



Πανεπιστήμιο Κρήτης

*Σχολή Θετικών & Τεχνολογικών Επιστημών
Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Υλικών*

Διπλωματική Εργασία

Θέμα: «Φαρμακολογικός χαρακτηρισμός του CRF1 υποδοχέα μετά από μετάλλαξη της ασπαραγίνης 283 σε αλανίνη»

*Επιμέλεια Εργασίας: Βελιανίτη Άννα-Μαρία
Επιβλέπων Καθηγητής: κ.Λιαπάκης Γεώργιος
Υπεύθυνος Καθηγητής: κ.Μητράκη Άννα*

Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Κρήτης

Εργαστήριο Φαρμακολογίας

Μάιος 2019

Αντί προλόγου...

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Λιαπάκη που με δέχθηκε από την πρώτη στιγμή στο εργαστήριο του και με εμπιστεύτηκε μέχρι και το τέλος της διπλωματικής μου εργασίας.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Ματσούκα Μίνω για την κατασκευή των μοριακών μοντέλων του CRF₁ υποδοχέα.

Βέβαια δε θα ήταν εφικτή η πραγματοποίηση της εργασίας μου χωρίς την κ. Άννα Μητράκη, Υπεύθυνη Καθηγήτρια από το Τμήμα Επιστήμης & Τεχνολογίας Υλικών, που με συμβούλευε με σύνεση όλο αυτό το διάστημα.

Για την ομαλή ολοκλήρωση της εργασίας μου ευθύνεται σε μεγάλο βαθμό ο φοιτητής, του Τμήματος Βιολογίας, Μιχάλης Παρδαλός που με καθοδήγησε καθ'όλη τη διάρκεια του πειράματος και μου μετέδωσε τις γνώσεις του με υπομονή, συνέπεια και ήθος. Όπως και η φοιτήτρια Μαρκέλλα Κωστοπούλου για τη συμπαράσταση της και την άψογη συνεργασία μας.

Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Στέλιο Σακκελάρη για την ομαλή συνεργασία μας στο χώρο του εργαστηρίου και τον Βλάσση Καραγεωργό για τη συνεισφορά του τόσο κατά το διάστημα διεξαγωγής του πειράματος όσο και στον τρόπο παρουσίασης της εργασίας μου.

Το μεγαλύτερο ευχαριστώ το οφείλω στην οικογένεια μου που με υποστήριξε όλα τα χρόνια των σπουδών μου και φρόντισε να μου παρέχει τα απαραίτητα υλικά αγαθά, αλλά κυρίως πνευματικά και ηθικά εφόδια για να μπορώ να εξελίξομαι και να υλοποιώ κάθε στόχο που θέτω στη ζωή μου.

Συντομογραφίες

- **AC** Adenyl cyclase (Αδενυλική Κυκλάση)
- **Ac** Acetyl (Ακετύλιο)
- **ACTH** Adrenocorticotropin Hormone (Αδρενοκορτικοτρόπος Ορμόνη)
- **Ala** Alanine (Αλανίνη)
- **Asn** Asparagine (Ασπαραγίνη)
- **Asp** Aspartic acid (Ασπαρτικό οξύ)
- **ATP** Adenosine triphosphate (Τριφωσφορική αδενοσίνη)
- **FBS** Fetal Bovine Serum (Ορός Βοός)
- **cDNA** Complementary DNA (Συμπληρωματικό DNA)
- **cAMP** Cyclic adenosine monophosphate (Κυκλική Μονοφωσφορική Αδενοσίνη)
- **CRF** Corticotropin Releasing Factor (Εκλυτικός Παράγοντας της Κορτικοτροπίνης)
- **CRF_{1R}** Corticotropin Releasing Factor Receptor type 1 (Τύπου 1 Υποδοχέας του Εκλυτικού Παράγοντα της Κορτικοτροπίνης)
- **CRF_{2R}** Corticotropin Releasing Factor Receptor type 2 (Τύπου 2 Υποδοχέας του Εκλυτικού Παράγοντα της Κορτικοτροπίνης)
- **CRF_{3R}** Corticotropin Releasing Factor Receptor type 3 (Τύπου 3 Υποδοχέας του Εκλυτικού Παράγοντα της Κορτικοτροπίνης)
- **CRFR_s** Corticotropin Releasing Factor Receptors (Υποδοχείς του Εκλυτικού Παράγοντα της Κορτικοτροπίνης)
- **Cys** Cysteine (Κυστεΐνη)
- **Da** (Dalton) Μονάδα Μέτρησης Μάζας (Χρησιμοποιείται για να εκφράσει μοριακές ατομικές ή ιοντικές μάζες)
- **DAG** Diacylglycerol (διακυλογλυκερόλη)
- **DMEM** Dulbecco's Modified Eagle Medium (Θρεπτικό Υγικό)
- **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)
- **ERK1/2** Extracellular signal-regulated kinases 1 and 2
- **EtBr** Ethidium bromide (Βρωμιούχο Αιθίδιο)
- **G418** Geneticin (Γενετισίνη)
- **Glu** Glutamate (Γλουταμικό)
- **Gly** Glycine (Γλυκίνη)
- **GDP** Guanosine diphosphate (Διφωσφορική Γουανοσίνη)
- **GPCRs** G-protein coupled receptors (Υποδοχείς που Συζεύγγονται με τις G-Πρωτεΐνες)
- **GTP** Guanosine-5'-triphosphate (Τριφωσφορική Γουανοσίνη)

- **HEK 293** Human Embryonic Kidney 293 cells (Ανθρώπινα Εμβρυικά Νεφρικά Κύτταρα)
- **HEPES** 4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid
- **HIS** Histidine (Ιστιδίνη)
- **HPA** Hypothalamic-pituitary-adrenal axis (Άξονας Υποθαλάμου-υπόφυσης - επινεφριδίων)
- **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)
- **Met** Methionine (Μεθειονίνη)
- **mRNA** Messenger RNA (Αγγελιοφόρο RNA)
- **Nle** Norleucine (Νορλευκίνη)
- **NMR** Nuclear magnetic resonance (Πυρηνικός Μαγνητικός Συντονισμός)
- **NPT II** Neomycin phosphotransferase II (Φωσφοτρανσφεράση της Νεομυκίνης)
- **PCR** Polymerase Chain Reaction (Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης)
- **Phe** Phenylalanine (Φαινυλαλανίνη)
- **PKA** Protein kinase A (Πρωτεϊνική Κινάση Α)
- **PKC** Protein kinase C (Πρωτεϊνική Κινάση C)
- **PLC** Phospholipase C (Φωσφολιπάση C)
- **Pro** Proline (Προλίνη)
- **PVN** Paraventricular Nucleus (Παρακοιλιακός Πυρήνας)
- **SCAM** Substituted-cysteine accessibility method (Μέθοδος Διαθεσιμότητας των Υποκαταστατών)
- **Ser** Serine (Σερίνη)
- **SVG** Sauvagine (Σοβαγίνη)
- **TAE** Tris-acetate-EDTA
- **Thr** Threonine (Θρεονίνη)
- **TMs** Transmembrane Domains (Διαμεμβρανικές περιοχές)
- **Trp** Tryptophan (Τρυπτοφάνη)
- **Tyr** Tyrosine (Τυροσίνη)
- **UCN I** Urocortin I (Ουροκορτίνη)
- **UCN II** Urocortin II (Ουροκορτίνη II)
- **UCN III** Urocortin III (Ουροκορτίνη III)
- **URO** Urotensin I (Ουροτενσίνη I)
- **Val** Valine (Βαλίνη)
- **ΚΝΣ** (Κεντρικό Νευρικό Σύστημα)

Περιεχόμενα

Περίληψη	6
1. Εισαγωγή	7
1.1. Εκλυτικός παράγοντας της κορτικοτροπίνης	7
1.2. Συγγενή πεπτίδια του CRF	8
1.3. Δομή του CRF και των συγγενών πεπτιδίων	10
1.4. Βιολογική δράση του CRF και των συγγενών πεπτιδίων	11
1.4.1. CRF και Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ)	11
1.4.2. CRF και Ανοσοποιητικό Σύστημα	12
1.5. Υποδοχείς του εκλυτικού παράγοντα της κορτικοτροπίνης (CRF-Rs)	13
1.5.1. Ισομορφές των υποδοχέων του εκλυτικού παράγοντα κορτικοτροπίνης	14
1.5.2. Φαρμακολογικές ιδιότητες των υποδοχέων του CRF	14
1.6. Κυτταρική σηματοδότηση	15
1.7. Δομή και λειτουργία των υποδοχέων του CRF	18
2. Σκοπός	21
3. Υλικά και Μέθοδοι	22
3.1. Μετάλλαξη του DNA του ανθρώπινου υποδοχέα CRF1 και κλωνοποίηση του DNA	22
3.1.1. Μεταλλαξιγένεση κατευθυνόμενης θέσης με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης	23
3.1.2. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης-απομόνωση και καθαρισμός των επιθυμητών τμημάτων του DNA	27
3.1.3. Πέψη DNA με ένζυμα περιορισμού	28
3.1.4. Συρραφή τεμαχίων DNA-Ligation	29
3.1.5. Μετασχηματισμός βακτηρίων DH-10b <i>E.coli</i> με το πλασμιδιακό DNA που έφερε την επιθυμητή μετάλλαξη	29
3.1.6. Πολλαπλασιασμός μετασχηματισμένων βακτηρίων DH-10b <i>E.coli</i>	30
3.1.7. Καλλιέργεια κυττάρων HEK 293	30
3.1.8. Δημιουργία κυτταρικών σειρών που εκφράζουν μόνιμα τους υποδοχείς	31
3.1.9. Πείραμα συναγωνιστικής δεύσμευσης	32
4. Αποτελέσματα	33
4.1. Δημιουργία του μεταλλαγμένου CRF ₁ R	33
4.2. Φαρμακολογικός χαρακτηρισμός του CRF ₁ R-N283A	44
5. Συζήτηση	46
6. Βιβλιογραφία	50

Περίληψη

Ο τύπος 1 (CRF₁R) υποδοχέας του εκλυτικού παράγοντα της κορτικοτροπίνης (CRF) παίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της ομοιόστασης ρυθμίζοντας τη λειτουργία πολλών συστημάτων του οργανισμού μας. Ο CRF₁R βρίσκεται στη πλασματική μεμβράνη του κυττάρου και ανήκει στην οικογένεια των υποδοχέων που συζεύγνυνται με τις G proteins (G protein-coupled receptors, ή GCPRs). Όπως όλοι οι GCPRs έτσι και ο CRF₁R αποτελείται από 7 διαμεμβρανικές α-έλικες (TM1-7). Μοριακά μοντέλα που κατασκευάσαμε σε προηγούμενη μελέτη μας έδειξαν ότι η ασπαραγίνη 283 (Asn283 ή N283) της πέμπτης TM (TM5) του CRF₁R παίζει ρόλο στην ενεργοποίηση του υποδοχέα πιθανόν μετά από αλληλεπίδραση της πλευρικής αλυσίδας της με την τρίτη TM (TM3). Ο σκοπός μας είναι να εξεταστεί ο ρόλος της Asn283 του CRF₁R στην ενεργοποίηση του υποδοχέα. Στην παρούσα μελέτη αφαιρέθηκε η πλευρική της αλυσίδα μετά από μετάλλαξη της σε Ala (N283A) και εξετάστηκε κατά πόσο η τροποποίηση αυτή θα επηρεάσει την ικανότητα του υποδοχέα να ενεργοποιείται. Αυτό επιτεύχθηκε με τον προσδιορισμό της ικανότητας του CRF₁R πριν και μετά την N283 μετάλλαξη να δεσμεύει με υψηλή συγγένεια τον CRF αγωνιστή, σοβαγίνη.

1.Εισαγωγή

1.1 Εκλυτικός παράγοντας της κορτικοτροπίνης

Μελετώντας τις ερευνητικές διαδικασίες που έλαβαν χώρα τον περασμένο αιώνα και αφορούν στον εκλυτικό παράγοντα της κορτικοτροπίνης (corticotropin releasing factor ή CRF) επικεντρωνόμαστε στο 1981⁽¹⁾, όπου ο Vale κατάφερε να απομονώσει τον CRF από τον υποθάλαμο ενός προβάτου. Με βάση τη μέλετη αυτή ο CRF χαρακτηρίστηκε ως ένα υποθαλαμικό πεπτιδίο, μοριακού βάρους 4761 Da, που αποτελείται από 41 αμινοξέα. Ο CRF εκκρίνεται από τον παρακοιλιακό πυρήνα (PVN) του υποθαλάμου και ρυθμίζει τη λειτουργία του υποθάλαμο-υπόφυσο-επινεφριδιακού (HPA) άξονα, όπως αναλυτικά αναφέρεται παρακάτω ⁽²⁾.

Ο CRF εκτός του προβάτου έχει εντοπιστεί και σε άλλα θηλαστικά όπως στον άνθρωπο, αίγα, επιμύ, χοίρο κ.α., αλλά και σε μη θηλαστικά όπως σε αμφίβια και ιχθύες ^(40,83). Χαρακτηριστικό είναι ότι οι αμινοξικές αλληλουχίες του CRF του ανθρώπου (hCRF) και του επίμους (rCRF) έχουν ομολογία 100% και εκεί οφείλεται και το κοινό τους όνομα h/r CRF ^(48,94). Οι ομολογίες των αμινοξικών αλληλουχιών του CRF στους άλλους οργανισμούς είναι μεγαλύτερη του 80% σε σχέση με τον h/rCRF και συγκεκριμένα η διαφορά της αλληλουχίας του πεπτιδίου στον άνθρωπο με αυτό των αμφίβιων διαφέρει μόνο κατά 3 αμινοξέα ^(48,94).

Είναι σημαντικό να τονίσουμε ότι ο CRF δεν περιορίζεται μόνο στη ρύθμιση του υποθαλαμο-υπόφυσο-επινεφριδιακού (HPA Axis) άξονα, αλλά ελέγχει και τη λειτουργία άλλων συστημάτων όπως το καρδιαγγειακό, το ανοσοποιητικό, το γαστρεντερικό, το αναπαραγωγικό και το κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ)^(2,3-7,8-22). Ο έλεγχος πολλών διαφορετικών λειτουργιών του οργανισμού από τον CRF δικαιολογεί τον σημαντικό ρόλο που έχει στη διατήρηση της ομοιόστασης του οργανισμού ανταποκρινόμενος σε διάφορα στρεσογόνα ερεθίσματα⁽²³⁾.

Στο κεντρικό νευρικό σύστημα ο CRF ανιχνεύεται σε περιοχές όπως είναι ο θάλαμος, ο εγκεφαλικός φλοιός, η γέφυρα, η παραγκεφαλίδα, ο ιππόκαμπος, ο νωτιαίος μυελός, ο προμήκης μυελός (ή μυελεγγέφαλος) και τα βασικά γάγγλια⁽²⁵⁻²⁷⁾. Όμως τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις του εκλυτικού παράγοντα κορτικοτροπίνης τις εντοπίζουμε στο χοανικό, υπεροπτικό και παρακοιλιακό πυρήνα⁽²⁴⁾.

Εκτός από το ΚΝΣ ο CRF εντοπίζεται και σε άλλα όργανα και ιστούς στην περιφέρεια με τον πλακούντα να είναι ο ιστός που παράγει τις μεγαλύτερες ποσότητες CRF, μετά τον υποθάλαμο⁽²⁸⁻²⁹⁾. Επιπλέον το CRF έχει ανιχτευτεί στο στομάχι, το παχύ έντερο, τους πνεύμονες, το δωδεκαδάκτυλο, το ήπαρ, τα επινεφρίδια, τις ωθήκες, το πάγκρεας, το ενδομήτριο και σε κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος⁽³⁰⁻³⁵⁾. Ακόμα σημαντικές ποσότητες του πεπτιδίου έχουν βρεθεί σε αρκετά μεγάλο αριθμό καρκινικών κυττάρων από τον μαστό, τον πνεύμονα, την υπόφυση, τα επινεφρίδια και το θύμο αδέν⁽³⁶⁻³⁹⁾.

1.2 CRF-Συγγενή πεπτίδια

Συγγενή πεπτίδια του CRF έχουν βρεθεί τόσο σε θηλαστικά όσο και σε αμφίβια και ψάρια. Ο όρος συγγενή πεπτίδια οφείλεται στις παρόμοιες ιδιότητες που φαίνεται να έχουν με τον CRF και έτσι καταλήγουμε να έχουμε μια οικογένεια CRF πεπτιδίων που αποτελείται από τον εκλυτικό παράγοντα της κορτικοτροπίνης (corticotropin releasing factor, CRF) την ουροτενσίνη-I (Urotensin I ή URO I), την ουροκορτίνη I (Urocortin I ή UCN I), την ουροκορτίνη II (Urocortin II ή UCN II), την ουροκορτίνη III (Urocortin III ή UCN III) και τη σοβαγίνη (Sauvagine ή SVG) ⁽⁴⁰⁻⁴⁶⁾ (Πίνακας 1).

Πεπτίδιο	Είδος	Αλληλουχία αμινοξέων
CRF	Human	SEPPISLDLTFHLLREVLEMARAEQLAQQAHSNRKLMEII-NH ₂
	Rat	SEPPISLDLTFHLLREVLEMARAEQLAQQAHSNRKLMEII-NH ₂
	Ovine	SQEPISLDLTFHLLREVLEMTKADQLAQQAHSNRKLDDIA-NH ₂
Sauvagine (SVG)	Frog	EGPPISIDLSLELLRKMIEIEKQEKEKQAANNRLLDITI-NH ₂
UrotensinI (UroI)	Fish	NDDPPISIDLTFHLLRNMIEMARIENEREQAGLNRKYLDEV-NH ₂
UrocortinI (UCN I)	Human	DNPSLSIDLTFHLLRTLLELARTQSQRERAEQNRIIFDSV-NH ₂
	Rat	DDPPLSIDLTFHLLRTLLELARTQSQRERAEQNRIIFDSV-NH ₂
UrocortinII (UCNII)	Human	IVLSLDVPIGLLQILLEQARARAAREQATTNARILARV-NH ₂
	Mouse	VISLDVPIGLLRILLEQARYKAARNQAATNAQILAHV-NH ₂
	Rat	VILSLDVPIGLLRILLEQARNKAARNQAATNAQILARV-NH ₂
UrocortinII (UCNIII)	Human	FTLSLDVPTNIMNLLFNIAKAKNLRAQAAANAHLMAQI-NH ₂
	Mouse	FTLSLDVPTNIMNILFNIDKAKNLRAKAAANAQLMAQI-NH ₂

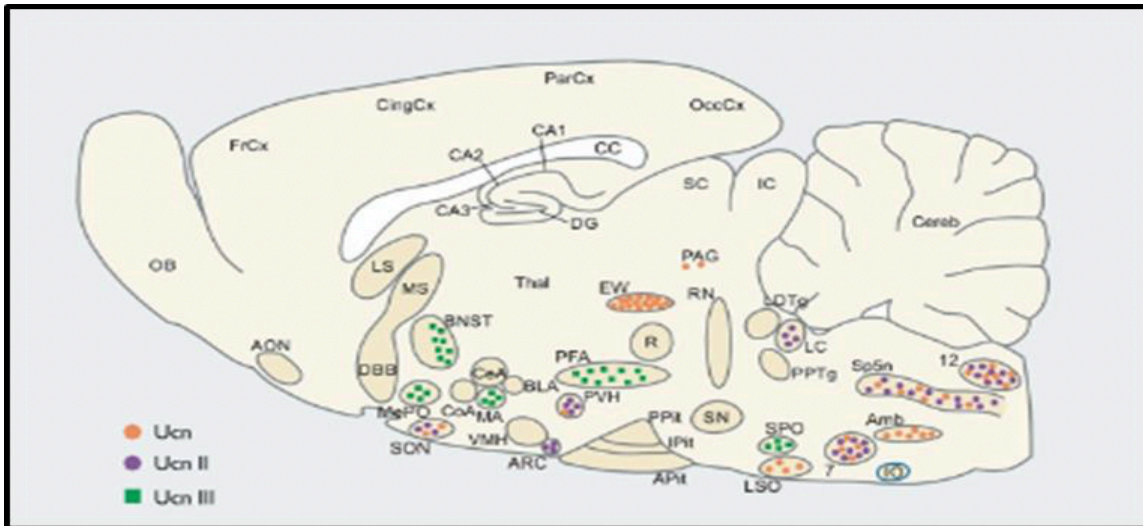
Πίνακας 1: Η αλληλουχία των αμινοξέων των πεπτιδίων της οικογένειας του CRF.

- i. **Ουροτενσίνη (Urotensin I ή URO I):** Πεπτίδιο μήκους 41 αμινοξέων που έχει 54% ομοιότητα με την αλληλουχία του του h/rCRF ⁽⁴⁸⁾ και η οποία απομονώθηκε από την ουρόφυση του είδους *Catostomus commersonii* το 1982, από τους Lederis et al ⁽⁴⁰⁾. Ένα χρόνο μετά, το 1983, οι Rivier et al κατάφεραν να δείξουν ότι η URO διεγείρει την απελευθέρωση ACTH *in vitro* σε καλλιέργειες κυττάρων υπόφυσης, αλλά και *in vivo* σε επίμους, στον ίδιο βαθμό με την SVG και τον CRF προβάτου (oCRF)⁽⁵⁰⁾.
- ii. **Ουροκορτίνη I (Urocortin I ή UCN I):** Πεπτίδιο μήκους 40 αμινοξέων και η αμινοξική αλληλουχία του έχει ποσοστά ομολογίας 35%, 43-45% και 53-% με την αλληλουχία της σοβαγίνης, του CRF και της ουροτενσίνης αντίστοιχα. Το πεπτίδιο αυτό το απομόνωσαν το 1995 οι Vaughan et al από τον πυρήνα Edinger-Westphal του ΚΝΣ του επιμύου ⁽⁴²⁾. Η UCN I του ποντικού, του προβάτου και του επίμους είναι ίδιες, ενώ διαφέρουν κατά 2 αμινοξέα από την ανθρώπινη UCN I ^(43,51-52).
- iii. **Ουροκορτίνη II (Urocortin II ή UCN II):** Πεπτίδιο μήκους 38 αμινοξέων. Το πεπτίδιο αυτό βρέθηκε το 2001 από τους Reyes et al στον επίμου, ενώ παρουσιάζει

ομοιότητες με την ουροκορτίνη I ⁽⁴⁵⁾. Το πεπτίδιο αυτό στο ποντίκι έχει 34% ομοιότητα στην αμινοξική αλληλουχία με εκείνη του h/rCRF ⁽⁴⁸⁾.

iv. Ουροκορτίνη III (Urocortin III ή UCN III): Πεπτίδιο που απομονώθηκε από τον ποντικό (mUCN III)⁽⁴⁴⁾ και τον άνθρωπο (hUCN III)⁽⁵³⁾. Η αλληλουχία της hUCN III είναι κατά 90% όμοια με αυτή του mUCN III, ενώ και οι δύο διαφέρουν αρκετά από την UCN II του ποντικού^(44-45,53). Επιπλέον η αμινοξική αλληλουχία της mUCN III έχει 26% ομοιότητα με εκείνη του h/rCRF ⁽⁴⁸⁾.

❖ Εξίσου σημαντική είναι και η απομόνωση δύο ορθόλογων των UCN II, UCN III από τον εγκέφαλο βατράχου του είδους *Xenopus laevis* οδηγώντας στην υπόθεση ότι εμφανίστηκαν στα αρχικά στάδια της εξελικτικής διαδικασίας, παίζοντας ρόλο στη διατήρηση της ομοιότητας των διαφόρων οργανισμών⁽⁵⁴⁾. Οι ουροκορτίνες I, II, III, όπως ο CRF, εντοπίζονται στο ΚΝΣ και στην περιφέρεια (Εικόνα 1), παίζοντας σημαντικό βιολογικό ρόλο, όπως αναφέρεται παρακάτω ^(90,94).



