ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΒΑΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΔΟΜΗΣ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΤΟΥ ΤΥΠΟΥ 1 ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΤΟΥ ΕΚΛΥΤΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΤΗΣ ΚΟΡΤΙΚΟΤΡΟΠΙΝΗΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΓΚΟΥΝΤΕΛΙΑΣ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2009

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Ιατρικό Τμήμα της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Κρήτης δε σημαίνει και αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα.

(Ν. 5343/1932, άρθρο 202)

Ευχαριστίες

Η ολοκλήρωση της διδακτορικής μου διατριβής μου δίνει την ιδιαίτερη τιμή να ευχαριστήσω όλους αυτούς που συνέβαλαν στην ολοκλήρωσή της.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή Φαρμακολογίας και επιβλέποντα μου Λιαπάκη Γεώργιο, για την αμέριστη ηθική, πνευματική και οικονομική βοήθεια που μου προσέφερε σε όλη τη διάρκεια της πορείας μου. Η συμβολή του ήταν υπέρ του δέοντος καθοριστική και η παρουσία του καταλυτική.

Επίσης είναι μεγάλη μου τιμή να έχω στην επταμελή μου επιτροπή τον Καθηγητή Γραβάνη Αχιλλέα, τον Αναπληρωτή Καθηγητή Καρδάση Δημήτρη, την Καθηγήτρια Θερμού Κυριακή, τον Καθηγητή Μαργιωρή, τον Επίκουρο Καθηγητή Τσατσάνη Χρήστο και τον Επίκουρο Καθηγητή Τσέλιο Θεόδωρο.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους βρέθηκαν στο δρόμο μου όλα αυτά τα χρόνια και φυσικά τους ανθρώπους που με έφεραν στην Κρήτη, τον ανηψιό μου Γκούρβα Βίκτωρα και το Δέρδα Σταύρο

Βενυχάκη Μαρία, Κοκολογιαννάκη Γιώργο, Κολτσάκη Ιωάννα, Δαλδογιάννη Φανή, Κιαγιαδάκη Φωτεινή, Μαστροδήμου Νίκη, Ψηφογεώργου Κάσση, Καραγιάννη Έφη, Λαζαρίδη Ιάκωβο, Μηνά Βασίλη, Χαραλαμπόπουλο Ιωάννη, Παπαδοπούλου Ναταλία, Κωνσταντινίδη Γιώργο, Παπαδημητρίου Έλσα, Μηλιαρά Σοφία, Μπορομπόκα Νικόλα, Βουγιουκαλάκη Μαρία, Κανέλη Δημήτρη, Αλφαρά-Μελαίνη Κωνσταντίνο, Ξανθάκη Άννα, Αντώνου Μαριάννα, Γεωργιαννάκη Αποστόλη, Σταγουράκη Αργύρη, Κόγια Χριστίνα, Καμηλέρη Ειρήνη, Δάλπα Πέπη, Νεοφύτου Ειρήνη, Λένα Λατσούδη, Βολουδάκη Γιώργο, Νοδαράκη Γιάννη, Βαλαχή Αντώνη, Καμπουράκη Μάνο, Σπανέα Πέτρο, Μπουκουβαλέα Γιάννη, Γκούρβα Γρηγόρη, Φιλιππάκη Χάρη, Παπάζογλου Γρηγόρη, Θεοδώρου Ειρήνη, Βαϊλάκη Ισμήνη, Απάζογλου Κάλλια, Καναβούρα Κωστή, Αδαμούδη Λάζαρο, Κολιόπουλο Αλέξανδρο, Καρανάσιου Βέτα, Βερυκούκη Κωνσταντίνο, Λίδα Ζούπη, Σαββάκη Μαρία, Ιωάννου Μαριάννα, Βιδάκη Μαρίνα, Καραβελάκη Μιχάλη, Σουλιτζή Νίκο, Κυριαζή Οδυσσέα, Νομικό Παναγιώτη, Δάλπα Παναγιώτη, Βαλσαμίδη Κωνσταντίνο, Καμβίσιου Ματίνα, Παπαχατζάκη Μαρία-Μάρθα, Τσόκα Παυλίνα, Νιφλή Φοίβη, Βάσω Πελεκάνου, Αφροδίτη Τούρκα, Αλεξάκη Ισμήνη, Καμπά Μαριλένα, Βάσσου Δέσποινα, Σκουλά Ρένα, Μπαλή Βασίλη, Βρούζο Στέλιο, Ζαγανά Γιάννη, Μπιμπισίδη Ζήση, Βαϊλάκη Γιάννη, Βρούζο Σωτήρη, Γκουντέλια Γρηγόρη, Σταμούλη Μάκη, Κουϊκόγλου Αθηνά, Τζιμουράκα Αλέξανδρο, Αντωνιάδη Γιάννη, Ανδρουλιδάκη Αριάδνη, Τζέμο Αχιλλέα, Καρούλη Κώστα, Κούκουλη Βαγγέλη, Κούκουλη Εβελίνα, Καραδήμο Γιάννη, Αριανόγλου Γιοβάννα, Πλιότα Πηνελόπη, Βαϊλάκη Γιώργο, Μπερτσιά Γιώργο, Βλαχάκη Ρένα, Ελίνα Βαλούρδου, Τζωρτζάτο Ηλία, Παπαπαναγιώτου Σοφία, Παπαδάκη Θέκλα, Βαϊλάκη Ιωάννα, Δεμιρτζόγλου Κυριάκο, Βαρδούλη Λίνα, Δελιδάκη Μαρία, Παπαδάκη Μάριο, Ρασούλη Όλγα, Βαμβακίδου Σοφία, Βαρβάρα Βέργου, Μητρούλα Χρήστο, Ζαραγούλια Ανδρέα, Φλουρή Σοφία,

Δερμιτζάκη Μαριέττα, Μουντάκη Μαρία, Τζωράκη-Χατζάκη Αικατερίνη, Κονιδάκη Γιώργο, Βλαχάκη Ρένα, Δελιδάκη Ιωάννη, Παναγιώτη Ευθυμίου, Σπυριδάκη Δέσποινα, Τσαγκαράκη Μαρία, Εφεντάκη Νίκη, Παπαδάκη Χαρούλα, Γκουντέλια Ιωάννη, Σερκελή Μαρία, Γκουντέλια Μερόπη

Και ένα μεγάλο ευχαριστώ για την κα. Παπαδοκωστάκη Μαίρη

Γηράσκων δ’ αιεί πολλά διδασκόμενος

Σόλων

στους δασκάλους μου

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

ACTH	Adrenocorticotropin Hormone (Αδρενοκορτικοτρόπος ορμόνη)
Akt/PKB	Protein kinase B (Πρωτεϊνική κινάση Β)
AMP	Adenosine monophosphate (Μονοφωσφορική αδενοσίνη)
ANOVA	Analysis of variance (Ανάλυση διασποράς)
BSA	Bovine serum albumin (Αλβουμίνη ορού βοός)
BCS	Bovine Calf Serum) (Ορός εμβρύου βοός)
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate (Κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη)
CCP	Complement Control Protein
cDNA	copy DNA (Αντίγραφο DNA)
CRH/CRF	Corticotropin Releasing Hormone/Corticotropin Releasing Factor (Εκλυτική ορμόνη της κορτικοτροπίνης)
CRH-R	Corticotropin Releasing Hormone Receptor (Υποδοχέας της εκλυτικής ορμόνης της κορτικοτροπίνης)
cpm	Counts per minute (Κρούσεις ανά λεπτό)
DAG	Diacylglycerol (Διακυλγλυκερόλη)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium (Θρεπτικό Υλικό)
DMSO	Deimethyl sulfoxide (Διμεθυλσουλφοξύδιο)
DNA	Deoxyribonucleic acid (Δε(σ)οξυριβο(ζο)νουκλεϊ(νι)κό οξύ)
dNTP	Deoxyribonucleoside triphosphate (Δεοξυνουκλεοτίδια)
EC_{50}	Efficiency Concentration (Συγκέντρωση δραστικότητας του 50%)
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid (Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ)
EGTA	Ethylene glycol-bis(beta-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (Αιθυλενο γλυκολ- δις (β αμινοαιθυλαιθέρας)-N,N, N',N' τετραοξικό οξύ)
ENY	Εγκεφαλονωτιαίο υγρό
ERK	Extracellular signal regulated kinase (Πρωτεϊνική κινάση που ελέγχεται από εξωκυττάριο σήμα)
EtBr	Ethidium bromide (Βρωμιούχο αιθίδιο)
FITC	Fluorescein isothiocyanate (Ισοθειοκυανική φθορισεΐνη)
GABA	Gamma-amino-boutyric-acid (γ-αμινοβουτυρικό οξύ)
GDP	Guanosine diphosphate (Διφωσφορική γουανοσίνη)
GHRF	Growth hormone-releasing factor (Εκλυτική ορμόνη της αυξητικής ορμόνης)
GLP1	Glycagon like peptide 1 (Γλυκαγονοειδές πεπτίδιο 1)
GPCRs	G – protein coupled receptors (Υποδοχείς που συζεύγνυνται με τις G-πρωτεΐνες)
GTP	Guanosine-5'-triphosphate (Τριφωσφορική γουανοσίνη)
GTPγS	guanosine 5'-O-[gamma-thio]triphosphate (Υπομονάδα γ της διεγερτικής τριφωσφορικής γουανοσίνης)
HEK293	Human Embryonic Kidney 293 cells
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid (N-2-υδροξυεθυλπιπεραζίνη Ν-2 αιθανοσουλφονικό οξύ)

HPA	Hypothalamic-pituitary-adrenal axis (Υποθαλαμο-υποφυσο-επινεφριδιακός άξονας)
IC_{50}	Inhibitory Concentration (Μέση κατασταλτική συγκέντρωση)
IgG	Immunoglobulin G (Ανοσοσφαιρίνη G)
IP_3	Inositol 1,4,5-trisphosphate (1, 4, 5 – τριφοσφωρική ινοσιτόλη)
K_D	Dissociation constant (Σταθερά διάστασης)
kDa	Kilodalton
ΚΝΣ	Κεντρικό Νευρικό Σύστημα
LASER	Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation (Ενίσχυση φωτός με εξαναγκασμένη εκπομπή ακτινοβολίας)
M	Molar (Μοριακότητα)
MAPK	Mitogen-activated protein kinase (Πρωτεϊνική κινάση που ενεργοποιείται από μιτογόνα σήματα)
MTS	Methanethiosulfonate (Μεθανοθιοθειϊκό)
MTSEA	2-aminoethyl methanethiosulfonate hydrobromide (Μέθανοθιοθειϊκό-αιθυλ-αμμώνιο)
MTSET	2-(trimethylammonium)ethyl methanethiosulfonate (Μέθανοθιοθειϊκό-αίθυλ-τριμέθυλ-αμμώνιο)
MTSES	2-sulfonatoethyl methanethiosulfonate (Μέθανοθιοθειϊκό-αίθυλ-σουλφονικό)
NMR	Nuclear magnetic resonance (πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός)
NPT II	Neomycin phosphotransferase II (Φωσφοτρανσφεράση της νεομυκίνης)
O.D.	Optical Density (Οπτική πυκνότητα)
OptiMEM	Opti-Modified Eagle Medium (Θρεπτικό Υλικό)
PBS	Phosphate Buffer Saline (Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Αλυσιδωτή Αντίδραση πολυμεράσης)
PEI	Polyethylenimine (Πολυαιθυλενιμίνη)
pfu	Pyrococcus furiosus
PIP_2	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (φωσφατιδυλινοσιτόλη)
PKA	Protein kinase A (Πρωτεϊνική κινάση Α)
PKC	Protein kinase C (Πρωτεϊνική κινάση C)
PLC	Phospholipase C (Φωσφολιπάση C)
POMC	Propiomelanocortin (Προ-οπιο-μελανοκορτίνη)
POPOP	2,2΄-p-φαινυλεν-bis-(5-φαινυλο-οξαζόλιο)
PPO	2,5-διφαινυλο-οξαζόλιο
PTH	Parathyroid hormone (Παραθυροειδής ορμόνη)
RNA	Ribonucleic Acid (Ριβονουκλεϊκό οξύ)
RPM	Rounds per min (Στροφές ανά λεπτό)
SCR	Short consensus repeat
SCAM	Substituted-cysteine accessibility method (Μέθοδος της διαθεσιμότητας των κυστεϊνών-υποκαταστατών)
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences (Στατιστικό Πακέτο για τις Κοινωνικές Επιστήμες)

Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethan (Τρις-υδροξυ μεθυλ αμινομεθάνιο)
Triton	t-Octylphenoxypolyethoxyethanol (t-Οκτυλ φαινοξυ πολυαιθοξυ αιθανόλη)
Ucn	Urocortin (ουροκορτίνη)
UEK	Urocortin-EK (ουροκορτίνη-ΕΚ)
UV	Ultraviolet (Υπεριώδης)
VIP	Vasoactive intestinal peptide (Αγγειαδραστικό εντερικό πεπτίδιο)

ABSTRACT

The subfamily B of G-protein-coupled receptors (GPCRs) consists of receptors that bind peptides, such as secretin, vasoactive intestinal peptide, glucagon, corticotropin-releasing hormone (CRF), which play a fundamental role in body function. These receptors, like all GPCRs, are plasma membrane proteins sharing a common structural motif of seven membrane-spanning domains (TMs), which have been shown to bind small molecules, such as antalarmin, a non-peptide antagonist of the type 1 receptor for CRF (CRF_1). This leads to the hypothesis that similar to family A, rhodopsin-like, GPCRs, the TMs of subfamily B GPCRs form a water-accessible crevice, the binding-site crevice, which extends from the extracellular surface of the receptor into the plane of the membrane. The surface of this crevice is formed not only by residues that can contact small molecules but also by residues that may play a structural role and affect binding indirectly. However, the lack of considerable structural information for the family B GPCRs precludes the support of this hypothesis.

To test this hypothesis we started obtaining structural information about subfamily B GPCRs, using as prototype the CRF_1 and determining its ability to react with the charged, hydrophilic, lipophobic, sulfhydryl-specific methanethiosulfonate (MTS) derivative, MTSethylammonium (MTSEA). The reaction of MTSEA with CRF_1 was tested by its ability to irreversibly inhibit [^{125}I]-sauvagine binding to receptor. Reaction of MTSEA with CRF_1 inhibited [^{125}I]-sauvagine binding to CRF_1. These results, in conjunction with that the antagonist antalarmin protected against irreversible inhibition by the MTSEA, suggest that MTSEA reacted with the sulfhydryl of one or more cysteines of CRF_1. To identify the susceptible cysteine(s), we mutated to serine, one at a time, the four endogenous cysteine residues, Cys128, Cys211, Cys233 and Cys364, which are located in the first (TM1), third (TM3), fourth (TM4) and seventh (TM7) membrane spanning segment of CRF_1. In contrast to Cys128 mutation, substitution of Cys211, Cys233 and Cys364 by serine decreased the susceptibility of sauvagine binding to irreversible inhibition by MTSEA. These results suggest that Cys211, Cys233 and Cys364 are exposed in the binding-site crevice of CRF_1, and their reaction with MTSEA decreased sauvagine binding to receptor.

Subsequently we mutated, one at a time, 18 residues (engineered Cys) of the third membrane spanning segment (TM3) of CRF_1 to cysteine, and tested the accessibilities of the engineered Cys for reaction with the MTSEA. Six of the mutant receptors reacted with MTSEA, suggesting that the side chains of these residues are exposed in the binding-site crevice, of CRF_1. The pattern of accessibility was consistent with an alpha-helical conformation.

In contrast to membrane spanning segments of CRF_1 which have been proposed to bind the small non-peptide antagonists, the extracellular amino-terminal regions and the three extracellular loops of CRF_1 interact with the larger peptides belonging to CRF family, such as CRF and sauvagine. In specific previous studies have been shown that upon binding of sauvagine to CRF_1, the amino-terminal portion of the peptide lies near Lys257 in the receptor's second

extracellular loop (EL2). To test the hypothesis that EL2 residues play a role in the binding of sauvagine to CRF_1 we carried out an alanine-scanning mutagenesis study to determine the functional role of EL2 residues (Leu251 to Val266). Only the W259A, F260A, and W259A/F260A mutations reduced the binding affinity and potency of sauvagine. In contrast, these mutations did not seem to significantly alter the overall receptor conformation, in that they left unchanged the affinities of the ligands astressin and antalarmin that have been suggested to bind to different regions of CRF_1. The W259A, F260A, and W259A/F260A mutations also decreased the affinity of the endogenous ligand, CRF, implying that these residues may play a common important role in the binding of different peptides belonging to CRF family. Parallel amino acid deletions of the two peptides produced ligands with various affinities for wild-type CRF_1 compared with the W259A, F260A, and W259A/F260A mutants, supporting the interaction between the amino-terminal residues 8 to 10 of sauvagine and the corresponding region in CRF with EL2 of CRF_1. This is the first time that a specific region of CRF_1 has been implicated in detailed interactions between the receptor and the amino-terminal portion of peptides belonging to the CRF family.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η υποοικογένεια Β των υποδοχέων που συζεύγνυνται με τις G-πρωτεΐνες (GPCRs) περιλαμβάνει υποδοχείς που δεσμεύουν πεπτίδια όπως η σεκρετίνη, το εντερικό αγγειοδραστικό πεπτίδιο, το γλυκαγόνο, τον εκλυτικό παράγοντα της κορτικοτροπίνης (CRF), τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο στη λειτουργία του οργανισμού. Οι υποδοχείς αυτοί, όπως όλοι οι υποδοχείς GPCRs, είναι πρωτεΐνες της πλασματικής μεβράνης των κυττάρων και έχουν κοινή δομή, η οποία περιλαμβάνει επτά διαμεμβρανικές περιοχές (TMs), οι οποίες έχει δειχθεί ότι δεσμεύουν μικρά μόρια όπως η ανταλαρμίνη, ένας μη πεπτιδικός ανταγωνιστής του τύπου 1 υποδοχέα του CRF (CRF_1). Αυτό οδηγεί στην υπόθεση ότι παρόμοια με την υποοικογένεια Α των GPCRs, στην οποία ανήκουν οι υποδοχείς της ροδοψίνης, οι διαμεμβρανικές περιοχές της υποοικογένειας Β των GPCRs σχηματίζουν μια κοιλότητα, την κοιλότητα θέσεων δέσμευσης, που εκτείνεται από την εξωκυττάρια επιφάνεια του υποδοχέα, μέχρι το τμήμα που βρίσκεται μέσα στη φωσφολιπιδική διπλοστιβάδα της πλασματικής μεμβράνης του κυττάρου. Η επιφάνεια της κοιλότητας αυτής σχηματίζεται από αμινοξέα που αλληλεπιδρούν με μικρά μόρια, καθώς και από άλλα που παίζουν δομικό ρόλο, επηρεάζοντας τη δέσμευση έμμεσα. Ωστόσο η έλλειψη πληροφοριών για τη δομή των υποδοχέων της υποοικογένειας Β των GPCRs καθιστά αδύνατη την επιβεβαίωση της υπόθεσης αυτής.

Για να ελέγξουμε την παραπάνω υπόθεση, αρχίσαμε να λαμβάνουμε πληροφορίες για τη δομή των υποδοχέων της υποοικογένειας Β των GPCRs, χρησιμοποιώντας ως πρότυπο τον CRF_1 υποδοχέα και εξετάσαμε την αντίδρασή του με το φορτισμένο, υδρόφιλο, λιπόφοβο, μεθανοθειοσουλφονικό (MTS) αντιδραστήριο μεθανοθιοθειϊκό-αιθυλ-αμμώνιο (MTSEA). Η αντίδραση του MTSEA με τον CRF_1 βασίστηκε στην ικανότητά του να αναστέλλει μη αντιστρεπτά τη δέσμευση της [^{125}I]-σοβαγίνης στον υποδοχέα. Η αντίδραση του MTSEA με τον CRF_1 μείωσε τη δέσμευση της [^{125}I]-σοβαγίνης στον CRF_1. Τα αποτελέσματα αυτά, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι ο ανταγωνιστής ανταλαρμίνη προστάτεψε την προκαλούμενη από το MTSEA μείωση της δέσμευσης, οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το αντιδραστήριο αυτό αντέδρασε με τη σουλφυδρυλική ομάδα μιας ή περισσότερων από τις ενδογενείς κυστεΐνες του CRF_1. Για να εξακριβώσουμε την υπεύθυνη κυστεΐνη (-ες), μεταλλάξαμε σε σερίνες, μια την κάθε φορά, τις τέσσερις ενδογενείς κυστεΐνες, Cys128, Cys211, Cys233 και Cys364, που βρίσκονται στην πρώτη (TM1), τρίτη (TM3), τέταρτη (TM4) και έβδομη (TM7) διαμεμβρανική περιοχή του CRF_1. Σε αντίθεση με τη μετάλλαξη της Cys128, η μετάλλαξη των Cys211, Cys233 και Cys364 σε σερίνη, μείωσε σημαντικά την ευαισθησία του υποδοχέα στο MTSEA. Τα αποτελέσματα αυτά οδηγούν στο συμπέρασμα ότι οι Cys211, Cys233 και Cys364 του CRF_1, είναι προσανατολισμένες προς την κοιλότητα θέσεων δέσμευσης του υποδοχέα και η αντίδρασή τους με το MTSEA μείωσε τη δέσμευση της σοβαγίνης.

Στη συνέχεια μεταλλάξαμε ένα την κάθε φορά, 18 αμινοξέα της τρίτης διαμεμβρανικής περιοχής (TM3) του CRF_1 σε κυστεΐνη (τεχνητές κυστεΐνες) και προσδιορίσαμε τη διαθεσιμότητα των τεχνητών κυστεϊνών, να αντιδράσουν με το MTSEA. Έξι από τους μεταλλαγμένους υποδοχείς αντέδρασαν με το MTSEA,

υποδεικνύοντας έτσι ότι οι πλευρικές αλυσίδες των αμινοξέων αυτών είναι προσανατολισμένες προς την κοιλότητα θέσεων δέσμευσης του CRF_1. Το πρότυπο αυτό της διαθεσιμότητας ήταν σύμφωνο με αυτό της δομής άλφα έλικας.

Σε αντίθεση με τις διαμεμβρανικές περιοχές του CRF_1 οι οποίες έχει προταθεί ότι δεσμεύουν μικρούς μη πεπτιδικούς ανταγωνιστές, η εξωκυττάρια αμινοτελική περιοχή και οι τρεις εξωκυττάριοι βρόγχοι του υποδοχέα αλληλεπιδρούν με τα πεπτίδια της οικογένειας του CRF, όπως ο CRF και η σοβαγίνη. Σε προηγούμενες μελέτες έχει βρεθεί ότι η δεσμευμένη στον CRF_1 σοβαγίνη, βρίσκεται σε κοντινή απόσταση από τη λυσίνη257 του δεύτερου εξωκυττάριου βρόγχου του υποδοχέα (EL2). Για να ελέγξουμε την υπόθεση ότι τα αμινοξέα του EL2 του CRF_1 παίζουν σημαντικό ρόλο στη δέσμευση της σοβαγίνης, μεταλλάξαμε αυτά, ένα την κάθε φορά, σε αλανίνη και προσδιορίσαμε τη συγγένεια με την οποία οι μεταλλαγμένοι υποδοχείς δεσμεύαν τη σοβαγίνη. Μόνο οι μεταλλάξεις των Trp259 (W259A) και Phe260 (F260A) σε αλανίνη, καθώς και ο συνδυασμός τους (W259A/F260A), μείωσαν τόσο τη συγγένεια δέσμευσης σοβαγίνης όσο και την ισχύ του πεπτιδίου αυτού να διεγείρει την παραγωγή κυκλικού AMP σε κύτταρα που εκφράζανε τον CRF_1. Σε αντίθεση, οι μεταλλάξεις αυτές δε φάνηκε να επηρεάζουν σημαντικά τη στερεοδιαμόρφωση του CRF_1, αφού δε μείωσαν τη συγγένεια δέσμευσης της αστρεσίνης και της ανταλαρμίνης, οι οποίες έχει βρεθεί ότι δεσμεύονται σε διαφορετικές περιοχές του CRF_1. Οι μεταλλάξεις W259A, F260A και W259A/F260A μείωσαν επίσης και τη συγγένεια δέσμευσης του CRF, υποδηλώνοντας ότι τα αμινοξέα Trp259 και Phe260 πιθανόν παίζουν έναν κοινό σημαντικό ρόλο στη δέσμευση διαφορετικών πεπτιδίων που ανήκουν στην οικογένεια του CRF. Απαλοιφή αμινοξέων από τον CRF και τη σοβαγίνη επηρέασε τις συγγένειες δέσμευσής τους γιατ τον άγριο τύπο CRF_1 και τους μεταλλαγμένους υποδοχείς, W259A, F260A και W259A/F260A, με τέτοιο τρόπο που οδήγησε στο συμπέρασμα ότι τα αμινοτελικά αμινοξέα των πεπτιδίων στις θέσεις 8-10 της σοβαγίνης και των αντίστοιχων του CRF, αλληλεπιδρούν με τα Trp259 και Phe260 του EL2 του CRF_1. Αυτή είναι η πρώτη φορά που μια συγκεκριμένη περιοχή του CRF_1 εμπλέκεται σε λεπτομερείς αλληλεπιδράσεις μεταξύ του υποδοχέα και της αμινοτελικής περιοχής των πεπτιδίων που ανήκουν στην οικογένεια του CRF.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

σελ.

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ
ΠΕΡΙΛΗΨΗ
ΕΙΣΑΓΩΓΗ 1
1 Η εκλυτική ορμόνη της κορτικοτροπίνης (CRH) 2
1.1 Συγγενή πεπτίδια του CRF 2
1.2 Δράσεις του CRF και των συγγενών του πεπτιδίων 5
1.3 Μελέτες δομής-λειτουργίας του CRF και των συγγενών του πεπτιδίων 8
1.4 Θέσεις δέσμευσης 9
1.5 Μοριακός χαρακτηρισμός θέσεων δέσμευσης 11
1.6 Φαρμακολογικές ιδιότητες υποδοχέων CRF 18
Υποδοχείς του CRF και κυτταρική σηματοδότηση 20
1.7 Εντοπισμός υποδοχέων CRF 22
1.8 Δομή των CRF υποδοχέων 24
1.9 Ρόλος των εξωκυττάριων και διαμεβρανικών περιοχών των CRF υποδοχέων στη δέσμευση του CRF και των αναλόγων του 28
ΣΚΟΠΟΣ 31
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ 34
1 ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΥΛΙΚΑ 35
2 ΜΕΘΟΔΟΙ 35
2.1 Καλλιέργεια κυττάρων HEK293 35
2.2 Επιμόλυνση κυττάρων με πλασμιδιακό DNA 37
2.3 Δημιουργία κυτταρικών σειρών που εκφράζουν μόνιμα τους υποδοχείς 39
2.4 Μέθοδος προσδιορισμού συγκέντρωσης πρωτεϊνών (Μέθοδος Brandford) 40
2.5 Μετάλλαξη του DNA που κωδικοποιούσε τον ανθρώπινο CRF_1 41
2.5.1 Δημιουργία μεταλλάξεων στο δεύτερο εξωκυττάριο βρόγχο και την πέμπτη διαμεμβρανική περιοχή του CRF_1 41
2.5.2 Μεταλλαξιγένεση κατευθυνόμενης θέσης με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR-Site Directed Mutagenesis) 43
2.5.3 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 56
2.5.4 Πέψη DNA με ένζυμα περιορισμού 58
2.5.5 Συρραφή τεμαχίων DNA (ligation) 60
2.5.6 Μετασχηματισμός βακτηρίων DH-10b E.coli με το πλασμιδιακό DNA που έφερε την επιθυμητή μετάλλαξη 62
2.5.7 Πολλαπλασιασμός βακτηρίων DH-10b E.coli 62
2.5.8 Ταυτοποίηση του DNAπου έφερε την επιθυμητή μετάλλαξη 62
2.5.9 Ανάλυση αλληλουχίας (Sequencing) 63
2.6 Φαρμακολογικός χαρακτηρισμός των υποδοχέων 65
2.6.1 Μελέτες συναγωνιστικής δέσμευσης 65
2.6.2 Μελέτες μέτρησης ενδοκυττάριου κυκλικού AMP 69
Παρασκευή διαλύματος σπινθηρισμού (scintillation fluid) 72
Παρασκευή εκχυλίσματος PKA από φλοιό επινεφριδίων 72

2.7 Μέθοδος διαθεσιμότητας των κυστεϊνών-υποκαταστατών (substituted-cysteine accessibility method, SCAM) 74
2.8 Μέθοδος προστασίας με ανταλαρμίνη 78
2.9 Κυτταρομετρία ροής (FACS ανάλυση) 82
Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων 84
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 85
Α ΤΡΙΤΗ ΔΙΑΜΕΜΒΡΑΝΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ ΤΟΥ CRF_1 87
Προσδιορισμός του ρόλου της His199 της τρίτης διαμεμβρανικής περιοχής του CRF_1 στη λειτουργία του υποδοχέα. 88
Λήψη πληροφοριών για τη δομή της τρίτης διαμεμβρανικής περιοχής του CRF_1 91
Αντίδραση του MTSEA με τον άγριο τύπο CRF_1 95
Φαρμακολογικές ιδιότητες του άγριου τύπου CRF_1 και των μεταλλαγμένων υποδοχέων C128S, C211S, C233S και C364S. 102
Αντίδραση του MTSEA με τους μεταλλαγμένους υποδοχείς C128S, C211S, C233S και C364S 102
Φαρμακολογικές ιδιότητες του μεταλλαγμένου υποδοχέα ΔCys 105
Αντίδραση του MTSEA με το μεταλλαγμένο υποδοχέα ΔCys 108
Διαφορετικοί χρόνοι αντίδρασης του MTSEA με τον άγριο τύπου CRF_1 και το μεταλλαγμένο υποδοχέα ΔCys 108
Αντίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων MTSEA με τον άγριο τύπο CRF_1 και το μεταλλαγμένο υποδοχέα ΔCys 110
Αντίδραση των MTSES και MTSET με τον άγριο τύπο CRF_1 και τη μεταλλαγμένη μορφή του ΔCys 113
Προστασία της αντίδρασης του MTSEA με τον άγριο τύπο CRF_1 116
Επίδραση του MTSEA στις φαρμακολογικές ιδιότητες του CRF_1 116
Αντίδραση του MTSEA για 15 δευτερόλεπτα με τους μεταλλαγμένους υποδοχείς C128S, C211S, C233S και C364S 118
Φαρμακολογικές ιδιότητες του άγριου τύπου CRF1 και των μεταλλαγμένων υποδοχέων ΔCys+128C, ΔCys+211C, ΔCys+233C και ΔCys+364C 120
Αντίδραση του MTSEA με τους μεταλλαγμένους υποδοχείς ΔCys+128C, ΔCys+211C, ΔCys+233C και ΔCys+364C 122
Προσδιορισμός των διαθέσιμων για αντίδραση με το MTSEA τεχνητών κυστεϊνών της τρίτης διαμεμβρανικής περιοχής του CRF_1 124
Β ΠΕΜΠΤΗ ΔΙΑΜΕΜΒΡΑΝΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ ΤΟΥ CRF_1 145
Μελέτη του ρόλου των αμινοξέων της πέμπτης διαμεμβρανικής περιοχής του CRF_1 στη δέσμευση των πεπτιδίων της οικογένειας του CRF 146
Επίδραση των μεταλλάξεων Y267A, I271A και G274A στη δέσμευση της σοβαγίνης 156
Επίδραση των μεταλλάξεων T268A, Y270A, Y272A, Q273 και P275A στη δέσμευση της σοβαγίνης 156
Επίδραση της μετάλλαξης D269A στη δέσμευση της σοβαγίνης 156
Γ ΤΕΤΑΡΤΗ ΔΙΑΜΕΜΒΡΑΝΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ ΤΟΥ CRF_1 161
Μελέτη του ρόλου της Lys250 στις φαρμακολογικές ιδιότητες του 163

CRF_1
A. Επίδραση της K250A μετάλλαξης στις φαρμακολογικές ιδιότητες του CRF_1 163
Επίδραση της μετάλλαξης K250A στη δέσμευση της σοβαγίνης 163
Επίδραση της μετάλλαξης K250A στην ικανότητα της σοβαγίνης να διεγείρει την παραγωγή ενδοκυττάριου κυκλικού AMP 166
Επίδραση της μετάλλαξης K250A στη δέσμευση του CRF 166
Επίδραση της μετάλλαξης K250A στη δέσμευση του άλφα-ελικοειδή CRF(9-41) 169
Επίδραση της μετάλλαξης K250A στη δέσμευση της αστρεσίνης 169
Επίδραση της μετάλλαξης K250A στη δέσμευση της ανταλαρμίνης 169
Επίδραση της μετάλλαξης K250A στη συγγένεια δέσμευσης της Ala8-σοβαγίνης 173
Επίδραση της μετάλλαξης K250A στην ικανότητα της Ala8-σοβαγίνης να διεγείρει την παραγωγή ενδοκυττάριου κυκλικού AMP 176
B. Επίδραση των μεταλλάξεων K250R και K250E στις λειτουργικές ιδιότητες του CRF_1 178
Επίδραση των μεταλλάξεων K250R και K250E στην ικανότητα της σοβαγίνης να διεγείρει την παραγωγή ενδοκυττάριου κυκλικού AMP 181
Επίδραση των μεταλλάξεων K250R και K250E στην ικανότητα της Ala8-σοβαγίνης να διεγείρει την παραγωγή ενδοκυττάριου κυκλικού AMP 181
Σύγκριση της ισχύος της Ala8-σοβαγίνης με εκείνη της σοβαγίνης 186
Δ ΔΕΥΤΕΡΟΣ ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΟΣ ΒΡΟΓΧΟΣ ΤΟΥ CRF_1 187
Επίδραση της μετάλλαξης σε αλανίνη των αμινοξέων του δεύτερου εξωκυττάριου βρόγχου του CRF_1 στις φαρμακολογικές ιδιότητες του υποδοχέα 188
Επίδραση των L251A και Y252A μεταλλάξεων στη συγγένεια δέσμευσης και ισχύ της σοβαγίνης 206
Επίδραση των Y253A και D254A μεταλλάξεων στη συγγένεια δέσμευσης και ισχύ της σοβαγίνης 209
Επίδραση των N255A, E256A και K257A μεταλλάξεων στη συγγένεια δέσμευσης και ισχύ της σοβαγίνης 212
Επίδραση των G261A και K262A μεταλλάξεων στη συγγένεια δέσμευσης και ισχύ της σοβαγίνης 215
Επίδραση των R263A και P264A μεταλλάξεων στη συγγένεια δέσμευσης και ισχύ της σοβαγίνης 218
Επίδραση των G265A και V266A μεταλλάξεων στη συγγένεια δέσμευσης και ισχύ της σοβαγίνης 221
Επίδραση των W259A, F260A και W259A/F260A μεταλλάξεων στη συγγένεια δέσμευσης και ισχύ της σοβαγίνης 224
Έκφραση των υποδοχέων του CRF στην πλασματική μεμβράνη των κυττάρων πριν και μετά τις μεταλλάξεις W259A, F260A και W259A/F260A 230
Επίδραση των μεταλλάξεων W259A, F260A και W259A/F260A στη συγγένεια δέσμευσης και ισχύ του CRF 232

Επίδραση των μεταλλάξεων W259A, F260A και W259A/F260A στις συγγένειες δέσμευσης των ανταγωνιστών ανταλαρμίνη και αστρεσίνη 236
Επίδραση των μεταλλάξεων W259A, F260A και W259A/F260A στη συγγένεια δέσμευσης του άλφα-ελικοειδή CRF (9-41) 239
Επίδραση των W259A, F260A και W259A/F260A μεταλλάξεων στη συγγένεια δέσμευσης της σοβαγίνης 8-40 και της σοβαγίνης 11-40 243
ΣΥΖΗΤΗΣΗ 250
ΤΡΙΤΗ ΔΙΑΜΕΜΒΡΑΝΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ ΤΟΥ CRF_1 - ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΗΣ 251
Προσδιορισμός του ρόλου της τρίτης διαμεμβρανικής περιοχής του CRF_1 στη δέσμευση μη πεπτιδικών αναλόγων του CRF 251
Υποθέσεις για τη δομή των διαμεβρανικών περιοχών του CRF_1 253
Αντίδραση MTS-αντιδραστηρίων με τον CRF_1 256
Αντίδραση του MTSEA με τον ΔCys υποδοχέα 259
Χρονοεξαρτώμενη και δοσοεξαρτώμενη αντίδραση του MTSEA με τον άγριο τύπο CRF_1 260
Μηχανισμός ελάττωσης της δέσμευσης της σοβαγίνης στον CRF_1 μετά από αντίδραση του με το MTSEA 261
Αντίδραση των MTSET και MTSES με τον CRF_1 263
Αντίδραση των Cys211, Cys233 Cys364, του CRF_1 με το MTSEA. Κοιλότητα θέσεων δέσμευσης CRF_1 263
Συνεργιστικό αποτέλεσμα της αντίδρασης του MTSEA με τις ενδογενείς κυστεΐνες του CRF_1 στη δέσμευση της σοβαγίνης 266
Λήψη πληροφοριών για τη δομή της τρίτης διαμεμβρανικής περιοχής του CRF_1 267
ΤΕΤΑΡΤΗ ΚΑΙ ΠΕΜΠΤΗ ΔΙΑΜΕΜΒΡΑΝΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ ΤΟΥ CRF_1 - ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΟΥΣ 272
Προσδιορισμός του ρόλου των αμινοξέων της πέμπτης διαμεμβρανικής περιοχής στη δέσμευση των πεπτιδίων της οικογένειας του CRF 272
Προσδιορισμός του ρόλου της Lys250 στη δέσμευση των πεπτιδίων της οικογένειας του CRF 273
Αλληλεπίδραση της Lys250 του CRF_1 με το Asp8 της σοβαγίνης και το Asp9 του CRF 276
ΔΕΥΤΕΡΟΣ ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΟΣ ΒΡΟΓΧΟΣ ΤΟΥ CRF_1 - ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΟΥ 279
Προσδιορισμός του ρόλου των αμινοξέων του δεύτερου εξωκυττάριου βρόγχου στη δέσμευση των πεπτιδίων της οικογένειας του CRF 279
Επίδραση των W259A και F260A μεταλλάξεων στη κυτταρική σηματοδότηση του CRF 281
Αλληλεπίδραση των αμινοξέων 9-11 του CRF και των αντίστοιχων της σοβαγίνης με τα Trp259 και Phe260 του CRF_1 283
Η ταυτόχρονη μετάλλαξη των Trp259 και Phe260 του CRF_1, επηρέασε συνεργιστικά τις φαρμακολογικές ιδιότητες του υποδοχέα 285

Γενικό συμπέρασμα 286
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 287

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η εκλυτική ορμόνη της κορτικοτροπίνης (CRH)

Οι πρώτες υποθέσεις για τη ρύθμιση της λειτουργίας της πρόσθιας υπόφυσης από υποθαλαμικούς παράγοντες είχαν γίνει από τον Harris το 1948 για τους οποίους βρέθηκε λίγα χρόνια αργότερα ότι επάγουν την έκκριση κορτικοτροπίνης από την υπόφυση [1-3].

Από τους υποθαλαμικούς παράγοντες εκείνος που επάγει την έκκριση ACTH, ονομάστηκε εκλυτικός παράγοντας της κορτικοτροπίνης (corticotropin releasing factor, CRF, or corticotropin [4]releasing hormone, CRH) και απομονώθηκε για πρώτη φορά από τον Vale το 1981 [5-9]. Το πεπτίδιο αυτό είχε μοριακό βάρος 4671 Da και δομή 41 αμινοξέων.

Στον υποθάλαμο ο CRF βρίσκεται στους παρακοιλιακούς, υπεροπτικό και τοξοειδή πυρήνες. Σημαντικές ποσότητες CRF βρέθηκαν επίσης και στο υπόλοιπο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ), όπως στο φλοιό του εγκεφάλου, στον πυρήνα μέσης προεξοχής, στην αμυγδαλή, στα βασικά γάγγλια, στην παρεγκεφαλίδα, στο νωτιαίο μυελό, και στον ιππόκαμπο ([10-13].

Εκτός από το ΚΝΣ ο CRF ανιχνεύεται επίσης σε πληθώρα κυττάρων στην περιφέρεια, όπως σε μυελό των επινεφριδίων, πνεύμονα, καρδιά, σπλήνα συκώτι, στομάχι, δωδεκαδάκτυλο, παχύ έντερο και πάγκρεας [14-20]. Επίσης βρέθηκε σε κύτταρα Leydig όρχεων, σε αρκετές περιοχές του ενδομητρίου, στον ανθρώπινο πλακούντα, σε κύτταρα του επιθηλίου της μήτρας, καθώς και στο αμνιακό υγρό [21-23]. Ο CRF έχει επίσης ανιχνευτεί σε κύτταρα του ανοσολογικού συστήματος, όπως Τ και Β λεμφοκύτταρα και σε ουδετερόφιλα [24, 25]. Εκτός των φυσιολογικών κυττάρων βρέθηκε επίσης σε πληθώρα καρκινικών όπως εκείνα από μαστό, πνεύμονα και θύμο αδένα [19, 26, 27].

1.1 Συγγενή πεπτίδια του CRF

Εκτός από τον CRF (εικόνα 1) ανακαλύφθηκαν και άλλα συγγενή με αυτόν πεπτίδια (CRF-συγγενή πεπτίδια) τόσο στα θηλαστικά όσο και σε άλλα είδη όπως ψάρια και αμφίβια, τα οποία έχουν παρόμοιες ιδιότητες με εκείνες του

CRF. Συγκεκριμένα, απομονώθηκαν από τα ψάρια (του είδους *Catostomus commersoni*) και το βάτραχο (του είδους *Phyllomedusa sauvegei)* τα πεπτίδια ουροτενσίνη Ι και σοβαγίνη, αντίστοιχα ([28, 29]) (εικόνα 1). Επίσης το 1995, βρέθηκε στα θηλαστικά ένα νέο CRF – συγγενές πεπτίδιο, η ουροκορτίνη (Ucn) με παρόμοιες φυσιολογικές δράσεις με εκείνες του CRF και της οποίας η αλληλουχία των αμινοξέων είναι κατά 43%, 63% και 35% ταυτόσημη με εκείνη του CRF, της ουροτενσίνης και της σοβαγίνης αντίστοιχα [30-32] (εικόνα 1)

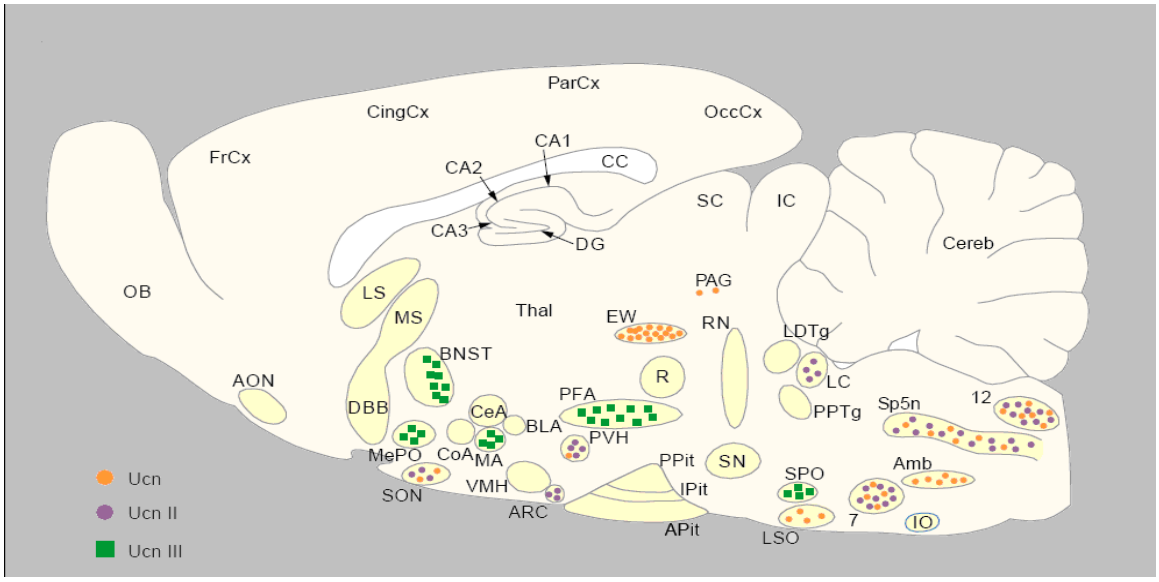
Πεπτίδιο	**Αλληλουχία**	**Μήκος**	**Ομολογία (%)**
h/rCRF	SEEPPISLDLTFHLLREVLEMARAEQLAQQAHSNRKLMEII	41	100
oCRF	SQEPPISLDLTFHLLREVLEMTKADQLABQAHSNRKLLDIA	41	83
hUCN	DNPSLSIDLTFHLLRTLLELARTQSQRERAEQNRIIFDSV	40	43
Sauv	ZGPPISIDLSLELLRKMIEIEKQEKEKQQAANNRLLLDTI	40	48
mUCNII	VILSLDVPIGLLRILLEQARYKAARNQAATNAQILAHV	38	34
mUCNIII	FTLSLDVPTNIMNILFNIDKAKNLRAKAAANAQLMAQI	38	26

h/rCRF : human/rat CRF oCRF: ovine CRF hUcn: human Urocortin
Sauv: frog Sauvagine mUcnII: mouse Urocortin II mUcnIII: mouse Urocortin III

Εικόνα 1. *Αλληλουχίες των αμινοξέων του CRF και των συγγενών του πεπτιδίων. Από Dautzenberg et al. [32].*

Η ουροκορτίνη εντοπίζεται σε διάφορες περιοχές του κεντρικού νευρικού συστήματος (εικόνα 2), όπως στους πυρήνες Edinger-Westphal και της πλάγιας ελαίας [33, 34]. Ανιχνεύεται επίσης στον ιππόκαμπο, στα βασικά γάγγλια, στον παρακοιλιακό πυρήνα του υποθαλάμου και στον πλάγιο υποθάλαμο [31, 34]. Η ανατομική αλληλοεπικάλυψη στην κατανομή της ουροκορτίνης και του CRF στον εγκέφαλο είναι πολύ μικρή, συμβαδίζοντας με τις διαφορετικές δράσεις τους στον ιστό αυτό [35]. Το πεπτίδιο αυτό εκφράζεται επίσης, όπως και ο CRF, σε αρκετούς ιστούς στην περιφέρεια, όπως σε καρδιά, πλακούντα, έντερο, σπλήνα, προστάτη, δέρμα, θύμο αδένα, καθώς και σε όργανα του ανοσοποιητικού

συστήματος [35]. Εκτός των φυσιολογικών κυττάρων βρέθηκε επίσης σε πολλές νεοπλασίες όπως σε αδενώματα της υπόφυσης, σε καρκινώματα του ενδομητρίου και στον καρκίνο του προστάτη [36-39].

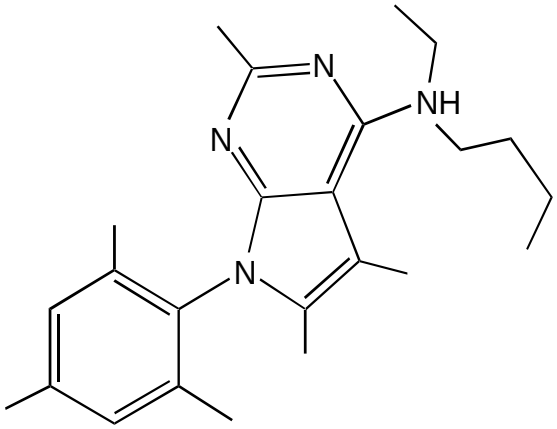


Εικόνα 2. *Κατανομή των ουροκορτινών στον εγκέφαλο αρουραίου. Με κίτρινο, μωβ και πράσινο απεικονίζονται οι κατανομές της UcnI, της UcnII και της UcnIII, αντίστοιχα. Από Reul and Holsboer [33].*

Πρόσφατα διαπιστώθηκε η ύπαρξη δύο επιπλέον CRF-συγγενών πεπτιδίων, της ουροκορτίνης ΙΙ (UcnII) και της ουροκορτίνης ΙΙΙ (UcnIII) (εικόνα 1) [40-42]. Τα δύο αυτά πεπτίδια εντοπίζονται στο ΚΝΣ, όπως σε ορισμένες υποφλοιώδεις περιοχές του εγκεφάλου (εικόνα 2) [33, 43-46]. Επιπρόσθετα του ΚΝΣ τα πεπτίδια αυτά εντοπίζονται τη περιφέρεια. Συγκεκριμένα, η UcnII εντοπίζεται σε καρδιά, πνεύμονες, στομάχι, κύτταρα του αίματος, δέρμα και πλακούντα [43, 47]. Στην περιφέρεια, η UcnIII ανιχνεύεται σε καρδιά, δέρμα, θυρεοειδή αδένα, επινεφρίδια, πάγκρεας, σπλήνα, ωοθήκες και νεφρούς [40, 48].

Επιπρόσθετα των φυσιολογικών πεπτιδίων, πρόσφατα συντέθηκαν διάφορα ανάλογα του CRF, όπως η κορταγίνη, καθώς και τα πεπτίδια, α – ελικοειδής CRF (9 – 41), αστρεσίνη (astressin: cyclo (30 – 33) [DPhe12, Nle21, Glu30, Lys33, Nle38] hCRF (12 – 41), το ανάλογο της αστρεσίνης, αστρεσίνη

(2)Β και επίσης διάφορα ανάλογα της σοβαγίνης, όπως η αντισοβαγίνη – 30 [49-53]. Παράλληλα συντέθηκαν και μη πεπτιδικά μικρομοριακά ανάλογα όπως η ανταλαρμίνη (εικόνα 3) και το NBI 27914 [54, 55].

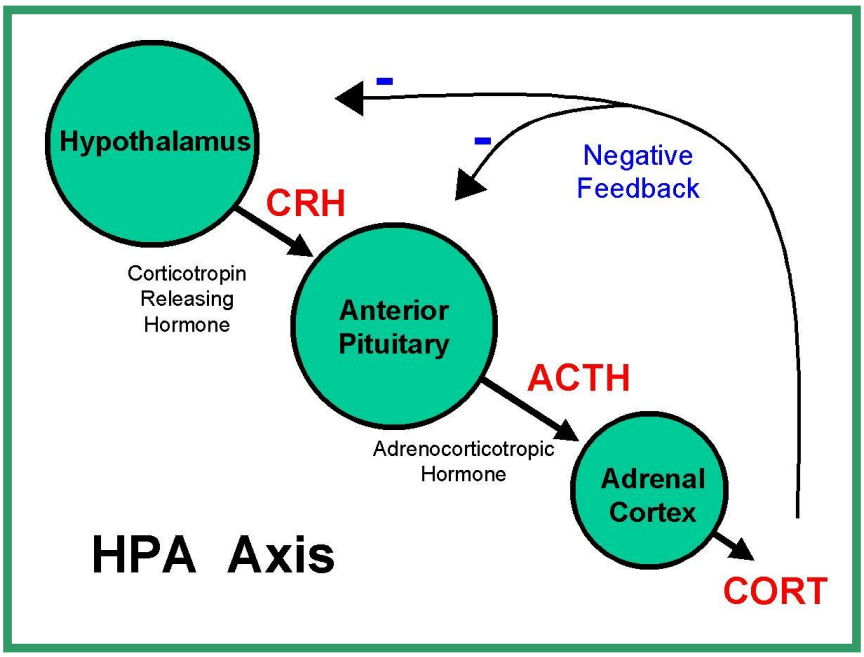


Antalarmin

Εικόνα 3. *Χημική δομή της ανταλαρμίνης. Από Webster et al. [55].*

1.2 Δράσεις του CRF και των συγγενών του πεπτιδίων

Ο CRF παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της δραστηριότητας του υποθαλαμο – υποφυσο – επινεφριδιακού άξονα (HPA) (Εικόνα 4) [56-58]. Συγκεκριμένα, ο CRF απελευθερώνεται από τους παρακοιλιακούς πυρήνες του υποθαλάμου και εισερχόμενος στην πυλαία κυκλοφορία καταλήγει στα κορτικοτρόφα κύτταρα της υπόφυσης. Εκεί διεγείρει τη σύνθεση και παραγωγή της προοπιομελανοκορτίνης (POMC), το πρόδρομο μόριο της κορτικοτροπίνης (ACTH) και κατά συνέπεια διεγείρει την παραγωγή και έκκριση της ACTH. Η ACTH με τη σειρά της διεγείρει την απελευθέρωση των γλυκοκορτικοειδών (κυρίως κορτιζόλης) από το φλοιό των επινεφριδίων, τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο σε πολλές σημαντικές φυσιολογικές λειτουργίες του οργανισμού [59].



Εικόνα 4 *Γραφική απεικόνιση του υποθάλαμο – υπόφυσο – 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). Η ACTH στη συνέχεια διεγείρει την έκκριση γλυκοκορτικοειδών (CORT) από τα επινεφρίδια.*

Εκτός από τη ρύθμιση της δραστηριότητας του υποθαλαμο – υποφυσο – επινεφριδιακού άξονα, ο CRF δρα στο ΚΝΣ παίζοντας ρόλο νευροδιαβιβαστή / νευροτροποποιητή [32, 60]. Ο CRF έχει βρεθεί ότι συντονίζει τις συμπεριφορικές και ενδοκρινικές αποκρίσεις του οργανισμού στο στρες και εμπλέκεται στην παθοφυσιολογία διαφόρων νευροψυχιατρικών νόσων όπως το άγχος και η κατάθλιψη, η οποία συγκαταλέγεται στις δέκα σημαντικότερες ασθένειες παγκοσμίως, που καθιστούν τον άνθρωπο ανίκανο να ανταπεξέλθει και να διεκπεραιώσει τις καθημερινές δραστηριότητες του. [60]. Συγκεκριμένα, μελέτες έχουν δείξει ότι η απορύθμιση του HPA καθώς και τροποποιημένα επίπεδα CRF σε διάφορες περιοχές του ΚΝΣ σχετίζονται με την παθοφυσιολογία νόσων, όπως είναι η κατάθλιψη και το άγχος. Για παράδειγμα συναισθηματικές διαταραχές, όπως είναι η μελαγχολική κατάθλιψη, χαρακτηρίζονται από αυξημένες τιμές CRF

στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ΕΝΥ) [61]. Παρόμοια, παθολογικά υψηλά επίπεδα του CRF έχουν βρεθεί στο ΕΝΥ ασθενών με διαταραχές άγχους [62].

Επιπρόσθετα της δράσης του στο ΚΝΣ, ο CRF διαδραματίζει έναν πολύ σημαντικό ρόλο στο ανοσοποιητικό σύστημα ρυθμίζοντας τις ανοσολογικές αποκρίσεις μέσω δυο δράσεων του. Μιας έμμεσης αντιφλεγμονώδους δράσης που οφείλεται στη διέγερση του υποθαλαμο – υποφυσο – επινεφριδιακού άξονα από τον υποθαλαμικό CRF και επακόλουθη έκκριση γλυκοκορτικοειδών και μιας άμεσης, προφλεγμονώδους δράσης, που οφείλεται στη διέγερση κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος από τοπικά εκκρινόμενο CRF [58, 63, 64].

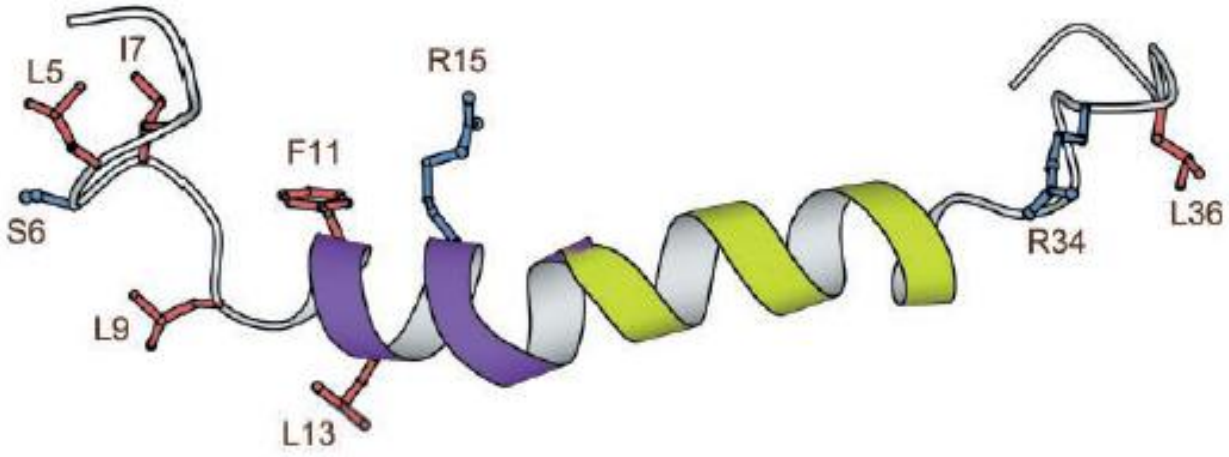
Επίσης, ο CRF παίζει ρόλο στη λειτουργία πολλών συστημάτων στην περιφέρεια όπως του καρδιαγγειακού, του γαστρεντερικού και του αναπαραγωγικού συστήματος [65-71]. Υψηλές συγκεντρώσεις CRF προκαλούν αγγειοδιαστολή, πτώση της αρτηριακής πίεσης και αύξηση του καρδιακού ρυθμού, ενώ στο γαστρεντερικό σύστημα ο CRF τροποποιεί τη γαστρική κένωση και την εντερική κινητικότητα [72-78]. Επίσης στο αναπαραγωγικό σύστημα ο CRF ρυθμίζει την παραγωγή τεστοστερόνης από τα κύτταρα Leydig των όρχεων, επηρεάζει τη συσταλτικότητα του μυομητρίου και την απελευθέρωση των προσταγλαδινών και παίζει ρόλο στο τοκετό [67, 79-89].

Παρόμοια με τον CRF, η ουροκορτίνη (ή ουροκορτίνη Ι) και οι ουροκορτίνες ΙΙ και ΙΙΙ, παίζουν ρόλο στη λειτουργία του ΚΝΣ, καθώς και του καρδιαγγειακού, γαστρεντερικού, ανοσοποιητικού και αναπαραγωγικού [45, 90, 91]. Οι ουροκορτίνες ΙΙ και ΙΙΙ συμβάλλουν στην παθοφυσιολογία του στρες, άγχους και της κατάθλιψης [33, 46, 92]. Στο γαστρεντερικό σύστημα οι ουροκορτίνες επηρεάζουν τη γαστρική κένωση και τη κινητικότητα του εντέρου, ενώ στο καρδιαγγειακό, τροποποιούν τη συσταλτικότητα της καρδιάς, τον καρδιακό ρυθμό, την αορτική ροή του αίματος και την αρτηριακή πίεση και προστατεύουν τα κύτταρα του μυοκαρδίου σε επεισόδια υποξίας [93-99]. Επιπρόσθετα, οι ουροκορτίνες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος, έχοντας αντιφλεγμονώδεις δράσεις [100, 101].

1.3 Μελέτες δομής - λειτουργίας του CRF και των συγγενών του πεπτιδίων

Ο CRF και τα συγγενή του πεπτίδια, είναι πεπτίδια 40 – 41 αμινοξέων (εικόνα 1) που αποτελούνται από ένα καρβοξυτελικό άκρο, ένα αμινοτελικό άκρο και μία ενδιάμεση περιοχή. Έχει βρεθεί ότι η ενδιάμεση περιοχή και τμήματα των καρβοξυτελικών και αμινοτελικών άκρων μπορεί να σχηματίσει δομή άλφα – έλικας, που θεωρείται η βιολογικά δραστική διαμόρφωση του πεπτιδίου. Συγκεκριμένα, ο CRF σε υδατικό διάλυμα βρέθηκε ότι έχει ακαθόριστη δομή, ενώ όταν βρεθεί σε υδρόφοβο διάλυμα τριφθοροαιθανόλης τα αμινοξέα του 8 έως 32 τείνουν να αποκτήσουν δομή άλφα – έλικας [102, 103]. Παρόμοια δομή και ιδιότητες με τον CRF έχουν και τα συγγενή του πεπτίδια ουροτενσίνη και σοβαγίνη με τα αμινοξέα 8 -31 και 7 -31 αντίστοιχα να αποκτούν δομή άλφα – έλικας όταν βρίσκονται σε υδρόφοβο περιβάλλον (εικόνα 5) [102]. Τα παραπάνω οδήγησαν στην υπόθεση ότι η αλληλεπίδραση του CRF και των συγγενών του πεπτιδίων με τις θέσεις δέσμευσης τους, που βρίσκονται στο λιπιδικό περιβάλλον της πλασματικής μεμβράνης του κυττάρου ευνοεί το σχηματισμό άλφα – έλικας σε αυτά. Η υπόθεση αυτή ενισχύθηκε από το γεγονός ότι αντικαταστάσεις αμινοξέων του CRF με άλλα που σταθεροποίησαν τη δομή άλφα – έλικας, αύξησαν τη συγγένεια δέσμευσης του πεπτιδίου [104]. Επίσης, βρέθηκε ότι η άλφα – ελικοειδής δομή της ενδιάμεσης περιοχής των πεπτιδίων προσανατολίζει τα καρβοξυτελικά και αμινοτελικά άκρα τους με τέτοιο τρόπο που είναι απαραίτητος για την εμφάνιση των βιολογικών δράσεων τους. Συγκεκριμένα, εισαγωγή στην ενδιάμεση περιοχή της ουροκορτίνης θετικά και αρνητικά φορτισμένων αμινοξέων με τέτοιο τρόπο ώστε, σχηματίζοντας ηλεκτροστατικούς δεσμούς μεταξύ τους, να δημιουργούν πλήρεις άλφα – έλικες, είχε σαν αποτέλεσμα τη διατήρηση των λειτουργικών ιδιοτήτων του πεπτιδίου [103]. Αντίθετα, εισαγωγή φορτισμένων αμινοξέων με τέτοιο τρόπο ώστε από τις άλφα – έλικες που δημιουργήθηκαν η παρακείμενη στο καρβοξυτελικό άκρο της ουροκορτίνης να μην είναι ολοκληρωμένη, είχε σαν αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση της βιολογικής δράσης του πεπτιδίου [103]

Εκτός του ρόλου της άλφα – ελικοειδούς δομής στη λειτουργία των πεπτιδίων σημασία επίσης παίζουν τα καρβοξυτελικά και αμινοτελικά αμινοξέα τους. Συγκεκριμένα, τροποποίηση του καρβοξυτελικού άκρου του CRF ή απαλοιφή των δύο τελευταίων καρβοξυτελικών αμινοξέων του, είχε σαν αποτέλεσμα την κατάργηση της βιολογικής δραστικότητας του πεπτιδίου [103, 105]. Παρόμοια, απαλοιφή των πρώτων οκτώ αμινοτελικών αμινοξέων του oCRF σχεδόν κατήργησε τη βιολογική του δραστικότητα [104]. Επιπρόσθετα, αντικατάσταση με αλανίνη των δεκατριών από τα πρώτα δεκαεννιά αμινοτελικά αμινοξέα οδήγησε σε μείωση ή κατάργηση της βιολογικής δραστικότητας του CRF [105].



