



Πανεπιστήμιο Κρήτης
Σχολή Θετικών & Τεχνολογικών
Επιστημών
Τμήμα Χημείας

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

“ Φαρμακολογικός χαρακτηρισμός του τύπου 2 υποδοχέα του εκλυτικού παράγοντα της κορτικοτροπίνης (CRF₂R) μετά από μετάλλαξη της Ile272 σε Met. ”

Κατέβα Μαρίτα-Ασημίνα

Υπεύθυνος Καθηγητής Τμήματος Ιατρικής

Λιαπάκης Γεώργιος

Υπεύθυνος Καθηγητής Τμήματος Χημείας

Κατερινόπουλος Χαράλαμπος

Εργαστήριο Μοριακής Φαρμακολογίας

Τομέας Φαρμακολογίας του τμήματος Ιατρικής Σχολής

Σεπτέμβριος 2018, Ηράκλειο Κρήτης

Περιεχόμενα

1	Περίληψη	1
2	Εισαγωγή	3
2.1	Ομοιόσταση.....	3
2.2	Άξονας Υποθαλάμου-Υπόφυσης-Επινεφριδίων (HPA)	3
2.3	Εκλυτικός παράγοντας της κορτικοτροπίνης (CRF).....	4
2.4	Συγγενή Πεπτίδια του CRF	5
2.4.1	Σοβαγίνη (<i>Sauvagine-SVG</i>).....	7
2.4.2	Ουροτενσίνη (<i>Urotensin-URO</i>).....	7
2.4.3	Ουροκορτίνη I,II,III(<i>UCN I,II,III</i>).....	7
2.4.4	Συνθετικά ανάλογα του CRF	8
2.5	Δομή του CRF και των συγγενών του πεπτιδίων	8
2.6	Υποδοχείς του Εκλυτικού Παράγοντα της Κορτικοτροπίνης (CRFRs)	9
2.7	Υποδοχείς του CRF και Κυτταρική σηματοδότηση	10
2.7.1	Δομή και λειτουργία των υποδοχέων του εκλυτικού παράγοντα της κορτικοτροπίνης	13
2.7.2	Δομικές και λειτουργικές διαφορές των υποτύπων του υποδοχέα του εκλυτικού παράγοντα της κορτικοτροπίνης (<i>CRF₁R</i> και <i>CRF₂R</i>).....	14
2.7.3	Δέσμευση μη πεπτιδικών ανταγωνιστών στους δύο υποδοχείς του CRF.....	16
3	Σκοπός	19
4	Υλικά και Μέθοδοι	20
4.1	Μεταλλαξιγένεση κατευθυνόμενης θέσης με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR - Site Directed Mutagenesis)	20
4.1.1	Υλικά – Συσκευές.....	20
4.1.2	Μέθοδος	21
4.2	Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης – απομόνωση και καθαρισμός επιθυμητών τμημάτων DNA	25
4.2.1	Υλικά-Συσκευές	25
4.2.2	Μέθοδος	25

4.3	Πέψη DNA με ένζυμα περιορισμού	27
4.4	Συρραφή τεμαχίων DNA (ligation)	28
4.4.1	Υλικά – Συσκευές.....	28
4.4.2	Μέθοδος	28
4.5	Μετασχηματισμός βακτηρίων DH-10b <i>E.coli</i> με το πλασμιδιακό DNA που έφερε την επιθυμητή μετάλλαξη	29
4.5.1	Υλικά – Συσκευές.....	29
4.5.2	Μέθοδος	29
4.6	Πολλαπλασιασμός μετασχηματισμένων βακτηρίων DH-10b <i>E.coli</i>	29
4.6.1	Υλικά – Συσκευές.....	29
4.6.2	Μέθοδος	30
4.7	Καλλιέργεια κυττάρων HEK 293.....	30
4.7.1	Υλικά – Συσκευές.....	30
4.7.2	Μέθοδος	30
4.8	Επιμόλυνση κυττάρων με πλασμιδιακό DNA(Transient Transfection).....	31
4.8.1	Υλικά – Συσκευές.....	31
4.8.2	Μέθοδος	32
4.9	Μελέτες μέτρησης ενδοκυττάρου κυκλικού AMP.....	32
4.9.1	Υλικά – Συσκευές.....	32
4.9.2	Μέθοδος	33
4.10	Παρασκευή διαλύματος σπινθηρισμού (scintillation fluid).....	35
4.10.1	Υλικά – Συσκευές.....	35
4.10.2	Μέθοδος	35
5	Αποτελέσματα	36
5.1	Δημιουργία μετάλλαξης στον τύπο 2 υποδοχέα του εκλυτικού παράγοντα της κορτικοτροπίνης (CRF ₂ R).....	36
5.2	Φαρμακολογικός χαρακτηρισμός του CRF ₂ R-I272M.....	47
6	Συζήτηση.....	50
7	Βιβλιογραφία.....	53

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές ευχαριστίες μου στον Καθ. Κατερινόπουλο Χαράλαμπο, (Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης) για τη δυνατότητα που μου έδωσε να ασχοληθώ με το φαρμακολογικό χαρακτηρισμό, αντικείμενο που με ενδιαφέρει ιδιαίτερα, αλλά και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε με την ανάθεση του θέματος αυτού. Εκτιμώ ότι η συνεισφορά του αυτή θα υπάρξει καθοριστική για τη μελλοντική μου πορεία στο πεδίο της Χημείας και για αυτό τον ευχαριστώ θερμά.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς τον Καθ. Λιαπάκη Γεώργιο (Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης), χωρίς την καθοδήγηση του οποίου και την άοκνη υποστήριξή του σε όλα τα θέματα που αντιμετώπισα κατά την εκπόνηση της εργασίας (εργαστηριακά και μεθοδολογικά ζητήματα, υπόδειξη και μελέτη πηγών κλπ.), δε θα ήταν δυνατή η ολοκλήρωσή της στη μορφή που έχει σήμερα. Πλέον της επιστημονικής καθοδήγησης οφείλω επιπρόσθετες ευχαριστίες στον Καθ.Λιαπάκη για την πρόσβαση που μου παρείχε στον απαιτούμενο υλικοτεχνικό εξοπλισμό στο Εργαστήριο Μοριακής Φαρμακολογίας του Τομέα Φαρμακολογίας της Ιατρικής Σχολής.

Θα ήταν παράλειψή μου αν δεν ευχαριστούσα θερμά την Καθ. Θερμού Κυριακή (Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Κρήτης) για τις πολύτιμες συμβουλές της κατά την εκπόνηση της εργασίας αλλά και για την καθοδήγησή της σε σημαντικά θέματα για εμένα, ιδιαίτερα σχετικά με το πλαίσιο της συνέχισης των σπουδών μου.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ.Μιχάλη Παρδαλό, συνεργάτη στο εργαστήριο και πλέον καλό μου φίλο, για την αμέριστη βοήθεια και υποδείξεις του στα μικρά αλλά και στα μεγαλύτερα καθημερινά θέματα που αντιμετώπισα στο εργαστήριο. Χωρίς αυτήν και τις συμβουλές του η μέχρι τώρα πορεία μου στην έρευνα θα ήταν πολύ διαφορετική. Επίσης, ευχαριστώ θερμά τον κ.Βλάση Καραγεώργο και τον κ.Στέλιο Σακελάρη για το χρόνο που αφιέρωσαν προκειμένου να με εκπαιδεύσουν τόσο γνωστικά όσο και εργαστηριακά. Ιδιαίτερες ευχαριστίες αρμόζουν στην κα.Κατερίνα Πετροπούλου φίλη και συνεργάτη στο εργαστήριο, με την οποία ξεκινήσαμε μαζί τα βήματα μας στην έρευνα και εύχομαι να μπορέσουμε να συνεργαστούμε και στο μέλλον.

1 Περίληψη

Ο εκλυτικός παράγοντας της κορτικοτροπίνης (corticotropin releasing factor, CRF) είναι ένα πεπτίδιο 41 αμινοξέων που ασκεί πληθώρα βιολογικών δράσεων μέσω αλληλεπίδρασης του με 2 τύπους υποδοχέων, τον τύπο 1 (CRF₁R) και τύπο 2 (CRF₂R). 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 (TM1-7) που ενώνονται με τρεις εξωκυττάριους και τρεις ενδοκυττάριους βρόγχους. Ο CRF δεσμεύεται στις εξωκυττάριες περιοχές των υποδοχέων του, ενώ τα CRF₁R-εκλεκτικά μη πεπτιδικά ανάλογα όπως η ανταλαρμίνη, δεσμεύονται σε αμινοξέα των διαμεμβρανικών περιοχών του CRF₁R και ανταγωνίζονται τις δράσεις του CRF αλλοστερικά.

Αξιοπερίεργο αποτελεί το γεγονός ότι ενώ όλες οι θέσεις δέσμησης των CRF₁R-εκλεκτικών μη πεπτιδικών ανταγωνιστών στον CRF₁R διατηρούνται στον CRF₂R, τα μόρια αυτά δεν δεσμεύονται στον CRF₂R. Με βάση μοριακά πρότυπα που κατασκευάσαμε υποθέσαμε ότι σημαντικό ρόλο στην εκλεκτικότητα δέσμησης των CRF₁R-εκλεκτικών μη πεπτιδικών ανταγωνιστών διαδραματίζει η ύπαρξη 2 αμινοξέων στον CRF₁R που βρίσκονται πάνω από τις θέσεις δέσμησης των ανταγωνιστών αυτών και τα οποία δεν υπάρχουν στον CRF₂R. Τα αμινοξέα αυτά σχηματίζουν ένα δίκτυο δεσμών που επηρεάζει τη δέσμηση των CRF₁R-εκλεκτικών μη πεπτιδικών ανταγωνιστών του υποδοχέα. Τα αμινοξέα αυτά είναι η Met276 στην πέμπτη διαμεμβρανική περιοχή (TM5) και η His199 στην τρίτη διαμεμβρανική περιοχή (TM3) του CRF₁R. Αντίθετα στον CRF₂R τα αντίστοιχα είναι Val195 και Ile272. Υποθέτουμε ότι αντικαθιστώντας τα Val195 και Ile272 του CRF₂R με τα αντίστοιχα His199 και Met276 του CRF₁R, θα δημιουργήσουμε έναν ή περισσότερους μεταλλαγμένους CRF₂R υποδοχείς (V195H, I272M και V195H+I272M) που θα δεσμεύουν τους CRF₁R-εκλεκτικούς μη πεπτιδικούς ανταγωνιστές.

Στην παρούσα μελέτη αντικαταστήσαμε τη Ile272 του CRF₂R με την αντίστοιχη Met276 του CRF₁R και μελετήσαμε τις φαρμακολογικές ιδιότητες του

μεταλλαγμένου υποδοχέα, I272M, και ιδιαίτερα την ικανότητά του να δεσμεύει CRF₁R-εκλεκτικούς μη πεπτιδικούς ανταγωνιστές.

Οι μελέτες αυτές στο σύνολο τους θα βοηθήσουν στο σχεδιασμό νέων CRF₁R- και CRF₂R-εκλεκτικών μη πεπτιδικών ανταγωνιστών που θα χρησιμοποιηθούν στη μελέτη των υποδοχέων αυτών καθώς και του ρόλου τους σε διάφορες φυσιολογικές λειτουργίες και παθοφυσιολογικές καταστάσεις.

2 Εισαγωγή

2.1 Ομοίσταση

Όλοι οι οργανισμοί λειτουργούν βέλτιστα σε συγκεκριμένες συνθήκες. Όταν οι συνθήκες αυτές αλλάξουν από εξωτερικά ή εσωτερικά ερεθίσματα οι οργανισμοί τείνουν να τις επαναφέρουν προκειμένου να επανέλθει η ισορροπία. Η διατήρηση της ισορροπίας αυτής ονομάζεται ομοίσταση και είναι μία βασική ιδιότητα για την επιβίωση ενός οργανισμού.¹

Η πρώτη αναφορά στην έννοια της ομοιόστασης έγινε το 1865 από τον Claude Bernard και έπειτα από τον Walter Bradford Cannon το 1926 ο οποίος την εισήγαγε ως επιστημονικό όρο.^{2,3}

2.2 Άξονας Υποθαλάμου-Υπόφυσης-Επινεφριδίων (HPA)

Ο οργανισμός ανταποκρίνεται σε στρεσογόνα ερεθίσματα έτσι ώστε να διατηρήσει την ομοιόστασή του. Η απόκριση στα ερεθίσματα αυτά προέρχεται από την ενορχηστρωμένη λειτουργία πολλών συστημάτων του οργανισμού μας, όπως του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (ΚΝΣ), καρδιαγγειακού, ανοσοποιητικού, και ενδοκρινικού, συμπεριλαμβανομένου του άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-επινεφριδίων (HPA, Hypothalamus-Pituitary-Adrenal axis).⁴

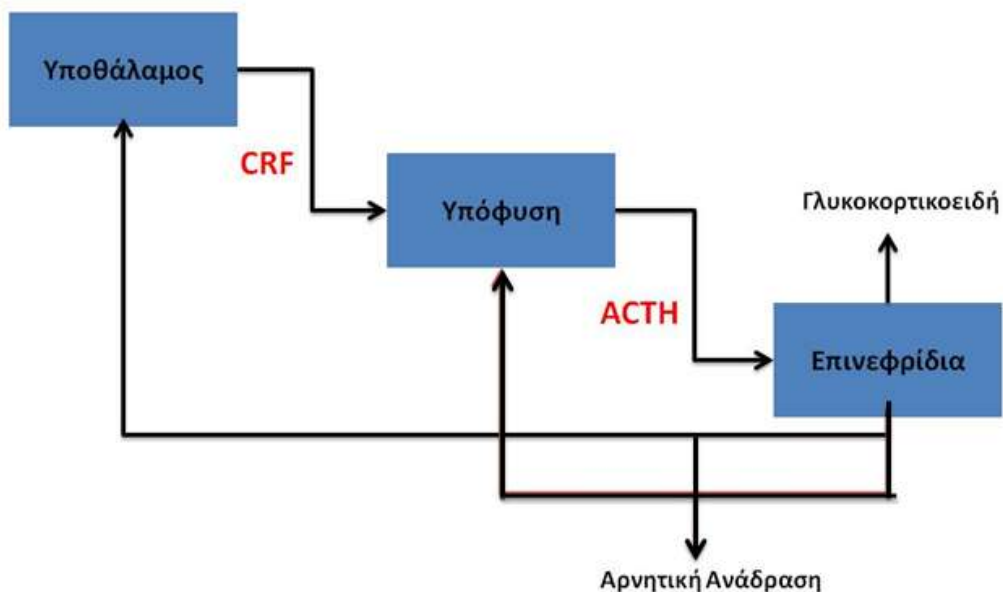
Συγκεκριμένα στον παρακοιλιακό πυρήνα του υποθαλάμου συντίθεται ο παράγοντας απελευθέρωσης της κορτικοτροπίνης CRF (corticotropin releasing factor), εκκρίνεται στην πυλαία κυκλοφορία και μέσω αυτής φτάνει στον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης όπου ενεργοποιεί αυτή με αποτέλεσμα τη σύνθεση της προοπιομέλανοκορτίνης (POMC). Η POMC αποτελεί πρόδρομο μόριο της κορτικοτροπίνης (ACTH) η οποία μέσω της κυκλοφορίας του αίματος μεταφέρεται στα επινεφρίδια όπου προκαλείται η απελευθέρωση γλυκοκορτικοειδών.⁵

Το χρόνιο άγχος (μη προσαρμογή σε στρεσογόνα ερεθίσματα) σχετίζεται με την υπερδραστηριότητα του άξονα HPA. Το άγχος προκαλεί έκλυση γλυκοκορτικοειδών, με αποτέλεσμα τη μη διατήρηση της μεταβολικής ομοιόστασης, όπως αυξημένη παραγωγή γλυκόζης, καθώς η συγκέντρωση των γλυκοκορτικοειδών στο σώμα ελέγχει τη λειτουργία του μεταβολισμού.⁶

Ο Geoffrey Harris είναι ο πρώτος που πρότεινε ότι ο εγκέφαλος ελέγχει το ενδοκρινικό σύστημα με ένα εξαιρετικά ρυθμιζόμενο σύστημα σύνθεσης και απελευθέρωσης πεπτιδικών ορμονών.⁷

Το 1955 οι Saffran & Schally σε μελέτη στο εκχύλισμα του υποθαλάμου βρήκαν ένα παράγοντα που είναι υπεύθυνος για την

κορτικοτροπίνης (ACTH) από κύτταρα της άνω υπόφυσης *in vitro*. Ο παράγοντας αυτός έχει την ικανότητα να προκαλεί απελευθέρωση ACTH και ονομάστηκε εκλυτικός παράγοντας της κορτικοτροπίνης ή CRF.⁸



Εικόνα 1 : Απεικόνιση του άξονα Υποθαλάμου-Υπόφυσης-Επινεφριδίων.

