



ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

## ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Ο ρόλος των αμινοξέων του δεύτερου εξωκυττάριου βρόγχου του τύπου 1 υποδοχέα του εκλυτικού παράγοντα της κορτικοτροπίνης στην ενεργοποίησή του»

“The role of the aminoacids of the second extracellular loop of type 1 receptor of the corticotropin releasing factor in the activation of the receptor”

**Εργαστήριο Φαρμακολογίας  
Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Κρήτης**

Υπεύθυνος καθηγητής Τμ. Ιατρικής: **Λιαπάκης Γεώργιος**

Υπεύθυνος καθηγητής Τμ. Χημείας: **Κατερινόπουλος Χαράλαμπος**

**Χριστοπούλου Καλλιόπη**

**Ιούνιος 2016**

# **Ευχαριστίες**

*Στην πραγματοποίηση της παρούσας πτυχιακής εργασίας συνέβαλαν αρκετοί άνθρωποι, ο καθένας με το δικό του ξεχωριστό τρόπο.*

*Πρώτα απ' όλα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υπεύθυνο Αναπληρωτή Καθηγητή Λιαπάκη Γεώργιο για τη συνεχή καθοδήγηση, την αμέριστη υποστήριξη, τις ουσιώδεις συμβουλές, την αδιάκοπη συμπαράσταση και ενθάρρυνση που μου παρείχε, αλλά πιο πολύ για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε όλο αυτό το χρονικό διάστημα που ήμουν μέλος της εργαστηριακής του ομάδας στο Τμήμα Φαρμακολογίας, έτσι ώστε να φέρω εις πέρας την εργασία αυτή.*

*Η ολοκλήρωση της εργασίας οφείλεται κατά πολύ μεγάλο βαθμό στη υποψήφια διδάκτορα Σπυριδάκη Κατερίνα, την οποία ευχαριστώ θερμά για την ουσιαστική βοήθεια, την υπομονή, την κατανόηση, τη στήριξη, αλλά και τις πολύτιμες ιδέες και γνώσεις που μου μετέδωσε όλο αυτό το χρονικό διάστημα.*

*Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου για τη ευχάριστη συνεργασία, τη βοήθεια, αλλά και το ζεστό και φιλικό κλίμα που επικρατούσε στον εργαστηριακό χώρο και ιδιαίτερα τον φοιτητή της Ιατρικής σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης Καραγεώργο Βλάση, για την προθυμία του να με καθοδηγήσει σε πολλές τεχνικές που ήταν απαραίτητες για τη διεξαγωγή των πειραμάτων.*

*Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα Καθηγητή του τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης Κατερινόπουλο Χαράλαμπο για τις συμβουλές και τη βοήθεια που μου παρείχε.*

*Τέλος ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένειά μου για τη συμπαράσταση και την υποστήριξη που μου έδωσαν όλα αυτά τα χρόνια ώστε να πραγματοποιήσω το στόχο μου...*

*Χριστοπούλου Καλλιόπη,*

*Ιούνιος 2016*

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

### 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

#### 1.1 Εκλυτικός παράγοντας της κορτικοτροπίνης

#### 1.2 Συγγενή πεπτίδια του CRF

#### 1.3 Δράσεις του CRF και των συγγενών πεπτιδίων

#### 1.4 Μελέτες δομής και λειτουργίας του CRF και των συγγενών του πεπτιδίων

#### 1.5 Υποδοχείς του εκλυτικού παράγοντα της κορτικοτροπίνης (CRF)

1.5.1 Εντοπισμός υποδοχέων CRF βιολογικές δράσεις και ισομορφές

1.5.2 Φαρμακολογικές ιδιότητες των υποδοχέων του CRF

1.5.3 Υποδοχείς CRF και κυτταρική σηματοδότηση

1.5.4 Δομή και λειτουργία των υποδοχέων του CRF

#### 1.6 Σκοπός

### 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 2.1 Μετάλλαξη του DNA του ανθρώπινου CRF<sub>1</sub> - Γενική πειραματική διαδικασία

2.1.1 Μεταλλαξιγένεση κατευθυνόμενης θέσης με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), (PCR – site – directed – mutagenesis)

2.1.2 Πέψη DNA με ένζυμα περιορισμού

2.1.3 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

2.1.4 Απομόνωση DNA από πήκτωμα αγαρόζης (gel extraction)

2.1.5 Συρραφή των τεμαχίων του DNA μετά την πέψη τους με ένζυμα περιορισμού (Ligation)

#### 2.2 Μετασηματισμός βακτηρίων με πλασμιδιακό DNA

2.2.1 Μετασηματισμός και καλλιέργεια βακτηρίων DH-10b E.Coli με το πλασμιδιακό DNA που φέρει τη μετάλλαξη

2.2.2 Λήψη αποικιών και πολλαπλασιασμός μετασηματισμένων βακτηρίων DH-10b E.Coli

2.2.3 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από μετασηματισμένα βακτήρια DH – 10bE.Coli (Miniprep) και ταυτοποίηση του πλασμιδιακού DNA CRF<sub>1</sub>R – D269A/pCIN4 που φέρει τη μετάλλαξη

### **2.3 Κυτταροκαλλιέργειες**

2.3.1 Κρυοσυντήρηση κυττάρων

2.3.2 Απόψυξη κυττάρων

**2.4 Επιμόλυνση κυττάρων με πλασμιδιακό DNA που φέρει τη μετάλλαξη**

**2.5 Δημιουργία κυτταρικών σειρών που εκφράζουν σταθερά τους υποδοχείς (Stables)**

**2.6 Μελέτες διέγερσης παραγωγής κυκλικής μονοφωσφορικής αδενοσίνης (cAMP)**

## **3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

**3.1 Δημιουργία της μετάλλαξης D269A**

**3.2 Επίδραση της μετάλλαξης D269A στην ικανότητα της σοβαγίνης να διεγείρει την παραγωγή ενδοκυττάρου κυκλικού AMP**

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

5. ΒΙΒΛΟΓΡΑΦΙΑ

# ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο τύπος 1 υποδοχέα (CRF<sub>1</sub>R) του εκλυτικού παράγοντα της κορτικοτροπίνης (CRF) συγκαταλέγεται στη οικογένεια Β των υποδοχέων, οι οποίοι συζεύγνυνται με τις G-πρωτεΐνες, (G-protein coupled receptors, GPCRs) και συγκεκριμένα με τις G<sub>s</sub> πρωτεΐνες οι οποίες διεγείρουν το ενζυμο της αδενυλικής κυκλάσης. Ο CRF<sub>1</sub>R, αποτελείται από 7 διαμεμβρανικές περιοχές (TMs), οι οποίες ενώνονται μεταξύ τους με τρεις εξωκυττάριους και τρεις ενδοκυττάριους βρόγχους. Αυτό αποτελεί χαρακτηριστικό δομικό γνώρισμα των GPCRs. Προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου όσο και άλλων ερευνητικών ομάδων έχουν δείξει το σημαντικό ρόλο του δεύτερου εξωκυττάριου βρόγχου του CRF<sub>1</sub>R στη λειτουργία του υποδοχέα. Προκαταρκτικές μοριακές προσομοιώσεις του CRF<sub>1</sub>R στο εργαστήριο μας έδειξαν ότι το ασπαραγινικό οξύ στη θέση 269 (Asp269) του δεύτερου εξωκυττάριου βρόγχου παίζει ρόλο στη λειτουργία του υποδοχέα, χωρίς όμως να έχει πειραματικά επαληθευτεί.

Έχοντας ως σκοπό τη μελέτη του λειτουργικού ρόλου του Asp269 του CRF<sub>1</sub>R, μεταλλάξαμε το αμινοξύ αυτό σε αλανίνη, δημιουργώντας έτσι τον μεταλλαγμένο υποδοχέα CRF<sub>1</sub>R - D269A και εξετάσαμε την επίδραση της μετάλλαξης αυτής στη λειτουργία του υποδοχέα. Συγκεκριμένα εξετάστηκε η επίδραση της D269A μετάλλαξης στην ισχύ της σοβαγίνης με την οποία διεγείρει τη παραγωγή ενδοκυττάριου κυκλικού AMP σε κύτταρα που εκφράζουν σταθερά τον CRF<sub>1</sub>R.

Τα αποτελέσματα έδειξαν πως η κατάργηση του αρνητικά φορτισμένου φορτίου στη θέση 269 του CRF<sub>1</sub>R μετά την D269A μετάλλαξη μείωσε την ισχύ της σοβαγίνης για τον CRF<sub>1</sub>R, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι το Asp269 του δεύτερου εξωκυττάριου βρόγχου του CRF<sub>1</sub>R παίζει ρόλο στην ενεργοποίηση του υποδοχέα.

# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1 Εκλυτικός παράγοντας της κορτικοτροπίνης

Βασική προϋπόθεση για τη ζωή είναι η διατήρηση της ομοιόστασης στον οργανισμό μας. Ομοιόσταση είναι η τάση του σώματος να διατηρεί την εσωτερική του ισορροπία και να εξασφαλίζει τη σταθερότητά του από εξωτερικά ή εσωτερικά ερεθίσματα (στρεσογόνα ερεθίσματα). Η διατήρηση της ομοιόστασης παρουσία στρεσογόνων ερεθισμάτων απαιτεί προσαρμοστικές αλλαγές από τον οργανισμό συμπεριλαμβανομένων διαφόρων μεταβολών της συμπεριφοράς και μεταβολών στη λειτουργία του ενδοκρινικού, του ανοσοποιητικού και του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ), καθώς επίσης και πολλών οργάνων της περιφέρειας. Χρόνια έκθεση του οργανισμού σε στρεσογόνα ερεθίσματα τροποποιεί την απάντηση του σε αυτά πιθανόν οδηγώντας σε διάφορες διαταραχές, συμπεριλαμβανομένων της κατάθλιψης και του χρόνιου άγχους. Κεντρικό ρόλο στη διατήρηση της ομοιόστασης παίζει ο εκλυτικός παράγοντας της κορτικοτροπίνης (CRF) ή αλλιώς η εκλυτική ορμόνη της κορτικοτροπίνης (CRH). Η απομόνωσή του CRF αρχικά πραγματοποιήθηκε από τον υποθάλαμο προβάτου (οCRF με μοριακό βάρος 4671 Da), οδηγώντας στη διαπίστωση ότι είναι ένα ένα πεπτίδιο 41 αμινοξέων του οποίου η κύρια λειτουργία του είναι η διέγερση της υπόφυσης για τη έκλυση της κορτικοτροπίνης (ACTH) τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* [1]. Εκτός από τον αρουραίο ο CRF απαντάται στον άνθρωπο και σε πολλά άλλα θηλαστικά [2].

Ο CRF συντίθεται κυρίως στους νευρώνες του παρακλιμακίου πυρήνα (PVN) που βρίσκονται στον υποθάλαμο. Οι νευρώνες αυτοί αποκρίνονται σε στρεσογόνα ερεθίσματα λαμβάνοντας σήματα μέσω διαφόρων περιοχών του εγκεφάλου [3].

Ο CRF επίσης εντοπίζεται στην αμυγδαλή, στα βασικά γάγγλια, στο νωτιαίο μυελό, στην παρεγκεφαλίδα, στη γέφυρα και στον ιππόκαμπο [2,4,5]. Εκτός του ΚΝΣ, ο CRF εντοπίζεται και σε άλλους ιστούς και όργανα της περιφέρειας, όπως είναι η καρδιά, ο πνεύμονας, ο μυελός του επινεφριδίου κ.α. Επίσης εντοπίζεται στο ενδομήτριο, και στον πλακούντα [6-9]. Τέλος, ο CRF έχει εντοπιστεί σε κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος αλλά και σε καρκινικά κύτταρα, όπως του μαστού, του πνεύμονα και του θύμου αδένος [10-13].

## 1.2 Συγγενή πεπτίδια του CRF

Μετά την απομόνωση και ταυτοποίηση του CRF, απομονώθηκαν από θηλαστικά, ψάρια, αλλά και αμφίβια πεπτίδια συγγενή του CRF με παρόμοιες ιδιότητες με αυτόν. Συγκεκριμένα απομονώθηκαν από τα ψάρια *Catostomus commersoni* και το βάτραχο *Phyllomedusa sauvagei* τα πεπτίδια ουροτενσίνη I (URO) (μήκους 41 αμινοξέων) και σοβαγίνη (SVG) (μήκους 40 αμινοξέων) αντίστοιχα [14-15]. Επίσης το 1995 ανακαλύφθηκε στα θηλαστικά ένα νέο CRF – συγγενές πεπτίδιο μήκους 40 αμινοξέων, με φυσιολογικές δράσεις παρόμοιες με εκείνες του CRF και αμινοξική αλληλουχία κατά 43% ταυτόσημη με εκείνη του CRF, 63% με εκείνη της URO και 35% με εκείνη της SVG. Το πεπτίδιο αυτό ονομάστηκε ουροκορτίνη (UcnI) [16] (Εικόνα 1.1).

Η UcnI εντοπίζεται σε διάφορα τμήματα του ΚΝΣ, όπως για παράδειγμα στους πυρήνες Edinger-Westphal και της πλαγίας ελαίας [20]. Ακόμη ανιχνεύεται στον υπόκαμπο, στα βασικά γάγγλια, στον παρακοιλιακό πυρήνα του υποθαλάμου και στον πλάγιο υποθάλαμο [17]. Η κατανομή του CRF και της UcnI στο ΚΝΣ εμφανίζει μικρή ανατομική αλληλεπικάλυψη συμβαδίζοντας με τις διαφορετικές δράσεις τους στον ιστό αυτό. Όπως ο CRF έτσι και η ουροκορτίνη εντοπίζεται επίσης στη περιφέρεια, όπως στην καρδιά, στο έντερο, στον σπλήνα, στον πλακούντα στον προστάτη, στο δέρμα, στο θύμο αδένα, αλλά επίσης και σε καρκινώματα και νεοπλασίες του προστάτη και του ενδομητρίου [18-19].

Πρόσφατα ανιχνεύθηκαν δύο CRF-συγγενή πεπτίδια εκείνα της ουροκορτίνης-II (UcnII) και της ουροκορτίνης-III (UcnIII). Οι ουροκορτίνες αυτές εντοπίζονται σε διάφορες περιοχές του ΚΝΣ αλλά και στην περιφέρεια. Συγκεκριμένα, η UcnII εντοπίζεται στην καρδιά, στους πνεύμονες, στο στομάχι, στον πλακούντα, σε κύτταρα του αίματος και στο δέρμα, ενώ η UcnIII βρίσκεται στην καρδιά, το δέρμα, τον θυροειδή αδένα, στις ωοθήκες, στα επινεφρίδια και στο πάγκρεας [20-22] (Εικόνα 1.2).

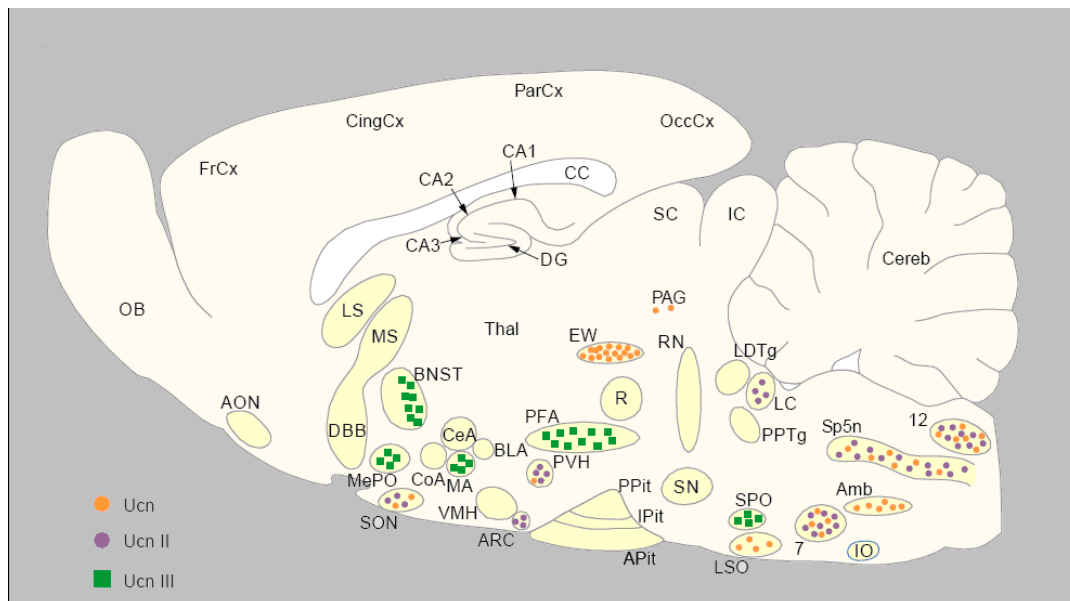
Επιπρόσθετα των φυσιολογικών πεπτιδίων υπάρχουν διάφορα συνθετικά ανάλογα του CRF όπως κορταγίνη, καθώς και τα πεπτίδια α-ελικοειδής CRF(9-41), αστρεσίνη [astressin: cyclo(30 – 33)], [DPhe<sup>12</sup>, Nle<sup>21</sup>, Glu<sup>30</sup>, Lys<sup>33</sup>, Nle<sup>38</sup>] hCRF(12 – 41), το ανάλογο της αστρεσίνης, αστρεσίνη (2)B και διάφορα ανάλογα της σοβαγίνης, όπως η αντισοβαγίνη-30. Παράλληλα συντέθηκαν και μη πεπτιδικά μικρομοριακά ανάλογα όπως η ανταλαρμίνη και το NBI 27914 [23-28].

Πεπτιδίο	Αλληλουχία	Μήκος	Ομολογία (%)
hCRF	SEPPISLDLTFHLLREVLEMARAEQLAQQAHSNRKIMEII	41	100
oCRF	SQEPPISLDLTFHLLREVLEMTKADQLABQAHSNRKLLDIA	41	83
URO	NDDPPISIDLTFHLLRNMIEMARIENEREQAGLNKYLDEV	41	54
hUCN	DNPSLSIDLTFHLLRTLLELARTQSQREAEQNRIIFDSV	40	43
SVG	ZGPPISIDLSELELRKMIIEIEKQEKEKQQAANNRLLDTI	40	48
mUCNII	VILSLDVPIGLLRILLEQARYKAARNQAATNAQILAHV	38	34
mUCNIII	FTLSLDVPTNIMNILFNIDKAKNLRKAAANAQLMAQI	38	26

h/rCRF : CRF ανθρώπου/αρουραίου	oCRF: πρόβατου CRF
SVG: Σοβαγίνη βατράχου	URO : Ουτοτενσίνη-1
hUCN: Ουροκορτίνη ανθρώπου	mUCN II: Ουροκορτίνη II ποντικού
mUCN III: Ουροκορτίνη III ποντικού	

*Εικόνα 1.1* Γραφική απεικόνιση της αλληλουχίας των αμινοξέων του CRF και των συγγενών πεπτιδίων [19].



*Εικόνα 1.2* Απεικόνιση της κατανομής των ουροκορτινών στον εγκέφαλο αρουραίου. Στο κίτρινο χρώμα αντιστοιχεί η UcnI, στο μωβ η UcnII και στο πράσινο η UcnIII [20].

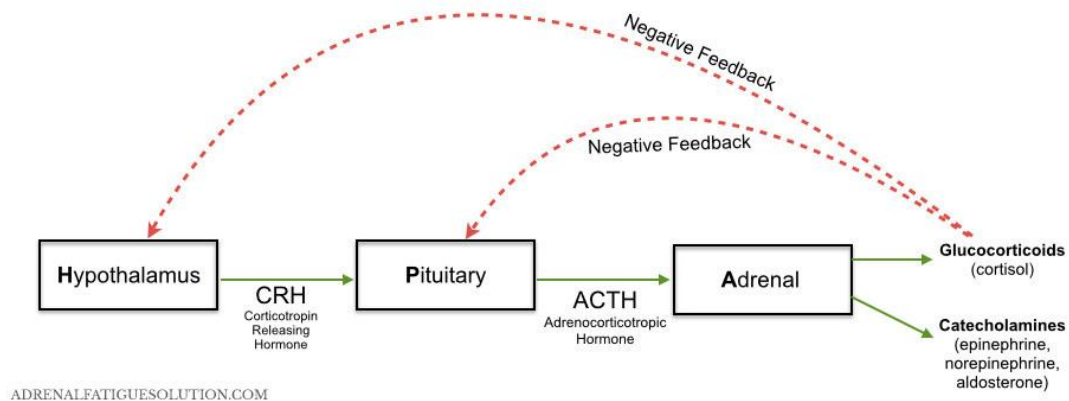


### 1.3 Δράσεις του CRF και των συγγενών πεπτιδίων

- Ρύθμιση λειτουργίας του HPA άξονα

Οι δράσεις του CRF στο ΚΝΣ και σε άλλα συστήματα στα οποία εντοπίζεται σχετίζονται με τη ρύθμιση της λειτουργίας της δραστηριότητας των συστημάτων [2,16].

Όσον αφορά τον υποθαλαμικό CRF αυτός ρυθμίζει τη λειτουργία του υποθαλαμο-υποφυσιο-επινεφριδιακού άξονα (HPA άξονα) ως εξής. Παραγόμενος στους παρακλιμακικούς πυρήνες του υποθαλάμου μεταφέρεται μέσω των αξόνων τους στη μέση προεξοχή, όπου εκλύεται, και στην πυλαία κυκλοφορία, μέσω της οποίας μεταφέρεται στην αδενοϋπόφυση. Στη συνέχεια αλληλεπιδρώντας με ειδικές θέσεις δέσμευσης του στα κορτικοτρόφα κύτταρα της υπόφυσης, ο CRF επάγει τη σύνθεση της προ-οπιομελανοκορτίνης (POMC). Η POMC είναι ένα μεγάλο μόριο το οποίο διασπάται σε επιμέρους μικρότερα ένα από τα οποία και η ACTH [29]. Η ACTH που απελευθερώνεται από την υπόφυση μεταφέρεται μέσω της κυκλοφορίας του αίματος στο φλοιό των επινεφριδίων όπου διεγείρεται η έκλυση γλυκοκορτικοειδών (συγκεκριμένα της κορτιζόλης), μορίων που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στις φλεγμονές και άλλες σημαντικές λειτουργίες του οργανισμού [30-31] (Εικόνα 1.3).



*Εικόνα 1.3* Γραφική απεικόνιση του HPA άξονα. Ο CRF (ή CRH) απελευθερώνεται από τον υποθάλαμο εισέρχεται στην πυλαία κυκλοφορία και καταλήγει στην υπόφυση όπου διεγείρει την έκκριση της ACTH. Η ACTH στη συνέχεια διεγείρει την έκκριση γλυκοκορτικοειδών (CORT) από το φλοιό των επινεφριδίων.