Εικόνα 5. *Δομή συνθετικού αναλόγου της ουροκορτίνης (UEK) σε διάλυμα, προσδιοριζόμενη με φασματοσκοπία NMR και μοριακή μοντελοποίηση. Από Beyermann et al. [103].*

1.4 Θέσεις δέσμευσης

Οι πολλαπλές δράσεις των πεπτιδίων της οικογένειας του CRF επιτελούνται μέσω αλληλεπίδρασής της με ειδικές θέσεις δέσμευσης. Ειδικές θέσεις δέσμευσης για τον CRF ταυτοποιήθηκαν πρώτη φορά σε μεμβρανικά παρασκευάσματα υπόφυσης επίμυος και ακολούθως βρέθηκαν τόσο σε

διάφορες περιοχές του ΚΝΣ, όσο και στην περιφέρεια, όπως στο ανοσοποιητικό και αναπαραγωγικό σύστημα [106-117]

		Υπόφυση		
Χαρακτηριστικά	Εγκέφαλος	Πρόσθιος λοβός	Διάμεσος λοβός	Σπλήνα
Συγγένεια (K_D, pM)	200-400	200-400	200-400	200-400
Δέσμευση παρουσία δισθενών κατιόντων (πχ. Mg^{2+})	Αύξηση	Αύξηση	Αύξηση	Αύξηση
Δέσμευση παρουσία νουκλεοτιδίων γουανοσίνης (πχ. GTP)	Μείωση	Μείωση	Μείωση	Μείωση
Δεύτεροι αγγελιοφόροι (διέγερση της αδενυλικής κυκλάσης)	Ναι	Ναι	Ναι	Ναι
Φαρμακολογικές ιδιότητες σε σύγκριση με την in vitro έκλυση ACTH από τον CRF	Ναι	Ναι	Ναι	Ναι
Μοριακό βάρος (Da)	58000	75000	75000	75000
Σύσταση δομής	Γλυκοπρωτεΐνη	Γλυκοπρωτεΐνη	Γλυκοπρωτεΐνη	Γλυκοπρωτεΐνη

Εικόνα 6. *Χαρακτηρισμός των θέσεων δέσμευσης του CRF σε διαφορετικούς ιστούς. Από De Souza et al. [60].*

Οι θέσεις δέσμευσης του CRF, είναι γλυκοπρωτεΐνες της πλασματικής μεμβράνης του κυττάρου (Εικόνα 6), των οποίων το μοριακό βάρος βρέθηκε ότι κυμαίνεται από 58.000 Da έως 75.000 Da, (Εικόνα 6). Η διαφοροποίηση αυτή πιθανόν οφείλεται στη διαφορετικής έκτασης γλυκοζυλίωσή τους σε διαφορετικούς ιστούς [118, 119]. Μετά από απογλυκοζυλίωσή τους, οι θέσεις δέσμευσης του CRF σε διάφορους ιστούς, βρέθηκε ότι είχαν παρόμοιο μοριακό βάρος της τάξης των 40kDa – 45 kDa [60].

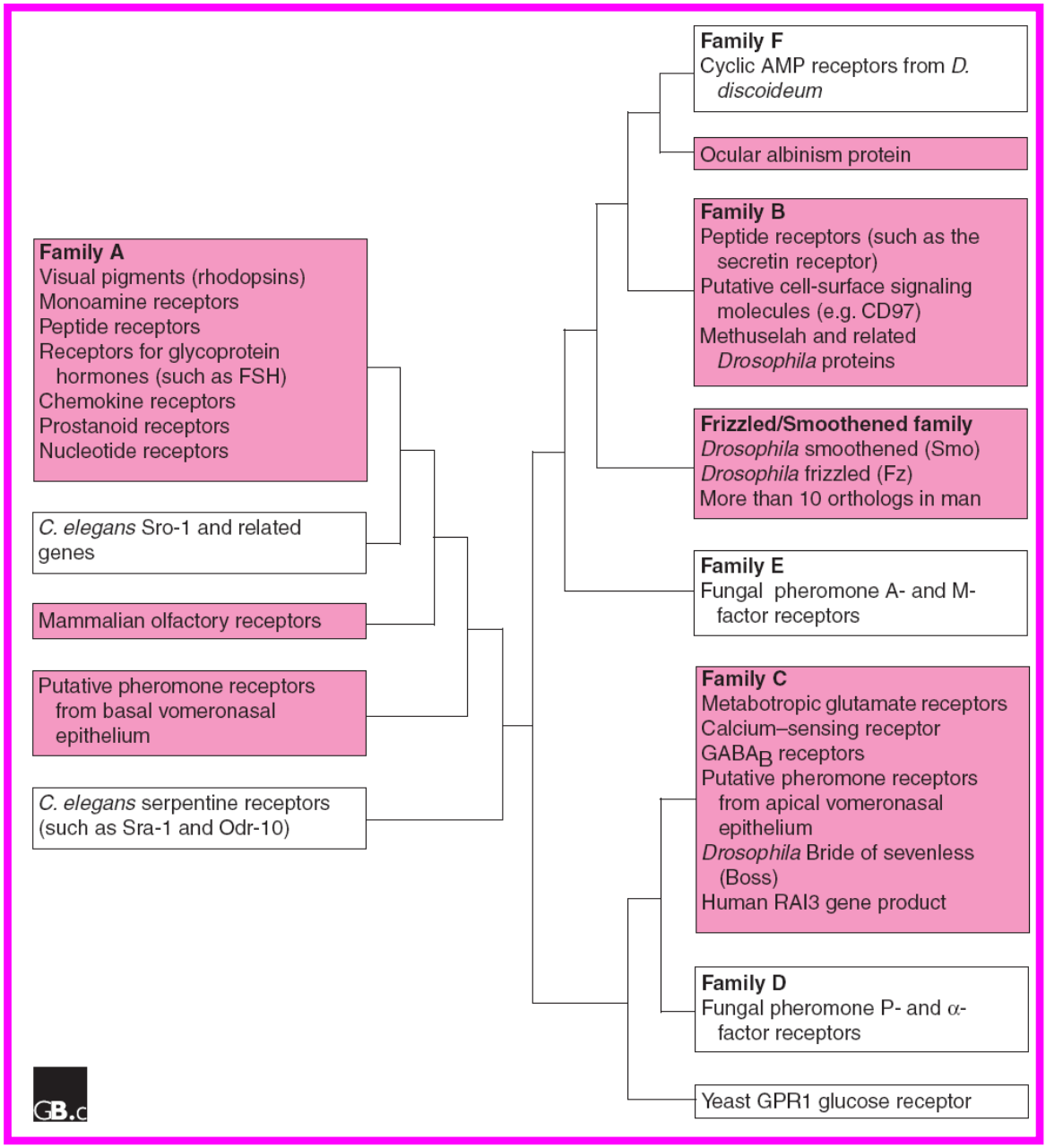
Επίσης βρέθηκε ότι οι θέσεις δέσμευσης του CRF αλληλεπιδρούν με τις G-πρωτεΐνες αφού η υψηλή συγγένεια δέσμευσης του αγωνιστή CRF μειώθηκε παρουσία GTP-γS, ενώ αυξήθηκε παρουσία μαγνησίου (Εικόνα 6). Το μαγνήσιο έχει βρεθεί ότι παίζει ρόλο στην αλληλεπίδραση των θέσεων δέσμευσης του CRF με τις G–πρωτεΐνες η οποία απαιτείται για την υψηλής συγγένειας δέσμευση των αγωνιστών στον υποδοχέα [60, 120]. Αντίθετα, το GTP–γS (στην εικόνα 6 αναφέρεται σαν GTP) είναι ένα μη υδρολυόμενο παράγωγο του GTP, το οποίο δεσμευμένο μη αντιστρεπτά με τις G–πρωτεΐνες προκαλεί την απομάκρυνσή

τους από τις θέσεις δέσμευσης του CRF με αποτέλεσμα οι τελευταίες να δεσμεύουν με χαμηλή συγγένεια τον CRF [60, 120].

1.5 Μοριακός χαρακτηρισμός θέσεων δέσμευσης

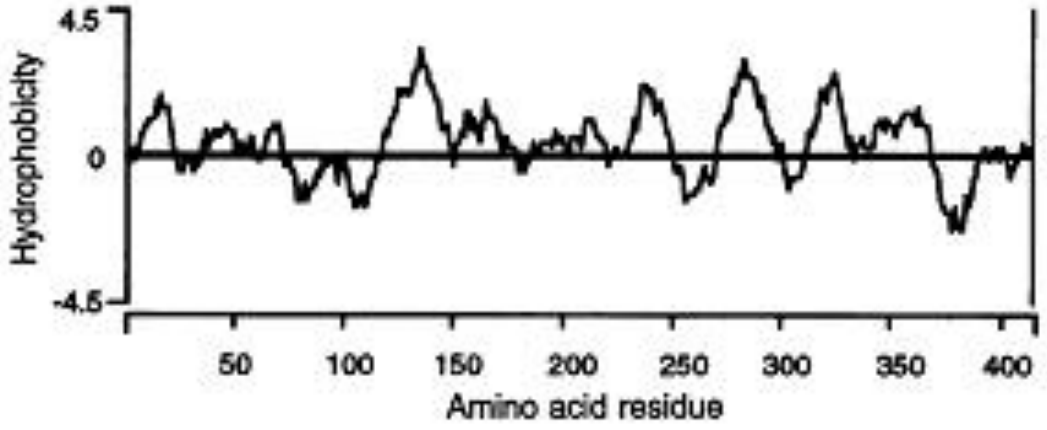
Ο μοριακός χαρακτηρισμός των θέσεων δέσμευσης του CRF επιτεύχθηκε με την κλωνοποίηση της πρωτεΐνης που δεσμεύει τον CRF (υποδοχέας του CRF). Συγκεκριμένα, ανακαλύφθηκε ότι υπάρχουν δύο κύριοι τύποι υποδοχέα μέσω των οποίων ο CRF και τα συγγενή του πεπτίδια ασκούν τις πολλαπλές τους δράσεις, ο τύπος 1 (CRF_1) και ο τύπος 2 (CRF_2) [121-123]. Οι δυο αυτοί υποδοχείς, κωδικοποιούνται από γονίδια τα οποία εντοπίζονται στα χρωμοσώματα 17 και 7 αντίστοιχα στο ανθρώπινο γονιδίωμα [124]. Οι δυο τύποι του CRF υποδοχέα, CRF_1 και CRF_2, έχουν 70% ομολογία στην αμινοξική τους αλληλουχία, με τις κυριότερες διαφορές να εντοπίζονται στο αμινοτελικό άκρο και στους εξωκυττάριους βρόγχους [125].

Οι υποδοχείς του CRF ανήκουν στην οικογένεια Β των υποδοχέων που συζεύγνυνται με τις G πρωτεΐνες (G – protein coupled receptors ή GPCRs) (Εικόνα 7), η οποία περιλαμβάνει υποδοχείς πολλών φυσιολογικά σημαντικών ορμονών, πεπτιδίων και νευροπεπτιδίων, όπως το αγγειαδραστικό εντερικό πεπτίδιο (VIP), η καλσιτονίνη (calcitonin), η παραθορμόνη (PTH), η γλυκαγόνη (glucagon) την εκλυτική ορμόνη της αυξητικής ορμόνης (GHRF), η παραθυροειδής ορμόνη (PTH) η σεκρετίνη (secretin) και άλλες [126, 127].



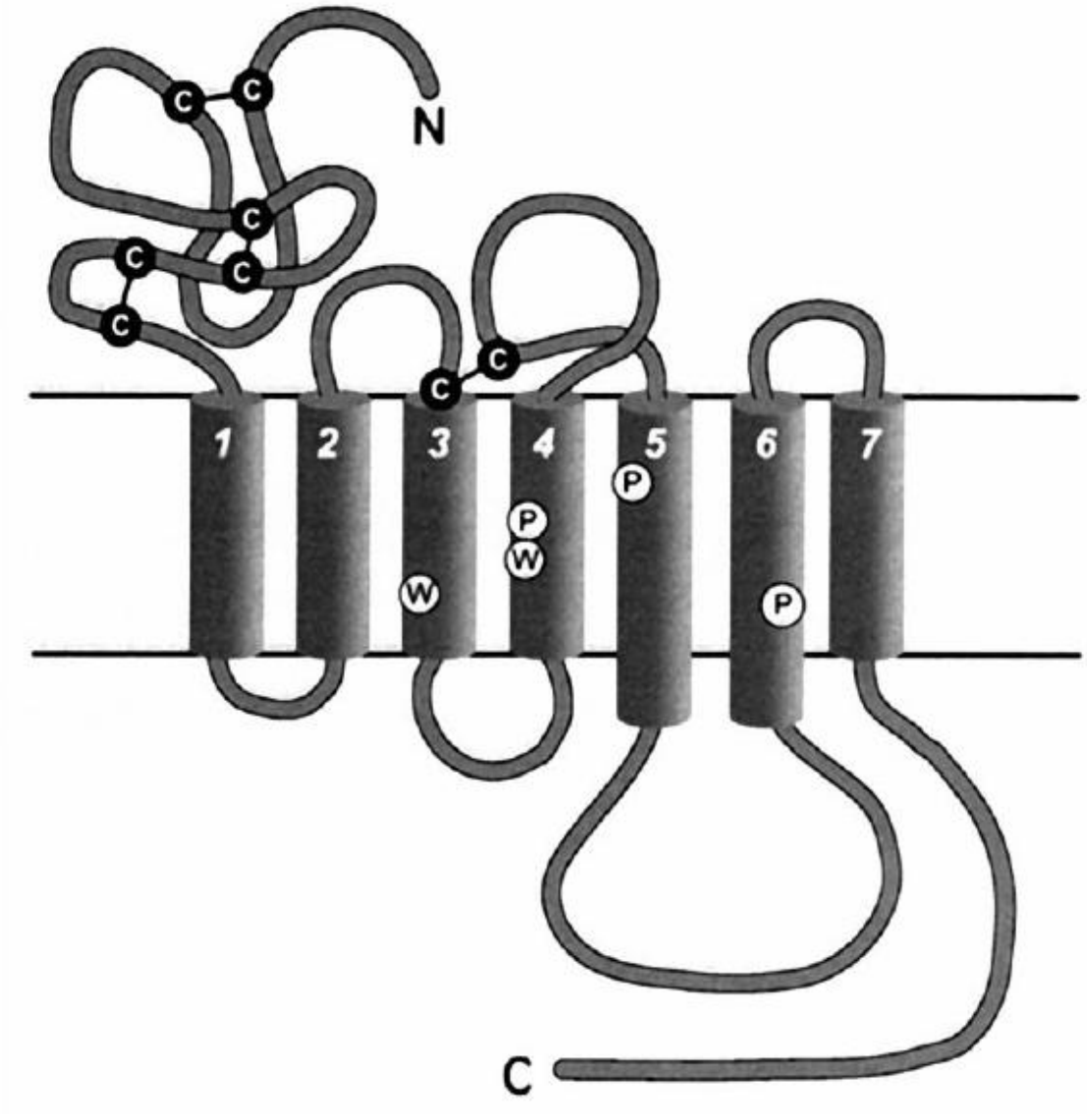
Εικόνα 7. *Οικογένειες υποδοχέων της υπεροικογένειας των GPCRs. Οι υποδοχείς του CRF ανήκουν στην οικογένεια Β των GPCRs. Από Harmar et al. [126]*

Οι υποδοχείς του CRF όπως και οι άλλοι GPCRs με βάση την ανάλυση της υδροφοβικότητας των αμινοξέων του (εικόνα 8) αποτελούνται από 7 διαμεμβρανικές περιοχές.



Εικόνα 8. *Kyte-Doolittle ανάλυση της υδροφοβικότητας της αλληλουχίας των αμινοξέων του CRF_1, όπου διακρίνονται 8 υδρόφοβες περιοχές ~20 αμινοξέων, που αντιστοιχούν σε μία περιοχή εκ των οποίων οι 7 αντιστοιχούν στις διαμεμβρανικές περιοχές ενώ η $8^{η}$ βρίσκεται στην αρχή της εξωκυττάριας αμινοτελικής περιοχής του υποδοχέα. Από Chen et al. [121]*

Οι διαμεμβρανικές περιοχές των υποδοχέων του CRF (όπως και οι άλλοι GPCRs) συνδέονται μεταξύ τους με τρεις ενδοκυττάριους και τρεις εξωκυττάριους βρόγχους (εικόνα 8). Επίσης περιέχουν μία εξωκυττάρια αμινοτελική περιοχή και ένα ενδοκυττάριο καρβοξυτελικό άκρο (εικόνα 8). Κύριο χαρακτηριστικό της οικογένειας Β των GPCRs είναι το μεγάλο μήκος της εξωκυττάριας αμινοτελικής περιοχής (περίπου 100 αμινοξέα), που σχηματίζει 3 δισουλφιδικούς δεσμούς μεταξύ τους [127-130].



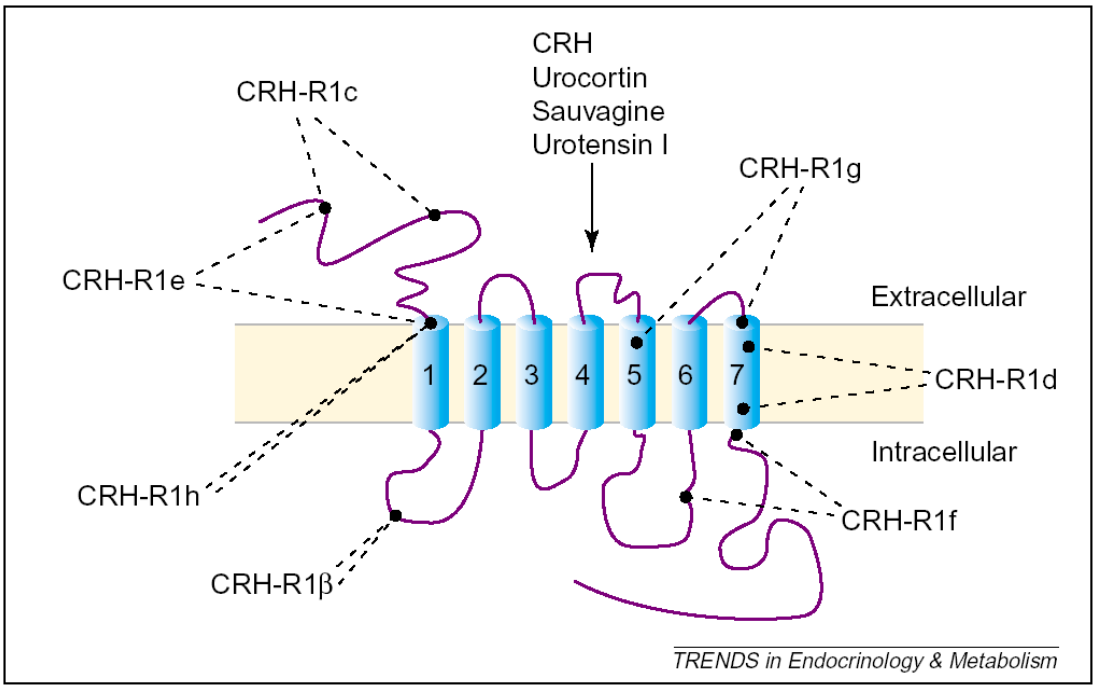
Εικόνα 8. Γραφική αναπαράσταση των υποδοχέων της οικογένειας Β. *Οι υποδοχείς αυτοί χαρακτηρίζονται από ένα αμινοτελικό άκρο μεγάλου μήκους, το οποίο περιέχει κυστεΐνες που σχηματίζουν δισουλφιδικούς δεσμούς. Οι διαμεμβρανικές περιοχές παριστάνονται με κυλίνδρους που μεταξύ τους ενώνονται εξωκυττάρια με τρεις εξωκυττάριους βρόγχους (παριστάνονται με ταινίες) και στο κυτταρόπλασμα με τρεις ενδοκυττάριους βρόγχους (παριστάνονται με ταινίες). Η εξωκυττάριος αμινοτελική περιοχή των υποδοχέων αυτών περιέχει 6 κυστεΐνες (κύκλοι με το γράμμα C) που ενώνονται μεταξύ τους με δισουλφιδικούς δεσμούς (γραμμές που ενώνουν τις κυστεΐνες). Από Gether et al [127].*

Πρόσφατα βρέθηκε ότι οι CRF_1 και CRF_2 αποτελούνται από διαφορετικές ισομορφές που έχουν προκύψει από εναλλακτικό κόψιμο και μάτισμα των εξονίων τους [35, 125]. Συγκεκριμένα ο CRF_1 έχει οκτώ ισομορφές τις CRH-R1α, CRH-R1β, CRH-R1c, CRH-R1d, CRH-R1e, CRH-R1f, CRH-R1g, CRH-R1h και ο CRF_2 τρεις, που είναι οι CRH-R2α, CRH-R2β και CRH-R2γ.

Οι διαφορετικές ισομορφές του CRF_1 διαφέρουν δομικά μεταξύ τους (εικόνες 9 και 10). Έτσι ο CRH-R1β διαθέτει 29 επιπρόσθετα αμινοξέα στον πρώτο ενδοκυττάριο βρόγχο, σε σύγκριση με τον CRH-R1α [35, 125]. Ο CRH-R1c διαθέτει 40 λιγότερα αμινοξέα στο αμινοτελικό άκρο από τον CRH-R1α, ενώ ο CRH-R1d 14 αμινοξέα λιγότερα στην έβδομη διαμεμβρανική περιοχή από τον CRH-R1α. [35, 125]

Ισομορφές	**Δομικά χαρακτηριστικά**
CRH-R1α (415 αμινοξέα)	Περιέχει 13 εξόνια
CRH-R1β (444 αμινοξέα)	Εισαγωγή εξονίου μετά το εξόνιο 5 = CRF_1 με επιπλέον 29 αμινοξέα στον πρώτο εξωκυττάριο βρόγχο
CRH-R1c (375 αμινοξέα)	Διαγραφή εξονίου 3 = CRF_1 με 40 αμινοξέα να λείπουν από το αμινοτελικό άκρο
CRH-R1d (401 αμινοξέα)	Διαγραφή εξονίου 12 = CRF_1 με 14 αμινοξέα να λείπουν από την έβδομη διαμεμβρανική περιοχή
CRH-R1e (194 και 240 αμινοξέα)	Διαγραφή εξονίων 3 και 4 = Σχηματισμός διαλυτής πρωτεΐνης με τα πρώτα 40 αμινοξέα του αμινοτελικού άκρου του CRF_1και 154 διαφορετικά αμινοξέα και μιας άλλης που την τρίτη διαμεμβρανική περιοχή των CRF_2 μέχρι το καρβοξυτελικό άκρο του.
CRH-R1f (370 αμινοξέα)	Διαγραφή εξονίου 11 = Πρωτεΐνη η οποία περιέχει το αμινοτελικό άκρο και τις πρώτες 5 διαμεμβρανικές περιοχές των R1α, ενώ τα υπόλοιπα 60 αμινοξέα είναι διαφορετικά
CRH-R1g (341 αμινοξέα)	Διαγραφή του εξονίου 10, 27 βάσεις του εξονίου 9 και 28 βάσεις του εξονίου 11 = CRF_1 με 74 αμινοξέα να λείπου συνολικά από την πέμπτη διαμεμβρανική περιοχή, τον τρίτο εξωκυττάριο βρόγχο, την έκτη διαμεμβρανική περιοχή και τον τρίτο εξωκυττάριο βρόγχο
CRH-R1h (145 αμινοξέα)	Εισαγωγή εξονίου μετά το εξονιο 4, διακοπή μετάφρασης

Εικόνα 9. *Ισομορφές του CRF_1.*

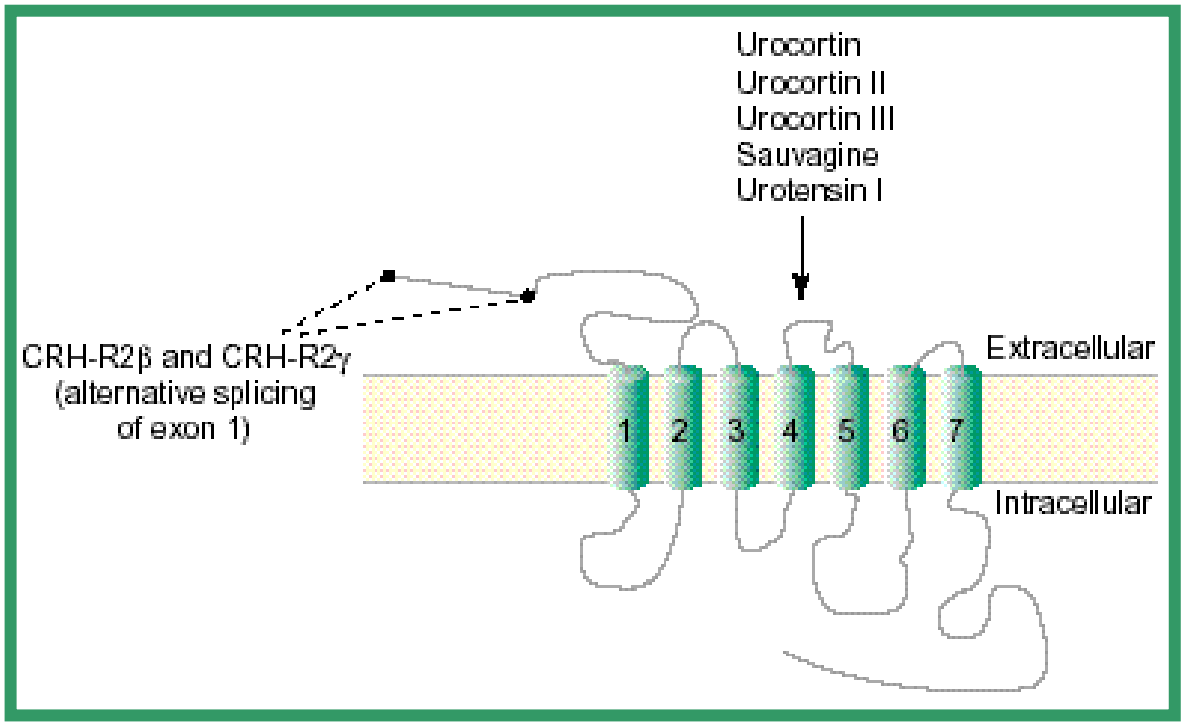


Εικόνα 10. Γραφική αναπαράσταση των ισομορφών του CRF_1. *Οι διάφορες ισομορφές του CRF_1 δημιουργούνται με διαφορετικό τρόπο κοπής και ματίσματος της ισομορφής CRH-R1α. Στις ισομορφές αυτές διακρίνονται απαλοιφές ή εισαγωγές αμινοξέων στις θέσεις που σημειώνονται με διακεκομμένες γραμμές. Από Grammatopoulos και Chrousos [123].*

Παρόμοια με τον CRF_1 έτσι και οι ισομορφές του CRF_2 διαφέρουν δομικά μεταξύ τους αλλά μόνο στο αμινοτελικό τους άκρο, όπου ο CRH-R2α διαθέτει 34 αμινοξέα, ο CRH-R2β 61 αμινοξέα και ο CRH-R2γ 20 αμινοξέα (εικόνες 11 και 12) [35].

Υπότυποι CRF_2	**Δομικά χαρακτηριστικά**
CRH-R2α (411 αμινοξέα)	Περιέχει 12 εξόνια, το εξόνιο 1 κωδικοποιεί 34 αμινοξέα στο αμινοτελικό άκρο
CRH-R2β (438 αμινοξέα)	Εναλλακτικό εξόνιο στη θέση 1, κωδικοποιεί 61 αμινοξέα στο αμινοτελικό άκρο
CRH-R2γ (397 αμινοξέα)	Εναλλακτικό εξόνιο στη θέση 1, κωδικοποιεί 20 αμινοξέα στο αμινοτελικό άκρο

Εικόνα 11. *Ισομορφές του CRF_2.*



Εικόνα 12. Γραφική αναπαράσταση των ισομορφών του CRF_2. *Οι δύο ισομορφές του CRF_2 ,CRH-R2β και CRH-R2γ διαφέρουν από την ισομορφή CRH-R2α στο αμινοτελικό τους άκρο. Συγκεκριμένα, η ισομορφή CRH-R2α έχει 34 αμινοξέα στην αμινοτελική περιοχή της τα οποία όταν αντικαθίστανται από 64 ή 20 αμινοξέα σχηματίζουν τις ισομορφές CRH-R2β και CRH-R2γ, αντίστοιχα Από Grammatopoulos και Chrousos [123].*

Επιπρόσθετα των CRF_1 και CRF_2 βρέθηκε στο γατόψαρο ένας τρίτος τύπος του CRF υποδοχέα, CRF_3 [131]. Ο τύπος αυτός εντοπίστηκε κυρίως στην ουρόφυση του γατόψαρου [125]

1.6 Φαρμακολογικές ιδιότητες υποδοχέων CRF

Φαρμακολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι τα συγγενή με τον CRF πεπτίδια, ουροκορτίνη (Ucn) και σοβαγίνη (Sauvagine) δεσμεύονται με παρόμοιες συγγένειες στους δύο τύπους υποδοχέα του CRF (CRF_1 και CRF_2) (εικόνα 13) [132]. Αντίθετα, ο CRF του ανθρώπου / αρουραίου (rat/human CRF, ή h/rCRF) και ο CRF του προβάτου (sheep CRF ή oCRF) δεσμεύονται με μεγαλύτερη συγγένεια στον CRF_1 από ότι στον CRF_2 [132]. Από τους h/rCRF και oCRF ο δεύτερος έχει το μεγαλύτερο βαθμό CRF_1-εκλεκτικότητας γιατί η συγγένεια δέσμευσης του για τον CRF_1 είναι περίπου ~200 φορές μεγαλύτερη από εκείνη για τον CRF_2, ενώ ο η αντίστοιχη διαφορά στις συγγένειες δέσμευσης του h/rCRF για τους δύο τύπους υποδοχέων είναι μόνο 14 φορές περίπου (εικόνα 13)

Peptide	Binding (K_i, nM)	
	$hCRF_1$	$rCRF_{2\alpha}$
CRF (rat/human)	3.3	42
CRF (sheep)	1.1	230*
Ucn (rat)	0.32	2.2
Ucn (human)	0.4	0.3*
Ucn II (human)	>100	1.7
Ucn II (mouse)	>100	2.1
Ucn III (human)	>100	21.7
Ucn III (mouse)	>100	5.0
Urotensin I (fish)	0.4	1.8*
Sauvagine (frog)	0.7	0.5*

Εικόνα 13. *Συγγένειες δέσμευσης διαφόρων πεπτιδίων της οικογένειας του CRF με τους CRF_1 και CRF_2.Από Reul and Holsboer [33]*

Επιπρόσθετα, ή ανθρώπινη ουροκορτίνη παρουσιάζει σε σχέση με τον h/rCRF περίπου 10 φορές μεγαλύτερη συγγένεια δέσμευσης για τον CRF_1 και περίπου 50 φορές μεγαλύτερη συγγένεια δέσμευσης για τον CRF_2 (εικόνα 13). Λαμβάνοντας υπόψη ότι η ουροκορτίνη εκφράζεται σε περιοχές του εγκεφάλου στις οποίες εκφράζεται και ο CRF_2, οι Vaughan et al. υπέθεσαν ότι η ουροκορτίνη είναι ο 'φυσιολογικός' ενδογενής CRF_2 αγωνιστής, ενώ ο CRF είναι ο 'φυσιολογικός' ενδογενής CRF_1 αγωνιστής [31]. Σε αντίθεση με τους CRF_1-εκλεκτικούς oCRF και CRF, οι ουροκορτίνες II και III είναι CRF_2-εκλεκτικές, γιατί δεσμεύονται στον CRF_2 με συγγένεια δέσμευσης πάνω από 100 φορές μεγαλύτερη εκείνης με την οποία δεσμεύονται στον CRF_1 [41, 42].

Εκτός από τα φυσιολογικά πεπτίδια, έχουν συντεθεί διάφορα ανάλογα του CRF, όπως η κορταγίνη που έχει ιδιότητες αγωνιστή. Η κορταγίνη παρόμοια με τους oCRF και CRF είναι CRF_1-εκλεκτική, αφού δεσμεύεται με πολύ μεγαλύτερη συγγένεια στον CRF_1 από ότι στον CRF_2 [53] Έτσι λοιπόν μέσω αλληλεπίδρασης της με τον CRF_1 η κορταγίνη (όπως και ο oCRF) εγχυόμενη στις κοιλίες του εγκεφάλου προκαλεί εκδηλώσεις άγχους [53].

Αντίθετα με την κορταγίνη, τα συνθετικά πεπτίδια άλφα ελικοειδή CRF(9 – 41) και αστρεσίνη [astressin: cyclo(30 – 33)], [$DPhe^{12}$,Nle^{21}, Glu^{30}, Lys^{33}, Nle^{38}] hCRF(12 – 41), τα οποία συνδέονται μη εκλεκτικά και στους δυο τύπους του CRF υποδοχέα δρουν ως ανταγωνιστές [49, 104, 132]. Πρόσφατα επιτεύχθηκε η σύνθεση ανταγωνιστών όπως το ανάλογο της αστρεσίνης, αστρεσίνη – 2B, καθώς και το ανάλογο της σοβαγίνης, αντισοβαγίνη – 30, τα οποία δεσμεύονται με πολύ μεγαλύτερη συγγένεια στον CRF_2 από ότι στον CRF_1. [50, 51].

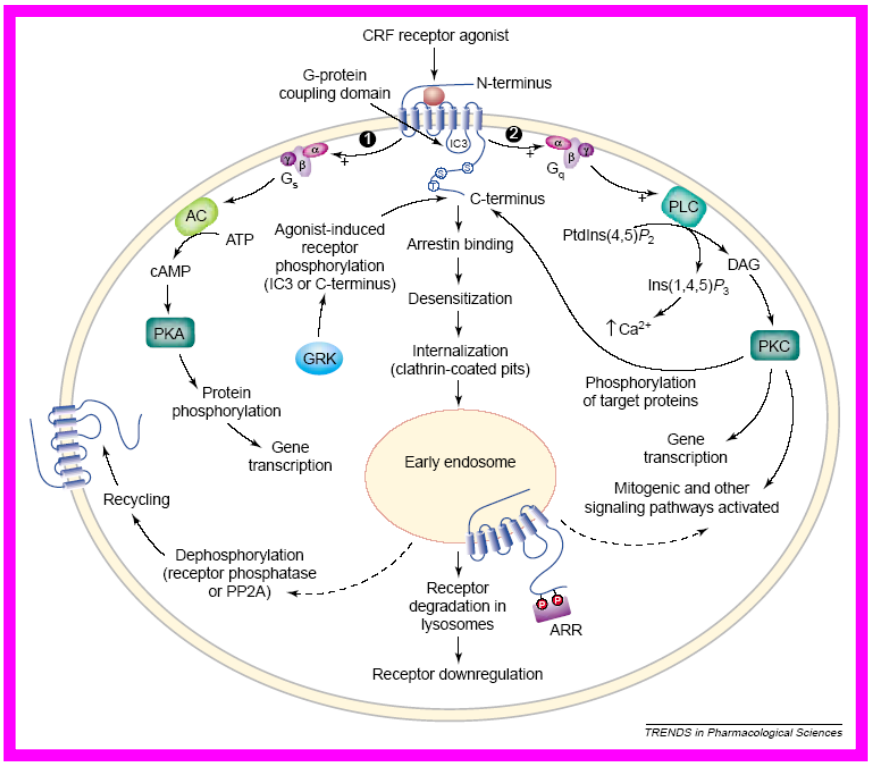
Παράλληλα με τη σύνθεση των παραπάνω πεπτιδικών αναλόγων του CRF και της σοβαγίνης, επιτεύχθηκε η σύνθεση διαφόρων μη πεπτιδικών μικρομοριακών αναλόγων εκλεκτικών για τον CRF_1, όπως, της ανταλαρμίνης, του R121919, του NBI 35965 και του NBI 27914 τα οποία έχουν δράση ανταγωνιστή *[54, 55, 128]*. Οι CRF_1– εκλεκτικοί αυτοί μικρομοριακοί ανταγωνιστές χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό του ρόλου του CRF_1 σε διάφορες φυσιολογικές και παθοφυσιολογικές καταστάσεις, όπως άγχους και κατάθλιψης, καθώς και για την αντιμετώπιση των τελευταίων [128].

Υποδοχείς του CRF και κυτταρική σηματοδότηση

Η δέσμευση των πεπτιδίων της οικογένειας του CRF στους υποδοχείς τους έχει σαν αποτέλεσμα τη διέγερση τους, και τη μετέπειτα ενεργοποίησή των G_s πρωτεϊνών που συζεύγνυνται με τους υποδοχείς αυτούς [35]. Στη συνέχεια οι ενεργοποιημένες G_s πρωτείνες, διεγείρουν το ένζυμο της αδενυλικής κυκλάσης, με αποτέλεσμα την παραγωγή 3', 5' – κυκλικής μονοφωσφορικής αδενοσίνης (κυκλικού AMP) [35]. Πιο συγκεκριμένα, η ενεργοποίηση των G_s πρωτεϊνών (που είναι ένα τριμερές σύμπλοκο αποτελούμενο από τις υπομονάδες G_α, G_β και G_γ και το οποίο αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα) έχει σαν αποτέλεσμα το GDP που είναι δεσμευμένο στη G_α – υπομονάδα, να εκτοπιστεί από GTP και έτσι οι G_β και G_γ να αποχωριστούν (σαν διμερές) από τη G_α – GTP υπομονάδα [133]. Οι ενεργοποιημένες G_s υπομονάδες στη συνέχεια τροποποιούν τη δραστηριότητα διαφόρων κυτταρικών σηματοδοτικών μονοπατιών συμπεριλαμβανομένου και εκείνου του ενζύμου της αδενυλοκυκλάσης η οποία διεγείρεται από τη G_α – GTP υπομονάδα [133]. Στη συνέχεια η ενεργοποιημένη αδενυλοκυκλάση μετατρέπει το ATP σε κυκλικό AMP το οποίο με τη σειρά του ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση A, προκαλώντας έτσι έναν καταρράκτη φωσφορυλιώσεων που οδηγεί σε συγκεκριμένο βιολογικό αποτέλεσμα [133]

Εκτός από τις G_s πρωτείνες οι υποδοχείς του CRF μπορούν να αλληλεπιδράσουν με και να διεγείρουν άλλες G – πρωτεΐνες, όπως τις G_i, G_o, G_z και $G_{q/11}$, με αποτέλεσμα την τροποποίηση της λειτουργίας διαφορετικών κυτταρικών σηματοδοτικών οδών (εικόνα 14) [35, 134]. Οι G_i αναστέλλουν τη λειτουργία της αδενυλοκυκλάσης, ενώ οι G_q ενεργοποιούν τη φωσφολιπάση C (PLC), η οποία στη συνέχεια υδρολύει τη φωσφατιδυλινοσιτόλη (PIP_2) σε διακυλγλυκερόλη (DAG) και 1, 4, 5 – τριφοσφωρική ινοσιτόλη (IP_3). Η διακυλγλυκερόλη στη συνέχεια ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση C (PKC), προκαλώντας έτσι αύξηση της πρωτεϊνικής φωσφορυλίωσης, ενώ η 1,4,5-τριφωσφορική ινοσιτόλη συμβάλει στην απελευθέρωση Ca^{+2} από ενδοκυττάριες αποθήκες ασβεστίου, το οποίο παίζει επίσης ρόλο στη κυτταρική σηματοδότηση [133].

Έτσι λοιπόν. οι υποδοχείς του CRF, αλληλεπιδρώντας με διαφορετικές G-πρωτεΐνες, μπορούν να ενεργοποιήσουν πλήθος διαφορετικών κυτταρικών σηματοδοτικών μονοπατιών, όπως τα εκείνα των PKC και cAMP/PKA, όπως αναφέραμε παραπάνω καθώς και άλλα συμπεριλαμβανομένων των PKB/Akt, ERK, p38 MAPK [65, 135-143].



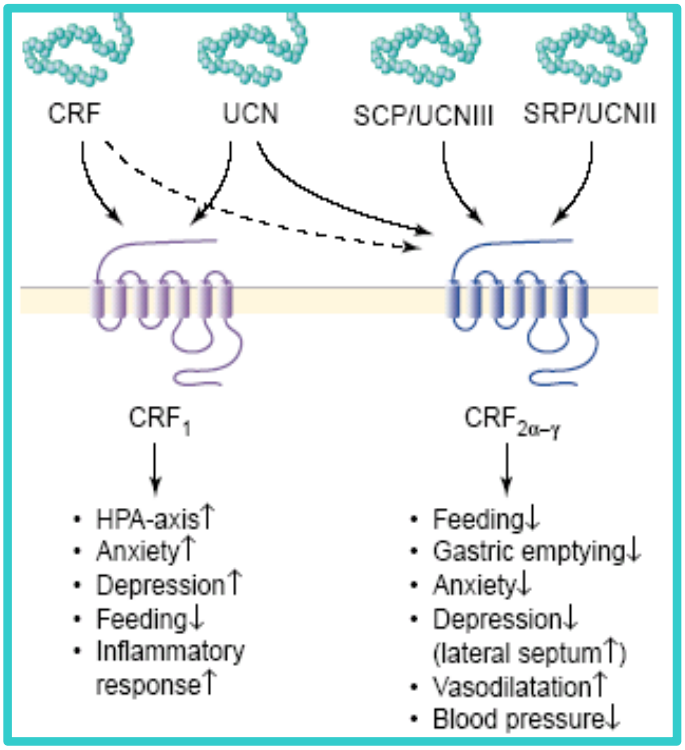
Εικόνα 14. *Ικανότητα του CRF_1 να συζεύγνυται με διαφορετικές G – πρωτεΐνες μετά από ενεργοποίηση του από τον CRF και συγγενή του πεπτίδια Από Dautzenberg et al. [32].*

Υπάρχουν ενδείξεις ότι σε διαφορετικούς ιστούς ο ίδιος υποδοχέας συνδέεται με διαφορετικές G–πρωτεΐνες και έτσι ενεργοποιεί διαφορετικές οδούς κυτταρικής σηματοδότησης [35]. Αυτό σημαίνει ότι ο CRF και τα συγγενή του πεπτίδια μπορούν να προκαλέσουν μέσω του ίδιου τύπου υποδοχέα διαφορετικές βιολογικές αποκρίσεις σε διαφορετικούς ιστούς στόχους [144-148]. Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με την ύπαρξη διαφορετικών τύπων υποδοχέα του CRF (και ισομορφών τους), καθώς και το διαφορετικό τρόπο έκφρασής τους σε διάφορους ιστούς, θα μπορούσε να εξηγήσει την εμφάνιση των πολλαπλών δράσεων των πεπτιδίων της οικογένειας του CRF.

Οι CRF υποδοχείς, όπως όλοι οι GPCRs, μετά από ενεργοποίησή τους από αγωνιστές, υπόκεινται σε μία σειρά τροποποιήσεων ώστε να αποφευχθεί η συνεχής κυτταρική σηματοδότηση. Αυτό επιτυγχάνεται αρχικά με φωσφορυλίωσή τους, διακοπή της αλληλεπίδρασης τους με τις G-πρωτεΐνες και ενδοκυττάρωση τους. [149-152]

1.7 Εντοπισμός υποδοχέων CRF

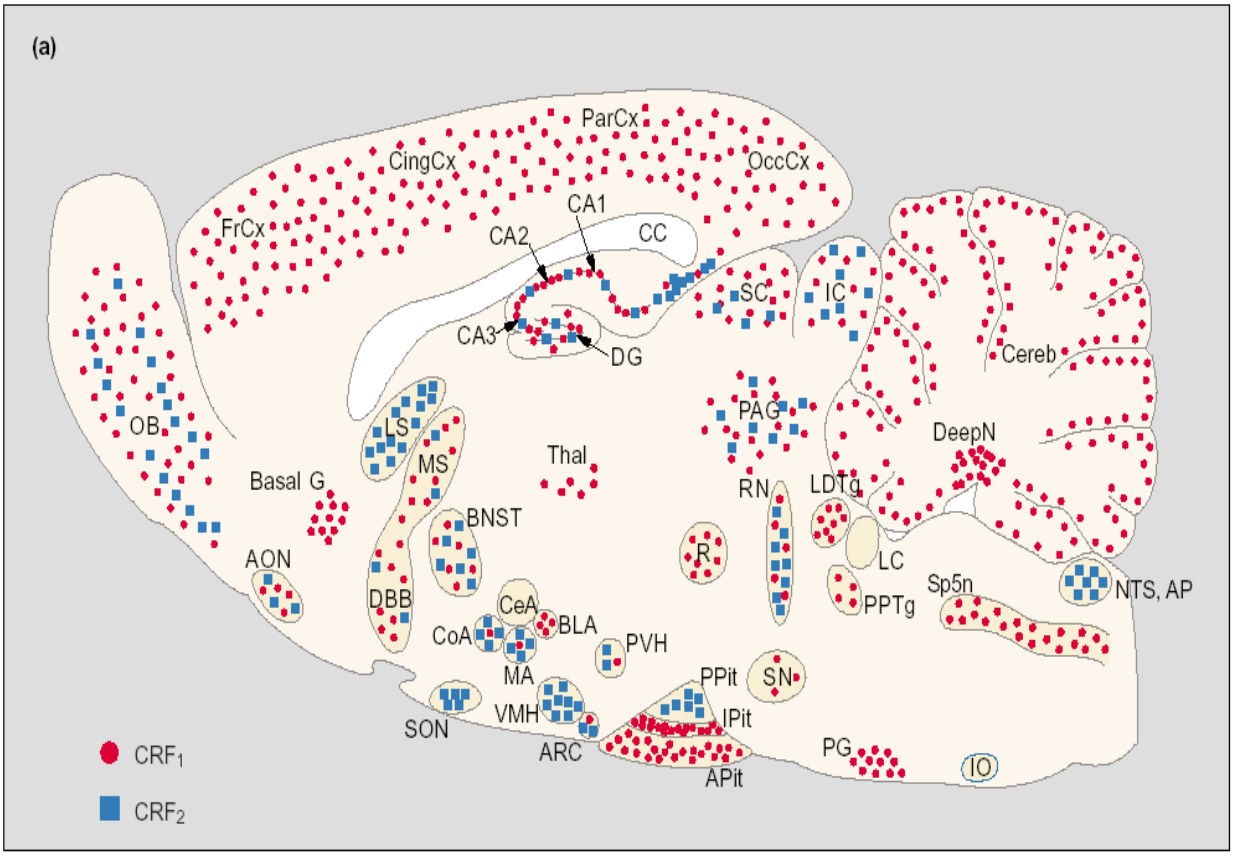
Η έκφραση των υποδοχέων του CRF τόσο στη περιφέρεια όσο και στο ΚΝΣ είναι τέτοια ώστε να δικαιολογεί τις δράσεις των διαφόρων πεπτιδίων της οικογένειας του CRF εικόνα 15) .



Εικόνα 15. *Βιολογικές δράσεις του CRF και των συγγενών του πεπτιδίων μετά από αλληλεπίδρασή τους με τους δύο τύπους του CRF υποδοχέα. Από Dautzenberg et al. [32].*

Για παράδειγμα ο CRF_1 εκφράζεται στον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης μέσω του οποίου το CRF_1-εκλεκτικό πεπτίδιο, CRF (που εντοπίζεται στον υποθάλαμο

και από τον οποίο εκλυόμενο φτάνει στην υπόφυση) διεγείρει την έκκριση της ACTH [33]. Ο CRF_1 εντοπίζεται επίσης σε αρκετές περιοχές του ΚΝΣ όπως σε φλοιό, παρεγκεφαλίδα, αμυγδαλή, ιππόκαμπο και οσφρητικούς βολβούς (εικόνα 16) [33, 60, 108]. Στην περιφέρεια, ο CRF_1 εντοπίζεται σε ωοθήκες, όρχεις, ενδομήτριο, μυομήτριο, πλακούντα, επινεφρίδια, λιπώδη ιστό, δέρμα, σπλήνα, κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος και έντερο [35, 99, 153, 154].



Εικόνα 16 *Κατανομή των CRF_1 και CRF_2 σε εγκέφαλο αρουραίου. Από Reul and Holsboer [33].*

Όπως ο CRF_1 έτσι και ο CRF_2 εκφράζεται τόσο σε διάφορες περιοχές του ΚΝΣ, όπως επικλινή πυρήνα διαφράγματος, υποθάλαμο, ιππόκαμπο, αμυγδαλή, βασικό πυρήνα της τελικής ταινίας, οσφρητικούς βολβούς και πυρήνες της ραφής (εικόνα 16), όσο και σε ιστούς της περιφέρειας, όπως καρδιά, πνεύμονες,

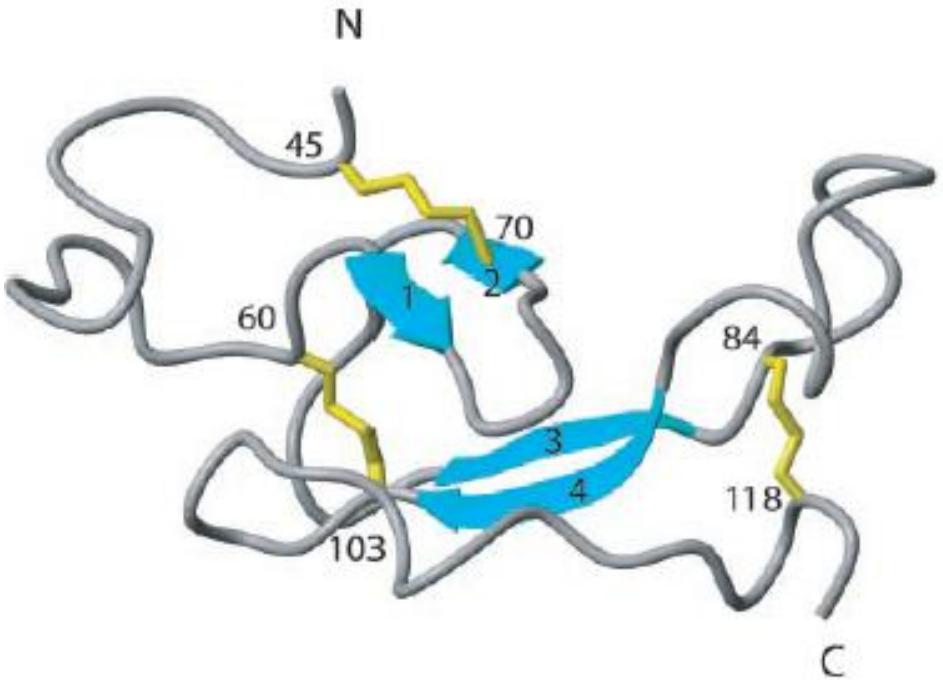
ωοθήκες, σκελετικούς μύες καθώς και στο γαστρεντερικό σύστημα [32 , 33, 35 , 99 , 154, 155 , 156].

Όσο αφορά την έκφραση των ισομορφών του CRF_1 οι CRH-R1α, CRH-R1β, CRH-R1c, CRH-R1d, CRH-R1e, CRH-R1f, CRH-R1g και CRH-R1h εντοπίζονται σε υποθάλαμο και πλακούντα, [82 , 121 , 123 , 125, 157 , 158]. Επιπρόσθετα, ο CRH-R1β βρέθηκε στην υπόφυση, καθώς και σε μυομήτριο, κύτταρα μαστού και ενδομήτριο [121, 159-161] . Οι ισομορφές του CRF_2, CRH-R2α και CRH-R2β ανιχνεύονται στον εγκέφαλο με τον CRH-R2α να βρίσκεται επίσης στην περιφέρεια όπως καρδιά, σκελετικοί μύες και μυομήτριο [35, 125].

1.8 Δομή των CRF υποδοχέων

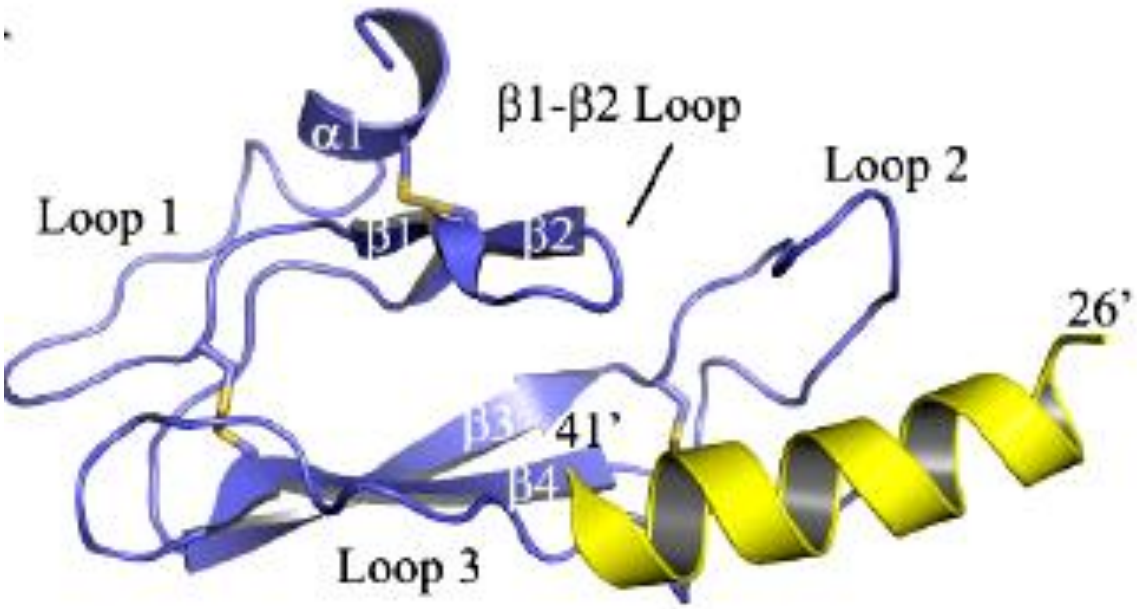
Από τις περιοχές των CRF_1 και CRF_2 εκείνες των οποίων η δομή έχει προσδιοριστεί είναι η αμινοτελική εξωκυττάριος περιοχή τους (N-περιοχή). Συγκεκριμένα, με τη χρήση φασματοσκοπίας NMR βρέθηκε ότι η N-περιοχή του CRF_2 αποτελείται από δύο αντιπαράλληλες δομές β-φύλλων, που περιλαμβάνουν τα αμινοξέα 63 – 64 (β1 τμήμα), 70 – 71 (β2 τμήμα), 79 – 82 (β3 τμήμα) και 99 – 102 (β4 τμήμα) [162, 163] (εικόνα 17). Η παραπάνω δομή σταθεροποιείται μέσω τριών δισουλφιδικών δεσμών μεταξύ των κυστεϊνών, Cys45-Cys70, Cys60-Cys103 και Cys84-Cys118, καθώς επίσης και με το σχηματισμό ενός κεντρικού συμπλέγματος αμινοξέων που σχηματίζουν μία εσωτερική γέφυρα άλατος μεταξύ των αμινοξέων ασπαρτικού οξέος στη θέση 65 και αργινίνης στη θέση 101 η οποία βρίσκεται ανάμεσα στους αρωματικούς δακτυλίους δύο αμινοξέων τρυπτοφάνης στις θέσεις 71 και 109. Το σύμπλοκο αυτό των αμινοξέων περιβάλλεται από μία στοιβάδα, αμινοξέων τα οποία διατηρούνται σε μεγάλο βαθμό, ανάμεσα στους υποδοχείς του CRF.

Η δομή της N-περιοχής του CRF_2 αναγνωρίστηκε ότι έχει τη χαρακτηριστική δομή της Sushi περιοχής/ short consensus repeat (SCR) που ορισμένες φορές ονομάζεται Complement Control Protein CCP και η οποία βρίσκεται σε πολλές διαφορετικές πρωτεΐνες παίζοντας σημασία στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους [129, 164-166].



Εικόνα 17. *Δομή του αμινοτελικού άκρου του CRF_2. Από Grace et al. [162]*

Πρόσφατα, η N-περιοχή του CRF_1 κρυσταλλώθηκε και η δομή της μελετήθηκε [167]. Από τις μελέτες αυτές φαίνεται ότι σε γενικές γραμμές (εκτός από ορισμένες διαφορές) η δομή της περιοχής αυτή του CRF_1 είναι όμοια με την αντίστοιχη του CRF_2. Δηλαδή στη N-περιοχή του CRF_1, όπως και στην αντίστοιχη του CRF_2 παρατηρούνται οι δύο αντιπαράλληλες δομές β – φύλλων (εικόνα 18) που ενώνονται μεταξύ τους με τρεις δισουλφιδικούς δεσμούς που διατηρούνται στην οικογένεια Β των GPCRs υποδοχέων. Επίσης όπως στον CRF_2, έτσι και η δομή της N-περιοχής του CRF_1 αναγνωρίστηκε ότι έχει τη χαρακτηριστική δομή της Sushi περιοχής/ short consensus repeat (SCR).

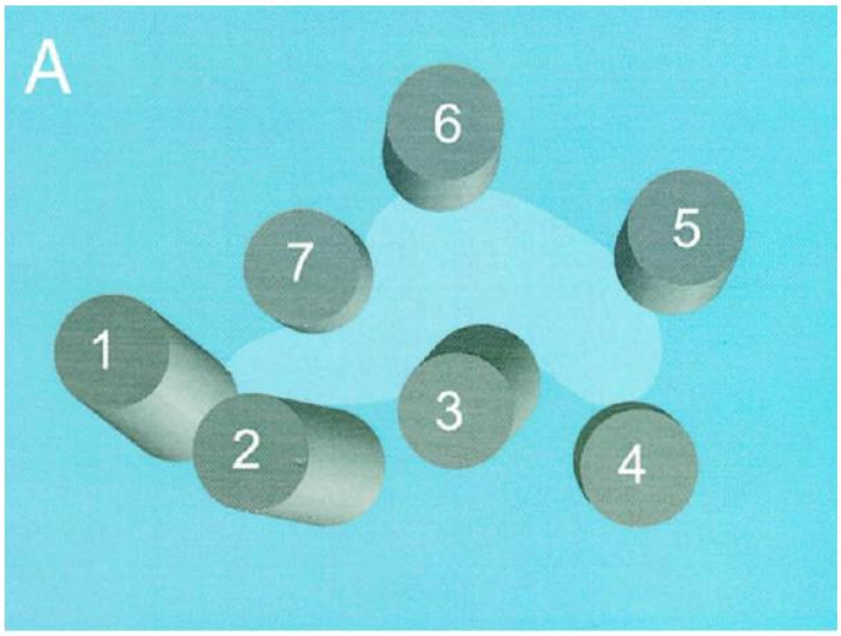


Εικόνα 18. *Δομή του αμινοτελικού άκρου του CRF_1. Από Pioszak et al. [168].*

Επιπρόσθετα των έξι κυστεϊνών στο αμινοτελικό άκρο του CRF_1 (και του CRF_2), υπάρχουν άλλες δύο, οι οποίες βρίσκονται στον πρώτο (θέση 188) και στο δεύτερο εξωκυττάριο βρόγχο (θέση 258) του υποδοχέα, και ενώνονται μεταξύ τους με δισουλφιδικό δεσμό ο οποίος προτάθηκε ότι παίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της λειτουργικής δομής του υποδοχέα [169]. υποδοχέων. Η σημασία των δύο αυτών κυστεινών στη λειτουργία των CRF υποδοχέων φαίνεται και από το γεγονός ότι αυτές διατηρούνται σχεδόν σε όλους τους GPCRs υποδοχείς στους οποίους σχηματίζοντας δισουλφιδικό δεσμό μεταξύ τους και παίζουν καθοριστικό ρόλο στη διατήρηση της λειτουργικής δομής τους [170-175]. Επιπρόσθετα των κυστεινών των εξωκυττάριων περιοχών του CRF_1, ο υποδοχέας αυτός έχει άλλες 5 κυστεΐνες στις θέσεις 128, 211, 233, 364 και 150 που βρίσκονται στην πρώτη, τρίτη, τέταρτη, έκτη διαμεμβρανική περιοχή και στο πρώτο ενδοκυττάριο βρόγχο αντίστοιχα και των οποίων η σημασία τους στη λειτουργία του υποδοχέα είναι ακόμα άγνωστη.(εικόνα 17)

Παρά την πληθώρα των πληροφοριών για τη δομή του αμινοτελικού άκρου των υποδοχέων του CRF, η δομή των διαμεβρανικών περιοχών του δεν

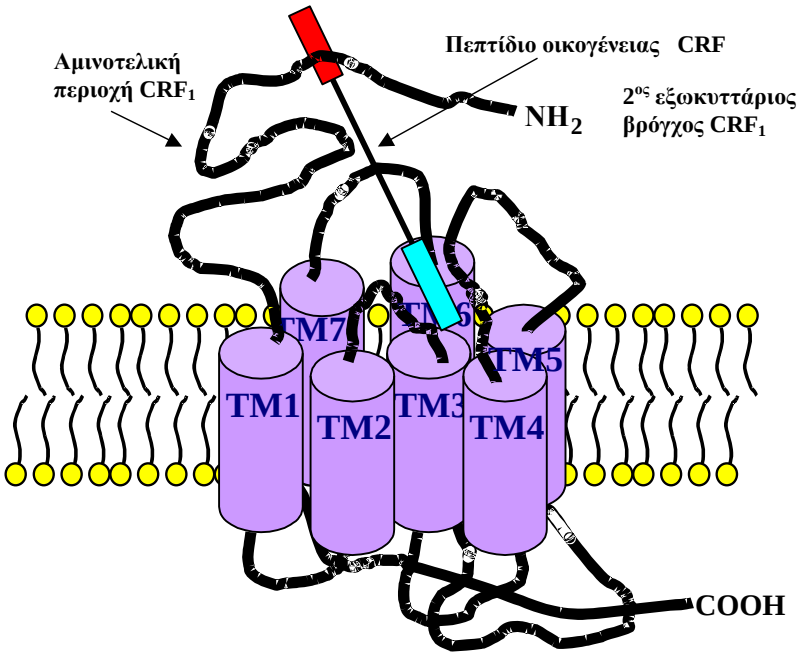
είναι ακόμη γνωστή σε αντίθεση με τη δομή των αντίστοιχων περιοχών των GPCRs της οικογένειας A όπως της ροδοψίνης, του β_1 και β_2 αδρενεργικού και του D_2 υποδοχέα της ντοπαμίνης. Η δομή των περιοχών αυτών προσδιορίστηκε τόσο σε κρυσταλλογραφικές μελέτες στους αδρενεργικούς υποδοχείς και στον υποδοχέα της ροδοψίνης όσο και σε μελέτες στον D2 υποδοχέα της ντοπαμίνης στις οποίες χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της διαθεσιμότητας των κυστεϊνών-υποκαταστατών (substituted-cysteine accessibility method, SCAM) [176-185]. Όλες οι μελέτες αυτές έδειξαν ότι οι διαμεμβρανικές περιοχές των υποδοχέων της οικογένειας A των GPCRs τοποθετούνται στο χώρο με τέτοιο τρόπο ώστε σχηματίζουν μια κοιλότητα θέσης δέσμευσης (εικόνα 19) που εκτείνεται από την εξωκυττάρια επιφάνεια του υποδοχέα ως το τμήμα του που βρίσκεται μέσα στη φωσφολιπιδική διπλοστιβάδα της πλασματικής μεμβράνης του κυττάρου. Η επιφάνεια της κοιλότητας αυτής βρίσκεται σε επαφή με το υδατικό εξωκυττάριο υγρό και περιέχει αμινοξέα που αλληλεπιδρούν με τα μικρομοριακά ανάλογα των υποδοχέων, όπως εκείνων της ντοπαμίνης και των κατεχολαμινών [186, 187].



