



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗΣ
259Α/260Α ΣΤΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ
ΤΟΥ ΤΥΠΟΥ 1 ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΤΟΥ
CRF.**

Φωθιαδάκη Μυρτώ
Ηράκλειο Κρήτης, 2015

Υπευθυνος Καθηγητής Τμήματος Ιατρικής:

Λιαπάκης Γεώργιος

Επιβλέπων Καθηγητής Τμήματος Χημείας:

Κατερινόπουλος Χαράλαμπος

Ευχαριστίες

Με το πέρας της συγκεκριμένης πτυχιακής εργασίας θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή μου, κ.Λιαπάκη που μου έδωσε την ευκαιρία να ανοίξω τους ορίζοντες μου και να ασχοληθώ με τον κλάδο της Φαρμακολογίας, που πίστεψε σε εμένα και που ήταν πάντα πρόθυμος να με βοηθήσει. Ευχαριστώ την Κατερίνα Σπυριδάκη που με υπομονή με δίδαξε , ήταν πάντα δίπλα μου και που χωρίς εκείνη και την πολύτιμη βοήθεια της τίποτα από αυτά δεν θα ήταν εφικτό. Ευχαριστώ τον Βλάσση για την δημιουργική συνεργασία μας, για τις γνώσεις και τη στήριξη που μου προσέφερε και την όμορφη παρέα. Τέλος, ευχαριστώ τον κ.Κατερινόπουλο για την καθοδήγηση, το ενδιαφέρον, την όρεξη να βοηθήσει και για το ότι είναι πάντα δίπλα στους φοιτητές του.

Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή
 - 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 - λειτουργίας του CRF και των συγγενών του πεπτιδίων.
 - 1.5 Θέσεις δέσμευσης
 - 1.6 Υποδοχείς εκλυτικού παράγοντα της κορτικοτροπίνης
 - 1.7 Εντοπισμός υποδοχέων CRF και βιολογικές δράσεις
 - 1.8 Φαρμακολογικές ιδιότητες υποδοχέων του CRF
 - 1.9 Υποδοχείς του CRF και κυτταρική σηματοδότηση
 - 1.10 Δομή και λειτουργία των υποδοχέων του CRF
2. Υλικά και Μέθοδοι
 - 2.1 Βιολογικά Υλικά
 - 2.2 Μέθοδοι
 - 2.2.1 Καλλιέργεια κυττάρων HEK293
 - 2.3 Φαρμακολογικός χαρακτηρισμός των υποδοχέων
 - 2.3.1 Μελέτες μέτρησης ενδοκυττάριου κυκλικού AMP
 - 2.3.2 Παρασκευή διαλύματος σπινθηρισμού (scintillation fluid)
3. Αποτελέσματα
 - 3.1 Επίδραση της μετάλλαξης W259A/F260A στην ικανότητα της σοβαγίνης να διεγείρει την παραγωγή ενδοκυττάριου κυκλικού AMP.
 - 3.2 Επίδραση της μετάλλαξης W259A/F260A στην ικανότητα του CRF να διεγείρει την παραγωγή ενδοκυττάριου κυκλικού AMP.
4. Συζήτηση
5. Βιβλιογραφία

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Εκλυτικός παράγοντας της κορτικοτροπίνης

Ο εκλυτικός παράγοντας της κορτικοτροπίνης (CRF), είναι ένα πεπτίδιο 41 αμινοξέων που απομονώθηκε από τον υποθάλαμο προβάτων ξεκινώντας από ένα ακατέργαστο υποθαλαμικό εκχύλισμα που οδηγούσε στην απελευθέρωση της αδρενοκορτικοτρόπου ορμόνης (ACTH) από την υπόφυση [1,2]. Η ανακάλυψη βοήθησε σημαντικά στην κατανόηση του ρόλου του CRF στη λειτουργία του υποθαλαμο-υπόφυσο-επινεφριδιακού (HPA) άξονα όπως και σε άλλες φυσιολογικές καθώς και παθοφυσιολογικές καταστάσεις του οργανισμού μας.

Ο υποθάλαμος είναι ο ρυθμιστής αρκετών σημαντικών λειτουργιών, που απαιτούνται για τη διατήρηση της ομοιόστασης του οργανισμού μας [3]. Μέσα στον υποθάλαμο, ο CRF συντίθεται κυρίως στους νευρώνες του παρακοιλιακού πυρήνα (PVN). Αυτοί, λαμβάνουν σήματα από διάφορες περιοχές του εγκεφάλου, όπως είναι η αμυγδαλή, ο βασικός πυρήνας τελικής ταινίας και το εγκεφαλικό στέλεχος [4]. Στον υποθάλαμο προβάλλουν στη μέση προεξοχή, όπου εκλύουν το πεπτίδιο, το οποίο μέσω της πυλαίας κυκλοφορίας μεταφέρεται στην αδενούποφυση. Στη συνέχεια αλληλεπιδρώντας με ειδικές θέσεις δέσμευσής του στα κορτικοτρόφα κύτταρα της υπόφυσης, ο CRF επάγει τη σύνθεση της προ-οπιομελανοκορτίνης και την απελευθέρωση των προϊόντων της, συγκαταλεγμένης της ACTH [3]. Με τη σειρά της η ACTH μετά την έκλυση της από την υπόφυση μεταφέρεται μέσω της κυκλοφορίας του αίματος στα επινεφρίδια όπου διεγείρει την έκλυση κορτιζόλης [5, 6].

Επιπρόσθετα ο CRF παίζει σημαντικό ρόλο στη λειτουργία του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ), καθώς και άλλων, όπως του ενδοκρινικού, ανοσοποιητικού, καρδιαγγειακού, γαστρεντερικού, αναπαραγωγικού και αυτόνομου νευρικού συστήματος αλλά και στις συμπεριφορικές αντιδράσεις των θηλαστικών στο στρες [3, 7].

1.2 Συγγενή πεπτίδια του CRF

Εκτός από τον CRF ανακαλύφθηκαν και άλλα συγγενή με αυτόν πεπτίδια τόσο στα θηλαστικά όσο και σε ψάρια και αμφίβια, τα οποία έχουν παρόμοιες ιδιότητες με εκείνες του CRF (Πίνακας 1). Συγκεκριμένα απομονώθηκαν τα πεπτίδια ουροτενσίνη I (URO) από τα ψάρια και σοβαγίνη (SVG) από τα αμφίβια [8, 9].

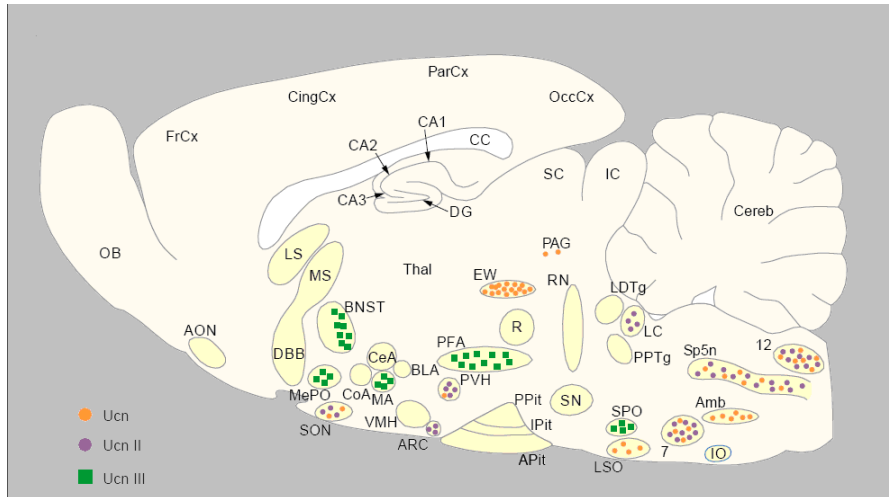
Επίσης ανακαλύφθηκε στα θηλαστικά ένα νέο CRF-συγγενές πεπτίδιο, η ουροκορτίνη (UCN), το οποίο παρουσιάζει ομολογία κατά 43% με τον CRF, 63% με την ουροτενσίνη και 35% με την σοβαγίνη [10, 11].

Πεπτίδιο	Αλληλουχία	Μήκος	Ομολογία (%)
hCRF	SEPPISLDLTFHLLREVLEMARAEQLAQQAHSNRKLMETI	41	100
oCRF	SQEPPIISLDLTFHLLREVLEMTKADQLABQAHSNRKLLDIA	41	83
URO	NDDPPIISIDLTFHLLRNMIEMARIENEREQAGLNKYLDEV	41	54
hUCN	DNPSLSIDLTFHLLRTLLELARTQSQRERAEQNRIFDVS	40	43
SVG	ZGPPISIDLSLELLRKMIETEKQEKEKQQAANNRLLDIT	40	48
mUCNII	VILSLDVPIGLLRILLEQARYKAARNQAATNAQILAHV	38	34
mUCNIII	FTLSLDVPTNIMNIFNIDKAKNLRKAAANAQLMAQI	38	26

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

Πίνακας 1. Γραφική απεικόνιση της αμινοξικής αλληλουχίας του CRF και των συγγενών του πεπτιδίων [12].

Η ουροκορτίνη (UCN) εντοπίζεται σε διάφορες περιοχές του ΚΝΣ, όπως και στους πυρήνες Edinger-Westphal και της πλάγιας ελαίας [13]. Ανιχνεύεται επίσης στον ιππόκαμπο, στα βασικά γάγγλια, στον παρακοιλιακό πυρήνα του υποθαλάμου και στον πλάγιο υποθάλαμο [13] (Εικόνα 1).



Εικόνα 1. Κατανομή των ουροκορτινών στον εγκέφαλο αρουραίου. Με κίτρινο, μωβ και πράσινο απεικονίζονται οι κατανομές της Ucn, της UcnII και της UcnIII, αντίστοιχα [13].

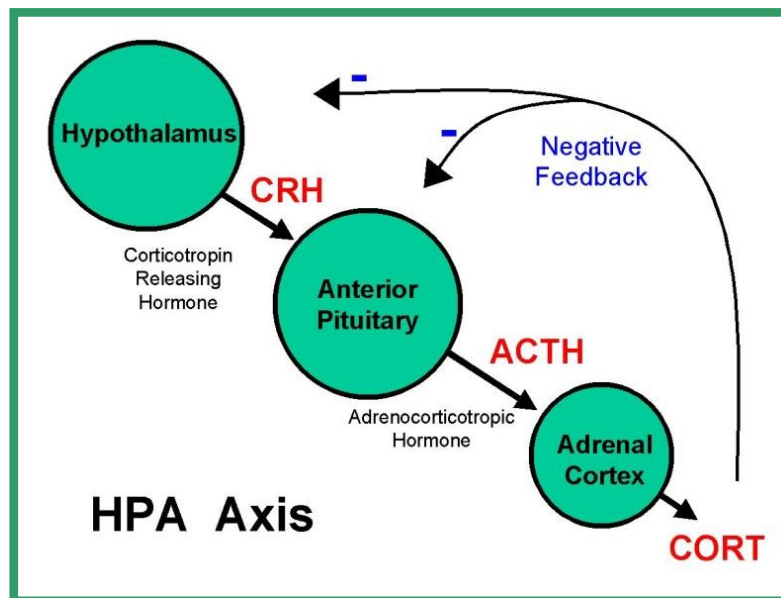
Η κατανομή του CRF και της UCN στον εγκέφαλο παρουσιάζει μικρή αλληλοεπικάλυψη, συμβαδίζοντας με τις διαφορετικές δράσεις τους. Το πεπτιδίο αυτό όπως και ο CRF εκφράζεται σε αρκετά όργανα όπως είναι η καρδιά, ο πλακούντας, το έντερο, η σπλήνα, ο προστάτης, το δέρμα και ο θύμος αδένας [14]. Επίσης βρέθηκε και σε νεοπλασίες της υπόφυσης, καρκινώματα του ενδομητρίου και του προστάτη [15-18].

Πρόσφατα διαπιστώθηκε η ύπαρξη δύο επιπλέον CRF-συγγενών πεπτιδίων, της ουροκορτινής II (UCNII) και της ουροκορτινής III (UCNIII) [19, 20]. Τα δύο αυτά πεπτιδία εντοπίζονται στο ΚΝΣ, όπως σε ορισμένες υποφλοιώδεις περιοχές του εγκεφάλου (Εικόνα 1) [13] και στη περιφέρεια. Συγκεκριμένα, η UCNII εντοπίζεται σε καρδιά, πνεύμονες, στομάχι, κύτταρα του αίματος, δέρμα και πλακούντα [19], [21] ενώ η UCNIII ανιχνεύεται σε καρδιά, δέρμα, θυροειδή αδένες, επινεφρίδια, πάγκρεας, σπλήνα, ωοθήκες και νεφρούς [20, 21].

