso, se desconoce cuál es el mecanismo involucrado en el señalamiento, y únicamente se sabe que la caveolina puede estar involucrada (Madhusudhan et al., 2012). La interacción de PAR1 con PAR3 ha sido demostrada por BRET (McLaughlin et al., 2007).

### TRANSACTIVACIÓN DE RECEPTORES PROMOVIDA POR LOS PARs

La transactivación de receptores fue descrita por primera vez en 1996 sugerida por la observación de que el receptor para el factor de crecimiento epidérmico (EGFR) se fosforila como respuesta a los agonistas de GPCRs como la endotelina, el ácido lisofosfatídico o la trombina (Daub et al., 1996); lo que implica un entrecruzamiento de los mecanismos de estimulación de los diversos tipos de receptores en la membrana. Los GPCRs pueden estimular el señalamiento y actividad de varios tipos de receptores, además de los receptores acoplados a cinasas de tirosina (RTKs) como el EGFR; también se ha visto que



**Figura 2. Heterodimerización de los PARS.** Panel A. El heterodímero PAR1/PAR4 señala principalmente a través de la activación de la subunidad G<sub>aq</sub> que induce una elevación de calcio intracelular. Las flechas negras señalan la vía de activación en común para este heterodímero, en tanto que las flechas azules señalan el mecanismo involucrado en la agregación plaquetaria y las flechas rojas, aquel relacionado con la vasorelajación de la aorta. Figura de elaboración propia. Panel B. El señalamiento de PAR1 participa en la ruptura de la barrera endotelial; sin embargo, la dimerización con PAR2 promueve su interacción con la subunidad G<sub>ai</sub>, y su efecto se torna protector. Figura modificada de Lee-Rivera, et al. (Lee-Rivera et al., 2022). Panel C. El señalamiento desencadenado por PAR1/PAR3 puede tener efecto protector o disruptivo de la barrera endotelial dependiendo de la identidad de la proteasa activadora. Figura modificada de Lee-Rivera, et al. (Lee-Rivera et al., 2022). Las flechas punteadas indican la presencia de mensajeros intermedios que no necesariamente han sido identificados.

interactúan con receptores acoplados a cinasas de serina/ treonina (RSTKs)(Chaplin et al., 2017), con otros GPCRs (Wang et al., 2018), con los de reconocimiento de patrones (PRRs) (Wang et al., 2018), e incluso con canales iónicos (Burke & Bender, 2019). A continuación, utilizando a los PARS como ejemplo, discutiremos algunas de estas interacciones para ilustrar la importancia fisiológica y patológica que

pueden tener.

**RECEPTORES ACOPLADOS A CINASAS DE TIROSINA (RTKS)**

Los RTKs son proteínas que contienen un solo dominio transmembranal, un extremo extracelular, de estructura muy diversa y cuya función es la unión de ligando, y un dominio

citoplásmico, que contiene actividad intrínseca de cinasa de tirosina. La mayor parte de estos receptores son monoméricos en ausencia de ligando, que comúnmente es un factor de crecimiento. En algunos casos, forman dímeros enlazados por puentes de disulfuro (Hubbard, 1999). Comúnmente, en respuesta a la unión de ligando, dos receptores se acercan y cambia su configuración, de manera que se autofosforilan en residuos de tirosina, generando sitios de anclaje para las proteínas de señalamiento intracelular como son los dominios SH2 o PTB (Hubbard, 1999).

La transactivación del EGFR por PAR1 descrita por el grupo de Ulrich (Daub et al., 1996) involucra un mecanismo que es válido para otros RTKs como son los receptores para los factores de crecimiento vascular endotelial (VEGFR), y el derivado de plaquetas (PDGFR) (Cattaneo et al., 2014). Este proceso involucra a las metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMPs) o a las metaloproteinasas de la familia ADAM, que al ser activadas por el señalamiento intracelular de PAR1 o PAR2 estimulan el corte proteolítico de proteínas de membrana cuya porción extracelular actúa como ligandos para estos RTKs (Figura 3A) (Cattaneo et al., 2014; El-Daly et al., 2014; van der Merwe et al., 2008).

La transactivación de los RTKs a partir de especies reactivas de oxígeno (ROS) es interesante puesto que éstas pueden activar cinasas de tirosina (acopladas a receptor o no) por diversos mecanismos: Pueden alterar directamente las interacciones proteína-proteína, modificar el estado de oxidación de una cisteína crítica para el sitio catalítico de las fosfatasa de tirosina,

o pueden estimular la degradación de proteínas reguladoras que inhiben la actividad de cinasa de tirosina (Cattaneo et al., 2014). Un ejemplo de esto es la activación de la cinasa Src por PAR1, que induce la fosforilación de p47phox, subunidad activadora de la NADPH oxidasa (NOX) (Cattaneo et al., 2011). Es importante aclarar que NOX está localizada en la membrana plasmática y su actividad está altamente regulada y restringida espacialmente, lo que es particularmente importante para la transducción de señales. Este complejo es capaz de generar ROS a partir del NADPH como donador de electrones. Este incremento promueve la oxidación de las cisteínas del sitio catalítico de proteínas fosfatasa de tirosina (PTPs), lo que tiene como consecuencia un aumento en la actividad de las cinasas de tirosina (PTKs), que al fosforilar la región citosólica de los RTKs crean sitios de anclaje para proteínas de señalamiento, y desencadenan las cascadas (Figura 3B) (Cattaneo et al., 2014). PDGFR, VEGFR, y c-Met son ejemplos de RTKs cuya transfosforilación a partir de ROS es promovida por un GPCR (Cattaneo et al., 2018; Lei & Kazlauskas, 2014; Mußbach et al., 2015). Por otra parte, el incremento de calcio inducido por los PAR promueve la producción de ROS de origen mitocondrial, que se ha involucrado en la inducción de factores proinflamatorios, sin embargo, no está claro si este incremento está involucrado con la transactivación de otros receptores (Bang et al., 2021; Hawkins et al., 2007).

La activación concertada de los RTKs a partir de los PARs es compleja. Un ejemplo interesante descrito por Chandrasekharan et al., involucra a PAR1, EGFR y VEGFR. En este trabajo se observó que la fosfatasa MKP-1, un mediador clave en

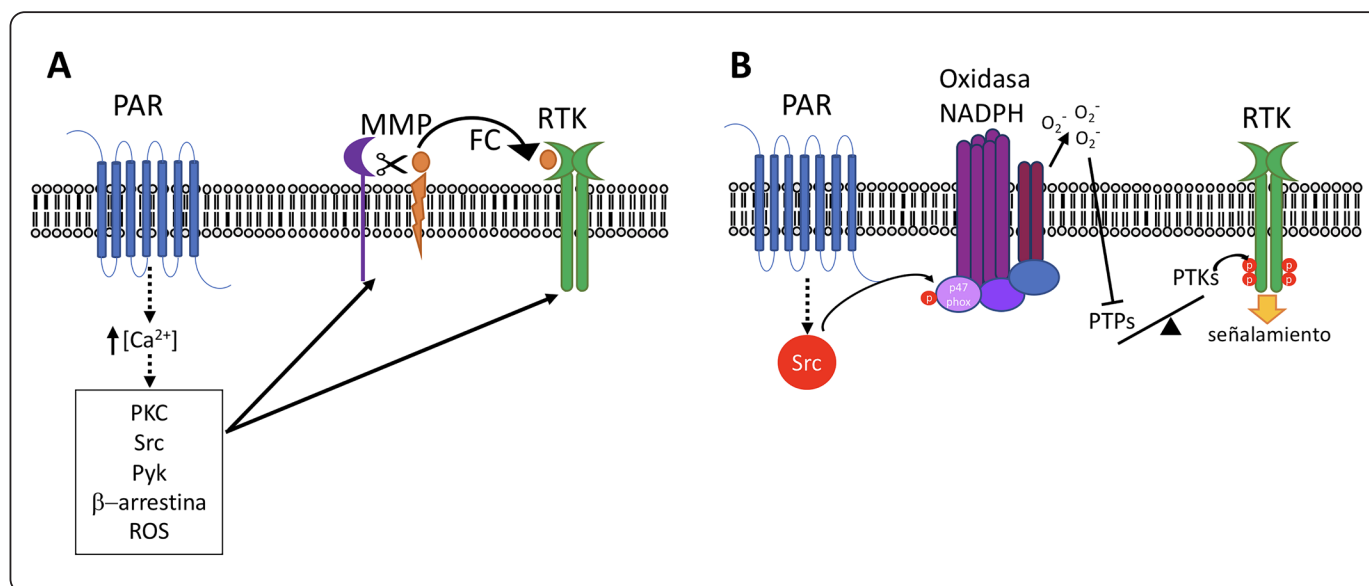


Figura 3. Transactivación de RTKs. Panel A. El mecanismo clásico de transactivación de los RTKs involucra el desprendimiento de factores de crecimiento por la estimulación de metaloproteinasas. Figura modificada de Lee-Rivera, et. al. (Lee-Rivera et al., 2022). Panel B. Mecanismo de transactivación los RTKs a través del incremento de especies reactivas de oxígeno. Figura de elaboración propia. Las flechas punteadas indican la presencia de mensajeros intermedios que no necesariamente han sido identificados.

la activación de células endoteliales, se activa por trombina como consecuencia de la activación sinérgica de dos vías de señalamiento. La primera ruta involucra la activación de MAPK, a partir de EGFR. La segunda requiere de la estimulación de la cinasa N-terminal de c-Jun (JNK) y el VEGFR-2 (Chandrasekharan et al., 2010). Es particularmente interesante que el mecanismo de inducción de VEGFR es un proceso que no depende de la secreción del ligando al compartimiento extracelular, sino de un proceso intracelular. En este sentido, el hecho de que los 3 receptores no puedan ser co-inmunoprecipitados, apoya la hipótesis de la transactivación. Este trabajo es particularmente importante, ya que demuestra por primera vez, las interacciones entre tres receptores: PAR1, el EGFR y el VEGFR, cuya estimulación concertada, conduce a la regulación transcripcional en este tipo de células, y subraya la importancia de esta compleja interacción de receptores en el microambiente vascular.