- Δράσεις στο ανοσοποιητικό σύστημα

Ο CRF αλλά και οι ουροκορτίνες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος [32]. Ο CRF ρυθμίζει τις ανοσολογικές και φλεγμονώδεις αποκρίσεις μέσω δύο δράσεων:

- I. Διεγείρεται ο HPA άξονας από τον CRF του υποθαλάμου με αποτέλεσμα την έκκριση γλυκοκορτικοειδών (κορτιζόλης). Οι ενώσεις αυτές που απελευθερώνονται έχουν αντιφλεγμονώδη δράση [33].
- II. Ο CRF εντοπίζεται στις θέσεις της φλεγμονής ασκώντας τοπική προφλεγμονώδη δράση τόσο in vivo όσο και in vitro. [34-36].

- Δράσεις σε άλλα συστήματα

Ο CRF όπως και οι ουροκορτίνες (I,II και III) παίζουν σημαντικό ρόλο στη λειτουργία πολλών συστημάτων στην περιφέρεια όπως του καρδιαγγειακού, του γαστρεντερικού, και του αναπαραγωγικού συστήματος [37-43]. Συγκεκριμένα οι ουροκορτίνες προκαλούν αγγειοδιαστολή, πράγμα το οποίο είναι απαραίτητο για τη ρύθμιση και τη σωστή λειτουργία του καρδιαγγειακού συστήματος [44-45]. Επίσης η ουροκορτίνη I προκαλεί αύξηση του καρδιακού παλμού, της αορτικής ροής του αίματος αλλά και της συσταλτικότητας της καρδιάς [45-46].

Στο γαστρεντερικό σύστημα ο CRF και οι ουροκορτίνες συμβάλλουν στη λειτουργία του τροποιώντας την εντερική κένωση και την κινητικότητα του εντέρου [47-48].

Στο αναπαραγωγικό σύστημα ο CRF αποτελεί κύριο ρυθμιστή στην παραγωγή τεστοστερόνης από τα κύτταρα Leydig, και επίσης επηρεάζει τη συσταλτικότητα του ενδομητρίου [37,49].

- Λειτουργία στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ)

Ο CRF δρά ως νευροδιαβιβαστής / νευροτροποποιητής στο ΚΝΣ. Ο κύριος ρόλος του είναι να συντονίζει τις αποκρίσεις του οργανισμού στο στρες και εμπλέκεται στην παθοφυσιολογία διαφόρων νευροψυχιατρικών νόσων που σχετίζονται άμεσα με το στρες όπως το άγχος και η κατάθλιψη. Αυτό αποδεικνύεται από τα παρακάτω. Πρώτον διαγονιδιακά ποντίκια στα οποία έχει απαλειφθεί το γονίδιο του CRF<sub>1</sub>R εμφανίζουν μειωμένη συμπεριφορά άγχους [50,51]. Δεύτερον, διαγονιδιακά ποντίκια τα οποία υπερεκφράζουν τον CRF εμφανίζουν αυξημένη συμπεριφορά άγχους [52]. Τρίτον κεντρική χορήγηση CRF<sub>1</sub>R antisense ολιγονουκλεοτιδίων περιόρισαν προκαλούμενες από CRF συμπεριφορές άγχους και είχε αγχολυτικά αποτελέσματα κάτω από ορισμένες πειραματικές συνθήκες [53-56]. Τέταρτον, CRF<sub>1</sub>R-εκλεκτικοί ανταγωνιστές (μη πεπτιδικοί) ανέστειλλαν τις αγχογενείς δράσεις του CRF σε πειραματόζωα [57-59]. Επιπρόσθετα η απορύθμιση του HPA άξονα, αλλά και τροποποιημένα επίπεδα CRF σε διάφορες περιοχές του ΚΝΣ, σχετίζονται με τη παθοφυσιολογία του άγχους και της κατάθλιψης [2,60]. Επιπλέον, βρέθηκε ότι τα επίπεδα του CRF είναι υψηλά στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ENY) ασθενών με κατάθλιψη και αποκαθίστανται μετά από την αντικαταθλιπτική θεραπεία [61].

Τα δεδομένα αυτά οδήγησαν στην αναγνώριση του CRF συστήματος ως θεραπευτικού στόχου για την θεραπευτική αντιμετώπιση της κατάθλιψης και ενθάρρυναν τη διεξαγωγή κλινικών μελετών με CRF ανταγωνιστές [60].

#### **1.4 Μελέτες δομής και λειτουργίας του CRF και των συγγενών του πεπτιδίων**

Ο CRF και τα συγγενή του πεπτίδια, είναι πεπτίδια 40 – 41 αμινοξέων που αποτελούνται από ένα καρβοξυτελικό άκρο, ένα αμινοτελικό άκρο και μία ενδιάμεση περιοχή. Σε υδρόφιλο περιβάλλον ο CRF έχει ακαθόριστη δομή. Όταν όμως βρεθεί σε υδρόφοβο περιβάλλον σχηματίζει δομή α-έλικας. Συγκεκριμένα σε διάλυμα τριφθοροαιθανόλης τα αμινοξέα τα οποία τείνουν να αποκτήσουν δομή α-έλικας είναι τα αμινοξέα 8-32. Όπως ο CRF έτσι και τα συγγενή του πεπτίδια ουροτενσίνη και σοβαγίνη αποκτούν την ίδια δομή σε υδρόφοβο περιβάλλον. Συγκεκριμένα τα αμινοξέα που σχηματίζουν τη δομή α-έλικας στην ουροτενσίνη είναι κυρίως εκείνα της ενδιάμεσου περιοχής [62-63] (Εικόνα 1.4). Τα παραπάνω οδήγησαν στην υπόθεση ότι η αλληλεπίδραση του CRF και των συγγενών του πεπτιδίων με τις θέσεις δέσμευσης τους που βρίσκονται στο λιπιδικό περιβάλλον της πλασματικής μεμβράνης του κυττάρου μετατρέπει τη δομή τους σε άλφα ελικοειδή. Η υπόθεση αυτή ενισχύθηκε από την παρατήρηση ότι αντικαταστάσεις αμινοξέων του CRF με άλλα που σταθεροποιούν την άλφα ελικοειδή δομή αύξησαν τη βιολογική δραστηριότητα του πεπτιδίου [64].

Μελέτες δομής και λειτουργίας έδειξαν ότι επίσης τα καρβοξυτελικά και αμινοτελικά αμινοξέα των παραπάνω πεπτιδίων παίζουν σημαντικό ρόλο στη βιολογική δραστηριότητα του πεπτιδίου. Συγκεκριμένα η απαλοιφή των δύο τελευταίων καρβοξυλικών αμινοξέων κατήργησαν τη βιολογική δράση του CRF. Παρόμοια απαλοιφές αμινοξέων από το αμινοτελικό άκρο έχουν ως αποτέλεσμα την κατάργηση της βιολογικής δραστηριότητάς του CRF [64-65].

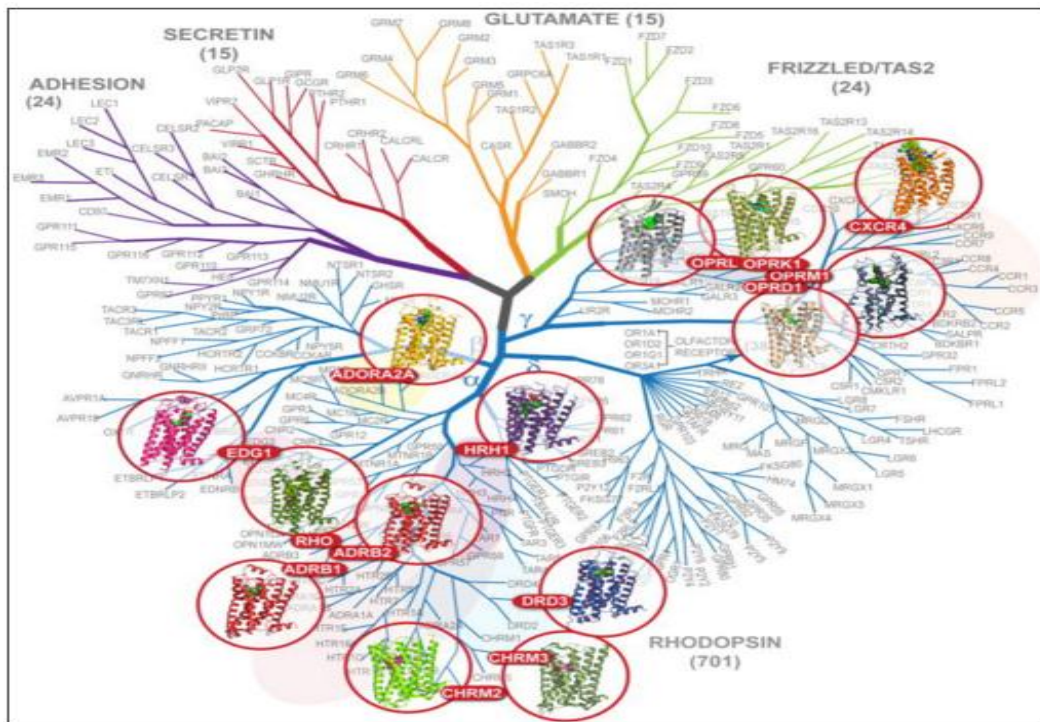
Επίσης διαπιστώθηκε πως η άλφα – ελικοειδής δομή της ενδιάμεσης περιοχής των πεπτιδίων προσανατολίζει τα καρβοξυτελικά και αμινοτελικά άκρα τους με τέτοιο τρόπο που είναι απαραίτητος για την εμφάνιση των βιολογικών δράσεων τους. Συγκεκριμένα, εισαγωγή στην ενδιάμεση περιοχή της ουροκορτίνης θετικά και αρνητικά φορτισμένων αμινοξέων με τέτοιο τρόπο ώστε, σχηματίζοντας ηλεκτροστατικούς δεσμούς μεταξύ τους, να δημιουργούν άλφα – έλικες, είχε σαν αποτέλεσμα τη διατήρηση των λειτουργικών ιδιοτήτων του πεπτιδίου [63].



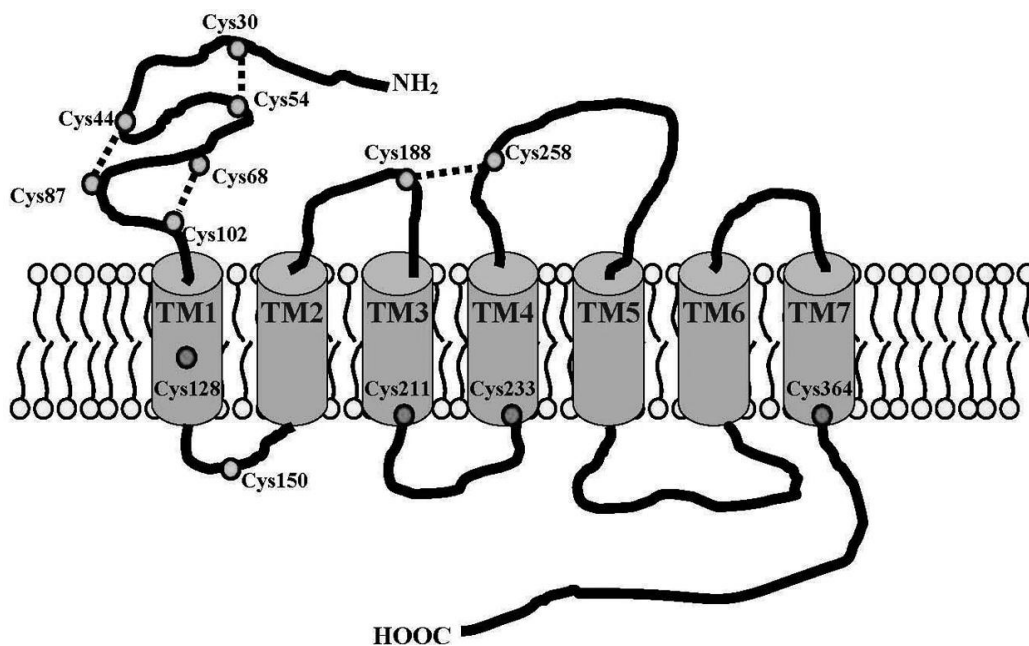
Εικόνα 1.4 Διαγράμματα α ελκοειδούς δομής των των CRF, σοβαγίνης (SAUV) και ουροτενσίνης I (U<sub>1</sub>). [62].

## 1.5 Υποδοχείς του εκλυτικού παράγοντα της κορτικοτροπίνης (CRF)

Οι ποικίλλες δράσεις του CRF αλλά και των συγγενών του πεπτιδίων καθορίζονται μέσω της αλληλεπίδρασής τους με ειδικούς υποδοχείς τους. Υπάρχουν δύο κύριοι τύποι υποδοχέων του CRF, ο τύπος 1 (CRF<sub>1</sub>R) και ο τύπος 2 (CRF<sub>2</sub>R), οι οποίοι εμφανίζουν 70% ομολογία στην αμινοξική αλληλουχία τους [66-67]. Ο CRF<sub>1</sub>R κωδικοποιείται από γονίδια που φέρονται στο χρωμόσωμα 17 του ανθρώπινου γονιδιώματος, ενώ ο CRF<sub>2</sub>R κωδικοποιείται από γονίδια του 7<sup>ου</sup> χρωμοσώματος στο ανθρώπινο γονιδίωμα. Επίσης πρόσφατα ανακαλύφθηκε κι ένας τρίτος τύπος υποδοχέα του εκλυτικού παράγοντα της κορτικοτροπίνης (CRF<sub>3</sub>R), ο οποίος έχει εντοπιστεί στην ουρόφυση του γατόψαρου [68-69]. Οι υποδοχείς της εκλυτικής ορμόνης της κορτικοτροπίνης (CRF) ανήκουν στην υποοικογένεια B της υπεροικογένειας των υποδοχέων που συζεύγνυνται με G-πρωτεΐνες (G-protein-coupled-receptors, GPCRs)[70] (Εικόνα 1.5) Όπως όλοι οι GPCRs, έτσι και οι υποδοχείς του CRF αποτελούνται από 7 διαμεμβρανικές περιοχές οι οποίες συνδέονται μεταξύ τους μέσω τριών ενδοκυττάρων και τριών εξωκυττάρων βρόγχων. Επίσης έχουν ένα καρβοξυτελικό άκρο που βρίσκεται ενδοκυττάρια και ένα μεγάλο αμινοτελικό άκρο, που βρίσκεται εξωκυττάρια. Πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι στον CRF<sub>1</sub>R υποδοχέα οι δύο κυστεΐνες στις θέσεις 188 (1<sup>ος</sup> εξωκυττάριος βρόγχος) και 258 (2<sup>ος</sup> εξωκυττάριος βρόγχος) αλληλεπιδρούν με έναν δισουλφιδικό δεσμό, ο οποίος παίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της δομής και της λειτουργικότητας του υποδοχέα, υποδηλώνοντας έτσι τη λειτουργική σημασία του 2<sup>ου</sup> εξωκυττάριου βρόγχου του υποδοχέα [71] (Εικόνα 1.6).



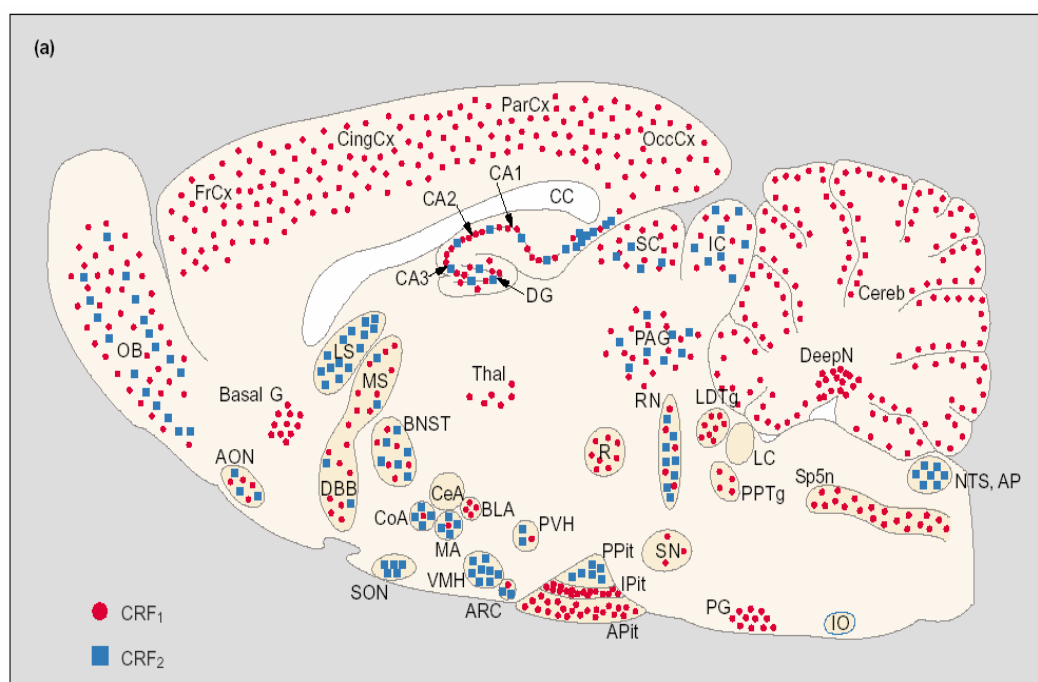
*Εικόνα 1.5* Δενδρόγραμμα της ανθρώπινης υπερικογένειας των GPCRs. Σύμφωνα με το σχήμα οι GPCRs περιλαμβάνουν πέντε υποοικένειες εκ των οποίων μια είναι η υποοικογένεια B (*Secreting and Adhesion families*) στην οποία ανήκουν οι υποδοχείς του CRF, [72].



Εικόνα 1.6 Απεικόνιση  $CRF_1R$  υποδοχέα. Οι κύλινδροι αναπαριστούν τις διαμεμβρανικές περιοχές οι οποίες ενώνονται μεταξύ τους με τους τρεις εξωκυττάριους και τους τρεις ενδοκυττάριους βρόγχους. Ο σημαντικός για τη λειτουργία του υποδοχέα δισουλφιδικός δεσμός μεταξύ των κυστεινών στις θέσεις 188 και 258 αναπαρίσταται με μια διακεκομμένη γραμμή [71].

### 1.5.1. Εντοπισμός $CRF$ υποδοχέων και βιολογικές δράσεις τους

Η έκφραση των υποδοχέων του  $CRF$  τόσο στο ΚΝΣ όσο και στα περιφερειακά συστήματα, είναι τέτοια ώστε να δικαιολογεί τις ποικίλλες δράσεις των πεπτιδίων της οικογένειας του  $CRF$ . Ο  $CRF_1R$  εκφράζεται στον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης μέσω του οποίου ο  $CRF$  διεγείρει την έκκριση της  $ACTH$ . Ο  $CRF_1R$  επίσης βρίσκεται σε αρκετές περιοχές του ΚΝΣ όπως στο φλοιό, την παρεγκεφαλίδα, την αμυγδαλή, τον ιππόκαμπο και τους οσφρητικούς βολβούς [2,17]. Στην περιφέρεια, ο  $CRF_1R$  εντοπίζεται στις ωθήκες, τους όρχεις, το ενδομήτριο, το μωμήτριο, τον πλακούντα, τα επινεφρίδια, το λιπώδη ιστό, το δέρμα, τον σπλήνα, τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος και το έντερο [48]. Παρομοίως και ο  $CRF_2R$  εκφράζεται σε διάφορες περιοχές του ΚΝΣ (επικλινής πυρήνας διαφράγματος, υποθάλαμος, ιππόκαμπος, αμυγδαλή, βασικός πυρήνας της τελικής ταινίας, οσφρητικοί βολβοί και πυρήνες της ραφής), αλλά και σε ιστούς της περιφέρειας (καρδιά, πνεύμονες, ωθήκες, σκελετικοί μύες και γαστρεντερικό σύστημα) [16-17,48,73-75] (Εικόνα 1.7).



Εικόνα 1.7 Σχηματική κατανομή των  $CRF_1R$  και  $CRF_2R$  σε εγκέφαλο αρουραίου [17].

### 1.5.2. Φαρμακολογικές ιδιότητες των υποδοχέων του CRF

Φαρμακολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι τα συγγενή-CRF πεπτίδια SVG και UcnI δεσμεύονται και στους δύο τύπους υποδοχέων, CRF<sub>1</sub>R και CRF<sub>2</sub>R, με παραπλήσιες συγγένειες. Αντίθετα οι UcnII και UcnIII είναι εκλεκτικές για τον CRF<sub>2</sub>R αφού δεσμεύονται στον υποδοχέα αυτόν με συγγένεια πάνω από 100 φορές μεγαλύτερη από εκείνη με την οποία δεσμεύονται στον CRF<sub>1</sub>R [76-78].

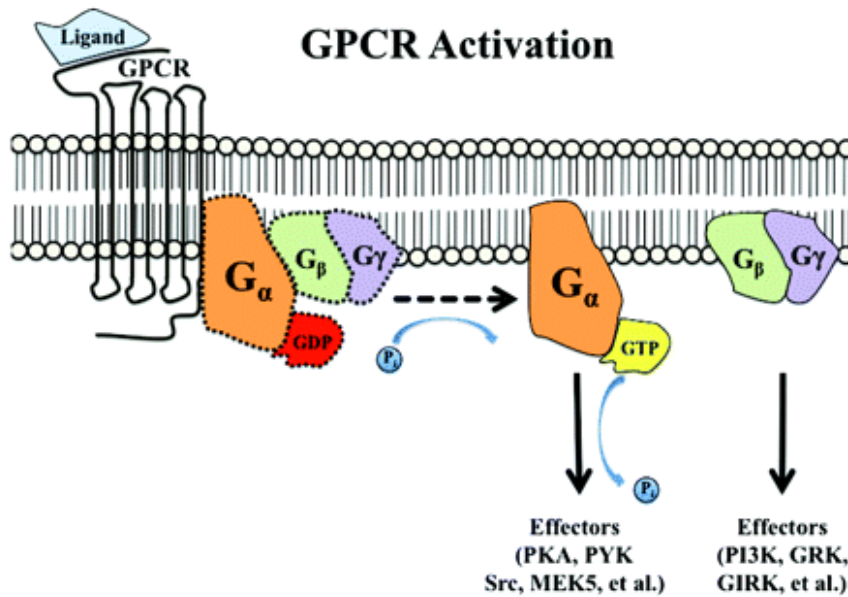
Σε αντίθεση με τις UcnII και UcnIII ο ανθρώπινος CRF που είναι ίδιος με τον CRF του αρουραίου και γιαυτό ονομάζεται CRF ανθρώπου/αρουραίου (h/rCRF), όπως και ο CRF του προβάτου (oCRF) εμφανίζουν εκλεκτικότητα δέσμευσης για τον CRF<sub>1</sub>R. Ο oCRF εμφανίζει τη μεγαλύτερη CRF<sub>1</sub>R εκλεκτικότητα εφόσον δεσμεύεται σε αυτόν τον υποδοχέα με 200 φορές μεγαλύτερη συγγένεια από αυτή που συνδέεται με τον CRF<sub>2</sub>R. Η διαφορά συγγένειας δέσμευσης του h/rCRF και για τους δύο τύπους υποδοχέων είναι μικρότερη και περίπου 14 φορές [23].