2.3 Εκλυτικός παράγοντας της κορτικοτροπίνης (CRF)

Το 1981 οι Vale *et al.* απομόνωσαν και χαρακτήρισαν τον CRF. Η απομόνωση έγινε από εκχύλισμα υποθαλαμικού ιστού προβάτων. Στη συνέχεια, ο CRF χαρακτηρίστηκε ως ένα πεπτίδιο 41 αμινοξέων το οποίο διεγείρει την απελευθέρωση της ACTH *in vitro* και *in vivo*.⁵

Η αλληλουχία του CRF όπως προτάθηκε από τους Vale *et al.* είναι:

H-Ser-Gln-Glu-Pro-Pro-Ile-Ser-Leu-Asp-Leu-Thr-Phe-
His-Leu-Leu-Arg-Glu-Val-Leu-Glu-Met-Thr-Lys-Ala-
Asp-Gln-Leu-Ala-Gln-Gln-Ala-His-Ser-Asn-Arg-Lys-
Leu-Leu-Asp-Ile-Ala-NH₂

Ο CRF παίζει σημαντικό ρόλο στην απόκριση του οργανισμού σε κατάσταση άγχους επηρεάζοντας τις λειτουργίες του ενδοκρινικού, ανοσολογικού και συμπεριφορικού συστήματος των θηλαστικών. Η σύνθεση του γίνεται κατά κύριο λόγο στον υποθάλαμο με βασικό χαρακτηριστικό τη ρύθμιση του άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-επινεφριδίων. Στην υπόφυση ο CRF επάγει την παραγωγή της προπιομελανοκορτίνης (POMC), πρόδρομο μόριο της ACTH, καθώς και την έκκριση της τελευταίας ^{5,9,10}

Στον άνθρωπο το γονίδιο του CRF βρίσκεται στο χρωμόσωμα 8. Το γονίδιο του CRF εκφράζεται κυρίως στον υποθάλαμο εκτός όμως από εκεί εκφράζεται και σε άλλες περιοχές ΚΝΣ όπως και σε ένα πλήθος περιφερειακών ιστών όπως στο μυελό των επινεφριδίων, τα λεμφοκύτταρα, το πάγκρεας, τον πνεύμονα, το ήπαρ, το στομάχι, το δωδεκαδάκτυλο και το δέρμα.¹¹

2.4 Συγγενή Πεπτίδια του CRF

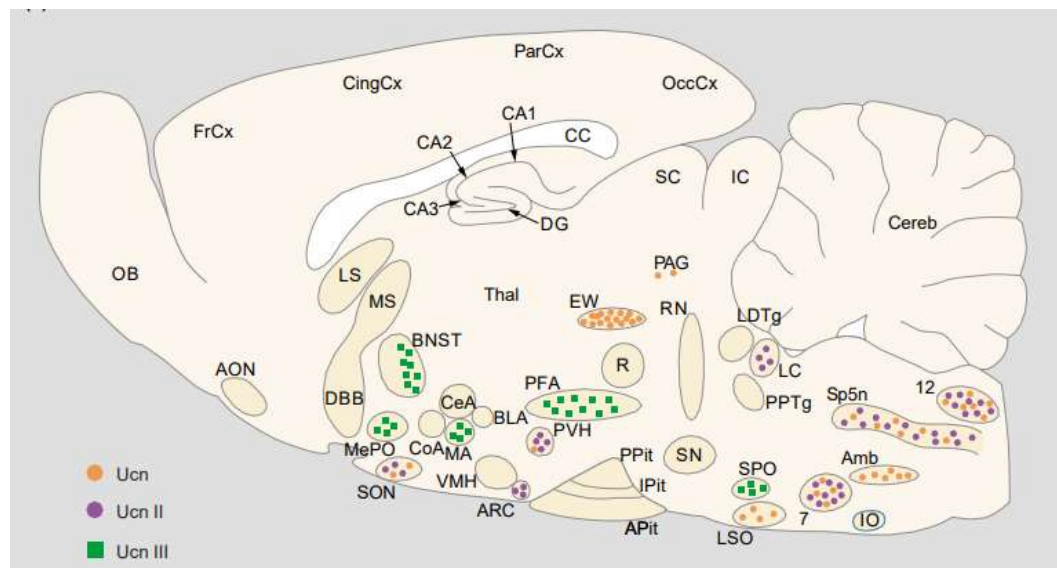
Ο CRF ανήκει σε μία οικογένεια πεπτιδίων με τα οποία έχει παρόμοιες ιδιότητες. Τα συγγενή με τον CRF πεπτίδια είναι: η ουροτενσίνη-I (Urotensin I ή URO I), η σοβαγίνη (Sauvagine ή SVG), η ουροκορτίνη I (Urocortin I ή UCN I), η ουροκορτίνη II (Urocortin II ή UCN II) και η ουροκορτίνη III (Urocortin III ή UCN III). Τα συγκεκριμένα πεπτίδια προσδιορίστηκαν σε θηλαστικά αλλά και σε άλλα είδη όπως τα ψάρια και τα αμφίβια.¹²⁻¹⁷

Η ομολογία στις αλληλουχίες των αμινοξέων μεταξύ του CRF και των συγγενών του πεπτιδίων αναπαρίσταται στην παρακάτω **Σφάλμα! Το αρχείο προέλευσης της αναφοράς δεν βρέθηκε.2**).

Peptide	Sequence	Length	Identity (%)
hCRF	SEEPPISLDLTFHLLREVLEMARAEQLAQQAHSNRKLMEI I	41	100
oCRF	SQEPPISLDLTFHLLREVLEMTKADQLABQAHSNRKLDDIA	41	83
URO	NDDPPISIDLTFHLLRNMIEMARIENEREQAGLNRYLDEV	41	54
hUCN	DNPSLSIDLTFHLLRTLLELARTQSQRERAEQNRIIFDSV	40	43
SVG	ZGPPISIDLSLELLLRKMIEIEKQEKEKQQAANNRLLLDTI	40	48
hSRP	IVLSLDVPIGLLQILLEQARARAAREQATTNARILARV	38	34
mUCNII	VILSLDVPIGLLRILLEQARYKAARNQAATNAQILAHV	38	34
hSCP	FTLSLDVPTNIMNLLFNIAKAKNLRQAANAHLMAQI	38	32
mUCNIII	FTLSLDVPTNIMNLLFNIDKAKNLRKAAANAQLMAQI	38	26

Εικόνα 2: Απεικόνιση της ομολογίας των αμινοξέων μεταξύ του CRF και των συγγενών του πεπτιδίων. h/rCRF: human/rat CRF, oCRF: ovine CRF, hUcn: human Urocortin, Sauv: frog Sauvagin, mUcnII: mouse Urocortin II, mUcnIII: mouse Urocortin III.¹⁸

Τα πεπτιδία του CRF βρέθηκαν τόσο στο ΚΝΣ όσο και σε πολλά όργανα στην περιφέρεια. Στην Εικόνα 3 αναπαρίσταται η κατανομή των πεπτιδίων UcnI, UcnII, UcnIII σε περιοχές του εγκεφάλου σε πειράματα που έγιναν σε μύες.¹⁹



Εικόνα 3: Απεικόνιση της κατανομής των UcnI(πορτοκαλί), UcnII(μωβ), UcnIII(πράσινο) στον εγκεφαλο ποντικού.¹⁹

2.4.1 Σοβαγίνη (Sauvagine-SVG)

Το 1981 η σοβαγίνη (Sauvagine-SVG) απομονώθηκε από το δέρμα βατράχου, του είδους *Phyllomedusa sauvageii*. Στη συνέχεια έγινε χαρακτηρισμός της με τον προσδιορισμό της ακριβούς αλληλουχίας των αμινοξέων της.

Οι φαρμακολογικές δράσεις της SVG απαντώνται στη διούρηση, το καρδιαγγειακό σύστημα και στους ενδοκρινείς αδένες.¹³

Σε επόμενες μελέτες παρατηρήθηκε πως μπορεί να προκαλέσει την απελευθέρωση της κορτικοτροπίνης (ACTH) όπως και ο CRF. Μπορεί επίσης να προκαλέσει αύξηση των επιπέδων των κατεχολαμινών και της γλυκόζης.²⁰

2.4.2 Ουροτενσίνη (Urotensin-URO)

Το 1982 οι Lederis *et al.* απομόνωσαν την Ουροτενσίνη (Urotensin-URO) από την ουρόφυση ενός ψαριού του είδους *Catostomus commersonii*. Διαπιστώθηκε ότι το πεπτίδιο αυτό είναι ομόλογο με τον CRF προβάτου (oCRF) και τη SVG.¹²

Η ουροτενσίνη (Urotensin-URO) προκαλεί την απελευθέρωση της κορτικοτροπίνης (ACTH) όπως ο CRF. Στη συνέχεια βρέθηκε πως η ουροτενσίνη (Urotensin-URO) έχει την ικανότητα όπως και ο CRF να προκαλέσει διαστολή στη μεσεντέριο κυκλοφορία.²¹

2.4.3 Ουροκορτίνη I,II,III(UCN I,II,III)

Περίπου 10 χρόνια μετά την εύρεση της σοβαγίνης και της ουροτενσίνης το 1995, οι Vaughan *et al.* ανακάλυψαν και χαρακτήρισαν ένα πεπτίδιο με παρόμοιες ιδιότητες. Το πεπτίδιο αυτό ονομάστηκε ουροκορτίνη (Urocortin I/UCN I).

Η ουροκορτίνη (Urocortin I/UCN I) απομονώθηκε από τον πυρήνα Edinger-Westphal του ΚΝΣ επίμυος. Η αλληλουχία της εμφανίζει ομοιότητες στο 43-45% με αυτή του CRF, 53-63% με αυτή της ουροτενσίνης και 35% με αυτή της σοβαγίνης.¹⁴

Στη συνέχεια, 6 χρόνια μετά βρέθηκε ένα νέο πεπτίδιο παρόμοιο με την ουροκορτίνη I. Οι Reyes *et al.* απομόνωσαν το πεπτίδιο αυτό από επίμυ και το ονόμασαν ουροκορτίνη II (Urocortin II / UCN II).¹⁶

Την ίδια χρονιά σειρά είχε ο χαρακτηρισμός ακόμη ενός ομολόγου του CRF, της ουροκορτίνης III (Urocortin III -UCN III).¹⁵

2.4.4 Συνθετικά ανάλογα του CRF

Οι μελέτες της δομής και δράσης των ενδογενών συγγενών πεπτιδίων καθώς και του CRF, τα οποία είναι πεπτίδια 40-41 αμινοξέων, οδήγησαν στη σύνθεση νέων συνθετικών αναλόγων του CRF.

Τα συνθετικά ανάλογα του CRF δημιουργήθηκαν μετά από χημική τροποποίηση των CRF, ουροκουρτινών και της σοβαγίνης όπως και την απαλοιφή ορισμένων αμινοξέων τους.

Πιο συγκεκριμένα συνθετικά ανάλογα αποτελούν:

- το **oCRF(9-41)** το οποίο βρέθηκε ότι ανταγωνίζεται τη βιολογική δράση του CRF. Η σύνθεση του έγινε με την απαλοιφή των οχτώ πρώτων αμινοξέων από το άμινοτελικό άκρο του oCRF.²²
- το **α-ελικοειδούς-oCRF(9-41) ή ah-oCRF9-41**. Τροποποίηση του oCRF(9-41) με αντικατάσταση κάποιων αμινοξέων οδήγησε στη δημιουργία του α-ελικοειδούς-oCRF(9-41) ή ah-oCRF9-41. Τα αμινοξέα τα οποία προστέθηκαν με την αντικατάσταση βρέθηκε ότι σταθεροποιούν την α-ελικοειδή δομή του πεπτιδίου. Το πεπτίδιο αυτό δρα σαν ανταγωνιστής του CRF.²³
- το **[Nle21,38]h/rCRF(12-41)**. Η ανταγωνιστική ικανότητα αυξήθηκε περαιτέρω με τη δημιουργία του. Προέκυψε με την αντικατάσταση των αμινοξέων στις θέσεις 21 και 38 του h/rCRF με Nle.²³
- το **[D-Phe12, Nle21,38] h/rCRF(12-41)**. Αντικατάσταση στη θέση 12 του [Nle21,38]h/rCRF(12-41) με D-Phe οδήγησε στη δημιουργία του.²³
- Η **ασπρεσίνη**, η οποία αποτελεί ένα πολύ ισχυρό ανταγωνιστή που δημιουργήθηκε με τροποποιήσεις του [D-Phe12, Nle21,38] h/rCRF(12-41).²⁴
- το **[D-Phe11,His12]SVG(11-40)** προέκυψε με βάση τη δομή της σοβαγίνης το οποίο πήρε το όνομα αντισοβαγίνη-30 (antisauvagine-30).²⁵

Επίσης έχει γίνει σύνθεση αναλόγων όπως του NBI-27914 τα οποία έχουν μη πεπτιδική δομή. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η ανταλαρμίνη, η οποία είναι ισχυρός ανταγωνιστής του CRF.^{26,27}

2.5 Δομή του CRF και των συγγενών του πεπτιδίων

Ο CRF, η ουροτενσίνη και η σοβαγίνη διαθέτουν μία ενδιάμεσο περιοχή μήκους 25 αμινοξικών καταλοίπων που ενώνει στο καρβοξυτελικό (C-άκρο) με το άμινοτελικό άκρο (N-άκρο) των πεπτιδίων. Τα CRF πεπτίδια μπορούν να αποκτήσουν δομή α-έλικας στην ενδιάμεσο περιοχή. Οι υποθέσεις αυτές

επιβεβαιώθηκαν όταν μετά από την αντικατάσταση αμινοξέων, με άλλα τα οποία σταθεροποιούν το σχηματισμό της α-έλικας, η συγγένεια δέσμμευσης του CRF αυξήθηκε.²² Η δημιουργία της α-έλικας εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το περιβάλλον, σε υδρόφοβες συνθήκες όπως αυτές ευνοείται ο σχηματισμός της. Ο σχηματισμός της α-έλικας στα πεπτιδία παίζει σημαντικό ρόλο την εμφάνιση βιολογικής δράσης.²⁸ Οι θέσεις δέσμμευσης του CRF και των συγγενών του πεπτιδίων βρίσκεται στο λιπιδικό περιβάλλον της πλασματικής μεμβράνης του κυττάρου. Το περιβάλλον αυτό είναι υδρόφοβο και άρα υπό τις συνθήκες αυτές θα ευνοείται ο σχηματισμός της α-έλικας.

Έκτος από τη διαμόρφωση της α-έλικας η οποία είναι σημαντική για τη βιολογική δράση των πεπτιδίων, εξίσου σημαντικά είναι και τα αμινοξέα τα οποία βρίσκονται στα N-άκρο και C-άκρο των πεπτιδίων. Βρέθηκε ότι μετά την αφαίρεση των οκτώ πρώτων αμινοξέων από το N-άκρο του CRF αλλά και με την αφαίρεση των δύο τελευταίων αμινοξέων από το C-άκρο, υπήρξε κατάργηση της βιολογικής του δραστηριότητας.^{29,30}

2.6 Υποδοχείς του Εκλυτικού Παράγοντα της Κορτικοτροπίνης (CRFRs)

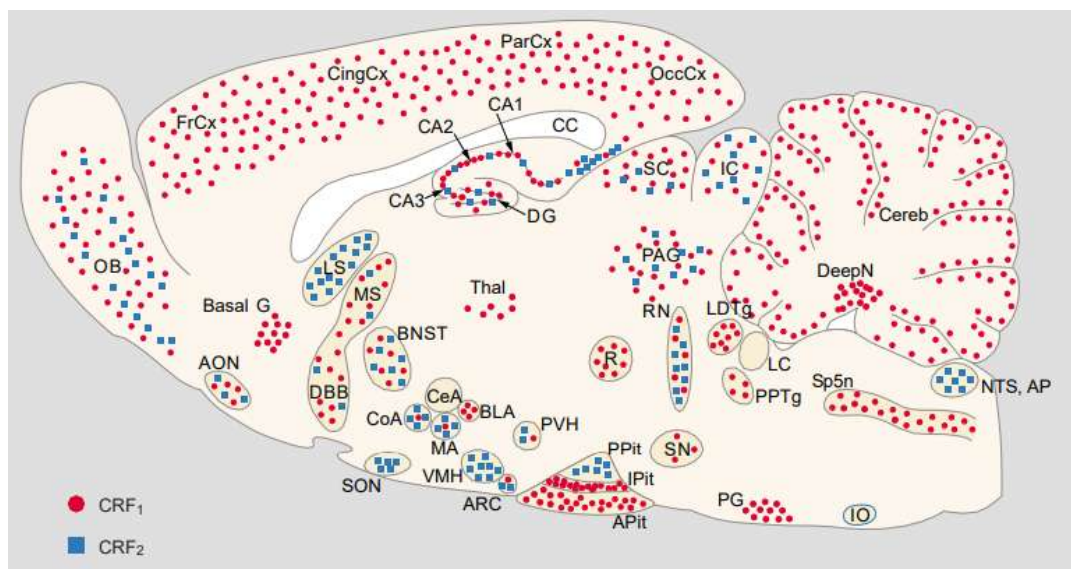
Το 1993 οι Chen *et al.* κλωνοποίησαν το cDNA προερχόμενο από μία βιβλιοθήκη με ανθρώπινα καρκινικά κοτρικοτροφικά κύτταρα. Το συγκεκριμένο cDNA κωδικοποιούσε μία πρωτεΐνη 415 αμινοξέων. Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη δέσμμευε τον CRF και ενεργοποιούσε την παραγωγή κυκλικού AMP (cAMP) μετά τη δέσμμευση της με CRF. Το γεγονός αυτό οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η πρωτεΐνη αυτή είναι ο υποδοχέας του CRF(CRF₁R).³¹

Επίσης έχει χαρακτηριστεί και ένας δεύτερος τύπος υποδοχέα του CRF, ο CRF₂R, ο οποίος έχει ομολογία με τον CRF₁R κατά 70% στην αλληλουχία των αμινοξέων τους.^{32,33}

Οι υποδοχείς του CRF 1 ή 2 οι οποίοι εντοπίζονται στον εγκέφαλο, την υπόφυση και το σπλήνα έχουν παρόμοια φαρμακολογική δράση. Παρατηρήθηκαν ορισμένες διαφορές όσον αφορά τη μοριακή μάζα του συμπλόκου υποδοχέα-CRF μεταξύ του εγκεφάλου (58.000 Da) και της υπόφυσης, της σπλήνας (75.000 Da), οι οποίες φαίνεται να οφείλονται σε διαφορετική γλυκοζυλίωση των πρωτεϊνών του υποδοχέα.³⁴

Ένα τρίτο είδος υποδοχέα (CRF₃R) έχει βρεθεί και βρίσκεται κυρίως στην ουρόφυση του γατόψαρου.³⁵

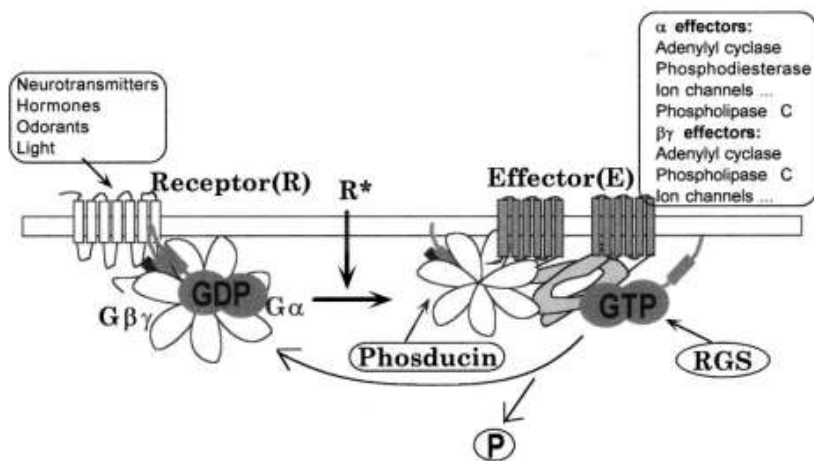
Η μεγάλη κατανομή των δύο υποδοχέων του CRF στο ΚΝΣ, αντανακλά τον καθοριστικό ρόλο του CRF και των συγγενών του πεπτιδίων στο σύστημα αυτό. Οι 2 υπότυποι του υποδοχέα του CRF βρίσκονται τόσο στο ΚΝΣ όσο και σε περιφερειακά όργανα.³⁶ Στην Εικόνα 4 φαίνεται η κατανομή των δύο υποδοχέων CRF₁R και CRF₂R στον εγκέφαλο μύων. Η διαφορετική κατανομή των δύο υποδοχέων στις περιοχές του εγκεφάλου βρέθηκε καθώς οι δύο υποδοχείς εμφανίζουν διαφορετική εκλεκτικότητα για τον CRF και τα συγγενή του πεπτίδια.¹⁹



Εικόνα 4: Απεικόνιση της κατανομής των δύο υποδοχέων CRF₁R (κόκκινοι κύκλοι) και CRF₂R (μπλε τετράγωνα) στον εγκέφαλο μύων.¹⁹

2.7 Υποδοχείς του CRF και Κυτταρική σηματοδότηση

Οι υποδοχείς του CRF αλληλεπιδρούν, μετά από σύνδεση τους με τα πεπτίδια αγωνιστές, με τις G-πρωτεΐνες και προκαλούν την ενεργοποίησή τους. Η ενεργοποίηση των G-πρωτεϊνών έχει σαν αποτέλεσμα την αλλαγή της διαμόρφωσής τους. Αρχικά το GDP απομακρύνεται από την α υπομονάδα και αντικαθίσταται από το μόριο του GTP. Άρα και το διαχωρισμό της Gα(GTP) υπομονάδας από το ετεροδιμερές Gβγ.(Εικόνα 5).