Existe un cuerpo creciente de literatura que describe la capacidad de PAR1 y PAR2 para transactivar al EGFR en células de varios carcinomas incluyendo pulmón (Kawao et al., 2005a), riñón (Bergmann et al., 2006), colon (Darmoul et al., 2004; Jarry et al., 2007; Van Der Merwe et al., 2008) y cáncer gástrico (Caruso et al., 2006; Fujimoto et al., 2010). Adicionalmente, PAR4 tiene la capacidad de estimular al EGFR y a ErbB-2 (un miembro de la misma familia), mediante un mecanismo que involucra a la cinasa de tirosina Src, a p42/p44 MAPK y a p38 MAPK en cardiomiocitos de ratón (Sabri et al., 2003). Se ha demostrado, asimismo, que la estimulación de PAR2 induce el entrecruzamiento de las vías de señalamiento del receptor del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), y de c-Met en células de carcinoma de hígado, promoviendo así la migración e invasión celular (Kaufmann et al., 2009, 2012).

Éstos son sólo algunos ejemplos que demuestran que la activación de los PARs puede promover la transactivación de una gran variedad de receptores acoplados a cinasas de tirosina, y la importancia fisiopatológica de estas interacciones.

## **B) RECEPTORES ACOPLADOS A CINASAS DE SERINA / TREONINA (RSTK)**

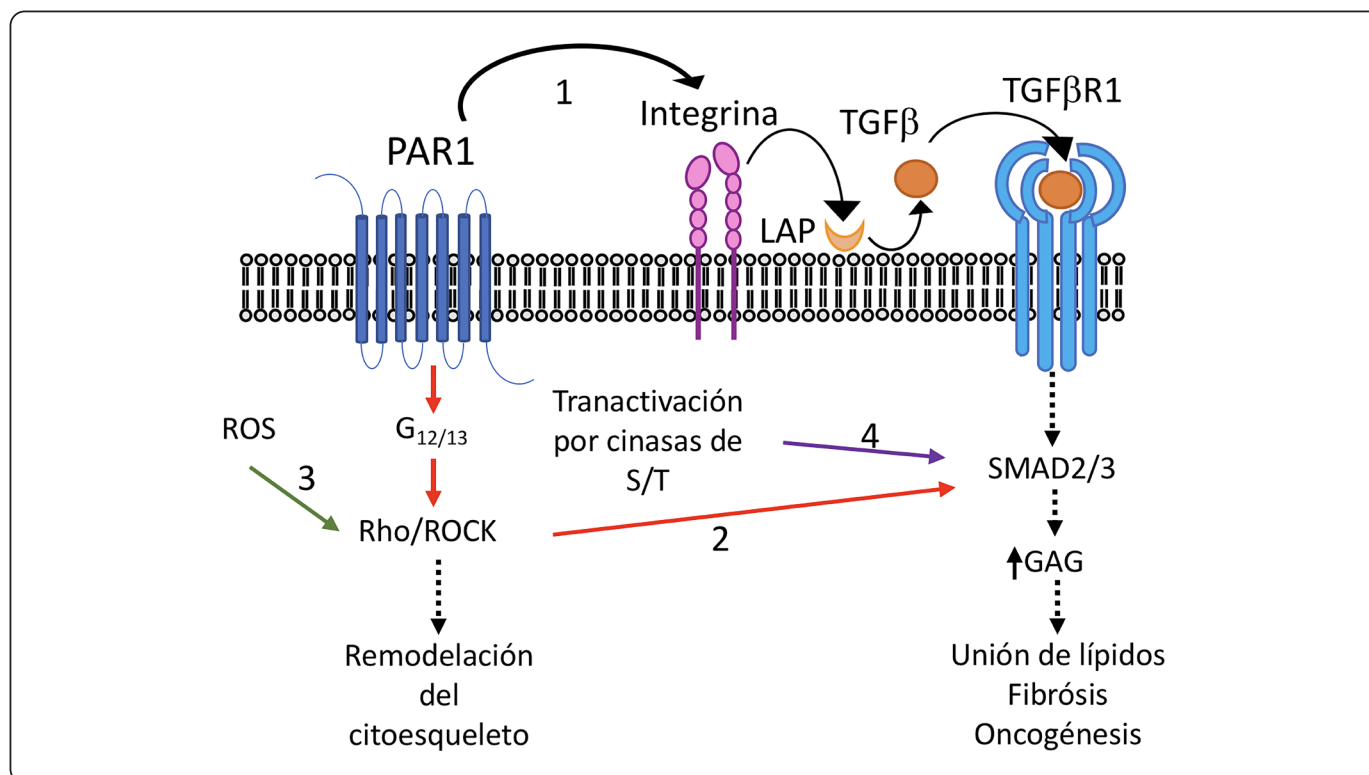
Hasta la fecha, la mayor parte del trabajo relacionado con la transactivación de receptores inducida por los PARs se ha enfocado principalmente en los receptores acoplados a cinasas de tirosina discutidos en la sección anterior. Sin embargo, este paradigma de señalización puede extenderse para incluir a receptores con actividad intrínseca de cinasa de serina/treonina (RSTK) (Burch et al., 2010a, 2012; Little et al., 2011). Al respecto, existe evidencia de que diversos GPCRs pueden transactivar a la superfamilia de receptores del factor de crecimiento TGF- $\beta$ /activina/BMP, todos los cuales poseen actividad de cinasa de serina/treonina y señalan a través de proteínas SMAD (para una revisión, ver (Derynck et al.,

2001)). La transactivación de los RSTK por PAR1 representa casi el 50% de los genes regulados por este GPCR: 177 en contraste con 209 activados por el señalamiento PAR1-RTK (Kamoto et al., 2017), lo que demuestra la relevancia de este tipo de interacciones.

Es importante mencionar que el mecanismo de transactivación inducido por PAR1 varía de acuerdo con el contexto celular; en el caso de las células de músculo liso vascular no se requiere de TGF- $\beta$ , en tanto que, en células epiteliales de pulmón o fibroblastos bucales, sí se requiere (Burch et al., 2010b; Chang et al., 2017; Jenkins et al., 2006). Al respecto, se han descrito cuatro mecanismos que regulan el señalamiento cruzado de estos dos tipos de receptores (Figura 4): en el primero, PAR1 se une a las integrinas  $\alpha_v\beta_6$ ,  $\alpha_v\beta_1$ ,  $\alpha_v\beta_3$ , o  $\alpha_v\beta_5$ , las que a su vez interactúan con el péptido asociado a la latencia (LAP). La escisión de este último libera al TGF- $\beta$ , que solo así es capaz de unirse a sus receptores y activarlos. El segundo mecanismo activa la vía de Rho/ROCK a través de PAR1, lo que, a su vez, conduce a la fosforilación de SMAD2/3 (Burch et al., 2012). El tercer mecanismo resulta de la capacidad de PAR1 para generar ROS, como se mencionó anteriormente, solo que, en este caso, el mecanismo involucra la activación de la vía Rho/ROCK que está involucrada en la fosforilación de SMAD2 (Kamoto et al., 2019). El cuarto mecanismo involucra a cinasas de serina/treonina intermedias, como pueden ser MAPKs, PI3K, CDKs, ROCK o GSK3, que son capaces de fosforilar la una región en SMAD2/3 conocida como región enlazadora entre el extremo N- y C-terminal. (Kamoto et al., 2019). La fosforilación en esta región parece ser muy importante para la transactivación del TGFBR1 a partir de otros tipos de receptores. En este sentido, la activación de la vía de las SMADs está relacionada con la síntesis de proteoglicanos y glicosaminoglicanos (GAG) (Kamoto et al., 2020). Cambios en la estructura de estas moléculas están estrechamente ligados con su capacidad de unión a lípidos y su acumulación está relacionada con la progresión de enfermedades como la aterosclerosis (Kamoto et al., 2020). Adicionalmente, la acumulación de proteoglicanos y GAGs juega un papel crucial en la regulación de la composición de la matriz extracelular y la adherencia de las células a la misma. En este sentido, es importante recalcar que la alteración de la vía de Rho/ROCK conduce a cambios en el citoesqueleto, que como consecuencia, resulta en el descontrol de procesos como la transición epitelio-mesénquima, que es esencial para la transformación de las células cancerosas (Principe et al., 2017), así como para la progresión de enfermedades que involucran la fibrosis (Chung et al., 2013). La desregulación de Rho/ROCK genera círculos viciosos que promueven, tanto la deposición de matriz extracelular, como la expresión de rasgos malignos, que exacerban patologías como la fibrosis o la oncogénesis.