Εκτός από τα φυσιολογικά πεπτίδια έχουν συντεθεί πεπτιδικά ανάλογα του CRF που εμφανίζουν διαφορετικές εκλεκτικότητες για τους 2 υποδοχείς του CRF. Για παράδειγμα ένα τέτοιο πεπτίδιο αποτελεί η κορταγίνη, η οποία δεσμεύεται με πολύ μεγαλύτερη συγγένεια στον CRF<sub>1</sub>R απ' ό τι στον CRF<sub>2</sub>R. Αντίθετα με την κορταγίνη, τα συνθετικά πεπτίδια α-ελικοειδές, CRF<sub>9-41</sub> και αστρεσσίνη (Astressin: cyclo (30-33) [DPhe12, Nle21, Glu30, Lys33, Nle38] hCRF δρουν συνδέονται μη εκλεκτικά και στους δύο τύπους υποδοχέων [23-24,26].

### 1.5.3 Υποδοχείς CRF και κυτταρική σηματοδότηση

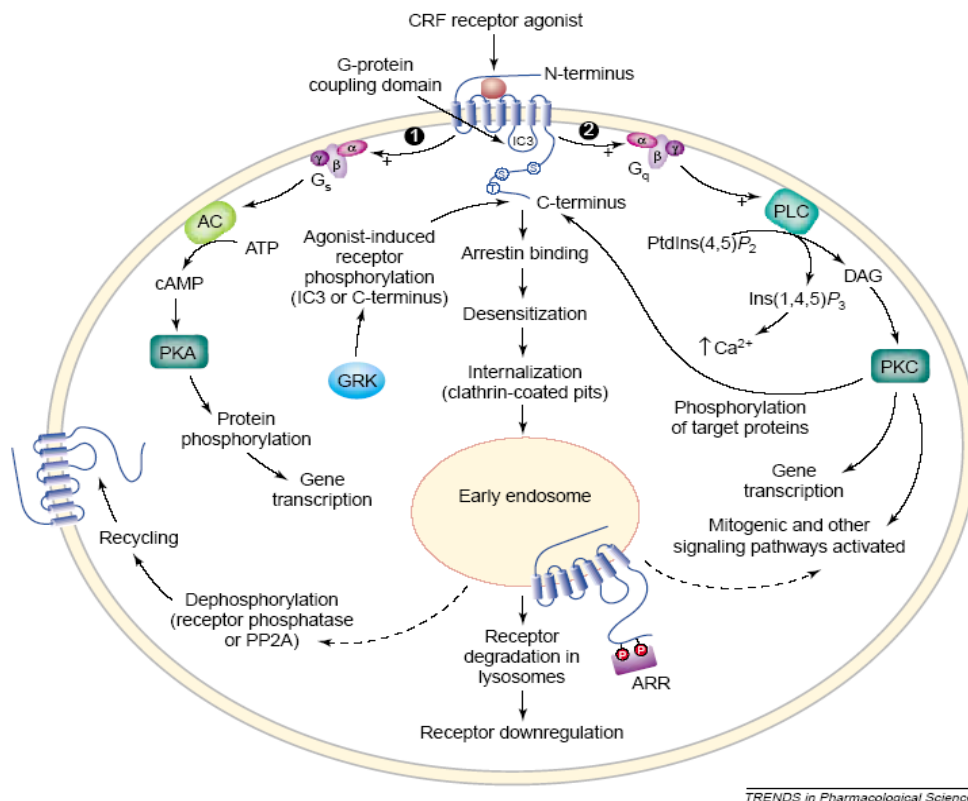
Η δέσμευση των πεπτιδίων της οικογένειας του CRF στους κατάλληλους υποδοχείς, έχει σαν αποτέλεσμα τη διέγερσή τους και την επακόλουθη ενεργοποίηση των Gs πρωτεϊνών, οι οποίες, αλληλεπιδρούν με τους υποδοχείς αυτούς. Στη συνέχεια οι ενεργοποιημένες Gs πρωτείνες διεγείρουν το ένζυμο της αδενυλικής κυκλάσης (cAMP), με αποτέλεσμα την παραγωγή 3', 5'-κυκλικής μονοφωσφορικής αδενοσίνης (PKA) (εικόνα 1.8). Πιο συγκεκριμένα, οι G-πρωτείνες αποτελούνται από τρεις υπομονάδες, τις α,β και γ. Η ενεργοποίηση των Gs πρωτεϊνών από τον υποδοχέα, έχει σαν αποτέλεσμα να απομακρυνθεί το δεσμευμένο GDP από την α υπομονάδα και να αντικατασταθεί από GTP. Έτσι το σύμπλοκο διαχωρίζεται σε βγ και α-GTP υπομονάδες. Οι υπομονάδες αυτές των Gs πρωτεϊνών απομακρυνόμενες από τον υποδοχέα ενεργοποιούν διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια συμπεριλαμβανομένου εκείνου του ενζύμου της αδενυλοκυκλάσης η οποία διεγείρεται από την α-GTP υπομονάδα. Η ενεργοποιημένη αδενυλοκυκλάση μετατρέπει το ATP σε κυκλικό AMP το οποίο στη συνέχεια προκαλεί διαδοχικές φωσφορυλιώσεις που οδηγούν σε συγκεκριμένο βιολογικό αποτέλεσμα. Αντίστοιχες πορείες ακολουθούν και οι υπόλοιποι τύποι G<sub>α</sub> υπομονάδων [80] (Εικόνα 1.9).

Σε διαφορετικούς ιστούς, επιπρόσθετα της  $G_s$ , ο  $CRF_1R$  συνδέεται με άλλες διαφορετικές G-πρωτεΐνες έχοντας ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση διαφορετικών οδών ενδοκυττάριας σηματοδότησης [75]. Εκτός τις  $G_s$  πρωτεΐνες ο  $CRF_1R$  ενεργοποιεί κυρίως τη  $G_i$  που αναστέλλει την αδενυλική κυκλάση, και τη  $G_q$  που αυξάνει την  $IP_3$  και το ενδοκυτταρικό ασβέστιο[81] (εικόνα 1.9).



*Εικόνα 1.8* Σχηματική απεικόνιση της ενεργοποίησης των G πρωτεϊνων. Ένας προσδέτης (Ligand) δεσμεύεται στον υποδοχέα του (GPCR) και ενεργοποιεί αυτόν. Στη συνέχεια διεγείρεται η  $\alpha$  υπομονάδα της G πρωτεΐνης ( $G_\alpha$ ) μέσω αντικατάστασης του GDP από GTP. Οι  $\alpha$  και  $\beta\gamma$  ( $G_\beta$  και  $G_\gamma$ ) υπομονάδες διασπώνται, ενεργοποιώντας το αντίστοιχο μονοπάτι σηματοδότησης, που οδηγεί σε βιολογικό αποτέλεσμα [79].





TRENDS in Pharmacological Sciences

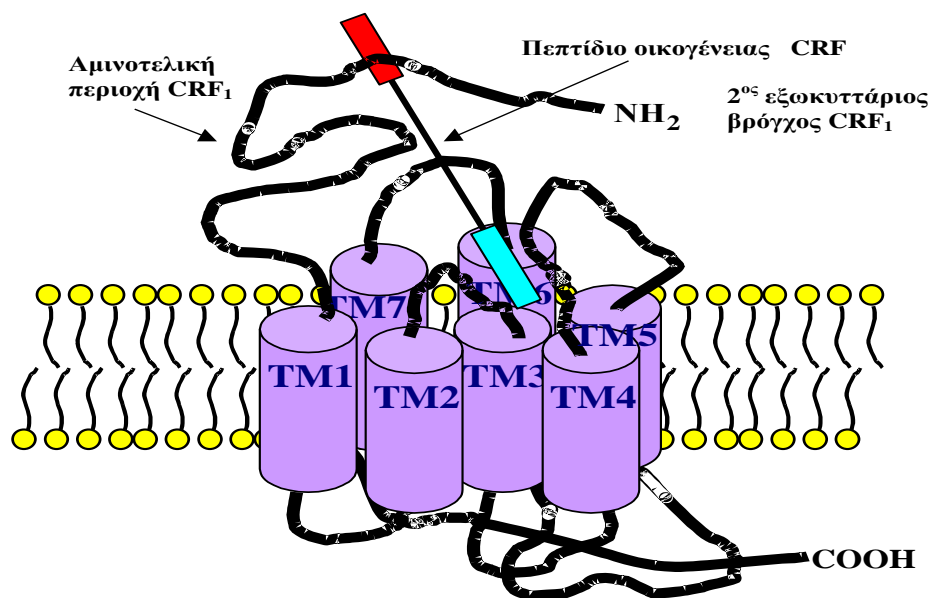
*Εικόνα 1.9 Σχηματική απεικόνιση της ενεργοποίησης του υποδοχέα CRF<sub>1</sub>R από τον CRF και τα συγγενή του πεπτίδια. Ακολουθεί η ενεργοποίηση των διαφορετικών G πρωτεϊνών, και έτσι διέγερση διαφορετικών σηματοδοτικών μονοπατιών [16].*

#### 1.5.4 Δομή και λειτουργία των υποδοχέων του CRF

Πρόσφατες μελέτες, χρησιμοποιώντας διαφορετικές τεχνικές, όπως κρυσταλλογραφία, NMR ή μεταλλαγμένη έχουν προσδιορίσει τον τρόπο αλληλεπίδρασης του CRF με τον CRF<sub>1</sub>R αλλά και τα συγγενή του πεπτίδια [82-84]. Συγκεκριμένα η αμινοτελική εξωκυττάρια περιοχή του CRF<sub>1</sub>R αλληλεπιδρά με το καρβοξυτελικό άκρο των πεπτιδίων και προσανατολίζει αυτά έτσι ώστε το αμινοτελικό άκρο των πεπτιδίων να αλληλεπιδρά με τη περιοχή J του υποδοχέα, η οποία αποτελείται από τους εξωκυττάριους βρόγχους και τα εξωκυττάρια άκρα των διαμεμβρανικών περιοχών του υποδοχέα [85] (Εικόνα 1.10).

Καθοριστικό ρόλο για τη δέσμευση των πεπτιδίων στον υποδοχέα CRF<sub>1</sub>R παίζει το τμήμα του υποδοχέα μεταξύ του 68<sup>ου</sup> και του 109<sup>ου</sup> αμινοξέος της εξωκυττάριας αμινοτελικής περιοχής. Επίσης έχει ανακαλυφθεί πως η αργινίνη στη θέση 189 του πρώτου εξωκυττάριου βρόγχου μαζί με τα αμινοξέα στις θέσεις 266, 267 και 268 του δεύτερου εξωκυττάριου βρόγχου διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη λειτουργία του CRF<sub>1</sub>R [86]. Μελέτες έχουν

δείξει επίσης πως κατά τη δέσμευση της σοβαγίνης στον CRF<sub>1</sub>R η λυσίνη στη θέση 257 του δεύτερου εξωκυττάριου βρόγχου και η ιστιδίνη της πρώτης διαμεμβρανικής περιοχής του υποδοχέα βρίσκονται πολύ κοντά στο πεπτίδιο [87-90]. Παρόμοια με τη σοβαγίνη, όταν η ουροκορτίνη είναι δεσμευμένη στον CRF<sub>1</sub>R, τότε ένα τμήμα της βρίσκεται πολύ κοντά στο δεύτερο εξωκυττάριο βρόγχο, ενώ ένα άλλο βρίσκεται κοντά στο πρώτο εξωκυττάριο βρόγχο του υποδοχέα [91]. Η σημασία του δεύτερου εξωκυττάριου βρόγχου στη λειτουργία του CRF<sub>1</sub>R φαίνεται και από το γεγονός ότι τα αμινοξέα στις θέσεις 259 και 260 της περιοχής αυτής του υποδοχέα παίζουν σημαντικό ρόλο στη δέσμευση του CRF και των συγγενών του πεπτιδίων [92]. Συγκεκριμένα τα αμινοτελικά αμινοξέα 9-11 του CRF και της σοβαγίνης, δεσμεύονται με τη Trp259 και Phe260 του CRF<sub>1</sub>R.



*Εικόνα 1.10* Γραφική απεικόνιση της αλληλεπίδρασης των πεπτιδίων της οικογένειας του CRF με τον CRF<sub>1</sub>R. Η αμινοτελική εξωκυττάρια περιοχή του CRF<sub>1</sub>R αλληλεπιδρά με το καρβοξυτελικό άκρο των πεπτιδίων της οικογένειας του CRF (κόκκινο κουτί), ενώ το αμινοτελικό άκρο των πεπτιδίων (μπλε κουτί) αλληλεπιδρά με τους εξωκυττάριους βρόγχους και τα εξωκυττάρια άκρα των διαμεμβρανικών περιοχών του υποδοχέα. Η λυσίνη 16 του αμινοτελικού άκρου του CRF αναλόγου, σοβαγίνη, βρίσκεται σε μικρή απόσταση από τη λυσίνη 257 του δεύτερου εξωκυττάριου βρόγχου του CRF<sub>1</sub>R [89].

## 1.6 Σκοπός

Ο σκοπός της εργασίας αυτής είναι ο προσδιορισμός του ρόλου του ασπαραγινικού οξέος της θέσης 269 (D269) του δευτέρου εξωκυττάριου βρόγχου του τύπου I υποδοχέα του εκλυτικού παράγοντα της κορτικοτροπίνης (CRF<sub>1</sub>R) στη λειτουργία του υποδοχέα. Για την εκπλήρωση του σκοπού αυτού, η D269 μεταλλάχθηκε σε αλανίνη και προσδιορίστηκε η επίδραση της μετάλλαξης στην ικανότητα του υποδοχέα να διεγείρει τη παραγωγή του ενδοκυττάριου κυκλικού AMP.

## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 Μετάλλαξη του DNA του ανθρώπινου CRF<sub>1</sub>R - Γενική πειραματική διαδικασία

Στην ερευνητική εργασία αυτή έχει χρησιμοποιηθεί το DNA του ανθρώπινου CRF<sub>1</sub>R (wildtype - άγριος τύπος) που βρίσκεται στο πλασμίδιο pCIN4 (CRF<sub>1</sub>R/ pCIN4) (ή πλασμιδιακό DNA wildtype CRF<sub>1</sub>R /pCIN4) και το οποίο, δημιουργήθηκε στο εργαστήριο του Γ. Λιαπάκη μέσω μεταφοράς του DNA του CRF<sub>1</sub>R που βρίσκεται στο πλασμίδιο pCDNA3 (ευγενική προσφορά του Δρ. Δημητρίου Γραμματόπουλου, Warwick University, UK) στο πλασμίδιο pCIN4 (ευγενική προσφορά του Δρ. Jonathan Javitch, Columbia University, USA). Το πλασμίδιο αυτό έχει μέγεθος 6.552 bp και περιέχει γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό γενετισίνη, γεγονός το οποίο επιτρέπει την επιλογή κυττάρων που εκφράζουν σταθερά την επιθυμητή πρωτεΐνη. Ο άγριος τύπος του DNA του ανθρώπινου CRF<sub>1</sub>R έχει υποστεί μετάλλαξη στο αμινοξύ της θέσης 269 που βρίσκεται στο δεύτερο εξωκυττάριο βρόγχο του υποδοχέα και από Ασπαραγινικό οξύ (D) έχει προκύψει Αλανίνη (A) (η μετάλλαξη αυτή έχει πραγματοποιηθεί στο εργαστήριο του Γ. Λιαπάκη μέσω τεχνικών μοριακής βιολογίας από το DNA του ανθρώπινου CRF<sub>1</sub>R- wildtype).

Επομένως αρχικά μέσω της μεθόδου της μεταλλαξιγένεσης κατευθυνόμενης θέσης με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), (PCR site-directed mutagenesis) και με βάση το DNA του hCRF<sub>1</sub>R, μεταλλάξαμε το αμινοξύ ασπαρτικό (D) στη θέση 269 του δευτέρου εξωκυττάριου βρόγχου του υποδοχέα στο αμινοξύ Αλανίνη (A), έχοντας ως αποτέλεσμα τη

μετάλλαξη D269A<sup>1</sup>. Συμπερασματικά με τη μέθοδο αυτή αντικαταστάθηκαν τα νουκλεοτίδια που κωδικοποιούν το ασπαραγινικό (D269), με νουκλεοτίδια που κωδικοποιούν την Αλανίνη (269A). Εν συνεχεία, χρησιμοποιήθηκαν τεχνικές μοριακής βιολογίας (ηλεκτροφόρηση του DNA σε πήκτωμα αγαρόζης, απομόνωση του από το πήκτωμα, ενζυμική πέψη και συρραφή του, μετασχηματισμός βακτηρίων *E. coli*, DH-10b, με τον προϊόν ενζυμικής συρραφής του DNA και απομόνωσή του από τα εν λόγω βακτήρια) έτσι ώστε να κλωνοποιηθεί το τμήμα αυτό του DNA και να δημιουργηθεί το πλασμιδιακό DNA CRF<sub>1</sub>R/pCIN4 που φέρει τη μετάλλαξη D269A. Κάθε ανασυνδυασμένο μόριο DNA αντιγράφεται στο κύτταρο-ξενιστή, με αποτέλεσμα την παραγωγή πολλών πανομοιότυπων αντιγράφων του που αποτελούν ένα κλώνο (μοριακή κλωνοποίηση). Καθώς τα βακτήρια *E.coli* αναπαράγονται, τα ανασυνδυασμένα μόρια DNA μεταβιβάζονται σε όλα τα παράγωγά τους δημιουργώντας πληθυσμούς κυττάρων που φέρουν τις κλωνοποιημένες αλληλουχίες.

### **2.1.1 Μεταλλαξιγένεση κατευθυνόμενης θέσης με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), (PCR – site – directed – mutagenesis)**

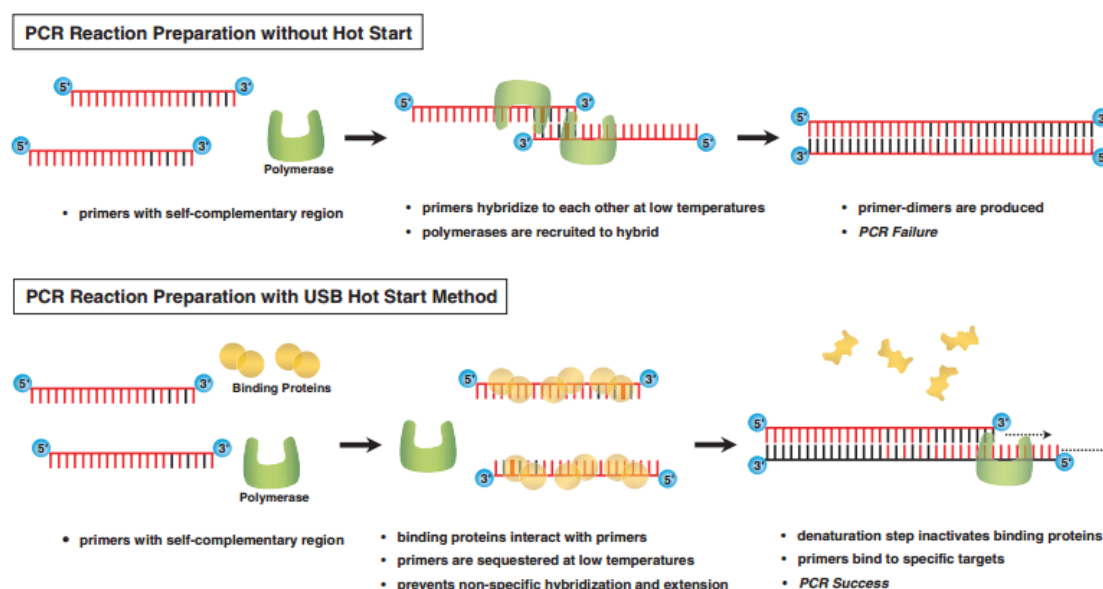
Η μεταλλαξιγένεση κατευθυνόμενης θέσης με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης είναι μία ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος της μοριακής βιολογίας για τη δημιουργία στοχευμένων αλλαγών στην αλληλουχία του DNA ενός γονιδίου. Επίσης χρησιμοποιείται για τη διερεύνηση της δομής, αλλά και της βιολογικής δράσης του DNA, RNA και πρωτεϊνικών μορίων, όπως επίσης αποτελεί αξιόπιστη μέθοδο για την εισαγωγή μετάλλαξης στην αλληλουχία DNA.

Συγκεκριμένα στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος PCR θερμικής εκκίνησης (Hot Start PCR). Η PCR θερμικής εκκίνησης αποτελεί μία τροποποιημένη μέθοδο που βελτιώνει σημαντικά την εξειδίκευση και την ευαισθησία της αντίδρασης PCR. Ειδικά αντισώματα είναι υπεύθυνα για την απενεργοποίηση της πολυμεράσης σε χαμηλή θερμοκρασία. Πρώτο βήμα είναι η θερμοκρασία των 95°C η οποία, είναι απαραίτητη για τη μετουσίωση των αντισωμάτων που συνδέονται με το ενεργό κέντρο του ενζύμου. Τα αντισώματα μειώνουν τη δραστηριότητα της πολυμεράσης κάτω από τους 72°C, η οποία είναι η βέλτιστη θερμοκρασία στην οποία το ένζυμο εκτείνει τους εκκινητές (primers). Όταν τα ειδικά αντισώματα αποκολλώνται από την πολυμεράση η διεύρυνση εξελίσσεται με μεγαλύτερη εξειδίκευση. Στη συμβατική PCR η πολυμεράση είναι ενεργή σε θερμοκρασία δωματίου, αλλά και σε χαμηλότερες θερμοκρασίες, μέχρι και σε πάγο. Σε ορισμένες

---

<sup>1</sup>Το αμινοξύ που αναγράφεται αριστερά από τον αριθμό της θέσης αφορά το αμινοξύ που υπάρχει στη θέση αυτή πριν πραγματοποιηθεί η μετάλλαξη ενώ το αμινοξύ, το οποίο αναγράφεται στη δεξιά πλευρά του αριθμού της θέσης, αναφέρεται στο προκύπτον αμινοξύ από τη διαδικασία της μεταλλαξιγένεσης.

περιπτώσεις, όταν όλα τα συστατικά της αντίδρασης τοποθετούνται μαζί, μπορεί να συμβεί μη ειδική σύνδεση του εκκινητή λόγω αυτών των χαμηλών θερμοκρασιών. Αυτός ο μη ειδικός υβριδισμός του εκκινητή, μπορεί να επεκταθεί μέσω της πολυμεράσης, δημιουργώντας μη ειδικά προϊόντα καθώς και μείωση των αποδόσεων των προϊόντων. Η PCR θερμικής εκκίνησης μειώνει σημαντικά τη μη ειδική σύνδεση του εκκινητή, το σχηματισμό μη ειδικών προϊόντων της PCR, καθώς αυξάνει τις αποδόσεις των προϊόντων (Εικόνα 2.1).



