



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ  
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**

**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

*Αντικατάσταση της Val195 με His του τύπου 2 υποδοχέα του εκλυτικού παράγοντα της κορτικοτροπίνης (CRF) και προδιορισμός των φαρμακολογικών ιδιοτήτων του μεταλλαγμένου υποδοχέα.*

**Πετροπούλου Αικατερίνη - Ισμήνη**

**Εργαστήριο Φαρμακολογίας**

Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Κρήτης

**Υπεύθυνος Καθηγητής Τμ. Ιατρικής:**

Λιαπάκης Γεώργιος

**Υπεύθυνος Καθηγητής Τμ. Χημείας:**

Κατερινόπουλος Χαράλαμπος

**Ηράκλειο, Οκτώβριος 2018**

# Ευχαριστίες

Με την ολοκλήρωση της πτυχιακής μου εργασίας, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες σε όλους όσους συνέβαλλαν στην εκπόνησή της.

Ευχαριστώ θερμά τον επιβλέπων καθηγητή μου, κ.Γεώργιο Λιαπάκη για την αμέριστη υποστήριξη και επιστημονική καθοδήγηση του καθ'όλη την διάρκεια της πτυχιακής μου εργασίας στο εργαστήριο Μοριακής Φαρμακολογίας του τμήματος Ιατρικής. Ευχαριστώ για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντάς μου το συγκεκριμένο θέμα, τις υποδείξεις του και το αμείωτο ενδιαφέρον του από την αρχή μέχρι το τέλος.

Επίσης θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον υπεύθυνο καθηγητή μου από το τμήμα Χημείας, κ. Κατερινόπουλο Χαράλαμπο για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε με την ανάθεση του συγκεκριμένου θέματος, αλλά κυρίως για όλες τις υποδείξεις και συμβουλές του, καθ' όλη την διάρκεια των φοιτητικών μου χρόνων.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου για την βοήθεια και τη συμπαράσταση τους. Ιδιαίτερα, τον κ. Μιχάλη Παρδαλό, για την τεράστια συνεισφορά ,το χρόνο που αφιέρωσε όλο αυτό το διάστημα και τις υποδείξεις του καθ'όλη τη διάρκεια της πτυχιακής μου εργασίας . Επίσης τον κ. Στέλιο Σακκελάρη και τον κ. Βλάσση Καραγεώργο, για την βοήθεια τους και τις γνώσεις που μου μετέδωσαν κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας της πτυχιακής μου . Ιδιαίτερα θερμές ευχαριστίες θέλω να δώσω στην συνεργάτη μου αλλά πάνω από όλα φίλη μου για την συνεχή συμπαράσταση της και την βοήθεια της Μαρίσα Κατέβα.

## Περιεχόμενα

Περίληψη.....	5
1. Εισαγωγή .....	6
1.1 Εκλυτικός παράγοντας κορτικοτροπίνης.....	6
1.2 Συγγενή πεπτίδια του CRF.....	7
1.2.1 Σοβαγίνη (SVG).....	7
1.2.2 Ουροκορτίνη I (UCN I).....	8
1.2.3 Ουροκορτίνη II & III (UCN II & UCN III) .....	8
1.2.4 Ουροτενσίνη (URO).....	9
1.2.5 Συνθετικά ανάλογα του CRF .....	9
1.3 Δομή του CRF και των συγγενών πεπτιδίων .....	10
1.4 Βιολογική δράση του CRF και των συγγενών πεπτιδίων .....	11
1.4.1 Πεπτίδια της οικογένειας του CRF και υποδοχείς τους στο κεντρικό νευρικό σύστημα .....	12
1.4.2 CRF και Ανοσοποιητικό σύστημα.....	13
1.5 Υποδοχείς του εκλυτικού παράγοντα κορτικοτροπίνης (CRF-Rs).....	13
1.5.1 Φαρμακολογικές ιδιότητες υποδοχέων CRF .....	16
1.6 Κυτταρική σηματοδότηση .....	17
1.7 Δομή και λειτουργία των υποδοχέων του CRF.....	19
2. Σκοπός.....	22
3. Υλικά και Μέθοδοι .....	23
3.1.1 Μεταλλαξιγένεση κατευθυνόμενης θέσης με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	23
3.1.2 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης – απομόνωση και καθαρισμός επιθυμητών τμημάτων DNA .....	27
3.1.3 Πέψη DNA με ένζυμα περιορισμού.....	28
3.1.4 Συρραφή τεμαχίων DNA – Ligation.....	29
3.1.5 Μετασχηματισμός βακτηρίων DH-10b E.coli με το πλασμιδιακό DNA που έφερε την επιθυμητή μετάλλαξη .....	30
3.1.6 Πολλαπλασιασμός μετασχηματισμένων βακτηρίων DH-10b E.coli .....	31
3.1.7 Καλλιέργεια κυττάρων HEK 293.....	31
3.1.8 Επιμόλυνση κυττάρων με πλασμιδιακό DNA (transient- Transfection).....	33
3.1.8 Μελέτες μέτρησης ενδοκυττάρου κυκλικού AMP (c-AMP).....	34
4. Αποτελέσματα.....	37

4.1 Δημιουργία του μεταλλαγμένου CRF <sub>2</sub> R υποδοχέα .....	37
4.2 Φαρμακολογικός χαρακτηρισμός του CRF <sub>2</sub> R-V195H.....	49
5. Συζήτηση.....	52
6. Βιβλιογραφία .....	55

# ΠΕΡΙΛΗΨΗ

---

Ο εκλυτικός παράγοντας της κορτικοτροπίνης (corticotropin releasing factor, CRF) είναι ένα πεπτίδιο 41 αμινοξέων που ασκεί πληθώρα βιολογικών δράσεων μέσω αλληλεπίδρασής του με 2 τύπους υποδοχέων, τον τύπο 1 (CRF<sub>1</sub>R) και τύπο 2 (CRF<sub>2</sub>R). Οι υποδοχείς του CRF ανήκουν στη κατηγορία των υποδοχέων που συζευγνύονται με τις G-πρωτεΐνες (GPCRs). Όπως όλοι οι GPCRs έτσι και οι CRF υποδοχείς περιέχουν μια αμινοτελική εξωκυττάρια περιοχή, μια καρβοξυτελική ενδοκυττάρια περιοχή και 7 διαμεμβρανικές περιοχές (TM<sub>s</sub>) που ενώνονται με τρεις ενδοκυττάριους και τρεις εξωκυττάριους βρόγχους. Ο CRF δεσμεύεται στις εξωκυττάρια περιοχές των υποδοχέων του, ενώ τα CRF<sub>1</sub>R-εκλεκτικά μη πεπτιδικά ανάλογα όπως η ανταλαρμίνη, δεσμεύονται σε αμινοξέα των TM<sub>s</sub> του CRF<sub>1</sub>R και ανταγωνίζονται τις δράσεις του CRF αλλοστερικά. Αξιοπερίεργο αποτελεί το γεγονός ότι ενώ όλες οι θέσεις δέσμησης των CRF<sub>1</sub>R-εκλεκτικών μη πεπτιδικών ανταγωνιστών στον CRF<sub>1</sub>R διατηρούνται στον CRF<sub>2</sub>R, τα μόρια αυτά δεν δεσμεύονται στον CRF<sub>2</sub>R. Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες, η ύπαρξη 2 αμινοξέων στον CRF<sub>1</sub>R που βρίσκονται πάνω από τις θέσεις δέσμησης των ανταγωνιστών αυτών και τα οποία δεν υπάρχουν στον CRF<sub>2</sub>R πιθανόν να παίζει ρόλο στην εκλεκτικότητα δέσμησης των CRF<sub>1</sub>R-εκλεκτικών μη πεπτιδικών ανταγωνιστών. Τα αμινοξέα αυτά είναι τα Met276 στην πέμπτη TM (TM<sub>5</sub>) και His199 στη τρίτη TM (TM<sub>3</sub>) του CRF<sub>1</sub>R. Στον CRF<sub>2</sub>R τα αντίστοιχα αμινοξέα είναι Val195 και Ile272. Υποθέτουμε ότι αντικαθιστώντας τα Val195 και Ile272 του CRF<sub>2</sub>R με τα αντίστοιχα His199 και Met276 του CRF<sub>1</sub>R, πιθανόν να δημιουργήσουμε μεταλλαγμένους CRF<sub>2</sub>R υποδοχείς (V195H, I272M και V195H+I272M) που θα δεσμεύουν τους CRF<sub>1</sub>R-εκλεκτικούς μη πεπτιδικούς ανταγωνιστές. Στη παρούσα μελέτη αντικαταστήσαμε τη Val195 του CRF<sub>2</sub>R με την αντίστοιχη His199 του CRF<sub>1</sub>R και μελετήσαμε τις φαρμακολογικές ιδιότητες του μεταλλαγμένου υποδοχέα, V195H, και ιδιαίτερα την ικανότητα του να δεσμεύει τους CRF<sub>2</sub>R-εκλεκτικούς μη πεπτιδικούς ανταγωνιστές. Οι μελέτες αυτές στο σύνολο τους θα βοηθήσουν στο σχεδιασμό νέων CRF<sub>1</sub>R- και CRF<sub>2</sub>R-εκλεκτικών μη πεπτιδικών ανταγωνιστών που θα χρησιμοποιηθούν στη μελέτη των υποδοχέων αυτών καθώς και του ρόλου τους σε διάφορες φυσιολογικές λειτουργίες και παθοφυσιολογικές καταστάσεις.

# 1. Εισαγωγή

---

## 1.1 Εκλυτικός παράγοντας της κορτικοτροπίνης

---

Ο εκλυτικός παράγοντας της κορτικοτροπίνης (CRF) είναι ένα πεπτίδιο που αποτελείται από 41 αμινοξέα. Είναι απαραίτητο για τη ρύθμιση της λειτουργίας του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ) καθώς και άλλων συστημάτων, όπως εκείνων του καρδιαγγειακού, γαστρεντερικού, ανοσοποιητικού και αναπαραγωγικού αποκτώντας έτσι σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της ομοιόστασης του οργανισμού. Ο CRF απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1981 από τον Vale από υποθαλαμικό εκχύλισμα προβάτου<sup>1</sup>. Ο CRF συντίθεται στον παρακοιλιακό πυρήνα (PVN) του υποθαλάμου και εκκρίνεται στην πυλαία κυκλοφορία και μέσω αυτής φτάνει στον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης (αδενοϋπόφυση), όπου προκαλεί την απελευθέρωση της αδρενοκορτικοτρόπου ορμόνης (ACTH), η οποία στη συνέχεια μέσω της κυκλοφορίας του αίματος ενεργοποιεί την απελευθέρωση γλυκοκορτικοειδών από τα επινεφρίδια<sup>2</sup>. Εκτός του υποθαλάμου το πεπτίδιο CRF βρέθηκε και σε περιοχές του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ), όπως και σε πολλές περιοχές στη περιφέρεια (κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, πάγκρεας, ήπαρ, ενδομήτριο, πλακούντα μήτρα, επινεφρίδια, και άλλα<sup>2-5</sup>).

## 1.2 Συγγενή πεπτίδια του CRF

Επιπρόσθετα του CRF βρέθηκαν και άλλα πεπτίδια τα οποία παρουσίασαν παρόμοιες ιδιότητες με αυτόν τόσο στα θηλαστικά όσο και σε άλλα είδη όπως ψάρια και αμφίβια. Τα πεπτίδια αυτά χαρακτηρίστηκαν ως CRF-συγγενή πεπτίδια και είναι η σοβαγίνη (Sauvagine ή SVG), η ουροτενσίνη-I (Urotensin I ή URO I), η ουροκορτίνη I (Urocortin I ή UCN I), η ουροκορτίνη II (Urocortin II ή UCN II) και η ουροκορτίνη III (Urocortin III ή UCN III)<sup>7,11,12,14,17,21,22</sup> (πίνακας 1).

Πεπτίδιο	Αλληλουχία	Μήκος	Ομοιότητα (%)
hCRF	SEEPPISLDLTFHLLREVLEMARAEQLAQQAHSNRKIMEII	41	100
oCRF	SQEPPISLDLTFHLLREVLEMTKADQLABQAHSNRKLLDIA	41	83
URO	NDDPPI SIDLTFHLLRNMIEMARIENEREQAGLNRRKYLDEV	41	54
hUCN	DNPSLSIDLTFHLLRLLTLELARTQSQRERAEQNRIIFDSV	40	43
SVG	ZGPPISIDLSLELLRKMIEIEKQEKEKQQAANNRLLEDTI	40	48
mUCNII	VILSLDVP IGLLRILLEQARYKAARNQAATNAQILAHV	38	34
mUCNIII	FTLSLDVPTNIMNIFNIDKAKNLRKAAANAQLMAQI	38	26

h/rCRF : CRF ανθρώπου/αρουραίου  
 SVG: Σοβαγίνη βατράχου  
 hUCN: Ουροκορτίνη ανθρώπου  
 mUCN III: Ουροκορτίνη III ποντικού

oCRF: προβάτου CRF  
 URO : Ουροτενσίνη-I  
 mUCN II: Ουροκορτίνη II ποντικού

**Πίνακας 1.** Αλληλουχία των αμινοξέων των πεπτιδίων της οικογένειας του CRF<sup>6</sup>

### 1.2.1 Σοβαγίνη (SVG)

Η σοβαγίνη (Sauvagine-SVG) είναι ένα πολυπεπτίδιο που απομονώθηκε από το δέρμα του βατράχου *Phyllomedusa sauvageii* το 1981<sup>12</sup>. Το 1982 οι Brown et al παρατήρησαν ότι ο CRF και SVG μοιράζονται σημαντικές δομικές ιδιότητες και προκαλούν παρόμοιες βιολογικές αποκρίσεις. Η SVG όπως και ο CRF προκαλεί την απελευθέρωση ACTH, και αύξηση των επιπέδων των κατεχολαμινών στο πλάσμα<sup>5</sup>. Η αλληλουχία της SVG παρουσιάζει 48% ομοιότητα με αυτή του ανθρώπινου (hCRF)<sup>6</sup> (Πίνακας 1). Ο hCRF έχει ακριβώς την ίδια αλληλουχία αμινοξέων με τον CRF του αρουραίου (rCRF) και γι αυτό οι CRF του ανθρώπου και αρουραίου ονομάζονται με τη κοινή ονομασία h/rCRF (Πίνακας 1).

### *1.2.2 Ουροκορτίνη I (UCN I)*

Η ουροκορτίνη, είναι ένα νέο μέλος της οικογένειας πεπτιδίων CRF. Η ουροκορτίνη κλωνοποιήθηκε από εγκέφαλο αρουραίου. Το 1995, οι Vaughan et al δημοσίευσαν την ανακάλυψη του πεπτιδίου (μήκους 40 αμινοξικών καταλοίπων).<sup>7</sup> Το πεπτίδιο αυτό ονομάστηκε ουροκορτίνη (Urocortin I/UCN I) και παρουσιάζει αμινοξική αλληλουχία του σε ποσοστό 53-63% με την αμινοξική αλληλουχία του CRF και 35% με της σοβαγίνης (πίνακας 1). Η συνθετική ουροκορτίνη προκαλεί αυξημένη έκκριση αδρενοκορτικοτροπικής ορμόνης (ACTH) τόσο in vitro όσο και in vivo <sup>7,8</sup>. Η UCN I βρέθηκε επίσης σε άνθρωπο, ποντικό, επίμυ και πρόβατο <sup>10</sup>. Η UCN I των διαφόρων ειδών βρέθηκαν να έχουν πολύ παρόμοιες δομές διαφέροντας από την ανθρώπινη UCNI σε δύο αμινοξέα <sup>8, 9, 10</sup>.

### *1.2.3 Ουροκορτίνες II & III (UCN II & UCN III)*

Η ουροκορτίνη II (Urocortin II / UCN II, είναι ένα πεπτίδιο 38 αμινοξέων, που εκφράζεται σε περιοχές του εγκεφάλου των ποντικών καθώς και άλλων θηλαστικών και ανακαλύφθηκε το 2001 από τους Reyes et al. Η ουροκορτίνη II μοιάζει με την ουροκορτίνη I.<sup>11</sup> Η αλληλουχία της UCN II του ποντικού παρουσιάζει 34% ομοιότητα με αυτή του ανθρώπινου CRF (πίνακας 1) <sup>6</sup>. Ένα ακόμη ανάλογο του CRF η ουροκορτίνη III (Urocortin III / UCN III) επίσης αποτελείται από 38 αμινοξέα (πίνακας 1). Η αλληλουχία της ανθρώπινης UCN III είναι κατά 90% ίδια με εκείνη του ποντικού, ενώ και οι δύο παρουσιάζουν 40% ομοιότητα με εκείνη της UCN II του ποντικού<sup>6,11,14</sup>. Παρατηρήθηκε επίσης ότι η UCN III του ποντικίου έχει ομολογία 26% με τον h/rCRF.



#### 1.2.4 Ουροτενσίνη (URO)

Η ουροτενσίνη (Urotensin/URO) απομονώθηκε το 1960 από τους Lederis et al από την ουρόφυση του είδους του ιχθύος *Catostomus commersonii*<sup>17</sup>. Είναι ένα πεπτίδιο 41 αμινοξικών καταλοίπων το οποίο εμφανίζει περίπου 50% ομολογία με τη CRH. Ακόμη παρουσιάζει μεγάλη ομολογία με τον CRF προβάτου και τη SVG<sup>17</sup>. Το 1983 οι Rivier et al έδειξαν ότι η URO διεγείρει όπως η SVG και ο CRF προβάτου (oCRF) την απελευθέρωση ACTH, *in vitro*, σε καλλιέργειες κυττάρων υπόφυσης αλλά και *in vivo* σε επίμυες<sup>16</sup>. Παρατηρήθηκε ότι η αλληλουχία της URO παρουσιάζει 54% ομοιότητα με αυτή του h/rCRF.<sup>6</sup>

#### 1.2.5 Συνθετικά ανάλογα του CRF

Εκτός από τα ενδογενή πεπτίδια της οικογένειας του CRF πρόσφατα συντέθηκαν διάφορα πεπτίδια τα οποία έχουν ως βάση τις δομές του CRF, των ουροκορτινών και της σοβαγίνης. Για παράδειγμα, η απαλειφή των πρώτων 11 αμινοτελικών υπολειμμάτων από ανθρώπινο CRF σε συνδυασμό με τροποποιήσεις του υπόλοιπου πεπτιδίου δημιούργησαν το ανάλογο της αστρεσσίνης [astressin: cyclo(30 – 33)], DPhe12,Nle21, Glu30, Lys33, Nle38 hCRF(12 – 41) καθώς και διάφορα ανάλογα της σοβαγίνης, όπως η αντισοβαγίνη-30<sup>16</sup>. Επίσης συντέθηκαν και μη πεπτιδικά μικρομοριακά ανάλογα όπως η ανταλαρμίνη και το NBI 27914<sup>16</sup>.