## **C) GPCRS: PROSTANOIDES Y RECEPTOR DE ADENOSINA**

Los prostanoides son moléculas lipídicas derivadas de eicosanoides (ácidos grasos de 20 carbonos) que juegan un



**Figura 4. Transactivación de RSTKs.** Se han identificado 4 mecanismos que convergen en la fosforilación de SMAD2/3: El primero (flechas negras) depende de la unión a integrinas y la escisión del péptido de latencia (LAP) para generar TGFβ. El segundo (flechas rojas) depende de la activación de G<sub>12/13</sub>; el tercero (flecha verde) de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) que activan a la vía de Rho/ROCK; y el cuarto (flecha morada) de la activación por cinasas intermedias de serina/treonina. Figura modificada de Lee-Rivera, *et al.* (Lee-Rivera et al., 2022). Las flechas punteadas indican la presencia de mensajeros intermedios que no necesariamente han sido identificados.

papel muy importante en el señalamiento local en los tejidos. Las prostaglandinas (PGs) o el tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) son prostanoides que participan en muy diversos procesos como la coagulación sanguínea, la protección de las células del tracto gastro-intestinal, la secreción de mucosidad, fluidos y bicarbonato duodenal, la función renal, el tono vascular, y la respuesta inmune. Estas moléculas ejercen su función a partir de la activación de receptores específicos acoplados a proteínas G. En particular, la prostaglandina E<sub>2</sub> activa a los receptores de tipo EP2, EP3 y EP4 (Dominguez, 2006); en tanto que el tromboxano A<sub>2</sub> actúa a través del receptor TP (Dominguez, 2006). Estas moléculas se sintetizan a partir de ácido araquidónico por las ciclooxigenasas COX-1 y -2 (Fitzpatrick, 2005). La COX-1 es una enzima de tipo constitutivo, expresada en la mayoría de las células y los tejidos; a diferencia de la COX-2, que es inducible y juega un papel muy importante en los procesos inflamatorios (Fitzpatrick, 2005).

Una gran parte del trabajo concerniente al efecto de la trombina en estos procesos se enfoca en la inducción de la COX-2 por PAR1 y PAR2 (Trusevych & MacNaughton, 2015). Sin embargo, el aumento en la expresión de esta enzima depende de la síntesis

de proteínas, por lo que los prostanoides liberados a tiempos largos no se consideran producto de la transactivación de receptores. Por esta razón, nos enfocaremos en el mecanismo de regulación de la COX-1 por PAR1 y PAR2, aunque es preciso aclarar que en algunos casos estos mecanismos involucran la inducción de COX-2.

Tanto la síntesis de PGs, como la de TXA<sub>2</sub> dependen de la síntesis de ácido araquidónico (AA) a partir de la fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) inducida por PAR1 o PAR2. La activación de esta vía puede depender de un aumento intracelular de calcio (Sekiguchi et al., 2007), o ser independiente (McHowat et al., 2001); sin embargo, ambas vías convergen en la estimulación de las MAPKs (Kawabata et al., 2004; Kawao et al., 2005b; Maeda et al., 2015; Sekiguchi et al., 2007). Por un lado, la fosforilación rápida y transitoria de Erk1/2 conduce a la activación de la fosfolipasa A<sub>2</sub> y consecuentemente de COX-1. Por otra parte, la inducción de la vía de Src, a partir de la transactivación del EGFR induce a la MAP p38. Este segundo mecanismo implica una demora en el señalamiento, puesto que involucra un aumento en la expresión de COX-2 (Kawao et al., 2005b; Maeda et al., 2015). La activación



de una u otra vía depende del contexto celular, pero ambas inducen la síntesis y liberación de prostaglandinas a partir de los PARs (Figura 5A) (Kawabata et al., 2004; Kawao et al., 2005b; Maeda et al., 2015; Moriyuki et al., 2009; Sekiguchi et al., 2007).

En las plaquetas humanas, el receptor purinérgico P2Y12, que también es un GPCR, promueve la actividad procoagulante inducida por trombina (Dorsam et al., 2004) al interactuar con PAR1 y PAR4 y coordinadamente, inducir la generación TXA<sub>2</sub> (Holinstat et al., 2006, 2011; Shankar et al., 2006). Como se discutió anteriormente, PAR1 y PAR4 estimulan a la Gα<sub>q</sub>, que induce a la fosfolipasa C-β (PLCβ), lo que da como resultado una elevación de calcio intracelular, crítico para la activación río abajo de las cinasas Erk1/2 y la proteína cinasa C (PKC). Esta última promueve la secreción de difosfato de adenosina (ADP) de los gránulos densos en plaquetas, que a su vez activa al receptor P2Y12. Este receptor está acoplado a Gα<sub>i</sub>, y su estimulación potencia la vía de las MAPK iniciada por PAR1 y 4 lo que eleva la síntesis de TXA<sub>2</sub> (Figura 5B) (Holinstat et al., 2006, 2011; Shankar et al., 2006).

La activación de los receptores de prostanoides por trombina conduce, dependiendo del contexto celular, a la inflamación o a la citoprotección de vías aéreas (Asokanathan et al., 2002; Henry, 2006), a la modulación de la actividad de las células del tracto gastrointestinal (Kawabata et al., 2008), a la agregación plaquetaria (Holinstat et al., 2011), etc.; y esta variedad de funciones deriva en la importancia de entender la complejidad de las relaciones éntrelos PARs y este tipo de receptores.

#### D) CANALES IÓNICOS

En el sistema nervioso central, la trombina se activa como consecuencia de la ruptura de la barrera hematoencefálica desencadenando efectos complejos sobre la salud neuronal como la neuroprotección o la neurotoxicidad (Maggio et al., 2013; Ruf, 2003; Veldhuis et al., 2015). De manera similar a los efectos aparentemente contradictorios de los PARs en el endotelio vascular, estos receptores activan diferentes vías de señalización en múltiples tipos de células en el cerebro (Ruf, 2003). Algunos de los efectos neuronales mediados por PAR1 dependen de su capacidad para potenciar la función del receptor sináptico para N-metil-D-aspartato (NMDA) (Maggio et al.,

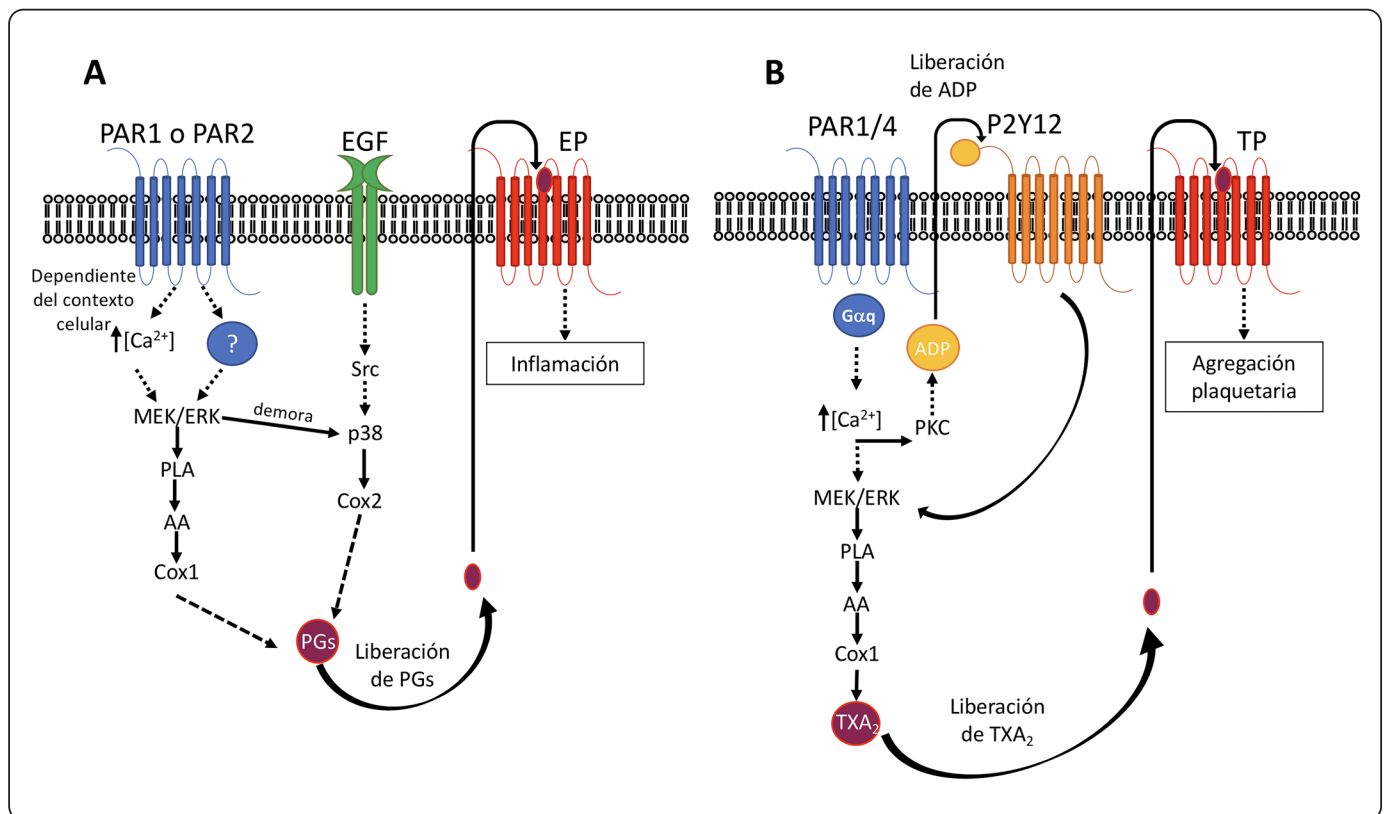


Figura 5. Transactivación de Receptores de Prostanoides. Panel A. Receptores de Prostaglandinas (EP). El señalamiento derivado de PAR1 o PAR2 puede estimular dos vías, una dependiente de calcio y otra independiente de este ion. Ambas convergen en la activación de MEK/Erk, que puede activar a Cox1 a tiempos cortos y promover la expresión de Cox2 a tiempos largos. Figura modificada de Lee-Rivera, et al. (Lee-Rivera et al., 2022). Panel B. Receptor de tromboxano (TP). La dimerización de PAR1/PAR4 conduce a la activación de Cox1, así como a la liberación de ADP, con la activación consecuente del receptor P2Y12. El señalamiento de este último refuerza la síntesis de TXA<sub>2</sub> a través de la estimulación de MEK/Erk. Figura de elaboración propia.

