



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΒΑΣΙΚΩΝ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

UNIVERSITY OF CRETE
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES
FACULTY OF MEDICINE
DEPT OF BASIC SCIENCES



ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Διαλεύκανση της δομής της τρίτης
διαμεμβρανικής περιοχής του τύπου 1
υποδοχέα του CRF, καθώς και των
αλληλεπιδράσεων του με τον CRF και των
αναλόγων του.

ΣΠΥΡΙΔΑΚΗ ΚΑΤΕΡΙΝΑ
ΦΑΡΜΑΚΟΠΟΙΟΣ

Ηράκλειο, Νοέμβριος 2016

Η παρούσα διδακτορική διατριβή πραγματοποιήθηκε στο:

Εργαστήριο Φαρμακολογίας

Τομέας Βασικών Επιστημών

Σχολή Ιατρικής

Πανεπιστήμιο Κρήτης

Επιβλέπων Καθηγητής

Αναπληρωτής Καθηγητής Φαρμακολογίας Δρ. Γ. Λιαπάκης

Μέλη Τριμελούς Επιτροπής

Γ. Λιαπάκης, Αναπληρωτής Καθηγητής Φαρμακολογίας.

Α. Γραβάνης, Καθηγητής Φαρμακολογίας

Α. Μαργιωρής Ομότιμος Καθηγητής Κλινικής Χημείας-Βιοχημείας

Μέλη Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής

Γ. Λιαπάκης, Αναπληρωτής Καθηγητής Φαρμακολογίας, Ιατρική Σχολή Παν. Κρήτης

Α. Γραβάνης, Καθηγητής Φαρμακολογίας, Ιατρική Σχολή Παν. Κρήτης

Α. Μαργιωρής, Ομότιμος Καθηγητής Κλινικής Χημείας-Βιοχημείας, Ιατρική Σχολή Παν. Κρήτης

Κ. Θερμού, Καθηγήτρια Φαρμακολογίας, Ιατρική Σχολή Παν. Κρήτης

Θ. Μαυρομούστακος, Καθηγητής Οργανικής Χημείας, Τμήμα Χημείας, Παν. Αθηνών

Μ. Βενυχάκη, Επίκουρη Καθηγήτρια Κλινικής Χημείας, Ιατρική Σχολή Παν. Κρήτης

Ι. Χαραλαμπόπουλος, Επίκουρος Καθηγητής Φαρμακολογίας, Ιατρική Σχολή Παν. Κρήτης

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η εκπόνηση διδακτορικής διατριβής αποτελεί μια ιδιαίτερα ξεχωριστή εμπειρία. Η ολοκλήρωσή της είναι καρπός προσωπικής προσπάθειας αλλά συγχρόνως υποστήριξης και συνδρομής πολλών ανθρώπων στους οποίους αξίζει να εκφράσω την ειλικρινή μου ευγνωμοσύνη.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα της διατριβής, κ. Λιαπάκη Γεώργιο, Αναπληρωτή Καθηγητή Φαρμακολογίας, για την αμέριστη επιστημονική και ηθική υποστήριξη, την ενθάρρυνση καθώς και την καθοδήγηση σε όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διδακτορικής διατριβής. Η ευρεία γνώση του στο αντικείμενο και ο επιστημονικός τρόπος σκέψης του αποτελούσαν πάντα τη λύση σε τυχόν δυσκολίες.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τα μέλη της επταμελούς εξεταστικής μου επιτροπής που ο καθένας τους ξεχωριστά, με τον δικό του τρόπο, στήριξαν την προσπάθεια μου για την ολοκλήρωση της διατριβής. Συγκεκριμένα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Γραβάνη Αχιλλέα, Καθηγητή Φαρμακολογίας, τον κ. Μαργιωρή Ανδρέα, Ομότιμο Καθηγητή Κλινικής Χημείας-Βιοχημείας, την κ. Θερμού Κυριακή, Καθηγήτρια Φαρμακολογίας, τον κ. Χαραλαμπίο Ιωάννη, Επίκουρο Καθηγητή Φαρμακολογίας, την κ. Βενυχάκη Μαρία, Επίκουρη Καθηγήτρια Κλινικής Χημείας και τον κ. Μαυρομούστακο Θωμά, Καθηγητή Οργανικής Χημείας στο Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Αθηνών.

Δεν θα μπορούσα να παραλείψω στις ευχαριστίες μου τον Δρ. Ματσούκα Μίνω-Τιμόθεο για την άριστη συνεργασία και για τη πολύτιμη συμβολή του στην εργασία αυτή, δομώντας τα μοριακά πρότυπα που χρησιμοποιήθηκαν. Επίσης ένα μεγάλο ευχαριστώ στους Dr. Pardo Leonardo και Dr. Cordomi Arnau για την συνεργασία και επιστημονική τους συμβολή στο θέμα των μοριακών προτύπων που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτήν την εργασία. Ακόμη ευχαριστώ πολύ τον Dr Hesham Fahmy και τον Bhimanna Kurpast για τη σύνθεση των μη πεπτιδικών αναλόγων του CRF που εξετάστηκαν στη παρούσα εργασία.

Από την πορεία μου στον ακαδημαϊκό χώρο ως φοιτήτρια δεν θα μπορούσα να παραλείψω να ευχαριστήσω την κ. Ανδρεάδου Ιωάννα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια

Φαρμακολογίας της Φαρμακευτικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών για την καθοδήγηση και την αμέριστη βοήθεια που μου παρείχε κάνοντας τα πρώτα βήματά μου στην έρευνα στο εργαστήριο της καθώς επίσης και τον Dr. Λογοθέτη Διομήδη για την φιλοξενία του στο εργαστήριο του στο Virginia Commonwealth University των ΗΠΑ.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου και ιδιαίτερος στον Καραγεώργο Βλάση, για την άψογη συνεργασία μας, την ηθική υποστήριξη και το ευχάριστο κλίμα σε όλη τη διάρκεια της διατριβής μου. Επίσης ευχαριστώ ιδιαίτερα την διδάκτορα Κουργιαντάκη Αλεξάνδρα για την αμέριστη φιλία και συμπαράστασή της καθώς και τον Πεδιαδιτάκη Ιωσήφ, τον Ευσταθόπουλο Πασχάλη, την Μαστροδήμου Νίκη, την Παυλίδου Άττικα, την Πουλάκη Σμαράγδα, την Καραγιάννη Έφη και τη Ρασούλη Όλγα, για την ευχάριστη τους παρέα κατά τη διάρκεια του διδακτορικού μου.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω μέσα από την καρδιά μου την Αλαφάκη Μίκα, τη Χαιρέτη Ειρήνη, την Μπιμπλή Σοφία- Ίρις, Σπυρίδη Νατάσα και Σκουτέλη Ελίζα, που έμειναν στο πλευρό μου σε όλες τις φάσεις, εύκολες και δύσκολες, της εκπόνησης της διατριβής μου, δίνοντας μου ότι είχα ανάγκη για να συνεχίζω. Ξεχωριστή θέση στις ευχαριστίες μου οφείλω στον Γεωργακόπουλο Αντώνη, για την υπομονή, την στήριξη και την απόλυτη κατανόησή του στη μακρόχρονη διαδικασία του διδακτορικού.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου, Στέλιο και Αθηνά, καθώς και τον αδερφό μου Γιώργο, οι οποίοι στήριξαν με κάθε δυνατό τρόπο κάθε στιγμή, από την έναρξη μέχρι την ολοκλήρωσή της, την εκπόνηση της διατριβής μου.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

AC	Adenyl Cyclase , αδενυλική κυκλάση
Ac	Acetyl , ακετύλιο
ACTH	Adrenocorticotropin Hormone , αδρενοκορτικοτρόπος ορμόνη
Ad5	Adenovirus 5 , αδενοϊός τύπου 5
Aib	2-aminoisobutyric acid , 2-αμινο-ισοβουτυρικό
Ala	Alanine , αλανίνη
Asn	Asparagine , ασπαραγίνη
Asp	Aspartic acid , ασπαρτικό οξύ
ATP	Adenosine Triphosphate , τριφωσφορική αδενοσίνη
BCS	Bovine Calf Serum , ορός βοός
C-άκρο	Καρβοξυτελικό άκρο πεπτιδίων
C-περιοχή	Καρβοξυτελική περιοχή υποδοχέα
Cha	Cyclohexylalanine
cAMP	Cyclic Adenosine Monophosphate , κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη
cDNA	Complementary DNA , συμπληρωματικό DNA
CRF/CRH	Corticotropin Releasing Factor/Hormone , εκλυτικός παράγοντας/ εκλυτική ορμόνη της κορτικοτροπίνης
CRF₁R	Corticotropin Releasing Factor Receptor type 1 , τύπου 1 υποδοχέας του εκλυτικού παράγοντα της κορτικοτροπίνης
CRF₂R	Corticotropin Releasing Factor Receptor type 2 , τύπου 2 υποδοχέας του εκλυτικού παράγοντα της κορτικοτροπίνης
CRF₃R	Corticotropin Releasing Factor Receptor type 3 , τύπου 3 υποδοχέας του εκλυτικού παράγοντα της κορτικοτροπίνης
Cys	Cysteine , κυστεΐνη
DAG	Diacylglycerol , διακυλογλυκερόλη
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium , θρεπτικό υλικό
DMSO	Dimethyl sulfoxide , διμέθυλο-σουλφοξείδιο
DNA	Deoxyribonucleic acid , δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ

dNTP	Deoxyribonucleoside triphosphate , τριφωσφορικά δεοξυ-ριβονουκλεοτίδια
DTT	Dithiothreitol , διθειοθρεϊτόλη
EC₅₀	Efficiency Concentration , συγκέντρωση δραστικότητας του 50%
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid , αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ
ELs	Extracellular Loops , εξωκυττάριοι βρόγχοι
Epac	Exchange proteins activated by cAMP
ERK1/2	Extracellular Signal-Regulated Kinases 1 and 2
EtBr	Ethidium Bromide , βρωμιούχο αιθίδιο
G418	Geneticin , γενετισίνη
GCGR	Glucagon Receptor , υποδοχέας της γλυκαγόνης
GIPR	Glucose dependent Insulinotropic Polypeptide Receptor , υποδοχέας του γλυκοζοεξαρτώμενου ινσουλινοτροπικού πολυπεπτιδίου
GLP-1R	Glucagon-Like Peptide 1 Receptor , υποδοχέας του προσομοιάζοντος με τη γλυκαγόνη πεπτιδίου 1
Glu	Glutamate , γλουταμικό
Gly	Glycine , γλυκίνη
GDP	Guanosine Diphosphate , διφωσφορική γουανοσίνη
GPCRs	G-Protein Coupled Receptors , υποδοχείς που συζεύγνυνται με τις G-πρωτεΐνες
GRF-R	Growth hormone Releasing Factor Receptor , υποδοχέας του παράγοντα απελευθέρωσης της αυξητικής ορμόνης
GTP	Guanosine-5'-Triphosphate , τριφωσφορική γουανοσίνη
GTP-γS	Guanosine 5'-O-[gamma-thio]triphosphate , υπομονάδα γ της διεγερτικής τριφωσφορικής γουανοσίνης
HEK 293	Human Embryonic Kidney 293 cells , ανθρώπινα εμβρυικά νεφρικά κυτταρα
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid
His	Histidine , ιστιδίνη
HPA	Hypothalamic-pituitary-adrenal axis , υποθαλαμο-υποφυσιο-επινεφριδιακός άξονας)
Ile	Isoleucine , ισολευκίνη

ILs	Intracellular Loops , ενδοκυττάριοι βρόγχοι
IP₃	Inositol 1,4,5-trisphosphate , (1, 4, 5)–τριφωσφορική ινοσιτόλη
LB	Luria-Bertani Broth , θρεπτικό υγρό
Leu	Leucine , λευκίνη
Lys	Lysine , λυσίνη
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase , πρωτεϊνική κινάση που ενεργοποιείται από μιτογόνο
MC2-R	Melanocortin type 2 Receptor , τύπος 2 υποδοχέα της μελανοκορτίνης
Met	Methionine , μεθειονίνη
mRNA	Messenger RNA
MTSEA	2-Aminoethyl Methanethiosulfonate hydrobromide , μεθανο-θειοσουλφονικό αιθυλαμμώνιο
N-άκρο	Αμινοτελικό άκρο πεπτιδίων
N-περιοχή	Αμινοτελική περιοχή υποδοχέα
Nle	Norleucine , νορλευκίνη
NMR	Nuclear Magnetic Resonance , φαρματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού
NPT II	Neomycin Phosphotransferase II , φωσφοτρανσφεράση της νεομυκίνης
OptiMEM	Opti-Modified Eagle Medium , θρεπτικό υλικό
P2Y1	Purine Receptor , υποδοχέας πουρινών
PC12	Pheochromocytoma of the rat adrenal medulla cell line
PCR	Polymerase Chain Reaction , αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
Phe	Phenylalanine , φαινυλαλανίνη
PI3-K	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase
PIP₂	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate , φωσφατιδυλινοσιτόλη
PKA	Protein Kinase A , πρωτεϊνική κινάση A
PKC	Protein Kinase C , πρωτεϊνική κινάση C
PLC	Phospholipase C , φωσφολιπάση C
POMC	Proiomelanocortin , προ-οπιο-μελανοκορτίνη
Pro	Proline , προλίνη
PTH_{1R}	Parathyroid Hormone type 1 Receptor , τύπου 1 υποδοχέας της παραθυροειδούς ορμόνης

PVN	Paraventricular Nucleus , παρακοιλιακός πυρήνας
SAR studies	Structure-Activity Relationship studies μελέτες σχέσεων δομής-δράσης
SCAM	Substituted-Cysteine Accessibility Method , μέθοδος διαθεσιμότητας των κυστεϊνών-υποκαταστατών
SCR	Short Consensus Repeat
Ser	Serine , σερίνη
SVG	Sauvagine , σοβαγίνη
TAE	Tris-Acetate-EDTA
Thr	Threonine , θρεονίνη
TMs	Transmembrane Domains , διαμεμβρανικές περιοχές
Trp	Tryptophan , τρυπτοφάνη
Tyr	Tyrosine τυροσίνη
Ucn1	Urocortin I , ουροκορτίνη
Ucn2	Urocortin II , ουροκορτίνη II
Ucn3	Urocortin III , ουροκορτίνη III
Uro1	Urotensin I , ουροτενσίνη I
Val	Valine , βαλίνη
VIP	Vasoactive Intestinal Peptide , αγγειοδραστικό εντερικό πεπτιδίο
VPAC₁R	Vasoactive intestinal Polypeptide type-1 Receptor , τύπου 1 υποδοχέας του εντερικού αγγειοδραστικού πεπτιδίου
ENY	Εγκεφαλονωτιαίο υγρό
ΓΕΣ	Γαστρεντερικό σύστημα
ΚΝΣ	Κεντρικό Νευρικό Σύστημα

ABSTRACT

The type 1 receptor (CRF₁R) for the corticotropin-releasing factor (CRF) is a family B G protein coupled receptor (GPCR) (1), which plays a key role in the maintenance of homeostasis by regulating neural and endocrine functions (2,3). Malfunction of CRF/CRF₁R systems is related with several diseases such as depression and anxiety. The clinical importance of CRF₁R is further supported by that CRF₁R-selective non-peptide small-molecule antagonists have been shown to display anxiolytic and antidepressant properties in animal models (4).

As all GPCRs, the CRF₁R consists of an extracellular amino-terminal domain (N-domain) and seven α -helical transmembrane domains (TM1-TM7), which are connected extracellularly with three loops (EL1-EL3). The CRF and its related peptides, such as sauvagine, bind to the extracellular regions of CRF₁R and activate the receptor (5,6). In contrast, small-molecule non-peptide antagonists have been proposed to interact with the TMs of CRF₁R and allosterically antagonize peptide-agonist binding and receptor activation (7). Recently our laboratory has shown that, similar to other GPCRs, the TMs of CRF₁R fold such as to form a water-accessible crevice (binding-site crevice) within the plasma membrane (8). Amino acids of TMs that contact non-peptide CRF analogues should be on the surface of the binding-site crevice of CRF₁R. Moreover, TM residues in family A GPCRs have been shown to participate in networks of interactions that play important role in receptor activation (9). However the molecular mechanisms underlying CRF₁R activation and its antagonism by non-peptide molecules are still elusive.

The present study aims to 1) obtain structural information for the TMs of CRF₁R, starting from TM3, 2) determine structural changes associated with receptor activation, 3) determine TM residues that interact with non-peptide CRF antagonists and 4) elucidate the molecular mechanisms underlying antagonism of receptor activation by non-peptide CRF antagonists. The TM3 has been selected because its tilted orientation in other GPCRs, relative to membrane, allows its residues to establish key interactions with ligands, other TMs and with G-proteins (10).

To obtain structural information for the TM3 of CRF₁R, we identified its residues that are located on the surface of the binding-site crevice of an inactive ligand-free state (apo-state) of the full-length receptor. To achieve this we mutated, one at a time, the TM3 residues to Cys

(engineered Cys) and determined their accessibilities by applying the Substituted Cysteine Accessibility Method (SCAM) (11,12). Among the twenty-two TM3 residues those at positions (upper half of TM3) 189^{3.26}, 192^{3.29}, 193^{3.30}, 195^{3.32}, 196^{3.33}, 199^{3.36} and 203^{3.40} were found to be located on the surface of the binding site crevice. These results suggest that the TM3 of the apo inactive state of CRF₁R is positioned such that the upper half of this helix participates in the formation of a large binding site crevice, whereas the other half is tightly packed with the other TMs. These results are in full agreement with those obtained from a crystallization study of a N-terminally truncated inactive non-peptide ligand-bound state of CRF₁R which has been published very recently.

Among TM3 residues, those at positions 203^{3.40} and 210^{3.47} play crucial role in receptor activation. Mutation of G210^{3.47} to Cys (G210^{3.47}C) largely decreased the high binding affinity of sauvagine, as well as, its potency to stimulate the accumulation of cAMP in cells expressing the receptor. According to our molecular model, which was constructed based on the crystal structures of the inactive glucagon receptor (GCGR) and CRF₁R, the G210^{3.47} is located one helical turn below M206^{3.43}. The M206^{3.43} forms a hydrogen bond with N283^{5.54} of TM5 (13,14). Mutation of G210^{3.47} to Cys adds a side chain at position 210^{3.47} which could form an additional hydrogen bond with the side chain of N283^{5.54} that further strengthens the TM3-TM5 interface, thus stabilizing the inactive conformation of receptor. These results suggest that movements of TM3 and TM5 that take place during activation of family A GPCRs (15), might also occur in class B receptors and are hampered by strengthening the TM3-TM5 interactions. This suggestion is further supported by the fact that mutation of G210^{3.47} to Ala (G210^{3.47}A) did not largely decrease the binding affinity and potency of sauvagine. In contrast to Cys, Ala at 210^{3.47} position of CRF₁R did not form a hydrogen bond with N283^{5.54}, and thus having a much smaller impact on receptor activation.

As G210^{3.47}, F203^{3.40} in TM3 plays an important role in receptor activation. Mutation of F203^{3.40} to Cys (F203^{3.40}C) largely decreased the ability of receptor to adopt its active state and to bind sauvagine with high affinity. Interestingly, addition of a Lys-like chain to F203^{3.40}C after its reaction with the positively charged reagent, MTSEA, restored sauvagine binding to normal (high affinity) levels. Similarly, addition of a Lys side chain at position 203^{3.40} by mutating F203^{3.40} to Lys (F203^{3.40}K) did not significantly alter the high binding affinity of sauvagine. As F203^{3.40}K substitution, mutation of F203^{3.40} to Trp (F203^{3.40}W) or Ile (F203^{3.40}I) did not decrease the high affinity binding and potency of sauvagine. In marked contrast, removing the

hydrophobic side chain at position 203^{3.40} by mutating F203^{3.40} to Ala (F203^{3.40} A) reduced the binding affinity and potency of sauvagine. Based on these results and comparing the inactive crystal structure of CRF₁R with the inactive and active crystal structures of the family A GPCR, β_2 adrenergic receptor (β_2 AR), we propose that F203^{3.40} in TM3 and L323^{6.44} in TM6 of CRF₁R, form an aromatic-aliphatic interaction in the inactive state of receptor. As in β_2 AR, activation of CRF₁R is associated with a repositioning of F203^{3.40} relative to L323^{6.44} and towards a nearby aromatic amino acid, which possibly interacts with F203^{3.40}, Trp (F203^{3.40} W) or Ile (F203^{3.40} I) but not with Ala (F203^{3.40} A). Such an aromatic-aromatic interaction most likely stabilizes the high affinity binding active state of CRF₁R and it is supported by that F203^{3.40}K mutation did not alter sauvagine binding. Lys (such as K203^{3.40}) has been shown to participate in cation-pi interactions with aromatic residues (16,17).

Despite the fact that the hydrophilic substitution F203^{3.40}K did not alter the ability of CRF₁R to adopt its active state, this modification abolished the binding of the hydrophobic non-peptide antagonist, antalarmin to receptor. Similarly, F203^{3.40}A mutation abolished antalarmin binding to CRF₁R. In marked contrast, the hydrophobic substitutions F203^{3.40}W and F203^{3.40}I did not decrease the binding and antagonistic properties of antalarmin. These results suggest that F203^{3.40} interacts with non-peptide CRF antagonists, as also observed in the crystal structure of CRF₁R in complex with the non-peptide antagonist CP-376395 (13). Interaction of non-peptide CRF antagonists with TMs of CRF₁R and intercalation between them most likely hampers receptor activation-associated movements of these regions.

Conclusively the present study provided structural information for the CRF₁R and elucidated the molecular mechanisms underlying receptor activation and its antagonism by small non-peptide molecules. In parallel this study designed, synthesized and pharmacologically evaluated several non-peptide CRF analogues. Among the 50 compounds tested, four showed promising binding affinities for CRF₁R and were selected as lead compounds for the design of novel molecules. All the results of the present study will put the basis for the design of novel non-peptide CRF₁R-selective antagonists with improved pharmacodynamic and pharmacokinetic properties that will enrich the pharmaceutical armoire against CRF₁R-related disorders such as depression and anxiety.

1. Chen, R., Lewis, K. A., Perrin, M. H., and Vale, W. W. (1993) *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 8967-8971

2. Chrousos, G. P. (1998) *Ann N Y Acad Sci* **851**, 311-335
3. Kovacs, K. J. (2013) *J Chem Neuroanat* **54**, 25-33
4. Zorrilla, E. P., and Koob, G. F. (2010) *Drug Discov Today* **15**, 371-383
5. Assil-Kishawi, I., and Abou-Samra, A. B. (2002) *J Biol Chem* **277**, 32558-32561
6. Gkountelias, K., Tselios, T., Venihaki, M., Deraos, G., Lazaridis, I., Rassouli, O., Gravanis, A., and Liapakis, G. (2009) *Mol Pharmacol* **75**, 793-800
7. Liaw, C. W., Grigoriadis, D. E., Lorang, M. T., De Souza, E. B., and Maki, R. A. (1997) *Mol Endocrinol* **11**, 2048-2053
8. Gkountelias, K., Papadokostaki, M., Javitch, J. A., and Liapakis, G. (2010) *Mol Pharmacol* **78**, 785-793
9. Rasmussen, S. G., Choi, H. J., Fung, J. J., Pardon, E., Casarosa, P., Chae, P. S., Devree, B. T., Rosenbaum, D. M., Thian, F. S., Kobilka, T. S., Schnapp, A., Konetzki, I., Sunahara, R. K., Gellman, S. H., Pautsch, A., Steyaert, J., Weis, W. I., and Kobilka, B. K. (2011) *Nature* **469**, 175-180
10. Venkatakrisnan, A. J., Deupi, X., Lebon, G., Tate, C. G., Schertler, G. F., and Babu, M. M. (2013) *Nature* **494**, 185-194
11. Liapakis, G., M. Martin, and J.A. Javitch. (1999) *Current Protocols in Neuroscience* **4.15.1-4.15.10**.
12. Liapakis, G. (2014) *Curr Pharm Biotechnol* **15**, 980-986
13. Hollenstein, K., Kean, J., Bortolato, A., Cheng, R. K., Dore, A. S., Jazayeri, A., Cooke, R. M., Weir, M., and Marshall, F. H. (2013) *Nature* **499**, 438-443
14. Siu, F. Y., He, M., de Graaf, C., Han, G. W., Yang, D., Zhang, Z., Zhou, C., Xu, Q., Wacker, D., Joseph, J. S., Liu, W., Lau, J., Cherezov, V., Katritch, V., Wang, M. W., and Stevens, R. C. (2013) *Nature* **499**, 444-449
15. Park, J. H., Scheerer, P., Hofmann, K. P., Choe, H. W., and Ernst, O. P. (2008) *Nature* **454**, 183-187
16. Crowley, P. B., and Golovin, A. (2005) *Proteins* **59**, 231-239
17. Gallivan, J. P., and Dougherty, D. A. (1999) *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 9459-9464

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο τύπου 1 υποδοχέας (CRF₁R) του εκλυτικού παράγοντα της κορτικοτροπίνης (CRF) ανήκει στην οικογένεια Β των υποδοχέων που συζεύγνυται με τις G-πρωτεΐνες (GPCRs) (1) και παίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της ομοιόστασης, ρυθμίζοντας νευρικές και ενδοκρινικές λειτουργίες (2,3). Δυσλειτουργία των CRF/CRF₁R συστημάτων στον οργανισμό, σχετίζεται με την εκδήλωση ασθενειών, όπως το άγχος και η κατάθλιψη. Ο σημαντικός ρόλος του CRF₁R ενισχύεται περαιτέρω από το γεγονός ότι CRF₁R-εκλεκτικοί μη πεπτιδικοί μικρομοριακοί ανταγωνιστές έχει δειχθεί ότι έχουν αγχολυτικές και αντικαταθλιπτικές δράσεις σε πειραματόζωα (4).

Όπως όλοι οι GPCRs, έτσι και ο CRF₁R αποτελείται από μια εξωκυττάρια αμινοτελική N-περιοχή και επτά α-ελικοειδείς διαμεμβρανικές περιοχές (TM1-TM7), οι οποίες συνδέονται εξωκυττάρια μεταξύ τους με τρεις βρόγχους (EL1-EL3). Ο CRF και τα συγγενή του πεπτίδια, όπως η σοβαγίνη, δεσμεύονται στις εξωκυττάρια περιοχές του CRF₁R και τον ενεργοποιούν (5,6). Αντίθετα, οι μικρομοριακοί μη πεπτιδικοί CRF ανταγωνιστές έχει προταθεί ότι αλληλεπιδρούν με τις TMs του CRF₁R και ανταγωνίζονται αλλοστερικά τη δέσμευση του CRF και των συγγενών του πεπτιδίων-αγωνιστών και την ενεργοποίηση του υποδοχέα (7). Πρόσφατα, μελέτη του εργαστηρίου μας έδειξε ότι οι TMs του CRF₁R, παρόμοια με άλλους GPCRs, αναδιπλώνονται στο χώρο της πλασματικής μεμβράνης με τέτοιο τρόπο ώστε να σχηματίζουν μια υδρόφιλη κοιλότητα που ονομάζεται κοιλότητα θέσεων δέσμευσης (8). Τα αμινοξέα των TMs που αλληλεπιδρούν με τα μη πεπτιδικά μόρια θα πρέπει να βρίσκονται πάνω στην επιφάνεια της κοιλότητας θέσεων δέσμευσης του CRF₁R. Επιπρόσθετα τα αμινοξέα των TMs των υποδοχέων της οικογένειας Α των GPCRs, έχει δειχθεί ότι συμμετέχουν σε δίκτυα δεσμών που παίζουν σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίησή τους (9). Όμως οι μηχανισμοί ενεργοποίησης του CRF₁R και ανταγωνισμού του από τους μικρομοριακούς CRF ανταγωνιστές είναι ακόμα άγνωστοι.

Η παρούσα εργασία στοχεύει 1) στη λήψη δομικών πληροφοριών για τις TMs του CRF₁R, ξεκινώντας από τη TM3, 2) στον προσδιορισμό δομικών αλλαγών που σχετίζονται με την ενεργοποίηση του υποδοχέα, 3) στον προσδιορισμό των αμινοξέων των TMs που αλληλεπιδρούν με τους μη πεπτιδικούς ανταγωνιστές και 4) διαλεύκανση των μοριακών

μηχανισμών ανταγωνισμού της ενεργοποίησης του υποδοχέα από μη πεπτιδικούς CRF προσδέτες. Επιλέξαμε την TM3 γιατί σε πλήθος διαφορετικών υποδοχέων επιτρέπει, λόγω της θέσης της, τη δημιουργία αλληλεπιδράσεων μεταξύ των αμινοξέων της με διάφορους προσδέτες, με αμινοξέα άλλων TMs καθώς και με τις G-πρωτεΐνες (10).

Με σκοπό να λάβουμε πληροφορίες για τη δομή της TM3 του CRF₁R, προσδιορίσαμε ποια από τα αμινοξέα της, έχουν τις πλευρικές τους αλυσίδες προσανατολισμένες στην επιφάνεια της κοιλότητας θέσεων δέσμησης μιας ανενεργού, αρο (απουσία προσδέτη) κατάστασης του υποδοχέα. Για να επιτύχουμε αυτό, μεταλλάξαμε, ένα τη φορά, τα αμινοξέα της TM3 σε κυστεΐνες (τεχνητές κυστεΐνες ή Cys) και προσδιορίσαμε τις διαθεσιμότητες τους, εφαρμόζοντας τη μέθοδο διαθεσιμότητας των κυστεϊνών-υποκαταστατών (SCAM) (11,12). Ανάμεσα στα είκοσι δύο αμινοξέα της TM3 που εξετάστηκαν, εκείνα στις θέσεις (άνω μισό τμήμα της TM3) 189^{3.26}, 192^{3.29}, 193^{3.30}, 195^{3.32}, 196^{3.33}, 199^{3.36} και 203^{3.40} βρέθηκαν να έχουν τις πλευρικές τους αλυσίδες προσανατολισμένες στην κοιλότητα θέσεων δέσμησης του CRF₁R. Τα αποτελέσματα αυτά οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η TM3 της ανενεργού αρο κατάστασης του CRF₁R, τοποθετείται με τέτοιο τρόπο στη πλασματική μεμβράνη ώστε το άνω μισό τμήμα της συμμετέχει στο σχηματισμό μιας ευρύχωρης κοιλότητας θέσεων δέσμησης, ενώ το κατώτερο τμήμα της βρίσκεται σε στενή επαφή με τις άλλες TMs. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε απόλυτη συμφωνία με εκείνα που ελήφθησαν από μια πρόσφατη κρυσταλλογραφική μελέτη μιας ανενεργού, δεσμευμένου με μη πεπτιδικό CRF ανταγωνιστή, κατάστασης του CRF₁R.

Από τα αμινοξέα της TM3 που εξετάστηκαν, εκείνα στις θέσεις 203^{3.40} και 210^{3.47} φάνηκε να παίζουν σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση του CRF₁R. Μετάλλαξη της G210^{3.47} σε Cys (G210^{3.47}C) μείωσε σημαντικά την υψηλής συγγένειας δέσμηση της σοβαγίνης καθώς επίσης και την ισχύ της να διεγείρει την παραγωγή ενδοκυττάριου cAMP σε κύτταρα που εξέφραζαν τον υποδοχέα αυτό. Σύμφωνα με το μοριακό μας πρότυπο το οποίο κατασκευάστηκε με βάση τις κρυσταλλικές δομές του ανενεργού υποδοχέα της γλυκαγόνης (GCGR) και του CRF₁R, η G210^{3.47} βρίσκεται κάτω από τη M206^{3.43} και σε απόσταση μιας ελικοειδούς στροφής. Η M206^{3.43} σχηματίζει έναν δεσμό υδρογόνου με την N283^{5.54} της TM5 (13,14). Η μετάλλαξη της G210^{3.47} σε Cys εισάγει μια πλευρική αλυσίδα στη θέση 210^{3.47} που μπορεί να σχηματίσει έναν επιπλέον δεσμό υδρογόνου με την πλευρική αλυσίδα της N283^{5.54} ο οποίος ενισχύει περαιτέρω την διεπιφάνεια μεταξύ TM3 και TM5, σταθεροποιώντας έτσι ακόμη περισσότερο την ανενεργό κατάσταση του υποδοχέα. Τα αποτελέσματα αυτά οδηγούν

στην υπόθεση ότι μετατόπιση των TM3 και TM5 που παρατηρείται κατά την ενεργοποίηση των υποδοχέων της οικογένειας A των GPCRs (15), πιθανόν να συμβαίνει και στους υποδοχείς της οικογένειας B και να παρεμποδίζεται ενισχύοντας τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των TM3 και TM5 αμινοξέων. Η υπόθεση αυτή ενισχύεται περαιτέρω από το γεγονός ότι μετάλλαξη της G210^{3.47} σε Ala (G210^{3.47}A) επηρέασε πολύ λιγότερο, τόσο τη συγγένεια δέσμευσης, όσο και την ισχύ της σοβαγίνης. Αντίθετα με τη Cys, η Ala στη θέση 210^{3.47} του CRF₁R δεν σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με τη N283^{5.54}, επηρεάζοντας έτσι σε πολύ μικρότερο βαθμό την ενεργοποίηση του υποδοχέα.

Παρόμοια με τη G210^{3.47}, η F203^{3.40} της TM3 φάνηκε να παίζει σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση του υποδοχέα. Μετάλλαξη της F203^{3.40} σε Cys (F203^{3.40}C) μείωσε σημαντικά την ικανότητα του υποδοχέα να μεταβαίνει στην ενεργό κατάστασή του και να δεσμεύει με υψηλή συγγένεια τη σοβαγίνη. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι η εισαγωγή πλευρικής αλυσίδας τύπου λυσίνης στον F203^{3.40}C έπειτα από την αντίδρασή του με το θετικά φορτισμένο MTSEA, αποκατέστησε τη δέσμευση της σοβαγίνης σε φυσιολογικά επίπεδα. Πρόμοια, η εισαγωγή της πλευρικής αλυσίδας της Lys στη θέση 203^{3.40} μετά από τη μετάλλαξη της F203^{3.40} σε Lys (F203^{3.40}K) δεν τροποποίησε σημαντικά την υψηλής συγγένειας δέσμευση της σοβαγίνης. Όπως παρατηρήθηκε για την F203^{3.40}K, έτσι και η μετάλλαξη της F203^{3.40} σε Trp (F203^{3.40}W) ή σε Ile (F203^{3.40}I) δεν μείωσε την υψηλής συγγένειας δέσμευση και ισχύ της σοβαγίνης. Αντίθετα η αφαίρεση της υδρόφοβης πλευρικής αλυσίδας στη θέση 203^{3.40} μετά από τη μετάλλαξή της σε Ala, μείωσε σημαντικά τη συγγένεια δέσμευσης και ισχύ της σοβαγίνης.

Βασιζόμενοι στα αποτελέσματά μας και στη σύγκριση της κρυσταλλικής δομής του ανενεργού CRF₁R με τις κρυσταλλικές δομές του ανενεργού και ενεργού β₂ αδρενεργικού υποδοχέα (β₂AR) που ανήκει στην οικογένεια A των GPCRs, οδηγούμαστε στο συμπέρασμα ότι η F203^{3.40} της TM3 και η L323^{6.44} της TM6 του CRF₁R, πιθανόν να σχηματίζουν μια αρωματική-αλειφατική αλληλεπίδραση στην ανενεργό κατάσταση του υποδοχέα. Παρόμοια με τον β₂AR, η ενεργοποίηση του CRF₁R, σχετίζεται με αλλαγή του προσανατολισμού της F203^{3.40} σχετικά με τη L323^{6.44}, προς κάποιο γειτονικό αρωματικό αμινοξύ με το οποίο πιθανόν να αλληλεπιδρά. Μια τέτοια αρωματική-αρωματική αλληλεπίδραση πιθανόν να σταθεροποιεί την υψηλής συγγένειας δέσμευση της σοβαγίνης της ενεργού κατάστασης του CRF₁R. Το γεγονός ότι η F203^{3.40}K μετάλλαξη δεν τροποποίησε τη δέσμευση της σοβαγίνης ενισχύει περαιτέρω την υπόθεση αυτή. Η Lys (όπως η K203^{3.40}) έχει δειχθεί ότι μπορεί να σχηματίζει κατιόν-π αλληλεπιδράσεις με αρωματικά αμινοξέα (16,17).

Παρά το γεγονός ότι η μετάλλαξη της F203^{3,40} στην υδρόφιλη Lys (F203^{3,40}K) δεν άλλαξε την ικανότητα του CRF₁R να μεταβαίνει στην ενεργό του κατάσταση, η τροποποίηση αυτή κατήργησε την δέσμευση του υδρόφοβου μη πεπτιδικού CRF ανταγωνιστή, ανταλαρμίνη στον υποδοχέα αυτόν. Παρόμοια, η μετάλλαξη F203^{3,40}A κατήργησε την ικανότητα του υποδοχέα να δεσμεύει την ανταλαρμίνη. Αντίθετα, οι υδρόφοβες υποκαταστάσεις F203^{3,40}W και F203^{3,40}I δεν μείωσαν τη δέσμευση και τις ανταγωνιστικές ιδιότητες της ανταλαρμίνης. Τα αποτελέσματα αυτά οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η F203^{3,40} αλληλεπιδρά με τους μη πεπτιδικούς CRF ανταγωνιστές, όπως παρατηρήθηκε και στη κρυσταλλική δομή του CRF₁R δεσμευμένου με τον μη πεπτιδικό ανταγωνιστή CP-376395 (13). Η αλληλεπίδραση των μη πεπτιδικών CRF ανταγωνιστών με τις TMs του CRF₁R πιθανόν να παρεμποδίζει μετατοπίσεις των περιοχών αυτών που σχετίζονται με την ενεργοποίηση του υποδοχέα.

Συμπερασματικά, η παρούσα μελέτη πρόσφερε δομικές πληροφορίες για τον CRF₁R και διαλεύκανε τους μοριακούς μηχανισμούς ενεργοποίησης του υποδοχέα και ανταγωνισμού της από τους μη πεπτιδικούς CRF ανταγωνιστές. Επιπρόσθετα στη μελέτη αυτή σχεδιάστηκαν, συντέθησαν και χαρακτηρίστηκαν φαρμακολογικά μη πεπτιδικά ανάλογα του CRF. Ανάμεσα στα 50 ανάλογα που εξετάστηκαν, τέσσερα παρουσίασαν ικανοποιητικές συγγένειες δέσμευσης για τον CRF₁R και επιλέχθηκαν ως ανάλογα «οδηγοί» με βάση τα οποία θα συντεθούν νέα μόρια. Όλα τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης θέτουν τη βάση για το σχεδιασμό νέων μη πεπτιδικών CRF₁R-εκλεκτικών ανταγωνιστών με βελτιωμένες φαρμακοδυναμικές και φαρμακοκινητικές ιδιότητες που θα εμπλουτίσουν το φαρμακευτικό οπλοστάσιο εναντίον παθήσεων στις οποίες εμπλέκεται ο CRF₁R όπως η κατάθλιψη και το άγχος.

1. Chen, R., Lewis, K. A., Perrin, M. H., and Vale, W. W. (1993) *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 8967-8971
2. Chrousos, G. P. (1998) *Ann N Y Acad Sci* **851**, 311-335
3. Kovacs, K. J. (2013) *J Chem Neuroanat* **54**, 25-33
4. Zorrilla, E. P., and Koob, G. F. (2010) *Drug Discov Today* **15**, 371-383
5. Assil-Kishawi, I., and Abou-Samra, A. B. (2002) *J Biol Chem* **277**, 32558-32561
6. Gkountelias, K., Tselios, T., Venihaki, M., Deraos, G., Lazaridis, I., Rassouli, O., Gravanis, A., and Liapakis, G. (2009) *Mol Pharmacol* **75**, 793-800

7. Liaw, C. W., Grigoriadis, D. E., Lorang, M. T., De Souza, E. B., and Maki, R. A. (1997) *Mol Endocrinol* **11**, 2048-2053
8. Gkountelias, K., Papadokostaki, M., Javitch, J. A., and Liapakis, G. (2010) *Mol Pharmacol* **78**, 785-793
9. Rasmussen, S. G., Choi, H. J., Fung, J. J., Pardon, E., Casarosa, P., Chae, P. S., Devree, B. T., Rosenbaum, D. M., Thian, F. S., Kobilka, T. S., Schnapp, A., Konetzki, I., Sunahara, R. K., Gellman, S. H., Pautsch, A., Steyaert, J., Weis, W. I., and Kobilka, B. K. (2011) *Nature* **469**, 175-180
10. Venkatakrisnan, A. J., Deupi, X., Lebon, G., Tate, C. G., Schertler, G. F., and Babu, M. M. (2013) *Nature* **494**, 185-194
11. Liapakis, G., M. Martin, and J.A. Javitch. (1999) *Current Protocols in Neuroscience* **4.15.1-4.15.10**.
12. Liapakis, G. (2014) *Curr Pharm Biotechnol* **15**, 980-986
13. Hollenstein, K., Kean, J., Bortolato, A., Cheng, R. K., Dore, A. S., Jazayeri, A., Cooke, R. M., Weir, M., and Marshall, F. H. (2013) *Nature* **499**, 438-443
14. Siu, F. Y., He, M., de Graaf, C., Han, G. W., Yang, D., Zhang, Z., Zhou, C., Xu, Q., Wacker, D., Joseph, J. S., Liu, W., Lau, J., Cherezov, V., Katritch, V., Wang, M. W., and Stevens, R. C. (2013) *Nature* **499**, 444-449
15. Park, J. H., Scheerer, P., Hofmann, K. P., Choe, H. W., and Ernst, O. P. (2008) *Nature* **454**, 183-187
16. Crowley, P. B., and Golovin, A. (2005) *Proteins* **59**, 231-239
17. Gallivan, J. P., and Dougherty, D. A. (1999) *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 9459-9464

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1 Το υποθαλαμικό πεπτιδίο CRF και διατήρηση της ομοιόστασης	1
1.2 Ο CRF εκπρόσωπος μιας οικογένειας νευροπεπτιδίων	2
1.3 Δομικά χαρακτηριστικά των πεπτιδίων της οικογένειας του CRF και βιολογική δράση τους	4
1.4 Θέσεις δέσμησης του CRF και των συγγενών του πεπτιδίων	6
1.5 Υποδοχείς του CRF και των συγγενών του πεπτιδίων	6
1.6 Σηματοδότηση υποδοχέων του CRF	9
1.7 Φυσιολογικές και παθοφυσιολογικές δράσεις του CRF	12
1.7.1 CRF και Νευροενδοκρινικό σύστημα	12
1.7.2 CRF και Ανοσοποιητικό σύστημα	14
1.7.3 CRF και Γαστρεντερικό σύστημα	15
1.7.4 CRF και Καρδιαγγειακό σύστημα	16
1.8 Ανταγωνιστές του CRF	17
1.8.1 Μη πεπτιδικοί ανταγωνιστές	17
1.8.2 Πεπτιδικοί ανταγωνιστές	18
1.9 Δομικά χαρακτηριστικά δέσμησης αγωνιστών και ανταγωνιστών του CRF	20
1.9.1 Αλληλεπίδραση μη πεπτιδικών μικρομοριακών ανταγωνιστών με τον υποδοχέα ...	20
1.9.2 Αλληλεπίδραση πεπτιδίων-υποδοχέα, σύμφωνα με το πρότυπο δέσμησης των «δυο περιοχών»	21
1.9.3 Αλληλεπίδραση πεπτιδίων-υποδοχέα, σύμφωνα με το πρότυπο «δυο-βημάτων» ..	23
1.10 Η εξωκυττάριος Ν-περιοχή των υποδοχέων του CRF	24
1.11 J-περιοχή-Διαμεμβρανικές περιοχές	28
2. ΣΚΟΠΟΣ	33

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	34
3.1 Δημιουργία μεταλλάξεων στο DNA που κωδικοποιεί τον hCRF ₁ R.....	34
3.1.1 Μεταλλαξιγένεση κατευθυνόμενης θέσης με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR - Site Directed Mutagenesis)	35
3.1.2 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.....	40
3.1.3 Ενζυμική πέψη του DNA	41
3.1.4 Συρραφή των τεμαχίων του DNA (Ligation)	43
3.1.5 Μετασηματισμός βακτηρίων DH-10b E.coli, με το πλασμιδιακό DNA που έφερε την επιθυμητή μετάλλαξη	44
3.1.6 Πολλαπλασιασμός βακτηρίων DH-10b E.coli	45
3.1.7 Ταυτοποίηση του DNA που έφερε την επιθυμητή μετάλλαξη.....	46
3.2 Καλλιέργειες ευκαρυωτικών κυττάρων.....	47
3.2.1 Καλλιέργεια κυττάρων HEK293.	47
3.2.2 Επιμόλυνση κυττάρων με πλασμιδιακό DNA και δημιουργία κυττάρων που εκφράζουν μόνιμα ή παροδικά τους υποδοχείς	48
3.2.3 Κρυοσυντήρηση και απόψυξη κυττάρων.	49
3.4 Φαρμακολογικός χαρακτηρισμός των υποδοχέων	51
3.4.1 Μελέτες συναγωνιστικής δέσμησης.....	51
3.4.2 Μέθοδος διαθεσιμότητας των κυστεϊνών-υποκαταστατών (Substituted-Cysteine Accessibility Method, SCAM)	54
3.4.3 Μέθοδος προστασίας από την αντίδραση με το MTSEA	57
3.4.4 Μελέτες μέτρησης ενδοκυττάρου κυκλικού AMP.....	59
3.5 Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων	63
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	64
4.1 Προσδιορισμός του ρόλου των αμινοξέων της τρίτης διαμεμβρανικής περιοχής (TM3) του CRF ₁ R στη δομή και λειτουργία του υποδοχέα	65
4.1.1 Δημιουργία Cys-μεταλλαγμένων υποδοχέων.	70

4.1.2 Επίδραση των Cys-μεταλλάξεων των αμινοξέων της TM3 του ΔCys στη συγγένεια δέσμευσης της Tyr ⁰ -σοβαγίνης.....	72
4.1.3 Προσδιορισμός του προσανατολισμού των αμινοξέων της TM3 του CRF ₁ R με τη μέθοδο SCAM.....	86
4.2 Ο ρόλος των F203 και G210 της TM3 στην ενεργοποίηση του CRF ₁ R.....	105
4.2.1 Μεταλλάξεις των F203 και G210.	106
4.3 Ρόλος της F203 της TM3 στη δέσμευση των μικρομοριακών αλλοστερικών ανταγωνιστών.....	130
4.3.1 WT και ανταλαρμίνη.....	131
4.3.2 F203A και ανταλαρμίνη.....	133
4.3.3 F203K και ανταλαρμίνη.....	136
4.3.4 F203I και ανταλαρμίνη.....	139
4.3.5 F203W και ανταλαρμίνη.....	142
4.4 Ανάπτυξη και φαρμακολογικός χαρακτηρισμός μη πεπτιδικών μικρομοριακών αλλοστερικών ανταγωνιστών.	146
4.4.1 Ανάλογα θειάζολο [4, 5-d] πυριμιδινών (ανάλογα 5a-5v).....	147
4.4.2 Ανάλογα πυριμιδινών (ανάλογα 1-28).	149
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	152
5.1 Λήψη δομικών πληροφοριών για τη τρίτη διαμεμβρανική περιοχή (TM3) του CRF ₁ R ..	153
5.1.1 Αρίθμηση αμινοξέων διαμεμβρανικών περιοχών.....	153
5.1.2 Εφαρμογή της μεθόδου διαθεσιμότητας υποκατεστημένων κυστεϊνών (SCAM) για λήψη δομικών πληροφοριών.....	156
5.1.3 Δομή της TM3 του CRF ₁ R.	163
5.2 Προσδιορισμός του ρόλου της TM3 στην ενεργοποίηση του CRF ₁ R.....	164
5.2.1 Η G210 ^{3,47} παίζει σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση του CRF ₁ R.....	164
5.2.2 Ο ρόλος της F203 ^{3,40} στην ενεργοποίηση του CRF ₁ R.....	166
5.2.3 Ο αλλοστερικός ρόλος της F203 ^{3,40} στη δέσμευση των πεπτιδίων.....	170

5.3 Αλληλεπίδραση μικρομοριακών προσδετών με τη TM3 του CRF ₁ R και ανταγωνισμός της ενεργοποίησης του υποδοχέα.....	171
5.4 Σχεδιασμός, σύνθεση και φαρμακολογικός χαρακτηρισμός νέων μη πεπτιδικών μικρομοριακών αναλόγων του CRF	174
5.5 Γενικό συμπέρασμα	179
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	180

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Το υποθαλαμικό πεπτίδιο CRF και διατήρηση της ομοιόστασης

Η επιβίωση εξαρτάται από την διατήρηση της ομοιόστασης, μιας σύνθετης δυναμικής ισορροπίας του οργανισμού, η οποία συνεχώς βάλλεται τόσο από εσωτερικά όσο και από εξωτερικά ερεθίσματα (στρεσογόνα ερεθίσματα) (1). Στις αρχές του 20^{ου} αιώνα ο Cannon απέδειξε πειραματικά ότι η απάντηση του οργανισμού στα στρεσογόνα ερεθίσματα, συνδέεται με την έκκριση και τη συντονισμένη δράση των κατεχολαμινών σε πολλά συστήματα του οργανισμού μας, περιγράφοντας το φαινόμενο αυτό ως την αντίδραση «πάλης ή φυγής» (fight or flight) του οργανισμού (2,3). Όμως λίγο αργότερα ο Selye, πρότεινε, ότι δεν είναι μόνο οι κατεχολαμίνες που παίζουν ρόλο στην απάντηση του οργανισμού στο στρες αλλά και τα κορτικοειδή που εκλύονται από τα επινεφρίδια υπό την επίδραση της αδρενοκορτικοτρόπου ορμόνης (ή κορτικοτροπίνης, ACTH) και κατ'επέκταση υποθαλαμικών παραγόντων/ ορμονών που ρυθμίζουν την έκκριση της ACTH από την πρόσθια υπόφυση (4-6).

Οι πρώτες υποθέσεις για τη ρύθμιση της λειτουργίας της πρόσθιας υπόφυσης από υποθαλαμικούς παράγοντες είχαν γίνει από τον Harris το 1948 (7). Οι υποθέσεις αυτές επιβεβαιώθηκαν από τους Saffran και Schally το 1955, οι οποίοι ονόμασαν τον υποθαλαμικό παράγοντα που ρύθμιζε την απελευθέρωση της ACTH, εκλυτικό παράγοντα της κορτικοτροπίνης (corticotropin releasing factor, CRF) (8). Ο εκλυτικός παράγοντας της κορτικοτροπίνης απομονώθηκε από υποθαλαμικά εκχυλίσματα προβάτων και χαρακτηρίστηκε δομικά για πρώτη φορά από τον Vale το 1981, ο οποίος έδειξε ότι είναι ένα πεπτίδιο 41 αμινοξέων (9).

Επιπρόσθετα του παρακοιλιακού, υπεροπτικού και τοξοειδή πυρήνα του υποθαλάμου (10) ο CRF εντοπίζεται και σε άλλες περιοχές του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ) καθώς και στη περιφέρεια δικαιολογώντας έτσι τις δράσεις του σε πολλά συστήματα με σκοπό τη διατήρηση της ομοιόστασης. Στο ΚΝΣ, ο CRF είναι κατανεμημένος σε πολλές περιοχές του όπως εγκεφαλικό φλοιό, ιππόκαμπο, αμυγδαλή, πυρήνα μέσης προεξοχής, παρεγκεφαλίδα και νωτιαίο μυελό (11-14). Στην περιφέρεια, εντοπίζεται σε πλήθος οργάνων όπως πνεύμονα,

καρδιά, στομάχι, δωδεκαδάκτυλο, παχύ έντερο, πάγκρεας, δέρμα και ήπαρ (15-22). Επίσης βρέθηκε σε κύτταρα Leydig όρχεων, σε αρκετές περιοχές του ενδομητρίου, στον ανθρώπινο πλακούντα, σε κύτταρα του επιθηλίου της μήτρας, καθώς και στο αμνιακό υγρό (23-26). Ο CRF έχει ακόμη ανιχνευτεί σε κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, όπως Β και Τ λεμφοκύτταρα καθώς και σε ουδετερόφιλα (27,28). Εκτός των φυσιολογικών κυττάρων βρέθηκε επίσης σε πληθώρα καρκινικών κυττάρων προερχόμενα από μαστό, πνεύμονα και θύμο αδένες (19,29,30).

1.2 Ο CRF εκπρόσωπος μιας οικογένειας νευροπεπτιδίων

Πολύ σύντομα μετά την απομόνωση του CRF από τον υποθάλαμο προβάτου, ακολούθησε ο προσδιορισμός του CRF σε διάφορα είδη θηλαστικών και μη θηλαστικών οργανισμών όπως στον επίμυ, άνθρωπο, βοοειδή, γουρούνια, βδέλλα και βάτραχο (31-37). Τα πεπτίδια CRF που απομονώθηκαν από διαφορετικά είδη διέφεραν μεταξύ τους μόνο κατά μερικά αμινοξέα, παρουσιάζοντας περισσότερο από 80% ομοιότητα στην αμινοξική τους αλληλουχία (38,39).

Όμως εκτός από τον CRF, προσδιορίστηκαν και διαφορετικά πεπτίδια τα οποία είχαν παρόμοιες ιδιότητες με εκείνες του CRF και χαρακτηρίστηκαν ως CRF-συγγενή πεπτίδια (Εικόνα 1.1). Συγκεκριμένα, απομονώθηκαν η ουροτενσίνη Ι (Urotensin Ι ή Uro1) από το *Catostomus commersoni* (είδος ψαριού) και η σοβαγίνη (Sauvagine ή SVG) από το δέρμα της *Phyllomedusa sauvegei* (είδος βατράχου) (40,41). Σχεδόν 15 χρόνια αργότερα, απομονώθηκε το γονίδιο ενός νέου CRF-συγγενούς πεπτιδίου από τον εγκέφαλο επίμυος, το οποίο ονομάστηκε ουροκορτίνη (Urocortin Ι ή Ucn1) (42). Το πεπτίδιο αυτό, είχε παρόμοιες φυσιολογικές δράσεις με εκείνες του CRF και η αμινοξική του αλληλουχία παρουσίαζε ποσοστά ομολογίας 43-45%, 53-63% και 35% με την αμινοξική αλληλουχία του CRF, της ουροτενσίνης και της σοβαγίνης αντίστοιχα (38,42-44). Η ουροκορτίνη εντοπίζεται σε διάφορες περιοχές του ΚΝΣ, όπως στους πυρήνες Edinger-Westphal και της πλάγιας ελαίας, στον υποκάμφο, στα βασικά γάγγλια, στον παρακοιλιακό πυρήνα του υποθαλάμου και στον πλάγιο υποθάλαμο (42,44-46). Το πεπτίδιο αυτό, όπως και ο CRF, εκφράζεται σε αρκετούς ιστούς στην περιφέρεια, όπως σε καρδιά, πλακούντα, έντερο, σπλήνα, προστάτη, δέρμα, θύμο αδένες, καθώς και σε όργανα του ανοσοποιητικού συστήματος (44,47).

Προσδέτης	Είδος	Αλληλουχία Αμινοξέων
CRF	Human	
	Rat	SEPPISLDLTFHLLREVLEMARAEQLAQQAHNSNRKLMIEI-NH ₂
	Mouse	
	Ovine	SQEPPIISLDLTFHLLREVLEMTKADQLAQQAHNSNRKLLDIA-NH ₂
Sauvagine (SVG)	Frog	EGPPISIDLSLELLRKMIEIEKQEKEKQQAANNRLLLDTI-NH ₂
Urotensin I (Uro1)	fish	NDDPPISIDLTFHLLRNMIEMARIENEREQAGLNRYLDEV-NH ₂
Urocortin I (Ucn1)	Human	DNPSLIDLTFHLLRTLLELARTQSQRERAEQNRIFDSV-NH ₂
	Rat	
	Mouse	DDPPLSIDLTFHLLRTLLELARTQSQRERAEQNRIFDSV-NH ₂
Urocortin II (Ucn2)	Mouse	VILSLDVPIGLLRILLEQARYKAARNQAATNAQILAHV-NH ₂
	Human	IVLSLDVPIGLLQILLEQARARAAREQATTNARILARV-NH ₂
	Rat	VILSLDVPIGLLRILLEQARNKAARNQAATNAQILARV-NH ₂
Urocortin III (Ucn3)	Human	FTLSLDVPTNIMNLLFNIAKAKNLRAQAAANAHLMAQI-NH ₂
	Mouse	
	Rat	FTLSLDVPTNIMNLLFNIDKAKNLRAKAAANAQLMAQI-NH ₂
Stressin 1	Synthetic	cyclo(31-34)[D-Phe ¹² , Nle ^{21,38} , Glu ³¹ , Lys ³⁴]Ac-hCRF (4-41) AcPPISLDLTFHLLREVLEXARAEQLAQQEHSKRKXLEI-NH ₂
Cortagine	Synthetic	[Glu ²¹ , Ala ⁴⁰][SVG(1-12)]*[h/r CRF(14-30)]*[SVG(30-40)] ZGPPISIDLSLELLREVLEMERAEQLAQQAANNRLLLDTA-NH ₂
a-helical CRF(9-41)	Synthetic	DLTFHLLREMLEMAKAEQAEQAALNRLLLEEA-NH ₂
Astressin	Synthetic	cyclo (30-33)[D-Phe ¹² , Nle ^{21,38} , Glu ³⁰ , Lys ³³]-hCRF (12-41) fHLLREVLEZARAEQLAQEAHKNRKLZEII-NH ₂
Astressin-2B	Synthetic	Ac-DLSfHXLKZIEIEKQEKEKQQAENKLLLDXI-NH ₂
Anti-sauvagine-30	Synthetic	fHLLRKMIEIEKQEKEKQQAANNRLLLDTI-NH ₂

Εικόνα 1.1 : Πεπτίδια της οικογένειας του CRF. Ac: ακετύλ, Z: Nle, f: D-Phe, X: Leu(Me), U: pGlu.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η απομόνωση ενός γονιδίου από τον εγκέφαλο επίμοι που κωδικοποιούσε ένα πεπτίδιο 38 αμινοξέων, που ονομάστηκε ουροκορτίνη II (Ucn2) και το οποίο παρουσίαζε κατά 34% και 42% ομολογία αμινοξέων με τον CRF και την Ucn1 αντίστοιχα (39,44,48). Η Ucn2 εντοπίζεται σε υποφλοιώδεις περιοχές του εγκεφάλου, όπως στον επικλινή πυρήνα του υποθαλάμου, τον υπομέλανα τόπο και τον τοξοειδή πυρήνα καθώς επίσης και στην περιφέρεια, όπου εντοπίζεται σε καρδιά, πνεύμονες, στομάχι, κύτταρα του αίματος, δέρμα και πλακούντα (44,45,49,50). Την απομόνωση του γονιδίου της Ucn2 ακολούθησε ο προσδιορισμός ενός ακόμα CRF-συγγενούς πεπτιδίου, της ουροκορτίνης III (Ucn3), τόσο στο ανθρώπινο όσο και στο γονιδίωμα μύος (51). Η Ucn3 του ανθρώπου και του μύος, παρουσιάζουν μεταξύ τους ομολογία αμινοξέων 90%, ενώ με την Ucn2 μύος 40%

(39,51). Επιπλέον η Ucn3 παρουσιάζει μικρά ποσοστά ομολογίας τόσο με την Ucn1 όσο και με τον CRF τα οποία δεν ξεπερνούν το 21% και 32% αντίστοιχα (39,51).

Παρόμοια με τον CRF, την Ucn1 και την Ucn2, η Ucn3 εντοπίζεται τόσο στο ΚΝΣ όσο και στη περιφέρεια. Έτσι στον εγκέφαλο βρίσκεται στη περιοχή του μέσου προοπτικού πυρήνα, στο οπίσθιο τμήμα του βασικού πυρήνα τελικής ταινίας και στην αμυγδαλή, ενώ στην περιφέρεια, η Ucn3 ανιχνεύεται σε καρδιά, δέρμα, θυρεοειδή αδένες, επινεφρίδια, πάγκρεας, σπλήνα, ωοθήκες και νεφρά (45,47,51-53). Στην οικογένεια του CRF συγκαταλλέγονται και μη φυσιολογικά πεπτίδια που συντέθηκαν πρόσφατα με βάση τις δομές του CRF, των ουροκορτινών και της σοβαγίνης (Εικόνα 1.1), όπως εκείνα της κορταγίνης, του α-ελικοειδή CRF (9–41), της αστρεσσίνης (cyclo (30-33) [DPhe¹², Nle^{21,38}, Glu³⁰, Lys³³] hCRF(12–41), της αστρεσσίνης-2B, της αντισοβαγίνης-30, της στρεσσίνης 1 καθώς και άλλα που αναφέρονται παρακάτω (54-59). Παράλληλα συντέθηκαν και μη πεπτιδικά, μικρομοριακά ανάλογα όπως η ανταλαρμίνη και το NBI 27914 (60,61).

1.3 Δομικά χαρακτηριστικά των πεπτιδίων της οικογένειας του CRF και βιολογική δράση τους

Τα πεπτίδια της οικογένειας του CRF αποτελούνται από ένα αμινοτελικό τμήμα (N-άκρο) και ένα καρβοξυτελικό τμήμα (C-άκρο) που ενώνονται μεταξύ τους με ένα ενδιάμεσο τμήμα το οποίο μπορεί να πάρει δομή α-έλικας (39,62). Η δομή α-έλικας είναι η δομή που λαμβάνει τόσο ο CRF όσο και τα συγγενή του πεπτίδια όταν βρίσκονται σε υδρόφοβο περιβάλλον και η οποία αποσταθεροποιείται όταν βρεθούν σε υδατικό περιβάλλον (62,63). Η ικανότητα των πεπτιδίων της οικογένειας του CRF να λαμβάνουν δομή α-έλικας σε υδρόφοβο περιβάλλον οδήγησε στην υπόθεση ότι η δέσμευσή τους σε ειδικές για αυτά θέσεις που βρίσκονται στην πλασματική μεμβράνη των κυττάρων επάγει την α-ελικοειδή στερεοδιαμόρφωσή τους, η οποία είναι και η βιολογικώς δραστική (62-64). Πράγματι, η αντικατάσταση αμινοξέων του CRF προβάτου (oCRF) με αμινοξέα που επάγουν την δομή α-έλικας είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της βιολογικής ισχύος του πεπτιδίου (65).

Ο σημαντικός ρόλος της α-ελικοειδούς δομής του CRF και των συγγενών του πεπτιδίων ενισχύθηκε ακόμη περισσότερο όταν αμινοξέα του οCRF αντικαταστάθηκαν με D-αμινοξέα, τα οποία έχει δείχθει ότι αποσταθεροποιούν την δομή α-έλικας, γεγονός που οδήγησε σε σημαντική μείωση της βιολογικής δραστηριότητας του πεπτιδίου (66-68). Ακόμη δείχτηκε ότι η α-ελικοειδής διαμόρφωση του τμήματος που συνδέει τα αμινοτελικά αμινοξέα και τα καρβοξυτελικά αμινοξέα του CRF και της Ucn 1 είναι σημαντική για τη λειτουργικότητα των πεπτιδίων (69).

Επιπρόσθετα του σημαντικού ρόλου της α-ελικοειδούς δομής του CRF και των συγγενών του πεπτιδίων, δείχτηκε ότι τα αμινοξέα του N-άκρου και του C-άκρου τους παίζουν επίσης σημαντικό ρόλο στην βιολογική τους δραστηριότητα (69,70). Τροποποιήσεις στις περιοχές αυτές οδήγησαν σε σημαντική αλλαγή των βιολογικών τους ιδιοτήτων. Συγκεκριμένα η αντικατάσταση αμινοξέων του C-άκρου του οCRF όπως η Arg35 και η Leu38 με αλανίνη, είχε ως αποτέλεσμα την σημαντική μείωση έως κατάργηση της ισχύος του πεπτιδίου αυτού να διεγείρει την απελευθέρωση της ACTH *in vitro* (71). Ακόμη η απαλοιφή των καρβοξυτελικών αμινοξέων Ile40 και Ala41 του οCRF (CRF (1-39)) οδήγησε σε δραματική μείωση της βιολογικής του ισχύος (71). Πολύ σημαντικό ρόλο όμως φάνηκε να παίζει και η αμιδιώση του τελευταίου καρβοξυτελικού αμινοξέος του οCRF, αφού αντικατάσταση της αμιδιωμένης από ελεύθερη καρβοξυλική ομάδα οδήγησε σε κατάργηση της βιολογικής ισχύος του πεπτιδίου (71).

Παρόμοια με το C-άκρο η αντικατάσταση με αλανίνη των αμινοξέων του N-άκρου του CRF είχε ως αποτέλεσμα σημαντική μείωση (Ser7, Asp9, Thr11, His13, Leu15, Arg16, Val18, Leu19), έως πλήρη κατάργηση (Ile6, Leu8, Leu10, Phe12, Leu14) της ικανότητας του να διεγείρει την απελευθέρωση της ACTH από κύτταρα της υπόφυσης *in vitro* (71). Όλα τα παραπάνω αποτελέσματα επισημαίνουν τον σημαντικό δομικό ρόλο των καρβοξυτελικών και αμινοτελικών αμινοξέων της οικογένειας των πεπτιδίων του CRF. Όλες οι μελέτες δομής-λειτουργίας του CRF που έχουν γίνει μέχρι σήμερα κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι το C-άκρο των πεπτιδίων της οικογένειας του CRF παίζει κύριο ρόλο στην αλληλεπίδραση των πεπτιδίων με ειδικές θέσεις δέσμευσής τους, ενώ το N-άκρο στην εμφάνιση βιολογικού αποτελέσματος (39).

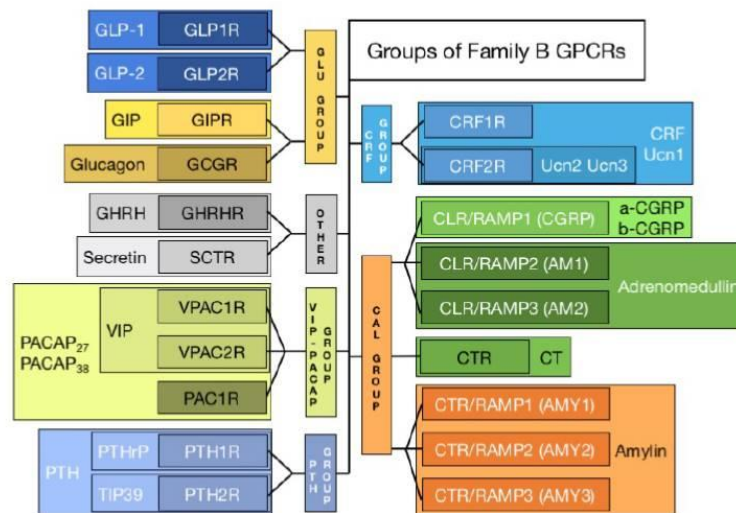
1.4 Θέσεις δέσμησης του CRF και των συγγενών του πεπτιδίων

Πολύ σύντομα μετά την απομόνωση και τον χαρακτηρισμό του CRF από τον Vale, ο Wynn και οι συνεργάτες του παρουσίασαν για πρώτη φορά την ύπαρξη ειδικών θέσεων δέσμησης για τον CRF σε μεμβρανικά παρασκευάσματα υπόφυσης επίμυος (72). Στη συνέχεια ακολούθησαν πολυάριθμες μελέτες που προσδιόρισαν την ύπαρξη ειδικών θέσεων δέσμησης για τον CRF σε διάφορες περιοχές του ΚΝΣ καθώς και στην περιφέρεια (15,73-79). Παράλληλα με τις μελέτες για την κατανομή των θέσεων δέσμησης του CRF στους διάφορους ιστούς, πολλές ερευνητικές ομάδες προσπάθησαν να προσδιορίσουν τα βιοχημικά χαρακτηριστικά αυτών των θέσεων δέσμησης. Συγκεκριμένα, βρήκαν ότι οι θέσεις δέσμησης του CRF, είναι γλυκοπρωτεΐνες της πλασματικής μεμβράνης του κυττάρου, των οποίων το μοριακό βάρος ήταν της τάξης των 40kDa-45kDa (80,81). Επίσης βρέθηκε ότι η δέσμηση του CRF στις θέσεις αυτές προκαλούσε την ενεργοποίηση ενδοκυττάρων σηματοδοτικών οδών και συγκεκριμένα εκείνης του ενζύμου της αδενυλικής κυκλάσης (AC) (80). Ακόμη βρέθηκε, ότι η ειδική δέσμηση του CRF στις θέσεις δέσμησης του, ενισχύθηκε παρουσία δισθενών ιόντων όπως το Mg^{2+} , Ca^{2+} και Mn^{2+} , ενώ αντίθετα η παρουσία του μη υδρολυόμενου παραγωγού του GTP, GTP-γS, οδήγησε σε δόσοεξαρτώμενη μείωση της υψηλής συγγένειας δέσμησης του CRF (15,80,82). Το GTP-γS δεσμεύεται μη αντιστρεπτά με τις G-πρωτεΐνες και προκαλεί την απομάκρυνσή τους από τις θέσεις δέσμησης των προσδετών-αγωνιστών, όπως του CRF, με αποτέλεσμα οι τελευταίες να δεσμεύουν με χαμηλή συγγένεια αυτούς (80). Τα παραπάνω οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι οι θέσεις δέσμησης του CRF αλληλεπιδρούν με τις G-πρωτεΐνες (82).

1.5 Υποδοχείς του CRF και των συγγενών του πεπτιδίων

Το 1993 παρουσιάζεται για πρώτη φορά από την ομάδα του Vale η κλωνοποίηση του cDNA για τον τύπο 1 υποδοχέα του CRF (CRF₁R), επιτρέποντας έτσι τον μοριακό χαρακτηρισμό των θέσεων δέσμησης του (83). Το κλωνοποιημένο cDNA κωδικοποιούσε μια πρωτεΐνη 415 αμινοξέων, η οποία ανήκει στην υπερικογένεια των υποδοχέων που συζευγνύονται με τις G-πρωτεΐνες (GPCRs) (83). Η υπερικογένεια των GPCRs αποτελείται από 5 οικογένειες, από τις οποίες η οικογένεια Β περιλαμβάνει τον CRF₁R (Εικόνα 1.2) (84,85). Μέχρι σήμερα έχουν προσδιοριστεί οκτώ ισομορφές του CRF₁R (CRF_{1α}R, CRF_{1β}R, CRF_{1c}R- CRF_{1η}R) οι οποίες έχουν

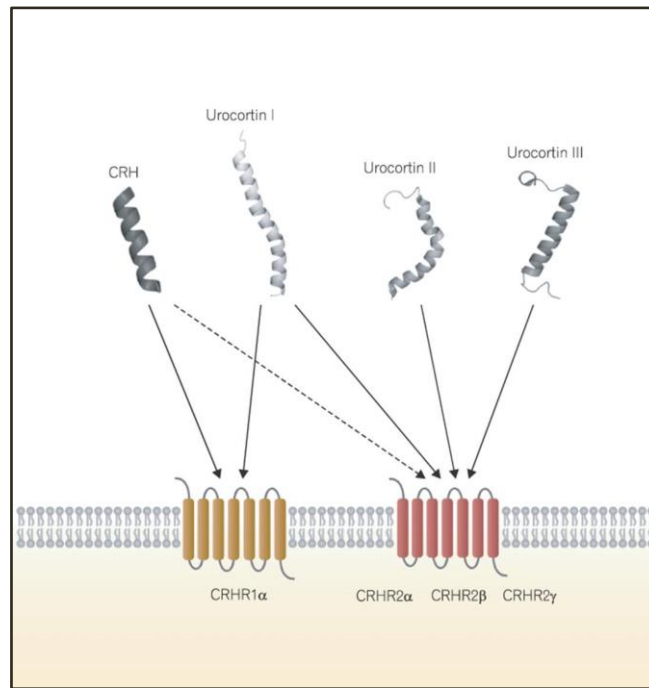
προκύψει από εναλλακτικό κόψιμο και συρραφή των εξωνίων του γονιδίου του και διαφέρουν δομικά και λειτουργικά μεταξύ τους, με την ισομορφή CRF_{1α}R (ή CRF₁R), να αποτελεί την πλήρως λειτουργική ισομορφή του υποδοχέα αυτού (38,39,44). Ο CRF₁R εντοπίζεται σε σημαντικές ποσότητες στον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης μεσολαβώντας την έκλυση της ACTH από τον CRF (44,83). Επίσης, όπως ο CRF, ο CRF₁R εντοπίζεται σε αρκετές περιοχές του ΚΝΣ όπως σε φλοιό, αμυγδαλή, παρεγκεφαλίδα, ιππόκαμπο και οσφρητικούς βολβούς (38,45,80). Στην περιφέρεια, ανιχνεύεται σε δέρμα, επινεφρίδια, ωοθήκες, όρχεις, πλακούντα, λιπώδη ιστό, σπλήνα, κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος και έντερο (44,47,86,87).



Εικόνα 1.2: Υποδοχείς της οικογένειας B των GPCRs και οι ενδογενείς προσδέτες τους (85).

Την κλωνοποίηση και τον χαρακτηρισμό του CRF₁R, ακολούθησε η απομόνωση ενός cDNA, που κωδικοποιούσε έναν δεύτερο τύπο υποδοχέα του CRF, τον CRF₂R, ή CRF_{2α}R (88). Ο CRF_{2α}R αποτελείται από 411 αμινοξέα και παρουσιάζει 70% ομολογία στην αμινοξική του αλληλουχία με τον CRF₁R (88,89). Ο CRF_{2α}R ανιχνεύεται σε διάφορες περιοχές του ΚΝΣ, όπως υποθάλαμο, ιππόκαμπο, αμυγδαλή, βασικό πυρήνα της τελικής ταινίας, οσφρητικούς βολβούς και πυρήνες της ραφής καθώς και σε ιστούς της περιφέρειας, όπως καρδιά, πνεύμονες, ωοθήκες, σκελετικούς μύες, γαστρεντερικό σύστημα, δέρμα και λιπώδη ιστό (44,45,47,88,91-98). Επιπρόσθετα βρέθηκε μια ακόμη ισομορφή του CRF₂R, ο CRF_{2β}R, που αποτελείται από 431 αμινοξέα, ενώ λίγο αργότερα προσδιορίστηκε και μια τρίτη ισομορφή, 397 αμινοξέων, ο CRF_{2γ}R (39,88,90). Αντίθετα με τις ισομορφές του CRF₁R, οι ισομορφές του CRF₂R είναι και οι τρεις λειτουργικές (38). Τέλος εντοπίστηκε και ένας τρίτος τύπος υποδοχέα του CRF (CRF₃R)

στην υπόφυση, εγκέφαλο και ουρόφυση του γατόψαρου, ο οποίος αποτελείται από 428 αμινοξέα (99). Η ύπαρξη διαφορετικών τύπων υποδοχέων στο ΚΝΣ και στη περιφέρεια και ο διαφορετικός τρόπος εντοπισμού και αλληλεπικάλυψής τους μπορεί να εξηγήσει τις πολλαπλές δράσεις του CRF και των συγγενών ενδογενών πεπτιδίων του, σε διάφορα συστήματα.



Εικόνα 1.3: Αναπαράσταση των λειτουργικών ισομορφών των υποδοχέων του CRF και των ενδογενών προσδετών τους, CRF (ή CRH), Ucn1, (ή Urocortin I), Ucn2, (ή Urocortin II) και Ucn3, (ή Urocortin III) (100).

Στην πολυπλοκότητα των δράσεων του CRF συμβάλλει και ο διαφορετικός τρόπος με τον οποίο δεσμεύονται τα διάφορα ενδογενή πεπτιδία αγωνιστές της οικογένειας του CRF στους διαφορετικούς τύπους των CRF υποδοχέων. Συγκεκριμένα ο CRF ανθρώπου/ επίμοιος (h/r CRF) και ιδιαίτερα ο oCRF δεσμεύονται με μεγαλύτερη συγγένεια στον CRF₁R από ότι στον CRF₂R (101). Αν και η ανθρώπινη Ucn1 παρουσιάζει σε σχέση με τον h/rCRF περίπου 5 φορές μεγαλύτερη συγγένεια δέσμευσης για τον CRF₁R εντούτοις δεσμεύεται στον CRF₂R με 100 φορές μεγαλύτερη συγγένεια δέσμευσης από ότι ο h/rCRF (86,102). Λαμβάνοντας υπόψη ότι η Ucn1 εκφράζεται σε περιοχές του εγκεφάλου στις οποίες εκφράζεται και ο CRF₂R, ο Vaughan και οι συνεργάτες του υπέθεσαν ότι η ουροκορτίνη είναι ο «φυσιολογικός» ενδογενής CRF₂R

αγωνιστής, ενώ ο CRF είναι ο «φυσιολογικός» ενδογενής CRF₁R αγωνιστής (42,103). Φυσιολογικοί αγωνιστές για τον CRF₂R είναι και οι Ucn2 και Ucn3 οι οποίες δεσμεύονται εκλεκτικά στον CRF₂R (39). Αντίθετα με τις Ucn2 και Ucn3, η σοβαγίνη δεσμεύεται μη εκλεκτικά και με παρόμοιες συγγένειες στους δύο τύπους CRF υποδοχέων (86,102).

Μελέτες ανάλυσης της υδροφοβικότητας των κλωνοποιημένων υποδοχέων του CRF, έδειξαν ότι αυτοί παρουσιάζουν τη χαρακτηριστική μορφολογία των GPCRs, δηλαδή επτά διαμεμβρανικές περιοχές (TMs) οι οποίες συνδέονται μεταξύ τους με τρεις εξωκυττάριους (ELs) και τρεις ενδοκυττάριους (ILs) βρόγχους (44,83,88). Επιπρόσθετα, οι υποδοχείς του CRF διαθέτουν μια εξωκυττάρια αμινοτελική περιοχή (N-περιοχή) και μια ενδοκυττάρια καρβοξυτελική περιοχή (C-περιοχή) (44,83,88,94,104,105). Όπως όλοι οι GPCRs, η δέσμευση του CRF καθώς και άλλων αγωνιστών της οικογένειας των πεπτιδίων του CRF όπως η σοβαγίνη και η ουροκορτίνες στις εξωκυττάριες περιοχές των υποδοχέων του CRF, οδηγεί στην ενεργοποίηση τους που σχετίζεται με αλλαγές της στερεοδιαμόρφωσής τους (44). Οι αλλαγές αυτές μεταφερόμενες μέσω των TMs φθάνουν έως τις ενδοκυττάριες περιοχές των υποδοχέων και είναι υπεύθυνες για την αλληλεπίδρασή τους με τις G-πρωτεΐνες και την ενεργοποίηση των τελευταίων, οδηγώντας έτσι σε ένα βιολογικό αποτέλεσμα (44).

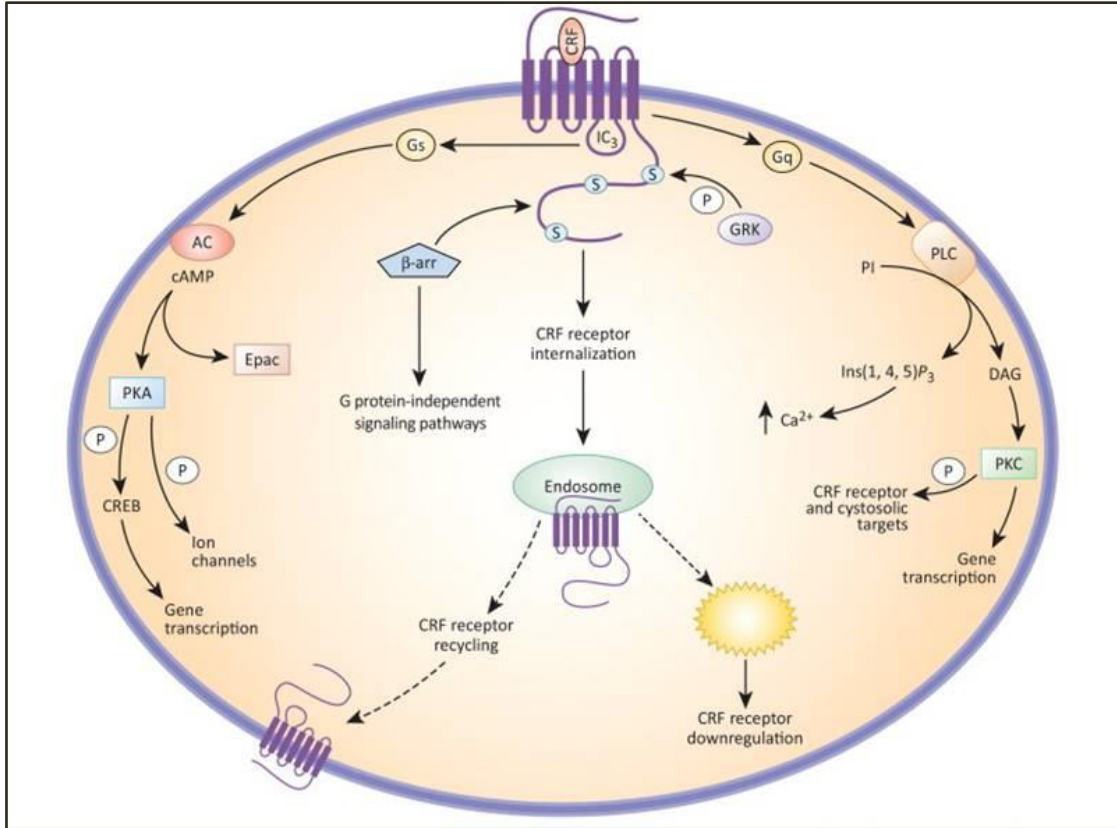
1.6 Σηματοδότηση υποδοχέων του CRF

Η ενεργοποίηση των υποδοχέων του CRF οδηγεί στην αλληλεπίδρασή τους με τις G πρωτεΐνες που αποτελούνται από τις G_α υπομονάδες και το σύμπλοκο των G_{βγ} υπομονάδων. Μελέτες, σε ιστούς από φλοιό εγκεφάλου επίμυος καθώς επίσης και σε κύτταρα HEK293 που υπερέκφραζαν τους υποδοχείς του CRF, έδειξαν ότι οι υποδοχείς αυτοί μπορούν να αλληλεπιδρούν και να ενεργοποιούν διαφορετικά είδη G_α υπομονάδων, όπως τις G_{αs}, G_{αi}, G_{αo}, G_{αq} και G_{αz} (44,106). Αρχικά η ενεργοποίηση των G_α υπομονάδων, από τους υποδοχείς του CRF, οδηγεί σε διαχωρισμό τους από το ετεροδιμερές σύμπλοκο G_{βγ}. Στη συνέχεια, οι ενεργοποιημένες G_α υπομονάδες καθώς επίσης και τα G_{βγ} ετεροδιμερή σύμπλοκα εμπλέκονται στη ρύθμιση πολλών σηματοδοτικών οδών (107,108).

Από τις διαφορετικές σηματοδοτικές οδούς, εκείνη των $G_{\alpha s}$ πρωτεϊνών είναι υπεύθυνη για τη πλειοψηφία των φυσιολογικών δράσεων του CRF και των συγγενών του πεπτιδίων, τόσο στο ΚΝΣ αλλά και στην περιφέρεια (109). Οι ενεργοποιημένες $G_{\alpha s}$ πρωτεΐνες, διεγείρουν το ένζυμο της αδενυλικής κυκλάσης (AC), με αποτέλεσμα την παραγωγή 3', 5'-κυκλικής μονοφωσφορικής αδενοσίνης (κυκλικού AMP ή cAMP), που με τη σειρά της ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση A (PKA), προκαλώντας έτσι έναν καταρράκτη φωσφορυλιώσεων και οδηγώντας σε κάποιο βιολογικό αποτέλεσμα (Εικόνα 1.4) (44,110). Η CRF₁R-διεγειρόμενη σηματοδοτική οδός cAMP/PKA επάγει ενδοκυττάρια γεγονότα όπως τη ρύθμιση της δραστηριότητας της κινάσης ERK1/2 (107,111,112). Αντίθετα η επαγόμενη διέγερση της παραγωγής cAMP από την ενεργοποίηση του CRF₁R στον υπομέλανα τόπο φάνηκε να ενεργοποιεί τη σηματοδοτική οδό Erac-ERK, με τρόπο ανεξάρτητο της PKA (113).

Επιπρόσθετα της $G_{\alpha s}$, η ενεργοποίηση των υποδοχέων του CRF μπορεί να οδηγήσει στη διέγερση των $G_{\alpha i}$ πρωτεϊνών που αναστέλλουν τη λειτουργία της AC, και των $G_{\alpha q}$ πρωτεϊνών που ενεργοποιούν τη φωσφολιπάση C (PLC) (44). Η ενεργοποιημένη PLC, υδρολύει τη διφωσφορική 4, 5-φωσφατιδυλινοσιτόλη (PIP₂) σε διακυλογλυκερόλη (DAG) και 1, 4, 5-τριφωσφορική ινοσιτόλη (IP₃). Στη συνέχεια η DAG ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση C (PKC), προκαλώντας έτσι αύξηση της πρωτεϊνικής φωσφορυλίωσης, ενώ η IP₃ συμβάλει στην απελευθέρωση Ca²⁺ από ενδοκυττάρια αποθήκες του, το οποίο παίζει επίσης ρόλο στη κυτταρική σηματοδότηση (Εικόνα 1.4) (44).

Η απελευθέρωση του Ca²⁺ από τις ενδοκυττάρια αποθήκες του μετά την ενεργοποίηση των CRF₁R και CRF₂R μπορεί να επιτευχθεί όχι μόνο μέσω διέγερσης της σηματοδοτικής οδού $G_{\alpha q}$ /PLC, αλλά και εκείνων της $G_{\beta\gamma}$ /PLC, και της κινάσης 3-φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη (PI3-K)/ PLC (107,115). Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι η CRF₁R-επαγόμενη ενεργοποίηση των σηματοδοτικών οδών της PI3-K και της PLC, καθώς επίσης και η μετακίνηση του Ca²⁺ από τις ενδοκυττάρια αποθήκες του παρόμοια με την διέγερση της $G_{\alpha s}$ σηματοδοτικής οδού, οδήγησε σε ενεργοποίηση της ERK1/2 κινάσης (107,116).

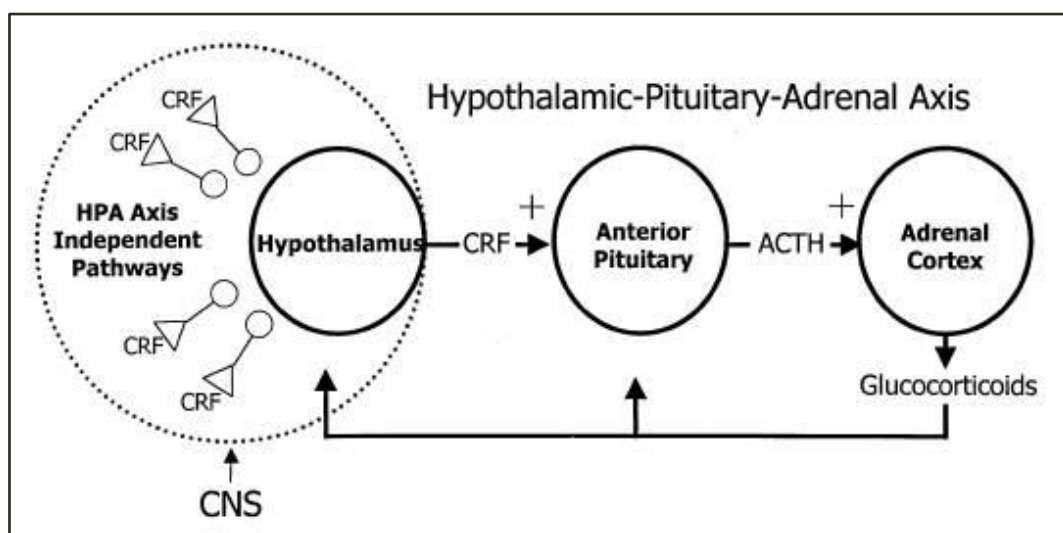


Εικόνα 1.4: Σχηματική αναπαράσταση των ενδοκυττάρων σηματοδοτικών οδών που διεγείρει η ενεργοποίηση των υποδοχέων του CRF (114).

Η ενεργοποίηση των CRF₁R και CRF₂R δεν οδηγεί μόνο στη διέγερση της ERK1/2 αλλά και της p38 MAPK που μαζί με την ERK1/2 παίζουν σημαντικό ρόλο στην κυτταρική λειτουργία (108,117). Συγκεκριμένα η CRF₁R-επαγόμενη ενεργοποίηση της p38 MAPK σε κύτταρα PC12 οδήγησε σε παραγωγή του προσδέτη Fas και σε απόπτωση (118,119). Επομένως οι υποδοχείς του CRF, αλληλεπιδρώντας με διαφορετικές G-πρωτεΐνες, μπορούν να ενεργοποιήσουν διαφορετικές κυτταρικές σηματοδοτικές οδούς και να οδηγήσουν σε πληθώρα βιολογικών αποτελεσμάτων.

1.7 Φυσιολογικές και παθοφυσιολογικές δράσεις του CRF

Ο CRF και οι ουροκορτίνες μέσω αλληλεπίδρασής τους με τους CRF₁R και CRF₂R και ενεργοποίηση διαφορετικών κυτταρικών σηματοδοτικών οδών σε διαφορετικά συστήματα, όπως ΚΝΣ, ενδοκρινικό, καρδιαγγειακό, γαστρεντερικό, ανοσοποιητικό και άλλων, ασκούν πλήθος διαφορετικών βιολογικών δράσεων, που η ενορχήστρωσή τους στοχεύει στη διατήρηση της ομοιόστασης ως απάντηση του οργανισμού στα στρεσογόνα ερεθίσματα (1,120). Τροποποίηση των CRF συστημάτων μπορεί να επηρεάσει τις φυσιολογικές λειτουργίες του οργανισμού και να οδηγήσει σε διαταραχές της ομοιόστασης και εκδήλωση παθολογικών καταστάσεων (121-130).



Εικόνα 1.5: Ο ρόλος του εκλυτικού παράγοντα της κορτικοτροπίνης (CRF) στη λειτουργία του HPA άξονα (131).

1.7.1 CRF και Νευροενδοκρινικό σύστημα

Η κυριότερη απάντηση του νευροενδοκρινικού συστήματος στο στρες πραγματοποιείται μέσω ενεργοποίησης του υποθαλαμο-υποφύσο-επινεφριδιακού άξονα (HPA axis) από τον CRF. Σε κατάσταση ηρεμίας, ο CRF συντίθεται στο παρακοιλιακό πυρήνα (PVN) του υποθαλάμου και απελευθερώνεται με παλμικό ρυθμό, στα αιμοφόρα αγγεία της πυλαίας κυκλοφορίας, ώστε να μεταφερθεί στον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης. Η

αλληλεπίδραση του CRF με τον CRF₁R που εκφράζεται στα κορτικοτρόφα κύτταρα της υπόφυσης, προκαλεί την απελευθέρωση της ACTH στη συστηματική κυκλοφορία (132). Σε κατάσταση στρες, η ποσότητα και ο ρυθμός απελευθέρωσης του CRF στην πυλαία κυκλοφορία, αυξάνονται σημαντικά με αποτέλεσμα να αυξάνεται και η έκκριση της ACTH από την υπόφυση (122,132).

Η ACTH που έχει απελευθερωθεί στην συστηματική κυκλοφορία δεσμεύεται στον τύπο 2 υποδοχέα της μελανοκορτίνης (MC2-R), του φλοιού των επινεφριδίων, διεγείροντας έτσι την σύνθεση των γλυκοκορτικοειδών (κυρίως κορτιζόλης) και την απελευθέρωσή τους στην κυκλοφορία (133). Τα γλυκοκορτικοειδή ασκούν πλειοτροπικές δράσεις αλληλεπιδρώντας με ειδικούς για αυτά ενδοκυττάριους υποδοχείς, οι οποίοι είναι ευρέως καταμεμημένοι στον οργανισμό (133). Τα γλυκοκορτικοειδή παίζουν σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση της δραστηριότητας του HPA άξονα καθώς και στον τερματισμό της απάντησης στο στρες, δρώντας σε εξωυποθαλαμικές περιοχές όπως ο υπόκαμπος, ο πρόσθιος φλοιός και η υπόφυση (133).