## 1.3 Δομή του CRF και των συγγενών πεπτιδίων

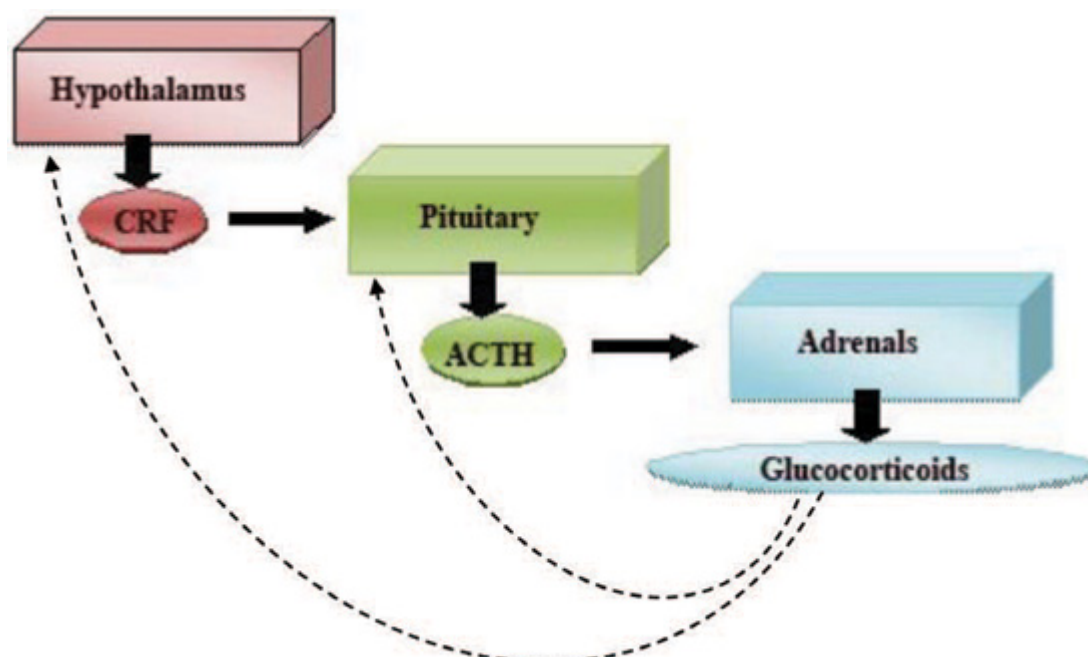
---

Ο CRF, καθώς και τα συγγενή τους πεπτίδια, όπως η SVG και η URO, είναι πεπτίδια που περιέχουν αμινοτελικές (1-7 υπολείμματα) και καρβοξυτελικές (36-41 κατάλοιπα) περιοχές συνδεδεμένες μεταξύ τους μέσω ενός εσωτερικού τμήματος 25 αμινοξέων. Αυτό το εσωτερικό τμήμα έχει την τάση να αποκτά μια άλφα-ελικοειδή δομή, η οποία είναι η προτιμώμενη διαμόρφωση του CRF και των σχετικών πεπτιδίων του σε υδρόφοβο ή αμφίφιλο περιβάλλον, ενώ αποσταθεροποιείται σε υδάτινο περιβάλλον<sup>13</sup>. Η ικανότητα του CRF και των συγγενών του πεπτιδίων να αποκτήσουν άλφα-ελικοειδή διαμόρφωση σε υδρόφοβο περιβάλλον οδήγησε στην υπόθεση ότι η σύνδεσή τους με συγκεκριμένους υποδοχείς CRF που βρίσκονται στο λιπιδικό περιβάλλον της πλασματικής μεμβράνης μεταβάλλει τη διαμόρφωση των πεπτιδίων σε άλφα-ελικοειδή μορφή η οποία είναι και η βιολογικά ενεργή μορφή του πεπτιδίου. Η υπόθεση αυτή στηρίζεται από το γεγονός ότι η αντικατάσταση αρκετών υπολειμμάτων της CRF με υπολείμματα που σταθεροποιούν τις άλφα-ελικοειδείς δομές είχαν ως αποτέλεσμα την αύξηση της βιολογικής ισχύος του πεπτιδίου<sup>18</sup>.

Σημαντικό ρόλο στη βιολογική δραστηριότητα των πεπτιδίων έχουν επίσης οι αμινοτελικές και οι καρβοξυτελικές περιοχές τους. Συγκεκριμένα, τα πεπτίδια που έχουν μόνο μία από αυτές τις περιοχές, ή τροποποιημένο το καρβοξυτελικό άκρο τους εμφανίζουν μικρή έως ασήμαντη βιολογική δραστηριότητα τους. Ο σημαντικός βιολογικός ρόλος των δυο περιοχών αυτών του CRF φαίνεται και από το γεγονός ότι αντικατάσταση με αλανίνη μερικών αμινοξέων στην καρβοξυτελική και αμινοτελική περιοχή του CRF, οδήγησε σε μείωση ή κατάργηση της βιολογικής του δραστηριότητας<sup>46</sup>.

## 1.4 Βιολογική δράση του CRF και των συγγενών πεπτιδίων

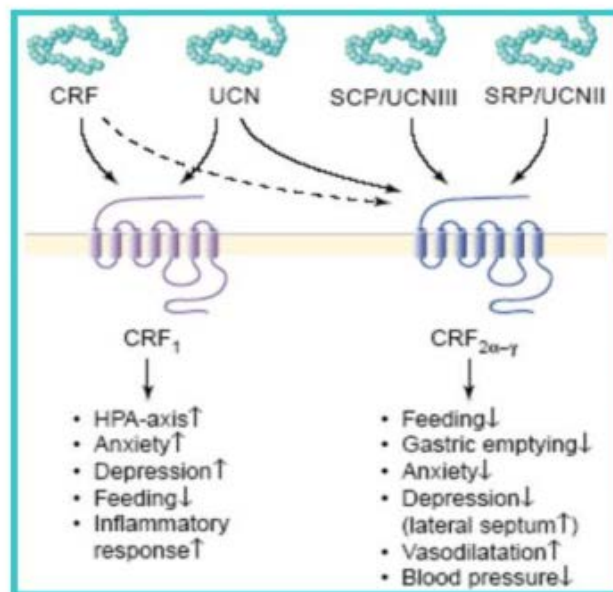
Η διατήρηση της ομοιόστασης είναι μια βασική προϋπόθεση για τη ζωή. Αυτή η πολύπλοκη ισορροπία συνεχώς απειλείται από εσωτερικά ή εξωγενή αίτια, τα κοινώς αποκαλούμενα στρεσογόνα ερεθίσματα. Η διατήρηση της ομοιόστασης απαιτεί αλλαγές στη λειτουργία του ενδοκρινικού συστήματος, συμπεριλαμβανομένου του άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-επινεφριδίων (HPA) (εικόνα 1). Διέγερση του HPA άξονα έχει σαν αποτέλεσμα την απελευθέρωση της κορτικοτροπίνης (ACTH) από την υπόφυση και μεταφορά της μέσω της κυκλοφορίας του αίματος στα επινεφρίδια όπου προκαλεί την απελευθέρωση γλυκοκορτικοειδών. Η έκκριση γλυκοκορτικοειδών από τα επινεφρίδια αποτελεί το τελικό στάδιο ενεργοποίησης του άξονα HPA <sup>1,2</sup> Στη διατήρηση της ομοιόστασης παίζουν ρόλο και αρκετές άλλες προσαρμοστικές αποκρίσεις, που περιλαμβάνουν αλλαγές στη λειτουργία διαφόρων συστημάτων του οργανισμού μας όπως του ανοσοποιητικού και του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ) <sup>25</sup>. Οι σημαντικές βιολογικές δράσεις των πεπτιδίων αυτών απεικονίζονται στην εικόνα 2.



Εικόνα 1 . Απεικόνιση του άξονα υποθαλάμου-υποφύσεως (HPA).<sup>25</sup>

### 1.4.1 Πεπτίδια της οικογένειας του CRF και υποδοχείς τους στο κεντρικό νευρικό σύστημα

Εκτός της ενεργοποίησης του HPA άξονα, ο CRF παίζει επίσης σημαντικό ρόλο σε πολλές περιοχές του ΚΝΣ . Τροποποίηση των CRF συστημάτων στο ΚΝΣ και HPA άξονα σχετίζεται με παθοφυσιολογικές καταστάσεις όπως χρόνιο άγχος και κατάθλιψη (εικόνα 2). Άτομα με μελαγχολική κατάθλιψη παρουσιάζουν υπερλειτουργία του HPA άξονα, πολύ αυξημένα επίπεδα CRF στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ΕΝΥ) και έντονη CRF νευροδιαβίβαση στον εγκέφαλο<sup>22,23</sup>. Τέλος, χορήγηση CRF στον εγκέφαλο πειραματόζωων αναπαράγει συμπτωματολογία μείζονος κατάθλιψης, δηλαδή αϋπνία, μειωμένη όρεξη, καθώς και εκδήλωση άγχους<sup>6, 15</sup>.



Εικόνα 2. Βιολογικές δράσεις του CRF και των συγγενών του πεπτιδίων<sup>6</sup>

### 1.4.2 CRF και Ανοσοποιητικό σύστημα

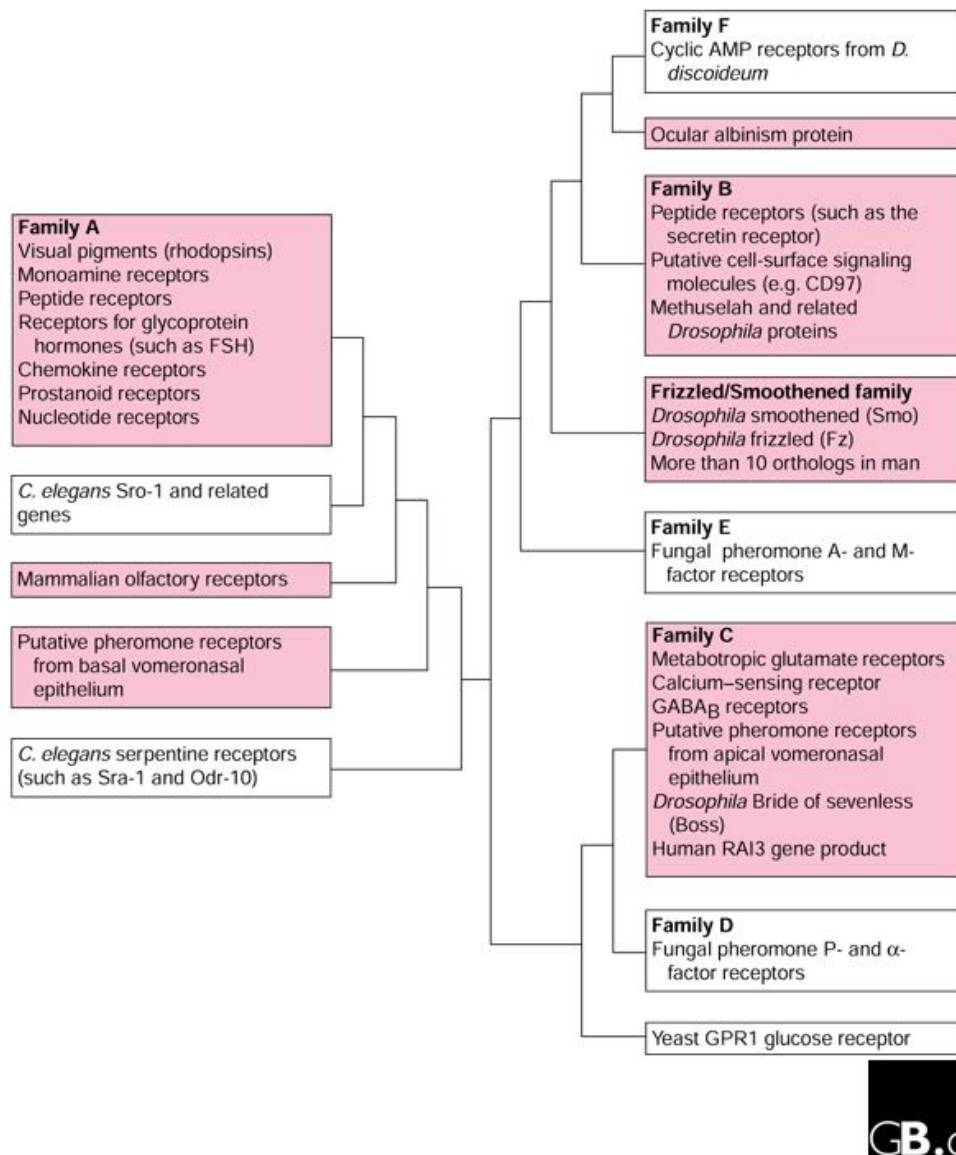
Ως αποτέλεσμα, της ενεργοποίησης του HPA άξονα, έχουμε την σημαντική αύξηση των επιπέδων των γλυκοκορτικοειδών που έχει ως συνέπεια την τροποποίηση της ανοσολογικής/φλεγμονώδους απόκρισης του οργανισμού (εικόνα 2)<sup>32</sup>. Συγκεκριμένα τα γλυκοκορτικοειδή μειώνουν τη φλεγμονή επηρεάζοντας την έκκριση κυτοκινών όπως IL-4, IL-10, IL-12 και τη δημιουργία T-βοηθητικών κυττάρων<sup>32</sup>. Αντίθετα με την κεντρική αντιφλεγμονώδη δράση του CRF μέσω έκκρισης των γλυκοκορτικοειδών μέσω ενεργοποίησης του HPA άξονα, στην περιφέρεια, έχει βρεθεί ότι ο CRF δρά ως προφλεγμονώδης παράγοντας<sup>33</sup>. Επίσης έχει βρεθεί ότι ο CRF προκαλεί αποκοκκίωση των ιστιοκυττάρων στους πνεύμονες ή το δέρμα με αποτέλεσμα την εκδήλωση άσθματος ή αλλεργικού εκζέματος αντίστοιχα<sup>36</sup>.

## 1.5 Υποδοχείς του εκλυτικού παράγοντα κορτικοτροπίνης (CRF-Rs)

---

Για να πραγματοποιηθεί η δράση του CRF και των συγγενών πεπτιδίων, πρέπει αρχικά να γίνει αλληλεπίδρασή τους με ειδικές θέσεις δέσμησης οι οποίες είναι γλυκοπρωτεΐνες της πλασματικής μεμβράνης του κυττάρου (μοριακό βάρος από 58.000-75.000 Da λόγω διαφορετικού βαθμού γλυκοζυλίωσης)<sup>35</sup>. Οι θέσεις δέσμησης του CRF συζευγνύονται με τις G-πρωτεΐνες αφού το GTP-γS που είναι ένα μη υδρολυόμενο παράγωγο του GTP το οποίο δεσμεύεται μη αντιστρεπτά με τις G-πρωτεΐνες μείωσε σημαντικά τη δέσμηση του CRF<sup>35</sup>. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι το GTP-γS δεν επιτρέπει να σχηματιστούν τα υψηλής συγγένειας σύμπλοκα μεταξύ των θέσεων δέσμησης του CRF με τις G-πρωτεΐνες<sup>19,27</sup>. Σημαντικό ρόλο στην αλληλεπίδραση των θέσεων δέσμησης του CRF με τις G-πρωτεΐνες παίζει επίσης το μαγνήσιο. Στη συνέχεια βρέθηκε σε μελέτες κλωνοποίησης ότι οι θέσεις δέσμησης του CRF είναι υποδοχείς της πλασματικής μεμβράνης του κυττάρου<sup>23</sup>. Υπάρχουν δύο κύριοι τύποι υποδοχέα με 70% ομολογία στην αμινοξική τους αλληλουχία και ένας τρίτος που βρέθηκε πρόσφατα στο γατόψαρο (εικόνα 3)<sup>20</sup>.





**Εικόνα 4.** Απεικόνιση των διαφορετικών υποοικογενειών των GPCRs.<sup>42</sup>

Ο τύπος 1 υποδοχέα του CRF (CRF<sub>1</sub>R) κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 415 αμινοξέων. Γενικά, έχουν προσδιοριστεί οκτώ ισομορφές του CRF<sub>1</sub>R (CRF<sub>1α</sub>R, CRF<sub>1β</sub>R, CRF<sub>1γ</sub>R, CRF<sub>1δ</sub>R, CRF<sub>1ε</sub>R, CRF<sub>1ζ</sub>R, CRF<sub>1η</sub>R, CRF<sub>1θ</sub>R) οι οποίες έχουν προκύψει από εναλλακτικό μάτισμα του γονιδίου και διαφέρουν δομικά και λειτουργικά μεταξύ τους<sup>39</sup>. Η ισομορφή CRF<sub>1α</sub>R (ή CRF<sub>1</sub>R), που είναι η μόνη πλήρως λειτουργική ισομορφή του υποδοχέα, εντοπίζεται στον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης και είναι υπεύθυνη για έκλυση της ACTH μετά από ενεργοποίηση του υποδοχέα από τον CRF. Ο CRF<sub>1α</sub>R, όπως και ο CRF, εκφράζεται σε διάφορες περιοχές του ΚΝΣ<sup>39</sup>. Στην

περιφέρεια, εντοπίζεται στις ωοθήκες, τον σπλήνα, τα επινεφρίδια, το δέρμα, το γαστρεντερικό σύστημα και το λιπώδη ιστό<sup>39</sup>.

Ο τύπος 2 υποδοχέα του CRF (CRF<sub>2</sub>R ή CRF<sub>2α</sub>R) κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 411 αμινοξέων<sup>39</sup>. Επιπρόσθετα του CRF<sub>2α</sub>R υπάρχουν άλλες δυο ισομορφές του CRF<sub>2</sub>R. Όλες οι ισομορφές του CRF<sub>2</sub>R διαφέρουν μόνο στο εξωκυττάριο αμινοτελικό τελικό άκρο τους. Συγκεκριμένα, ο CRF<sub>2β</sub>R διαφέρει από τον CRF<sub>2α</sub>R στα 34 πρώτα αμινοξέα του τα οποία έχουν αντικατασταθεί στον CRF<sub>2β</sub>R από 54 διαφορετικά. Ο CRF<sub>2α</sub>R εκφράζεται κυρίως στον υποθάλαμο, πλάγιο διάφραγμα, οσφρητικός βολβός και στην υπόφυση. Ο CRF<sub>2β</sub>R ανιχνεύεται στις εγκεφαλικές αρτηρίες, αλλά κατά κύριο λόγο στην περιφέρεια (καρδιά, σκελετικός μυς, γαστρεντερικός σωλήνας και λιπώδη ιστό). Ο CRF<sub>2γ</sub>R έχει ανιχνευθεί μόνο στην μεταιχμιακή περιοχή του ΚΝΣ του ανθρώπου. Αντίθετα με τον CRF<sub>1</sub>R, οι ισομορφές του CRF<sub>2</sub>R είναι και οι τρεις λειτουργικές<sup>39, 40</sup>.

### *1.5.1 Φαρμακολογικές ιδιότητες υποδοχέων CRF*

Οι υποδοχείς CRF1 (CRF<sub>1</sub>R) και CRF2 (CRF<sub>2</sub>R) δεσμεύουν τα πεπτίδια της οικογένειας του CRF με διαφορετικές συγγένειες. Ο φαρμακολογικός χαρακτηρισμός των πεπτιδίων της οικογένειας του CRF έδειξε ότι ορισμένα δεσμεύονται εκλεκτικά στον CRF<sub>1</sub>R ή στον CRF<sub>2</sub>R και άλλα μη εκλεκτικά. Συγκεκριμένα, τα h/rCRF και oCRF συνδέονται με τον CRF<sub>1</sub>R με υψηλότερες συγγένειες παρά με CRF<sub>2</sub>R<sup>47</sup>. Η συγγένεια του oCRF για τον CRF<sub>1</sub>R είναι 180 φορές υψηλότερη από αυτή για τον CRF<sub>2</sub>R. Η UCN I, αν και παρουσιάζει λίγο μεγαλύτερη συγγένεια από τον h/rCRF για τον CRF<sub>1</sub>R, δεσμεύεται στον CRF<sub>2</sub>R με πολύ μεγαλύτερη συγγένεια δέσμευσης από ότι ο h/rCRF. Βάσει του παραπάνω και στηριζόμενος στο τρόπο έκφρασης των δυο υπότυπων υποδοχέων του CRF στο ΚΝΣ ο Vaughan και οι συνεργάτες του, υπέθεσαν ότι η UCN I είναι ο φυσιολογικός ενδογενής CRF<sub>2</sub>R αγωνιστής, ενώ ο CRF είναι ο φυσιολογικός ενδογενής CRF<sub>1</sub>R αγωνιστής<sup>49</sup>. Σε έντονη αντίθεση, οι UcnII και UcnIII είναι ενδογενείς αγωνιστές που δεσμεύονται εκλεκτικά στον



CRF<sub>2</sub>R. Αντίθετα, τα UCN και SVG είναι μη εκλεκτικά πεπτίδια και δεσμεύονται στους υποδοχείς CRF<sub>1</sub>R και CRF<sub>2</sub>R με παρόμοιες συγγένειες<sup>40</sup>.