2013; Shavit-Stein et al., 2015), otros dependen de su capacidad de modular los canales de tipo TRP (Veldhuis et al., 2015).

El receptor para NMDA es un canal iónico controlado por ligando que requiere la unión de glutamato y D-serina o glicina como coagonistas. Este receptor está formado por cuatro subunidades, dos de tipo NR1 y una o dos de tipo NR2(A-D) o NR3(A-B). La composición heteromérica de este receptor determina sus características funcionales como la sensibilidad a los ligandos y moduladores. Los NMDARs se expresan en todo el SNC, donde juegan un papel muy importante, y se han implicado durante décadas en enfermedades neurológicas como la apoplejía, el traumatismo craneoencefálico, la demencia y la esquizofrenia (para una revisión, véase (Hollmann et al., 1989).

La mayor parte del trabajo que aborda la interacción de los NMDARs con PAR1 se ha hecho en neuronas del hipocampo (Maggio et al., 2013; Shavit-Stein et al., 2017). Sin embargo, ambos tipos de receptores están localizados en todo el cerebro tanto en neuronas como en astrocitos (Junge et al., 2004; Pagano et al., 2021); y recientemente se ha estudiado su interacción en neuronas dopaminérgicas de la *substantia nigra* y en el tracto solitario (Price et al., 2020; Vance et al., 2015). Uno de los mecanismos mediante los cuales PAR1 modula la función de los NMDARs es al regular la disponibilidad del glutamato. Esto se puede lograr al incrementar la liberación de este neurotransmisor por parte de los astrocitos (Lee et al., 2007) o al estimular la excitabilidad neuronal (Han et al., 2011). Este último mecanismo se conoce como potenciación a largo plazo (LTP, por sus siglas en inglés) y al modularlo, PAR1 interviene en procesos como la memoria (Almonte et al., 2013), la generación de convulsiones epilépticas (Maggio et al., 2008), y la isquemia (Shavit-Stein et al., 2015). Los NMDARs juegan un papel muy importante en el aprendizaje y la memoria, y resulta interesante que tanto PAR1 como PAR2 participen en el aprendizaje motivacional en ratas (Almonte et al., 2007; Lohman et al., 2009). PAR1 no solo induce la LTP, sino también puede impedirla en las sinapsis colaterales de Schaffer en el hipocampo, al inducir la reorganización estructural de los procesos astrocíticos que rodean las sinapsis (Sweeney et al., 2017). Esta reestructuración estimula la eliminación del glutamato de la hendidura sináptica, y de esta manera limita la activación de los NMDARs. De manera similar, PAR1 promueve la endocitosis de las subunidades NR1 y NR2B, regulando así el número de NMDARs en la membrana sináptica (Price et al., 2020).

Es importante mencionar que PAR2, al igual que PAR1, se expresa ampliamente en el sistema nervioso central en condiciones fisiológicas (Luo et al., 2007). Sin embargo, a diferencia de PAR1, PAR2 tiene un efecto sobre la depresión a largo plazo (LTD, por sus siglas en inglés). Interesantemente, la LTD inducida por PAR2 en neuronas de hipocampo, depende, tanto de la composición del NMDAR, particularmente de

aquellos receptores que contienen a la subunidad NR2B; como de la liberación de glutamato de los astrocitos circundantes inducida por PAR2 (Gan et al., 2011).

No se conoce con claridad cómo es que la trombina puede ejercer efectos opuestos en las neuronas, pero la concentración podría ser un factor importante a considerar. En el hipocampo, las concentraciones altas de trombina inducen LTP dependiente de los NMDARs, en tanto que a bajas concentraciones se promueve una LTP dependiente de otro receptor de glutamato, el mGluR5, que involucra, la transactivación del EPCR por PAR1 (Maggio et al., 2013). La proteína activada C (aPC), ligando del EPCR, protege a las neuronas corticales de la apoptosis inducida por NMDA vía PAR1 o PAR3 (Guo et al., 2004). Sin embargo, es importante aclarar que este efecto depende de la composición heteromérica de los NMDARs (Price et al., 2020; Vance et al., 2015). Estos resultados implican que la modulación de estos canales iónicos por los PARs depende de las poblaciones celulares, y el contexto en cual se expresan ambos tipos de receptores.

Los canales de potencial de receptor transitorio (TRP) comprenden una gran familia de 29 miembros que regulan el flujo transmembranal de cationes (principalmente  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ ), y juegan un papel muy importante en el señalamiento del dolor, así como en la comezón o prurito (para revisar el tema ver (Veldhuis et al., 2015; Wu et al., 2010)). La actividad de estos canales está regulada por muchos factores como cambios en la temperatura, estímulos mecánicos, ligandos específicos (como la capsaicina), intermediarios lipídicos, nucleótidos y iones como el  $\text{Ca}^{2+}$  o  $\text{Mg}^{2+}$ . Se han identificado más de 40 familias de GPCRs involucradas en el procesamiento de las señales dolorosas que interactúan con los canales TRP al detectar estímulos irritantes, nocivos, o inflamatorios con orígenes tan variados como péptidos, aminos, proteasas y lípidos (Stone & Molliver, 2009; Veldhuis et al., 2015). Los primeros trabajos realizados para establecer la relación entre los GPCRs y los TRPs se hicieron en *Drosophila melanogaster* (Hardie & Minke, 1992). Este primer trabajo, además de describir por primera vez un TRP, identificó al calcio, generado por la activación de la vía de  $\text{G}\alpha_q$ , como indispensable para reducir los umbrales de activación de TRP (Hardie & Minke, 1992). La función aparente de los GPCRs, en este contexto, consiste en en sensar una gran diversidad de estímulos que pueden ser nocivos, a través de la detección de proteasas (como en el caso de los PARs), pero también péptidos (como la bradicinina), nucleótidos (que activan a los receptores de tipo P2Y), citocinas, o prostaglandinas, por citar algunos ejemplos (Veldhuis et al., 2015). De esta manera, las interacciones entre estos receptores y canales desencadenan el señalamiento en procesos como el dolor, el prurito, y la inflamación neurogénica (Veldhuis et al., 2015). En este sentido, los PAR influyen en la actividad de los canales TRP al activar la vía de  $\text{G}\alpha_q$ . Esta cascada de señalamiento induce segundos mensajeros a varios niveles que modulan la actividad de estos

canales (Figura 1B). Primeramente, el fosfatidilinositol-4,5 bisfosfato (PIP2) normalmente inhibe al canal, y al activarse esta vía la PLC estimula la hidrólisis de este lípido que, al disociarse, permite la activación del canal. Por otra parte, la hidrólisis del PIP2 genera diacilglicerol (DAG), e inositol-1,4,5-trifosfato (InsP3) que actúan como segundos mensajeros y promueven la activación de la PKC, que a su vez fosforila al canal, modulando así su actividad. Además, esta vía promueve la elevación del calcio intracelular lo que induce cambios en la función del canal directamente, o a través de la calmodulina, uno de los principales transductores de las señales de calcio (Veldhuis et al., 2015). Adicionalmente, PAR2 puede modular estos canales a partir de la activación de la  $PLA_2$ , cinasas de tirosina, o de la PKA (Poole et al., 2013; Zhao et al., 2015). Adicionalmente, PAR2 interviene en la transducción del dolor al ser activado por la elastasa de neutrófilos o por Catepsina S (Zhao et al., 2014, 2015). En ambos casos las proteasas desencadenan la vía de  $G\alpha_s$  involucrada en el incremento de cAMP, que conduce a la activación de PKA y Erk1/2 que modulan la actividad de los canales de tipo TRPV4 (Zhao et al., 2014, 2015). Tanto PAR1, como PAR2 y PAR4 se expresan en neuronas sensoriales y pueden modular a TRPV1 a través de la activación de la  $PKC\epsilon$ , causando inflamación e hiperalgesia (Amadesi et al., 2006; Vellani et al., 2010). Por otra parte, PAR1 está involucrado en la modulación de permeabilidad endotelial a partir de la modulación de canales de tipo TRPC4 y TRPV4 en el endotelio vascular tanto en las vías aéreas como en el tracto gastrointestinal (Peng et al., 2020; Tirupathi et al., 2002). Es por esto que el estudio de las interacciones entre los GPCRs y los canales iónicos puede servir como una vía prometedora para el desarrollo de futuras terapias para aliviar el dolor y la inflamación.