Εικόνα 19*. Γραφική αναπαράσταση της κοιλότητας θέσεων δέσμευσης των GPCRs που σχηματίζεται από τις διαμεμβρανικές περιοχές τους. Από Gether et al. [127]*

1.9 Ρόλος των εξωκυττάριων και διαμεβρανικών περιοχών των CRF υποδοχέων στη δέσμευση του CRF και των αναλόγων του

Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι για τη δέσμευση του CRF και της σοβαγίνης στον CRF_1 σημαντικό ρόλο παίζει το τμήμα που βρίσκεται μεταξύ των αμινοξέων στις θέσεις 68 και 109 της εξωκυττάριας αμινοτελικής περιοχής (N-περιοχής) του υποδοχέα. [188, 189]. Αντίθετα τα πρώτα 31 αμινοξέα της αμινοτελική περιοχής του CRF_1 δεν είναι καθοριστικά για τη δέσμευση του CRF και της σοβαγίνης, καθώς αντικατάστασή τους από τα αντίστοιχα του ομόλογου υποδοχέα της παραθυρεοειδούς ορμόνης δεν άλλαξαν τα χαρακτηριστικά του, στη δέσμευση των πεπτιδίων [188]



Εικόνα 20. *Γραφική απεικόνιση της αλληλεπίδρασης των πεπτιδίων της οικογένειας του CRF με τον CRF_1. Η αμινοτελική εξωκυττάρια περιοχή του CRF_1 αλληλεπιδρά με το καρβοξυτελικό τμήμα των πεπτιδίων της οικογένειας του CRF (κόκκινο ορθογώνιο), ενώ το αμινοτελικό τμήμα των πεπτιδίων (μπλε ορθογώνιο) αλληλεπιδρά με τους εξωκυττάριους βρόγχους και τα εξωκυττάρια άκρα των διαμεβρανικών περιοχών του υποδοχέα.*

Το τμήμα των πεπτιδίων της οικογένειας του CRF που δεσμεύεται στην εξωκυττάρια N-περιοχή του CRF_1 βρέθηκε ότι είναι εκείνο που αντιστοιχεί στα καρβοξυτελικά αμινοξέα τους [190, 191]. Πρόσφατες μελέτες κρυσταλλογραφίας και NMR, προσδιόρισαν τον τρόπο αλληλεπίδρασης της εξωκυττάριας N-περιοχής των CRF_1 και CRF_2, με τα καρβοξυτελικά αμινοξέα των CRF και αστρεσίνης αντίστοιχα [162, 163, 168]. Από τις παραπάνω μελέτες προτάθηκε ότι τα πεπτίδια της οικογένειας του CRF δεσμεύονται στους υποδοχείς τους με δύο ομάδες αλληλεπιδράσεων, από τις οποίες η μια αφορά τη δέσμευση των καρβοξυτελικών αμινοξέων των πεπτιδίων της οικογένειας του CRF, με την N-περιοχή του CRF_1, και η άλλη τη δέσμευση των αμινοτελικών πεπτιδίων με τη J-περιοχή που απαρτίζεται από τους εξωκυττάριους βρόγχους και τις διαμεμβρανικές περιοχές των υποδοχέων (εικόνα 20) [192]. Ο τρόπος αυτός δέσμευσης των πεπτιδίων με τους CRF υποδοχείς βρίσκεται σε συμφωνία με μελέτες μεταλλαξιγένεσης στις οποίες βρέθηκε ότι τόσο ο πρώτος εξωκυττάριος βρόγχος όσο και ο δεύτερος και τρίτος καθώς και τα άνω τμήματα των διαμεβρανικών περιοχών του CRF_1, παίζουν ρόλο στη δέσμευση της σοβαγίνης και του CRF [191, 193-195]. Όμως στις μελέτες αυτές οι ακριβείς αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αμινοξέων των περιοχών αυτών και των πεπτιδίων δεν προσδιορίστηκαν.

Σε μια μελέτη που πραγματοποιήθηκε πρόσφατα για να διερευνηθεί ο τρόπος δέσμευσης των πεπτιδίων με τη J–περιοχή του CRF_1, βρέθηκε ότι όταν η σοβαγίνη είναι δεσμευμένη στον υποδοχέα τότε η λυσίνη της θέση 257 του δεύτερου εξωκυττάριου βρόγχου του CRF_1 βρίσκεται πολύ κοντά στο πεπτίδιο και μόλις σε απόσταση 11.4Å από αυτό [196]. Επιπρόσθετα, σε μια άλλη μελέτη βρέθηκε ότι το ίδιο πεπτίδιο όταν είναι δεσμευμένο στον CRF_1 βρίσκεται πολύ κοντά στην ιστιδίνη της πρώτης διαμεμβρανικής περιοχής του υποδοχέα και μόλις σε απόσταση 9Å από αυτή [197]. Παρόμοια με τη σοβαγίνη, όταν η ουροκορτίνη είναι δεσμευμένη στον CRF_1, τότε ένα τμήμα της βρίσκεται πολύ κοντά στο δεύτερο εξωκυττάριο βρόγχο, ενώ ένα άλλο βρίσκεται κοντά στο πρώτο εξωκυττάριο βρόγχο του υποδοχέα [198]. Σε όλες τις μελέτες αυτές τα αμινοξέα των πεπτιδίων που βρέθηκαν να είναι κοντά στους εξωκυττάριους

βρόγχους του CRF_1 ήταν αμινοτελικά. Τα αποτελέσματα αυτά βρίσκονται σε συμφωνία με τη θεωρία που διατυπώθηκε παραπάνω, δηλαδή ότι η J-περιοχή και άρα οι εξωκυττάριοι βρόγχοι των υποδοχέων του CRF δεσμεύουν τα αμινοτελικά αμινοξέα των πεπτιδίων. Όμως όλες οι παραπάνω μελέτες δεν προσδιόρισαν τις ακριβείς αλληλεπιδράσεις του CRF (και των συγγενών πεπτιδίων του) με τους υποδοχείς του.

Σε αντίθεση με τα πεπτίδια που δεσμεύονται στην αμινοτελική εξωκυττάρια περιοχή, στους εξωκυττάριους βρόγχους και τα άνω τμήματα των διαμεβρανικών περιοχών του CRF_1, τα μικρομοριακά μη πεπτιδικά ανάλογα του CRF όπως το NBI 27914 και η ανταλαρμίνη βρέθηκε ότι είναι πιθανόν να δεσμεύονται στις διαμεμβρανικές περιοχές του υποδοχέα. [192, 195]. Όμως απουσία άλλων μελετών μεταλλαξιγένεσης και σε συνδυασμό με την έλλειψη οποιαδήποτε πληροφορίας για τη δομή των διαμεβρανικών περιοχών τόσο του CRF_1 όσο και των άλλων υποδοχέων της οικογένειας Β (που ανήκει ο CRF_1), δεν επιτρέπει το προσδιορισμό των αλληλεπιδράσεων των μικρομοριακών αναλόγων του CRF με τα αμινοξέα των περιοχών αυτών.

ΣΚΟΠΟΣ

Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι το αμινοξύ His199 της τρίτης διαμεμβρανικής περιοχής (TM3) του CRF_1 παίζει έμμεσο ρόλο στη δέσμευση των μικρομοριακών μη πεπτιδικών ανταγωνιστών του CRF. Το γεγονός αυτό οδήγησε στην **υπόθεση** ότι αμινοξέα γειτονικά της TM3 αλληλεπιδρούν με τους μικρομοριακούς ανταγωνιστές του CRF. Όμως η έλλειψη πληροφοριών για τη δομή και λειτουργία των περιοχών αυτών του CRF_1 αποτελούσε μέχρι σήμερα εμπόδιο για την επαλήθευση της υπόθεσης αυτής.

Επιπρόσθετα της TM3 προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι το άνω τμήμα της πέμπτης διαμεμβρανικής περιοχής (TM5) παίζει ρόλο στη δέσμευση των πεπτιδίων της οικογένειας του CRF, οδηγώντας στην **υπόθεση** ότι τα αμινοξέα της περιοχής αυτής του υποδοχέα αλληλεπιδρούν με τα πεπτίδια. Όμως η έλλειψη πληροφοριών για τον ακριβή ρόλο του κάθε αμινοξέος της περιοχής αυτής στη δέσμευση των πεπτιδίων αποτελούσε μέχρι σήμερα εμπόδιο για την επαλήθευση της υπόθεσης αυτής.

Παράλληλα με τις TM3 και TM5 η τέταρτη διαμεμβρανική περιοχή (TM4) και συγκεκριμένα η θετικά φορτισμένη Lys250 που βρίσκεται στα όρια μεταξύ της TM4 και του δεύτερου εξωκυττάριου βρόχου του CRF_1 πρέπει να παίζει σημαντικό ρόλο στη λειτουργία του υποδοχέα. Η **υπόθεση** αυτή βασίστηκε στο γεγονός ότι το θετικό φορτίο στη θέση 250 του CRF_1 διατηρείται στην αντίστοιχη θέση όλων σχεδόν των υποδοχέων της οικογένειας στην οποία ανήκει ο CRF_1. Όμως η έλλειψη πληροφοριών για το ρόλο της Lys250 στη λειτουργία του CRF_1 αποτελούσε μέχρι σήμερα εμπόδιο για την επαλήθευση της υπόθεσης αυτής.

Σημαντικό ρόλο στη δέσμευση των πεπτιδίων της οικογένειας του CRF πρέπει επίσης να παίζουν τα αμινοξέα του δεύτερου εξωκυττάριου βρόγχου (EL2) του CRF_1. Η **υπόθεση** αυτή βασίστηκε στα αποτελέσματα προηγούμενης μελέτης η οποία έδειξε ότι η Lys257 του EL2 του CRF_1 βρίσκεται πολύ κοντά στη σοβαγίνη όταν αυτή είναι δεσμευμένη στον υποδοχέα. Όμως στη μελέτη αυτή δεν προσδιορίστηκαν οι αλληλεπιδράσεις της σοβαγίνης και των άλλων πεπτιδίων της οικογένειας του CRF τόσο με τη Lys257 ή / και με τα άλλα αμινοξέα του EL2 του CRF_1. Επιπρόσθετα, από τη προηγούμενη αυτή μελέτη μέχρι τη παρούσα ερευνητική εργασία δεν είχε προσδιοριστεί καμμία αλληλεπίδραση μεταξύ των

πεπτιδίων της οικογένειας του CRF και των αμινοξέων του EL2 του CRF_1 αποτελώντας έτσι εμπόδιο για την επαλήθευση της παραπάνω υπόθεσης.

Ο **σκοπός** της παρούσας ερευνητικής εργασίας ήταν να επαληθεύσει τις παραπάνω υποθέσεις και να :

1. *προσδιορίσει τη δομή και λειτουργία της τρίτης διαμεμβρανικής περιοχής του CRF_1*

2. *προσδιορίσει το ρόλο των αμινοξέων του άνω τμήματος της πέμπτης διαμεμβρανικής περιοχής του CRF_1 στη δέσμευση των πεπτιδίων της οικογένειας του CRF*

3. *προσδιορίσει το ρόλο της Lys250 του CRF_1 στη δέσμευση των πεπτιδίων της οικογένειας του CRF*

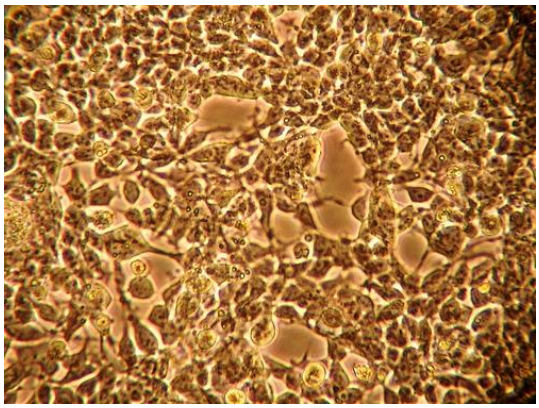
4. *προσδιορίσει το ρόλο των αμινοξέων του δεύτερου εξωκυττάριου βρόγχου του CRF_1 στη δέσμευση των πεπτιδίων της οικογένειας του CRF*

Αυτό επιτεύχθηκε με μια σειρά κατάλληλων πειραματικών προσεγγίσεων που περιγράφονται αμέσως παρακάτω μαζί με μια λεπτομερή ανάλυση και εξήγηση των αποτελεσμάτων τους.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΥΛΙΚΑ

Για την εκπόνηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής, χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά HEK293 (ευγενική προσφορά του Δρ. Jonathan Javitch, Columbia University, USA)



Εικόνα 1. *Φωτογραφία HEK293 κυττάρων*

Τα HEK293 κύτταρα (Human Embryonic Kidney 293 cells) προέρχονται από ανθρώπινα εμβρυϊκά κύτταρα νεφρού τα οποία επιμολύνθηκαν με DNA του ανθρώπινου αδενοϊού τύπου 5 (Ad)5, από τον Frank Graham στα τέλη της δεκαετίας του 70 [199]. Είναι επιδεικτικά στην επιμόλυνση και χρησιμοποιούνται ευρέως σε τεχνικές κυτταρικής βιολογίας εδώ και πολλά χρόνια.

2. ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Καλλιέργεια κυττάρων HEK293

Υλικά - Συσκευές

Θρεπτικό υλικό, DMEM/F12 (1:1) Dulbecco's Modified Eagle's Medium (GIBCO-BRL, Life Technologies, UK).
Ορός βοός, BCS (Bovine Calf Serum) (Hyclone, USA).

Τρυψίνη, Trypsin/EDTA (GIBCO-BRL, Life Technologies, UK).
Χρωστική Trypan Blue (GIBCO-BRL, Life Technologies, UK).
DMSO (Sigma, USA).
Φυγόκεντρος (Jouan CR422, France).
Μικροσκόπιο ορατού φωτός Olympus, Japan.
Πλάκα αιματοκυτταρομετρητή Neubauer.
Τρυβλία καλλιεργειών (SARSTEDT, Germany).
Επωαστικός κλίβανος Thermo Forma (Thermo Fisher Scientific Inc., USA).
Υπερκαταψύκτης (Bio-Freezer 8425, Forma Scientific, Inc USA)

Μέθοδος

Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό DMEM/F12 (1:1) που περιείχε 2,5 mM L-γλουταμίνη, 15 mM HEPES, 1,125 g/L $NaHCO_3$ εμπλουτισμένο με 10% ορό βοός, σε επωαστικό κλίβανο ρυθμισμένο σε θερμοκρασία 37^oC, ατμόσφαιρα 5% CO_2/95% αέρα και υγρασία 100%. Τα πειράματα έγιναν σε παρόμοια στάδια ανάπτυξης των κυττάρων. Το θρεπτικό υλικό ανανεωνόταν κάθε 72 ώρες και τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν για πείραμα είχαν φτάσει σε πυκνότητα 90% περίπου. Τα κύτταρα επιστρώθηκαν σε τρυβλία σε αρχική συγκέντρωση 10^5 κύτταρα/ml και ανακαλλιεργήθηκαν δύο φορές την εβδομάδα. Η αποκόλληση των κυττάρων έγινε με τρυψίνη - EDTA και η απενεργοποίησή της έγινε με προσθήκη 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 μεγένθυση 40x). Μέρος των κυττάρων σε κατάλληλη συγκέντρωση τοποθετήθηκε σε νέα τρυβλία για ανακαλλιέργεια ή χρησιμοποιήθηκε για την εκτέλεση πειραμάτων.

Τα κύτταρα καταψύχονταν σε τακτά χρονικά διαστήματα στους - 80^oC (και έπειτα από λίγες μέρες σε υγρό άζωτο), έτσι ώστε να διατηρούνταν σε χαμηλό

αριθμό γενεών και τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στην ίδια φάση της λογαριθμικής αύξησης των κυττάρων και περίπου στον ίδιο αριθμό γενιάς. Συγκεκριμένα, κυτταρικό εναιώρημα συγκεντρώσεως 5 x 10^6 κυττάρων σε υλικό κατάψυξης (BCS με 10% DMSO) τοποθετήθηκε σε σωληνάριο βαθιάς κατάψυξης υπό συνεχή ανάδευση. Ενώ η κατάψυξη των κυττάρων πραγματοποιήθηκε σταδιακά ώστε να εξασφαλιστεί η ακεραιότητά τους, η απόψυξή τους ήταν γρήγορη και άμεση. Τα κατεψυγμένα σωληνάρια που περιείχαν τα κύτταρα θερμάνθηκαν στους 37^{o}C υπό συνεχή ανάδευση και τα κύτταρα μεταφέρθηκαν άμεσα σε θρεπτικό υλικό καλλιέργειας.

2.2 Επιμόλυνση κυττάρων με πλασμιδιακό DNA

Υλικά - Συσκευές

Θρεπτικό υλικό, DMEM/F12 (1:1) Dulbecco's Modified Eagle's Medium (GIBCO-BRL, Life Technologies, UK).
Ορός βοός, BCS (Bovine Calf Serum) (Hyclone, USA).
Τρυψίνη, Trypsin/EDTA (GIBCO-BRL, Life Technologies, UK).
Φυγόκεντρος (Jouan CR422, France).
Χρωστική Trypan Blue (GIBCO-BRL, Life Technologies, UK).
DNA
Λιποφεκταμίνη, Lipofectamine (Invitrogen, USA).
Θρεπτικό υλικό, OptiMEM (GIBCO-BRL, Life Technologies, UK).
Μικροσκόπιο ορατού φωτός Olympus, Japan.
Πλάκα αιματοκυτταρομετρητή Neubauer.
Επωαστικός κλίβανος Thermo Forma (Thermo Fisher Scientific Inc., USA).
Τρυβλία καλλιεργειών (SARSTEDT, Germany).

Μέθοδος

HEK 293 κύτταρα που βρίσκονταν σε καλλιέργεια σε θρεπτικό υλικό DMEM/F12 (1:1) που περιείχε 2,5 mM L-γλουταμίνη, 15 mM HEPES, 1,125 g/L $NaHCO_3$ εμπλουτισμένο με 10% ορό βοός και σε τρυβλία διαμέτρου 100 mm, επιστρώθηκαν σε τρυβλίο διαμέτρου 60 mm ώστε την επόμενη μέρα να είχαν πυκνότητα 90% σύμφωνα με τη μέθοδο που αναφέρθηκε παραπάνω και διατηρήθηκαν σε καλλιέργεια σε επωαστικό κλίβανο ρυθμισμένο σε θερμοκρασία 37^oC, ατμόσφαιρα 5% CO_2/95% αέρα και υγρασία 100%. Την επόμενη μέρα 3 mg πλασμιδιακού DNA που κωδικοποιούσε τον CRF_1 (άγριο τύπο ή τη μεταλλαγμένη μορφή του) διαλύθηκε σε 200 μl OptiMEM. Ταυτόχρονα, σε 200 μl διαφορετικού OptiMEM διαλύθηκαν 7 μl λιποφεκταμίνης. Τα δύο αυτά μείγματα παρέμειναν σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά της ώρας και στη συνέχεια αναμίχθηκαν μεταξύ τους, σχηματίζοντας έτσι μείγμα OptiMEM 400 μl που περιείχε τη λιποφεκταμίνη και το πλασμιδιακό DNA μαζί. Το μείγμα αυτό επωάστηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 15 - 20 λεπτά της ώρας. Στο χρονικό αυτό διάστημα τα HEK 293 κύτταρα που βρισκόταν στο τρυβλίο διαμέτρου 60 mm εκπλύθηκαν με OptiMEM και προστέθηκαν σε αυτά 1600 μl OptiMEM. Στο τέλος της επώασης, το μείγμα των 400 μl του OptiMEM που περιείχε τη λιποφεκταμίνη και το πλασμιδιακό DNA, αναμίχθηκε με τα προαναφερθέντα 1600 μl OptiMEM, που υπήρχαν στο τρυβλίο με τα HEK 293 κύτταρα και επωάστηκαν για 3 - 18 ώρες σε θερμοκρασία 37^oC, ατμόσφαιρα 5% CO_2/95% αέρα και υγρασία 100%. Στο τέλος της επώασης, το διάλυμα των 2 ml OptiMEM/λιποφεκταμίνης/DNA, αφαιρέθηκε και στα κύτταρα προστέθηκε θρεπτικό υλικό DMEM/F12 (1:1) που περιείχε 2,5 mM L-γλουταμίνη, 15 mM HEPES, 1,125 g/L $NaHCO_3$ και 10% BCS. Μετά από 24 ώρες τα κύτταρα συλλέχθηκαν με σκοπό τη μελέτη των υποδοχέων του CRF_1 που εκφραζόταν σε αυτά παροδικά.

2.3 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).
Ορός βοός, BCS (Bovine Calf Serum) (Hyclone, USA).
Τρυψίνη, Trypsin/EDTA (GIBCO-BRL, Life Technologies, UK).
Χρωστική Trypan Blue (GIBCO-BRL, Life Technologies, UK).
Λιποφεκταμίνη, Lipofectamine (Invitrogen, USA).
Θρεπτικό υλικό, OptiMEM (GIBCO-BRL, Life Technologies, UK).
Γενετισίνη, Geneticin (GIBCO-BRL, Life Technologies, UK).
Επωαστικός κλίβανος Thermo Forma (Thermo Fisher Scientific Inc., USA).
Τρυβλία καλλιεργειών (SARSTEDT, Germany).

Μέθοδος

Μετά την επιμόλυνση και επώαση των HEK 293 κυττάρων για 3 - 18 ώρες με το μείγμα OptiMEM/λιποφεκταμίνης/DNA, αυτό αφαιρέθηκε και στα κύτταρα προστέθηκε θρεπτικό υλικό DMEM/F12 (1:1) που περιείχε 2,5 mM L-γλουταμίνη, 15 mM HEPES, 1,125 g/L $NaHCO_3$, 10% BCS, καθώς και το αντιβιοτικό γενετισίνη (G-418) σε συγκέντρωση 800 μg/ml.

Κάθε 48 ώρες το παραπάνω θρεπτικό υλικό ανανεωνόταν, μέχρι να θανατωθούν όλα τα κύτταρα που δεν εκφράζανε την πρωτεΐνη εκείνη, που τα καθιστά ανθεκτικά στο αντιβιοτικό. Το πλασμίδιο pCIN4 το οποίο περιείχε το DNA που κωδικοποιούσε τον CRF_1 ή τις μεταλλαγμένες μορφές του, περιείχε επίσης το γονίδιο που κωδικοποιούσε την πρωτεΐνη εκείνη (φωσφοτρανσφεράση της νεομυκίνης, ή NPT II) που καθιστούσε το κύτταρο ανθεκτικό στη γενετισίνη. Μετά την εμφάνιση αποικιών τα ανθεκτικά στη γενετισίνη κύτταρα μεταφέρθηκαν

σε τρυβλία και πολλαπλασιάστηκαν σε θρεπτικό υλικό DMEM/F12 (1:1) που περιείχε 2,5 mM L-γλουταμίνη, 15 mM HEPES, 1,125 g/L $NaHCO_3$, 10% BCS που περιείχε το αντιβιοτικό γενετισίνη. Οι κυτταρικές σειρές που δημιουργήθηκαν με την παραπάνω μέθοδο χρησιμοποιήθηκαν για τις ανάγκες των πειραμάτων.

2.4 Μέθοδος προσδιορισμού συγκέντρωσης πρωτεϊνών (Μέθοδος Bradford)

Υλικά - Συσκευές

Αλβουμίνη ορού βοός (Bovine Serum Albumin, BSA) (Sigma, USA).
Διάλυμα χρωστικής Coomassie Brilliant blue G-250 (Merck, USA).
Πλάκες 96 οπών, τύπου ELISA, επίπεδου πυθμένα (SARSTEDT, Germany).
Φωτόμετρο πλακών ELISA (Bio-Rad, Bio- Rad Life Technologies, USA).

Μέθοδος

Η μέθοδος Bradford [200] βασίζεται στην αντίδραση της χρωστικής Coomassie Brilliant blue G-250 με τις πρωτονιωμένες αμινομάδες των αμινοξέων της πολυπεπτιδικής αλυσίδας των πρωτεϊνών. Το κόκκινο χρώμα που έχει η ελεύθερη μορφή της χρωστικής μετατρέπεται σε μπλε, όταν συνδεθεί με πρωτεΐνη. Η μετατόπιση του μέγιστου απορροφήσεως της χρωστικής από τα 465 nm σε υψηλότερο μήκος κύματος 595 nm, μπορεί να προσδιορισθεί φωτομετρικά. Το σύμπλοκο της χρωστικής με την πρωτεΐνη έχει υψηλό συντελεστή απορροφήσεως, παρέχοντας κατ΄ αυτόν τον τρόπο μεγάλη ευαισθησία στη μέθοδο. Η σύνδεση της χρωστικής με την πρωτεΐνη γίνεται γρήγορα (2 λεπτά) και η σταθερότητα του χρώματος διατηρείται για μία ώρα. Η ποσοτική εκτίμηση των πρωτεϊνών κάθε δείγματος γίνεται με τη χρήση πρότυπης καμπύλης, η οποία κατασκευάζεται από τη ταυτόχρονη μέτρηση δειγμάτων γνωστών συγκεντρώσεων BSA (1 - 25 mg/ml). Το διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή των διαλυμάτων BSA είναι το ίδιο με το διάλυμα, στο οποίο

βρίσκονταν διαλυμένα τα υπό εξέταση δείγματα. Σε πλάκα 96 οπών τύπου ELISA τοποθετήσαμε 30 μl ανά οπή από κάθε γνωστό και άγνωστο δείγμα εις τριπλούν και στη συνέχεια προστέθηκαν 170 μl του διαλύματος χρωστικής. Ακολούθησε ανάδευση του μείγματος και μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (O.D.) σε μήκος κύματος 595 nm σε φωτόμετρο πλακών τύπου ELISA. Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης των άγνωστων δειγμάτων υπολογίστηκε βάσει της πρότυπης καμπύλης και εκφράστηκε σε μονάδες μg/ml.

2.5 Μετάλλαξη του DNA που κωδικοποιούσε τον ανθρώπινο CRF_1.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή χρησιμοποιήσαμε το DNA του ανθρώπινου CRF_1 (άγριο τύπος) που βρίσκεται στο πλασμίδιο pCIN4 (CRF_1/pCIN4). Το πλασμιδιακό αυτό DNA δημιουργήθηκε στο εργαστήριο μας, με υποκλωνοποίηση του DNA που κωδικοποιούσε τον ανθρώπινο CRF_1 που βρισκόταν στο πλασμίδιο pcDNA3 (ευγενική προσφορά του Δρ. Δημητρίου Γραμματόπουλου, Warwick University, UK) στο πλασμίδιο pCIN4 (ευγενική προσφορά του Δρ. Jonathan Javitch, Columbia University, USA). Το πλασμίδιο αυτό είχε μέγεθος 6552 βάσεων και περιείχε επίσης το γονίδιο που κωδικοποιούσε την πρωτεΐνη που προσδίδει αντοχή στο κύτταρο για το αντιβιοτικό γενετισίνη για τη μετέπειτα επιλογή κυττάρων που εκφράζανε μόνιμα το DNA του ανθρώπινου CRF_1 ή των μεταλλαγμένων μορφών του.

2.5.1 Δημιουργία μεταλλάξεων στο δεύτερο εξωκυττάριο βρόγχο και την πέμπτη διαμεμβρανική περιοχή του CRF_1

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή μεταλλάξαμε τα αμινοξέα του δεύτερου εξωκυττάριου βρόγχου του CRF_1 σε αλανίνη (δημιουργώντας έτσι τις μεταλλάξεις K250A, L251A, Y252A, Y253A, D254A, N255A, E256A, K257A, W259A, F260A, G261A, K262A, R263A, P264A, G265A, V266A καθώς επίσης και την ταυτόχρονη μετάλλαξη W259A/F260A και τα αμινοξέα της πέμπτης διαμεμβρανικής περιοχής του CRF_1 σε αλανίνη, δημιουργώντας έτσι τις

μεταλλάξεις Y267A, T268A, D269A, Y270A, I271A, Y272A, Q273A, G274A και P275A. Επίσης μεταλλάξαμε τις ενδογενείς κυστεΐνες που βρίσκονται στις θέσεις 128, 150, 211, 233 και 364 σε σερίνες, μία την κάθε φορά (δημιουργώντας έτσι τις μεταλλάξεις C128S, C150S, C211S, C233S, C364S), ή σε συνδυασμό ή όλες μαζί (δημιουργώντας έτσι το DNA, ΔCys/pCIN4 που κωδικοποιεί το μεταλλαγμένο υποδοχέα ΔCys). Ακόμη μεταλλάξαμε το αμινοξύ ιστιδίνη της τρίτης διαμεμβρανικής περιοχής σε αλανίνη (His199A) καθώς και τη Lys250 της τέταρτης διαμεμβρανικής περιοχής σε αλανίνη, αργινίνη, η γλουταμικό οξύ. Επίσης, μεταλλάξαμε, χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο το πλασμιδιακό ΔCys/pCIN4, τα αμινοξέα της τρίτης διαμεμβρανικής περιοχής του CRF_1 σε κυστεΐνες, ένα την κάθε φορά, δημιουργώντας με τον τρόπο αυτό τις μεταλλάξεις 189C, 190C, 191C, 192C, 193C, 194C, 195C, 196C, 197C, 198C, 199C, 200C, 201C, 202C, 203C, 204C, 205C, 206C, 207C, 208C, 209C, 210C, 212C, 213C και 214C. Αυτό επιτεύχθηκε με τη μέθοδο της μεταλλαξιγένεσης κατευθυνόμενης θέσης με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) (PCR site-directed mutagenesis) και αντικαθιστώντας τα νουκλεοτίδια εκείνα που κωδικοποιούσαντο εκάστοτε αμινοξύ X, με εκείνα που κωδικοποιούσαντην αλανίνη (Ala) τη κυστεΐνη (Cys) τη σερίνη (Ser), την αργινίνη (Arg), ή το γλουταμικό οξύ (Glu). Στη συνέχεια χρησιμοποιώντας τεχνικές μοριακής βιολογίας, όπως ηλεκτροφόρηση του DNA σε πήκτωμα αγαρόζης, απομόνωσή του από το πήκτωμα, ενζυμική πέψη, συρραφή του, μετασχηματισμός του σε βακτήρια E. coli, DH-10b, και απομόνωσή του από τα εν λόγω βακτήρια, δημιουργήσαμε το πλασμιδιακό DNA CRF_1/pCIN4 που φέρει την επιθυμητή μετάλλαξη η οποία παράλληλα είχε αφαιρέσει ή προσθέσει μια θέση ενζυμικής πέψης (CRF_1-mutant/ pCIN4).

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

Η μέθοδος της μεταλλαξιγένεσης κατευθυνόμενης θέσης με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αναπτύχθηκε από το Michael Smith (Nobel Prize in Chemistry 1993) και αποτελεί μια ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδο για τη μελέτη της δομής και λειτουργίας των πρωτεϊνών. Με τη μέθοδο αυτή μεταλλάξαμε τα νουκλεοτίδια του DNA, που κωδικοποιούσαν τα επιθυμητά αμινοξέα του CRF_1 σε άλλα χρησιμοποιώντας την τεχνική της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR) (Kary Mullis, Nobel Prize in Chemistry 1993) έχοντας ως εκμαγείο το πλασμιδιακό DNA που κωδικοποιούσε τον CRF_1/pCIN4 ή το ΔCys/pCIN4 και κατάλληλα σχεδιασμένα ολιγονουκλεοτίδια που χρησίμευαν ως εκκινητές, εκ των οποίων οι δυο είναι συμπληρωματικοί μεταξύ τους και περιείχαν την επιθυμητή μετάλλαξη (εκκινητές μετάλλαξης).

Το σημαντικότερο βήμα σε αυτήν τη διαδικασία ήταν ο σχεδιασμός των εκκινητών της μετάλλαξης έτσι ώστε ο εκκινητής και το εκμαγείο (πλασμιδιακό DNA CRF_1/pCIN4) να υβριδοποιούνταν σε ικανοποιητικό βαθμό. Έτσι επιτύχαμε την έναρξη της αντίδρασης πολυμεράσης παρά την ύπαρξη των νουκλεοτιδίων της μετάλλαξης που δεν ήταν συμπληρωματικά εκείνων του εκμαγείου. Για το σκοπό αυτό κατά το σχεδιασμό των εκκινητών που περιείχαν τη μετάλλαξη λάβαμε υπόψη μας τα παρακάτω:

- τα νουκλεοτίδια που κωδικοποιούσαν τη μετάλλαξη έπρεπε να βρίσκονταν στο μέσο του εκκινητή
- Τα 3’ άκρα του κάθε εκκινητή έπρεπε να είχαν τις βάσεις G ή C
- το ποσοστό των βάσεων GC σε κάθε εκκινητή έπρεπε να προσέγγιζε όσο το δυνατόν περισσότερο το 50% των νουκλεοτιδίων του εκκινητή

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

Υλικά - συσκευές

Ένζυμο πολυμεράσης: pfu DNA polymerase (Fermentas, USA).
Μίγμα ολιγονουκλεοτιδίων: dNTPs σε συγκέντρωση 2,5 mM (Fermentas, USA).
Ρυθμιστικό διάλυμα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης: pfu buffer 10X (Fermentas, USA).
Δείκτες γνωστού μοριακού βάρους: (Fermentas, USA) και (New England Biolabs, Inc., USA).
Αυτόματος Θερμικός Κυκλοποιητής PCR (Perkin Elmer PCR System 2400, USA).
Συσκευή οριζόντιας ηλεκτοφόρησης Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA).
Εκκινητές από τις εξής εταιρείες:
VBC-GENOMICS BIOSCIENCE Research GmbH, Austria.
Initrogen, USA.
VH Bio Ltd, UK.
Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας & Βιοτεχνολογίας

Εκκινητές (primers):
Sense pcDNA4 - 800: 5’ - GGCGTGTACGGTGGGAGG - 3’
Sense 908: 5’ - GGATCGATATCTGC - 3’
Antisense CRF_1-end: 5’ - CTAGTGGATCCCTACACTGCTGTGGAC - 3’
Antisense PAN4: 5’- GCAGACAGCGAATTAATTCCAGC -3’

Για τη μετάλλαξη K250A
Sense K250A: 5’- CTGGGCCATTGGTGCGCTGTACTAC -3’
Antisense K250A: 5’- GTAGTACAGCGCACCAATGGCCCAG -3’

Για τη μετάλλαξη L251A
Sense L251A: 5’- CATTGGGAAGGCGTACTACGAC -3’
Antisense L251A: 5’- GTCGTAGTACGCCTTCCCAATG -3’

Για τη μετάλλαξη Y252A

Sense Y252A: 5'- CATTGGGAAGCTTGCCTACGACAATG -3'

Antisense Y252A: 5'- CATTGTCGTAGGCAAGCTTCCCAATG -3'

Για τη μετάλλαξη Y253A

Sense Y253A: 5'- GAAGCTGTACGCGGACAATGAGAAG -3'

Antisense Y253A: 5'- CTTCTCATTGTCCGCGTACAGCTTC -3'

Για τη μετάλλαξη D254A

Sense D254A: 5'- GCTGTACTACGCGAATGAGAAG -3'

Antisense D254A: 5'- CTTCTCATTCGCGTAGTACAGC -3'

Για τη μετάλλαξη N255A

Sense N255A: 5'- GTACTACGACGCCGAGAAGTGCTG -3'

Antisense N255A: 5'- CAGCACTTCTCGGCGTCGTAGTAC -3'

Για τη μετάλλαξη E256A

Sense E256A: 5'- CTACGACAATGCTAAGTGCTGG -3'

Antisense E256A: 5'- CCAGCACTTAGCATTGTCGTAG -3'

Για τη μετάλλαξη K257A

Sense K257A: 5'- CGACAATGAGGCATGCTGGTTTG -3'

Antisense K257A: 5'- CAAACCAGCATGCCTCATTGTCG -3'

Για τη μετάλλαξη W259A

Sense W259A: 5'- GAGAAGTGCGCATTTGGCAAAAG -3'

Antisense W259A: 5'- CTTTTGCCAAATGCGCACTTCTC -3'

Για τη μετάλλαξη F260A

Sense F260A: 5'- GAAGTGCTGGGCTGGCAAAAGGC -3'

Antisense F260A: 5'- GCCTTTTGCCAGCCCAGCACTTC -3'

Για τη μετάλλαξη G261A

Sense G261A: 5'- GTGCTGGTTTGCGAAGAGGCCTGGGGTG -3'

Antisense G261A: 5'- CACCCCAGGCCTCTTCGCAAACCAGCAC -3'

Για τη μετάλλαξη K262A

Sense K262A: 5'- GCTGGTTTGGTGCTAGGCCTGGGGTG -3'

Antisense K262A: 5'- CACCCCAGGCCTAGCACCAAACCAGC -3'

Για τη μετάλλαξη R263A

Sense R263A: 5'- GTTTGGCAAAGCTCCTGGGGTGTAC -3'

Antisense R263A: 5'- GTACACCCCAGGAGCTTTGCCAAAC -3'

Για τη μετάλλαξη P264A

Sense P264A: 5'- GTTTGGCAAAAGGGCTGGGGTGTAC -3'

Antisense P264A: 5'- GTACACCCCAGCCCTTTTGCCAAAC -3'

Για τη μετάλλαξη G265A

Sense G265A: 5'- CAAAAGGCCTGCAGTATACACCGACTAC -3'

Antisense G265A: 5'- GTAGTCGGTGTATACTGCAGGCCTTTTG -3'

Για τη μετάλλαξη V266A

Sense V266A: 5'- CAAAAGGCCTGGGGCGTACACCGAC -3'

Antisense V266A: 5'- GTCGGTGTACGCCCCAGGCCTTTTG -3'

Για τη μετάλλαξη Y267A

Sense Y267A: 5'- GGCCTGGGGTAGCCACCGACTAC -3'

Antisense Y267A: 5'- GTAGTCGGTGGCTACCCCAGGCC -3'

Για τη μετάλλαξη T268A

Sense T268A: 5'- CTGGGGTGTACGCCGACTACATC -3'

Antisense T268A: 5'- GATGTAGTCGGCGTACACCCCAG -3'

Για τη μετάλλαξη D269A

Sense D269A: 5'- CTGGGGTGTATACCGCCTACATCTAC -3'

Antisense D269A: 5´- GTAGATGTAGGCGGTATACACCCCAG -3´

Για τη μετάλλαξη Y270A

Sense Y270A: 5'- GTACACCGACGCGATCTACCAGGGCCCC -3'

Antisense Y270A: 5'- GGGGCCCTGGTAGATCGCGTCGGTGTAC -3'

Για τη μετάλλαξη I271A

Sense I271A: 5'- CACCGACTACGCGTACCAGGGCCCC -3'

Antisense I271A: 5'- GGGGCCCTGGTACGCGTAGTCGGTG -3'

Για τη μετάλλαξη Y272A

Sense Y272A: 5'- CCGACTACATCGCGCAAGGCCCCATG -3'

Antisense Y272A: 5'- CATGGGGCCTTGCGCGATGTAGTCGG -3'

Για τη μετάλλαξη Q273A

Sense Q273A: 5'- CTACATCTACGCGGGACCCATGATCCTGG -3'

Antisense Q273A: 5'- CCAGGATCATGGGTCCCGCGTAGATGTAG -3'

Για τη μετάλλαξη G274A

Sense G274A: 5'- CATCTACCAGGCTCCCATGATCC -3'

Antisense G274A: 5'- GGATCATGGGAGCCTGGTAGATG -3'

Για τη μετάλλαξη P275A

Sense P275A: 5'- CTACATCTACCAAGGCGCTATGATCCTGG -3'

Antisense P275A: 5'- CCAGGATCATAGCGCCTTGGTAGATGTAG -3'

Για τη μετάλλαξη W259A/F260A

Sense W259A/F260A: 5'- CAATGAGAAGTGTGCAGCTGGCAAAAGGC -3'

Antisense W259A/F260A: 5'- GCCTTTTGCCAGCTGCACACTTCTCATTG -3'

Για τη μετάλλαξη K250R

Sense K250R: 5'- GGCCATTGGGCGTCTGTACTACG -3'

Antisense K250R: 5'- CGTAGTACAGACGCCCAATGGCC -3'

Για τη μετάλλαξη K250E

Sense K250E: 5'- GGGCCATTGGTGAGTTGTACTACGAC -3'

Antisense K250E: 5'- GTCGTAGTACAACTCACCAATGGCCC -3'

Για τη μετάλλαξη C128S

Sense C128S: 5'- CTACCTGGGACACAGTATCTCCCTGGTGG -3'

Antisense C128S: 5'- CCAGGGAGATACTGTGTCCCAGGTAGTTG -3'

Για τη μετάλλαξη C150S

Sense C150S: 5'- GAGCATCCGGAGCCTGCGAAAC -3'

Antisense C150S: 5'- GTTTCGCAGGCTCCGGATGCTC -3'

Για τη μετάλλαξη C211S

Sense C211S: 5'- CGGCGAGGGATCCTACCTGCACA -3'

Antisense C211S: 5'- TGCAGGTAGGATCCCTCGCCGAAC -3'

Για τη μετάλλαξη C233S

Sense C233S: 5'- GGATGTTCATATCGATTGGCTGGG -3'

Antisense C233S: 5'- CCCAGCCAATCGATATGAACATCC -3'

Για τη μετάλλαξη C364S

Sense C364S: 5'- GTGTTCTACAGCTTCCTTAATAGTGAGG -3'

Antisense C364S: 5'- CTCACTATTAAGGAAGCTGTAGAACAC -3'

Για τη μετάλλαξη 189C

Sense R189Cys: 5'- GGGCTGGTGCTGTTTGGTGACAG -3'

Antisense R189Cys: 5'- CTGTCACCAAACAGCACCAGCCC -3'

Για τη μετάλλαξη 190C

Sense L190Cys: 5'- CTGGTGCAGGTGTGTCACGGCCGCCTACAAC -3'

Antisense L190Cys: 5'- GTTGTAGGCGGCCGTGACACACCTGCACCAG -3'

Για τη μετάλλαξη 191C

Sense V191Cys: 5'- GTGCAGGTTGTGTACAGCCGCCTAC -3'

Antisense V191Cys: 5'- GTAGGCGGCTGTACACAACCTGCAC -3'

Για τη μετάλλαξη 192C

Sense T192Cys: 5'- CAGGTTGGTGTGTGCCGCGTACAACTACTTC -3'

Antisense T192Cys: 5'- GAAGTAGTTGTACGCGGCACACACCAACCTG -3'

Για τη μετάλλαξη 193C

Sense A193Cys: 5'- GTTGGTGACATGCGCCTATAACTACTTCC -3'

Antisense A193Cys: 5'- GGAAGTAGTTATAGGCGCATGTCACCAAC -3'

Για τη μετάλλαξη 194C

Sense A194Cys: 5'- GGTGACAGCCTGCTATAACTACTTCC -3'

Antisense A194Cys: 5'- GGAAGTAGTTATAGCAGGCTGTCACC -3'

Για τη μετάλλαξη 195C

Sense Y195Cys: 5'- GACAGCCGCATGTAACTACTTCC -3'

Antisense Y195Cys: 5'- GGAAGTAGTTACATGCGGCTGTC -3'

Για τη μετάλλαξη 196C

Sense N196Cys: 5'- GTGACAGCCGCGTACTGTTACTTCCATG -3'

Antisense N196Cys: 5'- CATGGAAGTAACAGTACGCGGCTGTCAC -3'

Για τη μετάλλαξη 197C

Sense Y197Cys: 5'- CCGCCTACAATTGCTTCCATGTG -3'

Antisense Y197Cys: 5'- CACATGGAAGCAATTGTAGGCGG -3'

Για τη μετάλλαξη 198C

Sense F198Cys: 5'- CTACAACTACTGCCACGTGACCAACTTC -3'

Antisense F198Cys: 5'- GAAGTTGGTCACGTGGCAGTAGTTGTAG -3'

Για τη μετάλλαξη 199C

Sense H199Cys: 5'- CAACTACTTCTGTGTGACGAACTTCTTCTGG -3'

Antisense H199Cys: 5'- CCAGAAGAAGTTCGTCACACAGAAGTAGTTG -3'

Για τη μετάλλαξη 200C

Sense V200Cys: 5'- CTACTTCCATTGCACCAACTTCTTC -3'

Antisense V200Cys: 5'- GAAGAAGTTGGTGCAATGGAAGTAG -3'

Για τη μετάλλαξη 201C

Sense T201Cys: 5'- CAACTACTTCCACGTGTGCAACTTCTTC -3'

Antisense T201Cys: 5'- GAAGAAGTTGCACACGTGGAAGTAGTTG -3'

Για τη μετάλλαξη 202C

Sense N202Cys: 5'- CTTCCATGTGACATGCTTCTTCTGG -3'

Antisense N202Cys: 5'- CCAGAAGAAGCATGTCACATGGAAG -3'

Για τη μετάλλαξη 203C

Sense F203Cys: 5'- CATGTGACCAATTGCTTCTGGATG -3'

Antisense F203Cys: 5'- CGAACATCCAGAAGCAATTGGTCACATG -3'

Για τη μετάλλαξη 204C

Sense F204Cys: 5'- CTTCCATGTGACGAATTTCTGCTGGATGTTC -3'

Antisense F204Cys: 5'- GAACATCCAGCAGAAATTCGTCACATGGAAG -3'

Για τη μετάλλαξη 205C

Sense W205Cys: 5'- CAACTTCTTCTGCATGTTCGGCG -3'

Antisense W205Cys: 5'- CGCCGAACATGCAGAAGAAGTTG -3'

Για τη μετάλλαξη 206C

Sense M206Cys: 5'- CCATGTGACGAATTTCTTCTGGTGCTTCGGCGAGG -3'

Antisense M206Cys: 5'- CCTCGCCGAAGCACCAGAAGAAATTCGTCACATGG -3'

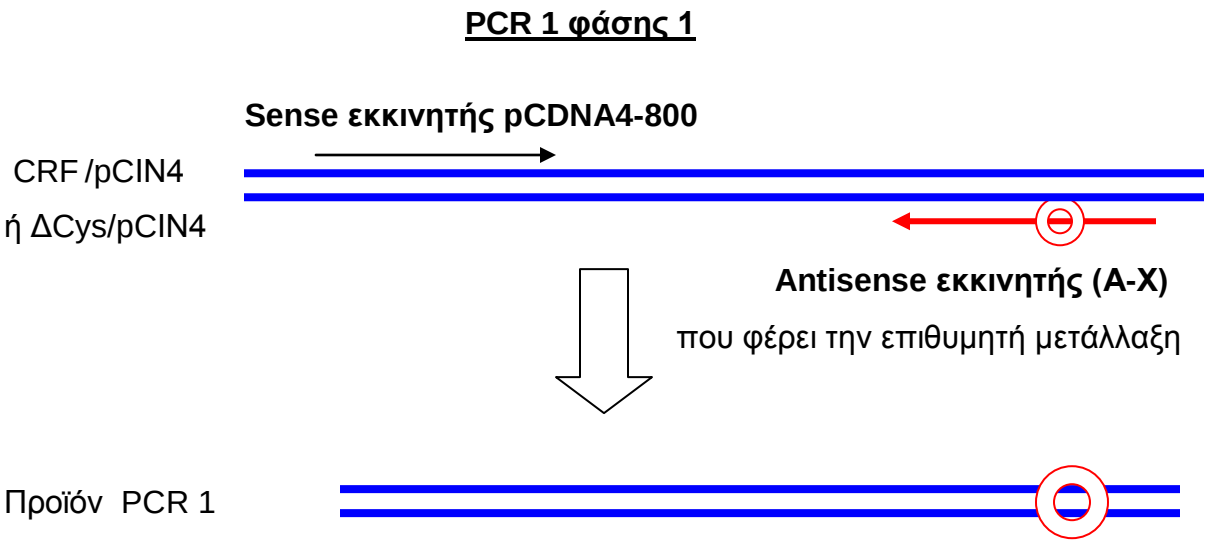
Για τη μετάλλαξη H199A

Sense H199A: 5'- CAACTACTTCGCGGTGACCAACTTG -3'

Antisense H199A: 5'- GAAGTTGGTCACCGCGAAGTAGTTG -3'

Οι sense και οι antisense εκκινητές που περιείχαν την εκάστοτε μετάλλαξη ήταν συμπληρωματικοί μεταξύ τους. Αναλυτικότερα, η επιθυμητή μετάλλαξη πραγματοποιήθηκε σε δύο διαδοχικές φάσεις. Στη πρώτη φάση έγιναν για κάθε μετάλλαξη δύο αντιδράσεις PCR, η PCR 1 και η PCR 2, στις οποίες χρησιμοποιήθηκε ως εκμαγείο το πλασμιδιακό DNA CRF_1/pCIN4 ή ΔCys/pCIN4 για την εκάστοτε μετάλλαξη, όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Για την επιμήκυνση της αλυσίδας του DNA χρησιμοποιήθηκε η πολυμεράση pfu και μείγμα των νουκλεοτιδίων (dNTPs), dTTP, dATP, dCTP, dGTP σε συγκέντρωση 2,5 mM το καθένα.

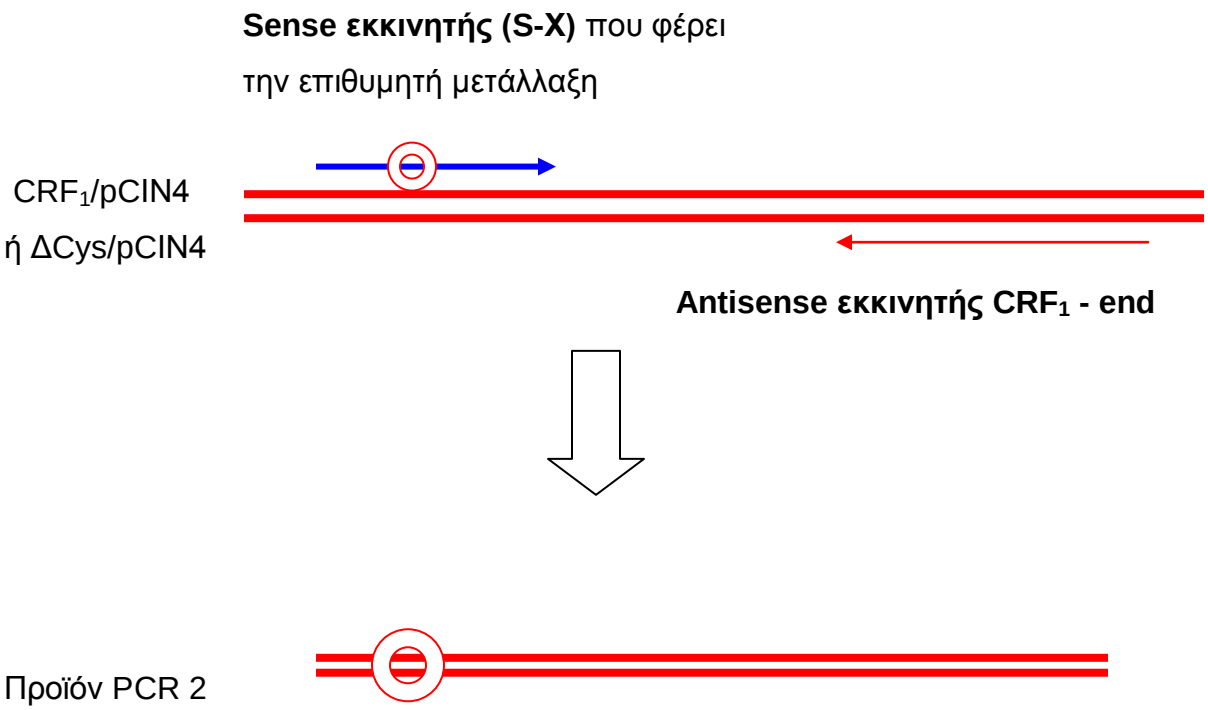
Στην αντίδραση PCR 1 χρησιμοποιήθηκαν ο εκκινητής sense pcDNA4-800 και ο antisense εκκινητής (A - X) που κωδικοποιούσε τα αμινοξέα της μετάλλαξης. Το προϊόν της αντίδρασης PCR 1 αναμενόταν να ήταν ένα τμήμα DNA του CRF_1, άγριου τύπου ή ΔCys, που περιείχε (στο ένα άκρο του) τα νουκλεοτίδια της επιθυμητής μετάλλαξης και το οποίο είχε μήκος περίπου 900 βάσεων όπως φαίνεται στην εικόνα 2.



Εικόνα 2. *Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης PCR 1 φάσης 1.*

Στην αντίδραση PCR 2 χρησιμοποιήθηκαν ο εκκινητής antisense CRF_1-end και ο εκκινητής sense (S-X) που κωδικοποιούσε τα αμινοξέα της μετάλλαξης και ήταν συμπληρωματικός του antisense εκκινητή (A-X). Το προϊόν του δείγματος PCR 2 αναμενόταν να είναι ένα τμήμα του DNA του CRF_1 άγριου τύπου ή ΔCys που περιέχει (στο ένα άκρο του) τα νουκλεοτίδια της επιθυμητής μετάλλαξης και το οποίο έχει μήκος περίπου 500 βάσεων όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα.

PCR 2 φάσης 1



Εικόνα 3. *Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης PCR 2 φάσης 1.*

Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης για τα δείγματα PCR 1 και PCR 2 της 1ης Φάσης ήταν τα εξής δύο:

	Διάλυμα αντίδρασης PCR 1	**Διάλυμα αντίδρασης PCR 2**
Sense εκκινητής pCDNA4-800 *(15 pmol/μl)*	1,5 μl	-
Sense εκκινητής (S - X) *(15 pmol/μl)*	-	1,5 μl
Antisense εκκινητής CRF_1 - end *(15 pmol/μl)*	-	1,5 μl
Antisense εκκινητής (A - X) *(15 pmol/μl)*	1,5 μl	-
Διάλυμα Α	42 μl	42 μl
Τελικός όγκος ανά δείγμα	**45** μl	**45** μl

Διάλυμα Α (όγκος/tube)	DNA που κωδικοποιούσε τον $hCRF_1$ - WT/pCIN4 ή ΔCys/pCIN4 (100 ng/μl)	0,5 μl
	dNTPs 2,5 mM ανά νουκλεοτίδιο	4 μl
	pfu buffer 10x	4,5 μl
	H_2O	33 μl
	Τελικός όγκος ανά δείγμα	42 μl

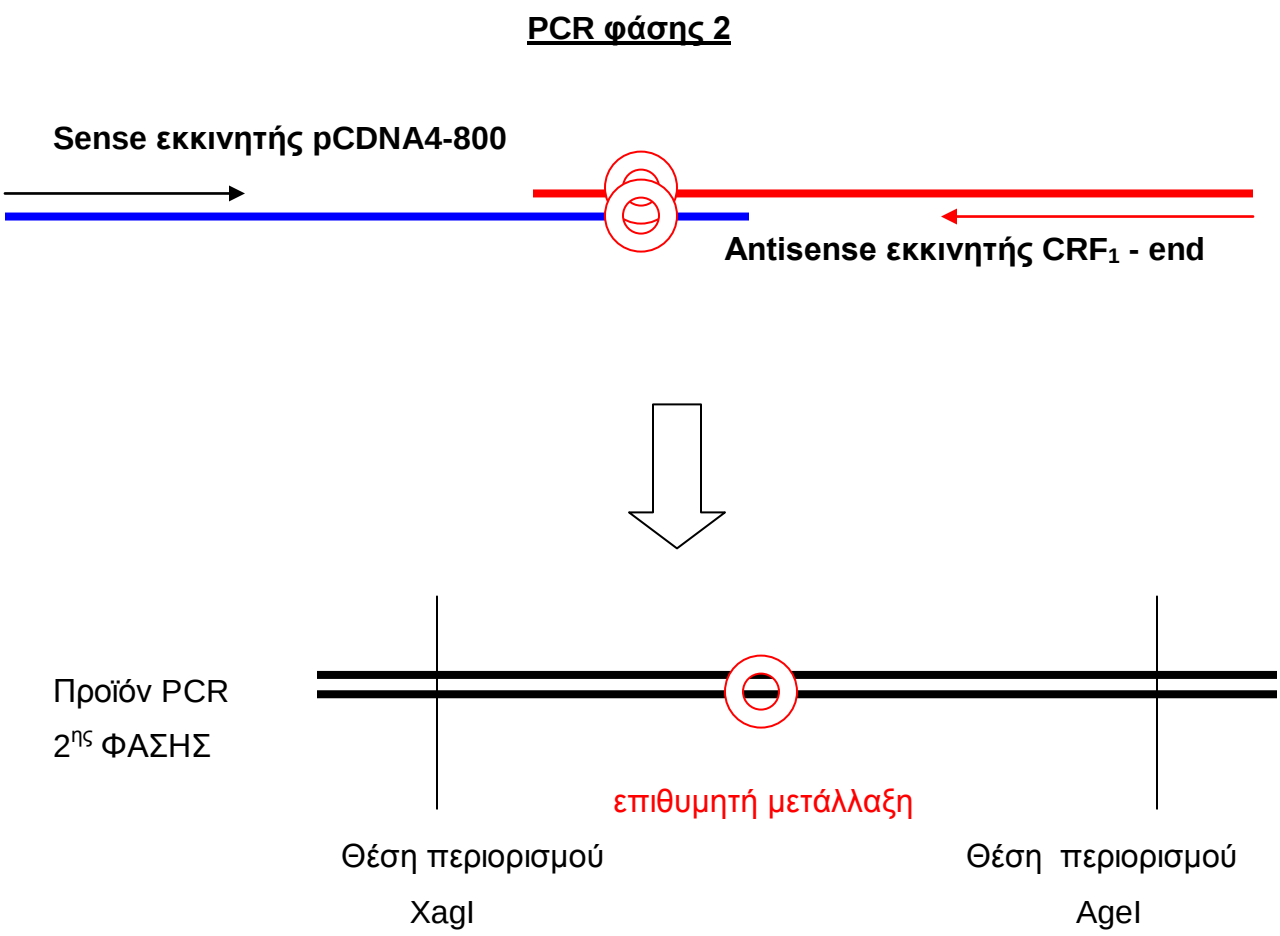
Μετά την παρασκευή των παραπάνω διαλυμάτων και την κατάλληλη ανάμιξη τους αυτά θερμάνθηκαν για 2 λεπτά στους 100^{o}C σε θερμικό κυκλοποιητή PCR. Στη συνέχεια προστέθηκαν σε κάθε δείγμα 5 μl διαλύματος Β ώστε ο τελικός όγκος σε κάθε διάλυμα να είναι 50 μl.

Διάλυμα Β	H_2O	4,2 μl
(όγκος/tube)	pfu buffer 10x	0,5 μl
	pfu polymerase	0,3 μl
	Τελικός όγκος ανά δείγμα	5 μl

Έπειτα τα διαλύματα επωάστηκαν σε τρεις διαδοχικές θερμοκρασίες (που αποτελούν ένα κύκλο της PCR) : αποδιάταξη του DNA στους 97^{o}C για 1 λεπτό, επώαση του DNA στους 55^{o}C για 3 λεπτά για την επικόλληση των εκκινητών στα συμπληρωματικά κομμάτια του DNA και πολυμερισμός και σύνθεση της αλληλουχίας DNA στους 72^{o}C για 15 λεπτά της ώρας. Η αντίδραση ολοκληρώθηκε μετά από 30-35 κύκλους. Μετά το τέλος των 30-35 κύκλων τα διαλύματα επωάστηκαν για άλλα 10 λεπτά της ώρας στους 72 ^{o}C.

Στη συνέχεια τα τεμάχια του DNA του CRF_1 που προήλθαν από τις αντιδράσεις PCR 1 (περίπου 900 βάσεων) και PCR 2 (περίπου 500 βάσεων) διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης, απομονώθηκαν (όπως περιγράφεται παρακάτω) και χρησιμοποιήθηκαν σαν εκμαγεία για την αντίδραση PCR της δεύτερης φάσης με σκοπό τη λήψη ενός προϊόντος μήκους περίπου 1400 βάσεων που αποτελούσε επίσης τμήμα του CRF_1/pCIN4 ή του ΔCys/pCIN4 και περιείχε την επιθυμητή μετάλλαξη (Εικόνα 4). Στην PCR αντίδραση αυτή, χρησιμοποιήθηκαν σαν εκκινητές τα ολιγονουκλεοτίδια Sense pCDNA4-800 και Antisense CRF_1-end. Η εκάστοτε μετάλλαξη αναμενόταν να υπάρχει στο μέσο περίπου του DNA αυτού και την οποία θα έπρεπε να περιβάλλουν δύο θέσεις πέψης συγκεκριμένων ενζύμων περιορισμού (XagI και AgeI) όπως φαίνεται στην εικόνα 4. Τα ένζυμα αυτά όπως περιγράφεται παρακάτω χρησιμοποιήθηκαν για την υποκλωνοποίηση του τμήματος του DNA

του CRF_1 που περιείχε την εκάστοτε μετάλλαξη στο πλασμιδικό DNA CRF_1/pCIN4 ή ΔCys/pCIN4.