Εκτός της ενεργοποίησης του HPA άξονα, σημαντικό ρόλο στην απάντηση του οργανισμού σε στρεσογόνα ερεθίσματα παίζει επίσης η δράση του CRF σε πολλές περιοχές του ΚΝΣ. Τροποποίηση των CRF/CRF₁R συστημάτων στο ΚΝΣ και HPA άξονα σχετίζεται με παθοφυσιολογικές καταστάσεις όπως χρόνιο άγχος και κατάθλιψη. Έτσι ασθενείς με μελαγχολική κατάθλιψη παρουσιάζουν υπερλειτουργία του HPA άξονα, εξαιρετικά αυξημένα επίπεδα CRF στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ENY) και έντονη CRF νευροδιαβίβαση στον εγκέφαλο (134-139). Ακόμη παρατηρήθηκε ότι τα επίπεδα του CRF στο ENY ήταν υψηλότερα σε καταθλιπτικούς ασθενείς που είχαν αυτοκτονήσει, οδηγώντας έτσι στην υπόθεση ότι η αύξηση της έκκρισης CRF πιθανόν να σχετίζεται με τη βαρύτητα της νόσου (134,137,140). Επίσης σε μελέτες που πραγματοποιήθηκαν μετά τον θάνατο ασθενών με κατάθλιψη, ανιχνεύθηκε σημαντική αύξηση στα επίπεδα έκφρασης του mRNA του CRF καθώς και αυξημένοι CRF-ανοσοδραστικοί νευρώνες στον παρακοιλιακό πυρήνα του υποθαλάμου, στον προμετωπιαίο και μετωπιαίο φλοιό, στον υπομέλανα τόπο καθώς και στον ραχιαίο και μέσο πυρήνα της ραφής (134,136,141-145). Αυξημένα επίπεδα CRF στο ENY παρατηρήθηκαν επίσης σε ασθενείς με αγχώδεις διαταραχές όπως σύνδρομο ψυχαναγκασμού και διαταραχή μετατραυματικού στρες (146,147). Σε συμφωνία με τα παραπάνω, κεντρική χορήγηση CRF σε πειραματόζωα ή η υπερέκφραση του CRF σε γενετικά τροποποιημένους μύες, οδήγησε σε φαινότυπους που

προσομοιάζουν με τα συμπτώματα της κατάθλιψης και του άγχους (148-150). Επιπρόσθετα, γενετικά τροποποιημένοι μύες με ανεπάρκεια έκφρασης των γονιδίων του CRF₁R, εμφάνισαν μειωμένη απόκριση στο στρες και μειωμένο άγχος (151). Μειωμένο άγχος εμφανίστηκε επίσης σε γενετικά τροποποιημένους μύες που προέκυψαν με απαλοιφή του γονιδίου του CRF₁R σε συγκεκριμένες περιοχές του ΚΝΣ (152). Αφού λοιπόν ο CRF₁R σχετίζεται με την εμφάνιση άγχους και κατάθλιψης, ανταγωνισμός του από μη πεπτιδικούς ανταγωνιστές του CRF, που δεσμεύονται εκλεκτικά στον υποδοχέα αυτό, αναμένεται να έχουν αγχολυτικές και αντικαταθλιπτικές δράσεις, όπως και αποδείχθηκε σε πειράματα χρησιμοποιώντας πειραματόζωα (153,154).

1.7.2 CRF και Ανοσοποιητικό σύστημα

Στα στρεσογόνα ερεθίσματα που οδηγούν στην έκλυση CRF και στην ενεργοποίηση του HPA άξονα, συγκαταλλέγονται οι κυτοκίνες, που απελευθερώνονται ως απάντηση του ανοσοποιητικού συστήματος στη φλεγμονή (123,127,155). Συγκεκριμένα οι κυτοκίνες διεγείρουν την έκκριση του CRF από τον υποθάλαμο προκαλώντας έτσι σημαντική αύξηση στα επίπεδα της ACTH και της κορτιζόλης (που επίσης αυξάνονται από την απευθείας επίδραση κυτοκινών στην υπόφυση και στον φλοιό των επινεφριδίων) (121,123). Η αύξηση των επιπέδων των γλυκοκορτικοειδών έχει ως συνέπεια την καταστολή της ανοσολογικής/φλεγμονώδους απόκρισης του οργανισμού (121,123,156,157).

Εκτός από τη κεντρική αντιφλεγμονώδη δράση του μέσω ενεργοποίησης του HPA άξονα ο CRF βρέθηκε ότι ασκεί τοπική προφλεγμονώδη δράση. Συγκεκριμένα, περιφερικά εκκρινόμενο CRF, επιδρά σε κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος (123,157,158). Έτσι, οι οξείες αλλεργικές αντιδράσεις είναι πιθανό να προκαλούνται, από την επαγόμενη από τον CRF του ανοσοποιητικού συστήματος, αποκοκκίωση των ιστιοκυττάρων στους πνεύμονες ή στο δέρμα, με αποτέλεσμα την εκδήλωση άσθματος ή αλλεργικού εκζέματος αντίστοιχα (127,129,159). Παρόμοια, οι ημικρανίες πιθανόν να προκαλούνται, από την επαγόμενη από τον CRF του ανοσοποιητικού συστήματος, αποκοκκίωση των ιστιοκυττάρων στα αιμοφόρα αγγεία των μηνίγγων με αποτέλεσμα τοπική αγγειοδιαστολή και αυξημένη διαπερατότητα του αιματοεγκεφαλικού φραγμού (130).

1.7.3 CRF και Γαστρεντερικό σύστημα

Στις προσαρμοστικές αποκρίσεις του οργανισμού στο στρες εμπλέκεται επίσης και το γαστρεντερικό σύστημα (ΓΕΣ) το οποίο συνδέεται άρρηκτα με το νευρικό σύστημα. Συγκεκριμένα, τόσο η δράση (κεντρική δράση) του CRF στο νευρικό σύστημα, όσο και εκείνη τοπικά (τοπική δράση) στο ΓΕΣ, επηρεάζουν τη λειτουργία του τελευταίου (160-163). Συγκεκριμένα, έχει παρατηρηθεί ότι η κεντρική δράση του CRF προκαλεί καθυστέρηση της γαστρικής διέλευσης. Η δράση αυτή επιτελείται μέσω του αυτόνομου νευρικού συστήματος (ΑΝΣ) και όχι του HPA άξονα, καθώς η ανασταλτική περίσταλη του γαστρεντερικού σωλήνα εξακολουθεί να παρατηρείται σε πειραματόζωα στα οποία έχουν αφαιρεθεί είτε η υπόφυση είτε τα επινεφρίδια, ενώ αντίθετα, δεν παρατηρείται σε αυτά που η λειτουργία του πνευμονογαστρικού νεύρου έχει διακοπεί (164,165). Οι δομές του εγκεφάλου που ευθύνονται για την επαγόμενη από τον CRF αναστολή της γαστρικής κένωσης και κινητικότητας και επομένως τροποποίηση της λειτουργίας του ΑΝΣ είναι ο παρακοιλιακός πυρήνας του υποθαλάμου και ο πυρήνας του πνευμονογαστρικού στο εγκεφαλικό στέλεχος (166,167).

Παρόμοια με τον στόμαχο, η κεντρική χορήγηση CRF (όπως και το στρες), αναστέλλει (σε μικρότερο όμως βαθμό), την κινητικότητα του λεπτού εντέρου καθώς και τη διέλευση μέσω αυτού (168). Αντίθετα με το λεπτό έντερο και το στόμαχο, το στρες αυξάνει την κινητικότητα του παχέως εντέρου όπως έχει παρατηρηθεί τόσο σε πειραματόζωα όσο και σε ανθρώπους (163). Παρόμοια, αυξημένη κινητικότητα και επιτάχυνση της κένωσης του παχέως εντέρου έχει παρατηρηθεί σε πειραματόζωα έπειτα από κεντρική χορήγηση CRF μέσω ενεργοποίησης κυρίως των CRF₁R του εγκεφάλου (167,169,170). Όπως στον στόμαχο, έτσι και στο παχύ έντερο η επαγόμενη τόσο από το στρες όσο και από τον CRF διέγερση της κινητικότητάς του, δεν οφείλεται στην ενεργοποίηση του HPA άξονα (164).

Η λειτουργία του ΓΕΣ δεν επηρεάζεται μόνο από τις κεντρικές δράσεις του CRF αλλά και από τη τοπική δράση του πεπτιδίου στο σύστημα αυτό, μέσω αλληλεπίδρασης του και με τους δύο τύπους υποδοχέων του που εκφράζονται στο στόμαχο και το έντερο (91,161,171). Περιφερική χορήγηση του CRF σε επίμυες αναστέλλει τη γαστρική κένωση, καθυστερεί την διέλευση μέσω του λεπτού εντέρου ενώ διεγείρει τη διέλευση μέσω του παχέως εντέρου και κατά συνέπεια την κένωσή του (87,172,173). Η επιβράδυνση της γαστρικής κένωσης

μεσολαβείται μέσω των CRF₂R ενώ η διέγερση της κινητικότητας του παχέως εντέρου μέσω των CRF₁R (87,174-176).

Η σημασία του ρόλου του CRF και των υποδοχέων του στη λειτουργία του ΓΕΣ ενισχύεται από το γεγονός ότι παρατεταμένη ενεργοποίηση του CRF₁R τόσο στο κεντρικό όσο και στο περιφερικό νευρικό σύστημα, σε καταστάσεις χρόνιου στρες εμπλέκεται στην εκδήλωση παθολογικών καταστάσεων του γαστρεντερικού συστήματος όπως το πεπτικό έλκος και το σύνδρομο ευερέθιστου εντέρου (123,160,161,177). Σε συμφωνία με τα παραπάνω, γενετικά τροποποιημένοι επίμυες με ανεπάρκεια έκφρασης του γονιδίου του CRF₁R εμφάνισαν μειωμένο στρες και μειωμένη κινητικότητα του παχέως εντέρου κατά τη δοκιμασία ανοιχτού πεδίου (178). Τα ευρήματα αυτά ήταν μεγάλης σημασίας γιατί οδήγησαν στη θεραπευτική αντιμετώπιση των παραπάνω παθοφυσιολογικών καταστάσεων του ΓΕΣ, αφού χορήγηση σε πειραματόζωα CRF₁R-εκλεκτικών, μη πεπτιδικών ανταγωνιστών του CRF, μείωσε την σπλαχνική υπεραλγησία, τις εκκρίσεις και τη κινητικότητα του παχέως εντέρου (163,178-180). Ακόμη η χορήγηση πεπτιδικών CRF ανταγωνιστών (οι οποίοι δεν διαπερνούν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και έτσι δρούν περιφερικά) οδήγησε σε μείωση της κινητικότητας και των εκκρίσεων του παχέως εντέρου σε επίμυες (174,181).

1.7.4 CRF και Καρδιαγγειακό σύστημα.

Στη διατήρηση της ομοιόστασης σημαντικό ρόλο παίζει επίσης το καρδιαγγειακό σύστημα του οποίου η λειτουργία έχει δειχτεί ότι ρυθμίζεται από τον CRF τόσο κεντρικά όσο και περιφερικά. Η κεντρική ρύθμιση του καρδιαγγειακού συστήματος από τον CRF αποδείχθηκε από το γεγονός ότι χορήγηση του πεπτιδίου αυτού στην πλάγια κοιλία του εγκεφάλου επίμυων οδήγησε σε αύξηση του καρδιακού ρυθμού και της αρτηριακής πίεσης, συμπτώματα που εμφανίζονται επίσης από έκθεση του οργανισμού σε στρεσογόνα ερεθίσματα (182). Η τοπική ρύθμιση του καρδιαγγειακού συστήματος από τον CRF φάνηκε σε *in vitro* πειράματα στα οποία σε παρασκευάσματα από απομονωμένες καρδιές επίμυων, τόσο ο CRF όσο και η Ucn1, άσκησαν θετική ινότροπο δράση και προκάλεσαν παρατεταμένη αγγειοδιαστολή της στεφανιαίας αρτηρίας (183-185). Επίσης, περιφερική χορήγηση του CRF καθώς και των Ucn's προκάλεσε αγγειοδιαστολή και επακόλουθη πτώση της αρτηριακής πίεσης η οποία σε κάποιες περιπτώσεις συνοδεύτηκε από αντισταθμιστική ταχυκαρδία (186-

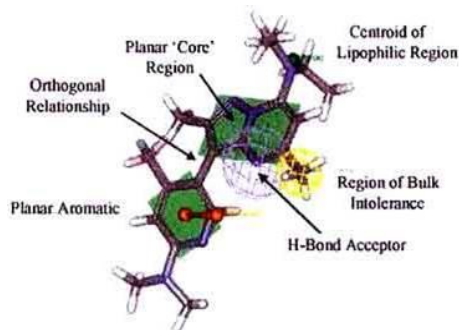
189). Η τοπική δράση του CRF και των Ucn3 στη καρδιά, οφείλεται στο γεγονός ότι τα πεπτίδια αυτά εκφράζονται στον ιστό αυτόν (190-192).

1.8 Ανταγωνιστές του CRF

Η δημιουργία ανταγωνιστών τόσο πεπτιδικών όσο και μικρομοριακών, μη πεπτιδικών, συνέβαλλε σημαντικά τόσο στην κατανόηση των μηχανισμών με τους οποίους δρούν σε διάφορα συστήματα ο CRF και οι Ucn3, όσο και στη δυνατότητα ανάπτυξης φαρμάκων για την αντιμετώπιση παθοφυσιολογικών καταστάσεων στις οποίες εμπλέκονται τα πεπτίδια αυτά (58,193).

1.8.1 Μη πεπτιδικοί ανταγωνιστές

Οι μελέτες για τον προσδιορισμό μη πεπτιδικών μικρομοριακών ανταγωνιστών των υποδοχέων του CRF ξεκίνησαν αρκετά νωρίς. Συγκεκριμένα, το 1991 δημοσιεύτηκε η πρώτη μελέτη που παρουσίαζε μια σειρά υποκατεστημένων θειοκυανικών οξο-πυραζολινών που ανταγωνίζονταν, αν και με χαμηλή συγγένεια (3-10mM), την δέσμευση του [¹²⁵I]-oCRF σε μεμβρανικά παρασκευάσματα εγκεφαλικού φλοιού επίμυος (194). Από τότε ακολούθησαν πολυάριθμες μελέτες που σχεδίασαν και συνέθεσαν μικρομοριακούς ανταγωνιστές των υποδοχέων του CRF όπως ανάλογα κινολινών και ισοκινολινών, πυριμιδινών, πυριδινών, πυράζολο-πυριμιδινών και πουρινών (195-202). Κοινό δομικό χαρακτηριστικό των μη πεπτιδικών CRF ανταγωνιστών είναι ένας κεντρικός, επίπεδος, ετεροκυκλικός δακτύλιος (Εικόνα 1.6) (39,203).



Εικόνα 1.6: Αναπαράσταση φαρμακοφόρου μικρομοριακών μη πεπτιδικών ανταγωνιστών του CRF (3-(3-πυριδυλ) πυράζολο[1, 5-α] πυριμιδίνες) (204).

Μελέτες σχέσεων δομής-δράσης (Structure-activity relationship studies ή SAR) των μη πεπτιδικών CRF ανταγωνιστών αποκάλυψε τη σημασία της παρουσίας κοινών δομικών χαρακτηριστικών, επιπρόσθετα του κεντρικού δακτυλίου τους τα οποία είναι απαραίτητα για τη δράση τους (39,203,204). Τα κοινά δομικά χαρακτηριστικά των μη πεπτιδικών ανταγωνιστών του CRF περιλαμβάνουν ένα άτομο αζώτου στον κεντρικό ετεροκυκλικό τους δακτύλιο το οποίο συμπεριφέρεται ως δέκτης δεσμού υδρογόνου, μια λιπόφιλη ομάδα στην κορυφή του δακτυλίου αυτού και έναν άρυλο- ή ετεροάρυλο δακτύλιο στο κατώτερο σημείο του, ο οποίος απέχει ένα ή δυο άτομα από το ετεροκυκλικό άτομο αζώτου (39,203). Ο σημαντικός λειτουργικός ρόλος του αζώτου του κεντρικού ετεροκυκλικού τους δακτυλίου επιβεβαιώνεται από το γεγονός ότι η μεθυλίωσή του κατήργησε την ικανότητα δέσμευσης των μη πεπτιδικών CRF ανταγωνιστών (39,205). Στη δέσμευση των ανταγωνιστών αυτών σημαντικό επίσης ρόλο παίζει ο ορθογώνιος προσανατολισμός του άρυλο- ή ετεροάρυλο δακτυλίου ως προς τον κεντρικό ετεροκυκλικό δακτύλιο (39,203). Τον εν λόγω προσανατολισμό εξασφαλίζει η παρουσία ορθο-υποκαταστάτη στον άρυλο- ή ετεροάρυλο δακτύλιο (39,203). Η όλη διάταξη μπορεί επίσης να διατηρηθεί από την παρουσία ενός άλκυλ- ή άλκοξυ υποκαταστάτη πλησίον του αζώτου του κεντρικού ετεροκυκλικού δακτυλίου (205).

1.8.2 Πεπτιδικοί ανταγωνιστές.

Το γεγονός ότι το C-άκρο των πεπτιδίων παίζει ρόλο στη δέσμευση τους στους CRF υποδοχείς ενώ το N-άκρο τους στην ενεργοποίηση των υποδοχέων και εμφάνιση βιολογικού αποτελέσματος αποτέλεσε τη βάση για τη δημιουργία των πρώτων πεπτιδικών ανταγωνιστών. Συγκεκριμένα, ο πρώτος CRF πεπτιδικός ανταγωνιστής που περιγράφηκε προήλθε από την απαλοιφή των πρώτων 8 αμινοτελικών αμινοξέων του oCRF (oCRF(9-41)) που είχε ως αποτέλεσμα την κατάργηση της ικανότητας του πεπτιδίου να διεγείρει την απελευθέρωση της ACTH από κύτταρα της υπόφυσης αλλά όχι την ικανότητα του να ανταγωνίζεται τις δράσεις του CRF (58,65). Στη συνέχεια ορισμένα αμινοξέα του oCRF(9-41) αντικαταστάθηκαν με άλλα που ευνοούν την α-ελικοειδή διαμόρφωση του με αποτέλεσμα να ενισχύσουν την ανταγωνιστική ικανότητα του πεπτιδίου (58,65). Η τροποποίηση αυτή οδήγησε στον πρώτο ευρέως χρησιμοποιούμενο ανταγωνιστή του CRF, που ονομάστηκε α-ελικοειδής CRF(9-41) (ή α-helical CRF(9-41)) (58,65). Επίσης, αντικαταστάσεις της μεθειονίνης (Met) στις θέσεις 21 και

38 του α-ελικοειδή CRF(9-41) με νορλευκίνη (Nle) που καθιστούσε το πεπτιδίο ανθεκτικό στην οξειδωση, ενίσχυσαν περαιτέρω την ανταγωνιστική ικανότητα του πεπτιδίου να αναστέλλει την επαγόμενη από τον oCRF έκκριση της ACTH από κύτταρα της πρόσθιας υπόφυσης επίμους (67).

Παρόμοια, η απαλοιφή των πρώτων 11 αμινοτελικών αμινοξέων του h/rCRF και η αντικατάσταση με Nle των αμινοξέων στις θέσεις 21 και 38 οδήγησε στην δημιουργία του ανταγωνιστή [Nle21,38] h/rCRF(12-41), ο οποίος ήταν 12 φορές ισχυρότερος από τον α-ελικοειδή CRF(9-41) (67). Περαιτέρω τροποποίηση του πεπτιδικού αυτού αναλόγου με αντικατάσταση του αμινοξέος στη θέση 12 με D-Phe, δημιουργώντας έτσι τον [D-Phe12,Nle21,38] h/rCRF(12-41) ενίσχυσε ακόμη περισσότερο την ανταγωνιστική ικανότητα του πεπτιδίου καθώς και τη διάρκεια δράσης του (67). Στη συνέχεια σε μια προσπάθεια βελτίωσης της ανταγωνιστικής ικανότητας του αναλόγου [D-Phe12,Nle21,38] h/rCRF(12-41) τα αμινοξέα στις θέσεις 30 και 33 αντικαταστάθηκαν με γλουταμικό (Glu) και λυσίνη (Lys) αντίστοιχα και ενώθηκαν μεταξύ τους μέσω ενός λακταμικού δακτυλίου οδηγώντας έτσι στη δημιουργία του αναλόγου cyclo(30-33)[D-Phe12,Nle21,38,Glu30, Lys33]h/rCRF(12-41) (55). Το ανάλογο αυτό που ονομάστηκε αστρεσσίνη δεσμευόταν τόσο στον CRF₁R όσο και στον CRF₂R και βρέθηκε ότι ήταν σημαντικά ισχυρότερο από όλους τους μέχρι τότε πεπτιδικούς ανταγωνιστές του CRF (55,180).

Στη συνέχεια ο Yamada και οι συνεργάτες του προσπάθησαν να δημιουργήσουν ανταγωνιστές αφαιρώντας σταδιακά τα αμινοξέα της αστρεσσίνης. Οι μελέτες αυτές έδειξαν ότι το μικρότερο πεπτιδίο με ιδιότητες ανταγωνιστή ήταν ένα ανάλογο 12 αμινοξέων, το cyclo(30-33)[Glu30,Lys33,Nle38]Ac-hCRF(30-41) το οποίο δεσμευόταν στον CRF₁R, με χαμηλότερη όμως συγγένεια από αυτή της αστρεσσίνης (206). Τροποποιήσεις του δωδεκαπεπτιδίου αυτού ώστε να βελτιωθούν οι φαρμακολογικές ιδιότητές του, οδήγησαν στο δωδεκαπεπτιδίο cyclo(30-33)[Glu30, Aib31, Glu32, Lys33, Cha38, Asp39]Ac-hCRF(30-41) το οποίο δεσμευόταν στον CRF₁R με παρόμοια συγγένεια δέσμευσης με αυτήν της αστρεσσίνης και η χορήγησή του σε επίμους είχε ως αποτέλεσμα σημαντική μείωση της έκκρισης της ACTH από την υπόφυση (206). Η μελέτη αυτή θεωρείται πολύ σημαντική καθώς προσδιόρισε ότι τα τελευταία 12 καρβοξυτελικά αμινοξέα του CRF αποτελούν το ελάχιστο τμήμα του πεπτιδίου που απαιτείται για τη δέσμευσή του στον CRF₁R (206).

Μελέτες ανάπτυξης νέων αναλόγων του CRF οδήγησαν σε πεπτιδία-ανταγωνιστές που εμφάνιζαν εκλεκτικότητα ως προς τη δέσμευσή τους στο CRF₂R. Ο πρώτος πεπτιδικός ανταγωνιστής που εμφάνιζε εκλεκτικότητα 100 φορές μεγαλύτερη για τον CRF₂R συγκριτικά με τον CRF₁R, ήταν το πεπτιδικό ανάλογο της σοβαγίνης [DPhe11, His12]-σοβαγίνη(11–40), που ονομάστηκε αντισοβαγίνη-30 (57). Στη συνέχεια παρατηρήθηκε ότι όταν οι πλευρικές αλυσίδες των αμινοξέων Glu32-Lys35 του hCRF και οι πλευρικές αλυσίδες των αντίστοιχων αμινοξέων της σοβαγίνης Glu31-Lys34 ενωθούν μεταξύ τους μέσω σχηματισμού ενός λακταμικού δακτυλίου, οδηγούν στη δημιουργία αναλόγων που εμφανίζουν μεγάλη εκλεκτικότητα για τον CRF₂R (56). Η παρατήρηση αυτή σε συνδυασμό με επιπλέον τροποποιήσεις στην αμινοξική αλληλουχία της σοβαγίνης, όπως απαλοιφές και αντικαταστάσεις αμινοξέων, οδήγησε στην δημιουργία του πεπτιδικού ανταγωνιστή cyclo(31–34)[DPhe11, His12, C^αMeLeu13,39, Nle17, Glu31, Lys34]Ac-σοβαγίνη(8–40), που ονομάστηκε αστρεσσίνη-2B και εμφάνιζε εκλεκτικότητα δέσμευσης στον CRF₂R (56).

1.9 Δομικά χαρακτηριστικά δέσμευσης αγωνιστών και ανταγωνιστών του CRF

1.9.1 Αλληλεπίδραση μη πεπτιδικών μικρομοριακών ανταγωνιστών με τον υποδοχέα

Η κρυσταλλική δομή του CRF₁R δεσμευμένου με τον μη πεπτιδικό ανταγωνιστή CP-376395 έδειξε ότι το μόριο αυτό δεσμεύεται στις TMs του υποδοχέα και συγκεκριμένα σε αλλοστερικές θέσεις που βρίσκονται μακριά από εκείνες (που αναφέρονται παρακάτω) που δεσμεύουν τον CRF και άλλους πεπτιδικούς αγωνιστές (207-209). Ο τρόπος αυτός δέσμευσης συμφωνεί με τα αποτελέσματα φαρμακολογικών μελετών που έδειξαν ότι οι CRF₁R-εκλεκτικοί μη πεπτιδικοί μικρομοριακοί ανταγωνιστές ανταγωνίζονται με αλλοστερικό τρόπο τη δέσμευση των πεπτιδικών αγωνιστών και έτσι την ενεργοποίηση του υποδοχέα (210).

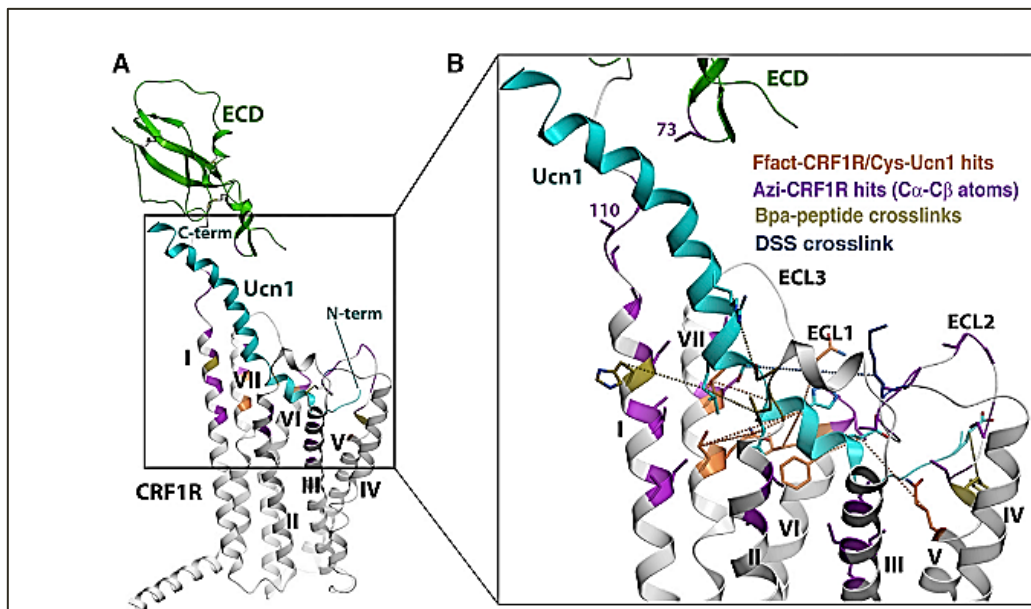
1.9.2 Αλληλεπίδραση πεπτιδίων-υποδοχέα, σύμφωνα με το πρότυπο δέσμησης των «δυο περιοχών»

Η δέσμηση του CRF και των συγγενών πεπτιδικών αγωνιστών, όπως της σοβαγίνης και των ουροκορτινών, επιτυγχάνεται με την αλληλεπίδραση των N-και C-άκρων τους στο εξωκυττάριο τμήμα των υποδοχέων τους (39). Συγκεκριμένα προτάθηκε ότι το C-άκρο των πεπτιδίων αλληλεπιδρά με την εξωκυττάριο N-περιοχή των υποδοχέων του CRF, ενώ το N-άκρο των πεπτιδίων αλληλεπιδρά με την J-περιοχή των υποδοχέων, η οποία απαρτίζεται από τα άνω τμήματα των TMs και τους εξωκυττάριους βρόγχους τους (39). Το πρότυπο αυτό αλληλεπίδρασης υποδοχέων-πεπτιδίων ονομάστηκε πρότυπο δέσμησης των «δυο περιοχών».

Μια από τις μελέτες που οδήγησαν στην διατύπωση του πρότυπου δέσμησης των «δυο περιοχών» ήταν εκείνη της Perrin και των συνεργατών της (211). Στη μελέτη αυτή έγινε αντικατάσταση της N-περιοχής του υποδοχέα του παράγοντα απελευθέρωσης της αυξητικής ορμόνης (GRF-R) με την αντίστοιχη περιοχή του CRF₁R και αντίστροφα (211). Η αντικατάσταση της N-περιοχής του GRF-R με την αντίστοιχη του CRF₁R οδήγησε στη δημιουργία ενός υποδοχέα-χίμαιρα που δέσμευε με σχετικά υψηλή συγγένεια την αστρεσσίνη, παρά το γεγονός ότι στο ανάλογο αυτό απουσιάζει το N-άκρο του CRF (211). Η αντίστροφη αντικατάσταση των N-περιοχών των 2 υποδοχέων δημιούργησε μια χίμαιρα που δεν μπορούσε να δεσμεύσει την αστρεσσίνη (211). Παρόμοια με την αστρεσσίνη, ένα πεπτιδικό ανάλογο του CRF που αποτελείται μόνο από τα τελευταία 12 καρβοξυτελικά του αμινοξέα του, το YAM19, έχει δειχθεί ότι δεσμεύεται με υψηλή συγγένεια στην εξωκυττάριο N-περιοχή του CRF₁R που είχε απομονωθεί από τον υπόλοιπο υποδοχέα (212). Τα αποτελέσματα αυτά οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι, η εξωκυττάριος N-περιοχή των υποδοχέων του CRF αλληλεπιδρά με το C-άκρο των πεπτιδίων. Κρυσταλλογραφικές μελέτες και μελέτες φασματοσκοπίας Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR) της εξωκυττάριας N-περιοχής των CRF₁R και CRF₂R επιβεβαίωσαν την αλληλεπίδραση αυτή και ταυτοποίησαν τα αμινοξέα των υποδοχέων και πεπτιδίων που αλληλεπιδρούν μεταξύ τους (213,214).

Η αλληλεπίδραση του N-άκρου του CRF και των άλλων πεπτιδίων αγωνιστών με τη J-περιοχή των υποδοχέων αποδείχτηκε σε πειράματα μεταλλαξιγένεσης και φωτοσούζευξης (215-219). Συγκεκριμένα, προηγούμενη μελέτη φωτοσούζευξης έδειξε ότι κατά τη δέσμηση της

σοβαγίνης στον CRF₁R, η Lys16 του N-άκρου του πεπτιδίου, βρίσκεται πολύ κοντά και σε απόσταση 11.4 Å από τη Lys257 του δεύτερου εξωκυττάριου βρόγχου (EL2) της J-περιοχής του υποδοχέα (215). Επιπρόσθετα, η μετάλλαξη σε αλανίνη των υδρόφοβων αμινοξέων Trp259 και Phe260 του EL2 του CRF₁R, που βρίσκονται πολύ κοντά στη Lys257, μείωσε τη δέσμευση του CRF, της σοβαγίνης και διάφορων συνθετικών αναλόγων τους (216). Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι τα αμινοξέα αυτά της J-περιοχής του υποδοχέα αλληλεπιδρούν με τα αμινοξέα του N-άκρου των πεπτιδίων και συγκεκριμένα με εκείνα που βρίσκονται στη περιοχή 8-10 των πεπτιδίων (216). Επιπρόσθετα του EL2, το άνω τμήμα της πρώτης διαμεμβρανικής περιοχής (TM1) και ο πρώτος εξωκυττάριος βρόγχος (EL1) της J-περιοχής του CRF₁R βρέθηκαν σε προηγούμενες μελέτες φωτοσύζευξης να βρίσκονται πολύ κοντά σε αμινοξέα του N-άκρου της δεσμευμένης σοβαγίνης και Ucn1 (217,218).



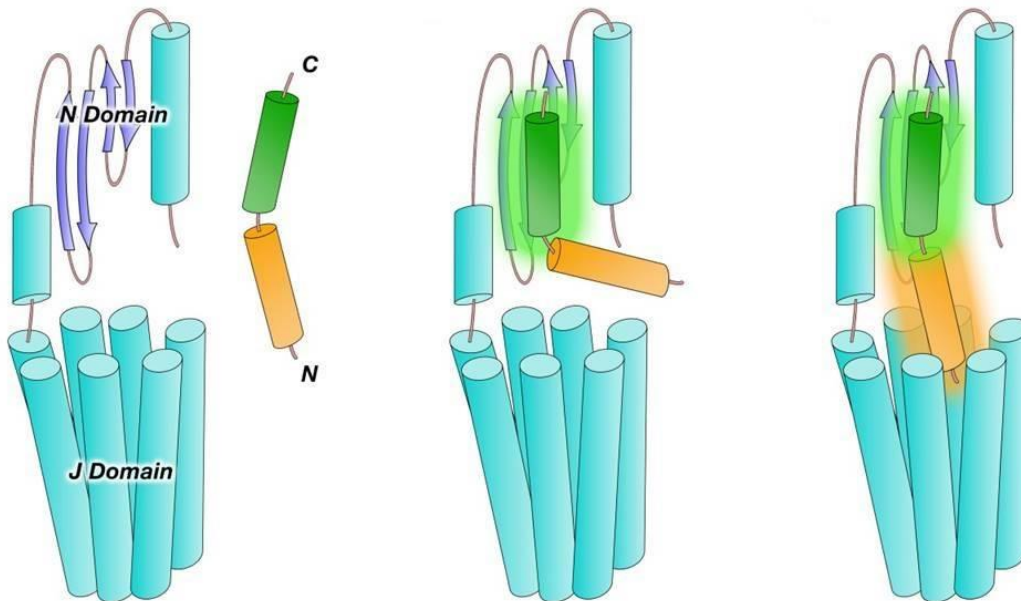
Εικόνα 1.7: Αλληλεπίδραση της Ucn1 με τον CRF₁R. Μοριακό πρότυπο που απεικονίζει τις αλληλεπιδράσεις της Ucn1 (γαλάζιο) με τη J-περιοχή (γκρι) του CRF₁R. Οι A και B απεικονίζουν αναπαριστούν το ίδιο μοριακό πρότυπο από διαφορετικές γωνίες και σε διαφορετικές μεγεθύνσεις (219).

Η μεγαλύτερη πληροφορία για την αλληλεπίδραση του N-άκρου της Ucn1 και της J-περιοχής του CRF₁R, ελήφθη σε μια πρόσφατη μελέτη στην οποία προσδιορίστηκαν με

πειράματα χημικής σύζευξης (chemical crosslinking reaction) τα πιθανά σημεία επαφής πεπτιδίου-υποδοχέα (219). Συγκεκριμένα, στη μελέτη αυτή φάνηκε ότι η Ucn1 αλληλεπιδρά με πολλά εξωκυττάρια αμινοξέα του CRF₁R, συμπεριλαμβανομένων των Trp259 και Phe260 του EL2 της J-περιοχής του υποδοχέα και πρότεινε ότι τα αμινοτελικά αμινοξέα στις θέσεις 8, 12 και 14 της Ucn1 βρίσκονται πολύ κοντά σε αμινοξέα των TM5-TM6, των TM6-TM7 και με τη Ser349 της TM7 αντίστοιχα (Εικόνα 1.7) (219).

1.9.3 Αλληλεπίδραση πεπτιδίων-υποδοχέα, σύμφωνα με το πρότυπο «δύο-βημάτων»

Η αλληλεπίδραση των υποδοχέων του CRF με τα πεπτίδια τους έχει προταθεί από φαρμακολογικές μελέτες και πειράματα NMR, ότι γίνεται σύμφωνα με το πρότυπο «δύο-βημάτων» (Εικόνα 1.8) (39,210,213,220,221). Σύμφωνα με το πρότυπο αυτό, η δέσμευση του C-άκρου των πεπτιδίων στην N-περιοχή του υποδοχέα (βήμα 1^ο) προηγείται και προσανατολίζει το N-άκρο των πεπτιδίων προς τη J-περιοχή του υποδοχέα. Στη συνέχεια (βήμα 2^ο) το N-άκρο των πεπτιδίων αλληλεπιδρά με αμινοξέα της J-περιοχής του υποδοχέα, γεγονός που οδηγεί στην ενεργοποίησή του.



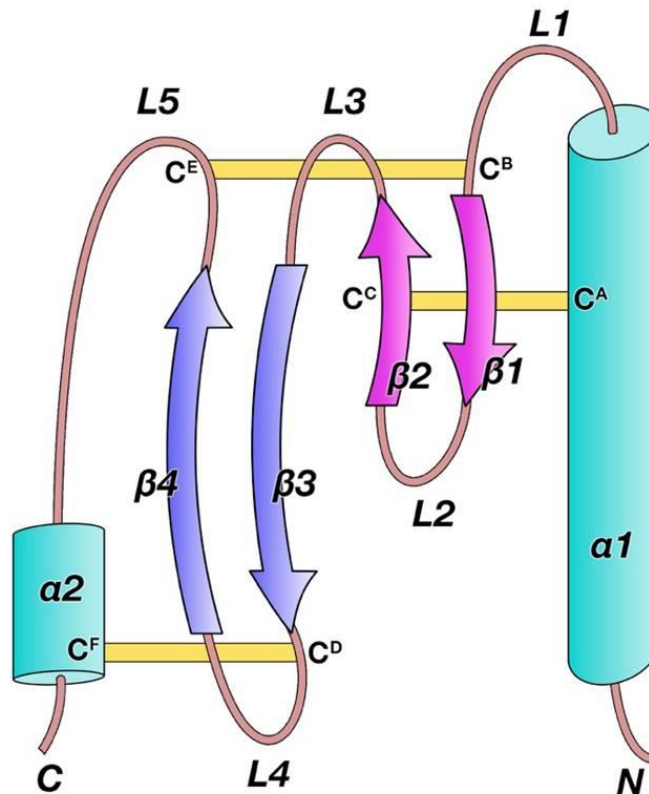
Εικόνα 1.8: Αναπαράσταση της αλληλεπίδρασης πεπτιδίου-υποδοχέα σύμφωνα με το πρότυπο των «δύο βημάτων» (85).

Με βάση το πρότυπο «δυο-βημάτων», τα πεπτίδια που στερούνται το N-άκρο του CRF, όπως η αστρεσσίνη και το YAM19 είναι ανταγωνιστές καθώς χάνουν την ικανότητα να αλληλεπιδρούν με την J-περιοχή του υποδοχέα και να τον ενεργοποιούν. Όμως, οι ανταγωνιστές αυτοί διατηρούν την ικανότητα να δεσμεύονται με υψηλή συγγένεια στην N-περιοχή του υποδοχέα και να αναστέλλουν τη δέσμευση άλλων αγωνιστών.

Το πρότυπο «δυο-βημάτων» ενισχύθηκε περισσότερο από μια μελέτη στην οποία η αντικατάσταση της N-περιοχής του CRF₁R με τα πρώτα 16 αμινοτελικά αμινοξέα του CRF (τα οποία είναι υπεύθυνα για την ενεργοποίηση του υποδοχέα), δημιούργησε τον υποδοχέα-χίμαιρα CRF(1–16)/R1ΔN, που ήταν μονίμως ενεργοποιημένος (222). Η αντικατάσταση αυτή που δημιούργησε τον CRF(1–16)/R1ΔN μιμήθηκε το 1^ο βήμα αλληλεπίδρασης πεπτιδίου-υποδοχέα φέρνοντας έτσι κοντά (βήμα 2^ο) το N-άκρο του CRF στη J-περιοχή του CRF₁R για αλληλεπίδραση μεταξύ τους και ενεργοποίηση του υποδοχέα (222). Τη μόνιμη ενεργοποίηση αυτού του υποδοχέα-χίμαιρα μπορούσε να αναστείλλει με δοσοεξαρτώμενο τρόπο, ο μη πεπτιδικός CRF ανταγωνιστής ανταλαρμίνη που έχει προταθεί ότι δεσμεύεται στις TMs του CRF₁R, αλλά όχι ο πεπτιδικός ανταγωνιστής αστρεσσίνη που δεσμεύεται την N-περιοχή του υποδοχέα και η οποία είχε αποκοπεί κατά τη δημιουργία του CRF(1–16)/R1ΔN (222).

1.10 Η εξωκυττάριος N-περιοχή των υποδοχέων του CRF

Η εξωκυττάριος N-περιοχή των υποδοχέων του CRF, έχει μελετηθεί εκτενώς δομικά, τόσο με κρυσταλλογραφικές μεθόδους όσο και με NMR (213,214,221,223,224). Η δομή της N-περιοχής του CRF₁R έδειξε ότι η περιοχή αυτή του υποδοχέα αποτελείται, από μια αμινοτελική α-ελικοειδή περιοχή (α1), η οποία ακολουθείται από δύο αντιπαράλληλες δομές β-φύλλων (β1-β2 και β3-β4) καθώς και μια καρβοξυτελική α-ελικοειδή περιοχή (α2) (214). Η δομή των β-φύλλων της N-περιοχής του CRF₁R αναγνωρίστηκε ότι έχει τη χαρακτηριστική δομή της Sushi περιοχής/ short consensus repeat (SCR), η οποία βρίσκεται σε πολλές διαφορετικές πρωτεΐνες παίζοντας σημαντικό ρόλο στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους (214,225).

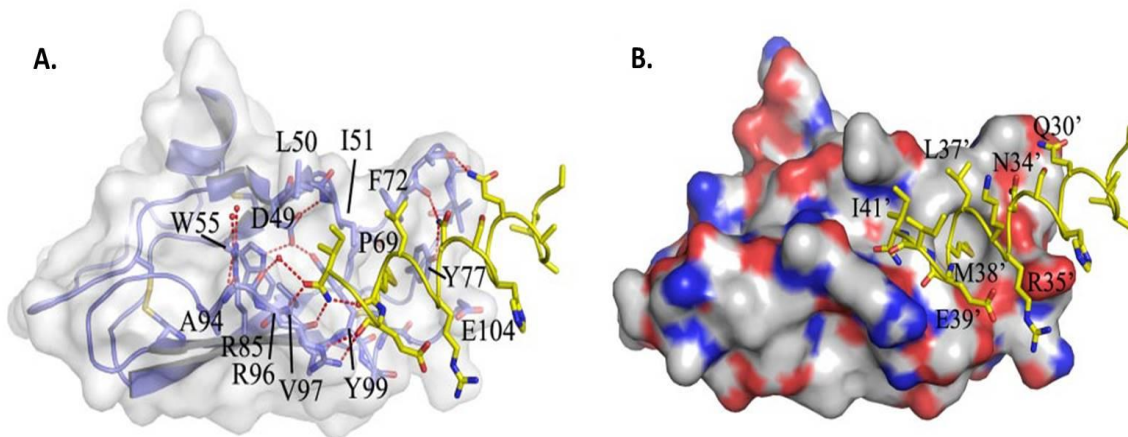


Εικόνα 1.9: Αναπαράσταση δομής της N-περιοχής του CRF₁R. Οι κυστεΐνες C^A-C^F που φαίνονται στο σχήμα συμμετέχουν σε τρεις δισουλφιδικούς δεσμούς που διατηρούνται σε όλους τους υποδοχείς της οικογένειας B των GPCRs (85).

Η διάταξη των δομικών αυτών χαρακτηριστικών της N-περιοχής των CRF υποδοχέων σταθεροποιείται με τρεις διατηρημένους δισουλφιδικούς δεσμούς μεταξύ των κυστεϊνών Cys30-Cys54 (ή C^A-C^C), Cys44-Cys87 (ή C^B-C^E) και Cys68-Cys102 (ή C^D-C^F) (Εικόνα 1.9) (214). Η σταθεροποίηση αυτή είναι ιδιαίτερα σημαντική για τη λειτουργία του υποδοχέα. Συγκεκριμένα διάσπαση των δισουλφιδικών δεσμών της N-περιοχής του CRF₁R είτε με τη χρήση DTT ή μεταλλάξεων των κυστεϊνών αυτών σε άλλα αμινοξέα οδήγησε σε σημαντική μείωση της ικανότητας του CRF να δεσμεύεται στον υποδοχέα και να τον ενεργοποιεί (226).

Η κρυσταλλική δομή της N-περιοχής του CRF₁R δεσμευμένης με πεπτιδικά ανάλογα του CRF (CRF₂₂₋₄₁ ή CRF₂₇₋₄₁), αποκάλυψε τις περιοχές αλληλεπίδρασης τους (Εικόνα 1.10) (214). Σύμφωνα με τον κρύσταλλο τα δεσμευμένα τμήματα των πεπτιδίων σχηματίζουν δομή α-

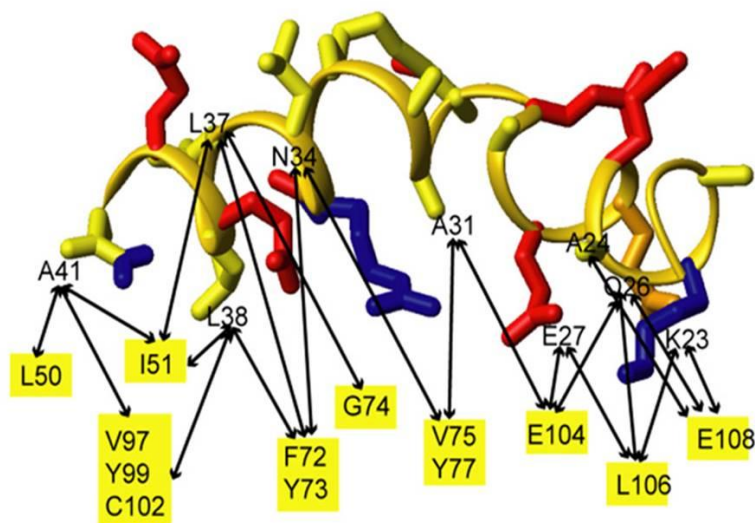
έλικας με το C-άκρο τους να αλληλεπιδρά με μια υδρόφοβη επιφάνεια της εξωκυττάρου N-περιοχής του CRF₁R, η οποία αποτελείται από τις β1-β2 περιοχές, τον βρόγχο (loop4 ή L4), τα αμινοξέα Tyr99, Pro69 και τον δισουλφιδικό δεσμό Cys68-Cys102 (214). Τα αμινοξέα των πεπτιδίων του CRF που εμπλέκονται στη δέσμευση τους με την παραπάνω περιοχή του CRF₁R είναι η Leu37, η Met38 και η Ile41 του CRF (214). Μεταξύ αυτών σημαντικότερο ρόλο φάνηκε να έχει η Met38 η οποία παρατηρείται στον κρύσταλλο να βρίσκεται βυθισμένη σε μια υδρόφοβη κοιλότητα του υποδοχέα που σχηματίζεται από την Tyr99, Cys68-Cys102, Ile51, Pro69, Phe72 και Tyr77, καθώς επίσης να σχηματίζει και ένα δεσμό υδρογόνου με το αμιδίο του C-άκρου των CRF πεπτιδίων έτσι ώστε να σταθεροποιείται η α-ελικοειδής δομή τους (214).



Εικόνα 1.10: Σχηματική αναπαράσταση της επιφάνειας αλληλεπίδρασης της N-περιοχής του CRF₁R με CRF πεπτιδία. Α) Αμινοξέα της N-περιοχής του CRF₁R που σχηματίζουν την επιφάνεια αλληλεπίδρασης υποδοχέα-πεπτιδίου, Β) αμινοξέα των CRF πεπτιδίων που εμπλέκονται στην αλληλεπίδραση υποδοχέα-πεπτιδίου (214).

Μετάλλαξη των αμινοξέων Leu37 και Met38 των CRF πεπτιδίων σε αλανίνη και τροποποίηση του καρβοξυτελικού αμιδίου της Ile41, μείωσε δραματικά την ικανότητα τους να δεσμεύονται στην N-περιοχή του υποδοχέα επιβεβαιώνοντας έτσι τον σημαντικό τους ρόλο στη δέσμευση (214). Επίσης σε μελέτη που χρησιμοποιήθηκε υποδοχέας-χίμαιρα του CRF₁R με τον τύπο 1 υποδοχέα της παραθυρεοειδούς ορμόνης (PTH₁R) προτάθηκε, ότι τα αμινοξέα ανάμεσα στη Cys68 και το Glu109 του CRF₁R παίζουν σημαντικό ρόλο στη δέσμευση (227).

Σε συμφωνία με τις κρυσταλλογραφικές μελέτες του CRF₁R, η NMR δομή της εξωκυττάρου N-περιοχής του υποδοχέα αυτού συνδεδεμένης με τον κυκλικό α-ελικοειδή CRF (ahcCRF) έδειξε ότι όπως και στην αλληλεπίδραση CRF πεπτιδίων-CRF₁R τα αντίστοιχα καρβοξυτελικά αμινοξέα Leu37, Leu38 και Ala41 του ahcCRF σχηματίζουν υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις με τα αμινοξέα Phe72, Tyr73, Tyr77, Ile51, Cys68, Pro69, Val97, Cys102 και Tyr99 του υποδοχέα (224). Επίσης, όπως η Met38 της κρυσταλλικής δομής CRF₁R-CRF πεπτιδίων έτσι και η αντίστοιχη Leu38 του ahcCRF βρίσκεται βυθισμένη στη ίδια υδρόφοβη κοιλότητα που σχηματίζεται από τα αμινοξέα Ile51, Cys68, Pro69, Phe72, Tyr77, Tyr99 και Cys102 του CRF₁R, ενώ το αμινοξύ στη θέση 41 του ahcCRF (Ala41) σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με τη Val97 του υποδοχέα (Εικόνα 1.11) (224).



Εικόνα 1.11: Σχηματική αναπαράσταση των αλληλεπιδράσεων του αγωνιστή ahcCRF με την εξωκυττάρου N-περιοχή του CRF₁R (224).

Η μεγάλη λειτουργική σημασία των Leu37, Leu38 και Ala41 των CRF πεπτιδίων επιβεβαιώνεται από το γεγονός ότι τα αμινοξέα αυτά είναι υπεύθυνα για την αλληλεπίδραση των πεπτιδίων όχι μόνο με τον CRF₁R αλλά και με τον CRF₂R. Συγκεκριμένα, τα αντίστοιχα αμινοξέα της μη εκλεκτικής αστρεσσίνης, Leu37, Ile38 και Ile41, όπως φάνηκε σε NMR μελέτες, συμμετέχουν σε υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις με κατάλοιπα της N-περιοχής του CRF₂R αντίστοιχες με εκείνες των CRF πεπτιδίων με τον CRF₁R (213,228). Όπως και στη

κρυσταλλική δομή του CRF₁R σημαντικότερο ρόλο στη δέσμευση της αστρεσσίνης με τον CRF₂R φάνηκε να παίζει εκείνο της θέσης 38 (Nle) του πεπτιδίου (213). Παρόμοιες αλληλεπιδράσεις παρατηρήθηκαν στη κρυσταλλική δομή της N-περιοχής του CRF₂R στην οποία είναι δεσμευμένη η Ucn1 της οποίας τα σημαντικά αμινοξέα είναι τα Ile37, Phe38, και Val41 που αντιστοιχούν με τα Leu37, Leu38 και Ala41, του CRF (223). Όλα τα παραπάνω αποδεικνύουν τη λειτουργική σημασία των Leu37, Leu38 και Ala41, του CRF.

1.11 J-περιοχή-Διαμεμβρανικές περιοχές

Μέχρι σήμερα έχουν παρουσιαστεί τρεις κρυσταλλικές δομές των TMs των υποδοχέων της οικογένειας B των GPCRs. Συγκεκριμένα έχουν παρουσιαστεί η κρυσταλλική δομή των TMs του ανενεργού υποδοχέα της γλυκαγόνης (GCGR), του ανενεργού GCGR δεσμευμένου με τον ανταγωνιστή MK-0893 και του ανενεργού CRF₁R δεσμευμένου με τον ανταγωνιστή CP-376395 (207-209). Οι μελέτες αυτές επιβεβαίωσαν την ύπαρξη της κοιλότητας θέσεων δέσμευσης για τους υποδοχείς της οικογένειας B, όπως παρατηρήθηκε στους υποδοχείς της οικογένειας A των GPCRs. Η ύπαρξη της κοιλότητας θέσεων δέσμευσης στον CRF₁R είχε προταθεί για πρώτη φορά το 2010 με τη μέθοδο διαθεσιμότητας κυστεϊνών-υποκαταστατών (Substituted-Cysteine Accessibility Method, SCAM) (229).

Η κοιλότητα θέσεων δέσμευσης των υποδοχέων της οικογένειας B των GPCRs που βρίσκεται ανάμεσα στις TM2-TM5 και TM1-TM6-TM7, έχει σχήμα V και είναι σε επικοινωνία με το εξωκυττάριο υγρό, επιτρέποντας έτσι την είσοδο σε αυτή των μεγάλων πεπτιδίων και την αλληλεπίδραση τους με αμινοξέα των TMs των υποδοχέων αυτών (207,209,230). Στις κρυσταλλικές δομές των CRF₁R και GCGR παρατηρείται μια έντονη προς τα έξω κλίση της TM7, η οποία δεν παρατηρείται στους GPCRs της οικογένειας A (207,209). Στον CRF₁R, η έντονη κλίση της TM7, σταθεροποιείται μέσω σχηματισμού δεσμών υδρογόνου ανάμεσα σε διατηρημένα αμινοξέα των TM1 και TM7. Το δομικό αυτό χαρακτηριστικό σε συνδυασμό με τη διαφορετική τοποθέτηση της TM6 φαίνονται να ευθύνονται για τη διευρυμένη κοιλότητα θέσεων δέσμευσης του CRF₁R συγκριτικά με τους υποδοχείς της οικογένειας A (207,231). Συγκεκριμένα, τα TM1 και TM7 αμινοξέα που συμμετέχουν στο δίκτυο δεσμών που ευθύνεται για τη έντονη κλίση της TM7 είναι τα Ser130^{1,46}, Ser353^{7,43} και Phe357^{7,47} (207,231). Ο εκθέτης κάθε αμινοξέος συμβολίζει τη διαμεμβρανική περιοχή (X) στην οποία ανήκει το αμινοξύ αυτό

(X=1-7 για τις TM1-TM7), ακολουθούμενη από έναν αριθμό. Ο αριθμός 50 αντιπροσωπεύει το αμινοξύ της κάθε TM (αα50) που διατηρείται σε όλους τους υποδοχείς της οικογένειας A. Κάθε TM έχει και ένα αα50. Η αρίθμηση αυτή έγινε σύμφωνα με τον Ballesteros και τους συνεργάτες του με τα αμινοξέα αμέσως πριν και μετά το X.50 να αριθμούνται ως X.49 και X.51 αντίστοιχα (232). Η αρίθμηση αυτή διατηρήθηκε στους υποδοχείς της οικογένειας B των GPCRs, όπως απέδειξε η παρούσα διαδακτορική διατριβή μετά από αντιστοίχιση των υποδοχέων των οικογενειών A και B με βάση τις κρυσταλλικές δομές τους (Αποτελέσματα και Συζήτηση). Η κοινή αρίθμηση των αμινοξέων των TMs των υποδοχέων διαφορετικών οικογενειών επέτρεψε τη σύγκρισή τους.

Η κρυσταλλική δομή του CRF₁R έδειξε ένα δίκτυο δεσμών γύρω από την Trp236^{4.50} της TM4. Η Trp236^{4.50} ανήκει στην αλληλουχία GWGxP (Gly235^{4.49}- Trp236^{4.50}- Gly237^{4.51}- x238^{4.52}- Pro239^{4.53}) της TM4 η οποία διατηρείται ανάμεσα στους υποδοχείς της οικογένειας B και φάνηκε να παίζει σημαντικό δομικό ρόλο σύμφωνα με τις κρυσταλλικές δομές του CRF₁R και του GCGR (207,231). Η TM4 φαίνεται να χάνει την α-ελικοειδή δομή της γύρω από την Gly235^{4.49} οδηγώντας έτσι την Trp236^{4.50} να προσανατολιστεί προς τις TM2 και TM3. Η πλευρική αλυσίδα της Trp236^{4.50} σχηματίζει έτσι δεσμούς με την Asn157^{2.52} της TM2 και την Trp205^{3.46} της TM3 (207). Η αλληλεπίδραση των TM4-TM3 ενισχύεται επιπλέον με έναν δεσμό υδρογόνου ανάμεσα στην πλευρική αλυσίδα της Tyr197^{3.38} με τη Trp236^{4.50} και με υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στη Gly235^{4.49} με τη Trp205^{3.46} και Pro239^{4.53} με την Tyr197^{3.38} (207). Οι αντίστοιχες αλληλεπιδράσεις παρατηρούνται επίσης στη κρυσταλλική δομή του GCGR, συνδέοντας μη ομοιοπολικά τις TM2, TM3 και TM4 (207,209,231). Οι αλληλεπιδράσεις λοιπόν αυτές φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της ανενεργού δομής τόσο του CRF₁R αλλά και των άλλων υποδοχέων της οικογένειας B αφού παρατηρήθηκαν στις κρυσταλλικές δομές των ανενεργών καταστάσεων τους (207-209).

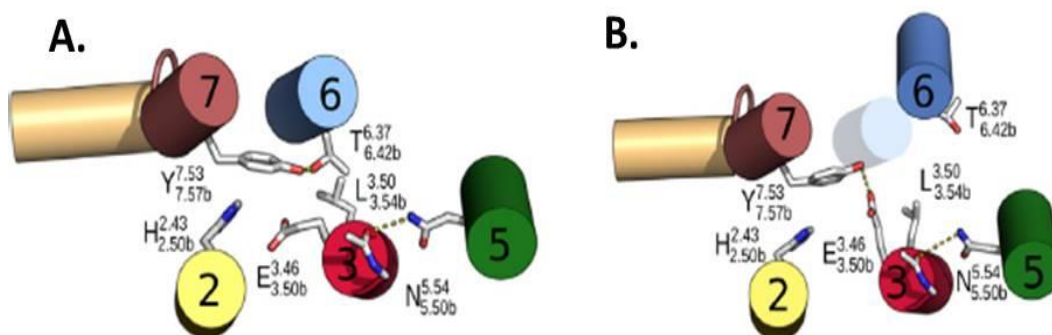
Η κρυσταλλική δομή του CRF₁R δεσμευμένου με τον μη πεπτιδικό ανταγωνιστή CP-376395, έδειξε ότι αυτός βρίσκεται βαθιά στην κοιλότητα δέσμευσης περισσότερο από κάθε άλλο μικρομοριακό προσδέτη των GPCRs αλληλεπιδρώντας με τη Asn283^{5.54}, Phe284^{5.55}, Leu287^{5.58}, Ile290^{5.61} της TM5, Thr316^{6.37}, Leu319^{6.40} και Leu320^{6.41}, Tyr327^{6.48} της TM6 και Phe203^{3.40} της TM3 (207). Η αλληλεπίδραση αυτή πιθανόν περιορίζει κινήσεις των διαμεμβρανικών περιοχών του υποδοχέα που σχετίζονται με την ενεργοποίησή του. Αντίθετα, απουσία ανταγωνιστή οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των TMs του CRF₁R που σταθεροποιούν την

ανενεργό δομή του, πιθανόν θα μπορούσαν ευκολότερα να διακοπούν οδηγώντας σε μετατοπίσεις των TMs που σχετίζονται με την ενεργοποίηση του υποδοχέα. Η θεωρία αυτή επιβεβαιώνεται από τα ευρήματα της κρυσταλλικής δομής του GCGR δεσμευμένου με τον μικρομοριακό ανταγωνιστή MK-0893 (208). Ο μικρομοριακός αυτός ανταγωνιστής αλληλεπιδρά με αμινοξέα των TM5, TM6 και TM7 που όμως βρίσκονται εκτός της υδρόφιλης κοιλάτητας θέσεων δέσμευσης του υποδοχέα, προσανατολισμένα προς το λιπιδικό περιβάλλον της πλασματικής μεμβράνης (208). Ο τρόπος αυτός δέσμευσης του MK-0893 παρεμποδίζει κινήσεις της TM6 που την απομακρύνουν από τις άλλες TMs του υποδοχέα και έχουν σχέση με την ενεργοποίηση του. Παρόμοια, ο αλλοστερικός ανταγωνιστής του υποδοχέα P2Y1 των πουρινών βρέθηκε ότι δεσμεύεται στις TMs του υποδοχέα εκτός της κοιλάτητας θέσεων δέσμευσης του, παρεμποδίζοντας κινήσεις της TM3 (233-235).

Η άποψη ότι οι TMs μετακινούνται κατά την ενεργοποίηση των υποδοχέων της οικογένειας B των GPCRs επιβεβαιώνεται στη μελέτη του Sheikh και των συνεργατών του (236). Η μελέτη αυτή έδειξε ότι ενεργοποίηση του υποδοχέα της παραθυρεοειδούς ορμόνης (PTHr) με αποτέλεσμα τη διέγερση των G-πρωτεϊνών σχετίζεται με κινήσεις των κυτταροπλασματικών τμημάτων των TM3 και TM6 του υποδοχέα που απομακρύνουν τη μια από την άλλη, ενώ στην ανενεργό δομή του βρίσκονται η μια κοντά στην άλλη (236). Αντικατάσταση των αμινοξέων των περιοχών αυτών με His και αλληλεπίδραση τους με Zn^{2+} εμπόδισε τις κινήσεις των TM3 και TM6 με αποτέλεσμα ο υποδοχέας να μην μπορεί να διεγείρει τις G-πρωτεΐνες (236). Στη ίδια μελέτη βρέθηκε επίσης ότι παρόμοιες κινήσεις των TM3 και TM6 παρατηρούνται στον β_2 -AR, οδηγώντας έτσι στο συμπέρασμα ότι υποδοχείς από διαφορετικές οικογένειες GPCRs (A και B) έχουν παρόμοιους μηχανισμούς ενεργοποίησης (236). Στις κινήσεις των TM3 και TM6 που παρατηρήθηκαν κατά την ενεργοποίηση του β_2 -AR σημαντικό ρόλο έπαιξε η διάσπαση ενός δικτύου δεσμών μεταξύ τριών φορτισμένων αμινοξέων των κυτταροπλασματικών άκρων των TM3 και TM6 (237). Συγκεκριμένα, τα αμινοξέα αυτά είναι μια θετικά φορτισμένη Arg ($R^{3.50}$), ένα αρνητικά φορτισμένο Asp ($D^{3.49}$) στη TM3 και ένα αρνητικά φορτισμένο Glu ($E^{6.30}$) στη TM6 (237). Από τα αμινοξέα αυτά εκείνο που αντιστοιχεί στη $R^{3.50}$ της TM3 δεν υπάρχει στους υποδοχείς της οικογένειας B. Όμως έχει προταθεί σε μια μελέτη του υποδοχέα του προσομοιάζοντος με τη γλυκαγόνη πεπτιδίου 1 (glucagon-like peptide 1 receptor, ή GLP-1R) ότι το ρόλο του $R^{3.50}$ παίζει η $H180^{2.50}$ στην TM2 (238). Συγκεκριμένα στη μελέτη αυτή προτάθηκε ότι τα αμινοξέα $H180^{2.50}$ της TM2, $E247^{3.50}$ της TM3 και $T353^{6.42}$ της TM6, εμπλέκονται στο σχηματισμό ενός δικτύου δεσμών, αντίστοιχο με

εκείνον μεταξύ των D^{3.49} - R^{3.50} - E^{6.30} που σταθεροποιεί τον υποδοχέα στην ανενεργό κατάστασή του (238). Μεταλλάξεις των H^{2.50} και T^{6.42} στον PTHR και στον υποδοχέα της σεκρετίνης καθώς και της H^{2.50} του τύπου 1 υποδοχέα του εντερικού αγγειοδραστικού πεπτιδίου (VPAC1R), οδήγησαν σε μόνιμα ενεργοποιημένους υποδοχείς (238-242).

Οι κινήσεις των TMs των υποδοχέων της οικογένειας A, καταγράφηκαν με τη σύγκριση δύο κρυσταλλικών δομών του β₂AR, που αναπαριστούν μια ανενεργή και μια ενεργή κατάστασή του (243). Στη μελέτη αυτή βρέθηκε ότι η ανενεργός κατάσταση του υποδοχέα σταθεροποιείται με αλληλεπιδράσεις μεταξύ των TM3, TM5, TM6 και TM7 και συγκεκριμένα μεταξύ των Pro211^{5.50}, Ile121^{3.40}, Phe282^{6.44} και Asn318^{7.45} (243). Ενεργοποίηση του υποδοχέα σχετίζεται με μετατόπιση της TM5 προς τις άλλες TMs του υποδοχέα καθώς και με αλλαγή των προσανατολισμών των Ile121^{3.40} και Phe282^{6.44} που σχετίζεται με περιστροφή της TM6 γύρω από τη Phe282^{6.44}. Οι δομικές αυτές αλλαγές του β₂AR οδηγούν σε μια κίνηση του κυτταροπλασματικού άκρου της TM6 που το απομακρύνει από τις άλλες TMs του υποδοχέα (243). Όπως στον β₂AR, έτσι και στους υποδοχείς της οικογένειας B οι TM3, TM5, TM6 και TM7 παίζουν σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίησή τους. Συγκεκριμένα η Tyr^{7.53} της TM7 βρέθηκε ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση του υποδοχέα του GLP-1 και του υποδοχέα του γλυκοζοεξαρτώμενου ινσουλινοτροπικού πολυπεπτιδίου (glucose dependent insulinotropic polypeptide receptor ή GIPR) (238,244). Επίσης ο Cordomi και οι συνεργάτες του, πολύ πρόσφατα προσδιόρισαν δίκτυα δεσμών που παίζουν ρόλο στην ενεργοποίηση του GIPR (244). Συγκριμένα, στα δίκτυα αυτά συμπεριλαμβανόταν ένα που συνδέει τη TM6 με τις TM2 και TM7 και ένα μεταξύ της TM3 και TM7 (Εικόνα 1.12).



Εικόνα 1.12: Μοριακά πρότυπα που αναπαριστούν τις δομικές αλλαγές που συμβαίνουν κατά την ενεργοποίηση του GIPR. Στα πρότυπα αυτά απεικονίζονται οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ TM αμινοξέων στην ανενεργό (A) και ενεργό (B) κατάσταση του GIPR (244).

Οι σχετιζόμενες με την ενεργοποίηση των υποδοχέων δομικές αλλαγές των TMs μεταφέρονται στις ενδοκυττάρια περιοχές του και είναι υπεύθυνες για την αλληλεπίδραση των υποδοχέων με τις G-πρωτεΐνες και διέγερση των τελευταίων. Συγκεκριμένα, πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι ο τρίτος ενδοκυττάριος βρόγχος (IL3) του CRF₁R και ιδιαίτερα η σερίνη στη θέση 301, εμπλέκεται στην αλληλεπίδραση του υποδοχέα με τις G-πρωτεΐνες (245).

Επιπρόσθετα, η καρβοξυτελική ενδοκυττάρια περιοχή των υποδοχέων του CRF παίζει σημαντικό ρόλο στην σηματοδότηση του υποδοχέα. Συγκεκριμένα, η απουσία δεκατεσσάρων αμινοξέων στην TM7 που παρατηρείται στην ισομορφή CRF_{1d}R έχει προταθεί ότι σχετίζεται με αλλαγή της στερεοδιαμόρφωσης/ή και του προσανατολισμού της καρβοξυτελικής περιοχής του υποδοχέα που έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της ενεργοποίησης της G πρωτεΐνης (246).

2. ΣΚΟΠΟΣ

Ο CRF₁R ανήκει στην οικογένεια Β των υποδοχέων που συζευγνύονται με τις G πρωτεΐνες (GPCRs) (83). Όπως όλοι οι GPCRs, έτσι και ο CRF₁R αποτελείται από επτά διαμεμβρανικές περιοχές (TMs). Από αυτές η τρίτη TM (TM3) παίζει σημαντικό δομικό-λειτουργικό ρόλο σε πλήθος GPCRs, δεσμεύοντας διάφορους προσδέτες και συμβάλλοντας στους μηχανισμούς ενεργοποίησής τους, αλληλεπιδρώντας με αμινοξέα άλλων TMs και με τις G-πρωτεΐνες (247). Η σύγκριση της TM3 του CRF₁R με εκείνες διαφορετικών GPCRs, των οποίων οι κρυσταλλικές δομές είναι γνωστές, μας οδήγησε στην υπόθεση ότι η TM3 του CRF₁R παίζει σημαντικό ρόλο στην δομή και ενεργοποίηση του υποδοχέα καθώς και στην αλληλεπίδρασή του με μικρομοριακούς μη πεπτιδικούς προσδέτες. Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι να επαληθεύσει την υπόθεση αυτή, στοχεύοντας:

- Στη λήψη πληροφοριών για τη δομή της TM3 του CRF₁R.
- Στον προσδιορισμό του ρόλου των αμινοξέων της TM3 στην ενεργοποίηση του υποδοχέα.
- Στον προσδιορισμό των αμινοξέων της TM3 που αλληλεπιδρούν με μικρομοριακούς μη πεπτιδικούς αλλοστερικούς ανταγωνιστές και το ρόλο των αλληλεπιδράσεων αυτών στην ενεργοποίηση του υποδοχέα.
- Στο σχεδιασμό, σύνθεση και φαρμακολογικό χαρακτηρισμό μη πεπτιδικών μικρομοριακών αναλόγων του CRF.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Δημιουργία μεταλλάξεων στο DNA που κωδικοποιεί τον hCRF₁R

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή χρησιμοποιήσαμε το DNA του ανθρώπινου CRF₁R (άγριος τύπος ή WT) καθώς και τη μεταλλαγμένη μορφή του CRF₁R-ΔCys (ΔCys) που δημιουργήθηκε στο εργαστήριο του επιβλέποντα Καθηγητή της διατριβής Γ. Λιαπάκη από το Δρ. Κ. Γκουντέλια και η οποία προέκυψε από την ταυτόχρονη μετάλλαξη των ελεύθερων ενδογενών κυστεϊνών (C ή Cys) του CRF₁R σε σερίνη (S ή Ser) (C128S, C150S, C211S, C233S, C364S). Τα παραπάνω DNA βρίσκονται στο πλασμίδιο pcin4 (CRF₁R-WT / pcin4 και CRF₁R-ΔCys / pcin4) το οποίο περιέχει το γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη που προσδίδει αντοχή στο κύτταρο για το αντιβιοτικό γενετισίνη με σκοπό την επιλογή κυττάρων που εκφράζανε μόνιμα το DNA του ανθρώπινου CRF₁R ή των μεταλλαγμένων μορφών του. Συγκεκριμένα, συνεχίζοντας την εργασία του Δρ. Γκουντέλια μεταλλάξαμε τα αμινοξέα της τρίτης διαμεμβρανικής περιοχής (TM3) του ΔCys σε κυστεΐνες, ένα την κάθε φορά, δημιουργώντας με τον τρόπο αυτό τους μεταλλαγμένους υποδοχείς ΔCys+F207C, ΔCys+G208C, ΔCys+E209C, ΔCys+G210C. Ακόμη μεταλλάξαμε το αμινοξύ φαινυλαλανίνη στη θέση 203 (F203) της TM3 του WT σε αλανίνη (A ή Ala), λυσίνη (K ή Lys), ισολευκίνη (I ή Ile) και τρυπτοφάνη (W ή Trp) δημιουργώντας με τον τρόπο αυτό τους μεταλλαγμένους υποδοχείς F203A, F203K, F203I και F203W αντίστοιχα.

Επιπρόσθετα πραγματοποιήθηκαν μεταλλάξεις και στην θέση 210 της TM3 του ΔCys. Συγκεκριμένα μεταλλάξαμε το αμινοξύ γλυκίνη στην θέση 210 (G210) της TM3 σε αλανίνη, δημιουργώντας έτσι τον μεταλλαγμένο υποδοχέα ΔCys+G210A. Οι παραπάνω μεταλλάξεις επιτεύχθηκαν με τη μέθοδο μεταλλαξιγένεσης κατευθυνόμενης θέσης με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) (PCR site-directed mutagenesis) αντικαθιστώντας τα νουκλεοτίδια εκείνα που κωδικοποιούσαν τα εκάστοτε προς μετάλλαξη αμινοξέα X, με εκείνα που κωδικοποιούσαν τα επιθυμητά αμινοξέα. Στη συνέχεια χρησιμοποιώντας τεχνικές μοριακής βιολογίας, όπως ηλεκτροφόρηση του DNA σε πήκτωμα αγαρόζης, απομόνωση του επιθυμητού τεμαχίου DNA από το πήκτωμα, ενζυμική πέψη, συρραφή του, μετασχηματισμός του σε βακτήρια *E. coli*, DH-10b, και απομόνωσή του από τα εν λόγω βακτήρια,

δημιουργήσαμε το πλασμιδιακό DNA CRF₁R / rcin4 ή CRF₁R -ΔCys / rcin4 που φέρει την επιθυμητή μετάλλαξη η οποία παράλληλα αφαιρούσε ή πρόσθετε μια θέση ενζυμικής πέψης (CRF₁R -mutant/rcin4).

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

Η μέθοδος της μεταλλαξιγένεσης κατευθυνόμενης θέσης με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR - Site Directed Mutagenesis) αποτελεί μια ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδο μοριακής βιολογίας για την εισαγωγή επιθυμητών αλλαγών στην αλληλουχία του DNA ενός γονιδίου. Με τη μέθοδο αυτή μεταλλάξαμε τα νουκλεοτίδια του DNA, που κωδικοποιούσαν τα υπό μελέτη αμινοξέα του CRF₁R σε άλλα, έχοντας ως εκμαγείο το πλασμιδιακό DNA που κωδικοποιούσε τον CRF₁R-WT/rcin4 ή τον CRF₁R-ΔCys/rcin4 και κατάλληλα σχεδιασμένα ολιγονουκλεοτίδια που χρησίμευαν ως εκκινητές (εκκινητές γονιδίου ή primers), εκ των οποίων οι δυο ήταν συμπληρωματικοί μεταξύ τους (sense-antisense) και περιείχαν την επιθυμητή μετάλλαξη (εκκινητές μετάλλαξης). Συγκεκριμένα, το πλασμιδιακό DNA που κωδικοποιεί τον WT (CRF₁R-WT/rcin4) χρησιμοποιήθηκε ως εκμαγείο για τις μεταλλάξεις F203A, F203K, F203I και F203W, ενώ το πλασμιδιακό DNA που κωδικοποιεί τον ΔCys (CRF₁R-ΔCys /rcin4) χρησιμοποιήθηκε ως εκμαγείο για τις μεταλλάξεις F207C, G208C, E209C, G210C και G210A.

Ο σχεδιασμός των εκκινητών της μετάλλαξης έγινε με μεγάλη προσοχή, έτσι ώστε ο εκκινητής και το εκμαγείο (πλασμιδιακό DNA CRF₁R-WT /rcin4 ή CRF₁R-ΔCys/rcin4) να υβριδοποιούνταν σε ικανοποιητικό βαθμό ώστε να πραγματοποιηθεί η αντίδραση πολυμεράσης παρά την ύπαρξη των νουκλεοτιδίων της μετάλλαξης τα οποία δεν ήταν συμπληρωματικά με εκείνα του εκμαγείου. Κατά το σχεδιασμό των εκκινητών που περιείχαν τη μετάλλαξη φροντίσαμε τα νουκλεοτίδια που κωδικοποιούσαν τη μετάλλαξη να βρίσκονται στο μέσο του εκκινητή, τα 3' άκρα του κάθε εκκινητή έπρεπε να είχαν τις βάσεις G ή C καθώς και το ποσοστό των βάσεων GC σε κάθε εκκινητή να προσέγγιζε το 50% του συνόλου των νουκλεοτιδίων του εκκινητή. Άλλες παράμετροι όπως η θερμοκρασία τήξης (T_m), η απουσία hairpin loops και παλίνδρομων αλληλουχιών ελήφθησαν επίσης υπόψιν κατά τον σχεδιασμό των εκκινητών.

Υλικά - συσκευές

- Ένζυμο πολυμεράση: pfu DNA polymerase (Fermentas, USA).
- Διάλυμα ολιγονουκλεοτιδίων: dNTPs σε συγκέντρωση 2,5 mM (Fermentas, USA).
- Ρυθμιστικό διάλυμα πολυμεράσης: pfu buffer 10X (Fermentas, USA).
- Δείκτης γνωστού μοριακού βάρους: (Fermentas, USA).
- Αυτόματος Θερμικός Κυκλοποιητής PCR (Perkin Elmer PCR System 2400, USA).
- Συσκευή οριζόντιας ηλεκτοφόρησης Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA).
- Εκκινητές από τις εξής εταιρείες: VBC-GENOMICS BIOSCIENCE Research GmbH, Austria και Invitrogen, USA. VH Bio Ltd, UK.

Εκκινητές γονιδίου CRF₁R (primers):

Sense pcDNA4 - 800: 5' - GCGTGTACGGTGGGAGG - 3'

Antisense APAN4: 5'- GCAGACAGCGAATTAATTCCAGC -3'

Για τη μετάλλαξη F207C

Sense F207C: 5'- CCATGTGACGAATTTCTTCTGGATGTGCGGCGAGGGC -3'

Antisense F207C: 5'- GCCCTCGCCGCACATCCAGAAGAAATTCGTCACATGG -3'

Για τη μετάλλαξη G208C

Sense G208C: 5'- CTGGATGTTCTGTGAAGGGTCCTACCTGC-3'

Antisense G208C: 5'- GCAGGTAGGACCCTTCACAGAACATCCAG -3'

Για τη μετάλλαξη E209C

Sense E209C: 5'-GATGTTCCGGCTGTGGTAGTTACCTGCACA -3'

Antisense E209C: 5'- TGTGCAGGTAACCTACCACAGCCGAACATC -3'

Για τη μετάλλαξη G210C

Sense G210C: 5'- GTTCGGCGAGTGTTCCTACCTGCAC -3'

Antisense G210C: 5'- GTGCAGGTAGGAACACTCGCCGAAC -3'

Για τη μετάλλαξη G210A

Sense G210A: 5'-GTTCCGGCGAGGCATCCTACCTG -3'

Antisense G210A: 5'-CAGGTAGGATGCCTCGCCGAAC -3'

Για τη μετάλλαξη F203A

Sense F203A: 5'-GTGACCAACGCATTCTGGATGTTTCG- 3'

Antisense F203A: 5'- CGAACATCCAGAATGCGTTGGTCAC -3'

Για τη μετάλλαξη F203K

Sense F203K: 5'- GTGACCAACAAATTCTGGATGTTTCG - 3'

Antisense F203K: 5'- CGAACATCCAGAATTTGTTGGTCAC -3'

Για τη μετάλλαξη F203I

Sense F203I: 5- CTTCCATGTGACGAATATCTTCTGGATG -3'

Antisense F203I: 5'- CATCCAGAAGATATTCGTCACATGGAAG -3'

Για τη μετάλλαξη F203W

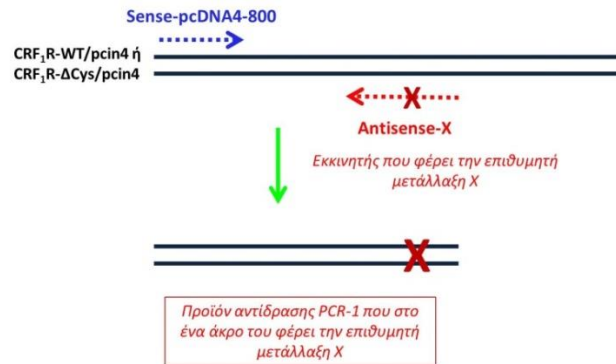
Sense F203W: 5'- CCATGTGACGAACTGGTTCTGGATG -3'

Antisense F203W: 5'- CATCCAGAACCAGTTCGTCACATGG -3'

Μέθοδος

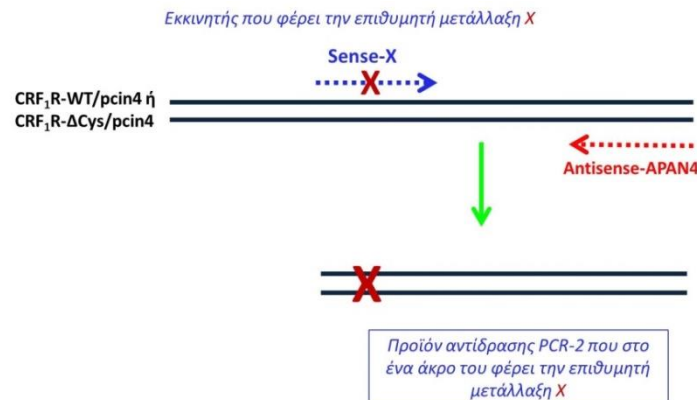
Η εισαγωγή της επιθυμητής μετάλλαξης στο πλασμιδιακό DNA CRF₁R-WT/pcin4 ή CRF₁R-ΔCys/pcin4 πραγματοποιήθηκε σε δυο διαδοχικά στάδια (A και B). Στο πρώτο στάδιο (A), για κάθε μετάλλαξη πραγματοποιήθηκαν δύο αντιδράσεις PCR, η PCR-1 και η PCR-2, στις οποίες χρησιμοποιήθηκε ως εκμαγείο το πλασμιδιακό DNA CRF₁R-WT / pcin4 ή CRF₁R-ΔCys / pcin4 ανάλογα με τις πειραματικές ανάγκες, όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Η επιμήκυνση της νουκλεοτιδικής αλυσίδας του DNA πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της πολυμεράσης rfu και διαλύματος τριφωσφορικών νουκλεοτιδίων (dNTPs), dTTP, dATP, dCTP και dGTP συγκέντρωσης 2,5 mM το καθένα. Στην αντίδραση PCR-1 χρησιμοποιήθηκαν ο εκκινητής

sense-γονιδίου (Sense pcDNA4-800) και ο antisense-μετάλλαξης X (Antisense-X) που κωδικοποιούσε το αμινοξύ της X μετάλλαξης. Το προϊόν της PCR-1 αντίδρασης αναμενόταν να ήταν ένα τεμάχιο DNA του WT ή του ΔCys μήκους περίπου 800 βάσεων που στο ένα άκρο του περιείχε τα νουκλεοτίδια της επιθυμητής μετάλλαξης (Εικόνα 3.1).



Εικόνα 3.1: Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης PCR-1, στάδιο πρώτο (A) για την εισαγωγή της επιθυμητής μετάλλαξης X στο πλασμιδιακό DNA $CRF_1R-WT / pcin4$ ή $CRF_1R-\Delta Cys / pcin4$.

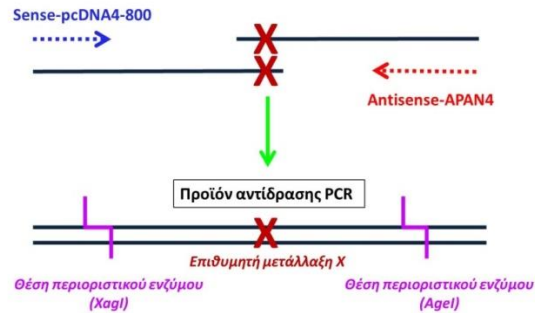
Στην αντίδραση PCR-2 του πρώτου σταδίου A, χρησιμοποιήθηκαν ο εκκινητής antisense-γονιδίου (Antisense-APAN4) και ο εκκινητής sense-μετάλλαξης X (Sense-X) που κωδικοποιούσε τα αμινοξέα της μετάλλαξης X και ήταν συμπληρωματικός του antisense-μετάλλαξης X (Antisense-X). Το προϊόν της PCR-2 αντίδρασης αναμενόταν να ήταν ένα τεμάχιο DNA του WT ή του ΔCys μήκους περίπου 700 βάσεων που στο ένα άκρο του περιείχε τα νουκλεοτίδια της επιθυμητής μετάλλαξης (Εικόνα 3.2).



Εικόνα 3.2: Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης PCR-2, στάδιο πρώτο (A), για την εισαγωγή της επιθυμητής μετάλλαξης X στο πλασμιδιακό DNA $CRF_1R-WT / pcin4$ ή $CRF_1R-\Delta Cys / pcin4$.

Τα μείγματα (DNA, εκκινητές, dNTPs και ρυθμιστικό διάλυμα rfu πολυμεράσης, σε όγκο ίσο με τα 9/10 του τελικού όγκου της αντίδρασης) των αντιδράσεων PCR-1 και PCR-2 του σταδίου A για την εισαγωγή της επιθυμητής μετάλλαξης X αναμίχθηκαν και θερμάνθηκαν για 2 λεπτά στους 100°C (hot start) σε θερμικό κυκλοποιητή PCR απουσία της πολυμεράσης rfu. Στη συνέχεια προστέθηκε στα μείγματα των αντιδράσεων PCR-1 και PCR-2 του σταδίου A, η πολυμεράση rfu (αραιωμένη σε ρυθμιστικό διάλυμα και όγκο ίσο με το 1/10 του τελικού όγκου της αντίδρασης) και αυτά επώαστηκαν σε τρεις διαδοχικές θερμοκρασίες οι οποίες αποτελούν ένα κύκλο της PCR. Συγκεκριμένα επώαστηκαν για 1 λεπτό στους 97°C ώστε να πραγματοποιηθεί αποδιάταξη του DNA, ακολούθησε επώαση του DNA για 3 λεπτά στους 55°C για τον υβριδισμό των εκκινητών και τέλος επώαση για 15 λεπτά της ώρας στους 72°C προκειμένου να γίνει η σύνθεση της αλληλουχίας DNA από την πολυμεράση. Η αντίδραση ολοκληρώθηκε μετά από 30-35 κύκλους τους οποίους ακολούθησε επώαση των μειγμάτων PCR-1 και PCR-2 του σταδίου A, για άλλα 10 λεπτά της ώρας στους 72 °C.

Τα τεμάχια του DNA του CRF₁R-WT/rcin4 ή του CRF₁R-ΔCys/rcin4 που προέκυψαν από τις αντιδράσεις PCR-1 (περίπου 800 βάσεων) και PCR-2 (περίπου 700 βάσεων) του σταδίου A, διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης, απομονώθηκαν από αυτό (όπως περιγράφεται παρακάτω) και χρησιμοποιήθηκαν ως εκμαγεία για την αντίδραση PCR του δεύτερου σταδίου (B) για την εισαγωγή της επιθυμητής μετάλλαξης X, με σκοπό τη λήψη ενός προϊόντος μήκους περίπου 1550 βάσεων που αποτελούσε επίσης τεμάχιο του CRF₁R-WT/rcin4 ή του CRF₁R-ΔCys/rcin4 και περιείχε την επιθυμητή μετάλλαξη X. Για αυτή την αντίδραση PCR, χρησιμοποιήθηκαν ως εκκινητές τα ολιγονουκλεοτίδια Sense-pCDNA4-800 και Antisense-APAN4. Η επιθυμητή μετάλλαξη X αναμενόταν να βρίσκεται στο μέσο περίπου αυτού του DNA και θα έπρεπε να την περιβάλλουν δύο θέσεις πέψης συγκεκριμένων ενζύμων περιορισμού (XagI και AgeI) (Εικόνα 3.3). Τα ένζυμα αυτά όπως περιγράφεται παρακάτω θα χρησιμοποιηθούν για την υποκλωνοποίηση του τμήματος του DNA του υποδοχέα που περιείχε την επιθυμητή μετάλλαξη στο πλασμιδιακό DNA CRF₁R-WT/rcin4 ή στο CRF₁R-ΔCys/rcin4.



Εικόνα 3.3: Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης στάδιο δεύτερο (B), για την εισαγωγή της επιθυμητής μετάλλαξης X στο πλασμιδιακό DNA $CRF_1R-WT/rcin4$ ή $CRF_1R-\Delta Cys/rcin4$.

3.1.2 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Υλικά-Συσκευές

- Διάλυμα TAE 50X (242 g Tris base, 57,1 ml glacial acetic acid, 37,2g $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$ σε H_2O).
- Αγαρόζη (Invitrogen, USA).
- Βρωμιούχο αιθίδιο, EtBr (10 mg/ml), $C_{21}H_{20}BrN_3$ (Fluka, Switzerland).
- Χρωστική, 6X Gel Loading Dye (40% γλυκερόλη, 0.25% Bromophenol Blue, 0.25% Xylene Cyanol).
- Δείκτης γνωστού μοριακού βάρους: (Fermentas, USA).
- Συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA).

Μέθοδος

Η ηλεκτροφόρηση τεμαχίων DNA σε πήκτωμα της αγαρόζης είναι μια εξαιρετικά διαδεδομένη μέθοδος μοριακής βιολογίας, η οποία επιτρέπει το διαχωρισμό τεμαχίων DNA ανάλογα με το μέγεθος τους και τη μετέπειτα απομόνωση από το πήκτωμα εκείνων που μας ενδιαφέρει. Συγκεκριμένα, κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα αγαρόζης επιτρέπει στα μικρότερου μοριακού βάρους τεμάχια DNA να κινηθούν γρηγορότερα από τον αρνητικό προς τον θετικό πόλο και να διανύσουν μεγαλύτερη απόσταση μέσα στο πήκτωμα συγκριτικά με τα μεγαλύτερου μοριακού βάρους τεμάχια DNA. Το πήκτωμα αγαρόζης που χρησιμοποιήθηκε ήταν περιεκτικότητας 1% και παρασκευάστηκε με διάλυση 1 gr αγαρόζης σε

100 ml διαλύματος TAE (Tris-acetate) (242 gr Tris-Base, 57,1 ml glacial acetic acid, 18,6 gr EDTA) αραιώσης 1:50 με θέρμανση και υπό συνεχή ανάδευση. Στη συνέχεια το διάλυμα ψύχθηκε μέχρι τους 40°C και τότε προστέθηκαν σε αυτό 4 μl βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr), το οποίο προσδένεται παρεμβαλλόμενο στις 2 αλυσίδες του DNA δημιουργώντας έτσι το σύμπλοκο EtBr/DNA που όταν εκτεθεί σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV) φθορίζει.

Το διάλυμα αγαρόζης 1% τοποθετήθηκε σε ειδική θήκη της συσκευής ηλεκτροφόρησης και αφέθηκε να πήξει, ενώ με τη βοήθεια ειδικού κτενίου δημιουργήθηκαν πηγάδια (εσοχές). Όταν ολοκληρώθηκε η πήξη του, το πήκτωμα αγαρόζης τοποθετήθηκε στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, η οποία περιείχε επαρκή ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος TAE 50X αραιώσης 1:50 ώστε να καλυφθεί πλήρως το πήκτωμα αγαρόζης. Στα διαλύματα που περιείχαν τα τεμάχια DNA που μας ενδιέφεραν (προϊόντα των αντιδράσεων PCR ή προϊόντα πέψης, όπως αναφέρεται παρακάτω), προστέθηκαν 4 μl 6X Gel Loading Dye και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν στα πηγάδια του πηκτώματος προκειμένου να ηλεκτροφορηθούν. Επίσης σε διαφορετικό πηγάδι τοποθετήθηκε και ένας δείκτης DNA ο οποίος περιείχε διάφορα τεμάχια DNA γνωστών μοριακών μεγεθών με σκοπό τον υπολογισμό του μοριακού μεγέθους των ηλεκτροφορηθέντων DNA. Η ηλεκτροφόρηση είχε διάρκεια περίπου 40 λεπτά της ώρας και πραγματοποιήθηκε υπό ηλεκτρική τάση 130 V.

3.1.3 Ενζυμική πέψη του DNA

Υλικά-Συσκευές

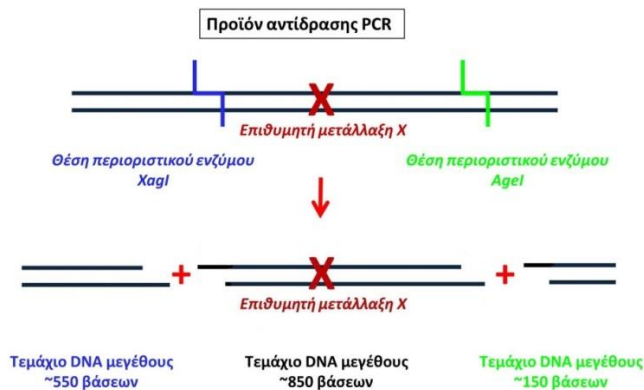
- Περιοριστικά ένζυμα Xag I (10u/μl) και AgeI (10u/μl), (Fermentas, USA).
- Ρυθμιστικό διάλυμα πέψης 10x (50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 0.1 mg/mL BSA) (Fermentas, USA).
- Θερμαινόμενη πλάκα επώασης (Bioblock Scientific, France).

Μέθοδος

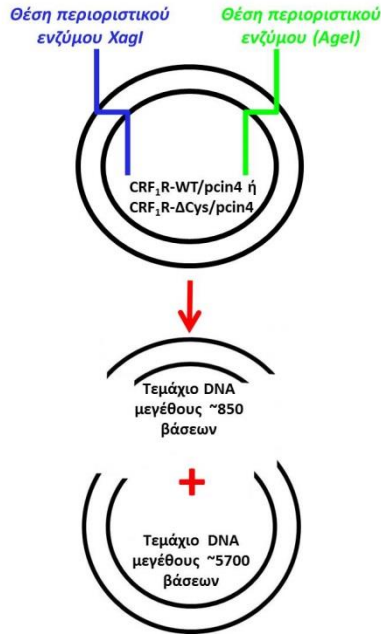
Τα περιοριστικά ένζυμα αναγνωρίζουν μια συγκεκριμένη και σχετικά μικρή αλληλουχία DNA την οποία κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες επώασης (θερμοκρασία, χρόνος και ιονική ισχύς του διαλύματος επώασης) μπορούν να πέψουν. Τα προϊόντα των PCR

του δεύτερου σταδίου (B) (μήκους περίπου 1550 βάσεων) που περιείχαν τις επιθυμητές μεταλλάξεις, υποβλήθηκαν σε πέψη με περιοριστικά ένζυμα. Με τα ίδια περιοριστικά ένζυμα υποβλήθηκε σε πέψη και το πλασμιδιακό DNA του CRF₁R-WT /rcin4 ή του CRF₁R-ΔCys /rcin4, (περίπου 6550 βάσεων). Τα περιοριστικά ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν για την πέψη αυτών των DNA ήταν το XagI, που αναγνώριζε την αλληλουχία 5'-CCTNN[^]NNNAGG-3' και το AgeI που αναγνώριζε την αλληλουχία 5'-A[^]CCGGT-3' (όπου [^] σημεία πέψης). Τα DNA που αναφέρθηκαν παραπάνω επωάστηκαν (σε διάλυμα πέψης 10x σε αραιώση 1:10) για 2 ώρες μαζί με περίπου 10 μονάδες από το κάθε ένζυμο στους 37°C.