Πρόσφατα συντέθηκαν διάφορα ανάλογα του CRF, όπως η κορταγίνη, καθώς και τα πεπτιδία α-ελικοειδές CRF(9-41), αστρεσίνη [astressin: cyclo(30 – 33)], [DPhe¹²,Nle²¹, Glu³⁰, Lys³³, Nle³⁸] hCRF(12 – 41), το ανάλογο της αστρεσίνης, αστρεσίνη (2)B και διάφορα ανάλογα της σοβαγίνης, όπως η αντισοβαγίνη-30 [22-26]. Παράλληλα συντέθηκαν και μη πεπτιδικά μικρομοριακά ανάλογα όπως η ανταλαρμίνη [27].

1.3 Δράσεις του CRF και των συγγενών πεπτιδίων

Ο εντοπισμός του CRF τόσο στον HPA άξονα, όσο και στο ΚΝΣ και στη περιφέρεια σχετίζεται με τις δράσεις του στις περιοχές αυτές. Έτσι λοιπόν ο CRF ρυθμίζει τη δραστηριότητα του HPA άξονα (Εικόνα 2), και τη λειτουργία του ΚΝΣ [4, 12], με αποτέλεσμα να συντονίζει συμπεριφορές και ενδοκρινικές αποκρίσεις του οργανισμού στο στρες και να εμπλέκεται στην παθοφυσιολογία διαφόρων νευροψυχιατρικών νόσων όπως το άγχος και η κατάθλιψη [4]. Μελέτες έχουν δείξει ότι η απορρύθμιση του HPA άξονα καθώς και η αύξηση των επιπέδων του CRF σε διάφορες περιοχές του ΚΝΣ, συμπεριλαμβανομένου και του εγκεφαλονωτιαίου υγρού σχετίζονται με την παθοφυσιολογία των νευροψυχιατρικών αυτών νόσων [13, 28, 29].



Εικόνα 2. Γραφική απεικόνιση του υποθάλαμο-υπόφυση-επινεφριδιακού (HPA) άξονα. Ο CRF (ή CRH) απελευθερώνεται από τον υποθάλαμο και εισερχόμενος στην πυλαία κυκλοφορία καταλήγει στην υπόφυση όπου διεγείρει την έκκριση της αδρενοκορτικοτρόπου ορμόνης (ACTH). Η ACTH στη συνέχεια διεγείρει την έκκριση γλυκοκορτικοειδών (CORT) από τα επινεφρίδια

Επιπρόσθετα της δράσης του στο ΚΝΣ, ο CRF διαδραματίζει ένα πολύ σημαντικό ρόλο στη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος ρυθμίζοντας τις ανοσολογικές αποκρίσεις κυρίως μέσω δύο δράσεων του: μιας έμμεσης

αντιφλεγμονώδους δράσης που οφείλεται στη διέγερση του HPA άξονα από τον υποθαλαμικό CRF και επακόλουθη έκκριση γλυκοκορτικοειδών και μιας άμεσης, προφλεγμονώδους δράσης, που οφείλεται στη διέγερση κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος από τοπικά εκκρινόμενο CRF [30-32] .

Επίσης ο CRF παίζει σημαντικό ρόλο στη λειτουργία πολλών συστημάτων στην περιφέρεια όπως του καρδιαγγειακού, του γαστρεντερικού και του αναπαραγωγικού συστήματος. Υψηλές συγκεντρώσεις CRF προκαλούν αγγειοδιαστολή, πτώση της αρτηριακής πίεσης και αύξηση του καρδιακού ρυθμού, ενώ στο γαστρεντερικό σύστημα ο CRF τροποποιεί τη γαστρική κένωση και την εντερική κινητικότητα [3, 33, 34] . Επίσης στο αναπαραγωγικό σύστημα ο CRF ρυθμίζει την παραγωγή τεστοστερόνης, επηρεάζει τη συσταλτικότητα του μυομητρίου και την απελευθέρωση των προσταγλαδινών και παίζει ρόλο στον τοκετό [35-37] .

Οι ουροκορτίνες (UCN, UCN II και UCN III), παίζουν ρόλο στη λειτουργία του ΚΝΣ [13, 38] και στην περιφέρεια, ρυθμίζοντας τη λειτουργία του καρδιαγγειακού συστήματος και προκαλώντας αγγειοδιαστολή [39]. Η UCN έχει δειχθεί ότι αυξάνει τη συσταλτικότητα της καρδιάς, τον καρδιακό ρυθμό και την αορτική ροή του αίματος [40, 41]. Σημαντικός όμως είναι και ο ρόλος των ουροκορτινών στη ρύθμιση της λειτουργίας του γαστρεντερικού συστήματος επηρεάζοντας την κινητικότητα του όπως έχει δειχθεί σε μελέτες με πειραματόζωα [34, 42]. Τέλος επηρεάζουν την λειτουργία του ανοσοποιητικού αλλά και του αναπαραγωγικού συστήματος [38] .

1.4 Μελέτες δομής - λειτουργίας του CRF και των συγγενών του πεπτιδίων.

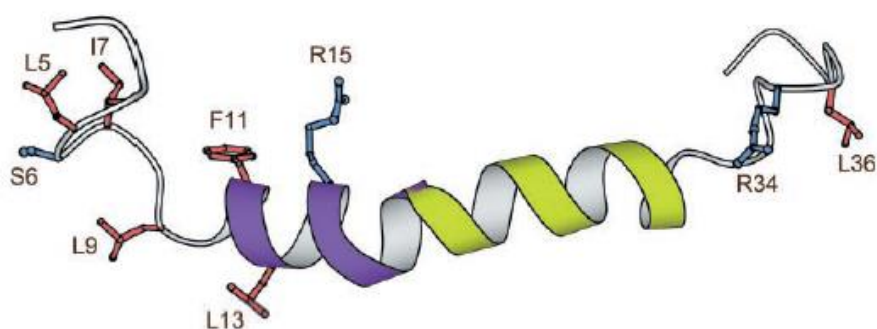
Ο CRF και τα συγγενή του πεπτίδια (μη συνθετικά), είναι πεπτίδια 40 – 41 αμινοξέων που αποτελούνται από ένα καρβοξυτελικό άκρο, ένα αμινοτελικό άκρο και μία ενδιάμεση περιοχή. Έχει βρεθεί ότι η ενδιάμεση περιοχή και τμήματα των καρβοξυτελικών και αμινοτελικών άκρων μπορούν να σχηματίσουν δομή άλφα – έλικας, που θεωρείται η βιολογικά δραστική διαμόρφωση του πεπτιδίου. Συγκεκριμένα, ο CRF όταν βρεθεί στο υδρόφοβο περιβάλλον διαλύματος τριφθοροαιθανόλης, τα αμινοξέα του 8-32 τείνουν να αποκτήσουν δομή άλφα – έλικας [43, 44] . Παρόμοια ελικοειδή δομή και ιδιότητες με τον CRF έχουν και τα συγγενή του πεπτίδια, συμπεριλαμβανομένης της ουροτενσίνης και της σοβαγίνης (Εικόνα 3). Τα αμινοξέα 8-31 της ουροτενσίνης και 7-31 της σοβαγίνης που

αντιστοιχούν στα αμινοξέα 8-32 του CRF αποκτούν δομή άλφα – έλικας όταν βρίσκονται σε υδρόφοβο περιβάλλον [43].

Τα παραπάνω οδήγησαν στην υπόθεση ότι η αλληλεπίδραση του CRF και των συγγενών του πεπτιδίων με τις θέσεις δέσμησης τους, που βρίσκονται στο λιπιδικό περιβάλλον της πλασματικής μεμβράνης του κυττάρου, ευνοεί το σχηματισμό άλφα – έλικας σε αυτά. Η υπόθεση αυτή ενισχύθηκε από το γεγονός ότι αντικαταστάσεις αμινοξέων του CRF με άλλα που σταθεροποίησαν τη δομή άλφα – έλικας, αύξησαν τη συγγένεια δέσμησης του πεπτιδίου [45].

Επίσης, βρέθηκε ότι 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 [44].

Εκτός του ρόλου της άλφα – ελικοειδούς δομής στη λειτουργία των πεπτιδίων σημασία επίσης παίζουν τα καρβοξυτελικά και αμινοτελικά αμινοξέα τους. Συγκεκριμένα, τροποποίηση του καρβοξυτελικού άκρου του CRF ή απαλοιφή των δύο τελευταίων καρβοξυτελικών αμινοξέων του, είχε σαν αποτέλεσμα την κατάργηση της βιολογικής δραστηριότητας του πεπτιδίου [44, 46]. Παρόμοια, με απαλοιφή των πρώτων οκτώ αμινοτελικών αμινοξέων του ο CRF σχεδόν κατήργησε τη βιολογική του δραστηριότητα [45] ενώ αντικατάσταση με αλανίνη των δεκατριών από τα πρώτα δεκαεννιά αμινοτελικά αμινοξέα οδήγησε σε μείωση ή κατάργηση της βιολογικής του δραστηριότητας [45].



Εικόνα 3. Δομή συνθετικού αναλόγου της ουροκορτίνης (UEK) σε διάλυμα, προσδιοριζόμενη με φασματοσκοπία NMR και μοριακή μοντελοποίηση [44].

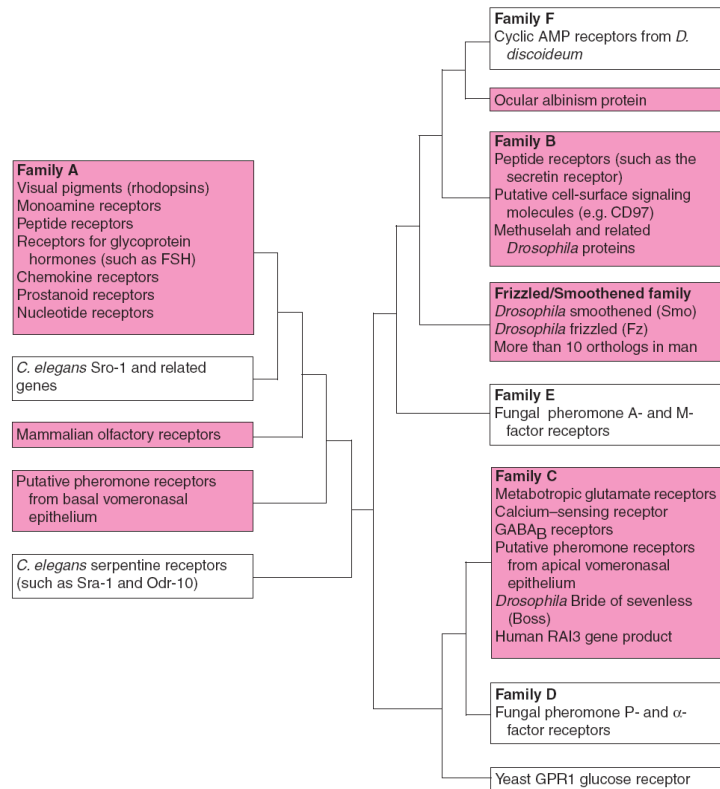
1.5 Θέσεις δέσμησης

Οι πολλαπλές δράσεις των πεπτιδίων της οικογένειας του CRF επιτελούνται μέσω αλληλεπίδρασης τους με ειδικές θέσεις δέσμησης [6, 47]. Οι θέσεις δέσμησης του CRF, είναι γλυκοπρωτεΐνες της πλασματικής μεμβράνης του κυττάρου, των οποίων το μοριακό βάρος βρέθηκε ότι κυμαίνεται από 58.000 έως 75.000 Da [6].

Επίσης βρέθηκε ότι οι θέσεις δέσμησης του CRF αλληλεπιδρούν με τις G-πρωτεΐνες αφού η υψηλή συγγένεια δέσμησης του αγωνιστή CRF μειώνεται παρουσία GTP-γS, ενώ αυξάνεται παρουσία μαγνησίου [4, 48]. Το μαγνήσιο όπως και το GTP-γS επηρεάζουν την αλληλεπίδραση των θέσεων δέσμησης του CRF με τις G-πρωτεΐνες [4, 48].