Εικόνα 4. *Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης φάσης 2*

2.5.3 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Υλικά-Συσκευές

Διάλυμα TAE 50X (242 g Tris base, 57,1 ml glacial acetic acid 37,2 $Na_2EDTA{\cdot}2H_2O$ σε H_2O).

Αγαρόζη (Invitrogen, USA).

Βρωμιούχο αιθίδιο, $C_{21}H_{20}BrN_3$ (Fluka, Switzerland).

Χρωστική, 6X Gel Loading Dye (Fermentas, USA)
Δείκτες γνωστού μοριακού βάρους: (Fermentas, USA) και (New England Biolabs, Inc., USA).
Συσκευή οριζόντιας ηλεκτοφόρησης Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA).

Μέθοδος

Κατά την ηλεκτροφόρηση, το πήκτωμα της αγαρόζης επιτρέπει στα μικρότερου μοριακού βάρους DNA να κινηθούν γρηγορότερα και να διανύσουν μεγαλύτερη απόσταση μέσα στο πήκτωμα απ' ότι τα μεγαλύτερα.

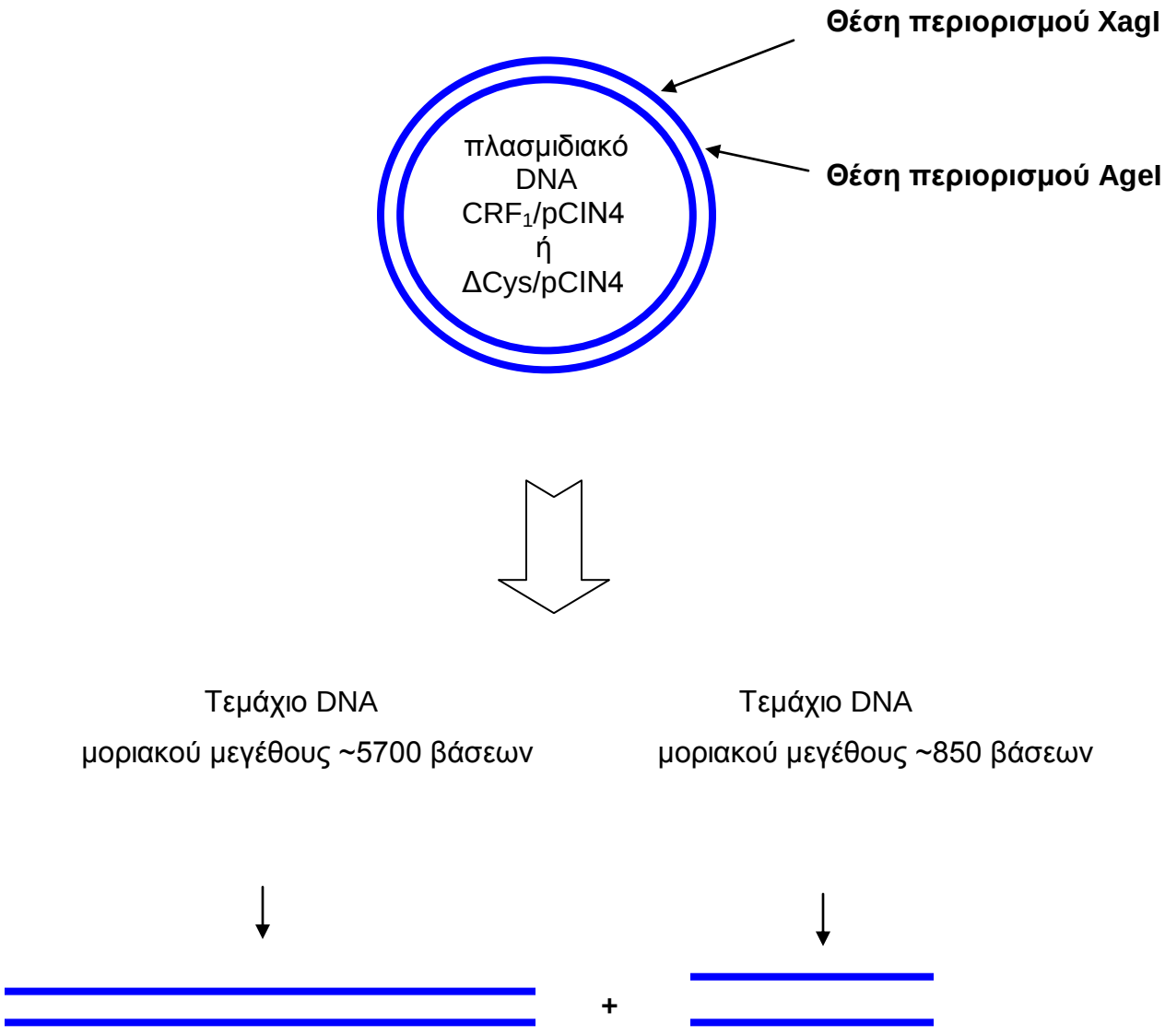
Για την προετοιμασία πηκτώματος αγαρόζης περιεκτικότητας 1%, διαλύθηκε 1 gr αγαρόζης σε 100 ml διαλύματος TAE (Tris-acetate) [242 gr Tris-Base, 57,1 ml glacial acetic acid, 18,6 gr EDTA (pH 8,0)] αραίωσης 1:50 με θέρμανση και υπό συνεχή ανάδευση. Το διάλυμα ψύχθηκε μέχρι τους 50^{o}C και ακολούθως προστέθηκαν σε αυτό 5 μl βρωμιούχου αιθιδίου (10 mg/ml). Το βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr) χρησίμευε για να παρατηρήσουμε το DNA που ηλεκτροφορήθηκε στο πήκτωμα αγαρόζης όταν αυτό είχε εκτεθεί σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV), γιατί το EtBr προσδένεται παρεμβαλλόμενο στις 2 αλυσίδες του DNA δημιουργώντας με αυτόν τον τρόπο το φθορίζον σύμπλοκο EtBr/DNA.

Το διάλυμα αγαρόζης τοποθετήθηκε στο δισκίο της συσκευής ηλεκτροφόρησης και αφέθηκε να πήξει, ενώ δημιουργήθηκαν εσοχές (πηγάδια) με τη βοήθεια ειδικού κτενίου. Μετά την πήξη του πηκτώματος αυτό τοποθετήθηκε στη συσκευή ηλεκτροφόρησης στην οποία υπήρχε ρυθμιστικό διάλυμα TAE 50X, αραίωσης 1:50. Ταυτόχρονα στα διαλύματα που περιείχαν τα δείγματα DNA και ήταν προϊόντα πέψης ή προιόντα των αντιδράσεων PCR, προστέθηκαν 4 μl 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 130 V για 40 περίπου λεπτά. Παράλληλα ηλεκτροφορήθηκε και δείγμα DNA που περιείχε διάφορα τμήματα γνωστών μοριακών μεγεθών με σκοπό τον υπολογισμό του μοριακού μεγέθους των ηλεκτροφορηθέντων DNA.

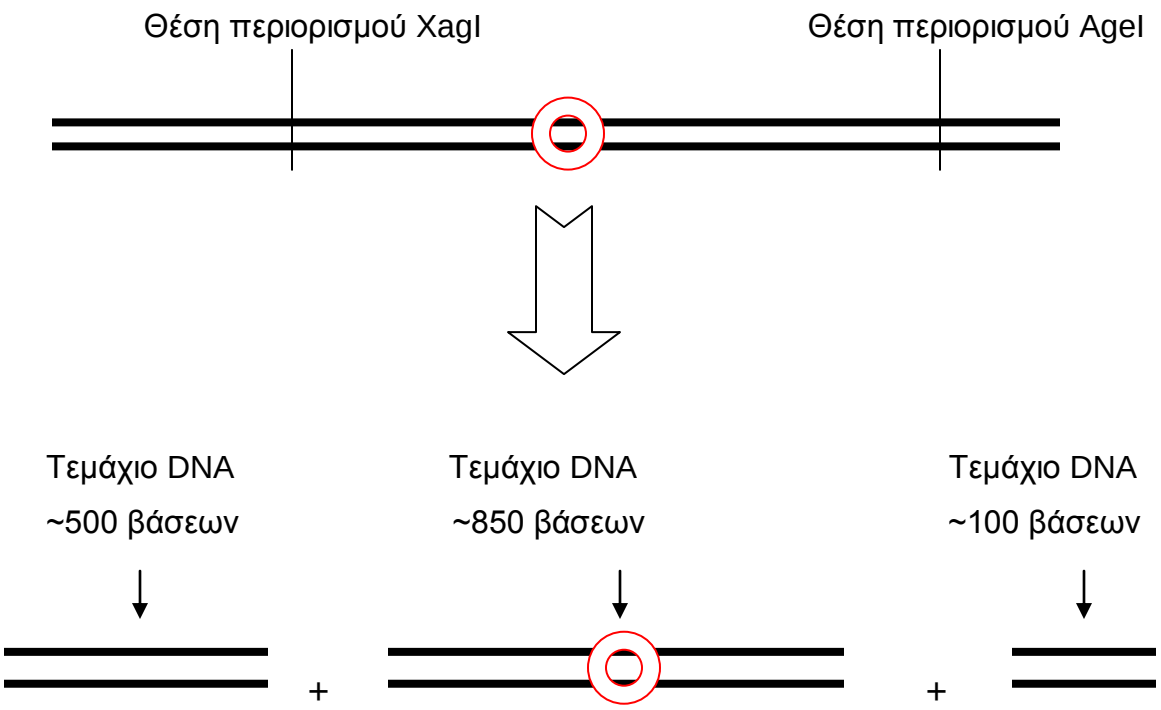
2.5.4 Πέψη DNA με ένζυμα περιορισμού

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 τα προϊόντα των PCR της $2^{ης}$ φάσης που περιείχαν τις επιθυμητές μεταλλάξεις και ήταν τμήματα του CRF_1, DNA μήκους περίπου 1400 βάσεων και πλασμιδιακό DNA CRF_1/pCIN4 ή ΔCys/pCIN4, περίπου 6550 βάσεων. Τα ένζυμα περιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν για την πέψη των DNA αυτών ήταν το XagI, που αναγνώριζε την αλληλουχία 5'-CCTNN^NNNAGG -3' και το AgeI που αναγνώριζε την αλληλουχία 5'- A^CCGGT -3' (όπου ^ σημεία πέψης). Η πέψη του πλασμιδιακού DNA CRF_1/pCIN4 ή ΔCys/pCIN4, με τα ένζυμα αυτά αναμενόταν να δώσει δύο τεμάχια DNA, ένα μικρότερο μήκους περίπου 850 βάσεων και ένα μεγαλύτερο μήκους περίπου 5700 βάσεων (Εικόνα 5). Η πέψη του προϊόντος του PCR της $2^{ης}$ φάσης που περιείχε την επιθυμητή μετάλλαξη με τα παραπάνω ένζυμα, αναμενόταν να δώσει τρία τεμάχια DNA, ένα μικρότερο μήκους περίπου 100 βάσεων, ένα μεγαλύτερο μήκους περίπου 500 βάσεων και ένα ακόμα μεγαλύτερο μήκους περίπου 850 βάσεων, εκ των οποίων το τελευταίο ήταν εκείνο που έφερε την επιθυμητή μετάλλαξη (Εικόνα 6).



Εικόνα 5. *Πέψη πλασμιδιακού DNA CRF$_1$/pCIN4 ή ΔCys/pCIN4 με τα ένζυμα XagI και AgeI.*



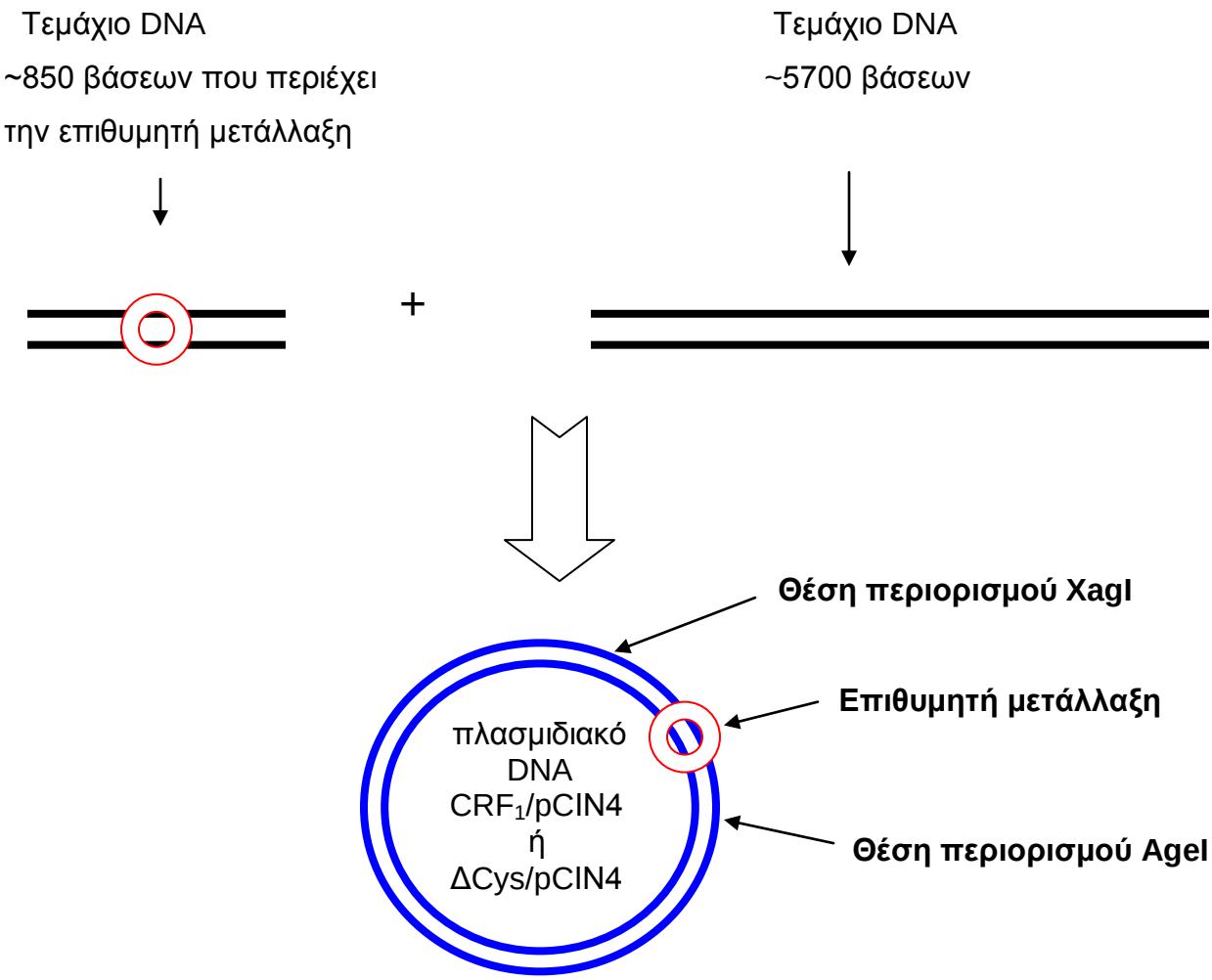
Εικόνα 6. *Πέψη προϊόντος της αντίδρασης PCR της 2ης φάσης (που περιέχει την επιθυμητή μετάλλαξη) με τα ένζυμα XagI και AgeI.*

Στη συνέαχεια τα προϊόντα πέψης - τεμάχια των DNA διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης, και απομονώθηκαν από αυτό χρησιμοποιώντας το kit Nucleospin Extract 2 της Macherey-Nagel σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρείας.

2.5.5 Συρραφή τεμαχίων DNA (ligation)

Μετά την απομόνωσή τους από το πήκτωμα αγαρόζης, τα προαναφερθέντα προϊόντα πέψης - τεμάχια των DNA συρράφτηκαν (εικόνα 7). Συγκεκριμένα έγινε συρραφή του τεμαχίου του DNA που προήλθε από το PCR της 2ης φάσης που περιείχε την επιθυμητή μετάλλαξη και είχε μοριακό μέγεθος περίπου 850 βάσεων, με το τεμάχιο εκείνο του πλασμιδιακού DNA CRF_1/pCIN4

(άγριου τύπου) ή ΔCys/pCIN4 που είχε μοριακό μέγεθος περίπου 5700 βάσεων. Η αντίδραση συρραφής έλαβε χώρα σε θερμοκρασία 16^{o}C για 12 περίπου ώρες.



Εικόνα 7. *Συρραφή τεμαχίων DNA.*

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

Για το μετασχηματισμό βακτηρίων με το πλασμιδιακό DNA του μεταλλαγμένου CRF_1/pCIN4 ή ΔCys/pCIN4 επιστρώσαμε βακτήρια DH-10B E. Coli. σε τρυβλία που περιείχαν LB-άγαρ (10 g τρυπτόνη, 5 g εκχύλισμα μαγιάς, 5 g NaCl, 15 g άγαρ και 1 ml 1 N NaOH ανά λίτρο) μαζί με το αντιβιοτικό αμπικιλλίνη σε συγκέντρωση 60 μg/ml. Μετά από 16 ώρες επώασης στους 37^{o}C, έγινε λήψη των αποικιών και νέα επώαση των βακτηρίων, όπως αναφέρεται αμέσως παρακάτω. Η εμφάνιση αποικιών βακτηρίων σε περιβάλλον που περιείχε αμπικιλλίνη οφείλονταν στο γεγονός ότι το πλασμιδιακό DNA, που έφερε το γονίδιο που κωδικοποιούσε τον CRF_1 ή τις μεταλλαγμένες μορφές του, περιείχε και ένα άλλο που προσέδιδε ανθεκτικότητα στα βακτήρια που έφεραν το πλασμίδιο αυτό, στο αντιβιοτικό αμπικιλλίνη.

2.5.7 Πολλαπλασιασμός βακτηρίων DH-10b E.coli

Μετά τη λήψη αποικιών, τα βακτήρια που υπήρχαν σε αυτές πολλαπλασιάστηκαν, με επώαση τους σε 9 ml LB (10 g τρυπτόνη, 5 g εκχύλισμα μαγιάς, 5 g NaCl και 1 ml 1 N NaOH ανά λίτρο) που περιείχε το αντιβιοτικό αμπικιλλίνη σε συγκέντρωση 60 μg/ml, για 16 ώρες και στους 37^{o}C υπό συνεχή ανάδευση (170 αναδεύσεις/λεπτό). Στο τέλος της επώασης έγινε απομόνωση από τα βακτήρια του πλασμιδιακού DNA, που έφερε το γονίδιο που κωδικοποιούσε τον CRF_1 ή τις μεταλλαγμένες μορφές του, χρησιμοποιώντας το kit Nucleospin® Plasmid της Macherey-Nagel (Germany) και ακολουθώντας το πρωτόκολλο της εταιρείας.

2.5.8 Ταυτοποίηση του DNA που έφερε την επιθυμητή μετάλλαξη

Η εξακρίβωση του αν το πλασμιδιακό DNA CRF_1/pCIN4 ή ΔCys/pCIN4 έφερε την επιθυμητή μετάλλαξη επιτεύχθηκε αρχικά με τη χρήση περιοριστικών ενζύμων. Τα ολιγουνεκλοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν για την εισαγωγή της

επιθυμητής μετάλλαξης στο DNA του άγριου τύπου CRF_1 ή του ΔCys ήταν έτσι τροποποιημένα ώστε να αφαιρούσαν ή να πρόσθεταν μια θέση πέψης για ένα συγκεκριμένο ένζυμο περιορισμού. Έτσι το πλασμιδιακό DNA CRF_1/pCIN4 ή ΔCys/pCIN4 που έφερε την επιθυμητή μετάλλαξη μετά την πέψη του με το κατάλληλο περιοριστικό ένζυμο και την ηλεκτροφόρησή του σε πήκτωμα αγαρόζης παρουσίαζε, σε σχέση με το μητρικό του διαφορές, όσον αφορά τον αριθμό και μέγεθος των τεμαχίων DNA που είχαν δημιουργηθεί από την πέψη με το συγκεκριμένο ένζυμο

Περαιτέρω επιβεβαίωση της εισαγωγής της επιθυμητής μετάλλαξης στο πλασμιδιακό DNA CRF_1/pCIN4 επιτεύχθηκε με ανάγνωση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του, χρησιμοποιώντας τον Genetic Analyser 3100 της Applied Biosystems.

2.5.9 Ανάλυση αλληλουχίας (Sequencing)

Υλικά – συσκευές

Εκκινητές.
Ρυθμιστικό διάλυμα Sequencing (Applied Biosystems, USA).
Μίγμα Sequencing (Applied Biosystems, USA).
Πλάκα 96 οπών (Applied Biosystems, USA).
Φυγόκεντρος (Eppendorf Centrifuge 5804R, Germany).
PCR machine (Applied Biosystems, USA).
Genetic Analyser 3100 (Applied Biosystems, USA).

Μέθοδος

Τοποθετήσαμε 2 μl από το κάθε δείγμα πλασμιδιακού DNA που θέλαμε να ελέγξουμε, σε κάθε οπή μιας πλάκας των 96 οπών. Τα δείγματα του

πλασμιδιακού DNA που θέλαμε να ελέγξουμε, είχαν συγκέντρωση 200 ng/μl. Ετοιμάσαμε το ακόλουθο μίγμα και προσθέσαμε 5,5 μl σε κάθε οπή

2 μl H_2O
1 μl εκκινητής
1,5 μl ρυθμιστικό διάλυμα Sequence
1 μl μίγμα Sequence (περιέχει dNTPs, ddNTPs, ένζυμο πολυμεράσης και Mg^{2+})

Στη συνέχεια, ακολούθησε σε θερμικό κυκλοποιητή PCR αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) με τα παρακάτω στάδια

(1) 96^{o}C για 1 λεπτό
(2) 96^{o}C για 10 λεπτά
(3) 50^{o}C για 5 λεπτά
(4) 60^{o}C για 4 λεπτά
(5) 4^{o}C μέχρι αφαίρεσης

τα στάδια (2), (3) και (4) έκαναν 25 κύκλους και η διάρκεια ήταν περίπου 2½ ώρες.

Ακολούθησε φυγοκέντρηση των δειγμάτων στα 1000 g για 1 λεπτό στους 4^{o}C, προσθήκη ανά οπή 5 μl διαλύματος 125 mM EDTA pH 8 και 60 μl παγωμένης αιθανόλης 100%, ανάδευση των δειγμάτων και αποθήκευση στο σκοτάδι για 15 λεπτά. Στη συνέχεια η πλάκα των 96 οπών φυγοκεντρήθηκε στα 1650 g για 45 λεπτά στους 4^{o}C και μετά την αφαίρεση του υπερκείμενου, προσθέσαμε 60 μl παγωμένης αιθανόλης (70%) σε κάθε δείγμα. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στα 1650 g για 15 λεπτά στους 4^{o}C και μετά την αφαίρεση του υπερκείμενου προστέθηκαν 10 μl φορμαμίδης σε κάθε δείγμα. Μετά από 1 λεπτού φυγοκέντρηση στα 1000 g στους 4^{o}C η πλάκα τοποθετήθηκε σε θερμικό κυκλοποιητή PCR, όπου έγινε αποδιάταξη του DNA των δειγμάτων με θέρμανση στους 95^{o}C για 5 λεπτά και στη συνέχεια ψύξη τους σε 4^{o}C. Στη συνέχεια τα

δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στα 1000 g για 1 λεπτό στους 4^{o}C και τέλος αναλύθηκαν στον αναλυτή Genetic Analyser 3100 της Applied Biosystems.

2.6 Φαρμακολογικός χαρακτηρισμός των υποδοχέων

Ο φαρμακολογικός χαρακτηρισμός των υποδοχέων του CRF επιτεύχθηκε πρώτον με το προσδιορισμό της συγγένειας δέσμευσης με την οποία δέσμευαν τον CRF και ανάλογα του σε μελέτες συναγωνιστικής δέσμευσης και δεύτερον με το προσδιορισμό της ισχύος με την οποία διάφορα πεπτίδια αγωνιστές διέγειραν τη παραγωγή κυκλικού AMP σε κύτταρα που εκφράζανε τους υποδοχείς του CRF.

2.6.1 Μελέτες συναγωνιστικής δέσμευσης

Υλικά - Συσκευές

Θρεπτικό υλικό, DMEM/F12 (1:1): Dulbecco's Modified Eagle's Medium (GIBCO-BRL, Life Technologies, UK).
Ορός βοός, BCS (Bovine Calf Serum) (Hyclone, USA).
Τρυψίνη, Trypsin/EDTA (GIBCO-BRL, Life Technologies, UK).
Χρωστική Trypan Blue (GIBCO-BRL, Life Technologies, UK).
Αλβουμίνη ορού βοός (Bovine Serum Albumin, BSA) (Sigma, USA).
Φυγόκεντρος (Jouan CR422, France).
Φυγόκεντρος (Eppendorf Centrifuge 5415, Germany).
Μικροσκόπιο ορατού φωτός Olympus, Japan.
Πλάκα αιματοκυτταρομετρητή Neubauer.
Επωαστικός κλίβανος Thermo Forma (Thermo Fisher Scientific Inc., USA).
Τρυβλία καλλιεργειών (SARSTEDT, Germany).
h/r CRF (Bachem, Germany).
[^{125}I]-Tyr^{0}-σοβαγίνη (2200 Ci (81.4 TBq)/mmol NEN Life Science Products, USA).
Πολυαιθυλενιμίνη, PEI (Merck, USA).

Ομογενοποιητής polytron (Janke & Kunkel IKA Ultra Turrax T25, Germany).
Σωληνάρια τύπου eppendorf χαμηλής κατακράτησης (low retention, Kisker, Germany).
Υδατόλουτρο (Salvis AG, Switzerland).
Συσκευή διήθησης Brandel Cell Harvester (USA).
Φίλτρα ινών υάλου AH934 (Whatman International Ltd., England).
Σωληνάρια 3 ml (SARSTEDT, Germany).
Μετρητής γ - ακτινοβολίας (LKB Wallac 1275 minigamma, Finland), απόδοσης 80%
Απροτινίνη, Aprotinin (Sigma, USA).
Βακιτρακίνη, Bacitracin (Sigma, USA).

Διάλυμα Α

137 mM NaCl
2,7 mM KCl
4,3 mM $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$
1,47 mM KH_2PO_4
2 mM EDTA
pH 7,3 στους 37^oC

Διάλυμα Β

20 mM HEPES
10 mM $MgCl_2 \cdot 6H_20$
2 mM EGTA
0,93 μg/ml απροτινίνη
0,2 mg/ml βακιτρακίνη
pH 7,1 στους 4^oC

Διάλυμα Γ

20 mM HEPES

10 mM $MgCl_2 \cdot 6H_20$

2 mM EGTA

0,1% BSA

0,93 μg/ml απροτινίνη

0,2 mg/ml βακιτρακίνη

pH 7,1 στους 20^oC

Διάλυμα Δ

137 mM NaCl

2,7 mM KCl

4,3 mM $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$

1,4 mM KH_2PO_4

0,01% Triton X-100

pH 7,1 στους 4^oC

Μέθοδος

HEK 293 κύτταρα που εκφράζανε τους υποδοχείς του CRF καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό όπως αναφέρθηκε παραπάνω και η πυκνότητα εκείνων που χρησιμοποιήθηκαν για πείραμα ήταν 100% περίπου.

Μετά την αφαίρεση του θρεπτικού υλικού τα κύτταρα εκπλύθηκαν πολύ γρήγορα με ρυθμιστικό διάλυμα Α, αποκολλήθηκαν με τη χρήση του ίδιου ρυθμιστικού διαλύματος, , μεταφέρθηκαν σε σωληνάριο των 15 ml, και τα κυτταρικά εναιωρήματα φυγοκεντρήθηκαν σε 1000 g για 5 λεπτά και σε θερμοκρασία δωματίου. Τα κύτταρα του ιζήματος επαναιωρήθηκαν σε 1,5 ml ρυθμιστικού διαλύματος Β και ομογενοποιήθηκαν σε ομογενοποιητή Polytron για 10-15 δευτερόλεπτα, στις 20000 στροφές/λεπτό στους 4^oC. Τα μεμβρανικά ομογενοποιήματα φυγοκεντρήθηκαν σε 16000 g για 10 λεπτά στους 4^oC και τα ιζήματα επαναιωρήθηκαν σε 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος Γ, ομογενοποιήθηκαν

όπως παραπάνω και χρησιμοποιήθηκαν σε κατάλληλες αραιώσεις για τα πειράματα δέσμευσης. Όγκος 50 μl από τα αραιωμένα μεμβρανικά ομογενοποιήματα επωάστηκε σε σωληνάρια τύπου eppendorf χαμηλής κατακράτησης (low retention), μαζί με 150 μl διαλύματος που περιείχε 25 - 45 pM [^{125}I]-Tyr^{0}-σοβαγίνης, απουσία (ολική δέσμευση) ή παρουσία αυξανομένων συγκεντρώσεων μη ραδιοσημασμένης Tyr^{0}-σοβαγίνης (πειράματα ομόλογης συναγωνιστικής δέσμευσης) ή μη ραδιοσημασμένων CRF ή συγγενών αναλόγων του (πειράματα ετερόλογης συναγωνιστικής δέσμευσης). Η μη ειδική δέσμευση προσδιορίστηκε παρουσία περίσσειας μη ραδιοσημασμένης σοβαγίνης (0,5-1 μM). Τα δείγματα επωάστηκαν σε θερμοκρασία 20 - 22^{o}C για 2 ώρες με ήπια ανάδευση (30 αναδεύσεις/λεπτό). Ο διαχωρισμός της δεσμευμένης με τον υποδοχέα από την ελεύθερη [^{125}I]-Tyr^{0}-σοβαγίνη, έγινε με διήθηση μέσω φίλτρων ινών υάλου AH934, σε συσκευή Brandel υπό κενό αέρος. Τα φίλτρα είχαν προηγουμένως επωαστεί για μια ώρα σε διάλυμα πολυαιθυλενιμίνης 0,3% στους 4^{o}C. Μετά το τέλος της διήθησης τα φίλτρα εκπλύθηκαν τρεις φορές με 1,5 ml (τη φορά) διαλύματος Δ και μετρήθηκαν σε μετρητή γ - ακτινοβολίας. Η ποσότητα των μεμβρανών που χρησιμοποιήθηκε ήταν τέτοια ώστε η ειδική δέσμευση να ήταν ίση ή μικρότερη του 10% της ολικής δέσμευσης. Η ειδική δέσμευση ορίστηκε ως η ολική μείον τη μη ειδική δέσμευση.

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων συναγωνιστικής δέσμευσης αναλύθηκαν με μη γραμμική ανάλυση (nonlinear regression analysis), χρησιμοποιώντας το λογισμικό GraphPad Prism 4.0 και οι τιμές IC_{50} υπολογίστηκαν σύμφωνα με το μοντέλο ύπαρξης ενός πληθυσμού θέσεων δέσμευσης (one-site competition model). Οι τιμές K_I υπολογίστηκαν από τις τιμές IC_{50} των πειραμάτων ετερόλογης συναγωνιστικής δέσμευσης με τη χρήση του λογισμικού GraphPad Prism 4.0 και σύμφωνα με την εξίσωση, $K_I = IC_{50} / (1 + L / K_D)$, όπου το L είναι η συγκέντρωση της ραδιοσημασμένης [^{125}I]-Tyr^{0}-σοβαγίνης και K_D η συγγένεια δέσμευσης της [^{125}I]-Tyr^{0}-σοβαγίνης [201]. Οι τιμές K_D για την [^{125}I]-Tyr^{0}-σοβαγίνη υπολογίστηκαν αναλύοντας τα αποτελέσματα των πειραμάτων ομόλογης συναγωνιστικής δέσμευσης, με τη χρήση του λογισμικού

GraphPad Prism 4.0 και σύμφωνα με την εξίσωση: $Y = \{(B_{max} \cdot [hot])/([hot] + [cold] + K_D)\} + NSB$ [202], όπου η τιμή Y είναι η ολική δέσμευση της [^{125}I]-Tyr^0-σοβαγίνης, NSB είναι η μη ειδική του δέσμευση, B_{max} είναι ο μέγιστος αριθμός των υποδοχέων, [hot] είναι η συγκέντρωση της [^{125}I]-Tyr^0-σοβαγίνης και [cold] είναι η συγκέντρωση της Tyr^0-σοβαγίνης.

2.6.2 Μελέτες μέτρησης ενδοκυττάριου κυκλικού AMP

Υλικά-Συσκευές

Θρεπτικό υλικό, DMEM/F12 (1:1) Dulbecco's Modified Eagle's Medium (GIBCO-BRL, Life Technologies, UK).
Ορός βοός, BCS (Bovine Calf Serum) (Hyclone, USA).
Τρυψίνη, Trypsin/EDTA (GIBCO-BRL, Life Technologies, UK).
Χρωστική Trypan Blue (GIBCO-BRL, Life Technologies, UK).
Φυγόκεντρος (Jouan CR422, France).
Μικροσκόπιο ορατού φωτός Olympus, Japan.
Πλάκα αιματοκυτταρομετρητή Neubauer.
Επωαστικός κλίβανος Thermo Forma (Thermo Fisher Scientific Inc., USA).
Τρυβλία καλλιεργειών (SARSTEDT, Germany).
Πλάκες 96 οπών (NUNC, Denmark).
Πολυ-L-λυσίνη, Poly-L-lysine (Fluka, Switzerland).
Φυγόκεντρος (Rotanda 46R, Hettich, Germany).
^{3}H-cAMP [2,8-^{3}H] Adenosine-3'-5'-cyclic phosphate ammonium salt (43,0 Ci/mmol Amersham, UK).
Εκχυλίσμα PKA (η παρασκευή του αναφέρεται παρακάτω).
Συσκευή διήθησης Brandel Cell Harvester (USA).
Φίλτρα ινών υάλου AH934 (Whatman International Ltd., England).
Σωληνάρια πλαστικά, υγρού σπινθηρισμού (SARSTEDT, Germany).
Υγρό σπινθηρισμού (η παρασκευή του αναφέρεται παρακάτω).

Μετρητής β-ακτινοβολίας (Perkin Elmer LS1801, Foster City,CA, USA) με απόδοση 60% στο ^{3}H.

Διάλυμα choline/sucrose:

25 mM Hepes

2 mM choline

288 mM sucrose

0,9 mM $CaCl_2$

0,5 mM $MgCl_2$

1 mM 3-ισοβούτυλ-1-μεθυλξανθίνη

pH 7,4

Ρυθμιστικό διάλυμα CAQ:

100 mM Tris-HCl

100 mM NaCl

5 mM EDTA

pH 7,4

Μέθοδος

HEK 293 κύτταρα που εκφράζανε τους υποδοχείς του CRF επιστρώθηκαν σε πλάκες 96 οπών και καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό όπως αναφέρθηκε παραπάνω ώστε την επόμενη ημέρα (ημέρα πειράματος) να έχουν πυκνότητα 90%. Πριν την επίστρωση των κυττάρων η επιφάνεια των πλακών είχε καλυφθεί για 1-3 λεπτά με διάλυμα 0,1 mg/ml poly-L-λυσίνης. Μετά την αφαίρεση του διαλύματος poly-L-λυσίνης οι πλάκες διατηρήθηκαν σε στείρο περιβάλλον και λίγο πριν από τη χρήση τους ξεπλύθηκαν με στείρο νερό.

Μετά από 16-24 ώρες καλλιέργειας των κυττάρων στις πλάκες των 96 οπών το θρεπτικό υλικό αφαιρέθηκε και προστέθηκαν 100 μl διαλύματος choline/sucrose και τα κύτταρα επωάστηκαν για 1 ώρα σε κλίβανο επώασης, θερμοκρασίας 37^{o}C, ατμόσφαιρας 5% CO_2/95% αέρα και υγρασίας 100%. Στο

τέλος της επώασης προστέθηκαν στα κύτταρα άλλα 100 μl διαλύματος choline/sucrose χωρίς ή με αυξανόμενες συγκεντρώσεις CRF ή Tyr^0-σαβαγίνης και συνεχίστηκε η επώαση για άλλα 20 λεπτά στους 37°C και 5% CO_2. Στο τέλος της επώασης το υπερκείμενο υγρό αφαιρέθηκε και μετά τη πρόσθεση κρύου διαλύματος TCA 3% τα κύτταρα έμειναν σε πάγο για 30 λεπτά. Στη συνέχεια τα κύτταρα καταψύχθηκαν σε - 20°C. Μετά από 1-3 ημέρες πραγματοποιήθηκαν τα επόμενα στάδια του πειράματος, ξεκινώντας με απόψυξη των κυττάρων (με ανάδευσή τους σε θερμοκρασία δωματίου) και φυγοκέντρηση τους για 15 λεπτά στα 1700g στους 4°C. Μετά το τέλος της φυγοκέντρησης 100 μl από τα υπερκείμενα διαλύματα αναμίχθηκαν (σε νέα πλάκα 96 οπών) με διάλυμα 6 μl 2N NaOH και μέρος (20 μl) των μιγμάτων αυτών επωάστηκε για 2,30-3,30 ώρες στους 4°C και σε τελικό όγκο 500 μl μαζί με ρυθμιστικό διάλυμα CAQ, ^{3}H-cAMP και PKA. Παράλληλα με τα άγνωστα δείγματα επωάστηκαν κάτω από τις ίδιες συνθήκες και γνωστές συγκεντρώσεις κυκλικού AMP (100 pmole, 30 pmole, 10 pmole, 3 pmole και 1 pmole) με σκοπό την κατασκευή πρότυπης καμπύλης που θα χρησίμευε για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης κυκλικού AMP στα άγνωστα δείγματα.

Στο τέλος της επώασης τα διαλύματα διηθήθηκαν μέσω φίλτρων ινών υάλου (Glass Microfibre Filters AH934, Whatman International Ltd., England) σε συσκευή Brandel υπό κενό αέρος. Τα φίλτρα που προηγουμένως είχαν διαβραχεί με απεσταγμένο νερό, μετά τη διήθηση εκπλύθηκαν τρεις φορές με συνολικά 3 ml διαλύματος Β (10 mM Tris - HCl, 120 mM NaCl, pH 7,4 στους 4°C) και τοποθετήθηκαν σε σωληνάρια σπινθηρισμού μαζί με 3 ml υγρού σπινθηρισμού (scintillation fluid), έγινε ανακίνηση των δειγμάτων και μετά από 3-24 ώρες μετρήθηκαν σε μετρητή β - ακτινοβολίας (Beckman LS 1801, USA) απόδοσης 50%.

Ο προσδιορισμός της ποσότητας του κυκλικού AMP για τα άγνωστα δείγματα έγινε με τη βοήθεια της πρότυπης καμπύλης, που δημιουργήθηκε με βάση τα αποτελέσματα των δειγμάτων κυκλικού AMP γνωστής συγκέντρωσης. Οι τιμές EC_{50} υπολογίστηκαν με μη γραμμική ανάλυση των αποτελεσμάτων

(nonlinear regression analysis), χρησιμοποιώντας το λογισμικό GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Prism v.4.0, GraphPad Software Inc., USA).

Παρασκευή διαλύματος σπινθηρισμού (scintillation fluid)

Υλικά-Συσκευές

Τολουόλιο (Merck, USA).
PPO (2,5-διφαινυλο-οξαζόλιο – $C_{15}H_{11}NO$) (Merck, USA).
POPOP (2,2΄-p-φαινυλεν-bis-(5-φαινυλο-οξαζόλιο) – $C_{24}H_{16}N_2O_2$) (Merck, USA).
Triton X-100 (Merck, USA).

Σε φιάλη η οποία περιείχε ένα λίτρο τολουόλιο προσθέσαμε 5 gr PPO και 0,5 gr POPOP και αφήσαμε για ανάδευση. Την επόμενη μέρα προστέθηκε στο διάλυμα αυτό 200 ml Triton X-100, ώστε η αναλογία να είναι διάλυμα PPO-POPOP προς Triton X-100, 5 προς 1. Η αποτελεσματικότητα του διαλύματος σπινθηρισμού εξετάστηκε με μέτρησή του σε μετρητή β - ακτινοβολίας (Beckman LS 1801, USA) απόδοσης 60%, αφού σε 3 ml από αυτό είχαμε προσθέσει ~40000 cpm ^{3}H-cAMP.

Παρασκευή εκχυλίσματος PKA από φλοιό επινεφριδίων

Τα επινεφρίδια αποτελούνται από μυελό που έχει σκοτεινό καφέ χρώμα και φλοιό που είναι κίτρινος και είναι πλούσιος σε πρωτεϊνική κινάση Α η οποία δεσμεύει το κυκλικό AMP

Υλικά-Συσκευές

20 επινεφρίδια βοός
Ρυθμιστικό διάλυμα PKA
100 mM Tris pH 7,4

250 mM NaCl

10 mM EDTA

0,1% 2 - μερκαπτοαιθανόλη

250 mM σουκρόζη

Ομογενοποιητής, Polytron JANKE & KUNKEL, IKA-TURRAX T25 (IKA, Germany).

Υπερφυγόκεντρος XL-90 Ultracentrifuge (Beckman, USA) με κεφαλή τύπου 70Ti.

Επινεφρίδια βοός που μας προμήθευσε το τοπικό σφαγείο τοποθετήθηκαν σε πάγο και αφαιρέθηκε από αυτά ο μυελός και το λίπος. Ο εναπομένων φλοιός τεμαχίστηκε σε μικρά κομμάτια τα οποία ομογενοποιήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα PKA ανά μικρές ποσότητες σε ομογενοποιητή Polytron για 15-30 δευτερόλεπτα στις 20000 στροφές/λεπτό, μέσα σε πάγο. Για κάθε 10-13 επινεφρίδια χρειαστήκαμε 500 ml ρυθμιστικού διαλύματος PKA. Στη συνέχεια τα ομογενοποιήματα διηθήθηκαν μέσω υφάσματος (cheesecloth) ώστε να αφαιρεθεί το λίπος και υπολείμματα που δεν είχαν ομογενοποιηθεί. Τα διηθήματα αναδεύτηκαν για 30 λεπτά, φυγοκεντρήθηκαν σε 30000 g για 30 λεπτά στους 4^{o}C και τα υπερκείμενα διαλύματα μετά το τέλος της φυγοκέντρησης επαναδιηθήθηκαν μέσω υφάσματος (cheesecloth) (1^{o} ΔΙΗΘΗΜΑ). Τα ιζήματα επαναομογενοποιήθηκαν όπως προηγουμένως σε 50 ml ρυθμιστικού διαλύματος PKA και φυγοκεντρήθηκαν σε 30000 g για 30 λεπτά στους 4^{o}C. Μετά το τέλος της φυγοκέντρησης τα υπερκείμενα διαλύματα διηθήθηκαν σε ύφασμα (cheesecloth) (2^{o} ΔΙΗΘΗΜΑ). Τα διηθήματα 1 και 2 ενώθηκαν και το μείγμα φυγοκεντρήθηκε σε 30000 g για 30 λεπτά στους 4^{o}C. Μετά το τέλος της φυγοκέντρησης το υπερκείμενο διάλυμα διηθήθηκε σε ύφασμα (cheesecloth) και φυγοκεντρήθηκε εκ νέου στα 30000 g για 30 λεπτά στους 4^{o}C. Μετά το τέλος της φυγοκέντρησης αυτής θα πρέπει να είχαμε περίπου 300 - 400 ml υπερκείμενου διαλύματος στο οποίο προσθέσαμε ρυθμιστικό διάλυμα PKA μέχρι όγκου 400 ml. Στη συνέχεια το πλούσιο αυτό σε PKA μείγμα διαμοιράστηκε σε σωληνάρια τύπου eppendorf και αποθηκεύτηκε στους - 80^{o}C.

2.7 Μέθοδος διαθεσιμότητας των κυστεϊνών-υποκαταστατών (substituted-cysteine accessibility method, SCAM)

Υλικά-Συσκευές

Θρεπτικό υλικό, DMEM/F12 (1:1): Dulbecco's Modified Eagle's Medium (GIBCO-BRL, Life Technologies, UK).
Ορός βοός, BCS (Bovine Calf Serum) (Hyclone, USA).
Τρυψίνη, Trypsin/EDTA (GIBCO-BRL, Life Technologies, UK).
Χρωστική Trypan Blue (GIBCO-BRL, Life Technologies, UK).
Αλβουμίνη ορού βοός (Bovine Serum Albumin, BSA) (Sigma, USA).
Φυγόκεντρος (Jouan CR422, France).
Φυγόκεντρος (Eppendorf Centrifuge 5415, Germany).
Μικροσκόπιο ορατού φωτός Olympus, Japan.
Πλάκα αιματοκυτταρομετρητή Neubauer.
Επωαστικός κλίβανος Thermo Forma (Thermo Fisher Scientific Inc., USA).
Τρυβλία καλλιεργειών (SARSTEDT, Germany).
Μέθανοθιοθειϊκό-αιθυλ-αμμώνιο (MTSEA) (Toronto Research Chemicals Inc., Canada)
Μέθανοθιοθειϊκό-αίθυλ-τριμέθυλ-αμμώνιο (MTSET) (Toronto Research Chemicals Inc., Canada)
Μέθανοθιοθειϊκό-αίθυλ-σουλφονικό (MTSES) (Toronto Research Chemicals Inc., Canada)
h/r CRF (Bachem, Germany).
[^{125}I]-Tyr^{0}-σοβαγίνη (2200 Ci (81.4 TBq)/mmol NEN Life Science Products, USA).
Πολυαιθυλενιμίνη, PEI (Merck, USA).
Ομογενοποιητής polytron (Janke & Kunkel IKA Ultra Turrax T25, Germany).
Σωληνάρια τύπου eppendorf χαμηλής κατακράτησης (low retention, Kisker, Germany).
Υδατόλουτρο (Salvis AG, Switzerland).
Συσκευή διήθησης Brandel Cell Harvester (USA).

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

Σωληνάρια 3 ml (SARSTEDT, Germany).

Μετρητής γ - ακτινοβολίας (LKB Wallac 1275 minigamma, Finland) με απόδοση 80% στο ^{125}I.

Διάλυμα 1

137 mM NaCl

2,7 mM KCl

4,3 mM $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$

1,4 mM KH_2PO_4

2 mM EDTA

pH 7,3 στους 37^oC

Διάλυμα 2

25 mM HEPES

5,4 mM KCl

140 mM NaCl

2 mM EDTA

pH 7,2 στους 25^oC

Διάλυμα 3

25 mM HEPES

5,4 mM KCl

140 mM NaCl

2 mM EDTA

pH 7,2 στους 18^oC

Διάλυμα 4

137 mM NaCl

2,7 mM KCl

4,3 mM $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$

1,4 mM KH_2PO_4

2 mM EDTA

10 mM $MgCl_2$

pH 7,1 στους 23^oC

Διάλυμα 5

25 mM HEPES

5,4 mM KCl

140 mM NaCl

2 mM EDTA

10 mM $MgCl_2$

0,93 μg/ml Απροτινίνη

0,2 mg/ml Βακιτρακίνη

pH 7,1 στους 23^oC

Διάλυμα 6

20 mM HEPES

10 mM $MgCl_2 \cdot 6H_2O$

2 mM EGTA

0,93 μg/ml Απροτινίνη

0,2 mg/ml Βακιτρακίνη

pH 7,1 στους 4^oC

Διάλυμα 7

20 mM HEPES

10 mM $MgCl_2 \cdot 6H_2O$

2 mM EGTA

0,1% BSA

0,93 μg/ml Απροτινίνη

0,2 mg/ml Βακιτρακίνη

pH 7,1 στους 20^oC

Διάλυμα 8

137 mM NaCl

2,7 mM KCl

4,3 mM $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$

1,4 mM KH_2PO_4

0,01% Triton X-100

pH 7,1 στους 4^oC

Μέθοδος

HEK 293 κύτταρα που εκφράζανε τους υποδοχείς του CRF καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό όπως αναφέρθηκε παραπάνω ώστε την επόμενη ημέρα (ημέρα πειράματος) να έχουν πυκνότητα 90-100%. Μετά την αφαίρεση του θρεπτικού υλικού τα κύτταρα εκπλύθηκαν με 6 ml διαλύματος 1, αποκολλήθηκαν με τη χρήση του ίδιου ρυθμιστικού διαλύματος, μεταφέρθηκαν σε σωληνάριο των 15 ml και τα κυτταρικά εναιωρήματα φυγοκεντρήθηκαν στα 50 g για 1 λεπτό. Το υπερκείμενο αφαιρέθηκε και τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε 180 μl-200 μl διαλύματος 2 ανά 100mm τρυβλίο. Τα κύτταρα διαμοιράστηκαν σε σωληνάρια (20 μl εναιωρήματος/σωληνάριο) και προστέθηκαν για αντίδραση 80 μl διαλύματος MTS αντιδραστηρίου (MTSEA, MTSET, ή MTSES) που η συγκέντρωσή του διέφερε ανάλογα του πειράματος. Η παρασκευή των διαλυμάτων των MTS-αντιδραστηρίων έγινε αμέσως πριν την αντίδραση τους λόγω της γρήγορης υδρόλυσής τους. Η αντίδρασης (η διάρκεια της οποίας διέφερε ανάλογα με το πείραμα) σταμάτησε με τη προσθήκη 14 ml διαλύματος 4 και φυγοκέντρηση των μειγμάτων για 5 λεπτά σε 250 g και σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το τέλος της φυγοκέντρησης το υπερκείμενο αφαιρέθηκε, τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε 1400 μl διαλύματος 5 και επαναφυγοκεντρήθηκαν για 5 λεπτά σε 250 g και σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το τέλος της φυγοκέντρησης και την αφαίρεση του υπερκείμενου τα κύτταρα ομογενοποιήθηκαν σε 1400 μl διαλύματος 6 για 20 δευτερόλεπτα σε ομογενοποιητή Polytron στις 20000 στροφές/λεπτό και σε 4^oC. Στη συνέχεια τα

μεμβρανικά ομογενοποιήματα φυγοκεντρήθηκαν σε 16000 g για 10 λεπτά στους 4^{o}C και τα ιζήματα επαναιωρήθηκαν σε διάλυμα 7 (100 μl) και ο όγκος αραιώθηκε ανάλογα με τον υποδοχέα που εξετάστηκε (άγριος τύπος CRF_1 ή μεταλλαγμένες μορφές του).

Όγκος 50 μl από τα αραιωμένα μεμβρανικά ομογενοποιήματα επωάστηκε σε σωληνάρια τύπου eppendorf χαμηλής κατακράτησης (low retention), μαζί με 150 μl διαλύματος που περιείχε 25 - 45 pM [^{125}I]-Tyr^{0}-σοβαγίνης, παρουσία (μη ειδική δέσμευση) ή απουσία (ολική δέσμευση) περίσσειας μη ιωδιωμένης σοβαγίνης (0,5-1 μM). Τα μείγματα επωάστηκαν σε θερμοκρασία 20 - 22^{o}C για 2 ώρες και ήπια ανάδευση (30 αναδεύσεις/λεπτό). Ο διαχωρισμός της δεσμευμένης με τον υποδοχέα από την ελεύθερη [^{125}I]-Tyr^{0}-σοβαγίνη, έγινε με διήθηση μέσω φίλτρων ινών υάλου AH934, σε συσκευή Brandel υπό κενό αέρος. Τα φίλτρα είχαν προηγουμένως επωαστεί για μια ώρα σε διάλυμα πολυαιθυλενιμίνης 0,3% στους 4^{o}C. Μετά το τέλος της διήθησης τα φίλτρα εκπλύθηκαν τρεις φορές με 1,5 ml (τη φορά) διαλύματος 8 και μετρήθηκαν σε μετρητή γ - ακτινοβολίας. Η ποσότητα των μεμβρανών που χρησιμοποιήθηκε ήταν τέτοια ώστε η ειδική δέσμευση να ήταν ίση ή μικρότερη του 10% της ολικής δέσμευσης. Η ειδική δέσμευση ορίστηκε ως η ολική μείον τη μη ειδική δέσμευση.

2.8 Μέθοδος προστασίας με ανταλαρμίνη

Υλικά-Συσκευές

Θρεπτικό υλικό, DMEM/F12 (1:1): Dulbecco's Modified Eagle's Medium (GIBCO-BRL, Life Technologies, UK).
Ορός βοός, BCS (Bovine Calf Serum) (Hyclone, USA).
Τρυψίνη, Trypsin/EDTA (GIBCO-BRL, Life Technologies, UK).
Χρωστική Trypan Blue (GIBCO-BRL, Life Technologies, UK).
Αλβουμίνη ορού βοός (Bovine Serum Albumin, BSA) (Sigma, USA).
Φυγόκεντρος (Jouan CR422, France).
Φυγόκεντρος (Eppendorf Centrifuge 5415, Germany).

Μικροσκόπιο ορατού φωτός Olympus, Japan.

Πλάκα αιματοκυτταρομετρητή Neubauer.

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

Τρυβλία καλλιεργειών (SARSTEDT, Germany).

Μέθανοθιοθειϊκό-αιθυλ-αμμώνιο (MTSEA) (Toronto Research Chemicals Inc., Canada)h/r CRF (Bachem, Germany).

Ανταλαρμίνη, Antalarmin (Tocris Bioscience, USA)

[^{125}I]-Tyr^{0}-σοβαγίνη (2200 Ci (81.4 TBq)/mmol NEN Life Science Products, USA).

Πολυαιθυλενιμίνη, Polyethylenimine (PEI) (Merck, USA).

Ομογενοποιητής polytron (Janke & Kunkel IKA Ultra Turrax T25, Germany).

Σωληνάρια τύπου eppendorf χαμηλής κατακράτησης (low retention, Kisker, Germany).

Υδατόλουτρο (Salvis AG, Switzerland).

Συσκευή διήθησης Brandel Cell Harvester (USA).

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

Σωληνάρια 3 ml (SARSTEDT, Germany)

Μετρητής γ - ακτινοβολίας (LKB Wallac 1275 minigamma, Finland) με απόδοση 80% στο ^{125}I.

Διάλυμα 1Π

137 mM NaCl

2,7 mM KCl

4,3 mM $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$

1,4 mM KH_2PO_4

2 mM EDTA

pH 7,3 στους 37^{o}C

Διάλυμα 2Π

25 mM HEPES

5,4 mM KCl

140 mM NaCl

2 mM EDTA

0,93 μg/ml Απροτινίνη

0,2 mg/ml Βακιτρακίνη

pH 7,1 στους 37^{o}C

Διάλυμα 3Π

25 mM HEPES

5,4 mM KCl

140 mM NaCl

2 mM EDTA

pH 6.85 στους 23^{o}C

Διάλυμα 4Π

137 mM NaCl

2,7 mM KCl

4,3 mM $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$

1,4 mM KH_2PO_4

2 mM EDTA

10 mM MgCl

0,93 μg/ml Απροτινίνη

0,2 mg/ml Βακιτρακίνη

pH 7,1 στους 23^{o}C

Διάλυμα 5Π

25 mM HEPES

5,4 mM KCl

140 mM NaCl

2 mM EDTA

10 mM MgCl

0,93 μg/ml Απροτινίνη

0,2 mg/ml Βακιτρακίνη

pH 7,1 στους 23^{o}C

Διάλυμα 6Π

20 mM HEPES

10 mM $MgCl \cdot 6H_2O$

2 mM EGTA

0,93 μg/ml Απροτινίνη

0,2 mg/ml Βακιτρακίνη

pH 7,1 στους 4^{o}C

Διάλυμα 7Π

20 mM HEPES

10 mM $MgCl \cdot 6H_2O$

2 mM EGTA

0,1% BSA

0,93 μg/ml Απροτινίνη

0,2 mg/ml Βακιτρακίνη

pH 7,1 στους 20^{o}C

Διάλυμα 8Π

137 mM NaCl

2,7 mM KCl

4,3 mM $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$

1,4 mM KH_2PO_4

0,01% Triton X-100

pH 7,1 στους 4^{o}C

Μέθοδος

HEK 293 κύτταρα που εκφράζανε τους υποδοχείς του CRF καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό όπως αναφέρθηκε παραπάνω ώστε την επόμενη ημέρα (ημέρα πειράματος) να έχουν πυκνότητα 90-100%. Μετά την αφαίρεση του θρεπτικού υλικού τα κύτταρα εκπλύθηκαν με 6 ml διαλύματος 1Π, αποκολλήθηκαν με τη χρήση του ίδιου ρυθμιστικού διαλύματος, μεταφέρθηκαν σε σωληνάριο των 15 ml και τα κυτταρικά εναιωρήματα φυγοκεντρήθηκαν στα 50 g για 1 λεπτό. Το υπερκείμενο αφαιρέθηκε και τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε 180 μl-200 μl διαλύματος 2Π ανά 100mm τρυβλίο. Τα κύτταρα διαμοιράστηκαν σε σωληνάρια (20 μl εναιωρήματος/σωληνάριο) χωρίς ή με αυξανόμενες συγκεντρώσεις ανταλαρμίνης σε τελικό όγκο 1 ml διαλύματος 2Π και σε θερμοκρασία 37^{o}C για 15 λεπτά. Στο τέλος της επώασης τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν σε 250 g για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και μετά την αφαίρεση 910 μl από το υπερκείμενο υγρό, τα ιζήματα επαναιωρήθηκαν στον εναπομείναντα όγκο των 90 μl και τα κυτταρικά εναιωρήματα επωάστηκαν για αντίδρασή με το MTS-αντιδραστήριο, MTSEA (2,5 mM) όπως αναφέρθηκε στο κεφάλαιο «2.7 Μέθοδος διαθεσιμότητας των κυστεϊνών-υποκαταστατών (substituted-cysteine accessibility method, SCAM)» και το πείραμα συνεχίστηκε με το τρόπο που περιγράφηκε στο κεφάλαιο αυτό .

2.9 Κυτταρομετρία Ροής (FACS Ανάλυση)

Η κυτταρομετρία ροής (Flow Cytometry - FC) είναι μια τεχνική αυτοματοποιημένης κυτταρικής ανάλυσης, που επιτρέπει τη μέτρηση μεμονωμένων σωματιδίων (κυττάρων, πυρήνων, χρωμοσωμάτων κλπ.), καθώς διέρχονται με μορφή νηματικής ροής από ένα σταθερό σημείο, όπου προσπίπτει μια ακτίνα LASER. Με την τεχνική αυτή αναλύονται τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των κατάλληλα προετοιμασμένων δειγμάτων, με βάση τον εκπεμπόμενο φθορισμό και τη σκέδαση του φωτός. Έτσι παρέχεται η δυνατότητα προσδιορισμού σκεδαστικών χαρακτηριστικών και αντιγόνων επιφανείας, αλλά

και αντιγόνων του κυτταροπλάσματος και του πυρήνα σε οποιοδήποτε κυτταρικό πληθυσμό.

Υλικά- Συσκευές

Φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα PBS (Merck, USA).
Φυγόκεντρος (Jouan CR422, France).
Αντίσωμα anti-CRF_1 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA).
Αντίσωμα όρνιθας anti-goat IgG, fluorescein isothiocyanate conjugate, Millipore, Billerica, MA, USA).
Κυτταρομετρητής Beckton-Dickinson FACSArray (Beckton-Dickinson Biosciences, Franklin Lakes, NJ).
Software προγράμματα CellQuest (Beckton-Dickinson Biosciences, Franklin Lakes, NJ).