## 1.6 Κυτταρική σηματοδότηση

---

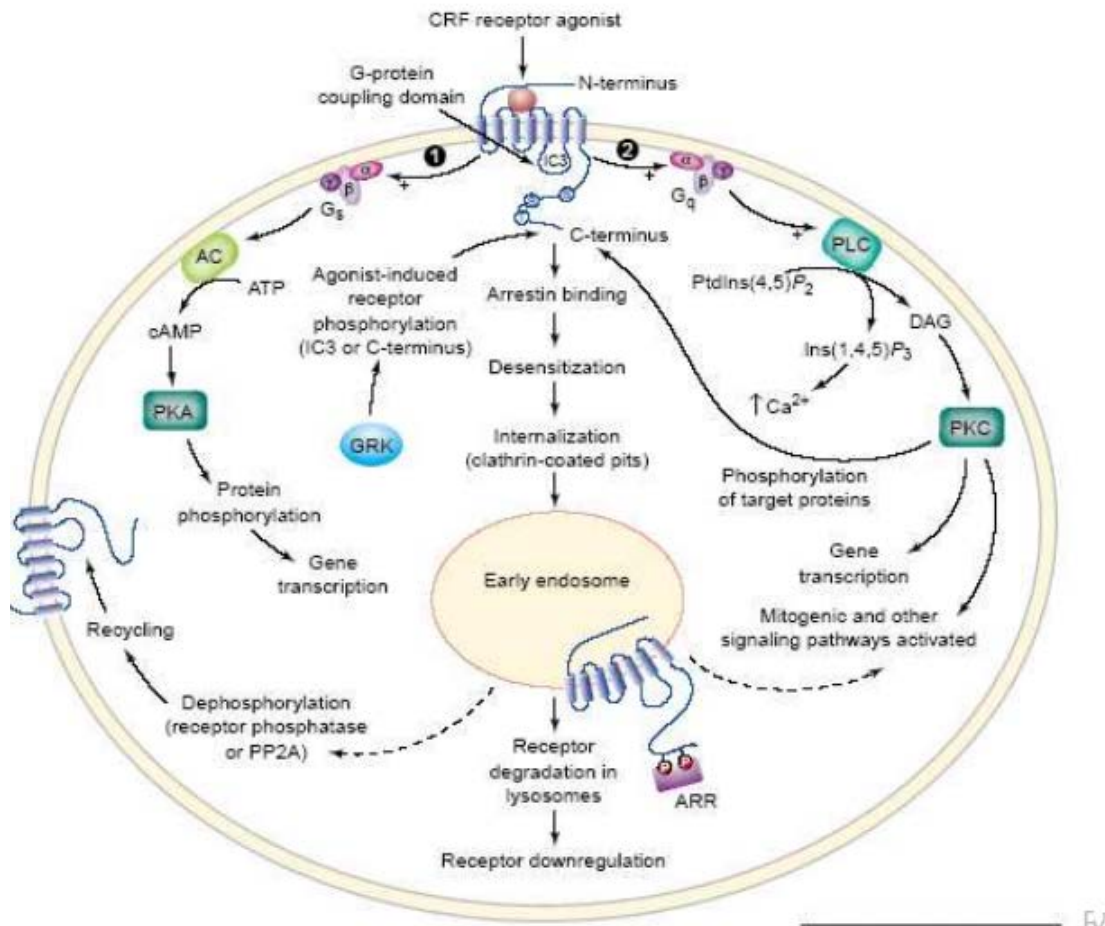
Η δημιουργία συμπλόκου CRF υποδοχέα-CRF αγωνιστών, οδηγεί σε αλλαγή της στερεοδιαμόρφωσης του υποδοχέα με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της G-πρωτεΐνης που είναι ένα τριμερές σύμπλοκο αποτελούμενο από τις υπομονάδες α, β και γ. Η ενεργοποίηση των υπομονάδων Gα από τους υποδοχείς του CRF οδηγεί στην αντικατάσταση του GDP με GTP στην Gα υπομονάδα και αποσύνδεση των δεσμευμένων με το GTP, Gα υπομονάδων από τα ετεροδιμερή Gβγ και τον υποδοχέα<sup>43</sup>. Στη συνέχεια οι ενεργοποιημένες υπομονάδες Gα και τα διμερή Gβγ οδηγούν σε κάποιο βιολογικό αποτέλεσμα, ρυθμίζοντας αρκετά μονοπάτια σηματοδότησης<sup>43</sup>.

Συγκεκριμένα ο CRF<sub>1</sub>R έχει αποδειχθεί ότι ενεργοποιεί μέσω της Gs πρωτεΐνης το ένζυμο της αδενυλικής κυκλάσης (εικόνα 5), με αποτέλεσμα τη παραγωγή ενδοκυτταρικού cAMP που στη συνέχεια διεγείρει τη πρωτεϊνική κινάση A (PKA)<sup>43</sup>. Η ενεργός PKA φωσφορυλιώνει εξειδικευμένα κατάλοιπα σερίνης και θρεονίνης σε πολλούς πρωτεϊνικούς στόχους, συμπεριλαμβανομένων και διαύλων ιόντων, τροποποιώντας έτσι τη λειτουργία τους<sup>43</sup>. Η ενεργός PKA, μπορεί επίσης να διεγείρει την έκφραση γονιδίων μέσω φωσφορυλίωσης του ενεργοποιητή της μεταγραφής τους που ονομάζεται πρωτεΐνη δέσμευσης στο στοιχείο απόκρισης για το κυκλικό AMP (CREB)<sup>43,44</sup>.

Οι υποδοχείς του CRF μπορούν επίσης να διεγείρουν σηματοδοτικά μονοπάτια μέσω ενεργοποίησης των Gq πρωτεϊνών (εικόνα 5)<sup>43, [1] (Hillhouse and Grammatopoulos 2006)<sup>44</sup></sup>.

Συγκεκριμένα, η δέσμευση του CRF με τους υποδοχείς του μπορεί να διεγείρουν τις Gq πρωτεΐνες με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης C (PLC). Η ενεργοποιημένη PLC στη συνέχεια υδρολύει τη 4,5 διφωσφορική φωσφατιδυλινοσιτόλη, παράγοντας έτσι διακυλογλυκερόλη (DAG) και 1,4,5 τριφωσφοροϊνοσιτόλη (IP3). Το IP3 συνδέεται σε υποδοχείς του στις ενδοκυττάρια αποθήκες ασβεστίου και προκαλεί την απελευθέρωση του με αποτέλεσμα την αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσής του. Το ασβέστιο μαζί με τη DAG προκαλεί την

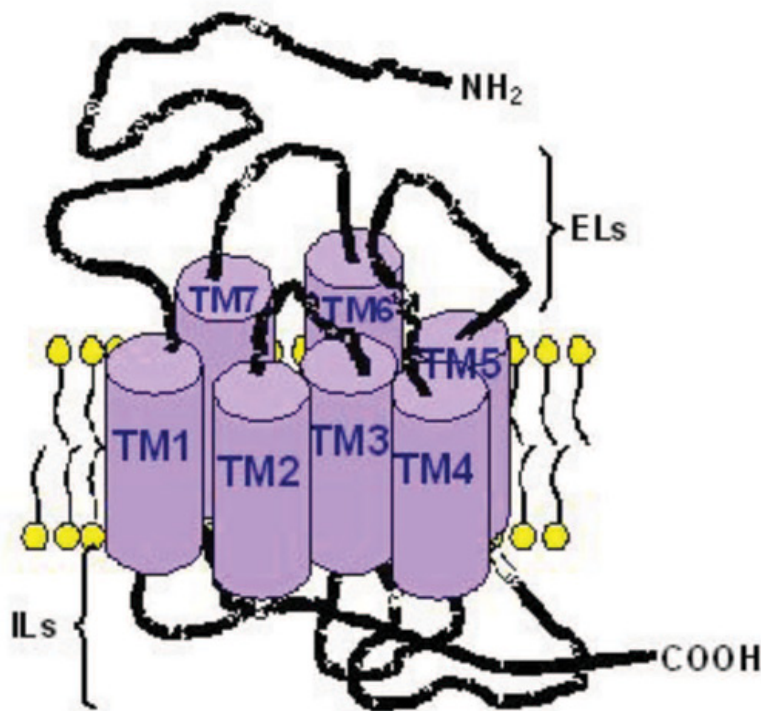
ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC), η οποία με τη σειρά της φωσφορυλιώνει διάφορους ενδοκυττάριους στόχους<sup>43,44</sup>.



**Εικόνα 1 .** Σχηματική αναπαράσταση των ενδοκυττάριων σηματοδοτικών οδών που διεγείρει η ενεργοποίηση των υποδοχέων του CRF<sup>6</sup>.

## 1.7 Δομή και λειτουργία των υποδοχέων του CRF

Οι υποδοχείς CRF, όπως όλοι οι GPCRs, αποτελούνται από τις παρακάτω λειτουργικές περιοχές. Από 7 άλφα ελικοειδή διαμεμβρανικά τμήματα (TM<sub>ς</sub>), μία εξωκυττάρια αμινοτελική περιοχή (N-περιοχή) και μια ενδοκυτταρική καρβοξυτελική (C-περιοχή) (εικόνα 6). Οι TM<sub>ς</sub> των υποδοχέων του CRF συνδέονται μεταξύ τους με τρεις εξωκυτταρικούς βρόγχους (ELs) και τρεις ενδοκυτταρικούς βρόγχους (ILs) (εικόνα 6). Οι εξωκυττάρια περιοχές και τα εξωκυτάρια τμήματα των TM<sub>ς</sub> των υποδοχέων του CRF αλληλεπιδρούν με τα πεπτίδια, ενώ οι ενδοκυττάρια με τις G-πρωτεΐνες. Αλληλεπίδραση των πεπτιδίων-αγωνιστών με το εξωκυττάριο τμήμα του υποδοχέα οδηγεί σε δομικές αλλαγές που τον ενεργοποιούν και μεταφερόμενες μέσω των διαμεμβρανικών περιοχών του στο ενδοκυττάριο τμήμα του είναι υπεύθυνες για την αλληλεπίδραση του με τις Gπρωτεΐνες και τη διέγερση τους<sup>37,38</sup>.



Εικόνα 2. Σχηματική απεικόνιση του υποδοχέα CRF<sub>1</sub>. Οι διαμεμβρανικές περιοχές αναπαρίστανται ως κύλινδροι και συνδέονται μεταξύ τους με τρία εξωκυτταρικά (ELs) και

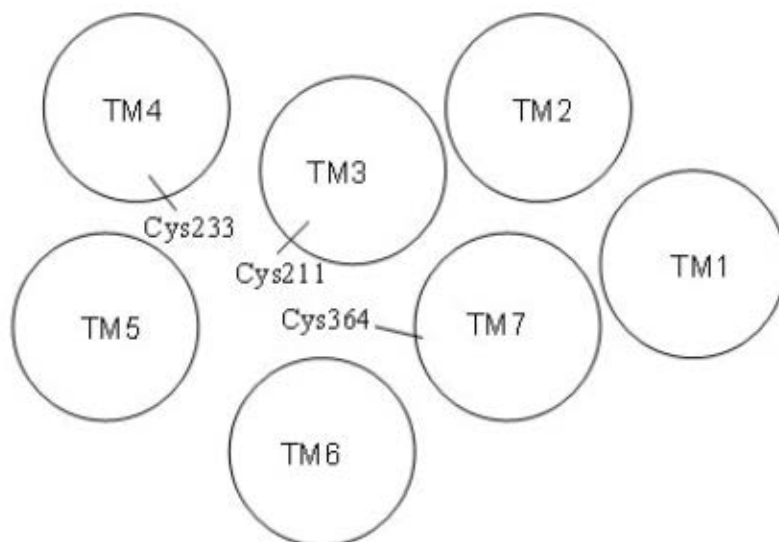
τρεις ενδοκυτταρικούς βρόχους (ILs). Ο υποδοχέα αυτός περιέχει μία εξωκυττάρια αμινοτελική περιοχή (NH<sub>2</sub> ή N-περιοχή) και μια ενδοκυτταρική καρβοξυτελική (COOH ή C-περιοχή)<sup>40</sup>.

Στη λειτουργία των υποδοχέων του CRF παίζουν ρόλο ορισμένα δομικά χαρακτηριστικά τους, ένα από τα οποία είναι οι τρεις δισουλφιδικοί δεσμοί που σχηματίζονται μεταξύ των 6 κυστεϊνών (Cys) που βρίσκονται στην N-περιοχή και εκείνος που ενώνει τις 2 κυστεϊνες του δεύτερου και πρώτου εξωκυττάριου βρόχου. Οι δισουλφιδικοί αυτοί δεσμοί υπάρχουν και σε άλλους υποδοχείς της οικογένειας B των GPCRs παίζοντας σημαντικό ρόλο στη λειτουργία τους<sup>37</sup>. Η σημασία των δισουλφιδικών δεσμών στη δομή της N-περιοχής των υποδοχέων του CRF φάνηκε επίσης σε μελέτες πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) και κρυσταλλογραφίας,<sup>24,38,47,50</sup>. Συγκεκριμένα οι τρεις δισουλφιδικοί δεσμοί μεταξύ των 6 Cys της N-περιοχής των CRF υποδοχέων σταθεροποιεί την εν λόγω περιοχή η οποία αποτελείται από δυο αντιπαράλληλες β-πτυχωτές δομές που σχηματίζουν τέσσερις β περιοχές (β1–β4).

Δομικές αλλαγές που συμβαίνουν στην N-περιοχή κατά τη δέσμευση πεπτιδίων είναι υπεύθυνες για την δέσμευση τους στις υπόλοιπες περιοχές του υποδοχέα σύμφωνα με το πρότυπο δυο σταδίων<sup>19,38,40</sup>. Σύμφωνα με το πρότυπο αυτό η αλληλεπίδραση του καρβοξυτελικού άκρου των πεπτιδίων-αγωνιστών με την N-περιοχή του υποδοχέα, προκαλεί δομικές αλλαγές που προσανατολίζουν το αμινοτελικό άκρο των πεπτιδίων προς τη J-περιοχή του υποδοχέα. Η J-περιοχή του υποδοχέα αποτελείται από τα εξωκυττάρια τμήματα των TMs και τους ELs του. Η αλληλεπίδραση των πεπτιδίων με τη J-περιοχή του υποδοχέα οδηγεί στην ενεργοποίηση του.

Σε αντίθεση με τα εξωκυττάρια τμήματα των υποδοχέων του CRF, οι TMs τους δεσμεύουν τους CRF<sub>1</sub>R-εκλεκτικούς μη πεπτιδικούς ανταγωνιστές του CRF, όπως η ανταλαρμίνη και το CP-376395,<sup>45,51</sup>. Συγκεκριμένα τα μόρια αυτά αλληλεπιδρούν με αμινοξέα των TMs του CRF<sub>1</sub>R που είναι τοποθετημένα στην επιφάνεια μιας κοιλότητας (κοιλότητα θέσεων δέσμευσης) που επικοινωνεί με το υδρόφιλο περιβάλλον του εξωκυττάριου υγρού και η οποία βρισκόμενη μέσα στη λιπιδική διπλοστιβάδα της πλασματικής μεμβράνης σχηματίζεται από τις TMs του υποδοχέα (εικόνα 7)<sup>51</sup>. Τα αμινοξέα των TMs που δεσμεύουν τον μη πεπτιδικό ανταγωνιστή CP-376395 όπως έδειξε η κρυσταλλική δομή του συμπλόκου CRF<sub>1</sub>R/CP376395 είναι τα Phe203, Met206, Leu280, Asn283, Phe284, Leu287, Ile290, Thr316, Leu319,

Leu320, Leu323, Gly324, Tyr327 και Val279 που βρίσκονται στις TM3, TM5 και TM6 του υποδοχέα<sup>45</sup>. Αξιοσημείωτο αποτελεί το γεγονός ότι και τα δεκατέσσερα αυτά αμινοξέα του CRF<sub>1</sub>R διατηρούνται στον CRF<sub>2</sub>R ο οποίος όμως δεν μπορεί να δεσμεύσει τους CRF<sub>1</sub>R μη πεπτιδικούς μικρομοριακούς ανταγωνιστές<sup>45</sup>.



**Εικόνα 3.** Σχηματική απεικόνιση της κοιλότητας θέσεων δέσμευσης του CRF<sub>1</sub>R που σχηματίζουν οι διαμεμβρανικές περιοχές TM1- TM7<sup>40</sup>.

Προσπάθειες να βρεθούν τα αμινοξέα που παίζουν ρόλο στην εκλεκτικότητα της δέσμευσης των ανταγωνιστών αυτών στον CRF<sub>1</sub>R σε σχέση με τον CRF<sub>2</sub>R οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι δύο αμινοξέα που διαφέρουν στον CRF<sub>1</sub>R και CRF<sub>2</sub>R μπορεί να είναι σημαντικά. Τα αμινοξέα αυτά είναι η ιστοιδίνη (His199) στη τρίτη διαμεμβρανική περιοχή του CRF<sub>1</sub>R που είναι βαλίνη στον CRF<sub>2</sub>R και η μεθειονίνη (Met276) στον CRF<sub>1</sub>R που είναι ισολευκίνη στον CRF<sub>2</sub>R<sup>38</sup>. Τα αμινοξέα αυτά του CRF<sub>1</sub>R, προτάθηκε σε μια κρυσταλλική μελέτη ότι πιθανόν παίζουν έμμεσο ρόλο στη δέσμευση των μη πεπτιδικών ανταγωνιστών<sup>38</sup>. Συγκεκριμένα στη μελέτη αυτή προτάθηκε ότι τα Met276 και His199 παίζουν έμμεσο ρόλο σταθεροποιώντας αμινοξέα όπως τη Phe203 και Tyr327 που δεσμεύουν τους μικρομοριακούς ανταγωνιστές. Εναλλακτικά θα μπορούσαν έμμεσα να επηρεάσουν τη δέσμευση των ανταγωνιστών αυτών ελέγχοντας τη προσβασιμότητα τους στη θέση δέσμευσης τους.

## 2. ΣΚΟΠΟΣ

---

Είναι ήδη γνωστό ότι οι μικρομοριακοί μη πεπτιδικοί ανταγωνιστές του CRF δεσμεύονται εκλεκτικά στον CRF<sub>1</sub>R. Οι μικρομοριακοί CRF<sub>1</sub>R-εκλεκτικοί μη πεπτιδικοί ανταγωνιστές δεσμεύονται σε αμινοξέα των διαμεμβρανικών περιοχών του CRF<sub>1</sub>R και ανταγωνίζονται αλλοστερικά τη δέσμευση του CRF στις εξωκυττάριας περιοχές του υποδοχέα.

Αξιοπερίεργο αποτελεί το γεγονός ότι ενώ όλες οι θέσεις δέσμευσης των CRF<sub>1</sub>R-εκλεκτικών μη πεπτιδικών ανταγωνιστών στον CRF<sub>1</sub>R διατηρούνται στον CRF<sub>2</sub>R, τα μόρια αυτά δεν δεσμεύονται στον CRF<sub>2</sub>R. Σε πρόσφατη μελέτη της κρυσταλλικής δομής του CRF<sub>1</sub>R προτάθηκε ότι τα His199 και Met 276 του CRF<sub>1</sub>R που στον CRF<sub>2</sub>R είναι βαλίνη (Val195) και ισολευκίνη (Ile272) πιθανόν παίζουν ρόλο στην εκλεκτικότητα δέσμευσης των μη πεπτιδικών ανταγωνιστών. Σε προηγούμενες μελέτες εξετάστηκαν οι φαρμακολογικές ιδιότητες του CRF<sub>1</sub>R πριν και μετά την αντικατάσταση των His199 και Met 276 του CRF<sub>1</sub>R από τα αντίστοιχα του CRF<sub>2</sub>R. Στις μελέτες αυτές προσδιορίστηκε η επίπτωση των μεταλλάξεων αυτών στη δέσμευση των μη πεπτιδικών ανταγωνιστών στον CRF<sub>1</sub>R. Όμως δεν έχει ακόμα επιτευχθεί το αντίστροφο.

Σκοπός της εργασίας αυτής είναι η αντικατάσταση της Val195 του CRF<sub>2</sub>R από την αντίστοιχη His199 του CRF<sub>1</sub>R και η μελέτη των φαρμακολογικών ιδιοτήτων του μεταλλαγμένου υποδοχέα CRF<sub>2</sub>R και ιδιαίτερα η ιδιότητα του να αποκτά CRF<sub>1</sub>R φαινότυπο όσο αφορά τη δέσμευση των CRF<sub>1</sub>R-εκλεκτικών μη πεπτιδικών ανταγωνιστών.

## 3. Υλικά και μέθοδοι

---

### 3.1.1 Μεταλλαξιγένεση κατευθυνόμενης θέσης με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR - Site Directed Mutagenesis)

Η διαδικασία γίνεται σε δύο στάδια, δημιουργώντας δύο τμήματα DNA (από τον sense εκκινητή του γονιδίου έως τον antisense εκκινητή της μετάλλαξης και από τον sense εκκινητή της μετάλλαξης (ο οποίος είναι συμπληρωματικός του antisense εκκινητή της μετάλλαξης) μέχρι τον antisense εκκινητή του γονιδίου). Στο δεύτερο στάδιο τα δυο τμήματα αυτά ενώνονται μεταξύ τους δίνοντας το τελικό DNA το οποίο φέρει την επιθυμητή μετάλλαξη. Οι εκκινητές των μεταλλάξεων έχουν σχεδιαστεί έτσι ώστε να προσθέτουν ή να αφαιρούν θέσεις αναγνώρισης περιοριστικών ενζύμων, απαραίτητο για την πρώτη εξακρίβωση της ύπαρξης της μετάλλαξης στο τελικό προϊόν.