Εικόνα 5: Απεικόνιση της διαμόρφωσης της G- πρωτεΐνης που είναι συνδεδεμένη με κάποιον υποδοχέα μετά την ενεργοποίηση της. Όπου R* είναι η ενεργοποιημένη μορφή του υποδοχέα.³⁷

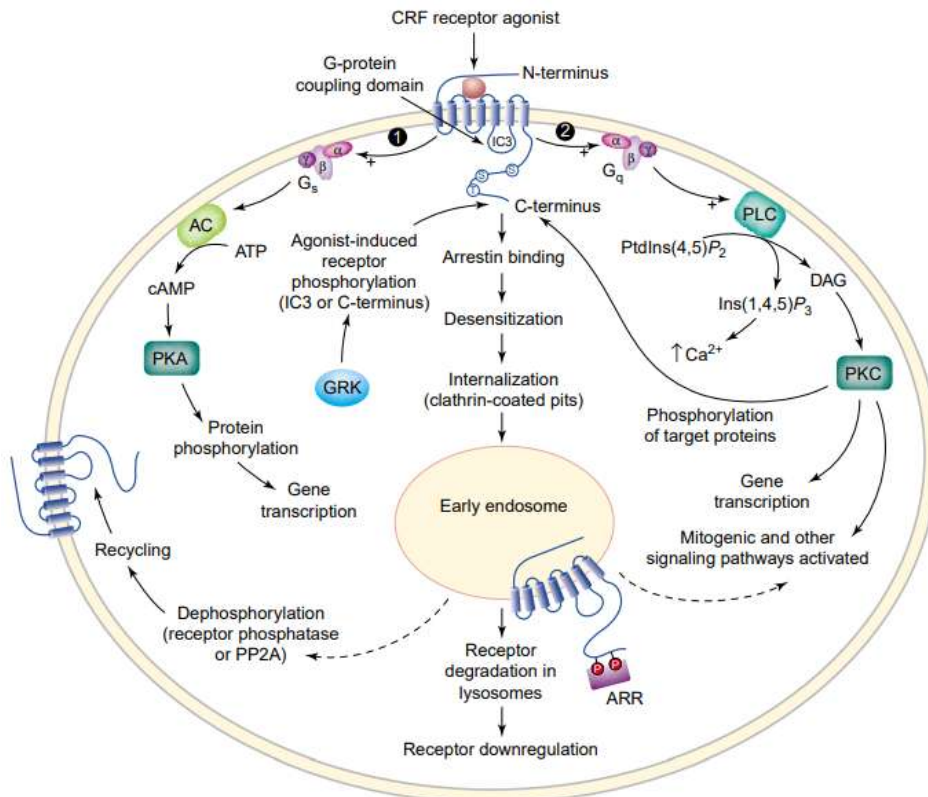
Πίνακας 1 : Είδος G-πρωτεϊνών, η σηματοδοτική της οδός και τα παραγόμενα μόρια.

G-πρωτεΐνη	Σηματοδοτική οδός	Επαγόμενες απαντήσεις
G _s	Αύξηση σύνθεσης cAMP	Παραγωγή κορτικοτροπίνης
G _i	Αναστέλλει την παραγωγή cAMP	Παραγωγή ακετυλοχολίνης και πολλών άλλων νευροδιαβιβαστών
G _q	Αυξάνει την IP ₃ και το ενδοκυτταρικό ασβέστιο	Παραγωγή ακετυλοχολίνης και πολλών άλλων νευροδιαβιβαστών

Οι υποδοχείς του CRF μπορούν να αλληλεπιδράσουν με διαφορετικές G-πρωτεΐνες και ιδιαίτερα με τις G_s-πρωτεΐνες οι οποίες διεγείρουν το ένζυμο της αδενυλικής κυκλάσης (AC) και έπειτα την αύξηση της σύνθεσης 3',5'-κυκλικής μονοφωσφορικής αδενοσίνης (cAMP) από ATP. Αυξημένη συγκέντρωση cAMP έχει σαν αποτέλεσμα μετέπειτα κυτταρικές διεργασίες, όπως είναι η ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης A (PKA) η οποία στη συνέχεια φωσφορυλιώνει διάφορους ενδοκυττάριους στόχους.³⁸

Έκτος από τις G_s-πρωτεΐνες οι υποδοχείς του CRF έχουν την ικανότητα επίσης να αλληλεπιδράσουν με τις G_q-πρωτεΐνες οι οποίες ενεργοποιούν τη φωσφολιπάση C (PLC). Η ενεργοποιημένη PLC υδρολύει τη 4,5 διφωσφορική φωσφατιδυλινοσιτόλη σε διακυλογλυκερόλη (DAG) και 1,4,5

τριφωσφοροϊνοσιτόλη (IP3). Η IP3 συνδέεται με υποδοχείς ασβεστίου και προκαλεί την απελευθέρωσή του άρα και την αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσής του. Τόσο το παραγόμενο ασβέστιο όσο και η DAG προκαλούν την ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC), η οποία στη συνέχεια φωσφορυλιώνει διάφορους ενδοκυττάριους στόχους.³⁹



Εικόνα 6: Τα δύο διαφορετικά σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται ανάλογα με το είδος της G-πρωτεΐνης (Gs ή Gq) με την οποία αλληλεπιδρά ο υποδοχέας του CRF.¹⁸

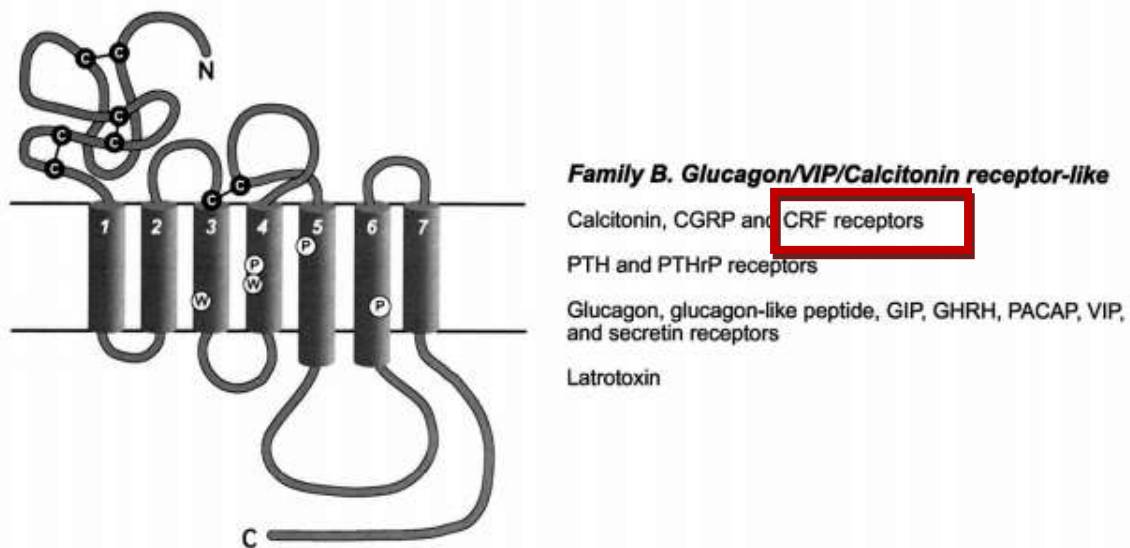
Υπάρχει η πεποίθηση ότι ο ίδιος υποδοχέας σε διαφορετικούς ιστούς δημιουργεί σύνδεση με διαφορετικές G-πρωτεΐνες ακολουθώντας έτσι διαφορετικά σηματοδοτικά μονοπάτια.³⁹

Συμπερασματικά, τόσο ο CRF όσο και τα συγγενή του πεπτιδία έχουν τη δυνατότητα να προκαλέσουν διαφορετικό είδος βιολογικής απόκρισης. Αυτό εξαρτάται από το είδος της G-πρωτεΐνης με την οποία αλληλεπιδρούν, το είδος του υποδοχέα καθώς και με τον ιστό στον οποίο βρίσκονται.

2.7.1 Δομή και λειτουργία των υποδοχέων του εκλυτικού παράγοντα της κορτικοτροπίνης.

Ο εκλυτικός παράγοντας της κορτικοτροπίνης δεσμεύεται ειδικά σε γλυκοπρωτεΐνες που βρίσκονται στην πλασματική μεμβράνη των κυττάρων και συνδέονται με G-πρωτεΐνες.⁴⁰

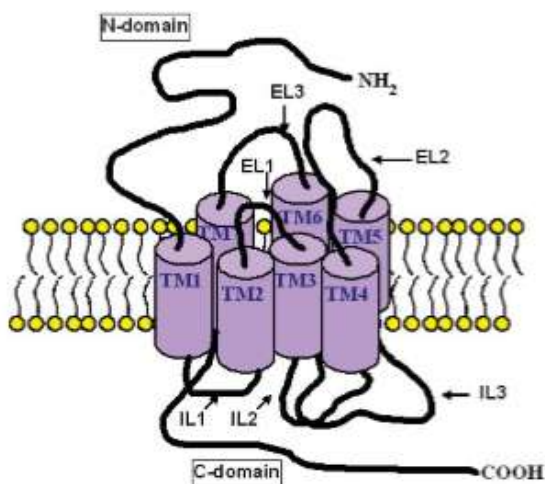
Οι υποδοχείς του CRF συμπεριλαμβάνονται στην οικογένεια B των υποδοχέων οι οποίοι είναι συζευγμένοι με G-πρωτεΐνες (GPCRs). Διαθέτουν επτά διαμεμβρανικές περιοχές (TM), μια εξωκυττάρια αμινοτελική περιοχή (N-περιοχή) και μια ενδοκυττάρια καρβοξυτελική περιοχή (C-περιοχή). Οι διαμεμβρανικές περιοχές αυτές ενώνονται μεταξύ τους με τρεις εξωκυττάριους (ELs) και τρεις ενδοκυττάριους (ILs) βρόγχους. Η αμινοτελική περιοχή βρίσκεται εξωκυττάρια, ενώ η καρβοξυτελική περιοχή βρίσκεται στο εσωτερικό του κυττάρου (Εικόνα 7). Αξιοσημείωτο χαρακτηριστικό των συγκεκριμένων υποδοχέων αποτελεί η αμινοτελική περιοχή καθώς διαθέτει μεγάλο μήκος που περιέχει κυστεΐνες που ενώνονται μεταξύ τους με δισουλφιδικούς δεσμούς, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 7 καθώς παίζουν σημαντικό ρόλο της εν λόγω περιοχής⁴¹



Εικόνα 7: Οικογένεια B των υποδοχέων που συνδέονται με G- πρωτεΐνες, στην οποία ανήκουν και οι υποδοχείς του CRF. Διακρίνονται οι 7 διαμεμβρανικές περιοχές, οι 3 εξωκυττάριοι και οι 3 ενδοκυττάριοι βρόγχοι καθώς και οι δισουλφιδικοί δεσμοί που σχηματίζονται στην αμινοτελική περιοχή.⁴¹

Έχει βρεθεί ότι οι εξωκυττάρια περιοχές των υποδοχέων του CRF αλληλεπιδρούν με τα πεπτίδια, ενώ οι ενδοκυττάρια με τις G-πρωτεΐνες. Με τη

δέσμευση των πεπτιδίων-αγωνιστών στην εξωκυττάρια περιοχή του υποδοχέα δημιουργούνται αλλαγές στη διαμόρφωση του άρα και την ενεργοποίησή του. Οι αλλαγές αυτές μέσω των διαμεμβρανικών περιοχών μεταφέρονται στις ενδοκυττάρια περιοχές του υποδοχέα με αποτέλεσμα την αλληλεπίδραση τους με τις G- πρωτεΐνες και την ενεργοποίηση των τελευταίων.³⁶



Εικόνα 8: Αναπαράσταση της σύνδεσης του υποδοχέα του CRF με τη G- πρωτεΐνη. Όπου EL: εξωκυττάρια περιοχή, IL: ενδοκυττάρια και TM: διαμεμβρανική περιοχή.

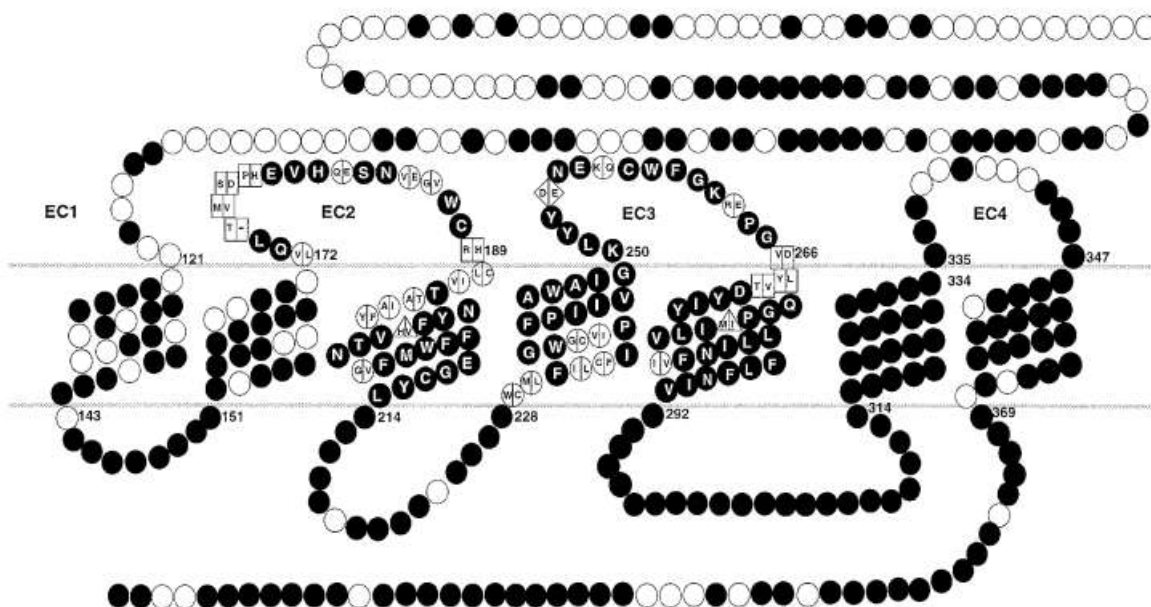
Σε μελέτη των Hoare *et al.* το 2003 βρέθηκε ότι η αμινοτελική εξωκυττάρια περιοχή του CRF₁R δεσμεύει το C-άκρο των πεπτιδίων της οικογένειας του CRF, ενώ το N-άκρο των πεπτιδίων αλληλεπιδρά με τη J-περιοχή που αποτελείται από τους εξωκυττάριους βρόγχους και τα εξωκυττάρια άκρα των διαμεμβρανικών περιοχών του υποδοχέα.⁴²

Από τις εξωκυττάρια περιοχές του CRF₁R ο δεύτερος εξωκυττάριος βρόγχος παίζει ρόλο στη δέσμευση των πεπτιδίων και συγκεκριμένα στα αμινοξέα του Trp259 και Phe26. Μετά από μεταλλάξεις των αμινοξέων αυτών η δέσμευση του CRF και της σοβαγίνης μειώθηκε σημαντικά, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι τα εν λόγω αμινοξέα παίζουν ρόλο στη δέσμευση των πεπτιδίων.⁴³

2.7.2 Δομικές και λειτουργικές διαφορές των υποτύπων του υποδοχέα του εκλυτικού παράγοντα της κορτικοτροπίνης (CRF₁R και CRF₂R).