**Εικόνα 2.1 α) Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), χωρίς Hot Start.** Δημιουργία μη ειδικών προϊόντων που οδηγούν σε σφάλμα της PCR. **β) Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), Hot Start.** Εμποδίζεται η δημιουργία μη ειδικών προϊόντων DNA που οδηγεί σε επιτυχημένο PCR αποτέλεσμα.

Επομένως μέσω της τεχνικής αυτής πραγματοποιήθηκε η μετάλλαξη των νουκλεοτιδίων στην αλληλουχία του DNA του CRF<sub>1</sub>R που κωδικοποιούν το αμινοξύ Ασπαραγινικό οξύ 269 σε Αλανίνη 269 (D269A). Για την πραγματοποίηση της διαδικασίας αυτής χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης ( PCR ). Σαν εκμαγείο χρησιμοποιείται το πλασμιδιακό DNA CRF<sub>1</sub>R /pCIN4 και 4 ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμεύουν σαν εκκινητές εκ των οποίων οι δυο είναι συμπληρωματικοί μεταξύ τους και περιέχουν την D269A μετάλλαξη (εκκινητές μετάλλαξης). Το σημαντικότερο βήμα σε αυτή τη διαδικασία είναι ο σχεδιασμός των εκκινητών της μετάλλαξης έτσι ώστε ο εκκινητής και το εκμαγείο (πλασμιδιακό DNA CRF<sub>1</sub>/pCIN4) να υβριδοποιούνται σε ικανοποιητικό βαθμό. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται η έναρξη της αντίδρασης πολυμεράσης παρά την ύπαρξη των νουκλεοτιδίων της μετάλλαξης που δεν είναι συμπληρωματικά εκείνων του εκμαγείου. Για το σκοπό αυτό κατά το σχεδιασμό των εκκινητών που περιέχουν τη μετάλλαξη είναι απαραίτητο να ληφθούν υπόψη τα εξής δεδομένα:

- Τα νουκλεοτίδια που κωδικοποιούν τη μετάλλαξη πρέπει να βρίσκονται στο μέσο του εκκινητή
- Τα 3' άκρα του κάθε εκκινητή πρέπει να έχουν ή G ή C
- Το ποσοστό GC σε κάθε εκκινητή πρέπει να προσεγγίζει όσο το δυνατόν περισσότερο το 50% των νουκλεοτιδίων του εκκινητή.

Ακόμη λήφθησαν υπόψη κι άλλες παράμετροι όπως η καθορισμένη θερμοκρασία τήξης ( $T_m$ ), η απουσία hairpin loops, παλίνδρομων αλληλουχιών, ολιγονουκλεοτιδίων με την ίδια βάση τοποθετημένη πολλές φορές στη σειρά κ.α.

Οι 4 εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για να πραγματοποιηθεί η μετάλλαξη D269A στο DNA CRF<sub>1</sub>R/ρCIN4 ήταν οι εξής:

- Εκκινητές (primers):

Sense MV10 (900-920): 5'-GGC GTG TAC GGT GGG AGG-3'

Antisense APAN4 (2230-2250): 5'-GCA GAC AGC GAA TTA ATT CCA GC-3'

- Για τη μετάλλαξη D269A (συμπληρωματικοί):

Sense 269A: 5'-CTGGGGTGTATACCGCCTACATCTAC-3'

Antisense 269A: 5'-GTAGATGTAGCGGTATACACCCAG-3'

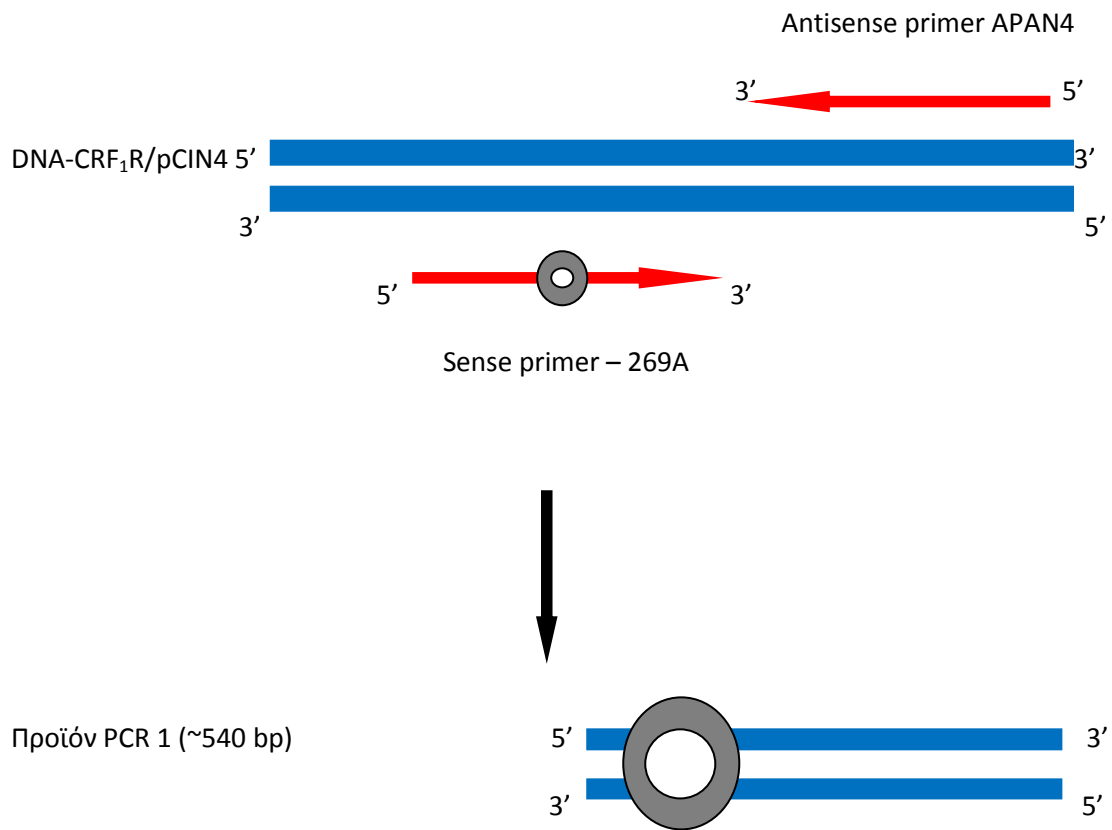
Η επιθυμητή μετάλλαξη πραγματοποιήθηκε σε δύο διαδοχικές φάσεις. Στη πρώτη φάση έγιναν για κάθε μετάλλαξη δύο αντιδράσεις PCR, η PCR 1 και η PCR 2, στις οποίες χρησιμοποιήθηκε ως εκμαγείο το πλασμιδιακό DNA CRF<sub>1</sub>R/ρCIN4. Για την επιμήκυνση της αλυσίδας του DNA χρησιμοποιήθηκε η πολυμεράση rfu και μείγμα των νουκλεοτιδίων (dNTPs), dTTP, dATP, dCTP, dGTP σε συγκέντρωση 2,5 mM το καθένα.

Στην αντίδραση PCR 1 χρησιμοποιήθηκαν ο εκκινητής sense – 269A και ο antisense εκκινητής APAN4. Το προϊόν της αντίδρασης PCR 1 αναμενόταν να είναι ένα τμήμα DNA του CRF<sub>1</sub>R, που περιείχε, στο ένα άκρο του, τα νουκλεοτίδια της επιθυμητής μετάλλαξης και το οποίο είχε μήκος περίπου 700 βάσεων (Εικόνα 2.2).

Στην αντίδραση PCR 2 χρησιμοποιήθηκαν ο εκκινητής sense MV10 και ο εκκινητής antisense – 269A που κωδικοποιούσε το αμινοξύ της μετάλλαξης και ήταν συμπληρωματικός του sense – 269A εκκινητή. Το προϊόν του δείγματος PCR 2 αναμενόταν να είναι ένα τμήμα του DNA του CRF<sub>1</sub>R που περιέχει, στο ένα άκρο του, τα νουκλεοτίδια της επιθυμητής μετάλλαξης και το οποίο έχει μήκος περίπου 800 βάσεων (Εικόνα 2.2).

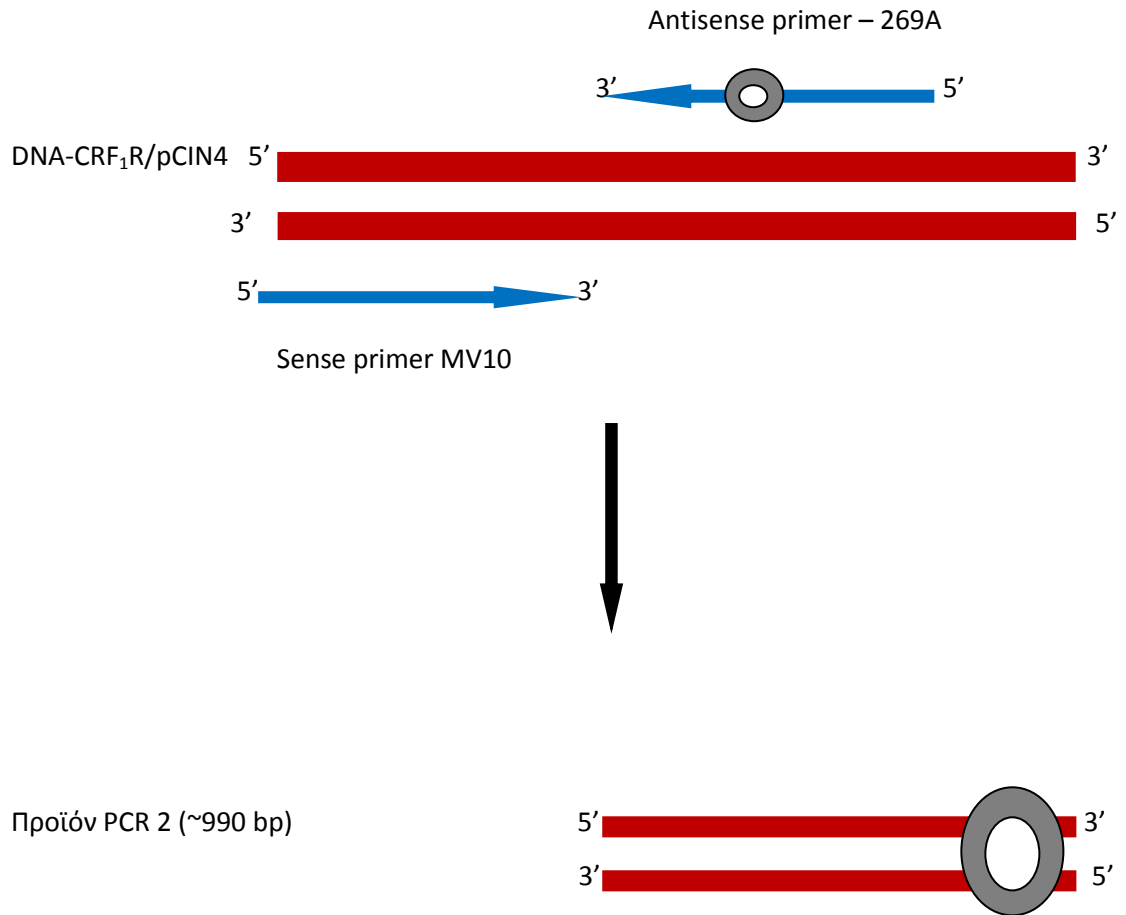
## PCR 1<sup>ης</sup> ΦΑΣΗΣ

### PCR 1



Εικόνα 2.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης PCR1 1<sup>ης</sup> φάσης.

## PCR 2



Εικόνα 2.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης PCR2 1<sup>ης</sup> φάσης.



---

**Διάλυμα A1 (PCR 1)**

<b>DNA template</b> hCRF <sub>1</sub> R/pCIN4	1 λ
<b>Primers</b> Sense – 269A	1,5 λ
Antisense APAN4	1,5 λ
<b>dNTP's</b>	4 λ
<b>Pfu buffer (10x)</b>	4,5 λ
<b>H<sub>2</sub>O sterile</b>	32,5 λ
<b>V<sub>final</sub></b>	45 λ

---

Πίνακας 1 Διαλύματα που περιέχονται στο tube A της 1<sup>ης</sup> φάσης PCR.

---

**Διάλυμα A2 (PCR 2)**

<b>DNA template</b> hCRF <sub>1</sub> R/pCIN4	
<b>Primers</b> Sense – MV10	
Antisense – 269A	
<b>dNTP's</b>	
<b>Pfu buffer (10x)</b>	
<b>H<sub>2</sub>O sterile</b>	
<b>V<sub>final</sub></b>	

---

Πίνακας 2 Διαλύματα που περιέχονται στο tube B της 1<sup>ης</sup> φάσης PCR.

Μετά την παρασκευή των διαλυμάτων 1 και 2, τοποθετήθηκαν σε θερμικό κυκλοποιητή PCR, όπου και θερμάνθηκαν για 2 λεπτά στους 100 °C. Στη συνέχεια προστέθηκαν σε αυτά 5μl διαλύματος B ώστε ο τελικός όγκος σε κάθε διάλυμα να είναι 50μl.

---

**Διάλυμα B**

<b>Pfu polymerase</b>	0,5 λ
<b>Pfu buffer (10x)</b>	0,5 λ
<b>H<sub>2</sub>O sterile</b>	4 λ
<b>V<sub>final</sub></b>	5 λ

---

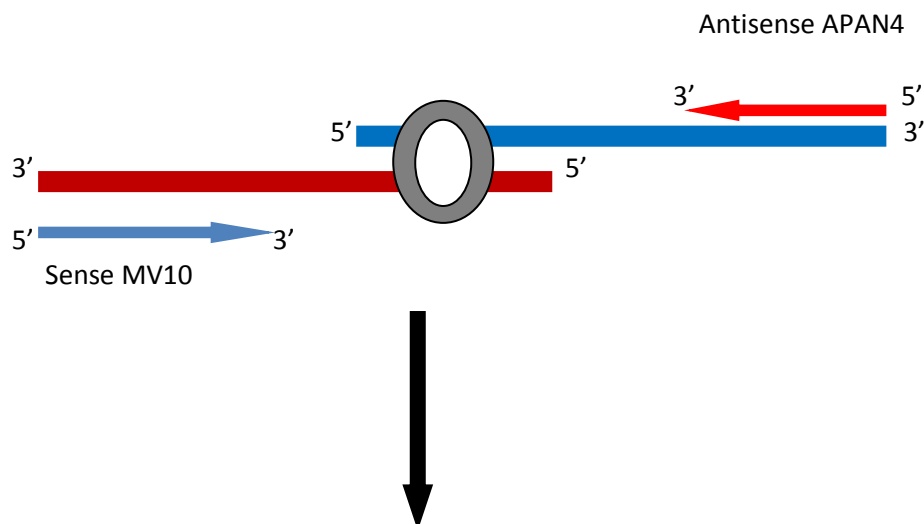
Πίνακας 3 Παρασκευή διαλύματος pfu – πολυμεράσης (Διάλυμα B).

Έπειτα τα διαλύματα που προέκυψαν από την ανάμειξη των διαλυμάτων A (1 και 2) με το B επώαστηκαν σε τρεις διαδοχικές θερμοκρασίες. Τα τρία αυτά στάδια συντελούν έναν κύκλο PCR.

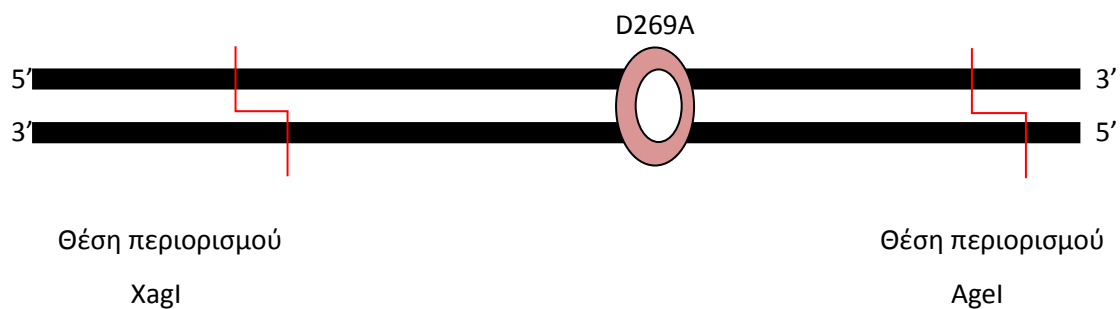
- Αποδιάταξη της διπλής έλικας του DNA στους 97°C για 1 λεπτό.
- Επώαση του DNA στους 55°C για 3 λεπτά για την επικόλληση των εκκινητών στα συμπληρωματικά κομμάτια του DNA.
- Πολυμερισμός και σύνθεση της αλληλουχίας DNA στους 72°C για 15 λεπτά.

Η παραπάνω αντίδραση ολοκληρώνεται μετά από 30 κύκλους, όπου τα διαλύματα οδηγούνται για επιπλέον επώαση 10 λεπτών στους 72 °C. Εν συνεχεία τα τεμάχια του DNA του υποδοχέα που προήλθαν από την 1<sup>η</sup> φάση της αντίδρασης PCR και ανήκουν στα διαλύματα A1 - PCR1 και A2 - PCR2, ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης, απομονώθηκαν από αυτό και χρησιμοποιήθηκαν ως εκμάγεια για την αντίδραση PCR 2<sup>ης</sup> φάσης με σκοπό τη λήψη ενός προϊόντος μήκους 1506bp που αποτελεί επίσης τμήμα του CRF<sub>1</sub>R/ρCIN4 DNA. Στην PCR αυτή χρησιμοποιήθηκαν σαν εκκινητές τα ολιγονουκλεοτίδια Sense MV10 και Antisense APAN4. Στο μέσο περίπου του DNA αυτού αναμενόταν να υπάρχει η μετάλλαξη D269A. Τα ένζυμα περιορισμού AgeI και XagI που χρησιμοποιούνται παρακάτω για την πέψη του επιθυμητού τμήματος DNA, περιλαμβάνουν την επιθυμητή προς μελέτη μετάλλαξη (D269A). Τα ένζυμα αυτά χρησιμοποιήθηκαν για την υποκλωνοποίηση του τμήματος του DNA του CRF<sub>1</sub>R που περιέχει την μετάλλαξη D269A στο πλασμιδικό DNA CRF<sub>1</sub>R/ρCIN4 (Εικόνα 2.4).

## PCR 2<sup>ης</sup> ΦΑΣΗΣ



Προϊόν PCR 2<sup>ης</sup> φάσης



*Εικόνα 2.4 Αντίδραση αλυσιδωτής πολυμεράσης (PCR) 2<sup>ης</sup> φάσης. Στην εικόνα φαίνονται οι θέσεις πέψης των περιοριστικών ενζύμων XagI και AgeI.*

Χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω διαλύματα στις αντίστοιχες ποσότητες για την πραγματοποίηση της δεύτερης φάσης της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR).

Διάλυμα Α	
Προϊόν PCR1 (sense D269A)	5 λ
Προϊόν PCR2 (antisense D269A)	5 λ
Primers Sense – MV10	1,5 λ
Antisense – APAN4	1,5 λ
dNTP's	4 λ
Pfu Buffer (10x)	4,5 λ
H <sub>2</sub> O sterile	23,5 λ
V <sub>final</sub>	45 λ

*Πίνακας 4 Διαλύματα που περιέχονται στο tube της 2<sup>ης</sup> φάσης PCR.*

Μετά την παρασκευή του παραπάνω διαλύματος, τοποθετήθηκε σε θερμικό κυκλοποιητή PCR, όπου και θερμάνθηκε για 2 λεπτά στους 100 °C. Στη συνέχεια προστέθηκαν σε αυτό 5μl διαλύματος B ώστε ο τελικός όγκος του συνολικού διαλύματος να είναι 50μl.

<b>Διάλυμα B</b>	
<b>Pfu polymerase</b>	0,5 λ
<b>Pfu buffer (10x)</b>	0,5 λ
<b>H<sub>2</sub>O sterile</b>	4 λ
<b>V<sub>final</sub></b>	5 λ

*Πίνακας 5 Παρασκευή διαλύματος rfu – πολυμεράσης (Διάλυμα B).*

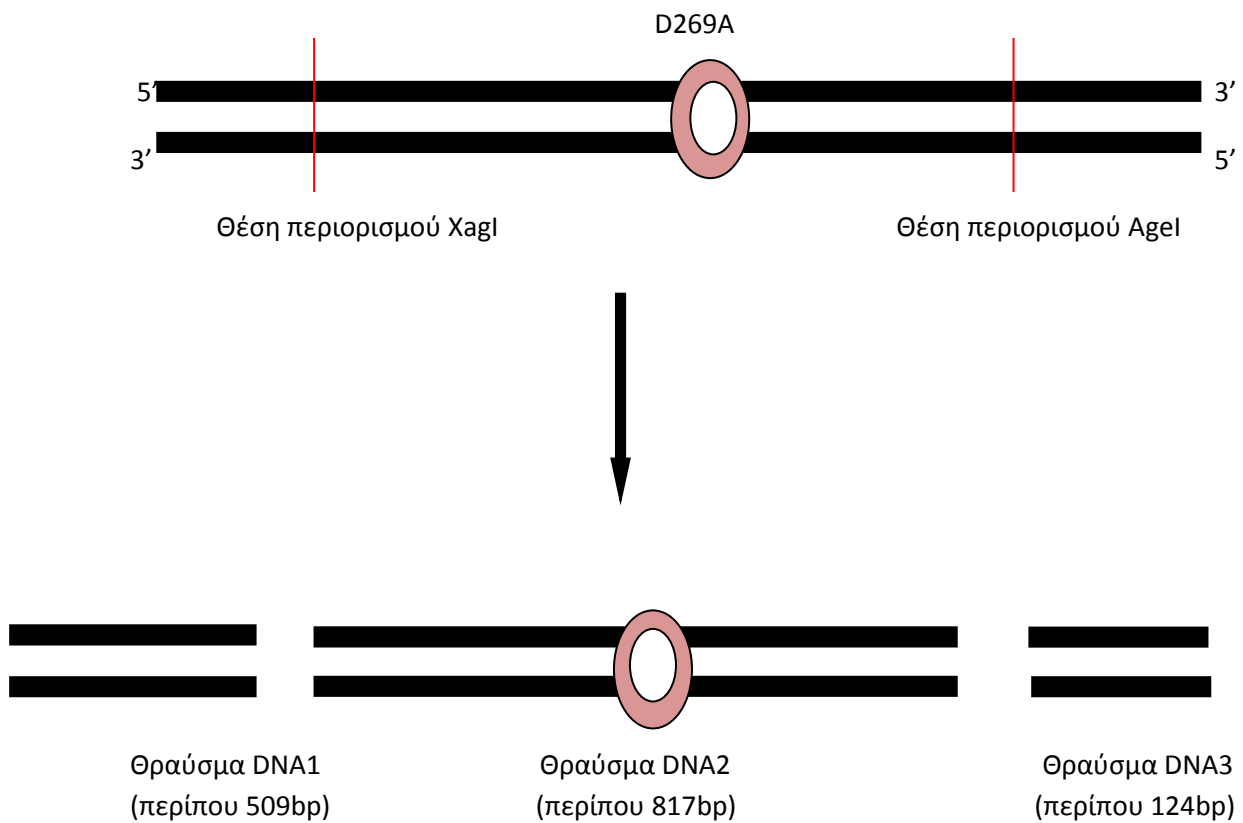
Το τεμάχιο του DNA του υποδοχέα που προήλθε από την φάση 2 της PCR είναι εκείνο που φέρει τη μετάλλαξη D269A. Αυτό το τεμάχιο υποκλωνοποιήθηκε στο πλασμιδιακό DNA CRF<sub>1</sub>R – WT/ρCIN4 και επιτεύχθηκε με την ηλεκτροφόρηση του σε πηκτή αγαρόζης, με απομόνωσή του από το πήκτωμα και πέψη του με τα περιοριστικά ένζυμα AgeI και XagI.