#### Υλικά – Συσκευές

- Διάλυμα τριφωσφορικών δεόξυ-νουκλεοτιδίων (dNTPs) (dTTP, dATP, dCTP, dGTP) 2,5mM το καθένα (Fermentas, USA)
- Στείρο νερό (nanopure)
- Ρυθμιστικό διάλυμα Pfu πολυμεράσης 10x (Fermentas, USA)
- Pfu πολυμεράση (Fermentas, USA)
- Διάλυμα MgSO<sub>4</sub> 10x (Fermentas, USA)
- Εκκινητές (Primers) (VBC-GENOMICS BIOSCIENCE Research GmbH, Austria)
- DNA εκμαγεία : hCRF<sub>2α</sub>R/rcin4 (γονίδιο του hCRF<sub>2α</sub>R στο πλασμίδιο rcin4 ) και προϊόντα των PCR-A & PCR-B και PCR-C
- Αυτόματος Θερμικός Κυκλοποιητής PCR (Perkin Elmer PCR System 2400, USA)
- Συσκευή οριζόντιας ηλεκτοφόρησης Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA)

#### **Αλληλουχία εκκινητών γονιδίου:**

- S-V195h: 5' CTACTTCCACGTGACCAACTTC 3'

θέση υβριδισμού: 6495 bp στο CRF<sub>2</sub>-WT-pCIN4

- A-V195H: 5' - GAAGTTGGTCACGTGGAAGTAG - 3'

θέση υβριδισμού: 6495bp στο CRF<sub>2</sub>-WT-pCIN4

#### **Αλληλουχία εκκινητών άκρων γονιδίου:**

- A-PAN4 : 5'- GCAGACAGCGAATTAATTCCAGC – 3'

θέση υβριδισμού: 2208-2230 bp στο CRF<sub>2</sub>-WT-pCIN4

- MV10 : 5'-GGCGTGTACGGTGGGAGG-3

θέση υβριδισμού: 784-801 bp στο CRF<sub>2</sub>-WT-pCIN4

#### **Μέθοδος**

Αρχικά (PCR-A & PCR-B) δημιουργήθηκαν τα τμήματα Antisense (εκκινητές : antisense μετάλλαξης & sense γονιδίου) και Sense (εκκινητές: sense μετάλλαξης & antisense γονιδίου). Στη συνέχεια τα δύο αυτά τμήματα ενώθηκαν μεταξύ τους με τη χρήση επικαλυπτόμενης αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR-2).

#### **Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης 1a και 1b (PCR-1a & PCR-1b)**

Αρχικά προστέθηκαν 1,5 μl από τον κάθε εκκινητή σε κάθε δοχεία αντίδρασης (PCR tubes), ο ένας στον πυθμένα και ο δεύτερος στα τοιχώματα. Στη συνέχεια παρασκευάστηκε μείγμα (Μείγμα A) το οποίο περιέχει νερό, dNTPs, ρυθμιστικό διάλυμα Pfu, ιόντα μαγνησίου και DNA – εκμαγείο. Στη συνέχεια προστέθηκαν σε κάθε PCR tube 42μl από το Μείγμα A, ώστε ο όγκος του διαλύματος να είναι 45μl. Τέλος παρασκευάστηκε διάλυμα (Μείγμα B) όγκου 5 μl/αντίδραση το οποίο περιέχει Pfu πολυμεράση, ρυθμιστικό διάλυμα Pfu, ιόντα μαγνησίου και νερό. Όλη η διαδικασία γίνεται στον πάγο.



Αντίδραση PCR		Μείγμα Α		Μείγμα Β	
Συστατικά	Όγκος/αντίδραση (μL)	Συστατικά	Όγκος/αντίδραση (μL)	Συστατικά	Όγκος/αντίδραση (μL)
DNA-εκαμαγείο	100ng / αντίδραση	DNA-εκαμαγείο	100ng / αντίδραση	Pfu πολυμεράση	0,5
Ρυθμιστικό διάλυμα Pfu 10x	4,5	Ρυθμιστικό διάλυμα Pfu 10x	4,5	Ρυθμιστικό διάλυμα Pfu 10x	0,5
dNTPs(2,5mM)	4	dNTPs (2,5mM)	4	Mg <sup>2+</sup> 10x	0,5
Mg <sup>2+</sup> 10x	4,5	Mg <sup>2+</sup> 10x	4,5	H <sub>2</sub> O	3,5
H <sub>2</sub> O	(μέχρι τελικού όγκου)	H <sub>2</sub> O	(μέχρι τελικού όγκου)		
Εκκινητές	1,5				
	1,5				
Τελικός όγκος	45	Τελικός όγκος	42	Τελικός όγκος	5

Ακολούθησε επώαση των αντιδράσεων για δύο λεπτά στους 99,9°C σε θερμικό κυκλοποιητή (κύκλος 1α). Μετά η θερμοκρασία μειώθηκε στους 97°C για δύο λεπτά (κύκλος 1β), και έγινε προσθήκη του μείγματος Β, ώστε ο τελικός όγκος της αντίδρασης να είναι 50μL. Οι αντιδράσεις παρέμειναν στους 97°C για άλλα 30 δευτερόλεπτα (κύκλος 2α) και στη συνέχεια ψύχονται στους 55°C όπου παραμένουν για 2 λεπτά (κύκλος 2β). Στη συνέχεια η θερμοκρασία αυξήθηκε στους 72°C, όπου και παραμένει για έξι λεπτά (κύκλος 2γ). Όλος ο κύκλος 2 (α,β, και γ) επαναλήφθηκε τριάντα πέντε (35) φορές μετά το πέρας τον οποίον η θερμοκρασία παρέμεινε στους 72°C για ακόμα δέκα λεπτά (κύκλος 3). Τέλος οι αντιδράσεις ψύχθηκαν στους 4°C. Μετά το τέλος της αντίδρασης τα προϊόντα αυτής διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης, απομονώθηκαν και καθαρίστηκαν.

### Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης 2 (PCR-2)

Τα τεμάχια του DNA του υποδοχέα που προήλθαν από τις PCR1 και PCR2, ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης, απομονώθηκαν από αυτό και χρησιμοποιήθηκαν ως εκμάγεια για την PCR δεύτερης φάσης μαζί με τους δύο εκκινητές (sense και antisense) του γονιδίου. Οι κύκλοι της PCR-2 και το μείγμα B παραμένουν τα ίδια με τις PCR-1a & PCR-1b. Αρχικά τοποθετήθηκαν 5μL από το κάθε προϊόν των PCR-1a & PCR-1b στο δοχείο της αντίδρασης, ενώ από σε κάθε ένα PCR tube προστέθηκαν 35μL από το Μείγμα A της PCR-2.

Αντίδραση PCR		Μείγμα A		Μείγμα B		
Συστατικά		Όγκος/αντίδραση (μL)	Συστατικά	Όγκος/αντίδραση (μL)	Συστατικά	Όγκος/αντίδραση (μL)
DNA	προϊόν PCR-1a	5	Ρυθμιστικό διάλυμα Pfu 10x	4,5	Pfu πολυμεράση	0,5
	προϊόν PCR-1b	5	dNTPs (2,5mM)	4	Ρυθμιστικό διάλυμα Pfu 10x	0,5
Ρυθμιστικό διάλυμα Pfu 10x		4,5	Mg <sup>2+</sup> 10x	4,5	Mg <sup>2+</sup> 10x	0,5
dNTPs(2,5mM)		4	Εκκινητές	1,5	H <sub>2</sub> O	3,5
Mg <sup>2+</sup> 10x		4,5		1,5		
H <sub>2</sub> O		19	H <sub>2</sub> O	19		
Εκκινητές		1,5				
		1,5				
Τελικός όγκος		45	Τελικός όγκος	35	Τελικός όγκος	5

### *3.1.2 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης – απομόνωση και καθαρισμός επιθυμητών τμημάτων DNA*

#### **Υλικά-Συσκευές**

- Διάλυμα TAE 50X (242 g Tris base, 57,1 ml οξικό οξύ 37,2 Na<sub>2</sub>EDTA·2H<sub>2</sub>O σε H<sub>2</sub>O).
- Αγαρόζη (Invitrogen, USA).
- Βρωμιούχο αιθίδιο, C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>BrN<sub>3</sub> (Fluka, Switzerland).
- Χρωστική, 6X Gel Loading Dye (Fermentas, USA)
- Δείκτες DNA με τεμάχια γνωστού μοριακού βάρους: (Invitrogen)
- Συσκευή οριζόντιας ηλεκτοφόρησης Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA)
- kit Nucleospin Gel and PCR cleanup της Macherey-Nagel (Germany)

#### **Μέθοδος**

Η ηλεκτροφόρηση, είναι μία τεχνική στην οποία το πήκτωμα της αγαρόζης τα μικρότερου μοριακού βάρους DNA κινούνται ταχύτερα και διανύσουν μεγαλύτερη απόσταση μέσα στο πήκτωμα σε σχέση με τα μεγαλύτερα. Κατά την προετοιμασία πηκτώματος αγαρόζης περιεκτικότητας 1% ακολουθείτε η εξής διαδικασία. Αρχικά διαλύεται 1,3 gr αγαρόζης σε 130 ml διαλύματος TAE 50X αραιωμένο σε αναλογία 1/50. Το διάλυμα θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων υπό συνεχή ανάδευση μέχρι η αγαρόζη να διαλυθεί πλήρως και το διάλυμα να γίνει διαυγές. Η κωνική φιάλη που περιέχει το διάλυμα της αγαρόζης ψύχεται μέχρι τους 50°C και ακολούθως προστίθενται σε αυτό 5 μl από τη χρωστική παρατήρησης του DNA, βρωμιούχου αιθιδίου (10 mg/ml). Το βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr) μας δείχνει τα τελικά τμήματα που γίνεται ηλεκτροφόρηση στο πήκτωμα αγαρόζης όταν αυτό εκτεθεί σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV).

Στη συνέχεια η ρευστή αγαρόζη τοποθετείται στο εκμαγείο, αφού κλειστούν οι ανοικτές πλευρές του με χαρτοταινία. Η ρευστή αγαρόζη χύνεται στο εκμαγείο με προσοχή, ώστε να μη σχηματιστούν φυσαλίδες. Αν δημιουργηθούν φυσαλίδες απομακρύνονται με τη βοήθεια ενός tip . Τοποθετείτε το «χτένι», ώστε να

δημιουργηθούν οι θέσεις υποδοχής των δειγμάτων (πηγαδάκια) και αφήνεται να πήξει. Μετά την πήξη του πηκτώματος αυτό τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης στην οποία υπάρχει ρυθμιστικό διάλυμα TAE 50X, αραιώσης 1:50. Ανάλογα με το αν τα διαλύματα που περιέχουν τα δείγματα DNA είναι προϊόντα πέψης ή προϊόντα των αντιδράσεων PCR, προστίθεται κατάλληλος όγκος 6X ρυθμιστικού διαλύματος (40% γλυκερόλη, 0,25% Bromophenol Blue, 0,25% Xylene Cyanol FF). Τα δείγματα τοποθετούνται στις θέσεις υποδοχής με τη βοήθεια πιπέτας ρυθμιζόμενου όγκου και γίνεται ηλεκτροφόρηση κάτω από ηλεκτρική τάση 110 V για 40 περίπου λεπτά. Ταυτόχρονα ηλεκτροφορείται και δείκτης DNA τεμαχίων γνωστού μοριακού βάρους (Ladder) ώστε να γίνει υπολογισμός του μοριακού μεγέθους των ηλεκτροφορηθέντων DNA. Μετά την ηλεκτροφόρηση το πήκτωμα τοποθετείται σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας, που βρίσκεται σε σκοτεινό θάλαμο. Τα μόρια DNA φθορίζουν και γίνονται ορατά ως πορτοκαλόχρωμες ζώνες, εξαιτίας της φθορίζουσας χρωστικής που έχει προστεθεί στο πήκτωμα. Τέλος, τα επιθυμητά κομμάτια του DNA (μπάντες) αποκόπτονται από το πήκτωμα με τη χρήση νυστεριού και απομονώνονται από αυτό με τη χρήση του kit Nucleospin Gel and PCR cleanup της Macherey-Nagel ακολουθώντας το πρωτόκολλο της εταιρίας.

### *3.1.3 Πέψη DNA με ένζυμα περιορισμού*

Τα ένζυμα περιορισμού έχουν την δυνατότητα να διασπών το δίκλωνο DNA σε συγκεκριμένες θέσεις, αφού αναγνωρίσουν μικρού μεγέθους χαρακτηριστικές αλληλουχίες. Τα ένζυμα αυτά προκαλούν πέψη του DNA όταν επωαστούν κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες (θερμοκρασία, χρόνος και ιονική ισχύς του διαλύματος επώασης). Τα DNA που υποβλήθηκαν σε πέψη είναι τα PCR2 μεγέθους το πλασμίδιο hCRF<sub>2</sub>R/pCIN4 μεγέθους 6495 bp. Τα ένζυμα περιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν για την πέψη των DNA αυτών ήταν το Xag I, που αναγνώριζε την αλληλουχία 5'- CCTNN<sup>^</sup>NNNAGC-3' και και το BamHI που αναγνώριζε την αλληλουχία 5'-G<sup>^</sup>GATCC -3' (όπου <sup>^</sup> σημείο κοπής).

### 3.1.4 Συρραφή τεμαχίων DNA (ligation)

#### Υλικά – Συσκευές

- T4 λιγάση 10u/μl (ThermoScientific)
- Ρυθμιστικό διάλυμα T4 λιγάσης 10x (ThermoScientific)
- Υπερκαθαρό νερό (nanopure)
- Επιθυμητό τμήμα DNA από το πλασμίδιο
- Τμήμα DNA που θα εισέρθει στο πλασμίδιο
- Συσκευή Επώασης Ρυθμιζόμενης Θερμοκρασίας

#### Μέθοδος

Μετά την απομόνωσή τους από το πήκτωμα αγαρόζης, τα επιθυμητά προϊόντα πέψης τεμάχια των DNA συρράπτονται . Η αντίδραση συρραφής λαμβάνει χώρα σε θερμοκρασία ~ 36 ~ 16°C για 16-18 ώρες (over night) και το αναμενόμενο προϊόν της ήταν το πλασμίδιο V195H-hCRF<sub>2α</sub>R/pCIN4 .Για τη συρραφή χρησιμοποιήθηκε η T4 λιγάση της Thermo Scientific.

Συστατικά	Όγκος (μl)
T4 λιγάση	2
Ρυθμιστικό διάλυμα T4 λιγάσης	4
H <sub>2</sub> O	22
Επιθυμητό τμήμα DNA από το πλασμίδιο	10
Τμήμα DNA που θα εισέρθει στο πλασμίδιο	2
Τελικός Όγκος	40

### 3.1.5 Μετασχηματισμός βακτηρίων DH-10b *E.coli* με το πλασμιδιακό DNA που έφερε την επιθυμητή μετάλλαξη

#### Υλικά – Συσκευές

- Επιδεκτικά (competent) στο μετασχηματισμό βακτήρια DH-10b *E.Coli*
- Προϊόν συρραφής (πλασμίδιο hCRF<sub>2α</sub>R/pcin4)
- Τρυβλία άγαρ-αμπικιλίνης (10 g τρυπτόνη, 15 g άγαρ, 5 g εκχύλισμα μαγιάς (yeast extract), 5 g NaCl, 1 ml NaOH 1N και αμπικιλίνη τελικής συγκέντρωσης 60μg/ml, διαλυμένα σε 1 λίτρο H<sub>2</sub>O)
- Θρεπτικό υλικό LB (10g τρυπτόνη, 5g εκχύλισμα μαγιάς, 5g NaCl, 1ml NaOH 1N σε 1 λίτρο H<sub>2</sub>O)
- Θερμαινόμενη πλάκα επώασης (Bioblock Scientific, France)
- Φυγόκεντρος (Eppendorf Centrifuge 5415, Germany)
- Επωαστικός κλίβανος Thermo Forma (Thermo Fisher Scientific Inc., USA)

#### Μέθοδος

Αρχικά για το μετασχηματισμό βακτηρίων με το προϊόν συρραφής, τα βακτήρια αφέθηκαν να ξεπαγώσουν σταδιακά στον πάγο. Μόλις ξεπάγωσαν προστέθηκαν 50μl βακτήρια Σε 10μl από το προϊόν συρραφής και επώαστηκαν για 30 λεπτά στον πάγο. Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν στο θερμομπλόκ στους 42°C αυστηρά για 45 δευτερόλεπτα. Το θερμικό σοκ γίνεται για να προκαλέσει την αποδιάταξη των κυτταρικών μεμβρανών και έτσι τα πλασμίδια εισέρχονται στα κύτταρα. Μετά το heat shock τοποθετήθηκαν στον πάγο για 2 λεπτά με σκοπό τη σταθεροποίηση της μεμβράνης τους. Τέλος επιστρώνονται σε τρυβλία άγαρ-αμπικιλίνης και αφέθηκαν για επώαση στους 37°C για 16 ώρες.

### *3.1.6 Πολλαπλασιασμός μετασχηματισμένων βακτηρίων DH-10b E.coli*

#### **Υλικά – Συσκευές**

- Θρεπτικό υλικό LB (10g τρυπτόνη, 5g εκχύλισμα μαγιάς, 5g NaCl, 1ml 1N NaOH σε 1 λίτρο H<sub>2</sub>O).
- Αντιβιοτικό αμπικιλίνη (60mg/ml).
- Δοκιμαστικοί σωλήνες αποστειρωμένοι.
- Θερμαινόμενη συσκευή ανάδευσης

Μετά τη λήψη αποικιών, τα βακτήρια που υπήρχαν σε αυτές πολλαπλασιάστηκαν, με επώαση τους σε 9 ml LB (10 g τρυπτόνη, 5 g εκχύλισμα μαγιάς, 5 g NaCl και 1 ml 1 N NaOH ανά λίτρο) που περιείχε το αντιβιοτικό αμπικιλίνη σε συγκέντρωση 60 μg/ml, για 16 ώρες στους 37°C υπό συνεχή ανάδευση (170 αναδεύσεις/λεπτό). Στο τέλος της επώασης έγινε απομόνωση από τα βακτήρια του πλασμιδιακού DNA V195H-hCRF<sub>2α</sub>R/pCIN4 χρησιμοποιώντας το kit Nucleospin Plasmid της Macherey-Nagel (Germany) και ακολουθώντας το πρωτόκολλο της εταιρείας.

### *3.1.6 Καλλιέργεια κυττάρων HEK 293*

#### **Υλικά – Συσκευές**

- Θρεπτικό υλικό, DMEM/F12 (1:1) Dulbecco's Modified Eagle's Medium (GIBCO-BRL, Life Technologies, UK) που περιείχε 2,5 mM L-γλουταμίνη, 15 mM HEPES, 1,125 g/L NaHCO<sub>3</sub>
- Ορός βοός, FBS (Fetal Bovine Serum) (GIBCO-BRL, Life Technologies, UK)
- Τρυψίνη, Trypsin/EDTA (GIBCO-BRL, Life Technologies, UK)
- Χρωστική Trypan Blue (GIBCO-BRL, Life Technologies, UK)
- DMSO (Sigma, USA)

- Φυγόκεντρος (Hermle Z320, Germany)
- Μικροσκόπιο ορατού φωτός (Olympus, Japan)
- Πλάκα αιματοκυτταρομετρητή Neubauer
- Τρυβλία καλλιέργειών (SARSTEDT, Germany).
- Επωαστικός κλίβανος Thermo Forma (Thermo Fisher Scientific Inc., USA).
- Υπερκαταψύκτης (Forma 900, ThermoScientific, Inc USA)

Η καλλιέργεια των κυττάρων πραγματοποιήθηκε σε θρεπτικό υλικό DMEM/F12 (1:1) εμπλουτισμένο με 10% ορό βοός, σε επωαστικό κλίβανο ρυθμισμένο σε θερμοκρασία 37°C, ατμόσφαιρα 5% CO<sub>2</sub> και υγρασία 100%. Τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν για τα πειράματα βρίσκονταν σε παρόμοια στάδια ανάπτυξης. Η ανανέωση του θρεπτικού υλικού γινόταν κάθε 48 ώρες και τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν για τα πειράματα είχαν φτάσει σε πυκνότητα 90% περίπου. Ακολούθησε επίστρωση των κυττάρων σε τρυβλία σε αρχική συγκέντρωση 10<sup>5</sup> κύτταρα/ml και ανακαλλιέργεια τους δύο φορές την εβδομάδα. Η αποκόλληση των κυττάρων έγινε με τρυψίνη/EDTA και η απενεργοποίηση της έγινε με προσθήκη περίσσειας θρεπτικού υλικού. Το κυτταρικό εναιώρημα συλλέχθηκε και φυγοκεντρήθηκε στα 250 g για 5 λεπτά. Ο προσδιορισμός του αριθμού των κυττάρων για επίστρωση, έγινε με τη μέθοδο κυτταρομετρίας (λήψη 10 μl από το κυτταρικό εναιώρημα σε 90 μl Trypan Blue, τοποθέτηση σε πλάκα Neubauer και καταμέτρηση των κυττάρων με τη βοήθεια μικροσκοπίου ορατού φωτός, σε μεγέθυνση 40x). Μέρος των κυττάρων σε κατάλληλη συγκέντρωση τοποθετήθηκε σε νέα τρυβλία για ανακαλλιέργεια ή χρησιμοποιήθηκε για την εκτέλεση πειραμάτων. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στην ίδια φάση της λογαριθμικής αύξησης των κυττάρων και περίπου στον ίδιο αριθμό γενιάς. Τα κύτταρα καταψύχονταν σε τακτά χρονικά διαστήματα στους - 80°C (και μετά από λίγες μέρες μεταφορά τους σε υγρό άζωτο), με σκοπό τη διατήρησή τους σε χαμηλό αριθμό γενεών. Συγκεκριμένα, κυτταρικό εναιώρημα συγκεντρώσεως 5 x 10<sup>6</sup> κυττάρων μέσα σε υλικό κατάψυξης (FBS με 10% DMSO) τοποθετήθηκε σε σωληνάριο βαθιάς κατάψυξης. Η κατάψυξη των κυττάρων στους - 80°C πραγματοποιήθηκε σταδιακά ώστε να εξασφαλιστεί η ακεραιότητά τους. Αντίθετα η απόψυξη τους ήταν γρήγορη και άμεση.