Ο CRF₂R έχει κοινή αλληλουχία αμινοξέων με τον CRF₁R σε ποσοστό περίπου 70%. Οι ενδοκυττάρια περιοχές των δύο υποδοχέων είναι αυτές που εμφανίζουν τη μεγαλύτερη ομολογία, σε ποσοστό περίπου 90%. Οι

διαμεμβρανικές περιοχές εμφανίζουν ομολογία κατά περίπου 85%, ενώ οι περιοχές στο εξωτερικό μέρος καθώς και η εξωκυττάρια άμινοτελική περιοχή εμφανίζει ομολογία σε βαθμό περίπου 60% (Εικόνα 9).⁴⁴



Εικόνα 9: Αναπαράσταση της αλληλουχίας αμινοξέων των δύο υποδοχέων CRF₁R και CRF₂R. Τα αμινοξέα αναπαρίστανται από τη δεύτερη εξωκυττάρια περιοχή (EC2) έως την πέμπτη διαμεμβρανική περιοχή (TM5). Τα κοινά αμινοξέα και για τους δύο υποδοχείς αναπαρίστανται με μαύρους κύκλους, τα μη κοινά χωρίζονται στη μέση όπου αριστερά είναι το αμινοξύ που αντιστοιχεί στον CRF₁R και δεξιά αυτό που αντιστοιχεί στον CRF₂R. Οι περιοχές που είναι σημαντικές για τη δέσμευση και των τριών πεπτιδίων CRF, σοβαγίνη, ουροκορτίνη αναπαρίστανται με τετράγωνα. Η αρίθμηση είναι αυτή που αντιστοιχεί στον CRF₁R.²⁷

Σε αντίθεση με την ομολογία των δύο υποδοχέων, αυτοί παρουσιάζουν αρκετές διαφορές όσον αφορά τη συγγένειά τους με το πεπτίδιο του CRF (ανθρώπου/επιμύος). Όπως φαίνεται και στην εικόνα 10 οι δύο τύποι του υποδοχέα του CRF εμφανίζουν διαφορετική συγγένεια δέσμευσης ανάμεσα στον CRF και τα συγγενή του πεπτίδια.³⁶

Ligand	K _{is} (nM)	
	CRF _{1a}	CRF _{2a}
h/rCRF	1.9 ^b	30.7 ^a
oCRF	1.2 ^b	184.6 ^a
URO	0.4 ^b	2.2 ^a
SVG	0.7 ^b	4.3 ^a
α-helical CRF (9-41)	23.7 ^b	96.2 ^a
Astressin	15.4 ^b	1.5 ^b
Rat UCN	0.3 ^b	0.3 ^b
Human UCN	0.4 ^b	0.3 ^b
Human UcnII	>100 ^c	1.7 ^c
Mouse UcnII	>100 ^c	2.1 ^c
Human UcnIII	>100 ^c	21.7 ^c
Mouse UcnIII	>100 ^c	5 ^c

Εικόνα 10: Συγγένεια δέσμευσης πεπτιδίων για τους CRF υποδοχείς.³⁶

Έχουν εντοπιστεί τρεις δυνητικές περιοχές στις οποίες οφείλονται οι φαρμακολογικές διαφορές ανάμεσα στους δύο υπότυπους του υποδοχέα του CRF. Συγκεκριμένα στη δεύτερη και τρίτη εξωκυττάρια περιοχή. Αντικατάσταση των περιοχών αυτών του CRF_{1R} από τα αντίστοιχα αμινοξέα του CRF_{2R} επηρέασε τη συγγένεια της σοβαγίνης και της ουροκορτίνης. Επίσης μία τέταρτη περιοχή που βρίσκεται στην τρίτη εξωκυττάρια περιοχή, συγκεκριμένα εκεί όπου βρίσκεται το αμινοξύ ασπαραγινικό οξύ(Asp) στη θέση 254(Asp254) στον CRF_{1R} που στον CRF_{2R} είναι Γλυκίνη(Glu), επηρεάζει τη λειτουργία του υποδοχέα. Η μετάλλαξη επηρέασε τη δέσμευση της σοβαγίνης αλλά όχι τόσο της ουροκορτίνης και του CRF.²⁷

Τα πεπτίδια CRF, ουροκορτίνη και σοβαγίνη είτε αλληλεπιδρούν σε διαφορετικές περιοχές των δύο υποδοχέων είτε αλληλεπιδρούν στις ίδιες περιοχές με διαφορετικά όμως αποτελέσματα.

2.7.3 Δέσμευση μη πεπτιδικών ανταγωνιστών στους δύο υποδοχείς του CRF

Φαρμακολογικές μελέτες του τύπου 1 υποδοχέα του εκλυτικού παράγοντα της κορτικοτροπίνης (CRF_{1R}) έδειξαν ότι οι υπάρχοντες μη πεπτιδικοί ανταγωνιστές εμφανίζουν υψηλό βαθμό συγγένειας για τον τύπο 1 υποδοχέα, ενώ δεν δεσμεύονται καθόλου στο CRF_{2R}.³⁶

Οι μη πεπτιδικοί ανταγωνιστές βρέθηκε ότι αλληλεπιδρούν με τις διαμεμβρανικές περιοχές του CRF₁R όπου και ανταγωνίζονται αλλοστερικά τη δέσμευση των αγωνιστών και την ενεργοποίηση του υποδοχέα. Πρόσφατη κρυσταλλογραφική μελέτη έδειξε ότι τα αμινοξέα του CRF₁R που δεσμεύουν τον αλλοστερικό μη πεπτιδικό ανταγωνιστή CP-376395 είναι 14 συμπεριλαμβανομένων των Phe203 στη τρίτη διαμεμβρανική περιοχή (TM3) και Leu323, και Tyr327 στην έκτη διαμεμβρανική περιοχή (TM6).⁴⁵

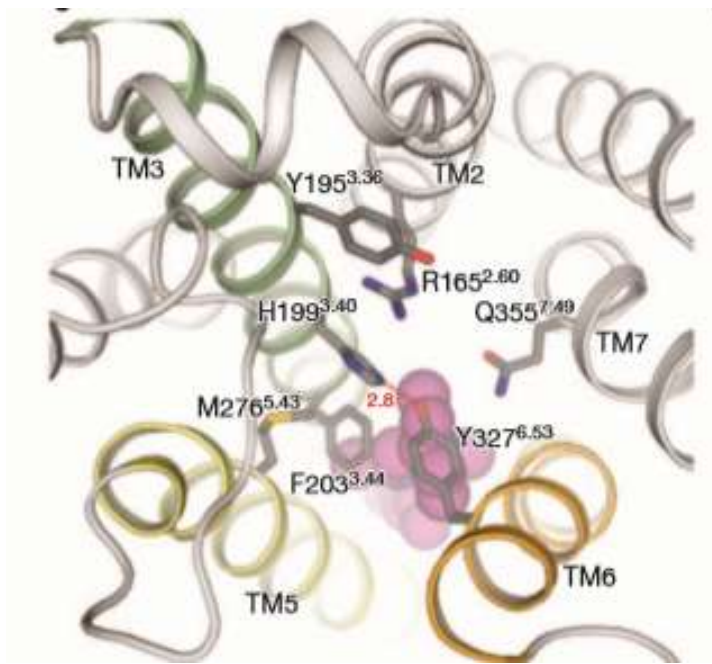
Με τα αμινοξέα αυτά δεσμεύεται και ο άλλος μη πεπτιδικός ανταγωνιστής ανταλαρμίνη.⁴⁶

Αξιοπερίεργο αποτελεί το γεγονός ότι όλα τα αμινοξέα του CRF₁R που δεσμεύουν τους μη πεπτιδικούς ανταγωνιστές διατηρούνται στον CRF₂R. Προσπάθειες να βρεθούν τα αμινοξέα που παίζουν ρόλο στην εκλεκτικότητα της δέσμευσης των ανταγωνιστών αυτών στον CRF₁R σε σχέση με τον CRF₂R έγινε πριν μερικά χρόνια. Συγκεκριμένα βρέθηκε ότι δύο αμινοξέα που διαφέρουν στον CRF₁R και CRF₂R μπορεί να ευθύνονται για την εκλεκτικότητα δέσμευσης των μη πεπτιδικών ανταγωνιστών στο CRF₁R σε σχέση με τον CRF₂R. Τα αμινοξέα αυτά είναι η Ιστιδίνη (His199) στην TM3 του CRF₁R που είναι βαλίνη στον CRF₂R και η Μεθειονίνη (Met276) στην TM5 του CRF₁R που είναι ισολευκίνη στον CRF₂R. Αντικατάσταση των αμινοξέων αυτών με τα αντίστοιχα του CRF₂R μείωσε σημαντικά τη συγγένεια δέσμευσης των μη πεπτιδικών ανταγωνιστών για τον CRF₁R.²⁷

Στην Εικόνα 11 φαίνεται η θέση των δύο αυτών αμινοξέων στον CRF₁R καθώς και η αλληλεπίδρασή τους τόσο με τον μη πεπτιδικό ανταγωνιστή CP-376395 όσο και με τη φαινυλανανίνη που βρίσκεται στη θέση 203 (phe203 ή F203).

Σε μεταγενέστερη μελέτη διαπιστώθηκε ότι οι αλλαγές αυτές στη συγγένεια δέσμευσης δεν οφειλόταν στο γεγονός ότι οι μεταλλάξεις αυτές παρεμπόδιζαν δεσμούς αλληλεπίδρασης μεταξύ των αμινοξέων του CRF₁R στις θέσεις 199 και 276 με τους μη πεπτιδικούς ανταγωνιστές αλλά μάλλον στο ότι προκάλεσαν δομικές αλλαγές που επηρέασαν τη συγγένεια δέσμευσης των ανταγωνιστών αυτών.⁴⁷

Από τα αμινοξέα αυτά βρέθηκε ότι η Met276 του CRF₁R παίζει έμμεσο ρόλο στη δέσμευση των μη πεπτιδικών ανταγωνιστών όπως προτάθηκε και σε μεταγενέστερη μελέτη.⁴⁵ Συγκεκριμένα μετάλλαξη της Met276 σε αλανίνη δεν επηρέασε τη δέσμευση του μη πεπτιδικού ανταγωνιστή NBI-27914 στον CRF₁R.⁴⁷



Εικόνα 11: Αναπαράσταση της αλληλεπίδρασης του μη πεπτιδικού ανταγωνιστή CP-376395 με τις διαμεμβρανικές περιοχές του υποδοχέα(TMs). Φαίνεται ότι τα αμινοξέα H199 και M276 αλληλεπιδρούν με τον ανταγωνιστή CP-376395. Αλληλεπιδρούν όμως και με την F203 η οποία αλληλεπιδρά άμεσα με τον μη πεπτιδικό ανταγωνιστή.

Ο έμμεσος ρόλος της Met276 όπως και της His199 στη δέσμευση των μη πεπτιδικών ανταγωνιστών στον CRF₁R προτάθηκε και σε μια κρυσταλλική μελέτη του υποδοχέα αυτού. Συγκεκριμένα στη μελέτη αυτή προτάθηκε ότι τα Met276 και His199 παίζουν έμμεσο ρόλο στη λειτουργία του CRF₁R σταθεροποιώντας αμινοξέα όπως τη Phe203 και Tyr327 που δεσμεύουν τους μικρομοριακούς ανταγωνιστές. Επιπρόσθετα θα μπορούσαν έμμεσα να επηρεάσουν τη δέσμευση των ανταγωνιστών αυτών ελέγχοντας τη προσβασιμότητα τους στη θέση δέσμευσης τους.⁴⁵

3 Σκοπός

Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι οι υπάρχοντες μη πεπτιδικοί ανταγωνιστές του CRF δεσμεύονται εκλεκτικά στον CRF₁R. Πρόσφατα, βρέθηκε ότι οι CRF₁R -εκλεκτικοί μη πεπτιδικοί ανταγωνιστές του CRF αλληλεπιδρούν με αμινοξέα των διαμεμβρανικών περιοχών του υποδοχέα όπου και ανταγωνίζονται αλλοστερικά τη δέσμευση των αγωνιστών και την ενεργοποίηση του υποδοχέα.

Αξιοπερίεργο αποτελεί το γεγονός ότι όλα τα αμινοξέα του CRF₁R που δεσμεύουν τους μη πεπτιδικούς ανταγωνιστές διατηρούνται στον CRF₂R. Σε πρόσφατη μελέτη της κρυσταλλικής δομής του CRF₁R προτάθηκε ότι τα αμινοξέα His199 και Met276 του CRF₁R που στον CRF₂R είναι βαλίνη (Val195) και ισολευκίνη (Ile272) πιθανόν παίζουν έμμεσο ρόλο στην εκλεκτικότητα δέσμευσης των μη πεπτιδικών ανταγωνιστών. Πειραματικά αυτό αποδείχθηκε σε 2 προηγούμενες φαρμακολογικές μελέτες στις οποίες έγινε αντικατάσταση των αμινοξέων του CRF₁R από εκείνα του CRF₂R και μελετήθηκε η επίπτωση των μεταλλάξεων αυτών στη δέσμευση των μη πεπτιδικών ανταγωνιστών στον CRF₁R. Παρόλα αυτά δεν έχει ακόμα επιτευχθεί το αντίστροφο.

Σκοπός της εργασίας αυτής είναι η αντικατάσταση της (Ile272 του CRF₂R από το αντίστοιχο Met276 του CRF₁R) και η μελέτη των φαρμακολογικών ιδιοτήτων του μεταλλαγμένου CRF₂R συμπεριλαμβανομένων και εκείνων που αφορούν τη δέσμευση των CRF₁R-εκλεκτικών μη πεπτιδικών ανταγωνιστών στον μεταλλαγμένο CRF₂R.

4 Υλικά και Μέθοδοι

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

Με τη διαδικασία της μεταλλαξιγένεσης κατευθυνόμενης θέσης με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματοποιείται η εισαγωγή μεταλλάξεων σε DNA – εκμαγείο. Η διαδικασία ολοκληρώνεται σε δύο στάδια όπου αρχικά δημιουργούνται 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, γεγονός που χρησιμοποιείται αργότερα για την πρώτη εξακρίβωση της ύπαρξης της μετάλλαξης στο τελικό προϊόν.

4.1.1 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 MgSO₄ 10x (Fermentas, USA)
- Εκκινητές (Primers) (VBC-GENOMICS BIOSCIENCE Research GmbH, Austria)
- DNA εκμαγεία : hCRF₂R/rcin4 (γονίδιο του hCRF₂R στο πλασμίδιο rcin4) και προϊόντα των PCR-1a, PCR-1b και PCR-2
- Αυτόματος Θερμικός Κυκλοποιητής PCR (Perkin Elmer PCR System 2400, USA)

- Συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA)

4.1.2 Μέθοδος

Αρχικά γίνεται η δημιουργία δύο τμημάτων DNA με τη χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης και των εκκινητών που αναφέρονται στη συνέχεια. Τα τμήματα τα οποία δημιουργήθηκαν ονομάστηκαν PCR-1a και PCR-1b τα οποία στη συνέχεια θα ενωθούν δημιουργώντας το τμήμα DNA με την επιθυμητή μετάλλαξη(PCR2).

PCR-1a: χρησιμοποιούνται οι εξής εκκινητές: antisense μετάλλαξης και sense γονιδίου

PCR-1b : χρησιμοποιούνται οι εξής εκκινητές: sense μετάλλαξης και antisense γονιδίου

Αλληλουχία εκκινητών μετάλλαξης γονιδίου:

- S-I272M: 5'-**CCAAGGTC**CCATGATTCTCGTG-3'
θέση υβριδισμού: 1745 bp στο CRF₂R-WT-pCIN4
- A-I272M: 5'- **CACGAGAAT**CATGGGACCTTGG-3'
θέση υβριδισμού: 1745 bp στο CRF₂R-WT-pCIN4

Αλληλουχία εκκινητών άκρων γονιδίου:

- A-PAN4 : 5'- GCAGACAGCGAATTAATTCAGC-3'
θέση υβριδισμού: 2208-2230 bp στο CRF₂R-WT-pCIN4
- MV10 : 5'-GGCGTGACGGTGGGAGG-3'
θέση υβριδισμού: 784-801 bp στο CRF₂R-WT-pCIN4

Για να γίνει η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (τόσο για το προϊόν PCR-1a όσο και για το προϊόν PCR-1b) τοποθετήθηκαν σε δοχεία αντίδρασης (PCR tubes) 1.5 μl από τον κάθε εκκινητή σε κάθε δοχείο αντίδρασης ο ένας στον πυθμένα και ο δεύτερος στα τοιχώματα (για να αποφευχθεί ο υβριδισμός των εκκινητών).

Έπειτα ακολουθεί η παρασκευή μείγματος A το οποίο περιέχει νερό, dNTPs, ρυθμιστικό διάλυμα Pfu, ιόντα μαγνησίου και DNA – εκμαγείο. Στη συνέχεια προσθέτονται σε κάθε PCR tube 42μl από το μείγμα A, ώστε ο τελικός όγκος του

διαλύματος να είναι 45μl (για τα υπόλοιπα 4 μl :1.5 μl από τον κάθε εκκινητή και 1 μl DNA-εκμαγείο).

Τέλος παρασκευάζεται διάλυμα μείγμα Β όγκου 5 μl/αντίδραση το οποίο περιέχει Pfu πολυμεράση, ρυθμιστικό διάλυμα Pfu, ιόντα μαγνησίου και νερό. Όλη η διαδικασία γίνεται στον πάγο.

Στους παρακάτω πίνακες αναγράφονται ακριβώς οι ποσότητες και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των: μείγμα Α, pcr tube για PCR-1a/1b και μείγμα Β.

Πίνακας 1: Συστατικά και ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των pcr tubes για τις αντιδράσεις PCR1a/1b, του μείγματος Α και Β αντίστοιχα.

Αντίδραση PCR		Μείγμα Α		Μείγμα Β	
Συστατικά	Όγκος/αντίδραση (μL)	Συστατικά	Όγκος/αντίδραση(μL)	Συστατικά	Όγκος/αντίδραση(μL)
DNA-εκμαγείο	100ng / αντίδραση	DNA-εκμαγείο	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 ²⁺ 10x	0.5
Mg ²⁺ 10x	4.5	Mg ²⁺ 10x	4.5	H ₂ O	3.5
H ₂ O	(μέχρι τελικού όγκου)	H ₂ O	(μέχρι τελικού όγκου)	Τελικός όγκος	5
Εκκινητές	1.5	Τελικός όγκος	42		
	1.5				
Τελικός όγκος	45				

Τα pcr Tubes για τις PCR-1a/1b τοποθετήθηκαν στο μηχάνημα θερμικού κυκλοποιητή όπου και πραγματοποιήθηκε η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης υπό τις εξής συνθήκες:

Οι αντιδράσεις επωάζονται για δύο λεπτά (2') στους 99.9 °C (κύκλος 1α). Στη συνέχεια η θερμοκρασία του διαλύματος κατεβαίνει στους 97 °C για δύο λεπτά (2') (κύκλος 1β) και γίνεται η προσθήκη του μείγματος Β, ώστε ο τελικός όγκος της αντίδρασης να είναι 50μL. Οι αντιδράσεις παραμένουν στους 97 °C για άλλα 30 δευτερόλεπτα (30'') (κύκλος 2α) και στη συνέχεια ψύχονται στους 55 °C όπου παραμένουν για 2 λεπτά (2') (κύκλος 2β). Ακολούθως η θερμοκρασία αυξάνεται στους 72 °C, όπου και παραμένει για έξι λεπτά (6') (κύκλος 2γ). Όλος ο κύκλος 2 (α, β και γ) επαναλαμβάνεται τριάντα πέντε (35) φορές μετά το πέρας των οποίων η θερμοκρασία παραμένει στους 72 °C για ακόμα δέκα λεπτά (10') (κύκλος 3). Τέλος οι αντιδράσεις ψύχονται στους 4 °C.