Η πέψη του προϊόντος του PCR του δεύτερου σταδίου που περιείχε την επιθυμητή μετάλλαξη με τα ένζυμα XagI και AgeI, αναμενόταν να δώσει τρία τεμάχια DNA, ένα μήκους περίπου 150 βάσεων, ένα μεγαλύτερο μήκους περίπου 550 βάσεων και ένα ακόμα μεγαλύτερου μήκους περίπου 850 βάσεων, εκ των οποίων το τελευταίο ήταν εκείνο που έφερε την επιθυμητή μετάλλαξη (Εικόνα 3.4). Η πέψη του πλασμιδιακού DNA CRF₁R-WT /rcin4 ή CRF₁R-ΔCys /rcin4, με τα παραπάνω περιοριστικά ένζυμα αναμενόταν να δώσει δύο τεμάχια DNA, ένα μήκους περίπου 850 βάσεων και ένα μήκους περίπου 5700 βάσεων (Εικόνα 3.5). Τα προϊόντα της πέψης διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης όπως αναφέρθηκε παραπάνω, και στη συνέχεια απομονώθηκαν τα επιθυμητά προϊόντα της πέψης από αυτό, χρησιμοποιώντας το kit Nucleospin Extract της Macherey-Nagel με βάση το πρωτόκολλο της εταιρείας.



Εικόνα 3.4: Πέψη προϊόντος της αντίδρασης PCR δεύτερου σταδίου (B) (που περιέχει την επιθυμητή μετάλλαξη X) με τα ένζυμα XagI και AgeI.



Εικόνα 3.5: Πέψη πλασμιδιακού DNA CRF₁R-WT/rcin4 ή CRF₁R-ΔCys/rcin4, με τα ένζυμα XbaI και AgeI.

3.1.4 Συρραφή των τεμαχίων του DNA (Ligation)

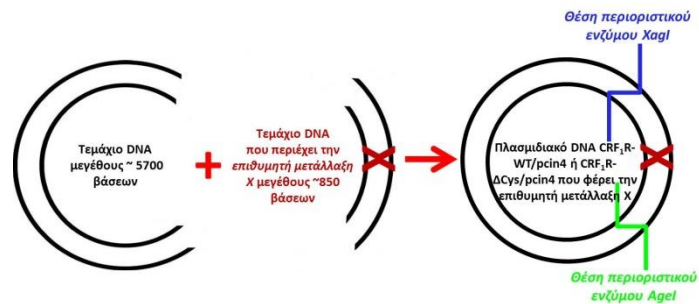
Υλικά-Συσκευές

- T4 DNA λιγάση (5 u/μl) (Fermentas, USA)
- Ρυθμιστικό διάλυμα T4 DNA λιγάσης 10x (400 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 5 mM ATP (pH 7.8 at 25°C)) (Fermentas, USA).
- Συσκευή επώασης ρυθμιζόμενης θερμοκρασίας.

Μέθοδος

Την απομόνωση των επιθυμητών προϊόντων πέψης από το πήκτωμα της αгарόζης, ακολούθησε η συρραφή τους με σκοπό την εισαγωγή του τεμαχίου DNA που έφερε την επιθυμητή μετάλλαξη στο επιθυμητό τεμάχιο του DNA από την πέψη είτε του CRF₁R-WT/rcin4 είτε του CRF₁R-ΔCys/rcin4 (Εικόνα 3.6). Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε συρραφή του τεμαχίου του DNA που προήλθε από το PCR του σταδίου B που περιείχε την επιθυμητή μετάλλαξη και είχε μέγεθος περίπου 850 βάσεων έπειτα από πέψη του με τα περιοριστικά

ένζυμα *AgeI*/*XbaI*, με το τεμάχιο του πλασμιδιακού DNA του *CRF₁R-WT /rcin4* ή του *CRF₁R-ΔCys /rcin4* που είχε μέγεθος περίπου 5700 βάσεων έπειτα από πέψη του με τα ίδια περιοριστικά ένζυμα. Η αντίδραση συρραφής έγινε με επώαση των παραπάνω τεμαχίων DNA (σε ρυθμιστικό διάλυμα T4 DNA λιγάσης 10x αραιώσης 1:10) σε θερμοκρασία 16°C για 12 ώρες. Τα προϊόντα συρραφής αναμένεται να είναι τα πλασμιδιακά DNA του WT ή ΔCys που φέρουν την επιθυμητή μετάλλαξη X (Εικόνα 3.6)



Εικόνα 3.6: Συρραφή τεμαχίων DNA μετά από πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα *AgeI*/*XbaI* των προϊόντων PCR του σταδίου B που περιέχουν την επιθυμητή μετάλλαξη (μέγεθος περίπου 850 βάσεων) (Εικόνα 3.4) και του πλασμιδιακού DNA του *CRF₁R-WT /rcin4* ή του *CRF₁R-ΔCys /rcin4* (μέγεθος περίπου 5700 βάσεων) (Εικόνα 3.5).

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

Υλικά-Συσκευές

- Τρυβλία επιστρωμένα με μείγμα LB-άγαρ-αμπικιλίνη (10 g τρυπτόνη, 15 g άγαρ, 5 g εκχύλισμα μαγιάς, 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).
- Επιδεκτικά βακτήρια DH-10b (Competent DH-10b) *E. Coli*.
- Θερμαινόμενη πλάκα επώασης (Bioblock Scientific, France).
- Φυγόκεντρος (Eppendorf Centrifuge 5415, Germany).
- Επωαστικός κλίβανος Thermo Forma (Thermo Fisher Scientific Inc., USA).

Μέθοδος

Στη συνέχεια ακολούθησε ο μετασχηματισμός επιδεκτικών βακτηρίων DH-10b (Competent DH-10b E.Coli) με τα προϊόντα συρραφής που αναφέρθηκαν παραπάνω. Συγκεκριμένα, επώασαμε για 30 λεπτά σε πάγο το μείγμα βακτηρίων DH-10b και DNA (προϊόν συρραφής) και στη συνέχεια υποβάλλαμε τα βακτήρια σε θερμικό σοκ, επωάζοντάς τα στους 42°C για 45 δευτερόλεπτα. Στη συνέχεια τοποθετήσαμε το μείγμα DNA-βακτήρια ξανά σε πάγο για 2 λεπτά. Έπειτα, προσθέσαμε 900μl υγρού θρεπτικού υλικού LB και επώασαμε για 1 ώρα στους 37°C. Στο τέλος της επώασης, φυγοκεντρήσαμε το μείγμα βακτηρίων-DNA-LB για 5 λεπτά σε 3000rpm και θερμοκρασία δωματίου και επαναιωρήσαμε το ίζημα των μετασχηματισμένων βακτηρίων με 100μl LB. Το εναιώρημα βακτηρίων επιστρώθηκε σε τρυβλίο που περιείχε LB-άγαρ-αμπικιλίνη και ακολούθησε επώαση για 16 ώρες σε θερμοκρασία 37°C. Η εμφάνιση αποικιών βακτηρίων στο τέλος της επώασης σε περιβάλλον που περιείχε αμπικιλίνη οφείλεται στο γεγονός ότι το πλασμιδιακό DNA *pcin4*, που έφερε το γονίδιο που κωδικοποιούσε τον WT ή τον ΔCys καθώς και τις μεταλλαγμένες μορφές τους, περιείχε επίσης το γονίδιο που προσέδιδε στα βακτήρια ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό αμπικιλίνη.

3.1.6 Πολλαπλασιασμός βακτηρίων DH-10b E.coli

Υλικά-Συσκευές

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

Μέθοδος

Οι αποικίες των βακτηρίων που είχαν σχηματιστεί στο τέλος της επώασης των 16 ωρών στους 37°C στο τρυβλίο που περιείχε LB-άγαρ-αμπικιλίνη, μεταφέρθηκαν σε αποστειρωμένους δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν 10 ml θρεπτικό υλικό LB

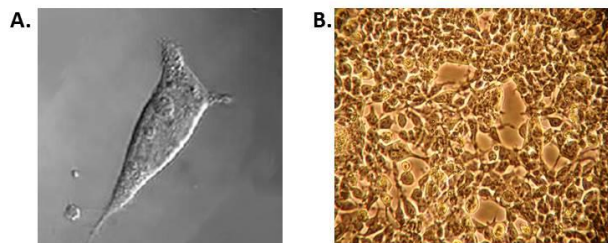
εμπλουτισμένο με το αντιβιοτικό αμπικιλίνη σε τελική συγκέντρωση 60 µg/ml. Στη συνέχεια τα βακτήρια πολλαπλασιάστηκαν με επώαση τους στους 37°C για 16 ώρες υπό συνεχή ανάδευση (170 αναδεύσεις/λεπτό). Στο τέλος της επώασης πραγματοποιήθηκε απομόνωση του πλασμιδιακού DNA από τα βακτήρια με τη χρήση του kit Nucleospin® Plasmid της Macherey-Nagel (Germany) σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρείας.

3.1.7 Ταυτοποίηση του DNA που έφερε την επιθυμητή μετάλλαξη

Αρχικά, η εξακρίβωση του αν το πλασμιδιακό DNA CRF₁R-WT/pcin4 ή CRF₁R-ΔCys/pcin4 έφερε την επιθυμητή μετάλλαξη πραγματοποιήθηκε με τη χρήση περιοριστικών ενζύμων. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την εισαγωγή της επιθυμητής μετάλλαξης (εκκινητές μετάλλαξης), στο DNA του WT ή του ΔCys ήταν με τέτοιο τρόπο σχεδιασμένοι ώστε να αφαιρούν ή να προσθέτουν μια θέση πέψης για ένα συγκεκριμένο περιοριστικό ένζυμο. Επομένως, το πλασμιδιακό DNA CRF₁R-WT/pcin4 ή CRF₁R-ΔCys/pcin4 που έφερε την επιθυμητή μετάλλαξη, μετά την πέψη του με συγκεκριμένο για την κάθε μετάλλαξη περιοριστικό ένζυμο και την ηλεκτροφόρησή του σε πήκτωμα αγαρόζης, εμφάνιζε συγκριτικά με το μητρικό του διαφορές, στον αριθμό καθώς και το μέγεθος των τεμαχίων DNA που είχαν δημιουργηθεί από την πέψη με το συγκεκριμένο ένζυμο. Περαιτέρω επιβεβαίωση της εισαγωγής της επιθυμητής μετάλλαξης στο πλασμιδιακό DNA CRF₁R-WT/pcin4 ή CRF₁R-ΔCys/pcin4 πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της ανάγνωσης της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του (sequencing) από τις εταιρείες VBC Biotech (Austria) και Genewiz (USA).

3.2 Καλλιέργειες ευκαρυωτικών κυττάρων

Για την πραγματοποίηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής, χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά HEK293 (ευγενική προσφορά του Dr. Jonathan Javitch, Columbia University, USA), η οποία δημιουργήθηκε από επιμόλυνση ανθρώπινων εμβρυϊκών κυττάρων νεφρού (HEK) με γενετικό υλικό του ανθρώπινου αδενοϊού τύπου 5 (Ad5) (248).



Εικόνα 3.7: Κυτταρική σειρά HEK293. Α) Φωτογραφία ενός κυττάρου HEK293 στην οποία φαίνεται η τυπική μορφολογία (πυραμίδας / ρόμβου) των κυττάρων της σειράς αυτής. Β) Κύτταρα HEK293 σε καλλιέργεια.

Τα κύτταρα HEK 293 μπορούν να μετασχηματιστούν εύκολα και να εκφράσουν σε ικανοποιητικό βαθμό ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες, ενώ παράλληλα έχουν αυξημένο ρυθμό πολλαπλασιασμού, χαρακτηριστικά που καθιστούν αυτή τη κυτταρική σειρά πολύτιμο εργαλείο σε τεχνικές κυτταρικής βιολογίας.

3.2.1 Καλλιέργεια κυττάρων HEK293.

Υλικά - Συσκευές

- Θρεπτικό μέσο τύπου Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM/F12 (1:1) (GIBCO-BRL, Life Technologies, UK).
- Ορός βοός, BCS (Bovine Calf Serum) (Hyclone, USA).
- Φυγόκεντρος (Jouan CR422, France).
- Μικροσκόπιο ορατού φωτός Olympus, Japan.
- Τρυβλία καλλιεργειών διαμέτρου 60mm και 100mm (SARSTEDT, Germany).
- Επωαστικός κλίβανος Thermo Forma (Thermo Fisher Scientific Inc., USA).
- Υπερκαταψύκτης (Bio-Freezer 8425, Forma Scientific, Inc USA).

Μέθοδος

Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν (σε τρυβλία 60mm και 100mm) σε θρεπτικό υλικό DMEM/F12 (1:1), το οποίο περιείχε 2,5 mM L-γλουταμίνη, 15 mM HEPES, 1,125 g/L NaHCO₃ και ήταν εμπλουτισμένο με 10% ορό βοός, σε επωαστικό κλίβανο ρυθμισμένο σε θερμοκρασία 37°C, ατμόσφαιρα 5% CO₂ / 95% αέρα (απαραίτητες συνθήκες για τη διατήρηση του pH του θρεπτικού υλικού) και υγρασία 100% (ελαχιστοποίηση εξάτμισης του θρεπτικού υλικού). Το θρεπτικό υλικό ανανεωνόταν κάθε 48 ώρες και τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν για πείραμα είχαν φτάσει σε πυκνότητα 90% περίπου. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν με κύτταρα σε παρόμοια στάδια ανάπτυξης.

3.2.2 Επιμόλυνση κυττάρων με πλασμιδιακό DNA και δημιουργία κυττάρων που εκφράζουν μόνιμα ή παροδικά τους υποδοχείς

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).
- Θρεπτικό υλικό, OptiMEM (GIBCO-BRL, Life Technologies, UK).
- Λιποφεκταμίνη, Lipofectamine (Invitrogen, USA).
- Γενετισίνη, Geneticin (GIBCO-BRL, Life Technologies, UK).
- Μικροσκόπιο ορατού φωτός Olympus, Japan.
- Επωαστικός κλίβανος Thermo Forma (Thermo Fisher Scientific Inc., USA).
- Τρυβλία καλλιεργειών 60mm (SARSTEDT, Germany).

Μέθοδος

Κύτταρα HEK 293 που βρίσκονταν σε καλλιέργεια με θρεπτικό υλικό DMEM/F12 (1:1) που περιείχε 2,5 mM L-γλουταμίνη, 15 mM HEPES, 1,125 g/L NaHCO₃ και ήταν εμπλουτισμένο με 10% ορό βοός επιστρώθηκαν σε τρυβλίο διαμέτρου 60 mm έτσι ώστε μετά την επώαση τους σε θερμοκρασία 37°C, ατμόσφαιρα 5% CO₂ / 95% αέρα και υγρασία 100%, την επόμενη

μέρα να είχαν πυκνότητα 80-90%. Στο τέλος της επώασης των κυττάρων, 3 μg πλασμιδιακού DNA που κωδικοποιούσε τον υποδοχέα διαλύθηκε σε 200 μl OptiMEM. Ταυτόχρονα, σε 200 μl διαφορετικού OptiMEM διαλύθηκαν 9 μl λιποφεκταμίνης. Τα δύο αυτά μείγματα αναμίχθηκαν και παρέμειναν σε ηρεμία σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά της ώρας. Στη συνέχεια τα δύο αυτά μείγματα αναμίχθηκαν μεταξύ τους, σχηματίζοντας έτσι μείγμα OptiMEM 400 μl που περιείχε τη λιποφεκταμίνη και το πλασμιδιακό DNA μαζί. Το μείγμα αυτό επώαστηκε σε ηρεμία σε θερμοκρασία δωματίου για 15 - 20 λεπτά της ώρας και προστέθηκε σε 2100 μl OptiMEM που κάλυπταν τα HEK 293 κύτταρα (80-90% πυκνότητας) τα οποία προηγουμένως είχαν εκπλυθεί με OptiMEM. Τα κύτταρα επώαστηκαν με το μείγμα (2,5 ml) λιποφεκταμίνης/πλασμιδιακό DNA/ OptiMEM για 5 - 12 ώρες σε θερμοκρασία 37°C, ατμόσφαιρα 5% CO₂/95% αέρα και υγρασία 100%. Στο τέλος της επώασης, το μείγμα αυτό, αντικαταστάθηκε με θρεπτικό υλικό DMEM/F12 (1:1) που περιείχε 2,5 mM L-γλουταμίνη, 15 mM HEPES, 1,125 g/L NaHCO₃, 10% BCS, καθώς και το αντιβιοτικό γενετισίνη (G-418) σε συγκέντρωση 800 μg/ml ώστε να γίνει επιλογή των θετικά επιμολυσμένων κυττάρων και η δημιουργία κυτταρικών σειρών που εκφράζουν σταθερά τους υπό μελέτη υποδοχείς. Το πλασμίδιο rcin4, στο οποίο βρίσκεται το γονίδιο που εκφράζει τον CRF₁R (WT ή τη μεταλλαγμένη μορφή του), περιέχει το γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη φωσφοτρανσφεράση της νεομυκίνης (NPT II) που προσδίδει στα κύτταρα ανθεκτικότητα στο κυτταροτοξικό αντιβιοτικό γενετισίνη.

Επιπρόσθετα των κυτταρικών σειρών που εξέφραζαν σταθερά τους υποδοχείς του CRF στα πειράματά μας χρησιμοποιήσαμε επίσης HEK 293 κύτταρα που εξέφραζαν τους υποδοχείς αυτούς παροδικά. Για τη παροδική έκφραση των υποδοχέων στα κύτταρα ακολουθήσαμε την ίδια μέθοδο επιμόλυνσης κυττάρων που αναφέραμε παραπάνω με τη διαφορά ότι μετά την επώαση με τα 2,5 ml OptiMEM/λιποφεκταμίνης/DNA για 5 - 12 ώρες, αντικαταστήσαμε το διάλυμα αυτό με θρεπτικό υλικό που περιείχε 10% BCS αλλά όχι γενετισίνη. Μετά από 24 ώρες τα κύτταρα συλλέχθηκαν με σκοπό τη μελέτη των υποδοχέων του CRF που εκφραζόταν σε αυτά παροδικά.

3.2.3 Κρυοσυντήρηση και απόψυξη κυττάρων.

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).
- Ορός βοός, BCS (Bovine Calf Serum) (Hyclone, USA) εμπλουτισμένος με 10% DMSO (Sigma, USA).
- Φυγόκεντρος (Jouan CR422, France).
- Μικροσκόπιο ορατού φωτός Olympus, Japan.
- Επωαστικός κλίβανος Thermo Forma (Thermo Fisher Scientific Inc., USA).
- Σωληνάρια κρυοσυντήρησης κυττάρων των 2ml (SARSTEDT, Germany).
- Τρυβλία καλλιέργειών 60mm (SARSTEDT, Germany).
- Υπερκαταψύκτης (Bio-Freezer 8425, Forma Scientific, Inc USA)

Μέθοδος

Τα κύτταρα, προκειμένου να διατηρηθούν σε χαμηλό αριθμό γενεών, καταψύχονταν ανά τακτά χρονικά διαστήματα, αρχικά στους -80°C και έπειτα από λίγες μέρες μεταφέρονταν σε υγρό άζωτο (-196°C) για τη μακροχρόνια αποθήκευσή τους, έτσι ώστε τα πειράματα να πραγματοποιούνται στον ίδιο αριθμό γενιάς. Συγκεκριμένα, τα κύτταρα συλλέχθηκαν από τα τρυβλία στα οποία καλλιεργούνταν με 2-3ml DMEM/F12 (1:1) (2,5 mM L-γλουταμίνη, 15 mM HEPES, 1,125 g/L NaHCO_3) εμπλουτισμένο με 10% BCS και το κυτταρικό εναιώρημα φυγοκεντρήθηκε στα 700g. Στη συνέχεια το υπερκείμενο θρεπτικό υλικό αφαιρέθηκε και τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε 900μl BCS εμπλουτισμένο με 10% DMSO (κρυοπροστατευτικός παράγοντας). Το εναιώρημα των κυττάρων τοποθετήθηκε σε σωληνάριο κρυοσυντήρησης και αφού πάγωσε σταδιακά σε -80°C μεταφέρθηκε σε υγρό άζωτο (-196°C) για μακροχρόνια αποθήκευση. Η παρουσία κρυοπροστατευτικού παράγοντα και η σταδιακή κατάψυξη των κυττάρων είναι απαραίτητα ώστε να περιοριστεί η πιθανότητα δημιουργίας κρυστάλλων στο εσωτερικό των κυττάρων και κατά συνέπεια πιθανός κυτταρικός θάνατος.

Αντίθετα με την κατάψυξη των κυττάρων που πραγματοποιήθηκε σταδιακά η απόψυξή τους ήταν γρήγορη και άμεση. Τα κατεψυγμένα σωληνάρια που περιείχαν το κυτταρικό εναιώρημα θερμάνθηκαν ταχέως στους 37°C υπό συνεχή ανάδευση και τα κύτταρα μεταφέρθηκαν άμεσα σε τρυβλία που περιείχαν θρεπτικό υλικό DMEM/F12 (1:1) (2,5 mM L-γλουταμίνη, 15 mM HEPES, 1,125 g/L NaHCO_3) εμπλουτισμένο με 10% BCS με σκοπό τη καλλιέργεια τους.

3.4 Φαρμακολογικός χαρακτηρισμός των υποδοχέων

Για τον φαρμακολογικό χαρακτηρισμό των υποδοχέων του CRF διεξήχθησαν αρχικά, μελέτες συναγωνιστικής δέσμησης στις οποίες προσδιορίστηκαν οι συγγένειες δέσμησης με τις οποίες δέσμευαν τον CRF και ανάλογα του. Επίσης πραγματοποιήθηκαν πειράματα διέγερσης της παραγωγής κυκλικού AMP (cAMP) σε κύτταρα που εκφράζανε τους υποδοχείς του CRF με σκοπό τον προσδιορισμό της ισχύος διαφόρων πεπτιδίων αγωνιστών, όπως της σοβαγίνης.

3.4.1 Μελέτες συναγωνιστικής δέσμησης.

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).
- Αλβουμίνη ορού βοός (Bovine Serum Albumin, BSA) (Sigma, USA).
- Φυγόκεντρος (Jouan CR422, France).
- Φυγόκεντρος (Eppendorf Centrifuge 5415, Germany).
- Μικροσκόπιο ορατού φωτός Olympus, Japan.
- Επωαστικός κλίβανος Thermo Forma (Thermo Fisher Scientific Inc., USA).
- Τρυβλία καλλιέργειών (SARSTEDT, Germany).
- Tyr⁰-σοβαγίνη (Polypeptides, France).
- Σοβαγίνη (Polypeptides, France).
- Ασπρεσσίνη (Polypeptides, France).
- Ανταλαρμίνη, Antalarmin (Tocris Bioscience, USA).
- [¹²⁵I]-Tyr⁰-σοβαγίνη (2200 Ci (81.4 TBq)/mmol Perkin Elmer, USA).
- Πολυαιθυλενιμίνη, PEI (Merck, USA).
- Ομογενοποιητής polytron (Janke & Kunkel IKA Ultra Turrax T25, Germany).
- Σωληνάρια τύπου erpendorf χαμηλής κατακράτησης (low retention, Kisker, Germany).
- Υδατόλουτρο (Salvis AG, Switzerland).
- Συσκευή διήθησης Brandel Cell Harvester (USA).
- Φίλτρα ιών υάλου AH934 (Whatman International Ltd., England).

- Σωληνάρια 3 ml (SARSTEDT, Germany).
- Μετρητής γ - ακτινοβολίας (LKB Wallac 1275 minigamma, Finland), απόδοσης 80% στο ¹²⁵I.
- Απροτινίνη, Aprotinin (Sigma, USA).
- Βακιτρακίνη, Bacitracin (Sigma, USA).

Μελέτες συναγωνιστικής δέσμησης Διαλύματα							
Διάλυμα Α		Διάλυμα Β		Διάλυμα Γ		Διάλυμα Δ	
NaCl	137mM	HEPES	20mM	HEPES	20mM	NaCl	137mM
KCl	2.7mM	MgCl ₂ ·6H ₂ O	10mM	MgCl ₂ ·6H ₂ O	10mM	KCl	2,7mM
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	4.3mM	EGTA	2mM	EGTA	2mM	Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	4,3mM
KH ₂ PO ₄	1.47mM	Απροτινίνη	0.93μg/ml	Απροτινίνη	0,93μg/ml	KH ₂ PO ₄	1,4mM
EDTA	2mM	Βακιτρακίνη	0.2mg/ml	Βακιτρακίνη	0,2mg/ml	Triton X-100	0,01% v/v
				BSA	0,1% w/v		
pH 7.3 στους 37°C		pH 7.1 στους 4°C		pH 7.1 στους 20°C		pH 7.1 στους 4°C	

Μέθοδος

Κύτταρα HEK293 τα οποία εκφράζανε τους υποδοχείς του CRF καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό για 2 ημέρες. Τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα συναγωνιστικής δέσμησης ήταν σε παρόμοια στάδια ανάπτυξης και είχαν πυκνότητα 100% περίπου. Η έναρξη των πειραμάτων αυτών έγινε με αφαίρεση του θρεπτικού υλικού καλλιέργειας των κυττάρων από τα τρυβλία, έκπλυση των κυττάρων με ρυθμιστικό διάλυμα Α και αποκόλληση τους από τα τρυβλία χρησιμοποιώντας το ίδιο διάλυμα. Στη συνέχεια τα κυτταρικά εναιωρήματα μεταφέρθηκαν σε σωληνάριο των 15ml όπου φυγοκεντρήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά στα 1000g. Στο τέλος της φυγοκέντρωσης τα υπερκείμενα διαλύματα αφαιρέθηκαν και τα ιζήματα επαναιωρήθηκαν σε 1,5ml ρυθμιστικού διαλύματος Β. Τα κυτταρικά εναιωρήματα στη συνέχεια ομογενοποιήθηκαν σε ομογενοποιητή Polytron για 10-15 δευτερόλεπτα, στις 20000 στροφές/λεπτό στους 4°C και τα μεμβρανικά ομογενοποιήματα φυγοκεντρήθηκαν για 10 λεπτά, σε 16000g στους 4°C. Τα υπερκείμενα αφαιρέθηκαν και τα ιζήματα επαναιωρήθηκαν σε 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος Γ. Όγκος 50 μl από τα αραιωμένα μεμβρανικά ομογενοποιήματα επώαστηκε σε σωληνάρια τύπου errendorf

χαμηλής κατακράτησης (low retention), μαζί με 150 μl διαλύματος που περιείχε 20-35 pM [¹²⁵I]-Tyr⁰-σοβαγίνης, απουσία (Bo) ή παρουσία (B) αυξανόμενων συγκεντρώσεων μη ραδιοσημασμένης Tyr⁰-σοβαγίνης (πειράματα ομόλογης συναγωνιστικής δέσμησης) ή μη ραδιοσημασμένου CRF ή αναλόγων του (πειράματα ετερόλογης συναγωνιστικής δέσμησης). Η μη ειδική δέσμηση (NSB) προσδιορίστηκε παρουσία περιόδου μη ραδιοσημασμένης σοβαγίνης ή ανταλαρμίνης (0,5-1 μM). Τα δείγματα επώαστηκαν σε θερμοκρασία 20-22°C για 2 ώρες με ήπια ανάδευση (30 αναδεύσεις/λεπτό).

Η ελεύθερη [¹²⁵I]-Tyr⁰-σοβαγίνη διαχωρίστηκε από την δεσμευμένη με τον υποδοχέα με διήθηση μέσω φίλτρων ινών υάλου AH934, σε συσκευή Brandel υπό κενό αέρος. Τα φίλτρα προηγουμένως είχαν επωαστεί για μια ώρα στους 4°C σε διάλυμα πολυαιθυλενιμίνης (PEI) 0,3%. Μετά το τέλος της διήθησης τα φίλτρα εκπλύθηκαν τρεις φορές με 0,5ml (τη φορά) διαλύματος Δ και ακολούθως μετρήθηκαν σε μετρητή γ-ακτινοβολίας. Η ειδική δέσμηση (SB) ορίστηκε ως η διαφορά Bo-NSB και η διαφορά B-NSB. Η ποσότητα των μεμβρανών που χρησιμοποιήθηκε ήταν τέτοια ώστε η ειδική δέσμηση απουσία μη ραδιοσημασμένου προσδέτη να ήταν ίση ή μικρότερη του 10% της ποσότητας της [¹²⁵I]-Tyr⁰-σοβαγίνης που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα αυτά.

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων συναγωνιστικής δέσμησης αναλύθηκαν με μη γραμμική ανάλυση (nonlinear regression analysis), χρησιμοποιώντας το λογισμικό GraphPad Prism 4.0 και οι τιμές IC₅₀ υπολογίστηκαν σύμφωνα με το μοντέλο ύπαρξης ενός πληθυσμού θέσεων δέσμησης (one-site competition model). Οι τιμές K_i υπολογίστηκαν από τις τιμές IC₅₀ των πειραμάτων ετερόλογης συναγωνιστικής δέσμησης με τη χρήση του λογισμικού GraphPad Prism 4.0 και σύμφωνα με την εξίσωση, $K_i = IC_{50} / (1 + L / K_D)$, όπου το L είναι η συγκέντρωση της ραδιοσημασμένης [¹²⁵I]-Tyr⁰-σοβαγίνης και K_D η συγγένεια δέσμησης της [¹²⁵I]-Tyr⁰-σοβαγίνης (249). Οι τιμές K_D για την [¹²⁵I]-Tyr⁰-σοβαγίνη υπολογίστηκαν αναλύοντας τα αποτελέσματα των πειραμάτων ομόλογης συναγωνιστικής δέσμησης, με τη χρήση του λογισμικού GraphPad Prism 4.0 και σύμφωνα με την εξίσωση: $Y = \{(B_{max} \cdot [hot]) / ([hot] + [cold] + K_D)\} + NSB$ (250), όπου η τιμή Y είναι η ολική δέσμηση της [¹²⁵I]-Tyr⁰-σοβαγίνης, NSB είναι η μη ειδική δέσμηση, B_{max} είναι ο μέγιστος αριθμός των υποδοχέων, [hot] είναι η συγκέντρωση της [¹²⁵I]-Tyr⁰-σοβαγίνης και [cold] είναι η συγκέντρωση της Tyr⁰-σοβαγίνης.

3.4.2 Μέθοδος διαθεσιμότητας των κυστεϊνών-υποκαταστατών (Substituted-Cysteine Accessibility Method, SCAM)

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).
- Αλβουμίνη ορού βοός (Bovine Serum Albumin, BSA) (Sigma, USA).
- Φυγόκεντρος (Jouan CR422, France).
- Φυγόκεντρος (Eppendorf Centrifuge 5415, Germany).
- Μικροσκόπιο ορατού φωτός Olympus, Japan.
- Επωαστικός κλίβανος Thermo Forma (Thermo Fisher Scientific Inc., USA).
- Τρυβλία καλλιέργειών (SARSTEDT, Germany).
- Μεθανοθειοσουλφονικό-αιθυλ-αμμώνιο (MTSEA) (Toronto Research Chemicals Inc., Canada).
- [¹²⁵I]-Tyr⁰-σοβαγίνη (2200 Ci (81.4 TBq)/mmol NEN Life Science Products, USA).
- Πολυαιθυλενιμίνη, PEI (Merck, USA).
- Ομογενοποιητής polytron (Janke & Kunkel IKA Ultra Turrax T10, Germany).
- Σωληνάρια τύπου erpendorf χαμηλής κατακράτησης (low retention, Kisker, Germany).
- Υδατόλουτρο (Salvis AG, Switzerland).
- Συσκευή διήθησης Brandel Cell Harvester (USA).
- Φίλτρα ιών υάλου AH934 (Whatman International Ltd., England).
- Σωληνάρια 3 ml (SARSTEDT, Germany).
- Μετρητής γ - ακτινοβολίας (LKB Wallac 1275 minigamma, Finland) με απόδοση 80% στο ¹²⁵I.
- Δοκιμαστικά σωληνάρια 15ml (Corning, USA)

Μέθοδος διαθεσιμότητας των κυστεϊνών-υποκαταστατών (SCAM)													
Διαλύματα													
Διάλυμα SCAM-1		Διάλυμα SCAM-2		Διάλυμα SCAM-3		Διάλυμα SCAM-4		Διάλυμα SCAM-5		Διάλυμα SCAM-6		Διάλυμα SCAM-7	
NaCl	137mM	HEPES	25mM	NaCl	137mM	HEPES	25mM	HEPES	20mM	HEPES	20mM	NaCl	137mM
KCl	2.7mM	KCl	5.4mM	KCl	2.7mM	KCl	5.4mM	MgCl ₂ ·6H ₂ O	10mM	MgCl ₂ ·6H ₂ O	10mM	KCl	2,7mM
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	4.3mM	NaCl	140mM	Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	4.3mM	NaCl	140mM	EGTA	2mM	EGTA	2mM	Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	4,3mM
KH ₂ PO ₄	1.47mM	EDTA	2mM	KH ₂ PO ₄	1,4mM	MgCl ₂ ·6H ₂ O	10mM	Απροτινίνη	0.93μg/ml	Απροτινίνη	0,93μg/ml	KH ₂ PO ₄	1,4mM
EDTA	2mM			MgCl ₂	10mM	EDTA	2mM	Βακτηρακίνη	0.2mg/ml	Βακτηρακίνη	0,2mg/ml	Triton X-100	0,01% v/v
				EDTA	2mM					BSA	0,1% w/v		
pH 7.3 / 37°C		pH 7.2 / 22°C		pH 7.1 / 22°C		pH 7.1 / 22°C		pH 7.1 / 4°C		pH 7.1 / 20°C		pH 7.1 / 4°C	

Μέθοδος

Κύτταρα HEK293 τα οποία εκφράζανε τους υποδοχείς του CRF καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό όπως αναφέρθηκε παραπάνω ώστε την ημέρα του πειράματος να έχουν πυκνότητα 90-100%. Το θρεπτικό υλικό αφαιρέθηκε και τα κύτταρα εκπλύθηκαν 3 φορές με συνολικά 9ml διαλύματος SCAM-1. Με το ίδιο διάλυμα στη συνέχεια τα κύτταρα αποκολλήθηκαν από τα τρυβλία τους και μεταφέρθηκαν σε σωληνάρια των 15 ml. Τα κυτταρικά εναιωρήματα φυγοκεντρήθηκαν σε 50 g για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου και μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης τα ιζήματα επαναιωρήθηκαν σε 200μl διαλύματος SCAM-2. Παράλληλα παρασκευάστηκαν διαλύματα μεθανοθειοσουλφονικού αιθυλαμμωνίου (MTSEA) σε H₂O έτσι ώστε να βρίσκονται σε δεκαπλάσια συγκέντρωση εκείνης της αντίδρασης (10x). Τα διαλύματα MTSEA παρασκευάστηκαν ελάχιστα λεπτά πριν χρησιμοποιηθούν για αντίδραση, λόγω της ταχείας υδρόλυσης του αντιδραστήριου. Τα διαλύματα MTSEA (10μl) προστέθηκαν (ώστε η αραιώση του MTSEA να είναι 1:10) ή H₂O (10μl) (δείγμα αναφοράς) στα κυτταρικά εναιωρήματα (90μl εναιωρήματος). Η αντίδραση του MTSEA με τα κύτταρα είχε διάρκεια 15 δευτερολέπτων, έγινε σε θερμοκρασία δωματίου (22-25°C) και σταμάτησε με την προσθήκη 14 ml διαλύματος SCAM-3 και φυγοκέντρωση των μειγμάτων σε θερμοκρασία δωματίου, για 10 λεπτά σε 250 g. Ακολούθως το υπερκείμενο απομακρύνθηκε προσεκτικά, τα ιζήματα των κυττάρων επαναιωρήθηκαν σε 1,4 ml διαλύματος SCAM-4 και επαναφυγοκεντρήθηκαν για 5 λεπτά σε 250 g και σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης, τα ιζήματα των κυττάρων επαναιωρήθηκαν σε 800μl διαλύματος SCAM-5 και ομογενοποιήθηκαν για 20 δευτερόλεπτα σε ομογενοποιητή Polytron στις 20000 στροφές/λεπτό και σε 4°C. Τα μεμβρανικά ομογενοποιημένα στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν στους 4°C σε 16000 g για 10 λεπτά και τα ιζήματα επαναιωρήθηκαν αρχικά σε 100μl διαλύματος SCAM-6 και ακολούθως

αραιώθηκαν ανάλογα με τον υποδοχέα που εξετάστηκε ($\Delta\text{Cys-CRF}_1\text{R}$ ή τις μεταλλαγμένες μορφές του).

Τα αραιωμένα μεμβρανικά ομογενοποιημένα (50μl) επωάστηκαν μαζί με 150 μl διαλύματος SCAM-6 που περιείχε 20-35 pM [^{125}I]-Tyr⁰-σοβαγίνης, απουσία (Bo) ή παρουσία (NSB) περίσσειας μη ιωδιωμένης σοβαγίνης ή ανταλαρμίνης (0,5-1 μM) σε σωληνάρια τύπου erpendorf χαμηλής κατακράτησης (low retention), για 2 ώρες σε θερμοκρασία 20 - 22°C και με ήπια ανάδευση (30 αναδεύσεις/λεπτό). Ο διαχωρισμός της δεσμευμένης με τον υποδοχέα [^{125}I]-Tyr⁰-σοβαγίνης από την ελεύθερη, πραγματοποιήθηκε με διήθηση υπό κενό αέρος μέσω φίλτρων ινών υάλου AH934, σε συσκευή Brandel. Τα φίλτρα προηγουμένως είχαν επωαστεί για μια ώρα στους 4°C σε διάλυμα πολυαιθυλενιμίνης (PEI) 0,3%. Μετά το τέλος της διήθησης τα φίλτρα εκπλύθηκαν τρεις φορές με 0,5ml (τη φορά) διαλύματος SCAM-7 και ακολούθως μετρήθηκαν σε μετρητή γ-ακτινοβολίας. Η ειδική δέσμευση (SB) ορίστηκε ως η διαφορά Bo-NSB. Η ποσότητα των μεμβρανών που χρησιμοποιήθηκε ήταν τέτοια ώστε η ειδική δέσμευση να ήταν ίση ή μικρότερη του 10% της ποσότητας της [^{125}I]-Tyr⁰-σοβαγίνης που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα αυτά.

Η δεύτερης τάξης σταθερά k της αντίδρασης με το MTSEA προσδιορίστηκε με βάση την επίδραση αυξανόμενων συγκεντρώσεων MTSEA (σε αντίδραση 15 δευτερολέπτων) στην ειδική δέσμευση της [^{125}I]-Tyr⁰-σοβαγίνης. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αναλύθηκαν με μη γραμμική ανάλυση (nonlinear regression analysis), χρησιμοποιώντας το λογισμικό GraphPad Prism 4.0 σύμφωνα με τις εξισώσεις one-phase exponential decay ($Y = (1 - \text{plateau}) * e^{k * X} + \text{plateau}$) ή one-phase exponential association ($Y = Y_{\text{max}} * (1 - e^{-(k * X)})$), ανάλογα με τις ανάγκες του πειράματος. Η πρώτη εξίσωση χρησιμοποιήθηκε σε αποτελέσματα στα οποία η αντίδραση με το MTSEA ελάττωσε την ειδική δέσμευση της [^{125}I]-Tyr⁰-σοβαγίνης ενώ η δεύτερη χρησιμοποιήθηκε όταν η αντίδραση αύξησε την ειδική δέσμευση. Στις παραπάνω εξισώσεις το Y αντιπροσωπεύει το κλάσμα B_{MTSEA}/B_0 , όπου B_0 η δέσμευση πριν την αντίδραση (δείγμα αναφοράς) και B_{MTSEA} η δέσμευση μετά την αντίδραση, το Y_{max} αντιπροσωπεύει τη μέγιστη τιμή του Y , το X αντιπροσωπεύει τη συγκέντρωση του MTSEA ενώ το plateau αντιπροσωπεύει τη δέσμευση και συνεπώς το κλάσμα της Y στις υψηλότερες συγκεντρώσεις MTSEA. Από τις εξισώσεις αυτές υπολογίζεται η σταθερά K που έχει τιμές M^{-1} και ισούται με $k * t$, δηλαδή $K = k * t$, όπου t είναι ο χρόνος των 15 δευτερολέπτων και k η σταθερά δεύτερης τάξης της αντίδρασης. Διαιρώντας τη τιμή K που προσδιορίζουμε από τα αποτελέσματα μας

όπως αναφέρθηκε παραπάνω προς το χρόνο t που είναι τα 15 δευτερόλεπτα της αντίδρασης υπολογίζουμε τη σταθερά δεύτερης τάξης της αντίδρασης k που η τιμή της εκφράζεται σε μονάδες $M^{-1} sec^{-1}$.

3.4.3 Μέθοδος προστασίας από την αντίδραση με το MTSEA

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).
- Αλβουμίνη ορού βοός (Bovine Serum Albumin, BSA) (Sigma, USA).
- Φυγόκεντρος (Jouan CR422, France).
- Φυγόκεντρος (Eppendorf Centrifuge 5415, Germany).
- Μικροσκόπιο ορατού φωτός Olympus, Japan.
- Πλάκα αιματοκυτταρομετρητή Neubauer.
- Επωαστικός κλίβανος Thermo Forma (Thermo Fisher Scientific Inc., USA).
- Τρυβλία καλλιέργειών (SARSTEDT, Germany).
- Μεθανοθειοσουλφονικό-αιθυλ-αμμώνιο (MTSEA) (Toronto Research Chemicals Inc., Canada)
- Ανταλαρμίνη, Antalarmin (Tocris Bioscience, USA)
- Ασπρεσίνη (Polypeptides, France)
- [^{125}I]-Tyr⁰-σοβαγίνη (2200 Ci (81.4 TBq)/mmol NEN Life Science Products, USA).
- Πολυαιθυλενιμίνη, Polyethylenimine (PEI) (Merck, USA).
- Ομογενοποιητής polytron (Janke & Kunkel IKA Ultra Turrax T10, Germany).
- Σωληνάρια τύπου erpendorf χαμηλής κατακράτησης (low retention, Kisker, Germany).
- Υδατόλουτρο (Salvis AG, Switzerland).
- Συσκευή διήθησης Brandel Cell Harvester (USA).
- Φίλτρα ιών υάλου AH934 (Whatman International Ltd., England).
- Σωληνάρια 3 ml (SARSTEDT, Germany)
- Μετρητής γ - ακτινοβολίας (LKB Wallac 1275 minigamma, Finland) με απόδοση 80% στο ^{125}I .

Μέθοδος προστασίας (Protection)													
Διαλύματα													
Διάλυμα P-1		Διάλυμα P-2		Διάλυμα P-3		Διάλυμα P-4		Διάλυμα P-5		Διάλυμα P-6		Διάλυμα P-7	
NaCl	137mM	HEPES	25mM	NaCl	137mM	HEPES	25mM	HEPES	20mM	HEPES	20mM	NaCl	137mM
KCl	2.7mM	KCl	5.4mM	KCl	2.7mM	KCl	5.4mM	MgCl ₂ ·6H ₂ O	10mM	MgCl ₂ ·6H ₂ O	10mM	KCl	2.7mM
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	4.3mM	NaCl	140mM	Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	4.3mM	NaCl	140mM	EGTA	2mM	EGTA	2mM	Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	4.3mM
KH ₂ PO ₄	1.4mM	EDTA	2mM	KH ₂ PO ₄	1.4mM	MgCl ₂ ·6H ₂ O	10mM	Απροτινίνη	0.93μg/ml	Απροτινίνη	0.93μg/ml	KH ₂ PO ₄	1.4mM
EDTA	2mM			MgCl ₂ ·6H ₂ O	10mM	EDTA	2mM	Βακτριακίνη	0.2mg/ml	Βακτριακίνη	0.2mg/ml	Triton X-100	0.01% v/v
				EDTA	2mM					BSA	0,1% w/v		
pH 7.3 / 37°C		pH 7.2 / 22°C		pH 7.1/22°C		pH 7.1 / 22°C		pH 7.1 / 4°C		pH 7.1 / 20°C		pH 7.1/4°C	

Μέθοδος

Κύτταρα HEK293 τα οποία εκφράζανε τους υποδοχείς του CRF καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό όπως αναφέρθηκε παραπάνω ώστε την ημέρα του πειράματος να έχουν πυκνότητα 90-100%. Το θρεπτικό υλικό αφαιρέθηκε και τα κύτταρα εκπλύθηκαν 3 φορές με συνολικά 9ml διαλύματος P-1. Με το ίδιο διάλυμα στη συνέχεια αποκολλήθηκαν από το τρυβλίο τους και μεταφέρθηκαν σε σωληνάρια των 15 ml. Τα κυτταρικά εναιωρήματα φυγοκεντρήθηκαν στα 50 g για 1 λεπτό και μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης τα ιζήματα των κυττάρων επαναιωρήθηκαν σε 200 μl διαλύματος P-2. Στα κυτταρικά εναιωρήματα (81μl εναιωρήματος) προστέθηκαν 9 μl διαλύματος P-2 παρουσία ή απουσία ανταλαρμίνης ή αστρεσσίνης (τελικής συγκέντρωσης 1 μM). Στη συνέχεια τα εναιωρήματα κυττάρων επώαστηκαν με ήπια ανάδευση για 30 λεπτά στους 37°C (πειράματα στα οποία χρησιμοποιήθηκε η ανταλαρμίνη) ή για 60 λεπτά στους 20°C (πειράματα στα οποία χρησιμοποιήθηκε η αστρεσσίνη). Μετά το τέλος των επώασεων τα κυτταρικά εναιωρήματα (90 μl εναιωρήματος) αφέθηκαν σε ηρεμία για 5 λεπτα σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια προστέθηκαν σε αυτά 10 μl H₂O ή 10 μl 25 mM MTSEA ώστε τελικά στο εναιώρημα κυττάρων το αντιδράστηριο να βρίσκεται σε συγκέντρωση 2,5 mM. Η αντίδραση MTSEA με τα κύτταρα πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου, είχε διάρκεια 15 δευτερόλεπτα και σταμάτησε με τη προσθήκη 14 ml διαλύματος P-3. Το πείραμα συνεχίστηκε με το τρόπο που περιγράφηκε στο κεφάλαιο «Μέθοδος διαθεσιμότητας των κυστεϊνών-υποκαταστατών (substituted-cysteine accessibility method, SCAM)» .

3.4.4 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).
- Μικροσκόπιο ορατού φωτός Olympus, Japan.
- Επωαστικός κλίβανος Thermo Forma (Thermo Fisher Scientific Inc., USA).
- Τρυβλία καλλιέργειών (SARSTEDT, Germany).
- Πιάτα 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).
- Tyr⁰-σοβαγίνη (Polypeptides, France)
- Ασπρεσίνη (Polypeptides, France)
- Ανταλαρμίνη, Antalarmin (Tocris Bioscience, USA)
- Εκχυλίσμα PKA (η παρασκευή του αναφέρεται παρακάτω).
- Συσκευή διήθησης Brandel Cell Harvester (USA).
- Φίλτρα ιών υάλου AH934 (Whatman International Ltd., England).
- Σωληνάκια πλαστικά, υγρού σπινθηρισμού (SARSTEDT, Germany).
- Υγρό σπινθηρισμού (η παρασκευή του αναφέρεται παρακάτω).
- Μετρητής β-ακτινοβολίας (Perkin Elmer LS1801, Foster City, CA, USA) με απόδοση 40% στο ^3H .

Μελέτες μέτρησης ενδοκυττάριου cAMP					
Διαλύματα					
Διάλυμα Choline/Sucrose		Διάλυμα CAQ		Διάλυμα Εκπλυσης	
HEPES	25mM	Tris-HCl	100mM	Tris-HCl	10mM
Choline	2mM	NaCl	100mM	NaCl	120mM
Sucrose	288mM	EDTA	5mM		
CaCl ₂	0.9mM				
MgCl ₂	0.5mM				
IBMX	1mM				
pH 7.4 στους 20-25°C		pH 7.4 στους 20-25°C		pH 7.4 στους 4°C	

Μέθοδος

Κύτταρα HEK293 που εκφράζανε σταθερά τους υποδοχείς του CRF καλλιεργήθηκαν με θρεπτικό υλικό εμπλουτισμένο με 10% BCS σε πλάκες 96 οπών, η επιφάνεια των οποίων είχε προηγουμένως επιστρωθεί με poly-L-λυσίνη, ώστε την επόμενη ημέρα (ημέρα πειράματος) να έχουν πυκνότητα 90%. Συγκεκριμένα 50μl διαλύματος 0,1 mg/ml poly-L-λυσίνης προστέθηκαν σε κάθε οπή των πλακών ώστε να καλύπτεται πλήρως η επιφάνεια της και οι πλάκες τοποθετήθηκαν σε κλίβανο (37°C) για 15 λεπτά. Στη συνέχεια το διάλυμα poly-L-λυσίνης αφαιρέθηκε και οι οπές ξεπλύθηκαν με στείρο νερό και επιστρώθηκαν με κύτταρα.

Μετά από 15 περίπου ώρες καλλιέργειας των κυττάρων στις πλάκες των 96 οπών, σε θερμοκρασία 37°C, ατμόσφαιρα 5% CO₂ / 95% αέρα και υγρασία 100%, το θρεπτικό υλικό αφαιρέθηκε προσεκτικά και προστέθηκαν 100 μl/οπή διαλύματος Choline/Sucrose, θερμοκρασίας 37°C. Τα κύτταρα επώαστηκαν με το διάλυμα Choline/Sucrose για 1 ώρα σε επωαστικό κλίβανο ρυθμισμένο σε θερμοκρασία 37°C, ατμόσφαιρα 5% CO₂ / 95% αέρα και υγρασία 100%. Στο τέλος της επώασης στα κύτταρα προστέθηκαν 100 μl/οπή διαλύματος Choline/Sucrose χωρίς ή με αυξανόμενες συγκεντρώσεις Tgr⁰-σοβαγίνης, απουσία ή παρουσία 0,3 μM αστρεσσίνης ή 1-2 μM ανταλαρμίνης. Η επώαση συνεχίστηκε για άλλα 30 λεπτά σε επωαστικό κλίβανο ρυθμισμένο σε θερμοκρασία 37°C, ατμόσφαιρα 5% CO₂ / 95% αέρα και υγρασία 100%. Στη συνέχεια το υπερκείμενο υγρό αφαιρέθηκε και στα κύτταρα προστέθηκαν 200 μl κρύου (4°C) διαλύματος TCA 3%. Τα κύτταρα με το διάλυμα TCA 3% έμειναν σε πάγο για 30 λεπτά και ακολούθως καταψύχθηκαν σε -20°C.

Μετά από παραμονή των κυττάρων στη κατάψυξη για 1-3 ημέρες αυτά αποψύχθηκαν (με ανάδυσή τους σε θερμοκρασία δωματίου) και φυγοκεντρήθηκαν για 15 λεπτά σε 1700 g στους 4°C. Μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης 100 μl από κάθε υπερκείμενο διάλυμα μεταφέρθηκαν σε νέα πλάκα 96 οπών και εξουδετερώθηκαν με 6 μl διαλύματος 2N NaOH. Μέρος (20 μl) των εξουδετερωμένων αυτών μειγμάτων προστέθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα CAQ που περιείχε [³H]-cAMP (1.5nM) και εκχύλισμα PKA, σε τελικό όγκο 600 μl. Τα μείγματα επώαστηκαν για 3 ώρες σε πάγο. Παράλληλα με τα κυτταρικά εκχυλίσματα επώαστηκαν κάτω από τις ίδιες ακριβώς συνθήκες γνωστές συγκεντρώσεις κυκλικού AMP (100 pmoles, 30 pmoles, 10 pmoles, 3 pmoles και 1 pmole). Στο τέλος της επώασης τα διαλύματα διηθήθηκαν υπό κενό αέρος σε συσκευή Brandel και μέσω φίλτρων ιών υάλου (Glass Microfibre Filters AH934, Whatman International Ltd., England), που προηγουμένως είχαν διαβραχεί με απεσταγμένο νερό. Μετά το τέλος της διήθησης τα φίλτρα εκπλύθηκαν τρεις φορές με συνολικά 3 ml διαλύματος έκπλυσης τοποθετήθηκαν σε σωληνάρια σπινθηρισμού μαζί με 3 ml υγρού σπινθηρισμού (scintillation fluid), και μετά από 3-24 ώρες μετρήθηκαν σε μετρητή β - ακτινοβολίας (Beckman LS 1801, USA) απόδοσης 40%.

Ο προσδιορισμός της ποσότητας του κυκλικού AMP στα κυτταρικά εκχυλίσματα έγινε με τη βοήθεια της πρότυπης καμπύλης, που δημιουργήθηκε με βάση τα αποτελέσματα 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).

3.4.4.1 Παρασκευή διαλύματος σπινθηρισμού (scintillation fluid)

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).

Μέθοδος

Σε ένα λίτρο τολουόλιο, το οποίο βρισκόταν σε σκοτεινή φιάλη, προσθέσαμε 5 gr PPO και 0,5 gr POPOP και αναδεύσαμε για 12 περίπου ώρες. Μετά τη διάλυση των PPO και POPOP, προσθέσαμε 200 ml Triton X-100 ώστε η αναλογία να είναι διάλυμα PPO-POPOP προς Triton X-100, 5 προς 1. Στη συνέχεια εξετάσαμε τη ποιότητα του διαλύματος σπινθηρισμού προσθέτοντας σε 3 ml από αυτό 40000 cpm περίπου ^3H -cAMP και μετρώντας αυτά σε μετρητή β - ακτινοβολίας (Beckman LS 1801, USA) απόδοσης 40%.

3.4.4.2 Παρασκευή εκχυλίσματος πρωτεϊνικής κινάσης A (PKA) από φλοιό επινεφριδίων

Τα επινεφρίδια αποτελούνται από ένα εσωτερικό τμήμα, τον μυελό των επινεφριδίων, που έχει σκούρο καφέ χρώμα και από ένα εξωτερικό τμήμα, τον φλοιό των επινεφριδίων, ο οποίος είναι ωχροκίτρινου χρώματος και πλούσιος σε πρωτεϊνική κινάση A (PKA) η οποία δεσμεύει το κυκλικό AMP.

Υλικά-Συσκευές

- 20 επινεφρίδια βοός (ευγενική χορηγεία των σφαγείων Αρκαλοχωρίου)
- Ρυθμιστικό διάλυμα PKA (Tris 100mM pH 7,4, NaCl 250mM, EDTA 10mM, 2-μερκαπτοαιθανόλη 0,1%, σουκρόζη 250mM).
- Ομογενοποιητής, Polytron JANKE & KUNKEL, IKA-TURRAX T25 (IKA, Germany).
- Υπερφυγόκεντρος XL-90 Ultracentrifuge (Beckman, USA) με κεφαλή τύπου 70Ti.

Μέθοδος

Επινεφρίδια βοός (10-13) τοποθετήθηκαν σε πάγο και αφαιρέθηκε από αυτά ο μυελός τους. Ο εναπομένον φλοιός τεμαχίστηκε σε μικρά κομμάτια τα οποία ομογενοποιήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα PKA (περίπου 80 ml) σε ομογενοποιητή Polytron για 15-30 δευτερόλεπτα στις 20000 στροφές/λεπτό και σε 4°C. Στη συνέχεια τα ομογενοποιημένα διηθήθηκαν μέσω υφάσματος (cheesecloth) ώστε να απομακρυνθεί το λίπος και τυχόν υπολείμματα που δεν είχαν ομογενοποιηθεί. Τα διηθήματα αναδεύτηκαν για 30 λεπτά, φυγοκεντρήθηκαν σε 30000 g για 30 λεπτά στους 4°C και τα υπερκείμενα διαλύματα διηθήθηκαν μέσω υφάσματος

(cheesecloth) (ΔΙΗΘΗΜΑ 1°). Τα ιζήματα επαναομογενοποιήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα ΡΚΑ (περίπου 80 ml) και φυγοκεντρήθηκαν σε 30000 g για 30 λεπτά στους 4°C. Μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης τα υπερκείμενα διαλύματα διηθήθηκαν σε ύφασμα (cheesecloth) (ΔΙΗΘΗΜΑ 2°). Τα διηθήματα 1 και 2 ενώθηκαν και το μείγμα φυγοκεντρήθηκε σε 30000 g για 30 λεπτά στους 4°C. Μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης το υπερκείμενο διάλυμα διηθήθηκε σε ύφασμα (cheesecloth) και φυγοκεντρήθηκε εκ νέου στα 30000 g για 30 λεπτά στους 4°C. Μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης αυτής προσθέσαμε στο υπερκείμενο διάλυμα ρυθμιστικό διάλυμα ΡΚΑ τόσο ώστε ο τελικός όγκος να είναι περίπου 400 ml. Στη συνέχεια το πλούσιο αυτό σε ΡΚΑ μείγμα διαμοιράστηκε σε σωληνάρια τύπου erpendorf και διατηρήθηκε σε - 80°C.

3.5 Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων

Για την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήσαμε τη δοκιμασία απλής (one-way) ανάλυσης της μεταβλητότητας (ANOVA). Για τη συγκριτική μελέτη απόλυτων τιμών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος LSD post hoc test. Οι στατιστικές αναλύσεις έγιναν με το προγράμμα SPSS.

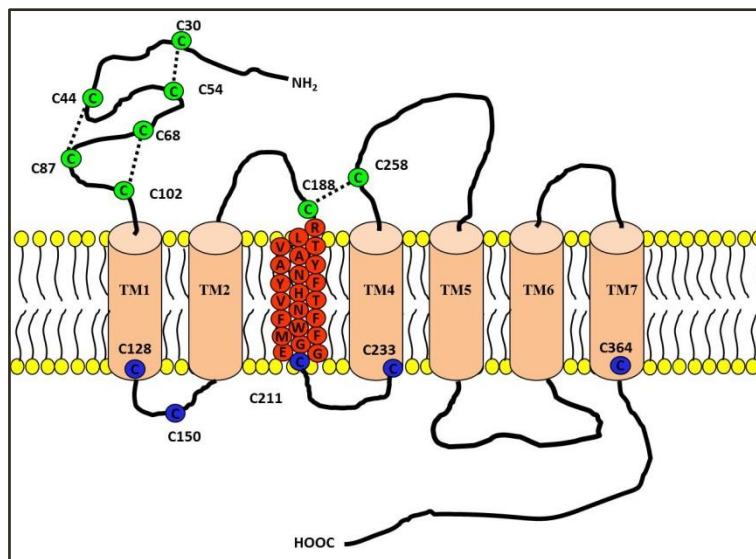
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στη παρούσα ερευνητική εργασία επιτεύχθηκαν τα εξής:

- Προσδιορισμός του ρόλου των αμινοξέων της τρίτης διαμεμβρανικής περιοχής (TM3) του CRF₁R στη δομή και λειτουργία του υποδοχέα.
- Διαλεύκανση των μηχανισμών ενεργοποίησης του υποδοχέα και αλλοστερικού ανταγωνισμού του από μικρομοριακούς ανταγωνιστές.
- Ανάπτυξη και φαρμακολογικός χαρακτηρισμός μη πεπτιδικών μικρομοριακών αλλοστερικών ανταγωνιστών.

4.1 Προσδιορισμός του ρόλου των αμινοξέων της τρίτης διαμεμβρανικής περιοχής (TM3) του CRF₁R στη δομή και λειτουργία του υποδοχέα

Στη παρούσα διδακτορική εργασία λάβαμε πληροφορίες για τη δομή της TM3 του CRF₁R και του ρόλου της στη λειτουργία του υποδοχέα (Εικόνα 4.1). Προκειμένου να λάβουμε αυτές τις πληροφορίες χρησιμοποιήσαμε συνδυασμό τεχνικών μοριακής βιολογίας, φαρμακολογίας και βιοχημείας, συμπεριλαμβανομένης και της μεθόδου της διαθεσιμότητας των υποκατεστημένων κυστεϊνών (substituted-cysteine accessibility method ή SCAM). Η μέθοδος SCAM λαμβάνει πληροφορίες για τη δομή των διαμεμβρανικών περιοχών ενός GPCR προσδιορίζοντας τις διαθεσιμότητες των αμινοξέων των περιοχών αυτών (251,252).

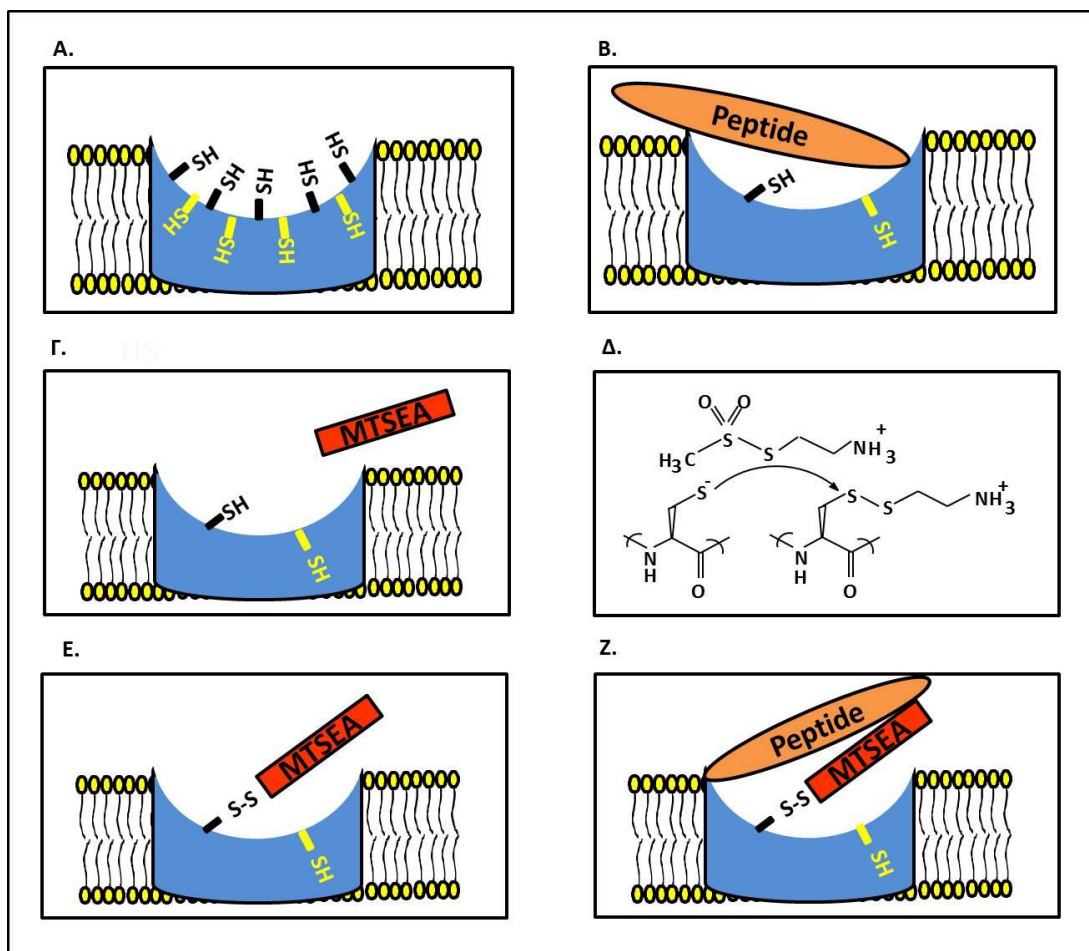


Εικόνα 4.1: Σχηματική αναπαράσταση του CRF₁R στην πλασματική μεμβράνη του κυττάρου καθώς και των αμινοξέων της TM3 του υποδοχέα.

Οι διαμεμβρανικές περιοχές (TM1, TM2, TM4, TM5, TM6 και TM7) του CRF₁R αναπαριστώνται με κυλίνδρους οι οποίοι διαπερνούν την πλασματική μεμβράνη. Τα αμινοξέα της TM3 του CRF₁R, της οποίας ο δομικός και λειτουργικός ρόλος εξετάστηκε στη παρούσα ερευνητική εργασία, απεικονίζονται με κόκκινους κύκλους. Οι ενδογενείς κυστεΐνες (C ή Cys) (C30, C44, C54, C68, C87, C102, C188 και C258) του CRF₁R που σχηματίζουν μεταξύ τους δισουλφιδικούς δεσμούς (στικτές γραμμές) απεικονίζονται με πράσινους κύκλους, ενώ οι ελεύθερες κυστεΐνες (C128, C150, C211, C233 και C364) απεικονίζονται με μπλε κύκλους.

Η μέθοδος SCAM (Εικόνα 4.2) συνοπτικά, περιλαμβάνει τη μετάλλαξη σε Cys (τεχνητές Cys) όλων των αμινοξέων (ένα τη κάθε φορά) της υπό εξέταση περιοχής του υποδοχέα και στη συνέχεια ετερόλογη έκφραση των Cys-μεταλλαγμένων υποδοχέων σε κύτταρα και χημική τροποποίηση των πρωτεϊνών αυτών. Η τροποποίηση αυτή επιτυγχάνεται με τη μη αντιστρεπτή αντίδραση των τεχνητών Cys με φορτισμένα μεθανοθειοσουλφονικά παράγωγα (MTS-αντιδραστήρια). Στη παρούσα εργασία το MTS-αντιδραστήριο που χρησιμοποιήθηκε ήταν το θετικά φορτισμένο, μεθανοθειοσουλφονικό αιθυλαμμώνιο (MTSEA) (Εικόνα 4.2).

Τα MTS-αντιδραστήρια αντιδρούν μη αντιστρεπτά (σχηματίζοντας δισουλφιδικό δεσμό) με τις σουλφυδρυλικές ομάδες, μόνο των τεχνητών Cys, που βρίσκονται στην επιφάνεια της κοιλότητας θέσεων δέσμησης του υποδοχέα που σχηματίζεται από τις TMs του. Αντίθετα, οι τεχνητές Cys που έχουν προσανατολισμένες τις πλευρικές αλυσίδες τους στην υδρόφοβη λιπιδική διπλοστιβάδα αντιδρούν σε ασήμαντο βαθμό με τα MTS-αντιδραστήρια. Η ανίχνευση της αντίδρασης βασίζεται στην ικανότητα των MTS-αντιδραστηρίων να τροποποιούν μη αντιστρεπτά τη δέσμηση της ραδιοσημασμένης σοβαγίνης στον μεταλλαγμένο με τεχνητή Cys υποδοχέα. Τροποποίηση της δέσμησης οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η τεχνητή Cys που αντέδρασε με τα MTS-αντιδραστήρια και κατά συνέπεια το αμινοξύ του άγριου τύπου υποδοχέα (WT) το οποίο αντικατέστησε η Cys αυτή, βρίσκεται στην επιφάνεια της κοιλότητας θέσεων δέσμησης του υποδοχέα και είναι διαθέσιμη στα συστατικά του εξωκυττάριου υγρού. Η πιθανότητα ο προσανατολισμός της πλευρικής αλυσίδας μιας τεχνητής Cys να είναι παρόμοιος με εκείνον του αμινοξέος που την αντικατέστησε είναι πολύ μεγάλη όταν οι λειτουργικές ιδιότητες του WT και της Cys-μεταλλαγμένης μορφής του είναι παρόμοιες. Αυτό διαπιστώνεται πριν την εφαρμογή της μεθόδου SCAM, με τον προσδιορισμό της επίδρασης της Cys-μετάλλαξης ενός αμινοξέος του υποδοχέα, στη συγγένεια δέσμησης του ραδιοσημασμένου προσδέτη.



Εικόνα 4.2: Μέθοδος διαθεσιμότητας υποκατεστημένων κυστεϊνών (SCAM).

Η τεχνική SCAM περιλαμβάνει τα ακόλουθα βήματα όπως φαίνονται στα πλαίσια A-Z.

(A) Μετάλλαξη των αμινοξέων των διαμεμβρανικών περιοχών (TMs) του CRF₁R-ΔCys (ή ΔCys), ένα τη κάθε φορά, σε Cys (τεχνητές Cys), δημιουργώντας έτσι διαφορετικούς Cys-μεταλλαγμένους υποδοχείς. Οι TMs (μπλέ περιοχή) διατάσσονται στο χώρο έτσι ώστε να σχηματίζουν τη κοιλότητα θέσεων δέσμησης (λευκή περιοχή) στη λιπιδική διπλοστιβάδα της πλασματικής μεμβράνης. Οι σουλφυδρυλικές ομάδες των τεχνητών Cys είναι είτε προσανατολισμένες προς τη κοιλότητα θέσεων δέσμησης του υποδοχέα (μαύρες -SH), ή προς το λιπόφιλο περιβάλλον της πλασματικής μεμβράνης (κίτρινες -SH).

(B) Σταθερή έκφραση των Cys-μεταλλαγμένων υποδοχέων σε HEK 293 κύτταρα και προσδιορισμός της ικανότητάς τους να δεσμεύουν το ραδιοσημασμένο πεπτίδιο, [¹²⁵I]-Tyr⁰-σοβαγίνη (πορτοκαλί επίμηκες οβάλ).

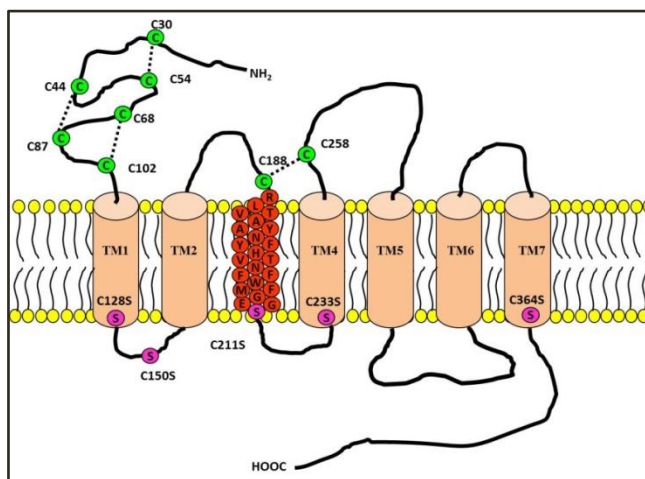
(Γ, Δ) Προσδιορισμός της ικανότητας των τεχνητών Cys να αντιδρούν με το θετικά φορτισμένο MTS-αντιδραστήριο, MTSEA. Το MTSEA σχηματίζει δισουλφιδικούς δεσμούς με τις

σουλφυδρυλικές ομάδες των Cys, αλληλεπιδρώντας μαζί τους ομοιοπολικά με την -SCH₂CH₂NH₃⁺ ομάδα του.

(E) Το MTSEA αντιδρά σε αξιόλογο ποσοστό και μη αντιστρεπτά, μόνο με τις Cys εκείνες των οποίων οι σουλφυδρυλικές ομάδες είναι προσανατολισμένες προς την κοιλότητα θέσεων δέσμευσης του υποδοχέα.

(Z) Η ανίχνευση της αντίδρασης με το MTSEA επιτεύχθηκε με τον προσδιορισμό της ικανότητάς του να τροποποιεί την ειδική δέσμευση της [¹²⁵I]-Tyr⁰-σοβαγίνης. Το MTSEA μπορεί να τροποποιεί τη δέσμευση του ραδιενεργού είτε άμεσα, είτε έμμεσα μέσω μιας αλλαγής στη στερεοδιαμόρφωση του υποδοχέα.

Στις μελέτες SCAM της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήσαμε τον μεταλλαγμένο υποδοχέα, CRF₁R-ΔCys (ΔCys), ο οποίος δημιουργήθηκε από την ταυτόχρονη μετάλλαξη των πέντε ελεύθερων ενδογενών κυστεϊνών του CRF₁R σε σερίνη (Ser ή S), ενώ δεν τροποποιήθηκαν οι ενδογενείς Cys που συμμετέχουν σε δισουλφιδικούς δεσμούς αφού δεν αντιδρούν με τα MTS-αντιδραστήρια (Εικόνα 4.3). Ο ΔCys έχει ίδιες φαρμακολογικές ιδιότητες και άρα παρόμοια δομή με τον WT (Εικόνα 4.4A) αλλά σε αντίθεση με τον τελευταίο δεν αντιδρά με το MTSEA (Εικόνα 4.4B).

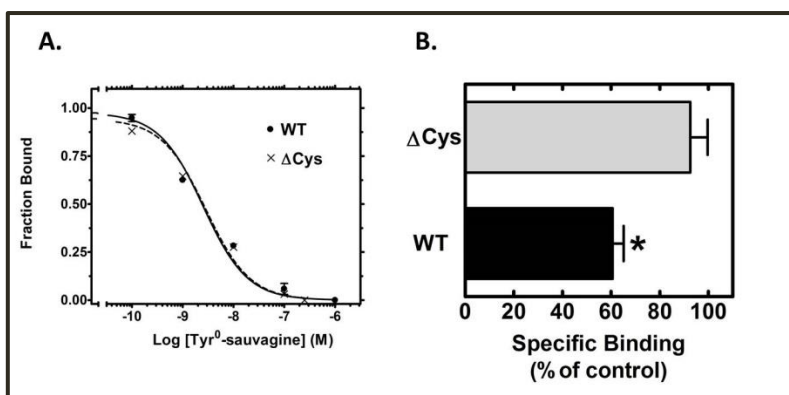


Εικόνα 4.3: Σχηματική αναπαράσταση της TM3 του μεταλλαγμένου υποδοχέα ΔCys.

Τα αμινοξέα της TM3 του ΔCys απεικονίζονται με κόκκινους κύκλους, ενώ οι TM1, TM2, TM4, TM5, TM6 και TM7 του ΔCys απεικονίζονται στην εικόνα με πορτοκαλί κυλίνδρους. Ο ΔCys δημιουργήθηκε από την ταυτόχρονη μετάλλαξη των ελεύθερων ενδογενών κυστεϊνών (C ή Cys)

του CRF₁R σε σερίνες (S ή Ser) (C128S, C150S, C211S, C233S και C364S) και οι οποίες απεικονίζονται στην εικόνα με ροζ κύκλους. Οι ενδογενείς Cys του ΔCys που σχηματίζουν δισουλφιδικούς δεσμούς (στικτές γραμμές) απεικονίζονται με πράσινους κύκλους.

Οι φαρμακολογικές ιδιότητες των ΔCys και WT, CRF₁R είναι παρόμοιες, αφού οι δύο αυτοί υποδοχείς τόσο σε προηγούμενες μελέτες (229), όσο και στη παρούσα εργασία (Εικόνα 4.4A) φάνηκαν να δεσμεύουν τη Tyr⁰-σοβαγίνη με παρόμοιες συγγένειες. Συγκεκριμένα η συγγένεια του ΔCys (-LogK_D=8,59 ± 0,37) ήταν 2,57nM, ενώ του WT (-LogK_D=8,38 ± 0,20) ήταν 4,19nM.



Εικόνα 4.4: Συναγωνιστική δέσμευση της Tyr⁰-σοβαγίνης στους WT και ΔCys και αντίδραση του MTSEA με τους υποδοχείς αυτούς.

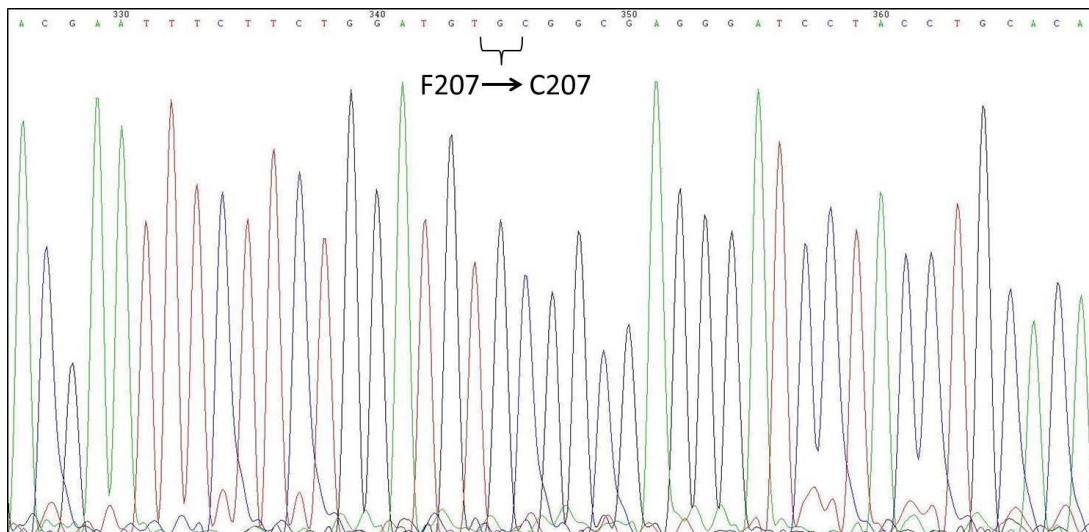
A) Ο συναγωνισμός της δέσμευσης της [¹²⁵I]-Tyr⁰-σοβαγίνης από την Tyr⁰-σοβαγίνη για τον WT και τη μεταλλαγμένη μορφή του, ΔCys, πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στα «Υλικά και Μέθοδοι». Οι μέσοι όροι (εις διπλούν) και τα σταθερά σφάλματα των τιμών προέρχονται από ένα χαρακτηριστικό πείραμα που έγινε 3 φορές δίνοντας παρόμοια αποτελέσματα. Η συγγένεια δέσμευσης της Tyr⁰-σοβαγίνης (-LogK_D) που προσδιορίστηκε από αυτά τα πειράματα για τους υποδοχείς WT και ΔCys ήταν 8,38 ± 0,20 και 8,59 ± 0,37 αντίστοιχα. B) Η % ειδική δέσμευση της [¹²⁵I]-Tyr⁰-σοβαγίνης στον WT ή στον ΔCys μετά από την αντίδρασή τους με το MTSEA αναπαριστάται με στήλες στο παραπάνω γράφημα. Απουσία MTSEA η ειδική δέσμευση της [¹²⁵I]-Tyr⁰-σοβαγίνης ορίζεται ως 100%. Οι στήλες αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους και τα τυπικά σφάλματα από 10-13 ανεξάρτητα πειράματα. Ο αστερίσκος δηλώνει ότι η ειδική δέσμευση της [¹²⁵I]-Tyr⁰-σοβαγίνης στον μεταλλαγμένο υποδοχέα ΔCys διαφέρει στατιστικά σημαντικά από εκείνη στον WT ($P < 0.05$; one way ANOVA).

4.1.1 Δημιουργία Cys-μεταλλαγμένων υποδοχών.

Με σκοπό να προσδιορίσουμε τη διαθεσιμότητα των αμινοξέων της TM3 του CRF₁R με την τεχνική SCAM όπως αναφέραμε παραπάνω, μεταλλάξαμε με τη μέθοδο της μεταλλαξιγένεσης κατευθυνόμενης θέσης με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR-Site Directed Mutagenesis) ένα τη κάθε φορά τα αμινοξέα της TM3 του ΔCys σε κυστεΐνη (τεχνητές Cys). Συγκεκριμένα μεταλλάξαμε τα αμινοξέα της TM3 από τη θέση 189 έως τη θέση 210, δημιουργώντας έτσι τους Cys-μεταλλαγμένους υποδοχείς ΔCys+R189C έως ΔCys+G210C. Η θέση 211 του WT CRF₁R περιέχει μια Cys η οποία μεταλλάχτηκε σε Ser, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, με σκοπό τη δημιουργία του ΔCys.

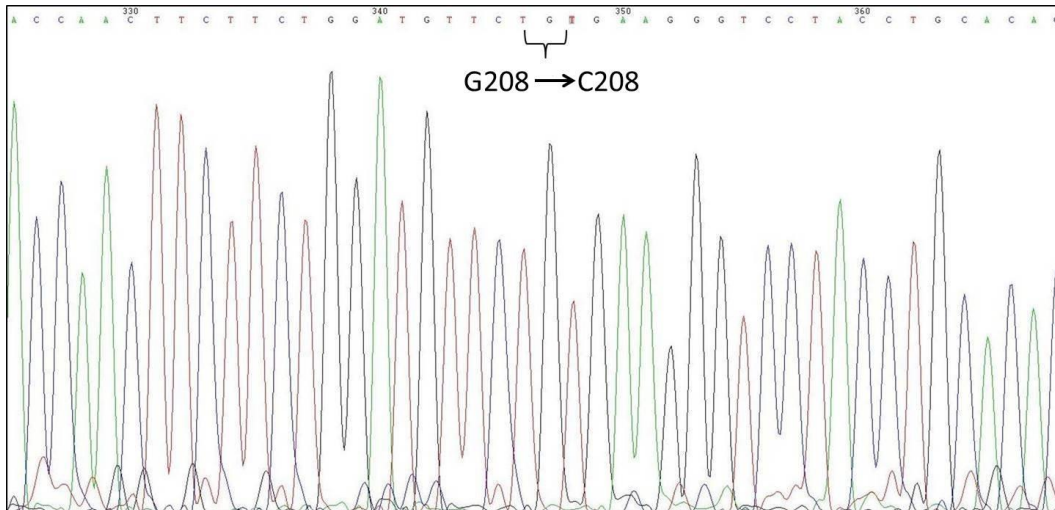
Οι μεταλλάξεις των αμινοξέων της TM3 από τη θέση 189 έως τη θέση 206 είχαν ήδη πραγματοποιηθεί πριν την εκπόνηση της εργασίας αυτής. Στη παρούσα ερευνητική εργασία παρουσιάζονται μόνο τα αποτελέσματα των Cys-μεταλλάξεων των αμινοξέων του ΔCys από τη θέση 207 έως 210, όπως αυτές επιβεβαιώθηκαν από την ανάγνωση αλληλουχιών βάσεων DNA (Εικόνες 4.5-4.8).

ο Μετάλλαξη της F207 σε C207.



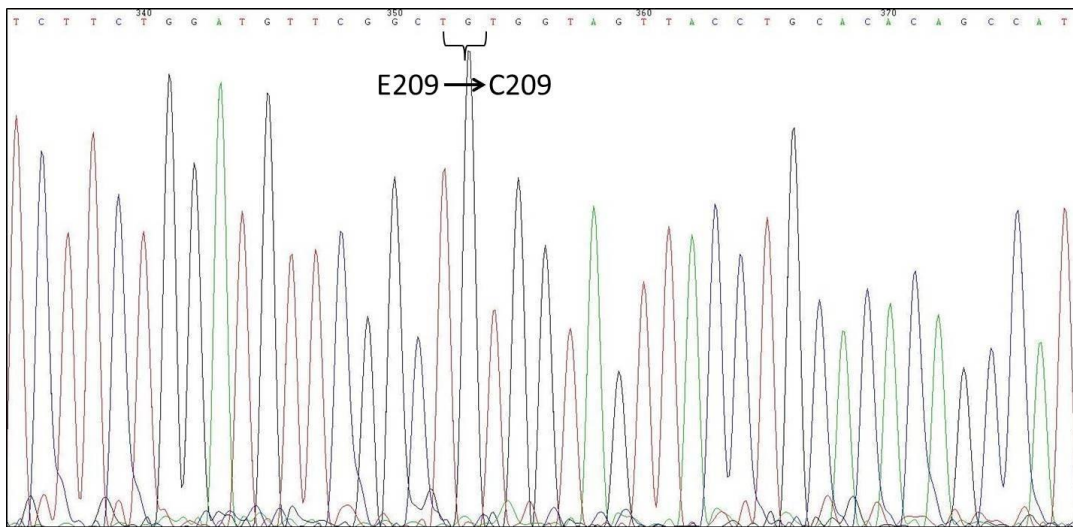
Εικόνα 4.5: Μετάλλαξη της F207 σε C207. Στο χρωματογράφημα διακρίνεται η περιοχή των νουκλεοτιδίων μέσα στην οποία υπάρχει η αλληλουχία TGC που κωδικοποιεί τη C στη θέση 207 του ΔCys. Τα νουκλεοτίδια αυτά αντικατέστησαν την αλληλουχία TTC που κωδικοποιεί τη F207 του ΔCys.

○ **Μετάλλαξη της G208 σε C208.**



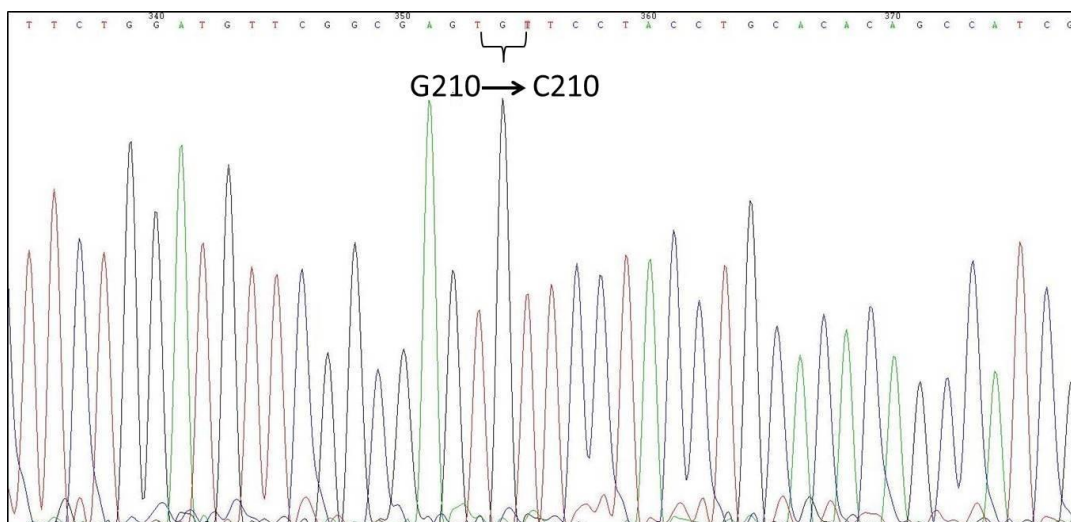
Εικόνα 4.6: Μετάλλαξη της G208 σε C208. Στο χρωματογράφημα διακρίνεται η περιοχή των νουκλεοτιδίων μέσα στην οποία υπάρχει η αλληλουχία TGT που κωδικοποιεί τη C στη θέση 208 του ΔCys. Τα νουκλεοτίδια αυτά αντικατέστησαν την αλληλουχία GGC που κωδικοποιεί τη G208 του ΔCys.

○ **Μετάλλαξη της E209 σε C209.**



Εικόνα 4.7: Μετάλλαξη της E209 σε C209. Στο χρωματογράφημα διακρίνεται η περιοχή των νουκλεοτιδίων μέσα στην οποία υπάρχει η αλληλουχία TGT που κωδικοποιεί C στη θέση 209 του ΔCys. Τα νουκλεοτίδια αυτά αντικατέστησαν την αλληλουχία GAG που κωδικοποιεί το E209 του ΔCys.

ο **Μετάλλαξη της G210 σε C210.**



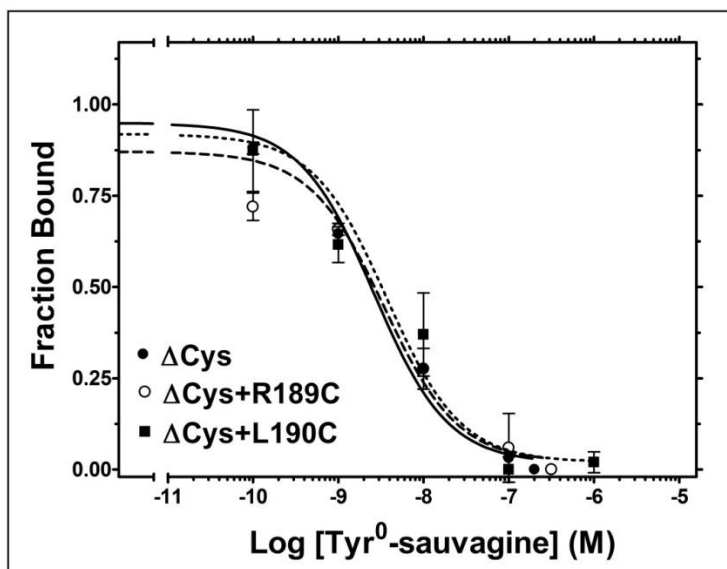
Εικόνα 4.8: Μετάλλαξη της G210 σε C210. Στο χρωματογράφημα διακρίνεται η περιοχή των νουκλεοτιδίων μέσα στην οποία υπάρχει η αλληλουχία TGT που κωδικοποιεί τη C στη θέση 210 του ΔCys. Τα νουκλεοτίδια αυτά αντικατέστησαν την αλληλουχία GGA που κωδικοποιεί τη G210 του ΔCys.

4.1.2 Επίδραση των Cys-μεταλλάξεων των αμινοξέων της TM3 του ΔCys στη συγγένεια δέσμευσης της Tyr⁰-σοβαγίνης.

Πριν εφαρμόσουμε την μέθοδο SCAM, εξετάσαμε την επίδραση των Cys-μεταλλάξεων (R189C έως G210C) των αμινοξέων της TM3 του ΔCys στις φαρμακολογικές ιδιότητες του υποδοχέα, προσδιορίζοντας τη συγγένεια δέσμευσης ($-\text{LogK}_D$) της Tyr⁰-σοβαγίνης για τους Cys-μεταλλαγμένους υποδοχείς. Η συγγένεια δέσμευσης της Tyr⁰-σοβαγίνης προσδιορίστηκε (σε πειράματα ομόλογης συναγωνιστικής δέσμευσης) με βάση την ικανότητα του πεπτιδίου αυτού να εκτοπίζει το ραδιοσημασμένο πεπτίδιο, [¹²⁵I]-Tyr⁰-σοβαγίνη, σε μεμβρανικά παρασκευάσματα από HEK 293 κύτταρα που εκφράζουν σταθερά τους υπό εξέταση υποδοχείς (Εικόνες 4.9-4.21).

R189C και L190C μεταλλάξεις

Η μετάλλαξη σε Cys των R189 και L190 του ΔCys, δημιουργώντας έτσι τους μεταλλαγμένους υποδοχείς ΔCys+R189C και ΔCys+L190C, δεν επηρέασε σημαντικά τη συγγένεια δέσμησης της Tyr⁰-σοβαγίνης, η οποία προσδιορίστηκε σε πειράματα ομόλογης συναγωνιστικής δέσμησης (Εικόνα 4.9). Συγκεκριμένα οι συγγένειες δέσμησης (-LogK_D) της Tyr⁰-σοβαγίνης, για τον ΔCys καθώς και τους ΔCys+R189C και ΔCys+L190C, ήταν 8,59 ± 0,37, 8,38 ± 0,11 και 8,53 ± 0,06, αντίστοιχα.

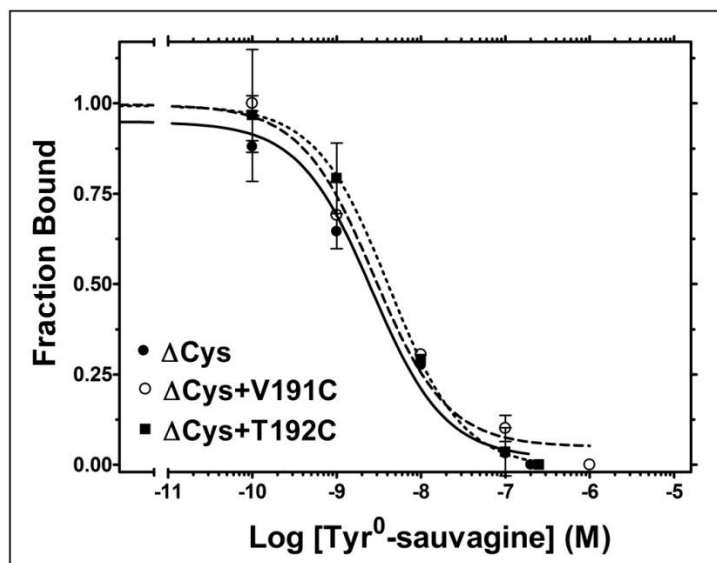


Εικόνα 4.9: Συναγωνιστική δέσμηση της Tyr⁰-σοβαγίνης στους ΔCys, ΔCys+R189C και ΔCys+L190C.