### **2.1.2 Πέψη DNA με ένζυμα περιορισμού**

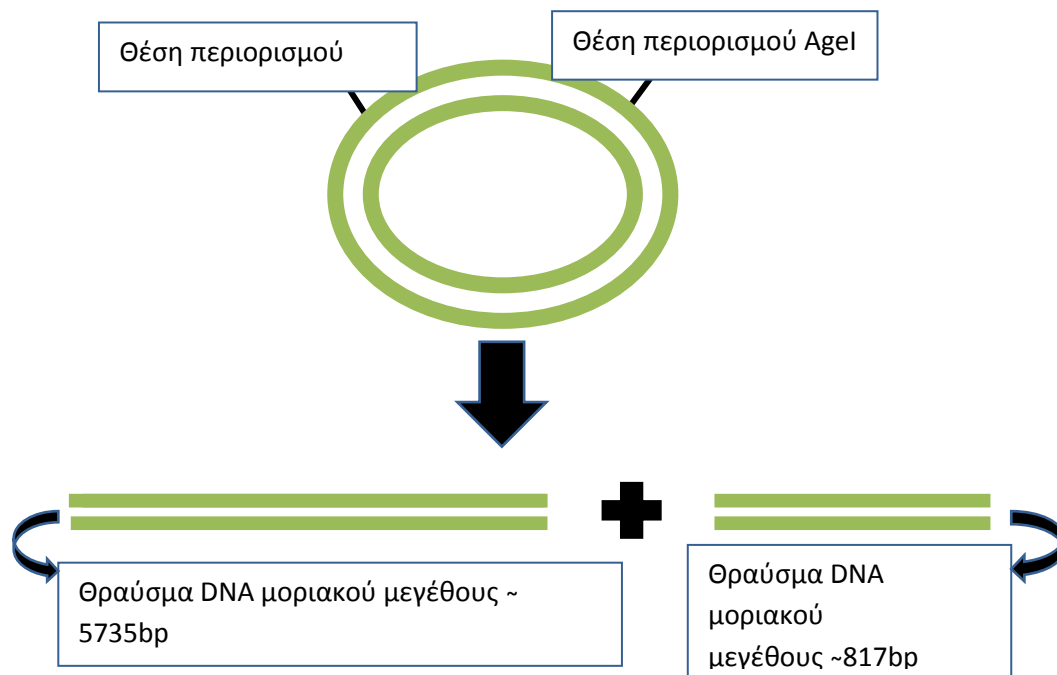
Τα περιοριστικά ένζυμα ή αλλιώς οι ενδονουκλεάσες περιορισμού αναγνωρίζουν συγκεκριμένες παλινδρομικές αλληλουχίες του DNA (μικρού μήκους βάσεων) και τις διασπούν πάντα στο ίδιο σημείο. Αυτές οι θέσεις ονομάζονται θέσεις περιορισμού. Το DNA εν συνεχεία διασπάται είτε στο εσωτερικό, είτε κοντά σε αυτή την αλληλουχία μέσω υδρόλυσης των φωσφοδιεστερικών δεσμών του DNA σε αυτά τα σημεία και κάτω από κατάλληλες συνθήκες θερμοκρασίας, χρόνου, επώασης και ιοντικής ισχύος του διαλύματος. Κατά την πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε στο εργαστήριο, το DNA παράγωγο της αντίδρασης PCR που προέκυψε από τη δεύτερη φάση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης και περιείχε τη μετάλλαξη D269A, χρησιμοποιήθηκε για την πραγματοποίηση της πέψης (digestion) με τα περιοριστικά ένζυμα AgeI και XagI. Τα παραγόμενα θραύσματα του DNA από αυτή τη διαδικασία είναι τα εξής:

- Ένα τμήμα DNA μήκους περίπου 509 bp (θραύσμα DNA1).
- Ένα τμήμα DNA μήκους περίπου 817bp (θραύσμα DNA2), το οποίο φέρει και την ως προς μελέτη μετάλλαξη.
- Ένα τμήμα DNA μήκους περίπου 124 bp (θραύσμα DNA3) (Εικόνα 2.5).

Επίσης πραγματοποιήθηκε επιπλέον μία πέψη με τα ίδια περιοριστικά ένζυμα σε πλασμιδιακό DNA CRF<sub>1</sub>R/ρCIN4 (μήκους περίπου 6517bp), προκύπτοντας δύο γραμμικά τμήματα DNA, το ένα μήκους 5735 bp (vector), όπου αποτελεί το επιθυμητό τμήμα για τη σύνδεση του DNA και το άλλο μήκους 817bp (Εικόνα 2.6). Τα περιοριστικά ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν για την πέψη αυτών των DNA ήταν το XagI που αναγνωρίζει την αλληλουχία 5'-CCTNN^NNNAGG-3' και το AgeI που αναγνωρίζει την αλληλουχία 5'-A^CCGGT-3' (όπου ^ είναι τα σημεία πέψης).



*Εικόνα 2.5* Απεικόνιση της πέψης του προϊόντος της φάσης 2 της PCR, που φέρει τη μετάλλαξη, με τα ένζυμα AgeI, XagI.



*Εικόνα 2.6 Αναπαράσταση της πέψης του πλασμιδιακού DNA – 269A/pCIN4 με τα περιοριστικά ένζυμα XagI και AgeI.*

Διάλυμα Α	
DNA hCRF <sub>1</sub> – D269A	20 λ
AgeI	1 λ
XagI	1 λ
Buffer Orange (10x)	3 λ
H <sub>2</sub> O sterile	5 λ
V <sub>final</sub>	30 λ

*Πίνακας 6 Τα διαλύματα με τις αντίστοιχες ποσότητες, που χρησιμοποιήθηκαν για την πέψη του DNA που προέκυψε από την PCR της 2<sup>ης</sup> φάσης.*

Διάλυμα Β	
DNA hCRF <sub>1</sub> /pCIN4	4 λ
AgeI	1 λ
XagI	1 λ
Buffer Orange (10x)	3 λ
H <sub>2</sub> O sterile	21 λ
V <sub>final</sub>	30 λ

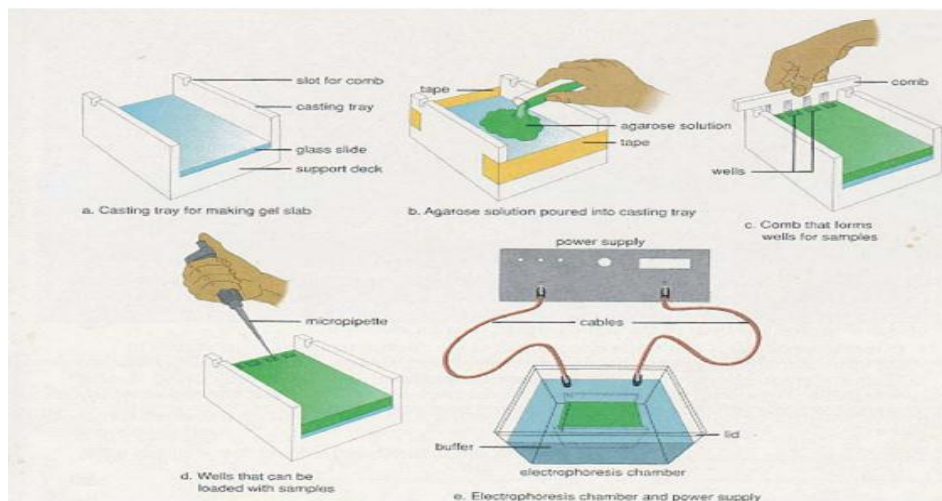
*Πίνακας 7 Τα διαλύματα με τις αντίστοιχες ποσότητες, που χρησιμοποιήθηκαν για την πέψη του DNA CRF<sub>1</sub>R/pCIN4.*

Η αντίδραση πέψης με τα δύο περιοριστικά ένζυμα πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία 37°C για περίπου 16 ώρες (overnight).

### **2.1.3 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης**

Τα προϊόντα από τις φάσεις 1 και 2 της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR), αλλά και τα τμήματα DNA του CRF<sub>1</sub>R που προέκυψαν από την πέψη με τα ένζυμα περιορισμού διαχωρίζονται με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης. Από το πήκτωμα στη συνέχεια απομονώνονται τα επιθυμητά τμήματα DNA με μία διαδικασία που θα περιγραφεί παρακάτω. Όταν εφαρμοστεί μία διαφορά δυναμικού στο πήκτωμα αγαρόζης, μόρια με διαφορετικό καθαρό φορτίο, αρχίζουν να διαχωρίζονται λόγω της διαφορετικής κινητικότητάς τους. Μόρια με το ίδιο καθαρό φορτίο αλλά με διαφορετικό μέγεθος θα έχουν διαφορετική ταχύτητα λόγω των διαφορετικών δυνάμεων τριβής που ασκούνται σε αυτά κι επομένως διαχωρίζονται. Μικρά μόρια θα μετακινούνται πιο γρήγορα μέσα από τους πόρους της πηκτής. Είναι προφανές ότι ρυθμίζοντας το μέγεθος των πόρων, αυξάνοντας ή μειώνοντας δηλαδή τη συγκέντρωση της αγαρόζης, μπορούμε να καθορίσουμε την κινητικότητα των μορίων που επιθυμούμε να διαχωριστούν ή να επιλέξουμε εμείς το εύρος του μεγέθους των μορίων τα οποία στο συγκεκριμένο σύστασης πήκτωμα θα διαχωρίζονται ικανοποιητικά το ένα από το άλλο. Το DNA επίσης λόγω του ότι είναι αρνητικά φορτισμένο εξαιτίας των φωσφορικών ομάδων που βρίσκονται στο φωσφοδιεστερικό σκελετό, θα κινείται από τον αρνητικό πόλο προς το θετικό κατά τη διαδικασία της ηλεκτροφόρησης. Για τη δημιουργία του πηκτώματος 1% αγαρόζης, διαλύονται 1.3 gr αγαρόζης σε 130 ml διαλύματος TAE [242 gr Tris-Base, 57.1 ml glacial acetic acid, 18.6 gr EDTA (pH 8.0)] αραιώσης 1/50, με θέρμανση και υπό συνεχή ανάδευση. Στη συνέχεια, το διάλυμα αφήνεται να κρυώσει μέχρι να φτάσει τη θερμοκρασία περίπου των 50°C και έπειτα προστίθενται σε αυτό 3.5ml βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr). Το EtBr χρησιμεύει για να παρατηρήσουμε το DNA που ηλεκτροφορήθηκε στο πήκτωμα αγαρόζης, γιατί προσδέεται παρεμβαλλόμενο στις δύο αλυσίδες του DNA και δημιουργεί έτσι ένα σύμπλοκο με το DNA που φθορίζει όταν το πήκτωμα εκτεθεί σε υπεριώδες φως. Μετά την προσθήκη του βρωμιούχου αιθιδίου, το μίγμα τοποθετείται στην κασέτα της συσκευής ηλεκτροφόρησης και περιμένουμε ωστόσο πήξει. Τοποθετείται και η ειδική χτένα έτσι ώστε να σχηματιστούν τα πηγαδάκια. Μετά την πήξη του πηκτώματος, αυτό τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης που περιέχει και ρυθμιστικό διάλυμα TAE αραιώσης 1/50. Επίσης, στα διαλύματα που περιέχουν τα προϊόντα DNA (είτε από τις δύο φάσεις των PCR, είτε τα τεμάχια που έχουν προκύψει από την πέψη του DNA) προστίθενται 4μl 6X loading buffer (40% γλυκερόλη, 0,25% Bromophenol Blue, 0,25% Xylene Cyanol FF). Τέλος, τα διαλύματα DNA τοποθετούνται στα πηγαδάκια που είχαν σχηματιστούν από το ειδικό

χτενάκι και ηλεκτροφορούνται κάτω από ηλεκτρική τάση 100V. Εκτός από τα δείγματα DNA σε ένα πηγαδάκι του πηκτώματος, τοποθετείται και ηλεκτροφορείται και ο μάρτυρας (ladder), ο οποίος περιέχει διάφορα τμήματα DNA γνωστών μοριακών μεγεθών με σκοπό τον υπολογισμό του μοριακού μεγέθους των τεμαχίων των DNA (δειγμάτων) που δημιουργήθηκαν από την πέψη (Εικόνα 2.7).



*Εικόνα 2.7 Διαδικασία τοποθέτησης του πηκτώματος και των δειγμάτων στη συσκευή ηλεκτροφόρησης.*

#### **2.1.4 Απομόνωση DNA από πήκτωμα αγαρόζης (gel extraction).**

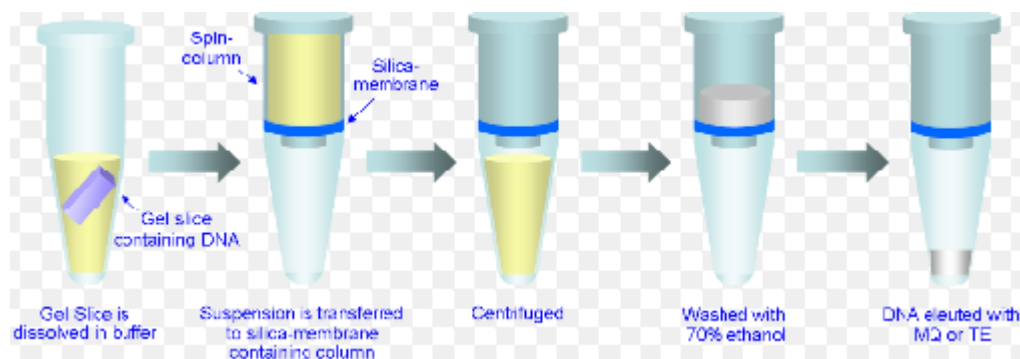
Μετά τη διαδικασία της ηλεκτροφόρησης τα προϊόντα του DNA από τις φάσεις 1 και 2 της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR), αλλά και τα τμήματα DNA του CRF<sub>1</sub>R που προέκυψαν από την πέψη με τα ένζυμα περιορισμού, παρατηρήθηκαν κάτω από υπεριώδες φως (εμφανίζονται με τη μορφή ζώνης) και απομονώθηκαν εκείνα που έχουν το επιθυμητό ως προς μελέτη μοριακό βάρος. Η συλλογή τους από το πήκτωμα αγαρόζης γίνεται με τη βοήθεια νυστεριού.

Η απομόνωση του DNA από το πήκτωμα αγαρόζης πραγματοποιείται μέσω του kit Nucleospin® Extract 2 της Macherey-Nagel. Η διαδικασία απομόνωσης του DNA περιγράφεται στα παρακάτω βήματα (Εικόνα 2.8):

1. Για κάθε 100mg πηκτώματος αγαρόζης (<2%) προστίθενται 200μl ρυθμιστικό διάλυμα NT1.
2. Επιάζονται τα πηκτώματα για 5-10 λεπτά στους 50°C, αναδεύοντας ανά 2-3 λεπτά χρησιμοποιώντας έντονη ανάδευση (Vortex), μέχρι την πλήρη διάλυσή τους.



3. Τοποθετούμε μία στήλη (column) μέσα σε ένα collection tube (2ml) και φορτώνουμε με δείγμα. Το collection tube με το δείγμα φυγοκεντρείται για 30 δευτερόλεπτα στις 10000g. Απορρίπτουμε το υγρό (Bind DNA to column).
4. Προσθέτουμε στη στήλη 600μl ρυθμιστικού διαλύματος NT3 και φυγοκεντρούμε πάλι για 30 δευτερόλεπτα στις 10000g. Απορρίπτουμε ξανά το υγρό και επαναλαμβάνουμε το βήμα αυτό (Wash silica membrane).
5. Φυγοκεντρούμε για 2 λεπτά για να απομακρυνθεί πλήρως το NT3 (Dry silica membrane).
6. Τοποθετούμε τη στήλη σε ένα νέο στείρο tube, προσθέτουμε σε αυτή 20μl ρυθμιστικού διαλύματος NE (5mM Tris-Cl, pH=8,5) και αφήνουμε τη στήλη πάνω από 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Φυγοκεντρούμε για 1 λεπτό. Το υγρό που εκλούστηκε περιέχει το DNA που θέλαμε να απομονώσουμε (Elute DNA).



Εικόνα 2.8 Απομόνωση DNA από το πήκτωμα αγαρόζης.

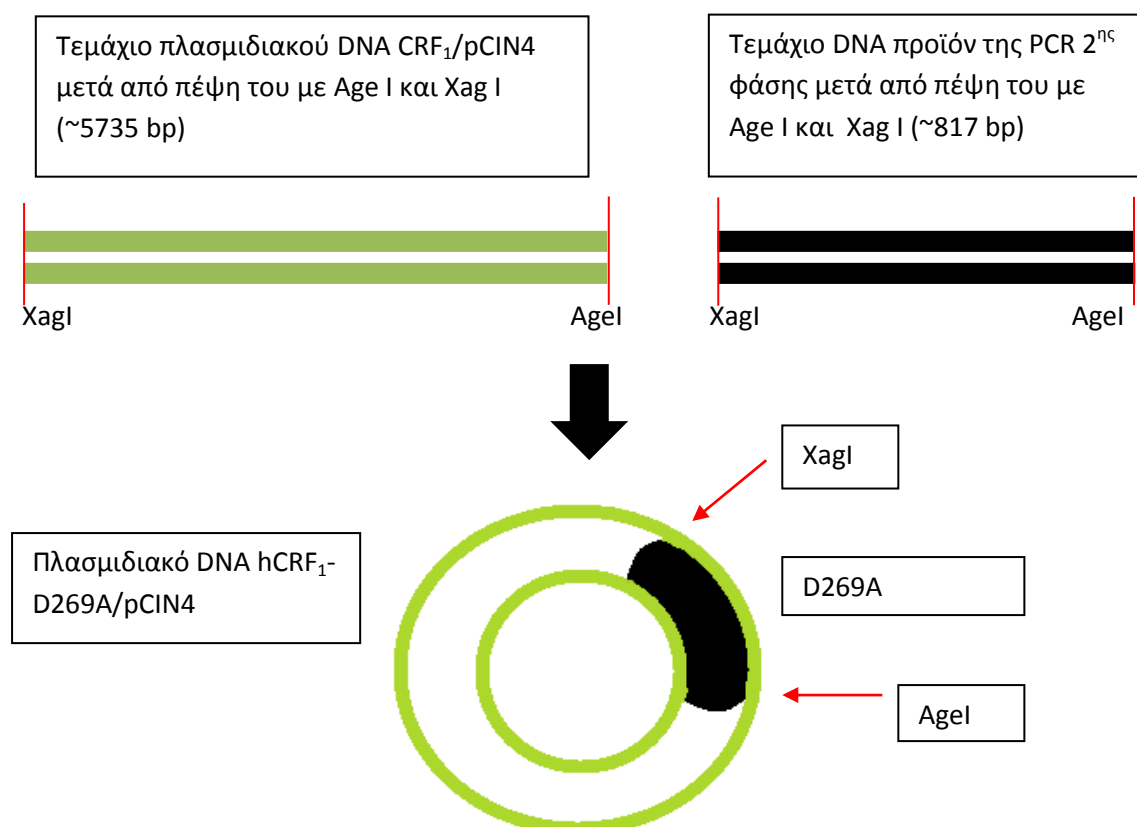
### 2.1.5 Συρραφή των τεμαχίων του DNA μετά την πέψη τους με ένζυμα περιορισμού (Ligation).

Τα τεμάχια του DNA τα οποία έχουν προκύψει από την πέψη του μεταλλαγμένου γενετικού υλικού που έχουμε δημιουργήσει κατά την πειραματική διαδικασία και τα οποία έχουν απομονωθεί από το πήκτωμα αγαρόζης, οδηγούνται στη διαδικασία της συρραφής με τη βοήθεια του ενζύμου DNA λιγάσης (*T<sub>4</sub> ligase*/Fermentas). Συγκεκριμένα, συρράφτηκαν, το κομμάτι του DNA που προέκυψε από τη δεύτερη φάση της PCR που περιείχε τη μετάλλαξη D269A μοριακού μεγέθους περίπου 817 bp, με το κομμάτι του πλασμιδιακού DNA CRF<sub>1</sub>R - WT/pCIN4 μοριακού μεγέθους 5735 bp (Εικόνα 2.9). Η αντίδραση συρραφής πραγματοποιήθηκε σε ειδική συσκευή που διατηρεί θερμοκρασία 16°C, για 16 ώρες περίπου.