Μετά το τέλος της αντίδρασης τα προϊόντα αυτής διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης (παράγραφος.4.2), απομονώθηκαν και καθαρίστηκαν ώστε να χρησιμοποιηθούν για τη δημιουργία του PCR-2.

Μετά τον καθαρισμό των PCR-1a και PCR-1b, πραγματοποιείται εκ νέου αντίδραση PCR (PCR-2), με τη διαφορά ότι ως DNA – εκμαγείο χρησιμοποιείται μέρος των προϊόντων των PCR-1a και PCR-1b καθώς και οι δύο εκκινητές (A-PAN4 και MV10) του γονιδίου. Οι συνθήκες (κύκλοι) της PCR-2 και το μείγμα Β παραμένουν τα ίδια με τις PCR-1a και PCR-1b.

Αρχικά τοποθετούνται 5μL από το κάθε προϊόν των PCR-1a και PCR-1b στο δοχείο της αντίδρασης, ενώ σε κάθε ένα pcr tube προστίθενται 35μL από το μείγμα Α της PCR-2.

Στους παρακάτω πίνακες φαίνονται αναλυτικά οι ποσότητες και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για το PCR-2 και το μείγμα Β.

Πίνακας 2: Συστατικά και ποσότητες για την Παρασκευή του pcr tube για την αντίδραση της PCR-2 καθώς και του μείγματος Α.

Αντίδραση PCR		Μείγμα Α	
Συστατικά		Όγκος/αντίδραση (μL)	Όγκος/αντίδραση (μL)
DNA	προϊόν PCR-1a	5	Ρυθμιστικό διάλυμα Pfu 10x
	προϊόν PCR-1b	5	dNTPs (2,5mM)
Ρυθμιστικό διάλυμα Pfu 10x		4.5	Mg ²⁺ 10x
dNTPs(2,5mM)		4	Εκκινητές
Mg ²⁺ 10x		4.5	
H ₂ O		19	H ₂ O
Εκκινητές		1.5	Τελικός όγκος
		1.5	
Τελικός όγκος		45	

Πίνακας 3: Συστατικά και αντιδραστήρια για την παρασκευή του μείγματος Β της αντίδρασης PCR-2.

Μείγμα Β	
Συστατικά	Όγκος/αντίδραση (μL)
Pfu πολυμεράση	0.5
Ρυθμιστικό διάλυμα Pfu 10x	0.5
Mg ²⁺ 10x	0.5
H ₂ O	3.5
Τελικός όγκος	5

4.2 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης – απομόνωση και καθαρισμός επιθυμητών τμημάτων DNA

4.2.1 Υλικά-Συσκευές

- Διάλυμα TAE 50X (242 g Tris base, 57,1 ml οξικό οξύ 37,2 Na₂EDTA·2H₂O σε H₂O).
- Αγαρόζη (Invitrogen, USA).
- Βρωμιούχο αιθίδιο, C₂₁H₂₀BrN₃ (Fluka, Switzerland).
- Χρωστική, 6X Gel Loading Dye (Fermentas, USA)
- Συσκευή οριζόντιας ηλεκτοφόρησης Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA)
- kit Nucleospin Gel and PCR cleanup της Macherey-Nagel (Germany)

4.2.2 Μέθοδος

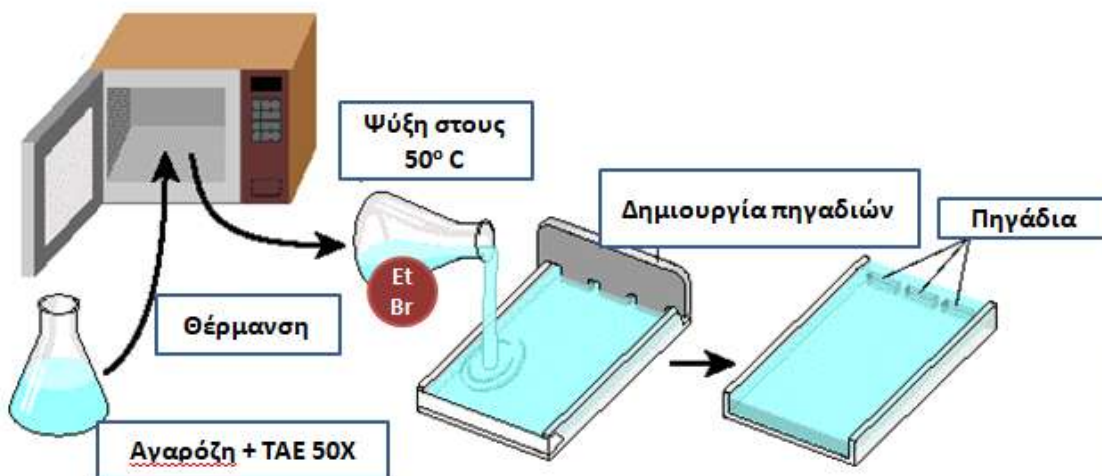
Με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης γίνεται διαχωρισμός των μορίων DNA με βάση το μοριακό τους βάρος. Τα μικρότερου μοριακού βάρους DNA κινούνται γρηγορότερα σε σχέση με τα μεγαλύτερου μοριακού βάρους, άρα μπορούν και να διανύσουν μεγαλύτερη απόσταση μέσα στο πήκτωμα σε σχέση με τα μεγαλύτερα.

Για την προετοιμασία πηκτώματος αγαρόζης περιεκτικότητας 1%, έγινε διάλυση 1.3 gr αγαρόζης σε 130 ml διαλύματος TAE 50X αραιωμένο σε αναλογία 1/50, με θέρμανση υπό συνεχή ανάδευση σε φούρνο μικροκυμάτων για λίγα λεπτά. Το διάλυμα ψύχθηκε μέχρι τους 50°C και προστέθηκαν σε αυτό 5 ml βρωμιούχου αιθιδίου (10 mg/ml). Το βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr) χρησιμεύει για τη σήμανση του DNA που ηλεκτροφορήθηκε στο πήκτωμα αγαρόζης όταν αυτό είχε εκτεθεί σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV), καθώς το EtBr προσδένεται παρεμβαλλόμενο στις 2 αλυσίδες του DNA δημιουργώντας με αυτόν τον τρόπο το φθορίζον σύμπλοκο EtBr/DNA.

Το διάλυμα αγαρόζης τοποθετήθηκε στο δισκίο της συσκευής ηλεκτροφόρησης και αφέθηκε να πήξει, ενώ δημιουργήθηκαν εσοχές (πηγάδια) με τη βοήθεια ειδικού κτενίου. Μετά την πήξη του πηκτώματος αυτό τοποθετήθηκε στη συσκευή ηλεκτροφόρησης στην οποία υπήρχε ρυθμιστικό διάλυμα TAE 50X, αραιώσης 1/50. Ταυτόχρονα στα διαλύματα που περιείχαν τα δείγματα DNA και προϊόντα των αντιδράσεων PCR ή ήταν προϊόντα πέψης, προστέθηκε κατάλληλος όγκος 6X ρυθμιστικού διαλύματος (loading dye, 40% γλυκερόλη,

0,25% Bromophenol Blue, 0,25% Xylene Cyanol FF). Στη συνέχεια τα δείγματα DNA τοποθετήθηκαν στα πηγάδια του πηκτώματος και ηλεκτροφορήθηκαν κάτω από ηλεκτρική τάση 110 V για 40 περίπου λεπτά. Παράλληλα ηλεκτροφορήθηκε και δείκτης DNA τεμαχίων γνωστού μοριακού βάρους (Ladder) με σκοπό τον υπολογισμό του μοριακού μεγέθους των DNA στα οποία έγινε ηλεκτροφόρηση.

Τα επιθυμητά τεμάχια του DNA αποκόπηκαν από το πήκτωμα με τη χρήση νυστεριού και απομονώθηκαν από αυτό με τη χρήση του kit Nucleospin Gel and PCR cleanup της Macherey-Nagel ακολουθώντας το πρωτόκολλο της εταιρίας το οποίο παρουσιάζεται και στη συνέχεια.



Εικόνα 12: Αναπαράσταση της διαδικασίας για τη δημιουργία του πηκτώματος της αγαρόζης. Προσθήκη αγαρόζης και ρυθμιστικού διαλύματος TAE 50X, θέρμανση σε φούρνο μικροκυμάτων υπό ανάδευση, ψύξη στους 50° C, προσθήκη Et-Br, δημιουργία πηγαδιών με ειδικό κτένιο.

Η απομόνωση του DNA από το πήκτωμα αγαρόζης έγινε ως εξής:

- Προσθήκη 200μl ρυθμιστικού διαλύματος NT1 για κάθε 100mg πηκτώματος αγαρόζης.

Στη συνέχεια ακολουθείται η εξής διαδικασία:

- Επώαση του πηκτώματος για 5-10 λεπτά στους 50 °C, με ανάδευση μέχρι την πλήρη διάλυσή.
- Τοποθέτηση στήλης (column) σε ένα collection tube (2ml) και φόρτωση του δείγματος. Φυγοκέντρηση για 30 δευτερόλεπτα στις 10000g. Απόρριψη υπερκείμενου (Bind DNA to column).
- Πρόσθεση στη στήλη 600μl ρυθμιστικού διαλύματος NT3 και φυγοκέντρηση για 30 δευτερόλεπτα στις 10000g. Απόρριψη υπερκείμενου και επανάληψη του βήματος αυτού (Wash silica membrane).
- Φυγοκέντρηση για 2 λεπτά για να απομακρυνθεί πλήρως το NT3 (Dry silica membrane).
- Τοποθέτηση της στήλης σε νέο στείρο tube, πρόσθεση σε αυτή 20μl ρυθμιστικού διαλύματος NE (5mM Tris-Cl, pH=8,5), 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Φυγοκέντρηση για 1 λεπτό. Έκλουση υγρού το οποίο περιέχει το επιθυμητό DNA (Elute DNA).

4.3 Πέψη DNA με ένζυμα περιορισμού

Τα ένζυμα περιορισμού έχουν την ιδιότητα να αναγνωρίζουν μια συγκεκριμένη και σχετικά μικρή αλληλουχία DNA. 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 ήταν συγκεκριμένα προϊόντα των PCR καθώς και το πλασμίδιο hCRF₂R/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[^]NNNAGC-3' και το BamHI που αναγνώριζε την αλληλουχία 5'-G[^]GATCC -3' (όπου [^] σημείο κοπής).

Εκτός από τα παραπάνω ένζυμα, στη διαδικασία της ταυτοποίησης της δημιουργίας του πλασμιδίου I272M-hCRF₂R/pCIN4, χρησιμοποιήθηκε και το ένζυμο Eco47I, το οποίο κόβει τόσο στο γονίδιο του WT-hCRF₂R όσο και του I272M -hCRF₂R. Η μετάλλαξη δημιουργεί στο πλασμίδιο μία παραπάνω θέση κοπής σε σχέση με τον άγριο τύπο (W.T) του πλασμιδίου για το ένζυμο αυτό, οπότε έγινε και εξακρίβωση της εισαγωγής της μετάλλαξης στο πλασμίδιο του CRF₂R.

4.4 Συρραφή τεμαχίων DNA (ligation)

4.4.1 Υλικά – Συσκευές

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

4.4.2 Μέθοδος

Μετά την απομόνωσή τους από το πήκτωμα αγαρόζης, τα επιθυμητά προϊόντα πέψης- τεμάχια των DNA συρράφτηκαν. Η αντίδραση συρραφής έλαβε χώρα σε θερμοκρασία 16°C για 16-18 ώρες (over night) και το αναμενόμενο προϊόν ήταν το πλασμίδιο hCRF₂R/pCIN4. Για τη συρραφή χρησιμοποιήθηκε η T4 λιγάση της Thermo Scientific. Το διάλυμα της αντίδρασης περιέχει:

Πίνακας 4: Συστατικά και ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν για την αντίδραση συρραφής τεμαχίων DNA(ligation).

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

4.5 Μετασηματισμός βακτηρίων DH-10b *E.coli* με το πλασμιδιακό DNA που έφερε την επιθυμητή μετάλλαξη

4.5.1 Υλικά – Συσκευές

- Επιδεκτικά (competent) στο μετασηματισμό βακτήρια DH-10b *E.Coli*
- Προϊόν συρραφής (πλασμίδιο hCRF₂R/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 H₂O)
- Θρεπτικό υλικό LB (10g τρυπτόνη, 5g εκχύλισμα μαγιάς, 5g NaCl, 1ml NaOH 1N σε 1 λίτρο H₂O)
- Θερμαινόμενη πλάκα επώασης (Bioblock Scientific, France)
- Φυγόκεντρος (Eppendorf Centrifuge 5415, Germany)
- Επωαστικός κλίβανος Thermo Forma (Thermo Fisher Scientific Inc., USA)

4.5.2 Μέθοδος

Για το μετασηματισμό βακτηρίων με το προϊόν συρραφής, τα βακτήρια ξεπάγωσαν σταδιακά στον πάγο. Σε 10μl από το προϊόν συρραφής προστέθηκαν 50μl βακτήρια και επώαστηκαν για 30 λεπτά στον πάγο. Στη συνέχεια έγινε θερμική προσβολή (heat shock) (42 °C για 45 δευτερόλεπτα). Μετά το heat shock τοποθετούνται στον πάγο για 2 λεπτά ώστε να σταθεροποιηθεί η μεμβράνη τους. Κατόπιν επιστρώνονται σε τρυβλία άγαρ-αμπικιλίνης.

Μετά από 16 ώρες επώασης στους 37 °C, έγινε λήψη των αποικιών και πολλαπλασιασμός τους.

4.6 Πολλαπλασιασμός μετασηματισμένων βακτηρίων DH-10b *E.coli*

4.6.1 Υλικά – Συσκευές

- Θρεπτικό υλικό LB (10g τρυπτόνη, 5g εκχύλισμα μαγιάς, 5g NaCl, 1ml 1N NaOH σε 1 λίτρο H₂O).
- Αντιβιοτικό αμπικιλίνη (60mg/ml).
- Δοκιμαστικοί σωλήνες αποστειρωμένοι.
- Θερμαινόμενη συσκευή ανάδευσης.

4.6.2 Μέθοδος

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 προϊόντος συρραφής (hCRF₂R/pCIN4) χρησιμοποιώντας το kit Nucleospin Plasmid της Macherey-Nagel (Germany) και ακολουθώντας το πρωτόκολλο της εταιρείας.

4.7 Καλλιέργεια κυττάρων HEK 293

4.7.1 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 NaHCO₃
- Ορός βοός, BCS(Bovine Calf 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)

4.7.2 Μέθοδος

Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό DMEM/F12 (1:1) εμπλουτισμένο με 10% ορό βοός, σε επωαστικό κλίβανο ρυθμισμένο σε θερμοκρασία 37 °C, ατμόσφαιρα 5% CO₂ και υγρασία 100%. Τα πειράματα έγιναν χρησιμοποιώντας κύτταρα σε παρόμοια στάδια ανάπτυξης. Το θρεπτικό υλικό ανανεωνόταν κάθε 48 ώρες και τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν για τα πειράματα είχαν φτάσει σε πυκνότητα 90% περίπου. Τα κύτταρα επιστρώθηκαν σε τρυβλία σε αρχική συγκέντρωση 10⁵ κύτταρα/ml και καλλιεργήθηκαν εκ νέου 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 5×10^6 κυττάρων μέσα σε υλικό κατάψυξης (BCS 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.

4.8 Επιμόλυνση κυττάρων με πλασμιδιακό DNA (Transient Transfection)

4.8.1 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_3
- 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 (CRF₂R/pCIN4 και CRF₂R-I272M/pCIN4)
- Λιποφεταμίνη (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)

4.8.2 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 μL λιποφεκταμίνης με 2.5μg DNA(CRF₂R/ρCIN4 και CRF₂R-I272M/ρCIN4) , 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, το οποίο είναι και το πιάτο του πειράματος.

4.9 Μελέτες μέτρησης ενδοκυττάριου κυκλικού AMP

4.9.1 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 NaHCO₃
- Ορός βοός, BCS(Bovine Calf 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)
- Τρυβλία καλλιέργειας 96 οπών (NUNC, Denmark)
- Πολυ-L-λυσίνη, Poly-L-lysine (Fluka, Switzerland)

- Φυγόκεντρος (Rotanda 46R, Hettich, Germany)
- 3H-cAMP [2,8-3H] Adenosine-3'-5'-cyclic phosphate ammonium salt (43,0 Ci/mmol Amersham, UK).
- Εκχύλισμα PKA
- Συσκευή διήθησης Brandel Cell Harvester (USA)
- Φίλτρα ινών 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 3H

Ρυθμιστικό διάλυμα choline/sucrose:

- 25 mM HEPES
- 2 mM choline
- 288 mM sucrose
- 0,9 mM CaCl₂
- 0,5 mM MgCl₂
- 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 40C

4.9.2 Μέθοδος

HEK 293 κύτταρα που εξέφραζαν τους υποδοχείς του CRF επιστρώθηκαν σε τρυβλία 96 οπών και καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό ώστε την επόμενη μέρα να έχουν πυκνότητα 90% (confluent). Πριν την επίστρωση 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 στα τρυβλία καλλιέργειας 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% CO₂/95% αέρα και υγρασίας 100%. Στο τέλος της επώασης προστέθηκαν στα κύτταρα άλλα 100 μl διαλύματος choline/sucrose χωρίς ή με αυξανόμενες συγκεντρώσεις αγωνιστή (σαβαγίνης), και συνεχίστηκε η επώαση για άλλα 20 λεπτά στους 37 °C και 5% CO₂. 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 (- 20 °C). Με το πέρας 1-3 ημερών πραγματοποιήθηκαν τα επόμενα στάδια του πειράματος, ξεκινώντας με απόψυξη των κυττάρων (με ανάδυσή 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 τρυβλίο 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, 3H-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 ινών 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 -LogEC50 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.

4.10 Παρασκευή διαλύματος σπινθηρισμού (scintillation fluid)

4.10.1 Υλικά – Συσκευές

- Τολουόλιο (Merck, USA).
- PPO (2,5-διφαινυλοξαζόλη – C₁₅H₁₁NO) (Merck, USA).
- POPOP (2,2'-p-φαινυλεν-δις(5-φαινυλοξαζόλη) – C₂₄H₁₆N₂O₂) (Merck, USA).
- Triton X-100 (Merck, USA).