Ο συναγωνισμός της δέσμησης της [¹²⁵I]-Tyr⁰-σοβαγίνης από την Tyr⁰-σοβαγίνη για τους υποδοχείς ΔCys, ΔCys+R189C και ΔCys+L190C πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στα «Υλικά και Μέθοδοι». Οι μέσοι όροι (εις διπλούν) και τα σταθερά σφάλματα των τιμών προέρχονται από ένα χαρακτηριστικό πείραμα που έγινε 3-7 φορές δίνοντας παρόμοια αποτελέσματα. Η συγγένεια δέσμησης της Tyr⁰-σοβαγίνης (-LogK_D) που προσδιορίστηκε από αυτά τα πειράματα για τους υποδοχείς ΔCys, ΔCys+R189C και ΔCys+L190C ήταν 8,59 ± 0,37, 8,38 ± 0,11 και 8,53 ± 0,06 αντίστοιχα.

V191C και T192C μεταλλάξεις

Η μετάλλαξη σε Cys των V191 και T192 του ΔCys, δημιουργώντας έτσι τους μεταλλαγμένους υποδοχείς ΔCys+V191C και ΔCys+T192C, δεν επηρέασε σημαντικά τη συγγένεια δέσμευσης της Tyr⁰-σοβαγίνης, η οποία προσδιορίστηκε σε πειράματα ομόλογης συναγωνιστικής δέσμευσης (Εικόνα 4.10). Συγκεκριμένα οι συγγένειες δέσμευσης (-LogK_D) της Tyr⁰-σοβαγίνης, για τον ΔCys καθώς και τους ΔCys+V191C και ΔCys+T192C, ήταν 8,59 ± 0,37, 8,57 ± 0,02 και 8,50 ± 0,24, αντίστοιχα.

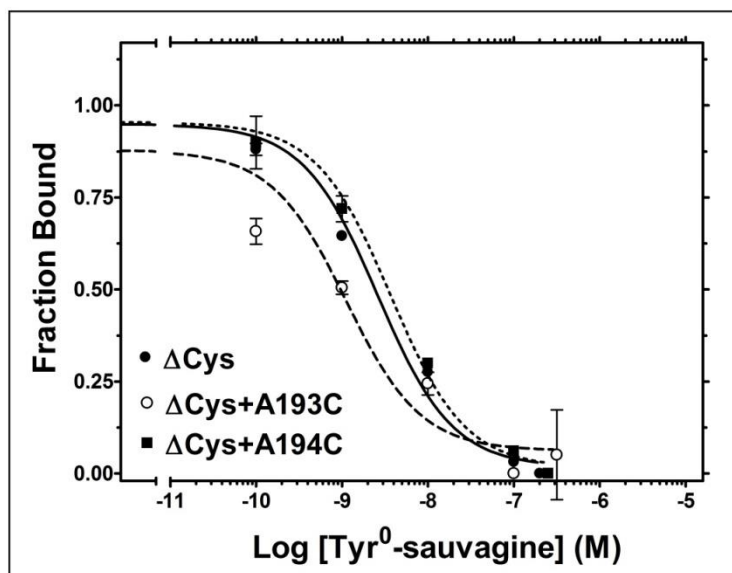


Εικόνα 4.10: Συναγωνιστική δέσμευση της Tyr⁰-σοβαγίνης στους ΔCys, ΔCys+V191C και ΔCys+T192C.

Ο συναγωνισμός της δέσμευσης της [¹²⁵I]-Tyr⁰-σοβαγίνης από την Tyr⁰-σοβαγίνη για τους υποδοχείς ΔCys, ΔCys+V191C και ΔCys+T192C πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στα «Υλικά και Μέθοδοι». Οι μέσοι όροι (εις διπλούν) και τα σταθερά σφάλματα των τιμών προέρχονται από ένα χαρακτηριστικό πείραμα που έγινε 3-5 φορές δίνοντας παρόμοια αποτελέσματα. Η συγγένεια δέσμευσης της Tyr⁰-σοβαγίνης (-LogK_D) που προσδιορίστηκε από αυτά τα πειράματα για τους υποδοχείς ΔCys, ΔCys+V191C και ΔCys+T192C ήταν 8,59 ± 0,37, 8,57 ± 0,02 και 8,50 ± 0,24 αντίστοιχα.

A193C και A194C μεταλλάξεις

Η μετάλλαξη σε Cys των A193 και A194 του ΔCys, δημιουργώντας έτσι τους μεταλλαγμένους υποδοχείς ΔCys+A193C και ΔCys+A194C, δεν επηρέασε σημαντικά τη συγγένεια δέσμευσης της Tyr⁰-σοβαγίνης, η οποία προσδιορίστηκε σε πειράματα ομόλογης συναγωνιστικής δέσμευσης (Εικόνα 4.11). Συγκεκριμένα οι συγγένειες δέσμευσης (-LogK_D) της Tyr⁰-σοβαγίνης, για τον ΔCys καθώς και τους ΔCys+A193C και ΔCys+A194C, ήταν 8,59 ± 0,37, 8,77 ± 0,12 και 7,87 ± 0,53 αντίστοιχα.

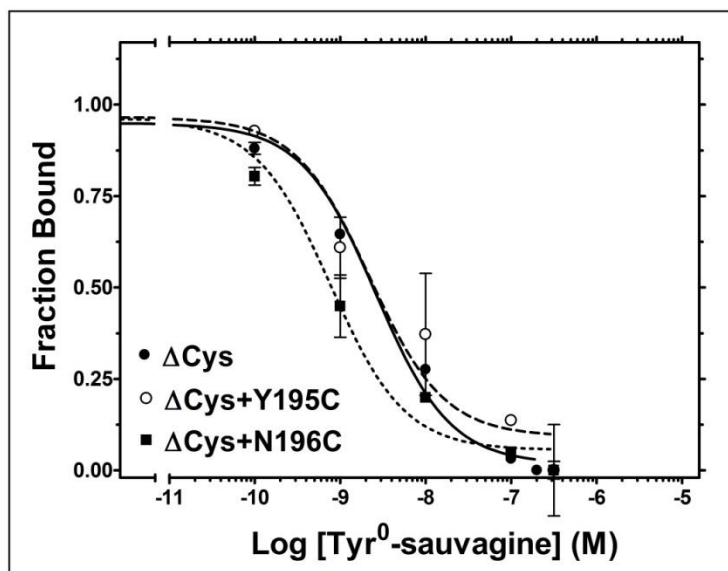


Εικόνα 4.11: Συναγωνιστική δέσμευση της Tyr⁰-σοβαγίνης στους ΔCys, ΔCys+A193C και ΔCys+A194C.

Ο συναγωνισμός της δέσμευσης της [¹²⁵I]-Tyr⁰-σοβαγίνης από την Tyr⁰-σοβαγίνη για τους υποδοχείς ΔCys, ΔCys+A193C και ΔCys+A194C πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στα «Υλικά και Μέθοδοι». Οι μέσοι όροι (εις διπλούν) και τα σταθερά σφάλματα των τιμών προέρχονται από ένα χαρακτηριστικό πείραμα που έγινε 3-5 φορές δίνοντας παρόμοια αποτελέσματα. Η συγγένεια δέσμευσης της Tyr⁰-σοβαγίνης (-LogK_D) που προσδιορίστηκε από αυτά τα πειράματα για τους υποδοχείς ΔCys, ΔCys+A193C και ΔCys+A194C ήταν 8,59 ± 0,37, 8,77 ± 0,12 και 7,87 ± 0,53 αντίστοιχα.

Y195C και N196C μεταλλάξεις

Η μετάλλαξη σε Cys των Y195 και N196 του ΔCys, δημιουργώντας έτσι τους μεταλλαγμένους υποδοχείς ΔCys+Y195C και ΔCys+N196C, δεν επηρέασε σημαντικά τη συγγένεια δέσμευσης της Tyr⁰-σοβαγίνης, η οποία προσδιορίστηκε σε πειράματα ομόλογης συναγωνιστικής δέσμευσης (Εικόνα 4.12). Συγκεκριμένα οι συγγένειες δέσμευσης (-LogK_D) της Tyr⁰-σοβαγίνης, για τον ΔCys καθώς και τους μεταλλαγμένους υποδοχείς ΔCys+Y195C και ΔCys+N196C, ήταν 8,59 ± 0,37, 8,94 ± 0,23 και 8,85 ± 0,21 αντίστοιχα.

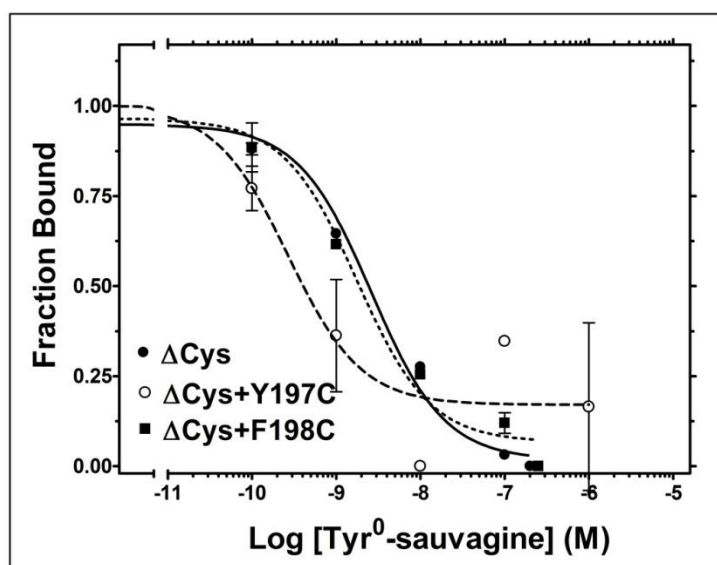


Εικόνα 4.12: Συναγωνιστική δέσμευση της Tyr⁰-σοβαγίνης στους ΔCys, ΔCys+Y195C και ΔCys+N196C.

Ο συναγωνισμός της δέσμευσης της [¹²⁵I]-Tyr⁰-σοβαγίνης από την Tyr⁰-σοβαγίνη για τους υποδοχείς ΔCys, ΔCys+Y195C και ΔCys+N196C πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στα «Υλικά και Μέθοδοι». Οι μέσοι όροι (εις διπλούν) και τα σταθερά σφάλματα των τιμών προέρχονται από ένα χαρακτηριστικό πείραμα που έγινε 3-6 φορές δίνοντας παρόμοια αποτελέσματα. Η συγγένεια δέσμευσης της Tyr⁰-σοβαγίνης (-LogK_D) που προσδιορίστηκε από αυτά τα πειράματα για τους υποδοχείς ΔCys, ΔCys+Y195C και ΔCys+N196C ήταν 8,59 ± 0,37, 8,94 ± 0,23 και 8,85 ± 0,21 αντίστοιχα.

Y197C και F198C μεταλλάξεις

Η μετάλλαξη σε Cys των Y197 και F198 του ΔCys, δημιουργώντας έτσι τους μεταλλαγμένους υποδοχείς ΔCys+Y197C και ΔCys+F198C, δεν επηρέασε σημαντικά τη συγγένεια δέσμευσης της Tyr⁰-σοβαγίνης, η οποία προσδιορίστηκε σε πειράματα ομόλογης συναγωνιστικής δέσμευσης (Εικόνα 4.13). Συγκεκριμένα οι συγγένειες δέσμευσης (-LogK_D) της Tyr⁰-σοβαγίνης, για τον ΔCys καθώς και τους μεταλλαγμένους υποδοχείς ΔCys+Y197C και ΔCys+F198C, που προσδιορίστηκαν σε πειράματα ομόλογης συναγωνιστικής δέσμευσης ήταν 8,59 ± 0,37, 9,09 ± 0,51 και 9,28 ± 0,53, αντίστοιχα.

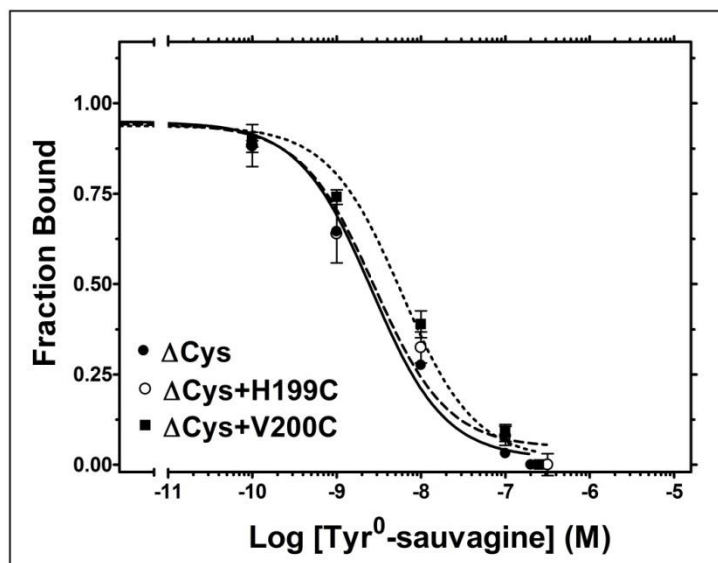


Εικόνα 4.13: Συναγωνιστική δέσμευση της Tyr⁰-σοβαγίνης στους ΔCys, ΔCys+Y197C και ΔCys+F198C.

Ο συναγωνισμός της δέσμευσης της [¹²⁵I]-Tyr⁰-σοβαγίνης από την Tyr⁰-σοβαγίνη για τους υποδοχείς ΔCys, ΔCys+Y197C και ΔCys+F198C πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στα «Υλικά και Μέθοδοι». Οι μέσοι όροι (εις διπλούν) και τα σταθερά σφάλματα των τιμών προέρχονται από ένα χαρακτηριστικό πείραμα που έγινε 3 φορές δίνοντας παρόμοια αποτελέσματα. Η συγγένεια δέσμευσης της Tyr⁰-σοβαγίνης (-LogK_D) που προσδιορίστηκε από αυτά τα πειράματα για τους υποδοχείς ΔCys, ΔCys+Y197C καθώς και ΔCys+F198C ήταν 8,59 ± 0,37, 9,09 ± 0,51 και 9,28 ± 0,53 αντίστοιχα.

H199C και V200C μεταλλάξεις

Η μετάλλαξη σε Cys των H199 και V200 του Δ Cys, δημιουργώντας έτσι τους μεταλλαγμένους υποδοχείς Δ Cys+H199C και Δ Cys+V200C, δεν επηρέασε σημαντικά τη συγγένεια δέσμευσης της Tyr⁰-σοβαγίνης, η οποία προσδιορίστηκε σε πειράματα ομόλογης συναγωνιστικής δέσμευσης (Εικόνα 4.14). Συγκεκριμένα οι συγγένειες δέσμευσης ($-\text{Log}K_D$) της Tyr⁰-σοβαγίνης, για τον Δ Cys καθώς και τους μεταλλαγμένους υποδοχείς Δ Cys+H199C και Δ Cys+V200C, ήταν $8,59 \pm 0,37$, $8,61 \pm 0,12$ και $7,95 \pm 0,53$, αντίστοιχα.

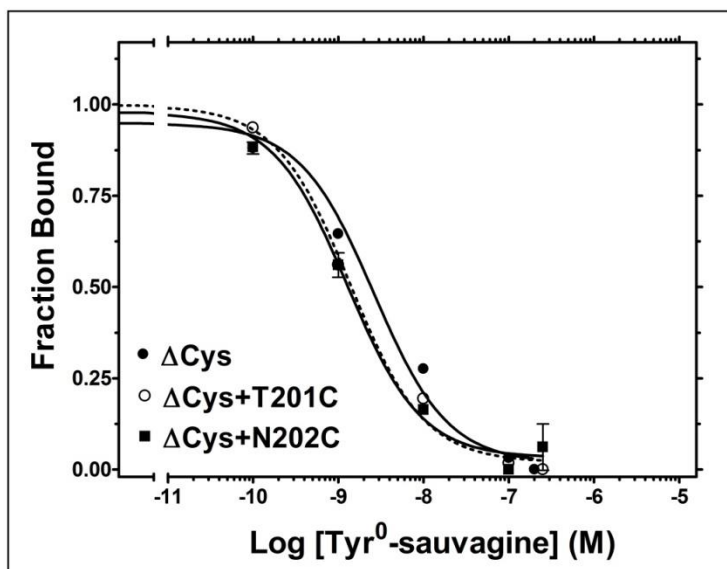


Εικόνα 4.14: Συναγωνιστική δέσμευση της Tyr⁰-σοβαγίνης στους Δ Cys, Δ Cys+H199C και Δ Cys+V200C.

Ο συναγωνισμός της δέσμευσης της [¹²⁵I]-Tyr⁰-σοβαγίνης από την Tyr⁰-σοβαγίνη για τους υποδοχείς Δ Cys, Δ Cys+H199C και Δ Cys+V200C πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στα «Υλικά και Μέθοδοι». Οι μέσοι όροι (εις διπλούν) και τα σταθερά σφάλματα των τιμών προέρχονται από ένα χαρακτηριστικό πείραμα που έγινε 3-5 φορές δίνοντας παρόμοια αποτελέσματα. Η συγγένεια δέσμευσης της Tyr⁰-σοβαγίνης ($-\text{Log}K_D$) που προσδιορίστηκε από αυτά τα πειράματα για τους υποδοχείς Δ Cys, Δ Cys+H199C καθώς και Δ Cys+V200C ήταν $8,59 \pm 0,37$, $8,61 \pm 0,12$ και $7,95 \pm 0,53$ αντίστοιχα.

T201C και N202C μεταλλάξεις

Η μετάλλαξη σε Cys των T201 και N202 του Δ Cys, δημιουργώντας έτσι τους μεταλλαγμένους υποδοχείς Δ Cys+T201C και Δ Cys+N202C, δεν επηρέασε σημαντικά τη συγγένεια δέσμευσης της Tyr⁰-σοβαγίνης, η οποία προσδιορίστηκε σε πειράματα ομόλογης συναγωνιστικής δέσμευσης (Εικόνα 4.15). Συγκεκριμένα οι συγγένειες δέσμευσης ($-\text{Log}K_D$) της Tyr⁰-σοβαγίνης, για τον Δ Cys καθώς και τους μεταλλαγμένους υποδοχείς Δ Cys+T201C και Δ Cys+N202C, ήταν $8,59 \pm 0,37$, $8,22 \pm 0,41$ και $8,26 \pm 0,32$ αντίστοιχα.

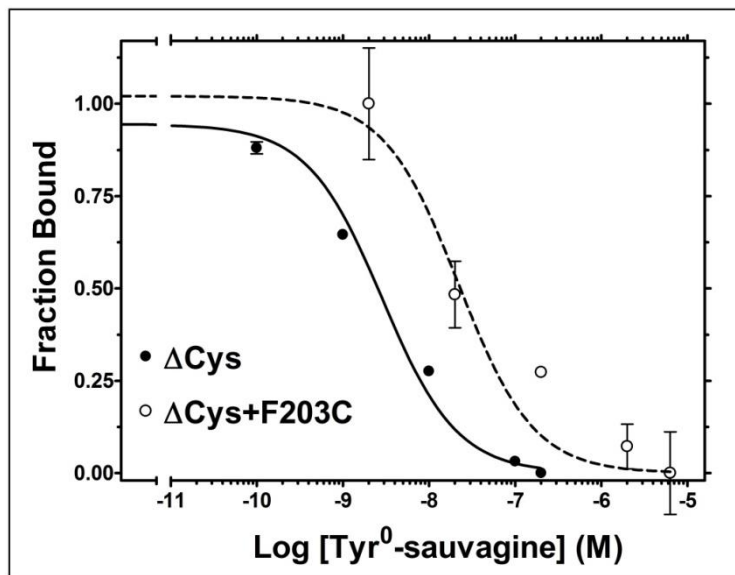


Εικόνα 4.15: Συναγωνιστική δέσμευση της Tyr⁰-σοβαγίνης στους Δ Cys, Δ Cys+T201C και Δ Cys+N202C.

Ο συναγωνισμός της δέσμευσης της [¹²⁵I]-Tyr⁰-σοβαγίνης από την Tyr⁰-σοβαγίνη για τους υποδοχείς Δ Cys, Δ Cys+T201C και Δ Cys+N202C πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στα «Υλικά και Μέθοδοι». Οι μέσοι όροι (εις διπλούν) και τα σταθερά σφάλματα των τιμών προέρχονται από ένα χαρακτηριστικό πείραμα που έγινε 3 φορές δίνοντας παρόμοια αποτελέσματα. Η συγγένεια δέσμευσης της Tyr⁰-σοβαγίνης ($-\text{Log}K_D$) που προσδιορίστηκε από αυτά τα πειράματα για τους υποδοχείς Δ Cys, Δ Cys+T201C καθώς και Δ Cys+N202C ήταν $8,59 \pm 0,37$, $8,22 \pm 0,41$ και $8,26 \pm 0,32$ αντίστοιχα.

F203C μετάλλαξη

Η Cys μετάλλαξη της F203 του ΔCys, δημιουργώντας έτσι τον μεταλλαγμένο υποδοχέα ΔCys+F203C, μείωσε σημαντικά (κατά 18 φορές) τη συγγένεια δέσμευσης της Tyr⁰-σοβαγίνης, η οποία προσδιορίστηκε σε πειράματα ομόλογης συναγωνιστικής δέσμευσης (Εικόνα 4.16). Συγκεκριμένα η συγγένεια δέσμευσης (-LogK_D) της Tyr⁰-σοβαγίνης, για τον ΔCys και τον ΔCys+F203C, ήταν 8,59 ± 0,37 και 7,33 ± 0,20, αντίστοιχα.

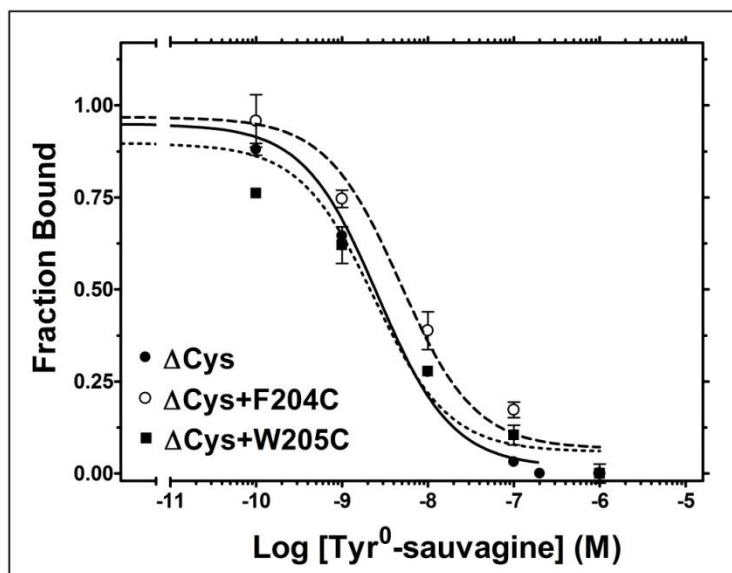


Εικόνα 4.16: Συναγωνιστική δέσμευση της Tyr⁰-σοβαγίνης στους ΔCys και ΔCys+F203C.

Ο συναγωνισμός της δέσμευσης της [¹²⁵I]-Tyr⁰-σοβαγίνης από την Tyr⁰-σοβαγίνη για τους υποδοχείς ΔCys και ΔCys+F203C πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στα «Υλικά και Μέθοδοι». Οι μέσοι όροι (εις διπλούν) και τα σταθερά σφάλματα προέρχονται από ένα χαρακτηριστικό πείραμα που έγινε 3-5 φορές δίνοντας παρόμοια αποτελέσματα. Η συγγένεια δέσμευσης της Tyr⁰-σοβαγίνης (-LogK_D) που προσδιορίστηκε από αυτά τα πειράματα για τους υποδοχείς ΔCys και ΔCys+F203C ήταν 8,59 ± 0,37 και 7,33 ± 0,20 αντίστοιχα.

F204C και W205C μεταλλάξεις

Η μετάλλαξη σε Cys των F204 και W205 του ΔCys, δημιουργώντας έτσι τους μεταλλαγμένους υποδοχείς ΔCys+F204C και ΔCys+W205C, δεν επηρέασε σημαντικά τη συγγένεια δέσμευσης της Tyr⁰-σοβαγίνης, η οποία προσδιορίστηκε σε πειράματα ομόλογης συναγωνιστικής δέσμευσης (Εικόνα 4.17). Συγκεκριμένα οι συγγένειες δέσμευσης (-LogK_D) της Tyr⁰-σοβαγίνης, για τον ΔCys και τους μεταλλαγμένους υποδοχείς ΔCys+F204C και ΔCys+W205C, ήταν 8,59 ± 0,37, 8,17 ± 0,32 και 8,50 ± 0,06, αντίστοιχα.

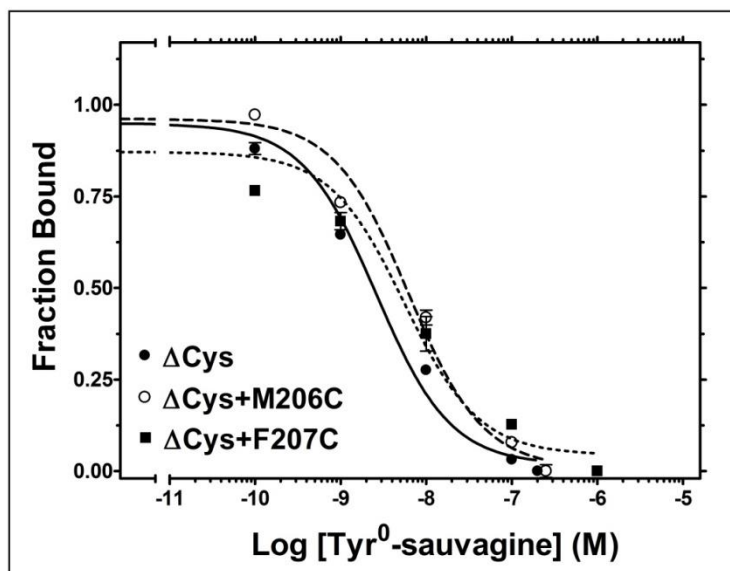


Εικόνα 4.17: Συναγωνιστική δέσμευση της Tyr⁰-σοβαγίνης στους ΔCys, ΔCys+F204C και ΔCys+W205C.

Ο συναγωνισμός της δέσμευσης της [¹²⁵I]-Tyr⁰-σοβαγίνης από την Tyr⁰-σοβαγίνη για τους υποδοχείς ΔCys, ΔCys+F204C και ΔCys+W205C πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στα «Υλικά και Μέθοδοι». Οι μέσοι όροι (εις διπλούν) και τα σταθερά σφάλματα των τιμών προέρχονται από ένα χαρακτηριστικό πείραμα που έγινε 3-6 φορές δίνοντας παρόμοια αποτελέσματα. Η συγγένεια δέσμευσης της Tyr⁰-σοβαγίνης (-LogK_D) που προσδιορίστηκε από αυτά τα πειράματα για τους υποδοχείς ΔCys, ΔCys+F204C καθώς και ΔCys+W205C ήταν 8,59 ± 0,37, 8,17 ± 0,32 και 8,50 ± 0,06 αντίστοιχα.

M206C και F207C μεταλλάξεις

Η μετάλλαξη σε Cys των M206 και F207 του ΔCys, δημιουργώντας έτσι τους μεταλλαγμένους υποδοχείς ΔCys+M206C και ΔCys+F207C, δεν επηρέασε σημαντικά τη συγγένεια δέσμευσης της Tyr⁰-σοβαγίνης, η οποία προσδιορίστηκε σε πειράματα ομόλογης συναγωνιστικής δέσμευσης (Εικόνα 4.18). Συγκεκριμένα οι συγγένειες δέσμευσης (-LogK_D) της Tyr⁰-σοβαγίνης, για τον ΔCys καθώς και τους μεταλλαγμένους υποδοχείς ΔCys+M206C και ΔCys+F207C, ήταν 8,59 ± 0,37, 7,95 ± 0,52 και 8,52 ± 0,16, αντίστοιχα.

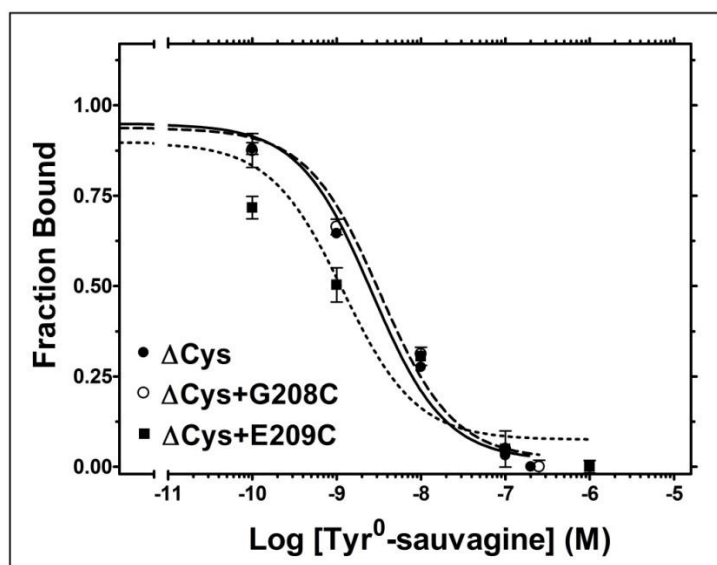


Εικόνα 4.18: Συναγωνιστική δέσμευση της Tyr⁰-σοβαγίνης στους ΔCys, ΔCys+M206C και ΔCys+F207C.

Ο συναγωνισμός της δέσμευσης της [¹²⁵I]-Tyr⁰-σοβαγίνης από την Tyr⁰-σοβαγίνη για τους υποδοχείς ΔCys, ΔCys+M206C και ΔCys+F207C πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στα «Υλικά και Μέθοδοι». Οι μέσοι όροι (εις διπλούν) και τα σταθερά σφάλματα των τιμών προέρχονται από ένα χαρακτηριστικό πείραμα που έγινε 3 φορές δίνοντας παρόμοια αποτελέσματα. Η συγγένεια δέσμευσης της Tyr⁰-σοβαγίνης (-LogK_D) που προσδιορίστηκε από αυτά τα πειράματα για τους υποδοχείς ΔCys, ΔCys+M206C καθώς και ΔCys+F207C ήταν 8,59 ± 0,37, 7,95 ± 0,52 και 8,52 ± 0,16 αντίστοιχα.

G208C και E209C μεταλλάξεις

Η μετάλλαξη σε Cys των G208 και E209 του ΔCys, δημιουργώντας έτσι τους μεταλλαγμένους υποδοχείς ΔCys+G208C και ΔCys+E209C, δεν επηρέασε σημαντικά τη συγγένεια δέσμευσης της Tyr⁰-σοβαγίνης, η οποία προσδιορίστηκε σε πειράματα ομόλογης συναγωνιστικής δέσμευσης (Εικόνα 4.19). Συγκεκριμένα οι συγγένειες δέσμευσης (-LogK_D) της Tyr⁰-σοβαγίνης, για τον ΔCys καθώς και τους μεταλλαγμένους υποδοχείς ΔCys+G208C και ΔCys+E209C ήταν 8,59 ± 0,37, 8,15 ± 0,30 και 8,70 ± 0,16, αντίστοιχα.

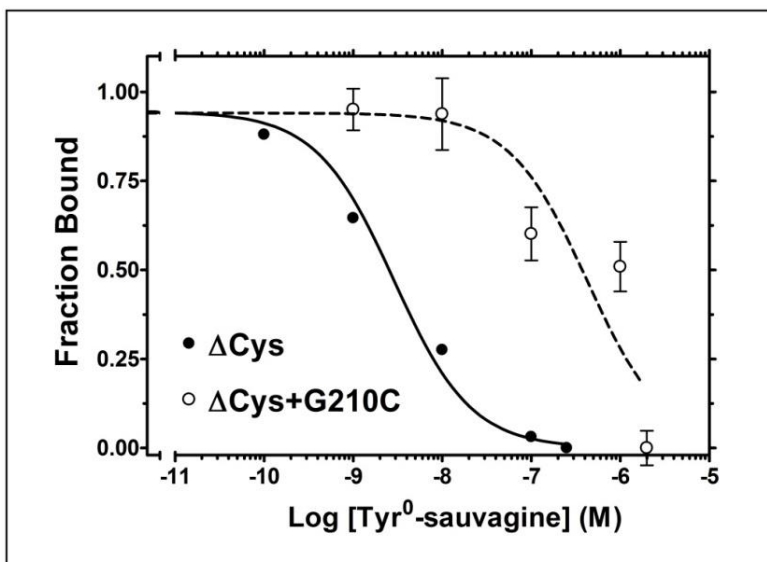


Εικόνα 4.19: Συναγωνιστική δέσμευση της Tyr⁰-σοβαγίνης στους ΔCys, ΔCys+G208C και ΔCys+E209C.

Ο συναγωνισμός της δέσμευσης της [¹²⁵I]-Tyr⁰-σοβαγίνης από την Tyr⁰-σοβαγίνη για τους υποδοχείς ΔCys, ΔCys+G208C και ΔCys+E209C πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στα «Υλικά και Μέθοδοι». Οι μέσοι όροι (εις διπλούν) και τα σταθερά σφάλματα των τιμών προέρχονται από ένα χαρακτηριστικό πείραμα που έγινε 3-4 φορές δίνοντας παρόμοια αποτελέσματα. Η συγγένεια δέσμευσης της Tyr⁰-σοβαγίνης (-LogK_D) που προσδιορίστηκε από αυτά τα πειράματα για τους υποδοχείς ΔCys, ΔCys+G208C καθώς και ΔCys+E209C ήταν 8,59 ± 0,37, 8,15 ± 0,30 και 8,70 ± 0,16, αντίστοιχα.

G210C μετάλλαξη

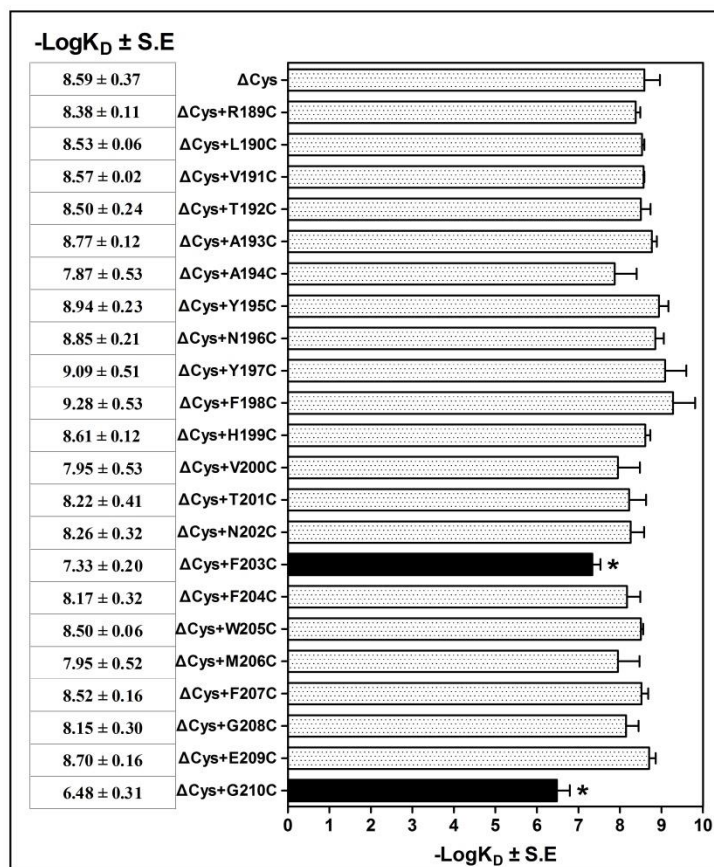
Η Cys μετάλλαξη της G210 του Δ Cys, δημιουργώντας έτσι τον μεταλλαγμένο υποδοχέα Δ Cys+G210C, μείωσε σημαντικά (κατά 129 φορές) τη συγγένεια δέσμευσης της Tyr⁰-σοβαγίνης, η οποία προσδιορίστηκε σε πειράματα ομόλογης συναγωνιστικής δέσμευσης (Εικόνα 4.20). Συγκεκριμένα η συγγένεια δέσμευσης ($-\text{Log}K_D$) της Tyr⁰-σοβαγίνης, για τον Δ Cys και τον Δ Cys+G210C, ήταν $8,59 \pm 0,37$ και $6,48 \pm 0,31$ αντίστοιχα.



Εικόνα 4.20: Συναγωνιστική δέσμευση της Tyr⁰-σοβαγίνης στους Δ Cys και Δ Cys+G210C.

Ο συναγωνισμός της δέσμευσης της [¹²⁵I]-Tyr⁰-σοβαγίνης από την Tyr⁰-σοβαγίνη για τους μεταλλαγμένους υποδοχείς Δ Cys και Δ Cys+G210C πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στα «Υλικά και Μέθοδοι». Οι μέσοι όροι (εις διπλούν) και τα σταθερά σφάλματα προέρχονται από ένα χαρακτηριστικό πείραμα που έγινε 3 φορές δίνοντας παρόμοια αποτελέσματα. Η συγγένεια δέσμευσης της Tyr⁰-σοβαγίνης ($-\text{Log}K_D$) που προσδιορίστηκε από αυτά τα πειράματα για τους υποδοχείς Δ Cys και Δ Cys+G210C ήταν $8,59 \pm 0,37$ και $6,48 \pm 0,31$ αντίστοιχα.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα όλων των παραπάνω φαρμακολογικών πειραμάτων έδειξαν ότι οι Cys-μεταλλαγμένοι υποδοχείς του Δ Cys, εκτός των Δ Cys+F203C και Δ Cys+G210C, έχουν παρόμοιες συγγένειες δέσμευσης με εκείνη του Δ Cys (Εικόνα 4.21). Αντίθετα η συγγένεια δέσμευσης της Tyr⁰-σοβαγίνης στον Δ Cys ελαττώθηκε σημαντικά με τις μεταλλάξεις F203C και G210C (Εικόνα 4.21).



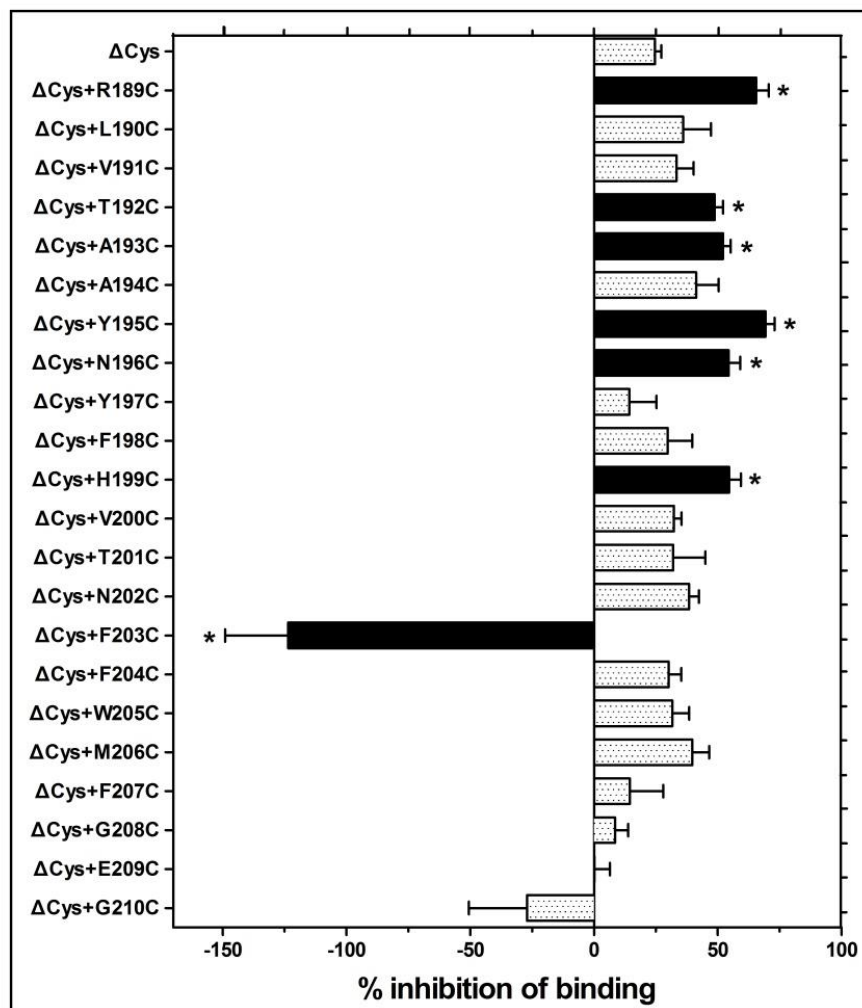
Εικόνα 4.21: Επίδραση της Cys μετάλλαξης των αμινοξέων της TM3 του ΔCys στη συγγένεια δέσμευσης της Tgr⁰-σοβαγίνης.

Οι συγγένειες δέσμευσης (-LogK_D) της Tgr⁰-σοβαγίνης για τον ΔCys και τους υποδοχείς ΔCys+R189C έως ΔCys+G210C απεικονίζονται με στήλες οι οποίες αναπαριστούν τους μέσους όρους (-LogK_D) και τα σταθερά σφάλματά (S.E) τους από 3-7 ανεξάρτητα πειράματα. Στον πίνακα αριστερά των στηλών αναγράφονται οι συγγένειες δέσμευσης της Tgr⁰-σοβαγίνης (-LogK_D ± S.E). Οι αστερίσκοι υποδηλώνουν τους Cys-μεταλλαγμένους υποδοχείς των οποίων η συγγένεια δέσμευσης της Tgr⁰-σοβαγίνης ήταν στατιστικώς σημαντικά διαφορετική από εκείνη του ΔCys ($P < 0.05$; one way ANOVA).

4.1.3 Προσδιορισμός του προσανατολισμού των αμινοξέων της TM3 του CRF₁R με τη μέθοδο SCAM

Μετά τον φαρμακολογικό χαρακτηρισμό των μεταλλαγμένων υποδοχέων που περιέχουν τις τεχνητές Cys στη TM3 λάβαμε πληροφορίες για τον προσανατολισμό των πλευρικών αλυσίδων των Cys αυτών. Συγκεκριμένα προσδιορίσαμε ποιές από τις τεχνητές Cys της TM3 είχαν την ικανότητα να αντιδρούν με το MTSEA (2,5 mM για 15 δευτερόλεπτα σε θερμοκρασία δωματίου). Η ανίχνευση της αντίδρασης του MTSEA έγινε με τον προσδιορισμό της ικανότητάς του να τροποποιεί την ειδική δέσμευση της [¹²⁵I]-Tyr⁰-σοβαγίνης στους Cys-μεταλλαγμένους υποδοχείς. Στα πειράματα αυτά επίσης χρησιμοποιήσαμε ως μάρτυρα (control) τον “αδρανή” στο MTSEA υποδοχέα ΔCys.

Από τις τεχνητές Cys, μόνο αυτές στις θέσεις 189, 192, 193, 195, 196, 199 και 203 της TM3 του υποδοχέα αντέδρασαν με το MTSEA, αφού η ειδική δέσμευση της [¹²⁵I]-Tyr⁰-σοβαγίνης στους Cys-μεταλλαγμένους υποδοχείς μειώθηκε (ΔCys+R189C, ΔCys+T192C, ΔCys+A193C, ΔCys+Y195C, ΔCys+N196C, ΔCys+H199C) ή αυξήθηκε (ΔCys+F203C) σημαντικά από το αντιδραστήριο αυτό (Εικόνα 4.22).

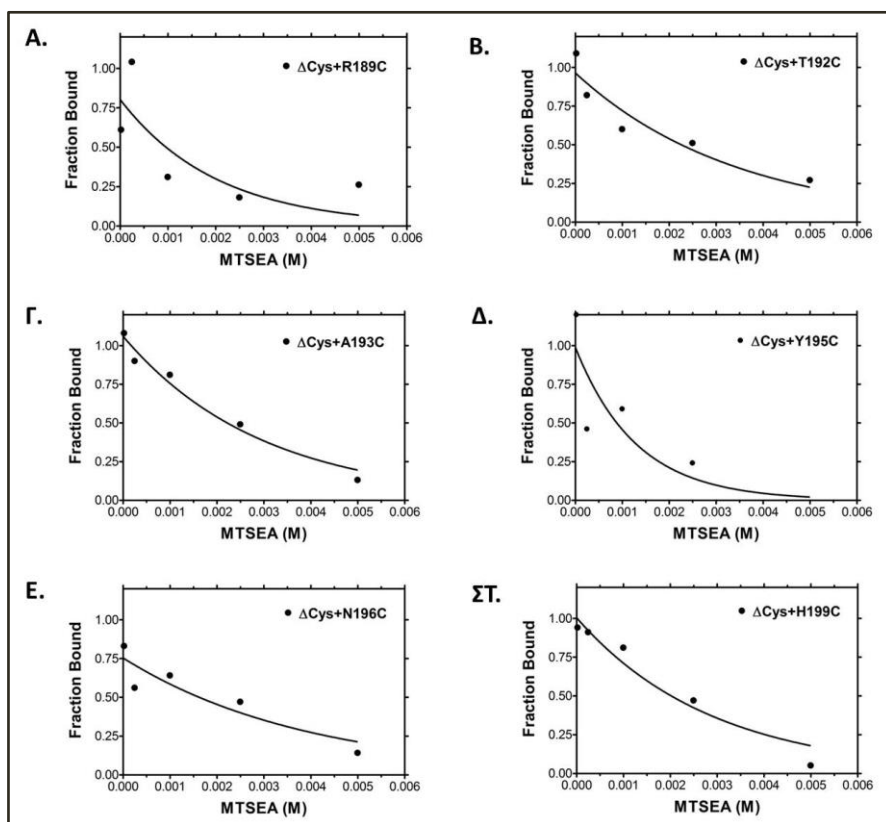


Εικόνα 4.22: Αντίδραση του MTSEA με τις τεχνητές Cys της TM3 του CRF₁R.

Η αναστολή από το MTSEA της ειδικής δέσμευσης της [¹²⁵I]-Tyr⁰-σοβαγίνης στον ΔCys ή στους υποδοχείς ΔCys+R189C έως ΔCys+G210C αναπαριστάται με στήλες στο παραπάνω γράφημα. Οι στήλες αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους και τα τυπικά σφάλματα από 3-32 ανεξάρτητα πειράματα. Η % αναστολή από το MTSEA της ειδικής δέσμευσης της [¹²⁵I]-Tyr⁰-σοβαγίνης ορίζεται ως {1- [ειδική δέσμευση μετά από την αντίδραση με MTSEA / ειδική δέσμευση απουσία MTSEA] x 100}. Αρνητική αναστολή υποδηλώνει ενίσχυση της ειδικής δέσμευσης της [¹²⁵I]-Tyr⁰-σοβαγίνης μετά από αντίδραση με το MTSEA. Ο αστερίσκος δηλώνει ότι η αναστολή/ενίσχυση από το MTSEA της ειδικής δέσμευσης της [¹²⁵I]-Tyr⁰-σοβαγίνης στους Cys-μεταλλαγμένους υποδοχείς διαφέρει στατιστικά σημαντικά από τον ΔCys. (P < 0.05; one way ANOVA).

Προσδιορισμός της σταθεράς k της αντίδρασης του MTSEA

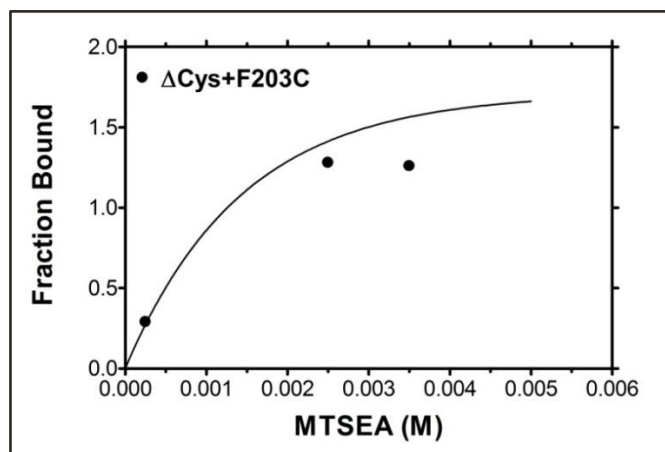
Στη συνέχεια εξετάσαμε τα χαρακτηριστικά της αντίδρασης των Cys-μεταλλαγμένων υποδοχέων με το MTSEA, προσδιορίζοντας τη δεύτερης τάξης σταθερά k της αντίδρασης. Συγκεκριμένα η δεύτερης τάξης σταθερά k της αντίδρασης των Δ Cys+R189C, Δ Cys+T192C, Δ Cys+A193C, Δ Cys+Y195C, Δ Cys+N196C, Δ Cys+H199C και Δ Cys+F203C με το MTSEA που προσδιορίστηκε από πειράματα επίδρασης αυξανόμενων συγκεντρώσεων MTSEA στην ειδική δέσμευση της [125 I]-Tyr⁰-σοβαγίνης ήταν $25,23 \pm 3,17 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $18,71 \pm 6,64 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $10,77 \pm 2,79 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $34,91 \pm 14,39 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $10,80 \pm 1,15 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $25,20 \pm 11,1 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ και $17,36 \pm 8,64 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ αντίστοιχα (Εικόνες 4.23 και 4.24).



Εικόνα 4.23: Επίδραση της συγκέντρωσης του MTSEA στην ειδική δέσμευση της [125 I]-Tyr⁰-σοβαγίνης, στους Δ Cys+R189C, Δ Cys+T192C, Δ Cys+A193C, Δ Cys+Y195C, Δ Cys+N196C και Δ Cys+H199C.

Η αναστολή της ειδικής δέσμευσης της [125 I]-Tyr⁰-σοβαγίνης στους Α) Δ Cys+R189C, Β) Δ Cys+T192C, Γ) Δ Cys+A193C, Δ) Δ Cys+Y195C, Ε) Δ Cys+N196C και ΣΤ) Δ Cys+H199C, από αυξανόμενες συγκεντρώσεις MTSEA (0,000025 M, 0,00025 M, 0,001 M, 0,0025 M και 0,005 M)

πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στα «Υλικά και Μέθοδοι». Η κάθε καμπύλη αντιπροσωπεύει ένα χαρακτηριστικό πείραμα αντίδρασης του MTSEA με ένα Cys-μεταλλαγμένο υποδοχέα που επαναλήφθηκε 4-8 φορές δίνοντας παρόμοια αποτελέσματα. Οι τιμές της σταθεράς k της αντίδρασης των Cys-μεταλλαγμένων υποδοχέων με το MTSEA που προσδιορίστηκαν από όλα τα πειράματα ήταν Α) $25,23 \pm 3,17 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ για τον $\Delta\text{Cys}+\text{R189C}$, Β) $18,71 \pm 6,64 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ για τον $\Delta\text{Cys}+\text{T192C}$, Γ) $10,77 \pm 2,79 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ για τον $\Delta\text{Cys}+\text{A193C}$, Δ) $34,91 \pm 14,39 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ για τον $\Delta\text{Cys}+\text{Y195C}$, Ε) $10,80 \pm 1,15 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ για τον $\Delta\text{Cys}+\text{N196C}$ και ΣΤ) $25,20 \pm 11,1 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ για τον $\Delta\text{Cys}+\text{H199C}$.



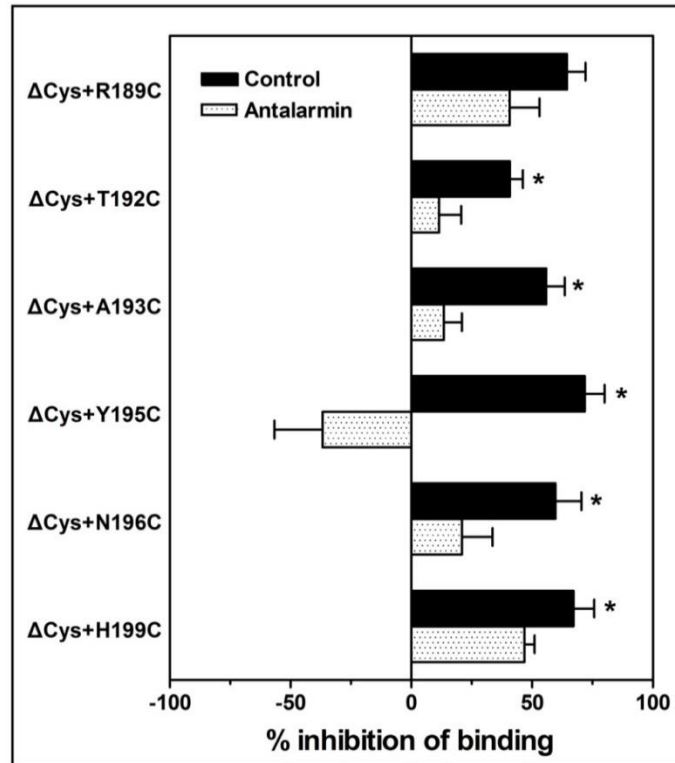
Εικόνα 4.24: Επίδραση της συγκέντρωσης του MTSEA στην ειδική δέσμευση της $[^{125}\text{I}]\text{-Tyr}^0\text{-σοθαγίνης}$ στον $\Delta\text{Cys}+\text{F203C}$.

Η αναστολή της ειδικής δέσμευσης της $[^{125}\text{I}]\text{-Tyr}^0\text{-σοθαγίνης}$ στον $\Delta\text{Cys}+\text{F203C}$ από αυξανόμενες συγκεντρώσεις MTSEA (0,000025 M, 0,00025 M, 0,001 M, 0,0025 M και 0,005 M), πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στα «Υλικά και Μέθοδοι». Η καμπύλη αντιπροσωπεύει ένα από δύο συνολικά πειράματα αντίδρασης του MTSEA με τον $\Delta\text{Cys}+\text{F203C}$ που έδωσαν παρόμοια αποτελέσματα. Η τιμή της σταθεράς k της αντίδρασης της αντίδρασης του $\Delta\text{Cys}+\text{F203C}$ με το MTSEA που προσδιορίστηκε ήταν $17,36 \pm 8,64 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

Προστασία από την αντίδραση με το MTSEA.

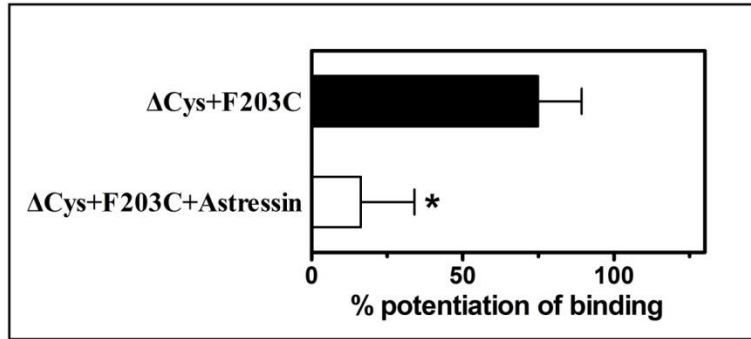
Η αντίδραση του MTSEA με τις τεχνητές Cys στις θέσεις 189, 192, 193, 195, 196, 199 και 203 της TM3 οδηγεί στο συμπέρασμα ότι οι Cys αυτές είναι προσανατολισμένες στο υδρόφιλο περιβάλλον και άρα διαθέσιμες στο αντιδραστήριο αυτό. Αν πραγματικά συμβαίνει αυτό, τότε προστασία των τεχνητών αυτών Cys από το MTSEA με προεπώαση με κάποιο προσδέτη των Cys-μεταλλαγμένων υποδοχέων, πρέπει να παρεμποδίζει την αντίδραση με το MTSEA.

Πράγματι, προεπώαση των ΔCys+R189C, ΔCys+T192C, ΔCys+A193C, ΔCys+Y195C, ΔCys+N196C, ΔCys+H199C με τον ανταγωνιστή ανταλαρμίνη (0,5-1 μM για 30 λεπτά στους 37⁰C) επιβράδυνε/παρεμπόδισε την αντίδραση των τεχνητών κυστεϊνών τους με το MTSEA (Εικόνα 4.25). Ενώ η ανταλαρμίνη (30 λεπτά στους 37⁰C) δεν μπόρεσε να προστατέψει τον ΔCys+F203C από το MTSEA (αφού δεν δεσμεύεται στον υποδοχέα αυτόν όπως εξηγείται παρακάτω), αυτό επιτεύχθηκε με την προεπώαση του υποδοχέα με τον πεπτιδικό ανταγωνιστή αστρεσσίνη (1 μM, για 60 λεπτά στους 20⁰C) (Εικόνα 4.26).



Εικόνα 4.25: Προστασία με ανταλαρμίνη των μεταλλαγμένων υποδοχέων του CRF₁R από την αντίδρασή τους με το MTSEA.

Ραβδόγραμμα που αναπαριστά την αναστολή της ειδικής δέσμευσης της [¹²⁵I]-Tyr⁰-σοβαγίνης έπειτα από αντίδραση με το MTSEA των ΔCys+R189C, ΔCys+T192C, ΔCys+A193C, ΔCys+Y195C, ΔCys+N196C, ΔCys+H199C, οι οποίοι προηγουμένως είχαν επωαστεί με ή χωρίς ανταλαρμίνη. Οι στήλες αναπαριστούν τους μέσους όρους και τα τυπικά σφάλματα από 4-9 ανεξάρτητα πειράματα. Οι αστερίσκοι υποδηλώνουν ότι η ανταλαρμίνη προστάτευσε τους Cys-μεταλλαγμένους υποδοχείς, επιβραδύνοντας στατιστικώς σημαντικά την αντίδρασή τους με το MTSEA ($P < 0.05$; paired t-test).

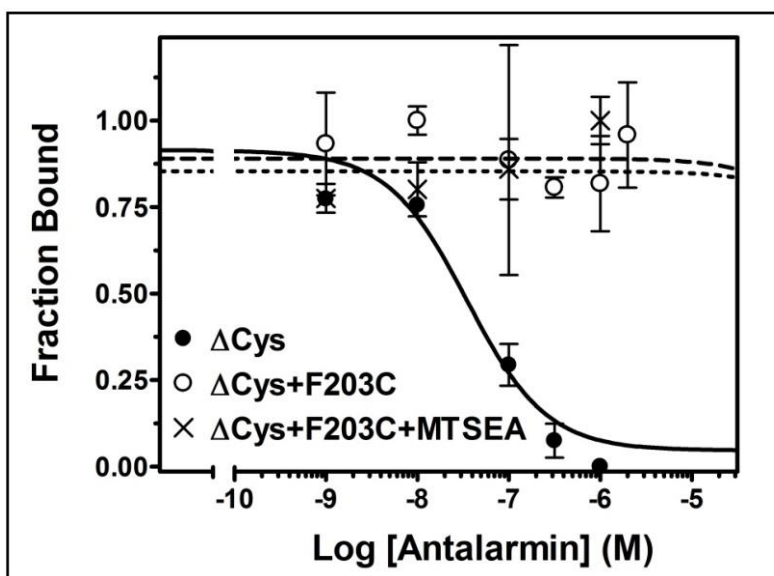


Εικόνα 4.26: Προστασία του μεταλλαγμένου υποδοχέα ΔCys+F203C από την αντίδρασή του με το MTSEA.

Ραβδόγραμμα που αναπαριστά την ενίσχυση της ειδικής δέσμευσης της [¹²⁵I]-Tyr⁰-σοβαγίνης έπειτα από αντίδραση του ΔCys+F203C με το MTSEA, ο οποίος προηγουμένως είχε επωαστεί με ή χωρίς 1 μM αστρεσσίνης. Οι στήλες αναπαριστούν τους μέσους όρους και τα τυπικά σφάλματα από 7 ανεξάρτητα πειράματα. Ο αστερίσκος υποδηλώνει ότι η ενίσχυση της ειδικής δέσμευσης της [¹²⁵I]-Tyr⁰-σοβαγίνης στον ΔCys+F203C έπειτα από αντίδρασή του με το MTSEA περιορίστηκε στατιστικώς σημαντικά από την αστρεσσίνη ($P < 0.05$; one-way ANOVA).

Επίδραση της μετάλλαξης F203C στη δέσμευση της ανταλαρμίνης πριν και μετά την αντίδραση με το MTSEA

Στη συνέχεια εξετάσαμε τον λόγο που η ανταλαρμίνη δεν μπόρεσε να προστατέψει τον $\Delta\text{Cys}+\text{F203C}$ από την αντίδραση με το MTSEA. Πειράματα ετερόλογης συναγωνιστικής δέσμευσης έδειξαν ότι ο $\Delta\text{Cys}+\text{F203C}$ δεν δεσμεύει την ανταλαρμίνη ($-\text{Log}K_i < 5.00$) σε αντίθεση με τον ΔCys ($-\text{Log}K_i=7,32 \pm 0,05$) και το φαινόμενο αυτό δεν επηρεάζεται έπειτα από αντίδραση του μεταλλαγμένου υποδοχέα $\Delta\text{Cys}+\text{F203C}$ με το MTSEA ($-\text{Log}K_i < 5.00$) (Εικόνα 4.27).

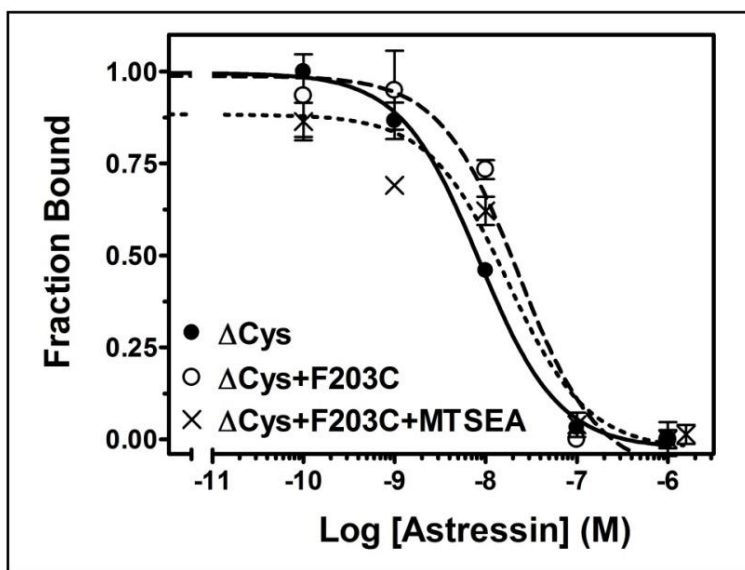


Εικόνα 4.27. Συναγωνιστική δέσμευση της ανταλαρμίνης στους ΔCys , $\Delta\text{Cys}+\text{F203C}$, $\Delta\text{Cys}+\text{F203C}+\text{MTSEA}$.

Ο συναγωνισμός της δέσμευσης της $[^{125}\text{I}]\text{-Tyr}^0\text{-σοθαγίνης}$ από την ανταλαρμίνη για τους υποδοχείς ΔCys , $\Delta\text{Cys}+\text{F203C}$ και $\Delta\text{Cys}+\text{F203C}$ μετά από την αντίδρασή του με το MTSEA ($\Delta\text{Cys}+\text{F203C}+\text{MTSEA}$) πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στα «Υλικά και Μέθοδοι». Οι μέσοι όροι (εις διπλούν) και τα σταθερά σφάλματα προέρχονται από ένα χαρακτηριστικό πείραμα που έγινε 3-6 φορές δίνοντας παρόμοια αποτελέσματα. Η συγγένεια δέσμευσης της ανταλαρμίνης ($-\text{Log}K_i$) που προσδιορίστηκε από αυτά τα πειράματα για τους υποδοχείς ΔCys , $\Delta\text{Cys}+\text{F203C}$ καθώς και $\Delta\text{Cys}+\text{F203C}+\text{MTSEA}$ ήταν $7,32 \pm 0,05$, $< 5,00$ και $< 5,00$ αντίστοιχα.

Επίδραση της μετάλλαξης F203C στη δέσμευση της αστρεσσίνης πριν και μετά την αντίδραση με το MTSEA

Αντίθετα με την ανταλαρμίνη, ο πεπτιδικός ανταγωνιστής του CRF, αστρεσσίνη, που δεσμεύεται σε διαφορετική περιοχή του CRF₁R από ότι η ανταλαρμίνη (211) προστάτευσε τον ΔCys+F203C από το MTSEA. Πειράματα ετερόλογης συναγωνιστικής δέσμευσης έδειξαν ότι η μετάλλαξη F203C δεν επηρεάζει τη δέσμευση του ανταγωνιστή αστρεσσίνης ($-\text{Log}K_i=7,78 \pm 0,19$) και το φαινόμενο αυτό δεν επηρεάζεται έπειτα από αντίδραση του μεταλλαγμένου υποδοχέα ΔCys+F203C με το MTSEA ($-\text{Log}K_i=7,54 \pm 0,27$) (Εικόνα 4.28).



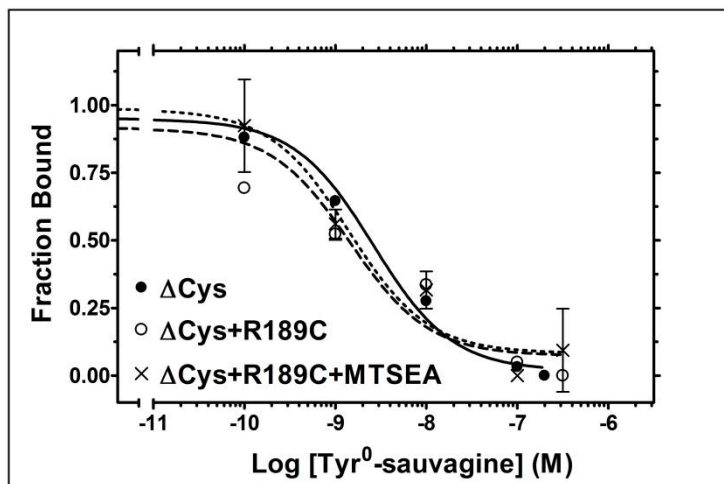
Εικόνα 4.28: Συναγωνιστική δέσμευση της αστρεσσίνης στους ΔCys, ΔCys+F203C, ΔCys+F203C+MTSEA.

Ο συναγωνισμός της δέσμευσης της [¹²⁵I]-Tyr⁰-σοβαγίνης από την αστρεσσίνη για τους υποδοχείς ΔCys, ΔCys+F203C και ΔCys+F203C μετά από την αντίδρασή του με το MTSEA (ΔCys+F203C+MTSEA) πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στα «Υλικά και Μέθοδοι». Οι μέσοι όροι (εις διπλούν) και τα σταθερά σφάλματα προέρχονται από ένα χαρακτηριστικό πείραμα που έγινε 3 φορές δίνοντας παρόμοια αποτελέσματα. Η συγγένεια δέσμευσης της αστρεσσίνης ($-\text{Log}K_i$) που προσδιορίστηκε από αυτά τα πειράματα για τους υποδοχείς ΔCys, ΔCys+F203C καθώς και ΔCys+F203C+MTSEA ήταν $8,00 \pm 0,10$, $7,78 \pm 0,19$ και $7,54 \pm 0,27$ αντίστοιχα.

Επίδραση της αντίδρασης του MTSEA στη συγγένεια δέσμευσης της Tyr⁰-σοβαγίνης

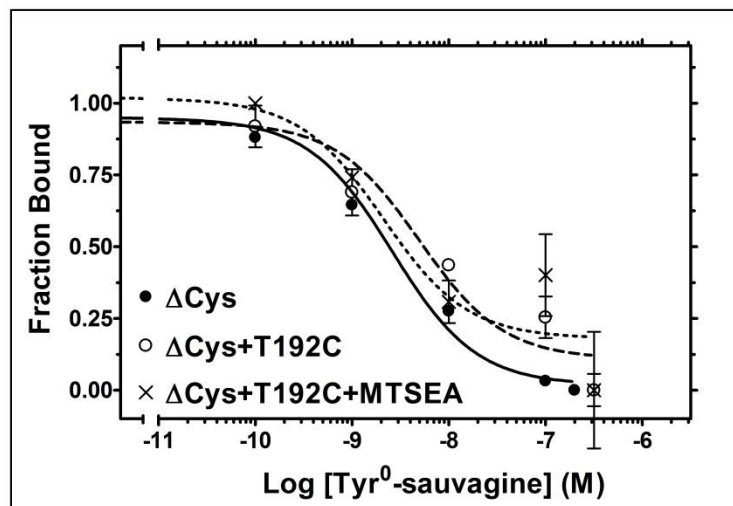
Επόμενο βήμα στη μελέτη μας ήταν να προσδιορίσουμε τις επιπτώσεις της αντίδρασης των Cys-μεταλλαγμένων υποδοχέων με το MTSEA, στις φαρμακολογικές ιδιότητές τους. Για το λόγο αυτό προσδιορίσαμε τη συγγένεια με την οποία η Tyr⁰-σοβαγίνη δεσμεύεται στους ΔCys+R189C, ΔCys+T192C, ΔCys+A193C, ΔCys+Y195C, ΔCys+N196C, ΔCys+H199C και ΔCys+F203C πριν και μετά την αντίδρασή τους με το MTSEA. Στα πειράματα αυτά παρατηρήσαμε ότι η συγγένεια δέσμευσης της Tyr⁰-σοβαγίνης για τους υποδοχείς ΔCys+R189C, ΔCys+T192C, ΔCys+A193C, ΔCys+Y195C, ΔCys+N196C, ΔCys+H199C δεν επηρεάστηκε από την αντίδρασή τους με το MTSEA (Εικόνα 4.36), παρά το γεγονός ότι η ειδική δέσμευση του ραδιοσημασμένου πεπτιδίου μειώθηκε από την αντίδραση. Συγκεκριμένα οι συγγένειες δέσμευσης (-LogK_D) της [¹²⁵I]-Tyr⁰-σοβαγίνης για τους μεταλλαγμένους υποδοχείς πριν και μετά την αντίδρασή τους με το MTSEA ήταν ΔCys+R189C: 8,38 ± 0,11 και 8,47 ± 0,40, ΔCys+T192C: 8,50 ± 0,24 και 9,03 ± 0,29, ΔCys+A193C: 8,77 ± 0,12 και 8,98 ± 0,05, ΔCys+Y195C: 8,94 ± 0,23 και 9,51 ± 0,21, ΔCys+N196C: 8,85 ± 0,21 και 9,33 ± 0,17 και τέλος ΔCys+H199C : 8,61 ± 0,12 και 8,94 ± 0,15, αντίστοιχα (Εικόνες 4.29-4.36).

Αντίθετα η αντίδραση του MTSEA με τον ΔCys+F203C αύξησε σημαντικά την ελαττωμένη (κατά 18 φορές) από τη F203C μετάλλαξη συγγένεια δέσμευσης της Tyr⁰-σοβαγίνης (-LogK_D=7,33 ± 0,20), σε επίπεδα παρόμοια με τα φυσιολογικά (-LogK_D=8,80 ± 0,33) (Εικόνα 4.35). Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί με την αύξηση της ελαττωμένης από την F203C μετάλλαξη ειδική δέσμευση της ραδιοσημασμένης Tyr⁰-σοβαγίνης.



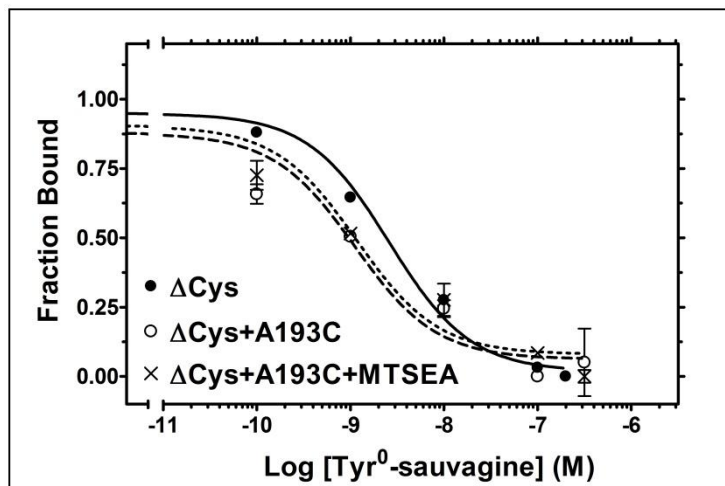
Εικόνα 4.29: Συναγωνιστική δέσμευση της Tyr⁰-σοβαγίνης στους ΔCys, ΔCys+R189C και ΔCys+R189C+MTSEA.

Ο συναγωνισμός της δέσμευσης της [¹²⁵I]-Tyr⁰-σοβαγίνης από την Tyr⁰-σοβαγίνη για τους υποδοχείς ΔCys, ΔCys+R189C και ΔCys+R189C μετά από την αντίδρασή του με το MTSEA (ΔCys+R189C+MTSEA) πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στα «Υλικά και Μέθοδοι». Οι μέσοι όροι (εις διπλούν) και τα σταθερά σφάλματα προέρχονται από ένα χαρακτηριστικό πείραμα που έγινε 2-7 φορές δίνοντας παρόμοια αποτελέσματα. Οι συγγένειες δέσμευσης της Tyr⁰-σοβαγίνης (-LogK_D) που προσδιορίστηκαν από αυτά τα πειράματα για τους υποδοχείς ΔCys, ΔCys+R189C καθώς και ΔCys+R189C+MTSEA αναγράφονται στην εικόνα 4.36 και ήταν 8,59 ± 0,37, 8,38 ± 0,11 και 8,47 ± 0,40 αντίστοιχα.



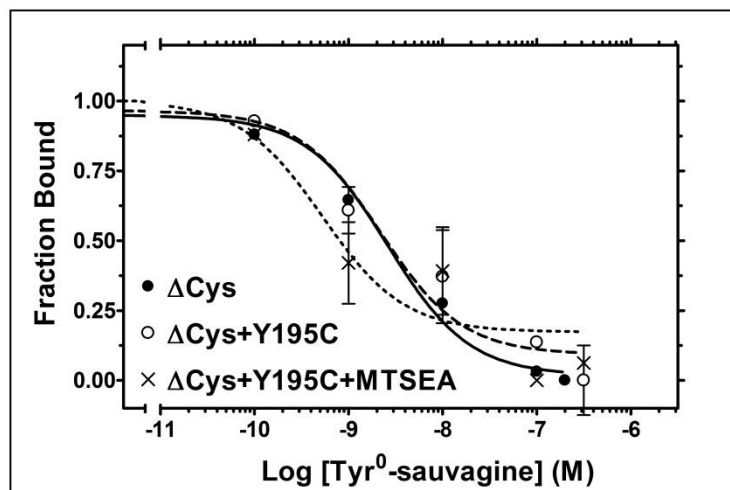
Εικόνα 4.30: Συναγωνιστική δέσμευση της Tyr⁰-σοβαγίνης στους ΔCys, ΔCys+T192C και ΔCys+T192C+MTSEA.

Ο συναγωνισμός της δέσμευσης της [¹²⁵I]-Tyr⁰-σοβαγίνης από την Tyr⁰-σοβαγίνη για τους υποδοχείς ΔCys, ΔCys+T192C και ΔCys+T192C μετά από την αντίδρασή του με το MTSEA (ΔCys+T192C+MTSEA) πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στα «Υλικά και Μέθοδοι». Οι μέσοι όροι (εις διπλούν) και τα σταθερά σφάλματα προέρχονται από ένα χαρακτηριστικό πείραμα που έγινε 3-5 φορές δίνοντας παρόμοια αποτελέσματα. Οι συγγένειες δέσμευσης της Tyr⁰-σοβαγίνης (-LogK_D) που προσδιορίστηκαν από αυτά τα πειράματα για τους υποδοχείς ΔCys, ΔCys+T192C καθώς και ΔCys+T192C+MTSEA αναγράφονται στην εικόνα 4.36 και ήταν 8,59 ± 0,37, 8,50 ± 0,24 και 9,03 ± 0,29 αντίστοιχα.



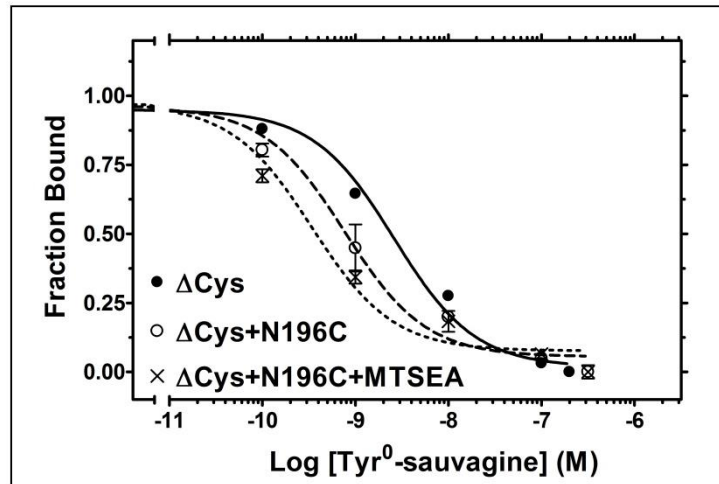
Εικόνα 4.31: Συναγωνιστική δέσμευση της Tyr⁰-σοβαγίνης στους ΔCys, ΔCys+A193C και ΔCys+A193C+MTSEA.

Ο συναγωνισμός της δέσμευσης της [¹²⁵I]-Tyr⁰-σοβαγίνης από την Tyr⁰-σοβαγίνη για τους υποδοχείς ΔCys, ΔCys+A193C και ΔCys+A193C μετά από την αντίδρασή του με το MTSEA (ΔCys+A193C+MTSEA) πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στα «Υλικά και Μέθοδοι». Οι μέσοι όροι (εις διπλούν) και τα σταθερά σφάλματα προέρχονται από ένα χαρακτηριστικό πείραμα που έγινε 3-5 φορές δίνοντας παρόμοια αποτελέσματα. Οι συγγένειες δέσμευσης της Tyr⁰-σοβαγίνης (-LogK_D) που προσδιορίστηκαν από αυτά τα πειράματα για τους υποδοχείς ΔCys, ΔCys+A193C καθώς και ΔCys+A193C+MTSEA αναγράφονται στην εικόνα 4.36 και ήταν 8,59 ± 0,37, 8,77 ± 0,12 και 8,98 ± 0,05 αντίστοιχα.



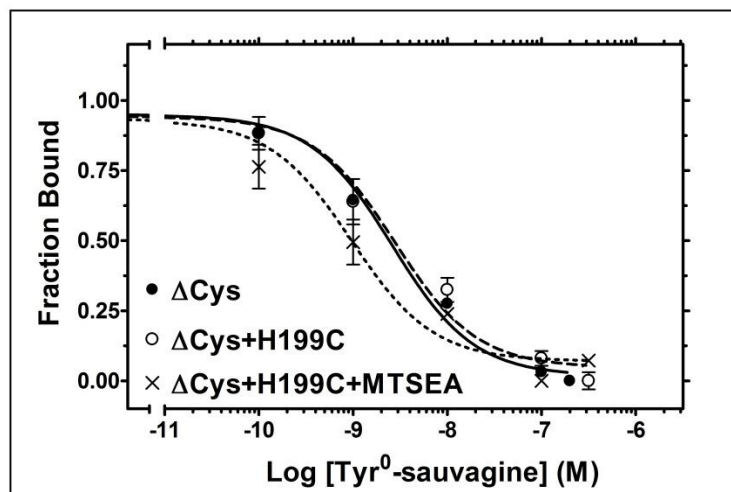
Εικόνα 4.32: Συναγωνιστική δέσμευση της Tyr⁰-σοβαγίνης στους ΔCys, ΔCys+Y195C και ΔCys+Y195C+MTSEA.

Ο συναγωνισμός της δέσμευσης της [¹²⁵I]-Tyr⁰-σοβαγίνης από την Tyr⁰-σοβαγίνη για τους υποδοχείς ΔCys, ΔCys+Y195C και ΔCys+Y195C μετά από την αντίδρασή του με το MTSEA (ΔCys+Y195C+MTSEA) πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στα «Υλικά και Μέθοδοι». Οι μέσοι όροι (εις διπλούν) και τα σταθερά σφάλματα προέρχονται από ένα χαρακτηριστικό πείραμα που έγινε 4-6 φορές δίνοντας παρόμοια αποτελέσματα. Οι συγγένειες δέσμευσης της Tyr⁰-σοβαγίνης (-LogK_D) που προσδιορίστηκαν από αυτά τα πειράματα για τους υποδοχείς ΔCys, ΔCys+Y195C καθώς και ΔCys+Y195C+MTSEA αναγράφονται στην εικόνα 4.36 και ήταν 8,59 ± 0,37, 8,94 ± 0,23 και 9,51 ± 0,21 αντίστοιχα.



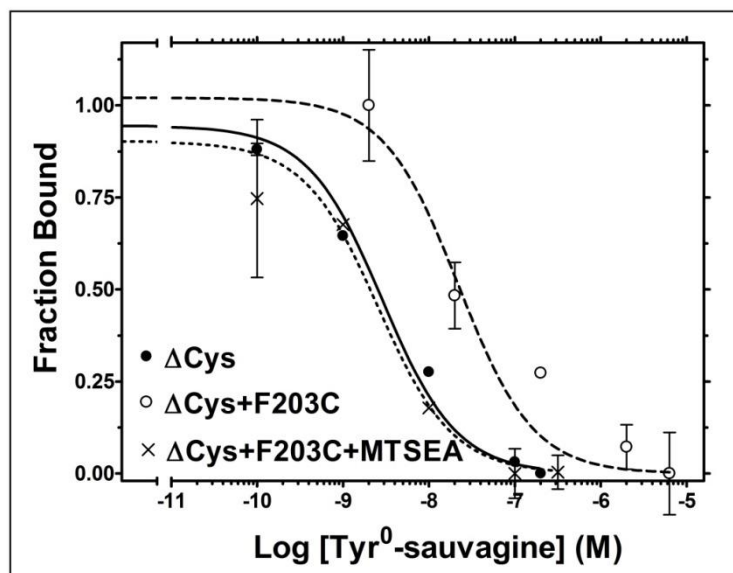
Εικόνα 4.33: Συναγωνιστική δέσμευση της Tyr⁰-σοβαγίνης στους ΔCys, ΔCys+N196C και ΔCys+N196C+MTSEA.

Ο συναγωνισμός της δέσμευσης της [¹²⁵I]-Tyr⁰-σοβαγίνης από την Tyr⁰-σοβαγίνη για τους υποδοχείς ΔCys, ΔCys+N196C και ΔCys+N196C μετά από την αντίδρασή του με το MTSEA (ΔCys+N196C+MTSEA) πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στα «Υλικά και Μέθοδοι». Οι μέσοι όροι (εις διπλούν) και τα σταθερά σφάλματα προέρχονται από ένα χαρακτηριστικό πείραμα που έγινε 4-6 φορές δίνοντας παρόμοια αποτελέσματα. Οι συγγένειες δέσμευσης της Tyr⁰-σοβαγίνης (-LogK_D) που προσδιορίστηκαν από αυτά τα πειράματα για τους υποδοχείς ΔCys, ΔCys+N196C καθώς και ΔCys+N196C+MTSEA αναγράφονται στην εικόνα 4.36 και ήταν 8,59 ± 0,37, 8,85 ± 0,21 και 9,33 ± 0,17 αντίστοιχα.



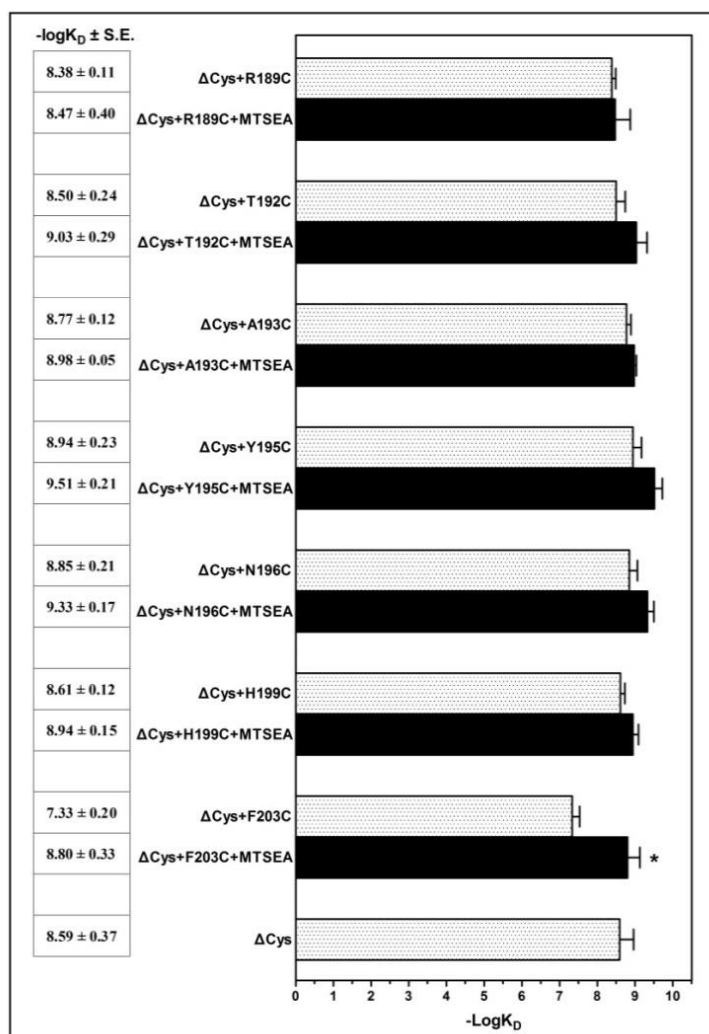
Εικόνα 4.34: Συναγωνιστική δέσμευση της Tyr^0 -σοβαγίνης στους ΔCys , $\Delta Cys+H199C$ και $\Delta Cys+H199C+MTSEA$.

Ο συναγωνισμός της δέσμευσης της $[^{125}I]$ - Tyr^0 -σοβαγίνης από την Tyr^0 -σοβαγίνη για τους υποδοχείς ΔCys , $\Delta Cys+H199C$ και $\Delta Cys+H199C$ μετά από την αντίδρασή του με το MTSEA ($\Delta Cys+H199C+MTSEA$) πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στα «Υλικά και Μέθοδοι». Οι μέσοι όροι (εις διπλούν) και τα σταθερά σφάλματα προέρχονται από ένα χαρακτηριστικό πείραμα που έγινε 3-5 φορές δίνοντας παρόμοια αποτελέσματα. Οι συγγένειες δέσμευσης της Tyr^0 -σοβαγίνης ($-\text{Log}K_D$) που προσδιορίστηκαν από αυτά τα πειράματα για τους υποδοχείς ΔCys , $\Delta Cys+H199C$ καθώς και $\Delta Cys+H199C+MTSEA$ αναγράφονται στην εικόνα 4.36 και ήταν $8,59 \pm 0,37$, $8,61 \pm 0,12$ και $8,94 \pm 0,15$ αντίστοιχα.



Εικόνα 4.35. Συναγωνιστική δέσμευση της Tyr⁰-σοβαγίνης στους ΔCys, ΔCys+F203C και ΔCys+F203C+MTSEA.

Ο συναγωνισμός της δέσμευσης της [¹²⁵I]-Tyr⁰-σοβαγίνης από την Tyr⁰-σοβαγίνη για τους υποδοχείς ΔCys, ΔCys+F203C και ΔCys+F203C μετά από την αντίδρασή του με το MTSEA (ΔCys+F203C+MTSEA) πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στα «Υλικά και Μέθοδοι». Οι μέσοι όροι (εις διπλούν) και τα σταθερά σφάλματα προέρχονται από ένα χαρακτηριστικό πείραμα που έγινε 4-5 φορές δίνοντας παρόμοια αποτελέσματα. Οι συγγένειες δέσμευσης της Tyr⁰-σοβαγίνης (-LogK_D) που προσδιορίστηκαν από αυτά τα πειράματα για τους υποδοχείς ΔCys, ΔCys+F203C καθώς και ΔCys+F203C+MTSEA αναγράφονται στην εικόνα 4.36 και ήταν 8,59 ± 0,37, 7,33 ± 0,20 και 8,80 ± 0,33 αντίστοιχα.

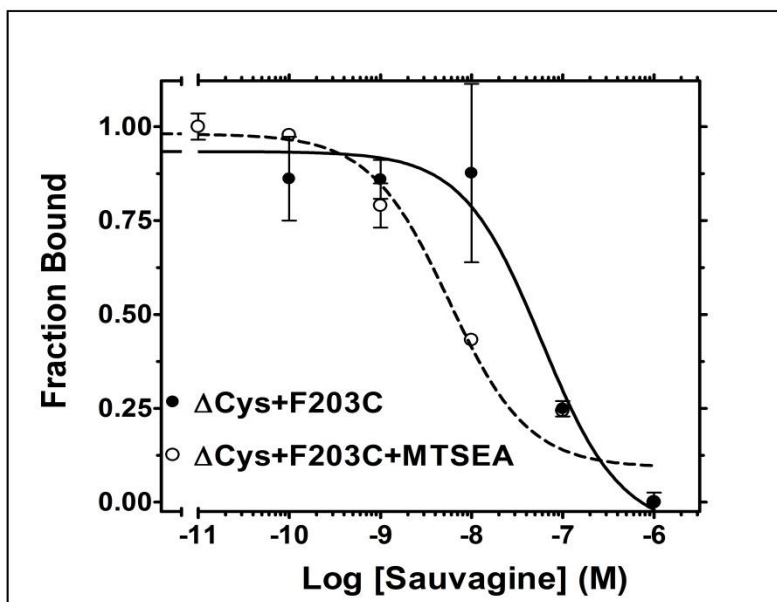


Εικόνα 4.36: Επίδραση της αντίδρασης με το MTSEA στην συγγένεια δέσμευσης της Tyr^0 -σοβαγίνης για τους Cys-μεταλλαγμένους υποδοχείς του CRF_1R .

Οι συγγένειες δέσμευσης ($-\log K_D$) της Tyr^0 -σοβαγίνης για τους μεταλλαγμένους υποδοχείς $\Delta Cys+R189C$, $\Delta Cys+T192C$, $\Delta Cys+A193C$, $\Delta Cys+Y195C$, $\Delta Cys+N196C$, $\Delta Cys+H199C$ και $\Delta Cys+F203C$ πριν (υποδοχέας) και μετά την αντίδρασή τους με το MTSEA (υποδοχέας + MTSEA) αναπαριστώνται με στήλες. Για λόγους σύγκρισης παρουσιάζεται επίσης η συγγένεια δέσμευσης της Tyr^0 -σοβαγίνης για τον ΔCys . Οι στήλες αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους ($-\log K_D$) και τα τυπικά σφάλματα (S.E.) από 2-7 ανεξάρτητα πειράματα ενώ στον πίνακα αριστερά των στηλών αναγράφονται οι συγγένειες δέσμευσης της Tyr^0 -σοβαγίνης ($-\log K_D \pm S.E.$). Ο αστερίσκος δηλώνει ότι η συγγένεια δέσμευσης της Tyr^0 -σοβαγίνης για τον υποδοχέα $\Delta Cys+F203C$ μετά από αντίδρασή του με το MTSEA ($\Delta Cys+F203C+MTSEA$) διαφέρει στατιστικά σημαντικά από εκείνη της Tyr^0 -σοβαγίνης πριν την αντίδρασή του με το MTSEA ($P < 0.05$; one way ANOVA).

Επίδραση της μετάλλαξης F203C στη δέσμευση της μη τυροσινιωμένης σοβαγίνης πριν και μετά την αντίδραση με το MTSEA

Παρόμοια αποτελέσματα με τα παραπάνω παρατηρήθηκαν όταν προσδιορίσαμε (σε μελέτες ετερόλογης συναγωνιστικής δέσμευσης) τη συγγένεια με την οποία δεσμεύεται η σοβαγίνη (στην οποία απουσιάζει η αμινοτελική Tyr⁰) στον ΔCys+F203C πριν και μετά την αντίδρασή του με το MTSEA. Συγκεκριμένα, όπως και η Tyr⁰-σοβαγίνη ($-\text{Log}K_D=7,33 \pm 0,20$), η σοβαγίνη δεσμεύεται με χαμηλή συγγένεια στον ΔCys+F203C ($-\text{Log}K_i= 7,37 \pm 0,11$), η οποία όμως επανέρχεται σε σχεδόν φυσιολογικές τιμές μετά την αντίδραση του MTSEA με τον υποδοχέα αυτόν ($-\text{Log}K_i= 8,20 \pm 0,15$) (Εικόνα 4.37).

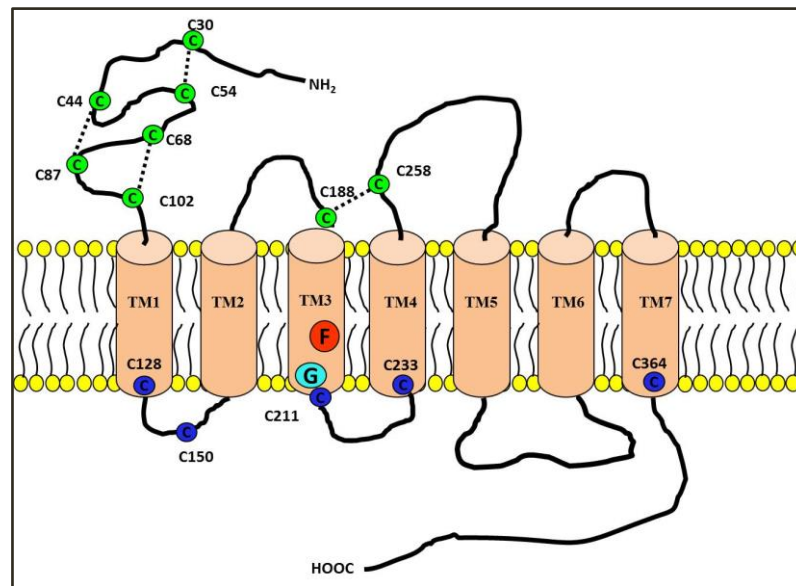


Εικόνα 4.37: Συναγωνιστική δέσμευση της σοβαγίνης στους ΔCys+F203C και ΔCys+F203C+MTSEA.