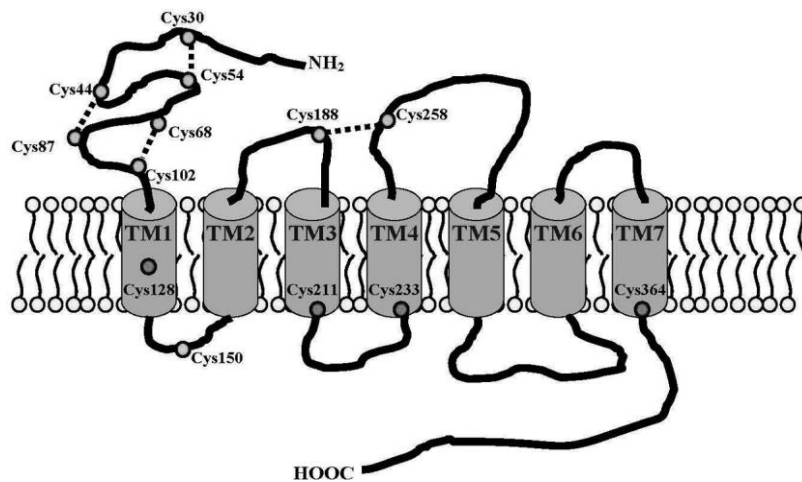
1.6 Υποδοχείς εκλυτικού παράγοντα της κορτικοτροπίνης

Η κλωνοποίηση της πρωτεΐνης που δεσμεύει τον CRF (υποδοχέας του CRF) αποκάλυψε την ύπαρξη δύο κύριων τύπων υποδοχέα, το τύπο 1 (CRF₁R) και το τύπο 2 (CRF₂R) [49-51]. Τα γονίδια των δύο αυτών υποδοχέων βρίσκονται στα χρωμοσώματα 17 και 7 αντίστοιχα και η αμινοξική τους αλληλουχία παρουσιάζει ομολογία 70%, με τις κυριότερες ομοιότητες να παρατηρούνται στις διαμεμβρανικές περιοχές τους [52, 53]. Οι υποδοχείς του CRF ανήκουν στην οικογένεια Β των υποδοχέων που συζευγνύονται με τις G πρωτεΐνες (G-coupled receptors ή GPCRs) [50, 54] (Εικόνα 4).



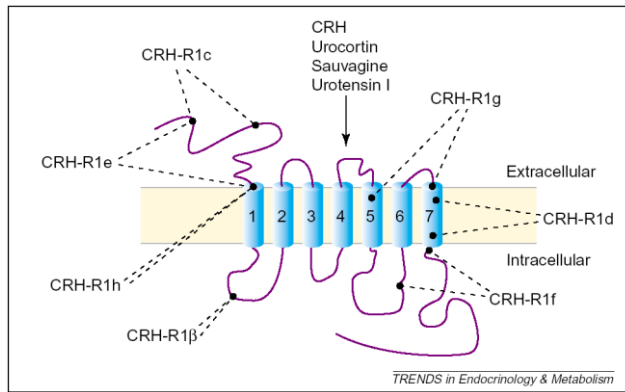
Εικόνα 4. Οικογένειες υποδοχέων της υπερικογένειας των GPCRs. Οι υποδοχείς του CRF ανήκουν στην οικογένεια B των GPCRs [54].

Οι υποδοχείς του CRF αποτελούνται από 7 διαμεμβρανικές περιοχές οι οποίες συνδέονται μεταξύ τους με τρεις ενδοκυττάριους και τρεις εξωκυττάριους βρόγχους[50]. Επίσης περιέχουν μια εξωκυττάρια αμινοτελική περιοχή και ένα ενδοκυττάριο καρβοξυτελικό άκρο. Κύριο χαρακτηριστικό της οικογένειας B των GPCRs είναι η εξωκυττάρια αμινοτελική περιοχής (~100 αμινοξέα), που έχει μεγάλο μήκος και περιέχει κυστείνες που σχηματίζουν δισουλφιδικούς δεσμούς [7, 50, 55-57] (Εικόνα 5).



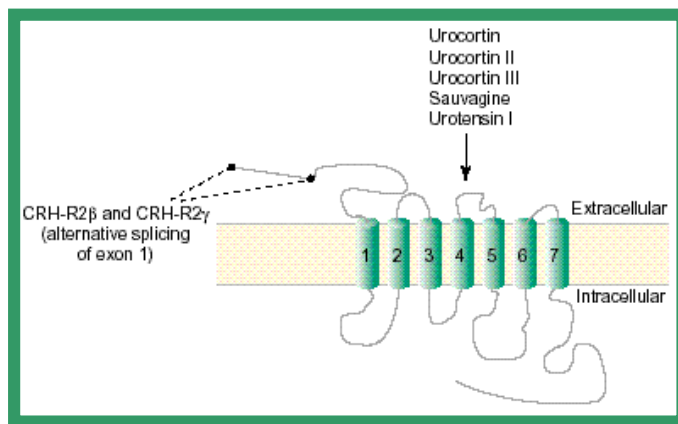
Εικόνα 5. Γραφική αναπαράσταση του CRF₁R υποδοχέα. Ο υποδοχέας αυτός χαρακτηρίζεται από ένα αμινοτελικό άκρο μεγάλου μήκους, το οποίο περιέχει 6 κυστεΐνες (γκρι κύκλοι) που σχηματίζουν μεταξύ τους δισουλφιδικούς δεσμούς (διακεκομμένες γραμμές). Οι διαμεμβρανικές περιοχές αναπαριστώνται με κυλίνδρους που ενώνονται μεταξύ τους εξωκυττάρια με τρεις εξωκυττάριους βρόγχους και στο κυτταρόπλασμα με τρεις ενδοκυττάριους [50].

Ο CRF₁R έχει οκτώ ισομορφές τις CRF-R_{1α}, CRF-R_{1β}, CRF-R_{1c}, CRF-R_{1d}, CRF-R_{1e}, CRF-R_{1f}, CRF-R_{1g}, CRF-R_{1h} ενώ ο CRF₂R τρεις, που είναι οι CRF-R_{2α}, CRF-R_{2β} και CRF-R_{2γ} [14, 52]. Οι διαφορετικές ισομορφές του CRF₁R διαφέρουν δομικά και λειτουργικά μεταξύ τους (Εικόνα 6). Έτσι ο CRF-R_{1β} διαθέτει 29 επιπρόσθετα αμινοξέα στον πρώτο ενδοκυττάριο βρόγχο, σε σύγκριση με τον CRF-R_{1α}. Ο CRF-R_{1c} διαθέτει 40 λιγότερα αμινοξέα στο αμινοτελικό άκρο από τον CRF-R_{1α}, ενώ ο CRF-R_{1d} 14 αμινοξέα λιγότερα στην έβδομη διαμεμβρανική περιοχή από τον CRF-R_{1α} [14, 52, 58]. Ανάμεσα στις διάφορες ισομορφές του CRF₁R, η πλέον λειτουργική είναι εκείνη του CRF-R_{1α} μέσω της οποίας ο CRF επιτελεί τις δράσεις του στον οργανισμό [14].



Εικόνα 6. Γραφική αναπαράσταση των ισομορφών του CRF_1R . Οι διάφορες ισομορφές του CRF_1R ($CRF-R_{1\alpha}$ έως $CRF-R_{1h}$ ή $CRH-R_{1\alpha}$ έως $CRH-R_{1h}$) δημιουργούνται με διαφορετικό τρόπο κοπής και ματίσματος της ισομορφής $CRF-R_{1\alpha}$. Στις ισομορφές αυτές διακρίνονται απαλοιφές ή εισαγωγές αμινοξέων στις θέσεις που σημειώνονται με διακεκομμένες γραμμές[58].

Παρόμοια με τον CRF_1R έτσι και οι ισομορφές του CRF_2R διαφέρουν δομικά μεταξύ τους αλλά μόνο στο αμινοτελικό τους άκρο, όπου ο $CRF-R_{2\alpha}$ διαθέτει 34 αμινοξέα, ο $CRF-R_{2\beta}$ 61 αμινοξέα και ο $CRF-R_{2\gamma}$ 20 αμινοξέα (Εικόνα 7) [14].

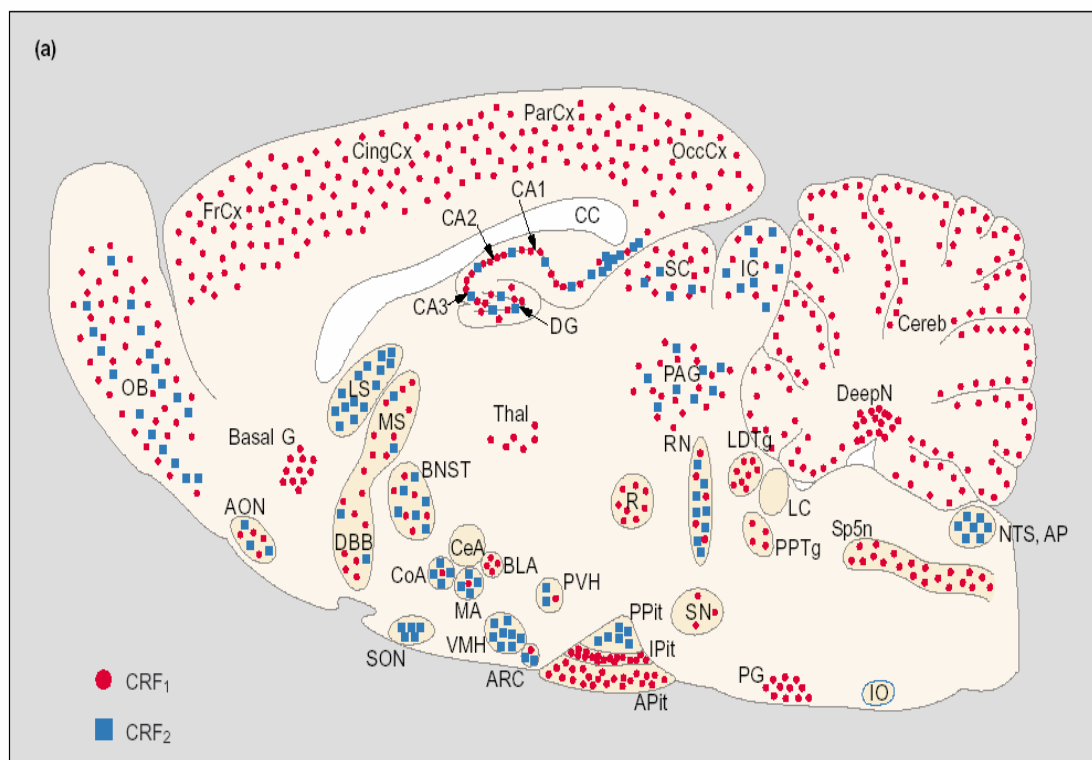


Εικόνα 7. Γραφική αναπαράσταση των ισομορφών του CRF_2R . Οι δύο ισομορφές του CRF_2R ($CRF-R_{2\alpha}$ έως $CRF-R_{2\gamma}$ ή $CRH-R_{2\alpha}$ έως $CRH-R_{2\gamma}$), $CRF-R_{2\beta}$ και $CRF-R_{2\gamma}$ διαφέρουν από την ισομορφή $CRF-R_{2\alpha}$ στο αμινοτελικό τους άκρο. Συγκεκριμένα, η ισομορφή $CRF-R_{2\alpha}$ έχει 34 αμινοξέα στην αμινοτελική περιοχή της τα οποία όταν αντικαθίστανται από 64 ή 20 αμινοξέα σχηματίζουν τις ισομορφές $CRF-R_{2\beta}$ και $CRF-R_{2\gamma}$, αντίστοιχα [58].

1.7 Εντοπισμός υποδοχέων CRF και βιολογικές δράσεις

Η έκφραση των υποδοχέων του CRF τόσο στη περιφέρεια όσο και στο ΚΝΣ είναι τέτοια ώστε να δικαιολογεί τις δράσεις των διαφόρων πεπτιδίων της οικογένειας του CRF.

Για παράδειγμα ο CRF_1R εκφράζεται στον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης μέσω του οποίου διεγείρει την έκκριση της ACTH. Ο CRF_1R εντοπίζεται επίσης σε αρκετές περιοχές του ΚΝΣ όπως σε φλοιό, παρεγκεφαλίδα, αμυγδαλή, ιππόκαμπο και οσφρητικούς βολβούς (Εικόνα 8) [4, 13]. Στην περιφέρεια, ο CRF_1R εντοπίζεται σε ωοθήκες, όρχεις, ενδομήτριο, μυομήτριο, πλακούντα, επινεφρίδια, λιπώδη ιστό, δέρμα, σπλήνα, κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος και έντερο [4, 34] .