## CONCLUSIONES

Esta revisión proporciona una visión general de lo que se conoce acerca del impacto de las interacciones entre los GPCRs y los distintos tipos de receptores membranales. Nos enfocamos en los PARs debido a que fueron los primeros receptores descritos en este contexto. Sin embargo, el interés de esta revisión es señalar la diversidad de las interacciones entre receptores, así como de sus funciones fisiológicas y patológicas. Queda claro que el estudio de estas interacciones representa una estrategia prometedora, pero poco aplicada hasta ahora para desarrollar estrategias terapéuticas. Dependiendo de la naturaleza de estas interacciones, puede ser suficiente apuntar solo a uno de los receptores para evitar la transactivación posterior del receptor asociado. Alternativamente, puede ser necesario bloquear las vías de señalamiento desencadenadas en común río abajo para mejorar la eficacia terapéutica. Aunque la mayoría de las consideraciones terapéuticas anteriores siguen siendo especulativas, evaluarlas en estudios (pre) clínicos agregaría otra dimensión a la terapia farmacológica dirigida por GPCRs.

## AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se realizó con el financiamiento del proyecto IN201223 de PAPIIT/UNAM.

## REFERENCIAS

- Alberelli, M. A., & de Candia, E. (2014). Functional role of protease activated receptors in vascular biology. In *Vascular Pharmacology* (Vol. 62, Issue 2, pp. 72–81). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2014.06.001>
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). *General Principles of Cell Communication*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26813/>
- Almonte, A. G., Hamill, C. E., Chhatwal, J. P., Wingo, T. S., Barber, J. A., Lyuboslavsky, P. N., David Sweatt, J., Ressler, K. J., White, D. A., & Traynelis, S. F. (2007). Learning and memory deficits in mice lacking protease activated receptor-1. *Neurobiology of Learning and Memory*, 88(3), 295–304. <https://doi.org/10.1016/J.NLM.2007.04.004>
- Almonte, A. G., Qadri, L. H., Sultan, F. A., Watson, J. A., Mount, D. J., Rumbaugh, G., & Sweatt, J. D. (2013). Protease-activated receptor-1 modulates hippocampal memory formation and synaptic plasticity. *Journal of Neurochemistry*, 124(1), 109. <https://doi.org/10.1111/JNC.12075>
- Amadesi, S., Cottrell, G. S., Divino, L., Chapman, K., Grady, E. F., Bautista, F., Karanjia, R., Barajas-Lopez, C., Vanner, S., Vergnolle, N., & Bunnett, N. W. (2006). Protease-activated receptor 2 sensitizes TRPV1 by protein kinase C $\epsilon$ - and A-dependent mechanisms in rats and mice. *Journal of Physiology*, 575(2), 555–571. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.111534>
- Asokanathan, N., Graham, P. T., Fink, J., Knight, D. A., Bakker, A. J., McWilliam, A. S., Thompson, P. J., & Stewart, G. A. (2002). Activation of Protease-Activated Receptor (PAR)-1, PAR-2, and PAR-4 Stimulates IL-6, IL-8, and Prostaglandin E 2 Release from Human Respiratory Epithelial Cells. *The Journal of Immunology*, 168(7), 3577–3585. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.7.3577>
- Bai, M. (2004). Dimerization of G-protein-coupled receptors: roles in signal transduction. *Cellular Signalling*, 16(2), 175–186. [https://doi.org/10.1016/S0898-6568\(03\)00128-1](https://doi.org/10.1016/S0898-6568(03)00128-1)
- Bang, E. J., Kim, D. H., & Chung, H. Y. (2021). Protease-activated receptor 2 induces ROS-mediated inflammation through Akt-mediated NF- $\kappa$ B and FoxO6 modulation during skin photoaging. *Redox Biology*, 44. <https://doi.org/10.1016/J.REDOX.2021.102022>
- Bergmann, S., Junker, K., Henklein, P., Hollenberg, M. D., Settmacher, U., & Kaufmann, R. (2006). PAR-type thrombin receptors in renal carcinoma cells: PAR1-mediated EGFR activation promotes cell migration. *Oncology Reports*, 15(4), 889–893.
- Blackhart, B. D., Emilsson, K., Nguyen, D., Teng, W., Martelli,

- A. J., Nystedt, S., Sundelin, J., & Scarborough, R. M. (1996). Ligand cross-reactivity within the protease-activated receptor family. *Journal of Biological Chemistry*, 271(28), 16466–16471. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.28.16466>
- Burch, M. L., Ballinger, M. L., Yang, S. N. Y., Getachew, R., Itman, C., Loveland, K., Osman, N., & Little, P. J. (2010a). Thrombin stimulation of proteoglycan synthesis in vascular smooth muscle is mediated by protease-activated receptor-1 transactivation of the transforming growth factor  $\beta$  type I receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 285(35), 26798–26805. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.092767>
- Burch, M. L., Ballinger, M. L., Yang, S. N. Y., Getachew, R., Itman, C., Loveland, K., Osman, N., & Little, P. J. (2010b). Thrombin stimulation of proteoglycan synthesis in vascular smooth muscle is mediated by protease-activated receptor-1 transactivation of the transforming growth factor  $\beta$  type I receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 285(35), 26798–26805. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.092767>
- Burch, M. L., Osman, N., Getachew, R., Al-Aryahi, S., Poronnik, P., Zheng, W., Hill, M. A., & Little, P. J. (2012). G protein coupled receptor transactivation: Extending the paradigm to include serine/threonine kinase receptors. In *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* (Vol. 44, Issue 5, pp. 722–727). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2012.01.018>
- Burke, K. J., & Bender, K. J. (2019). Modulation of Ion Channels in the Axon: Mechanisms and Function. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 13. <https://doi.org/10.3389/FNCEL.2019.00221>
- Burnier, L., & Mosnier, L. O. (2013). Novel mechanisms for activated protein C cytoprotective activities involving noncanonical activation of protease-activated receptor 3. *Blood*, 122(5), 807–816. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-03-488957>
- Caruso, R., Pallone, F., Fina, D., Gioia, V., Peluso, I., Caprioli, F., Stolfi, C., Perfetti, A., Spagnoli, L. G., Palmieri, G., MacDonald, T. T., & Monteleone, G. (2006). Protease-activated receptor-2 activation in gastric cancer cells promotes epidermal growth factor receptor trans-activation and proliferation. *American Journal of Pathology*, 169(1), 268–278. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2006.050841>
- Cattaneo, F., Castaldo, M., Parisi, M., Faraonio, R., Esposito, G., & Ammendola, R. (2018). Formyl peptide receptor 1 modulates endothelial cell functions by NADPH oxidase-dependent VEGFR2 transactivation. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/2609847>
- Cattaneo, F., Guerra, G., Parisi, M., De Marinis, M., Tafuri, D., Cinelli, M., & Ammendola, R. (2014). Cell-surface receptors transactivation mediated by G protein-coupled receptors. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 15, Issue 11, pp. 19700–19728). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms151119700>
- Cattaneo, F., Iaccio, A., Guerra, G., Montagnani, S., & Ammendola, R. (2011). NADPH-oxidase-dependent reactive oxygen species mediate EGFR transactivation by FPRL1 in WKYMVm-stimulated human lung cancer cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 51(6), 1126–1136. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.05.040>
- Chandrasekharan, U. M., Waitkus, M., Kinney, C. M., Walters-Stewart, A., & Dicorleto, P. E. (2010). Synergistic induction of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 by thrombin and epidermal growth factor requires vascular endothelial growth factor receptor-2. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 30(10), 1983–1989. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.212399>
- Chang, J. Z.-C., Hsieh, Y.-P., Lin, W.-H., Chen, H.-M., & Kuo, M. Y.-P. (2017). Activation of transforming growth factor- $\beta$ 1 by thrombin via integrins  $\alpha$ v $\beta$ 1,  $\alpha$ v $\beta$ 3, and  $\alpha$ v $\beta$ 5 in buccal fibroblasts: Suppression by epigallocatechin-3-gallate. *Head & Neck*, 39(7), 1436–1445. <https://doi.org/10.1002/HED.24791>
- Chaplin, R., Thach, L., Hollenberg, M. D., Cao, Y., Little, P. J., & Kamato, D. (2017). Insights into cellular signalling by G protein coupled receptor transactivation of cell surface protein kinase receptors. *Journal of Cell Communication and Signaling*, 11(2), 117–125. <https://doi.org/10.1007/S12079-017-0375-9>
- Chen, J., Ishii, M., Wang, L., Ishii, K., & Coughlin, S. R. (1994). Thrombin receptor activation. Confirmation of the intramolecular tethered liganding hypothesis and discovery of an alternative intermolecular liganding mode. *Journal of Biological Chemistry*, 269(23), 16041–16045. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(17\)33970-4](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)33970-4)
- Chung, H., Ramachandran, R., Hollenberg, M. D., & Muruve, D. (2013). Proteinase-activated receptor-2 transactivation of epidermal growth factor receptor and transforming growth factor- $\beta$  receptor signaling pathways contributes to renal fibrosis. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(52), 37319–37331. <https://doi.org/10.1074/JBC.M113.492793>
- Covic, L., Gresser, A. L., & Kuliopulos, A. (2000). Biphasic kinetics of activation and signaling for PAR1 and PAR4 thrombin receptors in platelets. *Biochemistry*, 39(18). <https://doi.org/10.1021/bi9927078>
- Darmoul, D., Gratio, V., Devaud, H., & Laburthe, M. (2004). Protease-activated receptor 2 in colon cancer: Trypsin-induced MAPK phosphorylation and cell proliferation are mediated by epidermal growth factor receptor transactivation. *Journal of Biological Chemistry*, 279(20), 20927–20934. <https://doi.org/10.1074/jbc.M401430200>
- Daub, H., Weiss, F. U., Wallasch, C., & Ullrich, A. (1996). Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors. *Nature*, 379(6565), 557–560. <https://doi.org/10.1038/379557a0>
- de La Fuente, M., Noble, D. N., Verma, S., & Nieman, M. T. (2012). Mapping human Protease-activated Receptor 4 (PAR4) homodimer interface to transmembrane helix 4. *Journal of Biological Chemistry*, 287(13). <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.040000>