Εικόνα 1. Κατανομή των ουροκορτινών (Ucn ή UCN I, Ucn II ή UCN II, Ucn III ή UCN III) στον εγκέφαλο.

v. Σοβαγίνη (SVG): Η σοβαγίνη (Sauvagine-SVG), ένα πεπτίδιο μήκους 40 αμινοξέων και με αλληλουχία 48% όμοια με εκείνη του hCRF, απομονώθηκε το 1981 από το δέρμα του βατράχου του είδους *Phyllomedusa sauvageii*^(41,48). Ένα χρόνο μετά οι Brown et al μελετώντας και συγκρίνοντας τις βιολογικές δράσεις της SVG και του CRF σε επιμυές κατέληξαν στο ότι η SVG είναι πέντε με δέκα φορές ισχυρότερη από τον CRF όσο αφορά στην ικανότητά της να προκαλεί την αύξηση των επιπέδων των κατεχολαμινών⁽⁴⁷⁾. Παρόλα αυτά ο CRF βρέθηκε να είναι αποτελεσματικότερος στο να προκαλεί την απελευθέρωση ACTH σε σχέση με την SVG.

vi. Συνθετικά ανάλογα του CRF: Ανεξάρτητα από τα ενδογενή πεπτίδια της οικογένειας του CRF πρόσφατα συντέθηκαν πεπτίδια με βάση τις δομές του CRF, των ουροκορτινών και της σοβαγίνης μετά από χημική τροποποίηση τους. Παραδείγματα τέτοιων πεπτιδίων είναι η κορταγίνη, η αστρεσσίνη [astressin: cyclo(30-33)], το ανάλογο της αστρεσσίνης [αστρεσσίνη (2)B], τα πεπτίδια α-ελικοειδές CRF(9-41) και διάφορα ανάλογα της σοβαγίνης όπως η αντισοβαγίνη-

30 ⁽⁵⁵⁻⁵⁹⁾. Επίσης συντέθηκαν και μη πεπτιδικά μικρομοριακά ανάλογα, όπως η ανταλαρμίνη και το NBI 27914 ⁽⁶⁰⁾.

1.3 Δομή του CRF και των συγγενών πεπτιδίων

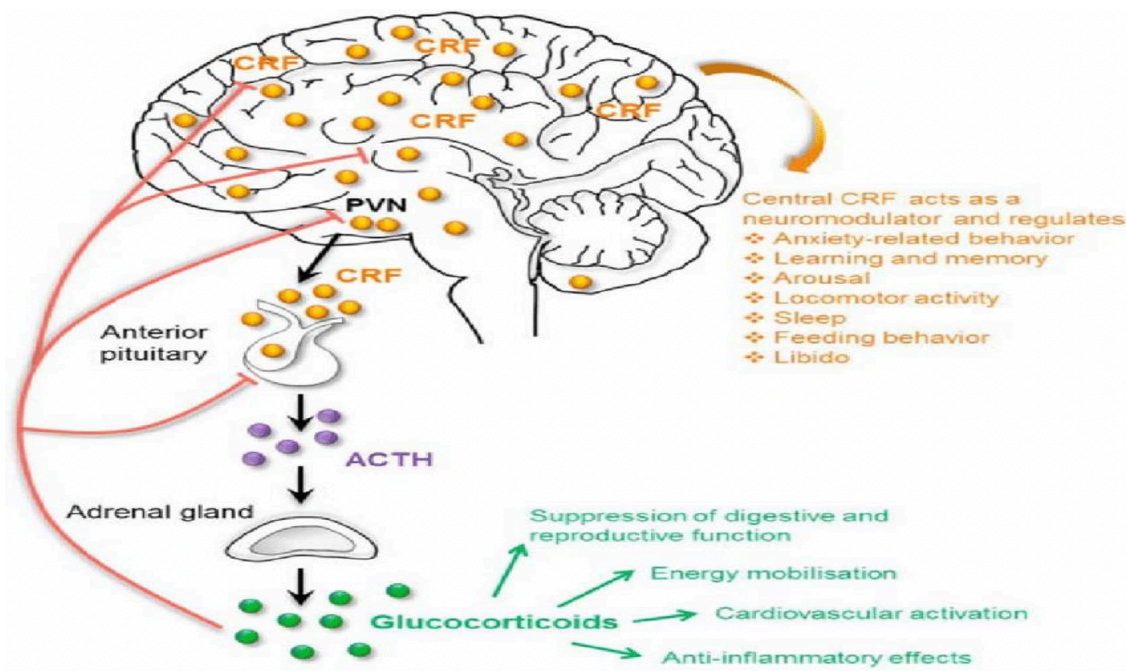
Όσο αφορά στη δομή του CRF και των συγγενών πεπτιδίων είναι γνωστό ότι έχουν μήκος περίπου 40-41 αμινοξέα και αποτελούνται από ένα καρβοξυλικό άκρο (C-άκρο), ένα αμινοτελικό άκρο (N-άκρο) και μια ενδιάμεση περιοχή. Η ενδιάμεση περιοχή και τμήματα των καρβοξυτελικών και αμινοτελικών άκρων μπορούν να σχηματίσουν δομή α-έλικας που είναι και η βιολογικά δραστική διαμόρφωση του πεπτιδίου, όταν είναι σε υδρόφοβο περιβάλλον⁽⁶¹⁾. Παρόμοια δομή και ιδιότητες με τον CRF1 έχουν και τα συγγενή πεπτιδία σοβαγίνη και ουροτενσίνη. ⁽⁶¹⁾

Με βάση όσα προαναφέρθηκαν δόθηκε το έναυσμα για την υπόθεση ότι η αλληλεπίδραση του CRF και των συγγενών πεπτιδίων, με τις θέσεις δέσμευσής τους που βρίσκονται στο λιπιδικό περιβάλλον της πλασματικής μεμβράνης του κυττάρου, ευνοούν το σχηματισμό άλφα-ελικοειδής δομής των πεπτιδίων αυτών ⁽⁹⁴⁾. Η υπόθεση αυτή ενισχύθηκε από το γεγονός ότι οι αντικαταστάσεις αμινοξέων του CRF με διαφορετικά αμινοξέα που σταθεροποίησαν τη δομή της άλφα-ελικοειδή δομή τους, αύξησαν τη βιολογική δράση του πεπτιδίου⁽⁶²⁾. Περαιτέρω παρατηρήθηκε ότι η άλφα-ελικοειδής δομή της ενδιάμεσης περιοχής των πεπτιδίων προσανατολίζει τα αμινοτελικά και καρβοξυτελικά άκρα τους με τέτοιο τρόπο, ο οποίος είναι απαραίτητος για την εμφάνιση των βιολογικών δράσεών τους ⁽⁶³⁾.

Στη λειτουργία των πεπτιδίων, εκτός από την άλφα-ελικοειδή δομή παίζουν ρόλο επίσης τα αμινοτελικά και καρβοξυτελικά αμινοξέα τους. Αναλυτικότερα η τροποποίηση του καρβοξυτελικού άκρου του CRF ή και η απαλοιφή των δύο τελευταίων καρβοξυτελικών αμινοξέων του, έχει ως αποτέλεσμα την κατάργηση της βιολογικής δραστηριότητας του πεπτιδίου⁽⁶³⁻⁶⁴⁾. Παρόμοια απαλοιφή των οκτώ πρώτων αμινοτελικών αμινοξέων του, ενώ και η αντικατάσταση των δεκατριών (ένα τη φορά) αμινοτελικών αμινοξέων του CRF κατήργησε τη βιολογική δραστηριότητα του πεπτιδίου⁽⁶²⁾.

1.4 Βιολογική δράση του CRF και των συγγενών πεπτιδίων

Ο CRF παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της δραστηριότητας του HPA άξονα και έτσι της έκκρισης γλυκοκορτικοειδών (κυρίως κορτιζόλης) από τη φλοιώδη μούρα των επινεφριδίων, τα οποία έχουν εξαιρετικά ευρύ φάσμα δράσεων ρυθμίζοντας την έκφραση διαφόρων γονιδίων σε όλο το σώμα^(2,65)(Εικόνα 1.1)



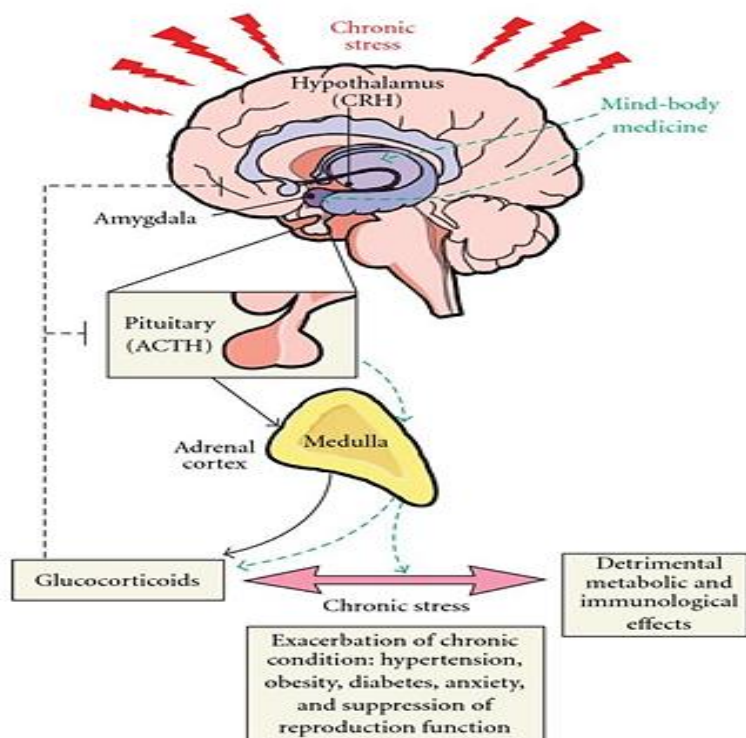
Εικόνα 1.1. Γραφική απεικόνιση του υποθαλάμο-υπόφυση-επινεφριδιακού άξονα (HPA). Ο CRF (ή CRH) απελευθερώνεται από τον υποθάλαμο και εισερχόμενος στην πυλαία κυκλοφορία καταλήγει στην υπόφυση όπου διεγείρει την έκκριση κορτικοτροπίνης (ACTH). Στη συνέχεια η ACTH διεγείρει την έκκριση γλυκοκορτικοειδών (CORT) από τα επινεφρίδια.

1.4.1 CRF και Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ)

Ο CRF εκτός από τον HPA άξονα, ρυθμίζει τη δραστηριότητα του ΚΝΣ παίζοντας τον ρόλο του νευροδιαβιβαστή / νευροτροποποιητή ^(4,48). Συγκεκριμένα συντονίζει τις συμπεριφορικές και ενδοκρινικές αποκρίσεις του οργανισμού στο στρες και εμπλέκεται στην παθοφυσιολογία διαφόρων νευροψυχιατρικών νόσων ,όπως οι αγχώδεις διαταραχές και η κατάθλιψη, που συγκαταλέγεται στις δέκα πιο σημαντικές ασθένειες παγκοσμίως^(1,66-67). Οι νευροψυχιατρικές αυτές ασθένειες εμποδίζουν τον άνθρωπο στο να είναι λειτουργικός και δραστήριος, με αποτέλεσμα να μην μπορεί να ανταπεξέλθει στις καθημερινές του υποχρεώσεις⁽⁴⁾.

Συγκεκριμένα, ο HPA άξονας συντονίζει τις αποκρίσεις του οργανισμού στο στρες με την παραγωγή και έκκριση ενδιάμεσων ρυθμιστικών πεπτιδίων, κατεχολαμινών και γλυκοκορτικοειδών ^(1,66-67) (Εικόνα 1.2) Έτσι παρατηρούνται αυξημένα επίπεδα

γλυκορτικοειδών που εκκρίνονται από τα επινεφρίδια και αυξημένα επίπεδα CRF στον HPA άξονα και στον εγκέφαλο⁽⁶⁸⁾. Αναλυτικότερα έχει δειχθεί ότι διαγονιδιακά ποντίκια που υπερέκφραζαν το πεπτίδιο CRF παρουσίαζαν αγχώδη συμπεριφορά ⁽⁶⁸⁾. Επιπλέον τα άτομα με μελαγχολική κατάθλιψη εμφανίζουν υπερλειτουργία του HPA άξονα,αυξημένα επίπεδα CRF στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό και έντονη CRF νευροδιαβίβαση στον εγκέφαλο^(6,69-70).



Εικόνα 1.2. Σχηματική απεικόνιση των αποκρίσεων στο στρες.

1.4.2 CRF και Ανοσοποιητικό Σύστημα

Σε περίπτωση φλεγμονής έχουμε απελευθέρωση κυτοκίνων, οι οποίες με τη σειρά τους ενεργοποιούν τον HPA άξονα και οδηγούν στην έκλυση του CRF ⁽²⁾. Η ενεργοποίηση του HPA άξονα επιφέρει αύξηση των επιπέδων των γλυκορτικοειδών μετά από έκκριση τους από τα επινεφρίδια, με αποτέλεσμα να έχουμε καταστολή της ανοσολογικής-φλεγμονώδους απόκρισης του οργανισμού. Τα γλυκορτικοειδή μειώνουν τη φλεγμονή επηρεάζοντας την έκκριση κυτοκίνων, όπως IL-4, IL-10, IL-12 και τη δημιουργία T-βοηθητικών κυττάρων⁽⁷⁵⁾. Τα γλυκορτικοειδή επίσης, εισερχόμενα στο κύτταρο ,προσδένονται σε ειδικούς υποδοχείς τους και ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση ⁽⁷⁵⁾.

Σε αντίθεση με την κεντρική αντιφλεγμονώδη δράση του CRF μέσω έκκρισης των γλυκορτικοειδών, ο CRF λειτουργεί και ως προ-φλεγμονώδης παράγοντας τοπικά στην περιφέρεια⁽¹⁷⁾. Επίσης έχει βρεθεί ότι ο CRF προκαλεί αποκοκκίωση των ιστιοκυττάρων στους πνεύμονες ή το δέρμα με αποτέλεσμα την εκδήλωση άσθματος ή αλλεργικού εκζέματος αντίστοιχα^(23,76). Πιθανόν και οι ημικρανίες να σχετίζονται με την επαγόμενη από τον CRF του ανοσοποιητικού, αποκοκκίωση των ιστιοκυττάρων στον εγκέφαλο ⁽⁷⁷⁾.

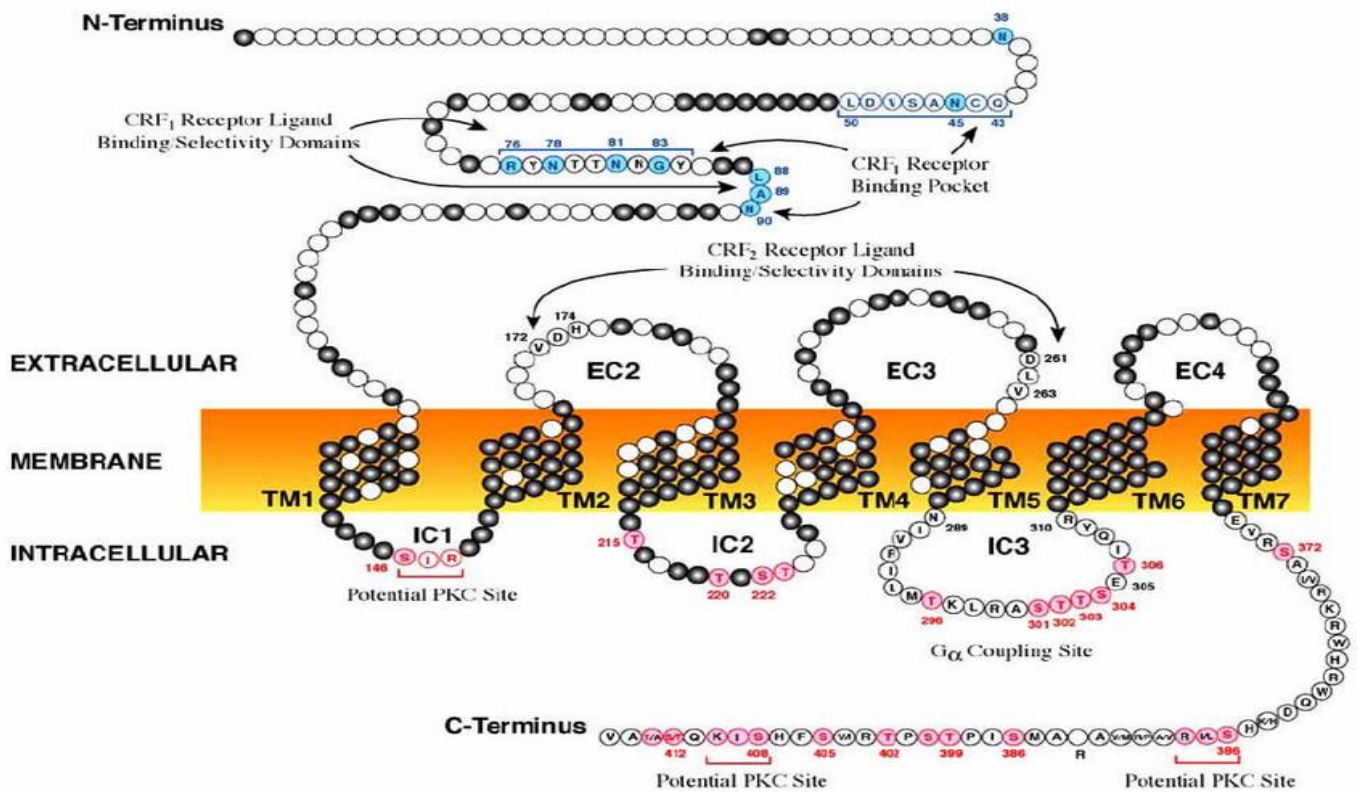
1.5. Υποδοχείς του CRF (CRF-Rs)

Η δράση του CRF και των συγγενών πεπτιδίων, πραγματοποιείται μετά από αλληλεπίδραση τους με ειδικές θέσεις δέσμησης που είναι γλυκοπρωτεΐνες της πλασματικής μεμβράνης του κυττάρου (μοριακό βάρος 70.000-75.000 Da). Οι θέσεις δέσμησης του CRF αλληλεπιδρούν με τις G-πρωτεΐνες, αφού παρουσία GTP-γS μειώθηκε η υψηλή συγγένεια δέσμησης του αγωνιστή CRF. Το GTP-γS είναι ένα μη υδρολύσιμο παράγωγο του GTP, το οποίο δεσμεύεται μη αντιστρεπτά με τις G-πρωτεΐνες και έτσι δεν επιτρέπει να σχηματιστούν τα υψηλής συγγένειας δέσμησης σύμπλοκα μεταξύ των θέσεων δέσμησης του CRF με των G-πρωτεϊνών⁽⁶³⁾.

Η κλωνοποίηση των πρωτεϊνών που δεσμεύουν τον CRF, οδήγησε στην ανακάλυψη δυο κύριων τύπων υποδοχέα όπως και ενός τρίτου τύπου CRF₃R που βρέθηκε σχετικά πρόσφατα στην ουρόφυση του γατόψαρου⁽⁸¹⁾ (Εικόνα 1.3). Οι δύο κύριοι τύποι υποδοχέων του CRF είναι ο τύπου-1 (CRF₁R) και ο τύπου-2 (CRF₂R)⁽⁹⁴⁾. Ο CRF₁R κωδικοποιείται από το γονίδιο στο χρωμόσωμα 17 στο γονιδίωμα του ανθρώπου (17q12-q22)⁽⁸²⁾ και αποτελείται από 14 εξώνια και 13 εσώνια⁽⁸³⁻⁸⁵⁾. Ο CRF₂R κωδικοποιείται από το γονίδιο στο χρωμόσωμα 7 στο γονιδίωμα του ανθρώπου. Επίσης βρέθηκαν οι υποδοχείς αυτοί και σε άλλα είδη θηλαστικών και μη θηλαστικών⁽¹⁰¹⁾

Στο ΚΝΣ ο CRF₁R εκφράζεται στον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης, αλλά και σε άλλες περιοχές του ΚΝΣ των θηλαστικών. Κάποιες από αυτές τις περιοχές είναι ο υποθάλαμος, η αμυγδαλή, οι οσφρητικοί βολβοί, ο φλοιός, η παρεγκεφαλίτιδα και ο ιππόκαμπος^{(4),(90-91)}. Επιπλέον, ο CRF₁R βρέθηκε και σε περιοχές της περιφέρειας, όπως στους όρχεις, στα επινεφρίδια, στον πλακούντα, στο ενδομήτριο, στο δέρμα, σε κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, στο έντερο και στις ωοθήκες⁽⁹²⁻⁹³⁾. Επίσης ο CRF₂R εκφράζεται σε περιοχές του ΚΝΣ και σε ιστούς στην περιφέρεια, όπως στην καρδιά, στους σκελετικούς μύες, στις ωοθήκες, στους πνεύμονες και στο γαστρεντερικό σύστημα^(48,92-93). Οι δυο τύποι του υποδοχέα CRF κατανέμονται με διαφορετικό τρόπο γεγονός που θα μπορούσε να εξηγήσει τις διαφορετικές βιολογικές δράσεις των διαφόρων πεπτιδίων της οικογένειας του CRF.

Οι υποδοχείς του CRF ανήκουν στην οικογένεια Β των GPCRs, στην οποία ανήκουν και άλλοι υποδοχείς που παίζουν σημαντικό ρόλο σε πολλές φυσιολογικές λειτουργίες του οργανισμού μας. Χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι οι υποδοχείς για την εκλυτική ορμόνη της αυξητικής ορμόνης (growth hormone releasing hormone, GHRH), την καλσιτονίνη, τη γλυκαγόνη, τη σεκρετίνη και την παραθυρεοειδική ορμόνη (parathyroid hormone, PHT)⁽⁸⁶⁻⁸⁸⁾.



Εικόνα 1.3. Αναπαράσταση των υποδοχέων του CRF του ανθρώπου.

1.5.1 Ισομορφές των υποδοχέων του CRF

Οι δυο τύποι του CRF υποδοχέα που προαναφέραμε συναντώνται σε διάφορες ισομορφές, οι οποίες έχουν προέλθει από τον διαφορετικό τύπο συρραφής των εξωνίων των γονιδίων των υποδοχέων⁽⁹⁸⁾. Αναλυτικότερα, ο CRF₁R βρίσκεται σε οκτώ ισομορφές τις 1α, 1β, 1c, 1d, 1e, 1f, 1g, 1h, ενώ ο CRF₂R σε τρεις διαφορετικές ισομορφές, τις 2α, 2β, 2γ⁽⁹⁹⁾.

Η ισομορφή του 1α του CRF₁R είναι η μόνη πλήρως λειτουργική ισομορφή του υποδοχέα και εκφράζεται στο ΚΝΣ και στην περιφέρεια. Οι υπόλοιπες ισομορφές εκφράζονται λιγότερο και επιλεκτικά σε διάφορους ιστούς^(98, 101). Αντίθετα με τον CRF₁R όλες ισομορφές του CRF₂R είναι λειτουργικές⁽¹⁰¹⁾. Οι ισομορφές 2α και 2β του CRF₂R εκφράζονται τόσο στον εγκέφαλο όσο και στην περιφέρεια, όπως επίσης στη καρδιά, τους σκελετικούς μύες και το μυομήτριο^(98, 101). Η ισομορφή 2γ περιορίζεται μόνο στον εγκέφαλο⁽⁹⁸⁾.

1.5.2 Φαρμακολογικές ιδιότητες των υποδοχέων CRF

Φαρμακολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι ο CRF του προβάτου (oCRF) και του ανθρώπου/αρουραίου (h/rCRF) δεσμεύονται με μεγαλύτερη συγγένεια στον CRF₁R σε σχέση με τον CRF₂R⁽⁵⁶⁾. Η συγγένεια δέσμευσης των oCRF και h/rCRF για CRF₁R είναι 180 και 15 φορές, αντίστοιχα, μεγαλύτερη από εκείνη για τον CRF₂R⁽⁹⁴⁾.