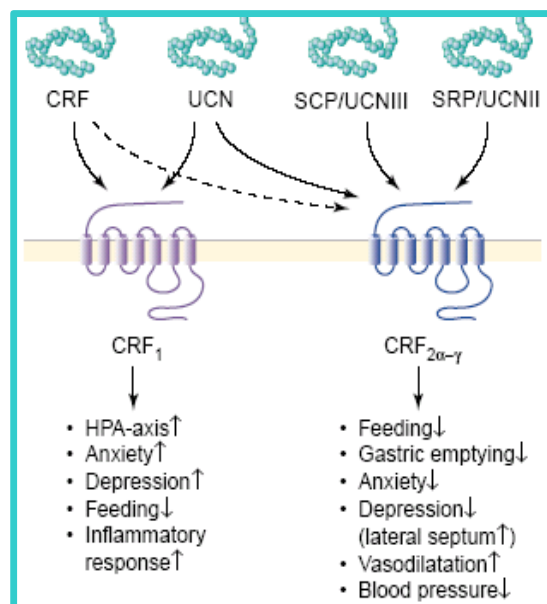


Εικόνα 8. Κατανομή των CRF_1R και CRF_2R σε εγκέφαλο αρουραίου [13].

Όπως ο CRF_1R έτσι και ο CRF_2R εκφράζεται τόσο σε διάφορες περιοχές του ΚΝΣ, όπως στον επικλινή πυρήνα διαφράγματος, υποθάλαμο, ιππόκαμπο, αμυγδαλή, βασικό πυρήνα της τελικής ταινίας, οσφρητικούς βολβούς και πυρήνες της ραφής (Εικόνα 8), καθώς και σε ιστούς της περιφέρειας, όπως καρδιά, πνεύμονες, ωοθήκες, σκελετικούς μύες καθώς και στο γαστρεντερικό σύστημα [12-14, 34, 60, 61] .

Όσο αφορά την έκφραση των ισομορφών του CRF₁R οι CRF-R_{1α}, CRF-R_{1β}, CRF-R_{1c}, CRF-R_{1d}, CRF-R_{1e}, CRF-R_{1f}, CRF-R_{1g} και CRF-R_{1h} εντοπίζονται σε υποθάλαμο και πλακούντα [49, 51, 52, 58, 62]. Επιπρόσθετα, ο CRF-R_{1β} βρέθηκε στην υπόφυση, καθώς και σε μυομήτριο, κύτταρα μαστού και ενδομήτριο [49, 63]. Οι ισομορφές του CRF₂R, CRF-R_{2α} και CRF-R_{2β} ανιχνεύονται στον εγκέφαλο με τον CRF-R_{2α} να βρίσκεται επίσης στην περιφέρεια όπως καρδιά, σκελετικοί μύες και μυομήτριο [14, 52].

Σημαντικά στοιχεία από μελέτες σε εργαστηριακά ζώα έχουν δείξει ότι οι στρεσογόνες συμπεριφορές που παρατηρούνται μετά τη χορήγηση CRF κυρίως οφείλονται μέσω της αλληλεπίδρασης του με τον CRF₁R (Εικόνα 9) [6]. Γενετικά τροποποιημένα ποντίκια (διαγονιδιακά ποντίκια) στα οποία δεν εκφράζεται ο CRF₁R υποδοχέας, βρέθηκε ότι εμφανίζουν μειωμένη απάντηση σε στρεσογόνα ερεθίσματα [13]. Σε αντίθεση με τον CRF₁R, η αλληλεπίδραση των συγγενών πεπτιδίων του CRF με τον CRF₂R (Εικόνα 9) έχει σε ορισμένες περιπτώσεις αγχολυτικές δράσεις [12].



Εικόνα 9. Βιολογικές δράσεις του CRF και των συγγενών του πεπτιδίων μετά από αλληλεπίδρασή τους με τους δύο τύπους του CRF υποδοχέα. [12].

1.8 Φαρμακολογικές ιδιότητες υποδοχέων του CRF

Φαρμακολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι τα συγγενή με τον CRF πεπτιδία, ουροκορτινή (UCN) και σοβαγίνη (SVG) δεσμεύονται με παρόμοιες συγγένειες στους δύο τύπους του υποδοχέα του CRF (Εικόνα 10) [23, 50]. Αντίθετα, ο

CRF του ανθρώπου/αρουραίου (rat/human CRF, ή h/rCRF) και ο CRF του προβάτου (oCRF) δεσμεύονται με μεγαλύτερη συγγένεια στον CRF₁R από ότι στον CRF₂R (Εικόνα 10) [13, 23, 50]. Από τους h/rCRF και oCRF ο δεύτερος έχει το μεγαλύτερο βαθμό CRF₁R-εκλεκτικότητας γιατί η συγγένεια δέσμευσης του για τον CRF₁R είναι περίπου ~200 φορές μεγαλύτερη από εκείνη για τον CRF₂R, ενώ ο η αντίστοιχη διαφορά στις συγγένειες δέσμευσης του h/rCRF για τους δύο τύπους υποδοχέων είναι μόνο 14 φορές περίπου (Εικόνα 10).

Peptide	Binding (K _i , nM)	
	hCRF ₁	rCRF _{2α}
CRF (rat/human)	3.3	42
CRF (sheep)	1.1	230*
Ucn (rat)	0.32	2.2
Ucn (human)	0.4	0.3*
Ucn II (human)	>100	1.7
Ucn II (mouse)	>100	2.1
Ucn III (human)	>100	21.7
Ucn III (mouse)	>100	5.0
Urotensin I (fish)	0.4	1.8*
Sauvagine (frog)	0.7	0.5*

Εικόνα 10. Συγγένειες δέσμευσης διαφόρων πεπτιδίων της οικογένειας του CRF με τους CRF₁R και CRF₂R [13].

Επιπρόσθετα, ή ανθρώπινη ουροκορτίνη παρουσιάζει σε σχέση με τον h/rCRF περίπου 10 φορές μεγαλύτερη συγγένεια δέσμευσης για τον CRF₁R και περίπου 50 φορές μεγαλύτερη συγγένεια δέσμευσης για τον CRF₂R [13] (Εικόνα 10). Σε αντίθεση με τους CRF₁R- εκλεκτικούς oCRF και h/rCRF, οι ουροκορτίνες II και III είναι CRF₂R -εκλεκτικές, γιατί δεσμεύονται στον CRF₂R με συγγένεια δέσμευσης πάνω από 100 φορές μεγαλύτερη εκείνης με την οποία δεσμεύονται στον CRF₁R (Εικόνα 10) [13, 64, 65].

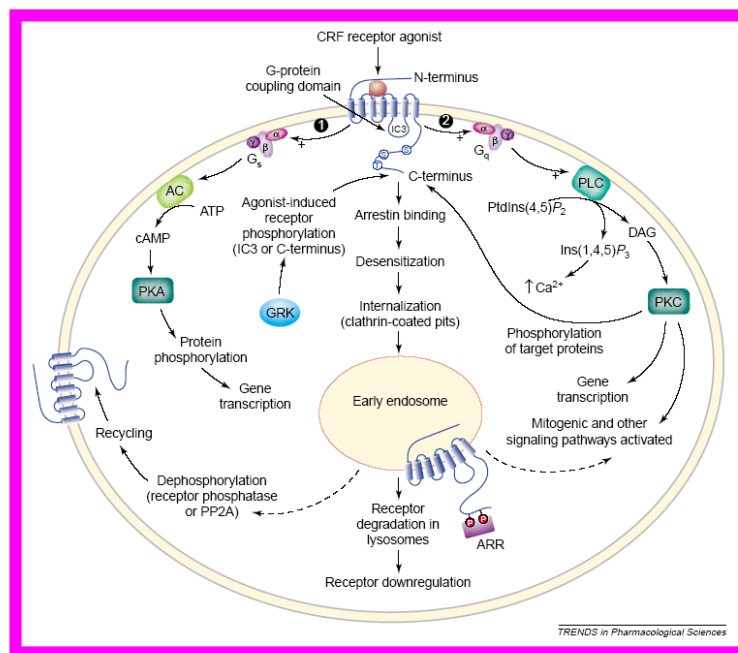
Η κορταγίνη παρόμοια με τους oCRF και h/rCRF είναι CRF₁R-εκλεκτική, αφού δεσμεύεται με πολύ μεγαλύτερη συγγένεια στον CRF₁R από ότι στον CRF₂R [26]. Έτσι λοιπόν μέσω αλληλεπίδρασης της με τον CRF₁R η κορταγίνη (όπως και ο oCRF) εγχύομενη στις κοιλίες του εγκεφάλου προκαλεί εκδηλώσεις άγχους [26]. Αντίθετα με την κορταγίνη, τα συνθετικά πεπτίδια άλφα ελικοειδή CRF(9 – 41) και αστρεσίνη, τα οποία συνδέονται μη εκλεκτικά και στους δυο τύπους του CRF

υποδοχέα δρουν ως ανταγωνιστές [22, 23, 45] . Πρόσφατα επιτεύχθηκε η σύνθεση ανταγωνιστών όπως το ανάλογο της αστρεσσίνης, αστρεσσίνη – 2B, καθώς και το ανάλογο της σοβαγίνης, αντισοβαγίνη – 30, τα οποία δεσμεύονται με πολύ μεγαλύτερη συγγένεια στον CRF₂R από ότι στον CRF₁R [24, 25].

Παράλληλα με τη σύνθεση των παραπάνω πεπτιδικών αναλόγων του CRF και της σοβαγίνης, επιτεύχθηκε η σύνθεση διαφόρων μη πεπτιδικών μικρομοριακών αναλόγων εκλεκτικών για τον CRF₁R, όπως, της ανταλαρμίνης, του R121919, του NBI 35965 και του NBI 27914 τα οποία έχουν δράση ανταγωνιστή [7, 66, 67]. Αυτοί οι CRF₁R εκλεκτικοί μη πεπτιδικοί ανταγωνιστές χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό του ρόλου του CRF₁R σε διάφορες φυσιολογικές και παθοφυσιολογικές καταστάσεις, όπως άγχος και κατάθλιψη, καθώς και για την αντιμετώπιση των τελευταίων [7] .

1.9 Υποδοχείς του CRF και κυτταρική σηματοδότηση

Η δέσμευση των πεπτιδίων της οικογένειας του CRF στους υποδοχείς τους έχει σαν αποτέλεσμα τη διέγερση τους, και τη μετέπειτα ενεργοποίησή των G_s πρωτεϊνών που συζευγνύονται με τους υποδοχείς αυτούς. Στη συνέχεια οι ενεργοποιημένες G_s πρωτεΐνες, διεγείρουν το ένζυμο της αδενυλικής κυκλάσης, με αποτέλεσμα την παραγωγή 3', 5' – κυκλικής μονοφωσφορικής αδενοσίνης (κυκλικού AMP) [14] . Πιο συγκεκριμένα, η ενεργοποίηση των G_s πρωτεϊνών έχει σαν αποτέλεσμα το GDP που είναι δεσμευμένο στη G_α – υπομονάδα, να εκτοπιστεί από GTP και έτσι οι G_β και G_γ να αποχωριστούν σαν διμερές από τη G_α – GTP υπομονάδα (Εικόνα 11) [68]. Οι ενεργοποιημένες G_s υπομονάδες στη συνέχεια τροποποιούν τη δραστηριότητα διαφόρων κυτταρικών σηματοδοτικών μονοπατιών συμπεριλαμβανομένου και εκείνου του ενζύμου της αδενυλοκυκλάσης η οποία διεγείρεται από τη G_α – GTP υπομονάδα. Στη συνέχεια η ενεργοποιημένη αδενυλοκυκλάση μετατρέπει το ATP σε κυκλικό AMP το οποίο με τη σειρά του ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση A, προκαλώντας έτσι έναν καταρράκτη φωσφορυλιώσεων που οδηγεί σε βιολογικό αποτέλεσμα [68].



Εικόνα 11. Ικανότητα του CRF_1R να συζεύγνται με διαφορετικές G – πρωτεΐνες μετά από ενεργοποίηση του από τον CRF και συγγενή του πεπτιδία [12].

Εκτός από τις G_s πρωτεΐνες οι υποδοχείς του CRF μπορούν να αλληλεπιδράσουν και να διεγείρουν άλλες G – πρωτεΐνες (Εικόνα 11), όπως τις G_i , G_o , G_z και $G_q/11$, με αποτέλεσμα την τροποποίηση της λειτουργίας διαφορετικών κυτταρικών σηματοδοτικών οδών [14, 69]. Οι G_i αναστέλλουν τη λειτουργία της αδενυλοκυκλάσης, ενώ οι G_q ενεργοποιούν τη φωσφολιπάση C (PLC), η οποία στη συνέχεια υδρολύει τη φωσφατιδυλινοσιτόλη (PIP_2) σε διακυλογλυκερόλη (DAG) και 1, 4, 5 – τριφωσφορική ινοσιτόλη (IP_3). Η διακυλογλυκερόλη στη συνέχεια ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση C (PKC), προκαλώντας έτσι αύξηση της πρωτεϊνικής φωσφορυλίωσης, ενώ η 1,4,5- τριφωσφορική ινοσιτόλη συμβάλει στην απελευθέρωση Ca^{+2} από ενδοκυττάρειες αποθήκες ασβεστίου, το οποίο παίζει επίσης ρόλο στη κυτταρική σηματοδότηση [68].