- org/10.1074/jbc.M112.341438
- Derynck, R., Akhurst, R. J., & Balmain, A. (2001). TGF- $\beta$  signaling in tumor suppression and cancer progression. In *Nature Genetics* (Vol. 29, Issue 2, pp. 117–129). Nat Genet. <https://doi.org/10.1038/ng1001-117>
- Dominguez, Z. (2006). Los prostanoides, una revolución autoaicoide. *Anales Venezolanos de Nutrición*, 19(2), 74–82. [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0798-07522006000200004&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-07522006000200004&lng=es&nrm=iso&tlng=es)
- Dorsam, R. T., Tuluc, M., & Kunapuli, S. P. (2004). Role of protease-activated and ADP receptor subtypes in thrombin generation on human platelets. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2(5), 804–812. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2004.00692.x>
- El-Daly, M., Saifeddine, M., Mihara, K., Ramachandran, R., Triggler, C. R., & Hollenberg, M. D. (2014). Proteinase-activated receptors 1 and 2 and the regulation of porcine coronary artery contractility: A role for distinct tyrosine kinase pathways. *British Journal of Pharmacology*, 171(9), 2413–2425. <https://doi.org/10.1111/bph.12593>
- Feistritzer, C., Lenta, R., & Riewald, M. (2005). Protease-activated receptors-1 and -2 can mediate endothelial barrier protection: Role in factor Xa signaling. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 3(12), 2798–2805. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2005.01610.x>
- Fitzpatrick, F. (2005). Cyclooxygenase Enzymes: Regulation and Function. *Current Pharmaceutical Design*, 10(6), 577–588. <https://doi.org/10.2174/1381612043453144>
- Fujimoto, D., Hirono, Y., Goi, T., Katayama, K., Matsukawa, S., & Yamaguchi, A. (2010). The activation of Proteinase-Activated Receptor-1 (PAR1) mediates gastric cancer cell proliferation and invasion. *BMC Cancer*, 10(443). <https://doi.org/10.1186/1471-2407-10-443>
- Gan, J., Greenwood, S. M., Cobb, S. R., & Bushell, T. J. (2011). Indirect modulation of neuronal excitability and synaptic transmission in the hippocampus by activation of proteinase-activated receptor-2. *British Journal of Pharmacology*, 163(5), 984–994. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01293.x>
- Gieseler, F., Ungefroren, H., Settmacher, U., Hollenberg, M. D., & Kaufmann, R. (2013). Proteinase-activated receptors (PARs) - Focus on receptor-receptor- interactions and their physiological and pathophysiological impact. In *Cell Communication and Signaling* (Vol. 11, Issue 1). <https://doi.org/10.1186/1478-811X-11-86>
- Guo, H., Liu, D., Gelbard, H., Cheng, T., Insalaco, R., Fernández, J. A., Griffin, J. H., & Zlokovic, B. v. (2004). Activated Protein C Prevents Neuronal Apoptosis via Protease Activated Receptors 1 and 3. *Neuron*, 41(4), 563–572. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(04\)00019-4](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(04)00019-4)
- Han, K. S., Mannaioni, G., Hamill, C. E., Lee, J., Junge, C. E., Lee, C. J., & Traynelis, S. F. (2011). Activation of protease activated receptor 1 increases the excitability of the dentate granule neurons of hippocampus. *Molecular Brain*, 4(1). <https://doi.org/10.1186/1756-6606-4-32>
- Han, X., & Nieman, M. T. (2020). The domino effect triggered by the tethered ligand of the protease activated receptors. *Thrombosis Research*, 196, 87–98. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2020.08.004>
- Hardie, R. C., & Minke, B. (1992). The trp gene is essential for a light-activated Ca<sup>2+</sup> channel in Drosophila photoreceptors. *Neuron*, 8(4), 643–651. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0896-6273\(92\)90086-S](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0896-6273(92)90086-S)
- Hawkins, B. J., Solt, L. A., Chowdhury, I., Kazi, A. S., Abid, M. R., Aird, W. C., May, M. J., Foskett, J. K., & Madesh, M. (2007). G Protein-Coupled Receptor Ca<sup>2+</sup>-Linked Mitochondrial Reactive Oxygen Species Are Essential for Endothelial/Leukocyte Adherence. *Molecular and Cellular Biology*, 27(21), 7582. <https://doi.org/10.1128/MCB.00493-07>
- Henry, P. J. (2006). The protease-activated receptor2 (PAR2)-prostaglandin E2-prostanoid EP receptor axis: A potential bronchoprotective unit in the respiratory tract? In *European Journal of Pharmacology* (Vol. 533, Issues 1–3, pp. 156–170). *Eur J Pharmacol*. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2005.12.051>
- Holinstat, M., Boutaud, O., Apopa, P. L., Vesci, J., Bala, M., Oates, J. A., & Hamm, H. E. (2011). Protease-Activated Receptor Signaling in Platelets Activates Cytosolic Phospholipase A2 $\alpha$  Differently for Cyclooxygenase-1 and 12-Lipoxygenase Catalysis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 31(2), 435. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.219527>
- Holinstat, M., Voss, B., Bilodeau, M. L., McLaughlin, J. N., Cleator, J., & Hamm, H. E. (2006). PAR4, but not PAR1, signals human platelet aggregation via Ca<sup>2+</sup> mobilization and synergistic P2Y12 receptor activation. *Journal of Biological Chemistry*, 281(36), 26665–26674. <https://doi.org/10.1074/jbc.M602174200>
- Hollmann, M., O’Shea-Greenfield, A., Rogers, S. W., & Heinemann, S. (1989). Cloning by functional expression of a member of the glutamate receptor family. *Nature*, 342(6250), 643–648. <https://doi.org/10.1038/342643a0>
- Hubbard, S. R. (1999). Structural analysis of receptor tyrosine kinases. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 71(3–4), 343–358. [https://doi.org/10.1016/S0079-6107\(98\)00047-9](https://doi.org/10.1016/S0079-6107(98)00047-9)
- Jarry, A., Dorso, L., Gratio, V., Fogue-Lafitte, M. E., Laburthe, M., Labois, C. L., & Darmoul, D. (2007). PAR-2 activation increases human intestinal mucin secretion through EGFR transactivation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 364(3), 689–694. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.10.073>
- Jenkins, R. G., Su, X., Su, G., Scotton, C. J., Camerer, E., Laurent, G. J., Davis, G. E., Chambers, R. C., Matthey, M. A., & Sheppard, D. (2006). Ligation of protease-activated receptor 1 enhances  $\alpha$  v $\beta$ 6 integrin-dependent