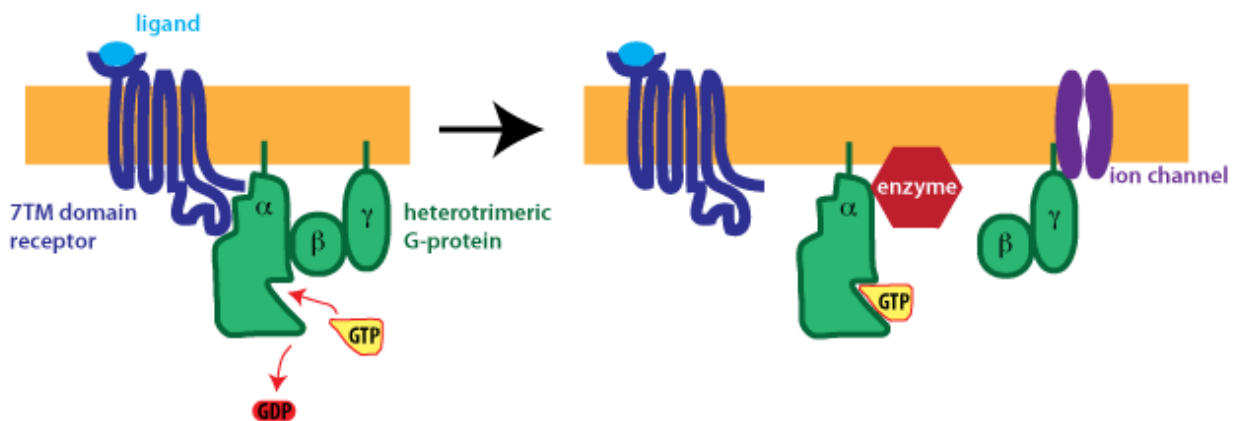
Για τα συγγενή πεπτίδια του CRF και συγκεκριμένα την UCNI και τη SVG, δεν υπάρχει κάποια εκλεκτικότητα για τους δυο τύπους υποδοχέων, επειδή δεσμεύονται με

σχεδόν παρόμοιες συγγένειες σε εκείνους⁽⁹⁴⁾. Η ανθρώπινη UCN1 παρουσιάζει 10 φορές περίπου μεγαλύτερη συγγένεια δέσμευσης για τον CRF₂R σε σχέση με τον h/rCRF. Βάσει αυτού και του γεγονότος ότι η UCN1 εντοπίζεται σε περιοχές του εγκεφάλου που εκφράζεται ο CRF₂R, οι Vaughan et al. υπέθεσαν ότι η UCN1 είναι ο φυσιολογικός ενδογενής αγωνιστής του CRF₂R⁽⁴²⁾. Αντίθετα ο CRF είναι ο φυσιολογικός ενδογενής αγωνιστής του CRF₁R. Σε αντίθεση με τις UCN1 και SVG οι UCN II και UCN III είναι CRF₂R εκλεκτικά πεπτιδία, που έχουν συγγένεια δέσμευσης για τον CRF₂R περίπου 100 φορές μεγαλύτερη από εκείνη για τον CRF₁R⁽⁴⁴⁻⁴⁵⁾.

Η κορταγίνη είναι συνθετικό CRF₁R-εκλεκτικό πεπτιδικό ανάλογο του CRF που έχει ιδιότητες αγωνιστή, προκαλώντας έτσι εκδηλώσεις άγχους⁽⁵⁹⁾. Αντίθετα, τα συνθετικά πεπτιδία α-ελικοειδές CRF και αστρεσίνη (Astressin: cyclo(30-33) [DPhe12, Nle21, Glu30, Lys33, Nle38] hCRF δρουν ως ανταγωνιστές και συνδέονται μη εκλεκτικά και στους δύο τύπους υποδοχέων⁽⁵⁵⁻⁵⁶⁾. Επίσης έχουν συντεθεί και μη πεπτιδικοί ανταγωνιστές, όπως η ανταλαρμίνη, οι οποίοι είναι CRF₁R εκλεκτικοί και έχουν αχολυτικές και αντικαταθλιπτικές ιδιότητες⁽⁶⁰⁾.

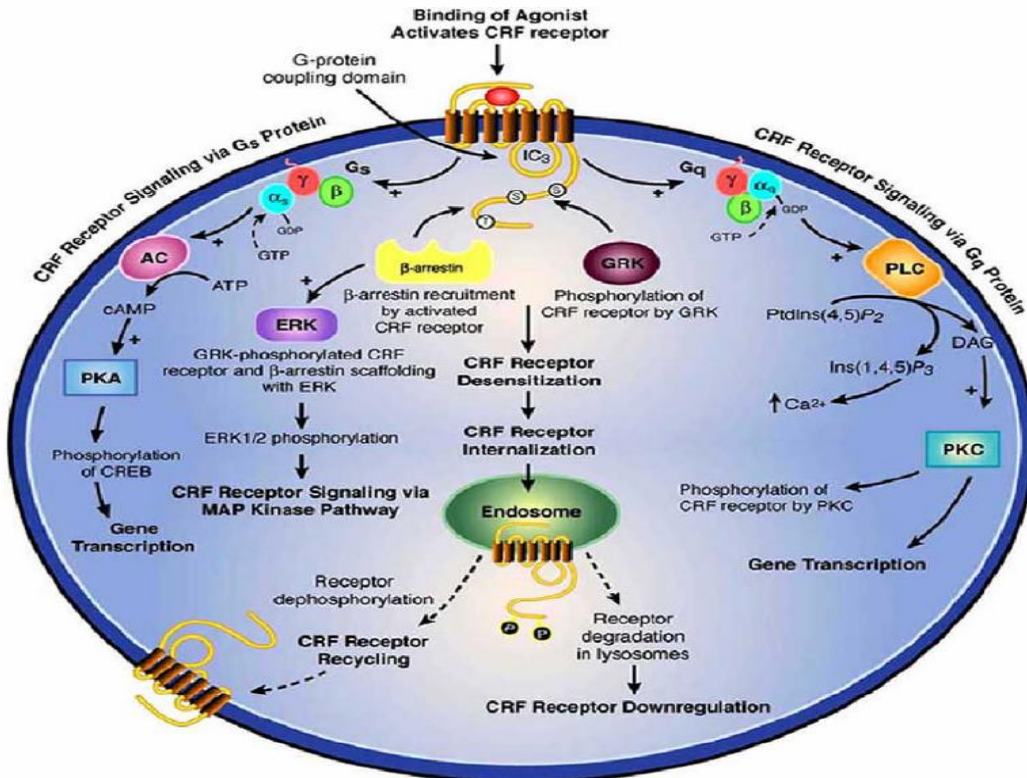
1.6 Κυτταρική σηματοδότηση

Η διέγερση του υποδοχέα γίνεται με τη δέσμευση των CRF πεπτιδίων σε αυτόν και ενεργοποιούνται οι πρωτεΐνες G που είναι συζευγμένες σε αυτούς. Οι G-πρωτεΐνες είναι τριμερή σύμπλοκα και αποτελούνται από τις υπομονάδες α, β και γ. Όταν το τριμερές σύμπλοκο α,β,γ είναι ενωμένο με τον υποδοχέα η α υπομονάδα έχει δεσμευμένο το GDP (Εικόνα 1.4). Η δέσμευση ενός αγωνιστή στον CRF υποδοχέα προκαλεί την ενεργοποίηση του και την διέγερση της G πρωτεΐνης με αποτέλεσμα να απομακρύνεται το GDP από την υπομονάδα α και να αντικαταστάται από GTP. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τον διαχωρισμό της α-GTP υπομονάδας από το ετεροδιμερές που αποτελείται από τις υπομονάδες βγ, καθώς και το διαχωρισμό των υπομονάδων αυτών από τους υποδοχείς του CRF.



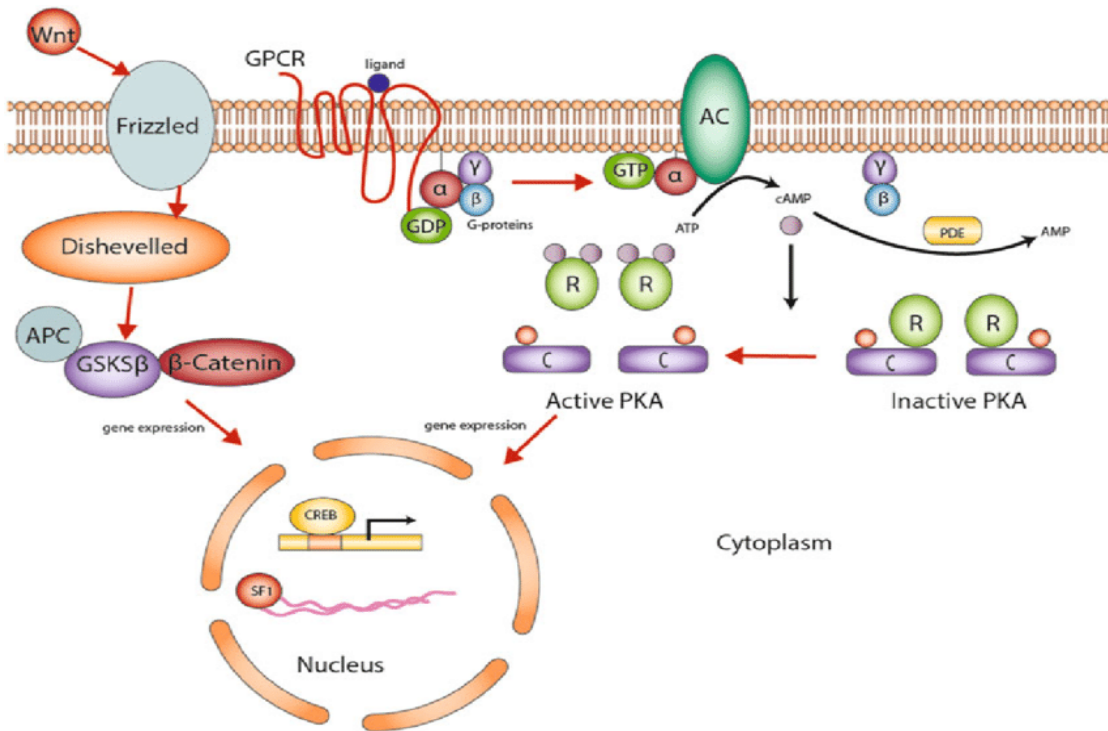
Εικόνα 1.4. Αναπαράσταση της αλληλεπίδρασης των θέσεων δέσμευσης του CRF με τα τριμερή σύμπλοκα (αβγ) των G-πρωτεϊνών.

Στη συνέχεια, οι υπομονάδες α και $\beta\gamma$ διεγείρουν βιοχημικά μονοπάτια προκαλώντας κάποιο βιολογικό αποτέλεσμα (Εικόνα 1.5). Οι CRF υποδοχείς μπορούν να συζεύγνυνται με διαφορετικές G- πρωτεΐνες, όπως τις G_s και G_q ⁽¹⁰⁰⁾.



Εικόνα 1.5. Αναπαράσταση των G-πρωτεϊνών και των ενδοκυττάρων μονοπατιών μέσω των οποίων σηματοδοτούν οι υποδοχείς του CRF.

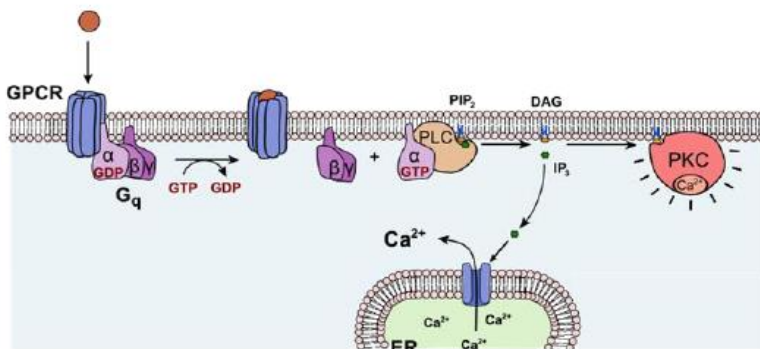
Συγκεκριμένα μέσω των G_s -πρωτεϊνών οι υποδοχείς CRF έχουν την ικανότητα να διεγείρουν το ένζυμο της αδενυλικής κυκλάσης (AC) και έτσι να παράγουν 3'-5'-κυκλική μονοσφορική αδενοσίνη (cAMP), από την τριφωσφορική αδενοσίνη ATP, η οποία με τη σειρά της διεγείρει την πρωτεϊνική κινάση A (PKA). Η ενεργός PKA φωσφορυλιώνει εξειδικευμένα κατάλοιπα σερίνης και θρεονίνης σε πολλούς πρωτεϊνικούς στόχους τροποιώντας έτσι τη λειτουργία τους. Επίσης η PKA, μέσω της φωσφορυλίωσης του ενεργοποιητή της μεταγραφής, δηλαδή της πρωτεΐνης δέσμευσης στο στοιχείο απόκρισης για το κυκλικό AMP (CREB), έχει την δυνατότητα να τροποποιήσει την έκφραση διαφόρων γονιδίων ⁽¹⁰¹⁾ (Εικόνα 1.6).



Εικόνα 1.6. Μεταγωγή σήματος μέσω Gs-πρωτεϊνών.

Οι CRF υποδοχείς μπορούν επίσης να διεγείρουν τις G α πρωτεΐνες και έτσι να ενεργοποιούν τη φωσφολιπάση C (PLC) ⁽¹⁰¹⁾. Η PLC παράγει από την 4,5-διφωσφορική φωσφατιδυλινοσιτόλη (PIP₂) της πλασματικής μεμβράνης, τους δύο δεύτερους αγγελιαφόρους, 1,4,5-τριφωσφορική ινοσιτόλη (IP₃) και διακυλογλυκερόλη (DAG) ⁽¹⁰⁰⁾ (Εικόνα 1.7).

Η IP₃ είναι ένα διαλυτό μόριο, το οποίο είναι υπεύθυνο για την απελευθέρωση του ασβεστίου από τις ενδοκυτταρικές αποθήκες (ενδοπλασματικό δίκτυο και σαρκοπλασματικό δίκτυο στις λείες μυϊκές ίνες), μέσω της ενεργοποίησης διαύλων ιόντων που ελέγχονται από την IP₃ (Εικόνα 1.7). Διεργασίες όπως είναι η απελευθέρωση ορμονών και νευροδιαβιβαστών και η ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης (PKC) λαμβάνουν χώρα όταν υπάρχουν αυξημένα επίπεδα ασβεστίου στο κυτταρόπλασμα. Η διακυλογλυκερόλη (DAG), αφού παραμένει στην μεμβράνη, ενεργοποιεί την PKC μαζί με το ασβέστιο, η οποία φωσφορυλιώνει κατάλοιπα σερίνης και θρεονίνης σε πολλές πρωτεΐνες-στόχους, τροποποιώντας έτσι τη λειτουργία τους⁽¹⁰⁰⁾.

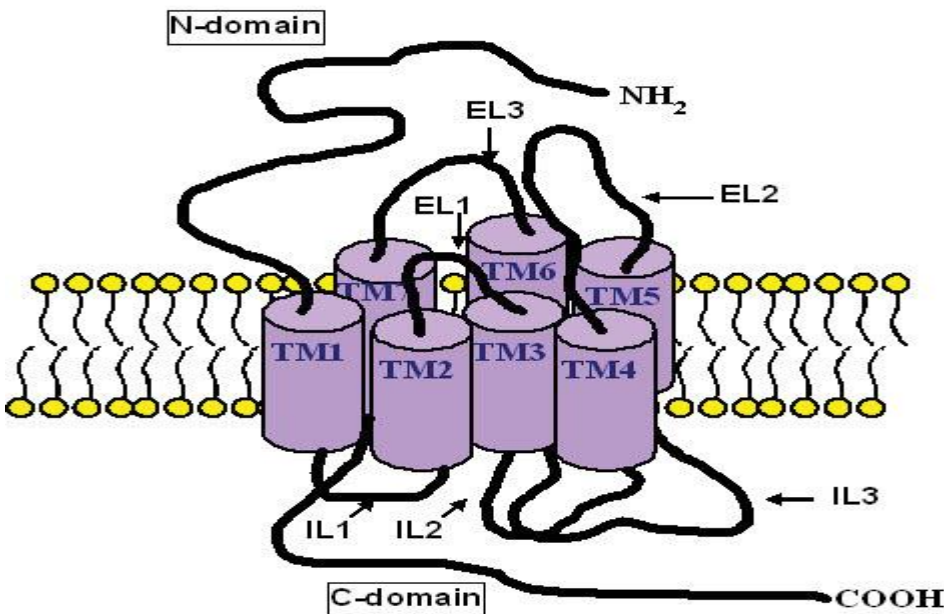


Εικόνα 1.7. Μεταγωγή σήματος μέσω Gq-πρωτεϊνών.

Οι υποδοχείς του CRF αλληλεπιδρούν και διεγείρουν επίσης τις πρωτεΐνες Gi, Gz, Go, τροποποιώντας έτσι τη λειτουργία διαφορετικών κυτταρικών σηματοδοτικών οδών⁽¹⁰¹⁾. Παράλληλα υπάρχουν ενδείξεις ότι σε διαφορετικούς ιστούς ο ίδιος υποδοχέας CRF συνδέεται με διαφορετικές G-πρωτεΐνες και ενεργοποιεί διαφορετικές οδούς σηματοδότησης⁽¹⁰¹⁾. Το γεγονός αυτό μπορεί να εξηγήσει τις ποικίλες βιολογικές δράσεις του CRF και των συγγενών του πεπτιδίων μέσω του ίδιου τύπου υποδοχέα σε διαφορετικούς όμως ιστούς-στόχους.

1.7 Δομή και λειτουργία των υποδοχέων του CRF

Οι υποδοχείς του CRF αποτελούνται από μια εξωκυττάρια αμινοτελική περιοχή (N-περιοχή), μια ενδοκυττάρια καρβοξυτελική περιοχή (COOH ή C-περιοχή) και επτά διαμεμβρανικές περιοχές (TM_s: TM1-TM7) που συνδέονται μεταξύ τους με τρεις εξωκυττάριους (EL_s: EL1-EL3) και τρεις ενδοκυττάριους βρόγχους (IL_s: IL1-IL3) (Εικόνα 1.8). Οι EL_s και τα άνω τμήματα των TM_s σχηματίζουν τη J-περιοχή του CRF₁R. Οι ενδοκυττάριες περιοχές των υποδοχέων του CRF αλληλεπιδρούν με τις G-πρωτεΐνες, ενώ οι εξωκυττάριες περιοχές αλληλεπιδρούν με τα πεπτίδια. Η αλληλεπίδραση των πεπτιδίων αγωνιστών με το εξωκυττάριο τμήμα του υποδοχέα επιφέρει δομικές αλλαγές που τον ενεργοποιούν και στη συνέχεια μεταφερόμενες μέσω των TM_s στο ενδοκυττάριο τμήμα ευθύνονται για την αλληλεπίδρασή του με τις G-πρωτεΐνες και τη διέγερση των τελευταίων.



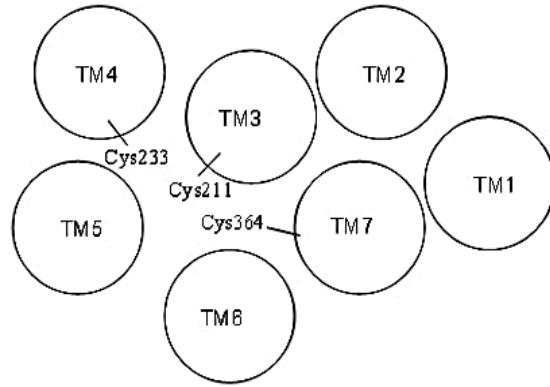
Εικόνα 1.8. Δομή του CRF υποδοχέα. Οι διαμεμβρανικές περιοχές (TM1-TM7) απεικονίζονται με μωβ κυλίνδρους. Επίσης διακρίνονται οι εξωκυττάριοι (EL1-EL3) και οι ενδοκυττάριοι (IL1-IL3) βρόγχοι καθώς και η αμινοτελική (N-περιοχή ή NH₂) και καρβοξυτελική περιοχή (COOH) του υποδοχέα.

Τα αμινοξέα των εξωκυττάρων περιοχών των υποδοχέων του CRF αποτελούν θέσεις γλυκοζυλίωσης, η οποία παίζει ρόλο στη λειτουργία των υποδοχέων αυτών⁽¹⁰²⁾. Σημαντικότερο όμως δομικό-λειτουργικό ρόλο παίζουν οι τρεις δισουλφιδικοί δεσμοί που σχηματίζονται μεταξύ των κυστεϊνών (Cys) που βρίσκονται στην εξωκυττάρια N-περιοχή των CRF υποδοχέων, καθώς και ο δισουλφιδικός δεσμός που σχηματίζεται μεταξύ του πρώτου και του δεύτερου εξωκυττάρου βρόγχου. Οι δεσμοί αυτοί υπάρχουν και σε άλλους υποδοχείς της οικογένειας B των GPCRs, παίζοντας σημαντικό ρόλο στη δομή και λειτουργία τους, όπως αποδείχθηκε σε μελέτες μαγνητικού συντονισμού (NMR) και κρυσταλλογραφίας^(89,103-108). Συγκεκριμένα οι τρεις δισουλφιδικοί δεσμοί της N-περιοχής των υποδοχέων του CRF σταθεροποιούν τη δομή της περιοχής αυτής η οποία αποτελείται από δυο αντιπαράλληλες β-πτυχωτές δομές.

Δομικές αλλαγές, οι οποίες συμβαίνουν στην εξωκυττάρια N-περιοχή κατά τη δέσμευση πεπτιδίων ευθύνονται για τη δεσμευσή τους στις υπόλοιπες περιοχές του υποδοχέα σύμφωνα με το πρότυπο δύο σταδίων^(94,103). Στο πρώτο στάδιο το καρβοξυτελικό άκρο των πεπτιδίων-αγωνιστών (π.χ CRF, σοβαγίνη) αλληλεπιδρά με την εξωκυττάρια N-περιοχή του υποδοχέα. Η αλληλεπίδραση αυτή προκαλεί δομικές αλλαγές που προσανατολίζουν το αμινοτελικό άκρο των πεπτιδίων προς τη J-περιοχή του υποδοχέα. Η αλληλεπίδραση των πεπτιδίων με τη J-περιοχή του υποδοχέα είναι υπεύθυνη για την ενεργοποίηση του.

Κρυσταλλογραφικές μελέτες των GPCRs έδειξαν ότι, αμινοξέα των TM3, TM5 και TM6 παίζουν σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίησή τους^(110-112,114). Τα αμινοξέα των TMs σχηματίζουν δίκτυα δεσμών, τα οποία καταστρέφονται και έπειτα δημιουργούνται νέα κατά με την ενεργοποίηση των υποδοχέων. Οι δομικές αυτές αλλαγές έχουν σαν αποτέλεσμα να δημιουργηθεί μια κοιλότητα στις ενδοκυττάρια περιοχές των υποδοχέων που δεσμεύει και διεγείρει τις G_s πρωτεΐνες. Ανάμεσα στα αμινοξέα που συμμετέχουν στη δημιουργία δικτύου δεσμών, το οποίο παίζει ρόλο στην ενεργοποίηση του υποδοχέα, είναι τα Gly210 στην τρίτη TM (TM3) και Asn283 στη πέμπτη TM (TM5)⁽¹¹¹⁾.

Η αλληλεπίδραση των μικρομοριακών μη πεπτιδικών ανταγωνιστών, συμπεριλαμβανομένων της ανταλαρμίνης και του CP-376395, με αμινοξέα των TM3, TM5 και TM6 του CRF₁R παρεμποδίζουν κινήσεις των TMs που σχετίζονται με την ενεργοποίηση του υποδοχέα. Τα μόρια αυτά αλληλεπιδρούν με αμινοξέα των TMs που είναι τοποθετημένα στην επιφάνεια μιας κοιλότητας που βρίσκεται στη λιπιδική διπλοστιβάδα της πλασματικής μεμβράνης, σχηματίζεται από τις TMs και επικοινωνεί με το υδρόφιλο περιβάλλον του εξωκυττάρου υγρού (Εικόνα 1.9)⁽⁹⁷⁾. Τα αμινοξέα των TMs που δεσμεύουν τον CP-376395 και την ανταλαρμίνη, όπως έδειξε τόσο η κρυσταλλική δομή του συμπλόκου CRF₁R/CP-376395 όσο και προηγούμενη μελέτη δομής-λειτουργίας του CRF₁R είναι τα Phe203, Met206, Leu280, Asn283, Phe284, Leu287, Ile290, Thr316, Leu319, Leu320, Leu323, Gly324, Tyr327 και Val279 που βρίσκονται στις TM3, TM5 και TM6⁽¹¹¹⁾.