Έτσι λοιπόν οι υποδοχείς του CRF , αλληλεπιδρώντας με διαφορετικές G -πρωτεΐνες, μπορούν να ενεργοποιήσουν πλήθος διαφορετικών κυτταρικών σηματοδοτικών μονοπατιών, όπως εκείνα των PKC και cAMP/PKA, καθώς και των PKB/Akt, ERK, p38 MAPK [70, 71].

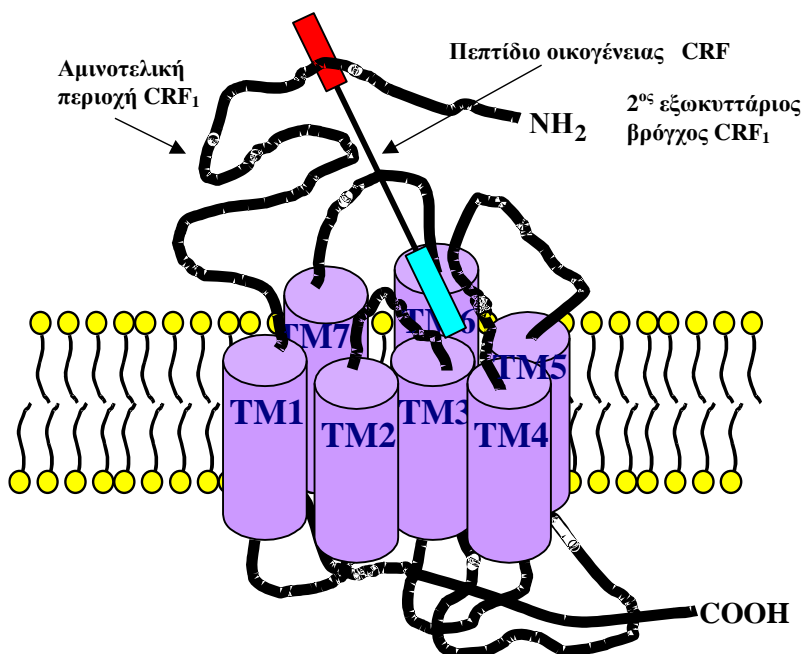
Σε διαφορετικούς ιστούς ο ίδιος υποδοχέας συνδέεται με διαφορετικές G -πρωτεΐνες και έτσι ενεργοποιεί διαφορετικές οδούς κυτταρικής σηματοδότησης

[12, 14]. Αυτό σημαίνει ότι ο CRF και τα συγγενή του πεπτιδία μπορούν να προκαλέσουν μέσω του ίδιου τύπου υποδοχέα διαφορετικές βιολογικές αποκρίσεις σε διαφορετικούς ιστούς στόχους. Αυτό, σε συνδυασμό με την ύπαρξη διαφορετικών τύπων υποδοχέα του CRF, καθώς και το διαφορετικό τρόπο έκφρασής τους σε διάφορους ιστούς εξηγεί την εμφάνιση των πολλαπλών δράσεων των πεπτιδίων της οικογένειας του CRF [72-75].

Οι CRF υποδοχείς μετά από ενεργοποίησή τους από αγωνιστές, υπόκεινται σε μία σειρά τροποποιήσεων ώστε να αποφευχθεί η συνεχής κυτταρική σηματοδότηση. Αυτό επιτυγχάνεται αρχικά με φωσφορυλίωσή τους, διακοπή της αλληλεπίδρασης τους με τις G-πρωτεΐνες και ενδοκυττάρωση τους [76-79].

1.10 Δομή και λειτουργία των υποδοχέων του CRF

Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι για τη δέσμευση των πεπτιδίων της οικογένειας του CRF στον CRF₁R σημαντικό ρόλο παίζει το τμήμα που βρίσκεται μεταξύ των αμινοξέων στις θέσεις 68 και 109 της εξωκυττάριας αμινοτελικής περιοχής (N-περιοχής) του υποδοχέα [80, 81].



Εικόνα 12. Γραφική απεικόνιση της αλληλεπίδρασης των πεπτιδίων της οικογένειας του CRF με τον CRF₁R. Η αμινοτελική εξωκυττάρια περιοχή του CRF₁R αλληλεπιδρά με το καρβοξυτελικό τμήμα των πεπτιδίων της οικογένειας του CRF (κόκκινο

ορθογώνιο), ενώ το αμινοτελικό τμήμα των πεπτιδίων (μπλε ορθογώνιο) αλληλεπιδρά με τους εξωκυττάριους βρόγχους και τα εξωκυττάρια άκρα των διαμεμβρανικών περιοχών του υποδοχέα.

Το τμήμα των πεπτιδίων της οικογένειας του CRF που δεσμεύεται στην εξωκυττάρια N-περιοχή του CRF₁R βρέθηκε ότι είναι εκείνο που αντιστοιχεί στα καρβοξυτελικά αμινοξέα τους [82, 83] . Πρόσφατες μελέτες κρυσταλλογραφίας και NMR, προσδιόρισαν τον τρόπο αλληλεπίδρασης της εξωκυττάριας N-περιοχής των CRF₁R και CRF₂R, με τα καρβοξυτελικά αμινοξέα των CRF και αστρεσίνης αντίστοιχα [84-86] . Τα καρβοξυτελικά αμινοξέα των πεπτιδίων της οικογένειας του CRF αλληλεπιδρούν με την N-περιοχή του CRF₁R, ενώ τα αμινοτελικά αμινοξέα των πεπτιδίων δεσμεύονται στη J-περιοχή που απαρτίζεται από τους εξωκυττάριους βρόγχους και τις διαμεμβρανικές περιοχές των υποδοχέων (εικόνα 12) [50, 82, 87-90] .

Έχει βρεθεί ότι όταν η σοβαγίνη είναι δεσμευμένη στον υποδοχέα τότε η λυσίνη της θέσης 257 του δεύτερου εξωκυττάριου βρόγχου του CRF₁R βρίσκεται πολύ κοντά στο πεπτίδιο και μόλις σε απόσταση 11.4Å από αυτό [91] . Επιπρόσθετα, βρέθηκε ότι το ίδιο πεπτίδιο όταν είναι δεσμευμένο στον CRF₁R βρίσκεται πολύ κοντά στην ιστιδίνη της πρώτης διαμεμβρανικής περιοχής του υποδοχέα και μόλις σε απόσταση 9Å από αυτή [92] . Παρόμοια, όταν η ουροκορτίνη είναι δεσμευμένη στον CRF₁R, τότε ένα τμήμα της βρίσκεται πολύ κοντά στο δεύτερο εξωκυττάριο βρόγχο, ενώ ένα άλλο βρίσκεται κοντά στο πρώτο εξωκυττάριο βρόγχο του υποδοχέα [93] . Σε όλες τις μελέτες αυτές τα αμινοξέα των πεπτιδίων που βρέθηκαν να είναι κοντά στους εξωκυττάριους βρόγχους του CRF₁R ήταν αμινοτελικά. Τα αποτελέσματα αυτά βρίσκονται σε συμφωνία με το ότι η J-περιοχή και άρα οι εξωκυττάριοι βρόγχοι των υποδοχέων του CRF δεσμεύουν τα αμινοτελικά αμινοξέα των πεπτιδίων.

Σε αντίθεση με τα πεπτίδια που δεσμεύονται στις εξωκυττάριας περιοχές του CRF₁R, τα μικρομοριακά μη πεπτιδικά ανάλογα του CRF όπως το NBI 27914 και η ανταλαρμίνη πιθανόν δεσμεύονται στις διαμεμβρανικές περιοχές του υποδοχέα [87, 89]. Πρόσφατα το εργαστήριο μας απέδειξε πειραματικά ότι, παρόμοια με τους υποδοχείς της οικογένειας A [94-96], οι διαμεμβρανικές περιοχές του CRF₁R σχηματίζουν μια υδρόφιλη κοιλότητα που ονομάζεται κοιλότητα θέσεων δέσμησης του CRF₁R [97]. Η κοιλότητα αυτή εκτείνεται από την εξωκυττάρια επιφάνεια του υποδοχέα ως το τμήμα του που βρίσκεται μέσα στη φωσφολιπιδική διπλοστιβάδα της

πλασματικής μεμβράνης του κυττάρου. Η επιφάνεια της κοιλότητας αυτής βρίσκεται σε επαφή με το υδατικό εξωκυττάριο υγρό και περιέχει αμινοξέα που αλληλεπιδρούν με τα μικρομοριακά ανάλογα του CRF (συμπεριλαμβανομένων της ανταλαρμίνης και του NBI 27914) που βρίσκονται στο εξωκυττάριο υγρό, καθώς και από αμινοξέα που παίζουν δομικό ρόλο.

ΣΚΟΠΟΣ

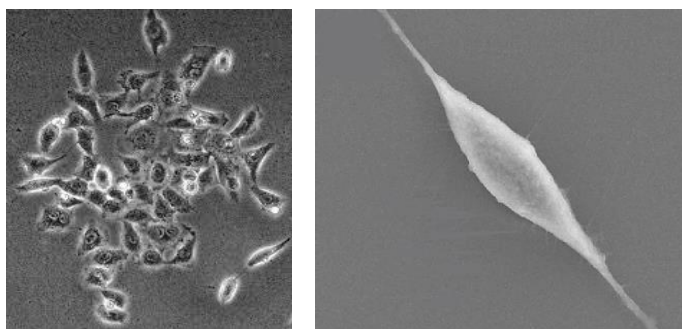
Προηγούμενη εργασία του εργαστηρίου μας έδειξε ότι τα αμινοξέα Trp259 και Phe260 του δεύτερου εξωκυττάριου βρόγχου του CRF₁R παίζουν σημαντικό ρόλο στη δέσμευση των πεπτιδίων CRF και σοβαγίνης. Το γεγονός αυτό οδήγησε στην **υπόθεση** ότι αμινοξέα αυτά παίζουν επίσης σημαντικό ρόλο στην ικανότητα του ενεργοποιημένου από CRF ή σοβαγίνη CRF₁R να διεγείρει κυτταρικές σηματοδοτικές οδούς οδηγώντας έτσι σε κάποιο βιολογικό αποτέλεσμα. Σκοπός της παρούσας ερευνητικής εργασίας ήταν να εξεταστεί ο ρόλος των Trp259 και Phe260 στη διέγερση από τον CRF₁R κυτταρικών σηματοδοτικών οδών, ξεκινώντας από εκείνη των Gs-πρωτεϊνών/αδενυλοκυκλάσης η οποία είναι υπεύθυνη για τη παραγωγή κυκλικού AMP. Αυτό επιτεύχθηκε με μια σειρά κατάλληλων πειραματικών προσεγγίσεων που περιγράφονται αμέσως παρακάτω μαζί με μια λεπτομερή ανάλυση και εξήγηση των αποτελεσμάτων τους.

2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΥΛΙΚΑ

Για την εκπόνηση της παρούσας εργασίας, χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα HEK293 τα οποία επιμολύνθηκαν με το πλασμιδιακό DNA που κωδικοποιεί είτε τον άγριο τύπο 1 του υποδοχέα του CRF (hCRF₁R) ή το μεταλλαγμένο υποδοχέα του CRF που δημιουργήθηκε στο εργαστήριο του κ. Λιαπάκη μετά από τη ταυτόχρονη αντικατάσταση με αλανίνη της Trp259 και της Phe260 του δεύτερου εξωκυττάρου βρόγχου του υποδοχέα (hCRF₁-W259A/F260A).

Τα HEK293 κύτταρα (Human Embryonic Kidney 293 cells) προέρχονται από ανθρώπινα εμβρυϊκά κύτταρα νεφρού τα οποία επιμολύνθηκαν με DNA του ανθρώπινου αδενοϊού τύπου 5 (Ad)5. Τα κύτταρα αυτά είναι επιδεκτικά στην επιμόλυνση και χρησιμοποιούνται ευρέως σε τεχνικές κυτταρικής βιολογίας.



Εικόνα 1. Φωτογραφία HEK293 κυττάρων

2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ

2.2.1 Καλλιέργεια κυττάρων HEK293

Υλικά - Συσκευές

Θρεπτικό υλικό, DMEM/F12 (1:1) Dulbecco's Modified Eagle's Medium (GIBCO-BRL, Life Technologies, UK).

Ορός βοός, BCS (Bovine Calf Serum) (Hyclone, USA).

DMSO (Sigma, USA).

Φυγόκεντρος (Jouan CR422, France).

Τρυβλία καλλιέργειών (SARSTEDT, Germany).

Επωαστικός κλίβανος Thermo Forma (Thermo Fisher Scientific Inc., USA).