Ο συναγωνισμός της δέσμευσης της [¹²⁵I]-Tyr⁰-σοβαγίνης από την σοβαγίνη για τους υποδοχείς ΔCys+F203C και ΔCys+F203C μετά από την αντίδρασή του με το MTSEA (ΔCys+F203C+MTSEA), πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στα «Υλικά και Μέθοδοι». Οι μέσοι όροι (εις διπλούν) και τα σταθερά σφάλματα προέρχονται από ένα χαρακτηριστικό πείραμα που έγινε 4 φορές δίνοντας παρόμοια αποτελέσματα. Η συγγένεια δέσμευσης της σοβαγίνης ($-\text{Log}K_i$) που προσδιορίστηκε από αυτά τα πειράματα για τους υποδοχείς ΔCys+F203C και ΔCys+F203C+MTSEA ήταν $7,37 \pm 0,11$ και $8,20 \pm 0,15$ αντίστοιχα.

4.2 Ο ρόλος των F203 και G210 της TM3 στην ενεργοποίηση του CRF₁R.

Τα παραπάνω αποτελέσματα έδειξαν ότι η Cys μετάλλαξη των F203 και G210 (Εικόνες 4.16, 4.20 και 4.21) της TM3 του CRF₁R, μείωσε σημαντικά την υψηλής συγγένειας δέσμευση της Tyr⁰-σοβαγίνης που κάτω από τις πειραματικές συνθήκες της παρούσας εργασίας αντιπροσωπεύει την δέσμευση του πεπτιδικού αυτού αγωνιστή στην ενεργό κατάσταση του υποδοχέα. Το γεγονός αυτό οδηγεί στην υπόθεση ότι οι F203C και G210C μεταλλάξεις επηρέασαν αρνητικά την ενεργοποίηση του CRF₁R.



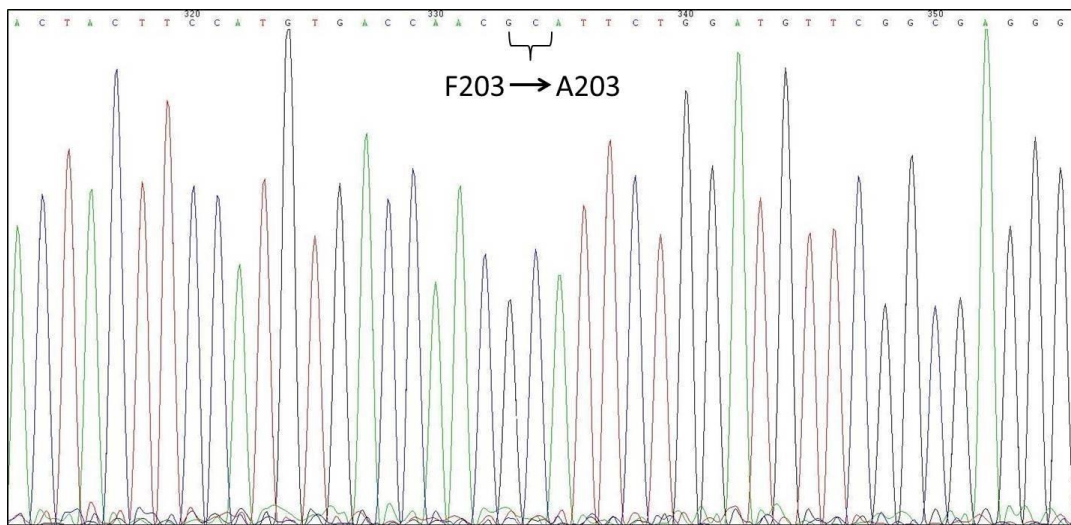
Εικόνα 4.38: Σχηματική αναπαράσταση των αμινοξέων F203 (F σε κόκκινο κύκλο) και G210 (G σε μπλε κύκλο) της TM3 του CRF₁R.

Για να εξετάσουμε περαιτέρω το ρόλο των F203 και G210 (Εικόνα 4.38) στην ενεργοποίηση του CRF₁R, αντικαταστήσαμε τα αμινοξέα αυτά με διαφορετικά και εξετάσαμε την επίδραση των μεταλλάξεων αυτών στις φαρμακολογικές ιδιότητες του υποδοχέα. Συγκεκριμένα, προσδιορίσαμε τη συγγένεια δέσμευσης της Tyr⁰-σοβαγίνης και της αστρεσσίνης πριν και μετά τις μεταλλάξεις των F203 και G210 καθώς και την επίδραση των μεταλλάξεων αυτών στην ικανότητα της σοβαγίνης να διεγείρει την παραγωγή ενδοκυττάριου cAMP σε κύτταρα που εκφράζουν σταθερά τους υποδοχείς αυτούς.

4.2.1 Μεταλλάξεις των F203 και G210.

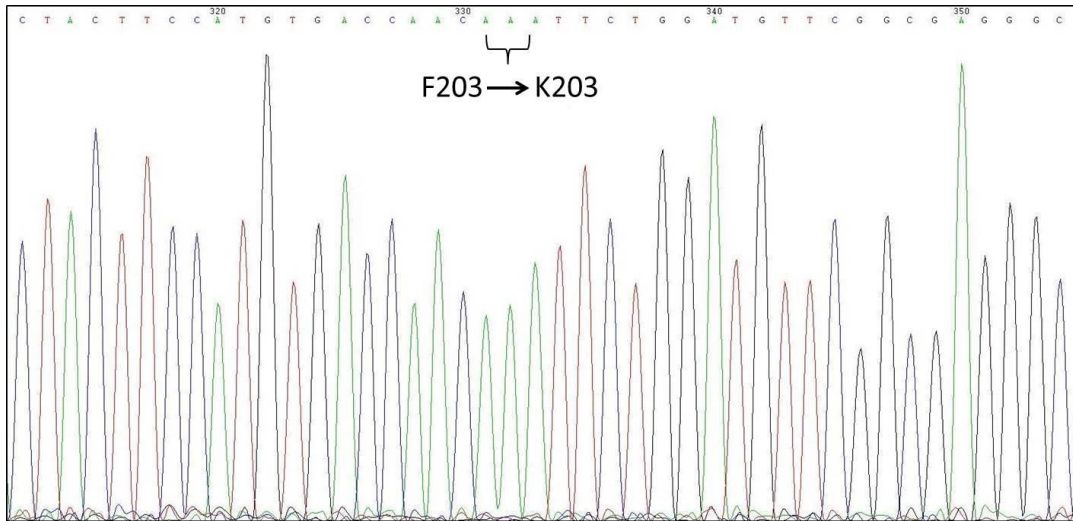
Τα αμινοξέα F203 και G210 μεταλλάχθηκαν με τη μέθοδο της μεταλλαξιγένεσης κατευθυνόμενης θέσης με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR-Site Directed Mutagenesis). Συγκεκριμένα μεταλλάξαμε το F203 σε αλανίνη ή A, λυσίνη ή K, ισολευκίνη ή I και τρυπτοφάνη ή W, δημιουργώντας έτσι τους μεταλλαγμένους υποδοχείς F203A, F203K, F203I και F203W αντίστοιχα. Επίσης αντικαταστήσαμε τη G210 με αλανίνη ή A, δημιουργώντας έτσι τον μεταλλαγμένο υποδοχέα G210A. Οι μεταλλάξεις αυτές επιβεβαιώθηκαν από την ανάγνωση αλληλουχιών βάσεων DNA (Εικόνες 4.39-4.43)

ο **Μετάλλαξη της F203 σε A203.**



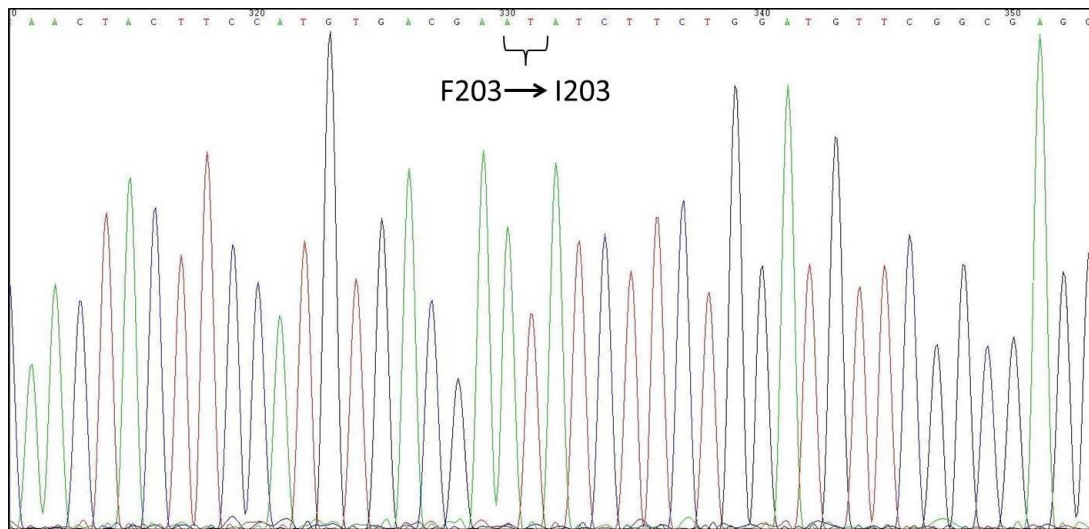
Εικόνα 4.39: Μετάλλαξη της F203 σε A203. Στο χρωματογράφημα διακρίνεται η περιοχή των νουκλεοτιδίων μέσα στην οποία υπάρχει η αλληλουχία GCA που κωδικοποιεί την A στη θέση 203 του CRF₁R. Τα νουκλεοτίδια αυτά αντικατέστησαν τα TTC που κωδικοποιούν το αμινοξύ F203 του CRF₁R.

○ **Μετάλλαξη της F203 σε K203**



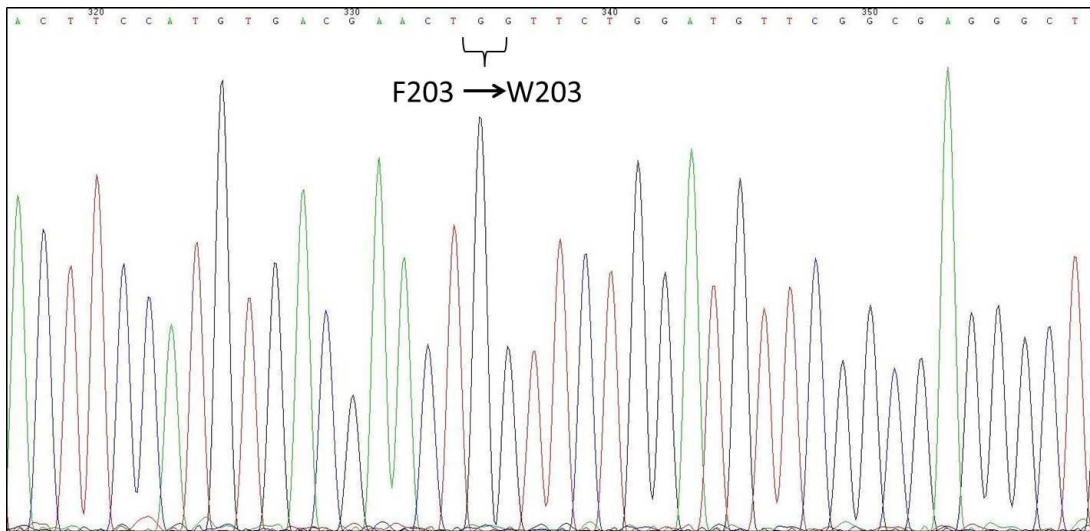
Εικόνα 4.40: Μετάλλαξη της F203 σε K203. Στο χρωματογράφημα διακρίνεται η περιοχή των νουκλεοτιδίων μέσα στην οποία υπάρχει η αλληλουχία AAA που κωδικοποιεί τη K στη θέση 203 του CRF₁R. Τα νουκλεοτίδια αυτά αντικατέστησαν τα TTC που κωδικοποιούν τη F203 του CRF₁R.

○ **Μετάλλαξη της F203 σε I203.**



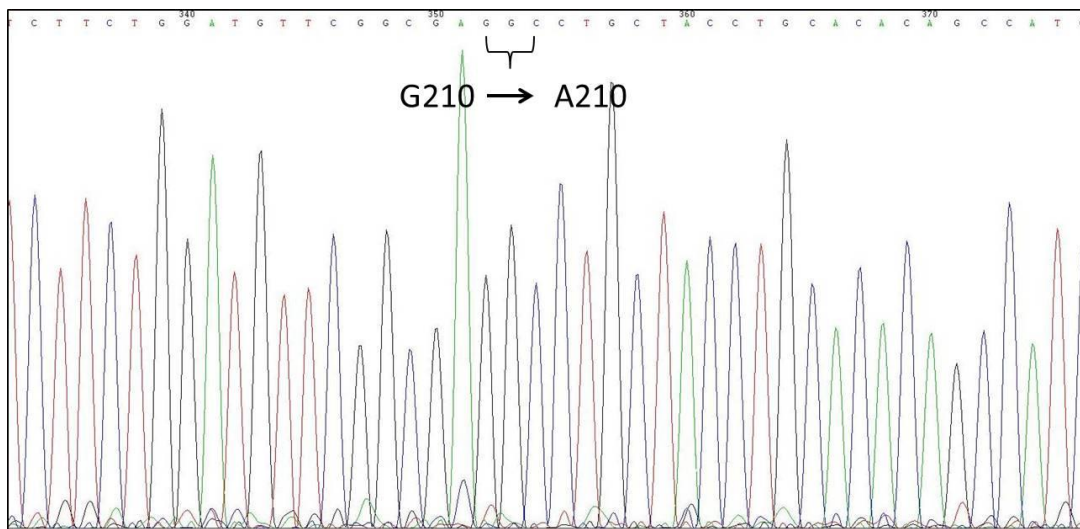
Εικόνα 4.41: Μετάλλαξη της F203 σε I203. Στο χρωματογράφημα διακρίνεται η περιοχή των νουκλεοτιδίων μέσα στην οποία υπάρχει η αλληλουχία ATA που κωδικοποιεί τη I στη θέση 203 του CRF₁R. Τα νουκλεοτίδια αυτά αντικατέστησαν τα TTC που κωδικοποιούν το αμινοξύ F203 του CRF₁R.

○ **Μετάλλαξη της F203 σε W203.**



Εικόνα 4.42: Μετάλλαξη της F203 σε W203. Στο χρωματογράφημα διακρίνεται η περιοχή των νουκλεοτιδίων μέσα στην οποία υπάρχει η αλληλουχία TGG που κωδικοποιεί τη W στη θέση 203 του CRF₁R. Τα νουκλεοτίδια αυτά αντικατέστησαν τα TTC που κωδικοποιούν το αμινοξύ F203 του CRF₁R.

○ **Μετάλλαξη της G210 σε A210.**



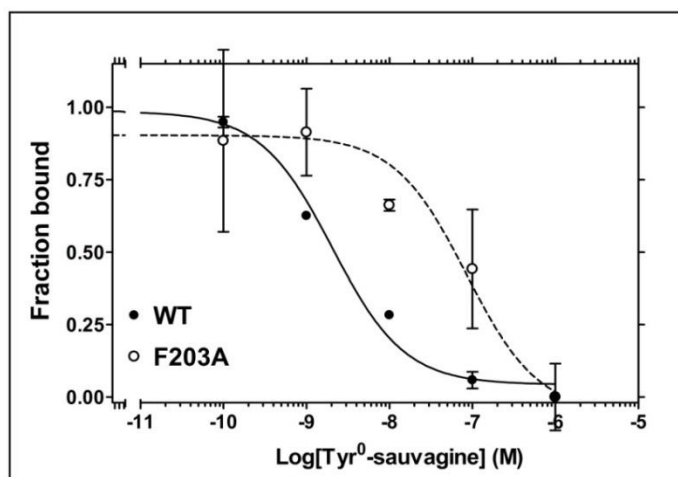
Εικόνα 4.43: Μετάλλαξη της G210 σε A210. Στο χρωματογράφημα διακρίνεται η περιοχή των νουκλεοτιδίων μέσα στην οποία υπάρχει η αλληλουχία GCC που κωδικοποιεί τη A στη θέση 210 του ΔCys. Τα νουκλεοτίδια αυτά αντικατέστησαν τα GGA που κωδικοποιούν το αμινοξύ G210 του ΔCys.

4.2.1.1 Μετάλλαξη F203A

Επίδραση της μετάλλαξης F203A στη δέσμευση της Tyr⁰-σοβαγίνης και της αστρεσσίνης

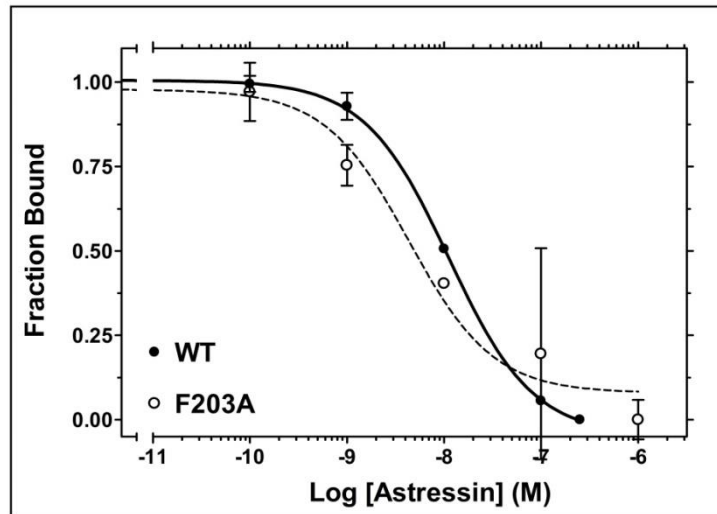
Η F203A μετάλλαξη μείωσε σημαντικά τη συγγένεια δέσμευσης της Tyr⁰-σοβαγίνης (Εικόνα 4.44) όπως παρατηρήθηκε και στη μετάλλαξη F203C (Εικόνα 4.16). Συγκεκριμένα οι συγγένειες δέσμευσης (-LogK_D) της Tyr⁰-σοβαγίνης για τον WT και τον υποδοχέα F203A όπως προσδιορίστηκαν σε πειράματα ομόλογης συναγωνιστικής δέσμευσης ήταν 8,38 ± 0,20 και 6,95 ± 0,11 αντίστοιχα (Εικόνα 4.44 και Πίνακας 4.1).

Σε αντίθεση με τη Tyr⁰-σοβαγίνη, η συγγένεια δέσμευσης της αστρεσσίνης δεν επηρεάστηκε από τη μετάλλαξη F203A (Εικόνα 4.45), όπως παρατηρήθηκε και στην μετάλλαξη F203C (Εικόνα 4.28). Συγκεκριμένα οι συγγένειες δέσμευσης (-LogK_i) της αστρεσσίνης για τον WT και τον μεταλλαγμένο υποδοχέα F203A όπως προσδιορίστηκαν σε πειράματα ετερόλογης συναγωνιστικής δέσμευσης ήταν 8,02 ± 0,07 και 8,03 ± 0,18 αντίστοιχα (Εικόνα 4.45 και Πίνακας 4.1).



Εικόνα 4.44: Συναγωνιστική δέσμευση της Tyr⁰-σοβαγίνης στους WT και F203A.

Ο συναγωνισμός της δέσμευσης της [¹²⁵I]-Tyr⁰-σοβαγίνης από την Tyr⁰-σοβαγίνη για τους υποδοχείς WT και F203A πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στα «Υλικά και Μέθοδοι». Οι μέσοι όροι (εις διπλούν) και τα σταθερά σφάλματα προέρχονται από ένα χαρακτηριστικό πείραμα που έγινε 3 φορές δίνοντας παρόμοια αποτελέσματα. Η συγγένεια δέσμευσης της Tyr⁰-σοβαγίνης (-LogK_D) που προσδιορίστηκε από αυτά τα πειράματα για τους υποδοχείς WT και F203A ήταν 8,38 ± 0,20 και 6,95 ± 0,11 αντίστοιχα.

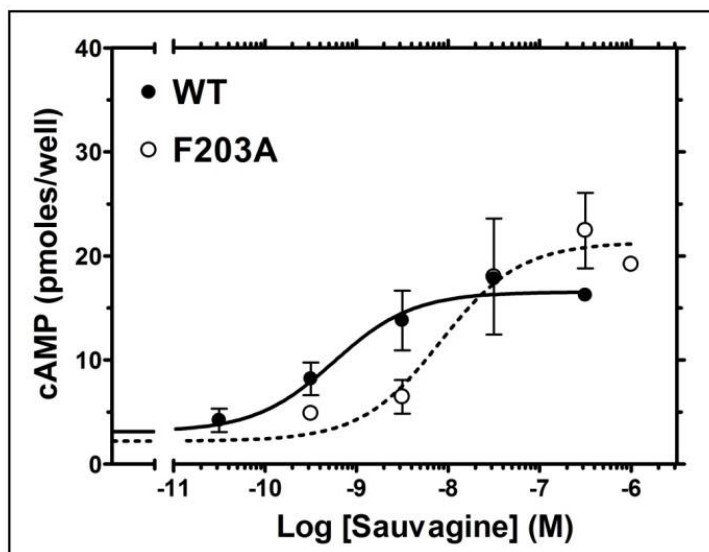


Εικόνα 4.45: Συναγωνιστική δέσμευση της αστρεσσίνης στους WT και F203A.

Ο συναγωνισμός της δέσμευσης της $[^{125}\text{I}]\text{-Tyr}^0\text{-σοβαγίνης}$ από την αστρεσσίνη για τους υποδοχείς WT και F203A πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στα «Υλικά και Μέθοδοι». Οι μέσοι όροι (εις διπλούν) και τα σταθερά σφάλματα προέρχονται από ένα χαρακτηριστικό πείραμα που έγινε 3-6 φορές δίνοντας παρόμοια αποτελέσματα. Η συγγένεια δέσμευσης της αστρεσσίνης ($-\text{Log}K_i$) που προσδιορίστηκε από αυτά τα πειράματα για τους υποδοχείς WT και F203A ήταν $8,02 \pm 0,07$ και $8,03 \pm 0,18$ αντίστοιχα.

Επίδραση της μετάλλαξης F203A στην ισχύ της σοβαγίνης.

Παρόμοια με τη συγγένεια δέσμευσης της σοβαγίνης, η F203A μετάλλαξη μείωσε σημαντικά την ισχύ με την οποία ο πεπτιδικός αυτός αγωνιστής διέγειρε τη παραγωγή ενδοκυττάριου κυκλικού AMP (cAMP) σε HEK 293 κύτταρα τα οποία εκφράζανε σταθερά τον CRF₁R. Συγκεκριμένα η ισχύς της σοβαγίνης (-LogEC₅₀) για τον WT και τον μεταλλαγμένο υποδοχέα F203A ήταν $9,90 \pm 0,19$ και $8,52 \pm 0,23$ αντίστοιχα (Εικόνα 4.46 και Πίνακας 4.1)



Εικόνα 4.46: Διέγερση παραγωγής ενδοκυττάριου cAMP από τη σοβαγίνη.

Η διέγερση της παραγωγής cAMP από αυξανόμενες συγκεντρώσεις σοβαγίνης, πραγματοποιήθηκε σε άθικτα HEK 293 κύτταρα που εκφράζανε σταθερά τον WT ή τον F203A. Οι μέσοι όροι (εις διπλούν) και τα σταθερά σφάλματά τους προέρχονται από ένα χαρακτηριστικό πείραμα που έγινε 5-7 φορές με παρόμοια αποτελέσματα. Η ισχύς της σοβαγίνης (-LogEC₅₀) να διεγείρει την παραγωγή cAMP που υπολογίστηκε από τα πειράματα αυτά για τους υποδοχείς WT και F203A και ήταν $9,90 \pm 0,19$ και $8,52 \pm 0,23$ αντίστοιχα.

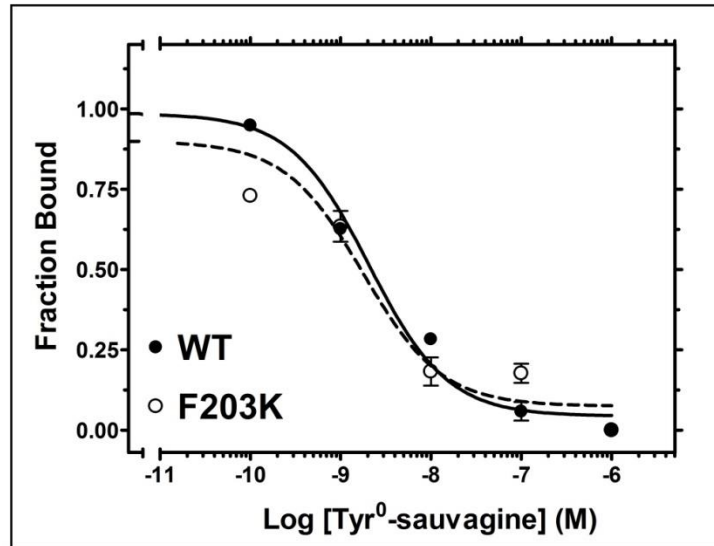
4.2.1.2 Μετάλλαξη F203K

Επίδραση της μετάλλαξης F203K στη δέσμευση της Tyr⁰-σοβαγίνης και της αστρεσσίνης

Η μετάλλαξη της F203 σε Lys (F203K) δεν επηρέασε σημαντικά την συγγένεια δέσμευσης της Tyr⁰-σοβαγίνης, η οποία ήταν παρόμοια με εκείνη του υποδοχέα F203C μετά την αντίδραση του με το MTSEA, που εισάγει μια θετικά φορτισμένη πλευρική αλυσίδα, παρόμοια με τη πλευρική αλυσίδα της Lys. Συγκεκριμένα οι συγγένειες δέσμευσης (-LogK_D) της Tyr⁰-σοβαγίνης για τον WT και τον F203K όπως προσδιορίστηκαν σε πειράματα ομόλογης συναγωνιστικής δέσμευσης ήταν $8,38 \pm 0,20$ και $8,51 \pm 0,21$ αντίστοιχα (Εικόνα 4.47 και Πίνακας 4.1), που ήταν παρόμοιες με εκείνη του ΔCys+F203C μετά την αντίδραση του με το MTSEA (-LogK_D = $8,80 \pm 0,33$).

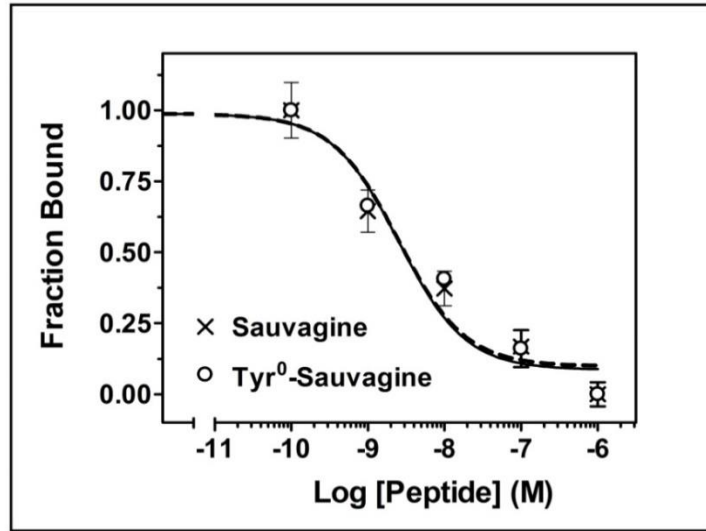
Η συγγένεια δέσμευσης της F203K για τη Tyr⁰-σοβαγίνη δεν επηρεάστηκε από την αφαίρεση της αμινοτελικής Tyr⁰ από το πεπτιδίο αυτό. Συγκεκριμένα η συγγένεια δέσμευσης της Tyr⁰-σοβαγίνης (-LogK_D= $8,51 \pm 0,21$) για τον F203K ήταν παραπλήσια με εκείνη της σοβαγίνης (-LogK_i= $8,50 \pm 0,12$) για τον υποδοχέα αυτόν (Εικόνα 4.48). Τα αποτελέσματα αυτά είναι παρόμοια με εκείνα του αντίστοιχου πειράματος στον ΔCys+F203C.

Παρόμοια με τη F203C μετάλλαξη έτσι και η F203K μετάλλαξη, δεν επηρέασε τη συγγένεια δέσμευσης της αστρεσσίνης. Συγκεκριμένα οι συγγένειες δέσμευσης (-LogK_i) της αστρεσσίνης για τον WT και τον F203K όπως προσδιορίστηκαν σε πειράματα ετερόλογης συναγωνιστικής δέσμευσης ήταν $8,02 \pm 0,07$ και $8,02 \pm 0,19$ αντίστοιχα (Εικόνα 4.49 και Πίνακας 4.1) που ήταν παρόμοιες με εκείνη για τον ΔCys+F203C (-LogK_i = $7,78 \pm 0,19$) (Εικόνα 4.28).



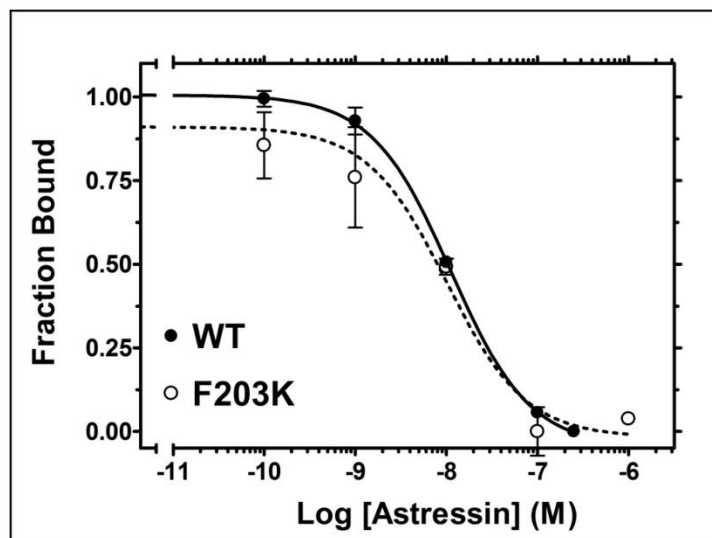
Εικόνα 4.47: Συναγωνιστική δέσμευση της Tyr⁰-σοβαγίνης στους WT και F203K.

Ο συναγωνισμός της δέσμευσης της [¹²⁵I]-Tyr⁰-σοβαγίνης από την Tyr⁰-σοβαγίνη για τους υποδοχείς WT και F203K πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στα «Υλικά και Μέθοδοι». Οι μέσοι όροι (εις διπλούν) και τα σταθερά σφάλματα προέρχονται από ένα χαρακτηριστικό πείραμα που έγινε 3-4 φορές δίνοντας παρόμοια αποτελέσματα. Η συγγένεια δέσμευσης της Tyr⁰-σοβαγίνης ($-\text{Log}K_D$) που προσδιορίστηκε από αυτά τα πειράματα για τους υποδοχείς WT και F203K ήταν $8,38 \pm 0,20$ και $8,51 \pm 0,21$ αντίστοιχα.



Εικόνα 4.48: Συναγωνιστική δέσμευση της Tyr⁰-σοβαγίνης και της σοβαγίνης στον F203K.

Ο συναγωνισμός της δέσμευσης της [¹²⁵I]-Tyr⁰-σοβαγίνης από την Tyr⁰-σοβαγίνη ή την σοβαγίνη για τον υποδοχέα F203K πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στα «Υλικά και Μέθοδοι». Οι μέσοι όροι (εις διπλούν) και τα σταθερά σφάλματα προέρχονται από ένα χαρακτηριστικό πείραμα που έγινε 4 φορές δίνοντας παρόμοια αποτελέσματα. Η συγγένεια δέσμευσης της Tyr⁰-σοβαγίνης (-LogK_D) που προσδιορίστηκε από αυτά τα πειράματα για τον υποδοχέα F203K ήταν $8,51 \pm 0,21$, ενώ η συγγένεια δέσμευσης της σοβαγίνης (-LogK_i) για τον υποδοχέα F203K ήταν $8,50 \pm 0,12$.

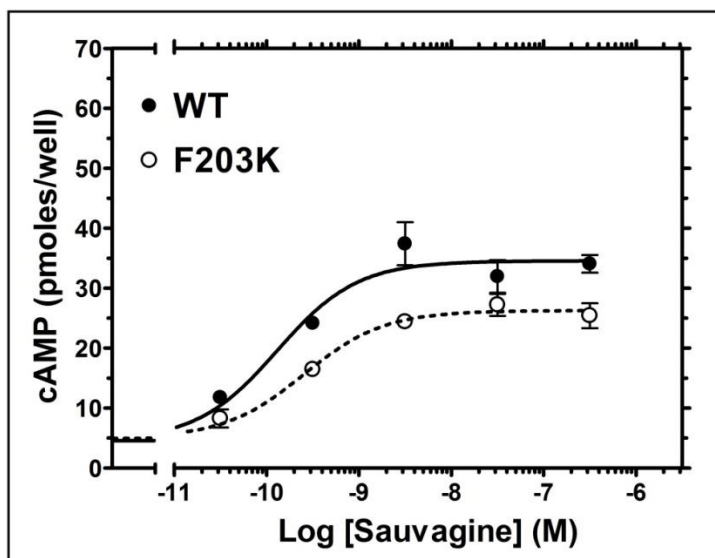


Εικόνα 4.49: Συναγωνιστική δέσμευση της αστρεσσίνης στους WT και F203K.

Ο συναγωνισμός της δέσμευσης της [125 I]-Tyr⁰-σοβαγίνης από την αστρεσσίνη για τους υποδοχείς WT και F203K πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στα «Υλικά και Μέθοδοι». Οι μέσοι όροι (εις διπλούν) και τα σταθερά σφάλματα προέρχονται από ένα χαρακτηριστικό πείραμα που έγινε 3-6 φορές δίνοντας παρόμοια αποτελέσματα. Η συγγένεια δέσμευσης της αστρεσσίνης (-LogK_d) που προσδιορίστηκε από αυτά τα πειράματα για τους υποδοχείς WT και F203K ήταν $8,02 \pm 0,07$ και $8,02 \pm 0,19$ αντίστοιχα.

Επίδραση της μετάλλαξης F203K στην ισχύ της σοβαγίνης

Παρόμοια με τη συγγένεια δέσμευσης της σοβαγίνης, η μετάλλαξη F203K δεν επηρέασε σημαντικά την ισχύ με την οποία το πεπτίδιο αυτό διεγείρει την παραγωγή ενδοκυττάριου cAMP σε HEK 293 κύτταρα τα οποία εκφράζανε τον CRF₁R. Συγκεκριμένα η ισχύς της σοβαγίνης (-LogEC₅₀) για τον WT και τον μεταλλαγμένο υποδοχέα F203K ήταν $9,90 \pm 0,19$ και $9,97 \pm 0,23$ αντίστοιχα (Εικόνα 4.50 και Πίνακας 4.1).



Εικόνα 4.50: Διέγερση παραγωγής ενδοκυττάριου κυκλικού AMP από την σοβαγίνη.

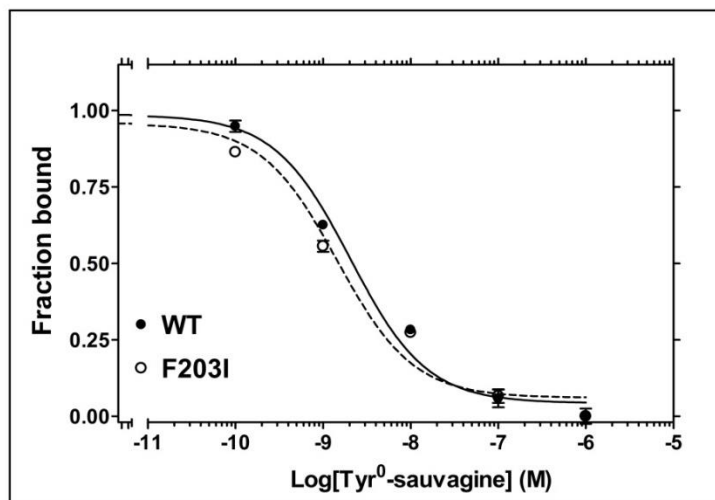
Η διέγερση της παραγωγής ενδοκυττάριου κυκλικού AMP από αυξανόμενες συγκεντρώσεις σοβαγίνης πραγματοποιήθηκε σε άδικτα HEK 293 κύτταρα που εκφράζανε σταθερά τον WT ή τον F203K. Οι μέσοι όροι (εις διπλούν) και τα σταθερά σφάλματα τους προέρχονται από ένα χαρακτηριστικό πείραμα που έγινε 5 φορές με παρόμοια αποτελέσματα. Η ισχύς της σοβαγίνης (-LogEC₅₀) να διεγείρει την παραγωγή ενδοκυττάριου cAMP που υπολογίστηκε από τα πειράματα αυτά για τους υποδοχείς WT και F203K ήταν $9,90 \pm 0,19$ και $9,97 \pm 0,23$ αντίστοιχα.

4.2.1.3 Μετάλλαξη F203I

Επίδραση της μετάλλαξης F203I στη δέσμευση της Tyr⁰-σοβαγίνης και της αστρεσσίνης

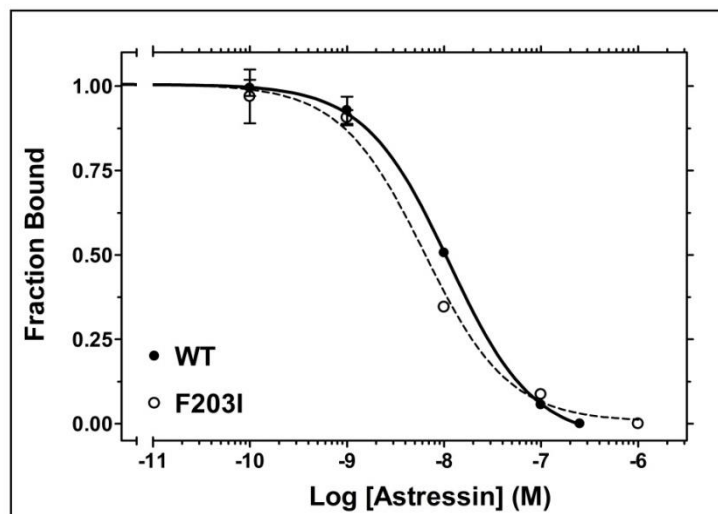
Η F203I μετάλλαξη δεν επηρέασε τη συγγένεια δέσμευσης της Tyr⁰-σοβαγίνης. Συγκεκριμένα οι συγγένειες δέσμευσης (-LogK_D) της Tyr⁰-σοβαγίνης για τον WT και τον μεταλλαγμένο υποδοχέα F203I, όπως προσδιορίστηκαν σε πειράματα ομόλογης συναγωνιστικής δέσμευσης ήταν $8,38 \pm 0,20$ και $8,40 \pm 0,16$ αντίστοιχα (Εικόνα 4.51 και Πίνακας 4.1).

Παρόμοια με τη Tyr⁰-σοβαγίνη, η F203I μετάλλαξη δεν επηρέασε τη συγγένεια δέσμευσης της αστρεσσίνης. Συγκεκριμένα οι συγγένειες δέσμευσης (-LogK_i) της αστρεσσίνης για τον WT και τον μεταλλαγμένο υποδοχέα F203I, όπως προσδιορίστηκαν σε πειράματα ετερόλογης συναγωνιστικής δέσμευσης ήταν $8,02 \pm 0,07$ και $7,84 \pm 0,18$ αντίστοιχα (Εικόνα 4.52 και Πίνακας 4.1).



Εικόνα 4.51: Συναγωνιστική δέσμευση της Tyr⁰-σοβαγίνης στους WT και F203I.

Ο συναγωνισμός της δέσμευσης της [¹²⁵I]-Tyr⁰-σοβαγίνης από την Tyr⁰-σοβαγίνη για τους υποδοχείς WT και F203I πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στα «Υλικά και Μέθοδοι». Οι μέσοι όροι (εις διπλούν) και τα σταθερά σφάλματα προέρχονται από ένα χαρακτηριστικό πείραμα που έγινε 3-4 φορές δίνοντας παρόμοια αποτελέσματα. Η συγγένεια δέσμευσης της Tyr⁰-σοβαγίνης (-LogK_D) που προσδιορίστηκε από αυτά τα πειράματα για τους υποδοχείς WT και F203I ήταν $8,38 \pm 0,20$ και $8,40 \pm 0,16$ αντίστοιχα.

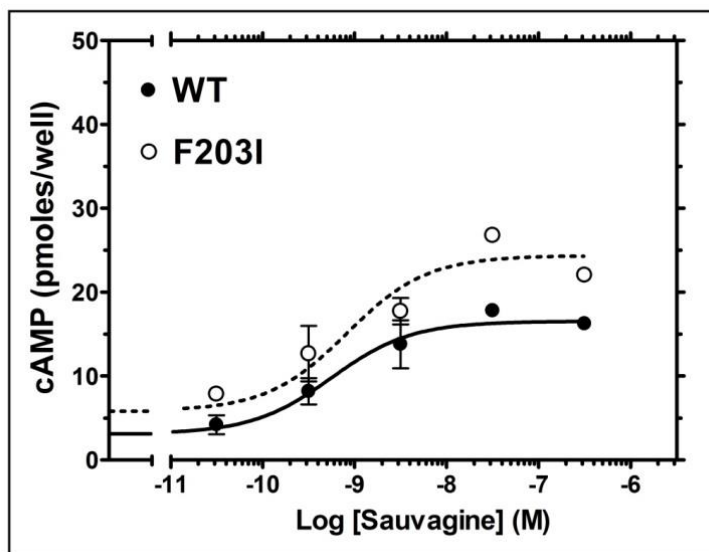


Εικόνα 4.52: Συναγωνιστική δέσμευση της αστρεσσίνης στους WT και F2031.

Ο συναγωνισμός της δέσμευσης της $[^{125}\text{I}]\text{-Tyr}^0\text{-σοβαγίνης}$ από την αστρεσσίνη για τους υποδοχείς WT και F2031 πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στα «Υλικά και Μέθοδοι». Οι μέσοι όροι (εις διπλούν) και τα σταθερά σφάλματα προέρχονται από ένα χαρακτηριστικό πείραμα που έγινε 3-6 φορές δίνοντας παρόμοια αποτελέσματα. Η συγγένεια δέσμευσης της αστρεσσίνης ($-\text{Log}K_i$) που προσδιορίστηκε από αυτά τα πειράματα για τους υποδοχείς WT και F2031 ήταν $8,02 \pm 0,07$ και $7,84 \pm 0,18$ αντίστοιχα.

Επίδραση της μετάλλαξης F203I στην ισχύ της σοβαγίνης

Παρόμοια με τη συγγένεια δέσμευσης της σοβαγίνης, η F203I μετάλλαξη δεν επηρέασε σημαντικά την ισχύ με την οποία ο πεπτιδικός αυτός αγωνιστής διέγειρε την παραγωγή ενδοκυττάριου cAMP σε HEK 293 κύτταρα τα οποία εκφράζανε τον CRF₁R. Συγκεκριμένα η ισχύς της σοβαγίνης (-LogEC₅₀) για τον WT και τον μεταλλαγμένο υποδοχέα F203I ήταν $9,90 \pm 0,19$ και $9,79 \pm 0,40$ αντίστοιχα (Εικόνα 4.53 και Πίνακας 4.1).



Εικόνα 4.53: Διέγερση παραγωγής ενδοκυττάριου cAMP από την σοβαγίνη.

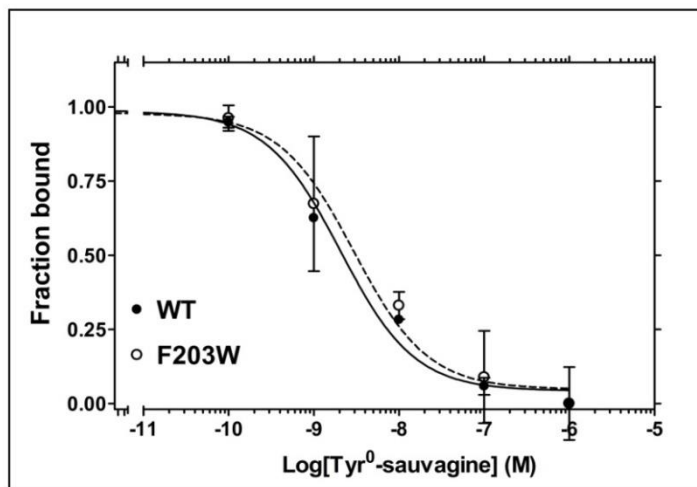
Η διέγερση της παραγωγής ενδοκυττάριου cAMP από αυξανόμενες συγκεντρώσεις σοβαγίνης, πραγματοποιήθηκε σε άθικτα HEK 293 κύτταρα που εκφράζανε σταθερά τον WT ή τον F203I. Οι μέσοι όροι (εις διπλούν) και τα σταθερά σφάλματά τους προέρχονται από ένα χαρακτηριστικό πείραμα που έγινε 5 φορές με παρόμοια αποτελέσματα. Η ισχύς της σοβαγίνης (-LogEC₅₀) να διεγείρει την παραγωγή cAMP που υπολογίστηκε από τα πειράματα αυτά για τους υποδοχείς WT και F203I ήταν $9,90 \pm 0,19$ και $9,79 \pm 0,40$ αντίστοιχα.

4.2.1.4 Μετάλλαξη F203W

Επίδραση της μετάλλαξης F203W στη δέσμευση της Tyr⁰-σοβαγίνης και της αστρεσσίνης

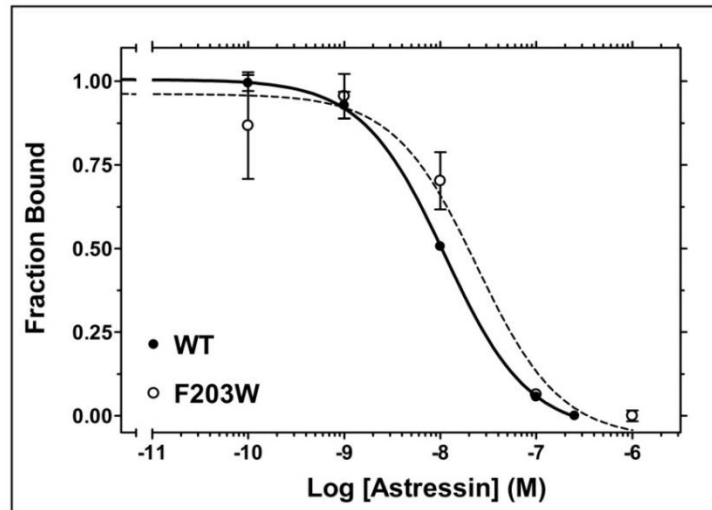
Παρόμοια με την F203I μετάλλαξη (Εικόνα 4.51), η F203W μετάλλαξη δεν επηρέασε τη συγγένεια δέσμευσης της Tyr⁰-σοβαγίνης. Συγκεκριμένα οι συγγένειες δέσμευσης (-LogK_D) της Tyr⁰-σοβαγίνης για τον WT και τον μεταλλαγμένο υποδοχέα F203W όπως προσδιορίστηκαν σε πειράματα ομόλογης συναγωνιστικής δέσμευσης ήταν $8,38 \pm 0,20$ και $8,40 \pm 0,37$ αντίστοιχα (Εικόνα 4.54 και Πίνακας 4.1).

Επιπρόσθετα, η μετάλλαξη F203W δεν επηρέασε τη συγγένεια δέσμευσης της αστρεσσίνης. Συγκεκριμένα οι συγγένειες δέσμευσης (-LogK_i) της αστρεσσίνης για τον WT και τον μεταλλαγμένο υποδοχέα F203W όπως προσδιορίστηκαν σε πειράματα ετερόλογης συναγωνιστικής δέσμευσης ήταν $8,02 \pm 0,07$ και $7,74 \pm 0,07$ αντίστοιχα (Εικόνα 4.55 και Πίνακας 4.1).



Εικόνα 4.54: Συναγωνιστική δέσμευση της Tyr⁰-σοβαγίνης στους WT και F203W.

Ο συναγωνισμός της δέσμευσης της [¹²⁵I]-Tyr⁰-σοβαγίνης από την Tyr⁰-σοβαγίνη για τους υποδοχείς WT και F203W πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στα «Υλικά και Μέθοδοι». Οι μέσοι όροι (εις διπλούν) και τα σταθερά σφάλματα προέρχονται από ένα χαρακτηριστικό πείραμα που έγινε 3-4 φορές δίνοντας παρόμοια αποτελέσματα. Η συγγένεια δέσμευσης της Tyr⁰-σοβαγίνης (-LogK_D) που προσδιορίστηκε από αυτά τα πειράματα για τους υποδοχείς WT και F203W ήταν $8,38 \pm 0,20$ και $8,40 \pm 0,37$ αντίστοιχα.

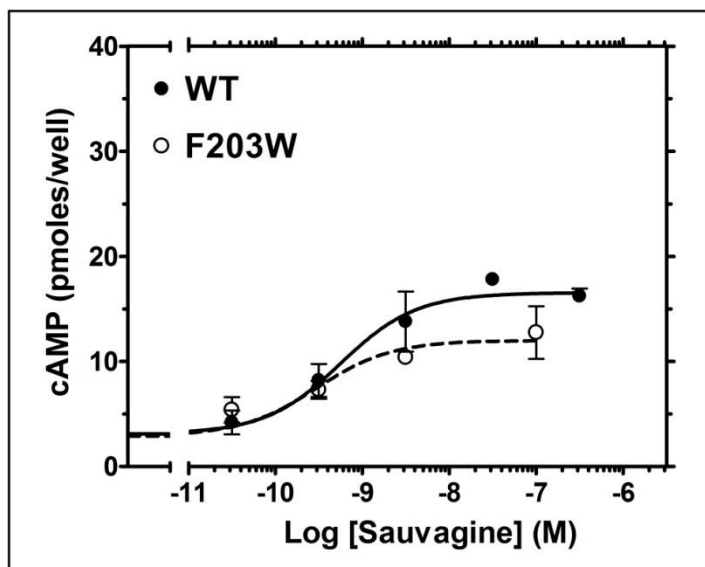


Εικόνα 4.55: Συναγωνιστική δέσμευση της αστρεσσίνης στους WT και F203W.

Ο συναγωνισμός της δέσμευσης της $[^{125}\text{I}]\text{-Tyr}^0\text{-σοβαγίνης}$ από την αστρεσσίνη για τους υποδοχείς WT και F203W πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στα «Υλικά και Μέθοδοι». Οι μέσοι όροι (εις διπλούν) και τα σταθερά σφάλματα προέρχονται από ένα χαρακτηριστικό πείραμα που έγινε 4-6 φορές δίνοντας παρόμοια αποτελέσματα. Η συγγένεια δέσμευσης της αστρεσσίνης ($-\text{Log}K_i$) που προσδιορίστηκε από αυτά τα πειράματα για τους υποδοχείς WT και F203W ήταν $8,02 \pm 0,07$ και $7,74 \pm 0,07$ αντίστοιχα.

Επίδραση της μετάλλαξης F203W στην ισχύ της σοβαγίνης

Παρόμοια με τη συγγένεια δέσμευσης της σοβαγίνης, η F203W μετάλλαξη δεν επηρέασε σημαντικά την ισχύ με την οποία ο πεπτιδικός αυτός αγωνιστής, διέγειρε την παραγωγή ενδοκυττάριου cAMP σε HEK 293 κύτταρα τα οποία εκφράζανε τον CRF₁R. Συγκεκριμένα η ισχύς της σοβαγίνης (-LogEC₅₀) για τον WT και τον μεταλλαγμένο υποδοχέα F203W ήταν $9,90 \pm 0,19$ και $9,60 \pm 0,06$ αντίστοιχα (Εικόνα 4.56 και Πίνακας 4.1).



Εικόνα 4.56: Διέγερση παραγωγής ενδοκυττάριου cAMP από την σοβαγίνη.

Η διέγερση της παραγωγής ενδοκυττάριου cAMP από αυξανόμενες συγκεντρώσεις σοβαγίνης, πραγματοποιήθηκε σε άθικτα HEK 293 κύτταρα που εκφράζανε σταθερά τον WT ή τον F203W. Οι μέσοι όροι (εις διπλούν) και τα σταθερά σφάλματά τους προέρχονται από ένα χαρακτηριστικό πείραμα που έγινε 3-5 φορές με παρόμοια αποτελέσματα. Η ισχύς της σοβαγίνης (-LogEC₅₀) να διεγείρει την παραγωγή cAMP που υπολογίστηκε από τα πειράματα αυτά για τους υποδοχείς WT και F203W ήταν $9,90 \pm 0,19$ και $9,60 \pm 0,06$ αντίστοιχα.

	WT	F203A	F203K	F203I	F203W
-LogK_D (or -LogK_i) ± S.E					
Tyr⁰-sauvagine	8.38 ± 0.20	6.95 ± 0.11*	8.51 ± 0.21	8.40 ± 0.16	8.40 ± 0.37
Astressin	8.02 ± 0.07	8.03 ± 0.18	8.02 ± 0.19	7.84 ± 0.18	7.74 ± 0.07
-LogEC₅₀ ± S.E					
Sauvagine	9.90 ± 0.19	8.52 ± 0.23*	9.97 ± 0.23	9.79 ± 0.40	9.60 ± 0.06

Πίνακας 4.1: Επίδραση των μεταλλάξεων στη θέση 203 της TM3 του CRF₁R στις φαρμακολογικές ιδιότητές του.

Οι συγγένειες δέσμησης της Tyr⁰-σοβαγίνης (-LogK_D) και της αστρεσσίνης (-LogK_i) για τους WT, F203A, F203K, F203I και F203W, όπως αυτές προσδιορίστηκαν σε μελέτες ομόλογης ή ετερόλογης συναγωνιστικής δέσμησης. Οι μέσοι όροι των τιμών (-LogK_D ή -LogK_i) και τα σταθερά σφάλματά (S.E) τους προέρχονται από 3-6 ανεξάρτητα πειράματα. Ο αστερίσκος δηλώνει ότι η συγγένεια δέσμησης της Tyr⁰-σοβαγίνης για τον υποδοχέα F203A διαφέρει στατιστικά σημαντικά από εκείνη για τον WT ($P < 0.05$; one way ANOVA).

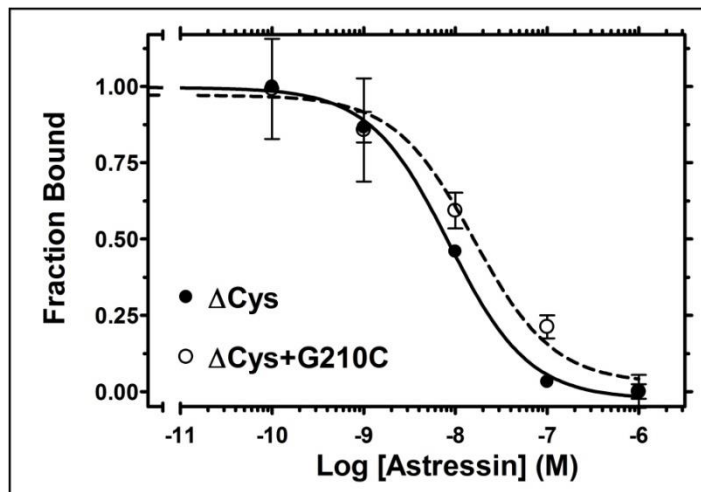
Η ισχύς της σοβαγίνης (-LogEC₅₀) για τους WT, F203A, F203K, F203I ή F203W, προσδιορίστηκε σε μελέτες μέτρησης ενδοκυττάριου cAMP χρησιμοποιώντας κύτταρα που εκφράζανε σταθερά του υποδοχείς αυτούς. Οι μέσοι όροι των τιμών (-LogEC₅₀) και τα σταθερά σφάλματά (S.E) τους προέρχονται από 3-7 ανεξάρτητα πειράματα. Ο αστερίσκος δηλώνει ότι η ισχύς της σοβαγίνης για τον υποδοχέα F203A διαφέρει στατιστικά σημαντικά από εκείνη για τον WT ($P < 0.05$; one way ANOVA).

4.2.1.5 Μετάλλαξη G210C

Επίδραση της μετάλλαξης G210C στη δέσμευση της Tyr⁰-σοβαγίνης και της αστρεσσίνης

Η G210C μετάλλαξη του ΔCys (δημιουργώντας έτσι τον μεταλλαγμένο υποδοχέα ΔCys+G210C) μείωσε σημαντικά (κατά 129 φορές) τη συγγένεια δέσμευσης της Tyr⁰-σοβαγίνης (ΔCys+G210C: $-\text{Log}K_D=6,48 \pm 0,31$ και ΔCys: $-\text{Log}K_D=8,59 \pm 0,37$), η οποία προσδιορίστηκε σε πειράματα ομόλογης συναγωνιστικής δέσμευσης όπως αναφέρθηκε παραπάνω (Εικόνα 4.20).

Σε αντίθεση με τη Tyr⁰-σοβαγίνη, η συγγένεια δέσμευσης της αστρεσσίνης δεν επηρεάστηκε σημαντικά από τη μετάλλαξη G210C. Συγκεκριμένα οι συγγένειες δέσμευσης ($-\text{Log}K_i$) της αστρεσσίνης για τον ΔCys και τον ΔCys+G210C όπως προσδιορίστηκαν σε πειράματα ετερόλογης συναγωνιστικής δέσμευσης ήταν $7,99 \pm 0,10$ και $7,71 \pm 0,06$ αντίστοιχα (Εικόνες 4.57 και 4.61).

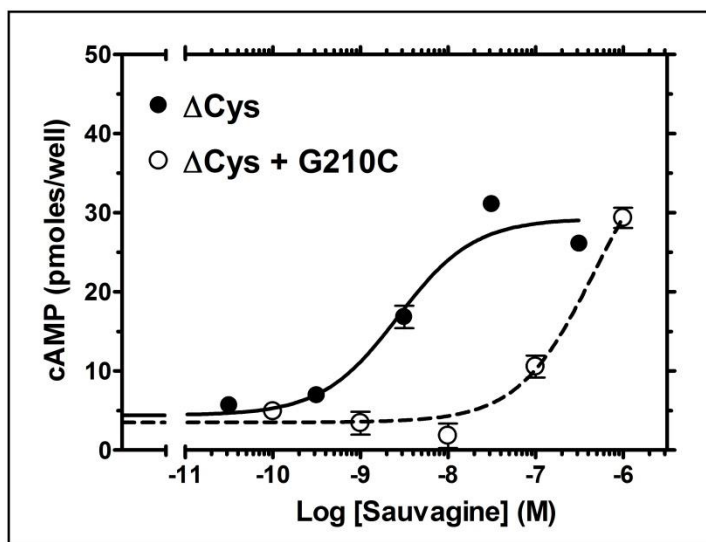


Εικόνα 4.57: Συναγωνιστική δέσμευση της αστρεσσίνης στους ΔCys και ΔCys+G210C.

Ο συναγωνισμός της δέσμευσης της [¹²⁵I]-Tyr⁰-σοβαγίνης από την αστρεσσίνη για τους ΔCys και ΔCys+G210C πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στα «Υλικά και Μέθοδοι». Οι μέσοι όροι (εις διπλούν) και τα σταθερά σφάλματα προέρχονται από ένα χαρακτηριστικό πείραμα που έγινε 3 φορές δίνοντας παρόμοια αποτελέσματα. Η συγγένεια δέσμευσης της αστρεσσίνης ($-\text{Log}K_i$) που προσδιορίστηκε από αυτά τα πειράματα για τους υποδοχείς ΔCys και ΔCys+G210C ήταν $7,99 \pm 0,10$ και $7,71 \pm 0,06$ αντίστοιχα.

Επίδραση της μετάλλαξης G210C στην ισχύ της σοβαγίνης

Παρόμοια με τη συγγένεια δέσμευσης της σοβαγίνης, η G210C μετάλλαξη μείωσε σημαντικά την ισχύ (121 φορές) με την οποία ο πεπτιδικός αυτός αγωνιστής διεγείρει την παραγωγή ενδοκυττάριου cAMP σε HEK 293 κύτταρα που εκφράζανε τον υποδοχέα. Συγκεκριμένα η ισχύς της σοβαγίνης ($-\text{LogEC}_{50}$) για τον ΔCys και τον $\Delta\text{Cys}+\text{G210C}$ ήταν $8,68 \pm 0,14$ και $6,60 \pm 0,13$ αντίστοιχα (Εικόνα 4.58).



Εικόνα 4.58: Διέγερση παραγωγής ενδοκυττάριου cAMP από την σοβαγίνη.

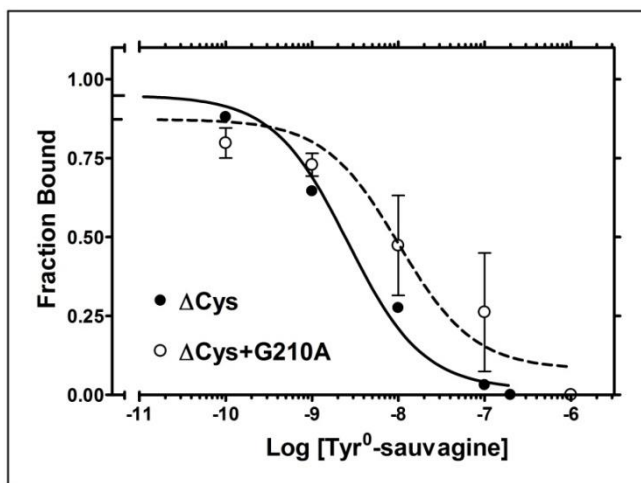
Η διέγερση της παραγωγής ενδοκυττάριου cAMP από αυξανόμενες συγκεντρώσεις σοβαγίνης, πραγματοποιήθηκε σε άθικτα HEK 293 κύτταρα που εκφράζανε σταθερά τον ΔCys ή τον $\Delta\text{Cys}+\text{G210C}$. Οι μέσοι όροι (εις διπλούν) και τα σταθερά σφάλματά τους προέρχονται από ένα χαρακτηριστικό πείραμα που έγινε 6-11 φορές με παρόμοια αποτελέσματα. Η ισχύς της σοβαγίνης ($-\text{LogEC}_{50}$) να διεγείρει την παραγωγή cAMP που υπολογίστηκε από τα πειράματα αυτά για τους υποδοχείς ΔCys και $\Delta\text{Cys}+\text{G210C}$ ήταν $8,68 \pm 0,14$ και $6,60 \pm 0,13$ αντίστοιχα.

4.2.1.6 Μετάλλαξη G210A

Επίδραση της μετάλλαξης G210A στη δέσμευση της Tyr⁰-σοβαγίνης και της αστρεσσίνης

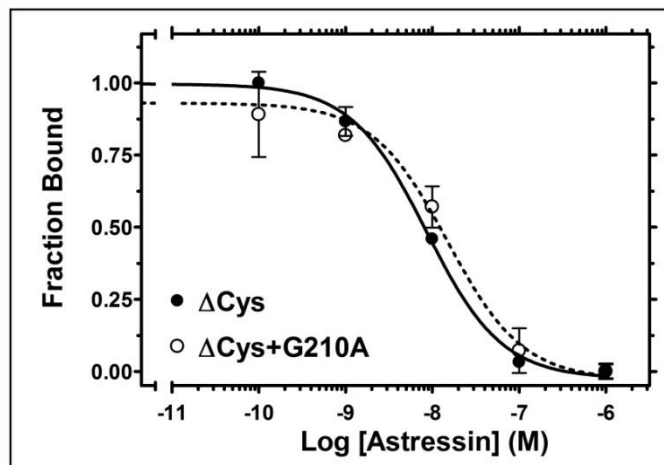
Η G210A μετάλλαξη είχε πολύ μικρότερη επίδραση στη συγγένεια δέσμευσης της Tyr⁰-σοβαγίνης συγκριτικά με τη μετάλλαξη G210C (Εικόνες 4.20, 4.59 και 4.61). Συγκεκριμένα οι συγγένειες δέσμευσης (-LogK_D) της Tyr⁰-σοβαγίνης για τον ΔCys και τον ΔCys+G210A όπως προσδιορίστηκαν σε πειράματα ομόλογης συναγωνιστικής δέσμευσης ήταν 8,59 ± 0,37 και 7,60 ± 0,15 αντίστοιχα (Εικόνα 4.59 και 4.61).

Παρόμοια με τη G210C, η μετάλλαξη G210A δεν επηρέασε σημαντικά τη συγγένεια δέσμευσης της αστρεσσίνης (Εικόνες 4.60 και 4.61). Συγκεκριμένα οι συγγένειες δέσμευσης (-LogK_i) της αστρεσσίνης για τον ΔCys και τον υποδοχέα ΔCys+G210A όπως προσδιορίστηκαν σε πειράματα ετερόλογης συναγωνιστικής δέσμευσης ήταν 7,99 ± 0,10 και 7,99 ± 0,09 αντίστοιχα (Εικόνες 4.60 και 4.61).



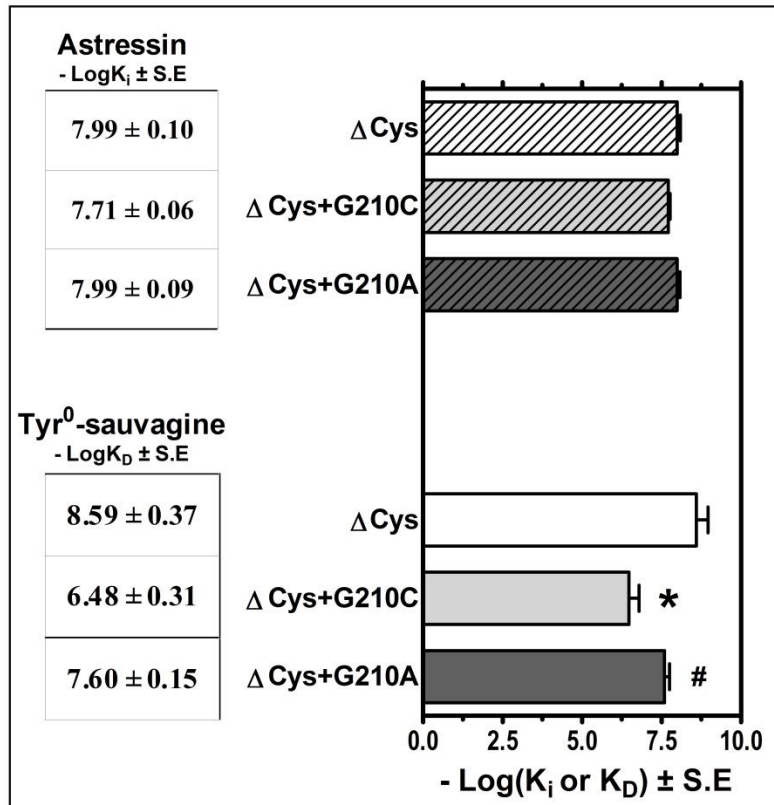
Εικόνα 4.59: Συναγωνιστική δέσμευση της Tyr⁰-σοβαγίνης στους ΔCys και ΔCys+G210A.

Ο συναγωνισμός της δέσμευσης της [¹²⁵I]-Tyr⁰-σοβαγίνης από την Tyr⁰-σοβαγίνη για τους ΔCys και ΔCys+G210A πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στα «Υλικά και Μέθοδοι». Οι μέσοι όροι (εις διπλούν) και τα σταθερά σφάλματα προέρχονται από ένα χαρακτηριστικό πείραμα που έγινε 3-4 φορές δίνοντας παρόμοια αποτελέσματα. Η συγγένεια δέσμευσης της Tyr⁰-σοβαγίνης (-LogK_D) που προσδιορίστηκε από αυτά τα πειράματα για τους υποδοχείς ΔCys και ΔCys+G210A ήταν 8,59 ± 0,37 και 7,60 ± 0,15 αντίστοιχα.



Εικόνα 4.60: Συναγωνιστική δέσμευση της αστρεσσίνης στους ΔCys και ΔCys+G210A.

Ο συναγωνισμός της δέσμευσης της $[^{125}\text{I}]\text{-Tyr}^0\text{-σοβαγίνης}$ από την αστρεσσίνη για τους ΔCys και ΔCys+G210A πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στα «Υλικά και Μέθοδοι». Οι μέσοι όροι (εις διπλούν) και τα σταθερά σφάλματα προέρχονται από ένα χαρακτηριστικό πείραμα που έγινε 3 φορές δίνοντας παρόμοια αποτελέσματα. Η συγγένεια δέσμευσης της αστρεσσίνης ($-\text{Log}K_i$) που προσδιορίστηκε από αυτά τα πειράματα για τους υποδοχείς ΔCys και ΔCys+G210A ήταν $7,99 \pm 0,10$ και $7,99 \pm 0,09$ αντίστοιχα.

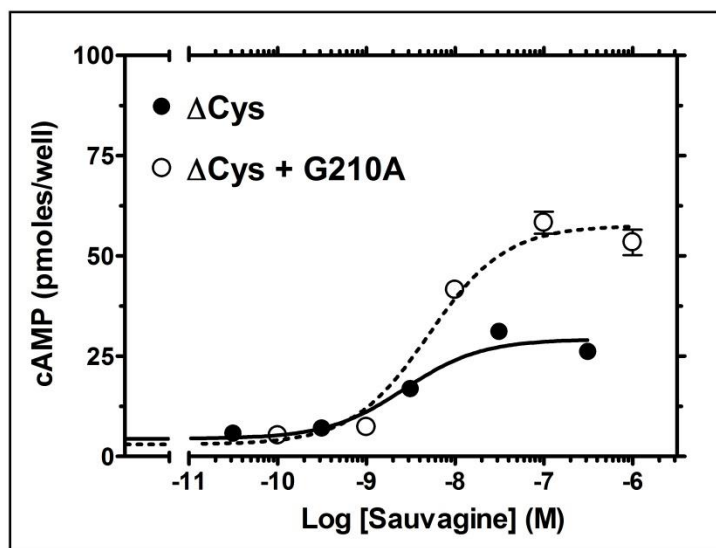


Εικόνα 4.61: Επίδραση των μεταλλάξεων G210C και G210A της TM3 του ΔCys στη δέσμευση της Tyr⁰-σοβαγίνης και της αστρεσσίνης.

Οι συγγένειες δέσμευσης της Tyr⁰-σοβαγίνης (-LogK_D) και της αστρεσσίνης (-LogK_i) για τους μεταλλαγμένους υποδοχείς ΔCys, ΔCys+G210C και ΔCys+G210A αναπαριστώνται με στήλες. Οι στήλες αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους (-LogK_D ή -LogK_i) και τα σταθερά σφάλματα (S.E) από 3-4 ανεξάρτητα πειράματα, ενώ στον πίνακα αριστερά των στηλών αναγράφονται οι συγγένειες δέσμευσης της Tyr⁰-σοβαγίνης (-LogK_D ± S.E) και της αστρεσσίνης (-LogK_i ± S.E). Ο αστερίσκος δηλώνει ότι η συγγένεια δέσμευσης της Tyr⁰-σοβαγίνης για τον υποδοχέα ΔCys+G210C διαφέρει στατιστικά σημαντικά από εκείνη για τον ΔCys (P < 0.05; one way ANOVA). Η δίεση δηλώνει ότι η συγγένεια δέσμευσης της Tyr⁰-σοβαγίνης για τον υποδοχέα ΔCys+G210A διαφέρει στατιστικά σημαντικά από εκείνη για τον ΔCys+G210C (P < 0.05; one way ANOVA).

Επίδραση της μετάλλαξης G210A στην ισχύ της σοβαγίνης

Παρόμοια με τη συγγένεια δέσμευσης της σοβαγίνης, η G210A μετάλλαξη είχε μικρή επίδραση στην ισχύ του πεπτιδικού αυτού αγωνιστή να διεγείρει την παραγωγή ενδοκυττάρου cAMP σε HEK 293 κύτταρα τα οποία εκφράζανε τον υποδοχέα. Συγκεκριμένα η ισχύς της σοβαγίνης ($-\text{LogEC}_{50}$) για τον ΔCys και τον $\Delta\text{Cys}+\text{G210A}$ ήταν $8,68 \pm 0,14$ και $8,15 \pm 0,06$ αντίστοιχα (Εικόνα 4.62).



Εικόνα 4.62: Διέγερση παραγωγής ενδοκυττάρου cAMP από την σοβαγίνη.

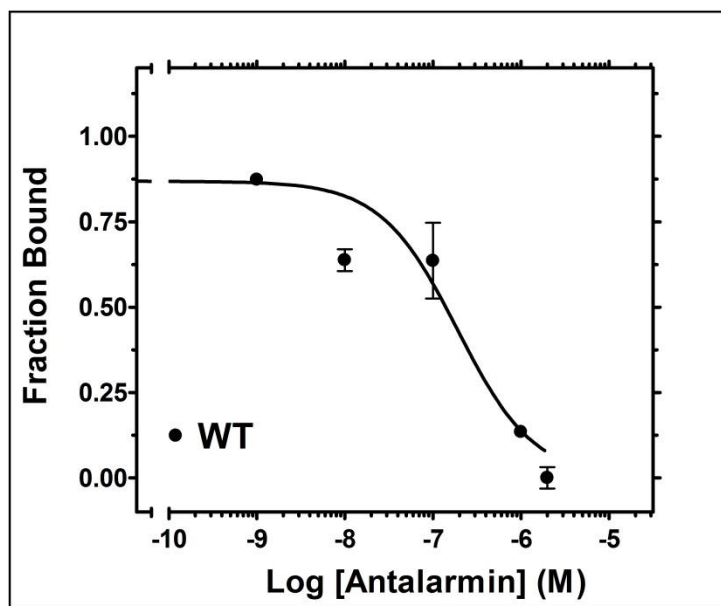
Η διέγερση της παραγωγής ενδοκυττάρου cAMP από αυξανόμενες συγκεντρώσεις σοβαγίνης, πραγματοποιήθηκε σε άθικτα HEK 293 κύτταρα που εκφράζανε σταθερά τον ΔCys ή τον $\Delta\text{Cys}+\text{G210A}$. Οι μέσοι όροι (εις διπλούν) και τα σταθερά σφάλματά τους προέρχονται από ένα χαρακτηριστικό πείραμα που έγινε 4-11 φορές με παρόμοια αποτελέσματα. Η ισχύς της σοβαγίνης ($-\text{LogEC}_{50}$) να διεγείρει την παραγωγή cAMP που υπολογίστηκε από τα πειράματα αυτά για τους υποδοχείς ΔCys και $\Delta\text{Cys}+\text{G210A}$ ήταν $8,68 \pm 0,14$ και $8,15 \pm 0,06$ αντίστοιχα.

4.3 Ρόλος της F203 της TM3 στη δέσμευση των μικρομοριακών αλλοστερικών ανταγωνιστών

Το γεγονός ότι η ανταλαρμίνη δεν μπόρεσε να προστατέψει τον μεταλλαγμένο υποδοχέα ΔCys+F203C από την αντίδρασή του με το MTSEA (Κεφάλαιο “Προστασία από την αντίδραση με το MTSEA”) οφείλεται στο ότι η μετάλλαξη F203C κατήργησε την ικανότητα του υποδοχέα να δεσμεύει την ανταλαρμίνη (Εικόνα 4.27). Με σκοπό να εξετάσουμε περαιτέρω το ρόλο της F203 του CRF₁R στη δέσμευση της ανταλαρμίνης, προσδιορίσαμε τις επιπτώσεις των μεταλλάξεων της F203 σε Ala (F203A), Lys (F203K), Ile (F203I) και Trp (F203W) στη συγγένεια δέσμευσης του ανταγωνιστή. Παράλληλα, μελετήσαμε την επίδραση των μεταλλάξεων αυτών στην ικανότητα της ανταλαρμίνης (1-2 μM) και της αστρεσσίνης (0,3 μM) να ανταγωνίζεται την προκαλούμενη από τη σοβαγίνη διέγερση της παραγωγής ενδοκυττάριου cAMP σε HEK293 κύτταρα που εκφράζουν τον υποδοχέα. Συγκεκριμένα η ανταγωνιστική ικανότητα της ανταλαρμίνης προσδιορίστηκε με βάση την επίδρασή της στην ισχύ (-LogEC₅₀) της σοβαγίνης. Στα πειράματα αυτά χρησιμοποιήθηκε ο άγριος τύπος CRF₁R (WT) καθώς και η αστρεσσίνη ως μέτρα σύγκρισης. Η επιλογή της αστρεσσίνης βασίστηκε στο γεγονός ότι, αντίθετα με την ανταλαρμίνη, δεσμεύεται σε εξωκυττάριας περιοχές του CRF₁R που βρίσκονται μακριά από τη F203 της TM3 (211) και όπως παρατηρήθηκε για τη συγγένεια δέσμευσής της (Εικόνες 4.28, 4.45, 4.49, 4.52 και 4.55), έτσι και η ικανότητα της να ανταγωνίζεται τη σοβαγίνη, αναμένεται να μην επηρεαστεί από τις F203 μεταλλάξεις.

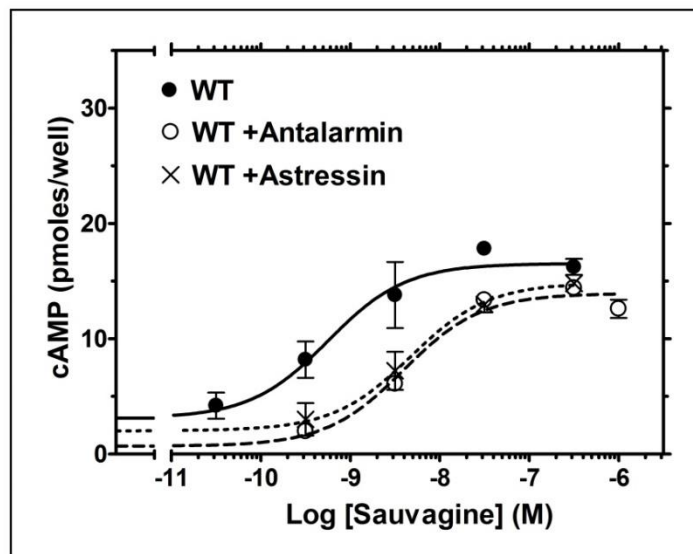
4.3.1 WT και ανταλαρμίνη

Η συγγένεια δέσμευσης ($-\text{Log}K_i$) της ανταλαρμίνης για τον WT όπως προσδιορίστηκε σε πειράματα ετερόλογης συναγωνιστικής δέσμευσης ήταν $7,62 \pm 0,13$ (Εικόνα 4.63 και Πίνακας 4.2). Η συγγένεια δέσμευσης ($-\text{Log}K_i$) της αστρεσσίνης για τον WT όπως αναφέρθηκε παραπάνω ήταν $8,02 \pm 0,07$ (Εικόνα 4.45, 4.49, 4.52 και 4.55 και Πίνακες 4.1 και 4.2). Η δέσμευση της ανταλαρμίνης και της αστρεσσίνης στον WT συμφωνεί με την ανταγωνιστική ικανότητά τους αφού και οι δύο ανταγωνιστές μείωσαν σημαντικά την ισχύ της σοβαγίνης να διεγείρει την παραγωγή ενδοκυττάριου cAMP σε HEK 293 κύτταρα που εκφράζουν τον υποδοχέα αυτό. Συγκεκριμένα η ισχύς της σοβαγίνης για τον WT ($-\text{LogEC}_{50} = 9,90 \pm 0,19$), μειώθηκε κατά 15 φορές παρουσία $0,3 \mu\text{M}$ αστρεσσίνης ($-\text{LogEC}_{50} = 8,72 \pm 0,21$) και 33 φορές παρουσία $1-2 \mu\text{M}$ ανταλαρμίνης ($-\text{LogEC}_{50} = 8,38 \pm 0,35$) (Εικόνα 4.64 και Πίνακας 4.2).



Εικόνα 4.63: Συναγωνιστική δέσμευση της ανταλαρμίνης στον WT.

Ο συναγωνισμός της δέσμευσης της $[^{125}\text{I}]\text{-Tyr}^0\text{-σοβαγίνης}$ από την ανταλαρμίνη για τον WT πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στα «Υλικά και Μέθοδοι». Οι μέσοι όροι (εις διπλούν) και τα σταθερά σφάλματα προέρχονται από ένα χαρακτηριστικό πείραμα που έγινε 4 φορές δίνοντας παρόμοια αποτελέσματα. Η συγγένεια δέσμευσης της ανταλαρμίνης ($-\text{Log}K_i$) που προσδιορίστηκε από αυτά τα πειράματα για τον WT ήταν $7,62 \pm 0,13$.



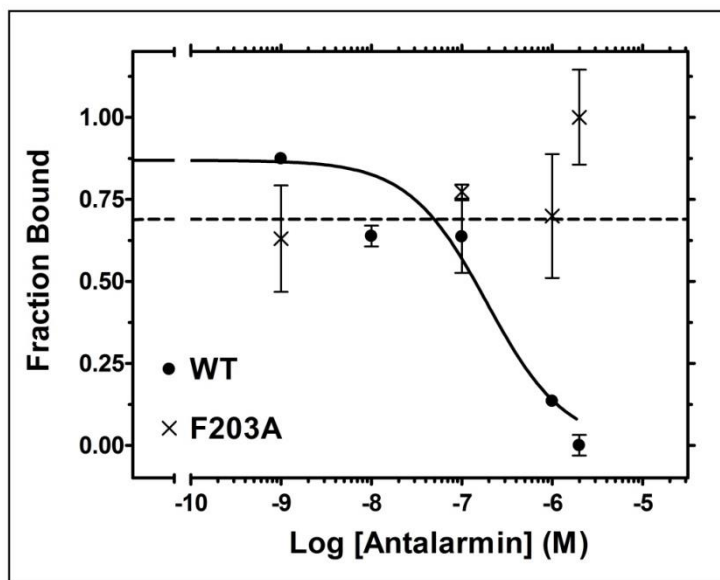
Εικόνα 4.64: Διέγερση παραγωγής ενδοκυττάριου cAMP από την σοβαγίνη.

Η διέγερση της παραγωγής ενδοκυττάριου cAMP από αυξανόμενες συγκεντρώσεις σοβαγίνης, πραγματοποιήθηκε σε άδικτα HEK 293 κύτταρα που εκφράζανε σταθερά τον WT, απουσία ή παρουσία 1-2 μM ανταλαρμίνης ή 0,3 μM αστρεσσίνης. Οι μέσοι όροι (εις διπλούν) και τα σταθερά σφάλματά τους προέρχονται από ένα χαρακτηριστικό πείραμα που έγινε 4-5 φορές με παρόμοια αποτελέσματα. Η ισχύς της σοβαγίνης ($-\text{LogEC}_{50}$) να διεγείρει την παραγωγή cAMP που υπολογίστηκε από τα πειράματα αυτά για τον WT απουσία ή παρουσία ανταλαρμίνης ή αστρεσσίνης ήταν $9,90 \pm 0,19$, $8,38 \pm 0,35$ και $8,72 \pm 0,21$ αντίστοιχα.

4.3.2 F203A και ανταλαρμίνη

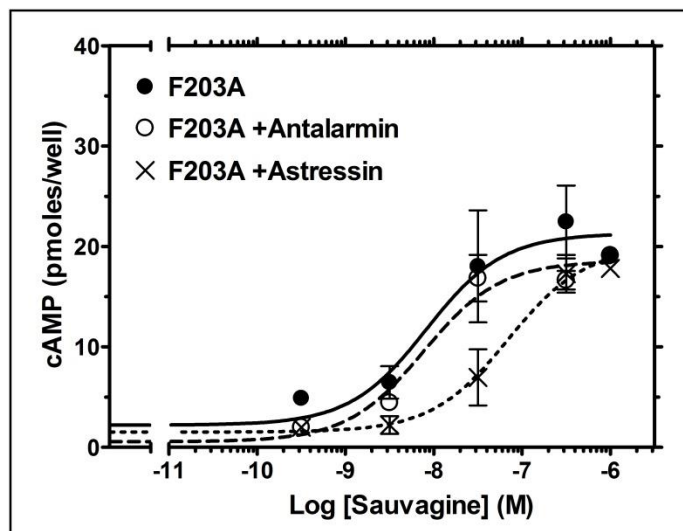
Παρόμοια με την F203C μετάλλαξη (Εικόνα 4.27 και Πίνακας 4.2), η F203A μετάλλαξη, κατήργησε την ικανότητα του υποδοχέα να δεσμεύει την ανταλαρμίνη, αλλά όχι την αστρεσσίνη. Συγκεκριμένα οι συγγένειες δέσμευσης ($-\text{Log}K_i$) της ανταλαρμίνης για τον WT και τον μεταλλαγμένο υποδοχέα F203A όπως προσδιορίστηκαν σε πειράματα ετερόλογης συναγωνιστικής δέσμευσης ήταν $7,62 \pm 0,13$ και $<5,00$ αντίστοιχα (Εικόνα 4.65 και Πίνακας 4.2). Επιπρόσθετα, οι συγγένειες δέσμευσης ($-\text{Log}K_i$) της αστρεσσίνης για τον WT και F203A όπως αναφέρονται παραπάνω ήταν $8,02 \pm 0,07$ και $8,03 \pm 0,18$ αντίστοιχα (Εικόνα 4.45 και Πίνακες 4.1 και 4.2).

Η κατάργηση της δέσμευσης της ανταλαρμίνης στον CRF_1R μετά τη F203A μετάλλαξη συμφωνεί με την έλλειψη της ικανότητάς του μορίου αυτού να ανταγωνίζεται τη σοβαγίνη να διεγείρει την παραγωγή ενδοκυττάριου cAMP σε HEK 293 κύτταρα που εκφράζουν τον F203A υποδοχέα. Αντίθετα, παρόμοια με τη συγγένεια δέσμευσής της, η ανταγωνιστική ικανότητα της αστρεσσίνης δεν επηρεάστηκε από τη F203A μετάλλαξη. Συγκεκριμένα η ισχύς της σοβαγίνης ($-\text{LogEC}_{50}$) για τον F203A ($-\text{LogEC}_{50} = 8,52 \pm 0,23$) (Εικόνες 4.46, 4.66 και Πίνακες 4.1 και 4.2), ήταν παρόμοια με εκείνη παρουσία 2 μM ανταλαρμίνης ($-\text{LogEC}_{50} = 8,00 \pm 0,29$), αλλά σημαντικά μικρότερη κατά 13 φορές από εκείνη παρουσία 0,3 μM αστρεσσίνης ($-\text{LogEC}_{50} = 7,40 \pm 0,21$) (Εικόνα 4.66 και Πίνακας 4.2).



Εικόνα 4.65: Συναγωνιστική δέσμευση της ανταλαρμίνης στους WT και F203A.

Ο συναγωνισμός της δέσμευσης της [125 I]-Tyr⁰-σοβαγίνης από την ανταλαρμίνη για τους WT και F203A πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στα «Υλικά και Μέθοδοι». Οι μέσοι όροι (εις διπλούν) και τα σταθερά σφάλματα προέρχονται από ένα χαρακτηριστικό πείραμα που έγινε 4 φορές δίνοντας παρόμοια αποτελέσματα. Η συγγένεια δέσμευσης της ανταλαρμίνης (-LogK_i) που προσδιορίστηκε από αυτά τα πειράματα για τους υποδοχείς WT και F203A ήταν 7,62 ± 0,13 και <5,00 αντίστοιχα.



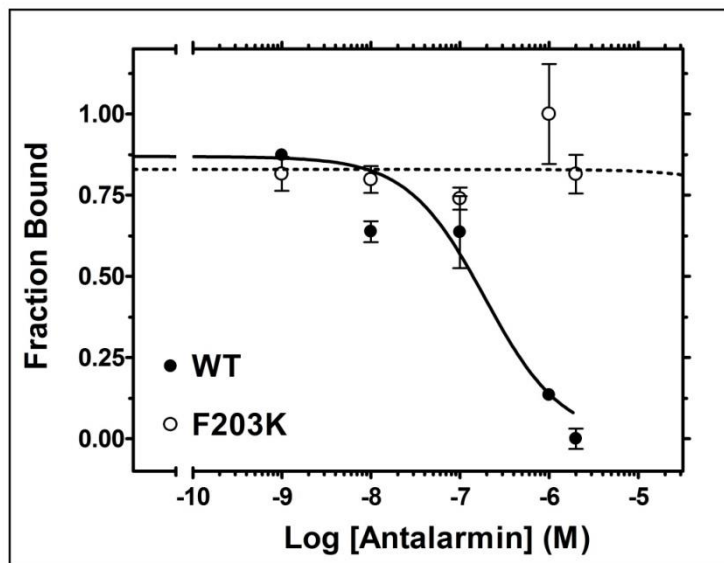
Εικόνα 4.66. Διέγερση παραγωγής ενδοκυττάριου cAMP από την σοβαγίνη.

Η διέγερση της παραγωγής ενδοκυττάριου cAMP από αυξανόμενες συγκεντρώσεις σοβαγίνης, πραγματοποιήθηκε σε άδικτα HEK 293 κύτταρα που εκφράζανε σταθερά τον μεταλλαγμένο υποδοχέα F203A, απουσία ή παρουσία 2 μ M ανταλαρμίνης ή 0,3 μ M αστρεσσίνης. Οι μέσοι όροι (εις διπλούν) και τα σταθερά σφάλματά τους προέρχονται από ένα χαρακτηριστικό πείραμα που έγινε 5-10 φορές με παρόμοια αποτελέσματα. Η ισχύς της σοβαγίνης (-LogEC₅₀) να διεγείρει την παραγωγή cAMP που υπολογίστηκε από τα πειράματα αυτά για τον υποδοχέα F203A απουσία ή παρουσία ανταλαρμίνης ή αστρεσσίνης ήταν $8,52 \pm 0,23$, $8,00 \pm 0,29$ και $7,40 \pm 0,21$ αντίστοιχα.

4.3.3 F203K και ανταλαρμίνη

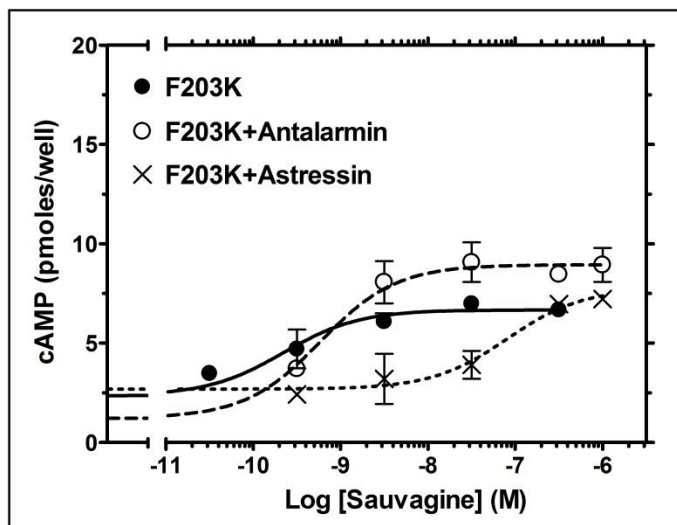
Παρόμοια με τις F203C (Εικόνα 4.27) και F203A (Εικόνα 4.65 και Πίνακας 4.2) μεταλλάξεις, η F203K μετάλλαξη κατήργησε την ικανότητα του υποδοχέα να δεσμεύει την ανταλαρμίνη αλλά όχι την αστρεσσίνη. Συγκεκριμένα οι συγγένειες δέσμευσης ($-\text{Log}K_i$) της ανταλαρμίνης για τον WT και τον μεταλλαγμένο υποδοχέα F203K όπως προσδιορίστηκαν σε πειράματα ετερόλογης συναγωνιστικής δέσμευσης ήταν $7,62 \pm 0,13$ και $<5,00$ αντίστοιχα (Εικόνα 4.67 και Πίνακας 4.2). Επιπρόσθετα, οι συγγένειες δέσμευσης ($-\text{Log}K_i$) της αστρεσσίνης για τον WT και F203K όπως αναφέρονται παραπάνω ήταν $8,02 \pm 0,07$ και $8,02 \pm 0,19$ αντίστοιχα (Εικόνα 4.49 και Πίνακες 4.1 και 4.2).

Η κατάργηση της δέσμευσης της ανταλαρμίνης στον CRF_1R μετά τη F203K μετάλλαξη συμφωνεί με την έλλειψη της ικανότητάς του μορίου αυτού να ανταγωνίζεται τη σοβαγίνη να διεγείρει τη παραγωγή ενδοκυττάριου cAMP σε HEK 293 κύτταρα που εκφράζουν τον F203K υποδοχέα. Αντίθετα, παρόμοια με τη συγγένεια δέσμευσής της, η ανταγωνιστική ικανότητα της αστρεσσίνης δεν επηρεάστηκε από τη F203K μετάλλαξη. Συγκεκριμένα η ισχύς της σοβαγίνης ($-\text{LogEC}_{50}$) για τον F203K ($-\text{LogEC}_{50} = 9,97 \pm 0,23$) (Εικόνες 4.50, 4.67 και Πίνακες 4.1 και 4.2), ήταν παρόμοια με εκείνη παρουσία 1-2 μM ανταλαρμίνης ($-\text{LogEC}_{50} = 9,26 \pm 0,93$), αλλά σημαντικά μικρότερη κατά 1014 φορές από εκείνη παρουσία 0,3 μM αστρεσσίνης ($-\text{LogEC}_{50} = 6,96 \pm 0,25$) (Εικόνα 4.68 και Πίνακας 4.2).