Εικόνα 1.9. Η κοιλότητα θέσης δέσμησης που σχηματίζουν οι διαμεμβρανικές περιοχές TM1- TM7 είναι το κενό που φαίνεται εσωτερικά και εκεί που βρίσκονται οι ενδογενείς Cys211, Cys233 και Cys364.

2. Σκοπός

Σε προηγούμενη μελέτη μας δείξαμε ότι η τρίτη (TM3), πέμπτη (TM5) και έκτη (TM6) διαμεμβρανικές περιοχές του CRF₁R⁽¹¹¹⁾ παίζουν σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση του υποδοχέα, μέσω της δημιουργίας δεσμών ανάμεσα στα αμινοξέα τους που σταθεροποιούν τον υποδοχέα, είτε στην ανενεργή ή στην ενεργή κατάσταση. Συγκεκριμένα στη μελέτη αυτή δείξαμε ότι το καρβονύλιο της Met206 της TM3, σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με την Asn283 της TM5 του CRF₁R, που σταθεροποιεί τον υποδοχέα στην ανενεργό του κατάσταση. Μοριακές προσομοιώσεις με βάση κρυσταλλικές δομές άλλων GPCRs σε ενεργό και ανενεργό κατάσταση έχουν δείξει ότι κατά την ενεργοποίησή τους οι TM3 και TM5 απομακρύνονται η μια από την άλλη. Στην παρούσα εργασία, μελετήσαμε τον ρόλο της Asn283 στην ενεργοποίηση του CRF₁R μεταλλάσσοντας το αμινοξύ αυτό σε αλανίνη (Ala) και προσδιορίζοντας το αποτέλεσμα της μετάλλαξης στις λειτουργικές ιδιότητες του υποδοχέα.

3. Υλικά και Μέθοδοι

3.1. Μετάλλαξη του DNA του ανθρώπινου υποδοχέα CRF₁R και κλωνοποίηση του DNA

Στη συγκεκριμένη ερευνητική εργασία χρησιμοποιήθηκε DNA ανθρώπινου CRF₁R (άγριος τύπος), το οποίο βρίσκεται σε πλασμίδιο pCIN4 (hCRF₁R/pCIN4), δηλαδή πλασμιδιακό DNA hCRF₁R/pCIN4.

Σκοπός της εργασίας είναι να μεταλλάξουμε την Asp283 (ή N283) της πέμπτης ενδοκυττάκριας περιοχής (TM5) του hCRF₁R σε αλανίνη (Ala,A), ώστε να δημιουργηθεί η μετάλλαξη N283A. Η μετάλλαξη αυτή επιτεύχθηκε με τη μέθοδο της μεταλλαξιγένεσης κατευθυνόμενης θέσης με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), (PCR Site-Directed Mutagenesis) και με αντικατάσταση των νουκλεοτιδίων, τα οποία κωδικοποιούν την Asp283 με εκείνα που κωδικοποιούν την αλανίνη.

Για την κλωνοποίηση του DNA του hCRF₁R που φέρει την μετάλλαξη εφαρμόστηκε το παρακάτω πρωτόκολλο:

- a. Απομονώση του DNA του υποδοχέα που φέρει τη μετάλλαξη.
- b. Ακολούθησε πέψη του DNA με ένζυμα περιορισμού και έκθεση του γονιδίου του μεταλλαγμένου υποδοχέα σε φορέα κλωνοποίησης (cloning vector), ο οποίος είχε πρώτα κοπεί με τα ίδια περιοριστικά ένζυμα, με σκοπό τη δημιουργία μορίου ανασυνδυασμένου DNA (recombinant DNA). Ο φορέας κλωνοποίησης ήταν ένα μόριο DNA (πλασμίδιο pCIN4) που είχε κατασκευαστεί τεχνητά και είχε την ικανότητα να αντιγράφεται σε έναν οργανισμό-ξενιστή (σε βακτήρια *E.coli*).
- c. Μετασηματίστηκαν τα κύτταρα του ξενιστή (*E.coli*) με το ανασυνδυασμένο μόριο DNA (πλασμιδιακό DNA CRF₁R/pCIN4 με τη μετάλλαξη N283A) δηλαδή εισήχθη το ανασυνδυασμένο μόριο στον ξενιστή. Το ανασυνδυασμένο μόριο DNA αντιγραφόταν στο κύτταρο-ξενιστή, με αποτέλεσμα την παραγωγή πολλών πανομοιότυπων αντιγράφων του που αποτελούν ένα κλώνο. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται μοριακή κλωνοποίηση. Καθώς τα βακτήρια *E.coli* αναπαράγονταν, τα ανασυνδυασμένα μόρια DNA μεταβιβάζονταν σε όλους τους απογόνους τους δημιουργώντας πληθυσμούς κυττάρων που φέρουν τις κλωνοποιημένες αλληλουχίες.

3.1.1. Μεταλλαξιγένεση κατευθυνόμενης θέσης με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

PCR Site- Directed Mutagenesis

Για μελέτη της δομής και της λειτουργίας των πρωτεϊνών μπορεί να χρησιμοποιηθεί η μέθοδος της μεταλλαξιγένεσης κατευθυνόμενης θέσης με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR). Χρησιμοποιώντας την μέθοδο της PCR μεταλλάξαμε τα νουκλεοτίδια του DNA του hCRF₁R που κωδικοποιούν την Asp283 σε αλανίνη (N283A), έχοντας σαν εκμαγείο το πλασμιδιακό DNA hCRF₁R/pCIN4 και 4 ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμεύουν σαν εκκινητές, οι δύο εκ των οποίων είναι συμπληρωματικοί μεταξύ τους και περιέχουν την N283A μετάλλαξη (εκκινητές μετάλλαξης).

Το πιο βασικό από όλα στη διαδικασία αυτή, είναι ο σχεδιασμός των εκκινητών της μετάλλαξης, έτσι ώστε ο εκκινητής και το εκμαγείο να υβριδοποιούνται σε ικανοποιητικό βαθμό. Με αυτό τον τρόπο επιτυγχάνεται η έναρξη της αντίδρασης πολυμεράσης παρά την ύπαρξη των νουκλεοτιδίων της μετάλλαξης που δεν είναι συμπληρωματικά εκείνων του εκμαγείου. Για αυτό το λόγο πρέπει να λαμβάνονται υπόψη κάποια σημεία κατά τον σχεδιασμό των εκκινητών, όπως το ότι τα νουκλεοτίδια που κωδικοποιούν τη μετάλλαξη έπρεπε να βρίσκονται στο μέσο του εκκινητή, τα 3' άκρα του κάθε εκκινητή έπρεπε να έχουν G ή C και το ποσοστό GC σε κάθε εκκινητή έπρεπε να προσεγγίζει όσο το δυνατόν περισσότερο το 50% των νουκλεοτιδίων του εκκινητή.

Επιπλέον, λήφθηκαν υπόψη και άλλες παράμετροι, όπως συγκεκριμένη θερμοκρασία τήξης (T_m), απουσία hairpin loops, παλίνδρομων αλληλουχιών, ολιγονουκλεοτιδίων με την ίδια βάση τοποθετημένη πολλές φορές στη σειρά κ.α.

Η συγκεκριμένη διαδικασία έχει δύο στάδια. Στο πρώτο στάδιο δημιουργούνται δύο τμήματα DNA (από τον sense εκκινητή του γονιδίου έως τον antisense εκκινητή της μετάλλαξης και από τον sense εκκινητή της μετάλλαξης, ο οποίος είναι συμπληρωματικός του antisense εκκινητή της μετάλλαξης- μέχρι τον antisense εκκινητή του γονιδίου). Στο επόμενο στάδιο τα δύο τμήματα ενώνονται μεταξύ τους και δίνουν το τελικό DNA που φέρει την επιθυμητή μετάλλαξη. Οι εκκινητές των μεταλλάξεων έχουν σχεδιαστεί έτσι ώστε να προσθέτουν ή να αφαιρούν θέσεις αναγνώρισης περιοριστικών ενζύμων, γεγονός που χρησιμοποιείται αργότερα για την πρώτη εξακρίβωση της ύπαρξης της μετάλλαξης στο τελικό προϊόν.

Για την επιμήκυνση της αλυσίδας του DNA χρησιμοποιήθηκε η πολυμεράση Pfu (Pfu-Polymerase) και μείγμα των νουκλεοτιδίων (dNTPs), dTTP, dATP, dCTP, dGTP, συγκέντρωση 2.5mM το καθένα.

Υλικά - Συσκευές

- Διάλυμα τριφωσφορικών δεόξυ-νουκλεοτιδίων (dNTPs) (dTTP,dATP,dCTP, dGTP) 2,5mM το καθένα (Fermentas, USA)
- Pfu πολυμεράση (Fermentas, USA)
- Ρυθμιστικό διάλυμα Pfu πολυμεράσης 10x (Fermentas, USA)
- Διάλυμα MgSO₄ 10x (Fermentas, USA)
- Στείρο νερό (nanopure)
- Εκκινητές (Primers) (VBC-GENOMICS BIOSCIENCE Research GmbH, Austria)
- DNA εκμαγεία: hCRF₁R/pcin4 (γονίδιο του hCRF₁R στο πλασμίδιο pcin4) και

- προϊόντα των PCR1a & PCR1b και PCR2
- Αυτόματος Θερμικός Κυκλοποιητής PCR (Perkin Elmer PCR System 2400,USA)
- Συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA)

Αλληλουχία εκκινητών μετάλλαξης γονιδίου

- **sense-CRF1-pcin4-N283A**
- CTGGTGCCGATCGATTACGACCATCTTC 3'
- θέση υβριδισμού: 1499 bp στο hCRF₁R/pCIN4

- **antisense-CRF1-pcin4- N283A**
- 5'- GAAGATGGTCGTAATCGATCGGCACCAG -3'
- θέση υβριδισμού: 1499 bp στο hCRF₁R/pCIN4

Αλληλουχία εκκινητών άκρων γονιδίου

- **A-PAN4** : 5'- GCA GAC AGC GAA TTA ATT CCA GC- 3'
θέση υβριδισμού: 2208-2230 bp στο hCRF₁R/pCIN4
- **MV10** : 5'-GGC GTG TAC GGT GGG AGG-3'
θέση υβριδισμού: 784-801 bp στο hCRF₁R/pCIN4

Μέθοδος

Κατά την πρώτη φάση (PCR1a & PCR1b) δημιουργούνται τα τμήματα sense (εκκινητές: sense μετάλλαξης & antisense γονιδίου) και antisense (εκκινητές: antisense μετάλλαξης & sense γονιδίου). Στη συνέχεια τα δύο αυτά τμήματα ενώνονται μεταξύ τους με τη χρήση επικαλυπτόμενης αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR2).

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης 1a και 1b (PCR1a & PCR1b)

Αρχικά προσθέτονται 1,5 μl από τον κάθε εκκινητή σε κάθε δοχείο αντίδρασης (PCR tubes), ο ένας στον πυθμένα και ο δεύτερος στα τοιχώματα, έτσι ώστε να αποφευχθεί ο υβριδισμός των εκκινητών. Ακολούθως, παρασκευάζεται μείγμα (Μείγμα A) το οποίο περιέχει νερό, dNTPs, ρυθμιστικό διάλυμα Pfu, ιόντα μαγνησίου και DNA-εκμαγείο. Στη συνέχεια, προσθέτονται σε κάθε PCR tube 44μl από το Μείγμα A, ώστε ο όγκος του διαλύματος να είναι 47μl. Τέλος, προσθέσαμε 3μl/αντίδραση Pfu πολυμεράσης. Όλη η διαδικασία γίνεται στον πάγο.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ PCR		ΜΕΙΓΜΑ Α	
Συστατικά	Όγκος/αντίδραση (μL)	Συστατικά	Όγκος/αντίδραση (μL)
DNA-εκμαγείο	100ng / αντίδραση	DNA-εκμαγείο	100ng / αντίδραση
Ρυθμιστικό διάλυμα Pfu 10x	5	Ρυθμιστικό διάλυμα Pfu 10x	5
dNTPs (2,5mM)	4	dNTPs (2,5mM)	4
Mg²⁺ 10x	5	Mg²⁺ 10x	5
H₂O	28,5	H₂O	28,5
Εκκινητές	1,5	Τελικός όγκος	44
	1,5		
Τελικός Όγκος	47		

Πίνακας 3.1. Ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν κατά την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης 1a και 1b (PCR1a & PCR1b).

Οι αντιδράσεις επωάζονται σε θερμικό κυκλοποιητή για δύο λεπτά στους 99,9°C (κύκλος 1α). Στη συνέχεια η θερμοκρασία του διαλύματος κατεβαίνει στους 97°C για δύο λεπτά (κύκλος 1β), όπου γίνεται και η προσθήκη της Pfu πολυμεράσης, έτσι ώστε ο τελικός όγκος της αντίδρασης να είναι 50μL.

Οι αντιδράσεις παραμένουν στους 97°C για άλλα 30 δευτερόλεπτα (κύκλος 2α) και στη συνέχεια ψύχονται στους 55°C, όπου παραμένουν για 2 λεπτά (κύκλος 2β). Ακολούθως, η θερμοκρασία αυξάνεται στους 72°C, όπου και παραμένει για έξι λεπτά (κύκλος 2γ). Όλος ο κύκλος 2 (α, β, και γ) επαναλαμβάνεται σαράντα πέντε φορές. Στη συνέχεια, η θερμοκρασία παραμένει στους 72°C για ακόμα δέκα λεπτά (κύκλος 3). Στο τέλος οι αντιδράσεις ψύχονται στους 4°C. Μετά το τέλος της αντίδρασης τα προϊόντα διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης, απομονώθηκαν και καθαρίστηκαν.

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης 2 (PCR2)

Μετά τον καθαρισμό των PCR1a και PCR1b, πραγματοποιούμε εκ νέου αντίδραση

PCR (PCR2), με τη διαφορά ότι ως DNA-εκμαγείο χρησιμοποιούμε μέρος των προϊόντων των PCR1a και PCR1b και τους δύο εκκινητές (sense και antisense) του γονιδίου. Οι συνθήκες της PCR2 παραμένουν ίδιες με τις PCR1a και PCR1b. Αρχικά τοποθετούνται 5μL από το κάθε προϊόν των PCR1a και PCR1b στο δοχείο της αντίδρασης και προστίθενται 38μL από το Μείγμα A της PCR2.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ PCR			ΜΕΙΓΜΑ A	
Συστατικά		Όγκος/αντίδραση (μL)	Συστατικά	Όγκος/αντίδραση (μL)
DNA	Προϊόν PCR1a	5	Ρυθμιστικό διάλυμα Pfu 10x	5
	Προϊόν PCR1b	5	dNTPs (2,5mM)	4
Ρυθμιστικό διάλυμα Pfu 10x		5	Mg²⁺ 10x	5
dNTPs (2,5mM)		4	H₂O	21
Mg²⁺ 10x		5	Εκκινητές	1,5
				1,5
H₂O		21	Τελικός Όγκος	38
Εκκινητές		1,5		
		1,5		
Τελικός Όγκος		48		

Πίνακας 3.2. Ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν κατά την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης 2 (PCR2).

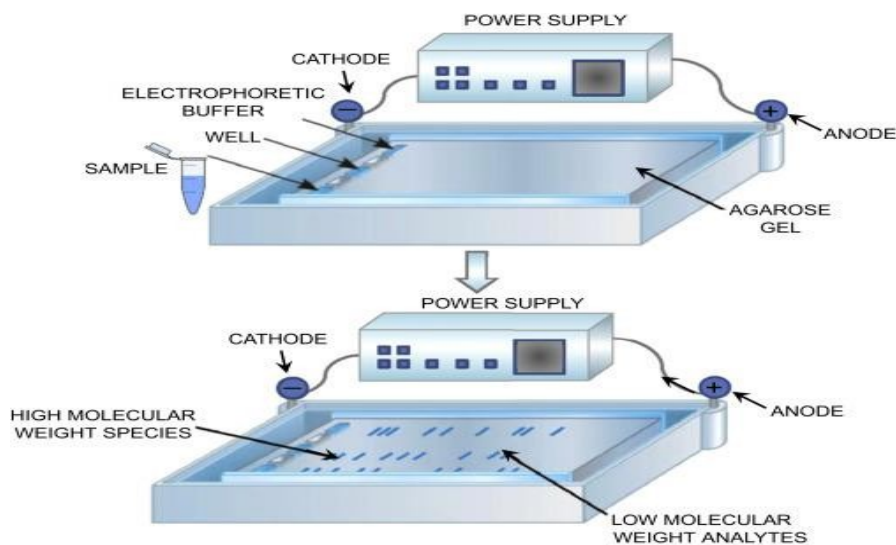
3.1.2. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης-απομόνωση και καθαρισμός επιθυμητών τμημάτων DNA

Υλικά-Συσκευές

- Διάλυμα TAE 50X (242 g Tris base, 57,1 ml οξικό οξύ 37,2 Na₂EDTA·2H₂O H₂O)
- Αγαρόζη (Invitrogen, USA)
- Βρωμιούχο αιθίδιο, C₂₁H₂₀BrN₃ (Fluka, Switzerland)
- Χρωστική, 6X Gel Loading Dye (Fermentas, USA)
- Δείκτες DNA με τεμάχια γνωστού μοριακού βάρους: (Invitrogen)(1Kb Plus DNA Ladder)
- Συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA)
- kit Nucleospin Gel and PCR clean-up της Macherey-Nagel (Germany)

Μέθοδος

Κατά την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης, επιτρέπεται στα μικρότερου μοριακού βάρους DNA να κινούνται πιο γρήγορα και να διανύουν μεγαλύτερη απόσταση μέσα στο πήκτωμα σε σύγκριση με τα μεγαλύτερα. Επίσης, το DNA κατά την ηλεκτροφόρηση μεταναστεύει από τον αρνητικό προς τον θετικό πόλο, διότι είναι αρνητικά φορτισμένο (Εικόνα 3.1).



Εικόνα 3.1. Συσκευή ηλεκτροφόρησης

Για την παρασκευή του πηκτώματος αγαρόζης περιεκτικότητας 1%, διαλύθηκε 1,7 gr αγαρόζης σε 170ml διαλύματος TAE 1X (αραιωμένο από TAE 50X σε αναλογία 1/50), με θέρμανση υπό συνεχή ανάδευση. Το διάλυμα ψύχθηκε και ακολούθως προστέθηκαν σε αυτό 4 μl βρωμιούχου αιθιδίου. Το βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr) χρησιμεύει για την σήμανση του DNA που ηλεκτροφορήθηκε στο πήκτωμα αγαρόζης όταν εκτεθεί σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV), καθώς το EtBr προσδένεται παρεμβαλλόμενο στις 2 αλυσίδες του DNA δημιουργώντας με αυτόν τον τρόπο το φθορίζον σύμπλοκο EtBr/DNA. Στη συνέχεια, το διάλυμα αγαρόζης τοποθετήθηκε στο δισκίο της συσκευής ηλεκτροφόρησης και αφέθηκε να πήξει, ενώ παράλληλα δημιουργήθηκαν εσοχές-πηγάδια με τη βοήθεια του ειδικού κτενίου.

Μετά την πήξη του πηκτώματος, αυτό τοποθετήθηκε στη συσκευή ηλεκτροφόρησης στην οποία υπήρχε ρυθμιστικό διάλυμα TAE 1X. Παράλληλα, στα διαλύματα που περιείχαν τα δείγματα DNA και ήταν προϊόντα των αντιδράσεων PCR ή προϊόντα πέψης προστέθηκε κατάλληλος όγκος 6X ρυθμιστικού διαλύματος (40% γλυκερόλη, 0,25% Bromophenol Blue, 0,25% Xylene Cyanol FF). Στη συνέχεια, τα δείγματα DNA τοποθετήθηκαν στα πηγάδια του πηκτώματος και ηλεκτροφορήθηκαν κάτω από ηλεκτρική τάση 110V για 50 περίπου λεπτά. Παράλληλα ηλεκτροφορήθηκε και δείκτης DNA τεμαχίων γνωστού μοριακού βάρους (Ladder) με σκοπό τον υπολογισμό των μοριακών μεγεθών των ηλεκτροφορηθέντων DNA. Τα επιθυμητά τεμάχια του DNA αποκόπτονται από το πήκτωμα με τη χρήση νυστεριού και ακολούθως απομονώνονται από αυτό με τη χρήση του kit Nucleospin Gel and PCR clean-up της Macherey-Nagel σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρίας.

3.1.3. Πέψη DNA με ένζυμα περιορισμού

Τα ένζυμα περιορισμού έχουν την ιδιότητα να αναγνωρίζουν μια συγκεκριμένη και σχετικά μικρή αλληλουχία DNA. Τα ένζυμα αυτά προκαλούν πέψη του DNA όταν επωαστούν κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες (θερμοκρασία, χρόνος και ιονική ισχύς του διαλύματος επώασης).

Τα DNA που υποβλήθηκαν σε πέψη ήταν το PCR2 μεγέθους 1552 bp και το πλασμίδιο hCRF₁R/pCIN4 μεγέθους 5760bp.

Τα ένζυμα περιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν για την πέψη αυτών των DNA ήταν το Xag I, που αναγνώριζε την αλληλουχία 5'- CCTNN ↓ NNNAGG -3' και το AgeI που αναγνώριζε την αλληλουχία 5'- A ↓ CCGGT -3' (όπου ↓ σημείο κοπής).

3.1.4. Συρραφή τεμαχίων DNA-Ligation

Υλικά - Συσκευές

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

Μέθοδος

Μετά την απομόνωσή τους από το πήκτωμα αγαρόζης, τα επιθυμητά προϊόντα πέψης- τεμάχια των DNA συρράφτηκαν. Η αντίδραση συρραφής έλαβε χώρα σε θερμοκρασία 16°C για 16 ώρες (over night) και το αναμενόμενο προϊόν της ήταν το πλασμίδιο hCRF₁R- N283A/pCIN4. Για τη συρραφή χρησιμοποιήθηκε η T4 λιγάση της Thermo Scientific. Στον πίνακα που ακολουθεί (Πίνακας 3.3) φαίνονται αναλυτικά οι ποσότητες των συστατικών του διαλύματος.

ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	ΟΓΚΟΣ (μl)
T4 λιγάση	4,5
Ρυθμιστικό διάλυμα T4 λιγάσης	5
H ₂ O	12,5
Επιθυμητό τμήμα DNA από το πλασμίδιο	20
Τμήμα DNA που θα εισέλθει στο πλασμίδιο	8
Τελικός Όγκος	50

Πίνακας 3.3. Ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη συρραφή τεμαχίων DNA.

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

Υλικά - Συσκευές

- Επιδεκτικά (competent) στο μετασχηματισμό βακτήρια DH-10b E.Coli
- Προϊόν συρραφής (πλασμίδιο N283A-hCRF₁R/pCIN4)
- Τρυβλία άγαρ-αμπικιλίνης (10 g τρυπτόνη, 15 g άγαρ, 5 g εκχύλισμα μαγιάς (yeast extract), 5 g NaCl, 1 ml NaOH 1N και αμπικιλίνη τελικής συγκέντρωσης 60μg/ml, διαλυμένα σε 1 λίτρο H₂O).
- Θρεπτικό υλικό LB (10g τρυπτόνη, 5g εκχύλισμα μαγιάς, 5g NaCl, 1ml NaOH 1N σε 1 λίτρο H₂O).

- Θερμαινόμενη πλάκα επώασης (Bioblock Scientific, France).
- Φυγόκεντρος (Eppendorf Centrifuge 5415, Germany).
- Επωαστικός κλίβανος Thermo Forma (Thermo Fisher Scientific Inc., USA).

Μέθοδος

Για το μετασχηματισμό βακτηρίων με το προϊόν συρραφής, τα βακτήρια ξεπάγωσαν σταδιακά στον πάγο. Στο προϊόν συρραφής προστέθηκαν 150μl βακτήρια και επώαστηκαν για 30 λεπτά στον πάγο. Στη συνέχεια, υπέστησαν αιφνίδια θερμική προσβολή (heat shock) (στους 42°C για 45 δευτερόλεπτα). Μετά το heat shock τοποθετούνται στον πάγο για 2 λεπτά ώστε να σταθεροποιηθεί η μεμβράνη τους. Στη συνέχεια επιστρώνονται σε τρυβλία άγαρ-αμπικιλίνης και αφήνονται για επώαση στους 37°C για 16 ώρες. Μετά από 16 ώρες επώασης, έγινε λήψη των αποικιών και πολλαπλασιασμός τους.