4.10.2 Μέθοδος

Σε φιάλη η οποία περιείχε ένα λίτρο τολουόλιο προσθέσαμε 5 g PPO και 0.5 g POPOP και αφήνεται για μία ημέρα υπό 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 3 ml από αυτό προστέθηκαν 20 μl, ~40000 cpm 3H-cAMP.

5 Αποτελέσματα

5.1 Δημιουργία μετάλλαξης στον τύπο 2 υποδοχέα του εκλυτικού παράγοντα της κορτικοτροπίνης (CRF₂R).

Στη συγκεκριμένη μελέτη πραγματοποιήθηκε η μετάλλαξη σε ισολευκίνη της μεθειονίνης στη θέση 272 που βρίσκεται στην πέμπτη διαμεμβρανική περιοχή (TM5) του CRF₂R, δημιουργώντας έτσι τον μεταλλαγμένο υποδοχέα I272M.

Η μετάλλαξη αυτή έγινε με τη χρήση της μεθόδου μεταλλαξιγένεσης κατευθυνόμενης θέσης με PCR (η οποία περιγράφεται στην παράγραφο 4.1), η οποία οδήγησε στη δημιουργία του πλασμιδιακού DNA (CRF₂R-I272M/pCIN4), που κωδικοποιεί τον μεταλλαγμένο CRF₂R-I272M υποδοχέα.

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) πραγματοποιήθηκε σε 2 φάσεις. Στην πρώτη φάση δημιουργήθηκαν τα προϊόντα PCR1a και PCR1b χρησιμοποιώντας σαν εκμαγείο το DNA που κωδικοποιεί τον CRF₂R και κατάλληλους εκκινητές που φέρουν τη μετάλλαξη I272M. Οι εκκινητές αυτοί φέρουν επιπρόσθετες μεταλλάξεις νουκλεοτιδίων που δεν επιφέρουν αλλαγές στη δομή του υποδοχέα αλλά εισάγουν ή εξάγουν κάποιο ένζυμο περιορισμού με σκοπό να διαπιστωθεί αν η μετάλλαξη επιτεύχθηκε χρησιμοποιώντας αυτό το ένζυμο περιορισμού. Στη δεύτερη φάση τα προϊόντα PCR 1a και PCR 1b χρησιμοποιήθηκαν σαν εκμαγεία για τη δημιουργία του προϊόντος PCR-2 που φέρει τη μετάλλαξη I272M.

PCR1α

Για τη δημιουργία της PCR1a χρησιμοποιήθηκαν ως εκμαγείο ο CRF₂R και οι εξής primers (εκκινητές):

Sense-I272M: 5'-CCAAGGTCCCATGATTCTCGTG-3'

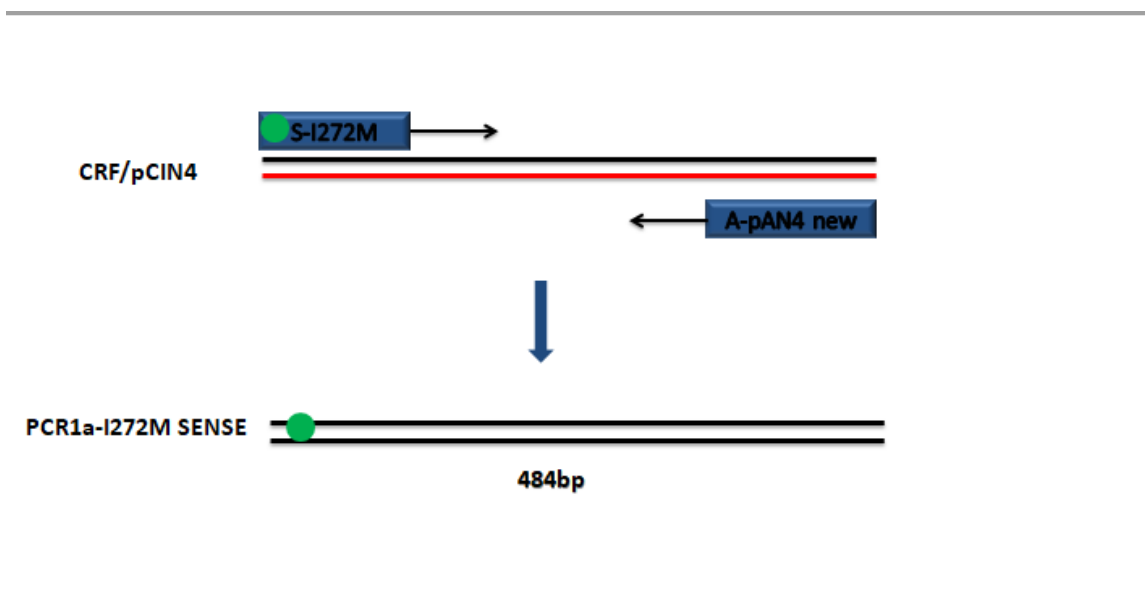
A-pAN4 new: 5'-GCAGACAGCGAATTAATTCCAGC-3'

Η αλληλουχία του εκκινητή Sense-I272M που χρησιμοποιήθηκε διαφέρει από αυτή του άγριου τύπου (wild type) του γονιδίου του CRF₂R σε δύο νουκλεοτίδια.

W.T CRF₂R: 5'-CCAAGGTCCCATGATTCTCGTG-3'

Sense-I272M: 5'-CCAAGGCC**CCAT**C**ATTCTCGTG-3'**

Σκοπός είναι η δημιουργία του τμήματος PCR1a το οποίο θα φέρει τη συγκεκριμένη μετάλλαξη στην αρχή. Το μήκος του PCR1a αναμένεται να είναι 484bp όπως φαίνεται και στην Εικόνα 13.



Εικόνα 13: Αναπαράσταση της δημιουργίας του τμήματος PCR1a, με τη χρήση των εκκινητών S-I272M και A-pAN4 new. Με πράσινο κύκλο αναπαριστάται η μετάλλαξη, η οποία βρίσκεται στην αλληλουχία του εκκινητή S-I272M. Η μετάλλαξη βρίσκεται και στο παραγόμενο τμήμα της PCR1a μήκους 484bp.

PCR1b

Για τη δημιουργία της PCR1b χρησιμοποιήθηκαν σαν εκμαγείο ο CRF₂R και οι εξής primers (εκκινητές):

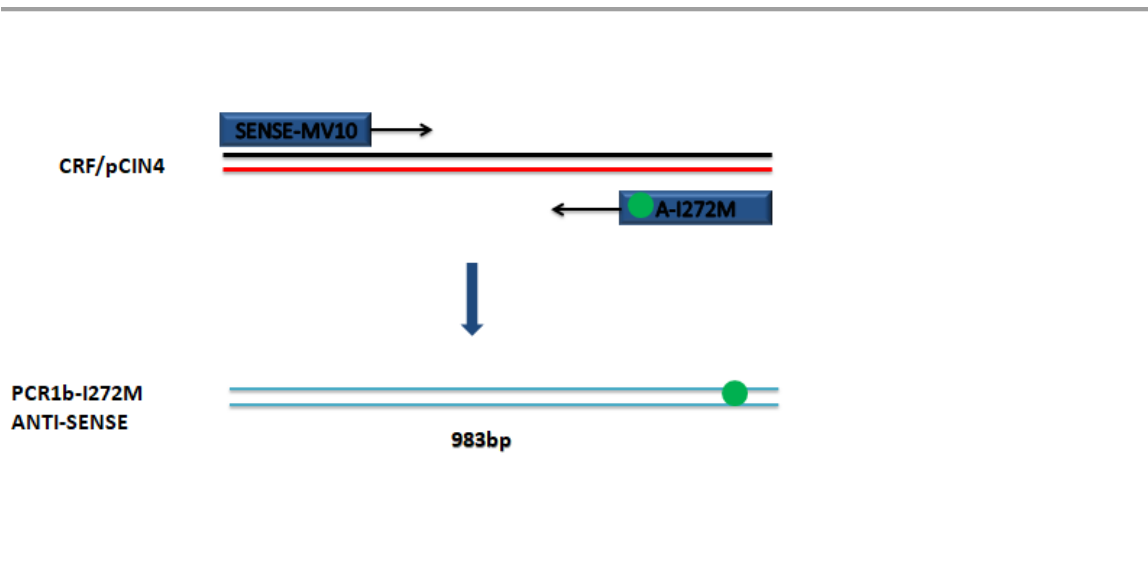
Anti-sense-I272M: 5'- CACGAGAATCATGGGACCTTGG - 3'

MV10: 5'-GGCGTGTACGGTGGGAGG-3'

Η αλληλουχία του εκκινητή Sense-I272M που χρησιμοποιήθηκε διαφέρει από αυτή του άγριου τύπου (wild type) του γονιδίου του CRF₂R σε δύο νουκλεοτίδια.

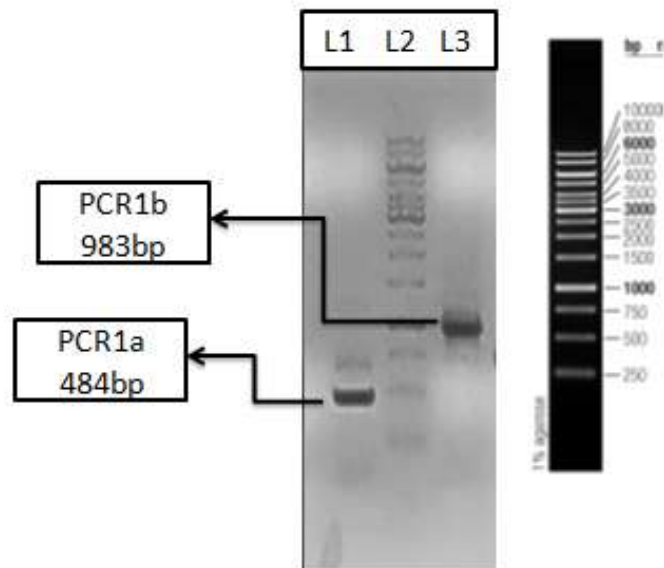
W.T CRF_{2R}: 5'-CACGAGAATCATGGGACCTTGG-3'
Anti-sense-I272M: 5'-CACGAGAATGATGGGGCCTTGG-3'

Σκοπός είναι η δημιουργία του τμήματος PCR1b το οποίο θα φέρει τη συγκεκριμένη μετάλλαξη στην αρχή. Το μήκος του PCR1b αναμένεται να είναι 983bp όπως φαίνεται και στην Εικόνα 14.



Εικόνα 14: Αναπαράσταση της δημιουργίας του τμήματος PCR1b, με τη χρήση των εκκινητών Anti-senseI272M και MV10. Με πράσινο κύκλο αναπαριστάται η μετάλλαξη, η οποία βρίσκεται στην αλληλουχία του εκκινητή A-I272M. Η μετάλλαξη βρίσκεται και στο παραγόμενο τμήμα της PCR1a μήκους 983bp.

Στη συνέχεια έγινε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης προκειμένου να εξακριβωθεί το μέγεθος των προϊόντων των PCR1a και PCR1b και να απομονωθούν για περαιτέρω χρήση. Στην Εικόνα 15 αναπαρίσταται το πήκτωμα της αγαρόζης με τα προϊόντα των PCR1a και PCR1b. Παράλληλα, ηλεκτροφορήθηκε ο μάρτυρας (Ladder 1Kb) που περιέχει τεμάχια DNA γνωστού μοριακού μεγέθους έτσι ώστε να είναι δυνατός ο υπολογισμός του μοριακού μεγέθους των προϊόντων των PCR. Όπως αναμενόταν στο πήκτωμα παρατηρήθηκε ότι το PCR1a έχει μέγεθος 484bp, ενώ το PCR1b έχει μέγεθος 983bp.



Εικόνα 15: Απεικόνιση του πηκτώματος αгарόζης για τα τμήματα PCR1a και PCR1b. Στην στήλη L1 βρίσκεται η PCR1a στην L2 είναι ο Ladder (Fermentas 1Kb 6λ/lane : from stock mg/ λ) και στη στήλη L3 το τμήμα της PCR1b.

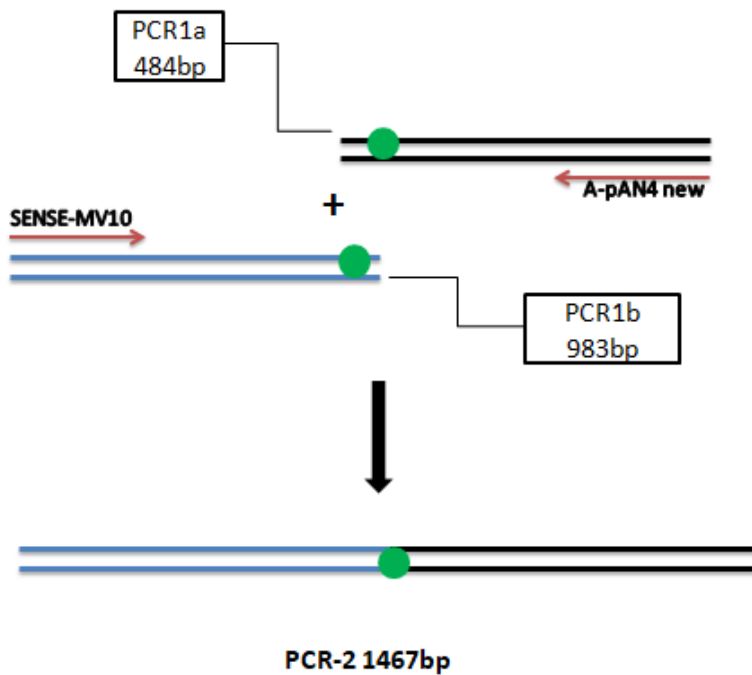
Ακολούθησε η απομόνωση των συγκεκριμένων τμημάτων (Εικόνα 16), έτσι ώστε να γίνει ο καθαρισμός τους και να μπορέσουν να χρησιμοποιηθούν ως εκμαγεία για το PCR-2 της δεύτερης φάσης.



Εικόνα 16: Αναπαράσταση του πηκτώματος αγαρόζης μετά την απομόνωση των δύο τμημάτων που περιείχαν τις PCR1a,b.

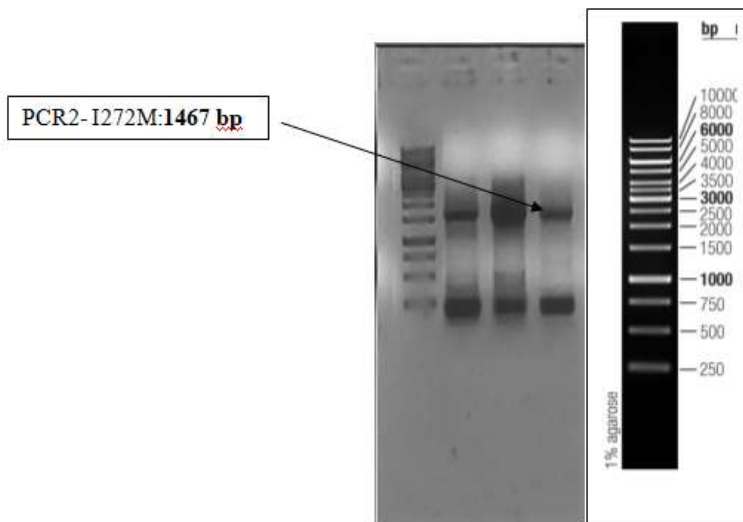
PCR-2

Για τη δημιουργία της PCR2 χρησιμοποιήθηκαν σαν εκμαγείο τα PCR1a και PCR1b προϊόντα και εκκινητές A-pAN4 new και MV10 (Εικόνα 17). Το μέγεθος του PCR-2 προϊόντος αναμενόταν να είναι 1467bp. Το εν λόγω προϊόν φέρει τη I272M μετάλλαξη περίπου στο μέσο του.

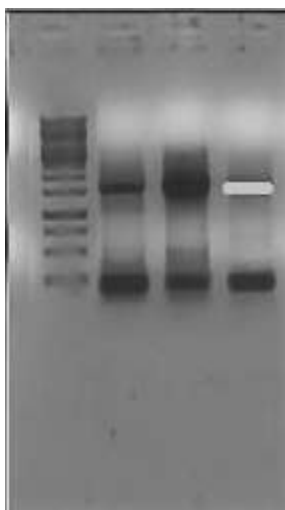


Εικόνα 17: Αναπαράσταση της δημιουργίας του τμήματος PCR-2 το οποίο φέρει τη μετάλλαξη (πράσινος κύκλος) στη μέση του γονιδίου.

Στη συνέχεια έγινε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης προκειμένου να εξακριβωθεί το μέγεθος των προϊόντων των PCR-2 και να απομονωθούν για περαιτέρω χρήση. Στην Εικόνα 18 αναπαρίσταται το πήκτωμα της αγαρόζης με τα προϊόντα του PCR-2. Παράλληλα, ηλεκτροφορήθηκε ο μάρτυρας (Ladder 1Kb) που περιέχει τεμάχια DNA γνωστού μοριακού μεγέθους έτσι ώστε να είναι δυνατός ο υπολογισμός του μοριακού μεγέθους των προϊόντων των PCR. Όπως αναμενόταν στο πήκτωμα παρατηρήθηκε ότι το PCR-2 έχει περίπου μέγεθος 1500 bp (το αναμενόμενο μέγεθος είναι 1467 bp).

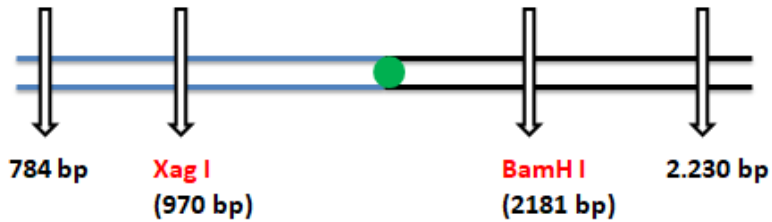


Εικόνα 18: Αναπαράσταση του τμήματος της PCR-2 μήκους 1467bp(φαίνεται με το βέλος), Ladder (Fermentas 1Kb 6 λ/lane : from stock mg/ λ).