Εικόνα 4.67: Συναγωνιστική δέσμευση της ανταλαρμίνης στους WT και F203K.

Ο συναγωνισμός της δέσμευσης της [125 I]-Tyr⁰-σοβαγίνης από την ανταλαρμίνη για τους WT και F203K πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στα «Υλικά και Μέθοδοι». Οι μέσοι όροι (εις διπλούν) και τα σταθερά σφάλματα προέρχονται από ένα χαρακτηριστικό πείραμα που έγινε 4-5 φορές δίνοντας παρόμοια αποτελέσματα. Η συγγένεια δέσμευσης της ανταλαρμίνης ($-LogK_i$) που προσδιορίστηκε από αυτά τα πειράματα για τους υποδοχείς WT και F203K ήταν $7,62 \pm 0,13$ και $<5,00$ αντίστοιχα.



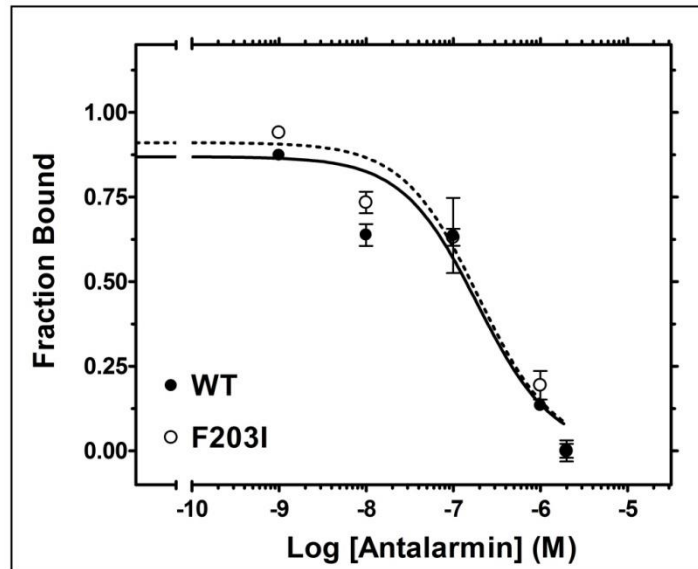
Εικόνα 4.68: Διέγερση παραγωγής ενδοκυττάριου cAMP από την σοβαγίνη.

Η διέγερση της παραγωγής ενδοκυττάριου cAMP από αυξανόμενες συγκεντρώσεις σοβαγίνης, πραγματοποιήθηκε σε άθικτα HEK 293 κύτταρα που εκφράζανε σταθερά τον μεταλλαγμένο υποδοχέα F203K απουσία ή παρουσία 1-2 μM ανταλαρμίνης ή 0,3 μM αστρεσσίνης. Οι μέσοι όροι (εις διπλούν) και τα σταθερά σφάλματά τους προέρχονται από ένα χαρακτηριστικό πείραμα που έγινε 3-5 φορές με παρόμοια αποτελέσματα. Η ισχύς της σοβαγίνης ($-\text{LogEC}_{50}$) να διεγείρει την παραγωγή cAMP που υπολογίστηκε από τα πειράματα αυτά για τον υποδοχέα F203K απουσία ή παρουσία ανταλαρμίνης ή αστρεσσίνης ήταν $9,97 \pm 0,23$, $9,26 \pm 0,93$ και $6,96 \pm 0,25$ αντίστοιχα.

4.3.4 F203I και ανταλαρμίνη

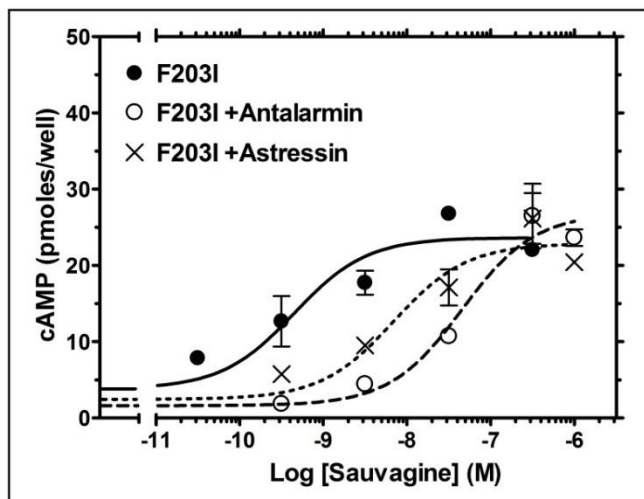
Αντίθετα με τις F203C, F203A και F203K μεταλλάξεις (Εικόνες 4.27, 4.65, 4.67 και Πίνακας 4.2), η F203I μετάλλαξη δεν επηρέασε τη δέσμευση της ανταλαρμίνης. Συγκεκριμένα οι συγγένειες δέσμευσης ($-\text{LogK}_i$) της ανταλαρμίνης για τον WT και τον μεταλλαγμένο υποδοχέα F203I όπως προσδιορίστηκαν σε πειράματα ετερόλογης συναγωνιστικής δέσμευσης ήταν $7,62 \pm 0,13$ και $6,92 \pm 0,15$ αντίστοιχα (Εικόνα 4.69 και Πίνακας 4.2). Παρόμοια, όπως αναφέρθηκε παραπάνω (Εικόνα 4.52 και Πίνακες 4.1 και 4.2), η F203I μετάλλαξη δεν επηρέασε τη συγγένεια δέσμευσης ($-\text{LogK}_i$) της αστρεσσίνης η οποία ήταν για τους υποδοχείς WT και F203I, $8,02 \pm 0,07$ και $7,84 \pm 0,18$ αντίστοιχα.

Η δέσμευση της ανταλαρμίνης και της αστρεσσίνης στον F203I συμφωνεί με την ανταγωνιστική ικανότητά τους αφού και οι δύο ανταγωνιστές μείωσαν σημαντικά την ισχύ της σοβαγίνης να διεγείρει τη παραγωγή ενδοκυττάριου cAMP σε HEK 293 κύτταρα που εκφράζουν τον υποδοχέα αυτό. Συγκεκριμένα η ισχύς της σοβαγίνης για τον F203I ($-\text{LogEC}_{50} = 9,79 \pm 0,40$), μειώθηκε κατά 65 φορές παρουσία 0,3 μM αστρεσσίνης ($-\text{LogEC}_{50} = 7,98 \pm 0,30$) και 1117 φορές παρουσία 1-2 μM ανταλαρμίνης ($-\text{LogEC}_{50} = 6,74 \pm 0,23$) (Εικόνα 4.70 και Πίνακας 4.2).



Εικόνα 4.69: Συναγωνιστική δέσμευση της ανταλαρμίνης στους WT και F203I.

Ο συναγωνισμός της δέσμευσης της $[^{125}\text{I}]\text{-Tyr}^0\text{-σοβαγίνης}$ από την ανταλαρμίνη για τους WT και F203I πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στα «Υλικά και Μέθοδοι». Οι μέσοι όροι (εις διπλούν) και τα σταθερά σφάλματα προέρχονται από ένα χαρακτηριστικό πείραμα που έγινε 3-4 φορές δίνοντας παρόμοια αποτελέσματα. Η συγγένεια δέσμευσης της ανταλαρμίνης ($-\text{Log}K_i$) που προσδιορίστηκε από αυτά τα πειράματα για τους υποδοχείς WT και F203I ήταν $7,62 \pm 0,13$ και $6,92 \pm 0,15$ αντίστοιχα.



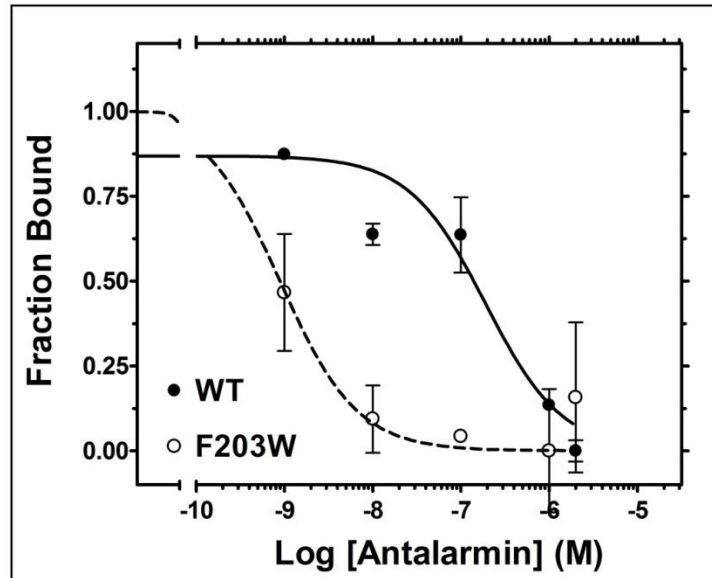
Εικόνα 4.70: Διέγερση παραγωγής ενδοκυττάριου cAMP από την σοβαγίνη.

Η διέγερση της παραγωγής ενδοκυττάριου cAMP από αυξανόμενες συγκεντρώσεις σοβαγίνης, πραγματοποιήθηκε σε άθικτα HEK 293 κύτταρα που εκφράζανε σταθερά τον μεταλλαγμένο υποδοχέα F203I απουσία ή παρουσία 1-2 μM ανταλαρμίνης ή 0,3 μM αστρεσσίνης. Οι μέσοι όροι (εις διπλούν) και τα σταθερά σφάλματά τους προέρχονται από ένα χαρακτηριστικό πείραμα που έγινε 4-5 φορές με παρόμοια αποτελέσματα. Η ισχύς της σοβαγίνης ($-\text{LogEC}_{50}$) να διεγείρει την παραγωγή cAMP που υπολογίστηκε από τα πειράματα αυτά για τον υποδοχέα F203I απουσία ή παρουσία ανταλαρμίνης ή αστρεσσίνης ήταν $9,79 \pm 0,40$, $6,74 \pm 0,23$ και $7,98 \pm 0,30$ αντίστοιχα.

4.3.5 F203W και ανταλαρμίνη

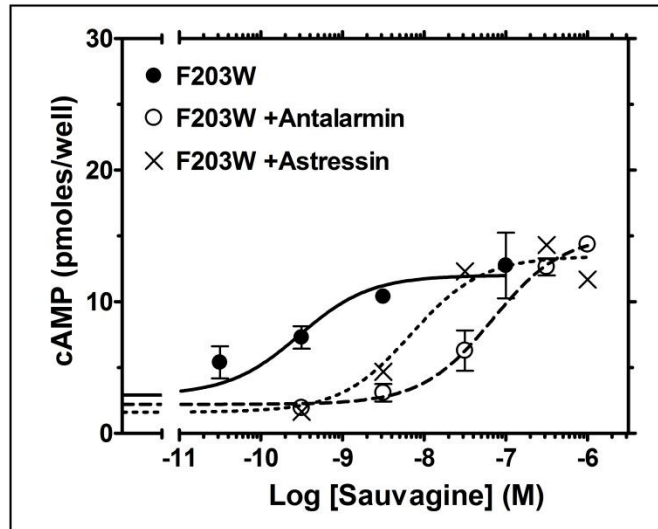
Αντίθετα με τις F203C, F203A και F203K μεταλλάξεις (Εικόνες 4.27, 4.65, 4.67 και Πίνακας 4.2), και παρόμοια με τη F203I μετάλλαξη (Εικόνα 4.69 και Πίνακας 4.2) η F203W μετάλλαξη όχι μόνο δεν μείωσε τη δέσμευση της ανταλαρμίνης αλλά την αύξησε. Συγκεκριμένα οι συγγένειες δέσμευσης ($-\text{Log}K_i$) της ανταλαρμίνης για τον WT και τον μεταλλαγμένο υποδοχέα F203W όπως προσδιορίστηκαν σε πειράματα ετερόλογης συναγωνιστικής δέσμευσης ήταν $7,62 \pm 0,13$ και $9,54 \pm 0,27$ αντίστοιχα (Εικόνα 4.71 και Πίνακας 4.2). Παρόμοια, όπως αναφέρθηκε παραπάνω (Εικόνα 4.55 και Πίνακες 4.1 και 4.2), η F203W μετάλλαξη δεν επηρέασε τη συγγένεια δέσμευσης ($-\text{Log}K_i$) της αστρεσσίνης η οποία ήταν για τους WT και F203W $8,02 \pm 0,07$ και $7,74 \pm 0,07$ αντίστοιχα.

Η δέσμευση της ανταλαρμίνης και της αστρεσσίνης στον F203W συμφωνεί με την ανταγωνιστική ικανότητά τους αφού και οι δύο ανταγωνιστές μείωσαν σημαντικά την ισχύ της σοβαγίνης να διεγείρει τη παραγωγή ενδοκυττάριου cAMP σε HEK 293 κύτταρα που εκφράζουν τον υποδοχέα αυτό. Συγκεκριμένα η ισχύς της σοβαγίνης για τον F203W ($-\text{LogEC}_{50} = 9,60 \pm 0,06$), μειώθηκε κατά 35 φορές παρουσία $0,3 \mu\text{M}$ αστρεσσίνης ($-\text{LogEC}_{50} = 8,05 \pm 0,43$) και 186 φορές παρουσία $1-2 \mu\text{M}$ ανταλαρμίνης ($-\text{LogEC}_{50} = 7,33 \pm 0,69$) (Εικόνα 4.72 και Πίνακας 4.2).



Εικόνα 4.71: Συναγωνιστική δέσμευση της ανταλαρμίνης στους WT και F203W.

Ο συναγωνισμός της δέσμευσης της [125 I]-Tyr⁰-σοβαγίνης από την ανταλαρμίνη για τους WT και F203W πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στα «Υλικά και Μέθοδοι». Οι μέσοι όροι (εις διπλούν) και τα σταθερά σφάλματα προέρχονται από ένα χαρακτηριστικό πείραμα που έγινε 3-4 φορές δίνοντας παρόμοια αποτελέσματα. Η συγγένεια δέσμευσης της ανταλαρμίνης ($-LogK_i$) που προσδιορίστηκε από αυτά τα πειράματα για τους υποδοχείς WT και F203W ήταν $7,62 \pm 0,13$ και $9,54 \pm 0,27$ αντίστοιχα.



Εικόνα 4.72: Διέγερση παραγωγής ενδοκυττάριου cAMP από την σοβαγίνη.

Η διέγερση της παραγωγής ενδοκυττάριου cAMP από αυξανόμενες συγκεντρώσεις σοβαγίνης, πραγματοποιήθηκε σε άθικτα HEK 293 κύτταρα που εκφράζανε σταθερά τον μεταλλαγμένο υποδοχέα F203W απουσία ή παρουσία 1-2 μM ανταλαρμίνης ή 0,3 μM αστρεσσίνης. Οι μέσοι όροι (εις διπλούν) και τα σταθερά σφάλματά τους προέρχονται από ένα χαρακτηριστικό πείραμα που έγινε 3-5 φορές με παρόμοια αποτελέσματα. Η ισχύς της σοβαγίνης ($-\text{LogEC}_{50}$) να διεγείρει την παραγωγή cAMP που υπολογίστηκε από τα πειράματα αυτά για τον υποδοχέα F203W απουσία ή παρουσία ανταλαρμίνης ή αστρεσσίνης ήταν $9,60 \pm 0,06$, $7,33 \pm 0,69$ και $8,05 \pm 0,43$ αντίστοιχα.

	WT	F203A	F203K	F203I	F203W
-LogK_D or -LogK_i					
Tyr⁰-sauvagine	8.38 ± 0.20	6.95 ± 0.11*	8.51 ± 0.21	8.40 ± 0.16	8.40 ± 0.37
Astressin	8.02 ± 0.07	8.03 ± 0.18	8.02 ± 0.19	7.84 ± 0.18	7.74 ± 0.07
Antalarmin	7.62 ± 0.13	<5.00*	<5.00*	6.92 ± 0.15	9.54 ± 0.27*
-LogEC₅₀					
Sauvagine	9.90 ± 0.19	8.52 ± 0.23*	9.97 ± 0.23	9.79 ± 0.40	9.60 ± 0.06
Sauvagine+Astressin	8.72 ± 0.21 [#]	7.40 ± 0.21 [#]	6.96 ± 0.25 [#]	7.98 ± 0.30 [#]	8.05 ± 0.43 [#]
Sauvagine+Antalarmin	8.38 ± 0.35 [†]	8.00 ± 0.29	9.26 ± 0.93	6.74 ± 0.23 [†]	7.33 ± 0.69 [†]

Πίνακας 4.2: Επίδραση των μεταλλάξεων στη θέση 203 της TM3 του CRF₁R στις φαρμακολογικές ιδιότητές του.

Οι συγγένειες δέσμησης της Tyr⁰-σοβαγίνης (-LogK_D), της αστρεσσίνης (-LogK_i) ή της ανταλαρμίνης (-LogK_i) για τους WT, F203A, F203K, F203I και F203W όπως αυτές προσδιορίστηκαν σε μελέτες ομόλογης ή ετερόλογης συναγωνιστικής δέσμησης. Οι μέσοι όροι των τιμών (-LogK_D ή -LogK_i) και τα σταθερά σφάλματά (S.E) τους προέρχονται από 3-6 ανεξάρτητα πειράματα. Ο αστερίσκος δηλώνει ότι η συγγένεια δέσμησης της Tyr⁰-σοβαγίνης (-LogK_D) για τον υποδοχέα F203A διαφέρει στατιστικά σημαντικά από εκείνη για τον WT ($P < 0.05$; one way ANOVA). Ο αστερίσκος επίσης δηλώνει ότι η συγγένεια δέσμησης της ανταλαρμίνης (-LogK_i) για τους υποδοχείς F203A, F203K και F203W αντίστοιχα, διαφέρει στατιστικά σημαντικά από εκείνη για τον WT ($P < 0.05$; one way ANOVA).

Η ισχύς της σοβαγίνης (-LogEC₅₀) για τους WT, F203A, F203K, F203I, ή F203W προσδιορίστηκε με μελέτες μέτρησης ενδοκυττάρου cAMP χρησιμοποιώντας κύτταρα που εκφράζανε σταθερά τους υποδοχείς αυτούς απουσία ή παρουσία 0,3 μM αστρεσσίνης ή 1-2 μM ανταλαρμίνης. Οι μέσοι όροι των τιμών (-LogEC₅₀) και τα σταθερά σφάλματα (S.E) τους προέρχονται από 3-10 ανεξάρτητα πειράματα. Ο αστερίσκος δηλώνει ότι η ισχύς της σοβαγίνης για τον υποδοχέα F203A διαφέρει στατιστικά σημαντικά από εκείνη για τον WT ($P < 0.05$; one way ANOVA). Η δόση δηλώνει ότι η ισχύς της σοβαγίνης παρουσία αστρεσσίνης για τους υποδοχείς WT, F203A, F203K, F203I και F203W διαφέρει στατιστικά σημαντικά από εκείνη της σοβαγίνης απουσία ανταγωνιστή ($P < 0.05$; one way ANOVA). Ο σταυρός δηλώνει ότι η ισχύς της σοβαγίνης παρουσία ανταλαρμίνης για τους υποδοχείς WT, F203I και F203W διαφέρει στατιστικά σημαντικά από εκείνη της σοβαγίνης απουσία ανταγωνιστή ($P < 0.05$; one way ANOVA).

4.4 Ανάπτυξη και φαρμακολογικός χαρακτηρισμός μη πεπτιδικών μικρομοριακών αλλοστερικών ανταγωνιστών.

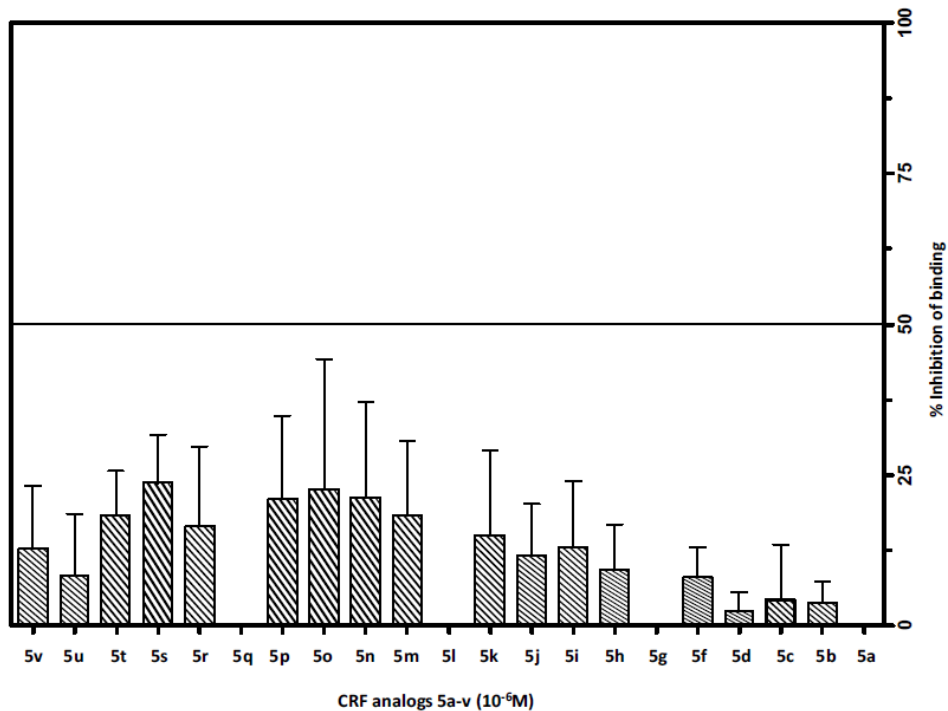
Σε συνεργασία με το εργαστήριο οργανικής σύνθεσης του Dr. Hesham Fahmy (Φαρμακευτικής Σχολή Πανεπιστημίου Ν. Ντακότας, Αμερική) πραγματοποιήθηκε ο σχεδιασμός, η σύνθεση, η ταυτοποίηση (με τεχνικές NMR και φασματοσκοπίας μάζας) και φαρμακολογικός χαρακτηρισμός μιας σειράς θειάζολο [4, 5-d] πυριμιδινών (ανάλογα 5a-5v) (Πίνακας 4.3) καθώς και μιας σειράς υποκατεστημένων πυριμιδινών (ανάλογα 1-28) (Πίνακας 4.4). Συγκεκριμένα στη παρούσα εργασία εξετάστηκαν φαρμακολογικά τα ανάλογα αυτά προσδιορίζοντας την ικανότητά τους να δεσμεύονται στον CRF₁R και να αναστέλλουν αλλοστερικά τη δέσμευση του ραδιοσημασμένου αγωνιστή [¹²⁵I]-Tyr⁰-σοβαγίνη.

4.4.1 Ανάλογα θειάζολο [4, 5-d] πυριμιδινών (ανάλογα 5a-5v)

<div style="display: flex; align-items: center; justify-content: space-between;"> <div style="text-align: center;"> </div> <div style="text-align: right;"> <p>Φαρμακοφόρο θειάζολο [4, 5-d] πυριμιδινών</p> </div> </div>						
Ανάλογο	R	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	X
5a	CH ₃	C ₃ H ₇	C ₃ H ₇	CN	CN	2,4,6-trimethyl
5b	CH ₃	C ₃ H ₇	C ₃ H ₇	CN	CO ₂ C ₂ H ₅	2,4,6-trimethyl
5c	CH ₃	C ₃ H ₇	C ₃ H ₇	CO ₂ C ₂ H ₅	CO ₂ C ₂ H ₅	2,4,6-trimethyl
5d	CH ₃	C ₂ H ₄ OCH ₃	C ₂ H ₄ OCH ₃	CN	CN	2,4,6-trimethyl
5e	CH ₃	C ₂ H ₄ OCH ₃	C ₂ H ₄ OCH ₃	CN	CO ₂ C ₂ H ₅	2,4,6-trimethyl
5f	CH ₃	C ₂ H ₅	C ₄ H ₉	CN	CN	2,4,6-trimethyl
5g	CH ₃	C ₂ H ₅	C ₄ H ₉	CN	CO ₂ C ₂ H ₅	2,4,6-trimethyl
5h	CH ₃	CH ₂ c-Pr	C ₃ H ₇	CN	CN	2,4,6-trimethyl
5i	CH ₃	CH ₂ c-Pr	C ₃ H ₇	CN	CO ₂ C ₂ H ₅	2,4,6-trimethyl
5j	CH ₃	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	CN	CN	2,4,6-trimethyl
5k	CH ₃	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	CN	CO ₂ C ₂ H ₅	2,4,6-trimethyl
5l	CH ₃	C ₃ H ₇	C ₃ H ₇	CN	CN	2-Br-4-sopropyl
5m	CH ₃	C ₃ H ₇	C ₃ H ₇	CN	CO ₂ C ₂ H ₅	2-Br-4-sopropyl
5n	CH ₃	C ₂ H ₄ OCH ₃	C ₂ H ₄ OCH ₃	CN	CN	2-Br-4-sopropyl
5o	CH ₃	C ₂ H ₄ OCH ₃	C ₂ H ₄ OCH ₃	CN	CO ₂ C ₂ H ₅	2-Br-4-sopropyl
5p	CH ₃	C ₂ H ₅	C ₄ H ₉	CN	CN	2-Br-4-sopropyl
5q	CH ₃	C ₂ H ₅	C ₄ H ₉	CN	CO ₂ C ₂ H ₅	2-Br-4-sopropyl
5r	CH ₃	C ₂ H ₅	C ₄ H ₉	CO ₂ C ₂ H ₅	CO ₂ C ₂ H ₅	2-Br-4-sopropyl
5s	CH ₃	CH ₂ c-Pr	C ₃ H ₇	CN	CN	2-Br-4-sopropyl
5t	CH ₃	CH ₂ c-Pr	C ₃ H ₇	CO ₂ C ₂ H ₅	CO ₂ C ₂ H ₅	2-Br-4-sopropyl
5u	CH ₃	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	CN	CN	2-Br-4-sopropyl
5v	CH ₃	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	CO ₂ C ₂ H ₅	CO ₂ C ₂ H ₅	2-Br-4-sopropyl

Πίνακας 4.3: Φαρμακοφόρο των θειάζολο [4, 5-d] πυριμιδινών (3-αρυλ-7-(N,N-διαλκυλαμινο)-5-μεθυλθειαζολο [4, 5-d] πυριμιδιν-2(3H)-υλιδίνες) που εξετάστηκαν στην παρούσα εργασία παρουσιάζονται στον παραπάνω πίνακα. Οι υποκαταστάσεις έγιναν στις ομάδες R, R₁, R₂, R₃ και X του φαρμακοφόρου, δημιουργώντας τα ανάλογα 5a-5v.

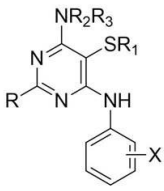
Πριν χαρακτηρίσουμε φαρμακολογικά τα ανάλογα των θειάζολο [4, 5-d] πυριμιδινών (5a-5v) προσδιορίσαμε την ικανότητα του καθενός από αυτά, στη συγκέντρωση του 1 μM, να αναστέλλει την ειδική δέσμευση της [¹²⁵I]-Tyr⁰-σοβαγίνης στον CRF₁R. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 73 κανένα από τα εξεταζόμενα ανάλογα δεν μπόρεσε να αναστείλλει την ειδική δέσμευση της [¹²⁵I]-Tyr⁰-σοβαγίνης περισσότερο από 50%. Η έλλειψη ικανότητας των αναλόγων αυτών να αναστέλλουν την δέσμευση της [¹²⁵I]-Tyr⁰-σοβαγίνης και άρα ο πολύ μικρός βαθμός δέσμευσης τους στον CRF₁R αποκλείει τον περαιτέρω φαρμακολογικό χαρακτηρισμό τους.



Εικόνα 4.73. Προσδιορισμός της ικανότητας των αναλόγων 5a-5v να δεσμεύονται στον CRF₁R.

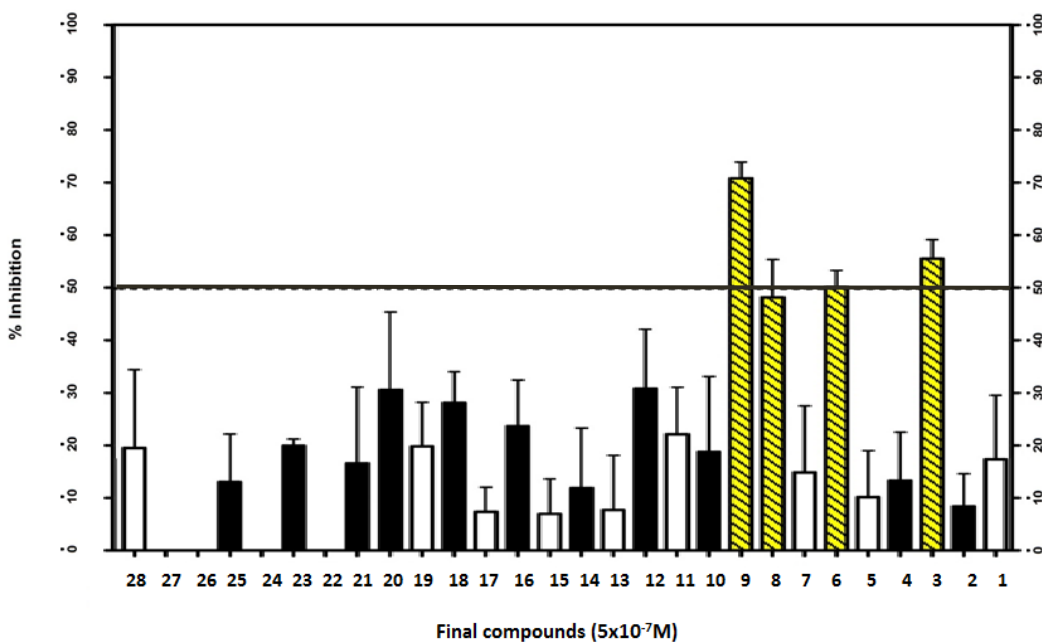
Ο προσδιορισμός της ικανότητας των αναλόγων 5a-5v να δεσμεύονται στον CRF₁R πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στα «Υλικά και Μέθοδοι» με βάση την αναστολή της δέσμευσης της [¹²⁵I]-Tyr⁰-σοβαγίνης στον υποδοχέα αυτόν από 1 μM των υπό εξέταση αναλόγων. Οι στήλες αναπαριστούν τους μέσους όρους και τα σταθερά σφάλματα της % αναστολής της ειδικής δέσμευσης της [¹²⁵I]-Tyr⁰-σοβαγίνης από τα ανάλογα 5a-5v όπως αυτή προσδιορίστηκε από 2-5 ανεξάρτητα πειράματα. Η οριζόντια γραμμή αναπαριστά την 50% αναστολή της ειδικής δέσμευσης του ραδιοσημασμένου αγωνιστή.

4.4.2 Ανάλογα πυριμιδινών (ανάλογα 1-28).

<div style="display: flex; align-items: center; justify-content: center;">  <div style="margin-left: 20px;">Φαρμακοφόρο πυριμιδινών</div> </div>					
Τελικά ανάλογα	R	R ₁	R ₂	R ₃	X
1	CH ₃	CH ₃	C ₃ H ₇	C ₃ H ₇	2,4,6-triCH ₃
2	CH ₃	CH ₃	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	2,4,6-triCH ₃
3	CH ₃	CH ₃	C ₂ H ₄ OCH ₃	C ₂ H ₄ OCH ₃	2,4,6-triCH ₃
4	CH ₃	CH ₃	c-PropylCH ₂	C ₃ H ₇	2,4,6-triCH ₃
5	CH ₃	CH ₃	C ₂ H ₅	C ₄ H ₉	2,4,6-triCH ₃
6	CH ₃	C ₂ H ₅	C ₃ H ₇	C ₃ H ₇	2,4,6-triCH ₃
7	CH ₃	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	2,4,6-triCH ₃
8	CH ₃	C ₂ H ₅	C ₂ H ₄ OCH ₃	C ₂ H ₄ OCH ₃	2,4,6-triCH ₃
9	CH ₃	C ₂ H ₅	c-PropylCH ₂	C ₃ H ₇	2,4,6-triCH ₃
10	CH ₃	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	C ₄ H ₉	2,4,6-triCH ₃
11	CH ₃	CH ₃	C ₃ H ₇	C ₃ H ₇	2-Br-4-CH(CH ₃) ₂
12	CH ₃	CH ₃	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	2-Br-4-CH(CH ₃) ₂
13	CH ₃	CH ₃	C ₂ H ₄ OCH ₃	C ₂ H ₄ OCH ₃	2-Br-4-CH(CH ₃) ₂
14	CH ₃	CH ₃	c-PropylCH ₂	C ₃ H ₇	2-Br-4-CH(CH ₃) ₂
15	CH ₃	CH ₃	C ₂ H ₅	C ₄ H ₉	2-Br-4-CH(CH ₃) ₂
16	CH ₃	C ₂ H ₅	C ₃ H ₇	C ₃ H ₇	2-Br-4-CH(CH ₃) ₂
17	CH ₃	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	2-Br-4-CH(CH ₃) ₂
18	CH ₃	C ₂ H ₅	C ₂ H ₄ OCH ₃	C ₂ H ₄ OCH ₃	2-Br-4-CH(CH ₃) ₂
19	CH ₃	C ₂ H ₅	c-PropylCH ₂	C ₃ H ₇	2-Br-4-CH(CH ₃) ₂
20	CH ₃	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	C ₄ H ₉	2-Br-4-CH(CH ₃) ₂
21	H	CH ₃	C ₃ H ₇	C ₃ H ₇	2,4,6-triCH ₃
22	H	CH ₃	C ₂ H ₄ OCH ₃	C ₂ H ₄ OCH ₃	2,4,6-triCH ₃
23	H	CH ₃	c-PropylCH ₂	C ₃ H ₇	2,4,6-triCH ₃
24	H	CH ₃	C ₂ H ₅	C ₄ H ₉	2,4,6-triCH ₃
25	H	C ₂ H ₅	C ₃ H ₇	C ₃ H ₇	2,4,6-triCH ₃
26	H	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	2,4,6-triCH ₃
27	H	C ₂ H ₅	C ₂ H ₄ OCH ₃	C ₂ H ₄ OCH ₃	2,4,6-triCH ₃
28	H	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	C ₄ H ₉	2,4,6-triCH ₃

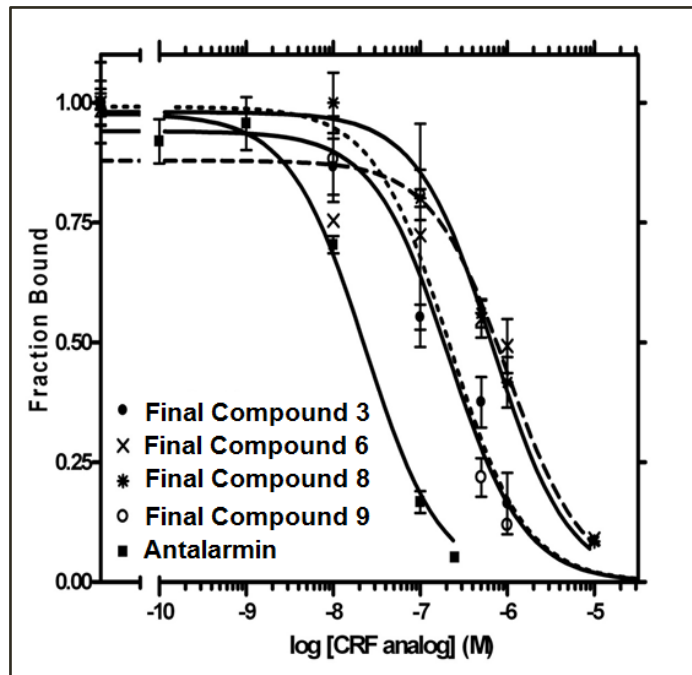
Πίνακας 4.4: Φαρμακοφόρο των πυριμιδινών (5-αλκυλθειο-6-N, N-διαλκυλ-αμινο-4-υποκατεστημένες φαινυλ-αμινο-πυριμιδίνες) που εξετάστηκαν στη παρούσα εργασία. Οι υποκαταστάσεις έγιναν στις ομάδες R, R₁, R₂, R₃ και X του φαρμακοφόρου, δημιουργώντας τα ανάλογα 1-28.

Πριν χαρακτηρίσουμε φαρμακολογικά τα ανάλογα των πυριμιδινών (1-28) προσδιορίσαμε την ικανότητα του καθενός από αυτά, στη συγκέντρωση του 0,5 μM , να αναστέλλει την ειδική δέσμευση της [^{125}I]-Tyr⁰-σοβαγίνης στον CRF₁R. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 4.74 από τα εξεταζόμενα ανάλογα, μόνο τα 3, 6, 8 και 9 μπόρεσαν να αναστείλλουν την ειδική δέσμευση της [^{125}I]-Tyr⁰-σοβαγίνης ίσο ή περισσότερο από 50%.



Εικόνα 4.74: Προσδιορισμός της ικανότητας των αναλόγων 1-28 να δεσμεύονται στον CRF₁R. Ο προσδιορισμός της ικανότητας των αναλόγων 1-28 να δεσμεύονται στον CRF₁R πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στα «Υλικά και Μέθοδοι» με βάση την αναστολή της δέσμευσης της [^{125}I]-Tyr⁰-σοβαγίνης στον υποδοχέα αυτόν από 0,5 μM των υπό εξέταση αναλόγων. Οι στήλες αναπαριστούν τους μέσους όρους και τα σταθερά σφάλματα της % αναστολής της ειδικής δέσμευσης της [^{125}I]-Tyr⁰-σοβαγίνης από τα ανάλογα 1-28 όπως αυτή προσδιορίστηκε από 2-5 ανεξάρτητα πειράματα. Η οριζόντια γραμμή αναπαριστά την 50% αναστολή της ειδικής δέσμευσης του ραδιοσημασμένου αγωνιστή. Οι κίτρινες στήλες αντιστοιχούν στα ανάλογα 3, 6, 8 και 9 που ανέστειλλαν ίσο ή περισσότερο από το 50% την ειδική δέσμευση της [^{125}I]-Tyr⁰-σοβαγίνης.

Η έλλειψη ικανότητας των υπολοίπων αναλόγων (1, 2, 4, 5, 7, 10-28) να αναστείλλουν την δέσμευση της $[^{125}\text{I}]\text{-Tyr}^0\text{-σοβαγίνης}$ περισσότερο από 50% και άρα ο πολύ μικρός βαθμός δέσμευσης τους στον CRF_1R τα απέκλεισε από περαιτέρω φαρμακολογικό χαρακτηρισμό τους. Αντίθετα τα ανάλογα 3, 6, 8 και 9 χαρακτηρίστηκαν φαρμακολογικά προσδιορίζοντας τις τιμές $-\text{LogIC}_{50}$ για τον CRF_1R σε μελέτες ετερόλογης συναγωνιστικής δέσμευσης. Οι τιμές $-\text{LogIC}_{50}$ που προσδιορίστηκαν κάτω από τις πειραματικές συνθήκες της παρούσας εργασίας συμβαδίζουν με εκείνες των $-\text{LogK}_i$ δηλαδή τις συγγένειες δέσμευσης των προσδετών στον CRF_1R . Συγκεκριμένα, οι τιμές $-\text{LogIC}_{50}$ των αναλόγων 3, 6, 8 και 9 καθώς και της ανταλαρμίνης, που χρησιμοποιήθηκε ως ουσία αναφοράς ήταν $6,56 \pm 0,12$, $6,27 \pm 0,26$, $6,23 \pm 0,06$, $6,61 \pm 0,06$ και $7,62 \pm 0,13$ αντίστοιχα (Εικόνα 4.75).



Εικόνα 4.75: Συναγωνιστική δέσμευση των αναλόγων 3, 6, 8 και 9 στον CRF_1R .

Ο συναγωνισμός της δέσμευσης της $[^{125}\text{I}]\text{-Tyr}^0\text{-σοβαγίνης}$ από τα ανάλογα 3, 6, 8 και 9 καθώς και της ανταλαρμίνης (ουσία αναφοράς) για τον CRF_1R πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στα «Υλικά και Μέθοδοι». Οι μέσοι όροι (εις διπλούν) και τα σταθερά σφάλματα προέρχονται από ένα χαρακτηριστικό πείραμα που έγινε 2 φορές δίνοντας παρόμοια αποτελέσματα. Οι τιμές $-\text{LogIC}_{50}$ της ανταλαρμίνης και των αναλόγων 3, 6, 8 και 9 που προσδιορίστηκαν από αυτά τα πειράματα για τον CRF_1R ήταν $7,62 \pm 0,13$, $6,56 \pm 0,12$, $6,27 \pm 0,26$, $6,23 \pm 0,06$ και $6,61 \pm 0,06$ αντίστοιχα.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

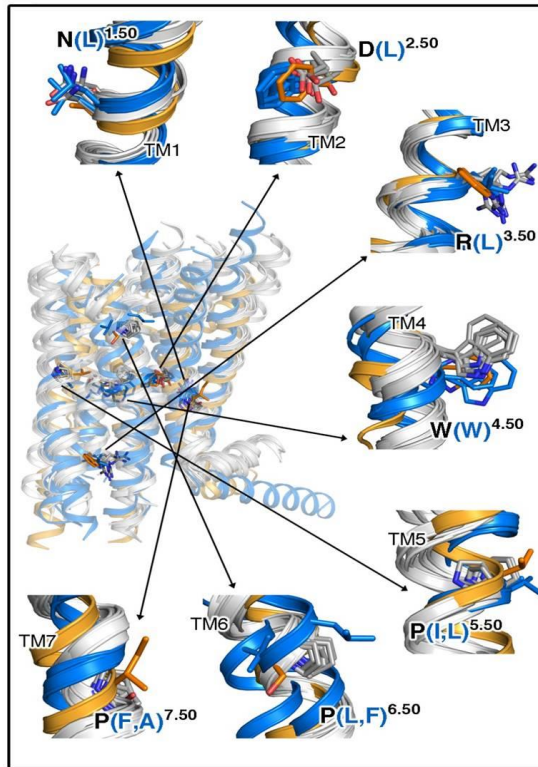
Ο CRF₁R ανήκει στην οικογένεια Β των υποδοχέων που συζευγνύονται με τις G πρωτεΐνες (GPCRs) (83). Όπως όλοι οι GPCRs, έτσι και ο CRF₁R αποτελείται από επτά διαμεμβρανικές περιοχές (TMs). Από αυτές η τρίτη TM (TM3) παίζει σημαντικό δομικό-λειτουργικό ρόλο σε πλήθος υποδοχέων, δεσμεύοντας διάφορους προσδέτες και συμβάλλοντας στους μηχανισμούς ενεργοποίησής τους, αλληλεπιδρώντας με αμινοξέα άλλων TMs και με τις G-πρωτεΐνες (247). Η σύγκριση των TM3 των GPCRs με εκείνη του CRF₁R μας οδήγησε στην υπόθεση ότι η TM3 του CRF₁R κατέχει τέτοια θέση στο χώρο που μπορεί να επιτρέψει τη δημιουργία αλληλεπιδράσεων μεταξύ των αμινοξέων της με μικρομοριακά μη πεπτιδικά CRF ανάλογα, καθώς και με αμινοξέα άλλων TMs αλλά και με τις G-πρωτεΐνες. Η παρούσα ερευνητική εργασία επαλήθευσε την υπόθεση αυτή 1) λαμβάνοντας πληροφορίες για τη δομή της TM3 του CRF₁R, 2) προσδιορίζοντας το ρόλο της TM3 στην ενεργοποίηση του υποδοχέα, 3) προσδιορίζοντας τα αμινοξέα της TM3 που αλληλεπιδρούν με μικρομοριακούς μη πεπτιδικούς αλλοστερικούς CRF ανταγωνιστές και το ρόλο των αλληλεπιδράσεων αυτών στη ενεργοποίηση του υποδοχέα. Επίσης στη παρούσα εργασία χαρακτηρίστηκαν φαρμακολογικά νέα μη πεπτιδικά μικρομοριακά ανάλογα του CRF, τα οποία σχεδιάστηκαν και συντέθηκαν στο εργαστήριο Οργανικής Σύνθεσης του συνεργάτη μας Dr. Fahmy Hesham.

5.1 Λήψη δομικών πληροφοριών για τη τρίτη διαμεμβρανική περιοχή (TM3) του CRF₁R

5.1.1 Αρίθμηση αμινοξέων διαμεμβρανικών περιοχών

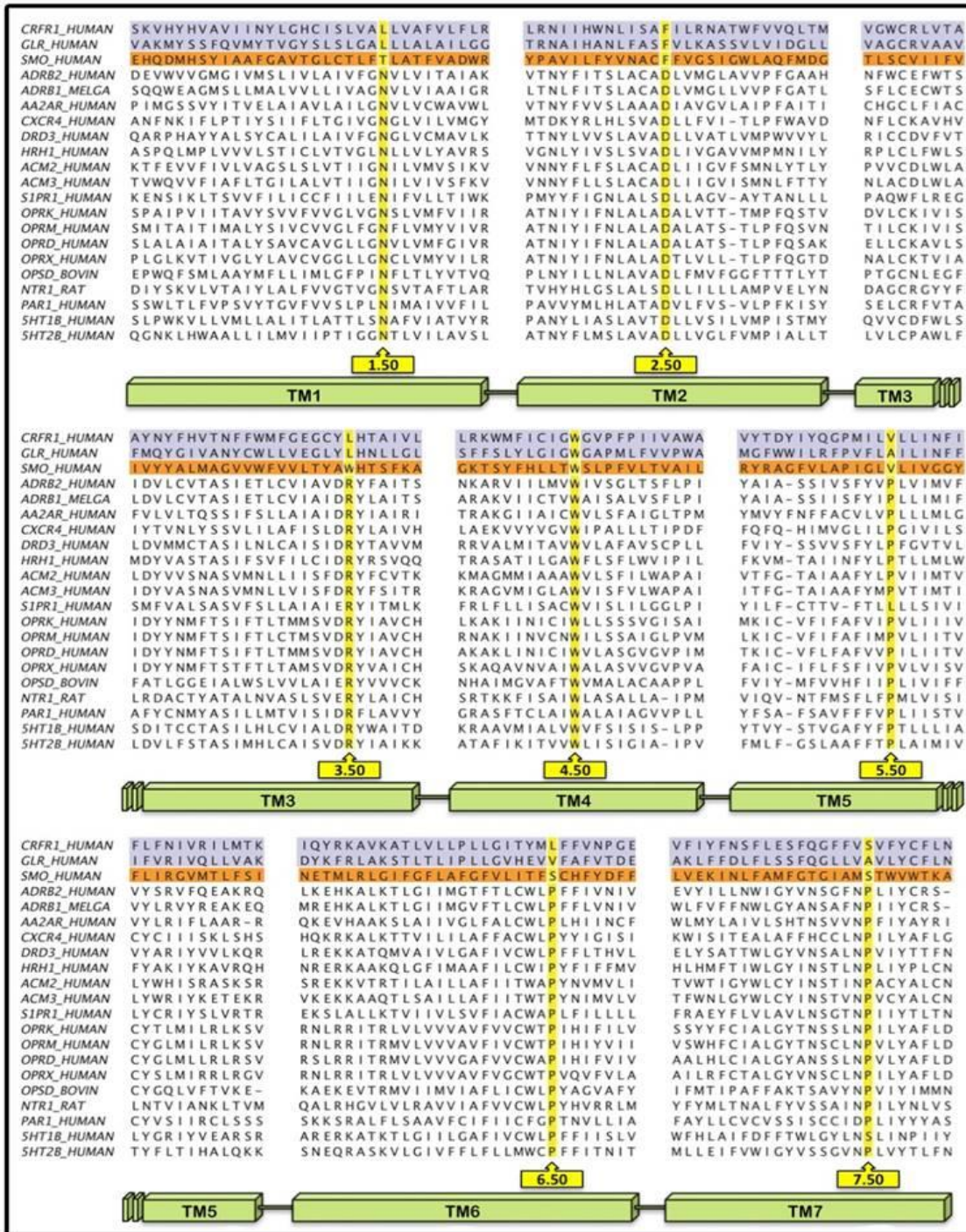
Πριν την εκτέλεση των πειραμάτων αριθμήσαμε για πρώτη φορά (σε συνεργασία με τους Dr. Pardo Leonardo, Εργαστήριο Υπολογιστικής Ιατρικής, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Βαρκελώνης, Ισπανία και Δρ. Ματσούκα Μίνω, Εργαστήριο Μοριακού Σχεδιασμού και βιομοριακού NMR, Φαρμακευτική Σχολή, Πανεπιστήμιο Πατρών), τα TM αμινοξέα των υποδοχέων της οικογένειας Β των GPCRs, με τέτοιο τρόπο που να επιτρέπει τη σύγκρισή τους με αυτά των υποδοχέων της οικογένειας Α. Μέχρι πρόσφατα η αρίθμηση που είχε δοθεί για τα TM αμινοξέα των υποδοχέων της οικογένειας Α ή της οικογένειας Β των GPCRs χρησιμοποίησε ως βάση τα διατηρημένα αμινοξέα των υποδοχέων της κάθε οικογένειας, χωρίς όμως να μπορεί να συγκρίνει αμινοξέα διαφορετικών οικογενειών μεταξύ τους (232,238). Συγκεκριμένα η αρίθμηση κατά Ballesteros και Weinstein, εισάγει δεξιά σε κάθε αμινοξύ των TMs της οικογένειας Α των GPCRs τον εκθέτη, $X.(50\pm Y)$. Το γράμμα X συμβολίζει τη TM στην οποία ανήκει το εν λόγω αμινοξύ, ο αριθμός 50 συμβολίζει το καθολικά διατηρημένο αμινοξύ σε κάθε TM και ο αριθμός Y συμβολίζει τη θέση του αμινοξέος σε μια TM ως προς εκείνη του καθολικά διατηρημένου αμινοξέος στη TM αυτή. Για παράδειγμα τα αμινοξέα αμέσως πριν και μετά το X.50 αριθμούνται ως X.49 και X.51 αντίστοιχα (232). Αντίστοιχη αρίθμηση των αμινοξέων των υποδοχέων της οικογένειας Β έγινε από τον Wootten (238).

Στη παρούσα εργασία η αρίθμηση των αμινοξέων των υποδοχέων της οικογένειας Β βασίστηκε στη αντιστοίχιση (δομική αντιστοίχιση) των υπαρχόντων μέχρι σήμερα κρυσταλλικών δομών υποδοχέων από διαφορετικές οικογένειες των GPCRs στην ανενεργή τους κατάσταση (Εικόνα 5.1).

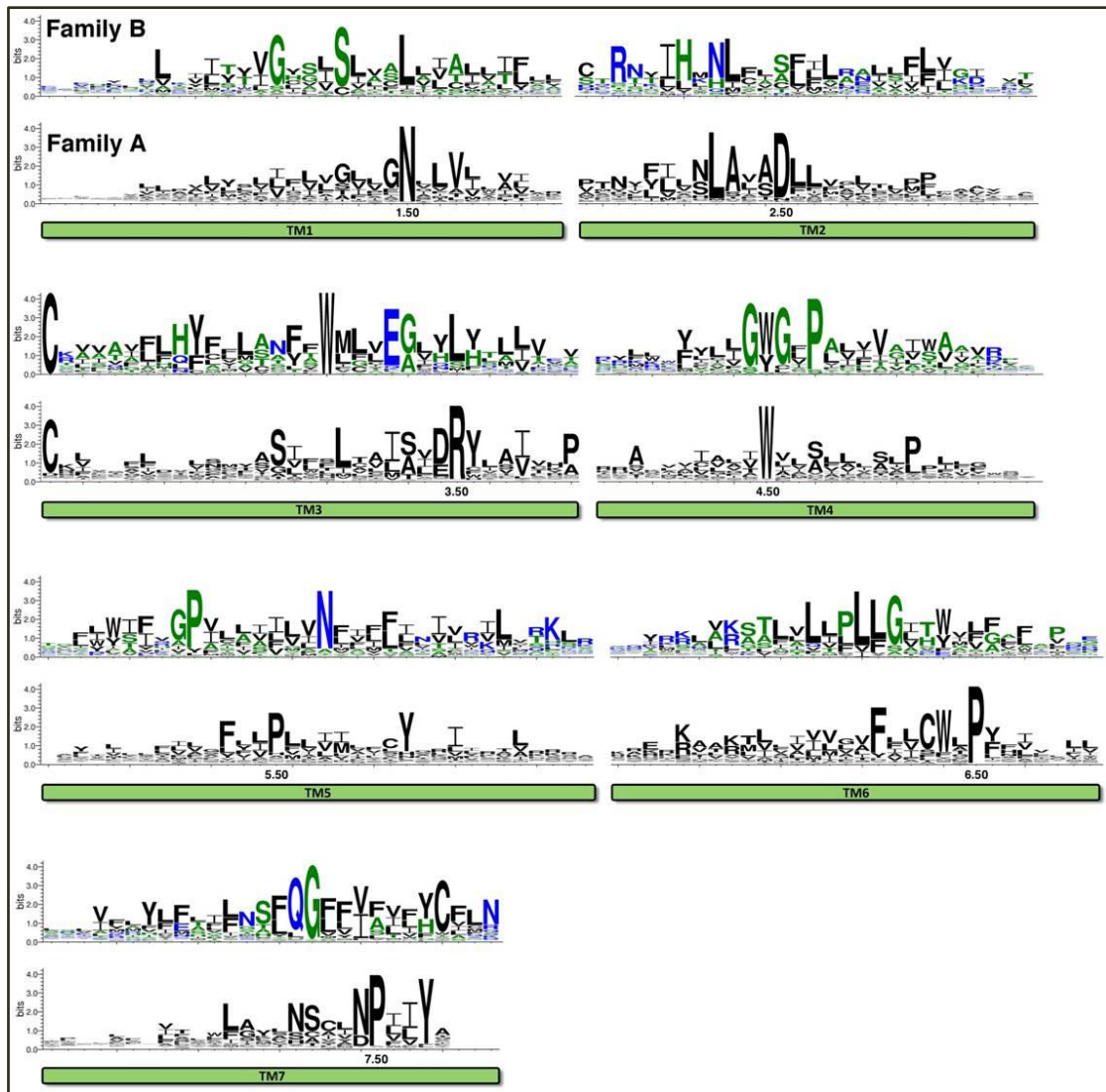


Εικόνα 5.1: Δομική αντιστοίχιση κρυσταλλικών δομών GPCRs διαφορετικών οικογενειών στην ανενεργή κατάστασή τους. Οι δομές των TMs των υποδοχέων των οικογενειών A, B και *smoothened* αναπαριστώνται με λευκό, μπλε και κίτρινο χρώμα αντίστοιχα. Τα διατηρημένα αμινοξέα των TMs που χρησιμοποίησαν οι Ballesteros and Weinstein στην αρίθμησή τους για τους υποδοχείς της οικογένειας A αναπαριστώνται με γκρι πλευρικές αλυσίδες (232). Τα ομόλογα αμινοξέα με αυτά της οικογένειας A για τους υποδοχείς της οικογένειας *smoothened* και B αναπαριστώνται με πορτοκαλί και μπλε πλευρικές αλυσίδες αντίστοιχα.

Συγκεκριμένα, με βάση την αντιστοίχιση όλων των κρυσταλλικών δομών των GPCRs αλληλούχισαμε τα TM αμινοξέα τους (Εικόνα 5.2). Στην αλληλούχιση αυτή τα διατηρημένα αμινοξέα (X.50) των υποδοχέων της οικογένειας A που χρησιμοποιήθηκαν στην αρίθμηση των Ballesteros και Weinstein αποτέλεσαν μέτρο σύγκρισης για να καθοριστεί ένας γενικός τρόπος αρίθμησης για τους υποδοχείς των οικογενειών A και B (232). Η αλληλούχιση αυτή αποκάλυψε τη διατήρηση αμινοξέων σε δομικά ομόλογες θέσεις ανάμεσα στους υποδοχείς των οικογενειών A και B (Εικόνα 5.3).



Εικόνα 5.2: Αλληλούχηση αμινοξέων ανάμεσα στους GPCRs με βάση τη δομική αντιστοιχία των κρυσταλλικών δομών τους.



Εικόνα 5.3: Διατήρηση αμινοξέων των TM1-TM7 ανάμεσα στις οικογένειες A και B των GPCRs.

5.1.2 Εφαρμογή της μεθόδου διαθεσιμότητας υποκατεστημένων κυστεϊνών (SCAM) για λήψη δομικών πληροφοριών

Με σκοπό να λάβουμε δομικές πληροφορίες για την TM3 του CRF₁R προσδιορίσαμε τον προσανατολισμό των αμινοξέων της TM3. Συγκεκριμένα προσδιορίσαμε ποια αμινοξέα έχουν προσανατολισμένες τις πλευρικές τους αλυσίδες στην κοιλότητα θέσεων δέσμησης του CRF₁R και έτσι είναι διαθέσιμες για πιθανή αντίδραση με διάφορα μόρια του εξωκυττάριου υγρού. Για το σκοπό αυτό μεταλλάξαμε τα αμινοξέα της TM3 του CRF₁R, ένα τη κάθε φορά, σε

Cys (τεχνητές κυστεΐνες) και προσδιορίσαμε τις διαθεσιμότητές τους για αντίδραση με το θετικά φορτισμένο μεθυλοθειοσουλφονικό αιθυλαμμώνιο (MTSEA), εφαρμόζοντας τη μέθοδο SCAM (251-253). Η μέθοδος SCAM βασίζεται στην ικανότητα του MTSEA, να αντιδρά με την ελεύθερη σουλφυδρυλική ομάδα της πλευρικής αλυσίδας μιας Cys που βρίσκεται πάνω στην επιφάνεια της κοιλότητας δέσμησης ενός υποδοχέα αλλά όχι εκείνης που έχει προσανατολισμένη τη πλευρική αλυσίδα της στο υδρόφοβο περιβάλλον της λιπιδικής διπλοστιβάδας της πλασματικής μεμβράνης ή εκείνης που συμμετέχει σε δισουλφιδικό δεσμό (229,251,252).

Η μέθοδος SCAM περιλαμβάνει εν συντομία τα εξής στάδια: 1) μετάλλαξη, ενός τη κάθε φορά, των αμινοξέων της TM3 σε Cys (τεχνητή Cys), δημιουργώντας έτσι σειρά Cys-μεταλλαγμένων υποδοχέων, 2) ετερόλογη έκφραση των Cys-μεταλλαγμένων υποδοχέων σε κύτταρα και 3) χημική τροποποίηση των Cys-μεταλλαγμένων υποδοχέων με την μη αντιστρεπτή αντίδραση τους με το MTSEA.

Η ανίχνευση της αντίδρασης αυτής βασίζεται στην ικανότητα του MTSEA να τροποποιεί μη αντιστρεπτά τη δέσμηση της ραδιοσημασμένης Tyr⁰-σοβαγίνης ([¹²⁵I]-Tyr⁰-σοβαγίνη) στον Cys-μεταλλαγμένο υποδοχέα. Τροποποίηση της δέσμησης οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το MTSEA αντέδρασε με τη σουλφυδρυλική ομάδα της τεχνητής Cys, σχηματίζοντας δισουλφιδικό δεσμό με αυτή και ότι η τεχνητή Cys και κατά συνέπεια το αμινοξύ του άγριου τύπου υποδοχέα το οποίο αντικατέστησε η Cys αυτή, βρίσκεται πάνω στην επιφάνεια της κοιλότητας θέσεων δέσμησης του υποδοχέα και είναι προσανατολισμένο στο εξωκυττάριο υδατικό περιβάλλον. Η πιθανότητα ο προσανατολισμός της πλευρικής αλυσίδας μιας τεχνητής Cys να είναι παρόμοιος με εκείνον του αμινοξέος του άγριου τύπου που την αντικατέστησε είναι πολύ μεγάλη όταν οι λειτουργικές ιδιότητες του άγριου τύπου υποδοχέα και της Cys-μεταλλαγμένης μορφής του είναι παρόμοιες. Αυτό διαπιστώνεται πριν την εφαρμογή της μεθόδου SCAM, με τον προσδιορισμό της επίδρασης της Cys μετάλλαξης ενός αμινοξέος του υποδοχέα, στη δέσμηση κάποιου ραδιοσημασμένου προσδέτη στον εν λόγω υποδοχέα.

Στις μελέτες μας προσδιορίσαμε τον προσανατολισμό των αμινοξέων της TM3 του μεταλλαγμένου CRF₁R, ΔCys. Χρησιμοποιήσαμε τον ΔCys γιατί, σε αντίθεση με τον άγριο τύπο CRF₁R (WT), ο υποδοχέας αυτός δεν αντιδρά με το MTSEA (αντίδραση με 2,5 mM MTSEA, για 15 δευτερόλεπτα σε θερμοκρασία δωματίου), αφού οι πέντε ελεύθερες ενδογενείς Cys του

WT που θα μπορούσαν να αντιδράσουν με το MTSEA έχουν αντικατασταθεί από σερίνες (Ser ή S) στον ΔCys (229). Επιπρόσθετα ο ΔCys έχει παρόμοιες φαρμακολογικές ιδιότητες και άρα δομή με τον WT. Στη παρούσα εργασία μεταλλάξαμε σε Cys, ένα τη κάθε φορά, τα TM3 αμινοξέα του ΔCys από τη θέση 189^{3.26} έως τη θέση 210^{3.47}, δημιουργώντας έτσι 22 Cys-μεταλλαγμένους υποδοχείς, τους ΔCys+R189^{3.26}C έως ΔCys+G210^{3.47}C και τις αντίστοιχες κυτταρικές σειρές που έκφραζαν αυτούς μόνιμα. Το αμινοξύ στη θέση 211^{3.48} της TM3 είναι μια από τις ενδογενείς Cys του WT, CRF₁R και έχει μεταλλαχθεί σε σερίνη κατά τη δημιουργία του «αδρανή» στο MTSEA, ΔCys υποδοχέα.

Ανάμεσα στις 22 τεχνητές Cys της TM3 του ΔCys CRF₁R που εξετάστηκαν στη παρούσα εργασία, μόνο εκείνες στις θέσεις 189^{3.26}, 192^{3.29}, 193^{3.30}, 195^{3.32}, 196^{3.33}, 199^{3.36} και 203^{3.40} αντέδρασαν με το MTSEA.

5.1.2.1 Αντίδραση του MTSEA με τους υποδοχείς ΔCys+R189^{3.26}C, ΔCys+T192^{3.29}C, ΔCys+A193^{3.30}C, ΔCys+Y195^{3.32}C, ΔCys+N196^{3.33}C και ΔCys+H199^{3.36}C

Οι τεχνητές Cys της TM3 του ΔCys CRF₁R στις θέσεις 189^{3.26}, 192^{3.29}, 193^{3.30}, 195^{3.32}, 196^{3.33} και 199^{3.36} αντέδρασαν με το MTSEA, αφού η αντίδρασή του με τους υποδοχείς που τις περιέχουν τροποποίησε σημαντικά την ειδική δέσμευση της [¹²⁵I]-Tyr⁰-σοβαγίνης σε αυτούς. Συγκεκριμένα η αντίδραση του MTSEA με τους ΔCys+R189^{3.26}C, ΔCys+T192^{3.29}C, ΔCys+A193^{3.30}C, ΔCys+Y195^{3.32}C, ΔCys+N196^{3.33}C και ΔCys+H199^{3.36}C μείωσε σημαντικά τη δέσμευση της [¹²⁵I]-Tyr⁰-σοβαγίνης. Το αποτέλεσμα αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι οι τεχνητές Cys στις θέσεις 189^{3.26}, 192^{3.29}, 193^{3.30}, 195^{3.32}, 196^{3.33}, 199^{3.36} έχουν τις πλευρικές τους αλυσίδες προσανατολισμένες προς την κοιλότητα θέσεων δέσμευσης των Cys-μεταλλαγμένων υποδοχέων που τις περιέχουν και έτσι είναι διαθέσιμες για αντίδραση με το MTSEA. Αν συμβαίνει αυτό τότε η παρουσία κάποιου προσδέτη στη κοιλότητα θέσεων δέσμευσης του υποδοχέα πριν την αντίδραση θα προστάτευε τις τεχνητές Cys από το MTSEA (251,252). Πράγματι, προεπώαση των ΔCys+T192^{3.29}C, ΔCys+A193^{3.30}C, ΔCys+Y195^{3.32}C, ΔCys+N196^{3.33}C, ΔCys+H199^{3.36}C, αλλά όχι του ΔCys+R189^{3.26}C, με τον ανταγωνιστή ανταλαρμίνη επιβράδυνε ή και κατήργησε την αντίδραση τους με το MTSEA. Η ανταλαρμίνη ανήκει στην οικογένεια των μικρομοριακών μη πεπτιδικών ανταγωνιστών του CRF₁R, οι οποίοι έχει δειχθεί ότι δεσμεύονται βαθειά στις διαμεμβρανικές περιοχές του υποδοχέα (207). Η προστασία από την

αντίδραση μπορεί να οφείλεται είτε σε στερεοχημική παρεμπόδιση του MTSEA από την ανταλαρμίνη ή σε δομική αλλαγή σχετιζόμενη με τη δέσμευση της ανταλαρμίνης. Στην περίπτωση του υποδοχέα $\Delta\text{Cys}+\text{R189}^{3.26}\text{C}$, η ανταλαρμίνη δεν μπόρεσε να τον προστατέψει από το MTSEA. Μια πιθανή εξήγηση θα μπορούσε να ήταν ότι το $\text{R189}^{3.26}$ βρίσκεται στα όρια εξωκυττάριου βρόγχου (EL1)-διαμεμβρανικής περιοχής (TM3), με την πλευρική αλυσίδα του προσανατολισμένη στο εξωκυττάριο περιβάλλον και συνεχώς διαθέσιμη για αντίδραση με το MTSEA ανεξάρτητα των δομικών αλλαγών του υποδοχέα που σχετίζονται με τη δέσμευση της ανταλαρμίνης.

5.1.2.2 Μηχανισμός αντίδρασης του MTSEA με τις τεχνητές Cys, $\text{C189}^{3.26}$, $\text{C192}^{3.29}$, $\text{C193}^{3.30}$, $\text{C195}^{3.32}$, $\text{C196}^{3.33}$ και $\text{C199}^{3.36}$

Προκειμένου να μελετήσουμε τον μηχανισμό τροποποίησης της δέσμευσης της $[\text{}^{125}\text{I}]\text{-Tyr}^0\text{-σοβαγίνης}$ στους $\Delta\text{Cys}+\text{R189}^{3.26}\text{C}$, $\Delta\text{Cys}+\text{T192}^{3.29}\text{C}$, $\Delta\text{Cys}+\text{A193}^{3.30}\text{C}$, $\Delta\text{Cys}+\text{Y195}^{3.32}\text{C}$, $\Delta\text{Cys}+\text{N196}^{3.33}\text{C}$ και $\Delta\text{Cys}+\text{H199}^{3.36}\text{C}$ μετά την αντίδρασή τους με το MTSEA προσδιορίσαμε τη συγγένεια δέσμευσης της $\text{Tyr}^0\text{-σοβαγίνης}$ πριν και μετά την αντίδραση. Όπως φαίνεται στα αποτελέσματα η συγγένεια δέσμευσης της $\text{Tyr}^0\text{-σοβαγίνης}$ για τους Cys-μεταλλαγμένους υποδοχείς $\Delta\text{Cys}+\text{R189}^{3.26}\text{C}$, $\Delta\text{Cys}+\text{T192}^{3.29}\text{C}$, $\Delta\text{Cys}+\text{A193}^{3.30}\text{C}$, $\Delta\text{Cys}+\text{Y195}^{3.32}\text{C}$, $\Delta\text{Cys}+\text{N196}^{3.33}\text{C}$ και $\Delta\text{Cys}+\text{H199}^{3.36}\text{C}$ δεν επηρεάστηκε από την αντίδρασή τους με το MTSEA. Βάσει αυτού συμπεραίνουμε ότι η ελάττωση της δέσμευσης της $[\text{}^{125}\text{I}]\text{-Tyr}^0\text{-σοβαγίνης}$ από το MTSEA δεν οφείλεται σε ελάττωση της συγγένειας δέσμευσης του ραδιοσημασμένου αγωνιστή για αυτούς.

5.1.2.3 Προσανατολισμός των αμινοξέων της TM3 στις θέσεις $\text{189}^{3.26}$, $\text{192}^{3.29}$, $\text{193}^{3.30}$, $\text{195}^{3.32}$, $\text{196}^{3.33}$ και $\text{199}^{3.36}$ του CRF_1R

Οι μεταλλάξεις $\text{R189}^{3.26}\text{C}$, $\text{T192}^{3.29}\text{C}$, $\text{A193}^{3.30}\text{C}$, $\text{Y195}^{3.32}\text{C}$, $\text{N196}^{3.33}\text{C}$ και $\text{H199}^{3.36}\text{C}$ δεν επηρέασαν σημαντικά τη συγγένεια δέσμευσης της $\text{Tyr}^0\text{-σοβαγίνης}$ για τον $\Delta\text{Cys CRF}_1\text{R}$ και επομένως την στερεοδιαμόρφωση του υποδοχέα. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με το ότι οι ΔCys και WT υποδοχείς έχουν παρόμοιες λειτουργικές και άρα δομικές ιδιότητες μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι όπως οι τεχνητές Cys έτσι και τα αμινοξέα που αυτές αντικατέστησαν,

δηλαδή τα R189^{3.26}, T192^{3.29}, A193^{3.30}, Y195^{3.32}, N196^{3.33} και H199^{3.36} των ΔCys και WT, έχουν τις πλευρικές τους αλυσίδες προσανατολισμένες προς την κοιλότητα θέσεων δέσμησης του CRF₁R. Παρόμοια, οι περισσότερες Cys-μεταλλάξεις των υπόλοιπων αμινοξέων της TM3 του CRF₁R δεν επηρέασαν τις λειτουργικές ιδιότητες του υποδοχέα. Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί με προηγούμενες μελέτες που έδειξαν ότι γενικά η μετάλλαξη αμινοξέων σε Cys δεν επηρεάζει σημαντικά τις λειτουργικές ιδιότητες του υποδοχέα και κατά συνέπεια τη στερεοδιαμόρφωση του (253). Μετάλλαξη των διαμεμβρανικών αμινοξέων του D2 υποδοχέα της ντοπαμίνης με Cys δεν επηρέασε σημαντικά τη δέσμηση του ραδιοσημασμένου προσδέτη και κατά συνέπεια τη δομή του υποδοχέα (254-257). Στις περιπτώσεις που η μετάλλαξη ενός αμινοξέος σε Cys επηρέασε τη δέσμηση του ραδιοσημασμένου προσδέτη, αυτό οφειλόταν στο ότι το αμινοξύ αυτό αλληλεπιδρούσε με αυτόν.

5.1.2.4 Αντίδραση MTSEA με τον υποδοχέα ΔCys+F203^{3.40}C

Η τεχνητή Cys της TM3 του ΔCys CRF₁R στη θέση 203^{3.40} αντέδρασε με το MTSEA, καθώς η αντίδρασή του με τον μεταλλαγμένο υποδοχέα που τη περιέχει τροποποίησε την ειδική δέσμηση της [¹²⁵I]-Tyr⁰-σοβαγίνης σε αυτόν. Όμως, σε αντίθεση με τους C189^{3.26}, C192^{3.29}, C193^{3.30}, C195^{3.32}, C196^{3.33} και C199^{3.36} η αντίδραση της F203^{3.40}C με το MTSEA ενίσχυσε σημαντικά τη δέσμηση της [¹²⁵I]-Tyr⁰-σοβαγίνης στον ΔCys+F203^{3.40}C υποδοχέα. Η τροποποίηση αυτή της δέσμησης του ραδιοσημασμένου προσδέτη οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η τεχνητή Cys στη θέση 203^{3.40} έχει τη πλευρική της αλυσίδα προσανατολισμένη προς την κοιλότητα θέσεων δέσμησης του ΔCys+F203^{3.40}C. Το συμπέρασμα αυτό επιβεβαιώνεται από το γεγονός ότι ο πεπτιδικός ανταγωνιστής αστρεσσίνη προστάτεψε τον ΔCys+F203^{3.40}C από το MTSEA, αφού παρουσία του μειώθηκε σημαντικά η αντίδραση. Είναι πιθανόν η αστρεσσίνη να προστάτεψε τον ΔCys+F203^{3.40}C από το MTSEA μέσω δομικών αλλαγών που προκάλεσε αφού οι θέσεις δέσμησης της βρίσκονται στις εξωκυττάρειες περιοχές του υποδοχέα και μακριά από την θέση 203^{3.40} (211). Εναλλακτικά η δέσμηση της αστρεσσίνης στις εξωκυττάρειες περιοχές θα μπορούσε να εμποδίζει την είσοδο του MTSEA στη κοιλότητα θέσεων δέσμησης του υποδοχέα και έτσι την αντίδρασή του με την τεχνητή Cys στη θέση 203^{3.40}.

Αντίθετα με την αστρεσσίνη και αντίθετα με τους ΔCys+R189^{3.26}C, ΔCys+T192^{3.29}C, ΔCys+A193^{3.30}C, ΔCys+Y195^{3.32}C, ΔCys+N196^{3.33}C και ΔCys+H199^{3.36}C η ανταλαρμίνη δεν

κατόρθωσε να προστατέψει τον $\Delta\text{Cys}+\text{F203}^{3,40}\text{C}$ από το MTSEA. Το αποτέλεσμα αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η ανταλαμίνη δεν δεσμεύεται στον $\Delta\text{Cys}+\text{F203}^{3,40}\text{C}$ ακόμα και σε συγκέντρωση 1 μM (ανεξάρτητα της αντίδρασης ή όχι του υποδοχέα αυτού με το MTSEA). Αντίθετα, η συγγένεια δέσμησης της αστρεσσίνης δεν επηρεάστηκε από την μετάλλαξη $\text{F203}^{3,40}\text{C}$ (ακόμη και μετά την αντίδραση του MTSEA με αυτή την τεχνητή Cys).

5.1.2.5 Μηχανισμός αντίδρασης του MTSEA με τη τεχνητή Cys, $\text{C203}^{3,40}$

Προκειμένου να μελετήσουμε το μηχανισμό τροποποίησης της δέσμησης της $[\text{}^{125}\text{I}]\text{-Tyr}^0\text{-σοβαγίνης}$ στον $\Delta\text{Cys}+\text{F203}^{3,40}\text{C}$ μετά την αντίδρασή του με το MTSEA προσδιορίσαμε τη συγγένεια δέσμησης της $\text{Tyr}^0\text{-σοβαγίνης}$ πριν και μετά την αντίδραση. Αντίθετα με τους υποδοχείς $\Delta\text{Cys}+\text{R189}^{3,26}\text{C}$, $\Delta\text{Cys}+\text{T192}^{3,29}\text{C}$, $\Delta\text{Cys}+\text{A193}^{3,30}\text{C}$, $\Delta\text{Cys}+\text{Y195}^{3,32}\text{C}$, $\Delta\text{Cys}+\text{N196}^{3,33}\text{C}$ και $\Delta\text{Cys}+\text{H199}^{3,36}\text{C}$, η αντίδραση του $\Delta\text{Cys}+\text{F203}^{3,40}\text{C}$ με το MTSEA αύξησε σημαντικά τη συγγένεια δέσμησης του ραδιοσημασμένου αναλόγου. Στην αύξηση αυτή, της συγγένειας δέσμησης της $\text{Tyr}^0\text{-σοβαγίνης}$, πολύ πιθανόν οφείλεται η αύξηση της ειδικής δέσμησης της $[\text{}^{125}\text{I}]\text{-Tyr}^0\text{-σοβαγίνης}$ για τον $\Delta\text{Cys}+\text{F203}^{3,40}\text{C}$.

Αξιοσημείωτο αποτελεί το γεγονός ότι η αντίδραση με το MTSEA όχι απλά αύξησε τη συγγένεια δέσμησης της $\text{Tyr}^0\text{-σοβαγίνης}$ για τον $\Delta\text{Cys}+\text{F203}^{3,40}\text{C}$ αλλά την επανέφερε σε φυσιολογικά επίπεδα μετά τη σημαντική ελάττωσή της (18 φορές) από τη μετάλλαξη $\text{F203}^{3,40}\text{C}$. Αντίθετα, η μετάλλαξη $\text{F203}^{3,40}\text{C}$ καθώς και η αντίδραση του $\Delta\text{Cys}+\text{F203}^{3,40}\text{C}$ με το MTSEA δεν επηρέασε σημαντικά τη συγγένεια δέσμησης της αστρεσσίνης για τον $\Delta\text{Cys CRF}_1\text{R}$. Όλα τα παραπάνω αποτελέσματα οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η $\text{F203}^{3,40}\text{C}$ μετάλλαξη επηρέασε την ενεργό κατάσταση του υποδοχέα και έτσι την υψηλής συγγένειας δέσμησης της $\text{Tyr}^0\text{-σοβαγίνης}$ για αυτήν χωρίς όμως να τροποποιεί τη γενική δομή του CRF_1R και έτσι να μην επηρεάζει τη δέσμησης της αστρεσσίνης. Αντίδραση του MTSEA με την τεχνητή Cys στη θέση $203^{3,40}$ του υποδοχέα αποκατέστησε την ικανότητά του να σταθεροποιείται στην ενεργό κατάστασή του.

Ο CRF_1R , όπως όλοι οι GPCRs, μπορεί να βρίσκεται σε τουλάχιστον δυο διαφορετικές στερεοδιαμορφώσεις, μια υψηλής συγγένειας (R^*), η οποία μπορεί να ενεργοποιήσει τις G πρωτεΐνες και να παράγει ένα βιολογικό αποτέλεσμα και μια χαμηλής συγγένειας (R)

ανενεργή, κατάσταση (210,220,258). Οι αγωνιστές, όπως η Tyr⁰-σοβαγίνη, δεσμεύονται με πολύ χαμηλή συγγένεια (K_{DR}) στη R ενώ με υψηλή συγγένεια (K_{DR^*}) στη R* η οποία είναι ευαίσθητη σε δομικές αλλαγές του υποδοχέα. Μεταλλάξεις αμινοξέων (χωρίς να είναι απαραίτητο να αποτελούν θέσεις δέσμευσης προσδετών) που αποσταθεροποιούν τη R* στερεοδιαμόρφωση ενός υποδοχέα ελαττώνουν την ικανότητα του να ενεργοποιείται και να δεσμεύει με υψηλή συγγένεια ένα αγωνιστή. Αντίθετα, τροποποιήσεις του υποδοχέα, όπως η αντίδραση της τεχνητής Cys στη θέση 203^{3,40} του CRF₁R με το MTSEA, μπορεί να σταθεροποιήσει την R* κατάσταση επαναφέροντας σε φυσιολογικά επίπεδα την ικανότητά του να μεταβαίνει σε αυτή και να δεσμεύει με υψηλή συγγένεια τη Tyr⁰-σοβαγίνη, όπως πράγματι παρατηρούμε στα πειράματά μας. Σε αντίθεση με τους αγωνιστές, η δέσμευση της αστρεσσίνης όπως όλων των ανταγωνιστών, πραγματοποιείται με διαφορετικό τρόπο από εκείνον των αγωνιστών και είναι πολύ λιγότερο ευαίσθητη στις δομικές αλλαγές που σχετίζονται με την ενεργοποίηση του υποδοχέα. Ο διαφορετικός τρόπος δέσμευσης των ανταγωνιστών από εκείνον των αγωνιστών σχετίζεται με την ικανότητα των πρώτων να δεσμεύονται με παρόμοια συγγένεια σε όλες τις καταστάσεις του υποδοχέα, ενεργές και ανενεργές, χωρίς να σταθεροποιούν επιλεκτικά κάποια από αυτές. Αν μια μετάλλαξη αλλάξει τη συγγένεια δέσμευσης της αστρεσσίνης αυτό πιθανόν οφείλεται σε τροποποίηση της δέσμευσής της σε όλες τις καταστάσεις του υποδοχέα, δηλαδή σε μια αλλαγή στη γενική δομή του.

5.1.2.6 Προσανατολισμός του αμινοξέος της TM3 στη θέση 203^{3,40} του CRF₁R

Το γεγονός ότι η μετάλλαξη F203^{3,40}C, καθώς και η αντίδραση του ΔCys+F203^{3,40}C με το MTSEA δεν επηρέασε σημαντικά τη συγγένεια δέσμευσης της αστρεσσίνης για τον ΔCys CRF₁R, οδηγεί στο συμπέρασμα ότι τόσο η F203^{3,40}C μετάλλαξη όσο και η αντίδραση του Cys-μεταλλαγμένου υποδοχέα με το MTSEA δεν επηρέασαν σημαντικά τη στερεοδιαμόρφωση του υποδοχέα. Το αποτέλεσμα αυτό σε συνδυασμό με το ότι οι ΔCys και WT υποδοχείς έχουν παρόμοιες λειτουργικές και άρα δομικές ιδιότητες, μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι όπως η τεχνητή Cys έτσι και το αμινοξύ που αυτή αντικατέστησε, δηλαδή το F203^{3,40} των ΔCys και WT, έχει την πλευρική του αλυσίδα προσανατολισμένη προς την κοιλότητα θέσεων δέσμευσης του CRF₁R.

5.1.3 Δομή της TM3 του CRF₁R.

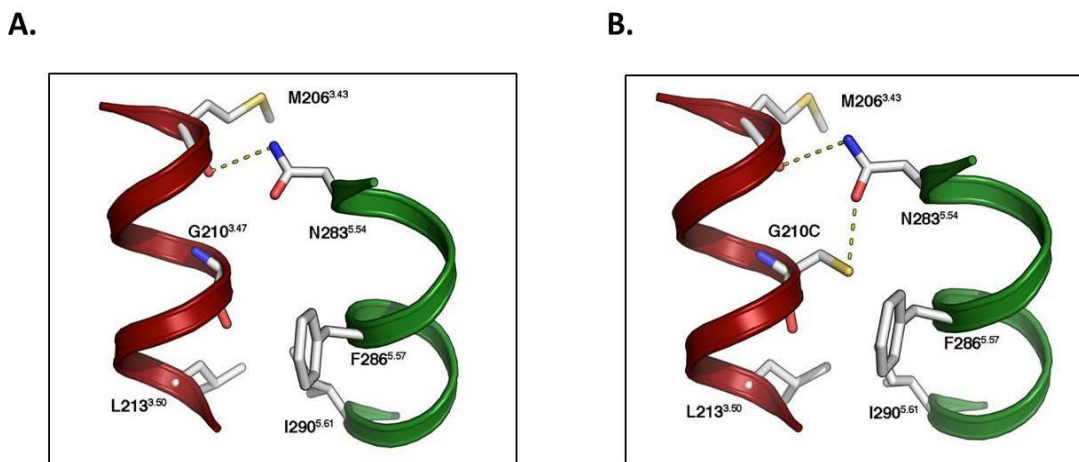
Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης οδηγούν στο συμπέρασμα ότι τα R189^{3.26}, T192^{3.29}, A193^{3.30}, Y195^{3.32}, N196^{3.33}, H199^{3.36} και F203^{3.40} της TM3 του CRF₁R, έχουν προσανατολισμένες τις πλευρικές αλυσίδες τους στην υδρόφιλη κοιλότητα θέσεων δέσμωσης του υποδοχέα. Αντίθετα, όλα τα άλλα αμινοξέα της TM3 είναι προσανατολισμένα είτε στο λιπόφιλο περιβάλλον της πλασματικής μεμβράνης ή στο εσωτερικό της πρωτεΐνης, έτσι ώστε να μην είναι διαθέσιμα για αντίδραση με το MTSEA. Αξιοσημείωτο αποτελεί το γεγονός ότι τα αμινοξέα που βρίσκονται κάτω από τη F203^{3.40}, προς το κυτταροπλασματικό άκρο της TM3 δεν βρίσκονται στην επιφάνεια της κοιλότητας δέσμωσης του CRF₁R. Η διάταξη αυτή των αμινοξέων της TM3 είναι χαρακτηριστική μιας α-ελικοειδούς δομής, με το άνω μισό τμήμα της να συμμετέχει στο σχηματισμό μιας μεγάλης κοιλότητας. Η δομή αυτή αντιπροσωπεύει εκείνη της ελεύθερης ανενεργού κατάστασης (apo state) του CRF₁R αφού τα πειράματα SCAM έγιναν απουσία αγωνιστή ή ανταγωνιστή.

Η δομική αυτή πληροφορία συμφωνεί απόλυτα με εκείνη που λήφθηκε από μια κρυσταλλογραφική μελέτη που πραγματοποιήθηκε ταυτόχρονα με τη παρούσα εργασία. Στη μελέτη αυτή βρέθηκε ότι το άνω μισό των διαμεμβρανικών περιοχών του ανενεργού CRF₁R φαίνεται να σχηματίζει μια μεγάλη κοιλότητα σχήματος V, η οποία θα μπορούσε να δεσμεύσει τα μεγάλα πεπτίδια (207). Αντίθετα, τα κατώτερα τμήματα των TMs (κυτταροπλασματικά άκρα τους), συμπεριλαμβανομένης και της TM3 βρίσκονται σε στενή επαφή μεταξύ τους. Η δομή αυτή του CRF₁R παρατηρήθηκε επίσης και σε μια κρυσταλλογραφική μελέτη του GCGR (209), οδηγώντας έτσι στην υπόθεση ότι η δομή αυτή πρέπει να είναι κοινή σε όλους τους υποδοχείς της οικογένειας Β των GPCRs με τη μεγάλη κοιλότητα σχήματος V να εξυπηρετεί στη δέσμωση των μεγαλομοριακών πεπτιδίων.

5.2 Προσδιορισμός του ρόλου της TM3 στην ενεργοποίηση του CRF₁R

5.2.1 Η G210^{3,47} παίζει σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση του CRF₁R.

Από τα αμινοξέα της TM3 τα οποία υποκαταστήσαμε με τεχνητές Cys, η μετάλλαξη G210^{3,47}C ήταν εκείνη που επηρέασε σε μεγαλύτερο βαθμό την υψηλής συγγένειας δέσμευση της Tyr⁰-σοβαγίνης για τον CRF₁R. Συγκεκριμένα η μετάλλαξη G210^{3,47}C μείωσε τη συγγένεια δέσμευσης της Tyr⁰-σοβαγίνης κατά 129 φορές. Παρόμοια η μετάλλαξη G210^{3,47}C μείωσε την ισχύ της σοβαγίνης κατά 121 φορές. Τα αποτελέσματα αυτά μας οδηγούν στην υπόθεση ότι η μετάλλαξη της γλυκίνης στη θέση 210^{3,47} της TM3 του CRF₁R σε κυστεΐνη (G210^{3,47}C) μείωσε σημαντικά την ικανότητα του υποδοχέα να σταθεροποιείται στην ενεργό κατάστασή του η οποία είναι υπεύθυνη τόσο για την μεγάλη ισχύ της σοβαγίνης όσο και για την υψηλής συγγένειας δέσμευσή της, που ανιχνεύεται κάτω από τις πειραματικές συνθήκες της παρούσας εργασίας. Αντίθετα η G210^{3,47}C δεν επηρέασε τη γενική δομή του CRF₁R αφού δεν μείωσε τη συγγένεια δέσμευσης της αστρεσσίνης.

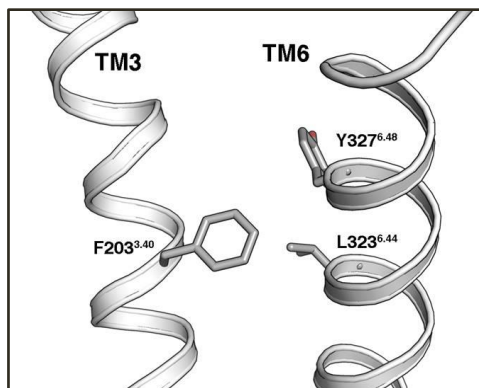


Εικόνα 5.4: Μοριακά πρότυπα που αναπαριστούν την αλληλεπίδραση αμινοξέων των TM3 και TM5 του CRF₁R με βάση την κρυσταλλική δομή (απουσία προσδέτη) του GCGR, στην ανενεργό κατάστασή του. Α) Η N283^{5,54} της TM5 σχηματίζει έναν δεσμό υδρογόνου με το καρβονύλιο του σκελετού της M206^{3,43}. Β) Η μετάλλαξη G210^{3,47} σε Cys προσθέτει πλευρική αλυσίδα που αλληλεπιδρά με τη N283^{5,54}.

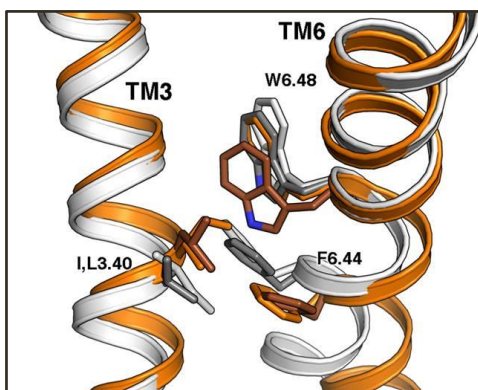
Η G210^{3.47} βρίσκεται σε απόσταση μιας ελικοειδούς στροφής κάτω από τη M206^{3.43} της οποίας η καρβονυλομάδα συμμετέχει στο σχηματισμό ενός δεσμού υδρογόνου με το υδρογόνο της αμινομάδας της πλευρικής αλυσίδας της N283^{5.54} της TM5 του ανενεργού υποδοχέα (Εικόνα 5.4A) όπως παρατηρήθηκε στις κρυσταλλικές δομές του CRF₁R και του GCGR (207,209). Η G210^{3.47} δεν έχει πλευρική αλυσίδα που να επιτρέπει τη συμμετοχή της στο δεσμό με το N283^{5.54}. Στα υπολογιστικά πρότυπα που κατασκευάστηκαν με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας και τη κρυσταλλική δομή (απουσία προσδέτη) του GCGR, στην ανενεργό κατάστασή του, φαίνεται ότι η πλευρική αλυσίδα της τεχνητής Cys που υποκατέστησε τη G210^{3.47} (μετάλλαξη G210^{3.47}C) και συγκεκριμένα η ομάδα -SH σχηματίζει έναν δεσμό υδρογόνου με το οξυγόνο της πλευρικής αλυσίδας της N283^{5.54} της TM5 η οποία ταυτόχρονα αλληλεπιδρά με τη M206^{3.43} όπως αναφέρθηκε παραπάνω (Εικόνα 5.4B). Το δίκτυο αυτών των δεσμών μεταξύ TM3 και TM5 σταθεροποιεί ακόμη περισσότερο τον CRF₁R στην ανενεργό κατάστασή του με αποτέλεσμα να μην μπορεί να ενεργοποιηθεί από τους αγωνιστές του στον ίδιο βαθμό με τον άγριο τύπο υποδοχέα. Αν ισχύει η θεωρία αυτή, τότε στη θέση 210^{3.47} του CRF₁R η παρουσία πλευρικής αλυσίδας που να μην μπορεί να συμμετέχει στο προαναφερόμενο δίκτυο δεσμών των TM3-TM5 αναμένεται να μην επηρεάσει δραματικά την ικανότητα του υποδοχέα να ενεργοποιείται και να δεσμεύει με υψηλή συγγένεια την Tyr⁰-σοβαγίνη. Πράγματι, η μετάλλαξη της G210^{3.47} σε αλανίνη (G210^{3.47}A), η οποία δεν μπορεί να σχηματίσει δεσμό υδρογόνου με το οξυγόνο της πλευρικής αλυσίδας της N283^{5.54} της TM5, επηρέασε πολύ λίγο, τόσο τη συγγένεια δέσμευσης, όσο και την ισχύ της σοβαγίνης. Παρόμοια με την G210^{3.47}C, η G210^{3.47}A μετάλλαξη, δεν επηρέασε την δομή του CRF₁R αφού δεν τροποποίησε τη συγγένεια δέσμευσης της αστρεσσίνης. Από τα αποτελέσματα αυτά, είναι εμφανής η μεγάλη σημασία των αλληλεπιδράσεων μεταξύ αμινοξέων της TM3 και TM5 στην ενεργοποίηση του CRF₁R. Συγκεκριμένα η ενεργοποίηση του CRF₁R και πιθανόν όλων των άλλων υποδοχέων της οικογένειας B των GPCRs, σχετίζεται με μετατόπιση των TM3 και TM5 όπως έχει παρατηρηθεί στους υποδοχείς της οικογένειας A (259).