Μέθοδος

Κύτταρα HEK 293 που εκφράζανε μόνιμα τον CRF_1 (άγριο τύπο ή τις μεταλλαγμένες μορφές του) συλλέχθηκαν με απόξεση, εκπλύθηκαν δύο φορές με PBS και επωάστηκαν (5×10^5 κύτταρα) για 30 λεπτά στους 4^oC, με το αντίσωμα anti-CRF_1 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) σε αραίωση 1:50. Ακολούθησε έκπλυση των κυττάρων 3 φορές με PBS και στη συνέχεια προστέθηκε σε αυτά το δεύτερο αντίσωμα που ήταν συζευγμένο με ισοθειοκυανική φθορισεΐνη (FITC), σε αραίωση 1:100. Μετά το πέρας της επώασης, τα κύτταρα εκπλύθηκαν δύο φορές με PBS και επαναδιαλύθηκαν σε 500 μl PBS. Η χρώση των κυττάρων αναλύθηκε με τη χρήση του κυτταρομετρητή τύπου Beckton-Dickinson FACSArray με τη χρήση δέσμης argon-ion laser στα 488 nm για τη διέγερση της χρωστικής FITC (με μέγιστο μήκος κύματος διέγερσης τα 495 nm και εκπομπής τα 520 nm) και με τη βοήθεια του προγράμματος CellQuest software (Beckton-Dickinson Biosciences, Franklin Lakes, NJ)

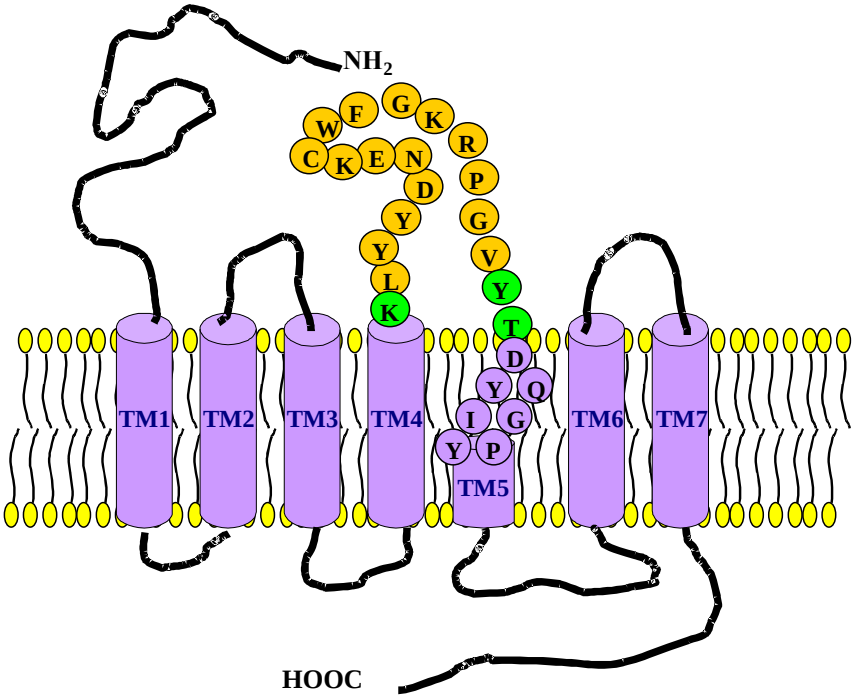
Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων

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

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Οι μελέτες της παρούσας ερευνητικής εργασίας αποσκοπούσαν να προσδιορίσουν το ρόλο στη λειτουργία του CRF_1

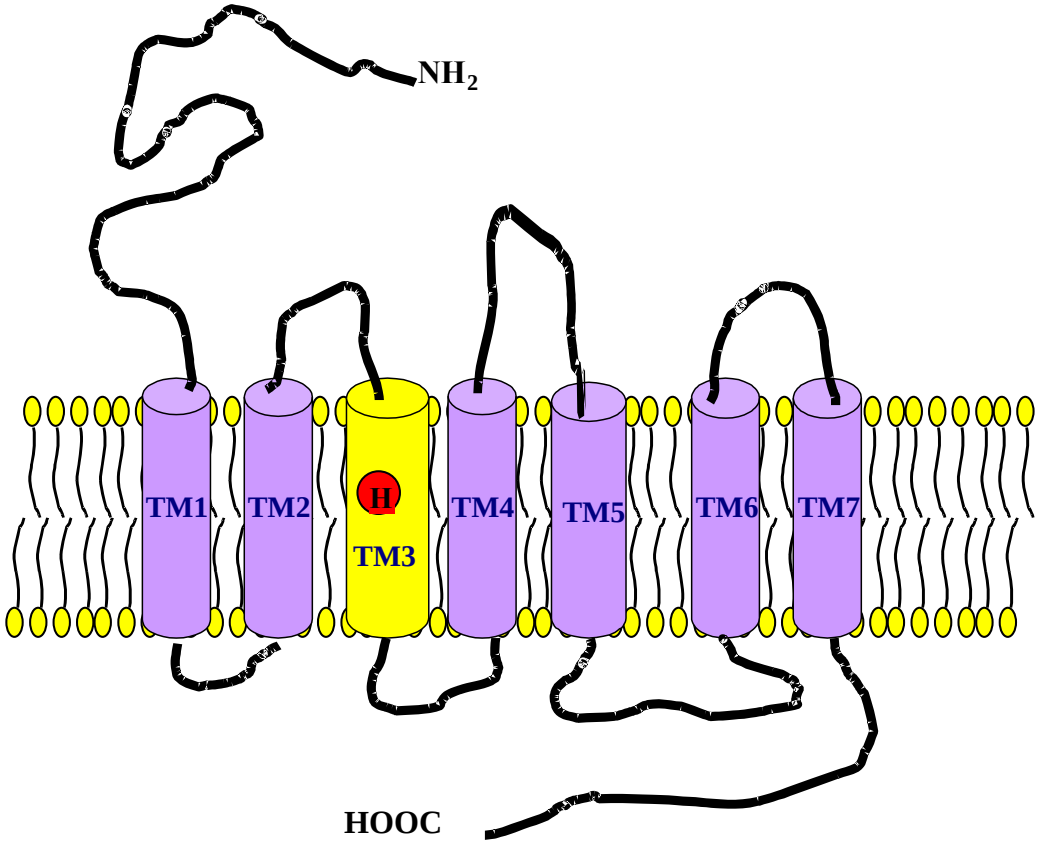
Α) της τρίτης διαμεμβρανικής περιοχής (TM3),
Β) της πέμπτης διαμεμβρανικής περιοχής (TM5)
Γ) της τέταρτης διαμεμβρανικής περιοχής (TM4)
Δ) του δεύτερου εξωκυττάριου βρόγχου (EL2)



Εικόνα 1. Σχηματική αναπαράσταση των περιοχών του CRF_1 που εξετάστηκαν στη παρούσα ερευνητική εργασία. *Στην παρούσα ερευνητική εργασία εξετάστηκε ο ρόλος στη λειτουργία του CRF_1, Α) της τρίτης διαμεμβρανικής περιοχής (TM3), Β) της Lys250 (χρωματισμένη πράσινη) στα όρια της τέταρτης διαμεμβρανικής περιοχής (TM4) και του δεύτερου εξωκυττάριου βρόγχου (EL2), Γ) τα αμινοξέα του EL2 (Leu251-Val266, χρωματισμένα πορτοκαλί) και Δ) τα αμινοξέα της πέμπτης διαμεμβρανικής περιοχής (TM5) (Tyr267-Pro275,χρωματισμένα μωβ), εκ των οποίων τα Tyr267 (Y) και Thr268 (T) (χρωματισμένα πράσινα) βρίσκονται στα όρια της TM5 και του EL2. Οι διαμεμβρανικές περιοχές του CRF_1 αναπαριστάνονται με μωβ κυλίνδρους.*

Α) ΤΡΙΤΗ ΔΙΑΜΕΜΒΡΑΝΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ ΤΟΥ CRF_1

Ο ρόλος των αμινοξέων της τρίτης διαμεμβρανικής περιοχής του CRF_1 (εικόνα 2) στη λειτουργία του υποδοχέα, ήταν ο πρώτος που προσδιορίστηκε στην παρούσα ερευνητική εργασία.



Εικόνα 2. Σχηματική αναπαράσταση της τρίτης διαμεμβρανικής περιοχής του CRF_1. *Η τρίτη διαμεμβρανική περιοχή (TM3) του CRF_1 αναπαριστάνεται με κίτρινο κύλινδρο σε αντίθεση με τις άλλες διαμεμβρανικές περιοχές που απεικονίζονται με μωβ κυλίνδρους. Στη μέση περίπου της TM3 βρίσκεται η His199 (χρωματισμένη με κόκκινο) η οποία ήταν το πρώτο από τα αμινοξέα της TM3 του οποίου ο ρόλος στη λειτουργία του CRF_1 προσδιορίστηκε.*

Προσδιορισμός του ρόλου της His199 της τρίτης διαμεμβρανικής περιοχής του CRF_1 στη λειτουργία του υποδοχέα.

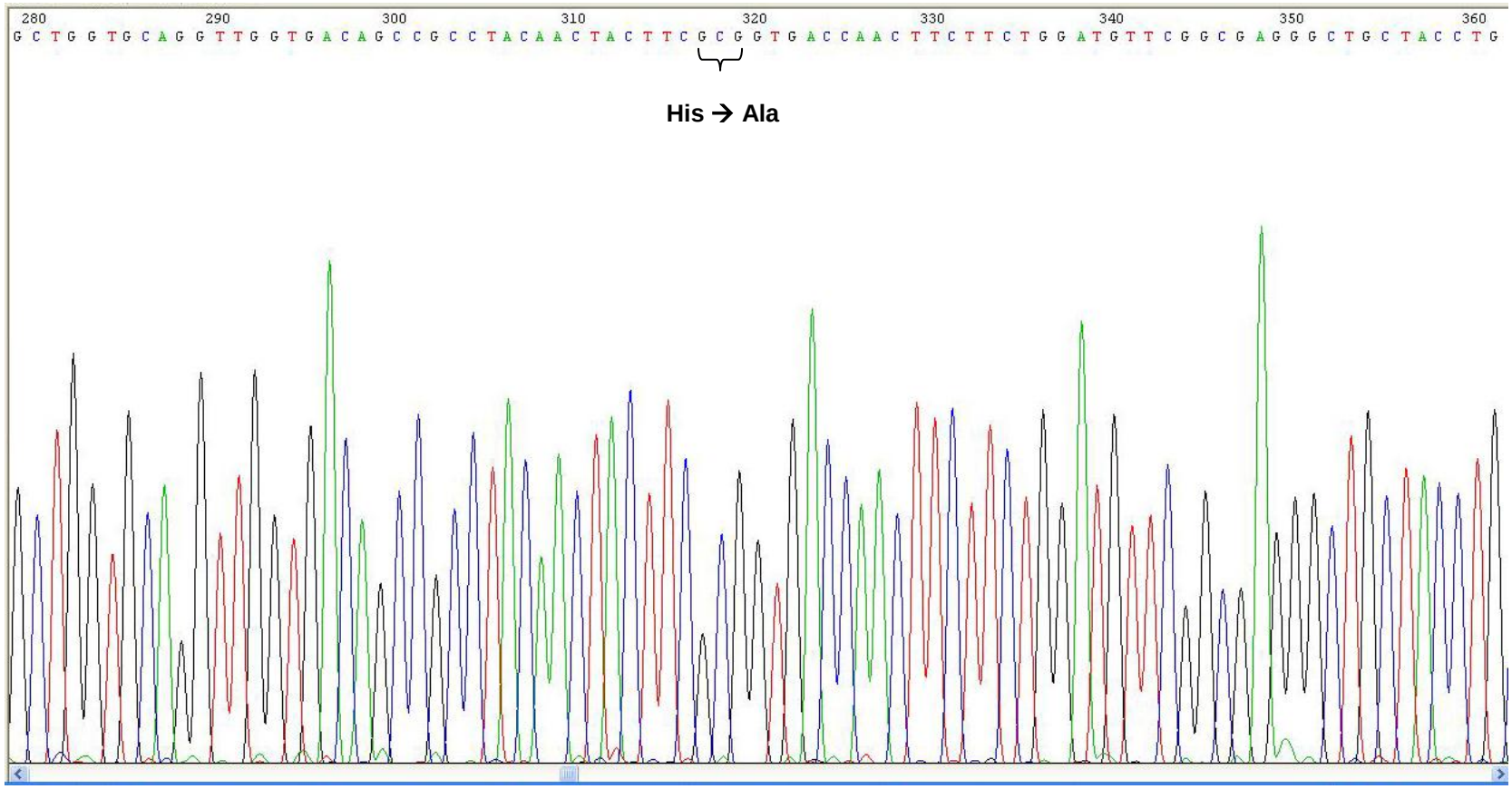
Με σκοπό να εξετάσουμε το ρόλο της His199 του CRF_1 που βρίσκεται στην τρίτη διαμεμβρανική περιοχή του υποδοχέα (TM3), στη δέσμευση του μικρομοριακού μη πεπτιδικού ανταγωνιστή, ανταλαρμίνη, μεταλλάξαμε αυτό το αμινοξύ σε αλανίνη (δημιουργώντας έτσι τον H199A μεταλλαγμένο υποδοχέα) και προσδιορίσαμε τη συγγένεια δέσμευσης της ανταλαρμίνης στον άγριο τύπο (WT) CRF_1 και στον H199A. Όπως φαίνεται στην εικόνα 3, η μετάλλαξη της His199 σε αλανίνη δεν επηρέασε σημαντικά τη συγγένεια δέσμευσης της ανταλαρμίνης για τον CRF_1. Συγκεκριμένα η ανταλαρμίνη δεσμευόταν στους WT και H199A με συγγένειες δέσμευσης 23,7 ± 15,6 nM (n=2) και 21.8 nM (n=1), αντίστοιχα.

Το αποτέλεσμα αυτό οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η His199 δε δεσμεύει την ανταλαρμίνη. Με σκοπό να βρούμε αν και ποια αμινοξέα της TM3 του CRF_1 δέσμευαν την ανταλαρμίνη έπρεπε πρώτα να προσδιορίσουμε :

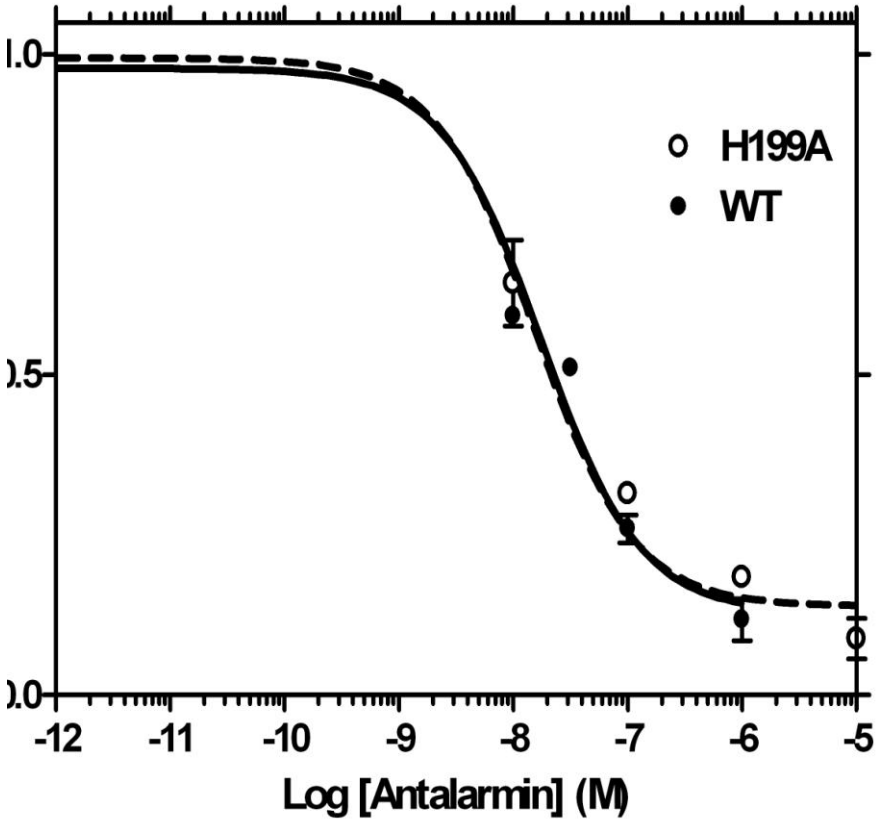
i) αν οι διαμεμβρανικές περιοχές του CRF_1 σχηματίζουν την κοιλότητα θέσεων δέσμευσης που σχηματίζουν οι αντίστοιχες περιοχές των άλλων υποδοχέων της οικογένειας των GPCRs που ανήκει και ο CRF_1, δηλαδή του υποδοχέα της ροδοψίνης, του β_2-αδρενεργικού υποδοχέα και του D_2-υποδοχέα της ντοπαμίνης [176-185]. Η κοιλότητα αυτή εισχωρεί στην πλασματική μεμβράνη του κυττάρου και επικοινωνεί με το εξωκυττάριο υγρό

ii) ποιά αμινοξέα της TM3 του CRF_1 βρίσκονται στην επιφάνεια της κοιλότητας θέσεων δέσμευσης του υποδοχέα και έτσι έχοντας προσανατολισμένες τις πλευρικές τους αλυσίδες στο εξωκυττάριο υγρό, είναι διαθέσιμα για πιθανή αλληλεπίδραση με την ανταλαρμίνη. Μόνο τα αμινοξέα αυτά της TM3 θα ληφθούν υπόψη στις μελέτες μας για το προσδιορισμό εκείνων που αλληλεπιδρούν με την ανταλαρμίνη.

Μετάλλαξη της His199 σε αλανίνη



Εικόνα ΑΧ1. Μετάλλαξη της His199 σε Ala. *Στο χρωματογράφημα διακρίνεται η περιοχή των νουκλεοτιδίων μέσα στην οποία υπάρχει η αλληλουχία GCG που κωδικοποιεί το αμινοξύ της μετάλλαξης αλανίνη. Τα νουκλεοτίδια αυτά αντικατέστησαν τα CAT του* $hCRF_1$.

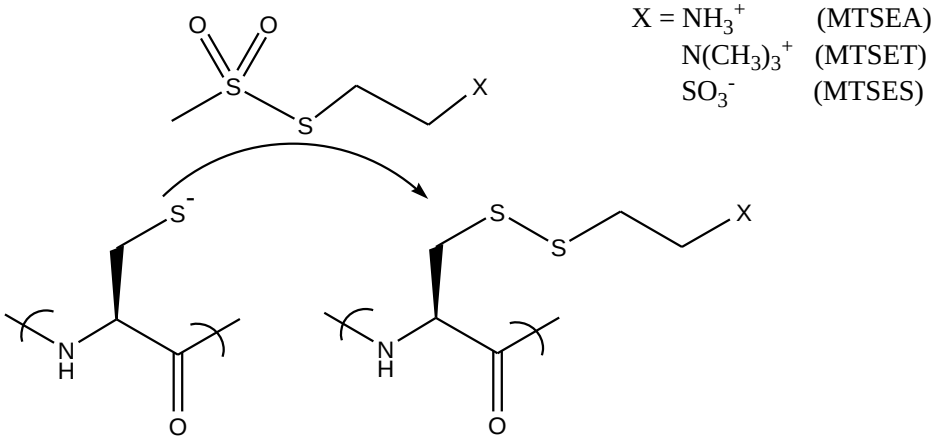


Εικόνα 3. Συναγωνιστική δέσμευση της ανταλαρμίνης στον άγριο τύπο CRF_1 και στο μεταλλαγμένο υποδοχέα, H199A. *Ο συναγωνισμός της δέσμευσης της [^{125}I] – Tyr^0-σοβαγίνης από την ανταλαρμίνη, επιτεύχθηκε, όπως αναφέρεται στο κεφάλαιο ΄΄Υλικά και Μέθοδοι΄΄, σε μεμβρανικά ομογενοποιήματα κυττάρων HEK 293 που εκφράζανε σταθερά τον άγριο τύπο CRF_1 (WT), ή το μεταλλαγμένο υποδοχέα H199A. Οι μέσοι όροι των τιμών (εις διπλούν) και τα σταθερά λάθη τους προέρχονται από ένα χαρακτηριστικό πείραμα που έγινε 1-2 φορές με παρόμοια αποτελέσματα. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων του κάθε πειράματος έγινε μη γραμμικά και οι τιμές logIC_{50} και IC_{50} προσδιορίστηκαν όπως αναφέρεται στη μεθοδολογία και ήταν 23,7 ± 15,6 nM για τον WT και 21,8 nM για τον H199A.*

Λήψη πληροφοριών για τη δομή της τρίτης διαμεμβρανικής περιοχής του CRF_1.

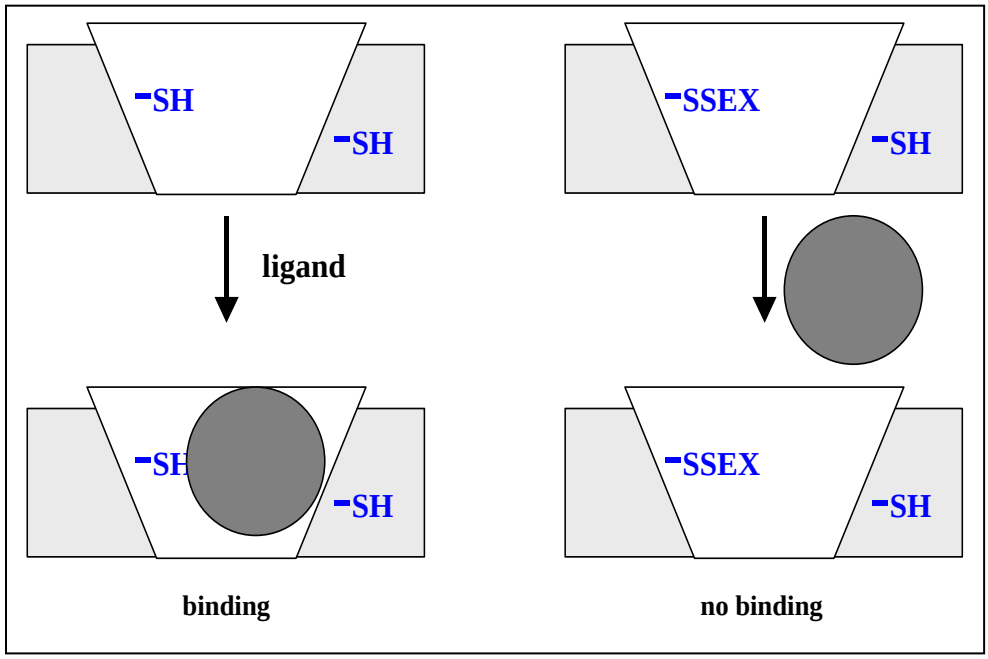
Για να προσδιορίσουμε αν οι διαμεμβρανικές περιοχές του υποδοχέα σχηματίζουν κοιλότητα θέσεων δέσμευσης και ποιά αμινοξέα της τρίτης διαμεμβρανικής περιοχής (TM3) του CRF_1 βρίσκονται πάνω στην επιφάνειά της, λαμβάνοντας έτσι πληροφορίες για τη δομή της περιοχής αυτής του υποδοχέα, χρησιμοποιήσαμε τη μέθοδο της διαθεσιμότητας των κυστεϊνών-υποκαταστατών (substituted-cysteine accessibility method (SCAM)). Η μέθοδος αυτή περιλαμβάνει :

1) μετάλλαξη των αμινοξέων της TM3 σε κυστεΐνες (τεχνητές κυστεΐνες), ένα την κάθε φορά
2) έκφραση των μεταλλαγμένων υποδοχέων σε κύτταρα και
3) χημική τροποποίηση των υποδοχέων με μη αντιστρεπτό τρόπο, χρησιμοποιώντας παράγωγα των μεθανοθειοσουλφονικών αντιδραστηρίων (MTS-αντιδραστηρίων) τα οποία έχουν την ικανότητα να αντιδρούν με τη σουλφυδρυλική ομάδα μιας κυστεΐνης, μέσω σχηματισμού δισουλφιδικού δεσμού (εικόνα 4).



Εικόνα 4. *Αντίδραση MTS-αντιδραστηρίων με τη σουλφυδρυλική ομάδα μιας κυστεΐνης, μέσω σχηματισμού δισουλφιδικού δεσμού*

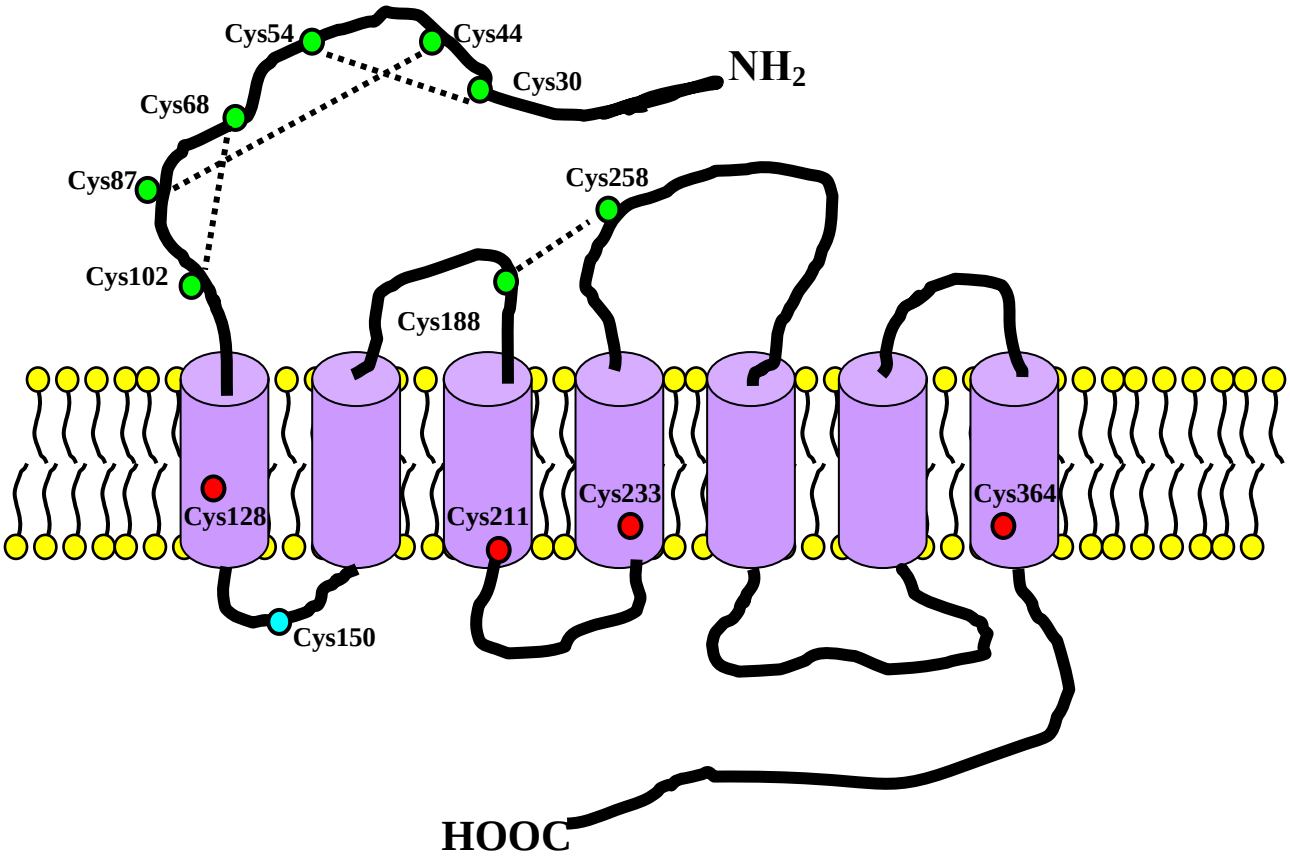
4) ανίχνευση της αντίδρασης των MTS-αντιδραστηρίων με μια τεχνητή κυστεΐνη με βάση την ικανότητα των αντιδραστηρίων αυτών να ελαττώνουν μη αντιστρεπτά τη δέσμευση της ραδιοσημασμένης σοβαγίνης στο μεταλλαγμένο με τεχνητή κυστεΐνη υποδοχέα (εικόνα 5).



Εικόνα 5. Σχηματική αναπαράσταση της αντίδρασης ενός MTS- αντιδραστηρίου με μια κυστεΐνη της τρίτης διαμεμβρανικής περιοχής του CRF_1 που βρίσκεται πάνω στην επιφάνεια της κοιλότητας των θέσεων δέσμευσης του υποδοχέα. *Η πλασματική μεμβράνη απεικονίζεται με γκρι παραλληλόγραμμο, η κοιλότητα θέσεων δέσμευσης (μαζί με το εξωκυττάριο υγρό) με άσπρο τραπέζιο, και η ραδιοσημασμένη σοβαγίνη (ligand) με μαύρο κύκλο. Το SEX παριστάνει την ομάδα $-SCH_2CH_2$ X των MTS αντιδραστηρίων (όπου X περιγράφεται στην εικόνα 4) που αντιδρά μη αντιστρεπτά με τη σουλφυδρυλική ομάδα (-SH) μιας κυστεΐνης της τρίτης διαμεμβρανικής περιοχής (TM3) του CRF_1, που βρίσκεται πάνω στην επιφάνεια της κοιλότητας των θέσεων δέσμευσης του υποδοχέα και έχει την πλευρική της αλυσίδα προσανατολισμένη στο εξωκυττάριο υγρό. Η αντίδραση αυτή δεν επιτρέπει στη ραδιοσημασμένη σοβαγίνη να δεσμευτεί στον υποδοχέα. Αντίθετα αν μια κυστεΐνη της TM3 έχει προσανατολισμένη την πλευρική της αλυσίδα στη λιπιδική διπλοστιβάδα της πλασματικής μεμβράνης τότε δεν αντιδρά με το MTS-αντιδραστήριο και έτσι το τελευταίο δεν επηρεάζει τη δέσμευση της σοβαγίνης.*

Ελάττωση της δέσμευσης της ραδιοσημασμένης σοβαγίνης σε ένα μεταλλαγμένο με τεχνητή κυστεΐνη υποδοχέα μετά από αντίδρασή του με τα MTS-αντιδραστήρια, οδηγεί στο συμπέρασμα ότι αυτά αντέδρασαν μη αντιστρεπτά με τη σουλφυδρυλική ομάδα της τεχνητής κυστεΐνης, σχηματίζοντας δισουλφιδικό δεσμό και ότι η τεχνητή κυστεΐνη και κατά συνέπεια το αμινοξύ του άγριου τύπου υποδοχέα το οποίο αντικατέστησε η κυστεΐνη αυτή, βρίσκεται στην επιφάνεια της κοιλότητας θέσεων δέσμευσης του υποδοχέα και είναι διαθέσιμο στο εξωκυττάριο υδατικό περιβάλλον.

Όμως πριν την εφαρμογή της μεθόδου SCAM ήταν απαραίτητο να διαπιστώσουμε αν κάποια ή κάποιες από τις 13 ενδογενείς κυστεΐνες του CRF_1 (εικόνα 6) θα μπορούσαν να αντιδράσουν με τα MTS-αντιδραστήρια. Στην περίπτωση αυτή δεν θα μπορούσε να εφαρμοστεί η μέθοδος SCAM, παρά μόνο αφού βρεθούν οι ενδογενείς κυστεΐνες του CRF_1 που αντιδρούν με τα MTS-αντιδραστήρια και αντικατασταθούν με την αδρανή στα αντιδραστήρια αυτά σερίνη.



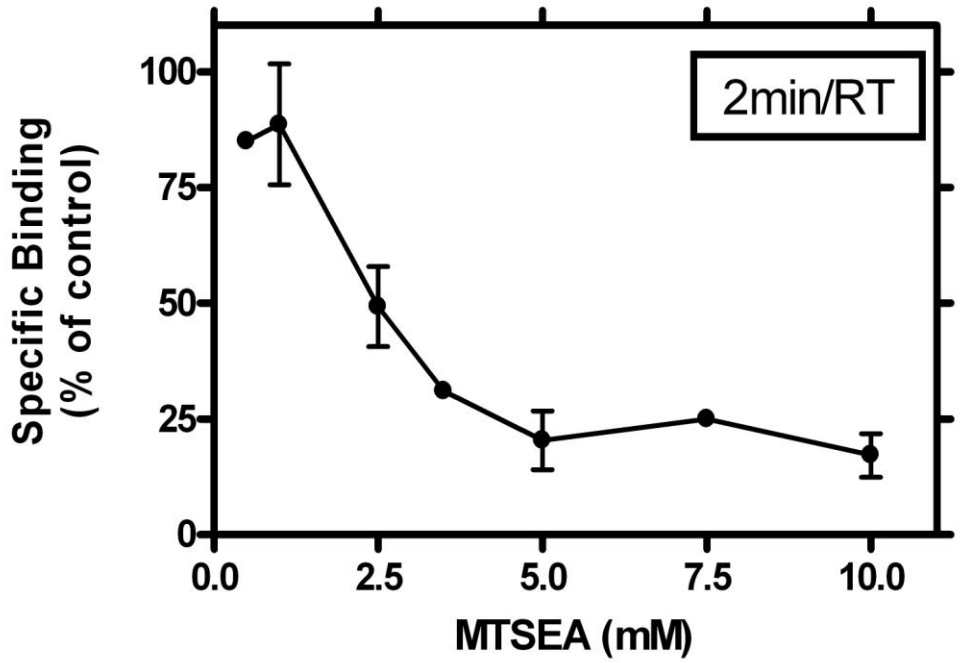
Εικόνα 6. Απεικόνιση του CRF_1 στην πλασματική μεμβράνη του κυττάρου. *Οι μωβ κύλινδροι παριστάνουν τις διαμεμβρανικές περιοχές (TM1-TM7) του υποδοχέα. Οι κυστεΐνες που σχηματίζουν δισουλφιδικούς δεσμούς (στικτές γραμμές) απεικονίζονται με πράσινους κύκλους και είναι οι Cys30, Cys44, Cys54, Cys68, Cys87, Cys102, Cys188 και Cys258. Οι κυστεΐνες αυτές βρίσκονται στην εξωκυττάριο αμινοτελική περιοχή καθώς και στο πρώτο και δεύτερο εξωκυττάριο βρόγχο του υποδοχέα και δε μπορούν να αντιδράσουν με τα MTS-αντιδραστήρια. Μόνο οι ελεύθερες κυστεΐνες Cys128, Cys211, Cys233 και Cys364 (κόκκινα αμινοξέα) που βρίσκονται στην πρώτη (TM1), τρίτη (TM3), τέταρτη (TM4) και έβδομη (TM7) διαμεμβρανική περιοχή του υποδοχέα αντίστοιχα, είναι υποψήφιες για αντίδραση με το MTSEA. Επίσης απεικονίζεται η Cys150 (μπλε αμινοξύ) που βρίσκεται στον πρώτο ενδοκυττάριο βρόγχο του υποδοχέα.*

Αντίδραση του MTSEA με τον άγριο τύπο CRF_1

Για να προσδιορίσουμε αν ο άγριος τύπος CRF_1 περιέχει ενδογενείς κυστεΐνες που αντιδρούν με τα MTS-αντιδραστήρια προσδιορίσαμε την επίδραση της αντίδρασης του MTS-αντιδραστηρίου μεθανοθειοσουλφονικού αιθυλαμμώνιου methanethiosulfonate ethylammonium (MTSEA) στη δέσμευση της $[^{125}I]$– Tyr^0 – σοβαγίνης.

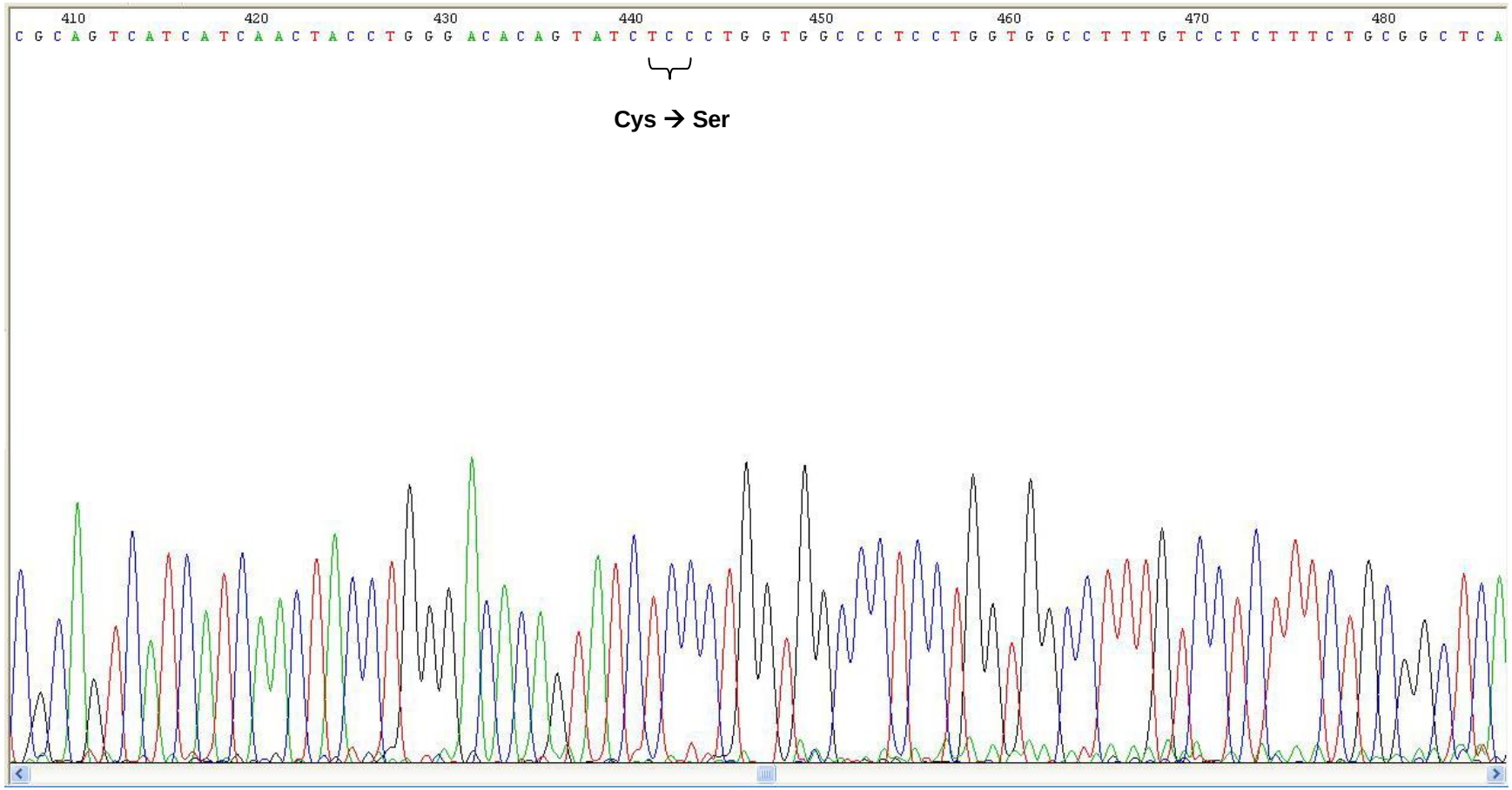
Όπως φαίνεται από την εικόνα 7, ο άγριος τύπος CRF_1 (WT) αντέδρασε με το MTSEA και έτσι ελάττωσε την ειδική δέσμευση της $[^{125}I]$ – Tyr^0 – σοβαγίνης, με δοσοεξαρτώμενο τρόπο. Αυτό σημαίνει ότι μία ή περισσότερες ενδογενείς κυστεΐνες του υποδοχέα αντέδρασαν με το MTSEA.

Με σκοπό την εύρεση των ενδογενών κυστεϊνών που αντιδρούν με το MTSEA, μεταλλάξαμε τις κυστεΐνες των διαμεβρανικών περιοχών που βρίσκονται στις θέσεις 128, 211, 233 και 364 (εικόνα 6) σε σερίνη, μία την κάθε φορά, δημιουργώντας με τον τρόπο αυτό τις μεταλλάξεις C128S, C211S, C233S και C364S και στη συνέχεια μελετήσαμε τις φαρμακολογικές ιδιότητες των μεταλλαγμένων υποδοχέων, καθώς και την επίδραση που είχε σε αυτές η αντίδραση του MTSEA.

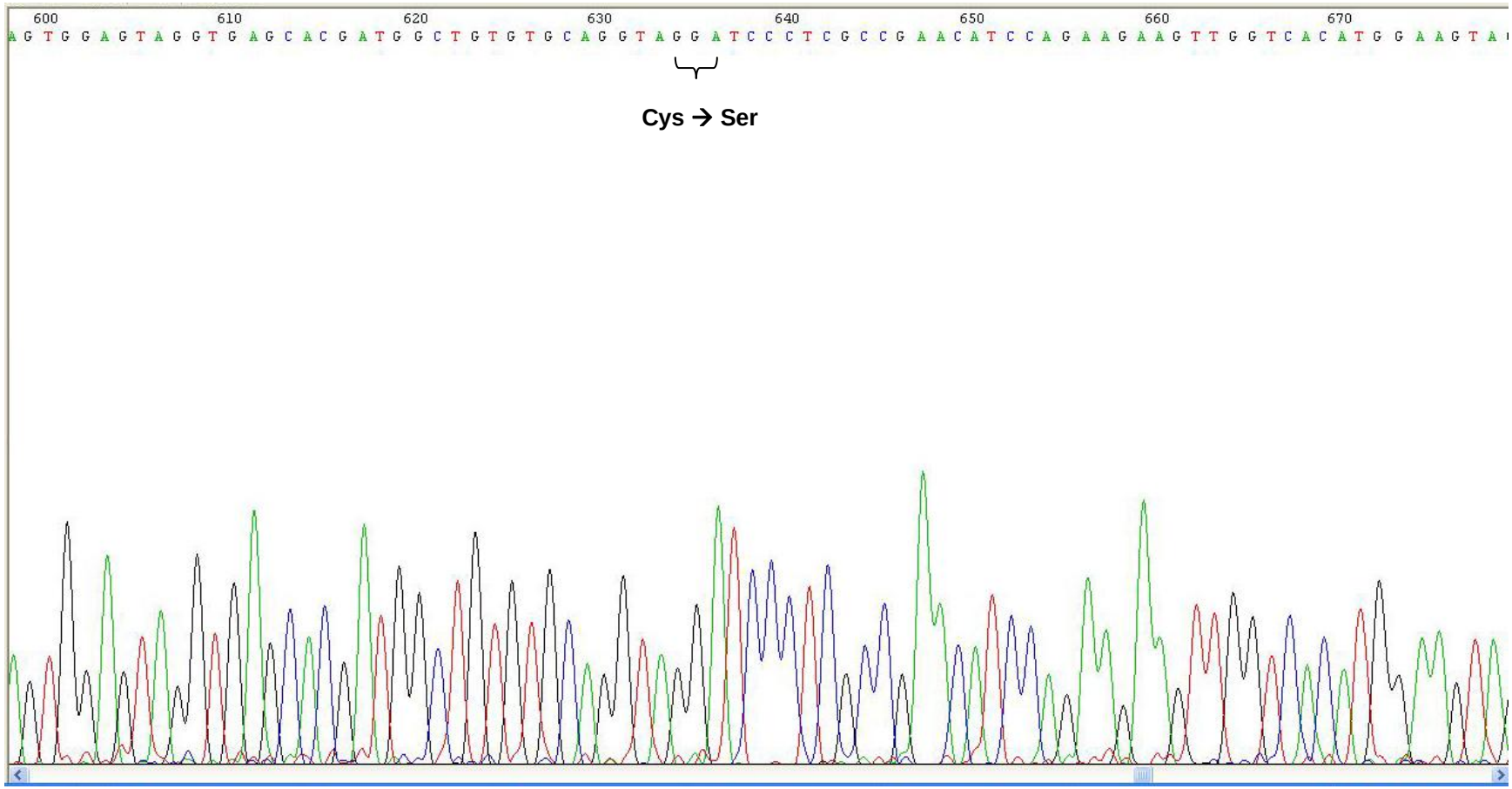


Εικόνα 7. Επίδραση της αντίδρασης του MTSEA με τον άγριο τύπο CRF_1 στην ειδική δέσμευση της [^{125}I] – Tyr^0 – σοβαγίνης. *Κύτταρα HEK 293 που εκφράζανε σταθερά τον άγριο τύπο (WT) CRF_1 αιωρημένα σε ρυθμιστικό διάλυμα Hepes/K^+/Na^+, επωάστηκαν για 2 λεπτά της ώρας σε θερμοκρασία δωματίου, με ή χωρίς (μάρτυρας) διαφορετικές συγκεντρώσεις MTSEA. Στη συνέχεια τα κύτταρα ομογενοποιήθηκαν και προσδιορίστηκε η ειδική δέσμευση της [^{125}I] – Tyr^0 – σοβαγίνης στα μεμβρανικά ομογενοποιήματα, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο ΄΄Υλικά και Μέθοδοι΄΄. Οι μέσοι όροι ± τυπικά σφάλματα είναι από 1-11 ξεχωριστά πειράματα. Η % ειδική δέσμευση ορίζεται ως {[ειδική δέσμευση μετά από την αντίδραση με MTSEA / ειδική δέσμευση χωρίς MTSEA (μάρτυρας)] x 100}.*

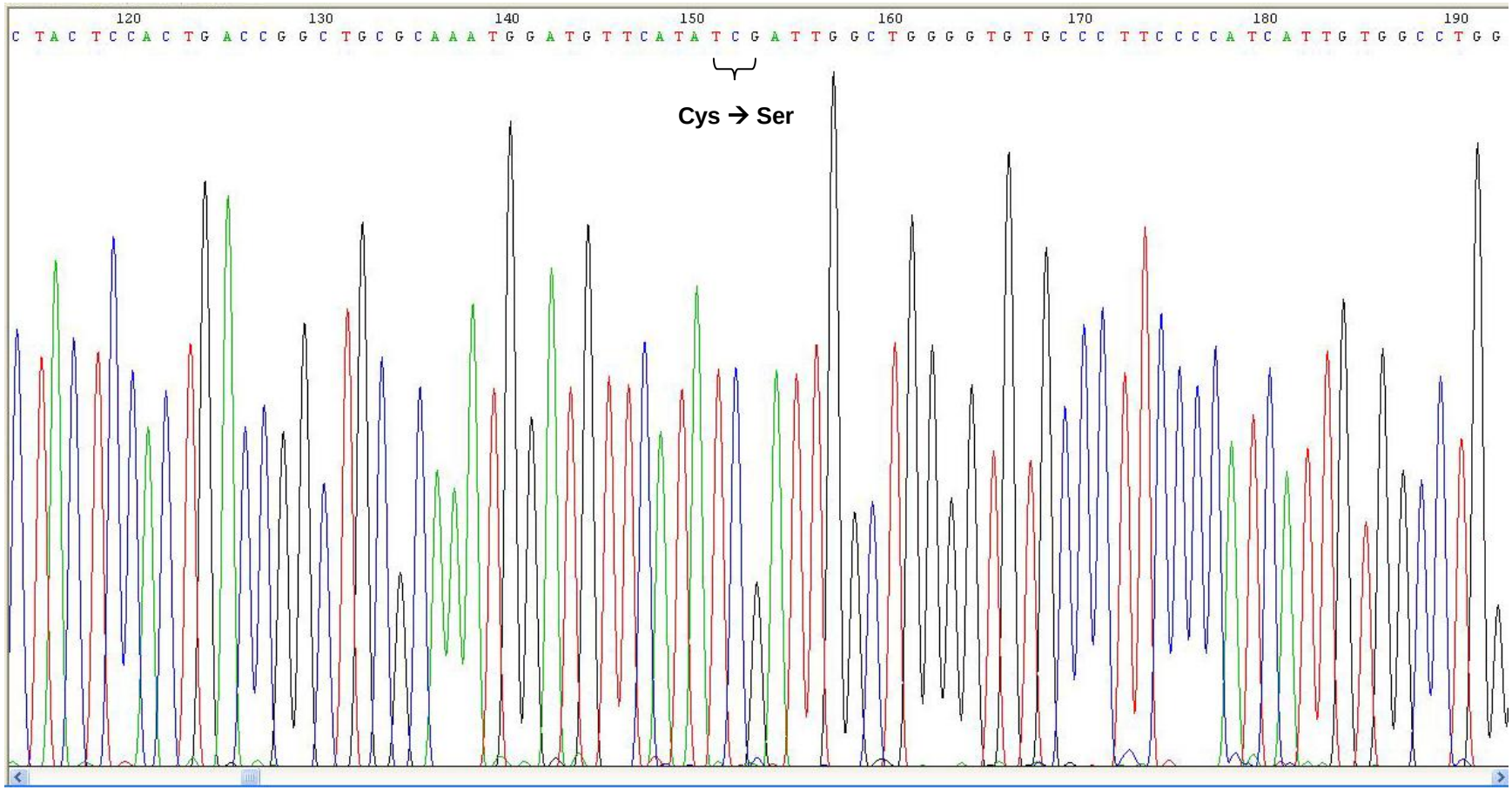
Μεταλλάξεις, C128S, C211S, C233S και C364S, του CRF_1



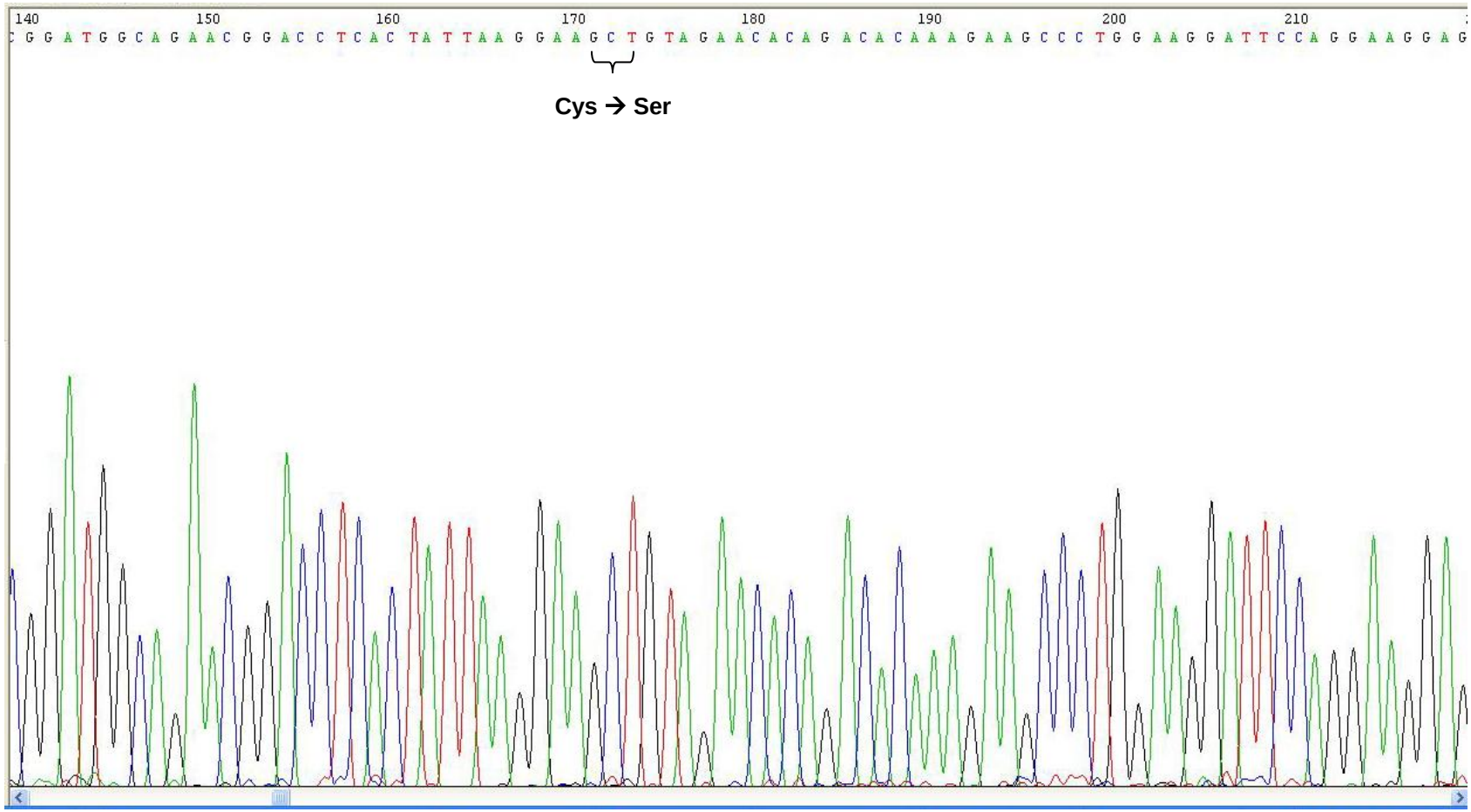
Εικόνα Α2.Χ1. Μετάλλαξη της Cys128 σε Ser. *Στο χρωματογράφημα διακρίνεται η περιοχή των νουκλεοτιδίων μέσα στην οποία υπάρχει η αλληλουχία TCC που κωδικοποιεί το αμινοξύ της μετάλλαξης σερίνη. Τα νουκλεοτίδια αυτά αντικατέστησαν τα TGT του $hCRF_1$.*



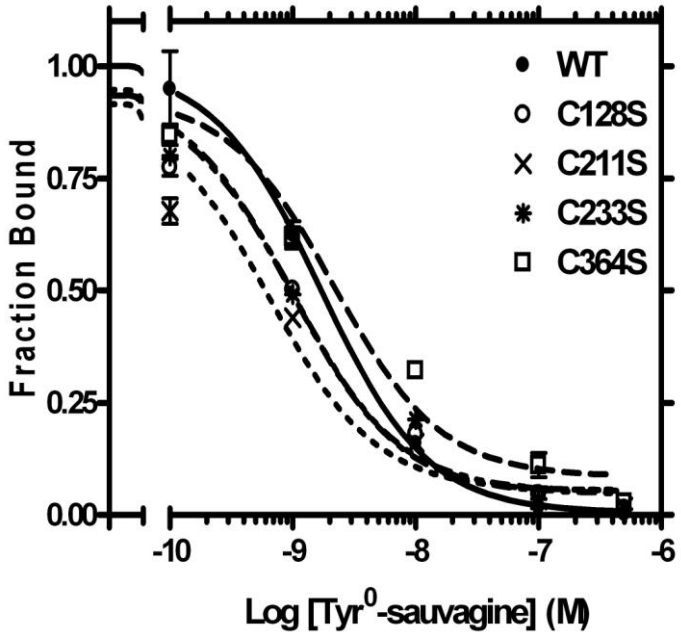
Εικόνα Α2.Χ2. Μετάλλαξη της Cys211 σε Ser. *Στο χρωματογράφημα διακρίνεται η περιοχή των νουκλεοτιδίων μέσα στην οποία υπάρχει η αλληλουχία GGA η οποία είναι η αντίστροφη και συμπληρωματική της αλληλουχίας TCC που κωδικοποιεί το αμινοξύ της μετάλλαξης σερίνη. Τα νουκλεοτίδια αυτά αντικατέστησαν τα TGC του hCRF$_1$.*



Εικόνα Α2.Χ3. Μετάλλαξη της Cys233 σε Ser. *Στο χρωματογράφημα διακρίνεται η περιοχή των νουκλεοτιδίων μέσα στην οποία υπάρχει η αλληλουχία TCG που κωδικοποιεί το αμινοξύ της μετάλλαξης σερίνη. Τα νουκλεοτίδια αυτά αντικατέστησαν τα TGC του* $hCRF_1$.



Εικόνα Α2.Χ4. Μετάλλαξη της Cys364 σε Ser. *Στο χρωματογράφημα διακρίνεται η περιοχή των νουκλεοτιδίων μέσα στην οποία υπάρχει η αλληλουχία GCT η οποία είναι η αντίστροφη και συμπληρωματική της αλληλουχίας AGC που κωδικοποιεί το αμινοξύ της μετάλλαξης σερίνη. Τα νουκλεοτίδια αυτά αντικατέστησαν τα TGT του hCRF$_1$.*



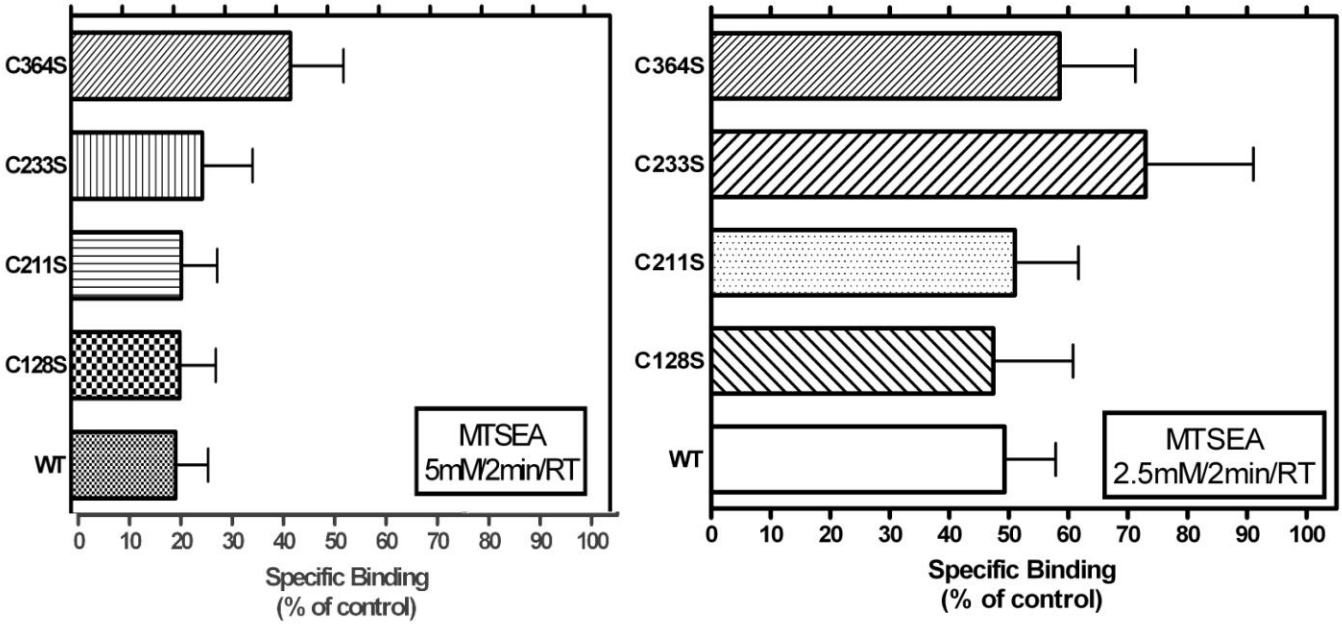
Εικόνα 8. Συναγωνιστική δέσμευση της Tyr^0 – σοβαγίνης στον άγριο τύπο CRF_1 και στους μεταλλαγμένους υποδοχείς C128S, C211S, C233S και C364S. *Ο συναγωνισμός της δέσμευσης της [^{125}I] – Tyr^0 – σοβαγίνης από την Tyr^0 – σοβαγίνη, επιτεύχθηκε όπως αναφέρεται στο κεφάλαιο ΄΄Υλικά και Μέθοδοι΄΄, σε μεμβρανικά ομογενοποιήματα κυττάρων HEK 293 που εκφράζανε σταθερά τον άγριο τύπο CRF_1, ή τους μεταλλαγμένους υποδοχείς. Οι μέσοι όροι των τιμών (εις διπλούν) και τα σταθερά λάθη τους προέρχονται από ένα χαρακτηριστικό πείραμα που έγινε 3-4 φορές με παρόμοια αποτελέσματα. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων του κάθε πειράματος έγινε μη γραμμικά, οι τιμές -logK_D υπολογίστηκαν σύμφωνα με τη μέθοδο των Motulsky και Christopoulos [202] και ήταν για τους υποδοχείς, WT, C128S, C211S, C233S και C364S ίσες με 9,01 ± 0,11, 8,94 ± 0,03, 9,18 ± 0,04, 9,00 ± 0,05 και 8,76 ± 0,23 αντίστοιχα.*

Φαρμακολογικές ιδιότητες του άγριου τύπου CRF_1 και των μεταλλαγμένων υποδοχέων C128S, C211S, C233S και C364S.

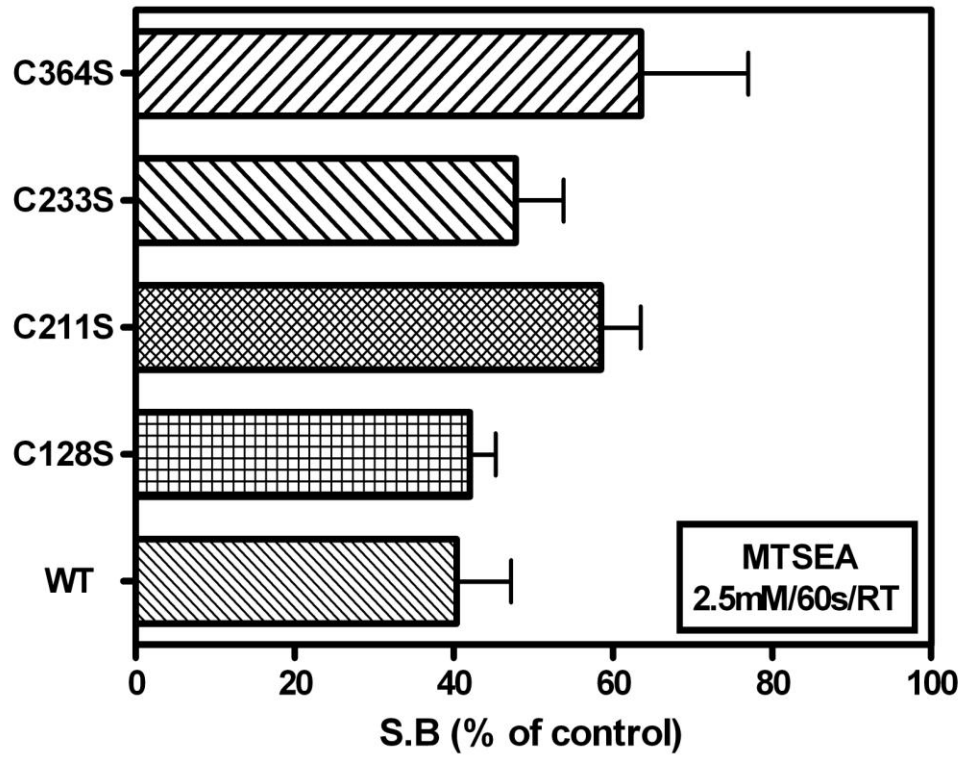
Με σκοπό να διαπιστώσουμε ότι οι μεταλλάξεις C128S, C211S, C233S και C364S δεν επηρέασαν σημαντικά τη λειτουργία και κατά συνέπεια τη δομή του CRF_1, μελετήσαμε τις φαρμακολογικές ιδιότητες των μεταλλαγμένων υποδοχέων προσδιορίζοντας τη συγγένεια με την οποία αυτοί δέσμευαν την [^{125}I] – Tyr^0 – σοβαγίνη. Όπως βλέπουμε στην εικόνα 8, η δέσμευση της [^{125}I] – Tyr^0 – σοβαγίνης δεν επηρεάστηκε σημαντικά από τις μεταλλάξεις. Συγκεκριμένα οι μεταλλάξεις C128S, C211S, C233S και C364S δέσμευαν την [^{125}I] – Tyr^0 – σοβαγίνη με συγγένειες ($-\log K_D$) 8,94 ± 0,03, 9,18 ± 0,04, 9,00 ± 0,05 και 8,76 ± 0,23 παρόμοιες με εκείνες του άγριου τύπου CRF_1 (WT), 9,01 ± 0,11.

Αντίδραση του MTSEA με τους μεταλλαγμένους υποδοχείς C128S, C211S, C233S και C364S

Στη συνέχεια εξετάσαμε την επίδραση της αντίδρασης του MTSEA με τους μεταλλαγμένους υποδοχείς, C128S, C211S, C233S και C364S στην ειδική δέσμευση της [^{125}I] – Tyr^0 – σοβαγίνης σε αυτούς. Όπως φαίνεται στην εικόνα 9, επώαση των μεταλλαγμένων υποδοχέων C128S, C211S, C233S και C364S, για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, με MTSEA σε συγκεντρώσεις των 2,5 και 5 mM, ελάττωσε την ειδική δέσμευση της [^{125}I] – Tyr^0 – σοβαγίνης, όπως και στον άγριο τύπο (WT) CRF_1. Καμία από τις μεταλλάξεις αυτές λοιπόν δεν στάθηκε ικανή να αναστείλει ή έστω να μειώσει το ανασταλτικό αποτέλεσμα του MTSEA στη δέσμευση της [^{125}I] – Tyr^0 – σοβαγίνης στον CRF_1. Το ίδιο παρατηρήθηκε και όταν η αντίδραση του MTSEA σε συγκέντρωση 2,5 mM, έλαβε χώρα για 1 μόνο λεπτό (εικόνα 10).