Υπερκαταψύκτης (Bio-Freezer 8425, Forma Scientific, Inc USA)

Μέθοδος

Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό DMEM/F12 (1:1) που περιείχε 2,5 mM L-γλουταμίνη, 15 mM HEPES, 1,125 g/L NaHCO₃ εμπλουτισμένο με 10% ορό βοός, σε επωαστικό κλίβανο ρυθμισμένο σε θερμοκρασία 37°C, ατμόσφαιρα 5% CO₂/95% αέρα και υγρασία 100%, συνθήκες ιδανικές για την ανάπτυξη των ευκαρυωτικών κυττάρων. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε παρόμοια στάδια ανάπτυξης των κυττάρων. Το θρεπτικό υλικό ανανεωνόταν κάθε 48 ώρες και τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν για πείραμα είχαν φτάσει σε πυκνότητα 90% περίπου.

Τα κύτταρα καταψύχονταν σε τακτά χρονικά διαστήματα στους - 80°C (και έπειτα από λίγες μέρες μεταφέρονταν σε υγρό άζωτο), έτσι ώστε να διατηρούνται σε μικρό αριθμό ανακαλλιεργιών και τα πειράματα να πραγματοποιούνται στην ίδια φάση της λογαριθμικής αύξησης των κυττάρων και περίπου στον ίδιο αριθμό ανακαλλιεργιών. Συγκεκριμένα, τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε υλικό κατάψυξης (BCS με 10% DMSO) και το κυτταρικό εναιώρημα τοποθετήθηκε σε σωληνάριο βαθιάς κατάψυξης και μεταφέρθηκε στους -80°C αρχικά όπου σταδιακά καταψύχθηκε. Στη συνέχεια το κατεψυγμένο εναιώρημα μεταφέρθηκε σε υγρό άζωτο για τη μακροχρόνια διατήρηση του. Αντίθετα με την κατάψυξη των κυττάρων η οποία πρέπει να πραγματοποιείται σταδιακά ώστε να εξασφαλιστεί η ακεραιότητά τους, η απόψυξή τους πρέπει να είναι γρήγορη και άμεση. Τα κατεψυγμένα σωληνάκια που περιείχαν τα κύτταρα ταχέως αποψύχθηκαν με θέρμανση τους στους 37°C υπό συνεχή ανάδευση και τα κύτταρα μεταφέρθηκαν άμεσα σε θρεπτικό υλικό καλλιέργειας.

2.3 ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΥΠΟΔΟΧΕΩΝ

Ο φαρμακολογικός χαρακτηρισμός των υποδοχέων του CRF επιτεύχθηκε με το προσδιορισμό της ισχύος με την οποία διάφορα πεπτιδία αγωνιστές διέγειραν τη παραγωγή κυκλικού AMP σε κύτταρα που εκφράζανε τους υποδοχείς.

2.3.1 Μελέτες μέτρησης ενδοκυττάριου κυκλικού AMP

Υλικά - Συσκευές

Θρεπτικό υλικό, DMEM/F12 (1:1): Dulbecco's Modified Eagle's Medium (GIBCO-BRL, Life Technologies, UK).

Ορός βοός, BCS (Bovine Calf Serum) (Hyclone, USA).

Φυγόκεντρος (Jouan CR422, France).

Επωαστικός κλίβανος Thermo Forma (Thermo Fisher Scientific Inc., USA).

Τρυβλία καλλιέργειών (SARSTEDT, Germany).

Πιάτα 96 οπών Πεπτίδια h/rCRF (Bachem, Germany), Σοβαγίνη (Polypeptides, France)

Πολυ-L-λυσίνη (100μg/mL), Poly-L-lysine (Fluka, Switzerland).

³H-cAMP [2,8-³H] Adenosine-3'-5'-cyclic phosphate ammonium salt (43,0 Ci/mmol Amersham, UK).

Εκχυλίσμα PKA

Σωληνάρια πλαστικά 6ml, υγρού σπινθηρισμού (SARSTEDT, Germany).

Συσκευή διήθησης Brandel Cell Harvester (USA).

Φίλτρα ινών υάλου AH934 (Whatman International Ltd., England).

Μετρητής β-ακτινοβολίας (Perkin Elmer LS1801, Foster City, CA, USA) με απόδοση 50% στο ³H.

Διάλυμα A (choline-sucrose)

25 mM Hepes

2 mM choline

288 mM sucrose

0,9 mM CaCl₂

0,5 mM MgCl₂

1 mM 3-ισοβουτύλ-1-μεθυλξανθίνη (IBMX)

pH 7,4

Διάλυμα B

100 mM Tris-HCl

100 mM NaCl

5 mM EDTA

Διάλυμα Γ

10 mM Tris-HCl

120 mM NaCl

pH 7,4

Μέθοδος

Σε πιάτο 96 οπών τοποθετούνται 50μl πολυ-L-λυσίνης (100μg/mL) σε κάθε οπή και επωάζονται για 15 λεπτά στους 37 °C. Στη συνέχεια αφαιρείται η πολυ-L-λυσίνη και κάθε οπή του πιάτου εκπλένεται με 100μl αποστειρωμένο νερό. Κύτταρα HEK 293 που εκφράζουν σταθερά τους υποδοχείς του CRF (hCRF₁-WT και hCRF₁+W259A/F260A) επιστρώνονται σε κάθε οπή του πιάτου και επωάζονται για 15 ώρες στους 37°C σε ατμόσφαιρα 5% CO₂/95% αέρα και υγρασία 100%. Μετά το τέλος της επώασης η πυκνότητα των κυττάρων σε κάθε οπή του πιάτου είναι 90%. Το θρεπτικό υλικό αφαιρείται και προστίθενται 100μl διαλύματος A (choline-sucrose) σε κάθε οπή. Τα κύτταρα επωάζονται με το διάλυμα A στους 37°C για 1 ώρα σε κλίβανο επώασης ατμόσφαιρας 5% CO₂/95% αέρα και υγρασίας 100%. Μετά το πέρας της 1 ώρας προστέθηκαν στα κύτταρα άλλα 100 μl διαλύματος choline-sucrose χωρίς ή με αυξανόμενες συγκεντρώσεις CRF ή Tyr⁰-σοβαγίνης και συνεχίστηκε η επώαση για άλλα 30 λεπτά στους 37°C και 5% CO₂/95% αέρα και 100% υγρασία. Στο τέλος της επώασης αφαιρείται το υπερκείμενο, το πιάτο μεταφέρεται σε πάγο και προστίθενται 200μl κρύου διαλύματος TCA 3% σε κάθε οπή του πιάτου με κύτταρα. Τα κύτταρα επωάζονται με το TCA για 30 λεπτά στον πάγο και στη συνέχεια καταψύχονται στους -20 °C. Την επόμενη μέρα τα κύτταρα με το TCA που βρίσκονται στο πιάτο των 96 οπών αποψύχονται και φυγοκεντρώνονται στα 3000 rpm στους 4 °C για 15 λεπτά. Σε δεύτερο πιάτο 96 οπών προστίθενται 6μl NaOH 2N σε κάθε οπή. Μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης 100 μl υπερκείμενου από κάθε οπή του πιάτου των 96 οπών με τα κύτταρα και το TCA μεταφέρθηκαν στο πιάτο με το NaOH με σκοπό την εξουδετέρωση του TCA. Μέρος του εξουδετερωμένου μίγματος (20 μl) επώαστηκε μαζί με [³H]-cAMP (1.5nM), εκχύλισμα PKA και διάλυμα B σε τελικό όγκο 600 μl για 3 ώρες σε πάγο. 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 χρησιμεύει στον προσδιορισμό της συγκέντρωσης κυκλικού

AMP στα άγνωστα δείγματα. Στο τέλος της επώασης τα διαλύματα διηθήθηκαν μέσω φίλτρων ινών υάλου AH934 σε συσκευή Brandel υπό κενό αέρος. Τα φίλτρα που προηγουμένως είχαν διαβραχεί με απεσταγμένο νερό, μετά τη διήθηση εκπλύθηκαν δύο φορές με συνολικά 3 ml διαλύματος Γ και τοποθετήθηκαν σε σωληνάρια σπινθηρισμού μαζί με 4 ml υγρού σπινθηρισμού και μετά από 3-24 ώρες μετρήθηκαν σε μετρητή β - ακτινοβολίας (Beckman LS 1801, USA) απόδοσης 50%.

Ο προσδιορισμός της διέγερσης της παραγωγής κυκλικού AMP από τα κύτταρα που εκφράζουν τον άγριο τύπο του υποδοχέα όσο και τη μεταλλαγμένη του μορφή έγινε με τη βοήθεια της πρότυπης καμπύλης, που δημιουργήθηκε με βάση τα αποτελέσματα των δειγμάτων κυκλικού AMP γνωστής συγκέντρωσης. Οι τιμές EC₅₀ 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).

2.3.2 Παρασκευή διαλύματος σπινθηρισμού (scintillation fluid)

Υλικά-Συσκευές

Τολουόλιο (Merck, USA).

PPO (C₁₅H₁₁NO) (Merck, USA).

POPOP (C₂₄H₁₆N₂O₂) (Merck, USA).

Triton X-100 (Merck, USA).

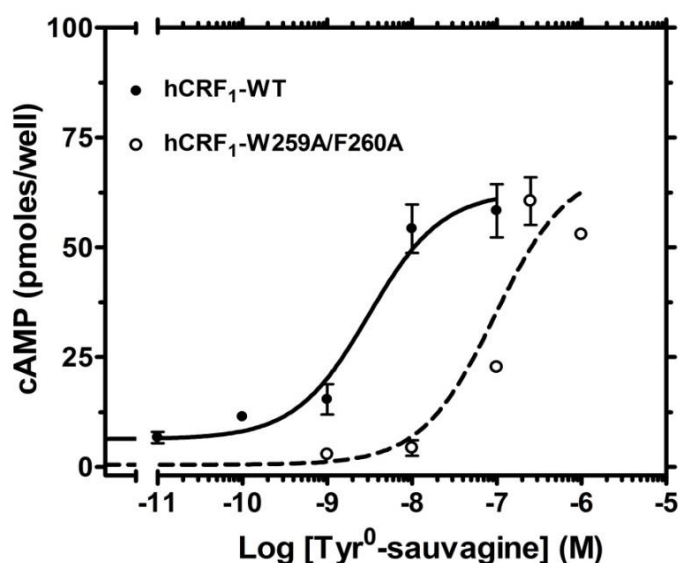
Μέθοδος

Σε φιάλη η οποία περιείχε ένα λίτρο τολουόλιο προστέθηκαν 5 gr PPO και 0,5 gr POPOP και αφέθηκαν για ανάδευση. Την επόμενη μέρα προστέθηκε στο διάλυμα αυτό 200 ml Triton X-100, ώστε η αναλογία να είναι διάλυμα PPO-POPOP προς Triton X-100, 5 προς 1. Η αποτελεσματικότητα του διαλύματος σπινθηρισμού εξετάστηκε με μέτρησή του σε μετρητή β - ακτινοβολίας (Beckman LS 1801, USA) απόδοσης 50%, αφού σε 4 ml από αυτό είχαν προστεθεί ~40000 cpm ³H-cAMP.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Επίδραση της μετάλλαξης W259A/F260A στην ικανότητα της σοβαγίνης να διεγείρει την παραγωγή ενδοκυττάριου κυκλικού AMP.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 1 η διπλή μετάλλαξη της Tyr259 και της Phe260 σε αλανίνη (W259A/F260A) μείωσε σε μεγάλο βαθμό την ισχύ με την οποία η σοβαγίνη διεγείρει την παραγωγή ενδοκυττάριου κυκλικού AMP σε HEK 293 κύτταρα που εκφράζανε τον CRF₁R. Συγκεκριμένα η ισχύς με την οποία η σοβαγίνη διεγείρει την παραγωγή ενδοκυττάριου κυκλικού AMP σε HEK 293 κύτταρα τα οποία εκφράζανε σταθερά τον άγριο τύπο (WT) CRF₁R (-LogEC₅₀ = 9.07 ± 0.08) μειώθηκε 162 φορές μετά την μετάλλαξη W259A/F260A (-LogEC₅₀ = 6.86 ± 0.09) (πίνακας 1).