5.2.2 Ο ρόλος της F203^{3.40} στην ενεργοποίηση του CRF₁R

Χρησιμοποιώντας ένα μοριακό πρότυπο του CRF₁R βασισμένο στην κρυσταλλική δομή (απουσία προσδέτη), του GCGR αναπαραστήσαμε τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αμινοξέων διαφορετικών TMs του υποδοχέα στην ανενεργό του κατάσταση, απουσία προσδέτη. Στη κατασκευή του μοριακού αυτού προτύπου δεν χρησιμοποιήσαμε την κρυσταλλική δομή του ανενεργού CRF₁R, η οποία αναπαριστά αλληλεπιδράσεις των αμινοξέων των TMs του υποδοχέα με τον ανταγωνιστή CP-376395. Στο μοριακό μας πρότυπο φαίνεται ένα δίκτυο υδρόφοβων-αρωματικών αλληλεπιδράσεων ανάμεσα στα αμινοξέα των TM3 και TM6 του CRF₁R (Εικόνα 5.5) που είναι παρόμοιο με εκείνο των υποδοχέων της οικογένειας A των GPCRs (Εικόνα 5.6) (260,261). Συγκεκριμένα τα υδρόφοβα αυτά αμινοξέα του CRF₁R είναι η Phe στη θέση 3.40 (F203^{3.40}) της TM3 (F: 77% και Y: 20%, ποσοστά διατήρησης στις αλληλουχίες των υποδοχέων της οικογένειας B των GPCRs), και η Leu στη θέση 6.44 (L323^{6.44}) της TM6 (L: 65% και F: 22% ποσοστά διατήρησης στις αλληλουχίες των υποδοχέων της οικογένειας B των GPCRs) (Εικόνα 5.3). Η F203^{3.40} και η L323^{6.44} του CRF₁R αντιστοιχούν στα επίσης υδρόφοβα αμινοξέα, I121^{3.40} (I: 40%, V: 25% και L: 11% ποσοστά διατήρησης στις αλληλουχίες των υποδοχέων της οικογένειας A των GPCRs) και F282^{6.44} (F: 81% και Y: 7% ποσοστά διατήρησης στις αλληλουχίες των υποδοχέων της οικογένειας A των GPCRs), αντίστοιχα του β₂AR (Εικόνα 5.3) που ανήκει στην οικογένεια A των GPCRs. Σύμφωνα με το μοριακό μας πρότυπο τα F203^{3.40} και L323^{6.44} του ανενεργού CRF₁R (απουσία ανταγωνιστή) σχηματίζουν, όπως τα αντίστοιχα αμινοξέα των ανενεργών υποδοχέων της οικογένειας A των GPCRs, μια αρωματική-αλειφατική αλληλεπίδραση (Εικόνες 5.5 και 5.6).



Εικόνα 5.5: Μοριακό πρότυπο που αναπαριστά την ανενεργό κατάσταση του CRF_1R , απουσία προσδέτη, με βάση την κρυσταλλική δομή (απουσία προσδέτη) του $GCGR$, στην ανενεργό κατάστασή του.



Εικόνα 5.6: Σύγκριση των αμινοξέων στις θέσεις 3.40, 6.44 και 6.48 του ανενεργού (λευκό) και ενεργού (πορτοκαλί) β_2AR και του ανενεργού (γκρι) και ενεργού (καφέ) υποδοχέα της ροδοψίνης.

Μετά τη σύγκριση των κρυσταλλικών δομών των ανενεργών CRF_1R και β_2AR , συγκρίναμε αυτές με τη κρυσταλλική δομή του ενεργού (δεσμευμένου με αγωνιστή) β_2AR με σκοπό να προσδιορίσουμε δομικές αλλαγές των $I121^{3.40}$ και $F282^{6.44}$ του β_2AR κατά την ενεργοποίησή του, που πιθανόν μπορούσαν να είναι παρόμοιες με εκείνες των $F203^{3.40}$ και $L323^{6.44}$ του CRF_1R κατά την ενεργοποίησή του. Από τη σύγκριση των κρυσταλλικών δομών της ανενεργού και ενεργού κατάστασης του β_2AR φαίνεται ότι κατά την ενεργοποίησή του αλλάζει ο προσανατολισμός των πλευρικών αλυσίδων των αμινοξέων των TMs συμπεριλαμβανομένων

των I121^{3.40} της TM3 και F282^{6.44} της TM6 (Εικόνα 5.6) (243,247,262). Συγκεκριμένα παρατηρώντας τον β_2 AR από την εξωκυττάριο περιοχή του, φαίνεται ότι η δέσμευση του αγωνιστή ενεργοποιεί τον υποδοχέα πυροδοτώντας μια αριστερόστροφη περιστροφή της I121^{3.40} και της F282^{6.44} που οδηγεί στην απομάκρυνση του κυτταροπλασματικού τμήματος της TM6 από τις άλλες TMs (Εικόνα 5.6) (243). Η σύγκριση των δομών (ενεργών και ανενεργών) των β_2 AR και CRF₁R, μας οδήγησε στην υπόθεση ότι τα F203^{3.40} και L323^{6.44} του CRF₁R αλλάζουν επίσης προσανατολισμούς κατά την ενεργοποίηση του υποδοχέα και οι δομικές αυτές αλλαγές είναι παρόμοιες με εκείνες των I121^{3.40} και της F282^{6.44} του β_2 AR. Οι δομικές αυτές αλλαγές δηλαδή περιλαμβάνουν μετατόπιση της F203^{3.40} της TM3 του CRF₁R προς ένα αρωματικό αμινοξύ, πιθανόν τη Y327^{6.48} (W^{6.48} στον β_2 AR) της TM6, και η αλληλεπίδραση των δύο αυτών αμινοξέων του υποδοχέα να τον σταθεροποιεί στην ενεργό κατάστασή του. Αν η υπόθεση αυτή ισχύει τότε κάθε μετάλλαξη της F203^{3.40}, που δεν επιτρέπει την αλληλεπίδραση αυτή, αναμένεται να παρεμποδίζει την ενεργοποίηση του CRF₁R.

Πράγματι, αφαίρεση της αρωματικής, πλευρικής αλυσίδας της F203^{3.40} μετά από μετάλλαξή της σε αλανίνη (F203^{3.40}A) η οποία δεν μπορεί να συμμετέχει στη TM3-TM6 αλληλεπίδραση παρεμποδίζει τον υποδοχέα να σταθεροποιηθεί στην ενεργό κατάστασή του, μειώνοντας σημαντικά την υψηλής συγγένειας δέσμευση και ισχύ της σοβαγίνης. Συγκεκριμένα η συγγένεια δέσμευσης του αγωνιστή Tyr⁰-σοβαγίνη για τον μεταλλαγμένο υποδοχέα F203^{3.40}A μειώθηκε κατά 27 φορές ενώ η ισχύς της σοβαγίνης να διεγείρει την παραγωγή ενδοκυττάριου cAMP σε κύτταρα που εξέφραζαν σταθερά τον υποδοχέα ελαττώθηκε κατά 24 φορές. Η επίδραση της μετάλλαξης F203^{3.40}A στη δέσμευση και ισχύ της σοβαγίνης δεν οφείλονταν σε τροποποίηση της γενικής δομής του υποδοχέα αφού η δέσμευση της ασπρεσσίνης δεν επηρεάστηκε.

Σε αντίθεση με τη F203^{3.40}A μετάλλαξη, διατήρηση της υδροφοβικότητας στη θέση 203^{3.40} που επιτρέπει την TM3-TM6 αλληλεπίδραση, αντικαθιστώντας τη φαινυλαλανίνη είτε με τρυπτοφάνη (F203^{3.40}W) ή με ισολευκίνη (F203^{3.40}I), δεν επηρέασε σημαντικά τις φαρμακολογικές ιδιότητες του υποδοχέα. Συγκεκριμένα οι μεταλλάξεις F203^{3.40}W και F203^{3.40}I δεν επηρέασαν καθόλου την υψηλής συγγένειας δέσμευση και ισχύ της σοβαγίνης, όπως επίσης και τη συγγένεια δέσμευσης της ασπρεσσίνης.

Σε συμφωνία με την αντίληψη ότι οι αρωματικές/υδροφοβες αλληλεπιδράσεις μεταξύ της πλευρικής αλυσίδας στη θέση F203^{3.40} και της TM6 του CRF₁R είναι σημαντικές για την

ενεργοποίηση του υποδοχέα, η διακοπή τους με την αντικατάσταση της F203^{3.40} με την μικρότερη υδρόφιλη κυστεΐνη (F203^{3.40}C) μείωσε την υψηλής συγγένειας δέσμευση της Tyr⁰-σοβαγίνης, όπως στη F203^{3.40}A μετάλλαξη. Το γεγονός ότι η υψηλής συγγένειας δέσμευση της Tyr⁰-σοβαγίνης αποκαταστάθηκε μετά την αντίδραση της C203^{3.40} με το MTSEA οφείλεται στην εισαγωγή μιας θετικά φορτισμένης ομάδας, που μιμείται την πλευρική αλυσίδα τύπου λυσίνης (252,253). Σε συμφωνία με τα παραπάνω, η μετάλλαξη της F203^{3.40} σε λυσίνη (F203^{3.40}K) δεν τροποποίησε την υψηλής συγγένειας δέσμευση της Tyr⁰-σοβαγίνης καθώς επίσης και την ισχύ με την οποία η σοβαγίνη διέγειρε την παραγωγή ενδοκυττάριου cAMP σε κύτταρα που εξέφραζαν σταθερά τον μεταλλαγμένο υποδοχέα F203^{3.40}K. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι αρωματικά αμινοξέα μπορούν να αλληλεπιδράσουν με θετικά φορτισμένα αμινοξέα μέσω κατιόν-π αλληλεπιδράσεων (263-265). Έτσι λοιπόν, η προσθήκη μιας θετικά φορτισμένης πλευρικής αλυσίδας στη θέση 203^{3.40} είτε με τη F203^{3.40}K μετάλλαξη ή με την αντίδραση της C203^{3.40} με το MTSEA, πιθανόν να συμμετέχει στο σχηματισμό ενός νέου δικτύου αλληλεπιδράσεων (πιθανόν κατιόν-π) με γειτονικά αμινοξέα (πιθανόν αρωματικά αμινοξέα της TM6) επιτρέποντας την φυσιολογική ενεργοποίηση του υποδοχέα. Το ότι οι τροποποιήσεις αυτές του υποδοχέα δεν επηρέασαν τη γενική δομή του φαίνεται και από το γεγονός ότι ούτε οι μεταλλάξεις F203^{3.40}K και F203^{3.40}C ούτε η αντίδραση του MTSEA με τον F203^{3.40}C υποδοχέα επηρέασαν τη συγγένεια δέσμευσης της ασπρεσσίνης.

Η λειτουργική σημασία της θέσης 3.40 στους GPCRs δεν φαίνεται μόνο στους CRF₁R (F203^{3.40}) και β₂AR (I121^{3.40}) αλλά και σε πολλούς άλλους υποδοχείς. Για παράδειγμα, μετάλλαξη σε αλανίνη του αμινοξέος 3.40 των υποδοχέων GIP (Gastric inhibitory polypeptide) και ισταμίνης H1, οι οποίοι ανήκουν στις οικογένειες B και A των GPCRs αντίστοιχα, μείωσε σημαντικά την ικανότητά τους να ενεργοποιούνται (261,266). Αντίθετα, η μετάλλαξη σε αλανίνη του ομόλογου αμινοξέος του μουσκαρινικού υποδοχέα οδήγησε σε μόνιμη ενεργοποίηση του και αύξησε τη συγγένεια δέσμευσης των αγωνιστών (267). Από τα παραπάνω φαίνεται ότι μέλη από διαφορετικές οικογένειες των GPCRs πιθανόν μοιράζονται ορισμένα κοινά δομικά στοιχεία που να εμπλέκονται στους μηχανισμούς ενεργοποίησής τους. Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής θα μπορούσαν να θέσουν τη βάση για μια πιθανή κατηγοριοποίηση των GPCRs σύμφωνα με κοινούς μηχανισμούς που εμπλέκονται στην ενεργοποίησή τους.

5.2.3 Ο αλλοστερικός ρόλος της F203^{3,40} στη δέσμευση των πεπτιδίων

Στη συνέχεια επιβεβαιώσαμε ότι οι τροποποιήσεις της 3.40 θέσης επηρέασαν την υψηλής συγγένειας δέσμευση της σοβαγίνης λόγω δομικών αλλαγών του υποδοχέα που επηρεάζουν την ενεργοποίησή του και όχι λόγω κατάργησης κάποιας αλληλεπίδρασης μεταξύ αμινοξέων του πεπτιδίου και της θέσης 3.40 του CRF₁R. Η θέση 3.40 βρίσκεται στην επιφάνεια της κοιλότητας θέσεων δέσμευσης του CRF₁R και αποτελώντας μέρος της J-περιοχής του υποδοχέα θα μπορούσε να αλληλεπιδράσει με το N-άκρο των πεπτιδίων (210). Αν συμβαίνει αυτό τότε η πιο πιθανή εκδοχή είναι, από τα αμινοτελικά αμινοξέα της Tyr⁰-σοβαγίνης, η τυροσίνη στη θέση μηδέν (Tyr⁰) να αλληλεπιδρά με τη F203^{3,40} μέσω αρωματικής-αρωματικής αλληλεπίδρασης (268-273). Τα πρώτα τέσσερα αμινοτελικά αμινοξέα των πεπτιδίων του CRF, που βρίσκονται αμέσως μετά τη Tyr⁰ της Tyr⁰-σοβαγίνης, δεν παίζουν ρόλο στη δέσμευσή τους αφού δεν είναι σημαντικά για την βιολογική τους δραστηριότητα σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες (35,65,71,204). Παρόμοια τα αλειφατικά αμινοξέα Ile5 και Ile7 της Tyr⁰-σοβαγίνης δεν πρέπει να αλληλεπιδρούν με την F203^{3,40}, αφού η εισαγωγή θετικού φορτίου στη θέση 203^{3,40} από την μετάλλαξη F203^{3,40}K δεν επηρέασε την υψηλής συγγένειας δέσμευση της Tyr⁰-σοβαγίνης. Η υδρόφιλη Ser6 της Tyr⁰-σοβαγίνης δεν είναι επίσης συμβατή για αλληλεπίδραση με την υδρόφοβη F203^{3,40} του CRF₁R. Επιπρόσθετα, τα αμινοξέα 8-11 της Tyr⁰-σοβαγίνης δεν πρέπει να εισέρχονται βαθειά στην κοιλότητα θέσεων δέσμευσης του CRF₁R ώστε να πλησιάζουν την F203^{3,40} καθώς αυτά αλληλεπιδρούν με τον δεύτερο εξωκυττάριο βρόγχο (EL2) του υποδοχέα (216).

Με σκοπό να εξετάσουμε το κατά πόσο η F203^{3,40} αλληλεπιδρά με τη Tyr⁰ της Tyr⁰-σοβαγίνης, μελετήσαμε τις επιπτώσεις της αφαίρεσης της Tyr⁰ στη δέσμευση του πεπτιδίου στον WT CRF₁R και σε μεταλλαγμένες μορφές του. Συγκεκριμένα, προσδιορίσαμε τη συγγένεια δέσμευσης της σοβαγίνης και της Tyr⁰-σοβαγίνης όταν στη θέση 203^{3,40} υπάρχει ο αρωματικός δακτύλιος της Phe (WT) με τον οποίο μπορεί να αλληλεπιδράσει εκείνος της Tyr⁰ της Tyr⁰-σοβαγίνης που όμως απουσιάζει στη σοβαγίνη. Επίσης προσδιορίσαμε την συγγένεια δέσμευσης της σοβαγίνης και της Tyr⁰-σοβαγίνης όταν στη θέση 203^{3,40} υπάρχει η σουλφυδρυλική ομάδα της Cys (F203^{3,40}C) που δεν αντιδρά με κανένα από τα δύο αυτά πεπτίδια. Τέλος προσδιορίσαμε την συγγένεια δέσμευσης της σοβαγίνης και της Tyr⁰-σοβαγίνης όταν στη θέση 203^{3,40} υπάρχει πλευρική αλυσίδα τύπου λυσίνης που προήλθε με την αντίδραση της F203^{3,40}C με το MTSEA και η οποία μπορεί να αλληλεπιδράσει μέσω κατιόν-

π αλληλεπίδρασης μόνο με τη Tyr⁰ της Tyr⁰-σοβαγίνης. Ανεξάρτητα της τροποποίησης των φυσικοχημικών ιδιοτήτων της θέσης 203^{3,40} τα αποτελέσματα της στη συγγένεια δέσμησης της Tyr⁰-σοβαγίνης και σοβαγίνης ήταν ακριβώς τα ίδια. Το αποτέλεσμα αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι οι τροποποιήσεις της F203^{3,40} επηρεάζουν τη δέσμηση των CRF πεπτιδίων αλλοστερικά.

5.3 Αλληλεπίδραση μικρομοριακών προσδετών με τη TM3 του CRF₁R και ανταγωνισμός της ενεργοποίησης του υποδοχέα

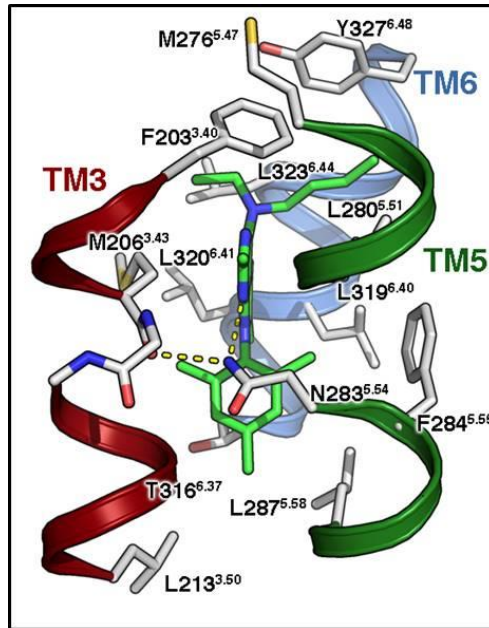
Η F203^{3,40} της TM3 δεν παίζει μόνο σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση του CRF₁R αλλά και στη δέσμηση των υδρόφοβων μικρομοριακών CRF ανταγωνιστών, όπως της ανταλαρμίνης, στον υποδοχέα αυτόν αφού τροποποιήσεις στη θέση 203^{3,40} επηρέασαν σημαντικά τη δέσμευσή της. Συγκεκριμένα, αφαίρεση της πλευρικής αλυσίδας της F203^{3,40} μετά από μετάλλαξή της σε αλανίνη (F203^{3,40}A) κατήργησε την υδρόφοβη αλληλεπίδρασή της με την ανταλαρμίνη και έτσι τη δέσμηση του ανταγωνιστή αυτού. Παρόμοια, η δέσμηση της ανταλαρμίνης καταργήθηκε με διακοπή της υδρόφοβης αυτής αλληλεπίδρασης από την αντικατάσταση της F203^{3,40} με την θετικά φορτισμένη λυσίνη ή με την υδρόφιλη πλευρική αλυσίδα της Cys (F203^{3,40}C), όπως επίσης και με τη προσθήκη θετικά φορτισμένης ομάδας μετά την αντίδραση της F203^{3,40}C με το MTSEA.

Αντίθετα, διατήρηση της υδροφοβικότητας στη θέση 203^{3,40} δεν επηρέασε σημαντικά τη δέσμηση της ανταλαρμίνης. Συγκεκριμένα, αντικατάσταση της πλευρικής αλυσίδας της F203^{3,40} με επίσης ογκώδη και αρωματική/υδρόφοβη πλευρική αλυσίδα, που επιτεύχθηκε με τις μεταλλάξεις F203^{3,40}I και F203^{3,40}W δεν μείωσε τη δέσμηση της ανταλαρμίνης στον CRF₁R. Τα αποτελέσματα αυτά οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η F203^{3,40} του CRF₁R αποτελεί καθοριστικό σημείο επαφής της ανταλαρμίνης.

Οι τροποποιήσεις στη θέση 203^{3,40} που κατήργησαν τη δέσμηση της ανταλαρμίνης αναμένεται να καταργήσουν επίσης την ικανότητά της να ανταγωνίζεται τη σοβαγίνη στο να ενεργοποιεί τον CRF₁R και να διεγείρει την παραγωγή cAMP σε κύτταρα που εκφράζουν αυτόν. Αντίθετα αναμένεται να μην επηρεαστεί η ανταγωνιστική ικανότητα της αστρεσσίνης σε

συμφωνία με το γεγονός ότι καμία από τις τροποποιήσεις στη θέση 203^{3.40} του CRF₁R δεν επηρέασε τη συγγένεια δέσμευσης του ανταγωνιστή αυτού. Πράγματι, η ισχύς της σοβαγίνης να διεγείρει την παραγωγή ενδοκυττάριου cAMP σε κύτταρα που εκφράζουν τον F203^{3.40}A δεν επηρεάστηκε παρουσία 2 μM ανταλαρμίνης, ενώ μειώθηκε κατά 13 φορές παρουσία αστρεσσίνης. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και για τη μετάλλαξη F203^{3.40}K. Αντίθετα με τις μεταλλάξεις F203^{3.40}A και F203^{3.40}K, η ισχύς της σοβαγίνης να διεγείρει την παραγωγή ενδοκυττάριου cAMP σε κύτταρα που εκφράζουν τον F203^{3.40}W ή τον F203^{3.40}I, μειώθηκε (παρόμοια με εκείνα που εκφράζουν τον WT CRF₁R) κατά 186 και 1117 φορές αντίστοιχα παρουσία 1 μM ανταλαρμίνης, και κατά 35 και 64 φορές αντίστοιχα παρουσία 1 μM αστρεσσίνης.

Παρόμοια πρόσφατη κρυσταλλογραφική μελέτη του CRF₁R δεσμευμένου με τον μικρομοριακό μη πεπτιδικό ανταγωνιστή CP-376395 έδειξε ότι το F203^{3.40} αποτελεί σημείο επαφής του προσδέτη αυτού (207). Έτσι λοιπόν φαίνεται ότι η F203^{3.40} παίζει κοινό ρόλο στη δέσμευση διαφορετικών μη πεπτιδικών ανταγωνιστών του CRF₁R. Συνδυάζοντας τα αποτελέσματα των πειραμάτων μας, με τις πληροφορίες από την κρυσταλλική δομή του ανενεργού CRF₁R, δεσμευμένου με τον μικρομοριακό ανταγωνιστή CP-376395, (207), δομήσαμε ένα μοριακό πρότυπο του CRF₁R όπου η ανταλαρμίνη είναι δεσμευμένη στον υποδοχέα (Εικόνα 5.7). Στο μοριακό αυτό πρότυπό μας, η ανταλαρμίνη αλληλεπιδρά με αμινοξέα των TMs του CRF₁R όπως αυτά των TM3, TM5 και TM6 (Εικόνα 5.7). Για παράδειγμα, η ομάδα της πύρρολο-πυριμιδίνης της ανταλαρμίνης σχηματίζει έναν δεσμό υδρογόνου με την N283^{5.54} της TM5 καθώς και μια υδρόφοβη αλληλεπίδραση με τη M206^{3.43} της TM3, ενώ η βουτυλομάδα της, συμμετέχει στο σχηματισμό μιας αλειφατικής-αρωματικής αλληλεπίδρασης με τη F203^{3.40} της TM3 (Εικόνα 5.7).



Εικόνα 5.7: Μοριακό πρότυπο που αναπαριστά την αλληλεπίδραση του CRF₁R με την ανταλαρμίνη.

Το γεγονός ότι η F203^{3.40} της TM3 παίζει αλλοστερικό ρόλο στη δέσμευση των πεπτιδίων-αγωνιστών και παράλληλα αλληλεπιδρά με τους μη πεπτιδικούς CRF ανταγωνιστές οδηγεί στο συμπέρασμα ότι οι τελευταίοι ανταγωνίζονται αλλοστερικά τη δέσμευση των πεπτιδίων-αγωνιστών και έτσι την ενεργοποίηση του CRF₁R. Ο μοριακός αυτός μηχανισμός αλλοστερικού ανταγωνισμού του CRF₁R από μικρομοριακούς μη πεπτιδικούς προσδέτες διαλευκάνεται για πρώτη φορά στη παρούσα μελέτη. Προηγούμενες μελέτες βασιζόμενες σε φαρμακολογικά αποτελέσματα, πρότειναν ότι οι μικρομοριακοί μη πεπτιδικοί προσδέτες ανταγωνίζονται αλλοστερικά τη δέσμευση των πεπτιδίων-αγωνιστών και έτσι την ενεργοποίηση του CRF₁R χωρίς όμως να παρέχουν δομικές πληροφορίες για τον μοριακό μηχανισμό δράσης τους. Αντίθετα πρόσφατη κρυσταλλογραφική μελέτη μιας ανενεργού δομής του CRF₁R, που δεν περιέχει την απαραίτητη, για τη δέσμευση των πεπτιδίων, εξωκυττάρια N-περιοχή, αποκάλυψε τα σημεία επαφής των μικρομοριακών ανταγωνιστών χωρίς όμως να μπορεί να εξηγήσει με ποιο τρόπο ανταγωνίζονται αλλοστερικά τη δέσμευση των πεπτιδίων αγωνιστών (207).

Ο διττός ρόλος της F203^{3.40} στην αλλοστερική δέσμευση των μη πεπτιδικών ανταγωνιστών στον CRF₁R και στην ενεργοποίηση του υποδοχέα αυτού, ο ρόλος των άλλων TMs του CRF₁R στη δέσμευση των μη πεπτιδικών ανταγωνιστών (207) και η καθοριστική για

την ενεργοποίηση ενός υποδοχέα σχέση του αμινοξέος 3.40 με άλλες TMs διαφορετικών GPCRs (234), αποτελούν σημαντικά στοιχεία για τη διαμόρφωση της παρακάτω θεωρίας. Οι μικρομοριακοί μη πεπτιδικοί CRF ανταγωνιστές εισχωρούν στην κοιλότητα θέσεων δέσμευσης του CRF₁R και παρεμβάλλονται μεταξύ αμινοξέων των TMs, όπως των F203^{3.40} της TM3 και Y327^{6.48} της TM6, μη επιτρέποντας έτσι σε αυτά να σχηματίσουν το δίκτυο δεσμών που είναι απαραίτητο για την ενεργοποίηση του υποδοχέα. Επιπρόσθετα, η αλληλεπίδραση των ανταγωνιστών αυτών με αμινοξέα των TMs, όπως η N283^{5.54} της TM5 και η M206^{3.43} της TM3, παρεμποδίζει κινήσεις αυτών των TMs που είναι απαραίτητες για την ενεργοποίηση του CRF₁R. Ο ανταγωνισμός των μικρομοριακών αυτών προσδετών είναι αλλοστερικής φύσης γιατί τα TM αμινοξέα με τα οποία αλληλεπιδρούν βρίσκονται σε διαφορετικές θέσεις του CRF₁R από εκείνες που δεσμεύουν τα πεπτιδία-αγωνιστές.

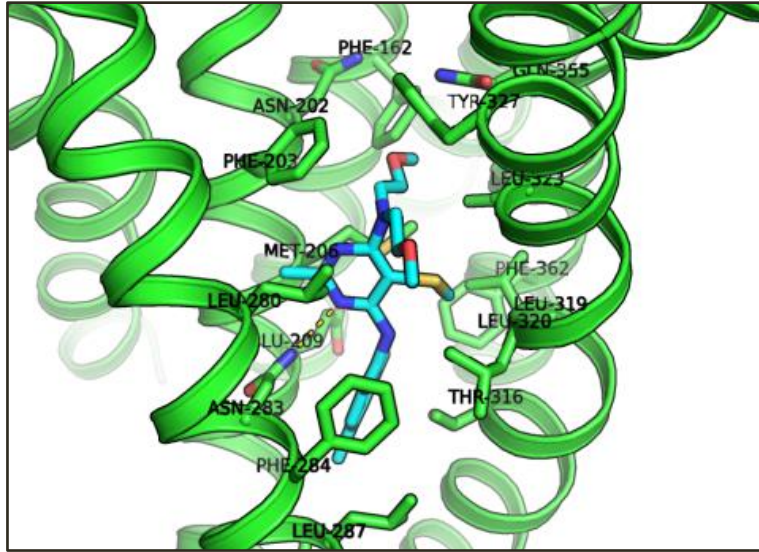
5.4 Σχεδιασμός, σύνθεση και φαρμακολογικός χαρακτηρισμός νέων μη πεπτιδικών μικρομοριακών αναλόγων του CRF

Η ανταλαρμίνη είναι ένα λιπόφιλο μη πεπτιδικό μόριο (εικόνες 5.8 και 5.9) που σε πειραματόζωα φαίνεται να έχει αντικαταθλιπτικές και αγχολυτικές ιδιότητες ανταγωνιζόμενο τις δράσεις του CRF (193,274,275). Όμως τόσο η ανταλαρμίνη όσο και πλήθος μικρομοριακών ανταγωνιστών που μέχρι σήμερα έχουν συντεθεί δεν έχουν βρει κλινική εφαρμογή λόγω φαρμακοκινητικών ή τοξικολογικών προβλημάτων τους (193). Ο σημαντικός ρόλος των CRF και CRF₁R στην παθοφυσιολογία του άγχους και της κατάθλιψης καθιστά φανερή την ανάγκη δημιουργίας νέων ανταγωνιστών του CRF₁R με κλινικές εφαρμογές. Για το σκοπό αυτό η παρούσα εργασία παράλληλα με τη μελέτη του μηχανισμού ενεργοποίησης του CRF₁R και του ανταγωνισμού της από την ανταλαρμίνη, επεδίωξε να σχεδιάσει, συνθέσει και να χαρακτηρίσει φαρμακολογικά διάφορα μη πεπτιδικά μόρια που διαθέτουν τον ίδιο κεντρικό δακτύλιο πυριμιδίνης στο μόριο τους με εκείνον της ανταλαρμίνης.

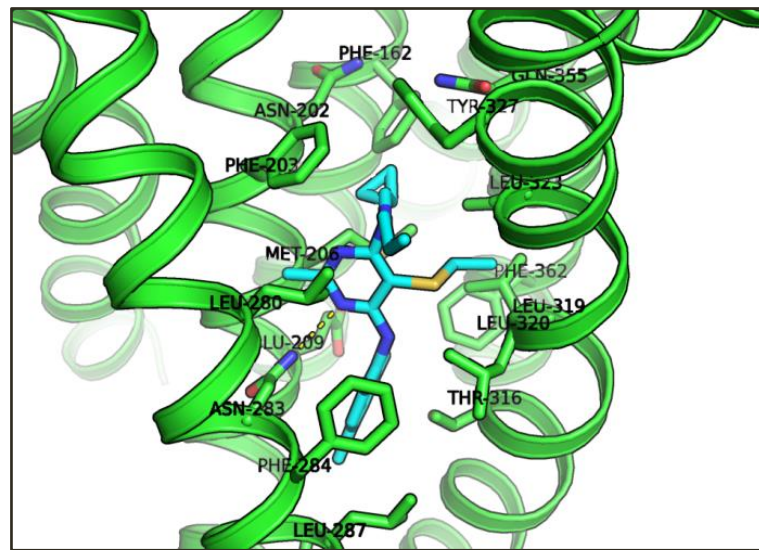
Συγκεκριμένα, σε συνεργασία με το εργαστήριο οργανικής σύνθεσης του Dr. Hesham Fahmy (Φαρμακευτικής Σχολή Πανεπιστημίου Ν. Ντακότας, Αμερική) πραγματοποιήθηκε ο σχεδιασμός, η σύνθεση, η ταυτοποίηση και ο φαρμακολογικός χαρακτηρισμός μιας σειράς

θειάζολο [4, 5-d] πυριμιδινών (ανάλογα 5a-5v) καθώς και μιας σειράς υποκατεστημένων πυριμιδινών (ανάλογα 1-28). Η παρούσα εργασία αρχικά προσδιόρισε την ικανότητα των αναλόγων αυτών να αναστέλλουν τη δέσμευση του ραδιοσημασμένου αγωνιστή [¹²⁵I]-Tyr⁰-σοβαγίνη στον CRF₁R. Από τα 50 ανάλογα (σειρές 5a-5v και 1-28) που εξετάστηκαν (στη συγκέντρωση των 500 nM) στη παρούσα εργασία μόνο τα ανάλογα 3, 6, 8 και 9 της σειράς των υποκατεστημένων πυριμιδινών μπόρεσαν να μειώσουν την ειδική δέσμευση της [¹²⁵I]-Tyr⁰-σοβαγίνης στον CRF₁R κατά 50% ή περισσότερο. Τα ανάλογα αυτά στη συνέχεια χαρακτηρίστηκαν φαρμακολογικά σε μελέτες ετερόλογης συναγωνιστικής δέσμευσης. Ως ουσία αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η ανταλαρμίνη. Παρόμοια με την ανταλαρμίνη, τα ανάλογα 3, 6, 8 και 9 εκτόπισαν με δόσοεξαρτώμενο τρόπο τη [¹²⁵I]-Tyr⁰-σοβαγίνη από τον CRF₁R, με τα 3 και 9 να έχουν μεγαλύτερη συγγένεια δέσμευσης για τον CRF₁R από τα ανάλογα 6 και 8. Τα πειραματικά αυτά δεδομένα μας επιτρέπουν να χαρακτηρίσουμε τα ανάλογα 3 και 9, ως ανάλογα «οδηγούς» (lead compounds) πάνω στα οποία θα στηριχθούμε για να σχεδιάσουμε και να συνθέσουμε νέα μόρια με βελτιωμένες φαρμακολογικές ιδιότητες.

Σημαντικό ρόλο στο σχεδιασμό νέων μορίων με βάση τα ανάλογα 3 και 9 παίζει ο προσδιορισμός του τρόπου με τον οποίο αυτά δεσμεύονται στον CRF₁R. Για το σκοπό αυτό, με βάση τη κρυσταλλική δομή του CRF₁R (207) και τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, κατασκευάστηκαν (σε συνεργασία με τον Δρ. Μίνω Ματσούκα, Εργαστήριο Μοριακού Σχεδιασμού και βιομοριακού NMR, Φαρμακευτική Σχολή, Πανεπιστήμιο Πατρών), μοριακά πρότυπα του υποδοχέα δεσμευμένου με τα ανάλογα 3 και 9 (Εικόνες 5.8 και 5.9).



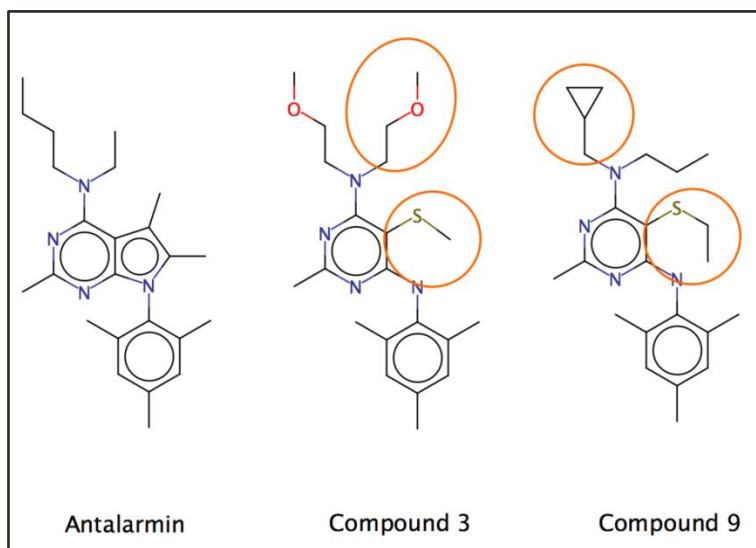
Εικόνα 5.8: Μοριακό πρότυπο που αναπαριστά την αλληλεπίδραση του αναλόγου 3 με τα αμινοξέα των διαμεμβρανικών περιοχών (πράσινες ταινίες) του CRF₁R.



Εικόνα 5.9: Μοριακό πρότυπο που αναπαριστά την αλληλεπίδραση του αναλόγου 9 με τα αμινοξέα των διαμεμβρανικών περιοχών (πράσινες ταινίες) του CRF₁R.

Η αλληλεπίδραση των αναλόγων 3 και 9 με τον CRF₁R φαίνεται να είναι διαφορετική από εκείνη της ανταλαρμίνης γεγονός που εξηγεί τις μικρότερες συγγένειες δέσμευσης που

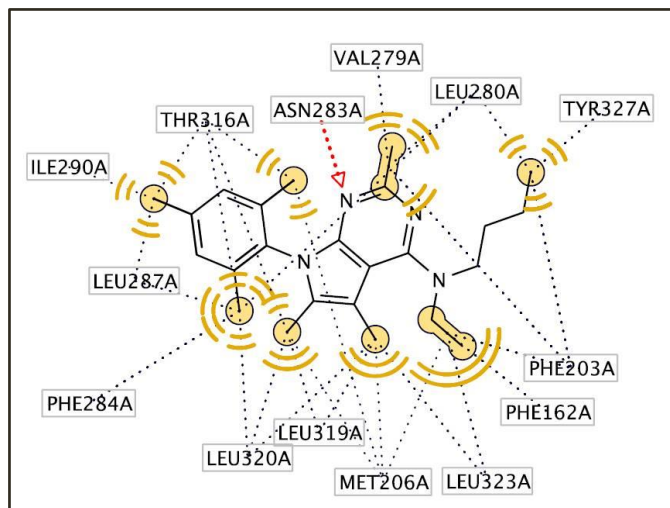
έχουν τα μόρια αυτά για τον CRF₁R από εκείνη της ανταλαρμίνης. Η διαφορετική αυτή αλληλεπίδραση πιθανόν οφείλεται στο ότι τα ανάλογα 3 και 9 αν και διαθέτουν τον κεντρικό δακτύλιο της πυριμιδίνης στο μόριο τους όπως η ανταλαρμίνη διαφέρουν σε κάποια δομικά χαρακτηριστικά από αυτή (Εικόνα 5.10). Συγκεκριμένα η αιθυλομάδα της ανταλαρμίνης που φαίνεται να αλληλεπιδρά με τα αμινοξέα Phe162^{2,57}, Phe203^{3,44}, Leu323^{6,49} και Met206^{3,47} (εικόνα 5.11) στο ανάλογο 3 έχει αντικατασταθεί με μια μεθοξυαιθυλομάδα η οποία δεν μετέχει στις αλληλεπιδράσεις αυτές (ή μέρος αυτών) λόγω στερεοχημικής παρεμπόδισης (Εικόνες 5.10 και 5.11).



Εικόνα 5.10: Αναπαράσταση της δομής της ανταλαρμίνης (*antalarmin*), του αναλόγου 3 (*compound 3*) και του αναλόγου 9 (*compound 9*). Οι χημικές ομάδες των αναλόγων 3 και 9 που διαφέρουν από εκείνες της ανταλαρμίνης και πιθανόν παίζουν ρόλο στο διαφορετικό τρόπο αλληλεπίδρασης τους με τον CRF₁R από εκείνον της ανταλαρμίνης επισημαίνονται με κύκλους.

Επιπρόσθετα, οι αλληλεπιδράσεις που φαίνεται να σχηματίζει η βουτυλομάδα της ανταλαρμίνης με τα αμινοξέα Phe203^{3,44}, Leu280^{5,47} και Tyr327^{6,53} καταργούνται για το ανάλογο 9 το οποίο στη θέση αυτή διαθέτει την ομάδα *c*-propyl-CH₂ που δεν ευνοεί στον σχηματισμό τους (Εικόνες 5.10 και 5.11). Τέλος οι αλληλεπιδράσεις που σχηματίζουν οι δυο μεθυλομάδες του πυρρολικού δακτυλίου της ανταλαρμίνης με τα αμινοξέα Met206^{3,47},

Leu319^{6.45}, Leu320^{6.46} και Leu323^{6.49} καταργούνται τόσο στο ανάλογο 3 όσο και στο ανάλογο 9 που δεν διαθέτουν πυρρολικό δακτύλιο αλλά μέθυλθειο- ή αιθύλθειο- υποκαταστάτη στη θέση 5 του δακτυλίου της πυριμιδίνης (Εικόνες 5.10 και 5.11).



Εικόνα 5.11: Δισδιάστατη αναπαράσταση του δικτύου των αλληλεπιδράσεων της ανταλαρμίνης με αμινοξέα των TMs του CRF₁R.

5.5 Γενικό συμπέρασμα

Συμπερασματικά στη παρούσα εργασία, λάβαμε πληροφορίες για τη δομή της τρίτης διαμεμβρανικής περιοχής (TM3) του CRF₁R και προσδιορίσαμε τα αμινοξέα της που παίζουν ρόλο στην ενεργοποίηση του υποδοχέα από πεπτίδια-αγωνιστές. Η ενεργοποίηση του CRF₁R σχετίζεται με μετακίνηση της TM3 σε σχέση με άλλες διαμεμβρανικές περιοχές (TM_s) του υποδοχέα. Τα αμινοξέα της TM3 επίσης δεσμεύουν μικρομοριακούς μη πεπτιδικούς ανταγωνιστές με αποτέλεσμα αυτοί παρεμβαλλόμενοι μεταξύ των TM_s να εμποδίζουν κινήσεις τους που σχετίζονται με την ενεργοποίηση του CRF₁R. Παράλληλα στη παρούσα εργασία, δημιουργήσαμε νέα μη πεπτιδικά ανάλογα που δεσμεύονται στον CRF₁R και προσδιορίσαμε θεωρητικά το τρόπο αλληλεπίδρασης τους με τον υποδοχέα αυτόν. Τα ανάλογα αυτά θα χρησιμοποιηθούν ως «οδηγοί» (lead compounds) για να σχεδιάσουμε και να συνθέσουμε νέα CRF₁R-εκλεκτικά μόρια με βελτιωμένες φαρμακολογικές ιδιότητες που θα εμπλουτίσουν το φαρμακευτικό οπλοστάσιο για την αντιμετώπιση ασθενειών που εμπλέκεται ο CRF₁R, όπως το άγχος και η κατάθλιψη.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Chrousos, G. P. (1998) *Ann N Y Acad Sci* **851**, 311-335
2. Cannon, W. (1914) *Am J Physiol* **33**, 356–372
3. Chrousos, G. P., and Gold, P. W. (1992) *JAMA* **267**, 1244-1252
4. Selye, H. (1936) *Nature* **138**
5. Selye, H. (1976) *Stress in health and disease*, Butterworth's, Inc. Boston, MA:.
6. Szabo, S., Tache, Y., and Somogyi, A. (2012) *Stress* **15**, 472-478
7. Harris, G. W. (1948) *Physiol Rev* **28**, 139-179
8. Saffran, M., and Schally, A. V. (1955) *Can J Biochem Physiol* **33**, 408-415
9. Vale, W., Spiess, J., Rivier, C., and Rivier, J. (1981) *Science* **213**, 1394-1397
10. Favrod-Coune, C.-A., Gaillard, R. C., Langevin, H., Jaquier, M.-C., Dolci, W., and Muller, A. F. (1986) *Life Sciences* **39**, 2475-2481
11. Swanson, L. W., Sawchenko, P. E., Rivier, J., and Vale, W. W. (1983) *Neuroendocrinology* **36**, 165-186
12. Merchenthaler, I. (1984) *Peptides* **5**, 53-69
13. Palkovits, M., Brownstein, M. J., and Vale, W. (1985) *Fed Proc* **44**, 215-219
14. Takahashi, K., Mouri, T., Yamamoto, T., Itoi, K., Murakami, O., Yoshinaga, K., and Sasano, N. (1989) *Endocrinol Jpn* **36**, 275-280
15. Owens, M. J., and Nemeroff, C. B. (1991) *Pharmacological Reviews* **43**, 425-473
16. Bruhn, T. O., Engeland, W. C., Anthony, E. L., Gann, D. S., and Jackson, I. M. (1987) *Ann N Y Acad Sci* **512**, 115-128

17. Petrusz, P., Merchenthaler, I., Maderdrut, J. L., Vigh, S., and Schally, A. V. (1983) *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 1721-1725
18. Petrusz, P., Merchenthaler, I., Ordronneau, P., Maderdrut, J. L., Vigh, S., and Schally, A. V. (1984) *Peptides* **5 Suppl 1**, 71-78
19. SUDA, T., TOMORI, N., TOZAWA, F., DEMURA, H., SHIZUME, K., MOURI, T., MIURA, Y., and SASANO, N. (1984) *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **58**, 919-924
20. SUDA, T., TOMORI, N., TOZAWA, F., MOURI, T., DEMURA, H., and SHIZUME, K. (1984) *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **59**, 861-866
21. Wolter, H. J. (1984) *Biochem Biophys Res Commun* **122**, 381-387
22. Slominski, A., Ermak, G., Hwang, J., Chakraborty, A., Mazurkiewicz, J. E., and Mihm, M. (1995) *FEBS Letters* **374**, 113-116
23. Makrigiannakis, A., Zoumakis, E., Margioris, A. N., Theodoropoulos, P., Stournaras, C., and Gravanis, A. (1995) *J Clin Endocrinol Metab* **80**, 185-189
24. Sasaki, A., Tempst, P., Liotta, A. S., Margioris, A. N., Hood, L. E., Kent, S. B., Sato, S., Shinkawa, O., Yoshinaga, K., and Krieger, D. T. (1988) *J Clin Endocrinol Metab* **67**, 768-773
25. Yoon, D. J., Sklar, C., and David, R. (1988) *Endocrinology* **122**, 759-761
26. Kalantaridou, S. N., Zoumakis, E., Makrigiannakis, A., Lavasidis, L. G., Vrekoussis, T., and Chrousos, G. P. (2010) *J Reprod Immunol* **85**, 33-39
27. Ekman, R., Serenius, B., Castro, M. G., Lowry, P. J., Cederlund, A. S., Bergman, O., and Sjogren, H. O. (1993) *J Neuroimmunol* **44**, 7-13
28. Stephanou, A., Jessop, D. S., Knight, R. A., and Lightman, S. L. (1990) *Brain Behav Immun* **4**, 67-73
29. Ciocca, D. R., Puy, L. A., Fasoli, L. C., Tello, O., Aznar, J. C., Gago, F. E., Papa, S. I., and Sonego, R. (1990) *Breast Cancer Res Treat* **15**, 175-184
30. Demay, M. C. R., Proeschel, M. F., De Keyzer, Y., Bertagna, X., Luton, J. P., and Girard, F. (1988) *Clinical Endocrinology* **29**, 649-657
31. Esch, F., Ling, N., Bohlen, P., Baird, A., Benoit, R., and Guillemin, R. (1984) *Biochem Biophys Res Commun* **122**, 899-905

32. Ling, N., Esch, F., Bohlen, P., Baird, A., and Guillemin, R. (1984) *Biochem Biophys Res Commun* **122**, 1218-1224
33. Okawara, Y., Morley, S. D., Burzio, L. O., Zwiers, H., Lederis, K., and Richter, D. (1988) *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 8439-8443
34. Patthy, M., Horvath, J., Mason-Garcia, M., Szoke, B., Schlesinger, D. H., and Schally, A. V. (1985) *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 8762-8766
35. Rivier, J., Spiess, J., and Vale, W. (1983) *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 4851-4855
36. Shibahara, S., Morimoto, Y., Furutani, Y., Notake, M., Takahashi, H., Shimizu, S., Horikawa, S., and Numa, S. (1983) *EMBO J* **2**, 775-779
37. Stenzel-Poore, M. P., Heldwein, K. A., Stenzel, P., Lee, S., and Vale, W. W. (1992) *Mol Endocrinol* **6**, 1716-1724
38. Dautzenberg, F. M., and Hauger, R. L. (2002) *Trends Pharmacol Sci* **23**, 71-77
39. Liapakis, G., Venihaki, M., Margioris, A., Grigoriadis, D., and Gkountelias, K. (2011) *Current Medicinal Chemistry* **18**, 2583-2600
40. Lederis, K., Letter, A., McMaster, D., Moore, G., and Schlesinger, D. (1982) *Science* **218**, 162-165
41. Montecucchi, P. C., and Henschen, A. (1981) *Int J Pept Protein Res* **18**, 113-120
42. Vaughan, J., Donaldson, C., Bittencourt, J., Perrin, M. H., Lewis, K., Sutton, S., Chan, R., Turnbull, A. V., Lovejoy, D., Rivier, C., and et al. (1995) *Nature* **378**, 287-292
43. Donaldson, C. J., Sutton, S. W., Perrin, M. H., Corrigan, A. Z., Lewis, K. A., Rivier, J. E., Vaughan, J. M., and Vale, W. W. (1996) *Endocrinology* **137**, 2167-2170
44. Hillhouse, E. W., and Grammatopoulos, D. K. (2006) *Endocr Rev* **27**, 260-286
45. Reul, J. M., and Holsboer, F. (2002) *Curr Opin Pharmacol* **2**, 23-33
46. Wong, M. L., al-Shehlee, A., Bongiorno, P. B., Esposito, A., Khatri, P., Sternberg, E. M., Gold, P. W., and Licinio, J. (1996) *Mol Psychiatry* **1**, 307-312
47. Boorse, G. C., and Denver, R. J. (2006) *General and Comparative Endocrinology* **146**, 9-18

48. Reyes, T. M., Lewis, K., Perrin, M. H., Kunitake, K. S., Vaughan, J., Arias, C. A., Hogenesch, J. B., Gulyas, J., Rivier, J., Vale, W. W., and Sawchenko, P. E. (2001) *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 2843-2848
49. Imperatore, A., Florio, P., Torres, P. B., Torricelli, M., Galleri, L., Toti, P., Occhini, R., Picciolini, E., Vale, W., and Petraglia, F. (2006) *Am J Obstet Gynecol* **195**, 288-295
50. Yamauchi, N., Otagiri, A., Nemoto, T., Sekino, A., Oono, H., Kato, I., Yanaihara, C., and Shibasaki, T. (2005) *J Neuroendocrinol* **17**, 656-663
51. Lewis, K., Li, C., Perrin, M. H., Blount, A., Kunitake, K., Donaldson, C., Vaughan, J., Reyes, T. M., Gulyas, J., Fischer, W., Bilezikjian, L., Rivier, J., Sawchenko, P. E., and Vale, W. W. (2001) *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 7570-7575
52. Hsu, S. Y., and Hsueh, A. J. (2001) *Nat Med* **7**, 605-611
53. Takahashi, K., Totsune, K., Murakami, O., and Shibahara, S. (2004) *Peptides* **25**, 1723-1731
54. Rivier, J., Gulyas, J., Kunitake, K., DiGrucchio, M., Cattle, J. P., Perrin, M. H., Donaldson, C., Vaughan, J., Million, M., Gourcerol, G., Adelson, D. W., Rivier, C., Tache, Y., and Vale, W. (2007) *J Med Chem* **50**, 1668-1674
55. Gulyas, J., Rivier, C., Perrin, M., Koerber, S. C., Sutton, S., Corrigan, A., Lahrachi, S. L., Craig, A. G., Vale, W., and Rivier, J. (1995) *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 10575-10579
56. Rivier, J., Gulyas, J., Kirby, D., Low, W., Perrin, M. H., Kunitake, K., DiGrucchio, M., Vaughan, J., Reubi, J. C., Waser, B., Koerber, S. C., Martinez, V., Wang, L., Tache, Y., and Vale, W. (2002) *J Med Chem* **45**, 4737-4747
57. Ruhmann, A., Bonk, I., Lin, C. R., Rosenfeld, M. G., and Spiess, J. (1998) *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 15264-15269
58. Rivier, J. E., and Rivier, C. L. (2014) *Front Neuroendocrinol* **35**, 161-170
59. Tezval, H., Jahn, O., Todorovic, C., Sasse, A., Eckart, K., and Spiess, J. (2004) *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 9468-9473
60. McCarthy, J. R., Heinrichs, S. C., and Grigoriadis, D. E. (1999) *Curr Pharm Des* **5**, 289-315
61. Webster, E. L., Lewis, D. B., Torpy, D. J., Zachman, E. K., Rice, K. C., and Chrousos, G. P. (1996) *Endocrinology* **137**, 5747-5750

62. Pallai, P. V., Mabilia, M., Goodman, M., Vale, W., and Rivier, J. (1983) *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 6770-6774
63. Dathe, M., Fabian, H., Gast, K., Zirwer, D., Winter, R., Beyermann, M., Schumann, M., and Bienert, M. (1996) *Int J Pept Protein Res* **47**, 383-393
64. Lau, S. H., Rivier, J., Vale, W., Kaiser, E. T., and Kezdy, F. J. (1983) *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 7070-7074
65. Rivier, J., Rivier, C., and Vale, W. (1984) *Science* **224**, 889-891
66. Heinrich, N., Meyer, M. R., Furkert, J., Sasse, A., Beyermann, M., Bonigk, W., and Berger, H. (1998) *Endocrinology* **139**, 651-658
67. Rivier, J., Rivier, C., Galyean, R., Miranda, A., Miller, C., Craig, A. G., Yamamoto, G., Brown, M., and Vale, W. (1993) *J Med Chem* **36**, 2851-2859
68. Rothmund, S., Krause, E., Beyermann, M., Dathe, M., Bienert, M., Hodges, R. S., Sykes, B. D., and Sonnichsen, F. D. (1996) *Pept Res* **9**, 79-87
69. Beyermann, M., Rothmund, S., Heinrich, N., Fechner, K., Furkert, J., Dathe, M., Winter, R., Krause, E., and Bienert, M. (2000) *J Biol Chem* **275**, 5702-5709
70. Ohta, N., Mochizuki, T., Hoshino, M., Jun, L., Kobayashi, H., and Yanaihara, N. (1997) *J Pept Res* **50**, 178-183
71. Kornreich, W. D., Galyean, R., Hernandez, J. F., Craig, A. G., Donaldson, C. J., Yamamoto, G., Rivier, C., Vale, W., and Rivier, J. (1992) *J Med Chem* **35**, 1870-1876
72. Wynn, P. C., Aguilera, G., Morell, J., and Catt, K. J. (1983) *Biochem Biophys Res Commun* **110**, 602-608
73. Dashwood, M. R., Andrews, H. E., and Wei, E. T. (1987) *Eur J Pharmacol* **135**, 111-112
74. Dave, J. R., Eiden, L. E., and Eskay, R. L. (1985) *Endocrinology* **116**, 2152-2159
75. De Souza, E. B., Insel, T. R., Perrin, M. H., Rivier, J., Vale, W. W., and Kuhar, M. J. (1985) *J Neurosci* **5**, 3189-3203
76. Udelsman, R., Harwood, J. P., Millan, M. A., Chrousos, G. P., Goldstein, D. S., Zimlichman, R., Catt, K. J., and Aguilera, G. (1986) *Nature* **319**, 147-150
77. Webster, E. L., Battaglia, G., and De Souza, E. B. (1989) *Peptides* **10**, 395-401

78. Webster, E. L., and De Souza, E. B. (1988) *Endocrinology* **122**, 609-617
79. Webster, E. L., Tracey, D. E., Jutila, M. A., Wolfe, S. A., Jr., and De Souza, E. B. (1990) *Endocrinology* **127**, 440-452
80. De Souza, E. B. (1995) *Psychoneuroendocrinology* **20**, 789-819
81. Grigoriadis, D. E., and De Souza, E. B. (1989) *Endocrinology* **125**, 1877-1888
82. Perrin, M. H., Haas, Y., Rivier, J. E., and Vale, W. W. (1986) *Endocrinology* **118**, 1171-1179
83. Chen, R., Lewis, K. A., Perrin, M. H., and Vale, W. W. (1993) *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 8967-8971
84. Fredriksson, R., Lagerstrom, M. C., Lundin, L. G., and Schioth, H. B. (2003) *Mol Pharmacol* **63**, 1256-1272
85. Liapakis, G., Matsoukas, T., Karageorgos, V., Venihaki, M., and Mavromoustakos, T. (2016) *Current Medicinal Chemistry*
86. Grigoriadis, D. E., Lovenberg, T. W., Chalmers, D. T., Liaw, C., and De Souza, E. B. (1996) *Ann N Y Acad Sci* **780**, 60-80
87. Martinez, V., Wang, L., Rivier, J. E., Vale, W., and Tache, Y. (2002) *J Pharmacol Exp Ther* **301**, 611-617
88. Lovenberg, T. W., Liaw, C. W., Grigoriadis, D. E., Clevenger, W., Chalmers, D. T., De Souza, E. B., and Oltersdorf, T. (1995) *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 836-840
89. Eckart, K., Jahn, O., Radulovic, J., Radulovic, M., Blank, T., Stiedl, O., Brauns, O., Tezval, H., Zeyda, T., and Spiess, J. (2002) *Receptors Channels* **8**, 163-177
90. Kostich, W. A., Chen, A., Sperle, K., and Largent, B. L. (1998) *Mol Endocrinol* **12**, 1077-1085
91. Chatzaki, E., Crowe, P. D., Wang, L., Million, M., Tache, Y., and Grigoriadis, D. E. (2004) *J Neurochem* **90**, 309-316
92. Chatzaki, E., Murphy, B. J., Wang, L., Million, M., Ohning, G. V., Crowe, P. D., Petroski, R., Tache, Y., and Grigoriadis, D. E. (2004) *J Neurochem* **88**, 1-11

93. Heldwein, K. A., Duncan, J. E., Stenzel, P., Rittenberg, M. B., and Stenzel-Poore, M. P. (1997) *Mol Cell Endocrinol* **131**, 167-172
94. Kishimoto, T., Pearce, R. V., 2nd, Lin, C. R., and Rosenfeld, M. G. (1995) *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 1108-1112
95. Nozu, T., Martinez, V., Rivier, J., and Tache, Y. (1999) *Am J Physiol* **276**, G867-874
96. Palchadhuri, M. R., Hauger, R. L., Wille, S., Fuchs, E., and Dautzenberg, F. M. (1999) *J Neuroendocrinol* **11**, 419-428
97. Seres, J., Bornstein, S. R., Seres, P., Willenberg, H. S., Schulte, K. M., Scherbaum, W. A., and Ehrhart-Bornstein, M. (2004) *J Clin Endocrinol Metab* **89**, 965-970
98. Slominski, A., Pisarchik, A., Tobin, D. J., Mazurkiewicz, J. E., and Wortsman, J. (2004) *Endocrinology* **145**, 941-950
99. Arai, M., Assil, I. Q., and Abou-Samra, A. B. (2001) *Endocrinology* **142**, 446-454
100. Im, E. (2014) *Intest Res* **12**, 96-102
101. Chalmers, D. T., Lovenberg, T. W., Grigoriadis, D. E., Behan, D. P., and De Souza, E. B. (1996) *Trends Pharmacol Sci* **17**, 166-172
102. Dautzenberg, F. M., Py-Lang, G., Higelin, J., Fischer, C., Wright, M. B., and Huber, G. (2001) *J Pharmacol Exp Ther* **296**, 113-120
103. Perrin, M. H., and Vale, W. W. (1999) *Ann N Y Acad Sci* **885**, 312-328
104. Chang, C. P., Pearce, R. V., 2nd, O'Connell, S., and Rosenfeld, M. G. (1993) *Neuron* **11**, 1187-1195
105. Perrin, M., Donaldson, C., Chen, R., Blount, A., Berggren, T., Bilezikjian, L., Sawchenko, P., and Vale, W. (1995) *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 2969-2973
106. Grammatopoulos, D. K., Randeva, H. S., Levine, M. A., Kanellopoulou, K. A., and Hillhouse, E. W. (2001) *J Neurochem* **76**, 509-519
107. Brar, B. K., Chen, A., Perrin, M. H., and Vale, W. (2004) *Endocrinology* **145**, 1718-1729
108. Punj, A., Levine, M. A., and Grammatopoulos, D. K. (2006) *Mol Endocrinol* **20**, 3179-3195

109. Grammatopoulos, D. K. (2012) *British Journal of Pharmacology* **166**, 85-97
110. Birnbaumer, L., Perez-Reyes, E., Bertrand, P., Gudermann, T., Wei, X. Y., Kim, H., Castellano, A., and Codina, J. (1991) *Biol Reprod* **44**, 207-224
111. Shaywitz, A. J., and Greenberg, M. E. (1999) *Annu Rev Biochem* **68**, 821-861
112. Kovalovsky, D., Refojo, D., Liberman, A. C., Hochbaum, D., Pereda, M. P., Coso, O. A., Stalla, G. K., Holsboer, F., and Arzt, E. (2002) *Mol Endocrinol* **16**, 1638-1651
113. Traver, S., Marien, M., Martin, E., Hirsch, E. C., and Michel, P. P. (2006) *Mol Pharmacol* **70**, 30-40
114. Valentino, R. J., Van Bockstaele, E., and Bangasser, D. (2013) *Trends in Pharmacological Sciences* **34**, 437-444
115. Dautzenberg, F. M., Gutknecht, E., Van der Linden, I., Olivares-Reyes, J. A., Durrenberger, F., and Hauger, R. L. (2004) *Biochem Pharmacol* **68**, 1833-1844
116. Grammatopoulos, D. K., Randeva, H. S., Levine, M. A., Katsanou, E. S., and Hillhouse, E. W. (2000) *Mol Endocrinol* **14**, 2076-2091
117. Markovic, D., Pun, A., Lehnert, H., and Grammatopoulos, D. K. (2008) *Mol Endocrinol* **22**, 689-706
118. Dermitzaki, E., Tsatsanis, C., Charalampopoulos, I., Androulidaki, A., Alexaki, V. I., Castanas, E., Gravanis, A., and Margioris, A. N. (2005) *Biochem Biophys Res Commun* **327**, 828-836
119. Dermitzaki, E., Tsatsanis, C., Gravanis, A., and Margioris, A. N. (2002) *J Biol Chem* **277**, 12280-12287
120. Kovacs, K. J. (2013) *J Chem Neuroanat* **54**, 25-33
121. Stratakis, C. A., and Chrousos, G. P. (1995) *Ann N Y Acad Sci* **771**, 1-18
122. Tsigos, C., and Chrousos, G. P. (2002) *J Psychosom Res* **53**, 865-871
123. Chrousos, G. P. (2009) *Nat Rev Endocrinol* **5**, 374-381
124. Chrousos, G. P., and Kino, T. (2005) *Sci STKE* **2005**, pe48

125. Chrousos, G. P., and Kino, T. (2007) *Stress* **10**, 213-219
126. Elenkov, I. J., Kvetnansky, R., Hashiramoto, A., Bakalov, V. K., Link, A. A., Zachman, K., Crane, M., Jezova, D., Rovensky, J., Dimitrov, M. A., Gold, P. W., Bonini, S., Fleisher, T., Chrousos, G. P., and Wilder, R. L. (2008) *J Immunol* **181**, 1737-1745
127. Karalis, K., Sano, H., Redwine, J., Listwak, S., Wilder, R. L., and Chrousos, G. P. (1991) *Science* **254**, 421-423
128. Nicolaides, N. C., Kyratzi, E., Lamprokostopoulou, A., Chrousos, G. P., and Charmandari, E. (2015) *Neuroimmunomodulation* **22**, 6-19
129. Theoharides, T. C., Singh, L. K., Boucher, W., Pang, X., Letourneau, R., Webster, E., and Chrousos, G. (1998) *Endocrinology* **139**, 403-413
130. Theoharides, T. C., Spanos, C., Pang, X., Alferes, L., Ligris, K., Letourneau, R., Rozniecki, J. J., Webster, E., and Chrousos, G. P. (1995) *Endocrinology* **136**, 5745-5750
131. Tallman, J., Cassella, J., and Kehne, J. (2002) *Mechanism of action of anxiolytics*,
132. Smith, S. M., and Vale, W. W. (2006) *Dialogues Clin Neurosci* **8**, 383-395
133. Chrousos, G. P. (2000) *Int J Obes Relat Metab Disord* **24 Suppl 2**, S50-55
134. Hauger, R. L., Risbrough, V., Oakley, R. H., Olivares-Reyes, J. A., and Dautzenberg, F. M. (2009) *Ann N Y Acad Sci* **1179**, 120-143
135. Grigoriadis, D. E. (2005) *Expert Opin Ther Targets* **9**, 651-684
136. Holsboer, F., and Ising, M. (2008) *Eur J Pharmacol* **583**, 350-357
137. Arato, M., Banki, C. M., Bissette, G., and Nemeroff, C. B. (1989) *Biol Psychiatry* **25**, 355-359
138. Nemeroff, C. B., Widerlov, E., Bissette, G., Walleus, H., Karlsson, I., Eklund, K., Kilts, C. D., Loosen, P. T., and Vale, W. (1984) *Science* **226**, 1342-1344
139. Gold, P. W., Goodwin, F. K., and Chrousos, G. P. (1988) *N Engl J Med* **319**, 413-420
140. Arborelius, L., Owens, M. J., Plotsky, P. M., and Nemeroff, C. B. (1999) *J Endocrinol* **160**, 1-12

141. Raadsheer, F. C., van Heerikhuize, J. J., Lucassen, P. J., Hoogendijk, W. J., Tilders, F. J., and Swaab, D. F. (1995) *Am J Psychiatry* **152**, 1372-1376
142. Bissette, G., Klimek, V., Pan, J., Stockmeier, C., and Ordway, G. (2003) *Neuropsychopharmacology* **28**, 1328-1335
143. Merali, Z., Du, L., Hrdina, P., Palkovits, M., Faludi, G., Poulter, M. O., and Anisman, H. (2004) *J Neurosci* **24**, 1478-1485
144. Hauger, R. L., Risbrough, V., Brauns, O., and Dautzenberg, F. M. (2006) *CNS Neurol Disord Drug Targets* **5**, 453-479
145. Wang, S. S., Kamphuis, W., Huitinga, I., Zhou, J. N., and Swaab, D. F. (2008) *Mol Psychiatry* **13**, 786-799, 741
146. Altemus, M., Pigott, T., Kalogeras, K. T., Demitrack, M., Dubbert, B., Murphy, D. L., and Gold, P. W. (1992) *Arch Gen Psychiatry* **49**, 9-20
147. Bremner, J. D., Licinio, J., Darnell, A., Krystal, J. H., Owens, M. J., Southwick, S. M., Nemeroff, C. B., and Charney, D. S. (1997) *Am J Psychiatry* **154**, 624-629
148. Muller, M. B., and Wurst, W. (2004) *Trends Mol Med* **10**, 409-415
149. Stenzel-Poore, M. P., Heinrichs, S. C., Rivest, S., Koob, G. F., and Vale, W. W. (1994) *J Neurosci* **14**, 2579-2584
150. Refojo, D., Echenique, C., Muller, M. B., Reul, J. M., Deussing, J. M., Wurst, W., Sillaber, I., Paez-Pereda, M., Holsboer, F., and Arzt, E. (2005) *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 6183-6188
151. Timpl, P., Spanagel, R., Sillaber, I., Kresse, A., Reul, J. M., Stalla, G. K., Blanquet, V., Steckler, T., Holsboer, F., and Wurst, W. (1998) *Nat Genet* **19**, 162-166
152. Muller, M. B., Zimmermann, S., Sillaber, I., Hagemeyer, T. P., Deussing, J. M., Timpl, P., Kormann, M. S., Droste, S. K., Kuhn, R., Reul, J. M., Holsboer, F., and Wurst, W. (2003) *Nat Neurosci* **6**, 1100-1107
153. Okuyama, S., Chaki, S., Kawashima, N., Suzuki, Y., Ogawa, S., Nakazato, A., Kumagai, T., Okubo, T., and Tomisawa, K. (1999) *J Pharmacol Exp Ther* **289**, 926-935
154. Holsboer, F. (2001) *CNS Spectr* **6**, 590-594
155. Chrousos, G. P. (2000) *Ann N Y Acad Sci* **917**, 38-67

156. Besedovsky, H., del Rey, A., Sorkin, E., and Dinarello, C. A. (1986) *Science* **233**, 652-654
157. Quintanar, J. L., and Guzman-Soto, I. (2013) *Front Integr Neurosci* **7**, 56
158. Karalis, K., Muglia, L. J., Bae, D., Hilderbrand, H., and Majzoub, J. A. (1997) *J Neuroimmunol* **72**, 131-136
159. Elenkov, I. J., and Chrousos, G. P. (1999) *Trends Endocrinol Metab* **10**, 359-368
160. Habib, K. E., Gold, P. W., and Chrousos, G. P. (2001) *Endocrinol Metab Clin North Am* **30**, 695-728; vii-viii
161. Stengel, A., and Tache, Y. (2010) *Exp Biol Med (Maywood)* **235**, 1168-1178
162. Tache, Y., Goto, Y., Gunion, M., Rivier, J., and Debas, H. (1984) *Gastroenterology* **86**, 281-286
163. Tache, Y., Martinez, V., Million, M., and Wang, L. (2001) *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **280**, G173-177
164. Lenz, H. J., Burlage, M., Raedler, A., and Greten, H. (1988) *Gastroenterology* **94**, 598-602
165. Tache, Y., Maeda-Hagiwara, M., and Turkelson, C. M. (1987) *Am J Physiol* **253**, G241-245
166. Monnikes, H., Schmidt, B. G., Raybould, H. E., and Tache, Y. (1992) *Am J Physiol* **262**, G137-143
167. Tache, Y., and Bonaz, B. (2007) *J Clin Invest* **117**, 33-40
168. Lenz, H. J., Raedler, A., Greten, H., Vale, W. W., and Rivier, J. E. (1988) *Gastroenterology* **95**, 1510-1517
169. Martinez, V., and Tache, Y. (2006) *Curr Pharm Des* **12**, 4071-4088
170. Martinez, V., Wang, L., Rivier, J., Grigoriadis, D., and Tache, Y. (2004) *J Physiol* **556**, 221-234
171. Porcher, C., Juhem, A., Peinnequin, A., Sinniger, V., and Bonaz, B. (2005) *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **288**, G1091-1103

172. Maillot, C., Million, M., Wei, J. Y., Gauthier, A., and Tache, Y. (2000) *Gastroenterology* **119**, 1569-1579
173. Williams, C. L., Peterson, J. M., Villar, R. G., and Burks, T. F. (1987) *Am J Physiol* **253**, G582-586
174. Tache, Y., and Perdue, M. H. (2004) *Neurogastroenterol Motil* **16 Suppl 1**, 137-142
175. Larauche, M., Gourcerol, G., Wang, L., Pambukchian, K., Brunnhuber, S., Adelson, D. W., Rivier, J., Million, M., and Tache, Y. (2009) *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **297**, G215-227
176. Million, M., Maillot, C., Saunders, P., Rivier, J., Vale, W., and Tache, Y. (2002) *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **282**, G34-40
177. Kiank, C., Tache, Y., and Larauche, M. (2010) *Brain Behav Immun* **24**, 41-48
178. Million, M., Grigoriadis, D. E., Sullivan, S., Crowe, P. D., McRoberts, J. A., Zhou, H., Saunders, P. R., Maillot, C., Mayer, E. A., and Tache, Y. (2003) *Brain Res* **985**, 32-42
179. Habib, K. E., Weld, K. P., Rice, K. C., Pushkas, J., Champoux, M., Listwak, S., Webster, E. L., Atkinson, A. J., Schulkin, J., Contoreggi, C., Chrousos, G. P., McCann, S. M., Suomi, S. J., Higley, J. D., and Gold, P. W. (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 6079-6084
180. Martinez, V., Barquist, E., Rivier, J., and Tache, Y. (1998) *Am J Physiol* **274**, G965-970
181. Santos, J., Saunders, P. R., Hanssen, N. P., Yang, P. C., Yates, D., Groot, J. A., and Perdue, M. H. (1999) *Am J Physiol* **277**, G391-399
182. Fisher, L. A., Jessen, G., and Brown, M. R. (1983) *Regul Pept* **5**, 153-161
183. Grunt, M., Glaser, J., Schmidhuber, H., Pauschinger, P., and Born, J. (1993) *Am J Physiol* **264**, H1124-1129
184. Grunt, M., Haug, C., Duntas, L., Pauschinger, P., Maier, V., and Pfeiffer, E. F. (1992) *Horm Metab Res* **24**, 56-59
185. Terui, K., Higashiyama, A., Horiba, N., Furukawa, K. I., Motomura, S., and Suda, T. (2001) *J Endocrinol* **169**, 177-183
186. Chen, C. Y., Doong, M. L., Rivier, J. E., and Tache, Y. (2003) *Regul Pept* **113**, 125-130
187. Abdelrahman, A. M., Lin Lim, S., and Pang, C. C. (2005) *Eur J Pharmacol* **510**, 107-111

188. Gardiner, S. M., March, J. E., Kemp, P. A., and Bennett, T. (2007) *J Pharmacol Exp Ther* **321**, 221-226
189. Gardiner, S. M., March, J. E., Kemp, P. A., Davenport, A. P., Wiley, K. E., and Bennett, T. (2005) *J Pharmacol Exp Ther* **312**, 53-60
190. Kimura, Y., Takahashi, K., Totsune, K., Muramatsu, Y., Kaneko, C., Darnel, A. D., Suzuki, T., Ebina, M., Nukiwa, T., and Sasano, H. (2002) *J Clin Endocrinol Metab* **87**, 340-346
191. Nishikimi, T., Miyata, A., Horio, T., Yoshihara, F., Nagaya, N., Takishita, S., Yutani, C., Matsuo, H., Matsuoka, H., and Kangawa, K. (2000) *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **279**, H3031-3039
192. Okosi, A., Brar, B. K., Chan, M., D'Souza, L., Smith, E., Stephanou, A., Latchman, D. S., Chowdrey, H. S., and Knight, R. A. (1998) *Neuropeptides* **32**, 167-171
193. Zorrilla, E. P., and Koob, G. F. (2010) *Drug Discov Today* **15**, 371-383
194. Abreu, M. E., Rzeszotarski, W., Kyle, D. J., Hiner, R. N., and Elliott, R. L. (1991) Corticotropin-releasing factor antagonism compounds. Google Patents
195. Beck, J. P., Arvanitis, A. G., Curry, M. A., Rescinito, J. T., Fitzgerald, L. W., Gilligan, P. J., Zaczek, R., and Trainor, G. L. (1999) *Bioorg Med Chem Lett* **9**, 967-972
196. Beck, J. P., Curry, M. A., Chorvat, R. J., Fitzgerald, L. W., Gilligan, P. J., Zaczek, R., and Trainor, G. L. (1999) *Bioorg Med Chem Lett* **9**, 1185-1188
197. Chen, C., Dagnino, R., Jr., De Souza, E. B., Grigoriadis, D. E., Huang, C. Q., Kim, K. I., Liu, Z., Moran, T., Webb, T. R., Whitten, J. P., Xie, Y. F., and McCarthy, J. R. (1996) *J Med Chem* **39**, 4358-4360
198. Chen, Y. L., Obach, R. S., Braselton, J., Corman, M. L., Forman, J., Freeman, J., Gallaschun, R. J., Mansbach, R., Schmidt, A. W., Sprouse, J. S., Tingley Iii, F. D., Winston, E., and Schulz, D. W. (2008) *J Med Chem* **51**, 1385-1392
199. Huang, C. Q., Wilcoxon, K., McCarthy, J. R., Haddach, M., Webb, T. R., Gu, J., Xie, Y. F., Grigoriadis, D. E., and Chen, C. (2003) *Bioorg Med Chem Lett* **13**, 3375-3379
200. Wustrow, D. J., Capiris, T., Rubin, R., Knobelsdorf, J. A., Akunne, H., Davis, M. D., MacKenzie, R., Pugsley, T. A., Zoski, K. T., Heffner, T. G., and Wise, L. D. (1998) *Bioorg Med Chem Lett* **8**, 2067-2070

201. Yoon, T., De Lombaert, S., Brodbeck, R., Gulianello, M., Chandrasekhar, J., Horvath, R. F., Ge, P., Kershaw, M. T., Krause, J. E., Kehne, J., Hoffman, D., Doller, D., and Hodgetts, K. J. (2008) *Bioorg Med Chem Lett* **18**, 891-896
202. Yoon, T., De Lombaert, S., Brodbeck, R., Gulianello, M., Krause, J. E., Hutchison, A., Horvath, R. F., Ge, P., Kehne, J., Hoffman, D., Chandrasekhar, J., Doller, D., and Hodgetts, K. J. (2008) *Bioorg Med Chem Lett* **18**, 4486-4490
203. Fahmy, H., Spyridaki, K., Kuppast, B., and Liapakis, G. (2012) *Hormones (Athens)* **11**, 254-271
204. Grigoriadis, D. E., Haddach, M., Ling, N., and Saunders, J. (2001) *Current Medicinal Chemistry - Central Nervous System Agents* **1**, 63-97
205. Molteni, V., Penzotti, J., Wilson, D. M., Termin, A. P., Mao, L., Crane, C. M., Hassman, F., Wang, T., Wong, H., Miller, K. J., Grossman, S., and Grootenhuis, P. D. (2004) *J Med Chem* **47**, 2426-2429
206. Yamada, Y., Mizutani, K., Mizusawa, Y., Hantani, Y., Tanaka, M., Tanaka, Y., Tomimoto, M., Sugawara, M., Imai, N., Yamada, H., Okajima, N., and Haruta, J. (2004) *J Med Chem* **47**, 1075-1078
207. Hollenstein, K., Kean, J., Bortolato, A., Cheng, R. K., Dore, A. S., Jazayeri, A., Cooke, R. M., Weir, M., and Marshall, F. H. (2013) *Nature* **499**, 438-443
208. Jazayeri, A., Dore, A. S., Lamb, D., Krishnamurthy, H., Southall, S. M., Baig, A. H., Bortolato, A., Koglin, M., Robertson, N. J., Errey, J. C., Andrews, S. P., Teobald, I., Brown, A. J., Cooke, R. M., Weir, M., and Marshall, F. H. (2016) *Nature* **533**, 274-277
209. Siu, F. Y., He, M., de Graaf, C., Han, G. W., Yang, D., Zhang, Z., Zhou, C., Xu, Q., Wacker, D., Joseph, J. S., Liu, W., Lau, J., Cherezov, V., Katritch, V., Wang, M. W., and Stevens, R. C. (2013) *Nature* **499**, 444-449
210. Hoare, S. R., Sullivan, S. K., Ling, N., Crowe, P. D., and Grigoriadis, D. E. (2003) *Mol Pharmacol* **63**, 751-765
211. Perrin, M. H., Sutton, S., Bain, D. L., Berggren, W. T., and Vale, W. W. (1998) *Endocrinology* **139**, 566-570
212. Mesleh, M. F., Shirley, W. A., Heise, C. E., Ling, N., Maki, R. A., and Laura, R. P. (2007) *J Biol Chem* **282**, 6338-6346
213. Grace, C. R., Perrin, M. H., Gulyas, J., Digruccio, M. R., Cattle, J. P., Rivier, J. E., Vale, W. W., and Riek, R. (2007) *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 4858-4863

214. Pioszak, A. A., Parker, N. R., Suino-Powell, K., and Xu, H. E. (2008) *J Biol Chem* **283**, 32900-32912
215. Assil-Kishawi, I., and Abou-Samra, A. B. (2002) *J Biol Chem* **277**, 32558-32561
216. Gkountelias, K., Tselios, T., Venihaki, M., Deraos, G., Lazaridis, I., Rassouli, O., Gravanis, A., and Liapakis, G. (2009) *Mol Pharmacol* **75**, 793-800
217. Assil-Kishawi, I., Samra, T. A., Mierke, D. F., and Abou-Samra, A. B. (2008) *J Biol Chem* **283**, 35644-35651
218. Kraetke, O., Holeran, B., Berger, H., Escher, E., Bienert, M., and Beyermann, M. (2005) *Biochemistry* **44**, 15569-15577
219. Coin, I., Katritch, V., Sun, T., Xiang, Z., Siu, F. Y., Beyermann, M., Stevens, R. C., and Wang, L. (2013) *Cell* **155**, 1258-1269
220. Hoare, S. R., Fleck, B. A., Gross, R. S., Crowe, P. D., Williams, J. P., and Grigoriadis, D. E. (2008) *Mol Pharmacol* **73**, 1371-1380
221. Grace, C. R., Perrin, M. H., DiGruccio, M. R., Miller, C. L., Rivier, J. E., Vale, W. W., and Riek, R. (2004) *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 12836-12841
222. Nielsen, S. M., Nielsen, L. Z., Hjorth, S. A., Perrin, M. H., and Vale, W. W. (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 10277-10281
223. Pal, K., Swaminathan, K., Xu, H. E., and Pioszak, A. A. (2010) *J Biol Chem* **285**, 40351-40361
224. Grace, C. R., Perrin, M. H., Gulyas, J., Rivier, J. E., Vale, W. W., and Riek, R. (2010) *J Biol Chem* **285**, 38580-38589
225. Perrin, M. H., Grace, C. R., Riek, R., and Vale, W. W. (2006) *Ann N Y Acad Sci* **1070**, 105-119
226. Qi, L. J., Leung, A. T., Xiong, Y., Marx, K. A., and Abou-Samra, A. B. (1997) *Biochemistry* **36**, 12442-12448
227. Assil, I. Q., Qi, L. J., Arai, M., Shomali, M., and Abou-Samra, A. B. (2001) *Biochemistry* **40**, 1187-1195
228. Grace, C. R., Perrin, M. H., Cattle, J. P., Vale, W. W., Rivier, J. E., and Riek, R. (2007) *J Am Chem Soc* **129**, 16102-16114

229. Gkountelias, K., Papadokostaki, M., Javitch, J. A., and Liapakis, G. (2010) *Mol Pharmacol* **78**, 785-793
230. Bortolato, A., Dore, A. S., Hollenstein, K., Tehan, B. G., Mason, J. S., and Marshall, F. H. (2014) *Br J Pharmacol* **171**, 3132-3145
231. Hollenstein, K., de Graaf, C., Bortolato, A., Wang, M. W., Marshall, F. H., and Stevens, R. C. (2014) *Trends Pharmacol Sci* **35**, 12-22
232. Ballesteros, J. A., and Weinstein, H. (1995) [19] Integrated methods for the construction of three-dimensional models and computational probing of structure-function relations in G protein-coupled receptors. in *Methods in Neurosciences* (Stuart, C. S. ed.), Academic Press. pp 366-428
233. Zhang, G., and Ghosh, S. (2001) *J Clin Invest* **107**, 13-19
234. Liapakis, G., Cordomi, A., and Pardo, L. (2012) *Curr Pharm Des* **18**, 175-185
235. Tehan, B. G., Bortolato, A., Blaney, F. E., Weir, M. P., and Mason, J. S. (2014) *Pharmacol Ther* **143**, 51-60
236. Sheikh, S. P., Vilardarga, J. P., Baranski, T. J., Lichtarge, O., Iiri, T., Meng, E. C., Nissenson, R. A., and Bourne, H. R. (1999) *J Biol Chem* **274**, 17033-17041
237. Ballesteros, J. A., Jensen, A. D., Liapakis, G., Rasmussen, S. G., Shi, L., Gether, U., and Javitch, J. A. (2001) *J Biol Chem* **276**, 29171-29177
238. Wootten, D., Simms, J., Miller, L. J., Christopoulos, A., and Sexton, P. M. (2013) *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 5211-5216
239. Schipani, E., Kruse, K., and Juppner, H. (1995) *Science* **268**, 98-100
240. Gaudin, P., Maoret, J. J., Couvineau, A., Rouyer-Fessard, C., and Laburthe, M. (1998) *J Biol Chem* **273**, 4990-4996
241. Schipani, E., Langman, C. B., Parfitt, A. M., Jensen, G. S., Kikuchi, S., Kooh, S. W., Cole, W. G., and Juppner, H. (1996) *N Engl J Med* **335**, 708-714
242. Ganguli, S. C., Park, C. G., Holtmann, M. H., Hadac, E. M., Kenakin, T. P., and Miller, L. J. (1998) *J Pharmacol Exp Ther* **286**, 593-598
243. Rasmussen, S. G., Choi, H. J., Fung, J. J., Pardon, E., Casarosa, P., Chae, P. S., Devree, B. T., Rosenbaum, D. M., Thian, F. S., Kobilka, T. S., Schnapp, A., Konetzki, I., Sunahara, R.

- K., Gellman, S. H., Pautsch, A., Steyaert, J., Weis, W. I., and Kobilka, B. K. (2011) *Nature* **469**, 175-180
244. Cordomi, A., Ismail, S., Matsoukas, M. T., Escriet, C., Gherardi, M. J., Pardo, L., and Fourmy, D. (2015) *Biochem Pharmacol* **96**, 237-246
245. Papadopoulou, N., Chen, J., Rande, H. S., Levine, M. A., Hillhouse, E. W., and Grammatopoulos, D. K. (2004) *Mol Endocrinol* **18**, 624-639
246. Grammatopoulos, D. K., Dai, Y., Rande, H. S., Levine, M. A., Karteris, E., Easton, A. J., and Hillhouse, E. W. (1999) *Mol Endocrinol* **13**, 2189-2202
247. Venkatakrisnan, A. J., Deupi, X., Lebon, G., Tate, C. G., Schertler, G. F., and Babu, M. M. (2013) *Nature* **494**, 185-194
248. Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C., and Nairn, R. (1977) *J Gen Virol* **36**, 59-74
249. Cheng, Y., and Prusoff, W. H. (1973) *Biochem Pharmacol* **22**, 3099-3108
250. Motulsky, H., and Christopoulos, A. (2003) *GraphPad Software Inc.: San Diego, CA*.
251. Liapakis, G. (2014) *Curr Pharm Biotechnol* **15**, 980-986
252. Liapakis, G., M. Martin, and J.A. Javitch. (1999) *Current Protocols in Neuroscience* **4.15.1-4.15.10**.
253. Javitch, J. A., Shi, L., and Liapakis, G. (2002) *Methods Enzymol* **343**, 137-156
254. Javitch, J. A., Ballesteros, J. A., Weinstein, H., and Chen, J. (1998) *Biochemistry* **37**, 998-1006
255. Javitch, J. A., Fu, D., and Chen, J. (1995) *Biochemistry* **34**, 16433-16439
256. Javitch, J. A., Fu, D., Chen, J., and Karlin, A. (1995) *Neuron* **14**, 825-831
257. Javitch, J. A., Shi, L., Simpson, M. M., Chen, J., Chiappa, V., Visiers, I., Weinstein, H., and Ballesteros, J. A. (2000) *Biochemistry* **39**, 12190-12199
258. Leff, P. (1995) *Trends Pharmacol Sci* **16**, 89-97
259. Park, J. H., Scheerer, P., Hofmann, K. P., Choe, H. W., and Ernst, O. P. (2008) *Nature* **454**, 183-187

260. Rasmussen, S. G., DeVree, B. T., Zou, Y., Kruse, A. C., Chung, K. Y., Kobilka, T. S., Thian, F. S., Chae, P. S., Pardon, E., Calinski, D., Mathiesen, J. M., Shah, S. T., Lyons, J. A., Caffrey, M., Gellman, S. H., Steyaert, J., Skinotitis, G., Weis, W. I., Sunahara, R. K., and Kobilka, B. K. (2011) *Nature* **477**, 549-555
261. Sansuk, K., Deupi, X., Torrecillas, I. R., Jongejan, A., Nijmeijer, S., Bakker, R. A., Pardo, L., and Leurs, R. (2011) *Mol Pharmacol* **79**, 262-269
262. Rasmussen, S. G., Choi, H. J., Rosenbaum, D. M., Kobilka, T. S., Thian, F. S., Edwards, P. C., Burghammer, M., Ratnala, V. R., Sanishvili, R., Fischetti, R. F., Schertler, G. F., Weis, W. I., and Kobilka, B. K. (2007) *Nature* **450**, 383-387
263. Crowley, P. B., and Golovin, A. (2005) *Proteins* **59**, 231-239
264. Gallivan, J. P., and Dougherty, D. A. (1999) *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 9459-9464
265. Scrutton, N. S., and Raine, A. R. (1996) *Biochem J* **319 (Pt 1)**, 1-8
266. Yaqub, T., Tikhonova, I. G., Lattig, J., Magnan, R., Laval, M., Escrieut, C., Boulegue, C., Hewage, C., and Fourmy, D. (2010) *Mol Pharmacol* **77**, 547-558
267. Lu, Z. L., and Hulme, E. C. (1999) *J Biol Chem* **274**, 7309-7315
268. Bhogal, N., Donnelly, D., and Findlay, J. B. (1994) *J Biol Chem* **269**, 27269-27274
269. Jagerschmidt, A., Guillaume, N., Roques, B. P., and Noble, F. (1998) *Mol Pharmacol* **53**, 878-885
270. Krystek, S. R., Jr., Patel, P. S., Rose, P. M., Fisher, S. M., Kienzle, B. K., Lach, D. A., Liu, E. C., Lynch, J. S., Novotny, J., and Webb, M. L. (1994) *J Biol Chem* **269**, 12383-12386
271. Liapakis, G., Fitzpatrick, D., Hoeger, C., Rivier, J., Vandlen, R., and Reisine, T. (1996) *J Biol Chem* **271**, 20331-20339
272. Miura, S., Feng, Y. H., Husain, A., and Karnik, S. S. (1999) *J Biol Chem* **274**, 7103-7110
273. Noda, K., Saad, Y., and Karnik, S. S. (1995) *J Biol Chem* **270**, 28511-28514
274. Ducottet, C., Griebel, G., and Belzung, C. (2003) *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* **27**, 625-631
275. Bale, T. L., and Vale, W. W. (2003) *J Neurosci* **23**, 5295-5301

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

First name(s) / Surname(s) Katerina Spyridaki
Father's Name Stylianos
Address Isotitas 8 Heraklion 71306, Greece
E-mail k.spyridaki@med.uoc.gr
Date of birth 09.07.1986
Place of Birth Heraklion Crete
Languages English, German

Education

March 2012 – onwards PhD Student. Thesis title: “Elucidation of structure of third transmembrane domain of type 1 corticotropin releasing factor receptor as well as its interactions with corticotropin releasing factor analogues”,
Department of Pharmacology, University of Crete, Faculty of Medicine, Supervisor Dr. G. Liapakis.

2005-2011 Bachelor of Pharmacy, National and Kapodistrian University of Athens, Faculty of Pharmacy.

Awards

October 2011 Distinction in 29th Cyprus-Camerino-Noordwijkerhout Trends in Drug Research Medicinal Chemistry EFMC Symposium, Cyprus, October 2011. For Poster with title: Synthesis, Competition Binding and Conformational Studies of Linear and Cyclic Analogues of C-Terminal Hexapeptide of Neurotensin. R. Exarchakou, K. Spyridaki, Venihaki, P. Cordopatis, G. Liapakis V. Magafa et al.

July-December 2013 Global Visiting Scholar Award from Virginia Commonwealth University, USA. Research scholar

Laboratory skills Molecular Biology techniques, Protein biochemistry methods, Microorganisms' cultures, Cell cultures, Binding studies, Substituted cysteine accessibility method (SCAM), Determination of c-AMP accumulation after GPCRs stimulation.

- Publications**
1. Andreadou I, Farmakis D, Prokovas E, Sigala F, Zoga A, **Spyridaki K**, Papalois A, Papapetropoulos A, Anastasiou-Nana M, Kremastinos DT, Iliodromitis EK. Short-term statin administration in hypercholesterolaemic rabbits resistant to postconditioning: effects on infarct size, endothelial nitric oxide synthase, and nitro-oxidative stress. **Cardiovasc Res.** 2012 Jun 1;94(3):501-9
 2. Fahmy H, **Spyridaki K**, Kuppast B, Liapakis G. The "homeostasis hormone" and its CRF₁ receptor. From structure to function. **Hormones.**2012 Jul;11 (3):254-71.
 3. Agelis G, Resvani A, Durdagi S, **Spyridaki K**, Tůmová T, Slaninová J, Giannopoulos P, Vlahakos D, Liapakis G, Mavromoustakos T, Matsoukas J. The discovery of new potent non-peptide Angiotensin II AT1 receptor blockers: a concise synthesis, molecular docking studies and biological evaluation of N-substituted 5-butylimidazole derivatives. **Eur J Med Chem.** 2012 Sep; 55:358-74.
 4. Agelis G, Resvani A, Koukoulitsa C, Tůmová T, Slaninová J, Kalavrizioti D, **Spyridaki K**, Afantitis A, Melagraki G, Siafaka A, Gkini E, Megariotis G, Grdadolnik SG, Papadopoulos MG, Vlahakos D, Maragoudakis M, Liapakis G, Mavromoustakos T, Matsoukas J. Rational design, efficient syntheses and biological evaluation of N,N'-symmetrically bis-substituted butylimidazole analogs as a new class of potent Angiotensin II receptor blockers. **Eur J Med Chem.** 2013 Jan 2;62C:352-370.
 5. Karampelas T, Argyros O, Sayyad N, **Spyridaki K**, Pappas C, Morgan K, Kolios G, Millar RP, Liapakis G, Tzakos AG, Fokas D, Tamvakopoulos C. GnRH-Gemcitabine Conjugates for the Treatment of Androgen-Independent Prostate Cancer: Pharmacokinetic Enhancements Combined with Targeted Drug Delivery. **Bioconjug Chem.** 2014 Apr 3.