Συγκεκριμένα, τα κατεψυγμένα σωληνάρια που περιείχαν τα κύτταρα θερμάνθηκαν στους 37°C υπό συνεχή ανάδευση και τα κύτταρα μεταφέρθηκαν άμεσα σε θρεπτικό υλικό καλλιέργειας.

### 3.1.7 Επιμόλυνση κυττάρων με πλασμιδιακό DNA ( *Transient Transfection* )

#### Υλικά – Συσκευές

- Θρεπτικό υλικό, DMEM/F12 (1:1) Dulbecco's Modified Eagle's Medium (GIBCO-BRL, Life Technologies, UK) που περιείχε 2,5 mM L-γλουταμίνη, 15 mM HEPES, 1,125 g/L NaHCO<sub>3</sub>
- Ορός βοός, BCS (Bovine Calf Serum) (GIBCO-BRL, Life Technologies, UK)
- Τρυψίνη, Trypsin/EDTA (GIBCO-BRL, Life Technologies, UK)
- Φυγόκεντρος (Hermle Z320, Germany)
- Χρωστική Trypan Blue (GIBCO-BRL, Life Technologies, UK)
- Πλασμιδιακό DNA ( CRF<sub>2</sub>R/pCIN4 και CRF<sub>2</sub>R-I272M/pCIN4)
- Λιποφεκταμίνη (Lipofetamin) (ThermoScientific)
- Μικροσκόπιο ορατού φωτός Olympus, Japan
- Πλάκα αιματοκυτταρομετρητή Neubauer
- Επωαστικός κλίβανος Thermo Forma (Thermo Fisher Scientific Inc., USA)
- Τρυβλία καλλιέργειας 96 οπών (NUNC, Denmark)

#### Μέθοδος

Με τη συγκεκριμένη μέθοδο εξασφαλίζεται η παροδική έκφραση του υποδοχέα στην επιφάνεια των κυττάρων και αυτό γίνεται καθώς εισάγεται το πλασμίδιο το οποίο έχει τη δυνατότητα να εκφραστεί μέσω άμεσης μεταγραφής και μετάφρασης.

Τα HEK 293 κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν για επιμόλυνση είχαν 90-100% πυκνότητα (confluent). Τα κύτταρα αυτά ξεπλύθηκαν από το BCS προκειμένου να απομακρυνθούν οι εναπομείναντες πρωτεΐνες. Στη συνέχεια προστέθηκε διάλυμα DMEM/F12 (1:1) χωρίς ορό προκειμένου τα κύτταρα να παραμείνουν ζωντανά. Επίσης προστέθηκαν 7  $\mu$ L λιποφεκταμίνης με 2.5 $\mu$ g DNA (CRF<sub>2</sub>R/pCIN4 και CRF<sub>2</sub>R-I272M/pCIN4), είναι ανάγκη η μεγάλη ποσότητα DNA έτσι ώστε να υπάρξει και αυξημένη έκφραση του υποδοχέα στην επιφάνεια των κυττάρων. Εφόσον έγινε

επώαση των κυττάρων για 24 ώρες από την επιμόλυνσή τους, αυτά έμειναν άλλες 24 ώρες με το νέο θρεπτικό υλικό πριν στρωθούν σε τρυβλία καλλιέργειας 96 οπών.

### 3.1.8 Μελέτες μέτρησης ενδοκυττάριου κυκλικού AMP

#### Υλικά – Συσκευές

- Θρεπτικό υλικό, DMEM/F12 (1:1) Dulbecco's Modified Eagle's Medium (GIBCO-BRL, Life Technologies, UK) που περιείχε 2,5 mM L-γλουταμίνη, 15 mM HEPES, 1,125 g/L NaHCO<sub>3</sub>
- Ορός βοός, FBS (Fetal Bovine Serum) (GIBCO-BRL, Life Technologies, UK)
- Τρυψίνη, Trypsin/EDTA (GIBCO-BRL, Life Technologies, UK)
- Χρωστική Trypan Blue (GIBCO-BRL, Life Technologies, UK)
- Φυγόκεντρος (Hermle Z320, Germany)
- Μικροσκόπιο ορατού φωτός (Olympus, Japan)
- Πλάκα αιματοκυτταρομετρητή Neubauer
- Επωαστικός κλίβανος Thermo Forma (Thermo Fisher Scientific Inc., USA)
- Τρυβλία καλλιέργειών (SARSTEDT, Germany)
- Πλάκες 96 οπών (NUNC, Denmark)
- Πολυ-L-λυσίνη, Poly-L-lysine (Fluka, Switzerland)
- Φυγόκεντρος (Rotanda 46R, Hettich, Germany)
- <sup>3</sup>H-cAMP [2,8-<sup>3</sup>H] Adenosine-3'-5'-cyclic phosphate ammonium salt (43,0 Ci/mmol Amersham, UK).
- Εκχύλισμα PKA (η παρασκευή του αναφέρεται παρακάτω)
- Συσκευή διήθησης Brandel Cell Harvester (USA)
- Φίλτρα ιών υάλου AH934 (Whatman International Ltd., England)
- Σωληνάκια πλαστικά, υγρού σπινθηρισμού (SARSTEDT, Germany)
- Υγρό σπινθηρισμού (η παρασκευή του αναφέρεται παρακάτω)
- Μετρητής β-ακτινοβολίας (Perkin Elmer LS1801, Foster City, CA, USA) με απόδοση 50% στο <sup>3</sup>H

#### Ρυθμιστικό διάλυμα choline/sucrose:

- 25 mM HEPES
- 2 mM choline

- 288 mM sucrose
- 0,9 mM CaCl<sub>2</sub>
- 0,5 mM MgCl<sub>2</sub>
- 1 mM 3-ισοβούτυλ-1-μεθυλξανθίνη
- pH 7,4

#### Ρυθμιστικό διάλυμα CAQ:

- 100 mM Tris-HCl
- 100 mM NaCl
- 5 mM EDTA
- pH 7,4

#### Ρυθμιστικό διάλυμα B

- 10 mM Tris - HCl,
- 120 mM NaCl
- pH 7,4 στους 4<sup>0</sup>C

## **Μέθοδος**

HEK 293 κύτταρα που εκφράζανε τους υποδοχείς του CRF επιστρώθηκαν σε πλάκες 96 οπών και καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό όπως αναφέρθηκε παραπάνω ώστε την επόμενη ημέρα (ημέρα πειράματος) να έχουν πυκνότητα 90%. Πριν την επιστροφή των κυττάρων η επιφάνεια των πλακών είχε καλυφθεί για 10-15 λεπτά με διάλυμα 0,1 mg/ml poly-L-λυσίνης σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την αφαίρεση του διαλύματος poly-L-λυσίνης οι πλάκες διατηρήθηκαν σε στείρο περιβάλλον και λίγο πριν από τη χρήση τους ξεπλύθηκαν με στείρο νερό.

Μετά από 16-24 ώρες καλλιέργειας των κυττάρων στις πλάκες των 96 οπών το θρεπτικό υλικό αφαιρέθηκε και προστέθηκαν 100 μl ρυθμιστικού διαλύματος choline/sucrose και τα κύτταρα επώαστηκαν για 1 ώρα σε κλίβανο επώασης, θερμοκρασίας 37°C, ατμόσφαιρας 5% CO<sub>2</sub>/95% αέρα και υγρασίας 100%. Στο τέλος της επώασης προστέθηκαν στα κύτταρα άλλα 100 μl διαλύματος choline/sucrose χωρίς ή με αυξανόμενες συγκεντρώσεις αγωνιστή (Tyr<sup>0</sup>-σαβαγίνης, κορταγίνη ή ουροκορτίνη II), και συνεχίστηκε η επώαση για άλλα 20 λεπτά στους 37°C και 5% CO<sub>2</sub>. Στο τέλος της επώασης το υπερκείμενο υγρό αφαιρέθηκε και μετά τη πρόσθεση

κρύου διαλύματος TCA 3% τα κύτταρα έμειναν σε πάγο για 30 λεπτά. Στη συνέχεια τα κύτταρα καταψύχθηκαν σε - 20°C. Μετά από 1-3 ημέρες πραγματοποιήθηκαν τα επόμενα στάδια του πειράματος, ξεκινώντας με απόψυξη των κυττάρων (με ανάδευσή τους σε θερμοκρασία δωματίου) και φυγοκέντρωση τους για 15 λεπτά στα 1700g στους 4°C. Μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης 100 μl από τα υπερκείμενα διαλύματα αναμίχθηκαν (σε νέα πλάκα 96 οπών ) με διάλυμα 6 μl 2N NaOH και μέρος (20 μl) των μιγμάτων αυτών επώαστηκε για 2,30-3,30 ώρες στους 4°C και σε τελικό όγκο 500 μl μαζί με ρυθμιστικό διάλυμα CAQ, <sup>3</sup>H-cAMP (20 μl, ~40,000 cpm) και αραιωμένο διάλυμα εκχυλίσματος PKA (500 μl, με την εξής αραιώση, εκχύλισμα PKA/ διάλυμα CAQ: 1/20).

Παράλληλα με τα άγνωστα δείγματα επώαστηκαν κάτω από τις ίδιες συνθήκες και γνωστές συγκεντρώσεις κυκλικού AMP (100 pmole, 30 pmole, 10 pmole, 3 pmole και 1 pmole) με σκοπό την κατασκευή πρότυπης καμπύλης που θα χρησίμευε για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης κυκλικού AMP στα άγνωστα δείγματα.

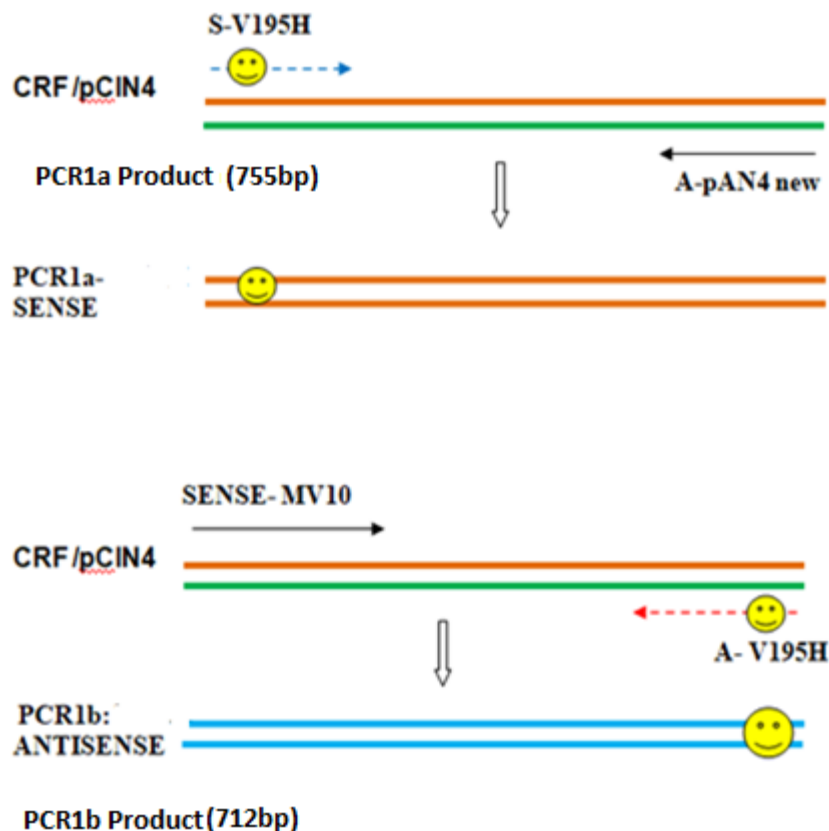
Στο τέλος της επώασης τα διαλύματα διηθήθηκαν μέσω φίλτρων ιών υάλου (Glass Microfibre Filters AH934, Whatman International Ltd., England), σε συσκευή Brandel κάτω από κενό αέρος. Τα φίλτρα που προηγουμένως είχαν διαβραχεί με απεσταγμένο νερό, μετά τη διήθηση εκπλύθηκαν τρεις φορές με συνολικά 3 ml ρυθμιστικού διαλύματος B και τοποθετήθηκαν σε σωληνάρια σπινθηρισμού μαζί με 3 ml υγρού σπινθηρισμού (scintillation fluid), έγινε ανακίνηση των δειγμάτων και μετά από 3-24 ώρες μετρήθηκαν σε μετρητή β - ακτινοβολίας (Beckman LS 1801, USA) απόδοσης 50%.

Ο προσδιορισμός της ποσότητας του κυκλικού AMP για τα άγνωστα δείγματα έγινε με τη βοήθεια της πρότυπης καμπύλης, που δημιουργήθηκε με βάση τα αποτελέσματα των δειγμάτων κυκλικού AMP γνωστής συγκέντρωσης. Οι τιμές - LogEC<sub>50</sub> υπολογίστηκαν με μη γραμμική ανάλυση των αποτελεσμάτων (nonlinear regression analysis), χρησιμοποιώντας το λογισμικό GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Prism v.4.0, GraphPad Software Inc.,USA), και αναφέρονται στα αποτελέσματα της εργασίας αυτής.

## 4. Αποτελέσματα

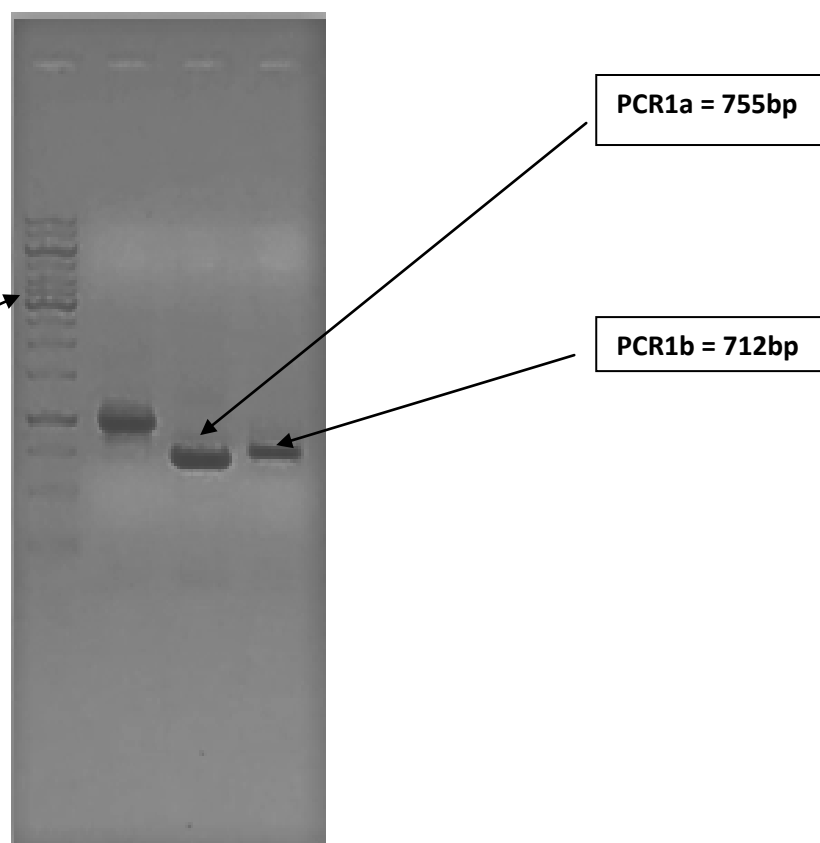
### 4.1 Δημιουργία του μεταλλαγμένου *CRF2R* υποδοχέα

Στην παρούσα μελέτη αντικαταστάθηκε η Val195 του *CRF<sub>2</sub>R* με την αντίστοιχη His199 του *CRF<sub>1</sub>R*. Αυτό πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της μεθόδου μεταλλαξιγένεσης κατευθυνόμενης θέσης με PCR (αναλύεται στο κεφάλαιο “Υλικά και Μέθοδοι”), η οποία οδήγησε στη δημιουργία του πλασμιδιακού DNA, h*CRF<sub>2</sub>R*-V195H/pCIN4, που περιέχει το DNA που κωδικοποιεί τον μεταλλαγμένο h*CRF<sub>2</sub>R*-V195H υποδοχέα. Η μέθοδος αυτή εκτελέστηκε σε 2 φάσεις. Στην πρώτη φάση έγιναν ταυτόχρονα δύο διαφορετικές PCR, η PCR1a και η PCR1b, οι οποίες όπως φαίνεται στις Εικόνες 8 και 9, δημιούργησαν δυο τμήματα DNA του h*CRF<sub>2</sub>R*, μήκους 755bp και 712bp, τα οποία έφεραν στα άκρα τους την μετάλλαξη V195H.



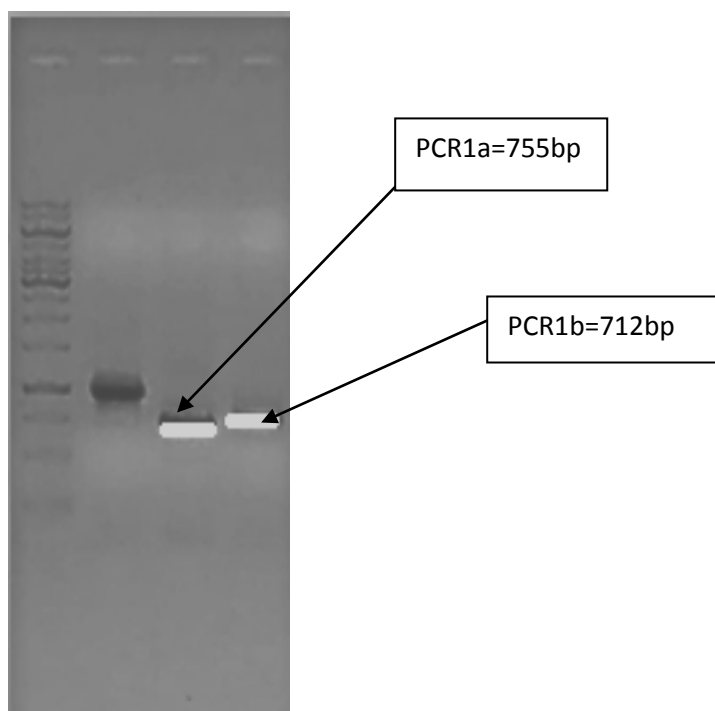
**Εικόνα 4.** Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης 1 (PCR 1) φάσης 1. Το πρόσωπο παριστάνει το σημείο της μετάλλαξης.

Ως εκκινητές στην PCR1a χρησιμοποιήθηκαν ο sense S-V195H που φέρει την μετάλλαξη και ο antisense A-PAN4 ενώ στην PCR1b χρησιμοποιήθηκαν ως εκκινητές ο sense MV10 και ο antisense A-V195H που φέρει την μετάλλαξη. Και στις δύο PCR1 χρησιμοποιήθηκε ως εκμαγείο το πλασμιδιακό DNA hCRF<sub>2</sub>R-pCIN4.