Εικόνα 9. Επίδραση της αντίδρασης για 2 λεπτά του MTSEA με τον άγριο τύπο CRF_1 και τους μεταλλαγμένους υποδοχείς C128S, C211S, C233S και C364S στην ειδική δέσμευση της [^{125}I] – Tyr^0 – σοβαγίνης. *Κύτταρα HEK 293 που εκφράζανε σταθερά τον άγριο τύπο (WT) CRF_1 και τους μεταλλαγμένους υποδοχείς C128S, C211S, C233S και C364S, αιωρημένα σε ρυθμιστικό διάλυμα Hepes/K^+/Na^+, επωάστηκαν για 2 λεπτά της ώρας σε θερμοκρασία δωματίου, χωρίς (μάρτυρας) ή με MTSEA συγκέντρωσης 2,5 mM και 5 mM. Στη συνέχεια τα κύτταρα ομογενοποιήθηκαν και προσδιορίστηκε η ειδική δέσμευση της [^{125}I] – Tyr^0 – σοβαγίνης σε μεμβρανικά ομογενοποιήματα, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο ΄΄Υλικά και Μέθοδοι΄΄. Οι στήλες αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους ± τυπικά σφάλματα από 4-11 ξεχωριστά πειράματα. Η % ειδική δέσμευση ορίζεται ως {[ειδική δέσμευση μετά από την αντίδραση με MTSEA / ειδική δέσμευση χωρίς MTSEA (μάρτυρας)] x 100}.*

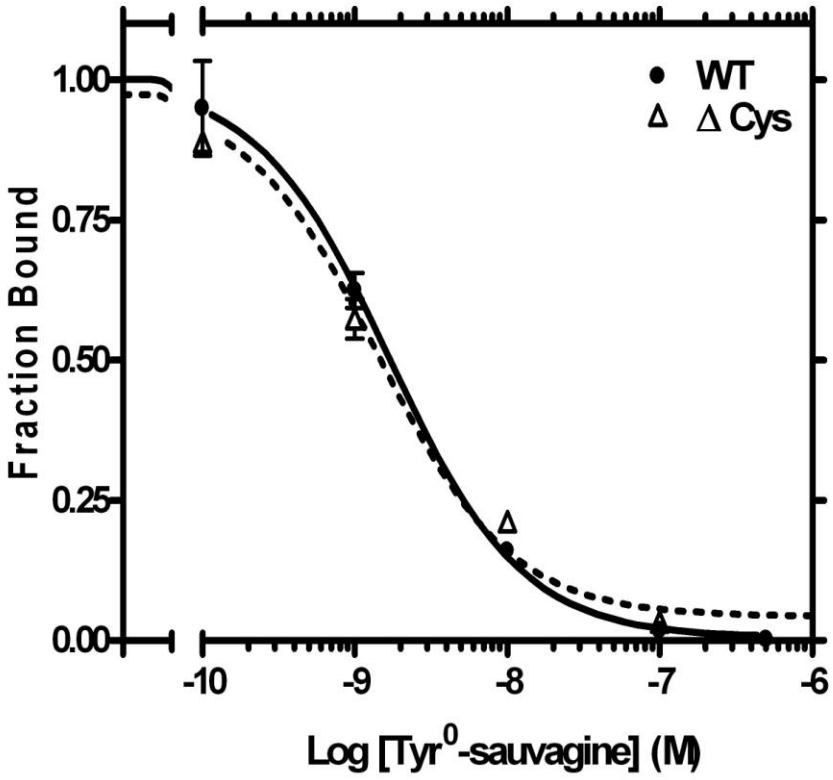


Εικόνα 10. Επίδραση της αντίδρασης για 1 λεπτό του MTSEA με τον άγριο τύπο CRF_1 και τους μεταλλαγμένους υποδοχείς C128S, C211S, C233S και C364S στην ειδική δέσμευση της [^{125}I] – Tyr^0 – σοβαγίνης. *Κύτταρα HEK 293 που εκφράζανε σταθερά τον άγριο τύπο CRF_1 και τους μεταλλαγμένους υποδοχείς C128S, C211S, C233S και C364S, αιωρημένα σε ρυθμιστικό διάλυμα Hepes/K^+/Na^+, επωάστηκαν για 1 λεπτό της ώρας σε θερμοκρασία δωματίου, με ή χωρίς (μάρτυρας) MTSEA συγκέντρωσης 2,5 mM. Στη συνέχεια τα κύτταρα ομογενοποιήθηκαν και προσδιορίστηκε η ειδική δέσμευση της [^{125}I] – Tyr^0 – σοβαγίνης στα μεμβρανικά ομογενοποιήματα, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο ΄΄Υλικά και Μέθοδοι΄΄. Οι στήλες αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους ± τυπικά σφάλματα από 4-8 ξεχωριστά πειράματα. Η % ειδική δέσμευση ορίζεται ως {[ειδική δέσμευση μετά από την αντίδραση με MTSEA / ειδική δέσμευση χωρίς MTSEA (μάρτυρας)] x 100}.*

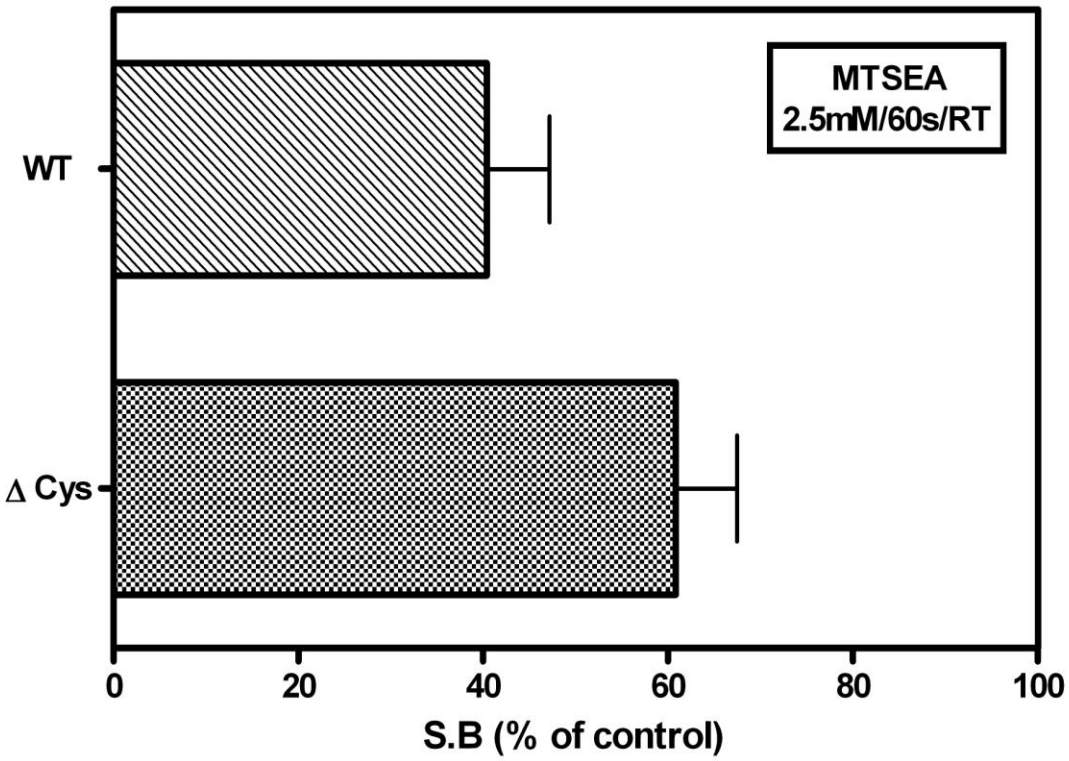
Φαρμακολογικές ιδιότητες του μεταλλαγμένου υποδοχέα ΔCys

Αφού καμία από τις μεταλλάξεις σε σερίνη των ελεύθερων ενδογενών κυστεϊνών του CRF_1, δε στάθηκε ικανή να αναστείλει ή έστω να μειώσει το ανασταλτικό αποτέλεσμα του MTSEA στη δέσμευση της [^{125}I] – Tyr^0 – σοβαγίνης στον CRF_1, εξετάσαμε στη συνέχεια αν το MTSEA αντιδρά με ένα μεταλλαγμένο υποδοχέα του CRF_1 που δεν έχει καμία ενδογενή ελεύθερη κυστεΐνη.

Για το σκοπό αυτό μεταλλάξαμε τις κυστεΐνες που βρίσκονται στις θέσεις 128, 211, 233 και 364 του CRF_1 ταυτόχρονα σε σερίνες, δημιουργώντας έτσι το μεταλλαγμένο υποδοχέα ΔCys. Πριν όμως προχωρήσουμε στα πειράματα αντίδρασης του MTSEA με τον ΔCys, εξετάσαμε τις φαρμακολογικές ιδιότητές του, προσδιορίζοντας τη συγγένεια με την οποία δεσμεύει την [^{125}I] – Tyr^0 – σοβαγίνη. Η δέσμευση της [^{125}I]– Tyr^0 – σοβαγίνης δεν επηρεάστηκε σημαντικά από τον παραπάνω συνδυασμό μεταλλάξεων (εικόνα 11). Συγκεκριμένα, ο μεταλλαγμένος υποδοχέας ΔCys δέσμευε την [^{125}I] – Tyr^0 – σοβαγίνη με συγγένεια ($-\log K_D$) 8,64 ± 0,21, παρόμοια με εκείνη του άγριου τύπου (WT) CRF_1 ($-\log K_D$) 9,01 ± 0,11.



Εικόνα 11. Συναγωνιστική δέσμευση της Tyr^0 – σοβαγίνης στον άγριο τύπο CRF$_1$ και στο μεταλλαγμένο υποδοχέα, ΔCys. *Ο συναγωνισμός της δέσμευσης της [^{125}I] – Tyr^0 – σοβαγίνης από την Tyr^0 – σοβαγίνη, επιτεύχθηκε όπως αναφέρεται στο κεφάλαιο ΄΄Υλικά και Μέθοδοι΄΄, σε μεμβρανικά ομογενοποιήματα από κύτταρα HEK 293 που εκφράζανε σταθερά τον άγριο τύπο (WT) CRF$_1$, ή το μεταλλαγμένο υποδοχέα ΔCys. Οι μέσοι όροι των τιμών και τα σταθερά λάθη τους προέρχονται από ένα χαρακτηριστικό πείραμα που έγινε 3-4 φορές δίνοντας παρόμοια αποτελέσματα. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων του κάθε πειράματος έγινε μη γραμμικά, οι τιμές -logK$_D$ υπολογίστηκαν σύμφωνα με τη μέθοδο των Motulsky και Christopoulos [202] και ήταν για τους υποδοχείς WT και ΔCys ίσες με 9,01 ± 0,11 και 8,64 ± 0,21 αντίστοιχα.*



Εικόνα 12. Επίδραση της αντίδρασης του MTSEA με τον άγριο τύπο CRF_1 και το μεταλλαγμένο υποδοχέα ΔCys στην ειδική δέσμευση της [^{125}I] – Tyr^0 – σοβαγίνης. *Κύτταρα HEK 293 που εκφράζανε σταθερά τον άγριο τύπο CRF_1 και το μεταλλαγμένο υποδοχέα ΔCys, αιωρημένα σε ρυθμιστικό διάλυμα Hepes/K^+/Na^+, επωάστηκαν για 1 λεπτό της ώρας σε θερμοκρασία δωματίου, χωρίς (μάρτυρας) ή με MTSEA συγκέντρωσης 2,5 mM. Στη συνέχεια τα κύτταρα ομογενοποιήθηκαν και προσδιορίστηκε η ειδική δέσμευση της [^{125}I] – Tyr^0 – σοβαγίνης, σε μεμβρανικά ομογενοποιήματα, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο ΄΄Υλικά και Μέθοδοι΄΄. Οι στήλες αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους ± τυπικά σφάλματα από 7-8 ξεχωριστά πειράματα. Η % ειδική δέσμευση ορίζεται ως {[ειδική δέσμευση μετά από την αντίδραση με MTSEA / ειδική δέσμευση χωρίς MTSEA (μάρτυρας)] x 100}.*

Αντίδραση του MTSEA με το μεταλλαγμένο υποδοχέα ΔCys

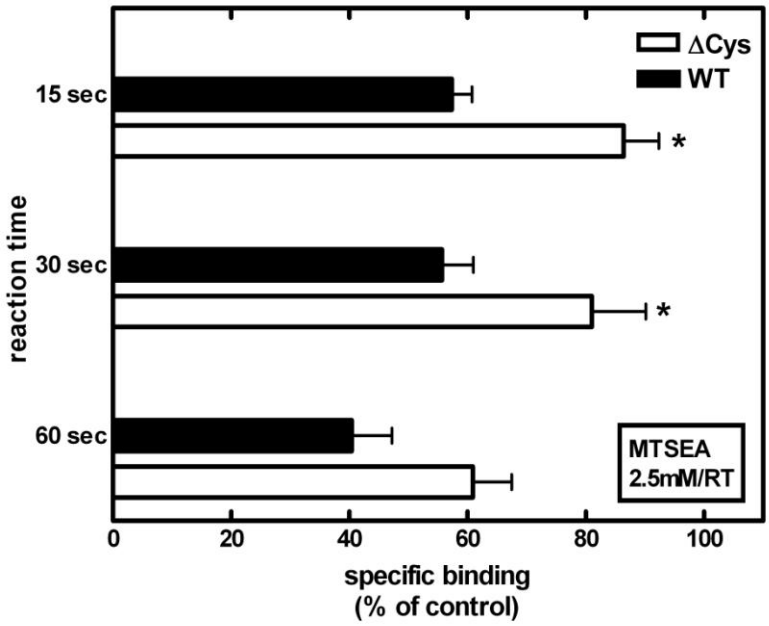
Στη συνέχεια προσδιορίσαμε αν η αντίδραση του MTSEA με τον ΔCys, επηρέασε τη συγγένεια δέσμευσης [^{125}I] – Tyr^{0} – σοβαγίνης στο μεταλλαγμένο αυτό υποδοχέα. Για το σκοπό αυτό επωάσαμε τον ΔCys με ή χωρίς (μάρτυρας) MTSEA συγκέντρωσης 2,5 mM για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου και προσδιορίσαμε την ειδική δέσμευση της [^{125}I] – Tyr^{0} – σοβαγίνης. Όπως φαίνεται στην εικόνα 12, επώαση του ΔCys με MTSEA ελάττωσε περίπου κατά 40 % (σε σχέση με τον μάρτυρα) την ειδική δέσμευση της [^{125}I] – Tyr^{0} – σοβαγίνης στον υποδοχέα αυτόν. Η αναστολή αυτή δε διέφερε σημαντικά από την αντίστοιχη στον (περίπου κατά 60%) άγριο τύπο (WT) CRF_1 (εικόνα 12)

Άρα λοιπόν, η ταυτόχρονη μετάλλαξη όλων των κυστεϊνών του CRF_1 σε σερίνες, δεν κατόρθωσε να δημιουργήσει έναν υποδοχέα που να μην αντιδρά με το MTSEA.

Διαφορετικοί χρόνοι αντίδρασης του MTSEA με τον άγριο τύπου CRF_1 και το μεταλλαγμένο υποδοχέα, ΔCys.

Το γεγονός ότι η αντίδραση του MTSEA με τον ΔCys για 1 λεπτό της ώρας, στάθηκε ικανή να ελαττώσει σε μεγάλο βαθμό την ειδική δέσμευση της [^{125}I] – Tyr^{0} – σοβαγίνης, μας ώθησε να προσδιορίσουμε την επίδραση διαφορετικών χρόνων αντίδρασης του MTSEA (μικρότερων του ενός λεπτού της ώρας) στην ευαισθησία του υποδοχέα αυτού στο αντιδραστήριο. Για το σκοπό αυτό επωάσαμε τον ΔCys καθώς και τον άγριο τύπο (WT) CRF_1 με 2,5 mM MTSEA για 60, 30 και 15 δευτερόλεπτα. Όπως βλέπουμε στην εικόνα 13, η αντίδραση του MTSEA και με τους δύο υποδοχείς ελάττωσε τη δέσμευση της [^{125}I] – Tyr^{0} – σοβαγίνης με χρονοεξαρτώμενο τρόπο. Η ελάττωση της δέσμευσης αυτής στον ΔCys ήταν πολύ μικρή (μόνο κατά 15 % περίπου) στο χρόνο αντίδρασης των 15 δευτερολέπτων. Αντίθετα η αντίστοιχη αντίδραση του MTSEA

με τον WT μείωσε κατά 40 % την ειδική δέσμευση της [^{125}I] – Tyr^{0} – σοβαγίνης στον υποδοχέα αυτόν. Η μείωση αυτή ήταν σημαντικά μεγαλύτερη από την αντίστοιχη στον ΔCys.



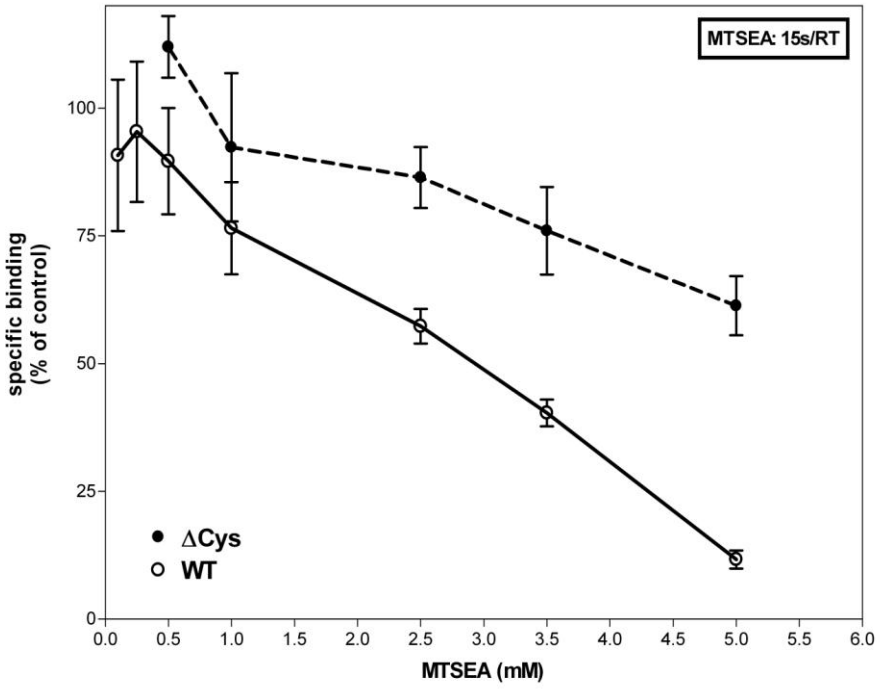
Εικόνα 13. Επίδραση διαφορετικών χρόνων αντίδρασης του MTSEA (2.5 mM) στην ειδική δέσμευση της [^{125}I] – Tyr^{0} – σοβαγίνης, στον άγριο τύπο CRF$_1$ και στο μεταλλαγμένο υποδοχέα, ΔCys. *Κύτταρα HEK 293 που εκφράζανε σταθερά τον άγριο τύπο (WT) CRF$_1$ ή το μεταλλαγμένο υποδοχέα ΔCys, αιωρημένα σε ρυθμιστικό διάλυμα Hepes/K$^+$/Na$^+$, επωάστηκαν για 60, 30 και 15 δευτερόλεπτα της ώρας σε θερμοκρασία δωματίου, χωρίς (μάρτυρας) ή με MTSEA συγκέντρωσης 2,5 mM. Στη συνέχεια τα κύτταρα ομογενοποιήθηκαν και προσδιορίστηκε η ειδική δέσμευση της [^{125}I] – Tyr^{0} – σοβαγίνης, σε μεμβρανικά ομογενοποιήματα, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο ΄΄Υλικά και Μέθοδοι΄΄. Οι στήλες αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους ± τυπικά σφάλματα από 7-30 ξεχωριστά πειράματα. Η % ειδική δέσμευση ορίζεται ως {[ειδική δέσμευση μετά από την αντίδραση με MTSEA / ειδική δέσμευση χωρίς MTSEA (μάρτυρας)] x 100}. Οι στατιστικά σημαντικά διαφορές υπολογίστηκαν με τη χρήση της ανάλυσης διασποράς (ANOVA) και στη συνέχεια με LSD's post hoc test (* p<0.05*

στατιστικώς σημαντική διαφορά της ειδικής δέσμευσης στον WT από εκείνης στον ΔCys, κάτω από τις ίδιες πειραματικές συνθήκες).

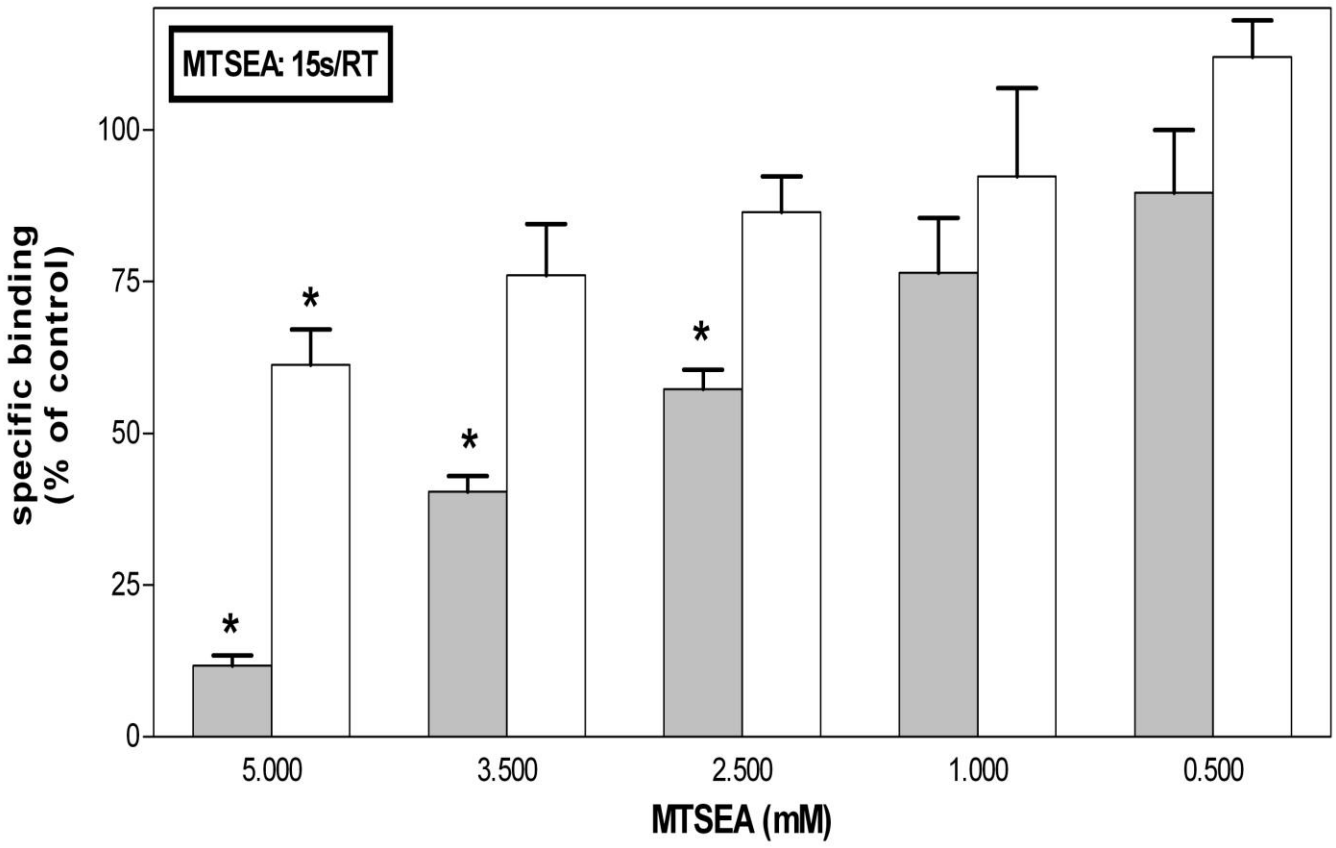
Αντίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων MTSEA με τον άγριο τύπο CRF_1 και το μεταλλαγμένο υποδοχέα, ΔCys.

Στη συνέχεια εξετάσαμε την επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων MTSEA στη δέσμευση της σοβαγίνης στον άγριο τύπο (WT) CRF_1 και στο μεταλλαγμένο υποδοχέα, ΔCys. Για το σκοπό αυτό επωάσαμε κύτταρα που εκφράζανε τους υποδοχείς αυτούς με διαφορετικές συγκεντρώσεις MTSEA για 15 δευτερόλεπτα σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια προσδιορίσαμε την ειδική δέσμευση της $[^{125}I]$ – Tyr^0 – σοβαγίνης στους εν λόγω υποδοχείς. Όπως φαίνεται στις εικόνες 14 και 15 το MTSEA ελάττωσε με δοσοεξαρτώμενο τρόπο την ειδική δέσμευση της $[^{125}I]$ – Tyr^0 – σοβαγίνης και στους δύο υποδοχείς. Η μείωση αυτή στον WT ήταν στατιστικά σημαντική μετά από αντίδρασή του με 2,5, 3,5 και 5 mM MTSEA (εικόνα 15). Αντίθετα η ειδική δέσμευση της $[^{125}I]$ – Tyr^0 – σοβαγίνης στον ΔCys μειώθηκε σημαντικά μόνο μετά από αντίδραση του με 5 mM MTSEA (εικόνα 15).

Η μεγαλύτερη διαφορά ανάμεσα στην ελάττωση από το MTSEA της ειδικής δέσμευσης της $[^{125}I]$ – Tyr^0 – σοβαγίνης στον WT από την αντίστοιχη ελάττωση στον ΔCys, παρατηρήθηκε όταν (σε χρόνο αντίδρασης 15 δευτερολέπτων) το αντιδραστήριο ήταν στη συγκέντρωση των 2,5 mM. Το παραπάνω σε συνδυασμό με το γεγονός ότι ο ΔCys ουσιαστικά δεν αντιδρά με 2,5 mM MTSEA για 15 δευτερόλεπτα σε θερμοκρασία δωματίου, μας οδήγησε να επιλέξουμε αυτές τις συνθήκες για την εκτέλεση των επομένων πειραμάτων.



Εικόνα 14. Επίδραση της συγκέντρωσης του MTSEA στην ειδική δέσμευση της [^{125}I] – Tyr^{0} – σοβαγίνης, στον άγριο τύπο CRF$_1$ και στο μεταλλαγμένο υποδοχέα, ΔCys. *Κύτταρα HEK 293 που εκφράζανε σταθερά τον άγριο τύπο CRF$_1$ ή το μεταλλαγμένο υποδοχέα ΔCys, αιωρημένα σε ρυθμιστικό διάλυμα Hepes/K$^+$/Na$^+$, επωάστηκαν για 15 δευτερόλεπτα της ώρας σε θερμοκρασία δωματίου, χωρίς (μάρτυρας) ή με αυξανόμενες συγκεντρώσεις MTSEA (0,25, 0,5, 1, 2,5, 3,5 και 5 mM). Στη συνέχεια τα κύτταρα ομογενοποιήθηκαν και προσδιορίστηκε η ειδική δέσμευση της [^{125}I] – Tyr^{0} – σοβαγίνης, στα μεμβρανικά ομογενοποιήματα, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο ΄΄Υλικά και Μέθοδοι΄΄. Οι μέσοι όροι των τιμών και τα σταθερά λάθη τους προέρχονται από ένα χαρακτηριστικό πείραμα που έγινε 3-30 φορές δίνοντας παρόμοια αποτελέσματα. Η % ειδική δέσμευση ορίζεται ως {[ειδική δέσμευση μετά από την αντίδραση με MTSEA / ειδική δέσμευση χωρίς MTSEA (μάρτυρας)] x 100}.*

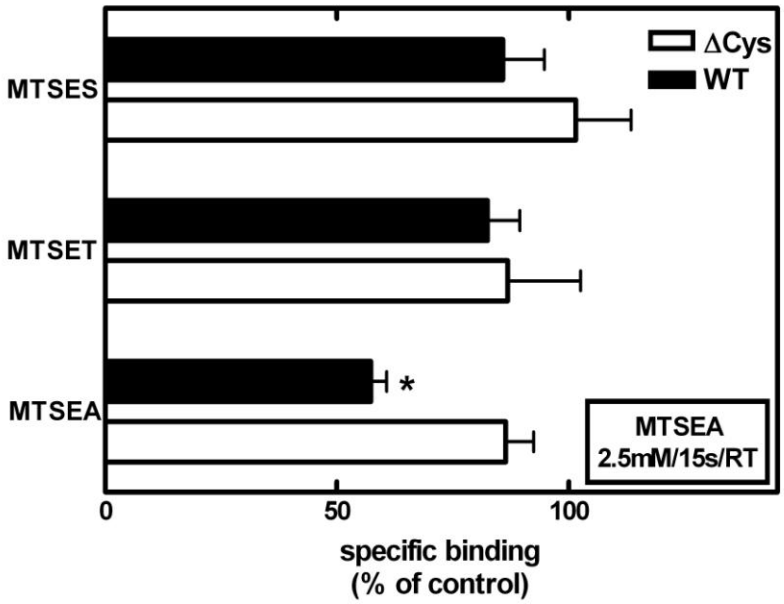


Εικόνα 15. Επίδραση της συγκέντρωσης του MTSEA στην ειδική δέσμευση της [^{125}I] – Tyr^{0} – σοβαγίνης. *Οι τιμές της % ειδικής δέσμευσης της [^{125}I] – Tyr^{0} – σοβαγίνης στον άγριο τύπο (WT) CRF$_1$ (γκρι στήλες) και στο μεταλλαγμένο υποδοχέα ΔCys (άσπρες στήλες), προσδιορίστηκαν στα πειράματα της εικόνας 14. Οι στατιστικά σημαντικά διαφορές υπολογίστηκαν με τη χρήση της ανάλυσης διασποράς (ANOVA) και στη συνέχεια με LSD's post hoc test (* p<0.05 στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ της δέσμευσης της [^{125}I] – Tyr^{0} – σοβαγίνης στον κάθε υποδοχέα πριν και μετά την αντίδρασή του με το MTSEA)*

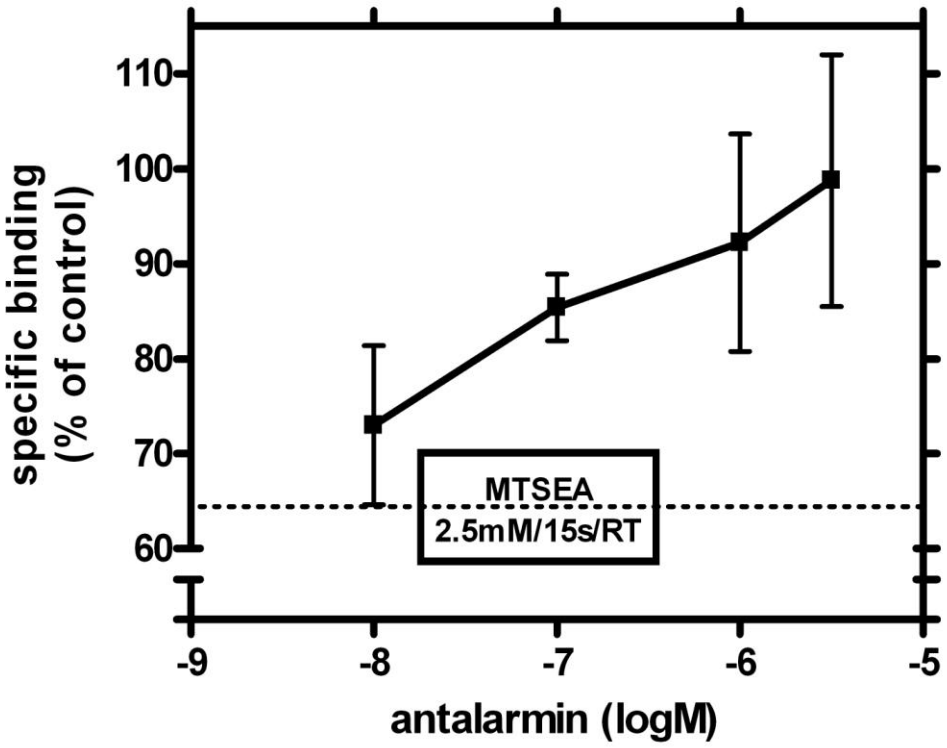
Αντίδραση των MTSES και MTSET με τον άγριο τύπο CRF_1 και τη μεταλλαγμένη μορφή του, ΔCys.

Στη συνέχεια εξετάσαμε κατά πόσο επηρεάζεται η ειδική δέσμευση της [^{125}I] – Tyr^0 – σοβαγίνης στον άγριο τύπο (WT) CRF_1 και στο μεταλλαγμένο υποδοχέα ΔCys μετά από 15-δευτερολέπτων επώασή τους με το θετικά φορτισμένο μεθανοθειοσουλφονικό αιθυλτριμεθυλαμμώνιο (methane-thiosulfonate ethyltrimethylammonium, MTSET) ή το αρνητικά φορτισμένο μεθανοθειοσουλφονικό αιθυλοσουλφονικό οξύ (methanethiosulfonate ethylsulfonate, MTSES) τα οποία είναι μεγαλύτερα σε μέγεθος από το θετικά φορτισμένο MTSEA.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 16 σε αντίθεση με το MTSEA, τα MTSES και MTSET δεν επηρέασαν σημαντικά την ειδική δέσμευση της [^{125}I] – Tyr^0 – σοβαγίνης στον WT. Επίσης παρόμοια με το MTSEA, τα MTSES και MTSET δεν επηρέασαν σημαντικά την ειδική δέσμευση της [^{125}I] – Tyr^0 – σοβαγίνης στον μεταλλαγμένο υποδοχέα, ΔCys.



Εικόνα 16. Επίδραση της αντίδρασης των MTSES, MTSET και MTSEA με τον άγριο τύπο CRF_1 και το μεταλλαγμένο υποδοχέα ΔCys στην ειδική δέσμευση της [^{125}I] – Tyr^0 – σοβαγίνης. *Κύτταρα HEK 293 που εκφράζανε σταθερά τον άγριο τύπο (WT) CRF_1 ή το μεταλλαγμένο υποδοχέα ΔCys, αιωρημένα σε ρυθμιστικό διάλυμα Hepes/K^+/Na^+, επωάστηκαν για 15 δευτερόλεπτα της ώρας σε θερμοκρασία δωματίου, με ή χωρίς (μάρτυρα), MTSEA, MTSET και MTSES συγκέντρωσης 2,5 mM. Στη συνέχεια τα κύτταρα ομογενοποιήθηκαν και προσδιορίστηκε η ειδική δέσμευση της [^{125}I] – Tyr^0 – σοβαγίνης στα μεμβρανικά ομογενοποιήματα, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο ΄΄Υλικά και Μέθοδοι΄΄. Οι στήλες αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους ± τυπικά σφάλματα από 3-30 ξεχωριστά πειράματα. Η % ειδική δέσμευση ορίζεται ως {[ειδική δέσμευση μετά από την αντίδραση με MTSEA, MTSET και MTSES / ειδική δέσμευση χωρίς MTSEA, MTSET και MTSES (μάρτυρας)] x 100}. Οι στατιστικά σημαντικά διαφορές υπολογίστηκαν με τη χρήση της ανάλυσης διασποράς (ANOVA) και στη συνέχεια με LSD's post hoc test (* p<0.05 στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ της δέσμευσης της [^{125}I] – Tyr^0 – σοβαγίνης στον κάθε υποδοχέα πριν και μετά την αντίδρασή του με το MTSEA, το MTSET ή το MTSES)*



Εικόνα 17. Προστασία με ανταλαρμίνη του CRF_1 από την αντίδρασή του με το MTSEA *Κύτταρα HEK 293 που εκφράζανε σταθερά τον άγριο τύπο CRF_1, αιωρημένα σε ρυθμιστικό διάλυμα Hepes/K^+/Na^+, επωάστηκαν για 15 λεπτά στους 37^oC, χωρίς ή με αυξανόμενες συγκεντρώσεις ανταλαρμίνης και στη συνέχεια αντέδρασαν για 15 δευτερόλεπτα σε θερμοκρασία δωματίου, με ή χωρίς (μάρτυρα) MTSEA, συγκέντρωσης 2,5 mM. Στη συνέχεια τα κύτταρα ομογενοποιήθηκαν και προσδιορίστηκε η ειδική δέσμευση της [^{125}I] – Tyr^0 – σοβαγίνης στα μεμβρανικά ομογενοποιήματα, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο ΄΄Υλικά και Μέθοδοι΄΄. Η % ειδική δέσμευση ορίζεται ως {[ειδική δέσμευση μετά από την αντίδραση με MTSEA / ειδική δέσμευση χωρίς MTSEA (μάρτυρας)] x 100}. Η διακεκομμένη γραμμή συμβολίζει την εδική δέσμευση της [^{125}I] – Tyr^0 – σοβαγίνης μετά από αντίδραση του υποδοχέα με 2,5 mM MTSEA απουσία ανταλαρμίνης. Οι μέσοι όροι των τιμών και τα σταθερά λάθη τους προέρχονται από ένα χαρακτηριστικό πείραμα που έγινε από 4-6 φορές δίνοντας παρόμοια αποτελέσματα.*

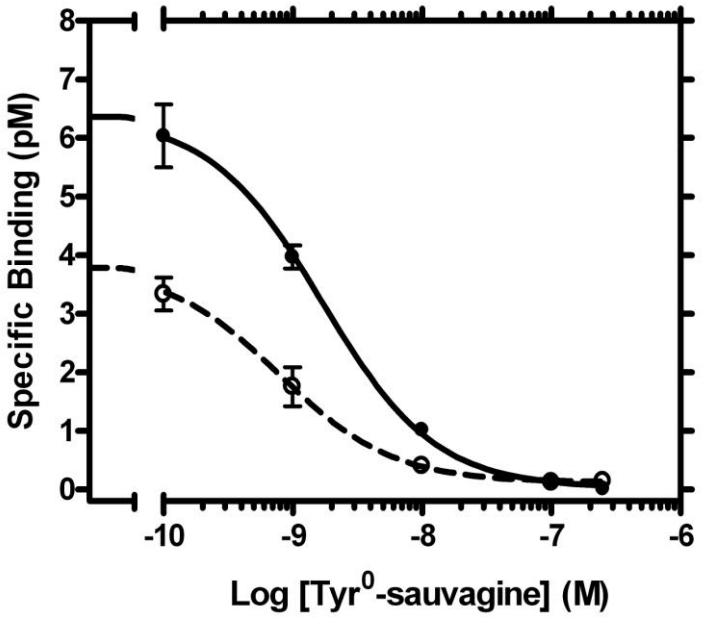
Προστασία της αντίδρασης του MTSEA με τον άγριο τύπο CRF_1.

Με σκοπό να εξετάσουμε αν ο μικρομοριακός ανταγωνιστής ανταλαρμίνη ήταν ικανός να προστατεύσει τον CRF_1 από την αντίδρασή του με το MTSEA, κύτταρα HEK 293, που εκφράζανε σταθερά τον άγριο τύπο (WT) CRF_1 επωάστηκαν για 15 λεπτά στους 37 ^oC με αυξανόμενες συγκεντρώσεις ανταλαρμίνης και στη συνέχεια έλαβε χώρα η αντίδραση του υποδοχέα με 2,5 mM MTSEA για 15 δευτερόλεπτα σε θερμοκρασία δωματίου. Όπως φαίνεται στην εικόνα 17, η μείωση της ειδικής δέσμευσης της [^{125}I] – Tyr^0 – σοβαγίνης στον WT μετά από την αντίδρασή του με MTSEA, ελαττώθηκε με επώαση του υποδοχέα με ανταλαρμίνη πριν την αντίδραση. Η προστασία με ανταλαρμίνη του CRF_1 από την αντίδρασή του με το MTSEA έγινε με δοσοεξαρτώμενο τρόπο (εικόνα 17).

Επίδραση του MTSEA στις φαρμακολογικές ιδιότητες του CRF_1

Με σκοπό να εξετάσουμε το μηχανισμό με τον οποίο η αντίδραση του MTSEA (2,5 mM - 15 δευτερόλεπτα) ελάττωσε την ειδική δέσμευση της [^{125}I] – Tyr^0 – σοβαγίνης στον CRF_1, προσδιορίσαμε τις φαρμακολογικές ιδιότητες του υποδοχέα πριν και μετά την αντίδρασή του με MTSEA. Συγκεκριμένα εξετάσαμε την επίδραση της αντίδρασης του MTSEA με τον άγριο τύπο CRF_1 (WT) στη συγγένεια δέσμευσης και στον αριθμό θέσεων δέσμευσης της [^{125}I] – Tyr^0 – σοβαγίνης. Όπως φαίνεται στην εικόνα 18, η αντίδραση του MTSEA με τον CRF_1 ελάττωσε το μέγιστο αριθμό θέσεων δέσμευσης της [^{125}I] – Tyr^0 – σοβαγίνης χωρίς όμως να επηρεάζει σημαντικά τη συγγένεια δέσμευσής της. Συγκεκριμένα, από 5,32 ± 0,36 pM ο αριθμός θέσεων δέσμευσης της [^{125}I] – Tyr^0 – σοβαγίνης μειώθηκε μετά την αντίδραση του υποδοχέα με το MTSEA σε 2,66 ± 0,71 pM. Αντίθετα η συγγένεια δέσμευσης της [^{125}I] – Tyr^0 – σοβαγίνης στον CRF_1 δεν

επηρεάστηκε σημαντικά αφού πριν και μετά την αντίδραση με MTSEA ήταν (-logK_D) 9,01 ± 0,11 και 9,05 ± 0,12 αντίστοιχα.



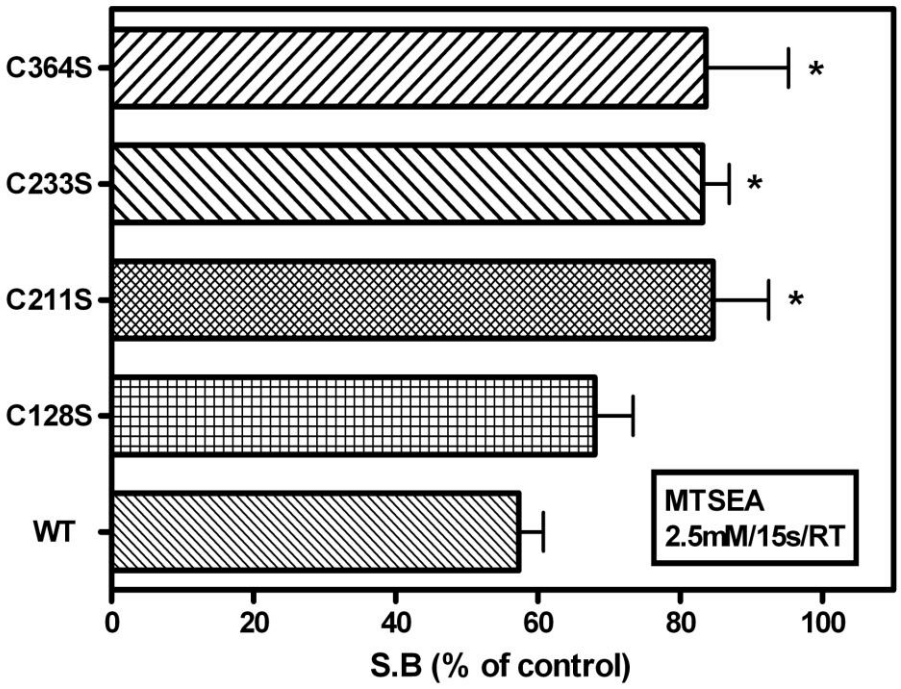
Εικόνα 18. Συναγωνιστική δέσμευση της Tyr^0 – σοβαγίνης στον άγριο τύπο CRF$_1$ πριν και μετά από την αντίδραση του με MTSEA. *Κύτταρα HEK 293 που εκφράζανε σταθερά τον άγριο τύπο CRF$_1$, αιωρημένα σε ρυθμιστικό διάλυμα Hepes/K$^+$/Na$^+$, επωάστηκαν για 15 δευτερόλεπτα σε θερμοκρασία δωματίου, με (άσπροι κύκλοι) ή χωρίς (μάρτυρας) (μαύροι κύκλοι) MTSEA, συγκέντρωσης 2,5 mM. Στη συνέχεια τα κύτταρα ομογενοποιήθηκαν και προσδιορίστηκε η ειδική δέσμευση της [^{125}I] – Tyr^0 – σοβαγίνης στα μεμβρανικά ομογενοποιήματα, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο ΄΄Υλικά και Μέθοδοι΄΄. Οι μέσοι όροι των τιμών και τα σταθερά λάθη τους προέρχονται από ένα χαρακτηριστικό πείραμα που έγινε 4 φορές δίνοντας παρόμοια αποτελέσματα. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων του κάθε πειράματος έγινε μη γραμμικά και οι τιμές -logK_D υπολογίστηκαν σύμφωνα με τη μέθοδο των Motulsky και Christopoulos [202]. Επίσης προσδιορίστηκαν οι τιμές του μέγιστου αριθμού θέσεων δέσμευσης (B_{max}) όπως αναφέρεται στη μεθοδολογία και οι τιμές τους αναφέρονται στο κείμενο.*

Αντίδραση του MTSEA για 15 δευτερόλεπτα με τους μεταλλαγμένους υποδοχείς C128S, C211S, C233S και C364S

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω η αντίδραση του MTSEA (2,5 mM) με τον άγριο τύπο (WT) CRF_1 (σε αντίθεση με τον ΔCys) για 15 δευτερόλεπτα σε θερμοκρασία δωματίου, μείωσε σημαντικά τη δέσμευση της [^{125}I] – Tyr^0 – σοβαγίνης στον υποδοχέα, πιθανόν αντιδρώντας με μια ή περισσότερες από τις ελεύθερες ενδογενείς κυστεΐνες του.

Με σκοπό να προσδιορίσουμε ποιά ή ποιές από τις ενδογενείς κυστεΐνες του CRF_1 αντέδρασαν με το MTSEA, προσδιορίσαμε την επίδραση της αντίδρασης του MTSEA (2,5 mM – 15 δευτερόλεπτα – θερμοκρασία δωματίου) με τους μεταλλαγμένους υποδοχείς C128S, C211S, C233S και C364S (που δημιουργήθηκαν από την αντικατάσταση των ενδογενών κυστεϊνών του CRF_1 στις θέσεις 128, 211, 233 και 364 από σερίνη) στη συγγένεια δέσμευσης της [^{125}I] – Tyr^0 – σοβαγίνης για τους υποδοχείς αυτούς.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 19, η αντίδραση 2,5 mM MTSEA (15 δευτερόλεπτα) με τους μεταλλαγμένους υποδοχείς C211S, C233S, C364S ελάττωσε την ειδική δέσμευση της [^{125}I] – Tyr^0 – σοβαγίνης, σε αυτούς μόνο 15% περίπου. Η ελάττωση αυτή ήταν στατιστικώς σημαντικά μικρότερη από εκείνη της ειδικής δέσμευσης της σοβαγίνης στον μεταλλαγμένο υποδοχέα C128S και στον άγριο τύπο (WT) CRF_1 μετά από αντίδραση τους με το MTSEA (που ήταν περίπου 30% και 40 %, αντίστοιχα).



Εικόνα 19. Επίδραση της αντίδρασης για 15 δευτερόλεπτα του MTSEA με τους μεταλλαγμένους υποδοχείς C128S, C211S, C233S και C364S στην ειδική δέσμευση της [^{125}I] – Tyr^{0} – σοβαγίνης. *Κύτταρα HEK 293 που εκφράζανε σταθερά τον άγριο τύπο CRF$_1$ (WT) και τους μεταλλαγμένους υποδοχείς C128S, C211S, C233S και C364S, αιωρημένα σε ρυθμιστικό διάλυμα Hepes/K$^+$/Na$^+$, επωάστηκαν για 15 δευτερόλεπτα της ώρας σε θερμοκρασία δωματίου, χωρίς (μάρτυρας) ή με MTSEA συγκέντρωσης 2,5 mM. Στη συνέχεια τα κύτταρα ομογενοποιήθηκαν και προσδιορίστηκε η ειδική δέσμευση της [^{125}I] – Tyr^{0} – σοβαγίνης στα μεμβρανικά ομογενοποιήματα, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο ΄΄Υλικά και Μέθοδοι΄΄. Οι στήλες αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους ± τυπικά σφάλματα από 4-30 ξεχωριστά πειράματα. Η % ειδική δέσμευση ορίζεται ως {[ειδική δέσμευση μετά από την αντίδραση με MTSEA / ειδική δέσμευση χωρίς MTSEA (μάρτυρας)] x 100}. Οι στατιστικά σημαντικά διαφορές υπολογίστηκαν με τη χρήση της ανάλυσης διασποράς (ANOVA) και στη συνέχεια με LSD's post hoc test (* p<0.05 στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ της δέσμευσης της [^{125}I] –*

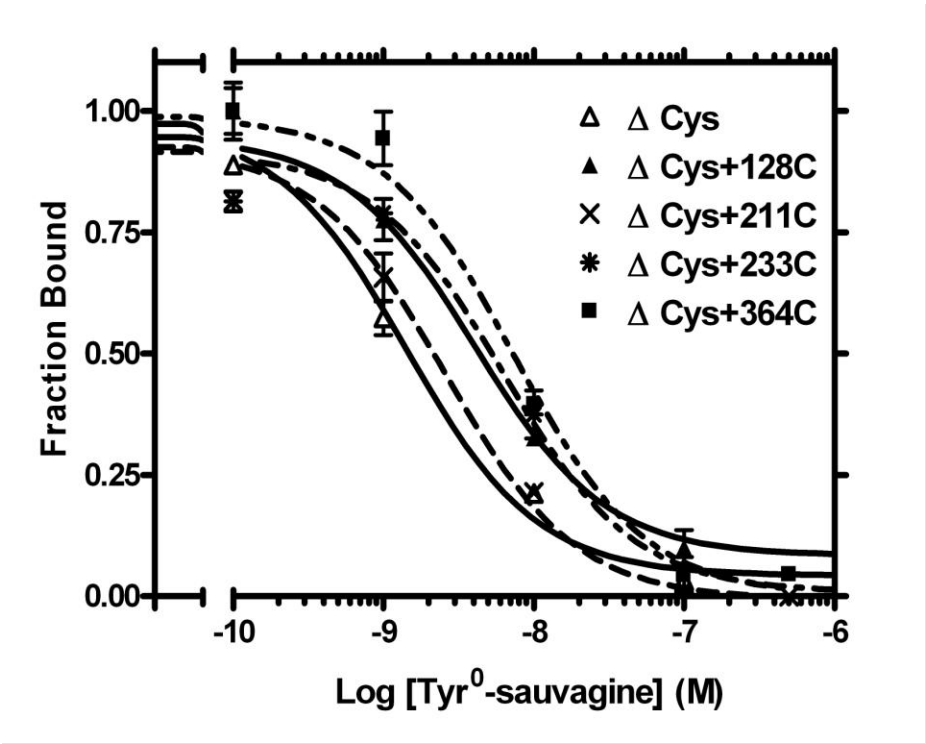
Tyr^0 – σοβαγίνης στον κάθε μεταλλαγμένο υποδοχέα και εκείνης στον WT μετά την αντίδρασή τους με το MTSEA)

Φαρμακολογικές ιδιότητες του άγριου τύπου CRF_1 και των μεταλλαγμένων υποδοχέων ΔCys+128C, ΔCys+211C, ΔCys+233C και ΔCys+364C.

Τα προηγούμενα πειράματα είχαν σα σκοπό να προσδιορίσουν την επίδραση της αντίδρασης του MTSEA στη δέσμευση της σοβαγίνης στον CRF_1 μετά από μετάλλαξη μιας από τις 4 ενδογενείς κυστεΐνες του (Cys128, Cys211, Cys233 και Cys364). Όμως η αντικατάσταση από σερίνη μιας από τις 4 ενδογενείς κυστεΐνες του υποδοχέα, άφηνε αυτόν με τις υπόλοιπες τρεις κυστεΐνες του, που δυνητικά θα μπορούσαν να αντιδράσουν με το MTSEA. Με σκοπό να προσδιορίσουμε το κατά πόσο μια ενδογενής κυστεΐνη όταν είναι μόνη της αντιδρά με το MTSEA, μεταλλάξαμε ταυτόχρονα όλες τις ενδογενείς κυστεΐνες του CRF_1, εκτός από εκείνη που θέλουμε να εξετάσουμε. Έτσι δημιουργήσαμε τους μεταλλαγμένους υποδοχείς ΔCys+128C, ΔCys+211C, ΔCys+233C και ΔCys+364C οι οποίοι έχουν μια ενδογενή κυστεΐνη. Συγκεκριμένα ο ΔCys+128C έχει την 128Cys, ο ΔCys+211C έχει την 211Cys, ο ΔCys+233C έχει την 233Cys και ο ΔCys+364C έχει την 364Cys.

Πριν εξετάσουμε την επίδραση της αντίδρασης του MTSEA στη συγγένεια δέσμευσης της Tyr^0 – σοβαγίνης στους ΔCys+128C, ΔCys+211C, ΔCys+233C και ΔCys+364C προσδιορίσαμε πρώτα τις φαρμακολογικές ιδιότητές τους, με σκοπό να διαπιστώσουμε ότι οι μεταλλάξεις αυτές δεν επηρέασαν σημαντικά τη δομή και λειτουργία του CRF_1. Αυτό επιτεύχθηκε με τον προσδιορισμό των συγγενειών με τις οποίες οι υποδοχείς αυτοί δέσμευαν την Tyr^0 – σοβαγίνη και τη σύγκριση τους με τη συγγένεια δέσμευσης της ραδιοσημασμένης σοβαγίνης για τον ΔCys. Όπως φαίνεται στην εικόνα 20, η συγγένεια δέσμευσης ($-\log K_D$) της Tyr^0 – σοβαγίνης για τους μεταλλαγμένους υποδοχείς ΔCys+128C και ΔCys+211C ήταν παρόμοια με εκείνη για τον ΔCys, ενώ η συγγένεια δέσμευσης

του πεπτιδίου αυτού για τους ΔCys+233C και ΔCys+364C έχει μειωθεί λίγο σε σχέση με τον ΔCys.

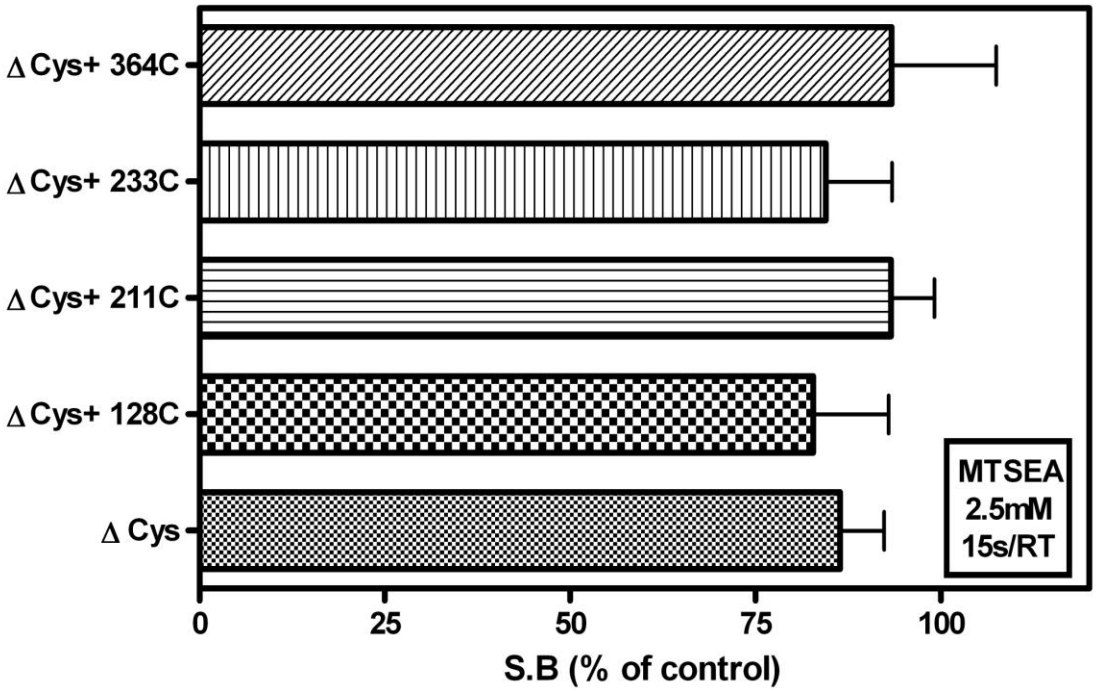


Εικόνα 20. Συναγωνιστική δέσμευση της Tyr^0 – σοβαγίνης στον άγριο τύπο CRF_1 και στους μεταλλαγμένους υποδοχείς ΔCys+128C, ΔCys+211C, ΔCys+233C και ΔCys+364C. *Ο συναγωνισμός της δέσμευσης της [^{125}I] – Tyr^0 – σοβαγίνης από την Tyr^0 – σοβαγίνη, επιτεύχθηκε όπως αναφέρεται στο κεφάλαιο ΄΄Υλικά και Μέθοδοι΄΄, σε μεμβρανικά ομογενοποιήματα κυττάρων HEK 293 που εκφράζανε σταθερά τον άγριο τύπο (WT) CRF_1, ή τους μεταλλαγμένους υποδοχείς, ΔCys+128C, ΔCys+211C, ΔCys+233C και ΔCys+364C. Οι μέσοι όροι των τιμών (εις διπλούν) και τα σταθερά λάθη τους προέρχονται από ένα χαρακτηριστικό πείραμα που έγινε 3 φορές με παρόμοια αποτελέσματα. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων του κάθε πειράματος έγινε μη γραμμικά, οι τιμές - $logK_D$ υπολογίστηκαν σύμφωνα με τη μέθοδο των Motulsky και Christopoulos [202] και ήταν για τους ΔCys, ΔCys+128C, ΔCys+211C, ΔCys+233C και ΔCys+364C, 8,64 ± 0,21, 8,50 ± 0,36, 8,39 ± 0,11, 7,89 ± 0,18 και 7,76 ± 0,18 αντίστοιχα.*

Αντίδραση του MTSEA με τους μεταλλαγμένους υποδοχείς ΔCys+128C, ΔCys+211C, ΔCys+233C και ΔCys+364C.

Στη συνέχεια προσδιορίσαμε την επίδραση της αντίδρασης του MTSEA με τους μεταλλαγμένους υποδοχείς ΔCys+128C, ΔCys+211C, ΔCys+233C και ΔCys+364C, στη δέσμευση της [^{125}I] – Tyr^{0} – σοβαγίνης σε αυτούς.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 21, αντίδραση του MTSEA (2,5 mM, για 15 δευτερόλεπτα της ώρας) με τους ΔCys+128C, ΔCys+211C, ΔCys+233C και ΔCys+364C (παρόμοια με το μεταλλαγμένο υποδοχέα ΔCys), δεν ελάττωσε σημαντικά την ειδική δέσμευση της [^{125}I] – Tyr^{0} – σοβαγίνης στους υποδοχείς αυτούς.



Εικόνα 21. Επίδραση της αντίδρασης του MTSEA με τους μεταλλαγμένους υποδοχείς ΔCys+128C, ΔCys+211C, ΔCys+233C και ΔCys+364C στην ειδική δέσμευση της [^{125}I] – Tyr^{0} – σοβαγίνης. *Κύτταρα HEK 293 που εκφράζανε σταθερά τον άγριο τύπο CRF_1 (WT) και τους μεταλλαγμένους υποδοχείς ΔCys+128C, ΔCys+211C, ΔCys+233C και ΔCys+364C, αιωρημένα σε ρυθμιστικό διάλυμα Hepes/K^+/Na^+, επωάστηκαν για 15 δευτερόλεπτα της ώρας σε θερμοκρασία δωματίου, με ή χωρίς (μάρτυρας) MTSEA συγκέντρωσης 2,5 mM. Στη συνέχεια τα κύτταρα ομογενοποιήθηκαν και προσδιορίστηκε η ειδική δέσμευση της [^{125}I] – Tyr^{0} – σοβαγίνης, στα μεμβρανικά ομογενοποιήματα, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο ΄΄Υλικά και Μέθοδοι΄΄. Οι στήλες αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους ± τυπικά σφάλματα από 4-19 ξεχωριστά πειράματα. Η % ειδική δέσμευση ορίζεται ως {[ειδική δέσμευση μετά από την αντίδραση με MTSEA / ειδική δέσμευση χωρίς MTSEA (μάρτυρας)] x 100}.*

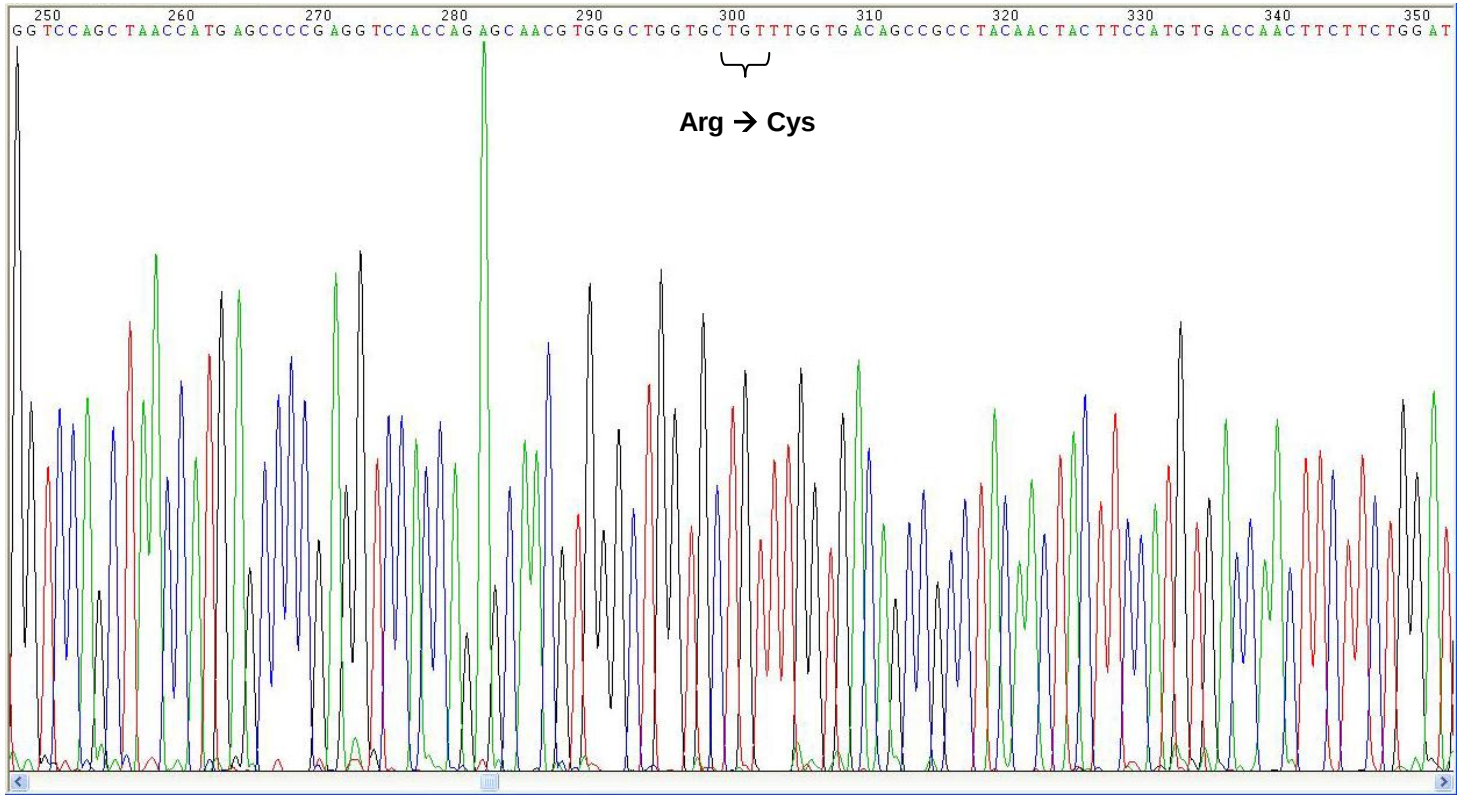
Προσδιορισμός των διαθέσιμων για αντίδραση με το MTSEA τεχνητών κυστεϊνών της τρίτης διαμεμβρανικής περιοχής του CRF_1.