6. Kuppast B, **Spyridaki K**, Liapakis G, Fahmy H. Synthesis of substituted pyrimidines as corticotropin releasing factor (CRF) receptor ligands. **Eur J Med Chem.** **2014** May 6;78:1-9.
7. **Spyridaki K**, Matsoukas MT, Cordomi A, Gkountelias K, Papadokostaki M, Mavromoustakos T, Logothetis DE, Margioris AN, Pardo L, Liapakis G. 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** Jul 4;289(27):18966-77.
8. Ntountaniotis D, Agelis G, Resvani A, Halabalaki M, Liapakis G, **Spyridaki K**, Grdadolnik SG, Merzel F, Kostidis S, Potamitis C, Tselios T, Matsoukas J, Skaltsounis LA, Mavromoustakos T. An Efficient Synthetic Method and Theoretical Calculations of Olmesartan Methyl Ether. An efficient synthetic method and theoretical calculations of olmesartan methyl ether: study of biological function of AT1 antagonism. **Comb Chem High Throughput Screen.** **2014**;17(8):652-62.
9. Kuppast B, **Spyridaki K**, Lynch C, Hu Y, Liapakis G, Davies GE, Fahmy H. Synthesis of new thiazolo [4,5-d]pyrimidines as Corticotropin releasing factor modulators. **Med Chem.** **2014**;11(1):50-9.
10. Hatcher-Solis C, Fribourg M, **Spyridaki K**, Younkin J, Ellaithy A, Xiang G, Liapakis G, Gonzalez-Maeso J, Zhang H, Cui M, Logothetis DE. G protein-coupled receptor signaling to Kir channels in *Xenopus* oocytes. **Curr Pharm Biotechnol.** **2014**;15(10):987-95.
11. Gelain A., Rizzi L., Legnani L., Pacini A., **Spyridaki K.**, Karageorgos V., Liapakis G. and Villa S. Novel peptidomimetics related to gonadotropin-releasing hormone (GnRH). *Med. Chem. Commun.*; **2015**, 6: 1656-65.

Abstracts (Posters and Oral Presentations)

Katerina Spyridaki, Emmanuel Mastromanolis, Anastasia Zoga, Dimitrios Th. Kremastinos, Maria Anastasiou-Nan , Efstathios K. Iliodromitis, Ioanna Andreadou. Carotid remote preconditioning is a strong stimulus for the reduction of the infarct size in anesthetized rabbits independently of PI3-Akt pathway. 1η Πανελλήνια συνάντηση μεταπτυχιακών φοιτητών στις Φαρμακευτικές επιστήμες, Πλάκα Αθήνα, **Απρίλιος 2011.**

Σ.-Ι. Μπιμπλή, Ι. Ανδρεάδου, Ζ. Zhou, Κ. Σπυριδάκη, Α. Ζώγα, Δ.Θ. Κρεμαστινός, Μ. Αναστασίου-Νανά, Ε.Κ. Ηλιοδρομίτης, Α. Παπαπετρόπουλος. Το H₂S εισάγει φαρμακολογική μετισταμική προετοιμασία σε αναισθητοποιημένους κονίκλους μέσω ενεργοποίησης της PKG.32ο Πανελλήνιο Καρδιολογικό Συνέδριο, Θεσσαλονίκη, **Οκτώβριος 2011**.

Αντώνιος Γεωργακόπουλος, Ιωάννα Ανδρεάδου, Θεανώ Φωτοπούλου, Κατερίνα Σπυριδάκη, Αναστασία Ζώγα, Μαρία Κουφάκη, Δημήτριος Θ. Κρεμαστινός, Ευστάθιος Κ. Ηλιοδρομίτης, Μαρία Αναστασίου-Νανά. Ο ρόλος των δοτών μονοξειδίου του αζώτου στην μετισταμική προστασία (postconditioning) σε αναισθητοποιημένους κονίκλους. 32ο Πανελλήνιο Καρδιολογικό Συνέδριο, Θεσσαλονίκη, **Οκτώβριος 2011**.

Κ. Gkountelias, **Κ. Spyridaki**, T. Mavromoustakos and G. Liapakis et.al. Determination of Residues in the Third Membrane-Spanning Segment of CRF₁, which are Accessible in the Ligand Binding-Site Crevice of Receptor. 29th Cyprus-Camerino-Noordwijkerhout Trends in Drug Research Medicinal Chemistry EFMC Symposium, Cyprus, **October 2011**.

R. Exarchakou, **Κ. Spyridaki**, Venihaki, P. Cordopatis, G. Liapakis V. Magafa et al. Synthesis, Competition Binding and Conformational Studies of Linear and Cyclic Analogues of C-Terminal Hexapeptide of Neurotensin. 29th Cyprus-Camerino-Noordwijkerhout Trends in Drug Research Medicinal Chemistry EFMC Symposium, Cyprus, **October 2011**.

Spyridaki K., Prokovas E., Farmakis D., Sigala F., Zoga A., Papapetropoulos A., Anastasiou-Nana M., Kremastinos D.T, Iliodromitis E.K., Andreadou I. Short-term statin administration in hypercholesterolemic rabbits resistant to postconditioning: Effects on infarct size, endothelial nitric oxide synthase and nitro-oxidative stress. 10 Συνέδριο Φαρμακευτικών Επιστημών: Από την έρευνα στην κοινωνία, Αθήνα, **Απρίλιος 2012**.

Εξαρχάκου Ρεβέκκα, **Σπυριδάκη Αικατερίνη**, Μερτζιάνη Βασιλική, Τσουμάνη Ελευθερία, Hribar Teja, Ζουμπουλάκης Παναγιώτης, Ποταμίτης Κωνσταντίνος, Λιαπάκης Γεώργιος, Κορδοπάτης Παύλος, Μαγκαφά Βασιλική. Σύνθεση και μελέτη γραμμικών, διμερών και κυκλικών αναλόγων του C-τελικού εξαπεπτιδίου της νευροτενσίνης περιέχοντα μη φυσικά αμινοξέα. 10 Συνέδριο

Φαρμακευτικών Επιστημών: Από την έρευνα στην κοινωνία, Αθήνα, **Απρίλιος 2012**.

K. Spyridaki, K. Gkountelias, Pardo and G. Liapakis et. al. Structure-function analysis of the third membrane-spanning segment of CRF1. 7ο National conference of Greek society of pharmacology. Asscibility, quality and price of drugs. Thessaloniki, Greece, **May 2012**.

K. Spyridaki, K. Gkountelias, Pardo and G. Liapakis et. al. Structure-function analysis of the third membrane-spanning segment of CRF1. 7ο National conference of Greek society of pharmacology. Asscibility, quality and price of drugs. Thessaloniki, Greece, **May 2012**.

K. Spyridaki, T. Mavromoustakos, G. Liapakis et al. Structure-function analysis of the second extracellular loop of type 1 receptor for the corticotrophin releasing factor. 32nd European Peptide Symposium, Athens, **September 2012**.

G. Agelis, A., **K. Spyridaki**, G. Liapakis, T. Mavromoustakos, J. Matsoukas et al. A Concise Synthesis, Docking Studies and Biological Evaluation of N-substituted 5-Butylimidazole Analogues as Potent Angiotensin II Receptor Blockers. 32nd European Peptide Symposium, Athens, **September 2012**.

K. Spyridaki, K. T. Mavromoustakos, G. Liapakis et al. Structure-function analysis of the second extracellular loop of type 1 receptor for the corticotrophin releasing factor. 32nd European Peptide Symposium, Athens, **September 2012**.

G. Agelis, A. Resvani, C. Koukoulits, A. Afanitis, G. Melegraki, A. Siafaka, E. Gkini, T. Tumova, **K. Spyridaki**, D. Kalavrizioti, M-E. Androutsou, J. Slaninova, G. Liapakis, D. Vlahakos, T. Mavromoustakos, J. Matsoukas. Rational Design , Efficient Synthesis, Biological Evaluation of N,N'-bis-substituted Butylimidazole Analogs as Potent Angiotensin Receptor Blockers. 32nd European Peptide Symposium, Athens, **September 2012**.

Spyridaki K., Gkountelias K., Tselios T., Karageorgos V., Liapakis G. Different ligand-CRF1 receptor interactions differentially modulate the signaling properties of receptor. 63ο Πανελλήνιο Συνέδριο Βιοχημείας & Μοριακής Βιολογίας, Ηράκλειο Κρήτης, **Σεπτέμβριος 2012**.

Spyridaki K., Matsoukas M.T., Cordomi A., Karageorgos V., Fothiadaki M., Margioris A., Pardo L., Liapakis G. Structure and molecular mechanisms of activation of CRF1 receptor. 8^o National conference of Greek society of pharmacology Athens **May 2014**.

Κ. Σπυριδάκη, Μ.-Τ. Ματσούκας, Β. Καραγεώργος, Μ. Φωθιαδάκη, Α. Μαργιωρή, L. Pardo, Γ. Λιαπάκης. Διασαφήνιση της δομής και της λειτουργίας του υποδοχέα της «Ορμόνης της ομοιόστασης». 41^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ενδοκρινολογίας & Μεταβολισμού, Πόρτο Χέλι, **Μάιος 2014**.

Spyridaki K., Matsoukas M.-T., Cordomi A., Athanasakis A., Karageorgos V., Christopoulou K., Mavromoustakos T., Pardo L. and Liapakis G. Determination of a transmembrane amino acid of the CRF1 receptor that is critical for receptor's activation. Ημερίδα Ελληνικής Εταιρείας Βασικής και Κλινικής Φαρμακολογίας, Αθήνα, **Μάρτιος 2015**.

Karageorgos V., Gelain A., Koulouri A., **Spyridaki K.**, Villa S. and Liapakis G. Pharmacological characterization of novel analogues of Gonadotropin Releasing Hormone (GnRH). 13th Panhellenic Symposium of Clinical Chemistry, School of Medicine, Heraklion, Crete, Greece, 29-31 **October 2015**.

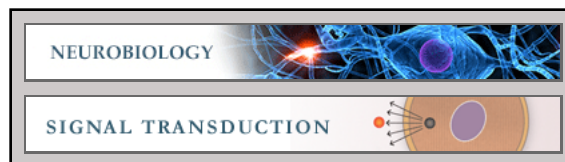
Neurobiology:

Structural-Functional Analysis of the Third Transmembrane Domain of the Corticotropin-releasing Factor Type 1 Receptor: ROLE IN ACTIVATION AND ALLOSTERIC ANTAGONISM

Katerina Spyridaki, Minos-Timotheos Matsoukas, Arnau Cordomi, Kostas Gkountelias, Maria Papadokostaki, Thomas Mavromoustakos, Diomedes E. Logothetis, Andrew N. Margioris, Leonardo Pardo and George Liapakis

J. Biol. Chem. 2014, 289:18966-18977.

doi: 10.1074/jbc.M113.544460 originally published online May 16, 2014



Access the most updated version of this article at doi: [10.1074/jbc.M113.544460](https://doi.org/10.1074/jbc.M113.544460)

Find articles, minireviews, Reflections and Classics on similar topics on the [JBC Affinity Sites](#).

Alerts:

- [When this article is cited](#)
- [When a correction for this article is posted](#)

[Click here](#) to choose from all of JBC's e-mail alerts

Supplemental material:

<http://www.jbc.org/jbc/suppl/2014/05/16/M113.544460.DC1.html>

This article cites 31 references, 10 of which can be accessed free at <http://www.jbc.org/content/289/27/18966.full.html#ref-list-1>

Structural-Functional Analysis of the Third Transmembrane Domain of the Corticotropin-releasing Factor Type 1 Receptor

ROLE IN ACTIVATION AND ALLOSTERIC ANTAGONISM^{*[5]}

Received for publication, December 18, 2013, and in revised form, May 13, 2014. Published, JBC Papers in Press, May 16, 2014, DOI 10.1074/jbc.M113.544460

Katerina Spyridaki[‡], Minos-Timotheos Matsoukas[§], Arnau Cordomi^{§1}, Kostas Gkountelias[‡], Maria Papadokostaki[‡], Thomas Mavromoustakos[¶], Diomedes E. Logothetis^{||}, Andrew N. Margioris^{**}, Leonardo Pardo[§], and George Liapakis^{‡2}

From the Departments of [‡]Pharmacology and ^{**}Clinical Chemistry, School of Medicine, University of Crete, Heraklion 71003, Greece, the [§]Laboratori de Medicina Computacional, Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra 08193, Spain, the [¶]Laboratory of Organic Chemistry, Department of Chemistry, University of Athens, Athens 11571, Greece, and the ^{||}Department of Physiology and Biophysics, School of Medicine, Virginia Commonwealth University, Richmond, Virginia 23298

Background: The molecular mechanisms underlying activation of CRF₁ receptor (CRF₁R) were elusive.

Results: We determined specific residues in the transmembrane domains (TMs) of CRF₁R that are critical for receptor activation.

Conclusion: A possible “transmission switch” involving TM interactions is important for CRF₁R activation.

Significance: This knowledge may aid in the development of nonpeptide CRF₁R antagonists for use in stress-related disorders.

The corticotropin-releasing factor (CRF) type 1 receptor (CRF₁R) for the 41-amino acid peptide CRF is a class B G protein-coupled receptor, which plays a key role in the response of our body to stressful stimuli and the maintenance of homeostasis by regulating neural and endocrine functions. CRF and related peptides, such as sauvagine, bind to the extracellular regions of CRF₁R and activate the receptor. In contrast, small nonpeptide antagonists, which are effective against stress-related disorders, such as depression and anxiety, have been proposed to interact with the helical transmembrane domains (TMs) of CRF₁R and allosterically antagonize peptide binding and receptor activation. Here, we aimed to elucidate the role of the third TM (TM3) in the molecular mechanisms underlying activation of CRF₁R. TM3 was selected because its tilted orientation, relative to the membrane, allows its residues to establish key interactions with ligands, other TM helices, and the G protein. Using a combination of pharmacological, biochemical, and computational approaches, we found that Phe-203^{3,40} and Gly-210^{3,47} in TM3 play an important role in receptor activation. Our experimental findings also suggest that Phe-203^{3,40} interacts with nonpeptide antagonists.

G protein-coupled receptors (GPCRs)³ are essential for life as they regulate vital physiological functions in almost every

eukaryotic organism, including fungi and plants (1). They accomplish this by triggering a large number of cellular signaling cascades, through their cognate heterotrimeric G proteins, as a result of their interaction with a vast number of chemically divergent molecules ranging from light to large polypeptides (1, 2).

Based on sequence similarity methods, the superfamily of GPCRs is classified into four families or classes (A, B, C, and smoothened), which display little sequence similarity and do not share common structural/functional motifs (3). Class A (or rhodopsin-like) is the largest family of GPCRs. Most of our understanding regarding the structure and function of GPCRs has been achieved in this family (4). Very recently the crystal structures of the type 1 receptor (CRF₁R) for the 41-amino acid peptide, corticotropin-releasing factor (CRF), and the glucagon receptor (GCGR), which belong to class B GPCRs, have been published (5, 6). Notably, despite their overall low sequence identity, structures from different families share a common molecular architecture and activate a similar pool of intracellular signaling molecules, the G proteins. This architecture is characterized by the presence of seven α -helical transmembrane domains (TMs) connected to each other by three extracellular (EL) and three intracellular loops. Moreover, all GPCRs possess an extracellular N-terminal region (N-domain) and a cytoplasmic C terminus, containing an α -helix (Hx8) oriented parallel to the cell membrane. These common features lead to the biologically important hypothesis that GPCR activation utilizes conserved structural elements leading to production of a biological effect.

^{*} This work was supported in part by a National Alliance for Research on Schizophrenia and Depression grant (to G. L.), a grant from the Greek Ministry of Health (to G. L.), and Grant SAF2013-48271-C2-2-R from Ministerio de Ciencia e Innovación (to L. P.).

[5] This article contains supplemental Figs. S1 and S2.

¹ Recipient of a contract grant from ISCIII.

² To whom correspondence should be addressed: Dept. of Pharmacology, School of Medicine, University of Crete, Heraklion, Voutes 71003 Crete, Greece. Tel.: 30-2810-394525; Fax: 30-2810-394530; E-mail: liapakis@med.uoc.gr.

³ The abbreviations used are: GPCR, G protein-coupled receptor; CRF₁R, type 1 receptor for the corticotropin-releasing factor; CRF, corticotropin-releas-

ing factor; GCGR, glucagon receptor; SCAM, substituted cysteine accessibility method; MTSEA, methanothiosulfonate ethylammonium; TM, transmembrane domain; EL, extracellular loop; N-domain, extracellular N-terminal region; β_2 -AR, β_2 -adrenergic receptor; GppNHp, guanosine 5'-[β , γ -imido]triphosphate; ANOVA, analysis of variance.

Although the crystal structure of a receptor provides the ultimate information for its structure, it represents a single snapshot of one conformational state. Specifically, the crystal structures of the apo-state of GCGR and the CRF₁R in complex with the nonpeptide CRF antagonist CP-376395 represent the inactive states of truncated receptors, lacking their extracellular N-domain (5, 6). Despite the fact that these truncated forms of class B GPCRs bound small nonpeptide ligands with similar affinities with those of the full-length receptors, they are not able to bind peptides and be activated because they lack the functionally indispensable N-domain (7, 8). Thus, although crystallization of CRF₁R or GCGR provided invaluable structural information for an inactive state of these receptors, the molecular mechanisms underlying receptor activation that convert ligand binding to a biological effect are still elusive.

In this study, we aimed to elucidate the molecular mechanisms underlying the activation of CRF₁R and to validate the hypothesis that activation of class A and B GPCRs utilizes conserved structural elements. We accomplished this by using a combination of different experimental approaches and by comparing the available results on the role of the third TM (TM3) in the structure-function of class A with the much less studied class B GPCRs. TM3 is a structural and functional hub as suggested by the comparison of class A crystal structures, in their inactive and active states (9). The residues in TM3 are functionally important by mediating interactions with the extracellular ligand, as well as by forming key inter-TM interactions that define the GPCR-fold, a conserved disulfide bridge with the second EL (EL2), and an important interface for G protein binding. We focused on the CRF₁R, which plays a key role in the response of our body to stressful stimuli and the maintenance of homeostasis, by regulating neural and endocrine functions (6, 10). Moreover, the TM3 of CRF₁R has been shown to be involved in the binding of small ligand antagonists that are effective against stress-related disorders, such as depression and anxiety (6, 10).

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Structural Alignment—All crystallized GPCRs (including 21 receptors, 18 of which belong to family A, two to family B, and one to family F) were structurally superimposed using MultiProt based on their C β atoms (11). This permitted us to obtain a structurally based sequence alignment, which was later revised using Jalview (12).

Model of the Inactive CRF₁R—To study the TM3-TM5 interface of the unliganded state of CRF₁R, a homology model based on the crystal structure of GCGR (Protein Data Bank code 4L6R) was built using MODELLER (5, 13). The primary sequence of human CRF₁R was used (UniProt accession code P34998) in which the G210^{3.47}C mutation was inserted. The highly conserved residues-motifs between family B (L1.42 in TM1, HXNL in TM2, W3.42 in TM3, GWGXP in TM4, N5.53 in TM5, PLLG in TM6, and G7.46 in TM7), were used as reference points in TM sequence alignments (supplemental Fig. S1). The N terminus of the receptor was disregarded. Residues are identified by the general numbering scheme of Ballesteros and Weinstein that allows easy comparison among residues in the 7TM segments of receptors belonging to different families.

Site-directed Mutagenesis—The cDNA sequences encoding wild-type CRF₁R (WT) or Δ Cys CRF₁R(Δ Cys) were subcloned into the bicistronic expression vector pcin4, thereby creating the vectors pcin4-WT or pcin4- Δ Cys, respectively, as described previously (14). Δ Cys is a mutant CRF₁R, which is insensitive to sulfhydryl-specific reagents and has similar functional properties with those of wild-type receptor (14). Mutations were generated by the polymerase chain reaction-mediated mutagenesis, using *Pfu* polymerase (MBI Fermentas, Hanover, MD) and mutagenic oligonucleotides encoding the desired amino acid substitution. The polymerase chain reaction generated DNA fragments containing Cys, Trp, Ala, Ile, or Lys mutations. The fragments containing the Cys mutations were subcloned into the pcin4- Δ Cys plasmid (creating the pcin4-substituted Cys mutant plasmids), whereas those containing the other mutations were subcloned into the pcin4-WT plasmid (creating the pcin4-X mutant plasmids). The mutations were confirmed by DNA sequencing.

Cell Culture, Transfection, and Harvesting—Human embryonic kidney (HEK) 293 cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium/F-12 (1:1) containing 3.15 g/liter glucose and 10% bovine calf serum at 37 °C and 5% CO₂. Sixty-millimeter dishes of HEK293 cells at 80–90% confluence were transfected with 2–3 μ g of pcin4-WT (WT), pcin4- Δ Cys (Δ Cys), pcin4-X mutant (X mutants), or pcin4-substituted Cys mutant (substituted Cys mutants) plasmids using 9 μ l of Lipofectamine and 2.5 ml of Opti-MEM (both from Invitrogen). To generate stably transfected pools of cells expressing the receptors 5–12 h after transfection, the medium was replaced by Dulbecco's modified Eagle's medium/F-12 (1:1) containing 3.15 g/liter glucose, 10% bovine calf serum (Hyclone Laboratories, Logan, UT), and 700 μ g/ml G418 (Geneticin, an antibiotic (Invitrogen)). The antibiotic was added to select a stably transfected pool of cells. Cells expressing WT, Δ Cys, or mutants, at 100% confluence in 60- or 100-mm dishes, were washed with phosphate-buffered saline (PBS) (4.3 mM Na₂HPO₄·7H₂O, 1.4 mM KH₂PO₄, 137 mM NaCl, and 2.7 mM KCl, pH 7.3–7.4, at 37 °C), briefly treated with PBS containing 2 mM EDTA (PBS/EDTA), and then dissociated in PBS/EDTA. Cells suspensions were centrifuged at 50 \times g for 2 min at room temperature, and the pellets were resuspended in 1 ml of buffer M (25 mM HEPES containing 5.4 mM KCl, 140 mM NaCl, and 2 mM EDTA, pH 7.2, at 22–25 °C) for treatment with methanethiosulfonate reagents or in 1.5 ml of buffer H (20 mM HEPES, containing 10 mM MgCl₂, 2 mM EGTA, 0.2 mg/ml bacitracin, and 0.93 μ g/ml aprotinin, pH 7.2, at 4 °C) for binding assays.

¹²⁵I-Tyr⁰-Sauvagine Binding—For radioligand binding assays, cell suspensions (1.5 ml) in buffer H were homogenized using an Ultra-Turrax T25 homogenizer (IKA Janke and Kunkel, Staufen, Germany) at setting ~20 for 10–15 s, at 4 °C. The homogenates were centrifuged at 16,000 \times g for 10 min at 4 °C, and the membrane pellets were resuspended in 1 ml of buffer B (buffer H containing 0.1% bovine serum albumin, pH 7.2, at 20 °C). The membrane suspensions were diluted in buffer B and used for homologous or heterologous competition binding studies as described previously (15). In brief, aliquots of diluted membrane suspensions (50 μ l) were added into low retention tubes (Kisker-Biotech, Steinfurt, Germany), containing buffer B and 20–50 pM ¹²⁵I-Tyr⁰-sauvagine with or without increasing

Structural-Functional Analysis of the CRF₁ Receptor

concentrations of Tyr⁰-sauvagine (homologous competition binding), sauvagine, astressin, or antalarmin (heterologous competition binding) (American Peptide Co., Sunnyvale, CA). The mixtures were incubated at 20–21 °C for 120 min and then filtered using a Brandel cell harvester through Whatman 934AH glass fiber filters presoaked for 1 h in 0.3% polyethyleneimine at 4 °C. The filters were washed three times with 0.5 ml of ice-cold PBS, pH 7.1, containing 0.01% Triton X-100. Filters were assessed for radioactivity in a gamma counter (1275 minigamma, 80% efficiency; LKB Wallac, Chalfont St. Giles, Buckinghamshire, UK). The amount of membrane used was adjusted to ensure that the specific binding was always equal to or less than 10% of the total concentration of the added radioligand. Specific ¹²⁵I-Tyr⁰-sauvagine binding was defined as total binding less nonspecific binding in the presence of 1000 nM sauvagine or antalarmin. Data for competition binding were analyzed by nonlinear regression analysis, using Prism 4.0 (GraphPad Software, San Diego). IC₅₀ values were obtained by fitting the data from competition studies to a one-site competition model. The logK_i values for astressin and antalarmin and the logK_D values for ¹²⁵I-Tyr⁰-sauvagine binding were determined from heterologous and homologous competition data, respectively, as described previously using Prism 4.0 (15).

Reactions with MTSEA—For treatment with MTSEA, aliquots (0.1 ml) of suspensions (in buffer M) of cells expressing ΔCys or substituted Cys mutants were incubated without or with 2.5 mM MTSEA for 15 s at 22–25 °C. Cell suspensions were then diluted 140-fold in buffer PBS/EDTA, pH 7.1, at 22–25 °C containing 10 mM MgCl₂ and centrifuged at 250 × g for 10 min at 22–25 °C, and the pellets were resuspended in 1.5 ml of buffer M containing 10 mM MgCl₂. Cell suspensions were centrifuged at 500 × g for 5 min at 22–25 °C, and the pellets were homogenized in 1.5 ml of buffer H, as described above. The homogenates were centrifuged at 16,000 × g for 10 min at 4 °C, and the membrane pellets were resuspended in 1 ml of buffer B (buffer H containing 0.1% bovine serum albumin, pH 7.2, at 20 °C). The membrane suspensions were used to assay for ¹²⁵I-Tyr⁰-sauvagine binding as described above. Inhibition of binding was calculated as 1 – (specific binding after MTSEA/specific binding without MTSEA).

Protection experiments were performed by preincubation of aliquots of cell suspensions with astressin (1 μM), Tyr⁰-sauvagine (1 μM), or α-helical (9–41) CRF (1 μM) for 60 min at 20 °C in buffer M. Subsequently, the mixtures (0.1 ml) were treated with 2.5 mM MTSEA as described above. Cells were treated and homogenized as described above, and homogenates were used to assay for ¹²⁵I-Tyr⁰-sauvagine binding.

cAMP Accumulation Assays—HEK293 cells stably expressing WT, ΔCys, or mutants were plated in 96-well cell culture plates (pretreated with 0.1 mg/ml poly-L-lysine). After incubation overnight at 37 °C in 5% CO₂, the cells were 95–100% confluent. The medium was removed, and 100 μl of assay buffer (25 mM HEPES, pH 7.4, 2 mM choline, 288 mM sucrose, 0.9 mM CaCl₂, 0.5 mM MgCl₂, and 1 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine) was added. After 1 h of incubation at 37 °C, more assay buffer without (basal levels) or with increasing concentrations of sauvagine in the presence or absence of 0.3 μM astressin or 1–2 μM antalarmin was added to a total volume of 200 μl, and the incu-

bation was continued for 30 min at 37 °C. At the end of the incubation, the assay buffer was removed. The cells were placed on ice and lysed with 3% trichloroacetic acid. Lysates were incubated on ice for 30–60 min and stored at –20 °C. After 1–5 days, frozen lysates were thawed and centrifuged at 1800 × g for 10 min at 4 °C, and the supernatants were neutralized with 2 N NaOH. Quantification of cAMP in the neutralized supernatants was performed using a competitive binding assay as described previously (15). In brief, supernatants were transferred to polypropylene mini-tubes (20 μl/tube) containing buffer A (100 mM Tris-HCl, pH 7.4, 100 mM NaCl, and 5 mM EDTA) with 1–1.5 nM [2,8-³H]cAMP (PerkinElmer Life Sciences). Subsequently, cAMP-binding protein (~100 mg of crude bovine adrenal cortex extract in 500 ml of buffer A) was added to each tube. After incubation on ice for 3 h, the mixtures were filtered through Whatman 934AH glass fiber filters as described for radioligand binding assays, using buffer C (120 mM NaCl and 10 mM Tris HCl, pH 7.4, at 4 °C) as washing buffer. The amount of cAMP in each sample (one-tenth of a well) was determined by comparison with a standard curve of known concentrations of unlabeled cAMP (1–100 pmol/tube). The logEC₅₀ values were obtained by fitting the data to a one-site sigmoidal model using nonlinear regression analysis (Prism 4.0).

RESULTS

Structure-based Alignment of GPCRs with Known Structure—Fig. 1A shows the superimposition of the helical TMs of representative members of the currently available crystal structures of GPCRs in the inactive conformation. The structure of the cytoplasmic part of TMs is highly conserved, whereas the structure of their extracellular part is more divergent. This suggests that each receptor family has adjusted specific structural characteristics for selective ligand binding that triggers a conserved set of conformational rearrangements of the helices near the G protein binding domains. The publication of the structures of the ligand-free opsin, the β₂-adrenergic receptor (β₂-AR) bound to agonists and the β₂-AR bound to G_s have shown the intracellular structural changes associated with activation of class A GPCRs (16–18). To compare these mechanisms with class B GPCRs, Fig. 1B shows a structure-based sequence alignment of all available crystal structures of GPCRs, and [supplemental Fig. S1](#) shows the amino acid conservation, at structurally homologous positions, within classes A and B. This alignment compares the highly conserved amino acids in class A, used by Ballesteros and Weinstein to define a general numbering scheme for class A GPCRs, with class B (19). Class B includes both the adhesion and secretin subfamilies, as the latter is a descendant from the adhesion subfamily (3). In particular, TM3 contains the conserved Cys^{3.25} engaged in a disulfide bond with a conserved Cys in EL2. The positional equivalent of the highly conserved (D/E)R^{3.50}Y motif in class A corresponds to (Y/H)L^{3.50}(Y/H) in class B. Because of the spatial conservation of the TM amino acids between classes A and B, the Ballesteros-Weinstein nomenclature is used throughout.

Use of the Substituted Cysteine Accessibility Method (SCAM) to Identify Amino Acids of TM3 Forming the Water-accessible Binding Site Crevice—To identify the TM3 residues that are located on the water-accessible binding site crevice of the inac-

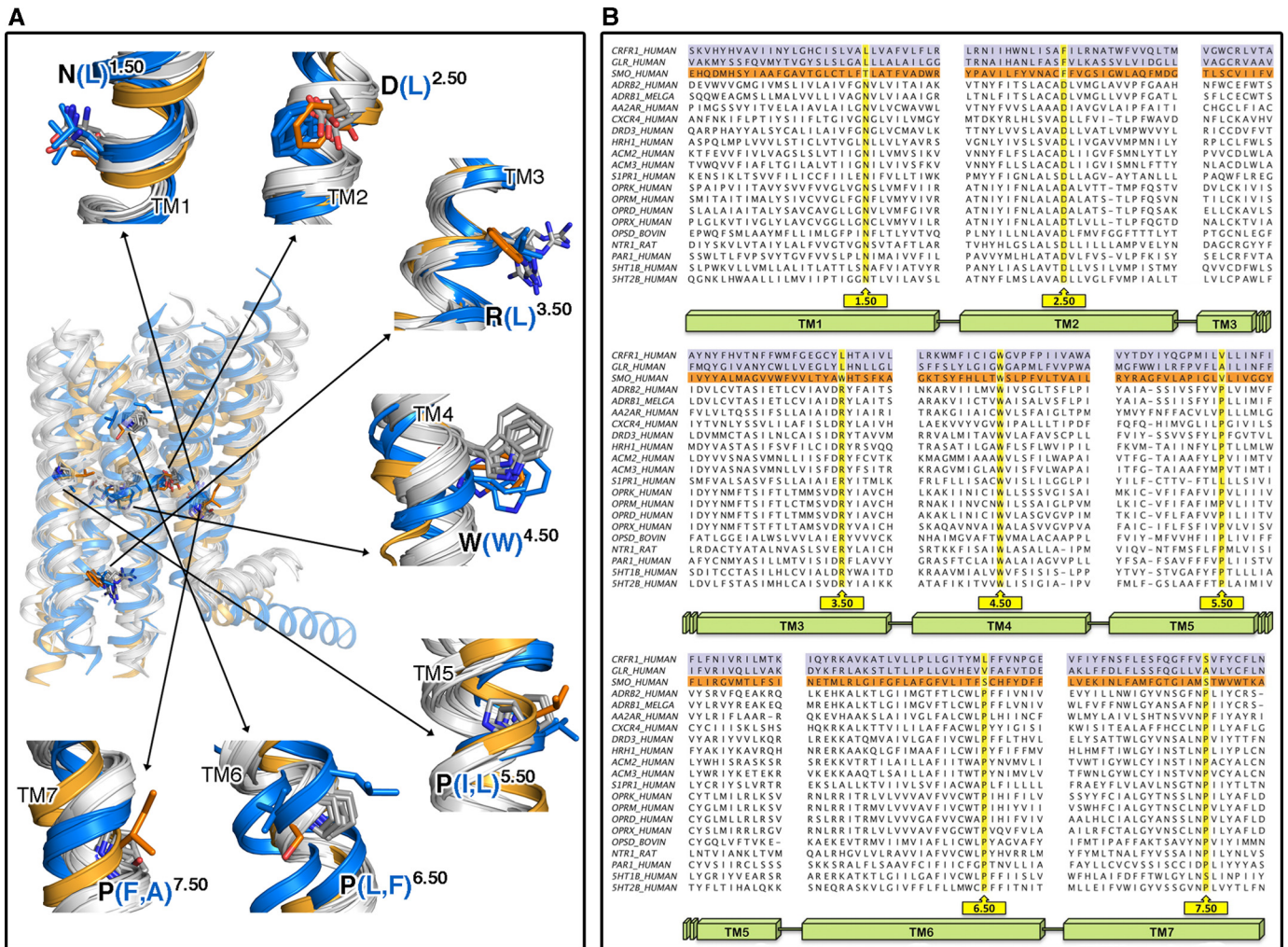


FIGURE 1. Structural alignment of GPCR families with known structure. *A*, comparison of the TM domains plus Hx8 of the currently available crystal structures in the inactive conformation. Rhodopsin (Protein Data Bank codes 1U19), β_2 -adrenergic (2RH1), dopamine D3 (3PBL), M3 muscarinic (4DAJ), μ -opioid (4DKL), and histamine H₁ (3RZE) receptors are shown as representative structures of class A GPCRs. The TM structures of class A, B (CRF₁, (4K5Y) and GCG (4L6R)), and smoothed (4JKV) receptors are shown as *white, blue, and orange ribbons*, respectively. The highly conserved amino acids in each helix, used by Ballesteros and Weinstein to define a general numbering scheme for class A GPCRs, are shown as *gray sticks* (19). The homologous amino acids, at these conserved class A positions, for the class F smoothed receptor are shown in *orange* and for class B CRF₁ and GCG receptors in *blue*. *B*, sequence alignment derived from the structural superimposition between GPCRs with known crystal structures.

tive apo-state of the full-length CRF₁R, we mutated each amino acid, one at a time, to Cys (engineered Cys) and determined their accessibilities by applying SCAM (20). SCAM is based on the ability of the positively charged MTSEA, to react with the free sulfhydryl group of a cysteine (supplemental Fig. S2). We detected the MTSEA reaction by determining its ability to inhibit the binding of the radiolabeled CRF analog, ¹²⁵I-Tyr⁰-sauvagine, to the receptor. We used an MTSEA-insensitive CRF₁R mutant (Δ Cys), which has a wild-type pharmacological profile and has been created by replacing five endogenous Cys by Ser (14). Among the 22 TM3 engineered Cys (Δ Cys + R189^{3.26}C to Δ Cys + G210^{3.47}C), those at positions 189^{3.26}, 192^{3.29}, 193^{3.30}, 195^{3.32}, 196^{3.33}, and 199^{3.36} reacted with MTSEA because the reaction significantly reduced the binding of ¹²⁵I-Tyr⁰-sauvagine to these Cys-substituted mutants (Fig. 2A). Given that in the absence of MTSEA, the R189^{3.26}C, T192^{3.29}C, A193^{3.30}C, Y195^{3.32}C, N196^{3.33}C, and H199^{3.36}C substitutions did not significantly alter ¹²⁵I-Tyr⁰-sauvagine affinity (Fig. 2B) and thus the overall conformation of receptor,

we infer that these TM3 residues are located on the binding site crevice of CRF₁R. This is consistent with the recent crystal structures of CRF₁R and GCGR (5, 6). Similarly, the Δ Cys + F203^{3.40}C mutant reacted with MTSEA, because the reaction significantly altered ¹²⁵I-Tyr⁰-sauvagine binding. Surprisingly, in contrast to the other positive TM3 Cys mutants, MTSEA reaction with Δ Cys + F203^{3.40}C increased binding (Fig. 2A). Notably, the potentiation of radioligand binding to Δ Cys + F203^{3.40}C by MTSEA was significantly decreased after pretreatment of cells expressing this mutant with 1 μ M astressin, but not with α -helical (9–41) CRF or Tyr⁰-sauvagine (at concentrations of 1 μ M) (Fig. 3A). We infer that F203^{3.40} is also located on the binding site crevice of CRF₁R, given that this TM3 residue interacts with small nonpeptide antagonists, such as antalarmin, as suggested by our results (Fig. 3B) and by the crystal structure of CRF₁R (6). The hydrophobic antalarmin, even at the high concentration of 1 μ M, failed to antagonize sauvagine binding to Δ Cys after mutation of the hydrophobic F203^{3.40} to the hydrophilic Cys, regardless of the presence of MTSEA (Fig.

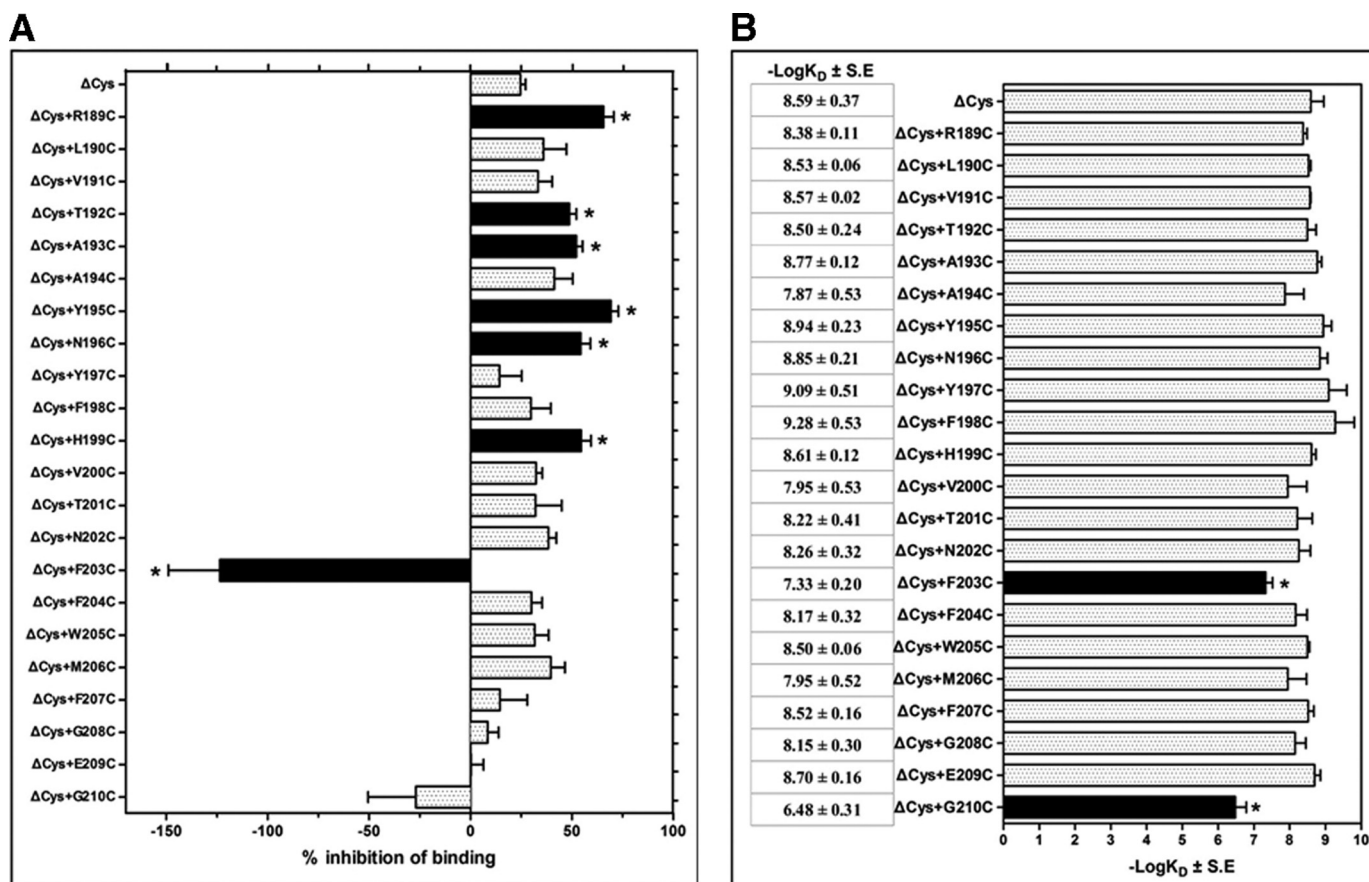


FIGURE 2. **Structural and functional characterization of the TM3 of CRF₁R.** A, inhibition of specific ¹²⁵I-Tyr⁰-sauvagine binding to MTSEA-insensitive CRF₁R mutant (ΔCys) or its substituted Cys mutants after their reaction with MTSEA is represented by bars, which indicate the mean ± S.E. values from 3 to 32 independent experiments. Negative inhibition means potentiation of radioligand binding after MTSEA reaction. *Solid bars with asterisks* indicate substituted Cys mutants for which inhibition/potentiation was significantly different from ΔCys ($p < 0.05$; one way ANOVA). B, binding affinities ($-\log K_D$) of ¹²⁵I-Tyr⁰-sauvagine for the ΔCys CRF₁R (ΔCys) and its substituted Cys mutants (ΔCys + R189^{3,26}C to ΔCys + G210^{3,47}C) are represented as bars, which indicate the mean ± S.E. values from 3 to 7 independent experiments. *Solid bars with asterisks* indicate substituted Cys mutants for which ¹²⁵I-Tyr⁰-sauvagine binding affinity was significantly different from that for ΔCys ($p < 0.05$; one way ANOVA).

3B). In marked contrast, the binding affinity of astressin was not affected by the F203^{3,40}C mutation even in the presence of MTSEA (Fig. 3C). Astressin is a CRF peptide antagonist that is less sensitive to receptor activation-associated conformational changes than agonists, and it interacts with the extracellular N-domain of CRF₁R (8, 15).

Quantification of the binding affinity of ¹²⁵I-Tyr⁰-sauvagine for the ΔCys CRF₁R indicated that the F203^{3,40}C mutation decreased the affinity of receptor 18-fold (Figs. 2B and 3D and Table 1). Notably, MTSEA restored the low affinity of ΔCys + F203^{3,40}C to normal levels (Figs. 2B and 3D and Table 1). Substitution of F203^{3,40} by Lys (F203^{3,40}K) did not significantly modify the binding of ¹²⁵I-Tyr⁰-sauvagine relative to wild-type receptor (Fig. 4A), in a manner similar to the effect of the MTSEA reaction that adds a Lys-like side chain to F203^{3,40}C (Fig. 3D). In contrast, the F203^{3,40}K mutation abolished antalarmin binding (Fig. 4B), as in the F203^{3,40}C mutation (Fig. 3B). The binding affinity of astressin was not affected by the F203^{3,40}K mutation (Fig. 4C), similar to the F203^{3,40}C mutation, which did not affect astressin affinity even in the presence of MTSEA (Fig. 3C). The effects of the Cys mutation of F203^{3,40} and its modification by MTSEA on the binding of the peptide

agonist Tyr⁰-sauvagine, but not on the peptide antagonist astressin, suggest that F203^{3,40} influences receptor activation.

Similar effects were observed in the binding of sauvagine, which lacks the N-terminal Tyr⁰ (Fig. 5A), to the F203^{3,40}C mutant receptor. Sauvagine bound ΔCys + F203^{3,40}C with low affinity, which was largely increased upon reaction with MTSEA (Fig. 5B).

Role of F203^{3,40} in the Activation of the CRF₁R—A GCGR-based homology model of the CRF₁R used to depict the unliganded basal state shows a network of hydrophobic-aromatic interactions between TM3 and -6 (Fig. 6A), which is similar to the class A network (Fig. 6B) (17, 21). In this network of interactions, the hydrophobic-aromatic residues at positions 3.40 (Phe 77% and Tyr 20%) and 6.44 (Leu 65% and Phe 22%) are highly conserved in class B GPCRs (supplemental Fig. S1).

The important functional role of F203^{3,40} of CRF₁R is supported by the fact that its mutation to Trp or Ile does not modify the binding of ¹²⁵I-Tyr⁰-sauvagine relative to WT receptor (Fig. 7A and Table 2). Importantly, removing the hydrophobic and bulky side chain at position 203 by mutating F203^{3,40} to Ala, reduced the affinity of the radiolabeled agonist 27-fold (Fig. 7A and Table 2). In contrast, the affinity of the antagonist astressin

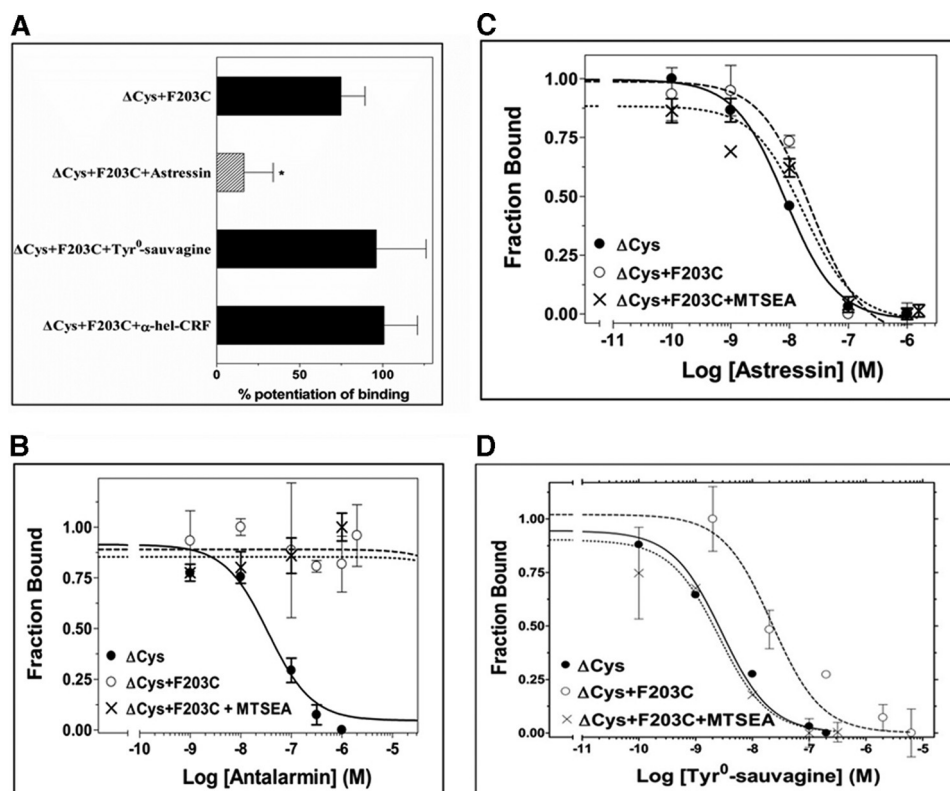


FIGURE 3. Effect of F203^{3,40}C mutation on the binding properties of Δ Cys CRF₁R. A, potentiation of [¹²⁵I]-Tyr⁰-sauvagine binding to Δ Cys + F203^{3,40}C by MTSEA after pretreatment of cells expressing this receptor without or with 1 μ M astressin, 1 μ M Tyr⁰-sauvagine, or 1 μ M α -helical (9–41) CRF (α -hel-CRF). The bars indicate the mean \pm S.E. values from 2 to 7 independent experiments. Hatched bar with asterisk indicates that MTSEA potentiation of binding to Δ Cys + F203^{3,40}C was significantly inhibited after pretreatment of receptor with ligand ($p < 0.05$; one-way ANOVA). B–D, competition binding isotherms of antalarmin (B), astressin (C), and Tyr⁰-sauvagine (D) at the Δ Cys CRF₁R, its substituted Cys mutant, Δ Cys + F203^{3,40}C, and the MTSEA-treated Δ Cys + F203^{3,40}C. The means \pm S.E. (duplicate determination) are shown from a representative experiment performed 3–6 times with similar results. The affinities ($-\log K_i$) of antalarmin, determined from these experiments, are 7.32 ± 0.05 , < 5.00 and < 5.00 , for Δ Cys, Δ Cys + F203^{3,40}C, and MTSEA-treated Δ Cys + F203^{3,40}C, respectively. The affinities ($-\log K_D$) of [¹²⁵I]-Tyr⁰-sauvagine, are given in Table 1. The affinities ($-\log K_i$) of astressin are 8.00 ± 0.10 , 7.58 ± 0.19 , and 7.54 ± 0.27 , for Δ Cys, Δ Cys + F203^{3,40}C, and MTSEA-treated Δ Cys + F203^{3,40}C, respectively.

TABLE 1

Effect of MTSEA reaction on the binding properties of the substituted Cys mutants

The affinities of Tyr⁰-sauvagine ($-\log K_D$) for the substituted Cys mutants before and after their reaction with MTSEA were determined from homologous competitive binding experiments, using as radioligand the [¹²⁵I]-Tyr⁰-sauvagine. The mean \pm S.E. values were obtained from 2 to 7 independent experiments with similar results.

$-\log K_D \pm$ S.E.		+ MTSEA
Δ Cys + R189C	8.38 ± 0.11	8.47 ± 0.40
Δ Cys + T192C	8.50 ± 0.24	9.03 ± 0.29
Δ Cys + A193C	8.77 ± 0.12	8.98 ± 0.05
Δ Cys + Y195C	8.94 ± 0.23	9.51 ± 0.21
Δ Cys + N196C	8.85 ± 0.21	9.33 ± 0.17
Δ Cys + H199C	8.61 ± 0.12	8.94 ± 0.15
Δ Cys + F203C	7.33 ± 0.20	8.80 ± 0.33

was not affected by these mutations (Fig. 7B and Table 2). The different effects of these mutations on peptide agonist versus antagonist binding further support that modifications at position 203^{3,40} of CRF₁R affect the ability of the receptor to adopt the active conformation, which binds with high affinity agonists such as [¹²⁵I]-Tyr⁰-sauvagine. Antalarmin binding to CRF₁R was abolished by the F203^{3,40}A mutation, whereas F203^{3,40}I and F203^{3,40}W substitutions slightly modified and increased its binding affinity, respectively (Fig. 7C and Table 2).

To provide additional experimental evidence for the important role of F203^{3,40} in receptor activation, we determined

the ability of sauvagine to stimulate cAMP accumulation in HEK293 cells before and after F203^{3,40} mutations. Clearly, F203^{3,40}W and F203^{3,40}I mutations did not affect the ability of sauvagine to activate CRF₁R (Fig. 7, D–F, and Table 2). Specifically, F203^{3,40}W and F203^{3,40}I mutations reduced the potencies of sauvagine ($-\log EC_{50}$) only 2- and 1.3-fold, respectively. In contrast, the F203^{3,40}A mutation had the greatest effect on sauvagine potency (Fig. 7G and Table 2), by decreasing it 24-fold. The potency of sauvagine ($-\log EC_{50}$) to stimulate cAMP accumulation was reduced by astressin or antalarmin by 15- or 33-fold, respectively, for WT receptor, 35- or 186-fold for the F203^{3,40}W mutant, and 65- or 1117-fold for the F203^{3,40}I mutant (Fig. 7, D–F, and Table 2).

Antalarmin Antagonizes Peptide Binding and Receptor Activation by Interacting with F203^{3,40}—The importance of the aromatic ring at position 203^{3,40} in antalarmin binding to CRF₁R has already been seen in different experiments (e.g. Figs. 3B, 4B, and 7C and Table 2). Moreover, the potency of sauvagine to stimulate cAMP accumulation greatly depended on the nature of the substituted residue at the 3.40 position (Fig. 7, D–G, and Table 2). Remarkably, antalarmin, even at a very high concentration (2 μ M), was unable to inhibit sauvagine potency for F203^{3,40}A, in agreement with the inability of this nonpeptide ligand to bind to F203^{3,40}A (Fig. 7G and Table 2). In marked contrast, the peptide antagonist astressin decreased the

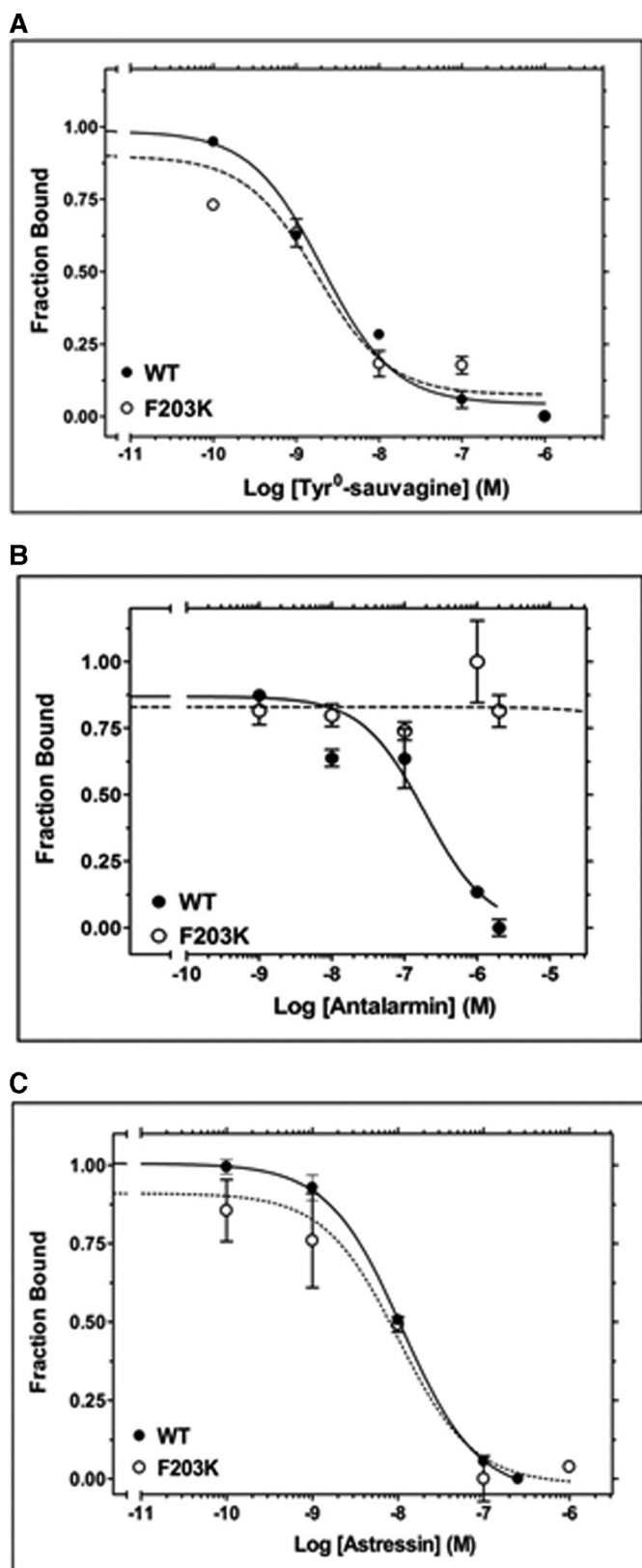


FIGURE 4. Effect of F203^{3,40}K mutation on ligand binding. A, competition binding isotherms of Tyr⁰-sauvagine at the WT CRF₁R and its F203K mutant. The means and S.E. (duplicate determination) are shown from a representative experiment performed 3–4 times with similar results. The affinities ($-\log K_D$) of [¹²⁵I]-Tyr⁰-sauvagine, determined from these experiments, are 8.38 ± 0.20 and 8.51 ± 0.21 for WT and F203K, respectively. B, competition binding isotherms of antalarmin at the F203K mutant and WT CRF₁R. The means and S.E. (duplicate determination) are shown from a representative experiment performed 4–5 times with similar results. The affinities ($-\log K_D$) of antalarmin, determined from these experiments, are 7.62 ± 0.13 and <5.00 for WT and F203K, respectively. C, competition binding isotherms of astressin at the 203K mutant and WT CRF₁R. The means and S.E. (duplicate determination) are shown from a representative experiment performed 3–6 times with similar results. The affinities ($-\log K_D$) of astressin, determined from these experiments, are 8.02 ± 0.07 and 8.02 ± 0.19 for WT and F203K, respectively.

potency of sauvagine to stimulate cAMP (Fig. 7G and Table 2). Fig. 7H shows a model of the complex between antalarmin and CRF₁R based on the crystal structure of the similar CP-376395 ligand and CRF₁R (6). F203^{3,40} interacts with the ethyl group of the ligand and restricts the binding site along with Y327^{6,48}.

Gly210^{3,47} Plays an Important Role in the Activation of the CRF₁R—The binding affinity of [¹²⁵I]-Tyr⁰-sauvagine for Δ Cys + G210^{3,47}C receptor was 129 times lower than that for Δ Cys, whereas this mutation did not affect the binding affinity of astressin (Figs. 2B and 8A). Similarly, the potency of sauvagine to stimulate cAMP accumulation was decreased 121 times due to the G210^{3,47}C mutation (Fig. 8B). The G210^{3,47}A mutation had a significantly smaller impact on the affinity and potency of sauvagine compared with that of G210^{3,47}C substitution. In specific the binding affinity of [¹²⁵I]-Tyr⁰-sauvagine and the potency of sauvagine for the Δ Cys were only reduced 10- and 3.5-fold, respectively, by the G210^{3,47}A mutation (Fig. 8, A and B). In addition, similar to G210^{3,47}C mutation, the G210^{3,47}A substitution did not affect the affinity of astressin (Fig. 8A). Fig. 8C shows that G210^{3,47} is pointing toward N283^{5,54} in TM5 (88% conserved in the class B sequences), which is forming an inter-helical hydrogen bond with the backbone oxygen of the amino acid at position 3.43 (Met-206). Mutation of G210^{3,47}C, but not of G210^{3,47}A, adds a polar side chain in the key interface between TM3 and -5 that interacts with N283^{5,54} (Fig. 8D). The publication of the crystal structure of the ligand-free opsin showed that during the process of receptor activation, the intracellular part of TM6 tilts outward and TM5 comes close to TM6 (16). Thus, we propose that the additional constraint between N283^{5,54} and C210^{3,47} that replaced G210^{3,47} restrains TM5 in the inactive conformation that makes difficult the activation of the mutant CRF₁R by the extracellular ligand. As a consequence, only small, nonpolar amino acids are found at position 3.47 in class B GPCRs (Gly 57% and Ala 39%).

DISCUSSION

By using SCAM, we identified the TM3 residues of the apo-inactive state of the full-length CRF₁R that are exposed in the water-accessible binding site crevice of the receptor. Seven among the 22 TM3 residues (R189^{3,26}, T192^{3,29}, A193^{3,30}, Y195^{3,32}, N196^{3,33}, H199^{3,36}, and F203^{3,40}) were found to be located on the surface of the binding site crevice, whereas residues that are located deeper in TM3 than F203^{3,40} were inaccessible. These results suggest that the TM3 of CRF₁R in its unliganded state is positioned such that half of this helix participates in the formation of a large cavity, whereas the other half is tightly packed with the other TMs. This prediction is compatible with the crystal structures of the solubilized, N-terminally truncated inactive states of both unliganded GCGR and

means and S.E. (duplicate determination) are shown from a representative experiment performed 4–5 times with similar results. The affinities ($-\log K_D$) of antalarmin, determined from these experiments, are 7.62 ± 0.13 and <5.00 for WT and F203K, respectively. C, competition binding isotherms of astressin at the 203K mutant and WT CRF₁R. The means and S.E. (duplicate determination) are shown from a representative experiment performed 3–6 times with similar results. The affinities ($-\log K_D$) of astressin, determined from these experiments, are 8.02 ± 0.07 and 8.02 ± 0.19 for WT and F203K, respectively.

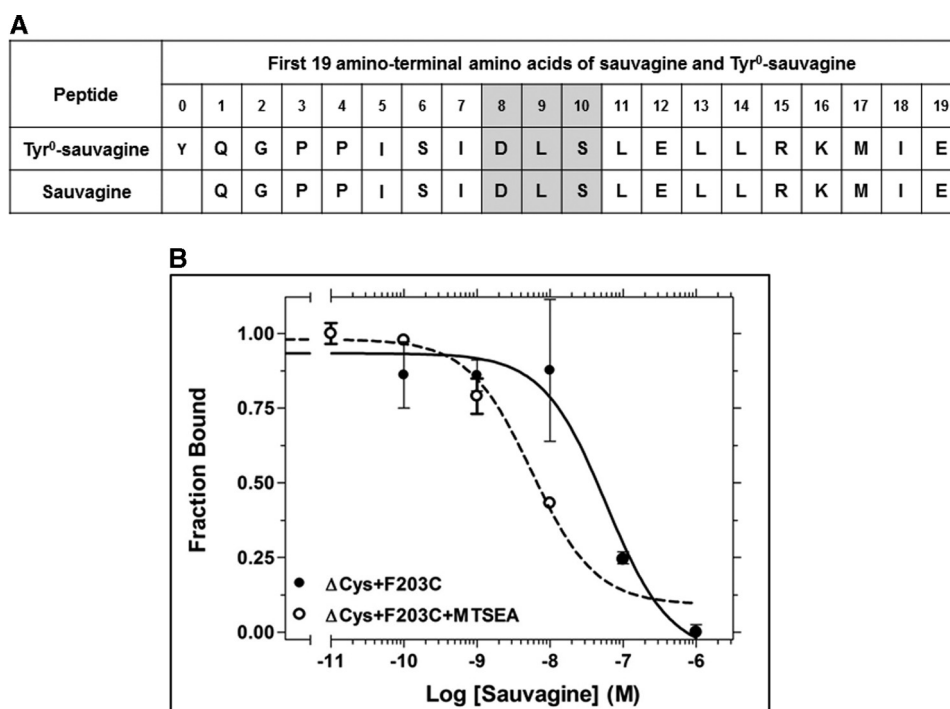


FIGURE 5. **Effect of F203^{3,40}C mutation on sauvagine binding.** *A*, amino acid sequences of sauvagine and Tyr⁰-sauvagine. The amino acids in *gray boxes* interact with the second extracellular loop of CRF₁R (15). *B*, competition binding isotherms of sauvagine at the Δ Cys + F203C, before and after its reaction with MTSEA. The means and S.E. (duplicate determination) are shown from a representative experiment performed four times with similar results. The affinities ($-\log K_i$) of sauvagine, determined from these experiments, are 7.37 ± 0.11 and 8.20 ± 0.15 , for the Δ Cys + F203C and the MTSEA-treated Δ Cys + F203C, respectively.

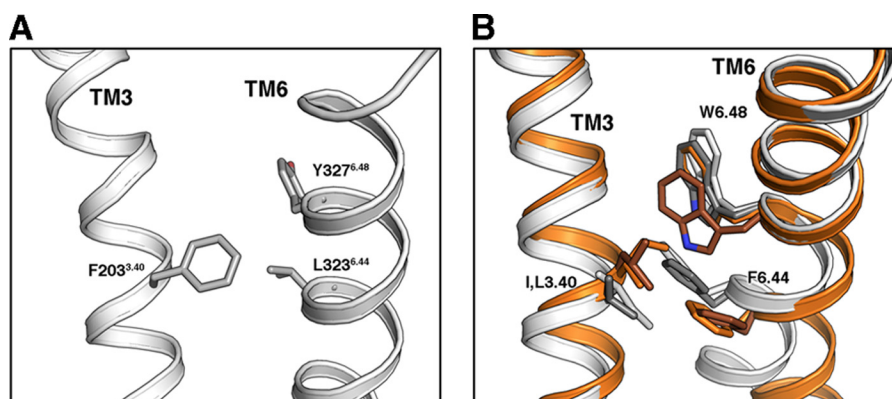


FIGURE 6. **Role of F203^{3,40} in CRF₁R activation.** *A*, GCGR-based homology model of CRF₁R, used to depict the ligand-free basal state. Residues F203^{3,40}, L323^{6,44}, and Y327^{6,48} are shown, whose homologous amino acids in class A GPCRs play a key role in receptor activation. *B*, comparison of the amino acids at positions 3.40, 6.44, and 6.48 in the inactive (*white*) and active (*orange*) β_2 -AR and the inactive (*gray*) and active (*brown*) rhodopsin.

CRF₁R complexed with CP-376395 (5, 6). The identified large V-shape cavity of the CRF₁R is capable of accommodating the large peptides that bind class B GPCRs.

Among the Cys substitutions of TM3 residues, the G210^{3,47}C mutation had the largest impact on the high affinity of [¹²⁵I]-Tyr⁰-sauvagine binding. Specifically, substitution of G210^{3,47} to Cys decreased the binding affinity of [¹²⁵I]-Tyr⁰-sauvagine 129-fold. Similarly, the G210^{3,47}C mutation decreased the potency of sauvagine 121-fold. These results suggest that mutation of G210^{3,47} to Cys largely decreased the ability of receptor to adopt its active state. G210^{3,47} is located one helical turn below residue M206^{3,43}, whose backbone carbonyl group forms a hydrogen bond interaction with N283^{5,54} of TM5 (Fig. 8C), in the crystal structures of GCGR and CRF₁R (5, 6). Our compu-

tational model shows that the $-\text{SH}$ group of C210^{3,47} in the G210^{3,47}C mutation forms a hydrogen bond with the side chain oxygen atom of N283^{5,54} (Fig. 8D). In contrast, mutation of G210^{3,47} to Ala, which cannot form this hydrogen bond, had a much smaller impact on the affinity and potency of sauvagine. Thus, strengthening the interface between TM3 and -5 further stabilizes the inactive state of receptor, thus rendering it unable to be activated by agonists to the same degree as the wild-type receptor. This leads to the speculation that the movement of TM3 and TM5 that occurs during the process of class A receptor activation might also occur in class B GPCRs (16). Similarly, the mechanism of receptor inactivation by the nonpeptide antagonist antalarmin could be partly due to the reinforcement of this interface between TM3 and -5 (Fig. 7H). The pyrrolo-

Structural-Functional Analysis of the CRF₁ Receptor

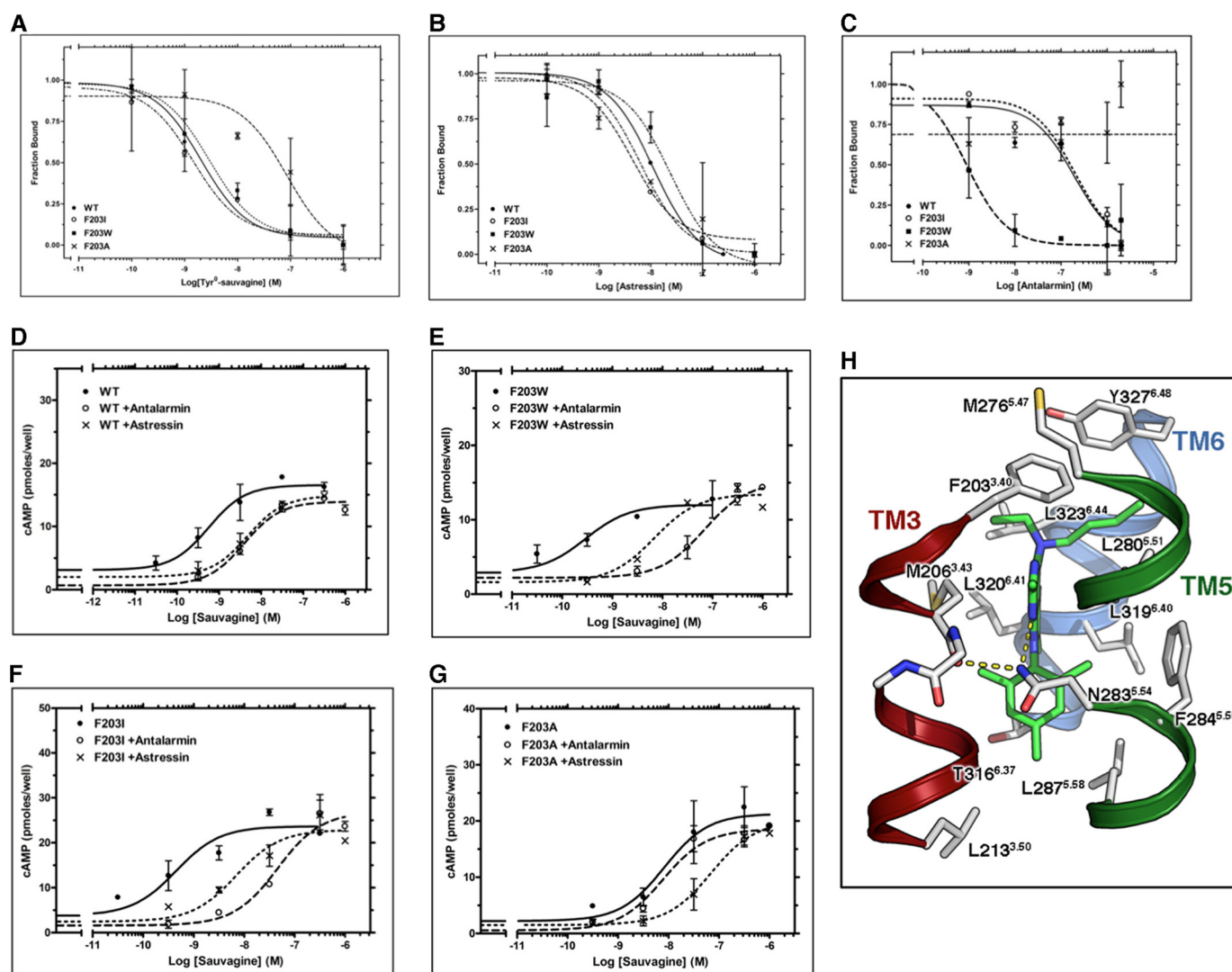


FIGURE 7. Interaction of antalarmin with F203^{3,40} of CRF₁R. A–C, competition binding isotherms of Tyr⁰-sauvagine (A), stressin (B), and antalarmin (C) at the WT CRF₁R and its F203^{3,40}A, F203^{3,40}I, and F203^{3,40}W mutants. The means and S.E. (duplicate determination) are shown from a representative experiment performed 3–6 times with similar results. The affinities of [¹²⁵I]-Tyr⁰-sauvagine ($-\log K_D$), stressin ($-\log K_D$), and antalarmin ($\log K_D$), determined from these experiments, are given in Table 2. D–G, stimulation of cAMP accumulation in HEK293 cells expressing WT (D), F203^{3,40}W (E), F203^{3,40}I (F), or F203^{3,40}A (G) by sauvagine in the absence or presence of 0.3 μ M stressin or 1–2 μ M antalarmin. The means and S.E. (duplicate determination) are shown from a representative experiment performed 3–10 times with similar results. The potencies ($-\log EC_{50}$) of sauvagine without or with antalarmin or stressin, determined from these experiments, are given in Table 2. H, molecular model of the complex between antalarmin and CRF₁R. The ethyl groups of the ligand interact with F203^{3,40}, the aromatic ring interacts with M206^{3,43} and N283^{5,54}, and the methyl groups of the terminal aromatic ring are located in a hydrophobic pocket of the receptor.

pyrimidine group of antalarmin forms a hydrogen bond with N283^{5.54} and a hydrophobic interaction with M206^{3.43}, whereas its ethyl group forms an aliphatic-aromatic interaction with F203^{3.40} (Fig. 7H).

Interestingly, the central part of the TM3-TM5 interface has also been suggested to play an important role in the activation of class A GPCRs (17, 21). Specifically, in the crystal structure of the inactive state of β_2 -AR, the relative positions of TM3, -5, and -6 are stabilized by interactions between a cluster of conserved hydrophobic and aromatic residues P211^{5.50}, I121^{3.40}, and F282^{6.44}. Comparison of the agonist-bound active structure of the β_2 -adrenergic receptor with its inactive structure shows an activation-associated rearrangement (“transmission switch”) of I121^{3.40}, P211^{5.50}, and F282^{6.44} (Fig. 6B) (9, 17, 22). In specific, agonist binding triggers an anticlockwise rotation, viewed from the extracellular part, of I121^{3.40} and F282^{6.44}

facilitating the outward movement of TM6 for β_2 -AR activation (Fig. 6B) (17). In addition to this rearrangement, the crystal structure of metarhodopsin II (23) also shows the shift of W^{6.48} toward TM5, relative to the inactive structure (Fig. 6B). Class B GPCRs also contain a conserved Pro residue (present in 87% of the sequences) at position 5.45 which, in the crystal structures of GCGR and CRF₁R, does not cause the characteristic opening of the helix as observed at P^{5.50} in class A receptors. However, F203^{3.40} (Phe 77% and Tyr 20% in class B sequences) and L323^{6.44} (Leu 65% and Phe 22%) of CRF₁R, which correspond to I121^{3.40} (Ile 40%, Val 25%, and Leu 11% in class A sequences), and F282^{6.44} (Phe 81% and Tyr 7%) in β_2 -AR (supplemental Fig. S1), respectively, form an aromatic-aliphatic interaction in the model of the apo, unliganded, and inactive state of CRF₁R (Fig. 6). Importantly, removal of the aromatic F203^{3.40} side chain (mutation to Ala, F203^{3,40}A) of CRF₁R decreased the ability of

TABLE 2

Effect of F203^{3,40} mutations on binding and signaling properties of CRF₁R

Top, affinities of Tyr⁰-sauvagine ($-\log K_D$), astressin ($-\log K_i$), or antalarmin ($-\log K_i$) for WT CRF₁R or F203^{3,40} mutants were determined from homologous or heterologous competitive binding experiments, using as radioligand the ¹²⁵I-Tyr⁰-sauvagine. The mean \pm S.E. values were obtained from 3 to 6 independent experiments with similar results. Bottom, potencies of sauvagine ($-\log EC_{50}$) for WT CRF₁R or F203^{3,40} mutants were determined in cAMP accumulation experiments, in the absence or presence of 0.3 μ M astressin or 1–2 μ M antalarmin. The mean \pm S.E. values were obtained from 3 to 10 independent experiments with similar results.

	WT	F203A	F203I	F203W
$-\log K_D$ or $-\log K_i$				
Tyr ⁰ -sauvagine	8.38 \pm 0.20	6.95 \pm 0.11	8.40 \pm 0.16	8.40 \pm 0.37
Astressin	8.02 \pm 0.07	8.03 \pm 0.18	7.84 \pm 0.18	7.74 \pm 0.07
Antalarmin	7.62 \pm 0.13	<5.00	6.92 \pm 0.15	9.54 \pm 0.27
$-\log EC_{50}$				
Sauvagine	9.90 \pm 0.19	8.52 \pm 0.23	9.79 \pm 0.40	9.60 \pm 0.06
Sauvagine + astressin	8.72 \pm 0.21	7.40 \pm 0.21	7.98 \pm 0.30	8.05 \pm 0.43
Sauvagine + antalarmin	8.38 \pm 0.35	8.00 \pm 0.29	6.74 \pm 0.23	7.33 \pm 0.69

receptor to adopt its active state, which is responsible for the high affinity binding of ¹²⁵I-Tyr⁰-sauvagine and the high potency of sauvagine. In contrast, conservation of the aromaticity at this position by mutating F203^{3,40} to Trp (F203^{3,40}W) or adding the bulky and aliphatic Ile side chain (F203^{3,40}I), to mimic the β_2 -adrenergic sequence, did not considerably affect the pharmacological properties of the receptor. These results led us to speculate that class B GPCRs might also contain a “transmission switch” from TM3 toward TM6 that finally triggers the outward movement of the cytoplasmic end of TM6 for receptor activation and G protein binding.

Consistent with the notion that the presence of a bulky aromatic/aliphatic side chain at position 203^{3,40} is important for CRF₁R activation, introduction of a smaller and hydrophilic Cys side chain (F203^{3,40}C) also decreased the high affinity binding of ¹²⁵I-Tyr⁰-sauvagine. Interestingly, reaction of C203^{3,40} of the mutant receptor with the MTSEA restored the binding affinity of radiolabeled agonist. Moreover, substitution of F203^{3,40} with Lys (F203^{3,40}K) did not alter the high affinity binding of ¹²⁵I-Tyr⁰-sauvagine relative to the wild-type receptor. Thus, addition of the positively charged side chain of K203^{3,40} or MTSEA-C203^{3,40}, within the hydrophobic environment of the 203^{3,40} locus, probably forms a new set of interactions with nearby amino acids that facilitate receptor activation. Repositioning of the 3.40 residue and formation of a new set of interactions during receptor activation has also been suggested in class A GPCRs (17).

Similar to the modification of F203^{3,40} in CRF₁R, Ala mutation of the homologous residue in the class B glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor has been shown to decrease the ability of peptides to activate the receptor (24). In contrast, Ala mutation of this residue in GCGR did not affect receptor activation by glucagon (5). Likewise, mutation of the corresponding residue in class A GPCRs had a different impact in receptor activation. For example, Ala mutation of the amino acid at position 3.40 decreased the basal and agonist-induced activation of the histamine H₁ receptor (21). In marked contrast Ala mutation of the homologous residue in the muscarinic receptor constitutively activated the receptor and increased the binding affinity and signaling efficacy of agonists (25). Moreover, mutation of the corresponding residue in the thyrotropin-releasing hormone receptor did not change its pharmacological

profile (26). Thus, members from different families of GPCRs could share common structural elements involved in their mechanism of activation, however without this pattern of conservation serving as an exclusive feature of all receptors belonging to these families. Furthermore, different ligands also trigger different activation mechanisms at a given receptor (27). These findings might provide the basis for a novel classification of GPCRs according to their common mechanisms of activation.

The effects of F203^{3,40}A and F203^{3,40}C mutations on ¹²⁵I-Tyr⁰-sauvagine binding are not likely to be due to a possible loss of interaction between the Tyr⁰ of sauvagine and the aromatic group of F203^{3,40} because these mutations had similar impact on the binding of sauvagine, which lacks Tyr⁰. Similarly, the first four N-terminal residues of CRF peptides are not important for their biological activity (28). Likewise the aliphatic residues Ile-5 and Ile-7 of sauvagine are not likely to interact with F203^{3,40} because the introduction of a positive charge at position 203^{3,40} after F203^{3,40}K mutation did not affect the high affinity binding ¹²⁵I-Tyr⁰-sauvagine. The hydrophilic Ser-6 of sauvagine is also not compatible with the hydrophobic F203^{3,40} of CRF₁R. In addition, sauvagine residues 8–11 do not enter the binding site crevice of CRF₁R to reach F203^{3,40}, because they interact with the EL2 of receptor (15). Thus, F203^{3,40} must play an allosteric role in peptide binding and peptide-mediated activation of CRF₁R. The important conformational role of F203^{3,40} is further supported by the different effects of various ligands on MTSEA reactivity at this residue. The agonist Tyr⁰-sauvagine and the α -helical (9–41) CRF, which is an antagonist with partial agonist properties (29), were unable to protect F203^{3,40}C from MTSEA modification. In marked contrast, the antagonist astressin significantly decreased the ability of MTSEA to potentiate ¹²⁵I-Tyr⁰-sauvagine binding to F203^{3,40}C. The different functional role of various CRF ligands is in agreement with previous studies. Astressin binding to CRF₁R has been shown to be potentiated by the GTP analog, Gpp(NH)p, whereas that of the agonist CRF was decreased (30).

Interestingly, F203^{3,40} not only plays a key role in CRF₁R activation but also is the most important contact site of the nonpeptide antagonist, antalarmin. Removing its side chain by mutating F203^{3,40} to Ala or replacing it with the hydrophilic Cys or the positively charged Lys abolished the binding of the hydrophobic nonpeptide antagonist, antalarmin, as well as its ability to decrease the potency of sauvagine for the CRF₁R. Similar to our findings, the crystal structure of CRF₁R has shown that F203^{3,40} interacts with CP-376395 (6). Thus, F203^{3,40} plays a common role in the binding of different nonpeptide CRF₁R antagonists, and it is speculated that this interaction allosterically inhibits peptide binding and receptor activation.

Conclusively, TM3 plays a key role in the activation of the class B CRF₁R, as in class A GPCRs. Remarkably, as in CRF₁R, mutations at position 3.40 of the TM3 of class A, rhodopsin receptor, severely affect the receptor's function, being related to a decreased time in the meta II active state of receptor, poor retinal binding, reduced transducin activation, and retinitis pigmentosa (31). Moreover, the 3.40 residue of CRF₁R is not just a mere contact site of nonpeptide antagonists, but possibly serves as a molecular determinant of allosteric antagonism for peptide binding and receptor activation by nonpeptide antagonists.

Structural-Functional Analysis of the CRF₁ Receptor

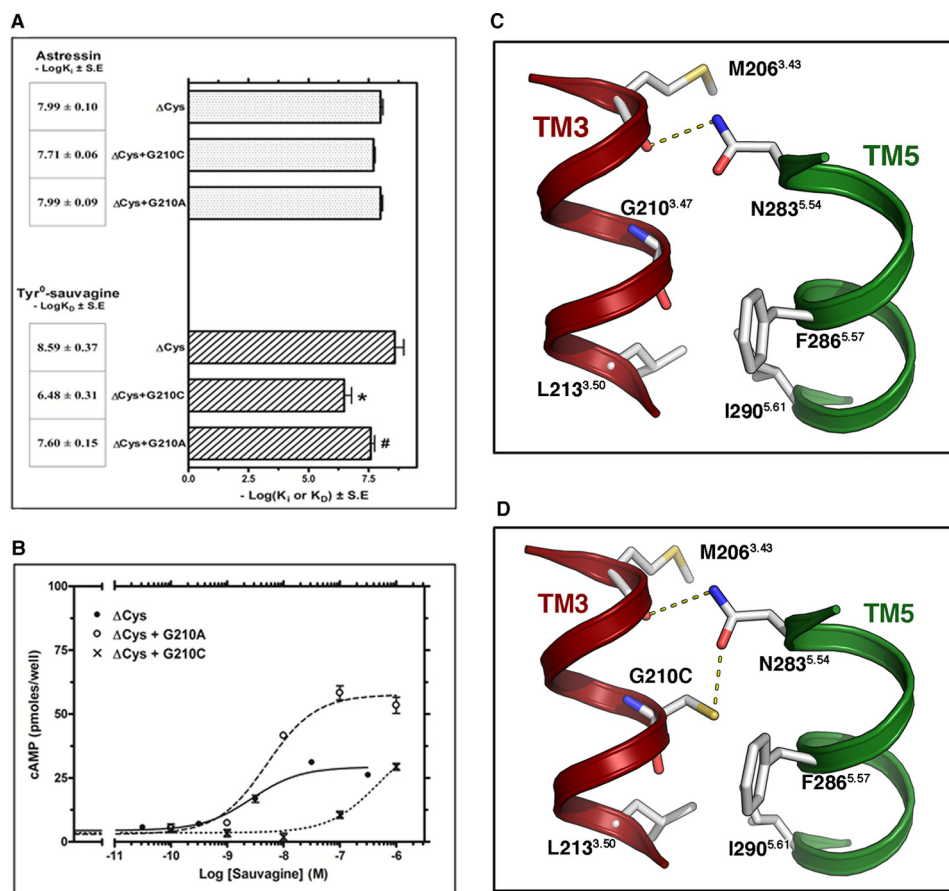


FIGURE 8. Effect of G210^{3,47}C and G210^{3,47}A mutations on the binding and signaling properties of ΔCys CRF₁R. *A*, binding affinities of astressin ($-\log(K_i)$) and ^{125}I -Tyr⁰-sauvagine ($-\log(K_D)$) for ΔCys and its substituted Cys mutants, $\Delta\text{Cys} + \text{G210}^{3,47}\text{C}$ and $\Delta\text{Cys} + \text{G210}^{3,47}\text{A}$, are represented as bars, which indicate the mean \pm S.E. values from 3 to 4 independent experiments. The asterisk and pound indicate that mutations significantly alter ^{125}I -Tyr⁰-sauvagine binding affinity compared with that of ΔCys and $\Delta\text{Cys} + \text{G210}^{3,47}\text{C}$, respectively ($p < 0.05$; one-way ANOVA). *B*, stimulation of cAMP accumulation in HEK293 cells expressing ΔCys , $\Delta\text{Cys} + \text{G210}^{3,47}\text{C}$, or $\Delta\text{Cys} + \text{G210}^{3,47}\text{A}$ by sauvagine. The means and S.E. (duplicate determination) are shown from a representative experiment performed 4–11 times with similar results. The potencies ($-\log(\text{EC}_{50})$) of sauvagine for the ΔCys , $\Delta\text{Cys} + \text{G210}^{3,47}\text{C}$, and $\Delta\text{Cys} + \text{G210}^{3,47}\text{A}$, determined from these experiments, are 8.68 ± 0.14 , 6.60 ± 0.13 , and 8.15 ± 0.06 , respectively. *C* and *D*, molecular model of the interface between TM3 and -5 of CRF₁R, constructed from the structure of the ligand-free GPCR. *C*, N283^{5,54} in TM5 is forming an inter-helical hydrogen bond with the backbone of M206^{3,43}. *D*, mutation of G210^{3,47} to Cys adds a polar side chain that interacts with N283^{5,54}.

This finding is not only of fundamental biological interest, but it also holds great potential for enhancing human health, given that small nonpeptide CRF₁R antagonists have been shown to be effective against stress-related disorders, such as anxiety and depression (10).

Acknowledgment—We are grateful to Dr. George Chrousos for the gift of antalarmin.

REFERENCES

- Bockaert, J., and Pin, J. P. (1999) Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J.* **18**, 1723–1729
- Liapakis, G., George, L., Cordini, A., Arnau, C., Pardo, L., and Leonardo, P. (2012) The G protein coupled receptor family: actors with many faces. *Curr. Pharm. Des.* **18**, 175–185
- Nordström, K. J., Lagerström, M. C., Wallér, L. M., Fredriksson, R., and Schiöth, H. B. (2009) The secretin GPCRs descended from the family of adhesion GPCRs. *Mol. Biol. Evol.* **26**, 71–84
- Katritch, V., Cherezov, V., and Stevens, R. C. (2013) Structure-function of the G protein-coupled receptor superfamily. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **53**, 531–556
- Siu, F. Y., He, M., de Graaf, C., Han, G. W., Yang, D., Zhang, Z., Zhou, C., Xu, Q., Wacker, D., Joseph, J. S., Liu, W., Lau, J., Cherezov, V., Katritch, V.,

- Wang, M. W., and Stevens, R. C. (2013) Structure of the human glucagon class B G protein-coupled receptor. *Nature* **499**, 444–449
- Hollenstein, K., Kean, J., Bortolato, A., Cheng, R. K., Doré, A. S., Jazayeri, A., Cooke, R. M., Weir, M., and Marshall, F. H. (2013) Structure of class B GPCR corticotropin-releasing factor receptor 1. *Nature* **499**, 438–443
- Hoare, S. R. (2005) Mechanisms of peptide and nonpeptide ligand binding to Class B G protein-coupled receptors. *Drug Discov. Today* **10**, 417–427
- Perrin, M. H., Sutton, S., Bain, D. L., Berggren, W. T., and Vale, W. W. (1998) The first extracellular domain of corticotropin releasing factor-R1 contains major binding determinants for urocortin and astressin. *Endocrinology* **139**, 566–570
- Venkatakrishnan, A. J., Deupi, X., Lebon, G., Tate, C. G., Schertler, G. F., and Babu, M. M. (2013) Molecular signatures of G protein-coupled receptors. *Nature* **494**, 185–194
- Liapakis, G., Venihaki, M., Margioris, A., Grigoriadis, D., and Gkoutelias, K. (2011) Members of CRF family and their receptors: from past to future. *Curr. Med. Chem.* **18**, 2583–2600
- Shatsky, M., Nussinov, R., and Wolfson, H. J. (2004) A method for simultaneous alignment of multiple protein structures. *Proteins* **56**, 143–156
- Waterhouse, A. M., Procter, J. B., Martin, D. M., Clamp, M., and Barton, G. J. (2009) Jalview Version 2—a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* **25**, 1189–1191
- Martí-Renom, M. A., Stuart, A. C., Fiser, A., Sánchez, R., Melo, F., and Sali, A. (2000) Comparative protein structure modeling of genes and genomes. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **29**, 291–325

14. Gkountelias, K., Papadokostaki, M., Javitch, J. A., and Liapakis, G. (2010) Exploring the binding site crevice of a family B G protein-coupled receptor, the type 1 corticotropin releasing factor receptor. *Mol. Pharmacol.* **78**, 785–793
15. Gkountelias, K., Tselios, T., Venihaki, M., Deraos, G., Lazaridis, I., Rassouli, O., Gravanis, A., and Liapakis, G. (2009) Alanine scanning mutagenesis of the second extracellular loop of type 1 corticotropin-releasing factor receptor revealed residues critical for peptide binding. *Mol. Pharmacol.* **75**, 793–800
16. Park, J. H., Scheerer, P., Hofmann, K. P., Choe, H. W., and Ernst, O. P. (2008) Crystal structure of the ligand-free G protein-coupled receptor opsin. *Nature* **454**, 183–187
17. Rasmussen, S. G., Choi, H. J., Fung, J. J., Pardon, E., Casarosa, P., Chae, P. S., Devree, B. T., Rosenbaum, D. M., Thian, F. S., Kobilka, T. S., Schnapp, A., Konetzki, I., Sunahara, R. K., Gellman, S. H., Pautsch, A., Steyaert, J., Weis, W. I., and Kobilka, B. K. (2011) Structure of a nanobody-stabilized active state of the β_2 adrenoceptor. *Nature* **469**, 175–180
18. Rasmussen, S. G., DeVree, B. T., Zou, Y., Kruse, A. C., Chung, K. Y., Kobilka, T. S., Thian, F. S., Chae, P. S., Pardon, E., Calinski, D., Mathiesen, J. M., Shah, S. T., Lyons, J. A., Caffrey, M., Gellman, S. H., Steyaert, J., Skiniotis, G., Weis, W. I., Sunahara, R. K., and Kobilka, B. K. (2011) Crystal structure of the β_2 adrenergic receptor-Gs protein complex. *Nature* **477**, 549–555
19. Ballesteros, J., and Weinstein, H. (1995) Integrated methods for the construction of three-dimensional models of structure-function relations in G protein-coupled receptors. *Methods Neurosci.* **25**, 366–428
20. Javitch, J. A., Shi, L., and Liapakis, G. (2002) Use of the substituted cysteine accessibility method to study the structure and function of G protein-coupled receptors. *Methods Enzymol.* **343**, 137–156
21. Sansuk, K., Deupi, X., Torrecillas, I. R., Jongejan, A., Nijmeijer, S., Bakker, R. A., Pardo, L., and Leurs, R. (2011) A structural insight into the reorientation of transmembrane domains 3 and 5 during family A G protein-coupled receptor activation. *Mol. Pharmacol.* **79**, 262–269
22. Rasmussen, S. G., Choi, H. J., Rosenbaum, D. M., Kobilka, T. S., Thian, F. S., Edwards, P. C., Burghammer, M., Ratnala, V. R., Sanishvili, R., Fischetti, R. F., Schertler, G. F., Weis, W. I., and Kobilka, B. K. (2007) Crystal structure of the human β_2 adrenergic G protein-coupled receptor. *Nature* **450**, 383–387
23. Choe, H. W., Kim, Y. J., Park, J. H., Morizumi, T., Pai, E. F., Krauss, N., Hofmann, K. P., Scheerer, P., and Ernst, O. P. (2011) Crystal structure of metarhodopsin II. *Nature* **471**, 651–655
24. Yaqub, T., Tikhonova, I. G., Lättig, J., Magnan, R., Laval, M., Escrieut, C., Boulègue, C., Hewage, C., and Fourmy, D. (2010) Identification of determinants of glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor that interact with N-terminal biologically active region of the natural ligand. *Mol. Pharmacol.* **77**, 547–558
25. Lu, Z. L., and Hulme, E. C. (1999) The functional topography of transmembrane domain 3 of the M1 muscarinic acetylcholine receptor, revealed by scanning mutagenesis. *J. Biol. Chem.* **274**, 7309–7315
26. Perlman, J. H., Laakkonen, L. J., Guarnieri, F., Osman, R., and Gershengorn, M. C. (1996) A refined model of the thyrotropin-releasing hormone (TRH) receptor binding pocket. Experimental analysis and energy minimization of the complex between TRH and TRH receptor. *Biochemistry* **35**, 7643–7650
27. Ersoy, B. A., Pardo, L., Zhang, S., Thompson, D. A., Millhauser, G., Govaerts, C., and Vaisse, C. (2012) Mechanism of N-terminal modulation of activity at the melanocortin-4 receptor GPCR. *Nat. Chem. Biol.* **8**, 725–730
28. Grigoriadis, D. E., Haddach, M., Ling, N., and Saunders, J. (2001) The CRF receptor: structure, function and potential for therapeutic intervention. *Curr. Med. Chem. Syst. Agents* **1**, 63–97
29. Winslow, J. T., Newman, J. D., and Insel, T. R. (1989) CRH and α -helical-CRH modulate behavioral measures of arousal in monkeys. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **32**, 919–926
30. Perrin, M. H., Sutton, S. W., Cervini, L. A., Rivier, J. E., and Vale, W. W. (1999) Comparison of an agonist, urocortin, and an antagonist, astressin, as radioligands for characterization of corticotropin-releasing factor receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **288**, 729–734
31. Madabushi, S., Gross, A. K., Philippi, A., Meng, E. C., Wensel, T. G., and Lichtarge, O. (2004) Evolutionary trace of G protein-coupled receptors reveals clusters of residues that determine global and class-specific functions. *J. Biol. Chem.* **279**, 8126–8132