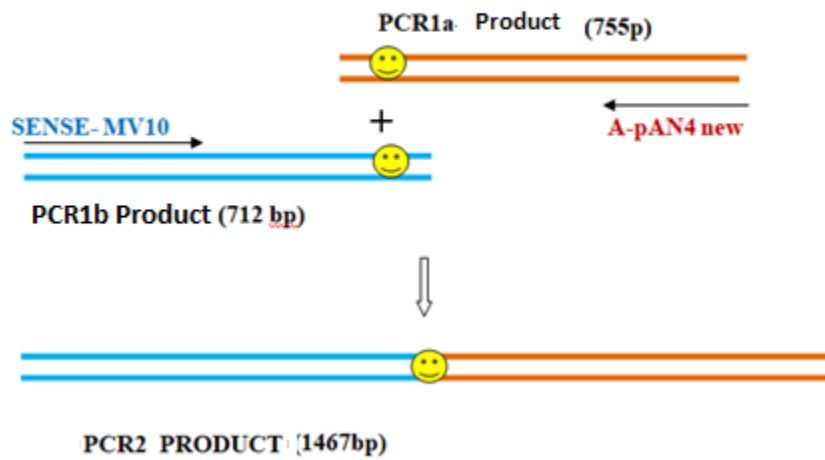
**Εικόνα 5. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης των προϊόντων των PCR1a και PCR1b της πρώτης φάσης. Τα προϊόντα της PCR1a και PCR1b, έχουν μήκος 755bp και 712bp, αντίστοιχα. Παράλληλα, ηλεκτροφορήθηκε και ο μάρτυρας (Ladder) που περιέχει τεμάχια DNA γνωστού μοριακού μεγέθους έτσι ώστε να είναι δυνατός ο υπολογισμός του μοριακού μεγέθους των προϊόντων των PCR.**

Στη συνέχεια τα προϊόντα των PCR1a και PCR1b, απομονώθηκαν από το πήκτωμα αγαρόζης, όπως φαίνεται στην Εικόνα 10 και περιγράφεται στο κεφάλαιο “Υλικά και Μέθοδοι”, με σκοπό τη χρησιμοποίησή τους στη δεύτερη φάση PCR.



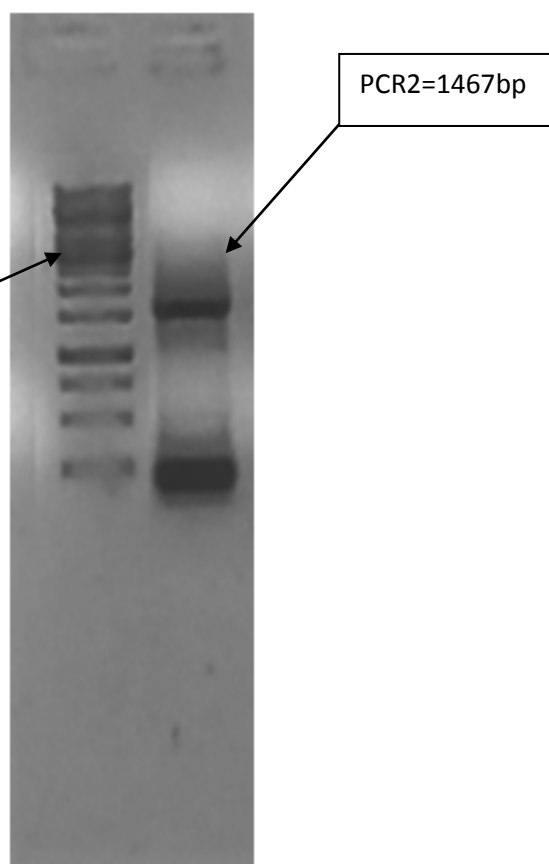
**Εικόνα 6.** Απομόνωση των επιθυμητών προϊόντων PCR1a και PCR1b της πρώτης φάσης από το πήκτωμα αγαρόζης.

Στη δεύτερη φάση έγινε μια PCR (PCR2) στην οποία χρησιμοποιήθηκαν ως εκκινητές οι antisense A-PAN4 και sense MV10 και ως εκμαγεία τα τεμάχια DNA που προήλθαν από τις PCR1a και PCR1b (εικόνα 11).



*Εικόνα 7. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης 2 (PCR 2) φάσης 2. Το πρόσωπο παριστάνει το σημείο της μετάλλαξης.*

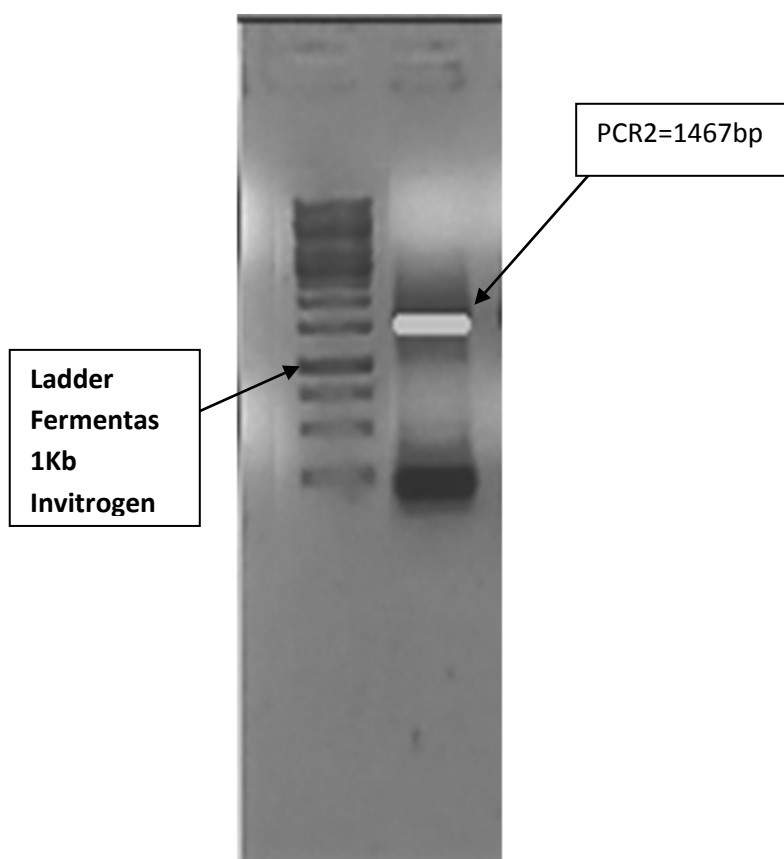
Το προϊόν της PCR της δεύτερης φάσης (Εικόνα 12) ήταν ένα κομμάτι DNA μεγέθους 1467 bp, που στο μέσον του υπήρχε η μετάλλαξη V195H.





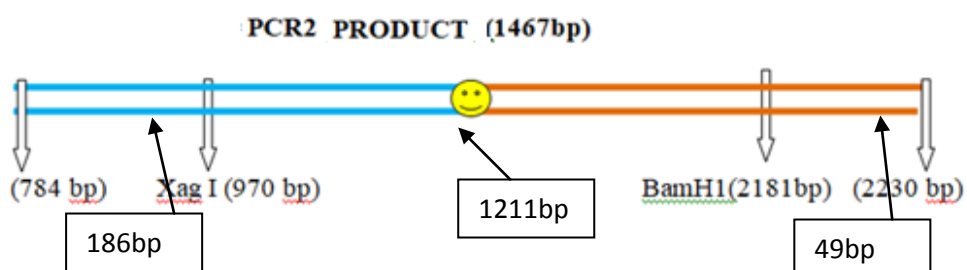
**Εικόνα 12. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης του προϊόντος της PCR2 της δεύτερης φάσης.** Στην εικόνα φαίνεται το προϊόν της PCR2 (V195H), το οποίο έχει μήκος 1467 bp και στο μέσον του οποίου υπάρχει η μετάλλαξη. Παράλληλα, ηλεκτροφορήθηκε και ο μάρτυρας (Ladder) που περιέχει τεμάχια DNA γνωστού μοριακού μεγέθους έτσι ώστε να είναι δυνατός ο υπολογισμός του μοριακού μεγέθους των προϊόντων των PCR.

Στη συνέχεια, το DNA που προήλθε από την PCR2 απομονώθηκε από το πήκτωμα (Εικόνα 13), με σκοπό τη πέψη του από συγκεκριμένα ένζυμα.



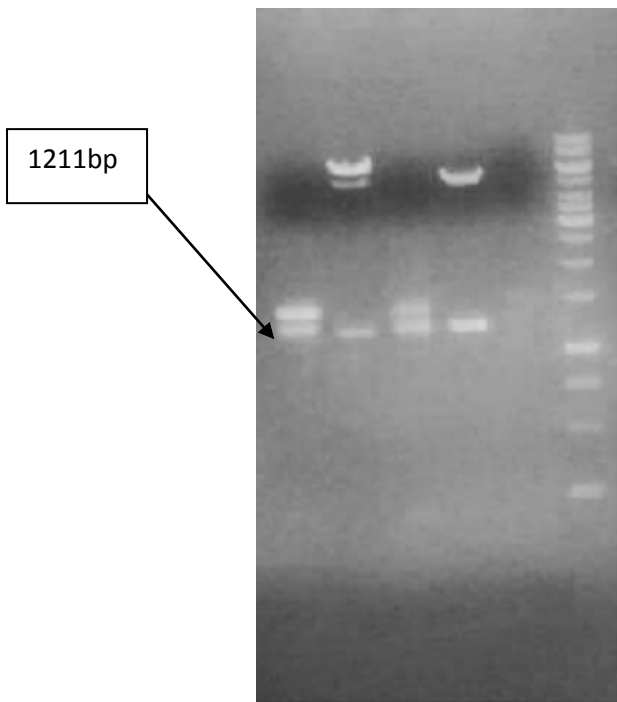
**Εικόνα 13. Απομόνωση των επιθυμητών προϊόντων PCR2 δεύτερης φάσης από το πήκτωμα αгарόζης.**

Το προϊόν που προήλθε από την PCR2 υποβλήθηκε σε πέψη με τα ένζυμα περιορισμού XagI και BamHI (Εικόνα 14).



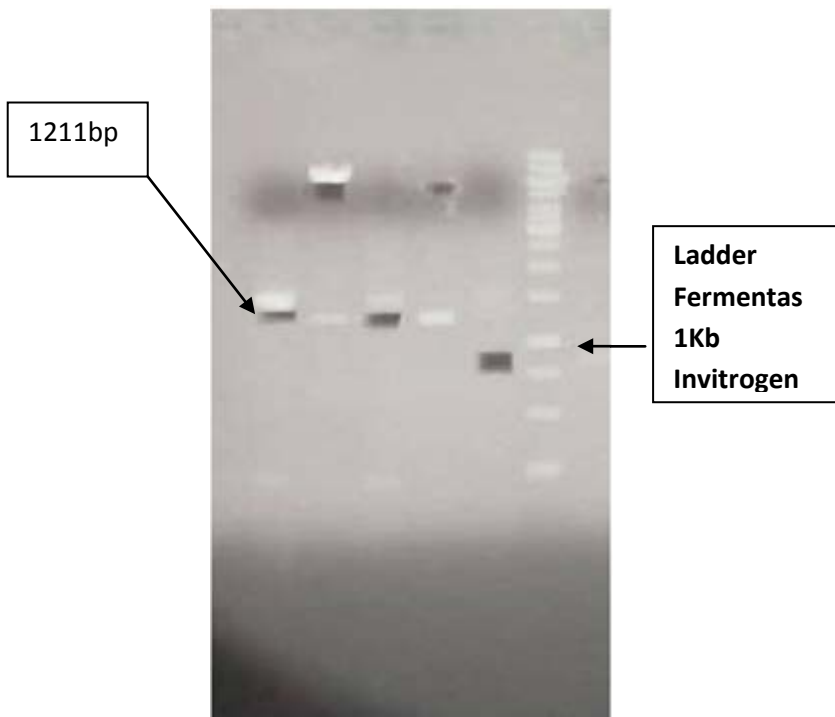
**Εικόνα 14.** Πέψη προϊόντος του PCR2 (που περιέχει τη μετάλλαξη V195H) με τα ένζυμα Xag I και BamHI. Το πρόσωπο παριστάνει το σημείο της μετάλλαξης.

Από την πέψη αυτή, λάβαμε τρία τεμάχια DNA του CRF<sub>2</sub>R με μεγέθη, 1211bp, 186bp και 49bp (Εικόνα 14). Από τα τεμάχια αυτά των DNA απομονώθηκε εκείνο που φέρει τη V195H μετάλλαξη και το οποίο βρίσκεται μεταξύ των θέσεων πέψης των ενζύμων και έχει μέγεθος 1211bp (Εικόνα 15).



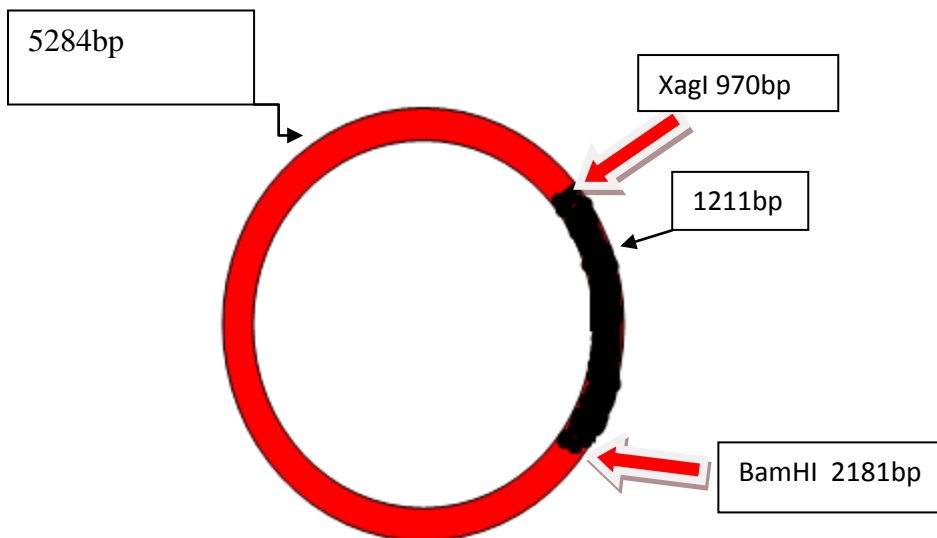
*Εικόνα 15. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης του προϊόντος του hCRF2R-wt/pCIN4. Στην εικόνα φαίνεται τα προϊόντα της πέψης τα οποία έχουν 1211 bp Παράλληλα, ηλεκτροφορήθηκε και ο μάρτυρας (Ladder) που περιέχει τεμάχια DNA γνωστού μοριακού μεγέθους έτσι ώστε να είναι δυνατός ο υπολογισμός του μοριακού μεγέθους*

Στη συνέχεια, το DNA με μέγεθος 1211bp που προήλθε από την πέψη του PCR2 με τα ένζυμα XagI και BamHI απομονώθηκε από το πήκτωμα (Εικόνα 16), με σκοπό τη χρησιμοποίησή του σε αντιδράσεις συρραφής όπως αναφέρεται παρακάτω.



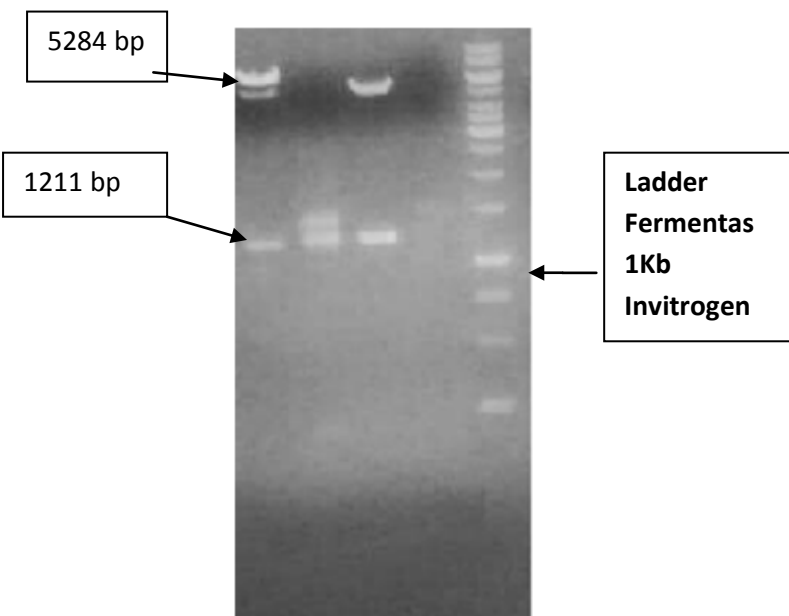
*Εικόνα 16. Απομόνωση του επιθυμητού προϊόντος πέψης του PCR2 της δεύτερης φάσης από το πήκτωμα αγαρόζης*

Παράλληλα έγινε πέψη του πλασμιδιακού DNA που κωδικοποιεί τον άγριο τύπο (WT) CRF<sub>2</sub>R (hCRF2R-wt/pCIN4) με τα ένζυμα BamHI και XagI (Εικόνα 17).



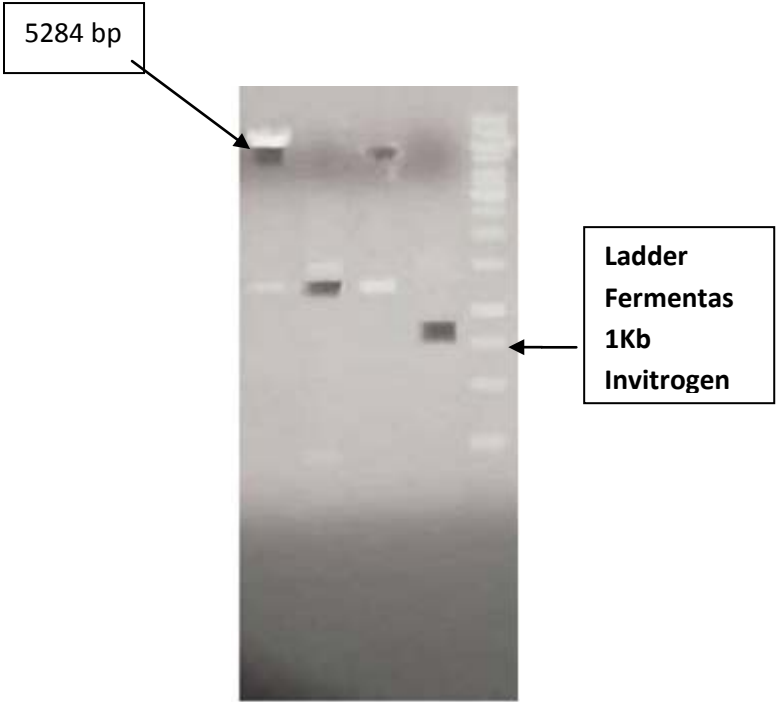
*Εικόνα 17. Πέψη πλασμιδιακού DNA CRF2 / pCIN4 με τα ένζυμα Xag I και BamHI.*

Από τα προϊόντα της πέψης αυτής προέκυψαν τεμάχια hCRF2R-wt/pCIN4 DNA που είχαν μεγέθη περίπου 5284bp και 1211bp (Εικόνα 18).



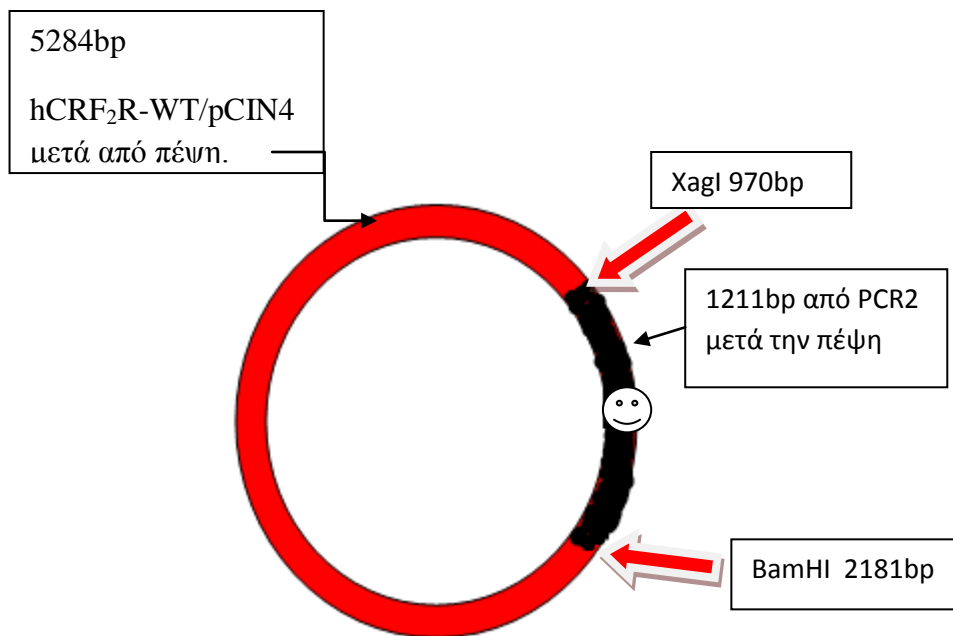
**Εικόνα 18.** Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης του προϊόντος του hCRF2R-wt/pCIN4. Στην εικόνα φαίνεται τα προϊόντα της πέψης τα οποία έχουν μήκος 5284 bp και 1211 bp Παράλληλα, ηλεκτροφορήθηκε και ο μάρτυρας (Ladder) που περιέχει τεμάχια DNA γνωστού μοριακού μεγέθους έτσι ώστε να είναι δυνατός ο υπολογισμός του μοριακού μεγέθους των προϊόντων των PCR.