Στη συνέχεια χρησιμοποιώντας τον "αδρανή" στο MTSEA (όταν είναι σε συγκέντρωση 2,5 mM και η αντίδραση διαρκεί 15 δευτερόλεπτα) υποδοχέα ΔCys (που έχει παρόμοιες φαρμακολογικές ιδιότητες και άρα δομή με εκείνες του άγριου τύπου CRF_1) μεταλλάξαμε (ένα τη κάθε φορά) τα αμινοξέα της τρίτης διαμεμβρανικής περιοχής (TM3) σε κυστεΐνη (τεχνητή κυστεΐνες). Ο σκοπός των μεταλλάξεων αυτών ήταν να δημιουργήσουμε τεχνητές κυστεΐνες και να προσδιορίσουμε τη διαθεσιμότητά τους για αντίδραση με το MTSEA, εφαρμόζοντας τη μέθοδο διαθεσιμότητας κυστεϊνών αντικαταστατών (SCAM), όπως αυτή περιγράφηκε στην αρχή του κεφαλαίου αυτού.

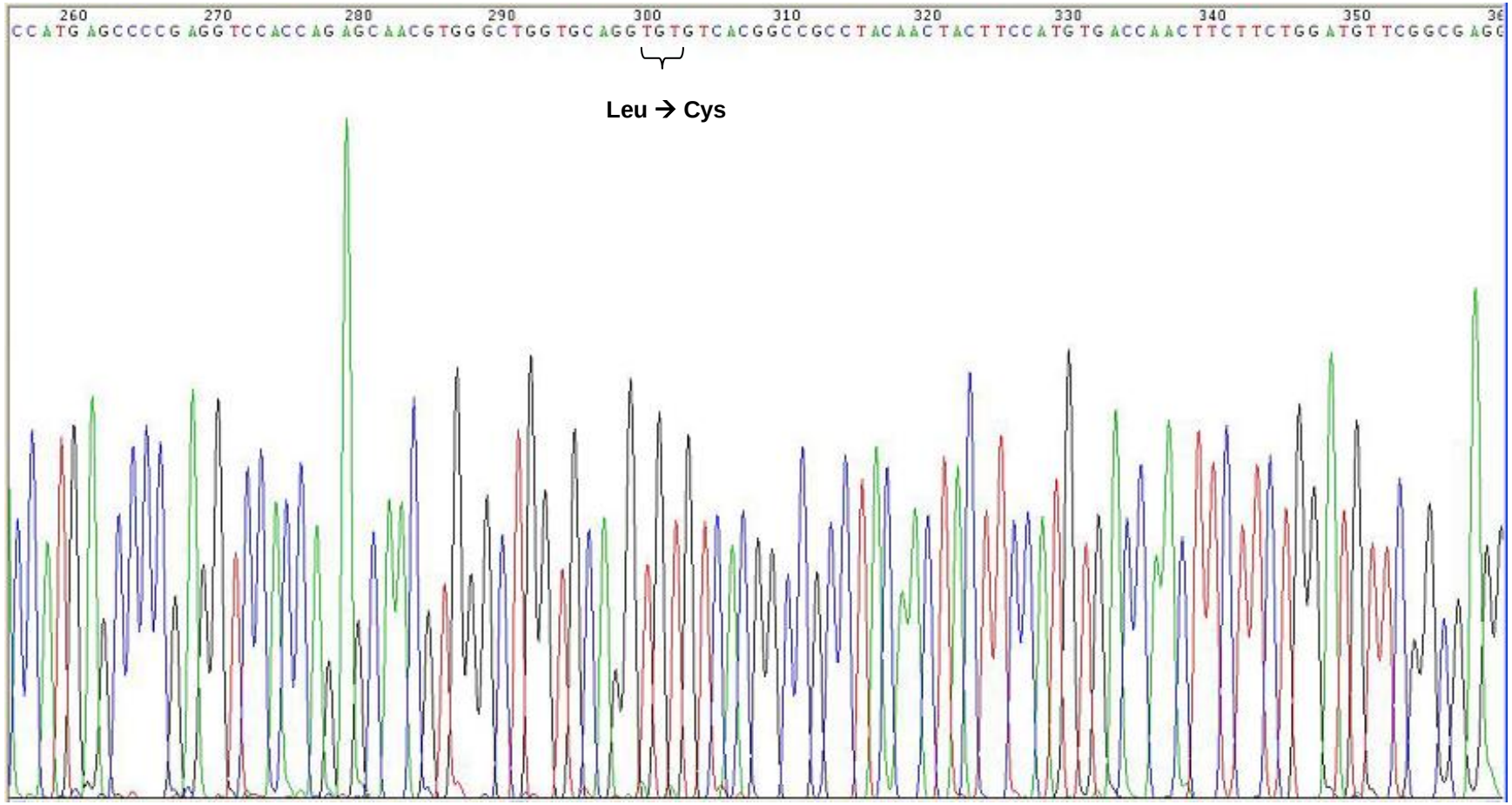
Συγκεκριμένα, μεταλλάξαμε τα αμινοξέα 189-206 της TM3 του ΔCys CRF_1, δημιουργώντας έτσι τους μεταλλαγμένους υποδοχείς 189C, 190C, 191C, 192C, 193Cys, 194C, 195C, 196C, 197C, 198C, 199C, 200C, 201C, 202C, 203C, 204C, 205C και 206C. Στη συνέχεια εκφράσαμε σταθερά του υποδοχείς αυτούς σε κύτταρα HEK 293 και μελετήσαμε την επίδραση της αντίδρασης του MTSEA με τους μεταλλαγμένους αυτούς υποδοχείς στην ειδική δέσμευση της [^{125}I] – Tyr^0 – σοβαγίνης σε αυτούς.

Όπως φαίνεται στις εικόνες 22 και 23, μόνο οι τεχνητές κυστεΐνες στις θέσεις 189, 192, 193, 195, 196 και 203 της TM3 του CRF_1 αντέδρασαν με το MTSEA, αφού η αντίδραση των μεταλλαγμένων υποδοχέων 189C, 192C, 193C 195C, 196C και 203C με το MTSEA, επηρέασε σημαντικά την ειδική δέσμευση της [^{125}I] – Tyr^0 – σοβαγίνης σε αυτούς. Συγκεκριμένα η αντίδραση του MTSEA με τους 189C, 192C, 193C 195C, 196C μείωσε σημαντικά τη δέσμευση της [^{125}I] – Tyr^0 – σοβαγίνης (εικόνα 22). Αντίθετα η αντίδραση του MTSEA με τον 203C αύξησε σημαντικά τη δέσμευση της [^{125}I] – Tyr^0 – σοβαγίνης στο μεταλλαγμένο αυτόν υποδοχέα (εικόνα 23).

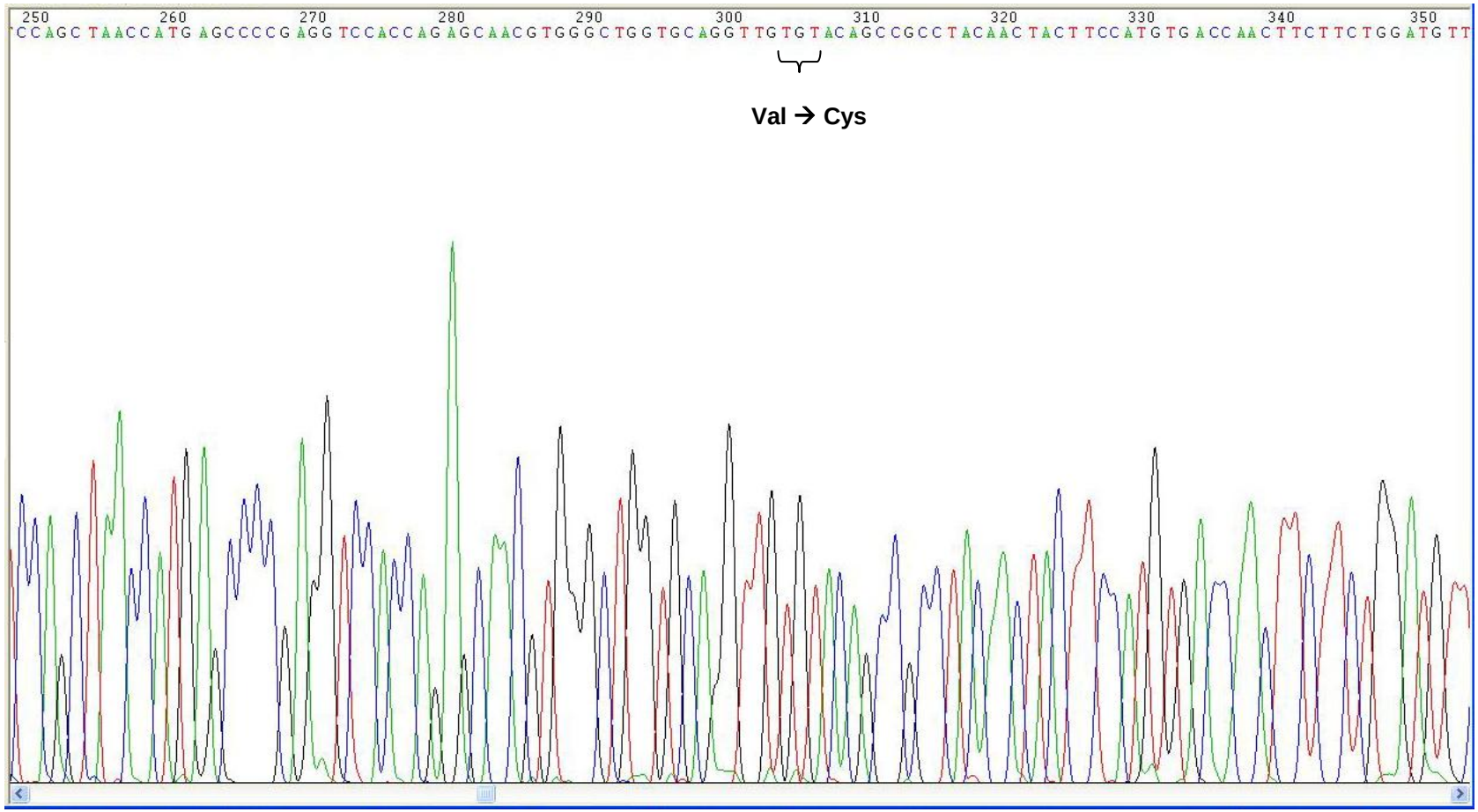
Μεταλλάξεις, 189C, 190C, 191C, 192C, 193Cys, 194C, 195C, 196C, 197C, 198C, 199C, 200C, 201C, 202C, 203C, 204C, 205C και 206C του CRF_1



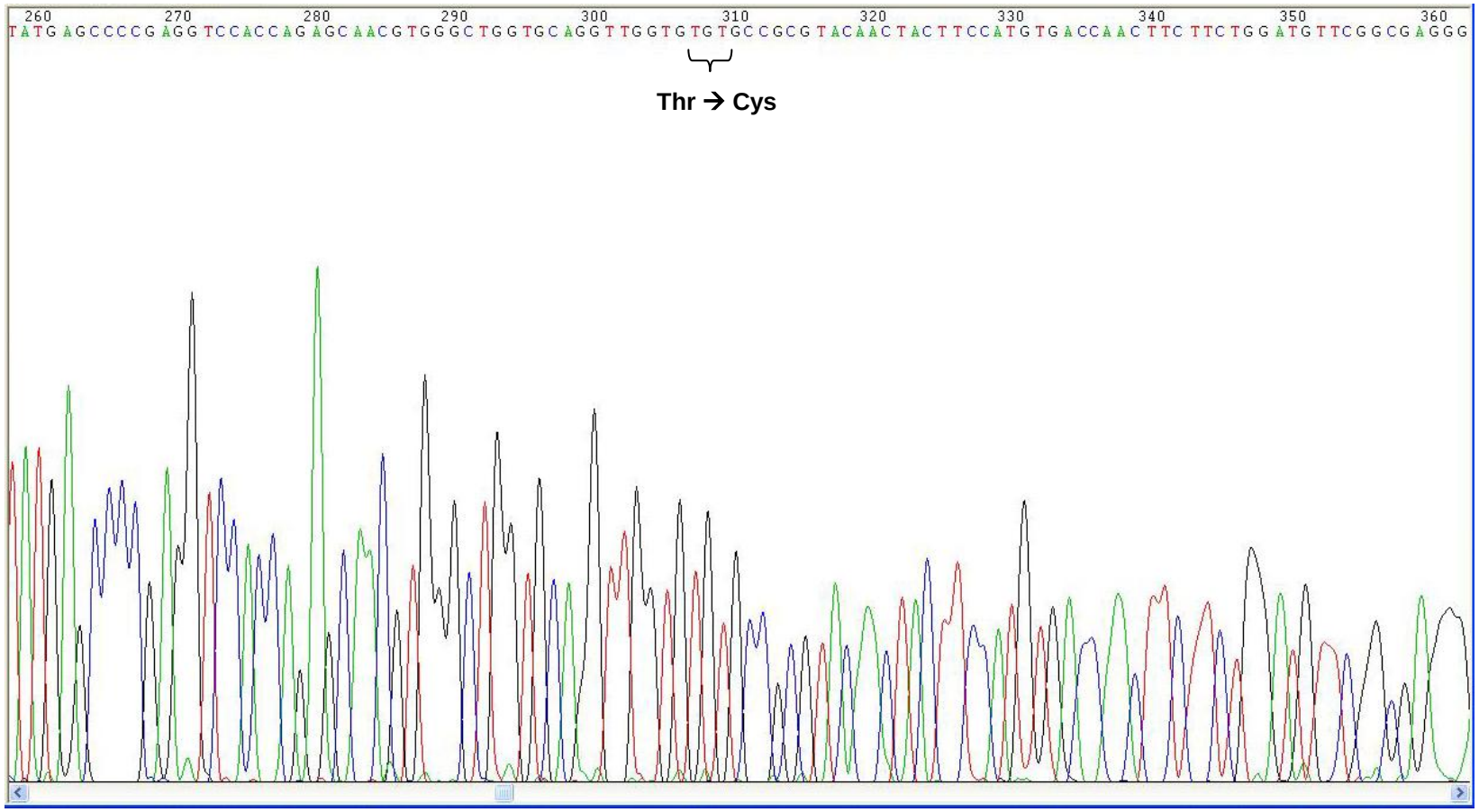
Εικόνα Α3.Χ1. Μετάλλαξη της Arg189 σε Cys. *Στο χρωματογράφημα διακρίνεται η περιοχή των νουκλεοτιδίων μέσα στην οποία υπάρχει η αλληλουχία TGT που κωδικοποιεί το αμινοξύ της μετάλλαξης κυστεΐνη. Τα νουκλεοτίδια αυτά αντικατέστησαν τα AGG του ΔCys.*



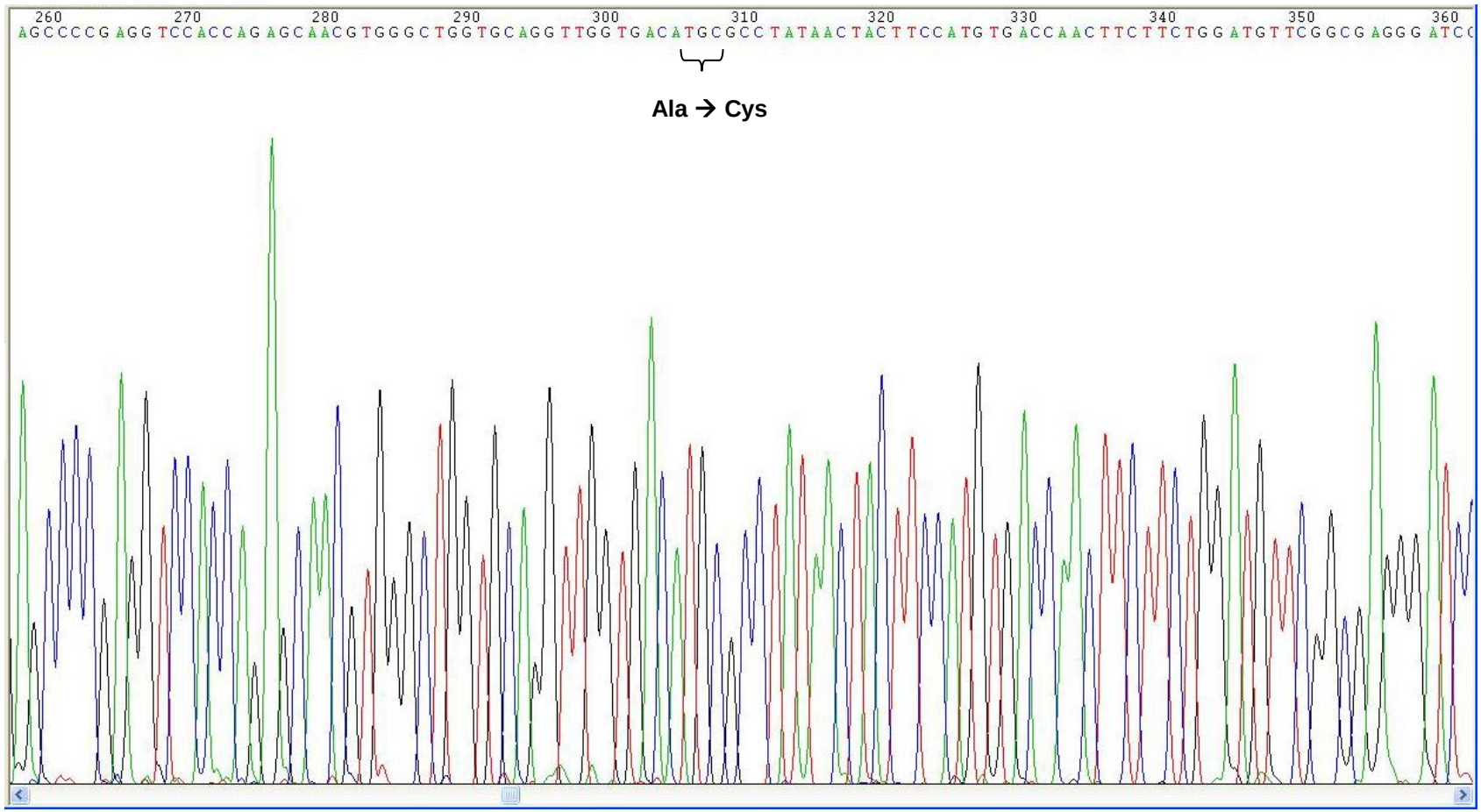
Εικόνα Α3.Χ2. Μετάλλαξη της Leu190 σε Cys. *Στο χρωματογράφημα διακρίνεται η περιοχή των νουκλεοτιδίων μέσα στην οποία υπάρχει η αλληλουχία TGT που κωδικοποιεί το αμινοξύ της μετάλλαξης κυστεΐνη. Τα νουκλεοτίδια αυτά αντικατέστησαν τα TTG του ΔCys.*



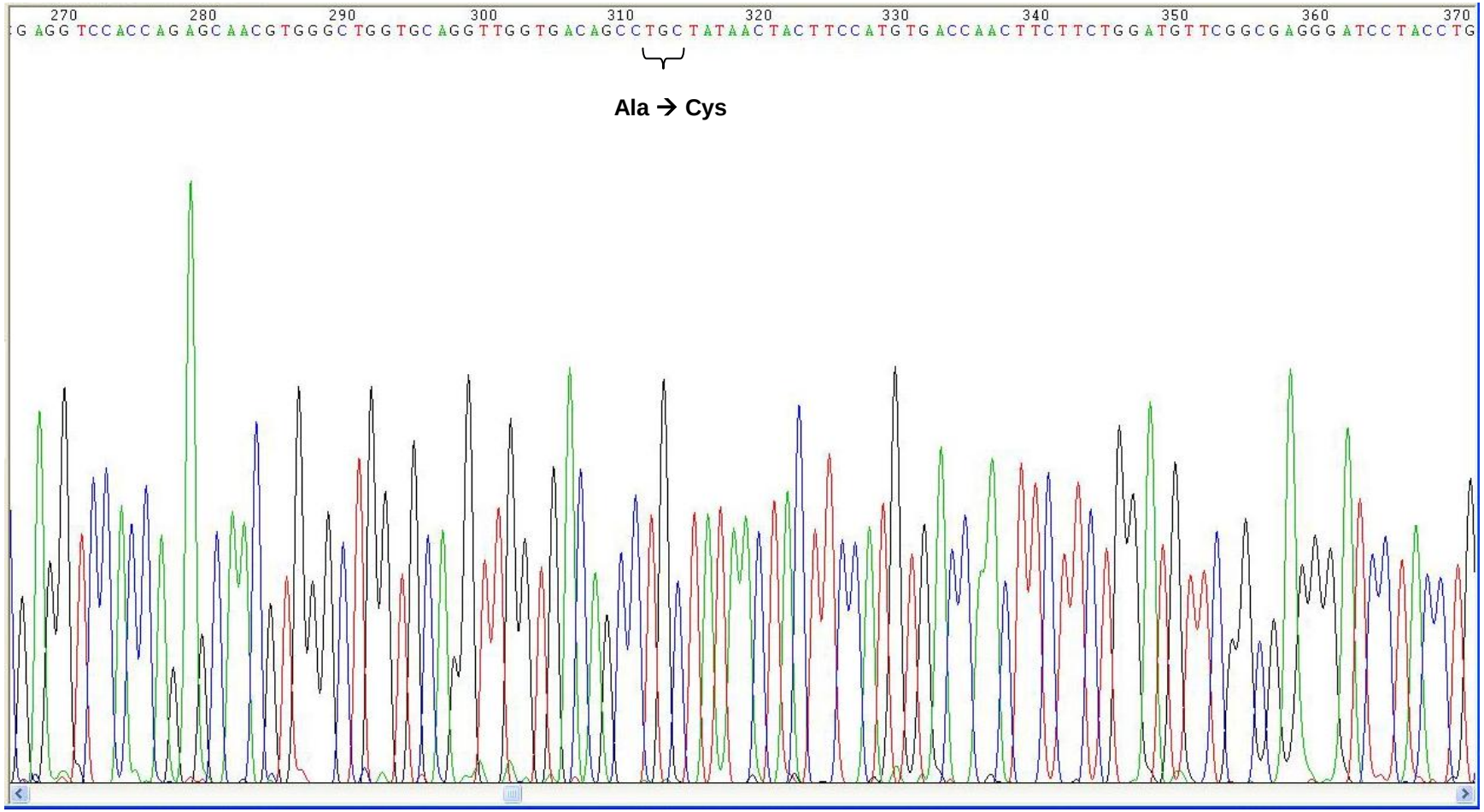
Εικόνα Α3.Χ3. Μετάλλαξη της Val191 σε Cys. *Στο χρωματογράφημα διακρίνεται η περιοχή των νουκλεοτιδίων μέσα στην οποία υπάρχει η αλληλουχία TGT που κωδικοποιεί το αμινοξύ της μετάλλαξης κυστεΐνη. Τα νουκλεοτίδια αυτά αντικατέστησαν τα GTG του ΔCys.*



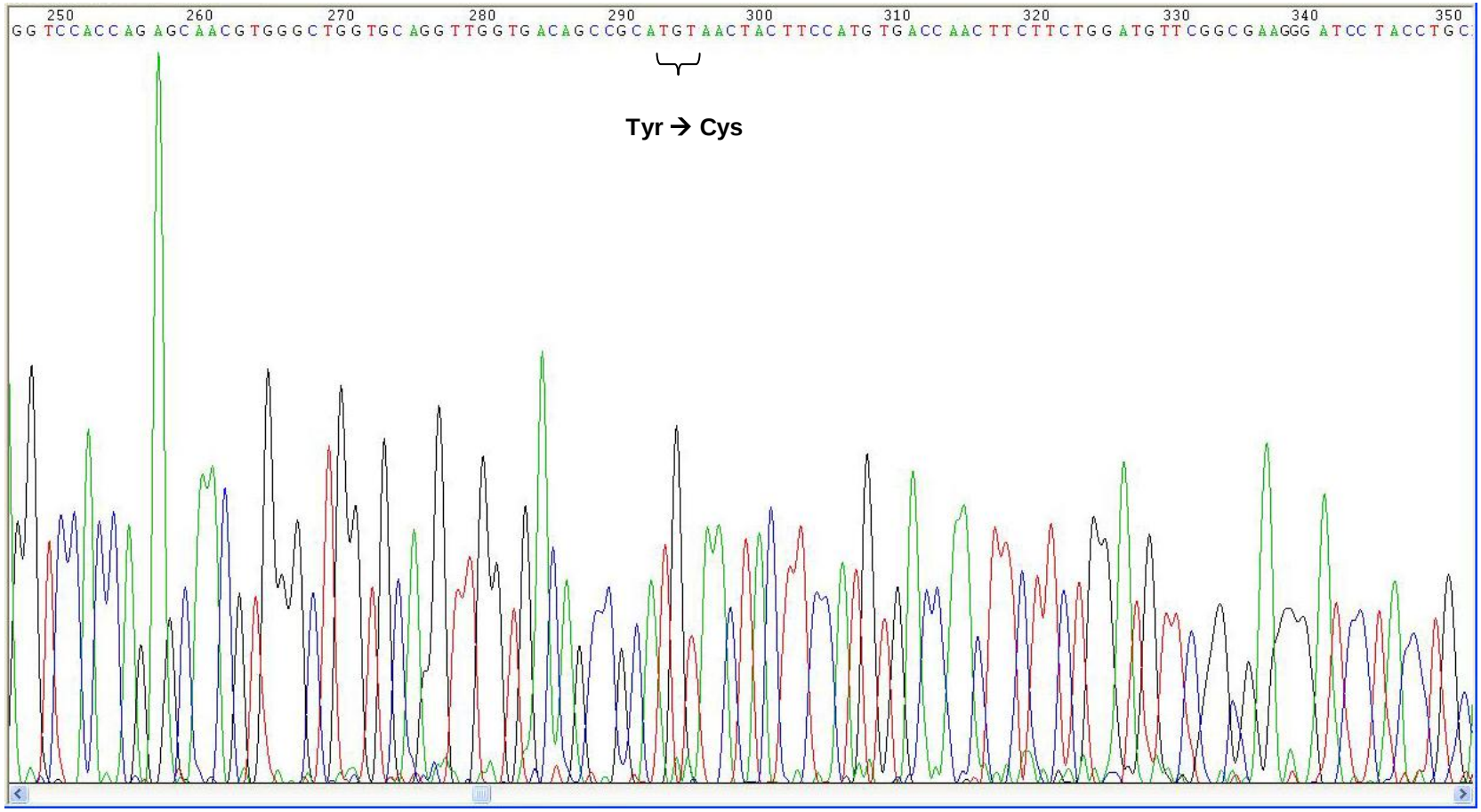
Εικόνα Α3.Χ4. Μετάλλαξη της Thr192 σε Cys. *Στο χρωματογράφημα διακρίνεται η περιοχή των νουκλεοτιδίων μέσα στην οποία υπάρχει η αλληλουχία TGT, που κωδικοποιεί το αμινοξύ της μετάλλαξης κυστεΐνη. Τα αντίστοιχα νουκλεοτίδια αυτά αντικατέστησαν τα ACA του ΔCys.*



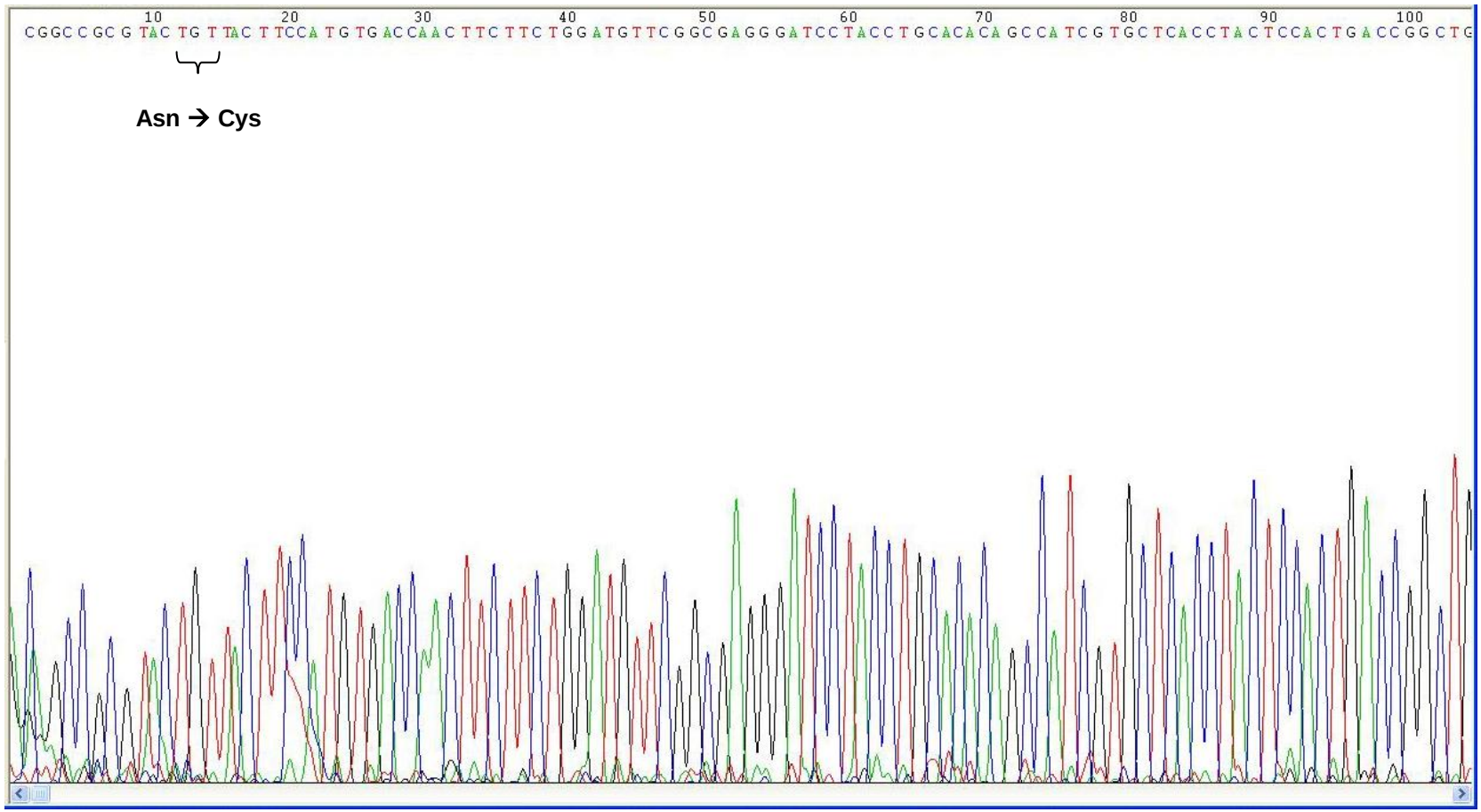
Εικόνα Α3.Χ5. Μετάλλαξη της Ala193 σε Cys. *Στο χρωματογράφημα διακρίνεται η περιοχή των νουκλεοτιδίων μέσα στην οποία υπάρχει η αλληλουχία TGC, που κωδικοποιεί το αμινοξύ της μετάλλαξης κυστεΐνη. Τα νουκλεοτίδια αυτά αντικατέστησαν τα GCC του ΔCys.*



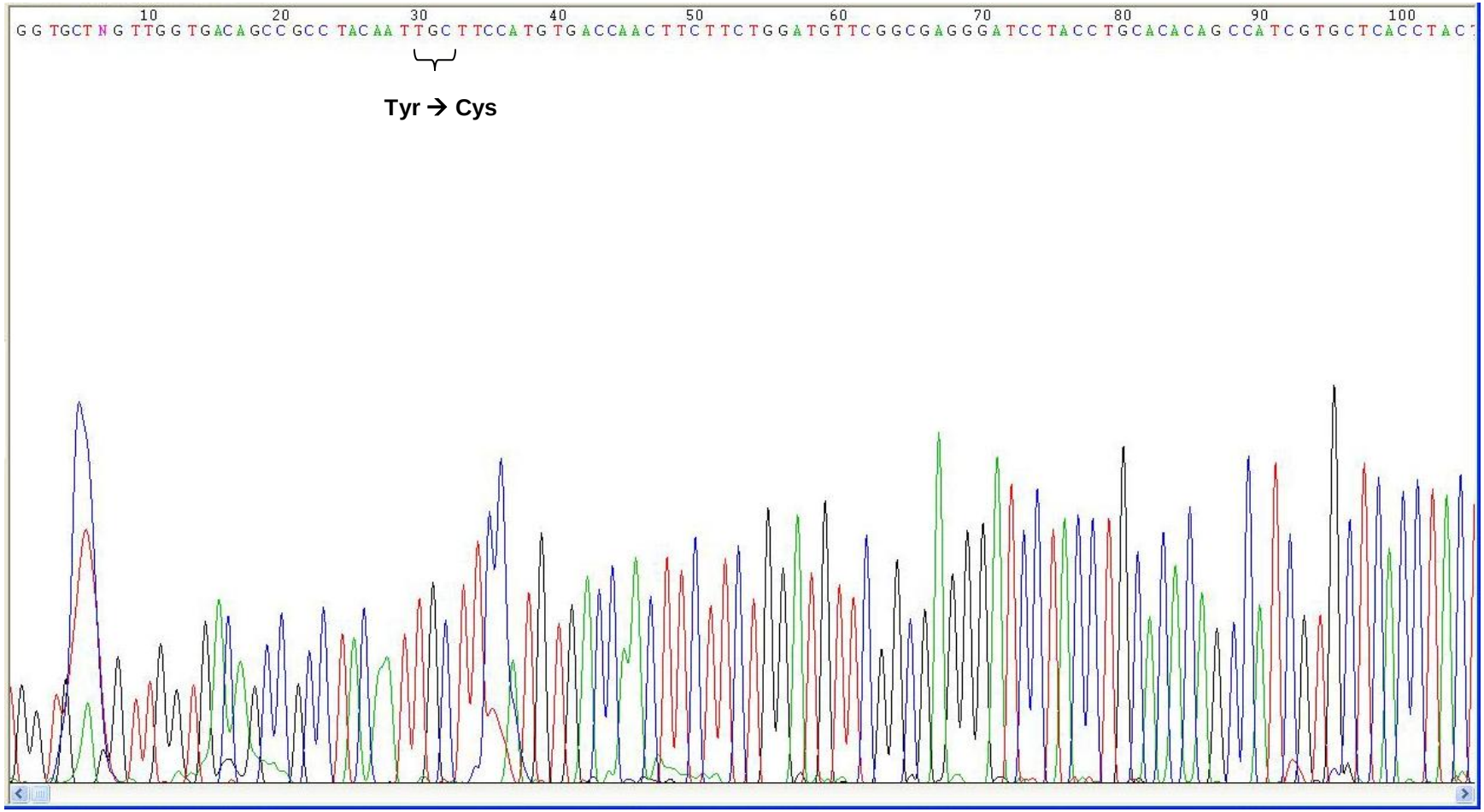
Εικόνα Α3.Χ6. Μετάλλαξη της Ala194 σε Cys. *Στο χρωματογράφημα διακρίνεται η περιοχή των νουκλεοτιδίων μέσα στην οποία υπάρχει η αλληλουχία TGC που κωδικοποιεί το αμινοξύ της μετάλλαξης κυστεΐνη. Τα νουκλεοτίδια αυτά αντικατέστησαν τα GCC του ΔCys.*



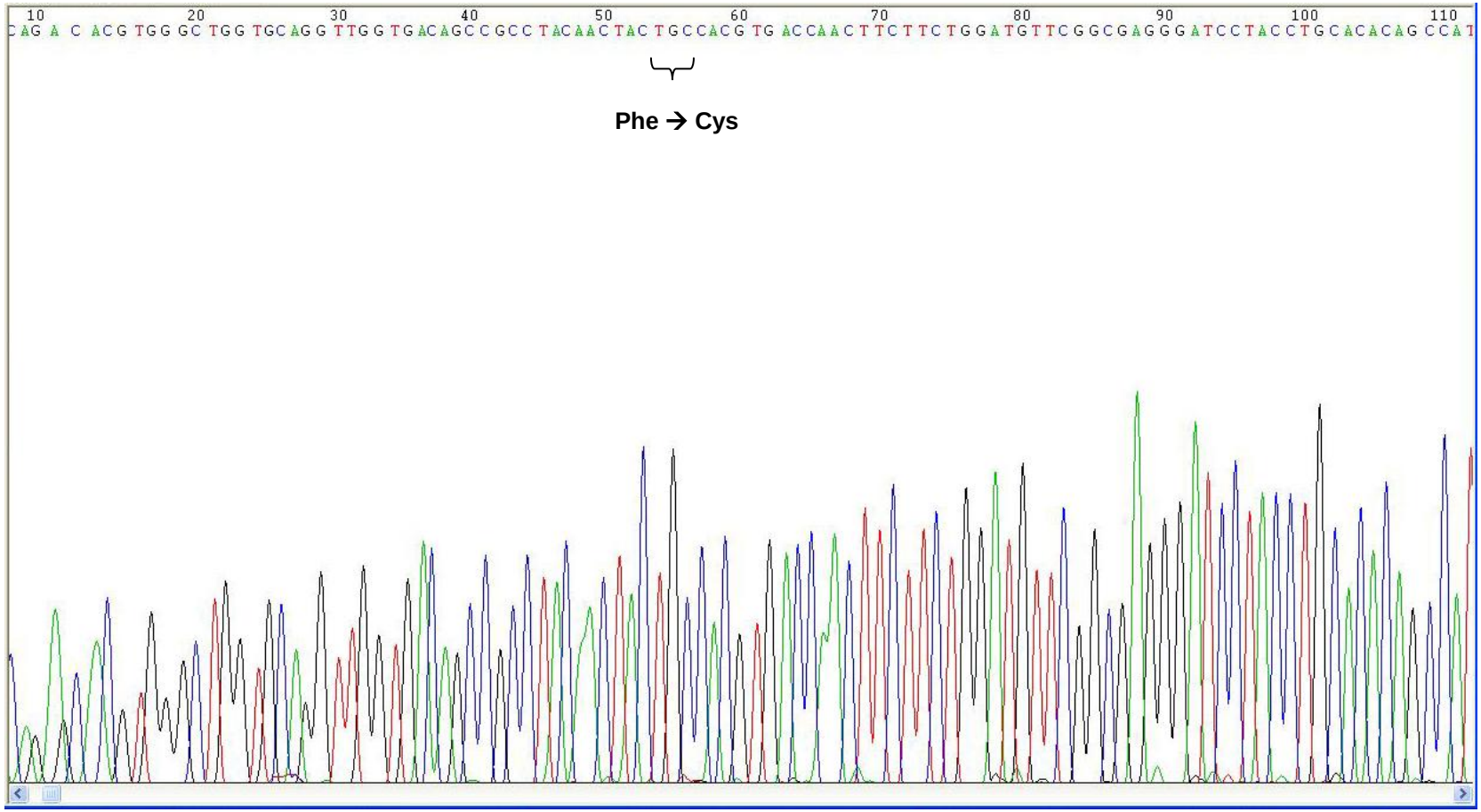
Εικόνα Α3.Χ7. Μετάλλαξη της Tyr195 σε Cys. *Στο χρωματογράφημα διακρίνεται η περιοχή των νουκλεοτιδίων μέσα στην οποία υπάρχει η αλληλουχία TGT που κωδικοποιεί το αμινοξύ της μετάλλαξης κυστεΐνη. Τα νουκλεοτίδια αυτά αντικατέστησαν τα TAC του ΔCys.*



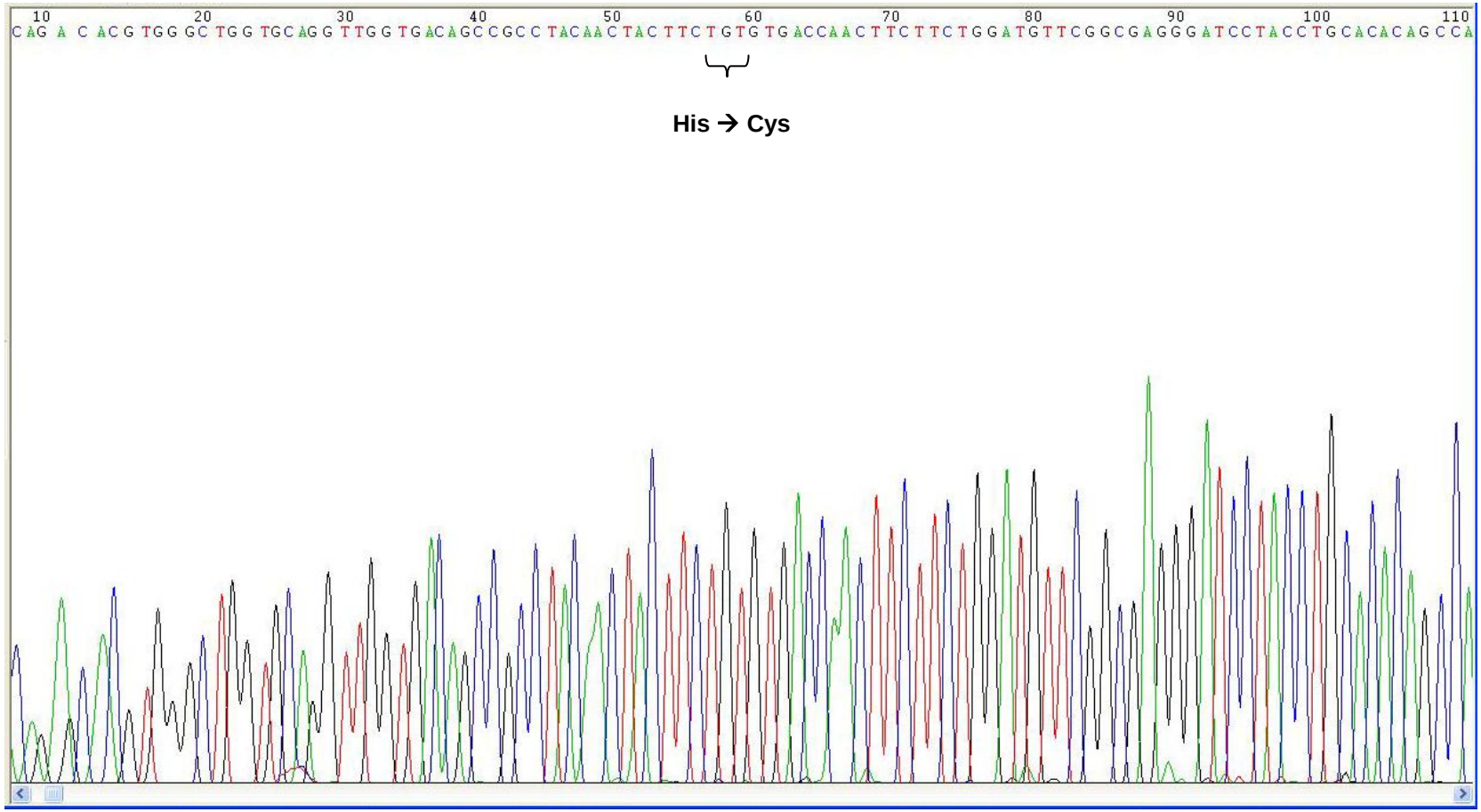
Εικόνα Α3.Χ8. Μετάλλαξη της Asn196 σε Cys. *Στο χρωματογράφημα διακρίνεται η περιοχή των νουκλεοτιδίων μέσα στην οποία υπάρχει η αλληλουχία TGT που κωδικοποιεί το αμινοξύ της μετάλλαξης κυστεΐνη. Τα νουκλεοτίδια αυτά αντικατέστησαν τα AAC του ΔCys.*



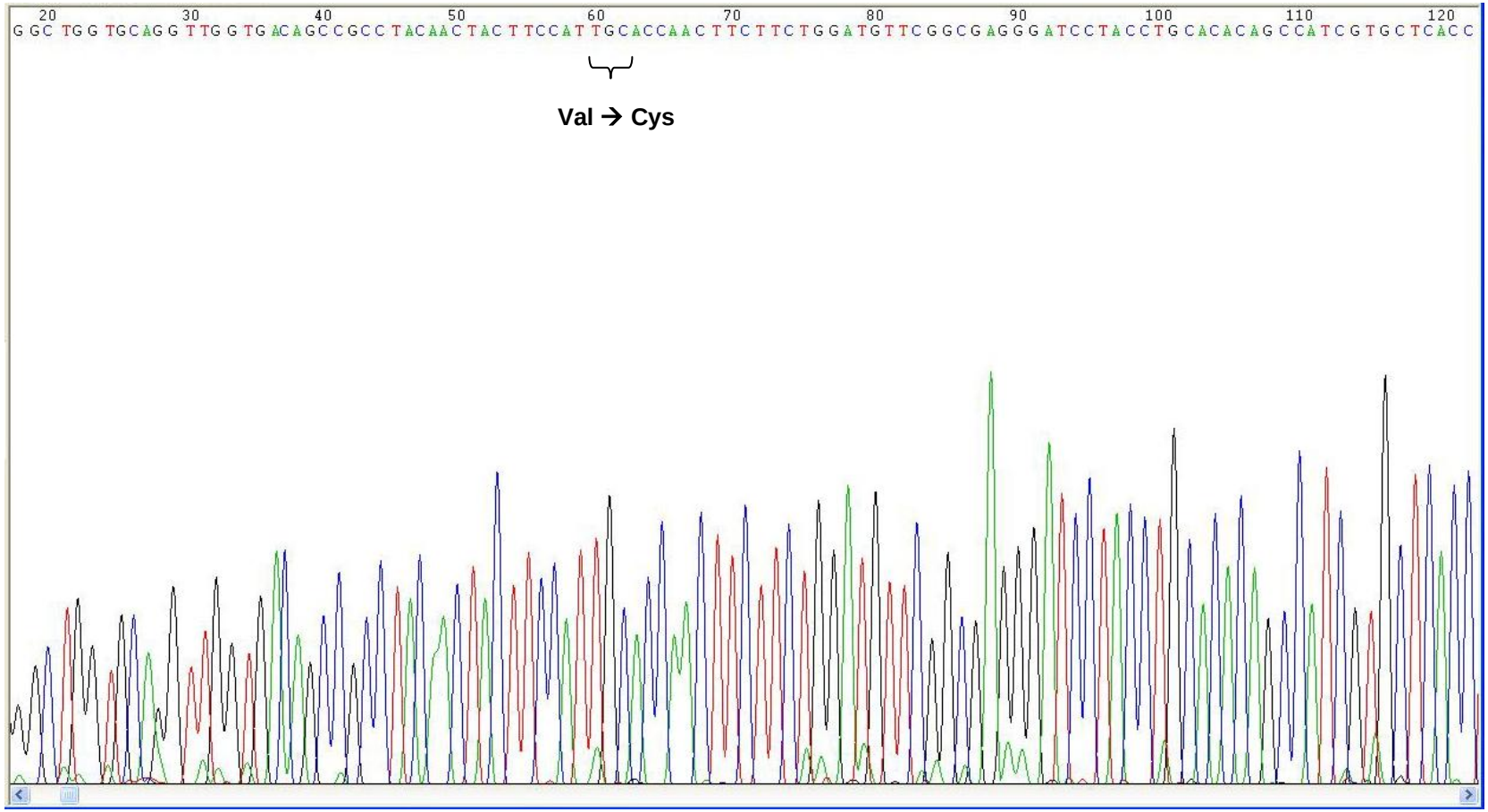
Εικόνα Α3.Χ9. Μετάλλαξη της Tyr197 σε Cys. *Στο χρωματογράφημα διακρίνεται η περιοχή των νουκλεοτιδίων μέσα στην οποία υπάρχει η αλληλουχία TGC που κωδικοποιεί το αμινοξύ της μετάλλαξης κυστεΐνη. Τα νουκλεοτίδια αυτά αντικατέστησαν τα TAC του ΔCys.*



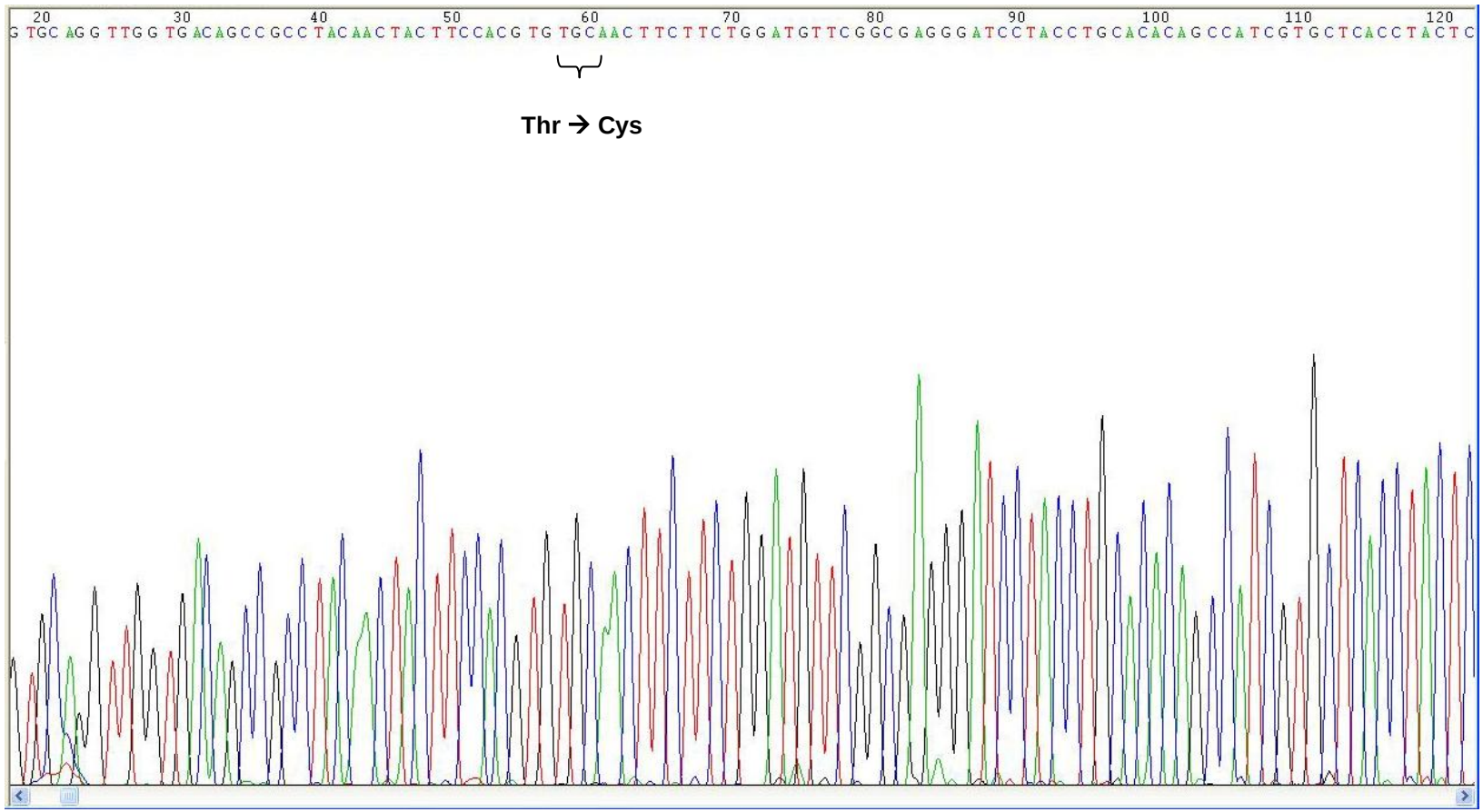
Εικόνα Α3.Χ10. Μετάλλαξη της Phe198 σε Cys. *Στο χρωματογράφημα διακρίνεται η περιοχή των νουκλεοτιδίων μέσα στην οποία υπάρχει η αλληλουχία TGC που κωδικοποιεί το αμινοξύ της μετάλλαξης κυστεΐνη. Τα νουκλεοτίδια αυτά αντικατέστησαν τα TTC του ΔCys.*



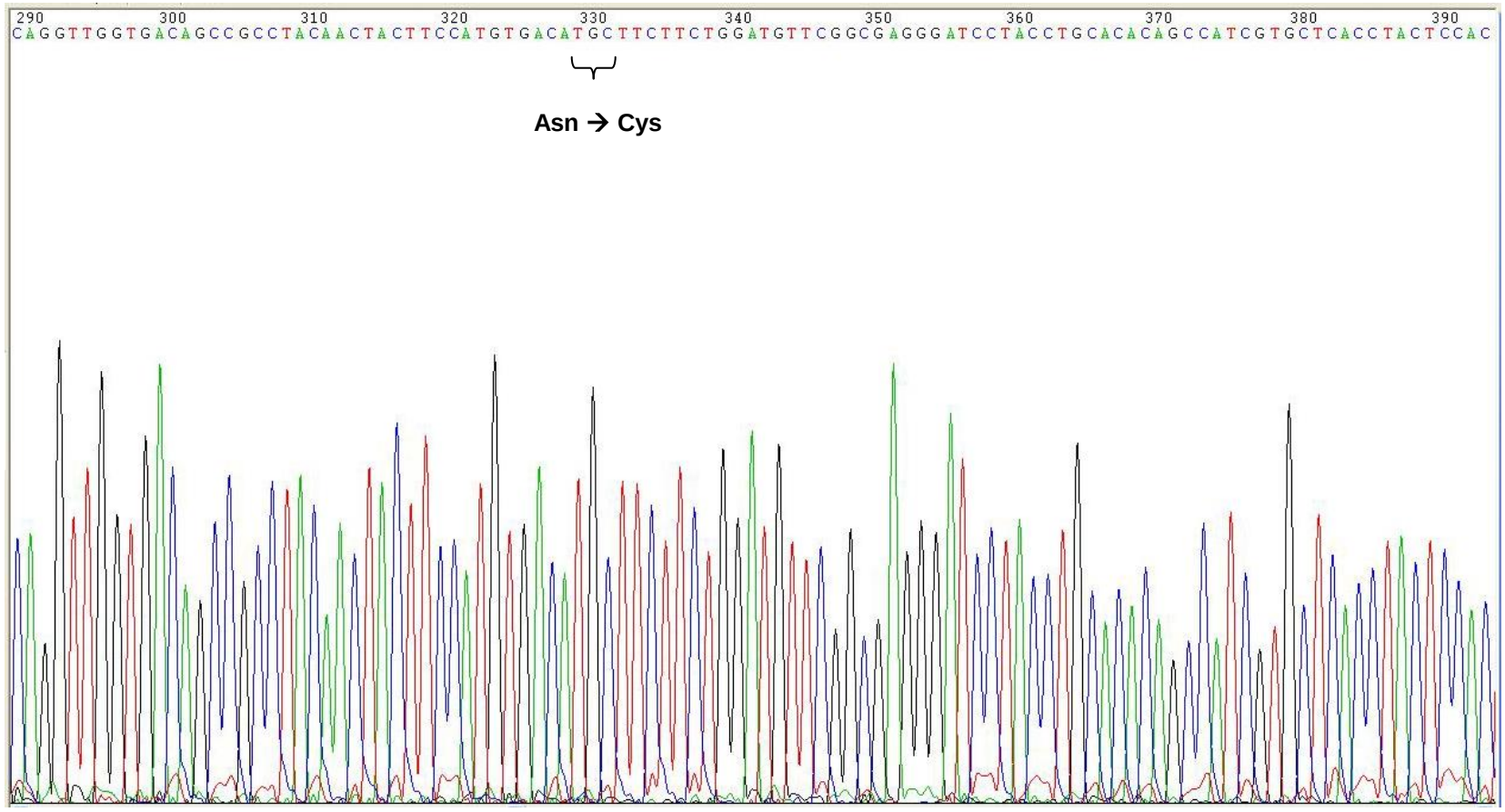
Εικόνα Α3.Χ11. Μετάλλαξη της His199 σε Cys. *Στο χρωματογράφημα διακρίνεται η περιοχή των νουκλεοτιδίων μέσα στην οποία υπάρχει η αλληλουχία TGT που κωδικοποιεί το αμινοξύ της μετάλλαξης κυστεΐνη. Τα νουκλεοτίδια αυτά αντικατέστησαν τα CAT του ΔCys.*



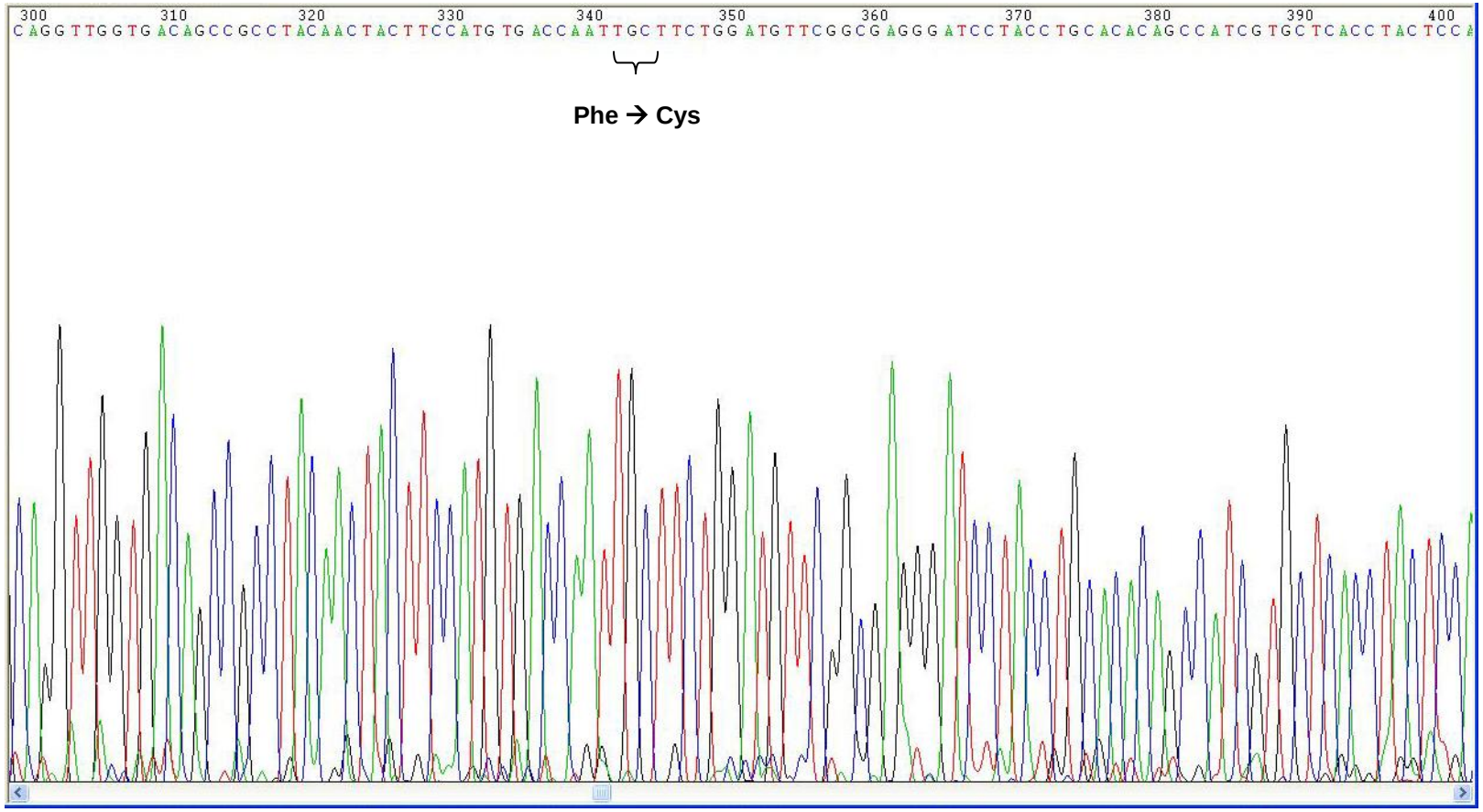
Εικόνα Α3.Χ12. Μετάλλαξη της Val200 σε Cys. *Στο χρωματογράφημα διακρίνεται η περιοχή των νουκλεοτιδίων μέσα στην οποία υπάρχει η αλληλουχία TGC που κωδικοποιεί το αμινοξύ της μετάλλαξης κυστεΐνη. Τα νουκλεοτίδια αυτά αντικατέστησαν τα GTG του ΔCys.*