### Διάλυμα Ligation

<b>Insert DNA: hCRF<sub>1</sub>/D269A</b> (φάση 2 της PCR, κομμένο με AgeI και XagI)	10λ
<b>DNA vector: hCRF<sub>1</sub>/pCIN4</b> (κομμένο με AgeI, XagI)	2λ
<b>T<sub>4</sub> ligase</b>	4λ
<b>T<sub>4</sub> Buffer (10x)</b>	2λ
<b>H<sub>2</sub>O sterile</b>	22λ
<b>V<sub>final</sub></b>	40λ

*Πίνακας 8 Τα διαλύματα και οι αντίστοιχες ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν για τη συρραφή του DNA που φέρει την επιθυμητή μετάλλαξη με το DNA vector.*



*Εικόνα 2.9 Συρραφή τμημάτων DNA με σκοπό τη δημιουργία του πλασμιδιακού DNA hCRF<sub>1</sub>-D269A.*

## **2.2 Μετασχηματισμός βακτηρίων με πλασμιδιακό DNA**

### **2.2.1 Μετασχηματισμός και καλλιέργεια βακτηρίων DH-10b E.Coli με το πλασμιδιακό DNA που φέρει τη μετάλλαξη**

Για το μετασχηματισμό (transformation) των βακτηρίων με το πλασμιδιακό DNA hCRF<sub>1</sub> - D269A χρησιμοποιήθηκαν τα βακτήρια DH-10b E.Coli τα οποία μεταφέρθηκαν για ξεπάγωμα από τους -80°C στον εργαστηριακό χώρο μέσα σε πάγο για 15 – 20 λεπτά. Παράλληλα τοποθετήσαμε το DNA που φέρει την επιθυμητή μετάλλαξη με τη σειρά του στον πάγο. Οι συνθήκες οι οποίες δουλεύουμε επιβάλλεται να είναι στείρες έτσι ώστε να αποφευχθούν τυχόν επιμολύνσεις, συνεπώς χρησιμοποιείται φλόγα σε όλη τη διάρκεια της διαδικασίας. Στη συνέχεια προσθέσαμε 40λ πλασμιδιακού DNA σε 200λ βακτηρίων και αφήσαμε να επωαστούν για 30 λεπτά. Μετά το πέρας των 30 λεπτών υποβάλαμε τα βακτήρια σε θερμικό σοκ θερμαίνοντάς τα στους 42°C για 45 δευτερόλεπτα αυστηρά και αμέσως μετά τα τοποθετήσαμε ξανά στον πάγο για 2 λεπτά. Στη συνέχεια, προσθέσαμε 900μl θρεπτικού υγρού Luria-Bertani Broth (LB) (10g Tryptone, 5g Yeast extract, 5g NaCl, 1ml 1N NaOH για 1 λίτρο) στα βακτήρια και τα επώασαμε για 1 ώρα στους 37°C. Έπειτα, φυγοκεντρήσαμε τα βακτήρια για 5 λεπτά σε 3000rpm. Η πελέτα η οποία δημιουργήθηκε από τη φυγοκέντρωση επαναιωρήθηκε σε 100μl LB και το αιώρημα βακτηρίων απλώθηκε σε τρυβλίο που περιείχε άγαρ-LB και το αντιβιοτικό αμπικιλίνη σε συγκέντρωση 60 μg/ml. Τέλος, πραγματοποιήθηκε επώαση για 16 ώρες (overnight) σε θερμοκρασία 37°C.

### **2.2.2 Λήψη αποικιών και πολλαπλασιασμός μετασχηματισμένων βακτηρίων DH-10b E.Coli**

Μετά το τέλος της επώασης του τρυβλίου, έγινε λήψη αποικιών και πολλαπλασιασμός τους. Η εμφάνιση αποικιών βακτηρίων σε περιβάλλον που περιέχει αμπικιλίνη οφείλεται στο γεγονός ότι το πλασμιδιακό DNA hCRF<sub>1</sub>R – D269A/pCIN4 εκτός του γονιδίου που κωδικοποιεί τον υποδοχέα CRF<sub>1</sub>D269A περιέχει και ένα γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό αμπικιλίνη. Έτσι λοιπόν με τη χρήση αμπικιλίνης γίνονται εμφανείς οι αποικίες των βακτηρίων αυτών που φέρουν το πλασμιδιακό DNA hCRF<sub>1</sub>R D269A/pCIN4 οι οποίες τελικά επιλέγονται και απομονώνονται. Μετά τη λήψη αποικιών από το τρυβλίο, τα βακτήρια πολλαπλασιάστηκαν σε δοκιμαστικό σωλήνα που περιείχε 10ml θρεπτικού LB, αλλά και 10λ αμπικιλίνη (60μg/ml σε EtOH). Τέλος, τα βακτήρια επωάστηκαν για 16 ώρες (overnight) στους 37°C υπό συνεχή ανάδευση.

### **2.2.3 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από μετασχηματισμένα βακτήρια DH – 10bE.Coli (Miniprep) και ταυτοποίηση του πλασμιδιακού DNA CRF<sub>1</sub>R – D269A/pCIN4 που φέρει τη μετάλλαξη**

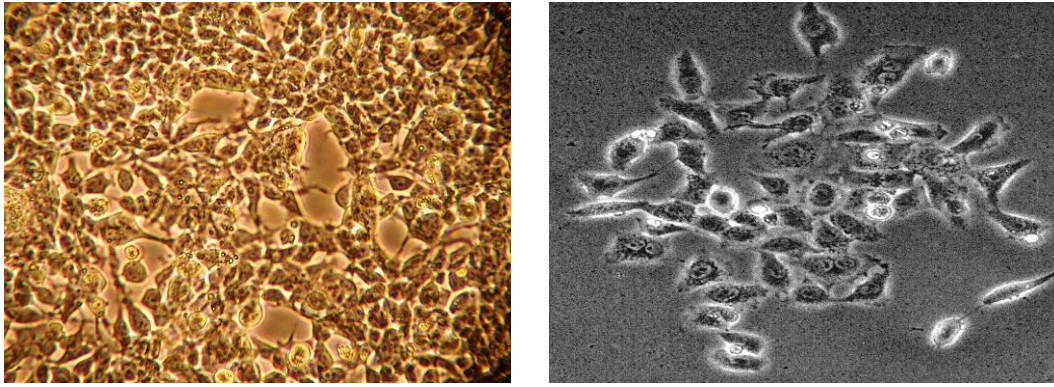
Το πλασμιδιακό DNA που περιείχε τη μετάλλαξη απομονώθηκε από τα βακτήρια με τη βοήθεια του kit Nucleospin® Plasmid της Macherey-Nagel ως εξής:

1. Φυγοκέντρηση βακτηρίων για 30 δευτερόλεπτα στις 11.000 g σε θερμοκρασία δωματίου.
2. Αφαίρεση υπερκρεμμένου και επαναιώρηση ιζήματος σε 250λ διαλύματος A1.
3. Προσθήκη 250λ διαλύματος A2 στα βακτήρια, επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και λύση τους.
4. Προσθήκη 300λ διαλύματος εξουδετέρωσης A3 και φυγοκέντρηση για 7 λεπτά στις 11.000 g σε θερμοκρασία δωματίου.
5. Μεταφορά υπερκρεμμένου σε στήλη Nucleospin Plasmid και φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 11.000 g σε θερμοκρασία δωματίου (Bind DNA).
6. Προσθήκη στη στήλη 600λ διαλύματος A4 (που περιέχει EtOH) και φυγοκέντρηση της στήλης για 1 λεπτό στις 11.000 g, σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα απορρίπτεται το υγρό και το βήμα αυτό επαναλαμβάνεται για ακόμα μία φορά (wash silica membrane).
7. Φυγοκέντρηση για 2 λεπτά σε 11.000 g σε θερμοκρασία δωματίου (dry silica membrane).
8. Προσθήκη 40λ TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH=8.03) στη στήλη. Το υγρό συλλέγεται μετά από επώαση της στήλης με το TE για λίγα λεπτά. Αυτό το υγρό περιείχε το πλασμιδιακό DNA hCRF<sub>1</sub> – D269A/pCIN4.

Τελική επιβεβαίωση της εισαγωγής της μετάλλαξης D269A στο πλασμιδιακό DNA CRF<sub>1</sub>R/pCIN4, επιτεύχθηκε με ανάγνωση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του, χρησιμοποιώντας τον Genetic Analyser 3100 της Applied Biosystems και ακολουθώντας το πρωτόκολλο της εταιρείας.

## **2.3 Κυτταροκαλλιέργειες**

Για την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά HEK293 (ευγενική προσφορά του Δρ. Jonathan Javitch, Columbia University, USA). Τα HEK293 (Human Embryonic Kidney 293 cells), προέρχονται από ανθρώπινα εμβρυϊκά νεφρικά κύτταρα που αναπτύσσονται σε καλλιέργεια ιστού. Συγκεκριμένα τα κύτταρα αυτά έχουν επιμολυνθεί με DNA του ανθρώπινου αδενοϊού τύπου 5 (Ad)5. Λόγω του ότι τα HEK293 είναι πολύ επιδεκτικά στην επιμόλυνση, χρησιμοποιούνται ευρέως στην κυτταρική βιολογία, αλλά και στη βιοτεχνολογία για την παραγωγή θρεπτικών πρωτεϊνών και ιών για γονιδιακή θεραπεία (Εικόνα 2.10).



*Εικόνα 2.10 HEK 293 κύτταρα από μικροσκόπιο*

Για την επίστρωση των κυττάρων HEK 293 χρησιμοποιήθηκαν στείρα τρυβλία διαμέτρου 60 mm ή 100 mm, ανάλογα με τις ανάγκες των πειραμάτων. Τα κύτταρα διατηρήθηκαν σε καλλιέργεια μέσα σε επωαστήριο θερμοκρασίας 37°C, 5% CO<sub>2</sub>/95% αέρα και 100% υγρασία, για την ομαλή ανάπτυξή τους. Το θρεπτικό υλικό για την καλλιέργεια των κυττάρων αποτελούσε το DMEM/F12/BCS το οποίο περιείχε DMEM/F12 (1:1) (2.5 mM L-γλουταμίνη, 15mM HEPES, 1.125 g/L NaHCO<sub>3</sub>, Invitrogen) και 10% ορό βοός (BCS, Hyclone). Τέλος το θρεπτικό υλικό ανανεωνόταν κάθε 48 ώρες και τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν για την πειραματική διαδικασία είχαν 90% περίπου πυκνότητα.

### **2.3.1 Κρυοσυντήρηση κυττάρων**

Η κρυοσυντήρηση των κυττάρων είναι απαραίτητη έτσι ώστε να διατηρούνται σε μικρό αριθμό γενεών ανακαλλιεργειών, οι οποίες δίνουν τη δυνατότητα διεξαγωγής πειραματικών διαδικασιών με κύτταρα στον ίδιο αριθμό γενεάς ακόμη και μετά από αρκετό χρονικό διάστημα. Συγκεκριμένα, τα κύτταρα επαναιωρούνται σε υλικό κατάψυξης (BCS με 10% DMSO) και το κυτταρικό εναιώρημα τοποθετείται σε σωληνάριο βαθιάς κατάψυξης, όπου μεταφέρεται αρχικά στους -80°C (συντήρηση κυττάρων για μικρό χρονικό διάστημα). Στη συνέχεια, το κατεψυγμένο εναιώρημα μεταφέρεται σε υγρό άζωτο για τη μακροχρόνια διατήρησή του. Η κρυοσυντήρηση των κυττάρων σε υγρό άζωτο, προϋποθέτει την αρχική συντήρησή τους στους -80°C, διότι η ψύξη τους είναι απαραίτητο να πραγματοποιείται σταδιακά σε χαμηλότερη θερμοκρασία, έτσι ώστε να αποφευχθεί η δημιουργία κρυστάλλων στο εσωτερικό των κυττάρων που θα οδηγήσουν στο κυτταρικό θάνατο.

### 2.3.2 Απόψυξη κυττάρων

Σε αντίθεση με τη σταδιακή ψύξη των κυττάρων η οποία διασφαλίζει την ακεραιότητά τους, η απόψυξή τους πρέπει να πραγματοποιείται άμεσα. Τα κατεψυγμένα σωληνάκια με τα κύτταρα αποψύχονται ταχέως με θέρμανση σε υδατόλουτρο που διατηρείται στους 37°C υπό συνεχή ανάδευση. Στη συνέχεια μεταφέρονται άμεσα σε θρεπτικό υλικό καλλιέργειας (10ml θρεπτικό).

### 2.4 Επιμόλυνση κυττάρων με πλασμιδιακό DNA που φέρει τη μετάλλαξη

Τα κύτταρα HEK293 τα οποία χρησιμοποιούνται στην πειραματική διαδικασία, καλλιεργούνται σε θρεπτικό υλικό DMEM/F12 (1:1) το οποίο συνίσταται από 2,5 mM L-γλουταμίνη, 15 mM HEPES, 1,125 g/L NaHCO<sub>3</sub> εμπλουτισμένο με 10% ορό βοός (BCS). Αρχικά τα κύτταρα, τα οποία θα χρησιμοποιηθούν, μεταφέρονται από τρυβλία Petri διαμέτρου 100mm και επιστρώνονται σε τρυβλία Petri διαμέτρου 60mm καθώς καλλιεργούνται σε επωαστικό κλίβανο με συνθήκες 37°C, ατμόσφαιρα 5% CO<sub>2</sub>/95% αέρα και υγρασία 100%, έχοντας ως αποτέλεσμα έπειτα από 24 ώρες να έχουν 90% πυκνότητα. Την επόμενη μέρα, αναμιγνύονται 3 μg πλασμιδιακού DNA που κωδικοποιεί τον CRF<sub>1</sub>R (άγριο τύπο ή τη μεταλλαγμένη μορφή του) με 600 μl OptiMEM, καθώς και με 12 μl Turbofect. Το μείγμα μεταφέρεται για επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 15 - 20. Κατά τη διάρκεια της επώασης τα HEK 293 κύτταρα που είχαν επιστρωθεί την προηγούμενη μέρα σε τρυβλίο Petri 60 mm εκπλένονται με OptiMEM και προστίθενται σε αυτά 3400 μl OptiMEM. Κατά το πέρας της επώασης, το μείγμα των 600 μl του OptiMEM που περιέχει το Turbofect και το πλασμιδιακό DNA, αναμιγνύεται με τα 3400 μl OptiMEM, που υπήρχαν στο τρυβλίο με τα HEK 293 κύτταρα και επωάζονται για 4-18 ώρες σε επωαστικό κλίβανο (συνθήκες: 37°C, ατμόσφαιρα 5% CO<sub>2</sub>/95% αέρα και υγρασία 100%).

### 2.5 Δημιουργία κυτταρικών σειρών που εκφράζουν σταθερά τους υποδοχείς (Stables)

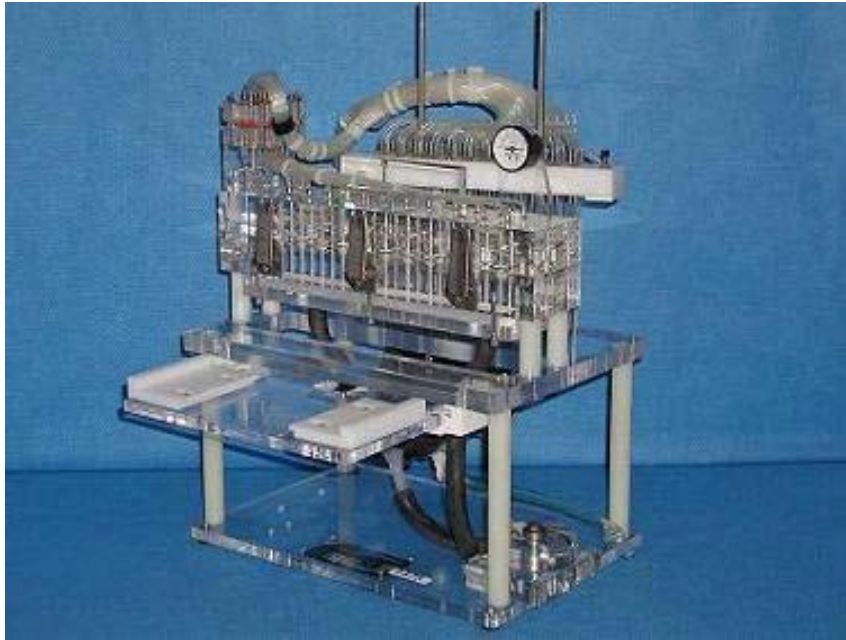
Μετά την επιμόλυνση και την επώαση των κυττάρων HEK293 για 4 – 18 ώρες, το μείγμα OptiMEM/Turbofect/DNA που περιλαμβάνεται στα κύτταρα, απομακρύνεται και αντί αυτού προστίθεται το θρεπτικό υλικό DMEM/F12 (1:1) μαζί με το αντιβιοτικό γενετισίνη (G-418) σε συγκέντρωση 800 μg/ml. Από εκείνη τη στιγμή κι έπειτα κάθε 48 ώρες ανανεώνεται το θρεπτικό υλικό μέχρις ότου περιέλθει θάνατος σε όλα τα κύτταρα τα οποία δεν εκφράζουν την πρωτεΐνη, που τα κάνει ανθεκτικά στο αντιβιοτικό γενετισίνη. Το πλασμίδιο pCIN4 το οποίο περιέχει το DNA που κωδικοποιεί τον CRF<sub>1</sub>R ή τις μεταλλαγμένες μορφές του,

περιλαμβάνει και το γονίδιο το οποίο κωδικοποιεί την πρωτεΐνη φωσφοτρανσφεράση της νεομυκίνης (NPT II) που καθιστά το κύτταρο ανθεκτικό στο αντιβιοτικό γενετισίνη. Όταν εμφανιστούν αποικίες στο τρυβλίο, τα ανθεκτικά στη γενετισίνη κύτταρα μεταφέρονται σε νέα τρυβλία και πολλαπλασιάζονται σε θρεπτικό υλικό DMEM/F12 (1:1), συμπεριλαμβανομένου της γενετισίνης. Μέσω της παραπάνω μεθόδου δημιουργούνται οι επιθυμητές προς χρήση για την πειραματική διαδικασία κυτταρικές σειρές.

## 2.6 Μελέτες διέγερσης παραγωγής κυκλικής μονοφωσφορικής αδενοσίνης (cAMP)

Ο φαρμακολογικός χαρακτηρισμός των υποδοχέων του CRF επιτυγχάνεται με τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της κυκλικής μονοφωσφορικής αδενοσίνης (κυκλικό AMP) η οποία παράγεται σε κύτταρα που εκφράζουν μόνιμα τους CRF υποδοχείς πριν και μετά από διέγερση τους με Tyr<sup>0</sup>-σοβαγίνη. Διέγερση παραγωγής κυκλικής μονοφωσφορικής αδενοσίνης (κυκλικού AMP) πραγματοποιείται σε άθικτα HEK 293 κύτταρα που εκφράζουν μόνιμα τον άγριο τύπο CRF<sub>1</sub>R ή στη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία τον υποδοχέα που φέρει τη μετάλλαξη D269A. Αναλυτικότερα, τα κύτταρα επιστρώνονται σε πλάκες 96 οπών (96 wells), που έχουν κατεργαστεί με poly-L-lysine (0.1 mg/ml), σε συγκέντρωση 40.000-60.000 κύτταρα/well. Μετά από επώαση των κυττάρων σε DMEM/F-12/BCS για 16-18 ώρες στους 37°C /5% CO<sub>2</sub>, το θρεπτικό υλικό αφαιρείται και προστίθενται 100μl ρυθμιστικού διαλύματος Buffer-CS (25mM HEPES, pH 7.4, 2mM choline, 288mM sucrose, 0.9 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>, και 1 mM 3-isobutyl-1- methylxanthine). Έπειτα από 1 ώρα επώασης στους 37°C, προστίθενται ακόμη 100μl ρυθμιστικού διαλύματος Buffer-CS και η επώαση συνεχίζεται για επιπλέον 20 λεπτά της ώρας στους 37°C/5%CO<sub>2</sub> παρουσία ή απουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων Tyr<sup>0</sup>-σοβαγίνης. Μετά το πέρας της επώασης, αφαιρείται το ρυθμιστικό διάλυμα Buffer-CS και ακολουθεί η λύση των κυττάρων με επώαση τους σε 200μl τριχλωροοξικού οξέος (TCA) συγκέντρωσης 3% για μισή με 1 ώρα σε πάγο. Στη συνέχεια τα κύτταρα καταψύχονται (-20°C) για 1-2 μέρες και μετά την απόψυξή τους φυγοκεντρώνονται για 15 λεπτά της ώρας (1800 g/4°C) και το υπερκείμενο (διαλυτοποιήμα) εξουδετερώνεται με προσθήκη NaOH (σε 100μl υπερκείμενου 6M NaOH 2 N) επωάζεται με 1-1.5 nM [2,8-<sup>3</sup>H]-3',5'-κυκλικής μονοφωσφορικής αδενοσίνης (<sup>3</sup>H cAMP) (Amersham) παρουσία πρωτεϊνικής κινάσης A (PKA). Συγκεκριμένα, 20μl εξουδετερωμένου υπερκείμενου επωάζονται με 50μl ρυθμιστικού διαλύματος Buffer-CAQ (100 mM Tris-HCl, pH 7.4, 100mM NaCl and 5 mM EDTA), 20μl <sup>3</sup>H cAMP (1-1.1 nM) και 500μl εκχυλίσματος φλοιού επινεφριδίων που είναι πλούσιο σε PKA. Μετά από επώαση 3 ωρών στον πάγο, τα μείγματα διηθούνται σε συσκευή Brandell (τύπου M-24R) υπό κενό αέρος, μέσω ηθμών με υάλινες ίνες, τύπου AH934 της Whatman. Στη συνέχεια, τα φίλτρα, που προηγουμένως έχουν διαβραχεί με απεσταγμένο νερό, εκπλένονται 3 φορές με συνολικά 3ml ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης (120 mM NaCl, 10mM Tris-HCl pH 7.3 στους 4°C), συλλέγονται και τοποθετούνται σε σωληνάρια σπινθηρισμού μαζί με 3ml υγρού σπινθηρισμού (scintillation fluid). Ακολουθεί η ανακίνηση των σωληναρίων σπινθηρισμού και μετά από 3-24 ώρες η ραδιενέργεια τους μετράται σε μετρητή β-ακτινοβολίας. Το ποσό του cAMP σε κάθε μίγμα

προσδιορίζεται με βάση μια πρότυπη καμπύλη γνωστών συγκεντρώσεων μη ραδιοσημασμένου cAMP (0.3–100 pMol/tube). Στη συνέχεια, γίνεται ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιώντας μη-γραμμική ανάλυση (GraphPad Prism 4.0) και προσδιορίζεται η ισχύς (logEC50) της Tyr<sup>0</sup>-σοβαγίνης να διεγείρει την παραγωγή κυκλικού AMP μετά από δέσμευση της στον άγριο τύπο CRF<sub>1</sub>R ή συγκεκριμένα στο μεταλλαγμένο υποδοχέα D269A υποδοχέα.