Στη συνέχεια, το προϊόν πέψης του hCRF2R-wt/pCIN4 με τα ένζυμα XagI και BamHI το οποίο είχε μέγεθος 5284bp απομονώθηκε (Εικόνα 19).



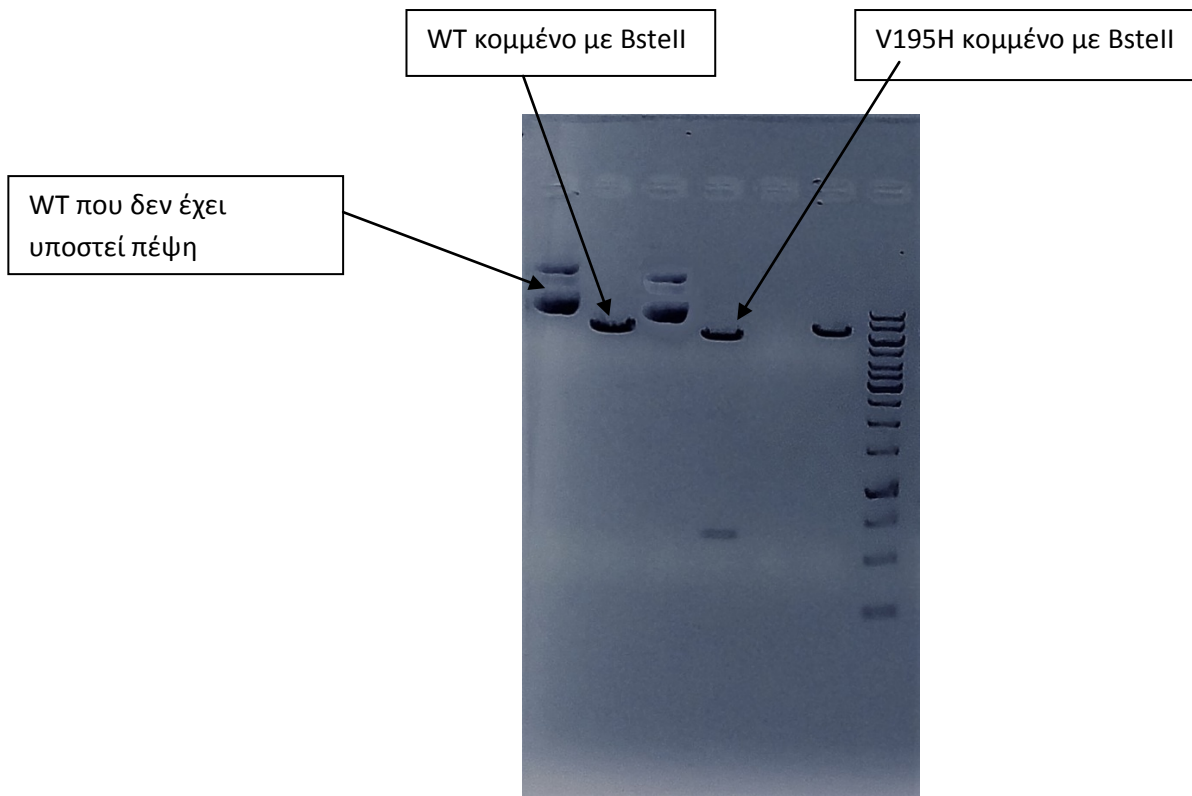
*Εικόνα 19. Απομόνωση του επιθυμητού προϊόντος πέψης του hCRF2R-wt/pCIN4 από το πήκτωμα αγαρόζης.*

Ακολούθησε συρραφή του προϊόντος πέψης (με BamHI και XagI) του hCRF<sub>2</sub>R-WT/pCIN4 με μέγεθος 5284bp και του προϊόντος πέψης (με BamHI και XagI) του PCR2 που φέρει τη V195. Η μετάλλαξη και το οποίο έχει μέγεθος 1211bp (Εικόνα 20). Το προϊόν της συρραφής τους ήταν το πλασμιδιακό DNA hCRF<sub>2</sub>R-V195H/pCIN4 το οποίο εισάχθηκε σε βακτήρια, πολλαπλασιάστηκε και απομονώθηκε με τη μέθοδο miniprep δίνοντας έτσι το πλασμιδιακό DNA hCRF<sub>2</sub>R-V195H/pCIN4.



**Εικόνα 20.** Συρραφή του προϊόντος πέψης του hCRF<sub>2</sub>R-WT/pCIN4 (5284bp) και του προϊόντος πέψης του PCR2 (1211bp) που φέρει τη V195H .

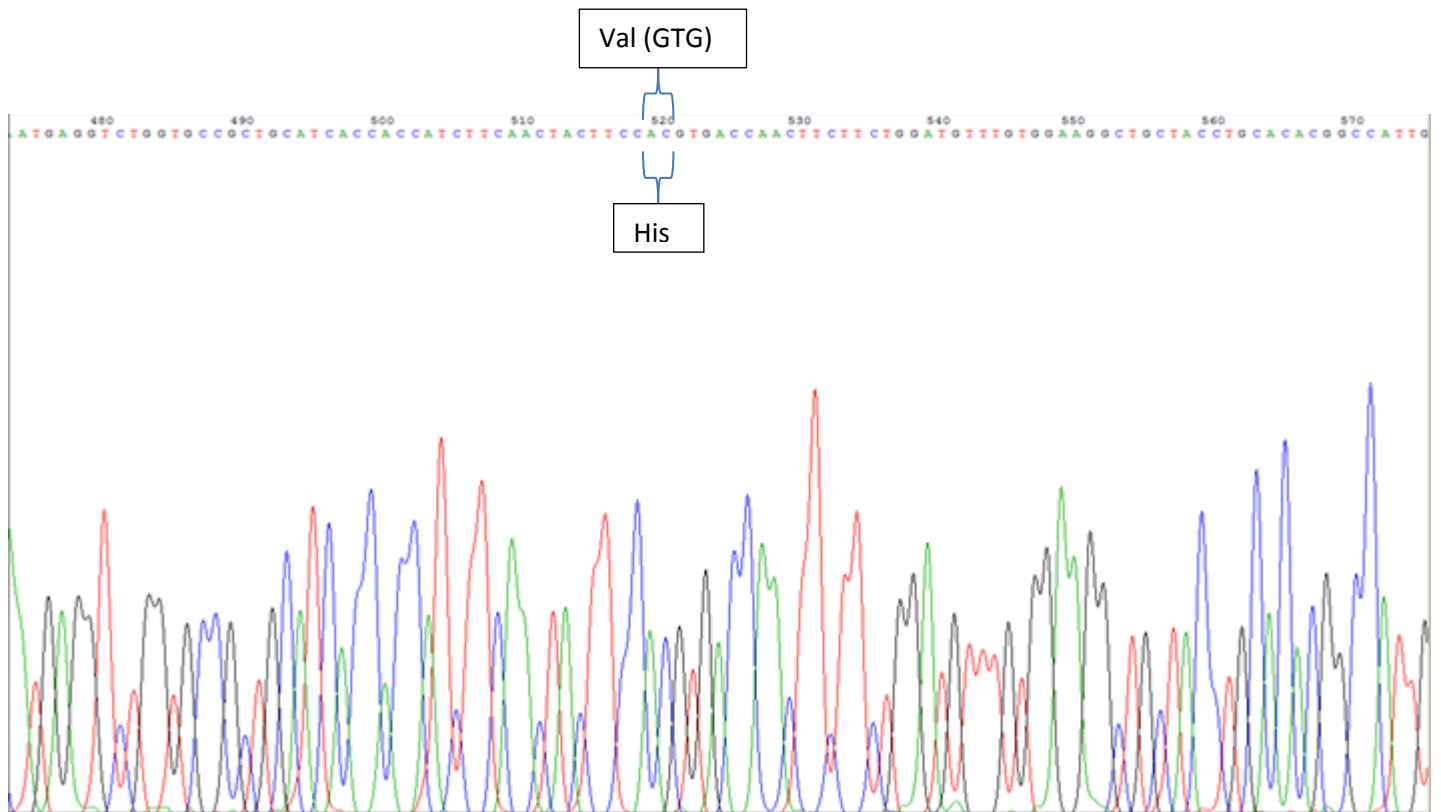
Με σκοπό να προσδιορίσουμε την εισαγωγή της V195H μετάλλαξης στον hCRF<sub>2</sub>R χρησιμοποιήσαμε το περιοριστικό ενζύμου BstE II . Συγκεκριμένα το ένζυμο αυτό πέπτει το hCRF<sub>2</sub>R-wt/pCIN4 δημιουργώντας ένα μόνο προϊόν πέψης μεγέθους 6495bp (CRF<sub>2</sub>- BstE II) το οποίο δεν δημιουργείται στον μεταλλαγμένο V195H υποδοχέα αφού η μετάλλαξη V195H αφαιρεί τη θέση πέψης του ενζύμου BstE II. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 21 ο CRF<sub>2</sub>-V195H δεν πέπτεται από το BstE II αφού στο πήκτωμα αγαρόζης εμφανίζεται διαφορετικά από τον CRF<sub>2</sub>-BstE II, όπως εμφανίζονται τα κυκλικά πλασμίδια σε σύγκριση με τα αντίστοιχα γραμμικά μετά από πέψη τους από ένα ένζυμο.



**Εικόνα 21.** Τμήματα των DNA του *hCRF<sub>2</sub>R-wt/pCIN4* (WT) καθώς και του *hCRF<sub>2</sub>R-V195H /pCIN4* (V195H) που προήλθαν από τη πέψη τους με το ένζυμο *BstE II*. Παράλληλα, ηλεκτροφορήθηκε και ο μάρτυρας (*Ladder*) που περιέχει τεμάχια DNA γνωστού μοριακού μεγέθους έτσι ώστε να είναι δυνατός ο υπολογισμός του μοριακού μεγέθους των προϊόντων πέψης.

Περαιτέρω επιβεβαίωση της εισαγωγής της V195H μετάλλαξης στον CRF<sub>2</sub>R έγινε με ανάγνωση της αλληλουχίας του DNA του μεταλλαγμένου υποδοχέα. Στην Εικόνα 22 φαίνεται η αλληλουχία των νουκλεοτιδίων του DNA CRF<sub>2</sub>RV195H/pCIN4 που κωδικοποιούν το αμινοξύ His (CAC) ενώ τα αντίστοιχα νουκλεοτίδια στο DNA του άγριου τύπου CRF<sub>2</sub>R/pCIN4 κωδικοποιούν το αμινοξύ Val (GTG).

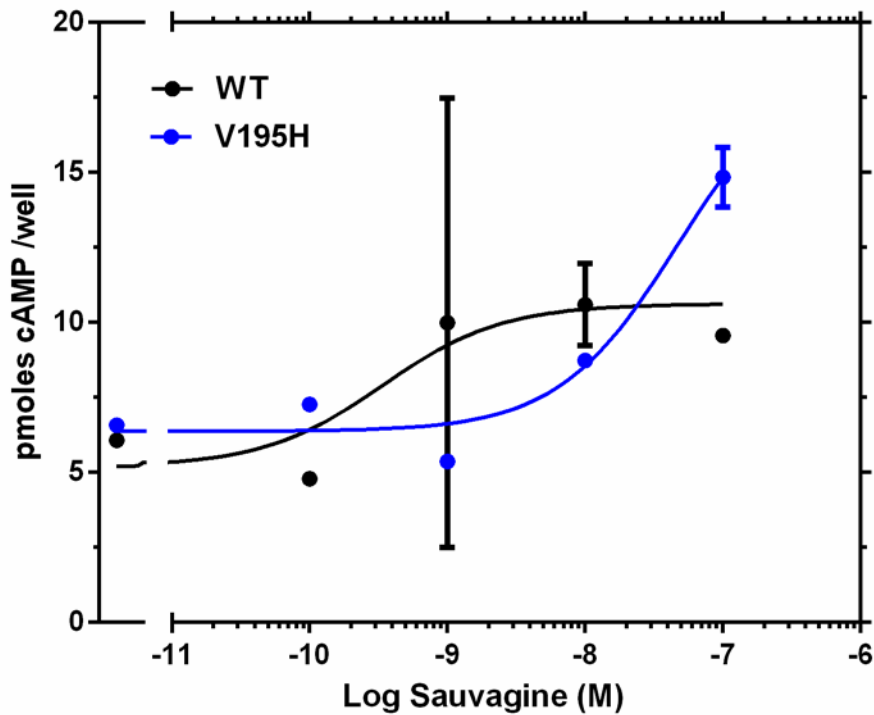




**Εικόνα 22. Μετάλλαξη της Val195 σε His.** Στο χρωματογράφημα διακρίνεται η περιοχή των νουκλεοτιδίων μέσα στην οποία υπάρχει η αλληλουχία CAC που κωδικοποιεί την His στη θέση 195 του μεταλλαγμένου CRF<sub>2</sub>R (V195H). Τα νουκλεοτίδια αυτά αντικατέστησαν τα νουκλεοτίδια GTG που κωδικοποιούν το αμινοξύ Val στη θέση 195 του άγριου τύπου CRF<sub>2</sub>R (WT).

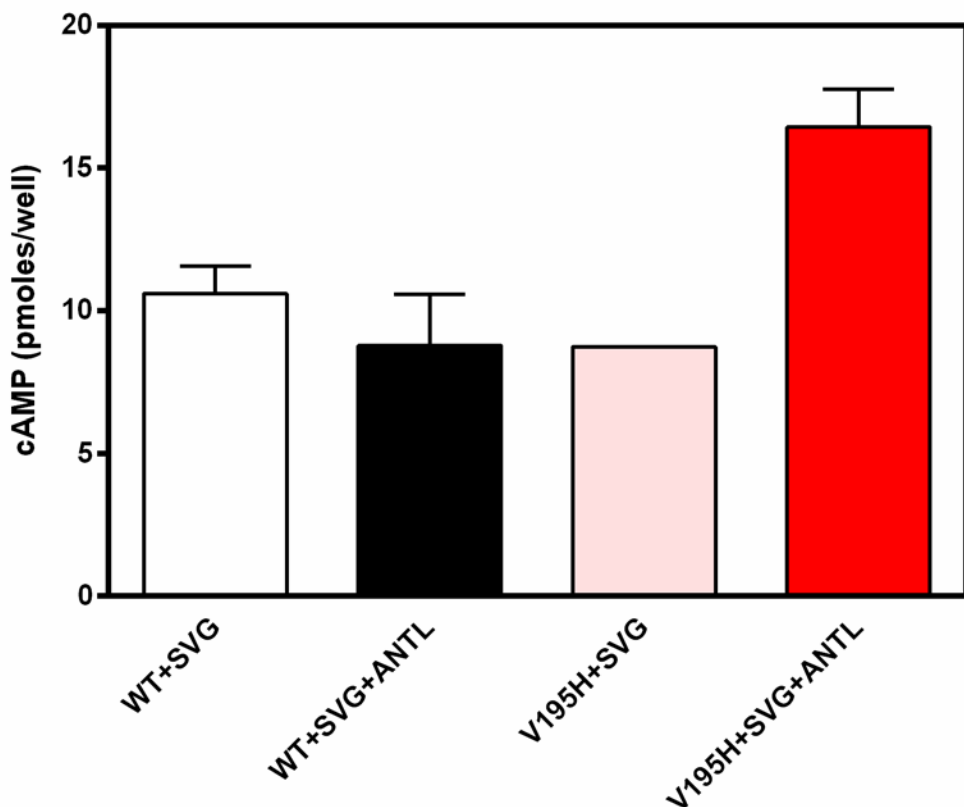
#### 4.2 Φαρμακολογικός χαρακτηρισμός του CRF<sub>2</sub>R-V195H

Ο φαρμακολογικός χαρακτηρισμός του μεταλλαγμένου CRF<sub>2</sub>R-V195H καθώς και του άγριου τύπου CRF<sub>2</sub>R (CRF<sub>2</sub>R-WT) (ως δείγμα αναφοράς), επιτεύχθηκε με προσδιορισμό της ικανότητας της σοβαγίνης να διεγείρει την παραγωγή ενδοκυττάριας κυκλικής μονοφωσφορικής αδενοσίνης (cAMP) σε HEK 293 κύτταρα που εκφράζανε τους υποδοχείς αυτούς.



**Εικόνα 23: Διέγερση παραγωγής cAMP από την σοβαγίνη.** Η διέγερση της παραγωγής ενδοκυττάριου cAMP από αυξανόμενες συγκεντρώσεις σοβαγίνης, επιτεύχθηκε όπως αναφέρεται στη παράγραφο «Υλικά και Μέθοδοι» σε άθικτα HEK 293 κύτταρα που εκφράζανε τον άγριο τύπο υποδοχέα (CRF<sub>2</sub>R-WT) ή τη μεταλλαγμένη μορφή του (CRF<sub>2</sub>R-V195H). Η τιμή logEC<sub>50</sub> υπολογίστηκε με μη γραμμική ανάλυση των αποτελεσμάτων (nonlinear regression analysis).

Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 23 η μετάλλαξη της βαλίνης σε ιστιδίνη (CRF<sub>2</sub>R-V195H) ελάττωσε την ικανότητα της σοβαγίνης να διεγείρει την παραγωγή ενδοκυττάριου κυκλικού AMP σε HEK 293 κύτταρα που εκφράζανε τον υποδοχέα. Συγκεκριμένα, η ισχύς της σοβαγίνης για τον CRF<sub>2</sub>R-WT (-LogEC<sub>50</sub> = 9.47) ήταν μικρότερη από εκείνη για τον CRF<sub>2</sub>R-V195H (-LogEC<sub>50</sub> = 7.33).



**Εικόνα 24:** Ανταγωνισμός της σοβαγίνης από την ανταλαρμίνη να διεγείρει τη παραγωγή ενδοκυττάριου cAMP. Η διέγερση της παραγωγής cAMP από 10 nM σοβαγίνης απουσία (WT+SVG , V195H+SVG) ή παρουσία (WT+SVG+ANTL, V195H+SVG+ANTL) 1000nM ανταλαρμίνης, επιτεύχθηκε όπως αναφέρεται στη παράγραφο «Υλικά και Μέθοδοι» σε άθικτα HEK 293 κύτταρα που εκφράζανε τον άγριο τύπο υποδοχέα (WT) ή τη μεταλλαγμένη μορφή του (V195H).

Επίσης, όπως φαίνεται στην Εικόνα 24 η ανταλαρμίνη δεν φάνηκε ικανή να ανταγωνιστεί την σοβαγίνη στο να διεγείρει τη παραγωγή cAMP σε κύτταρα που εκφράζουν τον άγριο τύπο CRF<sub>2</sub>R, αφού η σοβαγίνη σε συγκέντρωση 10 nM επέφερε σχεδόν το ίδιο αποτέλεσμα απουσία ((WT+SVG) και παρουσία ανταλαρμίνης 1μM (WT+SVG+ANTL). Παρόμοια, η ανταλαρμίνη δεν μπόρεσε να ανταγωνιστεί την σοβαγίνη στο να διεγείρει την παραγωγή cAMP σε κύτταρα που εκφράζουν τον CRF<sub>2</sub>R-V195.