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

Υλικά - Συσκευές

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

Μετά τη λήψη αποικιών, τα βακτήρια που υπήρχαν σε αυτές πολλαπλασιάστηκαν, με επώαση τους σε 7 ml LB (10 g τρυπτόνη, 5 g εκχύλισμα μαγιάς, 5 g NaCl και 1 ml 1 N NaOH ανά λίτρο) που περιείχε το αντιβιοτικό αμπικιλίνη σε συγκέντρωση 60 μg/ml, για 16 ώρες στους 37°C υπό συνεχή ανάδευση (170 αναδεύσεις/λεπτό). Στο τέλος της επώασης έγινε απομόνωση από τα βακτήρια του πλασμιδιακού DNA N283A-hCRF₁R/pCIN4 χρησιμοποιώντας το kit Nucleospin Plasmid της Macherey-Nagel (Germany) και σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρείας.

3.1.7. Καλλιέργεια κυττάρων HEK 293

Υλικά - Συσκευές

- Θρεπτικό υλικό, DMEM/F12 (1:1) Dulbecco's Modified Eagle's Medium (GIBCO-BRL, Life Technologies, UK) που περιείχε 2.5 mM L-γλουταμίνη, 15 mM HEPES, 1.125 g/L NaHCO₃.
- Ορός βοός, FBS (Fetal Bovine Serum) (GIBCO-BRL, Life Technologies, UK).
- Τρυψίνη, Trypsin/EDTA (GIBCO-BRL, Life Technologies, UK)
- Χρωστική Trypan Blue (GIBCO-BRL, Life Technologies, UK)
- DMSO (Sigma, USA)
- Φυγόκεντρος (Hermle Z320, Germany)
- Μικροσκόπιο ορατού φωτός (Olympus, Japan)

- Πλάκα αιματοκυτταρομετρητή Neubauer
- Τρυβλία καλλιιεργειών (SARSTEDT, Germany)
- Επωαστικός κλίβανος Thermo Forma (Thermo Fisher Scientific Inc., USA)
- Υπερκαταψύκτης (Forma 900, ThermoScientific, Inc USA)

Μέθοδος

Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό DMEM/F12 (1:1) εμπλουτισμένο με 10% ορό βοός, σε επωαστικό κλίβανο ρυθμισμένο σε θερμοκρασία 37°C, ατμόσφαιρα 5% CO₂ και υγρασία 100%. Τα πειράματα έγιναν χρησιμοποιώντας κύτταρα σε παρόμοια στάδια ανάπτυξης. Κάθε 48 ώρες ανανεωνόταν το θρεπτικό υλικό και τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν για τα πειράματα είχαν φτάσει σε πυκνότητα 90% περίπου. Τα κύτταρα επιστρώθηκαν σε τρυβλία σε αρχική συγκέντρωση 10⁵ κύτταρα/ml και ανακαλλιεργήθηκαν δύο φορές την εβδομάδα. Η αποκόλληση των κυττάρων έγινε με τρυψίνη/EDTA και η απενεργοποίηση της έγινε με προσθήκη περίσσειας θρεπτικού υλικού. Το κυτταρικό εναιώρημα συλλέχθηκε και φυγοκεντρήθηκε στα 250 g για 5 λεπτά. Ο προσδιορισμός του αριθμού των κυττάρων για επίστρωση, έγινε με τη μέθοδο κυτταρομετρίας (λήψη 10 μl από το κυτταρικό εναιώρημα σε 90 μl Trypan Blue, τοποθέτηση σε πλάκα Neubauer και καταμέτρηση των κυττάρων με τη βοήθεια μικροσκοπίου ορατού φωτός, σε μεγέθυνση 40x). Μέρος των κυττάρων σε κατάλληλη συγκέντρωση τοποθετήθηκε σε νέα τρυβλία για ανακαλλιέργεια ή χρησιμοποιήθηκε για την εκτέλεση πειραμάτων. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στην ίδια φάση της λογαριθμικής αύξησης των κυττάρων και περίπου στον ίδιο αριθμό γενιάς.

Τα κύτταρα καταψύχονταν σε τακτά χρονικά διαστήματα στους -80°C (και μετά από λίγες μέρες μεταφορά τους σε υγρό άζωτο), με σκοπό τη διατήρηση τους σε χαμηλό αριθμό γενεών. Συγκεκριμένα, κυτταρικό εναιώρημα συγκεντρώσεως 5 x 10⁶ κυττάρων μέσα σε υλικό κατάψυξης (FBS με 10% DMSO) τοποθετήθηκε σε σωληνάριο βαθιάς κατάψυξης. Η κατάψυξη των κυττάρων στους -80°C πραγματοποιήθηκε σταδιακά ώστε να εξασφαλιστεί η ακεραιότητά τους. Αντίθετα, η απόψυξη τους ήταν γρήγορη και άμεση. Συγκεκριμένα, τα κατεψυγμένα σωληνάρια που περιείχαν τα κύτταρα θερμάνθηκαν στους 37°C υπό συνεχή ανάδευση και τα κύτταρα μεταφέρθηκαν άμεσα σε θρεπτικό υλικό καλλιέργειας.

3.1.8. Δημιουργία κυτταρικών σειρών που εκφράζουν μόνιμα τους υποδοχείς

Υλικά - Συσκευές

- Θρεπτικό υλικό, DMEM/F12 (1:1) Dulbecco's Modified Eagle's Medium (GIBCO- BRL, Life Technologies, UK) που περιείχε 2.5 mM L-γλουταμίνη, 15 mM HEPES, 1.125 g/L NaHCO₃
- Ορός βοός, FBS (Fetal Bovine Serum) (GIBCO-BRL, Life Technologies, UK)
- Θρυψίνη, Trypsin/EDTA (GIBCO-BRL, Life Technologies, UK)
- Χρωστική Trypan Blue (GIBCO-BRL, Life Technologies, UK)
- Λιποφεκταμίνη, Lipofectamine (Invitrogen, USA)
- Γενετισίνη, Geneticin (G418) (GIBCO-BRL, Life Technologies, UK)
- Επωαστικός κλίβανος Thermo Forma (Thermo Fisher Scientific Inc., USA)
- Τρυβλία καλλιιεργειών (SARSTEDT, Germany)

Μέθοδος

Μετά την επιμόλυνση και επώαση των HEK 293 κυττάρων για 3-4 ώρες με το μείγμα θρεπτικού/λιποφεκταμίνης/DNA, αυτό αφαιρέθηκε και στα κύτταρα προστέθηκε θρεπτικό υλικό DMEM/F12 (1:1) που περιείχε 10% ορό βοός και το αντιβιοτικό γενετισίνη (G-418) σε τελική συγκέντρωση των 800 µg/ml. Τα κύτταρα επώαστηκαν σε θερμοκρασία 37°C, ατμόσφαιρα 5% CO₂ και υγρασία 100%. Κάθε 48 ώρες το παραπάνω θρεπτικό υλικό ανανεωνόταν, μέχρι να θανατωθούν όλα τα κύτταρα που δεν ήταν ανθεκτικά στο αντιβιοτικό. Μετά την εμφάνιση αποικιών τα ανθεκτικά στη γενετισίνη κύτταρα μεταφέρθηκαν σε τρυβλία και πολλαπλασιάστηκαν σε θρεπτικό υλικό DMEM/F12 (1:1) που περιείχε 10% ορό βοός και το αντιβιοτικό γενετισίνη. Οι κυτταρικές σειρές που δημιουργήθηκαν με την παραπάνω μέθοδο θα χρησιμοποιηθούν για φαρμακολογική μελέτη των υποδοχέων hCRF₁R/pCIN4 και N283A-hCRF₁R/pCIN4.

3.1.9. Πείραμα συναγωνιστικής δέσμευσης

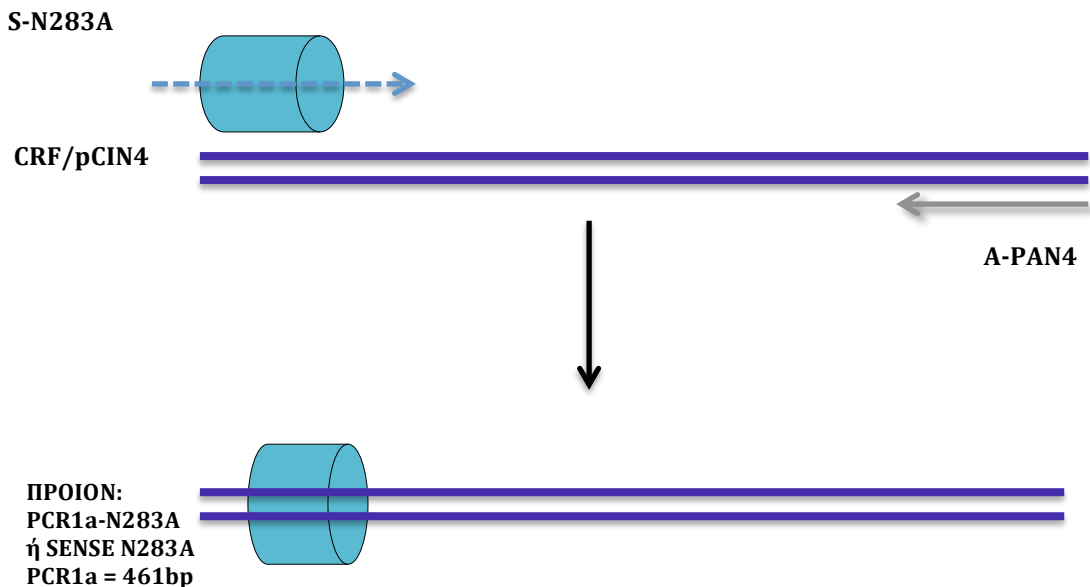
Ο φαρμακολογικός χαρακτηρισμός των υποδοχέων του CRF επιτεύχθηκε με την τεχνική της συναγωνιστικής δέσμευσης. Οι μεμβράνες που περιείχαν τους υποδοχείς του CRF επώαστηκαν με 0.04 nM [¹²⁵I]-Tyr⁰-σοβαγίνης, παρουσία ή απουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων μη ραδιοσημασμένης Tyr⁰-σοβαγίνης σε ρυθμιστικό διάλυμα Buffer-B και σε τελικό όγκο 200 λ. Η μη ειδική δέσμευση (NSB) προσδιορίστηκε παρουσία περισσειας (250-1000 nM) μη ραδιοσημασμένης ανταλαρμίνης ή αστρεσσίνης. Μετά από 2 ώρες επώασης σε θερμοκρασία δωματίου τα μίγματα διηθήθηκαν σε συσκευή Brandell, μέσω ηθμών με υάλινες ίνες, τύπου AH934 της Whatman, με σκοπό να διαχωριστεί η ελεύθερη από τη δεσμευμένη στους υποδοχείς [¹²⁵I]-Tyr⁰-σοβαγίνη. Οι ηθμοί είχαν προηγουμένως επωαστεί για 1 ώρα σε 4°C και σε υδατικό διάλυμα πολυαιθυλενιμίνης (PEI) 0.3%. Στη συνέχεια, οι ηθμοί εκπλύθηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα PBS/Triton (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na₂HPO₄•2H₂O, 1.47 mM KH₂PO₄, 0.01% Triton X-100, pH 7.08 στους 4°C), συλλέχθηκαν, και η ραδιενέργειά τους μετρήθηκε σε μετρητή γ-ακτινοβολίας, τύπου LKB Wallac 1275 Minigamma gamma counter. Η ειδική δέσμευση προσδιορίστηκε ως η διαφορά μεταξύ της μη ειδικής από τη συνολική δέσμευση. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων συναγωνιστικής δέσμευσης αναλύθηκαν με μη-γραμμική ανάλυση, χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα GraphPad Prism 6.0. Έτσι προσδιορίστηκε η ικανότητα (IC₅₀) της Tyr⁰-σοβαγίνης να εκτοπίζει τη [¹²⁵I]-Tyr⁰-σοβαγίνη από τον άγριο τύπο και το μεταλλαγμένο CRF₁R. Στις μελέτες αυτές η ποσότητα μεμβρανών που χρησιμοποιήθηκε ήταν τόση ώστε η ειδική δέσμευση της [¹²⁵I]-Tyr⁰-σοβαγίνης να μην είναι πολύ μικρή αλλά και να μην υπερβαίνει το 10% της ολικής συγκέντρωσης του ραδιοσημασμένου πεπτιδίου που χρησιμοποιείται. Επίσης, οι πειραματικές συνθήκες ήταν τέτοιες που (κατά την ανάλυση των αποτελεσμάτων) επέτρεψαν στη τιμή της συγγένειας δέσμευσης της [¹²⁵I]-Tyr⁰-σοβαγίνης (K_D) να προσεγγίζει κατά πολύ την τιμή του IC₅₀ της Tyr⁰-σοβαγίνης. Έτσι λοιπόν, όταν στο κεφάλαιο "Αποτελέσματα" αναφέρεται η συγγένεια δέσμευσης της [¹²⁵I]-Tyr⁰-σοβαγίνης και κατ' επέκταση της Tyr⁰-σοβαγίνης θα εννοείται η τιμή IC₅₀ της Tyr⁰-σοβαγίνης.

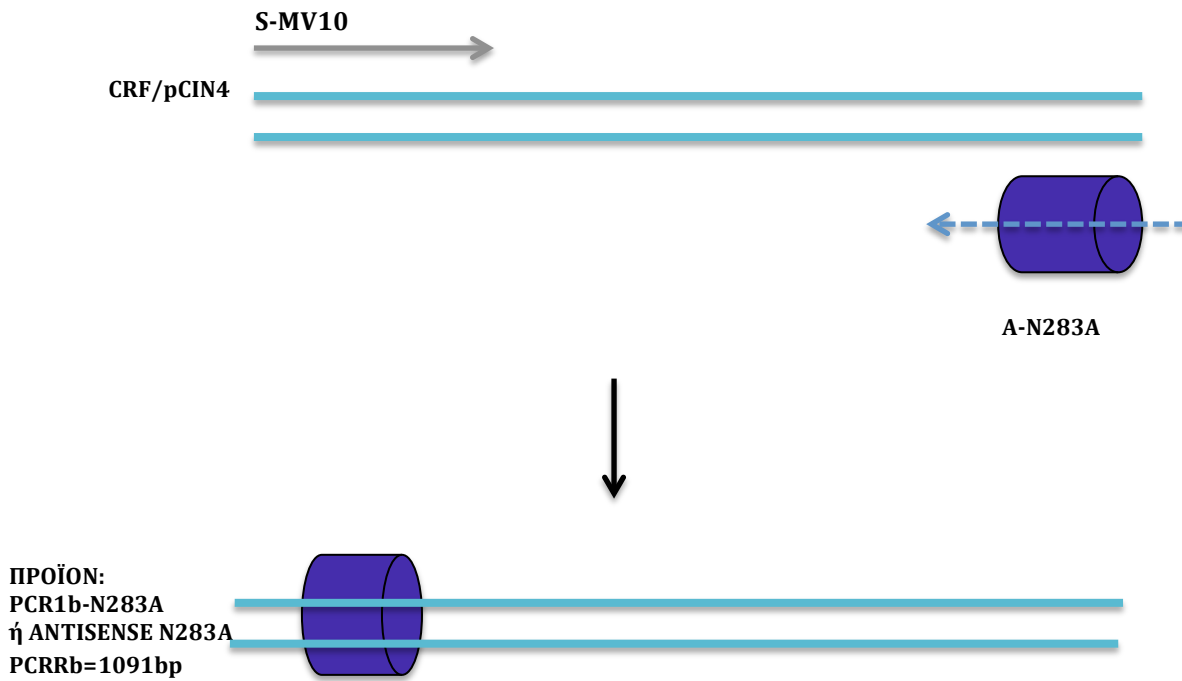
4. Αποτελέσματα

4.1 Δημιουργία του μεταλλαγμένου CRF₁R

Στην μελέτη αυτή, μεταλλάχθηκε η ασπαραγίνη 283 (Asn283) της TM5 του ανθρώπινου CRF₁R (hCRF₁R) σε αλανίνη (N283A). Η μετάλλαξη πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της μεθόδου μεταλλαξιγένεσης κατευθυνόμενης θέσης με PCR (όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο “Υλικά και Μέθοδοι”), η οποία οδήγησε στη δημιουργία του πλασμιδιακού DNA, hCRF₁R-N283A/pCIN4, που κωδικοποιεί τον μεταλλαγμένο υποδοχέα CRF₁R-N283A.

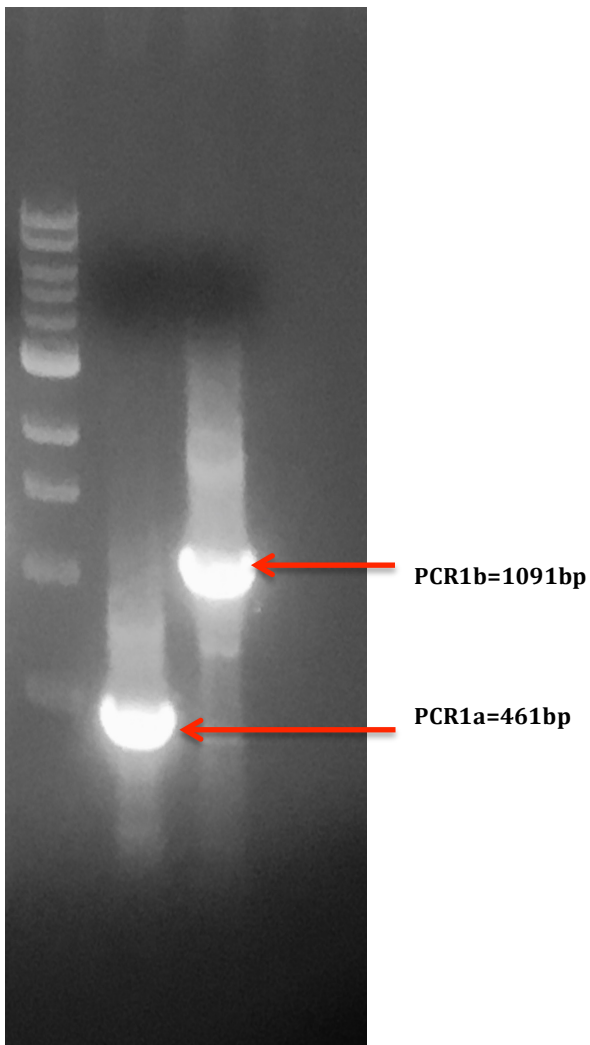
Η μέθοδος της μεταλλαξιγένεσης κατευθυνόμενης θέσης με PCR εκτελέστηκε σε δύο φάσεις και χρησιμοποιώντας τέσσερις εκκινητές (A-PAN4, S-MV10, S-N283A και A-N283A, όπου A είναι antisense εκκινητής και S είναι sense εκκινητής), από τους οποίους οι δύο είναι συμπληρωματικοί μεταξύ τους και φέρουν τη μετάλλαξη (S-N283A και A-N283A). Στη πρώτη φάση έγιναν ταυτόχρονα δύο διαφορετικές PCR, η PCR1a (με εκμαγείο το πλασμίδιο που φέρει το DNA που κωδικοποιεί τον CRF₁R και εκκινητές τους A-PAN4 και S-N283A) και η PCR1b (με εκμαγείο το πλασμίδιο που φέρει το DNA που κωδικοποιεί τον CRF₁R και εκκινητές τους S-MV10 και A-N283A), οι οποίες παρουσιάζονται στην εικόνα 4.1.



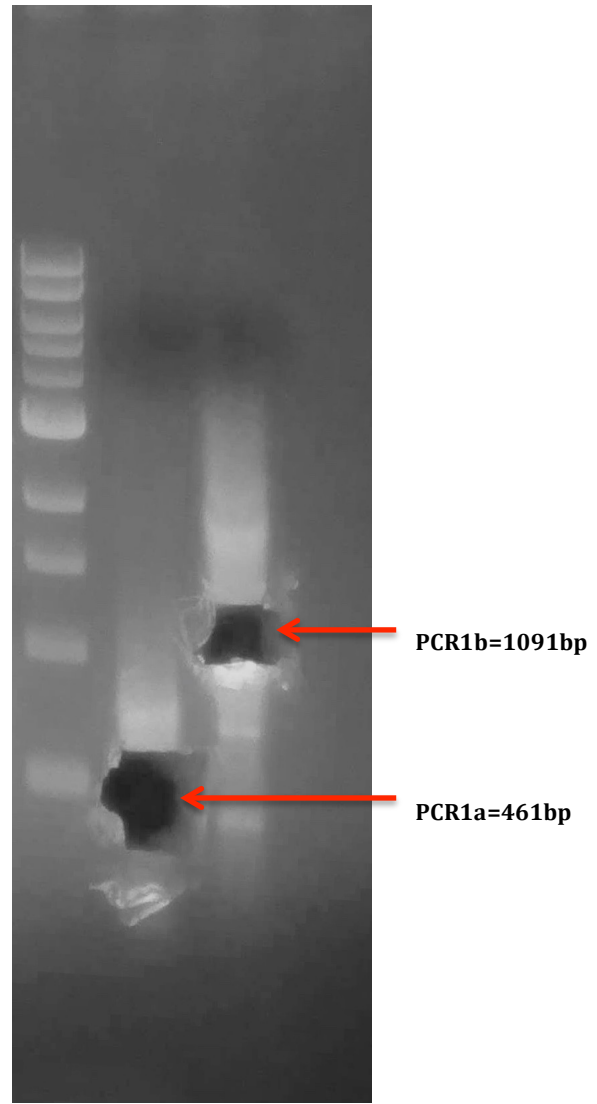


Εικόνα 4.1. Αλυσιδωτές αντιδράσεις πολυμεράσης (PCR1a και η PCR1b) φάσης 1 (ο κύλινδρος παριστάνει το σημείο μετάλλαξης).

Τα προϊόντα των PCR1a και PCR1b ήταν δύο τμήματα DNA του CRF₁R, μήκους 461bp και 1091bp, αντίστοιχα, τα οποία έφεραν στα άκρα τους τη μετάλλαξη N283A και τα οποία διαχωρίστηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης (Εικόνα 4.2).