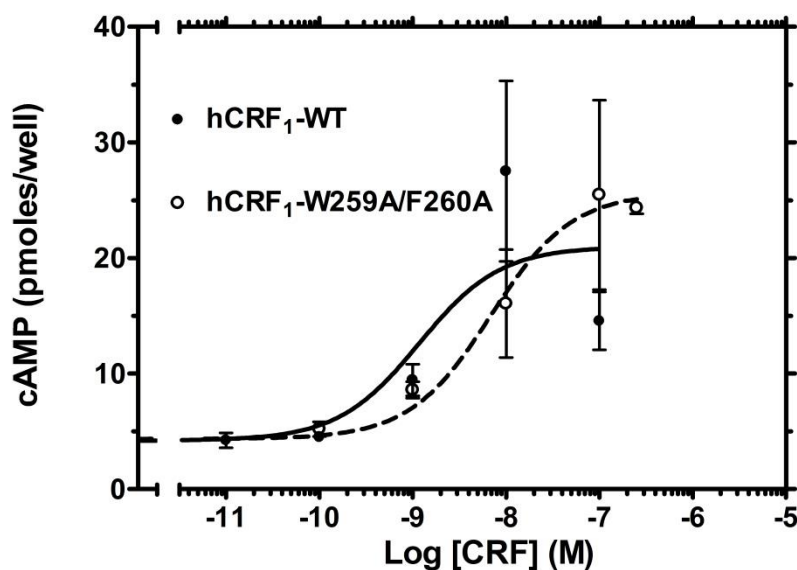
Εικόνα 1: Διέγερση παραγωγής ενδοκυττάριου κυκλικού AMP από την Tyr⁰-σοβαγίνη.

Η διέγερση της παραγωγής ενδοκυττάριου κυκλικού AMP από αυξανόμενες συγκεντρώσεις Tyr⁰-σοβαγίνης, επιτεύχθηκε όπως αναφέρεται στην ενότητα 'Υλικά και Μέθοδοι', σε άθικτα HEK 293 κύτταρα που εκφράζανε σταθερά τον άγριο τύπο hCRF₁-WT ή τον μεταλλαγμένο υποδοχέα, hCRF₁-W259A/F260A. Οι μέσοι όροι των τιμών και τα σταθερά σφάλματα τους προέρχονται από ένα χαρακτηριστικό πείραμα που έγινε πάνω από 3 φορές με παρόμοια αποτελέσματα. Οι τιμές logEC₅₀ του κάθε

πειράματος υπολογίστηκαν με μη γραμμική ανάλυση των αποτελεσμάτων (*nonlinear regression analysis*) όπως αναφέρεται στη μεθοδολογία.

3.2 Επίδραση της μετάλλαξης W259A/F260A στην ικανότητα του CRF να διεγείρει την παραγωγή ενδοκυττάριου κυκλικού AMP.

Σε αντίθεση με τη σοβαγίνη η μετάλλαξη W259A/F260A του CRF₁R δεν επηρέασε σημαντικά την ισχύ (και το μέγιστο αποτέλεσμα) με την οποία ο CRF διεγείρει την παραγωγή ενδοκυττάριου κυκλικού AMP σε HEK 293 κύτταρα τα οποία εκφράζανε τον CRF₁R (εικόνα 2). Συγκεκριμένα η ισχύς με την οποία ο CRF διεγείρει την παραγωγή ενδοκυττάριου κυκλικού AMP σε HEK 293 κύτταρα τα οποία εκφράζανε σταθερά τον άγριο τύπο (WT) CRF₁R ($-\text{LogEC}_{50} = 8.83 \pm 0.18$) μειώθηκε μόνο 12 φορές μετά την μετάλλαξη W259A/F260A ($-\text{LogEC}_{50} = 7.90 \pm 0.27$), σε αντίθεση με τη 162-φορές μείωση της ισχύος της σοβαγίνης (πίνακας 1)



Εικόνα 2 : Διέγερση της παραγωγής ενδοκυττάριου κυκλικού AMP από τον CRF.

Η διέγερση της παραγωγής ενδοκυττάριου κυκλικού AMP από αυξανόμενες συγκεντρώσεις CRF, επιτεύχθηκε όπως αναφέρεται στην ενότητα 'Υλικά και Μέθοδοι', σε άθικτα HEK 293 κύτταρα που εκφράζανε σταθερά τον άγριο τύπο hCRF₁-WT, ή τον μεταλλαγμένο υποδοχέα hCRF₁-W259A/F260A. Οι μέσοι όροι των τιμών και τα σταθερά σφαλματά τους προέρχονται από ένα χαρακτηριστικό πείραμα

που έγινε 2-3 φορές με παρόμοια αποτελέσματα. Οι τιμές $\log EC_{50}$ του κάθε πειράματος υπολογίστηκαν με μη γραμμική ανάλυση των αποτελεσμάτων (*nonlinear regression analysis*) όπως αναφέρεται στη μεθοδολογία.

Πίνακας 1: Ισχύς των πεπτιδίων της οικογένειας του CRF να διεγείρουν τη παραγωγή ενδοκυττάριου κυκλικού AMP. Οι τιμές ισχύος του CRF και σοβαγίνης προέρχονται από τα πειράματα που απεικονίζονται στις εικόνες 1 και 2 των αποτελεσμάτων.

	-LogEC₅₀±S.E	
	hCRF₁-WT	hCRF₁-W259A/F260A
Tyr⁰-σοβαγίνη	9.07 ± 0.08	6.86 ± 0.09
CRF	8.83 ± 0.18	7.90 ± 0.27

4.ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Προηγούμενη εργασία του εργαστηρίου μας έδειξε ότι τα αμινοξέα Trp259 και Phe260 του δεύτερου εξωκυττάριου βρόγχου του CRF₁R παίζουν σημαντικό ρόλο στην υψηλής συγγένειας δέσμευση των πεπτιδίων CRF και σοβαγίνης [98]. Συγκεκριμένα η μετάλλαξη, ένα την κάθε φορά, των αμινοξέων αυτών σε αλανίνη καθώς και η ταυτόχρονη μετάλλαξη τους (δημιουργώντας έτσι τον μεταλλαγμένο υποδοχέα 259A/260A), ελάττωσε σημαντικά τη συγγένεια δέσμευσης τόσο του CRF όσο και της σοβαγίνης. Στη παρούσα εργασία εξετάστηκε ο ρόλος των Trp259 και Phe260 στην ικανότητα του CRF₁R να ενεργοποιεί κυτταρικές σηματοδοτικές οδούς οδηγώντας έτσι σε βιολογικό αποτέλεσμα. Επειδή το πρώτο στάδιο κυτταρικής σηματοδότησης του ενεργοποιημένου από πεπτίδια CRF₁R είναι η διέγερση του ενζύμου της αδενυλικής κυκλάσης και η παραγωγή ενδοκυττάριου κυκλικού AMP, στη παρούσα μελέτη εξετάσαμε την επίδραση της ταυτόχρονης μετάλλαξης των Trp259 και Phe260 σε αλανίνη στην ικανότητα του CRF₁R να διεγείρει τη παραγωγή

ενδοκυττάριου κυκλικού AMP πριν και μετά την ενεργοποίηση του υποδοχέα από το CRF ή τη σοβαγίνη. Συγκεκριμένα μετρήσαμε το ενδοκυττάριο AMP που παράγεται μετά από επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων των πεπτιδικών αυτών αγωνιστών. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τόσο το CRF όσο και η σοβαγίνη διεγείραν τη παραγωγή κυκλικού AMP με δόσοεξαρτώμενο τρόπο τόσο σε κύτταρα που εκφράζανε τον άγριο τύπου CRF₁R όσο και τον 259A/260A μεταλλαγμένο υποδοχέα. Σε συμφωνία με τα πειράματα δέσμευσης όπως η συγγένεια δέσμευσης έτσι και η ισχύ της σοβαγίνης να διεγείρει τη παραγωγή κυκλικού AMP, ελαττώθηκε σημαντικά μετά από τη 259A/260A μετάλλαξη.

Αντίθετα, ενώ η 259A/260A μετάλλαξη ελάττωσε σημαντικά τη συγγένεια δέσμευσης του CRF για τον CRF₁R εντούτοις δεν επηρέασε σε μεγάλο βαθμό τόσο την ισχύ της να διεγείρει το ένζυμο της αδενυλοκυκλάσης σε κύτταρα που εκφράζανε τον υποδοχέα αυτόν όσο και το μέγιστο αποτέλεσμα. Το αποτέλεσμα αυτό πιθανόν οφείλεται στο ότι ο CRF₁R, όπως οι άλλοι GPCRs, (στο πιο απλό σενάριο) βρίσκεται σε δύο διαφορετικές δομικές καταστάσεις που δεσμεύουν τον CRF με υψηλή συγγένεια, τις R_{G_s}* και R_{G_x}* και οι οποίες διεγείρουν τουλάχιστον δύο διαφορετικές σηματοδοτικές κυτταρικές οδούς, εκείνη της G_s-cAMP και εκείνη της G_x-X (όπου X μια σηματοδοτική οδός διαφορετικής εκείνης του cAMP) [99- 101]. Η ικανότητα του CRF₁ να διεγείρει διαφορετικές σηματοδοτικές οδούς με διαφορετικό τρόπο έχει ήδη αναφερθεί σε προηγούμενες μελέτες.

Μετάλλαξη των Trp259 και Phe260 σε αλανίνη πιθανόν μείωσε τη συγγένεια δέσμευσης του CRF για την R_{G_x}*, χωρίς όμως να επηρεάζεται εκείνη για την R_{G_s}* και κατ'επέκταση η ισχύ με την οποία αυτό διέγειρε τις G_s-πρωτείνες και έτσι τη παραγωγή κυκλικού AMP. Όμως σε αντίθεση με την ισχύ διέγερσης παραγωγής κυκλικού AMP, οι μεταλλάξεις W259A και F260A ελάττωσαν τη φαινομενική υψηλή συγγένεια δέσμευσης του CRF, η οποία απαρτίζεται από τις επιμέρους συγγένειες για τις καταστάσεις R₁* και R₂*, λόγω της μείωσης της συγγένειας του πεπτιδίου για την R_{G_x}*. Παρόμοια προηγούμενες μελέτες σε διαφορετικούς GPCRs έχουν δείξει ότι διάφορες μεταλλάξεις των υποδοχέων μπορούν να τροποποιήσουν διαφορετικές σηματοδοτικές οδούς που διεγείρονται από τους υποδοχείς αυτούς με διαφορετικό τρόπο [102, 103]. Μελέτες που βρίσκονται σε εξέλιξη στο εργαστήριό μας στοχεύουν να αποκαλύψουν τη κυτταρική R_{G_x}*σηματοδοτική οδό.

5.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Spiess, J., et al., Primary structure of corticotropin-releasing factor from ovine hypothalamus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1981. 78(10): p. 6517-21.
2. Saffran, M. and A.V. Schally, The release of corticotrophin by anterior pituitary tissue in vitro. *Can J Biochem Physiol*, 1955. 33(3): p. 408-15.
3. Chrousos, G.P., Stress and disorders of the stress system. *Nat Rev Endocrinol*, 2009. 5(7): p. 374-81.
4. 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.
5. Guillemin, R., The adenohypophysis and its hypothalamic control. *Annu Rev Physiol*, 1967. 29: p. 313-48.
6. Binder, M.D., N. Hirokawa, and U. Windhorst, *Encyclopedia of neuroscience*. Vol. p. 5 v. ill (lxxii). 2009, Berlin ; London: Springer 4393
7. Grigoriadis, D.E., et al., The CRF Receptor Structure, Function and Potential for Therapeutic Intervention. *Current Medicinal Chemistry -Central Nervous System Agent*, 2001. 1(1): p. 63-97.
8. 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.
9. 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.
10. Donaldson, C.J., et al., Cloning and characterization of human urocortin. *Endocrinology*, 1996. 137(5): p. 2167-70.
11. 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.
12. Dautzenberg, F.M. and R.L. Hauger, The CRF peptide family and their receptors: yet more partners discovered. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2002. 23(2): p. 71-77.
13. 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.