## 5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

---

Στη μελέτη αυτή ξεκινήσαμε τη λήψη πληροφοριών για την διαλεύκανση του μοριακού μηχανισμού της εκλεκτικότητας δέσμευσης των μη πεπτιδικών ανταγωνιστών στον CRF<sub>1</sub>R. Όλοι οι μη πεπτιδικοί ανταγωνιστές που υπάρχουν σήμερα δεσμεύονται εκλεκτικά στον CRF<sub>1</sub>R αλλά όχι στον CRF<sub>2</sub>R. Προηγούμενη μελέτη έδειξε ότι η εκλεκτικότητα δέσμευσης των μη πεπτιδικών ανταγωνιστών στον CRF<sub>1</sub>R οφείλεται στην ύπαρξη δύο αμινοξέων του CRF<sub>1</sub>R που δεν υπάρχουν στον CRF<sub>2</sub>R<sup>41</sup>. Τα αμινοξέα αυτά είναι η His199 στη τρίτη διαμεμβρανική περιοχή (TM3) και η Met276 στη πέμπτη διαμεμβρανική περιοχή (TM5) του CRF<sub>1</sub>R. Τα αντίστοιχα αμινοξέα στον CRF<sub>2</sub>R είναι η Val195 στη TM3 και η Ile272 στη TM5. Αντικατάσταση της His199 του CRF<sub>1</sub>R από το αντίστοιχο αμινοξύ του CRF<sub>2</sub>R μείωσε σημαντικά τη δέσμευση των CRF<sub>1</sub>R-εκλεκτικών μη πεπτιδικών ανταγωνιστών. Το αποτέλεσμα αυτό θα μπορούσε να ήταν άμεσο λόγω κατάργησης αλληλεπίδρασης υποδοχέα-προσδέτη ή και έμμεσο λόγω αποσταθεροποίησης της δομής του υποδοχέα, όπως προτάθηκε σε πρόσφατη κρυσταλλογραφική μελέτη του CRF<sub>1</sub>R<sup>45</sup>. Συγκεκριμένα στη μελέτη αυτή προτάθηκε ότι η His199 μαζί με άλλα αμινοξέα σχηματίζουν ένα δίκτυο δεσμών λίγο πάνω από τις θέσεις δέσμευσης του μη πεπτιδικού ανταγωνιστή, CP-376395 στον CRF<sub>1</sub>R. Αν και δεν δεσμεύει το CP-376395, η His199 αλληλεπιδρά με τη Tyr327 της έκτης διαμεμβρανικής περιοχής (TM6). Η αλληλεπίδραση αυτή όπως και της Met276 με τη Phe203 της TM3 βοηθούν στη σωστή τοποθέτηση των Tyr327 και Phe203 που αποτελούν θέσεις δέσμευσης των CRF<sub>1</sub>R-εκλεκτικών μη πεπτιδικών ανταγωνιστών. Μια άλλη πρόταση για τον έμμεσο ρόλο των αμινοξέων αυτών στη δέσμευση των CRF<sub>1</sub>R-εκλεκτικών ανταγωνιστών είναι ότι ελέγχουν την προσβασιμότητα των μορίων αυτών στις θέσεις δέσμευσής τους<sup>45</sup>. Στις μελέτες αυτές εξετάστηκε η επίπτωση των μεταλλάξεων των His199 ή Met276 του CRF<sub>1</sub>R στη δέσμευση των μη πεπτιδικών ανταγωνιστών στον υποδοχέα αυτόν. Όμως δεν έχει ακόμα επιτευχθεί το αντίστροφο.

Με βάση τα παραπάνω υποθέσαμε ότι η αντικατάσταση της Val195 του CRF<sub>2</sub>R από την αντίστοιχη His199 του CRF<sub>1</sub>R θα μπορούσε να επιτρέψει τη δέσμευση των CRF<sub>1</sub>R-εκλεκτικών μη πεπτιδικών ανταγωνιστών στον CRF<sub>2</sub>R. Έτσι λοιπόν εξετάσαμε το λειτουργικό ρόλο της Val195 του CRF<sub>2</sub>R, μεταλλάσσοντας αυτή

σε His199 (V195H) και προσδιορίζοντας τις φαρμακολογικές ιδιότητες του υποδοχέα πριν και μετά τη μετάλλαξη. Συγκεκριμένα επιμόλωναμε HEK293 κύτταρα με το πλασμίδιο που κωδικοποιεί τον μεταλλαγμένο CRF<sub>2</sub>R, V195H, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της λιποφεκταμίνης. Η επιλογή της μεθόδου της λιποφεκταμίνης έγινε καθώς εμφανίζει μειωμένη κυτταροτοξικότητα και αυξημένη απόδοση συγκριτικά με άλλες μεθόδους επιμόλυνσης<sup>31</sup>. Συγκεκριμένα η μέθοδος της λιποφεκταμίνης, χρησιμοποιεί συνθετικά κατιονικά λιπίδια τα οποία έχουν ένα θετικά φορτισμένο τμήμα ενωμένο μέσω ενός εστερικού δεσμού με μια λιπιδική ομάδα. Το θετικά φορτισμένο τμήμα αντιδρά με τα αρνητικά φορτία των φωσφορικών ομάδων του DNA και σχηματίζουν το σύμπλοκο λιπίδια-DNA. Η αλληλεπίδραση αυτή προσδίδει στο σύμπλοκο λιπίδια-DNA ένα καθαρό θετικό φορτίο το οποίο μειώνει τις απωστικές δυνάμεις μεταξύ των αρνητικά φορτισμένων τμημάτων DNA και της αρνητικά φορτισμένης επιφάνειας της πλασματικής μεμβράνης των κυττάρων. Αλληλεπίδραση του συμπλόκου λιπίδια-DNA με τη πλασματική μεμβράνη του κυττάρου οδηγεί στην ενδοκυττάρωση του<sup>34</sup>.

Στη συνέχεια εξετάστηκαν οι φαρμακολογικές ιδιότητες του μεταλλαγμένου CRF<sub>2</sub>R, V195H, προσδιορίζοντας την ικανότητα του να ενεργοποιείται από το συγγενές πεπτίδιο του CRF, σοβαγίνη, και να διεγείρει την παραγωγή ενδοκυττάρου κυκλικού AMP σε HEK293 κύτταρα που εκφράζουν τον υποδοχέα αυτόν. Παράλληλα πραγματοποιήσαμε τις ίδιες μελέτες και σε κύτταρα που εκφράζουν τον άγριο τύπο CRF<sub>2</sub>R (WT) με σκοπό να συγκρίνουμε τις φαρμακολογικές ιδιότητες των δύο διαφορετικών τύπων υποδοχέων του CRF. Στις μελέτες αυτές προσδιορίσαμε επίσης την ικανότητα του μη πεπτιδικού ανταγωνιστή, ανταλαρμίνη, να ανταγωνίζεται τις δράσεις της σοβαγίνης. Τα πειράματά μας έδειξαν ότι η V195H μετάλλαξη του CRF<sub>2</sub>R μείωσε την ισχύ με την οποία η σοβαγίνη διεγείρει τη παραγωγή ενδοκυττάρου cAMP σε κύτταρα που εκφράζουν τον εν λόγω υποδοχέα. Αντίθετα, σε προηγούμενη μελέτη βρέθηκε ότι η αντικατάσταση της H199 του CRF<sub>1</sub>R από την V195 του CRF<sub>2</sub>R δεν επηρέασε σημαντικά την δέσμευση των αγωνιστών στον CRF<sub>1</sub>R<sup>41</sup>. Πιθανόν η V195 να αποτελεί θέση δέσμευσης της σοβαγίνης στον CRF<sub>2</sub>R αλλά όχι στον CRF<sub>1</sub>R. Εναλλακτικά θα μπορούσε η μετάλλαξη V195H να επηρεάσει έμμεσα τη δέσμευση της σοβαγίνης στον CRF<sub>2</sub>R, επηρεάζοντας την δομή του υποδοχέα. Πιθανόν αυτό να οφείλεται στο ότι η δομή του CRF<sub>2</sub>R είναι διαφορετική εκείνης του CRF<sub>1</sub>R, αφού οι δύο αυτοί υποδοχείς έχουν διαφορετική ομολογία αμινοξέων.

Σε αντίθεση με την ισχύ της σοβαγίνης η V195H μετάλλαξη δεν άλλαξε τον φαινότυπο του CRF<sub>2</sub>R όσο αφορά τη δέσμευση των CRF<sub>1</sub>R-εκλεκτικών ανταγωνιστών στον υποδοχέα αυτόν. Συγκεκριμένα ο CRF<sub>1</sub>R-εκλεκτικός μη πεπτιδικός ανταγωνιστής, ανταλαρμίνη, δεν κατόρθωσε να δεσμευτεί τον μεταλλαγμένο CRF<sub>2</sub>R, V195H, και να ανταγωνιστεί έτσι τη σοβαγίνη, να διεγείρει το ένζυμο της αδενυλοκυκλάσης σε κύτταρα που εκφράζουν τον υποδοχέα αυτόν. Ίσως η ταυτόχρονη μετάλλαξη των Val195 και Iso272 του CRF<sub>2</sub>R στα αντίστοιχα αμινοξέα του CRF<sub>1</sub>R δηλαδή σε His και Met να μπορέσει να αλλάξει το φαινότυπο του CRF<sub>2</sub>R όσο αφορά τη δέσμευση των μη πεπτιδικών CRF<sub>1</sub>R-εκλεκτικών ανταγωνιστών. Πειράματα που διεξάγονται στο εργαστήριο θα μπορέσουν να διευκρινίσουν περισσότερο το ρόλο των αμινοξέων αυτών στη δέσμευση μη πεπτιδικών CRF<sub>1</sub>R-εκλεκτικών ανταγωνιστών στους υποδοχείς του CRF .

## 6.Βιβλιογραφία

---

- <sup>1</sup> Vale W, S.J., Rivier C, Rivier J, *Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin*. Science, 1981. **213**: p. 1394-1397.
- <sup>2</sup> Tsigos C. and Chrousos G. P. ‘*Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis, Neuroendocrine Factors and Stress*’,*Journal of Psychosomatic Research*, 2002. **53**: p. 865 – 871.
- <sup>3</sup> Makrigiannakis A, Zoumakis E, Margioris AN, Theodoropoulos P, Stournaras C, Gravanis A. *The corticotropin-releasing hormone (CRH) in normal and tumoral epithelial cells of human endometrium*, *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 1995. **80**(1): p. 185-9.
- <sup>4</sup> Ekman R. Serenius B. Castro MG. et al. *Biosynthesis of corticotropin-releasing hormone in human T-lymphocytes*. *Journal of Neuroimmunol*, 1993. **44**: p. 7-13.
- <sup>5</sup> Venihaki M. Gravanis A. Margioris A.N. Comparative study between normal rat chromaffin and PC12 rat pheochromocytoma cells: production and effects of corticotropin-releasing hormone. *Endocrinology*. 1997;138(2):698-704
- <sup>6</sup> Dautzenberg F. M. and Hauger R. L., ‘*The CRF Peptide Family and Their Receptors: Yet More Partners Discovered*’. *TRENDS in Pharmacological Sciences* 2002. **23**: p. 71-77.
- <sup>7</sup> Vaughan J. Donaldson C. Bittencourt J. et al, ‘*Urocortin, a Mammalian Neuropeptide Related to Fish Urotensin I and to Corticotropin-Releasing Factor*. nature, 1995. **378**: p. 287-292.
- <sup>8</sup> Cepoi D. Sutton St. Arias C. et al ‘*Ovine genomic urocortin: cloning, pharmacologic characterization, and distribution of central mRNA*. *Molecular Brain Research* 1999. **68**: p. 109-118.
- <sup>9</sup> Zhao L. , Donaldson C. J. Smith G. W. et al, *The Structures of the Mouse and Human Urocortin Genes (Ucn and UCN)*. *Genomics*, 1998. **50**: p. 23-33.
- <sup>10</sup> Donaldson C. J. Sutton S. W. Perrin M. H et al, ‘*Cloning and Characterization of Human Urocortin.*’, *Endocrinology*. *Endocrinology*, 1996. **137**: p. 3896..
- <sup>11</sup> Reyes T. M. Lewis K. , Perrin M. H. 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*, 2000. **98**: p. 2843-2848.

<sup>12</sup> Montecucchi P. C. , Henschen A. *Amino acid composition and sequence analysis of sauvagine, a new active peptide from the skin of Phyllomedusa sauvagei.*

*International Journal of Peptide and Protein Research* 1981. **18**: p. 113-120.

<sup>13</sup> Pallai P.V, Mabilia M, Goodman M, Vale W, Rivier J. *Structural homology of corticotropin-releasing factor, sauvagine, and urotensin I: circular dichroism and prediction studies. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1983. **80**: p. 6770–6774.

<sup>14</sup> Lewis K ,Li C , Perrin M. H et al, *Identification of urocortin III, an additional member of the corticotropin-releasing factor (CRF) family with high affinity for the CRF2 receptor.* *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001. **98**: p. 7570-7575.

<sup>15</sup> Reul, J. M. H. M. & Holsboer, F *Corticotropin-releasing factor receptors 1 and 2 in anxiety and depression. Current Opinion in Pharmacology*, 2002. **2**: p. 22-23.

<sup>16</sup> Fahmy H, Spyridaki K, Kuppast B, Liapakis G. *he "homeostasis hormone" and its CRF(1) receptor. From structure to function. Hormones* 2012. **11**: p. 254-271.

<sup>17</sup> Lederis K, Letter A, McMaster D et al, *Complete Amino Acid Sequence of Urotensin I, a Hypotensive and Corticotropin-Releasing Neuropeptide from Catostomus. science*, 1982. **218**: p. 162-165.

<sup>18</sup> Rivier J, Rivier C, Vale W, *Synthetic competitive antagonists of corticotropin-releasing factor: effect on ACTH secretion in the rat. Science*, 1984. **224**: p. 889-91

<sup>19</sup> Perrin M.H, Haas Y, Rivier JE, Vale WW *Corticotropin-releasing factor binding to the anterior pituitary receptor is modulated by divalent cations and guanyl nucleotides. Endocrinology*, 1986. **118**: p. 1171-9.

<sup>20</sup> Eckart K, Jahn O, Radulovic J, et al. *Pharmacology and biology of corticotropin-releasing factor (CRF) receptors. Receptors Channels*, 2002. **8**: p. 163-77.

<sup>21</sup> Merlino F. ,Di Maro S. Munaim Yousif A. et al, *Urotensin-II Ligands: An Overview from Peptide to Nonpeptide Structures. Journal of Amino Acids*, 2013: p. 1-15.

<sup>22</sup> Venihaki M, Sakihara S, Subramanian S. et al, *Urocortin III, a Brain Neuropeptide of the Corticotropin-Releasing Hormone Family: Modulation by Stress and Attenuation of Some Anxiety-like Behaviours. Journal of Neuroendocrinology*, 2004. **16**: p. 411–422.



- <sup>23</sup> Liapakis G, Cordomi A, and Pardo L, *The G-Protein Coupled Receptor Family: Actors with Many Faces*. Current Pharmaceutical Design, 2012. **18**: p. 175-185.
- <sup>24</sup> Pioszak A. A. Parker N. R. Suino-Powell K. et al, *Molecular Recognition of Corticotropin-Releasing Factor by Its G-Protein-Coupled Receptor CRFR1*. Journal of Biological Chemistry, 2008. **283**: p. 32900-32912.
- <sup>25</sup> Plotsky P. M. and Vale W. W., *Hemorrhage-Induced Secretion of Corticotropin-Releasing Factor-like Immunoreactivity into the Rat Hypophysial Portal Circulation and Its Inhibition by Glucocorticoids*. Endocrinology, 1984. **114**: p. 164-169.
- <sup>26</sup> Tsigos C. and Chrousos G.P., *Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis, Neuroendocrine Factors and Stress*. in Journal of Psychosomatic Research, 2002. **53**: p. 865 – 871.
- <sup>27</sup> Souza, E.B. De *Corticotropin-Releasing Factor Receptors: Physiology, Pharmacology, Biochemistry and Role in Central Nervous System and Immune Disorders*. Psychoneuroendocrinology, 1995. **20**: p. 789--819.
- <sup>28</sup> Laburthe M, Couvineau A, Gaudin P, Maoret JJ, Rouyer-Fessard C, Nicole P. *Receptors for VIP, PACAP, secretin, GRF, glucagon, GLP-1, and other members of their new family of G protein-linked receptors: structure-function relationship with special reference to the human VIP-1 receptor*. Annals of the New York Academy of Sciences, 1996. **805**: p. 94-109.
- <sup>29</sup> Harmar A.J. *Family-B G-protein-coupled receptors*. Genome Biology 2001 .
- <sup>30</sup> Gether U. *Uncovering Molecular Mechanisms Involved in Activation of G Protein-Coupled Receptors*. Endocrine Reviews, 2000. **21**: p. 90-113.
- <sup>31</sup> Kim T.K. and Eberwine J.H., *Mammalian cell transfection: the present and the future*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2010. **397**: p. 3173-8.
- <sup>32</sup> Webster E. L. ,Torpy D. J , Elenkov I. J., *Corticotropin-Releasing Hormone and Inflammation* ,. Annals of the New York Academy of Sciences, 1998. **840**: p. 21-32.
- <sup>33</sup> Karalis K. Sano H. Redwine, J. et al , *‘Autocrine or Paracrine Inflammatory Actions of Corticotropin-Releasing Hormone in Vivo*. Science, 1991. **254**: p. 421-431.
- <sup>34</sup> Felgner, P.L, Gadek, T. R Holm M. et al., *Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1987. **81**: p. 7413-7.
- <sup>35</sup> De Souza, E.B , *Corticotropin-Releasing Factor Receptors: Physiology, Pharmacology, Biochemistry and Role in Central Nervous System and Immune Disorders*. Psychoneuroendocrinology, 1995. **20**: p. 789-819.

- <sup>36</sup> Theoharides T ,Spanos C, Pang X.et al, ‘*Stress-Induced Intracranial Mast Cell Degranulation: A Corticotropin-Releasing Hormone-Mediated Effect.* T, 1995. **136**: p. 5745-5750.
- <sup>37</sup> Assil I.Q, Abou-Samra AB. *N-glycosylation of CRF receptor type 1 is important for its ligandspecific interaction. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 2001. **281**: p. 1015-21.
- <sup>38</sup> Hoare S , Brown B. T. Santos M. A. et al. *Single amino acid residue determinants of non-peptide antagonist binding to the corticotropin-releasing factor1 (CRF1) receptor. biochemical pharmacology*, 2006. **72**: p. 244-255.
- <sup>39</sup> Pisarchik A. and Slominski A. *Corticotropin Releasing Factor Receptor Type 1: Molecular Cloning and Investigation of Alternative Splicing in the Hamster Skin. The Journal of Investigate Dermatology*, 2002. **118**: p. 1065-1072.
- <sup>40</sup> Liapakis G. Venihaki M. Margoris A. et al, ‘*Members of CRF Family and Their Receptors: From Past toFuture.* CurrentMedicinalChemistry, 2011. **18**: p. 2583-2600
- <sup>41</sup> Liaw C. W, Grigoriadis, D. E., Lorang, M. T., De Souza, E. B. & Maki, R. *Localization of agonist- and antagonist-binding domains of human corticotropin-releasing factor receptors. Molecular Endocrinology*, 1997. **11**: p. 2048-2053.
- <sup>42</sup> Harmar A. J. ‘*Family-B G-Protein-Coupled Receptors.* *Genome Biology*, 2001. **2**: p. 3013.
- <sup>43</sup> Berg J. M. , Tymoczko J. L ., and Stryer L., ‘*Proteases: Facilitating a Difficult Reaction.*’, *Biochemistry*, 2002.
- <sup>44</sup> Hillhouse E. and Grammatopoulos D. ‘*The Molecular Mechanisms Underlying the Regulation of the Biological Activity of Corticotropin-Releasing Hormone Receptors: Implications for Physiology and Pathophysiology.* *Endocrine Reviews*, 2006. **27**: p. 260-286.
- <sup>45</sup> Hollenstein K, Kean J. Bortolato A. et al. *Structure of class B GPCR corticotropin-releasing factor receptor 1. Nature*, 2013. **499**: p. 438-443.
- <sup>46</sup> Kornreich, W. D. *Alanine Series of Ovine Corticotropin Releasing Factor (oCRF): A Structure-Activity Relationship Study. journal of medical Chemistry*, 1992. **35**1870-1876.
- <sup>47</sup> Perrin M. H. , DiGruccio M. R., Rivier J. et al,‘ *A Soluble Form of the First Extracellular Domain of Mouse Type 2 Beta Corticotropin-Releasing Factor Receptor Reveals Differential Ligand Specificity*’. *Journal of Biological Chemistry*, 2003.

- <sup>48</sup> Perrin M. H. and Vale W. W. , ‘‘Corticotropin Releasing Factor Receptors and Their Ligand Family’’, *annals New York Academy Of Sciences*, 2006. **885**: p. 312-328.
- <sup>49</sup> Vaughan J. Perrin, M. H. Lewis K. et al, ‘‘Urocortin, a Mammalian Neuropeptide Related to Fish Urotensin I and to Corticotropin-Releasing Factor. *Nature*, 1995. **378**: p. 287-292.
- <sup>50</sup> Hollenstein K. Kean J. , ,Bortolato A. et al, *Structure of Class B GPCR Corticotropin-Releasing Factor Receptor 1. nature*, 2013. **499**: p. 438-443.
- <sup>51</sup> Spyridaki K. Matsoukas M. Cordomi A. et al, ‘‘Structural-Functional Analysis of the Third Transmembrane Domain of the Corticotropin-Releasing Factor Type 1 Receptor: Role in Activation and Allosteric Antagonism.’’. *The Journal of Biological Chemistry*, 2014. **289**: p. 18966-18977