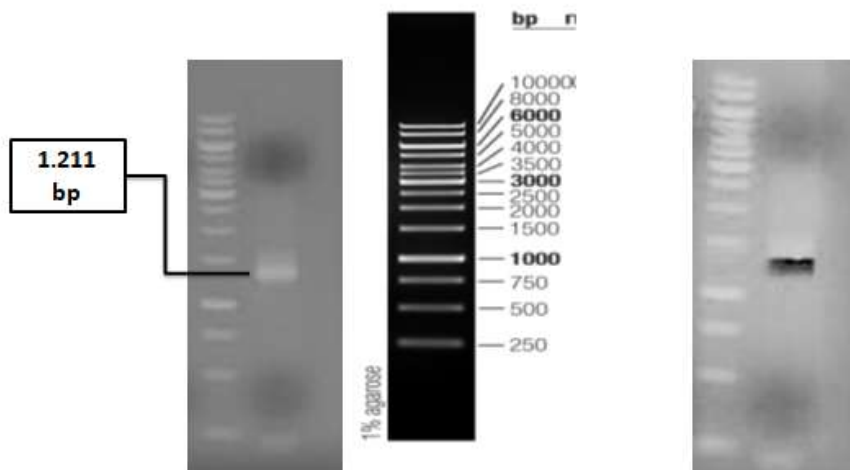
Εικόνα 19: Απεικόνιση του πηκτώματος αгарόζης μετά την απομόνωση του PCR-2.

Στη συνέχεια, το προϊόν την PCR-2 που είναι το DNA μεγέθους 1467 bp απομονώθηκε από το πήκτωμα και υποβλήθηκε σε πέψη με τα ένζυμα περιορισμού XagI και BamHI.



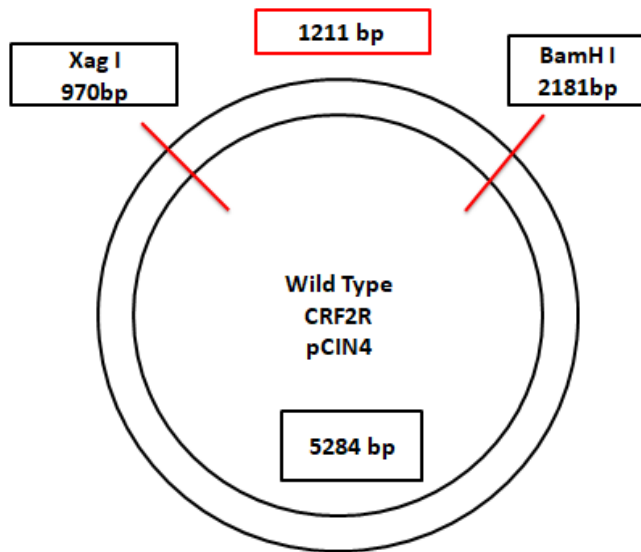
Εικόνα 20: Απεικόνιση του PCR-2 και των θέσεων περιορισμού των ενζύμων Xag I και BamH I. Στο τμήμα αυτό εμπεριέχεται η μετάλλαξη I272M (πράσινος κύκλος).

Μετά την πέψη με τα ένζυμα Xag I και BamH I προέκυψαν τμήματα DNA μεγέθους 49, 186, και 1211 bp. Το επιθυμητό τμήμα που εμπεριέχει τη μετάλλαξη είναι μεγέθους 1211 bp όπως φαίνεται στην Εικόνα 21.

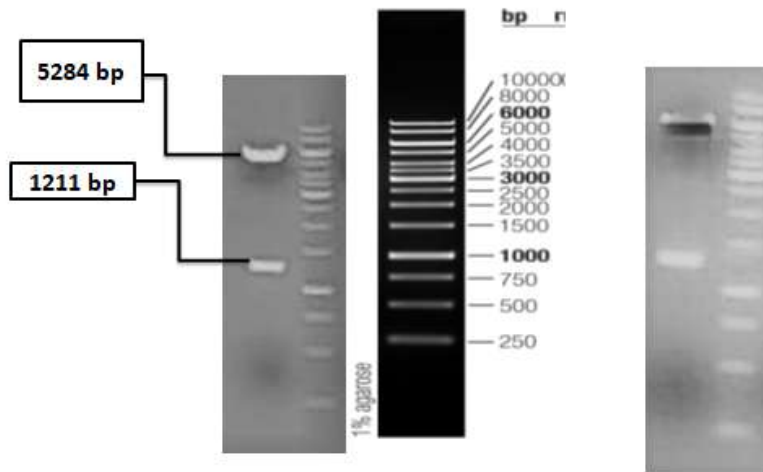


Εικόνα 21: Απεικόνιση του ηλεκτροφόρου αгарόζης μετά την πέψη με τα δύο ένζυμα περιορισμού. Το επιθυμητό τμήμα έχει μέγεθος 1211 bp και απομονώνεται (δεξιά φωτογραφία ηλεκτροφόρου) προκειμένου να καθαριστεί.

Ταυτόχρονα, έγινε πέψη του πλασμιδιακού DNA που κωδικοποιεί τον άγριο τύπο (Wild Type) CRF₂R (CRF₂R-WT/pCIN4) με τα ένζυμα XagI και BamHI. Από τα προϊόντα της πέψης που είχαν μεγέθη περίπου 5284bp και 1211bp, απομονώθηκε το 5284bp.



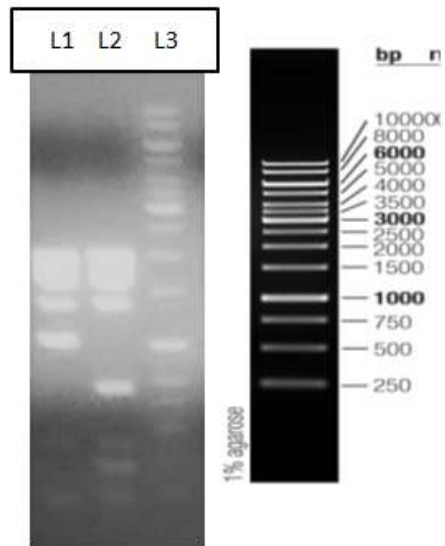
Εικόνα 22: Θέσεις περιοριστικών ενζύμων Xag I και BamH I του πλασμιδιακού DNA που κωδικοποιεί τον άγριο τύπο (Wild Type) CRF₂R. Προκύπτουν DNA μεγέθους 1211bp και 5284bp.



Εικόνα 23: Προϊόντα πέψης με τα δύο ένζυμα. Το DNA μεγέθους 5284 bp απομονώνεται για καθαρισμό όπως φαίνεται στη φωτογραφία του ηηκτώματος αραρόζης δεξιά.

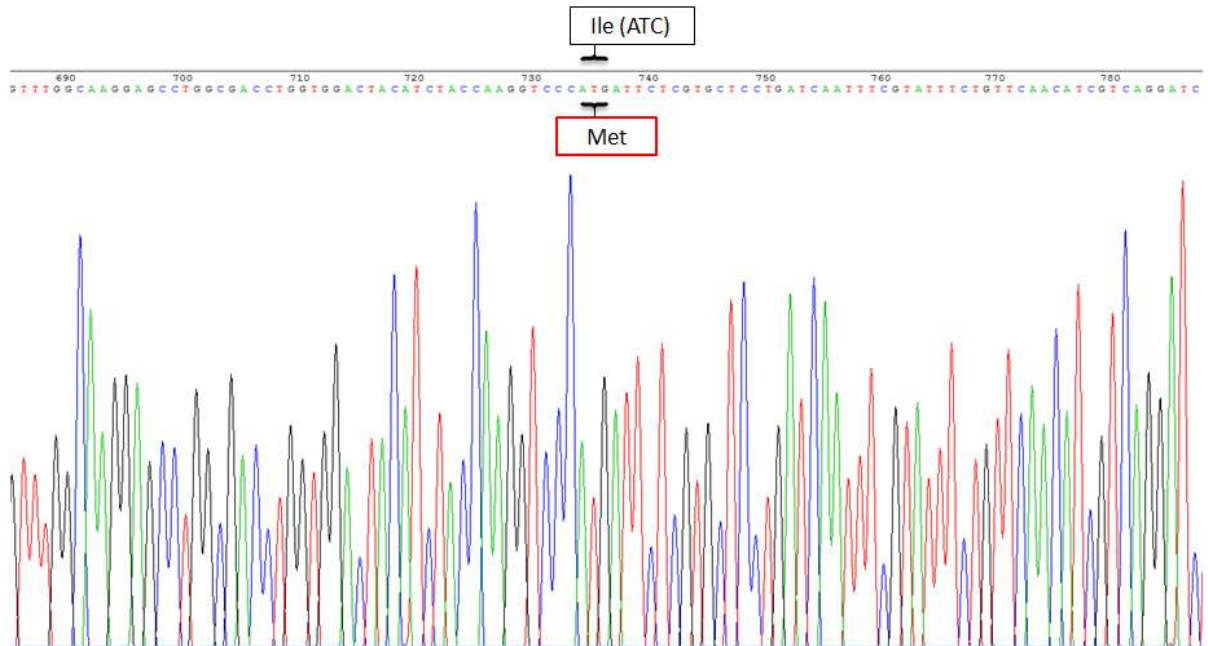
Στη συνέχεια έγινε συρραφή του προϊόντος πέψης του DNA του CRF₂R-WT/ρCIN4 με μέγεθος 5284 bp και του προϊόντος πέψης του DNA της PCR-2 με μέγεθος 1211 bp και το οποίο φέρει την I272M μετάλλαξη. Το προϊόν της συρραφής τους ήταν το πλασμιδιακό DNA CRF₂R- I272M /ρCIN4 το οποίο εισάχθηκε σε βακτήρια, πολλαπλασιάστηκε και απομονώθηκε δίνοντας έτσι το πλασμιδιακό DNA hCRF₂R-I272M /ρCIN4.

Για να προσδιοριστεί η εισαγωγή της μετάλλαξης στον hCRF1R έγινε χρήση του περιοριστικού ενζύμου, Eco47 I. Το ένζυμο αυτό πέπτει τον CRF₂R-wt/ρCIN4 σε 8 θέσεις δημιουργώντας έτσι 8 διαφορετικά προϊόντα πέψης. Η μετάλλαξη I272M εισάγει μια επιπλέον θέση πέψης του Eco47 I με αποτέλεσμα το ένζυμο αυτό να κόβει το DNA του CRF₂R- I272M /ρCIN4 μια παραπάνω φορά και να δημιουργούνται 9 προϊόντα πέψης από το DNA όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα.



Εικόνα 24: Η L1 αντιστοιχεί στο προϊόν πέψης του CRF₂R-wt/ρCIN4 (WT), η L2 στο προϊόν πέψης του CRF₂R-I272M/ρCIN4 με το ένζυμο Eco47 I. Η L3 αντιστοιχεί στο μάρτυρα (Ladder).

Περαιτέρω επιβεβαίωση της εισαγωγής της I272M μετάλλαξης στο πλασμιδιακό DNA που κωδικοποιεί τον CRF₂R έγινε με ανάγνωση της αλληλουχίας του DNA. Στην Εικόνα 25 φαίνεται η αλληλουχία των νουκλεοτιδίων του πλασμιδιακού DNA CRF₂R-I272M/ρCIN4 που κωδικοποιούν το αμινοξύ Met (ATG) ενώ τα αντίστοιχα νουκλεοτίδια στο πλασμιδιακό DNA του άγριου τύπου CRF₂R-WT/ρCIN4 κωδικοποιούν το αμινοξύ Ile (ATC).



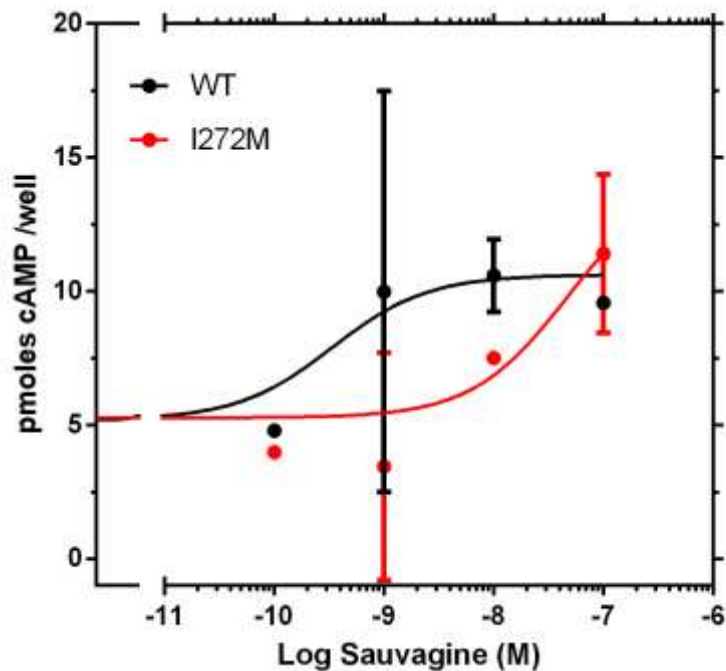
Εικόνα 25: Μετάλλαξη της Ile 272 σε Met.: Στο χρωματογράφημα διακρίνεται η περιοχή των νουκλεοτιδίων μέσα στην οποία υπάρχει η αλληλουχία ATG που κωδικοποιεί την Met στη θέση 272 του CRF₂R-I272M υποδοχέα. Τα νουκλεοτίδια αυτά αντικατέστησαν τα νουκλεοτίδια ATC που κωδικοποιούν το αμινοξύ Ile στη θέση 272 του CRF₂R-WT.

5.2 Φαρμακολογικός χαρακτηρισμός του CRF₂R-I272M

Ο φαρμακολογικός χαρακτηρισμός του μεταλλαγμένου CRF₂R-I272M καθώς και του άγριου τύπου CRF₂R (CRF₂R-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.

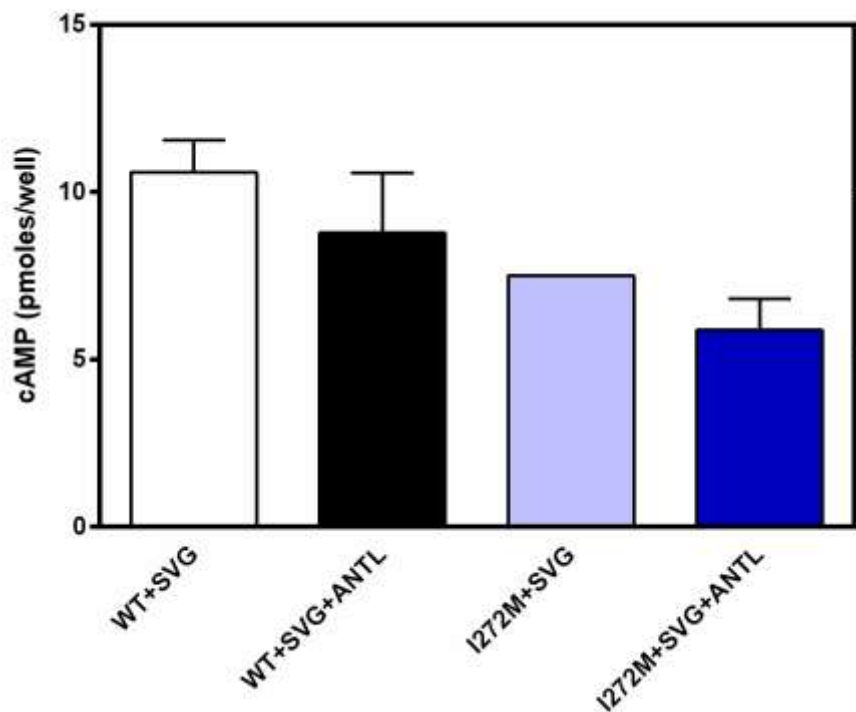
Όπως φαίνεται και στο παρακάτω γράφημα η μετάλλαξη της ισολευκίνης σε μεθειονίνη (CRF₂R-I272M) ελάττωσε την ικανότητα της σοβαγίνης να διεγείρει την παραγωγή ενδοκυττάριου κυκλικού AMP σε HEK 293 κύτταρα που εκφράζανε τον υποδοχέα. Συγκεκριμένα, η ισχύς της σοβαγίνης για τον CRF₂R-

WT (-LogEC50 = 9.5) ήταν μικρότερη από εκείνη του CRF₂R-I272M (-LogEC50 = 7.3).



Εικόνα 26: Διέγερση παραγωγής cAMP από την σοβαγίνη.

Η διέγερση της παραγωγής cAMP από αυξανόμενες συγκεντρώσεις σοβαγίνης, επιτεύχθηκε όπως αναφέρεται στην αντίστοιχη παράγραφο «Υλικά και Μέθοδοι» σε άθικτα HEK 293 κύτταρα που εκφράζανε τον άγριο τύπο υποδοχέα (CRF₂R-WT) ή τη μεταλλαγμένη μορφή του (CRF₂R-I272M). Η τιμή logEC50 υπολογίστηκε με μη γραμμική ανάλυση των αποτελεσμάτων (nonlinear regression analysis).



Εικόνα 27: Ανταγωνισμός της σοβαγίνης από την ανταλαρμίνη να διεγείρει τη παραγωγή ενδοκυττάρου cAMP.

Η διέγερση της παραγωγής cAMP από 10 nM σοβαγίνης απουσία (WT+SVG , I272M+SVG) ή παρουσία (WT+SVG+ANTL,I272M+SVG+ANTL) 1000nM ανταλαρμίνης, επιτεύχθηκε όπως αναφέρεται στην αντίστοιχη παράγραφο «Υλικά και Μέθοδοι» σε άθικτα HEK 293 κύτταρα που εκφράζανε τον άγριο τύπο υποδοχέα (WT) ή τη μεταλλαγμένη μορφή του (I272M).

Επίσης, όπως φαίνεται στο παραπάνω διάγραμμα η ανταλαρμίνη δεν φάνηκε ικανή να ανταγωνιστεί την σοβαγίνη στο να διεγείρει τη παραγωγή cAMP σε κύτταρα που εκφράζουν τον CRF₂R υποδοχέα, αφού η σοβαγίνη σε συγκέντρωση 10 nM επέφερε σχεδόν το ίδιο αποτέλεσμα απουσία ((WT+SVG) και παρουσία ανταλαρμίνης 1μM (WT+SVG +ANTL). Ομοίως, η ανταλαρμίνη δεν μπόρεσε να ανταγωνιστεί την σοβαγίνη στο να διεγείρει την παραγωγή cAMP σε κύτταρα που εκφράζουν τον CRF₂R-I272M ,αφού η σοβαγίνη σε συγκέντρωση

10 nM επέφερε σχεδόν το ίδιο αποτέλεσμα απουσία (I272M+SVG +ANTL) και παρουσία ανταλαρμίνης 1μM (I272M+SVG +ANTL).