- TGF- $\beta$  activation and promotes acute lung injury. *Journal of Clinical Investigation*, 116(6), 1606–1614. <https://doi.org/10.1172/JCI27183>
- Junge, C., Hubbard, K., Zhang, Z., Olson, J., Hepler, J., Brat, D., & Traynelis, S. (2004). Protease-activated receptor-1 in human brain: localization and functional expression in astrocytes. *Experimental Neurology*, 188(1), 94–103. <https://doi.org/10.1016/J.EXPNEUROL.2004.02.018>
- Kamato, D., Bhaskarala, V. V., Mantri, N., Oh, T. G., Ling, D., Janke, R., Zheng, W., Little, P. J., & Osman, N. (2017). RNA sequencing to determine the contribution of kinase receptor transactivation to G protein coupled receptor signalling in vascular smooth muscle cells. *PLoS ONE*, 12(7). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0180842>
- Kamato, D., Do, B. H., Osman, N., Ross, B. P., Mohamed, R., Xu, S., & Little, P. J. (2020). Smad linker region phosphorylation is a signalling pathway in its own right and not only a modulator of canonical TGF- $\beta$  signalling. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 77(2), 243–251. <https://doi.org/10.1007/S00018-019-03266-3>
- Kamato, D., Ta, H., Afroz, R., Xu, S., Osman, N., & Little, P. J. (2019). Mechanisms of PAR-1 mediated kinase receptor transactivation: Smad linker region phosphorylation. *Journal of Cell Communication and Signaling*, 13(4), 539. <https://doi.org/10.1007/S12079-019-00527-5>
- Kaneider, N. C., Leger, A. J., Agarwal, A., Nguyen, N., Perides, G., Derian, C., Covic, L., & Kuliopulos, A. (2007a). “Role reversal” for the receptor PAR1 in sepsis-induced vascular damage. *Nat Immunol*, 8(12), 1303–1312. <https://doi.org/10.1038/ni1525>
- Kaneider, N. C., Leger, A. J., Agarwal, A., Nguyen, N., Perides, G., Derian, C., Covic, L., & Kuliopulos, A. (2007b). “Role reversal” for the receptor PAR1 in sepsis-induced vascular damage. *Nature Immunology*, 8(12), 1303–1312. <https://doi.org/10.1038/ni1525>
- Kataoka, H., Hamilton, J. R., McKemy, D. D., Camerer, E., Zheng, Y. W., Cheng, A., Griffin, C., & Coughlin, S. R. (2003). Protease-activated receptors 1 and 4 mediate thrombin signaling in endothelial cells. *Blood*, 102(9). <https://doi.org/10.1182/blood-2003-04-1130>
- Kaufmann, R., Hascher, A., Mubbach, F., Henklein, P., Katenkamp, K., Westermann, M., & Settmacher, U. (2012). Proteinase-activated receptor 2 (PAR2) in cholangiocarcinoma (CCA) cells: Effects on signaling and cellular level. *Histochemistry and Cell Biology*, 138(6), 913–924. <https://doi.org/10.1007/s00418-012-1006-4>
- Kaufmann, R., Oettel, C., Horn, A., Halbhuber, K. J., Eitner, A., Krieg, R., Katenkamp, K., Henklein, P., Westermann, M., Böhmer, F. D., Ramachandran, R., Saifeddine, M., Hollenberg, M. D., & Settmacher, U. (2009). Met receptor tyrosine kinase transactivation is involved in proteinase-activated receptor-2-mediated hepatocellular carcinoma cell invasion. *Carcinogenesis*, 30(9), 1487–1496. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgp153>
- Kawabata, A., Kubo, S., Ishiki, T., Kawao, N., Sekiguchi, F., Kuroda, R., Hollenberg, M. D., Kanke, T., & Saito, N. (2004). Proteinase-Activated Receptor-2-Mediated Relaxation in Mouse Tracheal and Bronchial Smooth Muscle: Signal Transduction Mechanisms and Distinct Agonist Sensitivity. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 311(1), 402–410. <https://doi.org/10.1124/JPET.104.068387>
- Kawabata, A., Matsunami, M., & Sekiguchi, F. (2008). Gastrointestinal roles for proteinase-activated receptors in health and disease. *British Journal of Pharmacology*, 153(SUPPL. 1). <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707491>
- Kawao, N., Nagataki, M., Nagasawa, K., Kubo, S., Cushing, K., Wada, T., Sekiguchi, F., Ichida, S., Hollenberg, M. D., MacNaughton, W. K., Nishikawa, H., & Kawabata, A. (2005a). Signal transduction for proteinase-activated receptor-2-triggered prostaglandin E2 formation in human lung epithelial cells. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 315(2), 576–589. <https://doi.org/10.1124/jpet.105.089490>
- Kawao, N., Nagataki, M., Nagasawa, K., Kubo, S., Cushing, K., Wada, T., Sekiguchi, F., Ichida, S., Hollenberg, M. D., MacNaughton, W. K., Nishikawa, H., & Kawabata, A. (2005b). Signal transduction for proteinase-activated receptor-2-triggered prostaglandin E2 formation in human lung epithelial cells. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 315(2), 576–589. <https://doi.org/10.1124/jpet.105.089490>
- Komarova, Y. A., Mehta, D., & Malik, A. B. (2007). Dual regulation of endothelial junctional permeability. In *Science's STKE: signal transduction knowledge environment* (Vol. 2007, Issue 412). Sci STKE. <https://doi.org/10.1126/stke.4122007re8>
- Lee, C. J., Mannaioni, G., Yuan, H., Woo, D. H., Gingrich, M. B., & Traynelis, S. F. (2007). Astrocytic control of synaptic NMDA receptors. *Journal of Physiology*, 581(3), 1057–1081. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2007.130377>
- Lee-Rivera, I., López, E., & López-Colomé, A. M. (2022). Diversification of PAR signaling through receptor crosstalk. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 27(1), 77. <https://doi.org/10.1186/S11658-022-00382-0>
- Lei, H., & Kazlauskas, A. (2014). A Reactive Oxygen Species-Mediated, Self-Perpetuating Loop Persistently Activates Platelet-Derived Growth Factor Receptor  $\alpha$ . *Molecular and Cellular Biology*, 34(1), 110–122. <https://doi.org/10.1128/mcb.00839-13>
- Lin, H., Liu, A. P., Smith, T. H., & Trejo, J. A. (2013). Cofactoring and dimerization of proteinase-activated receptors. In *Pharmacological Reviews* (Vol. 65, Issue 4, pp. 1198–1213). American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics. <https://doi.org/10.1124/pr.111.004747>
- Lin, H., & Trejo, J. (2013). Transactivation of the PAR1-PAR2 heterodimer by thrombin elicits  $\beta$ -arrestin-mediated

- endosomal signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 288(16), 11203–11215. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.439950>
- Little, P. J., Burch, M. L., Al-aryahi, S., & Zheng, W. (2011). The paradigm of G protein receptor transactivation: A mechanistic definition and novel example. In *The Scientific World Journal* (Vol. 11, pp. 709–714). Scientific World Journal. <https://doi.org/10.1100/tsw.2011.75>
- Lohman, R. J., Jones, N. C., O'Brien, T. J., & Cocks, T. M. (2009). A regulatory role for protease-activated receptor-2 in motivational learning in rats. *Neurobiology of Learning and Memory*, 92(3), 301–309. <https://doi.org/10.1016/J.NLM.2009.03.010>
- Luo, W., Wang, Y., & Reiser, G. (2007). Protease-activated receptors in the brain: receptor expression, activation, and functions in neurodegeneration and neuroprotection. *Brain Research Reviews*, 56(2), 331–345. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRESREV.2007.08.002>
- Madhusudhan, T., Wang, H., Straub, B. K., Gröne, E., Zhou, Q., Shahzad, K., Müller-Krebs, S., Schwenger, V., Gerlitz, B., Grinnell, B. W., Griffin, J. H., Reiser, J., Gröne, H. J., Esmon, C. T., Nawroth, P. P., & Isermann, B. (2012). Cytoprotective signaling by activated protein C requires protease-activated receptor-3 in podocytes. *Blood*, 119(3), 874–883. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-07-365973>
- Maeda, Y., Sekiguchi, F., Yamanaka, R., Sugimoto, R., Yamasoba, D., Tomita, S., Nishikawa, H., & Kawabata, A. (2015). Mechanisms for proteinase-activated receptor 1-triggered prostaglandin E2 generation in mouse osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Biological Chemistry*, 396(2), 153–162. <https://doi.org/10.1515/HSZ-2014-0148>
- Maggio, N., Itsekson, Z., Dominissini, D., Blatt, I., Amariglio, N., Rechavi, G., Tanne, D., & Chapman, J. (2013). Thrombin regulation of synaptic plasticity: Implications for physiology and pathology. *Experimental Neurology*, 247, 595–604. <https://doi.org/10.1016/J.EXPNEUROL.2013.02.011>
- Maggio, N., Shavit, E., Chapman, J., & Segal, M. (2008). Thrombin Induces Long-Term Potentiation of Reactivity to Afferent Stimulation and Facilitates Epileptic Seizures in Rat Hippocampal Slices: Toward Understanding the Functional Consequences of Cerebrovascular Insults. *Journal of Neuroscience*, 28(3), 732–736. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3665-07.2008>
- McHowat, J., Creer, M., & Rickard, A. (2001). Stimulation of protease activated receptors on RT4 cells mediates arachidonic acid release via Ca<sup>2+</sup> independent phospholipase A2. *The Journal of Urology*, 165(6 Pt 1), 2063–2067. <https://doi.org/10.1097/00005392-200106000-00071>
- McLaughlin, J. N., Patterson, M. M., & Malik, A. B. (2007). Protease-activated receptor-3 (PAR3) regulates PAR1 signaling by receptor dimerization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(13), 5662–5667. <https://doi.org/10.1073/pnas.0700763104>
- Moriyuki, K., Sekiguchi, F., Matsubara, K., Nishikawa, H., & Kawabata, A. (2009). Proteinase-activated receptor-2-triggered prostaglandin E2 release, but not cyclooxygenase-2 upregulation, requires activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/akt/nuclear factor-κB pathway in human alveolar epithelial cells. *Journal of Pharmacological Sciences*, 111(3), 269–275. <https://doi.org/10.1254/jphs.09155FP>
- Mußbach, F., Henklein, P., Westermann, M., Settmacher, U., Böhmer, F. D., & Kaufmann, R. (2015). Proteinase-activated receptor 1- and 4-promoted migration of Hep3B hepatocellular carcinoma cells depends on ROS formation and RTK transactivation. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 141(5), 813–825. <https://doi.org/10.1007/S00432-014-1863-4>
- Nakanishi-Matsui, M., Zheng, Y. W., Sulciner, D. J., Welss, E. J., Ludeman, M. J., & Coughlin, S. R. (2000). PAR3 is a cofactor for PAR4 activation by thrombin. *Nature*, 404(6778), 609–613. <https://doi.org/10.1038/35007085>
- Ossovskaya, V. S., & Bunnett, N. W. (2004). Protease-Activated Receptors: Contribution to Physiology and Disease. In *Physiological Reviews* (Vol. 84, Issue 2, pp. 579–621). Physiol Rev. <https://doi.org/10.1152/physrev.00028.2003>
- Pagano, J., Giona, F., Beretta, S., Verpelli, C., & Sala, C. (2021). N-methyl-d-aspartate receptor function in neuronal and synaptic development and signaling. *Current Opinion in Pharmacology*, 56, 93–101. <https://doi.org/10.1016/J.COPH.2020.12.006>
- Peach, C. J., Edgington-Mitchell, L. E., Bunnett, N. W., & Schmidt, B. L. (2022). Protease-Activated Receptors in Health and Disease. *Physiological Reviews*. <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.00044.2021>
- Peng, S., Grace, M., Gondin, A., Retamal, J., Dill, L., Darby, W., Bunnett, N., Abogadie, F., Carbone, S., Tigani, T., Davis, T., Poole, D., NA, Veldhuis, N., & P, McIntyre, P. (2020). The transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) ion channel mediates protease activated receptor 1 (PAR1)-induced vascular hyperpermeability. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 100(8), 1057–1067. <https://doi.org/10.1038/S41374-020-0430-7>
- Poole, D. P., Amadesi, S., Veldhuis, N. A., Abogadie, F. C., Lieu, T., Darby, W., Liedtke, W., Lew, M. J., McIntyre, P., & Bunnett, N. W. (2013). Protease-activated Receptor 2 (PAR2) Protein and Transient Receptor Potential Vanilloid 4 (TRPV4) Protein Coupling Is Required for Sustained Inflammatory Signaling. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(8), 5790. <https://doi.org/10.1074/JBC.M112.438184>
- Price, R., Ferrari, E., Gardoni, F., Mercuri, N. B., & Ledonne, A. (2020). Protease-activated receptor 1 (PAR1) inhibits synaptic NMDARs in mouse nigral dopaminergic neurons. *Pharmacological Research*, 160, 105185. <https://doi.org/10.1016/J.PHRS.2020.105185>