Εικόνα 2.11 Συσκευή Brandell (για τα πειράματα δέσμευσης)



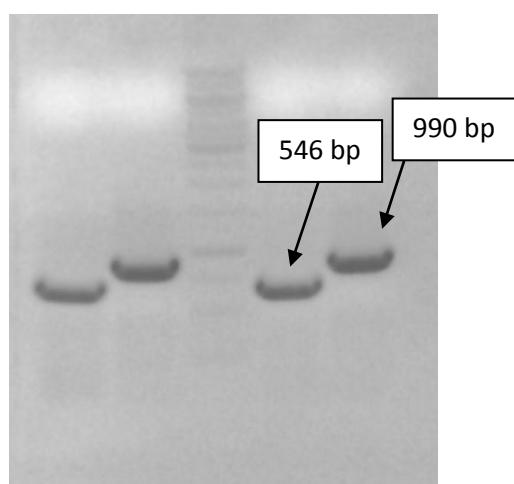
### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 3.1 Δημιουργία της μετάλλαξης D269A

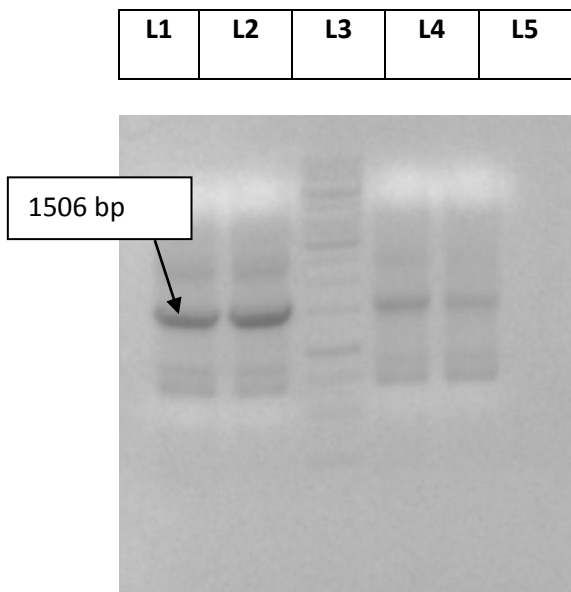
Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε η μετάλλαξη σε αλανίνη του D269 (D269A) που βρίσκεται στα όρια του δευτέρου εξωκυττάριου βρόγχου του CRF<sub>1</sub>R. Αυτό επιτεύχθηκε με τη χρήση της μεθόδου μεταλλαξιγένεσης κατευθυνόμενης θέσης με PCR, η οποία οδήγησε στη δημιουργία του πλασμιδιακού DNA με την ονομασία CRF<sub>1</sub>R – D269A/pCIN4, το οποίο κωδικοποιεί τον μεταλλαγμένο CRF<sub>1</sub>R – D269A υποδοχέα. Η μέθοδος μεταλλαξιγένεσης κατευθυνόμενης θέσης αποτελείται από 2 φάσεις εκτέλεσης. Στην πρώτη φάση έγιναν ταυτόχρονα δύο διαφορετικές PCR, η PCR 1 και η PCR 2, στις οποίες χρησιμοποιήθηκε σαν εκμαγείο το πλασμιδιακό DNA που κωδικοποιεί τον άγριο τύπο CRF<sub>1</sub>R (CRF<sub>1</sub>R/pCIN4) και οι οποίες δημιούργησαν δυο τμήματα του CRF<sub>1</sub>R/pCIN4, μήκους ~990 bp και ~540 bp, αντίστοιχα, που έφεραν τη μετάλλαξη D269A και τα οποία απομονώθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης (Εικόνα 3.1).

Στη δεύτερη φάση έγινε μια PCR στο οποίο χρησιμοποιήθηκαν σαν εκμαγεία τα δύο τμήματα DNA που προήλθαν από τις PCR 1 (~990 bp) και PCR 2 (~540 bp). Το προϊόν της δεύτερης φάσης ήταν ένα DNA μοριακού μεγέθους 1506 bp που περιείχε τα δύο τμήματα της πρώτης φάσης και στο μέσο του οποίου υπήρχε η μετάλλαξη D269A. Το DNA αυτό απομονώθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης όπως φαίνεται στην εικόνα 3.2.

L1	L2	L3	L4	L5
----	----	----	----	----

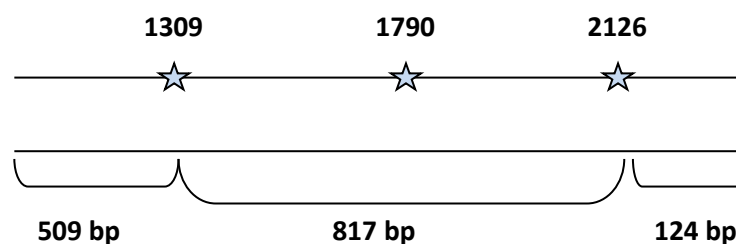


**Εικόνα 3.1** Απεικόνιση του πηκτώματος αγαρόζης με τα προϊόντα DNA των PCR (PCR 1 και PCR 2) πρώτης φάσης. Οι ζώνες οι οποίες υποδεικνύονται με βέλη αποτελούν τα προϊόντα PCR 1 (Sense 269A) μεγέθους 546 bp και PCR 2 (Antisense 269A) μεγέθους 990 bp. Ο προσδιορισμός του μεγέθους των τεμαχίων DNA έγινε με βάση δείκτη της Fermentas γνωστού μοριακού βάρους.



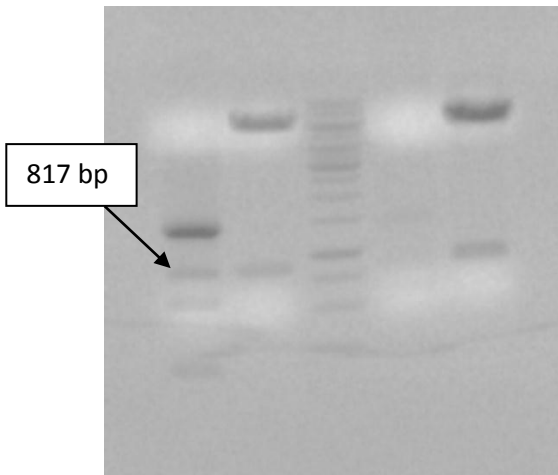
**Εικόνα 3.2** Απεικόνιση του πηκτώματος αγαρόζης με το προϊόν DNA της PCR δεύτερης φάσης. Η ζώνη η οποία υποδεικνύεται με βέλος αποτελεί το προϊόν της PCR δεύτερης φάσης μεγέθους 1506 bp. Ο προσδιορισμός του μεγέθους του τεμαχίου DNA έγινε με βάση δείκτη της Fermentas γνωστού μοριακού βάρους .

Στη συνέχεια το DNA που προήλθε από την PCR της δεύτερης φάσης υποβλήθηκε σε πέψη με τα ένζυμα περιορισμού AgeI και XagI. Από την πέψη αυτή, προέκυψαν τρία τμήματα DNA μεγεθών ~817 bp ~509 bp και ~124 bp, εκ των οποίων το πρώτο φέρει την D269A μετάλλαξη (Εικόνες 3.3, Εικόνα 3.4).



**Εικόνα 3.3** Στην εικόνα φαίνονται οι θέσεις κοπής των ενζύμων Age I και Xag I στο τμήμα του DNA που προήλθε από τη δεύτερη φάση PCR και φέρει τη D269A μετάλλαξη, καθώς και τα τεμάχια που προκύπτουν από την πέψη.

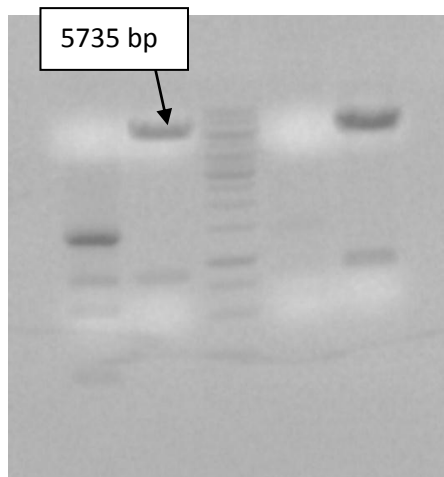
L1	L2	L3	L4	L5
----	----	----	----	----



**Εικόνα 3.4** Απεικόνιση πηκτώματος αγαρόζης με το DNA προϊόν της δεύτερης φάσης PCR μετά από πέψη του με τα περιοριστικά ένζυμα *Age I* και *Xag I*. Η ζώνη που υποδεικνύεται με βέλος προήλθε από τη *AgeI/XagI* πέψη του DNA προϊόντος της δεύτερης φάσης PCR, φέρει την D269A μετάλλαξη και έχει μέγεθος 817 bp. Ο προσδιορισμός του μεγέθους των τεμαχίων DNA έγινε με βάση δείκτη της *Fermentas* γνωστού μοριακού βάρους .

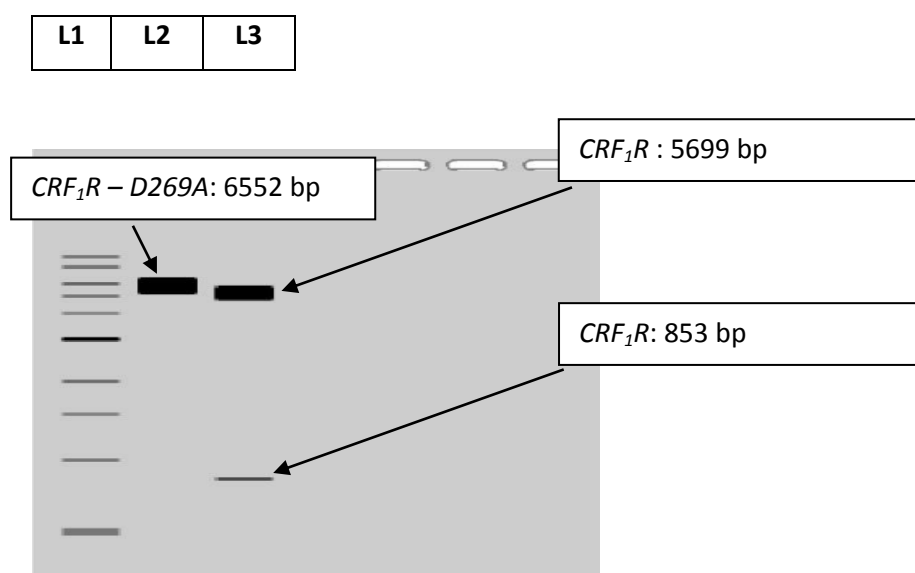
Επίσης σε *AgeI/XagI* πέψη υποβλήθηκε και το πλασμιδιακό DNA που κωδικοποιεί τον άγριο τύπο CRF<sub>1</sub>R (CRF<sub>1</sub>R/ρCIN4). Από την πέψη αυτή προέκυψαν δύο τμήματα ένα από τα οποία έχει μέγεθος 5735 bp και το οποίο απομονώθηκε σε πηκτώμα αγαρόζης (Εικόνα 3.5). Το εν λόγω τεμάχιο μαζί με εκείνο που προήλθε από την PCR της δεύτερης φάσης PCR και είχε μέγεθος 817 bp συρράφτηκαν (ligation) παρουσία T4 λιγάσης όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο «Υλικά και Μέθοδοι». Το προϊόν συρραφής ήταν το πλασμιδιακό DNA που φέρει τη μετάλλαξη D269A και ονομάζεται CRF<sub>1</sub>R – D269A /ρCIN4.

L1	L2	L3	L4	L5
----	----	----	----	----



**Εικόνα 3.5** Απεικόνιση πηκτώματος αγαρόζης με το προϊόν πέψης του DNA που περιέχει το γονίδιο του άγριου τύπου  $CRF_1R$ . Με το βέλος υποδεικνύεται το τεμάχιο DNA που έχει προκύψει από τη *AgeI/XbaI* πέψη του  $CRF_1R/pCIN4$  και το οποίο έχει μέγεθος 5735 bp.

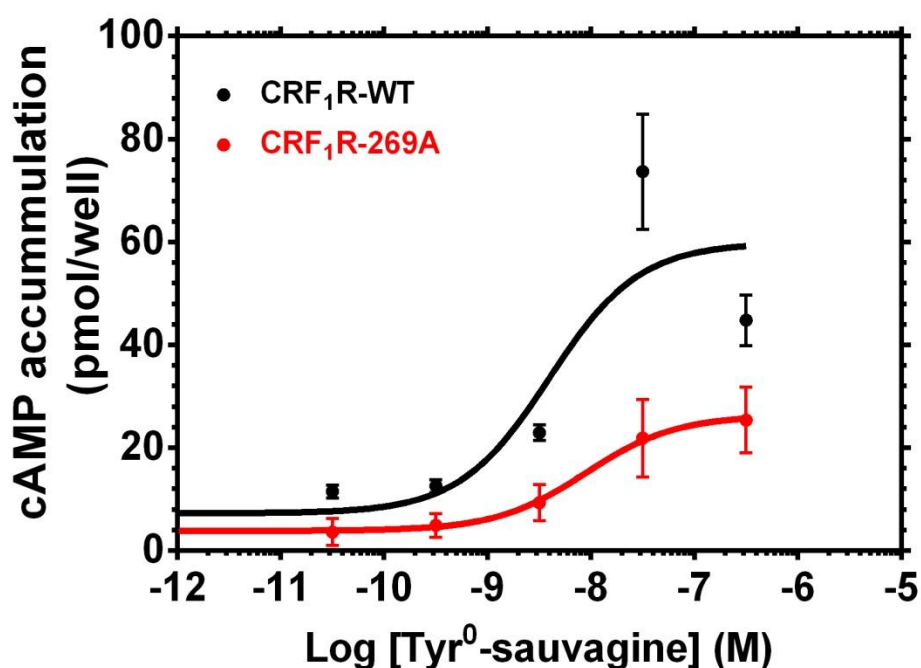
Τα ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν για να εισάγουν τη μετάλλαξη D269A στο πλασμιδιακό DNA που κωδικοποιεί τον  $CRF_1R$  καταργούν μια θέση κοπής με το ένζυμο *BsrGI*. Έτσι λοιπόν το DNA του μεταλλαγμένου υποδοχέα έχει μια θέση κοπής με *BsrGI* λιγότερη σε σχέση με το DNA του άγριου τύπου του  $CRF_1R$ . Χρησιμοποιώντας λοιπόν το ένζυμο *BsrGI* μαζί με το *EcoRI* (που κόβει μια φορά τόσο το DNA  $CRF_1 - D269A/pCIN4$  όσο και το DNA  $CRF_1/pCIN4$ ) εξετάσαμε αν το πλασμιδιακό DNA  $CRF_1R - D269A/pCIN4$  φέρει τη μετάλλαξη D269A. Σε πήκτωμα αγαρόζης (1%) φαίνεται ότι η *BsrGI/EcoRI* πέψη του DNA  $CRF_1R/pCIN4$  δημιουργεί δύο τμήματα του DNA που εμφανίζονται σαν 2 ζώνες. Αντίθετα το πλασμιδιακό DNA  $CRF_1 - D269A/pCIN4$  στο οποίο έχει καταργηθεί η θέση κοπής με *BsrGI* η πέψη με *BsrGI* και *EcoRI* δημιουργεί ένα DNA που έχει κοπεί μια μόνο φορά και εμφανίζεται σαν μια μόνο ζώνη στο πήκτωμα αγαρόζης (Εικόνα 3.6).



**Εικόνα 3.6** Απεικόνιση πηκτώματος αγαρόζης (1%), με τα προϊόντα από πέψη των DNA  $CRF_1R - WT$  και DNA  $CRF_1R - D269A$ . Η πέψη πραγματοποιήθηκε με τα ένζυμα περιορισμού *BsrGI* και *EcoRI*. Η πέψη του DNA του  $CRF_1R/pCIN4$  (από *BsrGI* και *EcoRI* ταυτόχρονα), δημιούργησε δύο ζώνες στο πήκτωμα αγαρόζης μεγέθους 5699bp και 853bp. Η πέψη του DNA του  $CRF_1R - D269A$  δημιούργησε μια ζώνη στο πήκτωμα αγαρόζης, μήκους 6552bp.

### 3.2 Επίδραση της μετάλλαξης D269A στην ικανότητα της σοβαγίνης να διεγείρει την παραγωγή ενδοκυττάριου κυκλικού AMP

Ο φαρμακολογικός χαρακτηρισμός του άγριου τύπου CRF<sub>1</sub>R και του μεταλλαγμένου υποδοχέα CRF<sub>1</sub>R – D269A επιτεύχθηκε με τον προσδιορισμό της ισχύος ( $-\log EC_{50}$ ) και της αποτελεσματικότητας (μέγιστο αποτέλεσμα) της Tyr<sup>0</sup>-σοβαγίνης να διεγείρει την παραγωγή ενδοκυττάριας κυκλικής μονοφωσφορικής αδενοσίνης (κυκλικού AMP) μετά από δέσμευσή του πεπτιδίου αυτού στους υποδοχείς αυτούς. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών έδειξαν ότι η ισχύς ( $-\log EC_{50}$ ) της Tyr<sup>0</sup>-σοβαγίνης να διεγείρει την παραγωγή κυκλικού AMP σε κύτταρα που εξέφραζαν μόνιμα τον άγριο τύπο CRF<sub>1</sub>R – WT (CRF<sub>1</sub>R/pCIN4) είχε τιμή ίση με  $-8,403$  ( $EC_{50} = 3.9$  nM). Η αντίστοιχη τιμή για τον μεταλλαγμένο υποδοχέα CRF<sub>1</sub>R – D269A, ήταν  $-8,053$  ( $EC_{50} = 8.9$  nM). Παράλληλα με τη μείωση της ισχύος της σοβαγίνης μειώθηκε από την μετάλλαξη και η αποτελεσματικότητα της, όπως φαίνεται στην εικόνα 3.7.



*Εικόνα 3.7 Διέγερση της παραγωγής ενδοκυττάριου κυκλικού AMP από την Tyr<sup>0</sup>-σοβαγίνη. Η διέγερση της παραγωγής ενδοκυττάριου κυκλικού AMP από αυξανόμενες συγκεντρώσεις Tyr<sup>0</sup>-σοβαγίνης, επιτεύχθηκε όπως αναφέρεται στο κεφάλαιο “Γλυκά και*

*Μέθοδοι”, σε άθικτα HEK 293 κύτταρα που εκφράζανε σταθερά τον άγριο τύπο CRF<sub>1</sub>R – WT και τον μεταλλαγμένο υποδοχέα CRF<sub>1</sub>R – D269A. Με βάση τους μέσους όρους των τιμών (εις διπλούν) και τα σταθερά λάθη τους έγινε μη γραμμική ανάλυση των αποτελεσμάτων και η τιμή (-logEC<sub>50</sub>) προσδιορίστηκε όπως αναφέρεται στη μεθοδολογία και αναγράφεται στο κυρίως κείμενο.*

## 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην εργασία αυτή εξετάσαμε το ρόλο του ασπαρτικού οξέος της θέσης 269 (D269) του CRF<sub>1</sub>R στη λειτουργία του υποδοχέα. Προκαταρκτικά πειράματα μοριακών προσομοιώσεων με βάση τη κρυσταλλική δομή του CRF<sub>1</sub>R [93], που έγιναν σε συνεργασία με το εργαστήριο του Dr. M. Ματσούκα, έδειξαν ότι το D269 εμπλεκόμενο σε δεσμούς με άλλα αμινοξέα του υποδοχέα παίζει ρόλο στη διατήρηση της λειτουργικής δομής του υποδοχέα. Με σκοπό να αποδείξουμε πειραματικά τα αποτελέσματα αυτά μετέλλαξαμε το D269 του CRF<sub>1</sub>R σε Ala (D269A) και εξετάσαμε την επίδραση της μετάλλαξης στην ικανότητα του υποδοχέα να διεγείρει τη παραγωγή ενδοκυττάριου AMP. Η επιλογή της αλανίνης έγινε διότι δεν έχει φορτίο και δεν προκαλεί σημαντικές αλλαγές στη γενική στερεοδιαμόρφωση του υποδοχέα [94]. Επίσης η μετάλλαξη σε αλανίνη είναι μια πολύ καλά ανεκτή μετάλλαξη, διότι η αλανίνη είναι το πλέον διαδεδομένο αμινοξύ στις πρωτεΐνες και βρίσκεται συχνά σε όλες τις δευτεροταγείς δομές αυτών όπως και σε όλες τις θέσεις μέσα σε αυτές [95-96]. Κατάργηση του αρνητικού φορτίου στη θέση 269 του CRF<sub>1</sub>R μετά την D269 μετάλλαξη μείωσε την ικανότητα της σοβαγίνης να ενεργοποιεί τον υποδοχέα αυτόν αφού ελάττωσε τόσο την ισχύ όσο και την αποτελεσματικότητα της να διεγείρει μέσω του CRF<sub>1</sub>R τη διέγερση των Gs πρωτεϊνών και έτσι τη παραγωγή ενδοκυττάριου κυκλικού AMP. Το αποτέλεσμα της μετάλλαξης αυτής του CRF<sub>1</sub>R στην ικανότητα της σοβαγίνης να ενεργοποιεί τον υποδοχέα είναι μάλλον έμμεσο, αφού στις μοριακές προσομοιώσεις η D269 δεν φαίνεται να αλληλεπιδρά με το πεπτιδίο. Πιθανόν η μετάλλαξη αυτή να άλλαξε τον τρόπο ενεργοποίησης του CRF<sub>1</sub>R από τους αγωνιστές του, όπως τη σοβαγίνη, έτσι ώστε αυτός να διεγείρει με μειωμένο βαθμό τις Gs-πρωτεΐνες.

Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν τη λειτουργική σημασία της D269 και της περιοχής του CRF<sub>1</sub>R στην οποία το αμινοξύ αυτό βρίσκεται. Το D269 του CRF<sub>1</sub>R γειτνιάζει με τα αμινοξέα των θέσεων 266, 267, 268 τα οποία βρέθηκαν ότι παίζουν ρόλο στη δέσμευση των πεπτιδίων του CRF στον CRF<sub>1</sub>R. Συγκεκριμένα, ταυτόχρονη αντικατάσταση των αμινοξέων αυτών του CRF<sub>1</sub>R με τα αντίστοιχα του CRF<sub>2</sub>R, δημιουργώντας έτσι τον μεταλλαγμένο DLV-CRF<sub>1</sub>R υποδοχέα μείωσε τη βιολογική ισχύ του CRF και της σοβαγίνης [86,97]. Αντικατάσταση του αμινοξέος στη θέση 254 του DLV-CRF<sub>1</sub>R υποδοχέα με το αντίστοιχο του CRF<sub>2</sub>R επανέφερε τις μειωμένες από τη DLV μετάλλαξη τιμές ισχύος της σοβαγίνης και του CRF στις φυσιολογικές τιμές τους. Το αποτέλεσμα αυτό υποδηλώνει τη σημασία της περιοχής αυτής του δεύτερου εξωκυττάριου βρόγχου του CRF<sub>1</sub>R στη δομή και τη λειτουργία του υποδοχέα.