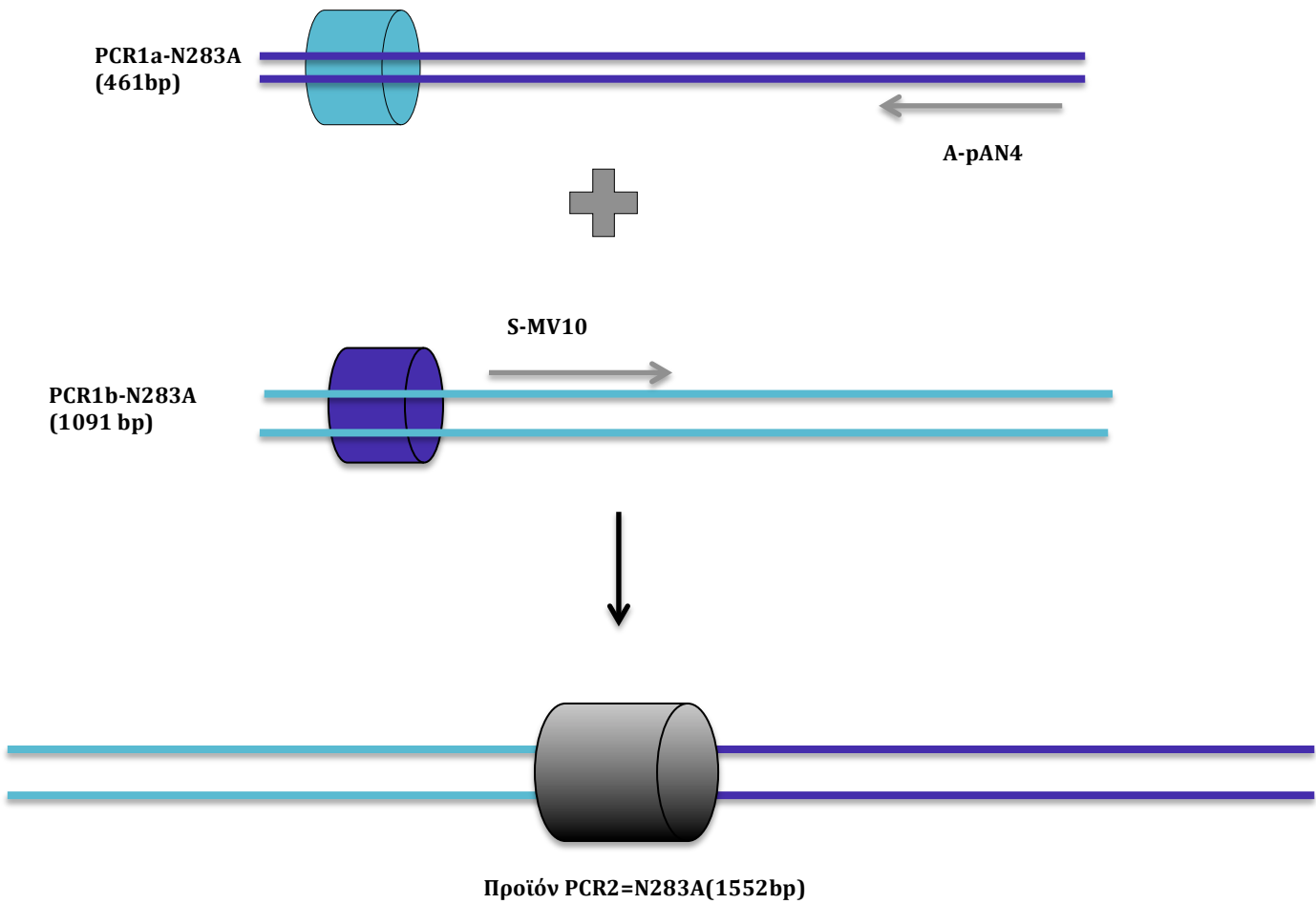


Εικόνα 4.2. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR1a και PCR1b σε πήκτωμα αγαρόζης. Τα προϊόντα της PCR1a (ή sense283A) και PCR1b (ή antisense283A) έχουν μήκος 461bp και 1091bp αντίστοιχα. Παράλληλα ηλεκτροφορήθηκε και ο μάρτυρας (ladder 1kb, Invitrogen) που περιέχει τεμάχια DNA γνωστού μοριακού μεγέθους, έτσι ώστε να είναι δυνατός ο υπολογισμός των μοριακών μεγεθών των PCR προϊόντων.



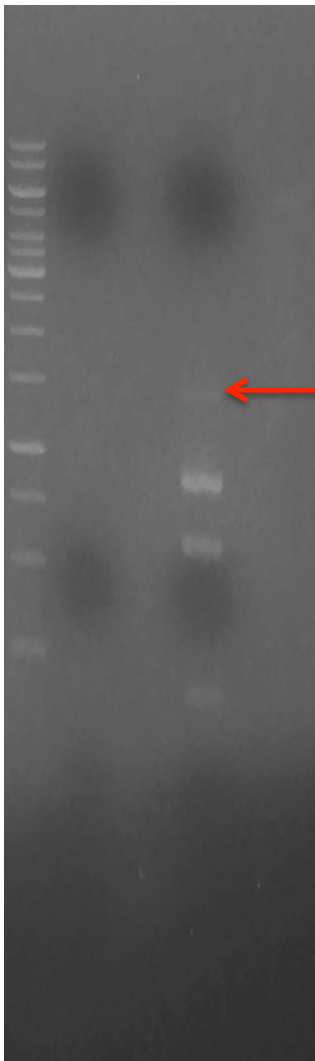
Εικόνα 4.3. Απομόνωση των επιθυμητών προϊόντων PCR1a και PCR1b από το πήκτωμα αγαρόζης.

Στη συνέχεια, απομονώθηκαν τα προϊόντα από το πήκτωμα (Εικόνα 4.3) και ακολούθησε η δεύτερη φάση PCR (PCR2), στην οποία χρησιμοποιήθηκαν ως εκκινητές οι A-PAN4 και S-MV10 και ως εκμαγεία τα τεμάχια DNA που προήλθαν από τις PCR1a και PCR1b (Εικόνα 4.4.).



Εικόνα 4.4. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR2) φάσης 2 (ο κύλινδρος παριστάνει το σημείο μετάλλαξης).

Το προϊόν DNA που προήλθε από την PCR2 είχε μέγεθος 1552bp και διαχωρίστηκε σε πήκτωμα αγαρόζης (Εικόνα 4.5).



← PCR2=1552bp



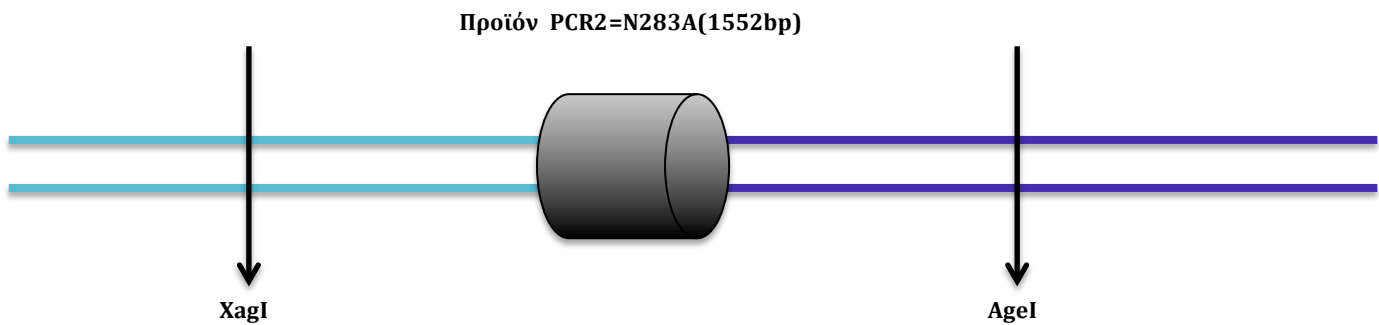
Εικόνα 4.5.

Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης του προϊόντος της PCR2. Το προϊόν της PCR2 (ή N283A) έχει μήκος 1552bp και στο μέσον του υπάρχει η μετάλλαξη. Παράλληλα ηλεκτροφορήθηκε και ο μάρτυρας (ladder 1kb, Invitrogen) που περιέχει τεμάχια DNA γνωστού μοριακού μεγέθους, έτσι ώστε να είναι δυνατός ο υπολογισμός των μοριακών μεγεθών των προϊόντων της PCR.

Εικόνα 4.6.

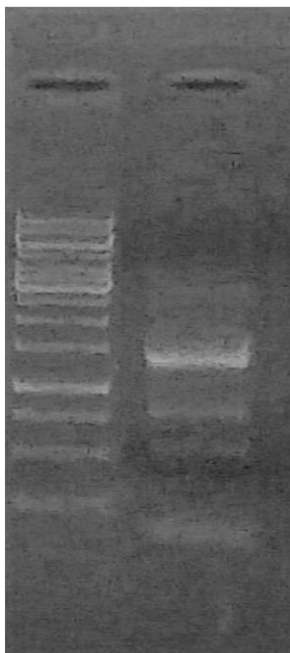
Απομόνωση των επιθυμητών προϊόντων της PCR2 από το πήκτωμα της αγαρόζης.

Στη συνέχεια το DNA που προήλθε από την PCR2 της δεύτερης φάσης (Εικόνα 4.5.) και απομονώθηκε από το πήκτωμα (Εικόνα 4.6.) υποβλήθηκε σε πέψη με τα ένζυμα περιορισμού XagI και AgeI (Εικόνα 4.7.).

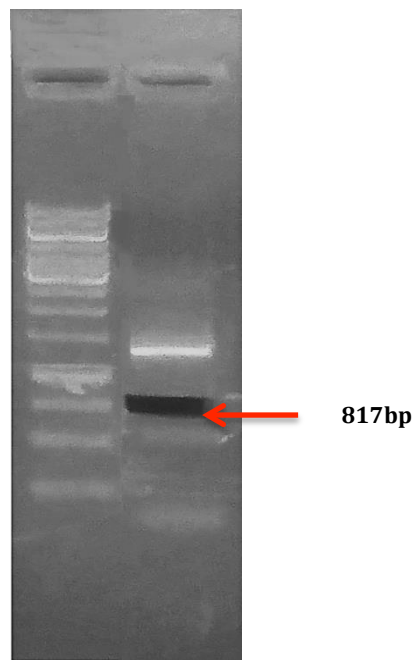


Εικόνα 4.7. Πέψη προϊόντος της PCR2(που περιέχει μετάλλαξη N233A) με τα ένζυμα XagI και AgeI

Από τη πέψη αυτή, λάβαμε τρία τεμάχια DNA με μεγέθη 550bp, 185bp και 817bp (Εικόνα 4.8.).Τα τεμάχια αυτά των DNA διαχωρίστηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης και εκείνο το οποίο αντιστοιχεί στο τμήμα του DNA του CRF₁R που φέρει τη N283A μετάλλαξη και βρίσκεται μεταξύ των θέσεων πέψης των δύο ενζύμων απομονώθηκε. Το τεμάχιο αυτό του DNA έχει μέγεθος 817bp (Εικόνα 4.9.).

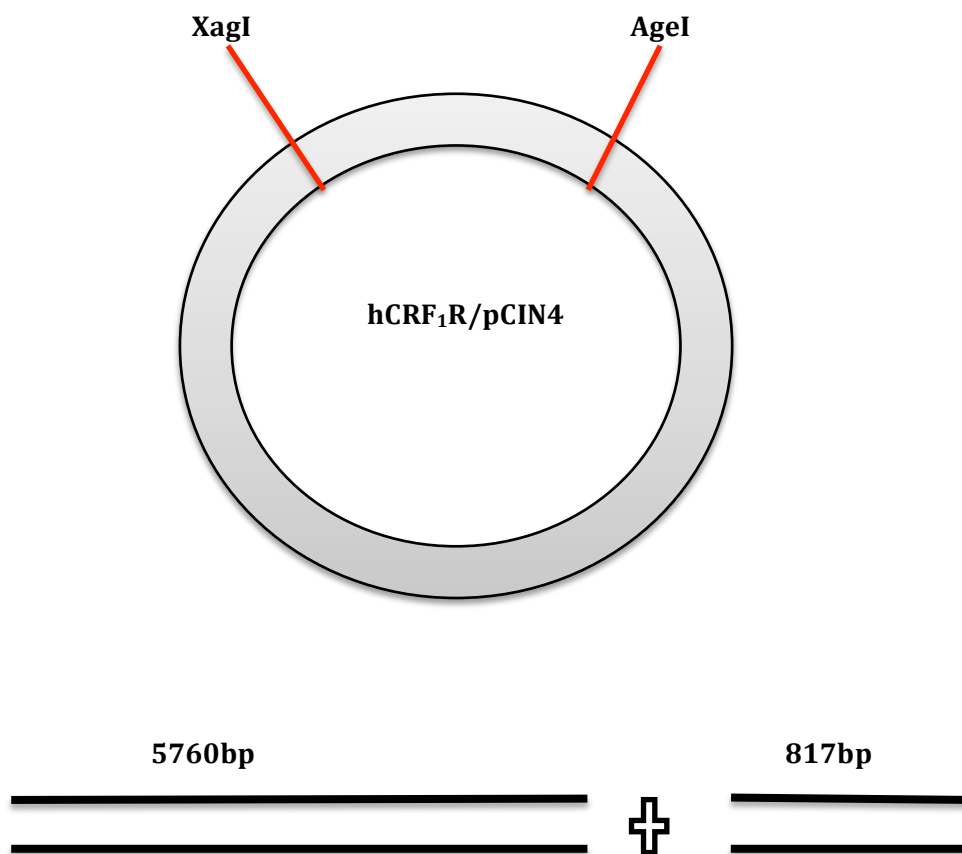


Εικόνα 4.8. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης του προϊόντος PCR2 μετά από πέψη του με τα ένζυμα περιορισμού AgeI και XagI. Στην εικόνα φαίνονται τα τεμάχια DNA που προήλθαν



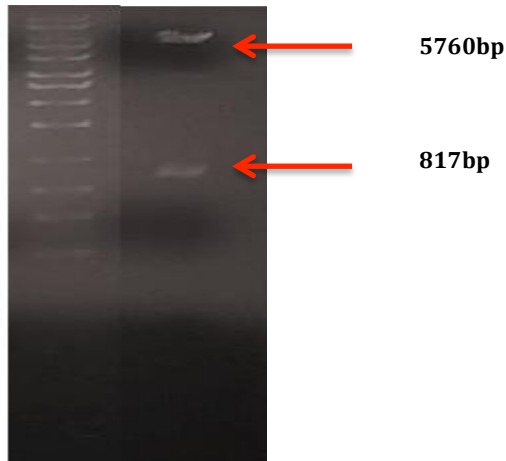
Εικόνα 4.9. Απομόνωση του προϊόντος της PCR2 που φέρει τη μετάλλαξη N283A (817 bp) μετά από πέψη με τα ένζυμα περιορισμού AgeI και XagI από το πήκτωμα αγαρόζης.

Παράλληλα έγινε πέψη του πλασμιδιακού DNA που κωδικοποιεί τον άγριο τύπο CRF₁R (hCRF₁R/pCIN4) με τα ένζυμα AgeI και XagI. Τα προϊόντα της πέψης είχαν μεγέθη 5760bp και 817bp (Εικόνες 4.10, 4.11.).

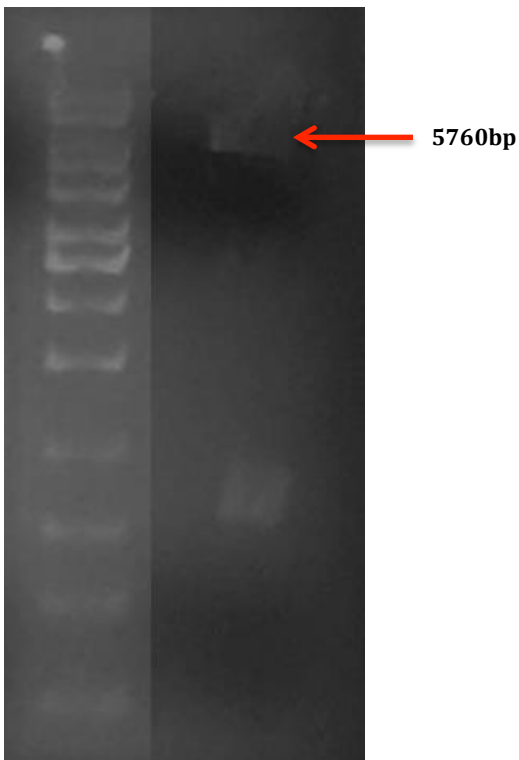


Εικόνα 4.10. Πέψη πλασμιδιακού DNA hCRF₁R/pCIN4 με τα ένζυμα XagI και AgeI.

Από τα προϊόντα της πέψης του πλασμιδιακού DNA που κωδικοποιεί τον άγριο τύπο CRF₁R απομονώθηκε εκείνο με μέγεθος των 5760bp (Εικόνα 4.12.).

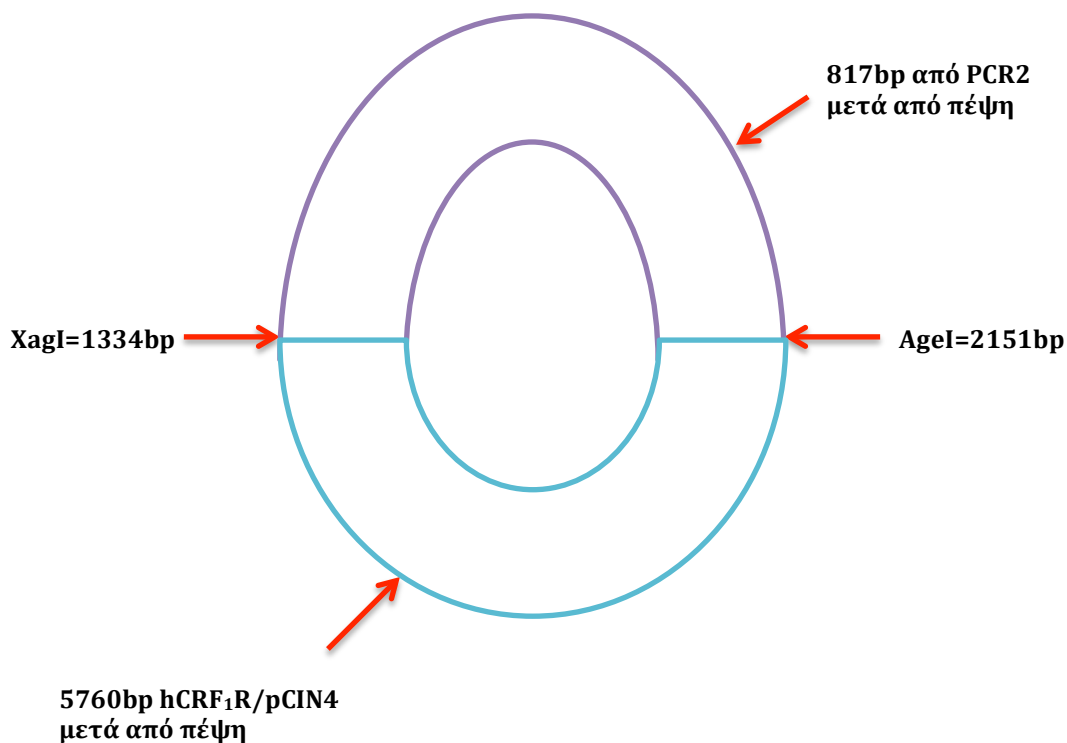


Εικόνα 4.11. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης του προϊόντος του $hCRF_1R$ / $pCIN4$. Στην εικόνα φαίνονται τα προϊόντα της πέψης του $hCRF_1R/pCIN4$ τα οποία έχουν μέγεθος 5760bp και 817bp. Παράλληλα, ηλεκτροφορήθηκε και ο μάρτυρας (Ladder) που περιέχει τεμάχια DNA γνωστού μοριακού μεγέθους, έτσι ώστε να είναι δυνατός ο υπολογισμός των μοριακών μεγεθών των προϊόντων της πέψης.



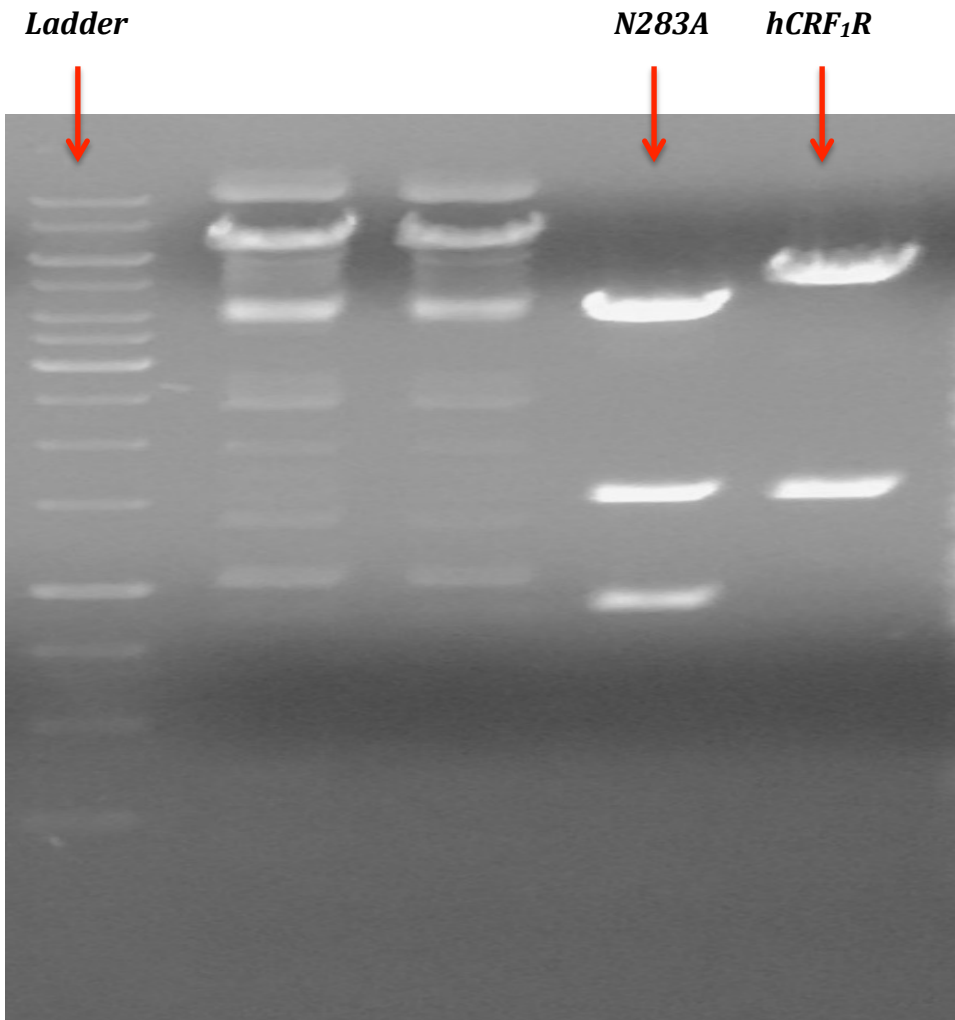
Εικόνα 4.12. Απομόνωση του επιθυμητού προϊόντος πέψης του $hCRF_1R/pCIN4$ από το πήκτωμα αγαρόζης.

Στη συνέχεια έγινε συρραφή των προϊόντων πέψης με τα ένζυμα AgeI και XagI του hCRF₁R/pCIN4 (5760bp) και του PCR2 (817bp) που φέρει την N283A μετάλλαξη (Εικόνα 4.13.). Το προϊόν της συρραφής τους ήταν το πλασμιδιακό DNA hCRF₁R-N283A/pCIN4, το οποίο εισάχθηκε σε βακτήρια, πολλαπλασιάστηκε και απομονώθηκε προς περαιτέρω χρήση.



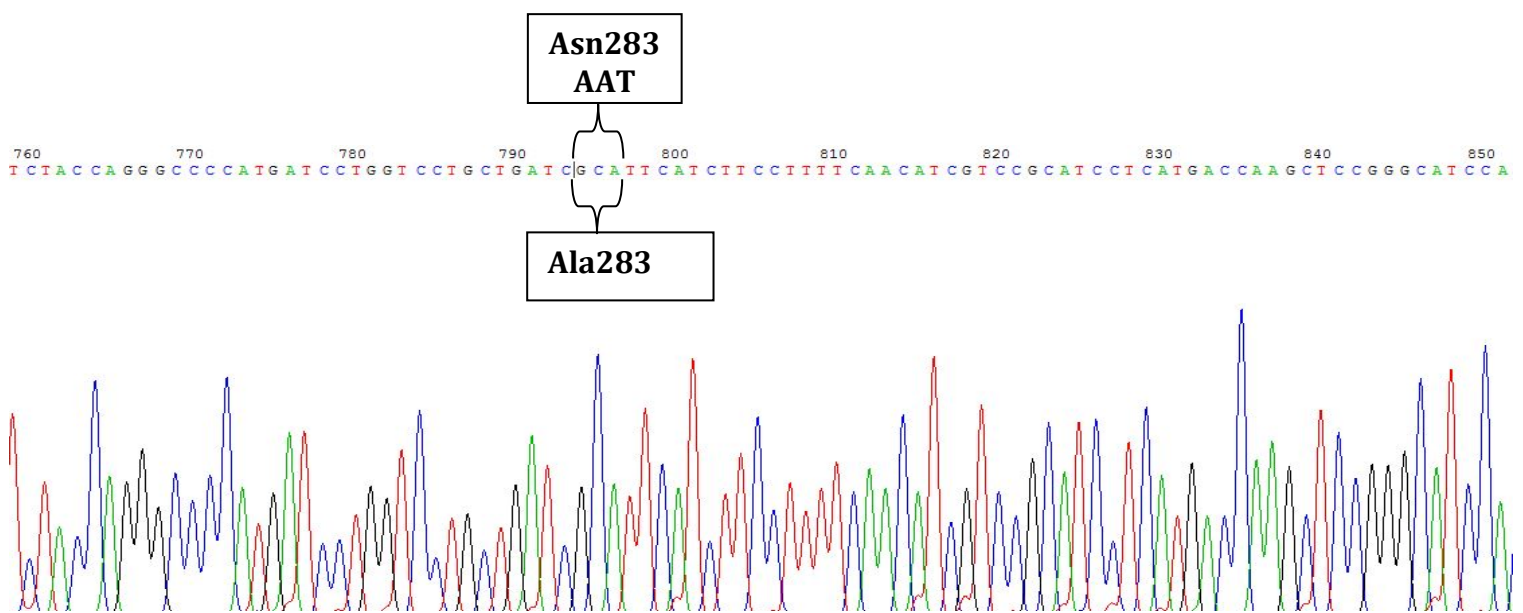
Εικόνα 4.13. Συρραφή των προϊόντων πέψης με τα ένζυμα AgeI και XagI του hCRF₁R/pCIN4 (5760bp) και του PCR2 (817bp).