6 Συζήτηση

Η μελέτη αυτή προσπάθησε να ρίξει φώς στο μοριακό μηχανισμό της εκλεκτικότητας δέσμησης των μη πεπτιδικών CRF ανταγωνιστών στον CRF₁R. Όλοι οι μη πεπτιδικοί ανταγωνιστές του CRF που υπάρχουν σήμερα δεσμεύονται στον CRF₁R και καθόλου στον CRF₂R. Προηγούμενη μελέτη έδειξε ότι η εκλεκτικότητα δέσμησης των μη πεπτιδικών ανταγωνιστών στον CRF₁R οφείλεται στην ύπαρξη των His199 στη τρίτη διαμεμβρανική περιοχή (TM3) και Met276 στη πέμπτη διαμεμβρανική περιοχή (TM5) του υποδοχέα που στον CRF₂R είναι Val195 (TM3) και Ile272 (TM5)²⁷. Σε πρόσφατη κρυσταλλογραφική μελέτη του CRF₁R προτάθηκε ότι η Met276 που αντιστοιχεί στην I272 του CRF₂R, μαζί με άλλα αμινοξέα σχηματίζουν ένα δίκτυο δεσμών λίγο πάνω από τις θέσεις δέσμησης του μη πεπτιδικού ανταγωνιστή, CP-376395 στον CRF₁R. Αν και δεν αλληλεπιδρά άμεσα με το CP-376395, η Met276 τοποθετείται απέναντι από τη Phe203 της TM3. Η αλληλεπίδραση αυτή όπως και της His199 με τη Tyr327 της έκτης διαμεμβρανικής περιοχής (TM6) βοηθούν στη σωστή τοποθέτηση των Tyr 327 και Phe203 που αποτελούν θέσεις δέσμησης των μη πεπτιδικών ανταγωνιστών. Μια άλλη πρόταση για τον έμμεσο ρόλο των αμινοξέων αυτών στη δέσμηση των CRF₁R-εκλεκτικών ανταγωνιστών είναι ότι ελέγχουν την προσβασιμότητα των μορίων αυτών προς τις θέσεις δέσμησης τους.⁴⁵ Η τελευταία πρόταση διατυπώθηκε και σε άλλες φαρμακολογικές μελέτες οι οποίες επαλήθευσαν πειραματικά τον έμμεσο ρόλο της Met276 στη δέσμηση των μη πεπτιδικών CRF₁R-εκλεκτικών ανταγωνιστών^{47,27}. Συγκεκριμένα στις μελέτες αυτές προτάθηκε ότι η ευλύγιστη πλευρική αλυσίδα της Met276 έχει την ικανότητα να τοποθετείται σχετικά μακριά από τους μη πεπτιδικούς CRF₁R-εκλεκτικούς ανταγωνιστές σε ένα ενεργειακά ευνοϊκό προσανατολισμό που δεν μπορεί να αποκτηθεί από πλευρικές αλυσίδες λιγότερο ευλύγιστες όπως της ισολευκίνης. Βάση των παραπάνω είναι πιθανόν να παρατηρήσουμε δέσμηση των CRF₁R-εκλεκτικών μη πεπτιδικών ανταγωνιστών στον CRF₂R μετά από αντικατάσταση της I272 από την αντίστοιχη μεθειονίνη (Met276) του CRF₁R.

Στην παρούσα εργασία επιτεύχθηκε η αντικατάσταση του αμινοξέος I272 της πέμπτης διαμεμβρανικής περιοχής του CRF₂R με την αντίστοιχη μεθειονίνη του CRF₁R, δημιουργώντας έτσι τον μεταλλαγμένο υποδοχέα CRF₂R-I272M. Η μετάλλαξη αυτή επιτεύχθηκε με τη μέθοδο της μεταλλαξιγένεσης κατευθυνόμενης αντίδρασης (PCR), χρησιμοποιώντας ως εκκινητές εκείνους που φέρουν τη μετάλλαξη I272M και ως εκμαγείο DNA που κωδικοποιεί τον CRF₂R. Το DNA αυτό βρίσκεται στο πλασμίδιο pCIN4 που περιέχει τον υποκινητή του μεγαλοκυτταροϊού (CMV promoter) ο οποίος είναι υπεύθυνος για την υψηλού βαθμού μεταγραφή του γονιδίου σε μεγάλο αριθμό διαφορετικών κυττάρων.

Προκειμένου να μελετήσουμε τις φαρμακολογικές ιδιότητες του CRF₂R-I272M επιμόλυναμε HEK293 κύτταρα με το DNA που κωδικοποιεί τον μεταλλαγμένο αυτό υποδοχέα, χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της λιποφεκταμίνης και στη συνέχεια εξετάσαμε την ικανότητα του CRF₂R-I272M να διεγείρει την αδενυλική κυκλάση έπειτα από ενεργοποίηση του από τον αγωνιστή σοβαγίνη. Η μέθοδος της λιποφεκταμίνης εμφανίζει μειωμένη κυτταροτοξικότητα και αυξημένη απόδοση συγκριτικά με άλλες μεθόδους επιμόλυνσης, όπως μικροέγχυση, ηλεκτροδιάτρηση, χρήση ασβεστίου ή χρήση DEAE-δεξτράνης. 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 αποτελεί το πρώτο βήμα για την ενδοκυττάρωσή του.

Στη συνέχεια εξετάστηκαν οι φαρμακολογικές ιδιότητες του CRF₂R προσδιορίζοντας την ικανότητα του να ενεργοποιείται από το συγγενές πεπτιδίο του CRF, σοβαγίνη καθώς την ικανότητα του συνθετικού μη πεπτιδικού ανταγωνιστή ανταλαρμίνη να ανταγωνίζεται την σοβαγίνη.

Στα πειράματα διέγερσης της αδενυλοκυκλάσης χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας ο άγριος τύπος (W.T) CRF₂R. Στα πειράματα αυτά παρατηρήθηκε ότι η μετάλλαξη I272M μείωσε την ισχύ με την οποία η σοβαγίνη διεγείρει τη παραγωγή ενδοκυττάρου cAMP μέσω ενεργοποίησης του CRF₂R. Αντίθετα η

αντίστροφη μετάλλαξη δηλαδή ή αντικατάσταση της M276 του CRF₁R από την I272 του CRF₂R δεν επηρέασε σημαντικά την δέσμευση των αγωνιστών στον CRF₁R.²⁷ Πιθανόν η I272 να αποτελεί θέση δέσμευσης της σοβαγίνης στον CRF₂R αλλά όχι στον CRF₁R. Εναλλακτικά θα μπορούσε η μετάλλαξη I272M να επηρεάσει έμμεσα τη δέσμευση της σοβαγίνης αλλάζοντας την δομή του CRF₂R αλλά όχι του CRF₁R. Πιθανόν αυτό να οφείλεται στο ότι η δομή του CRF₂R είναι λίγο διαφορετική εκείνης του CRF₁R, αφού οι δύο υποδοχείς έχουν διαφορετική ομολογία αμινοξέων. Μελλοντικές μελέτες στις οποίες θα αντικατασταθεί η I272 του CRF₂R σε περισσότερα του ενός διαφορετικά αμινοξέα θα αποδείξουν το ρόλο της I272 στη δέσμευση των αγωνιστών όπως η σοβαγίνη.

Το αξιοπερίεργο είναι ότι η I272M μετάλλαξη δεν άλλαξε τον φαινότυπο του CRF₂R όσο αφορά τη δέσμευση σε αυτόν των CRF₁R -εκλεκτικών ανταγωνιστών. Συγκεκριμένα ο CRF₁R-εκλεκτικός μη πεπτιδικός ανταγωνιστής ανταλαρμίνη δεν κατόρθωσε να δεσμευτεί στον CRF₂R -I272M υποδοχέα και να ανταγωνιστεί έτσι τη σοβαγίνη στο να διεγείρει το ένζυμο της αδενυλοκυκλάσης σε κύτταρα που εκφράζουν τον υποδοχέα αυτόν. Ίσως η ταυτόχρονη μετάλλαξη των I272 και V195 του CRF₂R στα αντίστοιχα αμινοξέα του CRF₁R που είναι Μεθειονίνη και Ιστιδίνη να μπορέσει να αλλάξει το φαινότυπο του CRF₂R όσο αφορά τη δέσμευση μη πεπτιδικών CRF₁R-εκλεκτικών ανταγωνιστών. Πειράματα που διεξάγονται στο εργαστήριο θα μπορέσουν να διευκρινίσουν περισσότερο το ρόλο των αμινοξέων αυτών στη δέσμευση μη πεπτιδικών CRF₁R-εκλεκτικών ανταγωνιστών.

Η λήψη πληροφοριών σχετικά με τη δομή και τη λειτουργία του CRF₂R θα συμβάλλει σημαντικά στον προσδιορισμό των αμινοξέων που είναι υπεύθυνα για τη δέσμευση διαφόρων προσδετών, οδηγώντας έτσι στο σχεδιασμό νέων CRF₂R-εκλεκτικών μορίων. Τέτοια μόρια θα επιτρέψουν να διασαφηνιστεί ο ρόλος του CRF₂R στη λειτουργία του ΚΝΣ και άλλων συστημάτων του οργανισμού, προσφέροντας έτσι τη δυνατότητα να αντιμετωπιστούν θεραπευτικά παθολογικές καταστάσεις στις οποίες εμπλέκεται ο CRF₂R.

7 Βιβλιογραφία

1. Chrousos, G. P. Stress and disorders of the stress system. *Nature Reviews Endocrinology* (2009). doi:10.1038/nrendo.2009.106
2. Gross, C. Claude Bernal and the constancy of the internal environment. *The Neuroscientist* (1998). doi:10.1177/107385849800400520
3. Davies, K. J. A. Adaptive homeostasis. *Molecular Aspects of Medicine* (2016). doi:10.1016/j.mam.2016.04.007
4. Chrousos, G. P. The Hypothalamic–Pituitary–Adrenal Axis and Immune-Mediated Inflammation. *N. Engl. J. Med.* (1995). doi:10.1056/NEJM199505183322008
5. Vale, W., Spiess, J., Rivier, C. & Rivier, J. Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and β -endorphin. *Science* (80-.). (1981). doi:10.1126/science.6267699
6. Zhu, L. J. *et al.* The different roles of glucocorticoids in the hippocampus and hypothalamus in chronic stress-induced HPA axis hyperactivity. *PLoS One* (2014). doi:10.1371/journal.pone.0097689
7. Raisman, G. An urge to explain the incomprehensible: Geoffrey Harris and the discovery of the neural control of the pituitary gland. *Annu. Rev. Neurosci.* (1997). doi:10.1146/annurev.neuro.20.1.533
8. Saffran, M. & Schally, A. V. the Release of Corticotrophin By Anterior Pituitary Tissue in Vitro. *Can. J. Biochem. Physiol.* (1955). doi:10.1139/o55-054
9. Antoni, F. A. Hypothalamic control of adrenocorticotropin secretion: Advances since the discovery of 41-residue corticotropin-releasing factor. *Endocr. Rev.* (1986). doi:10.1210/edrv-7-4-351
10. Vale, W. *et al.* Chemical and biological characterization of corticotropin releasing factor. *Recent Prog. Horm. Res.* (1983).
11. Zoumakis, E., Margioris, A. N., Makrigiannakis, A., Stournaras, C. & Gravanis, A. Human endometrium as a neuroendocrine tissue: Expression, regulation and biological roles of endometrial corticotropin-releasing hormone (CRH) and opioid peptides. *Journal of Endocrinological Investigation* (1997). doi:10.1007/BF03346896
12. Lederis, K., Letter, a, McMaster, D., Moore, G. & Schlesinger, D. Complete amino acid sequence of urotensin I, a hypotensive and corticotropin-releasing neuropeptide from *Catostomus*. *Science* (1982). doi:10.1126/science.6981844
13. MONTECUCCHI, P. C. & HENSCHEN, A. AMINO ACID COMPOSITION AND SEQUENCE ANALYSIS OF SAUVAGINE, A NEW ACTIVE PEPTIDE FROM THE SKIN OF PHYLLOMEDUSA SAUVAGEI. *Int. J. Pept. Protein Res.* (1981).

14. Vaughan, J. *et al.* Urocortin, a mammalian neuropeptide related to fish urotensin I and to corticotropin-releasing factor. *Nature* (1995). doi:10.1038/378287a0
15. 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). doi:10.1073/pnas.121165198
16. 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. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2001). doi:10.1073/pnas.051626398
17. Venihaki, M. *et al.* Urocortin III, a brain neuropeptide of the corticotropin-releasing hormone family: Modulation by stress and attenuation of some anxiety-like behaviours. *J. Neuroendocrinol.* (2004). doi:10.1111/j.1365-2826.2004.01170.x
18. Dautzenberg, F. M. & Hauger, R. L. The CRF peptide family and their receptors: Yet more partners discovered. *Trends in Pharmacological Sciences* (2002). doi:10.1016/S0165-6147(02)01946-6
19. Reul, J. M. H. M. & Holsboer, F. Corticotropin-releasing factor receptors 1 and 2 in anxiety and depression. *Curr. Opin. Pharmacol.* (2002). doi:10.1016/S1471-4892(01)00117-5
20. Brown, M. R. *et al.* Comparison of the biologic actions of corticotropin-releasing factor and sauvagine. *Regul. Pept.* (1982). doi:10.1016/0167-0115(82)90101-X
21. Rivier, C., Rivier, J., Lederis, K. & Vale, W. In vitro and in vivo ACTH-releasing activity of ovine CRF, sauvagine and urotensin I. *Regul. Pept.* (1983). doi:10.1016/0167-0115(83)90121-0
22. Rivier, J., Rivier, C. & Vale, W. Synthetic competitive antagonists of corticotropin-releasing factor: effect on ACTH secretion in the rat. *Science* (1984).
23. Rivier, J. *et al.* Single Point d-Substituted Corticotropin-Releasing Factor Analogues: Effects on Potency and Physicochemical Characteristics. *J. Med. Chem.* (1993). doi:10.1021/jm00072a003
24. Gulyas, J. *et al.* Potent, structurally constrained agonists and competitive antagonists of corticotropin-releasing factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (1995). doi:10.1073/pnas.92.23.10575
25. Rühmann, a, Bonk, I., Lin, C. R., Rosenfeld, M. G. & Spiess, J. 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). doi:10.1073/pnas.95.26.15264
26. 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). doi:10.1210/endo.137.12.8940412
27. Liaw, C. W., Grigoriadis, D. E., Lorang, M. T., De Souza, E. B. & Maki, R. a. Localization of agonist- and antagonist-binding domains of human corticotropin-

- releasing factor receptors. *Mol. Endocrinol.* (1997). doi:10.1210/mend.11.13.0034
28. 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (1983). doi:10.1073/pnas.80.22.6770
 29. Beyermann, M. *et al.* A role for a helical connector between two receptor binding sites of a long-chain peptide hormone. *J. Biol. Chem.* (2000). doi:10.1074/jbc.275.8.5702
 30. Kornreich, W. D. *et al.* Alanine Series of Ovine Corticotropin Releasing Factor (oCRF): A Structure-Activity Relationship Study. *J. Med. Chem.* (1992). doi:10.1021/jm00088a024
 31. Chen, R., Lewis, K. A., Perrin, M. H. & Vale, W. W. Expression cloning of a human corticotropin-releasing-factor receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (1993). doi:10.1073/pnas.90.19.8967
 32. Grammatopoulos, D. K. & Chrousos, G. P. Functional characteristics of CRH receptors and potential clinical applications of CRH-receptor antagonists. *Trends in Endocrinology and Metabolism* (2002). doi:10.1016/S1043-2760(02)00670-7
 33. Lovenberg, T. W. *et al.* Cloning and characterization of a functionally distinct corticotropin-releasing factor receptor subtype from rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (1995). doi:10.1073/pnas.92.3.836
 34. De Souza, E. B. Corticotropin-releasing factor receptors: physiology, pharmacology, biochemistry and role in central nervous system and immune disorders. *Psychoneuroendocrinology* (1995). doi:0306453095000119 [pii]
 35. Eckart, K. *et al.* Pharmacology and biology of corticotropin-releasing factor (CRF) receptors. *Receptors and Channels* (2002). doi:10.1080/10606820213678
 36. Liapakis, G., Venihaki, M., Margioris, A., Grigoriadis, D. & Gkountelias, K. Members of CRF family and their receptors: from past to future. *Curr. Med. Chem.* (2011). doi:10.2174/092986711795933704
 37. Oldham, W. M. & Hamm, H. E. Structural basis of function in heterotrimeric G proteins. *Quarterly Reviews of Biophysics* (2006). doi:10.1017/S0033583506004306
 38. Berg, J. M., Tymoczko, J. L. & Stryer, L. *Biochemistry.* *W H Freeman* (2013).
 39. Hillhouse, E. W. & Grammatopoulos, D. K. The molecular mechanisms underlying the regulation of the biological activity of corticotropin-releasing hormone receptors: Implications for physiology and pathophysiology. *Endocrine Reviews* (2006). doi:10.1210/er.2005-0034
 40. Grigoriadis, D. E. & De Souza, E. B. Heterogeneity between brain and pituitary corticotropin-releasing factor receptors is due to differential glycosylation. *Endocrinology* (1989). doi:10.1210/endo-125-4-1877
 41. Gether, U. Uncovering Molecular Mechanisms Involved in Activation of G

- Protein-Coupled Receptors. *Endocr. Rev.* (2000). doi:10.1210/er.21.1.90
42. Hoare, S. R. J., Sullivan, S. K., Ling, N., Crowe, P. D. & Grigoriadis, D. E. Mechanism of corticotropin-releasing factor type I receptor regulation by nonpeptide antagonists. *Mol. Pharmacol.* (2003). doi:10.1124/mol.63.3.751
 43. Gkountelias, 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). doi:10.1124/mol.108.052423
 44. Hauger, R. L., Risbrough, V., Brauns, O. & Dautzenberg, F. M. Corticotropin releasing factor (CRF) receptor signaling in the central nervous system: new molecular targets. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* (2006). doi:10.2174/187152706777950684
 45. Hollenstein, K. *et al.* Structure of class B GPCR corticotropin-releasing factor receptor 1. *Nature* (2013). doi:10.1038/nature12357
 46. Spyridaki, K. *et al.* Structural-functional analysis of the third transmembrane domain of the corticotropin-releasing factor type 1 receptor: role in activation and allosteric antagonism. *J. Biol. Chem.* (2014). doi:10.1074/jbc.M113.544460
 47. Hoare, S. R. J. *et al.* Single amino acid residue determinants of non-peptide antagonist binding to the corticotropin-releasing factor1 (CRF1) receptor. *Biochem. Pharmacol.* (2006). doi:10.1016/j.bcp.2006.04.007