- Principe, D. R., Diaz, A. M., Torres, C., Mangan, R. J., DeCant, B., McKinney, R., Tsao, M.-S., Lowy, A., Munshi, H. G., Jung, B., & Grippo, P. J. (2017). TGF $\beta$  engages MEK/ERK to differentially regulate benign and malignant pancreas cell function. *Oncogene*, *36*(30), 4336. <https://doi.org/10.1038/ONC.2016.500>
- Ruf, W. (2003). PAR1 signaling: More good than harm? In *Nature Medicine* (Vol. 9, Issue 3, pp. 258–260). Nat Med. <https://doi.org/10.1038/nm0303-258>
- Sabri, A., Guo, J., Elouardighi, H., Darrow, A. L., Andrade-Gordon, P., & Steinberg, S. F. (2003). Mechanisms of protease-activated receptor-4 actions in cardiomyocytes: Role of Src tyrosine kinase. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(13), 11714–11720. <https://doi.org/10.1074/jbc.M213091200>
- Sekiguchi, F., Saito, S., Takaoka, K., Hayashi, H., Nagataki, M., Nagasawa, K., Nishikawa, H., Matsui, H., & Kawabata, A. (2007). Mechanisms for prostaglandin E2 formation caused by proteinase-activated receptor-1 activation in rat gastric mucosal epithelial cells. *Biochemical Pharmacology*, *73*(1), 103–114. <https://doi.org/10.1016/J.BCP.2006.09.016>
- Sevigny, L. M., Zhang, P., Bohm, A., Lazarides, K., Perides, G., Covic, L., & Kuliopulos, A. (2011). Interdicting protease-activated receptor-2-driven inflammation with cell-penetrating pepducins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(20), 8491–8496. <https://doi.org/10.1073/pnas.1017091108>
- Shankar, H., Garcia, A., Prabhakar, J., Kim, S., & Kunapuli, S. P. (2006). P2Y12 receptor-mediated potentiation of thrombin-induced thromboxane A2 generation in platelets occurs through regulation of Erk1/2 activation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, *4*(3), 638–647. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2006.01789.x>
- Shapiro, M. J., Weiss, E. J., Faruqi, T. R., & Coughlin, S. R. (2000). Protease-activated receptors 1 and 4 are shut off with distinct kinetics after activation by thrombin. *Journal of Biological Chemistry*, *275*(33). <https://doi.org/10.1074/jbc.M004589200>
- Shavit-Stein, E., Artan-Furman, A., Feingold, E., Shimon, M. ben, Itsekson-Hayosh, Z., Chapman, J., Vlachos, A., & Maggio, N. (2017). Protease Activated Receptor 2 (PAR2) Induces Long-Term Depression in the Hippocampus through Transient Receptor Potential Vanilloid 4 (TRPV4). *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *10*. <https://doi.org/10.3389/FNMOL.2017.00042>
- Shavit-Stein, E., Itsekson-Hayosh, Z., Aronovich, A., Reisner, Y., Bushi, D., Pick, C. G., Tanne, D., Chapman, J., Vlachos, A., & Maggio, N. (2015). Thrombin induces ischemic LTP (iLTP): implications for synaptic plasticity in the acute phase of ischemic stroke. *Scientific Reports*, *5*. <https://doi.org/10.1038/SREP07912>
- Shi, X., Gangadharan, B., Brass, L. F., Ruf, W., & Mueller, B. M. (2004). Protease-activated receptors (PAR1 and PAR2) contribute to tumor cell motility and metastasis. *Molecular Cancer Research*, *2*(7).
- Stone, L. S., & Molliver, D. C. (2009). In search of analgesia: emerging roles of GPCRs in pain. *Molecular Interventions*, *9*(5), 234–251. <https://doi.org/10.1124/MI.9.5.7>
- Sweeney, A. M., Fleming, K. E., McCauley, J. P., Rodriguez, M. F., Martin, E. T., Sousa, A. A., Leapman, R. D., & Scimemi, A. (2017). PAR1 activation induces rapid changes in glutamate uptake and astrocyte morphology. *Scientific Reports* *2017* *7*:1, *7*(1), 1–20. <https://doi.org/10.1038/srep43606>
- Tiruppathi, C., Minshall, R., Paria, B., Vogel, S., & Malik, A. (2002). Role of Ca<sup>2+</sup> signaling in the regulation of endothelial permeability. *Vascular Pharmacology*, *39*(4–5), 173–185. [https://doi.org/10.1016/S1537-1891\(03\)00007-7](https://doi.org/10.1016/S1537-1891(03)00007-7)
- Trusevych, E., & MacNaughton, W. (2015). Proteases and their receptors as mediators of inflammation-associated colon cancer. *Current Pharmaceutical Design*, *21*(21), 2983–2992. <https://doi.org/10.2174/1381612821666150514104800>
- van der Merwe, J. Q., Hollenberg, M. D., & MacNaughton, W. K. (2008). EGF receptor transactivation and MAP kinase mediate proteinase-activated receptor-2-induced chloride secretion in intestinal epithelial cells. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, *294*(2). <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00303.2007>
- Van Der Merwe, J. Q., Hollenberg, M. D., & MacNaughton, W. K. (2008). EGF receptor transactivation and MAP kinase mediate proteinase-activated receptor-2-induced chloride secretion in intestinal epithelial cells. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, *294*(2), G441–G451. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00303.2007>
- Vance, K. M., Rogers, R. C., & Hermann, G. E. (2015). PAR1-Activated Astrocytes in the Nucleus of the Solitary Tract Stimulate Adjacent Neurons via NMDA Receptors. *The Journal of Neuroscience*, *35*(2), 776. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3105-14.2015>
- Veldhuis, N. A., Poole, D. P., Grace, M., McIntyre, P., & Bunnett, N. W. (2015). The G protein-coupled receptor–transient receptor potential channel axis: Molecular insights for targeting disorders of sensation and inflammation. *Pharmacological Reviews*, *67*(1), 36–73. <https://doi.org/10.1124/PR.114.009555>
- Vellani, V., Kinsey, A. M., Prandini, M., Hechtfisher, S. C., Reeh, P., Magherini, P. C., Giacomoni, C., & MacNaughton, P. A. (2010). Protease activated receptors 1 and 4 sensitize TRPV1 in nociceptive neurones. *Molecular Pain*, *6*, 61. <https://doi.org/10.1186/1744-8069-6-61>
- Wang, W., Qiao, Y., & Li, Z. (2018). New Insights into Modes of GPCR Activation. *Trends in Pharmacological Sciences*, *39*(4), 367–386.



TIPS.2018.01.001

- Wu, L. J., Sweet, T. B., & Clapham, D. E. (2010). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXVI. Current progress in the Mammalian TRP ion channel family. In *Pharmacological Reviews* (Vol. 62, Issue 3, pp. 381–404). Pharmacol Rev. <https://doi.org/10.1124/pr.110.002725>
- Zhao, P., Lieu, T., Barlow, N., Metcalf, M., Veldhuis, N. A., Jensen, D. D., Kocan, M., Sostegni, S., Haerteis, S., Baraznenok, V., Henderson, I., Lindström, E., Guerrero-Alba, R., Valdez-Morales, E. E., Liedtke, W., McIntyre, P., Vanner, S. J., Korbmacher, C., & Bunnett, N. W. (2014).

- Cathepsin S Causes Inflammatory Pain via Biased Agonism of PAR2 and TRPV4. *The Journal of Biological Chemistry*, 289(39), 27215. <https://doi.org/10.1074/JBC.M114.599712>
- Zhao, P., Lieu, T., Barlow, N., Sostegni, S., Haerteis, S., Korbmacher, C., Liedtke, W., Jimenez-Vargas, N. N., Vanner, S. J., & Bunnett, N. W. (2015). Neutrophil Elastase Activates Protease-activated Receptor-2 (PAR2) and Transient Receptor Potential Vanilloid 4 (TRPV4) to Cause Inflammation and Pain. *The Journal of Biological Chemistry*, 290(22), 13875. <https://doi.org/10.1074/JBC.M115.642736>