14. 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.
15. Florio, P., et al., Urocortin expression is downregulated in human endometrial carcinoma. *Journal of Endocrinology*, 2006. 190(1): p. 99-105.
16. Iino, K., et al., Urocortin expression in human pituitary gland and pituitary adenoma. *J Clin Endocrinol Metab*, 1997. 82(11): p. 3842-50.
17. Murakami, Y., et al., Stimulation by urocortin of growth hormone (GH) secretion in GH-producing human pituitary adenoma cells. *Endocr J*, 1997. 44(4): p. 627-9.
18. Arcuri, F., et al., Expression of urocortin mRNA and peptide in the human prostate and in prostatic adenocarcinoma. *Prostate*, 2002. 52(3): p. 167-72.
19. Yamauchi, N., et al., Distribution of urocortin 2 in various tissues of the rat. *J Neuroendocrinol*, 2005. 17(10): p. 656-63.
20. 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.
21. Imperatore, A., et al., Urocortin 2 and urocortin 3 are expressed by the human placenta, deciduas, and fetal membranes. *Am J Obstet Gynecol*, 2006. 195(1): p. 288-95.
22. 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.
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. 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.
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. Fahmy, H., et al., The "homeostasis hormone" and its CRF(1) receptor. From structure to function. *Hormones (Athens)*. 11(3): p. 254-71.
 28. Bremner, J.D., et al., Elevated CSF corticotropin-releasing factor concentrations in posttraumatic stress disorder. *Am J Psychiatry*, 1997. 154(5): p. 624-9.
 29. Nemeroff, C.B., The role of corticotropin-releasing factor in the pathogenesis of major depression. *Pharmacopsychiatry*, 1988. 21(2): p. 76-82.
 30. Chrousos, G.P., The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation. *N Engl J Med*, 1995. 332(20): p. 1351-62.
 31. Karalis, K., et al., CRH and the immune system. *J Neuroimmunol*, 1997. 72(2): p. 131-6.
 32. Karalis, K., et al., Autocrine or paracrine inflammatory actions of corticotropin-releasing hormone in vivo. *Science*, 1991. 254(5030): p. 421-3.
 33. Maillot, C., et al., Peripheral corticotropin-releasing factor and stress-stimulated colonic motor activity involve type 1 receptor in rats. *Gastroenterology*, 2000. 119(6): p. 1569-79.
 34. Martinez, V., et al., 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 Pharmacol Exp Ther*, 2002. 301(2): p. 611-7.
 35. Gravanis, A., et al., Endometrial and myometrial corticotropin-releasing hormone (CRH): its regulation and possible roles. *Peptides*, 2001. 22(5): p. 785-93.
 36. Huang, B.M., et al., Corticotropin-releasing hormone stimulates steroidogenesis in mouse Leydig cells. *Biol Reprod*, 1995. 53(3): p. 620-6.
 37. Heinrich, N., et al., Corticotropin-releasing factor (CRF) agonists stimulate testosterone production in mouse leydig cells through CRF receptor-1. *Endocrinology*, 1998. 139(2): p. 651-8.
 38. Skelton, K.H., M.J. Owens, and C.B. Nemeroff, The neurobiology of urocortin. *Regul Pept*, 2000. 93(1-3): p. 85-92.
 39. Fekete, E.M. and E.P. Zorrilla, Physiology, pharmacology, and therapeutic relevance of urocortins in mammals: ancient CRF paralogs. *Front Neuroendocrinol*, 2007. 28(1): p. 1-27.

40. Davis, M.E., et al., Effect of urocortin 1 infusion in humans with stable congestive cardiac failure. *Clin Sci (Lond)*, 2005. 109(4): p. 381-8.
41. Rademaker, M.T., et al., Four-day urocortin-I administration has sustained beneficial haemodynamic, hormonal, and renal effects in experimental heart failure. *Vol. 26. 2005. 2055-2062.*
42. Wang, L., et al., Peripheral urocortin inhibits gastric emptying and food intake in mice: differential role of CRF receptor 2. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2001. 281(5): p. R1401-10.
43. 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.
44. 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.
45. 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.
46. Kornreich, W.D., et al., Alanine series of ovine corticotropin releasing factor (oCRF): a structure-activity relationship study. *J Med Chem*, 1992. 35(10): p. 1870-6.
47. Aguilera, G., et al., Corticotropin-releasing factor receptors: distribution and regulation in brain, pituitary, and peripheral tissues. *Ann N Y Acad Sci*, 1987. 512: p. 48-66.
48. Perrin MH, et al., Corticotropin-Releasing Factor Binding to the Anterior Pituitary Receptor Is Modulated by Divalent Cations and Guanyl Nucleotides. *Endocrinology*, 1986. 118(3): p. 1171-1179.
49. Chen, R., et al., Expression cloning of a human corticotropin-releasing-factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. 90(19): p. 8967-71.
50. Liapakis, G., et al., Members of CRF family and their receptors: from past to future. *Curr Med Chem*, 2010. 18(17): p. 2583-600.
51. 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.

52. Eckart, K., et al., Pharmacology and biology of corticotropin-releasing factor (CRF) receptors. *Receptors Channels*, 2002. 8(3-4): p. 163-77.
53. 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.
54. Harmar, A.J., Family-B G-protein-coupled receptors. *Genome Biol*, 2001. 2(12): p. REVIEWS3013.
55. Gether, U., Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. *Endocr Rev*, 2000. 21(1): p. 90-113.
56. Perrin, M.H., et al., Expression, purification, and characterization of a soluble form of the first extracellular domain of the human type 1 corticotropin releasing factor receptor. *J Biol Chem*, 2001. 276(34): p. 31528-34.
57. Perrin, M.H., et al., The three-dimensional structure of the N-terminal domain of corticotropin-releasing factor receptors: sushi domains and the B1 family of G protein-coupled receptors. *Ann N Y Acad Sci*, 2006. 1070: p. 105-19.
58. Grammatopoulos, D.K. and G.P. Chrousos, Functional characteristics of CRH receptors and potential clinical applications of CRH-receptor antagonists. *Trends Endocrinol Metab*, 2002. 13(10): p. 436-44.
59. Arai , M., Q.A. Iman, and B.A.-S. Abdul, Characterization of Three Corticotropin-Releasing Factor Receptors in Catfish: A Novel Third Receptor Is Predominantly Expressed in Pituitary and Urophysis. *Endocrinology*, 2001. 142(1): p. 446-454.
60. 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.
61. Grigoriadis, D.E., et al., Characterization of corticotropin-releasing factor receptor subtypes. *Ann N Y Acad Sci*, 1996. 780: p. 60-80.
62. Grammatopoulos, D.K. and E.W. Hillhouse, Role of corticotropin-releasing hormone in onset of labour. *Lancet*, 1999. 354(9189): p. 1546-9.
63. Grammatopoulos, D., et al., Human corticotropin-releasing hormone receptor: differences in subtype expression between pregnant and nonpregnant myometria. *J Clin Endocrinol Metab*, 1998. 83(7): p. 2539-44.

64. 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. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. 98(13): p. 7570-5.
65. 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.
66. McCarthy, J.R., S.C. Heinrichs, and D.E. Grigoriadis, Recent advances with the CRF1 receptor: design of small molecule inhibitors, receptor subtypes and clinical indications. *Curr Pharm Des*, 1999. 5(5): p. 289-315.
67. Webster, E.L., et al., In vivo and in vitro characterization of antalarmin, a nonpeptide corticotropin-releasing hormone (CRH) receptor antagonist: suppression of pituitary ACTH release and peripheral inflammation. *Endocrinology*, 1996. 137(12): p. 5747-50.
68. Birnbaumer, L., Heterotrimeric G Proteins: Molecular Diversity and Structural Basis for Their Role in Signal Transduction., in *Encyclopedia of Hormones*, A.W. H.L.a.N. Henry, Editor. 2003, Academic Press.: New York NY. p. 260-271.
69. Blank, T., et al., Corticotropin-releasing factor receptors couple to multiple G-proteins to activate diverse intracellular signaling pathways in mouse hippocampus: role in neuronal excitability and associative learning. *J Neurosci*, 2003. 23(2): p. 700-7.
70. Dermitzaki, E., et al., Corticotropin-releasing hormone induces Fas ligand production and apoptosis in PC12 cells via activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem*, 2002. 277(14): p. 12280-7.
71. Punn, A., M.A. Levine, and D.K. Grammatopoulos, Identification of Signaling Molecules Mediating Corticotropin-Releasing Hormone-R1 \pm -Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) Interactions: The Critical Role of Phosphatidylinositol 3-Kinase in Regulating ERK1/2 But Not p38 MAPK Activation. *Molecular Endocrinology*, 2006. 20(12): p. 3179-3195.
72. Elliott-Hunt, C.R., et al., Potential signalling pathways underlying corticotrophin-releasing hormone-mediated neuroprotection from excitotoxicity in rat hippocampus. *J Neurochem*, 2002. 80(3): p. 416-25.
73. Grammatopoulos, D.K., et al., Urocortin, but Not Corticotropin-Releasing Hormone (CRH), Activates the Mitogen-Activated Protein Kinase Signal Transduction Pathway in Human Pregnant Myometrium: An Effect Mediated via

- R1 Ξ \pm and R2 Ξ \pm CRH Receptor Subtypes and Stimulation of Gq-Proteins. *Molecular Endocrinology*, 2000. 14(12): p. 2076-2091.
74. Grammatopoulos, D.K., et al., Rat cerebral cortex corticotropin-releasing hormone receptors: evidence for receptor coupling to multiple G-proteins. *J Neurochem*, 2001. 76(2): p. 509-19.
75. Papadopoulou, N., et al., Protein kinase A-induced negative regulation of the corticotropin-releasing hormone R1alpha receptor-extracellularly regulated kinase signal transduction pathway: the critical role of Ser301 for signaling switch and selectivity. *Mol Endocrinol*, 2004. 18(3): p. 624-39.
76. Lefkowitz, R.J., G protein-coupled receptors. III. New roles for receptor kinases and beta-arrestins in receptor signaling and desensitization. *J Biol Chem*, 1998. 273(30): p. 18677-80.
77. Perry, S.J., et al., Distinct conformations of the corticotropin releasing factor type 1 receptor adopted following agonist and antagonist binding are differentially regulated. *J Biol Chem*, 2005. 280(12): p. 11560-8.
78. Pitcher, J.A., N.J. Freedman, and R.J. Lefkowitz, G protein-coupled receptor kinases. *Annu Rev Biochem*, 1998. 67: p. 653-92.
79. Rasmussen, T.N., I. Novak, and S.M. Nielsen, Internalization of the human CRF receptor 1 is independent of classical phosphorylation sites and of beta-arrestin 1 recruitment. *Eur J Biochem*, 2004. 271(22): p. 4366-74.
80. 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.
81. 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.
82. Nielsen, S.M., et al., Constitutive activation of tethered-peptide/corticotropin-releasing factor receptor chimeras. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. 97(18): p. 10277-81.
83. Perrin, M.H., et al., The first extracellular domain of corticotropin releasing factor-R1 contains major binding determinants for urocortin and astressin. *Endocrinology*, 1998. 139(2): p. 566-70.

84. 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. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101(35): p. 12836-41.
85. 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.
86. Pioszak, A.A., et al., Molecular recognition of corticotropin-releasing factor by its G-protein-coupled receptor CRFR1. *J Biol Chem*, 2008. 283(47): p. 32900-12.
87. 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.
88. Liaw, C.W., et al., Localization of agonist- and antagonist-binding domains of human corticotropin-releasing factor receptors. *Mol Endocrinol*, 1997. 11(13): p. 2048-53.
89. Liaw, C.W., et al., Localization of ligand-binding domains of human corticotropin-releasing factor receptor: a chimeric receptor approach. *Mol Endocrinol*, 1997. 11(7): p. 980-5.
90. Sydow, S., et al., The role of the fourth extracellular domain of the rat corticotropin-releasing factor receptor type 1 in ligand binding. *Eur J Biochem*, 1999. 259(1-2): p. 55-62.
91. 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.
92. 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.
93. 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.
94. 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.
95. Javitch, J.A., et al., Mapping the binding-site crevice of the dopamine D2 receptor by the substituted-cysteine accessibility method. *Neuron*, 1995. 14(4): p. 825-31.

96. Liapakis, G., et al., The forgotten serine. A critical role for Ser-2035.42 in ligand binding to and activation of the beta 2-adrenergic receptor. *J Biol Chem*, 2000. 275(48): p. 37779-88.
97. Gkoutelias, K., et al., Exploring the binding site crevice of a family B G protein-coupled receptor, the type 1 corticotropin releasing factor receptor. *Mol Pharmacol*, 2010. 78(4): p. 785-93.
98. Gkoutelias, K., et al., Alanine scanning mutagenesis of the second extracellular loop of type 1 corticotropin-releasing factor receptor revealed residues critical for peptide binding. *Mol Pharmacol*, 2009. 75(4): p. 793-800.
99. Vauquelin, G. and I. Van Liefde, G protein-coupled receptors: a count of 1001 conformations. *Fundam Clin Pharmacol*, 2005. 19(1): p. 45-56.
100. Kenakin, T., Ligand-selective receptor conformations revisited: the promise and the problem. *Trends Pharmacol Sci*, 2003. 24(7): p. 346-54.
101. Berg, K.A., et al., Effector pathway-dependent relative efficacy at serotonin type 2A and 2C receptors: evidence for agonist-directed trafficking of receptor stimulus. *Mol Pharmacol*, 1998. 54(1): p. 94-104.
101. Perez, D.M., et al., Constitutive activation of a single effector pathway: evidence for multiple activation states of a G protein-coupled receptor. *Mol Pharmacol*, 1996. 49(1): p. 112-22.
103. Gilchrist, R.L., et al., The luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor has distinct transmembrane conductors for cAMP and inositol phosphate signals. *J Biol Chem*, 1996. 271(32): p. 19283-7.