Η εισαγωγή της N283A μετάλλαξης στον CRF₁R προσδιορίστηκε με τη χρήση του περιοριστικού ενζύμου BsmI. Συγκεκριμένα, το ένζυμο αυτό κόβει το CRF₁R/pCIN4 σε διάφορες θέσεις δημιουργώντας έτσι 3 διαφορετικά προϊόντα πέψης (39b0, 1525bp, 5013bp). Η μετάλλαξη N283A προσθέτει μια θέση πέψης του BsmI με αποτέλεσμα το προϊόν πέψης του DNA του CRF₁R με μέγεθος 5013bp να εξαφανίζεται μετά τη μετάλλαξη και να εμφανίζονται δύο νέα προϊόντα κοπής με μεγέθη 903bp και 4110bp, όπως φαίνεται στην εικόνα 4.14.



Εικόνα 4.14. Τμήματα των DNA του άγριου τύπου CRF_1R καθώς και του CRF_1R -N283A/pCIN4 (N283A) που προήλθαν από τη πέψη τους με το ένζυμο *BmsI*. Παράλληλα, ηλεκτροφορήθηκε και ο μάρτυρας (Ladder) που περιέχει τεμάχια DNA γνωστού μοριακού μεγέθους, έτσι ώστε να είναι δυνατός ο υπολογισμός των μοριακών μεγεθών των προϊόντων πέψης.

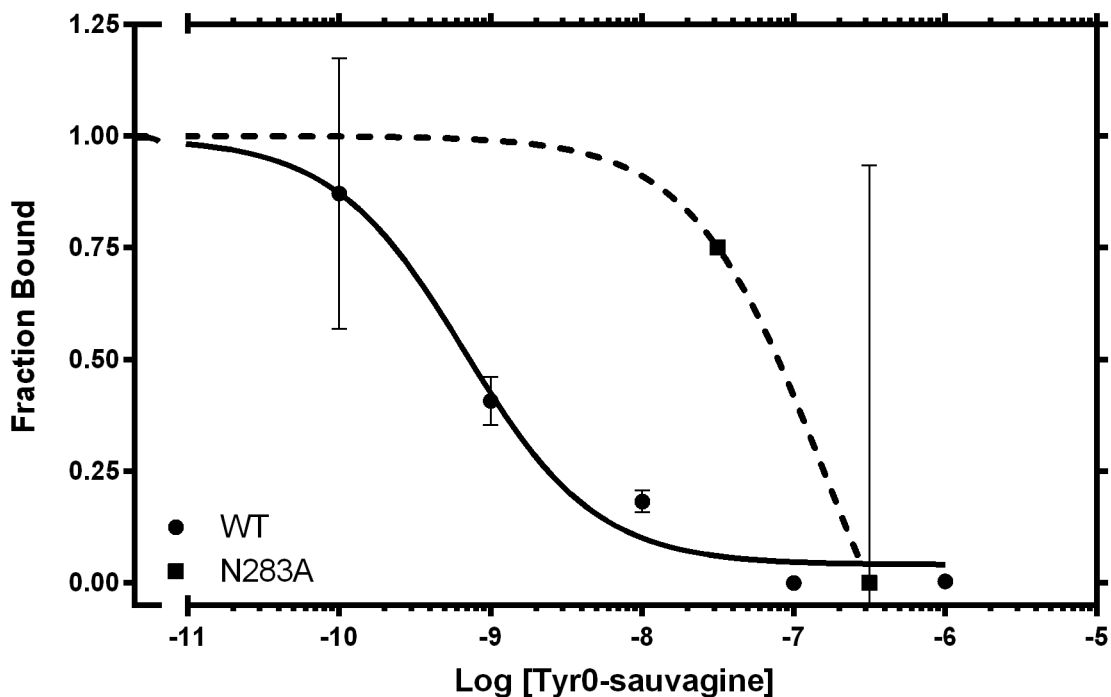
Περαιτέρω επιβεβαίωση της εισαγωγής της N283A μετάλλαξης στο πλασμιδιακό DNA που κωδικοποιεί τον CRF_1R έγινε με ανάγνωση της αλληλουχίας του DNA του. Στο χρωματογράφημα της εικόνας 4.15 φαίνεται η αλληλουχία των νουκλεοτιδίων του πλασμιδιακού DNA $hCRF_1R$ -N283A/pCIN4 που κωδικοποιούν το αμινοξύ Ala.



Εικόνα 4.15. Μετάλλαξη της Asn283 σε Ala. Στο χρωματογράφημα διακρίνεται η περιοχή των νουκλεοτιδίων μέσα στην οποία υπάρχει η αλληλουχία GCA που κωδικοποιεί την αλανίνη στη θέση 283 του hCRF₁R-N283A υποδοχέα. Τα νουκλεοτίδια αυτά αντικατέστησαν τα AAT που κωδικοποιούν το αμινοξύ Asn283 του CRF₁R.

4.2 Φαρμακολογικός χαρακτηρισμός του CRF₁R-N283A

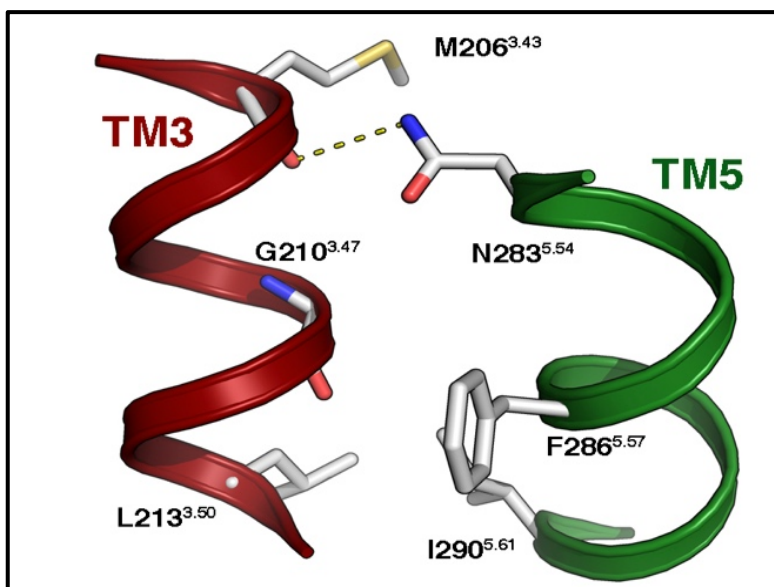
Ο φαρμακολογικός χαρακτηρισμός του μεταλλαγμένου υποδοχέα, CRF₁R-N283A, που προέκυψε από αντικατάσταση με Ala του αμινοξέος Asn283 της TM5 του CRF₁R, επιτεύχθηκε με προσδιορισμό της ικανότητας της Tyr⁰-σοβαγίνης να δεσμεύεται στον υποδοχέα πριν και μετά τη μετάλλαξη. Αυτό επιτεύχθηκε με τον προσδιορισμό της συγγένειας δέσμησης της Tyr⁰-σοβαγίνης για τον CRF₁R πριν (άγριος τύπος CRF₁R) και μετά την μετάλλαξη (CRF₁R-N283A). Ο προσδιορισμός της ικανότητας της σοβαγίνης να δεσμεύεται στους υποδοχείς επιτεύχθηκε με μελέτες συναγωνιστικής δέσμησης στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν μεμβρανικά ομογενοποιημένα από HEK 293 κύτταρα που εκφράζανε μόνιμα τους υποδοχείς αυτούς. Στις μελέτες αυτές χρησιμοποιήθηκαν πειραματικές συνθήκες οι οποίες μας επέτρεψαν να θεωρήσουμε ότι η συγγένεια (K_D) με την οποία η [¹²⁵I]-Tyr⁰-σοβαγίνη δεσμεύθηκε στους υποδοχείς είναι σχεδόν ίδια με την ικανότητα (IC₅₀) της Tyr⁰-σοβαγίνης να εκτοπίζει το ήμισυ της δεσμευμένης [¹²⁵I]-Tyr⁰-σοβαγίνης στους υποδοχείς αυτούς. Από τις μελέτες αυτές υπολογίστηκε ότι Tyr⁰-σοβαγίνη εκτόπισε τη δέσμηση της [¹²⁵I]-Tyr⁰-σοβαγίνης στον άγριο τύπο CRF₁R με δόσοεξαρτώμενο τρόπο με συγγένεια δέσμησης (IC₅₀) 0.7 nM (Εικόνα 4.16). Αντίθετα η δέσμηση της [¹²⁵I]-Tyr⁰-σοβαγίνης μειώθηκε πολύ μετά την N283A μετάλλαξη. Επιπρόσθετα η Tyr⁰-σοβαγίνη εκτόπισε τη δέσμηση της [¹²⁵I]-Tyr⁰-σοβαγίνης στον CRF₁R-N283A με πολύ μικρότερη συγγένεια δέσμησης (IC₅₀) 160 nM από ότι στον άγριο τύπο υποδοχέα (Εικόνα 4.16).



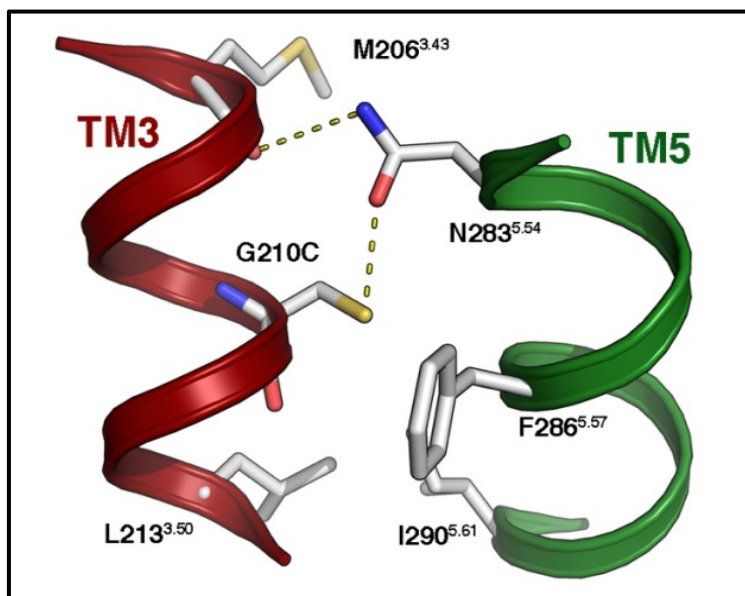
Εικόνα 4.16. Συναγωνιστική δέσμευση της Tyr⁰-σοβαγίνης στον CRF₁R πριν και μετά την N283A μετάλλαξη. Ο συναγωνισμός της δέσμευσης της [¹²⁵I]-Tyr⁰-σοβαγίνης από την Tyr⁰-σοβαγίνη, επιτεύχθηκε όπως αναφέρεται στο κεφάλαιο "Υλικά και Μέθοδοι", σε μεμβράνες από κύτταρα HEK 293 που εκφράζανε σταθερά τον άγριο τύπο CRF₁R (WT) ή τον μεταλλαγμένο υποδοχέα CRF1R-N283A (N283A). Οι μέσοι όροι των τιμών (εις διπλούν) και τα σταθερά λάθη τους προέρχονται από ένα πείραμα. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων του πειράματος έγινε μη γραμμικά και οι τιμές logIC₅₀ και IC₅₀ προσδιορίστηκαν όπως αναφέρεται στη μεθοδολογία και αναγράφονται στο κυρίως κείμενο.

5. Συζήτηση

Στη μελέτη αυτή μελετήσαμε το μοριακό μηχανισμό ενεργοποίησης του CRF₁R, προσδιορίζοντας αλλαγές στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ αμινοξέων των διαμεμβρανικών περιοχών (TMς) του υποδοχέα. Συγκεκριμένα, προσδιορίσαμε την επίπτωση της τροποποίησης της Asn283 της πέμπτης TM (TM5) του CRF₁R στην ενεργοποίηση του υποδοχέα. Πειραματικά ευρήματα και μοριακά μοντέλα του CRF₁R προηγούμενης μελέτης μας έδειξαν ότι υπάρχει ένα δίκτυο αλληλεπιδράσεων μεταξύ των αμινοξέων των διαμεμβρανικών περιοχών 3 και 5 (TM3 και TM5), το οποίο είναι παρόμοιο στους υποδοχείς της οικογένειας A των GPCRs, στην ανενεργή τους κατάσταση ⁽¹¹¹⁾. Στις αλληλεπιδράσεις αυτές συμπεριλαμβάνεται και ο δεσμός υδρογόνου μεταξύ της Asn283 της TM5 με το καρβονύλιο της Met206 της TM3. Ενίσχυση της αλληλεπίδρασης της TM3 με την TM5 δείξαμε ότι μπορεί να επιτευχθεί με την μετάλλαξη της Gly210 σε Cys. Η Gly210 βρίσκεται μια στροφή α-έλικας κάτω από τη Met206 (Εικόνα 5.1). Η σουλφιδρυλική ομάδα της Cys210 (μετά από μετάλλαξη της Gly210 σε Cys) σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με το οξυγόνο της πλευρικής αλυσίδας της Asn283, ενισχύοντας έτσι περισσότερο την αλληλεπίδραση των TM3 και TM5 και μη αφήνοντας αυτές να κινηθούν κατά την ενεργοποίηση του υποδοχέα (Εικόνα 5.2). Αυτό αντικατοπτρίζεται στην σημαντική ελάττωση της ικανότητας του CRF₁R να ενεργοποιείται⁽¹¹¹⁾. Παρόμοια βρέθηκε σε άλλους υποδοχείς ότι η ενδοεπιφάνεια TM3-TM5 παίζει σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση του υποδοχέα ⁽¹¹³⁻¹¹⁴⁾

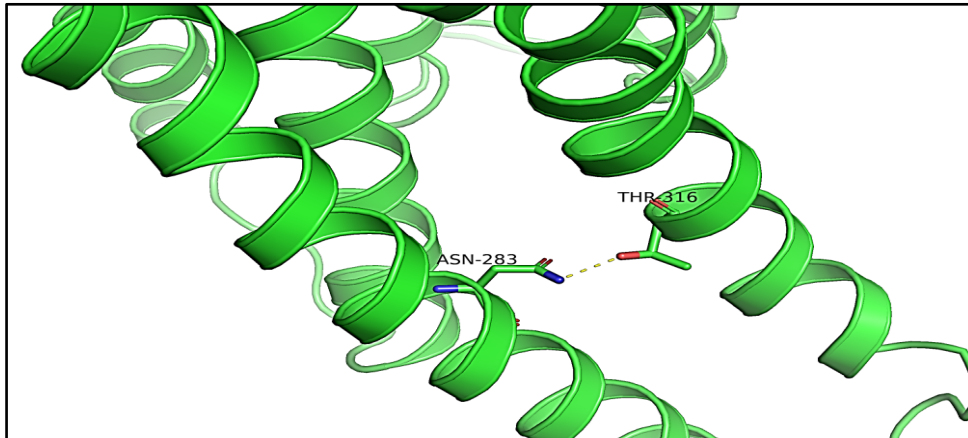


Εικόνα 5.1. Η μεθειονίνη στη θέση 206 (M206) της TM3 σχηματίζει έναν δεσμό υδρογόνου με τη ασπαραγίνη στη θέση 283 (N283) της TM5 στην ανενεργό κατάσταση του CRF₁R.

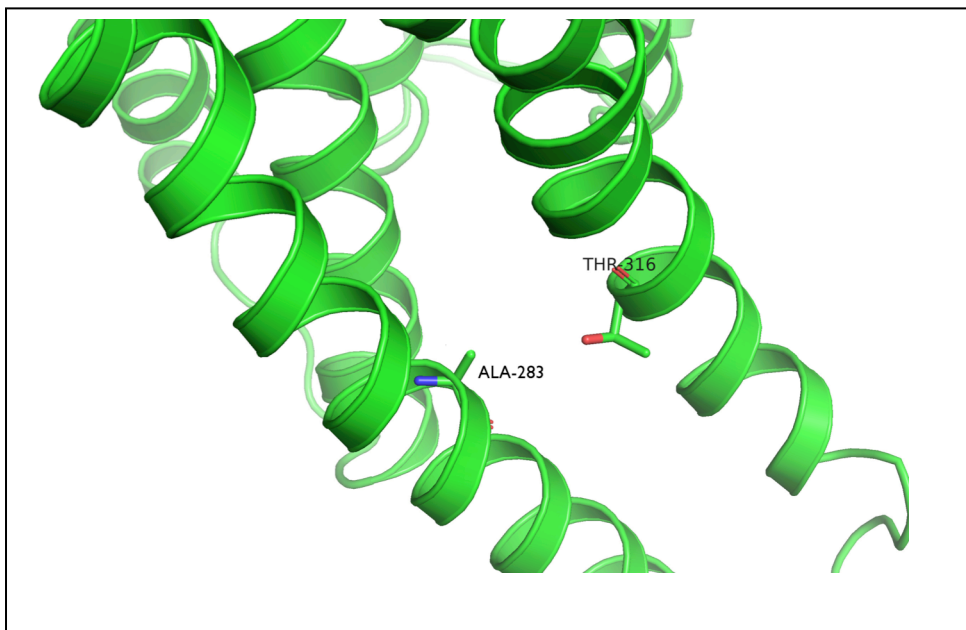


Εικόνα 5.2. Η πλευρική αλυσίδα της τεχνητής Cys που υποκατέστησε τη γλυκίνη στη θέση 210 της TM3 σχηματίζει έναν δεσμό υδρογόνου με τη Asn283 (N283) της TM5 η οποία ταυτόχρονα αλληλεπιδρά με την Met206 (M206).

Από τα παραπάνω θα περιμέναμε ότι αφαίρεση της πλευρικής αλυσίδας της Asn283 της TM5 μετά από αντικατάσταση της με Ala (N283A) θα επηρεάσει θετικά την ενεργοποίηση του CRF₁R, δηλαδή να αυξήσει την συγγένεια δέσμευσης του αγωνιστή (ανάλογο του CRF), σοβαγίνη. Οι πειραματικές συνθήκες στη παρούσα μελέτη ήταν τέτοιες ώστε η υψηλή συγγένεια δέσμευσης της σοβαγίνης οφείλεται κυρίως στη συγγένεια δέσμευσης της στην ενεργή κατάσταση του CRF₁R. Έτσι αλλαγές στη συγγένεια δέσμευσης της σοβαγίνης κυρίως οφείλονται σε αλλαγές στην ενεργοποίηση του υποδοχέα. Περιμένουμε ότι η N283A μετάλλαξη θα επηρεάσει θετικά την ενεργοποίηση του CRF₁R γιατί η Ala στη θέση 283 δεν μπορεί να σχηματίσει δεσμό υδρογόνου με την Met206. Αυτό θα είχε σαν αποτέλεσμα να ενεργοποιείται ευκολότερα ο υποδοχέας και έτσι η σοβαγίνη να δεσμεύεται στον υποδοχέα με μεγαλύτερη συγγένεια. Όμως διαπιστώσαμε ότι η μετάλλαξη της Asn283 σε Ala σχεδόν κατέργησε τη δέσμευση της σοβαγίνης. Η δραματική αυτή ελάττωση της ικανότητας του υποδοχέα να ενεργοποιείται θα μπορούσε να οφείλεται στο γεγονός ότι ο υποδοχέας δεν μπορεί να σταθεροποιηθεί εύκολα στην ενεργό του κατάσταση. Πράγματι, με βάση μοριακό μοντέλο του CRF₁R στην ενεργή του κατάσταση που κατασκευάσαμε με βάση την ενεργό κρυσταλλική δομή του β₂ αδρενεργικού υποδοχέα ⁽¹¹³⁾ παρατηρήσαμε ότι η Asn283 της TM5 σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με την Thr316 της TM6 ο οποίος σταθεροποιεί την ενεργό κατάσταση του υποδοχέα (Εικόνα 5.3). Αντικατάσταση της Asn283 από την Ala κατέργησε τον εν λόγω δεσμό (Εικόνα 5.4) με αποτέλεσμα να μην μπορεί εύκολα να σταθεροποιηθεί στην ενεργό του κατάσταση ο CRF₁R, γεγονός που αντικατοπτρίζεται στην κατέργηση της συγγένειας δέσμευσης του αγωνιστή σοβαγίνη στον εν λόγω υποδοχέα.



Εικόνα 5.3. Η πλευρική αλυσίδα της Asn283 της TM5 σχηματίζει έναν δεσμό υδρογόνου με τη Thr316 της TM6 στην ενεργή κατάσταση του CRF₁R. Ο δεσμός αυτός σταθεροποιεί την ενεργό κατάσταση του υποδοχέα.



Εικόνα 5.4. Η πλευρική αλυσίδα της Ala (Ala283) που υποκατέστησε την Asn283 της TM5 δεν μπορεί να σχηματίσει δεσμό υδρογόνου με τη Thr316 της TM6 στην ενεργή κατάσταση του CRF₁R, με αποτέλεσμα να ενεργοποιείται ο υποδοχέας σε πολύ μικρότερο βαθμό από εκείνον του άγριου τύπου.

Ο προσδιορισμός του μοριακού μηχανισμού ενεργοποίησης του CRF₁R, θα οδηγήσει στο σχεδιασμό νέων CRF₁R μικρομοριακών μη πεπτιδικών ανταγωνιστών που εμποδίζουν τον μηχανισμό αυτό. Οι ανταγωνιστές αυτοί μπορεί να χρησιμοποιηθούν

τόσο για τη διασαφήνιση του ρόλου του CRF₁R στη λειτουργία του ΚΝΣ και άλλων συστημάτων του οργανισμού, όσο και για την αντιμετώπιση παθολογικών καταστάσεων στις οποίες εμπλέκεται ο υποδοχέας αυτός, όπως άγχος και κατάθλιψη ⁽⁹⁴⁾.