Επιπρόσθετα η θέση της περιοχής αυτής μέσα στον CRF<sub>1</sub>R υποστηρίζει τη λειτουργική σημασία της. Η περιοχή αυτή συνδέει τον δεύτερο εξωκυττάριο βρόγχο (EL2) με την πέμπτη διαμεμβρανική περιοχή (TM5) του υποδοχέα. Μελέτες σε άλλους υποδοχείς της οικογένειας των GPCRs έχουν δείξει ότι δομικές αλλαγές της TM5 σχετίζονται με την ενεργοποίηση τους από αγωνιστές [98]. Οι δομικές αυτές αλλαγές μεταφέρονται στις κυτταροπλασματικές περιοχές των υποδοχέων και είναι υπεύθυνες για την αλληλεπίδραση τους με τις G-πρωτείνες και την διέγερση των τελευταίων. Αξιοσημείωτο αποτελεί το γεγονός ότι ο τρίτος ενδοκύτταριος βρόγχος (IL3) του CRF<sub>1</sub>R με τον οποίο συνδέεται η TM5, παίζει σημαντικό ρόλο στην αλληλεπίδραση του υποδοχέα με τις G-πρωτείνες και ενεργοποίηση των τελευταίων [99]. Επίσης πρόσφατη μελέτη που πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο μας έδειξε ότι ο CRF και η σοβαγίνη αλληλεπιδρούν με τα αμινοξέα 259 και 260 του EL2 του CRF<sub>1</sub>R. Είναι λοιπόν είναι πιθανόν οι δομικές αλλαγές που σχετίζονται με τη δέσμευση των πεπτιδίων του CRF στο EL2 του CRF<sub>1</sub>R να μεταφέρονται μέσω της TM5 στον IL3 του υποδοχέα και να παίζουν ρόλο στην αλληλεπίδραση του με τις G-πρωτείνες και συνεπώς στην εμφάνιση βιολογικού αποτελέσματος. Στις δομικές αυτές αλλαγές πιθανόν συμμετέχει η D269 που βρίσκεται στα όρια του EL2 και TM5.

## 5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Vale, W., J. Spiess, C. Rivier, and J. Rivier, Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. *Science*, 1981. 213(4514): p. 1394-7.
2. Charlton, B.G., I.N. Ferrier, and R.H. Perry, Distribution of corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in human brain. *Neuropeptides*, 1987. 10(4): p. 329-34.
3. De Souza, E.B., Corticotropin-releasing factor receptors: physiology, pharmacology, biochemistry and role in central nervous system and immune disorders. *Psychoneuroendocrinology*, 1995. 20(8): p. 789-819.
4. Kelley, M., and Kowall, N. (1989). Corticotropin-releasing factor immunoreactive neurons persist throughout the brain in Alzheimer's disease. *Brain Res* 501, 392-396.
5. Favrod-Coune, C. A., Gaillard, R. C., Langevin, H., Jaquier, M. C., Dolci, W., and Muller, A.F. (1986). Anatomical localization of corticotropin-releasing activity in the human brain. *Life Sci* 39, 2475-2481.
6. Makrigiannakis, A., Zoumakis, E., Margioris, A. N., Theodoropoulos, P., Stournaras, C., and Gravanis, A. (1995). The corticotropin-releasing hormone (CRH) in normal and tumoral epithelial cells of human endometrium. *J ClinEndocrinolMetab* 80, 185-189.
7. Sasaki, A., Tempst, P., Liotta, A. S., Margioris, A. N., Hood, L. E., Kent, S. B., Sato, S., Shinkawa, O., Yoshinaga, K., and Krieger, D. T. (1988). Isolation and characterization of a corticotropin-releasing hormone-like peptide from human placenta. *J ClinEndocrinolMetab* 67, 768-773.
8. Bruhn, T.O., et al., Corticotropin-releasing factor in the adrenal medulla. *Ann N Y AcadSci*, 1987. 512: p. 115-28.
9. Nicholson, W.E., et al., Pituitary and hypothalamic hormones in normal and neoplastic adrenal medullae: biologically active corticotropin-releasing hormone and corticotropin. *RegulPept*, 1987. 18(3-4): p. 173-88.
10. Stephanou, A., et al., Corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity and mRNA in human leukocytes. *Brain BehavImmun*, 1990. 4(1): p. 67-73.
11. Ekman, R., et al., Biosynthesis of corticotropin-releasing hormone in human T-lymphocytes. *J Neuroimmunol*, 1993. 44(1): p. 7-13.
12. Suda, T., et al., Immunoreactive corticotropin and corticotropin-releasing factor in human hypothalamus, adrenal, lung cancer, and pheochromocytoma. *J ClinEndocrinolMetab*, 1984. 58(5): p. 919-24.
13. Ciocca, D.R., et al., Corticotropin-releasing hormone, luteinizing hormone-releasing hormone, growth hormone-releasing hormone, and somatostatin-like immunoreactivities in biopsies from breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*, 1990. 15(3): p. 175-84.
14. Lederis, K., et al., Complete amino acid sequence of urotensin I, a hypotensive and corticotropin-releasing neuropeptide from *Catostomus*. *Science*, 1982. 218(4568): p. 162-5.
15. Montecucchi, P.C., et al., Isolation and amino acid composition of sauvagine. An active polypeptide from methanol extracts of the skin of the South American frog *Phyllomedusa sauvagei*. *Int J Pept Protein Res*, 1980. 16(3): p. 191-9.



16. Dautzenberg, F.M. and R.L. Hauger. The CRF peptide family and their receptors: yet more partners discovered. *Trends Pharmacol Sci.*, 2002. 23(2): p. 71-7.
17. Reul, J.M. and F. Holsboer, Corticotropin-releasing factor receptors 1 and 2 in anxiety and depression. *Curr Opin Pharmacol*, 2002. 2(1): p. 23-33.
18. Iino, K., et al., Urocortin expression in human pituitary gland and pituitary adenoma. *J ClinEndocrinolMetab*, 1997. 82(11): p. 3842-50.
19. Imperatore, A., et al., Urocortin 2 and urocortin 3 are expressed by the human placenta, deciduas, and fetal membranes. *Am J ObstetGynecol*, 2006. 195(1): p. 288-95.
20. Yamauchi, N., et al., Distribution of urocortin 2 in various tissues of the rat. *J Neuroendocrinol*, 2005. 17(10): p. 656-63.
21. Hsu, S.Y. and A.J. Hsueh, Human stresscopin and stresscopin-related peptide are selective ligands for the type 2 corticotropin-releasing hormone receptor. *Nat Med*, 2001. 7(5): p. 605-11.
22. Takahashi, K., et al., Urocortins as cardiovascular peptides. *Peptides*, 2004. 25(10): p. 1723-31.
23. Perrin, M.H. and W.W. Vale, Corticotropin Releasing Factor Receptors and Their Ligand Family. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1999. 885(1): p. 312-328.
24. Gulyas, J., et al., Potent, structurally constrained agonists and competitive antagonists of corticotropin-releasing factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. 92(23): p. 10575-9.
25. Ruhmann, A., et al., Structural requirements for peptidic antagonists of the corticotropin-releasing factor receptor (CRFR): development of CRFR2beta-selective antisauvagine-30. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. 95(26): p. 15264-9.
26. Tezval, H., et al., Cortagine, a specific agonist of corticotropin-releasing factor receptor subtype 1, is anxiogenic and antidepressive in the mouse model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004. 101(25): p. 9468-9473.
27. Rivier, J., et al., Potent and long-acting corticotropin releasing factor (CRF) receptor 2 selective peptide competitive antagonists. *J Med Chem*, 2002. 45(21): p. 4737-47.
28. Fahmy, H., et al., The "homeostasis hormone" and its CRF(1) receptor. From structure to function. *Hormones (Athens)*. 11(3): p. 254-71.
29. Chrousos, G.P., Stress and disorders of the stress system. *Nat Rev Endocrinol*, 2009.5(7): p. 374-81.
30. Guillemin, R., The adenohipophysis and its hypothalamic control. *Annu Rev Physiol*, 1967. 29: p. 313-48.
31. Binder, M.D., N. Hirokawa, and U. Windhorst, *Encyclopedia of neuroscience*. Vol. p. 5 v. ill ( (Ixxii). 2009, Berlin ; London: Springer 4393.
32. Skelton, K.H., M.J. Owens, and C.B. Nemeroff, The neurobiology of urocortin. *Regul Pept*, 2000. 93(1-3): p. 85-92.
33. Chrousos, G. P. (1995). The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune mediated inflammation. *N Engl J Med* 332, 1351-1362.
34. Karalis K, Sano H, Redwine J, Listwak S, Wilder RL, Chrousos GP. Autocrine or paracrine inflammatory actions of corticotropin-releasing hormone *in vivo*. *Science* 1991;254:421-3.

35. Crofford LJ, Sano H, Karalis K, et al. Local secretion of corticotropin releasing hormone in the joints of Lewis rats with inflammatory arthritis. *J Clin Invest* 1992;90:2555-64.
36. Karalis, Louis J. Muglia, Bae, Hilderbrand, Majzoub, CRH and the immune system, *Journal of Neuroimmunology* 72 1997 131–136.
37. Gravanis, A.; Makrigiannakis, A.; Zoumakis, E.; Margioris, A. N., Endometrial and myometrial corticotropin-releasing hormone (CRH): its regulation and possible roles, 2001, *Peptides*, Vol 22, 785-93.
38. Parkes, D. G.; Weisinger, R. S.; May, C. N., 2001, Cardiovascular actions of CRH and urocortin: an update, *Peptides*, 22, 821-7.
39. Makrigiannakis, A.; Zoumakis, E.; Kalantaridou, S.; Coutifaris, C.; Margioris, A. N.; Coukos, G.; Rice, K. C.; Gravanis, A.; Chrousos, G. P., Corticotropin-releasing hormone promotes blastocyst implantation and early maternal tolerance, 2001, *Nat Immunol*, Vol 2, 1018-24.
40. Venihaki, M.; Majzoub, J. A., 1999, Animal models of CRH deficiency, *Front Neuroendocrinol*, 20, 122-45.
41. Martinez, V.; Rivier, J.; Tach, Y., Peripheral injection of a new corticotropin-releasing factor (CRF) antagonist, astressin, blocks peripheral CRF- and abdominal surgery-induced delayed gastric emptying in rats, 1999, *J PharmacolExpTher*, Vol 290, 629-34.
42. Chrousos, G. P.; Torpy, D. J.; Gold, P. W., 1998, Interactions between the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and the female reproductive system: clinical implications, *Ann Intern Med*, Vol 129, 229-40.
43. Zoumakis, E.; Margioris, A. N.; Makrigiannakis, A.; Stournaras, C.; Gravanis, A., 1997, Human endometrium as a neuroendocrine tissue: expression, regulation and biological roles of endometrial corticotropin-releasing hormone (CRH) and opioid peptides, *J Endocrinol Invest*, 20, 158-67.
44. Fekete, Zorrilla, Physiology, pharmacology, and therapeutic relevance of urocortins in mammals: Ancient CRF paralogs. *Frontiers in Neuroendocrinology* 28 (2007) 1–27.
45. Davis, C.J. Pemberton, T.G. Yandle, J.G. Lainchbury, M.T. Rademaker, M.G. Nicholls, C.M. Frampton, A.M. Richards, Effect of urocortin 1 infusion in humans with stable congestive cardiac failure, *Clin. Sci. (Lond.)* 109 (2005) 381– 388.
46. Rademaker, C.J. Charles, E.A. Espiner, C.M. Frampton, J.G. Lainchbury, A.M. Richards, Four-day urocortin-I administration has sustained beneficial haemodynamic, hormonal, and renal effects in experimental heart failure, *Eur.Heart J.* 26 (2005) 2055–2062.
47. Wang, L.; Martinez, V.; Rivier, J. E.; Tache, Y., 2001, Peripheral urocortin inhibits gastric emptying and food intake in mice: differential role of CRF receptor 2, *Am J PhysiolRegulIntegr Comp Physiol*, 281, 1401-10.
48. Martinez, V.; Wang, L.; Rivier, J. E.; Vale, W.; Tache, Y., 2002, Differential actions of peripheral corticotropin-releasing factor (CRF), urocortin II, and urocortin III on gastric emptying and colonic transit in mice: role of CRF receptor subtypes 1 and 2, *J PharmacolExpTher*, 301, 611-7.
49. Makrigiannakis, A., et al. Endometrial and placental CRH as regulators of human embryo implantation. *J ReprodImmunol*, 2004. 62(1-2): p. 53-9.
50. Timpl P, Spanagel R, Sillaber I, Kresse A, Reul JM, Stalla GK, Blanquet V, Steckler T, Holsboer F, Wurst W: Impaired stress response and reduced anxiety in mice lacking a functional corticotropin-releasing hormone receptor 1. *Nat Genet* 1998, 19:162-166.

51. Smith GW, Aubry J-M, Delli F, Contarino A, Bilezikian LM, Gold LH, Chen R, Marchuk Y, Hauser C, Bentley CA et al.: Corticotropin releasing factor receptor 1-deficient mice display decreased anxiety, impaired stress response, and aberrant.
52. Stenzel-Poore MP, Heinrichs SC, Rivest S, Koob GF, Vale WW: Overproduction of corticotropin-releasing factor in transgenic CRF1 and CRF2 in anxiety and depression Reul and Holsboer 31 mice: a genetic model of anxiogenic behavior. *J Neurosci* 1994, 14:2579-2584.
53. Heinrichs SC, Lapansky J, Lovenberg TW, De Souza EB, Chalmers DT: Corticotropin-releasing factor CRF1, but not CRF2, receptors mediate anxiogenic-like behavior. *Regul Pept* 1997, 71:15-21.
54. Liebsch G, Landgraf R, Gerstberger R, Probst JC, Wotjak CT, Engelmann M, Holsboer F, Montkowski A: Chronic infusion of a CRH1 receptor antisense oligodeoxynucleotide into the central nucleus of the amygdala reduced anxiety-related behavior in socially defeated rats. *Regul Pept* 1995, 59:229-239.
55. Liebsch G, Landgraf R, Engelmann M, Lörcher P, Holsboer F: Differential behavioural effects of chronic infusion of CRH 1 and CRH 2 receptor antisense oligonucleotides into the rat brain. *J Psychiatr Res* 1999, 33:153-163.
56. Skutella T, Probst JC, Renner U, Holsboer F, Behl C: Corticotropinreleasing hormone receptor (type 1) antisense targeting reduces anxiety. *Neuroscience* 1998, 85:795-805
57. Smagin GN, Dunn AJ: The role of CRF receptor subtypes in stressinduced behavioural responses. *Eur J Pharmacol* 2000, 405:199-206
58. Okuyama S, Chaki S, Kawashima N, Suzuki Y, Ogawa S, Nakazato A, Kumagai T, Okubo T, Tomisawa K: Receptor binding, behavioral, and electrophysiological profiles of nonpeptide corticotropin-releasing factor subtype 1 receptor antagonists CRA 1000 and CRA 1001. *J Pharmacol Exp Ther* 1999, 289:926-935.
59. Holsboer F: CRHR1 Antagonists as novel treatment strategies. *CNS Spectrums* 2001, 6:590-594.
60. Nemeroff, C.B., The role of the corticotropin-releasing factor in the pathogenesis of major depression. *Pharmacopsychiatry*, 1988. 21(2): p. 76-78
61. Habib KE, Weld KP, Rice KC, Pushkas J, Champoux M, Listwak S et al. Oral administration of a corticotropin-releasing hormone receptor antagonist significantly attenuates behavioral, neuroendocrine, and autonomic responses to stress in primates. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000, 97:6079–6084
62. Pallai, P.V., et al., Structural homology of corticotropin-releasing factor, sauvagine, and urotensin I: circular dichroism and prediction studies. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1983. 80(22): p. 6770-4.
63. Beyermann, M., et al., A Role for a Helical Connector between Two Receptor Binding Sites of a Long-chain Peptide Hormone. *Journal of Biological Chemistry*, 2000. 275(8): p. 5702-5709.
64. Rivier, J., C. Rivier, and W. Vale, Synthetic competitive antagonists of corticotropin-releasing factor: effect on ACTH secretion in the rat. *Science*, 1984. 224(4651): p. 889-91.
65. Kornreich, W.D., R. Galyean, J.F. Hernandez, A.G. Craig, C.J. Donaldson, G. Yamamoto, C. Rivier, W. Vale, and J. Rivier, Alanine series of ovine corticotropin releasing factor (oCRF): a structure-activity relationship study. *J Med Chem*, 1992. 35(10): p. 1870-6.
66. Grammatopoulos, D.K. and G.P. Chrousos, Functional characteristics of CRH receptors and potential clinical applications of CRH-receptor antagonists. *Trends EndocrinolMetab*, 2002. 13(10): p. 436-44.

67. Lovenberg, T.W., et al., Cloning and characterization of a functionally distinct corticotropin-releasing factor receptor subtype from rat brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1995. 92(3): p. 836-840.
68. Eckart, K., et al., Pharmacology and biology of corticotropin-releasing factor (CRF) receptors. *Receptors Channels*, 2002. 8(3-4): p. 163-77.
69. Meyer, A.H., et al., Localization of the human CRF2 receptor to 7p21-p15 by radiation hybrid mapping and FISH analysis. *Genomics*, 1997. 40(1): p. 189-90.
70. Fu, D., et al., Residues in the seventh membrane-spanning segment of the dopamine D2 receptor accessible in the binding-site crevice. *Biochemistry*, 1996. 35(35): p. 11278-85.
71. Liapakis, G., et al., Members of CRF family and their receptors: from past to future. *Curr Med Chem*, 2010. 18(17): p. 2583-600.
72. VsevolodKatritch, VadimCherezov, and Raymond C. Stevens\* Structure-Function of the G-protein-Coupled Receptor Superfamily, *Annu Rev PharmacolToxicol*. 2013 Jan 6; 53: 531–556.
73. Chalmers, D.T., T.W. Lovenberg, and E.B. De Souza, Localization of novel corticotropin-releasing factor receptor (CRF2) mRNA expression to specific subcortical nuclei in rat brain: comparison with CRF1 receptor mRNA expression. *J Neurosci*, 1995. 15(10): p. 6340-50.
74. Grigoriadis, D.E., et al., Characterization of corticotropin-releasing factor receptor subtypes. *Ann N Y Acad Sci*, 1996. 780: p. 60-80.
75. Hillhouse, E.W. and D.K. Grammatopoulos, The molecular mechanisms underlying the regulation of the biological activity of corticotropin-releasing hormone receptors: implications for physiology and pathophysiology. *Endocr Rev*, 2006. 27(3): p. 260-86.
76. Vaughan, J., et al., Urocortin, a mammalian neuropeptide related to fish urotensin I and to corticotropin-releasing factor. *Nature*, 1995. 378(6554): p. 287-92.
77. Lewis, K., et al., Identification of urocortin III, an additional member of the corticotropin-releasing factor (CRF) family with high affinity for the CRF2 receptor. *ProcNatlAcadSci U S A*, 2001. 98(13): p. 7570-5.
78. Reyes, T.M., et al., Urocortin II: A member of the corticotropin-releasing factor (CRF) neuropeptide family that is selectively bound by type 2 CRF receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2001. 98(5): p. 2843-2848.
79. Stephen L. Belmonte, Burns C. Blaxall, Howard Rockman, Guest Editor, G Protein Coupled Receptor Kinases as Therapeutic Targets in Cardiovascular Disease, *Circulation Research*.2011; 109: 309-319.
80. Gether, U., Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. *Endocr Rev*, 2000. 21(1): p. 90-113.
81. Z. Farfel, H. R. Bourne, and T. Iiri. *N. Engl. J. Med*. 340(1999):1012.
82. Pioszak, A.A., et al., Molecular recognition of corticotropin-releasing factor by its G-protein-coupled receptor CRFR<sub>1</sub>. *J BiolChem*, 2008. 283(47): p. 32900-12.
83. Grace, C.R., et al., NMR structure and peptide hormone binding site of the first extracellular domain of a type B1 G protein-coupled receptor. *ProcNatlAcadSci U S A*, 2004. 101(35): p. 12836-41.

84. Grace, C.R., et al., Structure of the N-terminal domain of a type B1 G protein-coupled receptor in complex with a peptide ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. 104(12): p. 4858-63.
85. Hoare, S.R., et al., Mechanism of corticotropin-releasing factor type I receptor regulation by nonpeptide antagonists. *Mol Pharmacol*, 2003. 63(3): p. 751-65.
86. Liaw, C. W., D. E. Grigoriadis, et al. (1997). "Localization of agonist- and antagonist-binding domains of human corticotropin-releasing factor receptors." *Mol Endocrinol* 11(13): 2048-2053.
87. Assil, I.Q., et al., Juxtamembrane region of the amino terminus of the corticotropin releasing factor receptor type 1 is important for ligand interaction. *Biochemistry*, 2001. 40(5): p. 1187-95.
88. Dautzenberg, F.M., et al., Mapping of the ligand-selective domain of the *Xenopus laevis* corticotropin-releasing factor receptor 1: implications for the ligand-binding site. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. 95(9): p. 4941-6.
89. Assil-Kishawi, I. and A.B. Abou-Samra, Sauvagine cross-links to the second extracellular loop of the corticotropin-releasing factor type 1 receptor. *J Biol Chem*, 2002. 277(36): p. 32558-61.
90. Assil-Kishawi, I., et al., Residue 17 of sauvagine cross-links to the first transmembrane domain of corticotropin-releasing factor receptor 1 (CRFR1). *J Biol Chem*, 2008. 283(51): p. 35644-51.
91. Kraetke, O., et al., Photoaffinity cross-linking of the corticotropin-releasing factor receptor type 1 with photoreactive urocortin analogues. *Biochemistry*, 2005. 44(47): p. 15569-77.
92. Gkountelias K, Tselios T, Venihaki M, Deraos G, Lazaridis I, Rassouli O, Gravanis A, Liapakis G. Alanine scanning mutagenesis of the second extracellular loop of type 1 corticotropin-releasing factor receptor revealed residues critical for peptide binding. *Mol Pharmacol*, 2009 Apr. 75(4):793-800.
93. Hollenstein, K.; Kean, J.; Bortolato, A.; Cheng, R. K.; Dore, A. S.; Jazayeri, A.; Cooke, R. M.; Weir, M.; Marshall, F. H., Structure of class B GPCR corticotropin-releasing factor receptor 1. *Nature* 2013, 499 (7459), 438-43.
94. Cunningham, B.C. and J.A. Wells, *High-resolution epitope mapping of hGH-receptor interactions by alanine-scanning mutagenesis*. *Science*, 1989. 244(4908): p. 1081-5
95. Chothia, C., *The nature of the accessible and buried surfaces in proteins*. *J Mol Biol*, 1976. 105(1): p. 1-12.
96. Klapper, M.H., *The independent distribution of amino acid near neighbor pairs into polypeptides*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1977. 78(3): p. 1018-24
97. Liaw, C. W., Grigoriadis, D. E., Lovenberg, T. W., De Souza, E. B. & Maki, R. A. Localization of ligand-binding domains of human corticotropin-releasing factor receptor: a chimeric receptor approach. *Mol Endocrinol* 11, 980-985. (1997).
98. Liapakis, G.; Cordomi, A.; Pardo, L., The G-protein coupled receptor family: actors with many faces. *Curr Pharm Des* 2012, 18 (2), 175-85.
99. Pun, A.; Chen, J.; Delidakis, M.; Tang, J.; Liapakis, G.; Lehnert, H.; Levine, M. A.; Grammatopoulos, D. K., Mapping structural determinants within third intracellular loop that direct signaling specificity of type 1 corticotropin-releasing hormone receptor. *J Biol Chem* 2012, 287 (12), 8974-85.