6. Βιβλιογραφία

- 1.Vale W, Spiess J, Rivier C, Rivier J. Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. *Science*. 1981;213(4514):1394-7.
- 2.Chrousos GP. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation. *N Engl J Med*. 1995;332(20):1351-62.
- 3.Behan DP, Heinrichs SC, Troncoso JC, Liu XJ, Kawas CH, Ling N, et al. Displacement of corticotropin releasing factor from its binding protein as a possible treatment for Alzheimer's disease. *Nature*. 1995;378(6554):284-7.
- 4.De Souza EB. Corticotropin-releasing factor receptors: physiology, pharmacology, biochemistry and role in central nervous system and immune disorders. *Psychoneuroendocrinology*. 1995;20(8):789- 819.
- 5.De Souza EB, Whitehouse PJ, Kuhar MJ, Price DL, Vale WW. Reciprocal changes in corticotropin- releasing factor (CRF)-like immunoreactivity and CRF receptors in cerebral cortex of Alzheimer's disease. *Nature*. 1986;319(6054):593-5.
- 6.Gold PW, Chrousos GP. Organization of the stress system and its dysregulation in melancholic and atypical depression: high vs low CRH/NE states. *Mol Psychiatry*. 2002;7(3):254-75.
- 7.Owens MJ, Nemeroff CB. Physiology and pharmacology of corticotropin-releasing factor. *Pharmacol Rev*. 1991;43(4):425-73.
- 8.Zoumakis E, Margioris AN, Makrigiannakis A, Stournaras C, Gravanis A. Human endometrium as a neuroendocrine tissue: expression, regulation and biological roles of endometrial corticotropin- releasing hormone (CRH) and opioid peptides. *J Endocrinol Invest*. 1997;20(3):158-67.
- 9.Wang L, Martinez V, Rivier JE, Tache Y. Peripheral urocortin inhibits gastric emptying and food intake in mice: differential role of CRF receptor 2. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2001;281(5):R1401-10.
- 10.Venihaki M, Majzoub JA. Animal models of CRH deficiency. *Front Neuroendocrinol*. 1999;20(2):122-45.
- 11.Venihaki M, Dikkes P, Carrigan A, Karalis KP. Corticotropin-releasing hormone regulates IL-6 expression during inflammation. *J Clin Invest*. 2001;108(8):1159-66.
- 12.Parkes DG, Weisinger RS, May CN. Cardiovascular actions of CRH and urocortin: an update. *Peptides*. 2001;22(5):821-7.
- 13.Orth DN. Corticotropin-releasing hormone in humans. *Endocr Rev*. 1992;13(2):164-91.
- 14.Martinez V, Wang L, Rivier JE, Vale W, Tache Y. Differential actions of peripheral corticotropin- releasing factor (CRF), urocortin II, and urocortin III on gastric emptying and colonic transit in mice: role of CRF receptor subtypes 1 and 2. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2002;301(2):611-7.
15. Martinez V, Rivier J, Wang L, Tache Y. Central injection of a new corticotropin-releasing factor (CRF) antagonist, astressin, blocks CRF- and stress-related alterations of gastric and colonic motor function. *J Pharmacol Exp Ther*. 1997;280(2):754-60.
16. Makrigiannakis A, Zoumakis E, Kalantaridou S, Coutifaris C, Margioris AN, Coukos G, et al. Corticotropin-releasing hormone promotes blastocyst implantation and early maternal tolerance. *Nat Immunol*. 2001;2(11):1018-24.

17. Karalis K, Sano H, Redwine J, Listwak S, Wilder RL, Chrousos GP. Autocrine or paracrine inflammatory actions of corticotropin-releasing hormone in vivo. *Science*. 1991;254(5030):421-3.
18. Coste SC, Quintos RF, Stenzel-Poore MP. Corticotropin-releasing hormone-related peptides and receptors: emergent regulators of cardiovascular adaptations to stress. *Trends Cardiovasc Med*. 2002;12(4):176-82.
19. Coste SC, Kesterson RA, Heldwein KA, Stevens SL, Heard AD, Hollis JH, et al. Abnormal adaptations to stress and impaired cardiovascular function in mice lacking corticotropin-releasing hormone receptor-2. *Nat Genet*. 2000;24(4):403-9.
20. Chrousos GP, Torpy DJ, Gold PW. Interactions between the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and the female reproductive system: clinical implications. *Ann Intern Med*. 1998;129(3):229-40.
21. Chatzaki E, Charalampopoulos I, Leontidis C, Mouzas IA, Tzardi M, Tsatsanis C, et al. Urocortin in human gastric mucosa: relationship to inflammatory activity. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88(1):478-83.
22. Agelaki S, Tsatsanis C, Gravanis A, Margioris AN. Corticotropin-releasing hormone augments proinflammatory cytokine production from macrophages in vitro and in lipopolysaccharide-induced endotoxin shock in mice. *Infect Immun*. 2002;70(11):6068-74.
23. Chrousos GP. Stress and disorders of the stress system. *Nat Rev Endocrinol*. 2009;5(7):374-81.
24. Favrod-Coune CA, Gaillard RC, Langevin H, Jaquier MC, Dolci W, Muller AF. Anatomical localization of corticotropin-releasing activity in the human brain. *Life Sci*. 1986;39(25):2475-81.
25. Suda T, Tomori N, Tozawa F, Mouri T, Demura H, Shizume K. Distribution and characterization of immunoreactive corticotropin-releasing factor in human tissues. *J Clin Endocrinol Metab*. 1984;59(5):861-6.
26. Kelley M, Kowall N. Corticotropin-releasing factor immunoreactive neurons persist throughout the brain in Alzheimer's disease. *Brain Res*. 1989;501(2):392-6.
27. Van Pett K, Viau V, Bittencourt JC, Chan RK, Li HY, Arias C, et al. Distribution of mRNAs encoding CRF receptors in brain and pituitary of rat and mouse. *J Comp Neurol*. 2000;428(2):191-212.
28. Sasaki A, Sato S, Murakami O, Go M, Inoue M, Shimizu Y, et al. Immunoreactive corticotropin-releasing hormone present in human plasma may be derived from both hypothalamic and extrahypothalamic sources. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1987;65(1):176-82.
29. Sasaki A, Tempst P, Liotta AS, Margioris AN, Hood LE, Kent SB, et al. Isolation and characterization of a corticotropin-releasing hormone-like peptide from human placenta. *J Clin Endocrinol Metab*. 1988;67(4):768-73.
30. Makrigiannakis A, Zoumakis E, Margioris AN, Theodoropoulos P, Stournaras C, Gravanis A. The corticotropin-releasing hormone (CRH) in normal and tumoral epithelial cells of human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab*. 1995;80(1):185-9.
31. Kawahito Y, Sano H, Mukai S, Asai K, Kimura S, Yamamura Y, et al. Corticotropin releasing hormone in colonic mucosa in patients with ulcerative colitis. *Gut*. 1995;37(4):544-51.
32. Ekman R, Serenius B, Castro MG, Lowry PJ, Cederlund AS, Bergman O, et al. Biosynthesis of corticotropin-releasing hormone in human T-lymphocytes. *J Neuroimmunol*. 1993;44(1):7-13.

33. Stephanou A, Jessop DS, Knight RA, Lightman SL. Corticotrophin-releasing factor-like immunoreactivity and mRNA in human leukocytes. *Brain Behav Immun.* 1990;4(1):67-73.
34. Laatikainen T, Virtanen T, Raisanen I, Salminen K. Immunoreactive corticotropin-releasing factor and corticotropin during pregnancy, labor and puerperium. *Neuropeptides.* 1987;10(4):343-53.
35. Venihaki M, Gravanis A, Margioris AN. Comparative study between normal rat chromaffin and PC12 rat pheochromocytoma cells: production and effects of corticotropin-releasing hormone. *Endocrinology.* 1997;138(2):698-704.
36. Suda T, Tomori N, Tozawa F, Demura H, Shizume K, Mouri T, et al. Immunoreactive corticotropin and corticotropin-releasing factor in human hypothalamus, adrenal, lung cancer, and pheochromocytoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 1984;58(5):919-24.
37. Ciocca DR, Puy LA, Fasoli LC, Tello O, Aznar JC, Gago FE, et al. Corticotropin-releasing hormone, luteinizing hormone-releasing hormone, growth hormone-releasing hormone, and somatostatin-like immunoreactivities in biopsies from breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat.* 1990;15(3):175-84.
38. Nicholson WE, DeCherney GS, Jackson RV, Orth DN. Pituitary and hypothalamic hormones in normal and neoplastic adrenal medullae: biologically active corticotropin-releasing hormone and corticotropin. *Regul Pept.* 1987;18(3-4):173-88.
39. Raux Demay MC, Proeschel MF, de Keyzer Y, Bertagna X, Luton JP, Girard F. Characterization of human corticotrophin-releasing hormone and pro-opiomelanocortin-related peptides in a thymic carcinoid tumour responsible for Cushing's syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1988;29(6):649-57.
40. Lederis K, Letter A, McMaster D, Moore G, Schlesinger D. Complete amino acid sequence of urotensin I, a hypotensive and corticotropin-releasing neuropeptide from *Catostomus*. *Science.* 1982;218(4568):162-5.
41. Montecucchi PC, Henschen A. Amino acid composition and sequence analysis of sauvagine, a new active peptide from the skin of *Phyllomedusa sauvagei*. *Int J Pept Protein Res.* 1981;18(2):113-20.
42. Vaughan J, Donaldson C, Bittencourt J, Perrin MH, Lewis K, Sutton S, et al. Urocortin, a mammalian neuropeptide related to fish urotensin I and to corticotropin-releasing factor. *Nature.* 1995;378(6554):287-92.
43. Donaldson CJ, Sutton SW, Perrin MH, Corrigan AZ, Lewis KA, Rivier JE, et al. Cloning and characterization of human urocortin. *Endocrinology.* 1996;137(5):2167-70.
44. Lewis K, Li C, Perrin MH, Blount A, Kunitake K, Donaldson C, et al. Identification of urocortin III, an additional member of the corticotropin-releasing factor (CRF) family with high affinity for the CRF2 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(13):7570-5.
45. Reyes TM, Lewis K, Perrin MH, Kunitake KS, Vaughan J, Arias CA, et al. Urocortin II: a member of the corticotropin-releasing factor (CRF) neuropeptide family that is selectively bound by type 2 CRF receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(5):2843-8.
46. Venihaki M, Sakihara S, Subramanian S, Dikkes P, Weninger SC, Liapakis G, et al. Urocortin III, a brain neuropeptide of the corticotropin-releasing hormone family: modulation by stress and attenuation of some anxiety-like behaviours. *J Neuroendocrinol.* 2004;16(5):411-22.
47. Brown MR, Fisher LA, Spiess J, Rivier J, Rivier C, Vale W. Comparison of the biologic actions of corticotropin-releasing factor and sauvagine. *Regul Pept.* 1982;4(2):107-14.

48. Dautzenberg FM, Hauger RL. The CRF peptide family and their receptors: yet more partners discovered. *Trends Pharmacol Sci.* 2002;23(2):71-7.
49. Lederis K, Vale W, Rivier J, MacCannell KL, McMaster D, Kobayashi Y, et al. Urotensin I - a novel CRF-like peptide in *Catostomus commersoni* urophysis. *Proc West Pharmacol Soc.* 1982;25:223-7.
50. Rivier C, Rivier J, Lederis K, Vale W. In vitro and in vivo ACTH-releasing activity of ovine CRF, sauvagine and urotensin I. *Regul Pept.* 1983;5(2):139-43.
51. Zhao L, Donaldson CJ, Smith GW, Vale WW. The structures of the mouse and human urocortin genes (*Ucn* and *UCN*). *Genomics.* 1998;50(1):23-33.
52. Cepoi D, Sutton S, Arias C, Sawchenko P, Vale WW. Ovine genomic urocortin: cloning, pharmacologic characterization, and distribution of central mRNA. *Brain Res Mol Brain Res.* 1999;68(1-2):109-18.
53. Hsu SY, Hsueh AJ. Human stresscopin and stresscopin-related peptide are selective ligands for the type 2 corticotropin-releasing hormone receptor. *Nat Med.* 2001;7(5):605-11.
54. Boorse GC, Crespi EJ, Dautzenberg FM, Denver RJ. Urocortins of the South African clawed frog, *Xenopus laevis*: conservation of structure and function in tetrapod evolution. *Endocrinology.* 2005;146(11):4851-60.
55. Gulyas J, Rivier C, Perrin M, Koerber SC, Sutton S, Corrigan A, et al. Potent, structurally constrained agonists and competitive antagonists of corticotropin-releasing factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(23):10575-9.
56. Perrin MH, Vale WW. Corticotropin releasing factor receptors and their ligand family. *Ann N Y Acad Sci.* 1999;885:312-28.
57. Rivier J, Gulyas J, Kirby D, Low W, Perrin MH, Kunitake K, et al. Potent and long-acting corticotropin releasing factor (CRF) receptor 2 selective peptide competitive antagonists. *J Med Chem.* 2002;45(21):4737-47.
58. Ruhmann A, Bonk I, Lin CR, Rosenfeld MG, Spiess J. Structural requirements for peptidic antagonists of the corticotropin-releasing factor receptor (CRFR): development of CRFR2beta-selective antisauvagine-30. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(26):15264-9.
59. Tezval H, Jahn O, Todorovic C, Sasse A, Eckart K, Spiess J. Cortagine, a specific agonist of corticotropin-releasing factor receptor subtype 1, is anxiogenic and antidepressive in the mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(25):9468-73.
60. Fahmy H, Spyridaki K, Kuppast B, Liapakis G. The "homeostasis hormone" and its CRF(1) receptor. From structure to function. *Hormones (Athens, Greece).* 2012;11(3):254-71.
61. Pallai PV, Mabilia M, Goodman M, Vale W, Rivier J. Structural homology of corticotropin-releasing factor, sauvagine, and urotensin I: circular dichroism and prediction studies. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1983;80(22):6770-4.
62. Rivier J, Rivier C, Vale W. Synthetic competitive antagonists of corticotropin-releasing factor: effect on ACTH secretion in the rat. *Science.* 1984;224(4651):889-91.
63. Beyermann M, Rothmund S, Heinrich N, Fechner K, Furkert J, Dathe M, et al. A role for a helical connector between two receptor binding sites of a long-chain peptide hormone. *J Biol Chem.* 2000;275(8):5702-9.
64. Kornreich WD, Galyean R, Hernandez JF, Craig AG, Donaldson CJ, Yamamoto G, et al. Alanine series of ovine corticotropin releasing factor (oCRF): a structure-activity relationship study. *J Med Chem.* 1992;35(10):1870-6.

65. Plotsky PM, Vale W. Hemorrhage-induced secretion of corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity into the rat hypophysial portal circulation and its inhibition by glucocorticoids. *Endocrinology*. 1984;114(1):164-9.
66. Smith AI, Funder JW. Proopiomelanocortin processing in the pituitary, central nervous system, and peripheral tissues. *Endocrine reviews*. 1988;9(1):159-79.
67. Chrousos GP, Gold PW. The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis. *Jama*. 1992;267(9):1244-52.
68. Stenzel-Poore MP, Heinrichs SC, Rivest S, Koob GF, Vale WW. Overproduction of corticotropin-releasing factor in transgenic mice: a genetic model of anxiogenic behavior. *J Neurosci*. 1994;14(5 Pt 1):2579-84.
69. Arborelius L, Owens MJ, Plotsky PM, Nemeroff CB. The role of corticotropin-releasing factor in depression and anxiety disorders. *J Endocrinol*. 1999;160(1):1-12.
70. Kehne JH. The CRF1 receptor, a novel target for the treatment of depression, anxiety, and stress-related disorders. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2007;6(3):163-82.
71. Marcus SM, Young EA, Kerber KB, Kornstein S, Farabaugh AH, Mitchell J, et al. Gender differences in depression: findings from the STAR*D study. *Journal of affective disorders*. 2005;87(2-3):141-50.
72. Smith MA, Kling MA, Whitfield HJ, Brandt HA, Demitrack MA, Geraciotti TD, et al. Corticotropin-releasing hormone: from endocrinology to psychobiology. *Horm Res*. 1989;31(1-2):66-71.
73. Valentino RJ, Van Bockstaele E. Convergent regulation of locus coeruleus activity as an adaptive response to stress. *European journal of pharmacology*. 2008;583(2-3):194-203.
74. Curtis AL, Bethea T, Valentino RJ. Sexually dimorphic responses of the brain norepinephrine system to stress and corticotropin-releasing factor. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*. 2006;31(3):544-54.
75. Webster EL, Torpy DJ, Elenkov IJ, Chrousos GP. Corticotropin-releasing hormone and inflammation. *Ann N Y Acad Sci*. 1998;840:21-32.
76. Theoharides TC, Singh LK, Boucher W, Pang X, Letourneau R, Webster E, et al. Corticotropin-releasing hormone induces skin mast cell degranulation and increased vascular permeability, a possible explanation for its proinflammatory effects. *Endocrinology*. 1998;139(1):403-13.
77. Theoharides TC, Spanos C, Pang X, Alferes L, Ligris K, Letourneau R, et al. Stress-induced intracranial mast cell degranulation: a corticotropin-releasing hormone-mediated effect. *Endocrinology*. 1995;136(12):5745-50.
78. Perrin MH, Haas Y, Rivier JE, Vale WW. Corticotropin-releasing factor binding to the anterior pituitary receptor is modulated by divalent cations and guanyl nucleotides. *Endocrinology*. 1986;118(3):1171-9.
79. Grammatopoulos DK, Chrousos GP. Functional characteristics of CRH receptors and potential clinical applications of CRH-receptor antagonists. *Trends Endocrinol Metab*. 2002;13(10):436-44.
80. Lovenberg TW, Liaw CW, Grigoriadis DE, Clevenger W, Chalmers DT, De Souza EB, et al. Cloning and characterization of a functionally distinct corticotropin-releasing factor receptor subtype from rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(3):836-40.
81. Eckart K, Jahn O, Radulovic J, Radulovic M, Blank T, Stiedl O, et al. Pharmacology and biology of corticotropin-releasing factor (CRF) receptors. *Receptors Channels*. 2002;8(3-4):163-77.

- 82.** Polymeropoulos MH, Torres R, Yanovski JA, Chandrasekharappa SC, Ledbetter DH. The human corticotropin-releasing factor receptor (CRHR) gene maps to chromosome 17q12-q22. *Genomics*. 1995;28(1):123-4.
- 83.** Chen R, Lewis KA, Perrin MH, Vale WW. Expression cloning of a human corticotropin-releasing-factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(19):8967-71.
- 84.** Sakai K, Yamada M, Horiba N, Wakui M, Demura H, Suda T. The genomic organization of the human corticotropin-releasing factor type-1 receptor. *Gene*. 1998;219(1-2):125-30.
- 85.** Parham KL, Zervou S, Karteris E, Catalano RD, Old RW, Hillhouse EW. Promoter analysis of human corticotropin-releasing factor (CRF) type 1 receptor and regulation by CRF and urocortin. *Endocrinology*. 2004;145(8):3971-83.
- 86.** Laburthe M, Couvineau A, Gaudin P, Maoret JJ, Rouyer-Fessard C, Nicole P. Receptors for VIP, PACAP, secretin, GRF, glucagon, GLP-1, and other members of their new family of G protein-linked receptors: structure-function relationship with special reference to the human VIP-1 receptor. *Ann N Y Acad Sci*. 1996;805:94-109; discussion 10-1.
- 87.** Harmor AJ. Family-B G-protein-coupled receptors. *Genome Biol*. 2001;2(12):REVIEWS3013.
- 88.** Gether U. Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. *Endocr Rev*. 2000;21(1):90-113.
- 89.** Pioszak AA, Parker NR, Suino-Powell K, Xu HE. Molecular recognition of corticotropin-releasing factor by its G-protein-coupled receptor CRFR1. *J Biol Chem*. 2008;283(47):32900-12.
- 90.** Reul JM, Holsboer F. Corticotropin-releasing factor receptors 1 and 2 in anxiety and depression. *Current opinion in pharmacology*. 2002;2(1):23-33.
- 91.** Hillhouse EW, Grammatopoulos D, Milton NG, Quartero HW. The identification of a human myometrial corticotropin-releasing hormone receptor that increases in affinity during pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab*. 1993;76(3):736-41.
- 92.** Grigoriadis DE, Lovenberg TW, Chalmers DT, Liaw C, De Souza EB. Characterization of corticotropin-releasing factor receptor subtypes. *Ann N Y Acad Sci*. 1996;780:60-80.
- 93.** Martinez V, Wang L, Rivier JE, Vale W, Tache Y. Differential actions of peripheral corticotropin-releasing factor (CRF), urocortin II, and urocortin III on gastric emptying and colonic transit in mice: role of CRF receptor subtypes 1 and 2. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002;301(2):611-7.
- 94.** Liapakis G, Venihaki M, Margioris A, Grigoriadis D, Gkountelias K. Members of CRF family and their receptors: from past to future. *Current medicinal chemistry*. 2011;18(17):2583-600.
- 95.** Assil-Kishawi I, Samra TA, Mierke DF, Abou-Samra AB. Residue 17 of sauvagine cross-links to the first transmembrane domain of corticotropin-releasing factor receptor 1 (CRFR1). *J Biol Chem*. 2008;283(51):35644-51.
- 96.** Liaw CW, Grigoriadis DE, Lorang MT, De Souza EB, Maki RA. Localization of agonist- and antagonist-binding domains of human corticotropin-releasing factor receptors. *Mol Endocrinol*. 1997;11(13):2048-53.
- 97.** Gkountelias K, Papadokostaki M, Javitch JA, Liapakis G. Exploring the binding site crevice of a family B G protein-coupled receptor, the type 1 corticotropin releasing factor receptor. *Mol Pharmacol*. 2010;78(4):785-93.
- 98.** Pisarchik A, Slominski A. Corticotropin releasing factor receptor type 1: molecular cloning and investigation of alternative splicing in the hamster skin. *J Invest Dermatol*. 2002;118(6):1065-72.

- 99.** Liaw CW, Lovenberg TW, Barry G, Oltersdorf T, Grigoriadis DE, de Souza EB. Cloning and characterization of the human corticotropin-releasing factor-2 receptor complementary deoxyribonucleic acid. *Endocrinology*. 1996;137(1):72-7.
- 100.** Berg JM TJ, Stryer L. *Biochemistry*. 2012 7th edition Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης.
- 101.** Hillhouse EW, Grammatopoulos DK. The molecular mechanisms underlying the regulation of the biological activity of corticotropin-releasing hormone receptors: implications for physiology and pathophysiology. *Endocr Rev*. 2006;27(3):260-86.
- 102.** Assil IQ, Abou-Samra AB. N-glycosylation of CRF receptor type 1 is important for its ligand-specific interaction. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2001;281(5):E1015-21.
- 103.** Hoare SR. Mechanisms of peptide and nonpeptide ligand binding to Class B G-protein-coupled receptors. *Drug discovery today*. 2005;10(6):417-27.
- 104.** Grace CR, Perrin MH, Gulyas J, Rivier JE, Vale WW, Riek R. NMR structure of the first extracellular domain of corticotropin-releasing factor receptor 1 (ECD1-CRF-R1) complexed with a high affinity agonist. *J Biol Chem*. 2010;285(49):38580-9.
- 105.** Perrin MH, Grace CR, Riek R, Vale WW. The three-dimensional structure of the N-terminal domain of corticotropin-releasing factor receptors: sushi domains and the B1 family of G protein-coupled receptors. *Ann N Y Acad Sci*. 2006;1070:105-19.
- 106.** Grace CR, Perrin MH, Gulyas J, DiGrucchio MR, Cantle JP, Rivier JE, et al. Structure of the N-terminal domain of a type B1 G protein-coupled receptor in complex with a peptide ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(12):4858-63.
- 107.** Grace CR, Perrin MH, DiGrucchio MR, Miller CL, Rivier JE, Vale WW, et al. NMR structure and peptide hormone binding site of the first extracellular domain of a type B1 G protein-coupled receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(35):12836-41.
- 108.** Pal K, Swaminathan K, Xu HE, Pioszak AA. Structural basis for hormone recognition by the Human CRFR2{alpha} G protein-coupled receptor. *J Biol Chem*. 2010;285(51):40351-61.
- 109.** Perrin MH, DiGrucchio MR, Koerber SC, Rivier JE, Kunitake KS, Bain DL, et al. A soluble form of the first extracellular domain of mouse type 2beta corticotropin-releasing factor receptor reveals differential ligand specificity. *J Biol Chem*. 2003;278(18):15595-600.
- 110.** Hollenstein K, Kean J, Bortolato A, Cheng RK, Dore AS, Jazayeri A, et al. Structure of class B GPCR corticotropin-releasing factor receptor 1. *Nature*. 2013;499(7459):438-43.
- 111.** Spyridaki K, Matsoukas MT, Cordomi A, Gkountelias K, Papadokostaki M, Mavromoustakos T, et al. Structural-functional analysis of the third transmembrane domain of the corticotropin-releasing factor type 1 receptor: role in activation and allosteric antagonism. *The Journal of biological chemistry*. 2014;289(27):18966-77.
- 112.** Siu, F. Y., M. He, et al. "Structure of the human glucagon class B G-protein-coupled receptor." 2013 *Nature* 499(7459): 444-449.
- 113.** Rasmussen, S., G., et al, Structure of a nanobody-stabilized active state of the β 2 adrenoceptor. *Nature*, 2011. 469: p. 175-180.
- 114.** Sansuk, K., et al, A structural insight into the reorientation of transmembrane domains 3 and 5 during family A G protein coupled receptor activation. *Mol. Pharmacol.*, 2011. 79: p. 262-269.
- 115.** Yi-Lynn Liang1*, et al. Phase-plate cryo-EM structure of a biased agonistbound human GLP-1 receptor-Gs complex, *Nature*. 2018 Mar 1;555(7694):121-125.