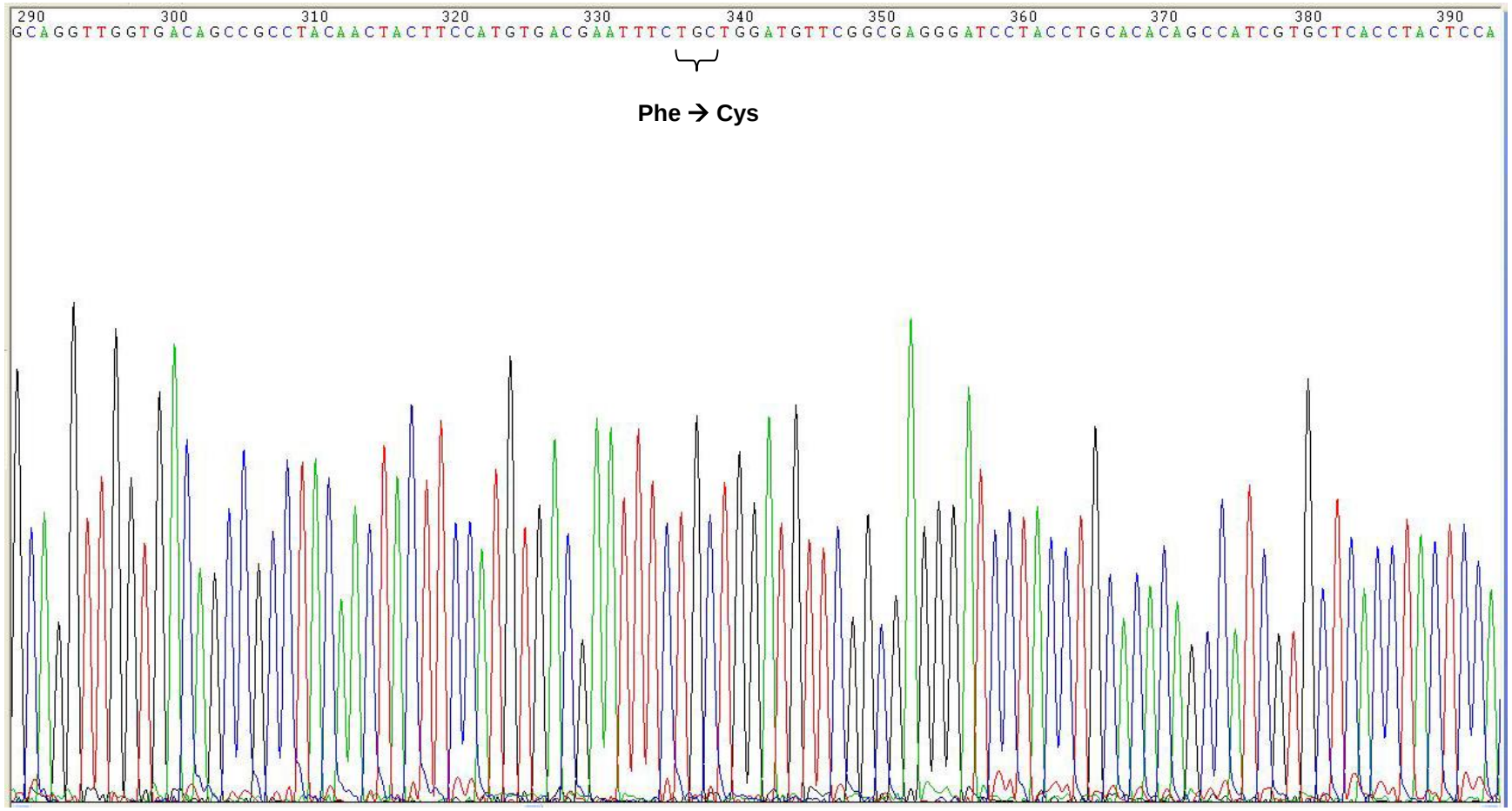
Εικόνα Α3.Χ13. Μετάλλαξη της Thr201 σε Cys. *Στο χρωματογράφημα διακρίνεται η περιοχή των νουκλεοτιδίων μέσα στην οποία υπάρχει η αλληλουχία TGC που κωδικοποιεί το αμινοξύ της μετάλλαξης κυστεΐνη. Τα νουκλεοτίδια αυτά αντικατέστησαν τα ACC του ΔCys.*



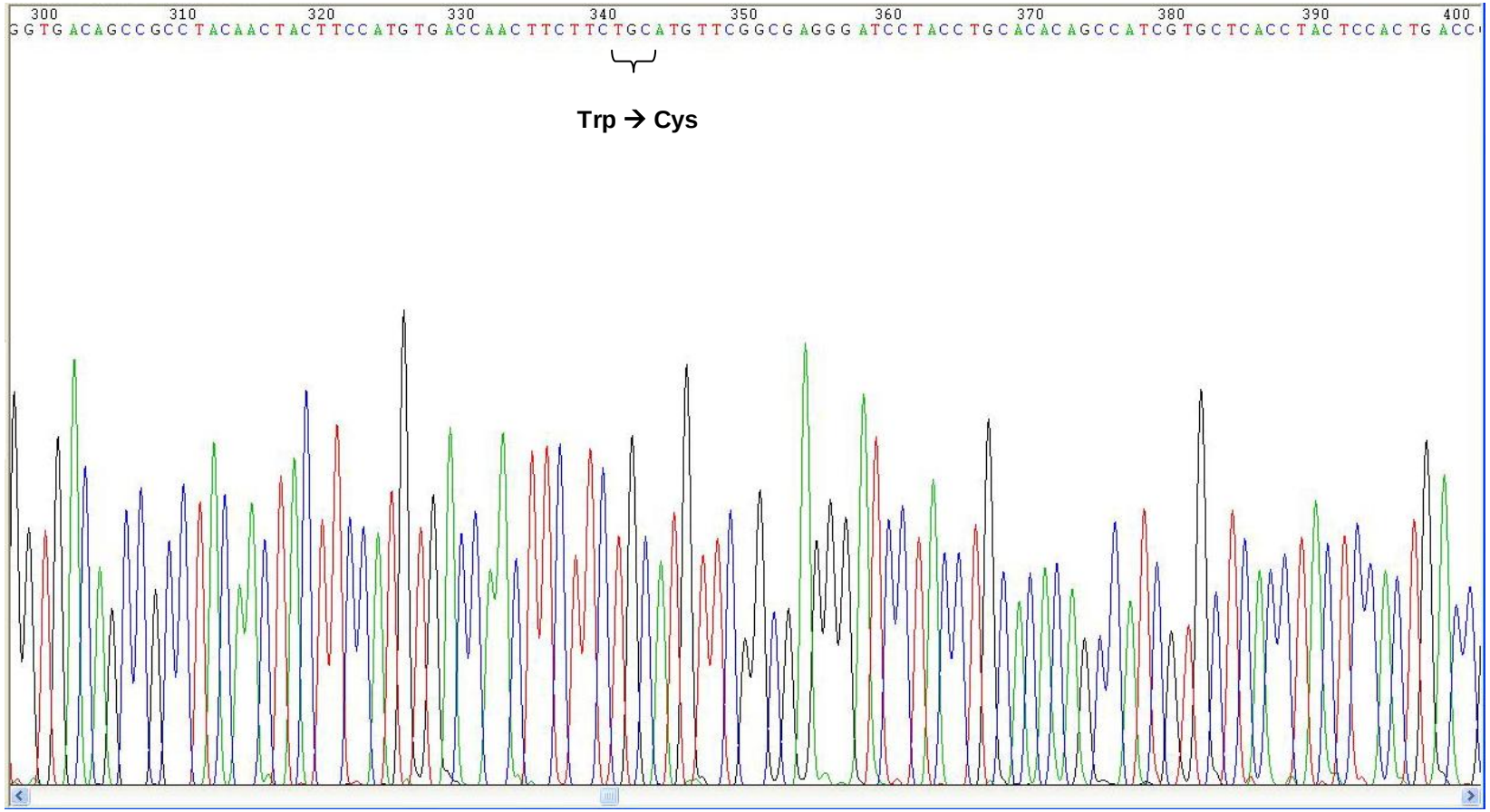
Εικόνα Α3.Χ14. Μετάλλαξη της Asn202 σε Cys. *Στο χρωματογράφημα διακρίνεται η περιοχή των νουκλεοτιδίων μέσα στην οποία υπάρχει η αλληλουχία TGC που κωδικοποιεί το αμινοξύ της μετάλλαξης κυστεΐνη. Τα νουκλεοτίδια αυτά αντικατέστησαν τα AAC του ΔCys.*



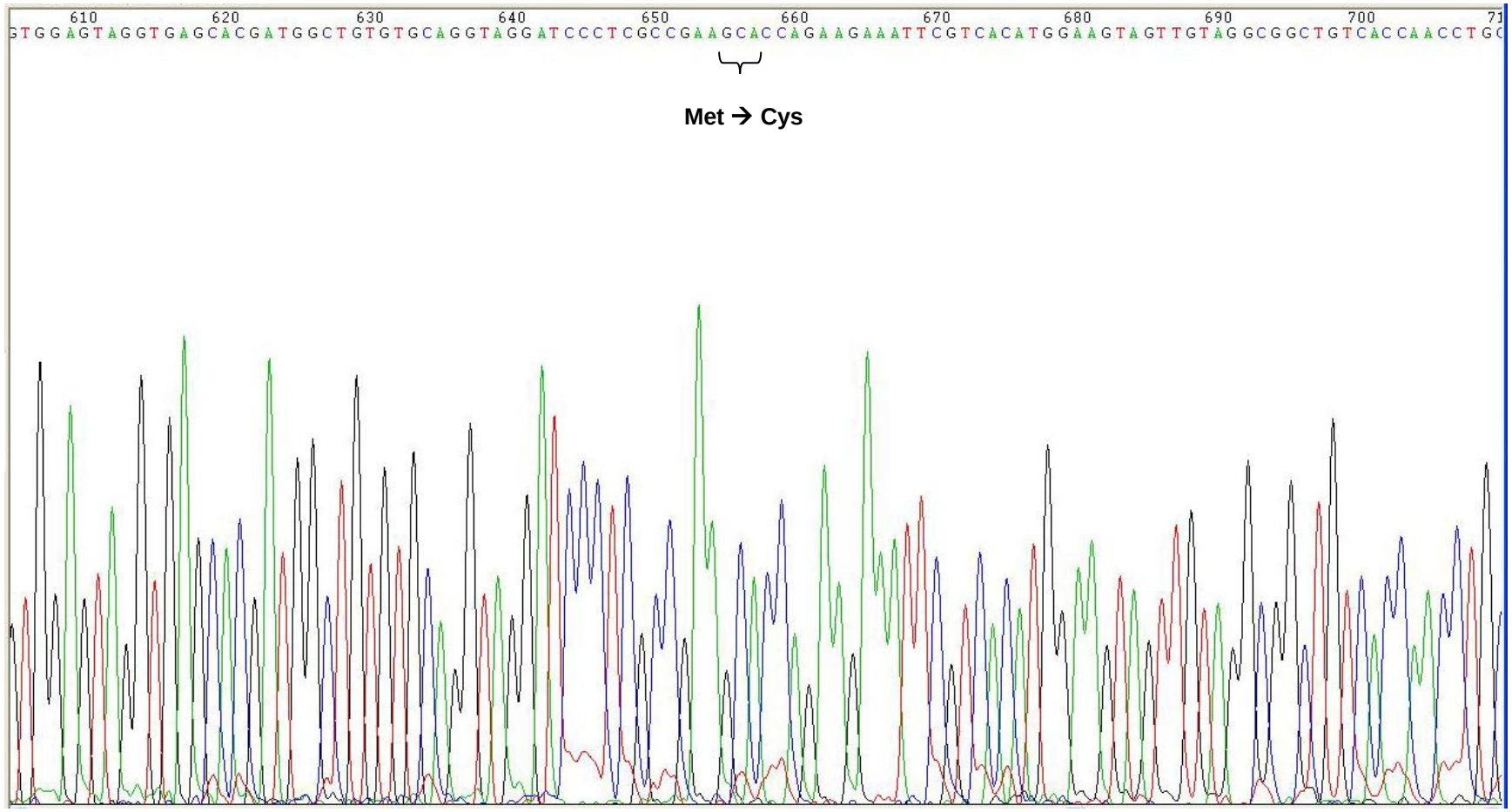
Εικόνα Α3.Χ15. Μετάλλαξη της Phe203 σε Cys. *Στο χρωματογράφημα διακρίνεται η περιοχή των νουκλεοτιδίων μέσα στην οποία υπάρχει η αλληλουχία TGC που κωδικοποιεί το αμινοξύ της μετάλλαξης κυστεΐνη. Τα νουκλεοτίδια αυτά αντικατέστησαν τα TTC του ΔCys.*



Εικόνα Α3.Χ16. Μετάλλαξη της Phe204 σε Cys. *Στο χρωματογράφημα διακρίνεται η περιοχή των νουκλεοτιδίων μέσα στην οποία υπάρχει η αλληλουχία TGC που κωδικοποιεί το αμινοξύ της μετάλλαξης κυστεΐνη. Τα νουκλεοτίδια αυτά αντικατέστησαν τα TTC του ΔCys.*

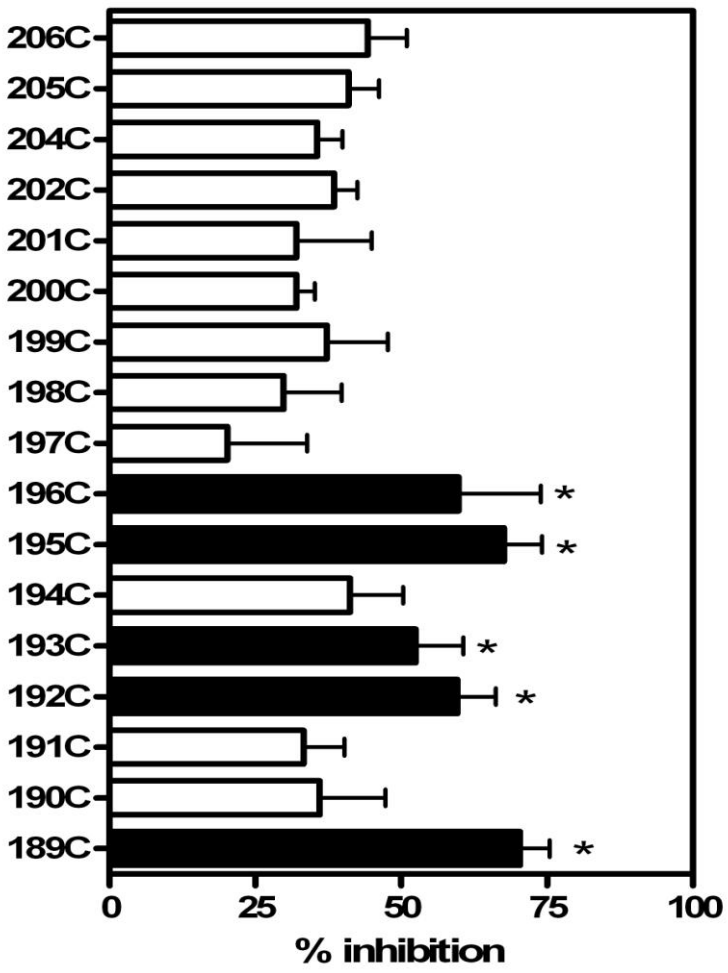


Εικόνα Α3.Χ17. Μετάλλαξη της Trp205 σε Cys. *Στο χρωματογράφημα διακρίνεται η περιοχή των νουκλεοτιδίων μέσα στην οποία υπάρχει η αλληλουχία TGC που κωδικοποιεί το αμινοξύ της μετάλλαξης κυστεΐνη. Τα νουκλεοτίδια αυτά αντικατάστησαν τα TGG του ΔCys.*

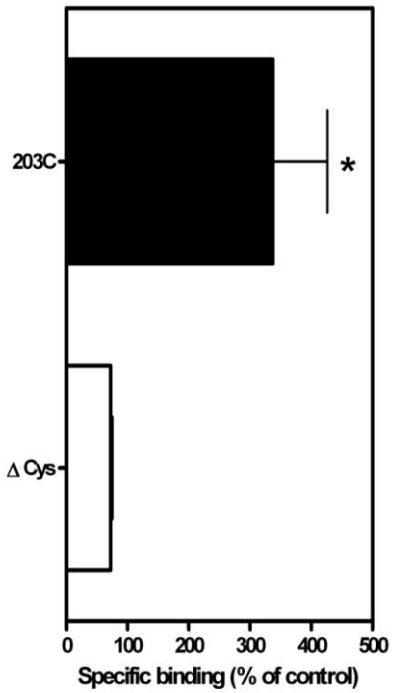


Εικόνα Α3.Χ18. Μετάλλαξη της Met206 σε Cys. *Στο χρωματογράφημα διακρίνεται η περιοχή των νουκλεοτιδίων μέσα στην οποία υπάρχει η αλληλουχία GCA η οποία είναι η αντίστροφη και συμπληρωματική της αλληλουχίας TGC που κωδικοποιεί το αμινοξύ της μετάλλαξης κυστεΐνη. Τα νουκλεοτίδια αυτά αντικατέστησαν τα ATG του ΔCys.*

Εικόνα 22. Διαθεσιμότητες για αντίδραση με το MTSEA των τεχνητών κυστεϊνών της τρίτης διαμεμβρανικής περιοχής του CRF_1. *Κύτταρα HEK 293 που εκφράζανε σταθερά τους μεταλλαγμένους υποδοχείς (189C-206C) με τις τεχνητές κυστεΐνες στις θέσεις 189-206 της τρίτης διαμεμβρανικής περιοχής του CRF_1, αιωρημένα σε ρυθμιστικό διάλυμα Hepes/K^+/Na^+, επωάστηκαν για 15 δευτερόλεπτα της ώρας σε θερμοκρασία δωματίου, χωρίς (μάρτυρας) ή με MTSEA συγκέντρωσης 2,5 mM. Στη συνέχεια τα κύτταρα ομογενοποιήθηκαν και προσδιορίστηκε η ειδική δέσμευση της [^{125}I] – Tyr^0 – σοβαγίνης στα μεμβρανικά ομογενοποιήματα, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο ΄΄Υλικά και Μέθοδοι΄΄. Οι στήλες αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους ± τυπικά σφάλματα από 3-23 ξεχωριστά πειράματα. Η % αναστολή από το MTSEA της ειδικής δέσμευσης της [^{125}I] – Tyr^0 – σοβαγίνης ορίζεται ως {1- [ειδική δέσμευση μετά από την αντίδραση με MTSEA / ειδική δέσμευση χωρίς MTSEA (μάρτυρας)] x 100}. Οι στατιστικά σημαντικά διαφορές υπολογίστηκαν με τη χρήση της ανάλυσης διασποράς (ANOVA) και στη συνέχεια με LSD's post hoc test (* p<0.05 στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ της αναστολής από το MTSEA της δέσμευσης της [^{125}I] – Tyr^0 – σοβαγίνης, στον κάθε μεταλλαγμένο υποδοχέα από εκείνης στον ΔCys)*

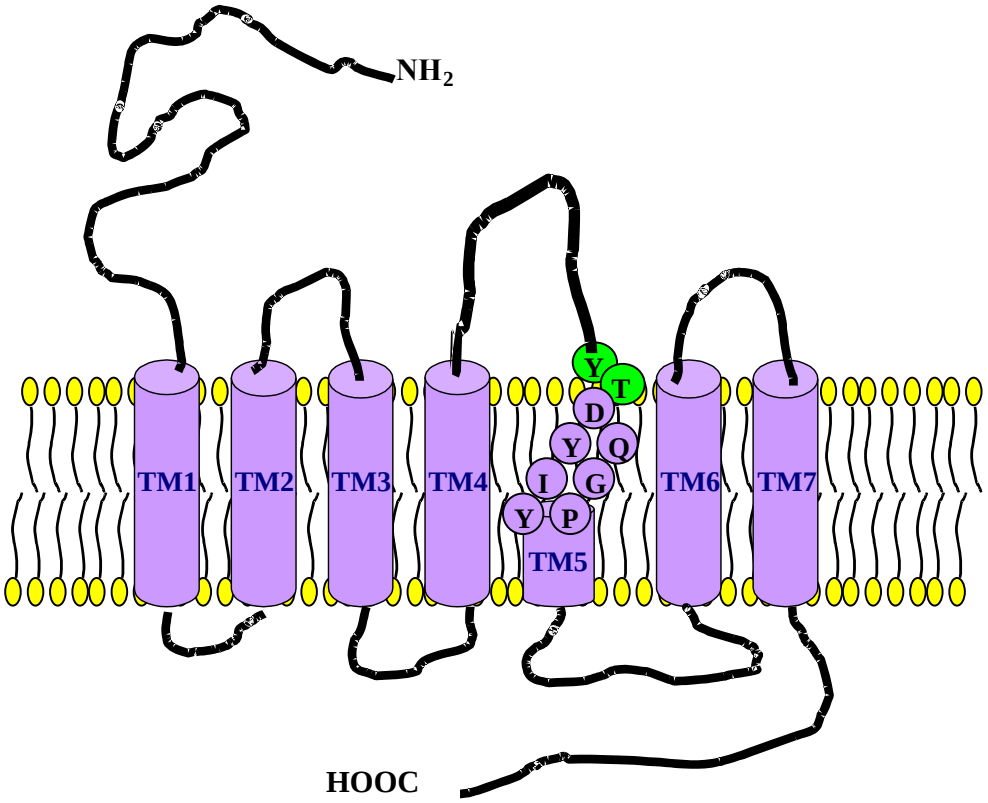


Εικόνα 23. Ενίσχυση από MTSEA της ειδικής δέσμευσης της [^{125}I] – Tyr^{0} – σοβαγίνης, στον 203C. *Κύτταρα HEK 293 που εκφράζανε σταθερά τους μεταλλαγμένους υποδοχείς, 203C ή ΔCys αιωρημένα σε ρυθμιστικό διάλυμα Hepes/K^{+}/Na^{+}, επωάστηκαν για 15 δευτερόλεπτα της ώρας σε θερμοκρασία δωματίου, χωρίς (μάρτυρας) ή με MTSEA συγκέντρωσης 2,5 mM. Στη συνέχεια τα κύτταρα ομογενοποιήθηκαν και προσδιορίστηκε η ειδική δέσμευση της [^{125}I] – Tyr^{0} – σοβαγίνης στα μεμβρανικά ομογενοποιήματα, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο ΄΄Υλικά και Μέθοδοι΄΄. Οι στήλες αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους ± τυπικά σφάλματα από 6-23 ξεχωριστά πειράματα. Η % ειδική δέσμευση ορίζεται ως {[ειδική δέσμευση μετά από την αντίδραση με MTSEA / ειδική δέσμευση χωρίς MTSEA (μάρτυρας)] x 100}. Οι στατιστικά σημαντικά διαφορές υπολογίστηκαν με τη χρήση της ανάλυσης διασποράς (ANOVA) και στη συνέχεια με LSD's post hoc test (* p<0.05 στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ της δέσμευσης της [^{125}I] – Tyr^{0} – σοβαγίνης στον 203C και εκείνης στον ΔCys μετά την αντίδρασή τους με το MTSEA)*



Β) ΠΕΜΠΤΗ ΔΙΑΜΕΜΒΡΑΝΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ ΤΟΥ CRF_1

Μετά την τρίτη διαμεμβρανική περιοχή εξετάσαμε το ρόλο των αμινοξέων της πέμπτης διαμεβρανικής περιοχής του CRF_1 (εικόνα 24) στη δέσμευση των πεπτιδίων της οικογένειας του CRF



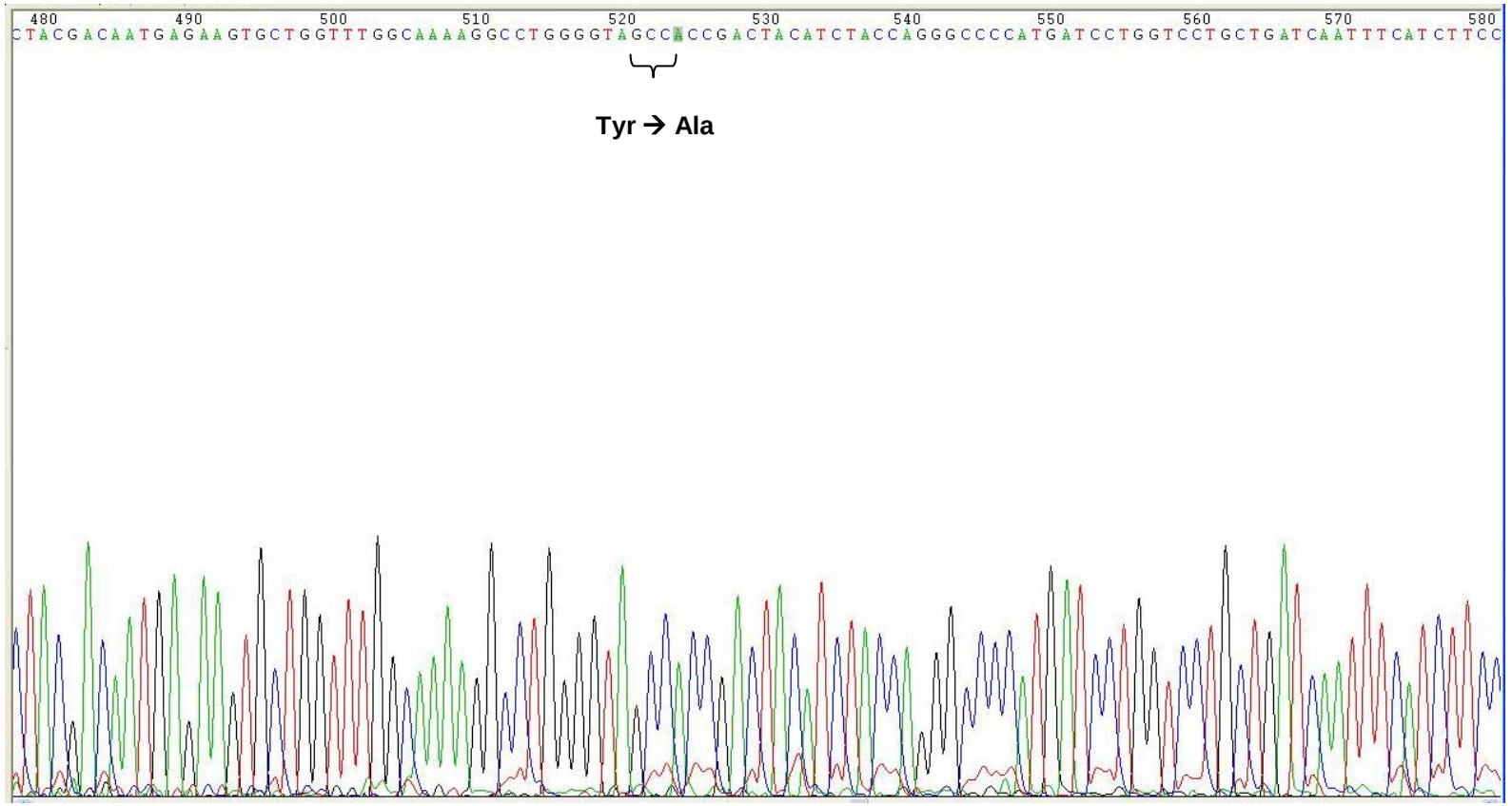
Εικόνα 24. Σχηματική αναπαράσταση της πέμπτης διαμεμβρανικής περιοχής του CRF_1. *Τα αμινοξέα της πέμπτης διαμεμβρανικής περιοχής (TM5) του CRF_1 των οποίων ο ρόλος στη δέσμευση των πεπτιδίων της οικογένειας του CRF εξετάστηκε στην παρούσα εργασία είναι χρωματισμένα μωβ. Επίσης εξετάστηκε ο ρόλος στη δέσμευση των πεπτιδίων των αμινοξέων που βρίσκονται στα όρια μεταξύ της TM5 και του δεύτερου εξωκυττάρου βρόγχου του υποδοχέα και είναι χρωματισμένα πράσινα.*

Μελέτη του ρόλου των αμινοξέων της πέμπτης διαμεμβρανικής περιοχής του CRF_1 στη δέσμευση των πεπτιδίων της οικογένειας του CRF

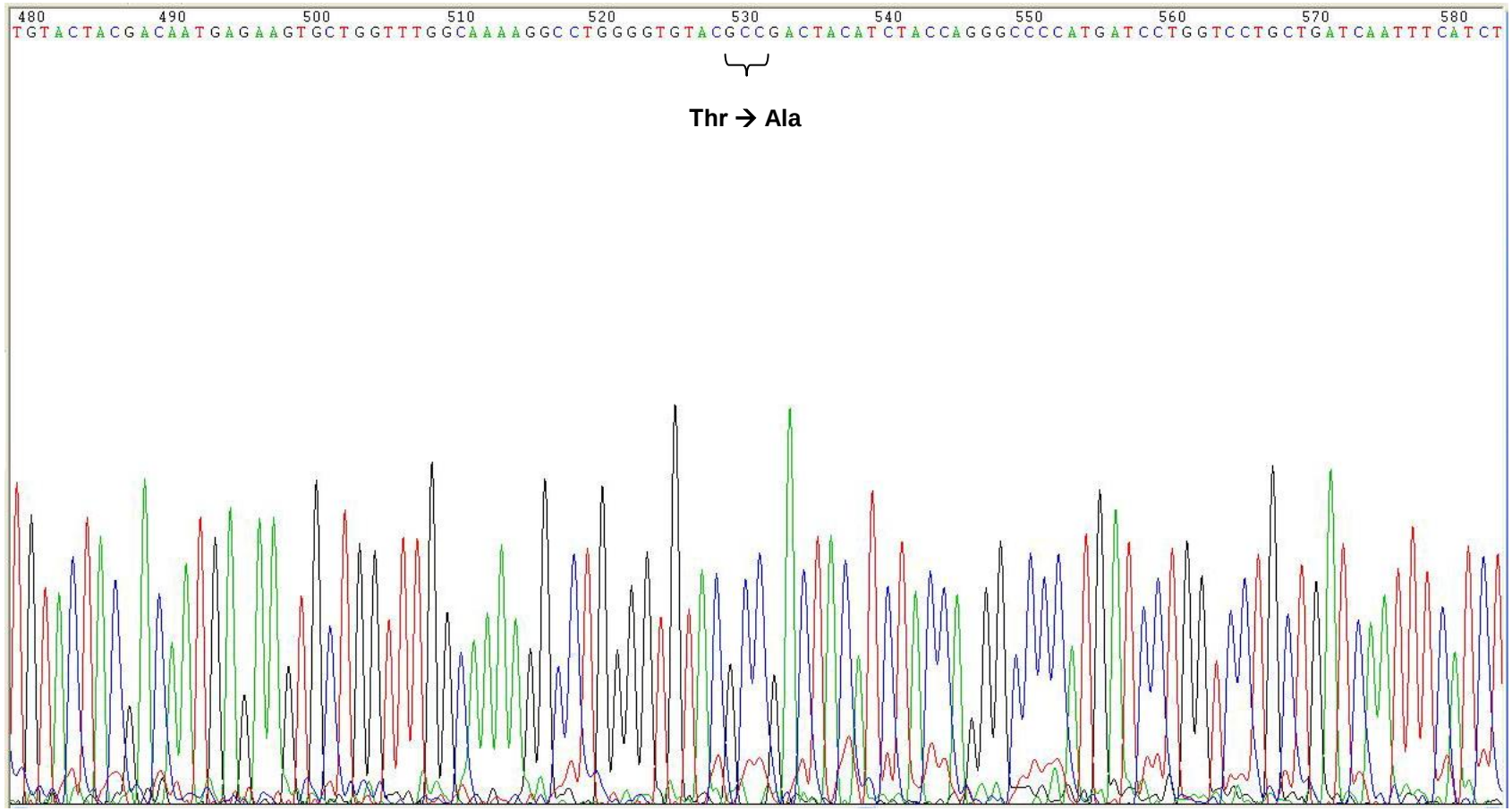
Με σκοπό να εξετάσουμε το ρόλο των αμινοξέων της πέμπτης διαμεμβρανικής περιοχής (TM5) του CRF_1 στη δέσμευση των πεπτιδίων της οικογένειας του CRF, αντικαταστήσαμε αυτά ένα την κάθε φορά και προσδιορίσαμε την επίδραση των μεταλλάξεων στη δέσμευση της συγγενούς με τον CRF, σοβαγίνης, στον CRF_1.

Συγκεκριμένα μεταλλάξαμε τα αμινοξέα της TM5 του CRF_1 (εικόνα 24), Tyr267, Thr268, Asp269, Tyr270, Ile271, Tyr272, Gln273, Gly274 και Pro275 σε αλανίνη, δημιουργώντας έτσι τους μεταλλαγμένους υποδοχείς, Y267A, T268A, D269A, Y270A, I271A, Y272A, Q273A, G274A και P275A.

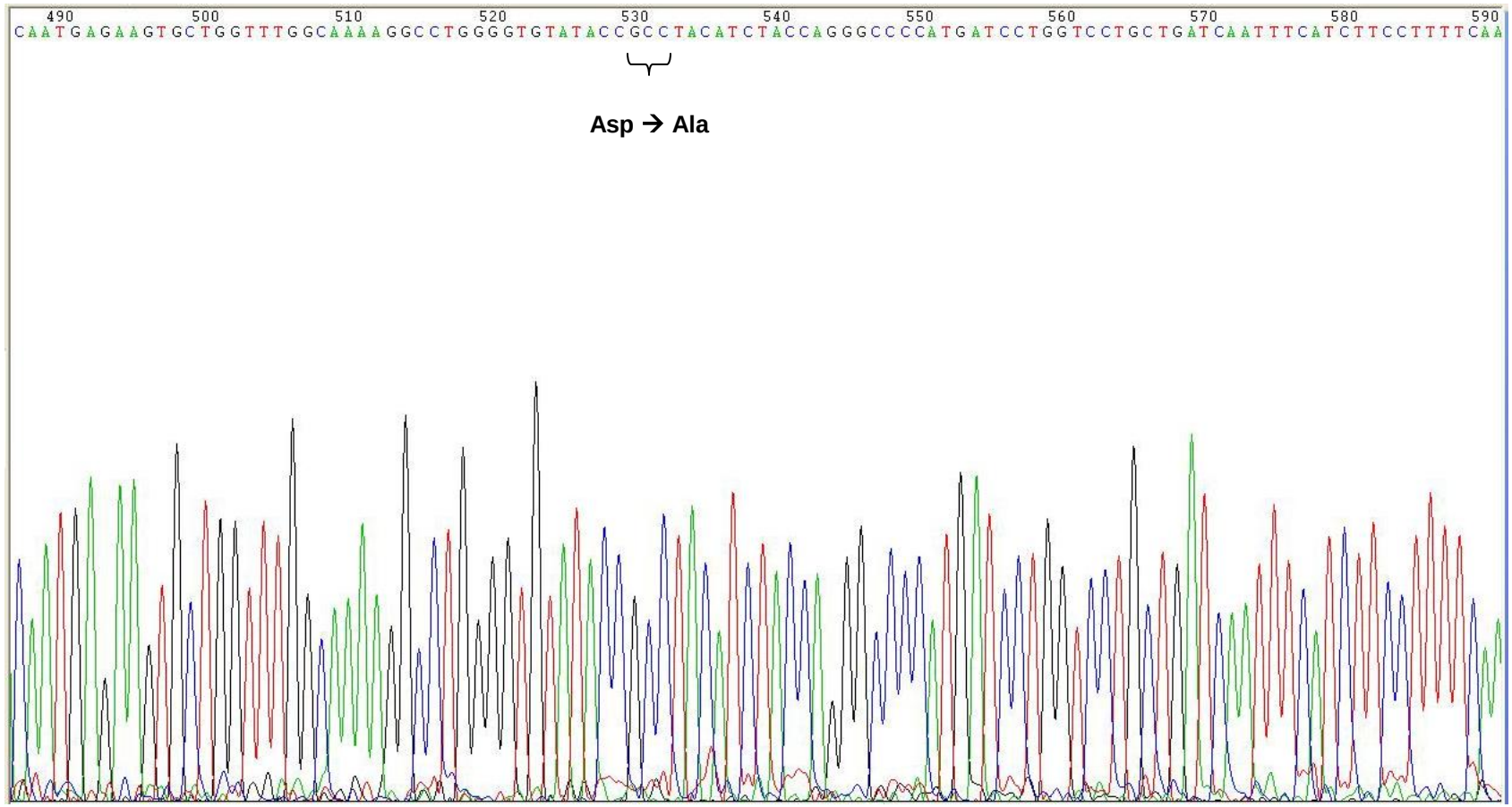
Μεταλλάξεις, Y267A, T268A, D269A, Y270A, I271A, Y272A, Q273, G274A και P275A του CRF_1



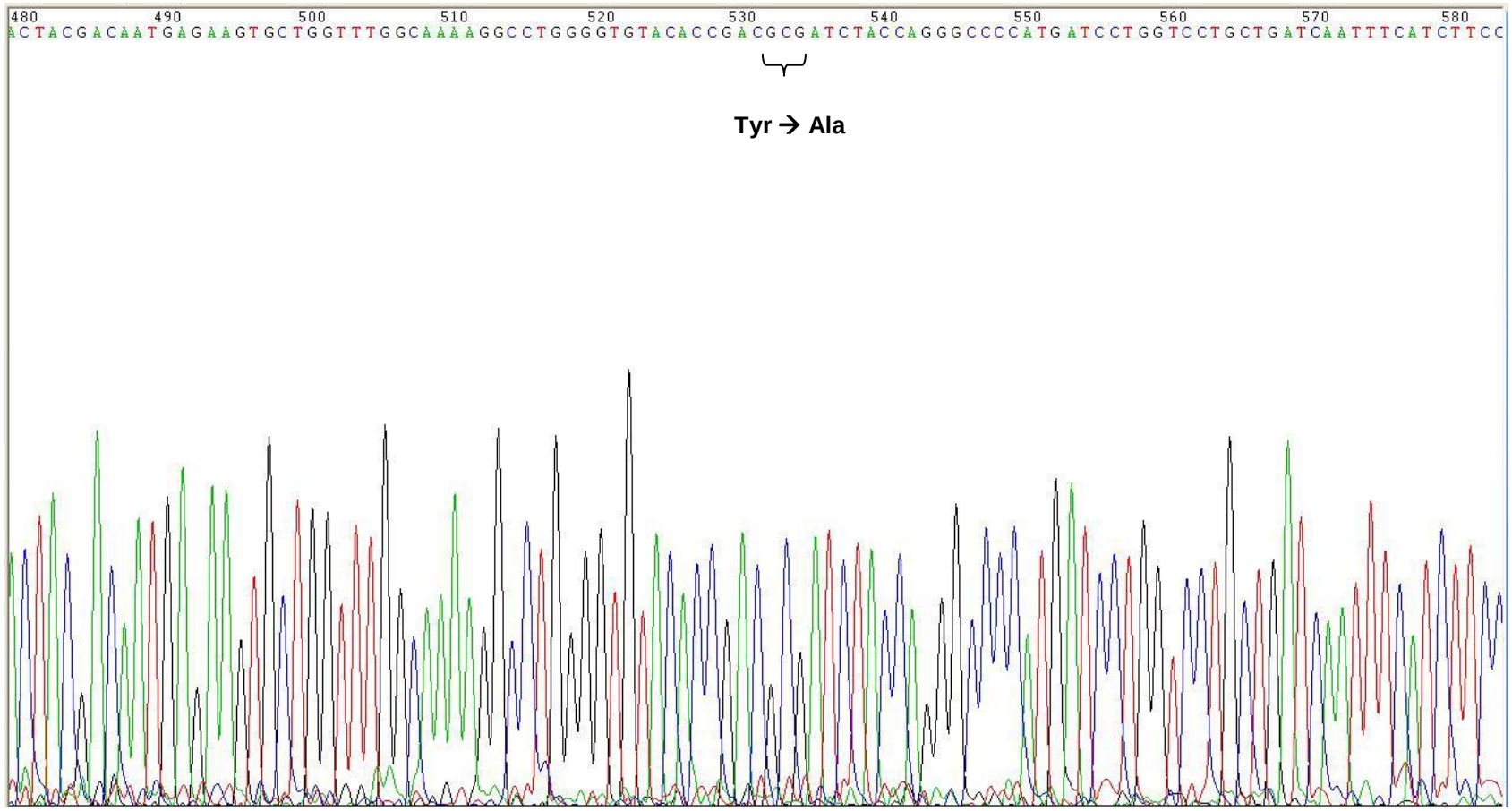
Εικόνα Β.Χ1. Μετάλλαξη της Tyr267 σε Ala. *Στο χρωματογράφημα διακρίνεται η περιοχή των νουκλεοτιδίων μέσα στην οποία υπάρχει η αλληλουχία GCC που κωδικοποιεί το αμινοξύ της μετάλλαξης αλανίνη. Τα νουκλεοτίδια αυτά αντικατέστησαν τα TAC του $hCRF_1$.*



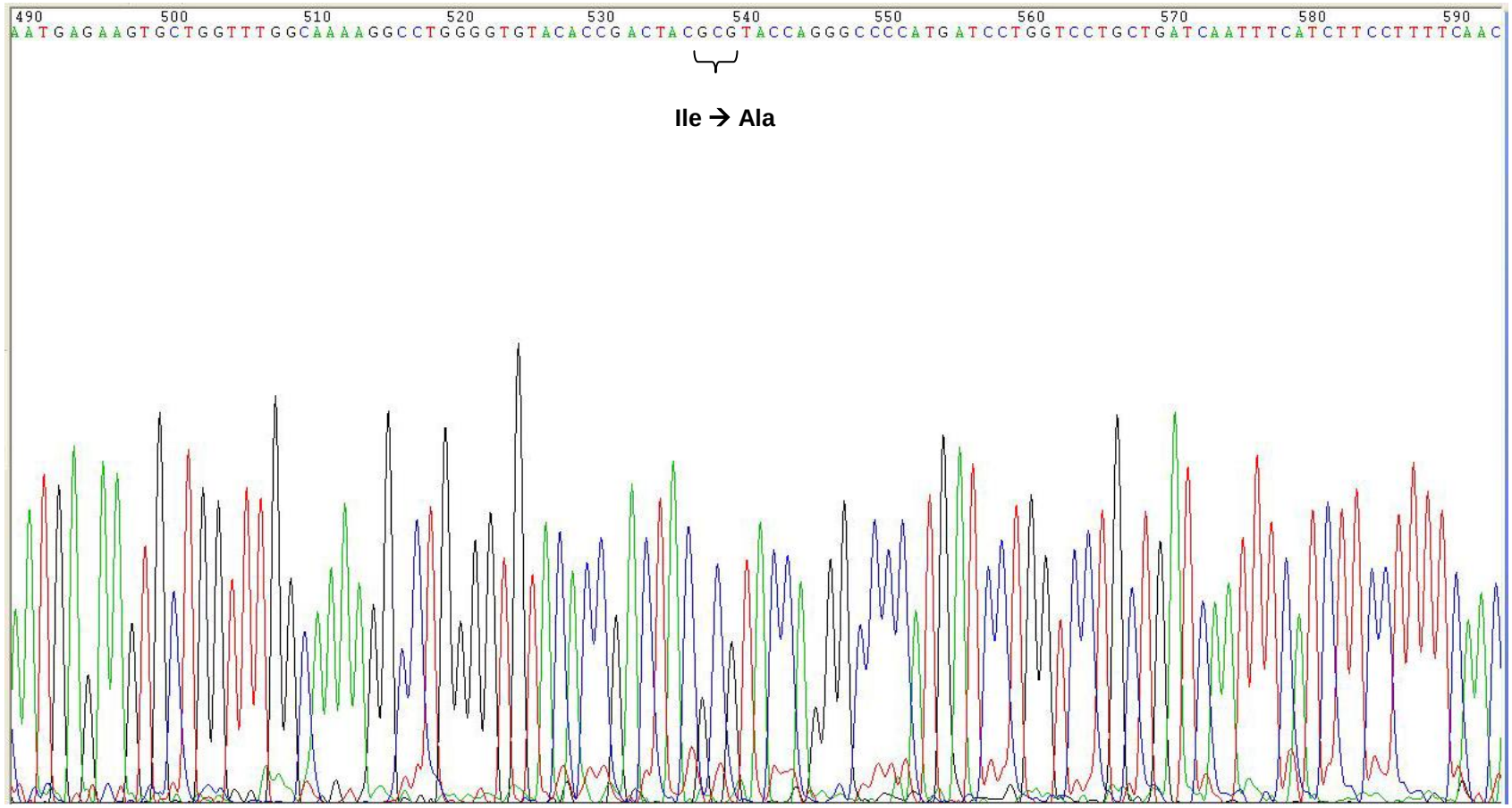
Εικόνα Β.Χ2. Μετάλλαξη της Thr268 σε Ala. *Στο χρωματογράφημα διακρίνεται η περιοχή των νουκλεοτιδίων μέσα στην οποία υπάρχει η αλληλουχία GCC που κωδικοποιεί το αμινοξύ της μετάλλαξης αλανίνη. Τα νουκλεοτίδια αυτά αντικατέστησαν τα ACC του* $hCRF_1$.



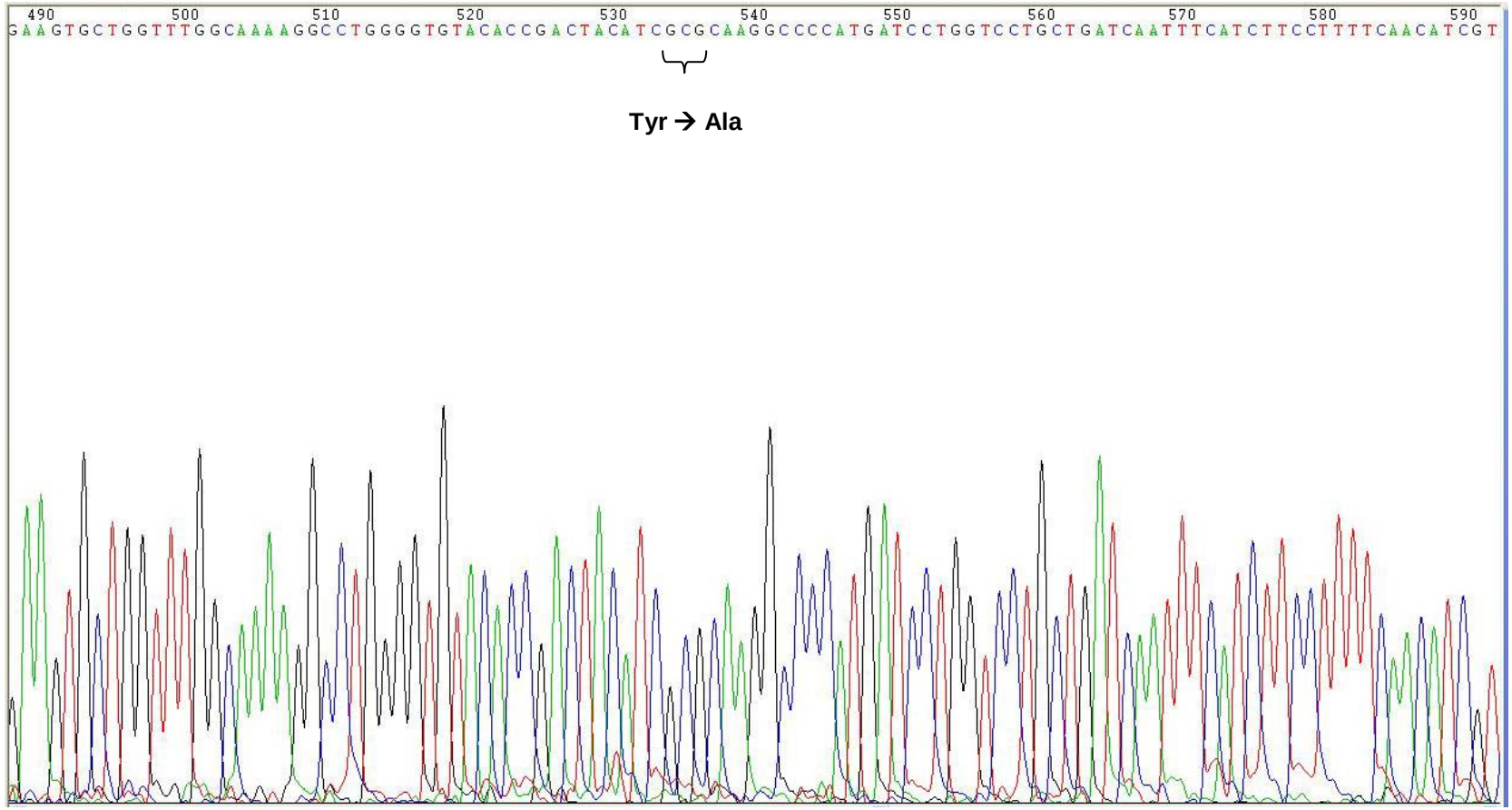
Εικόνα Β.Χ3. Μετάλλαξη του Asp269 σε Ala. *Στο χρωματογράφημα διακρίνεται η περιοχή των νουκλεοτιδίων μέσα στην οποία υπάρχει η αλληλουχία GCC που κωδικοποιεί το αμινοξύ της μετάλλαξης αλανίνη. Τα νουκλεοτίδια αυτά αντικατέστησαν τα GAC του* $hCRF_1$.



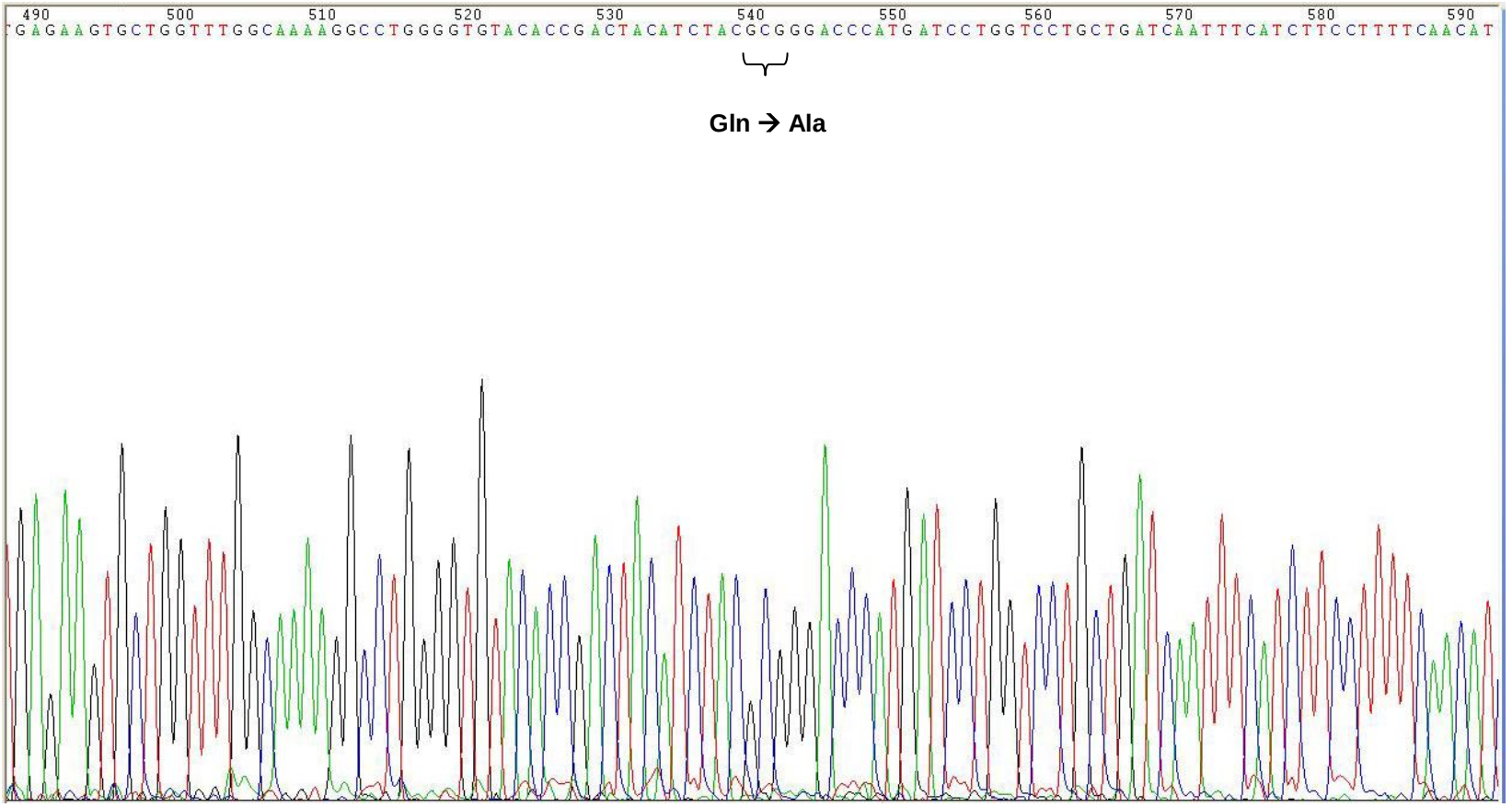
Εικόνα Β.Χ4. Μετάλλαξη της Tyr270 σε Ala. *Στο χρωματογράφημα διακρίνεται η περιοχή των νουκλεοτιδίων μέσα στην οποία υπάρχει η αλληλουχία GCG που κωδικοποιεί το αμινοξύ της μετάλλαξης αλανίνη. Τα νουκλεοτίδια αυτά αντικατέστησαν τα TAC του* $hCRF_1$.



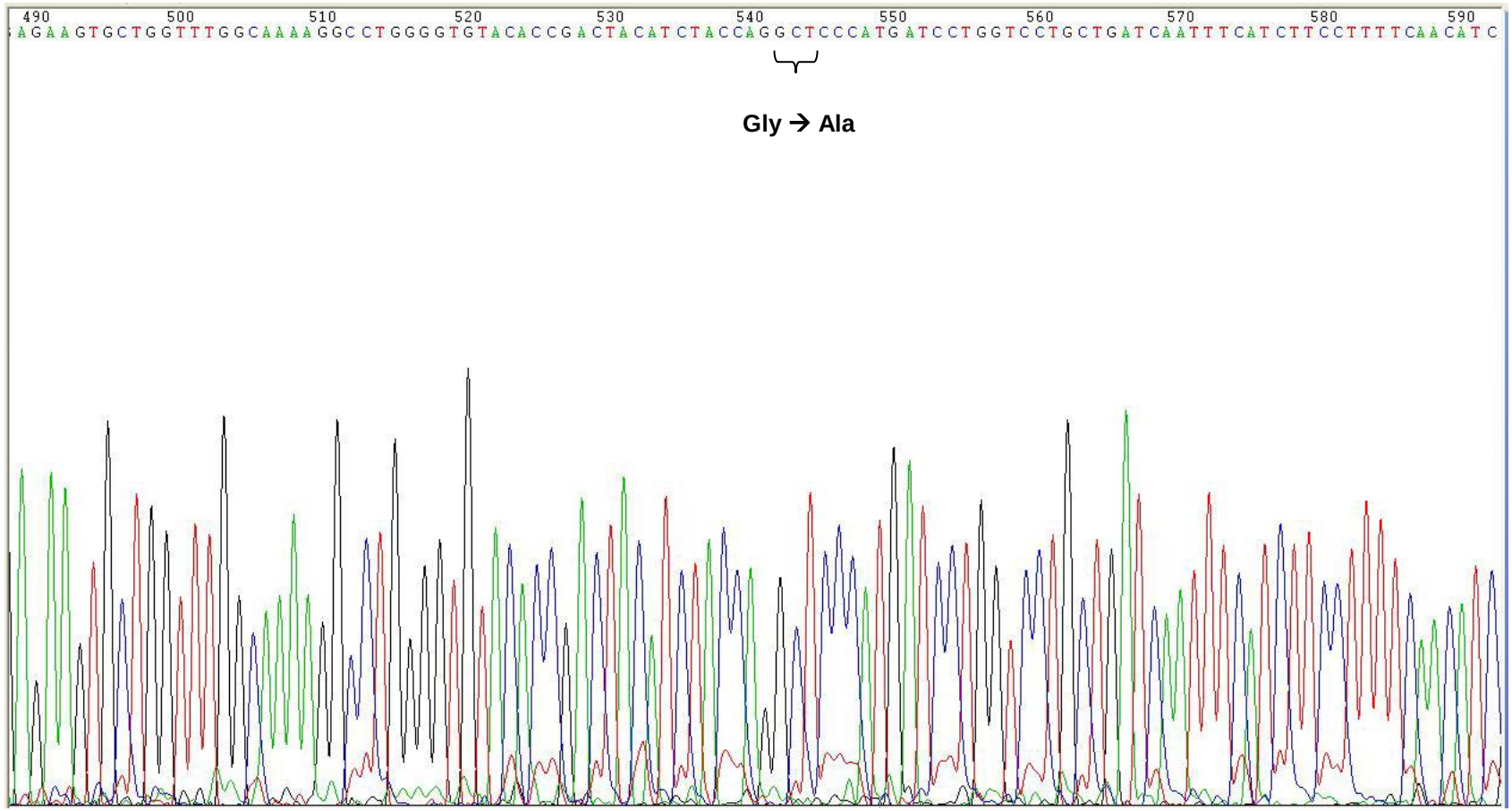
Εικόνα Β.Χ5. Μετάλλαξη της Ile271 σε Ala. *Στο χρωματογράφημα διακρίνεται η περιοχή των νουκλεοτιδίων μέσα στην οποία υπάρχει η αλληλουχία GCG που κωδικοποιεί το αμινοξύ της μετάλλαξης αλανίνη. Τα νουκλεοτίδια αυτά αντικατέστησαν τα ATC του* $hCRF_1$.



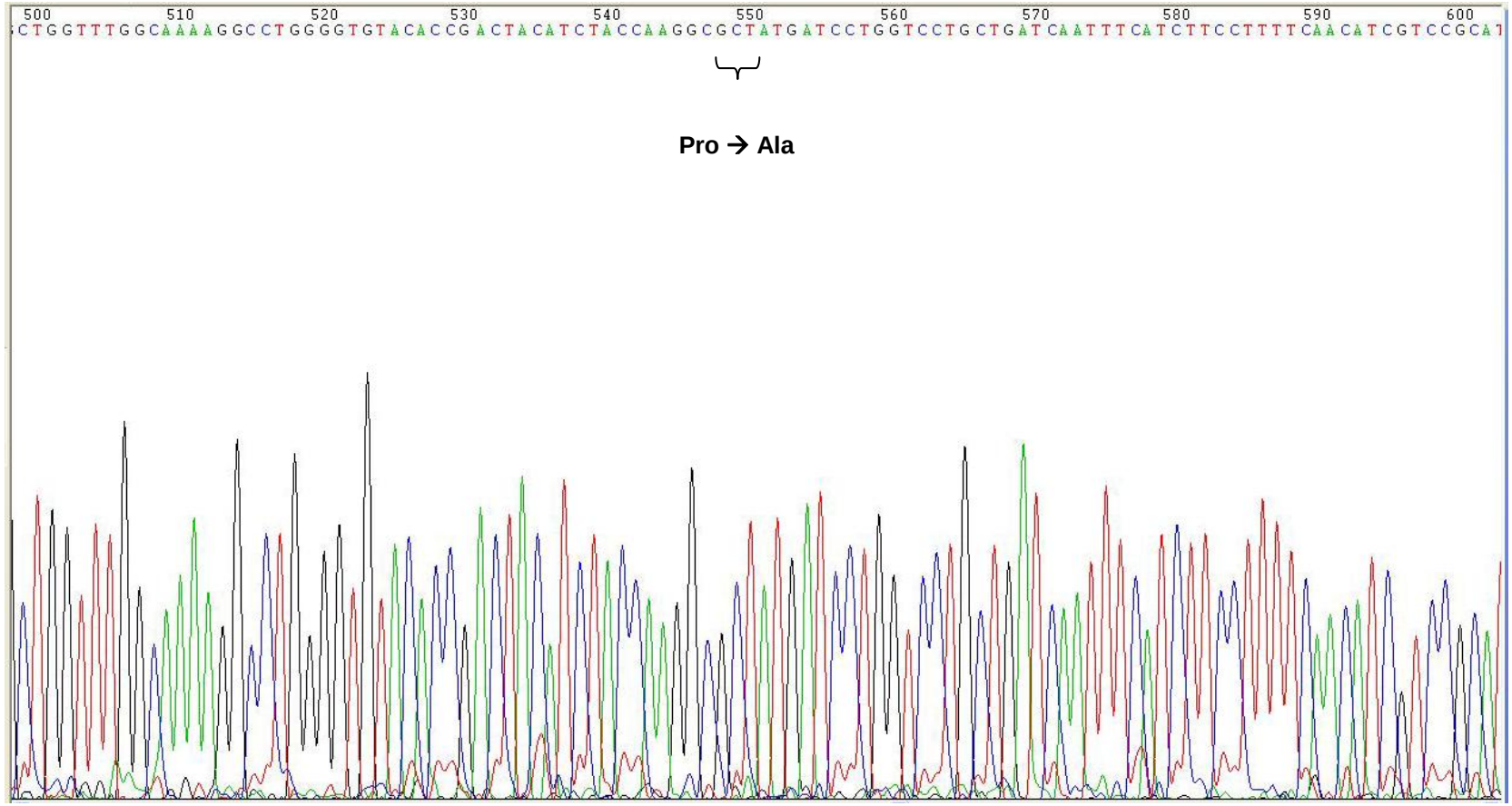
Εικόνα Β.Χ6. Μετάλλαξη της Tyr272 σε Ala. *Στο χρωματογράφημα διακρίνεται η περιοχή των νουκλεοτιδίων μέσα στην οποία υπάρχει η αλληλουχία GCG που κωδικοποιεί το αμινοξύ της μετάλλαξης αλανίνη. Τα νουκλεοτίδια αυτά αντικατέστησαν τα TAC του* $hCRF_1$.



Εικόνα Β.Χ7. Μετάλλαξη της Gln273 σε Ala. *Στο χρωματογράφημα διακρίνεται η περιοχή των νουκλεοτιδίων μέσα στην οποία υπάρχει η αλληλουχία GCG που κωδικοποιεί το αμινοξύ της μετάλλαξης αλανίνη. Τα νουκλεοτίδια αυτά αντικατέστησαν τα CAG του* $hCRF_1$.



Εικόνα Β.Χ8. Μετάλλαξη της Gly274 σε Ala. *Στο χρωματογράφημα διακρίνεται η περιοχή των νουκλεοτιδίων μέσα στην οποία υπάρχει η αλληλουχία GCT που κωδικοποιεί το αμινοξύ της μετάλλαξης αλανίνη. Τα νουκλεοτίδια αυτά αντικατέστησαν τα GGC του* $hCRF_1$.



Εικόνα Β.Χ9. Μετάλλαξη της Pro275 σε Ala. *Στο χρωματογράφημα διακρίνεται η περιοχή των νουκλεοτιδίων μέσα στην οποία υπάρχει η αλληλουχία GCT που κωδικοποιεί το αμινοξύ της μετάλλαξης αλανίνη. Τα νουκλεοτίδια αυτά αντικατέστησαν τα CCC του* $hCRF_1$.

Επίδραση των μεταλλάξεων Y267A, I271A και G274A στη δέσμευση της σοβαγίνης

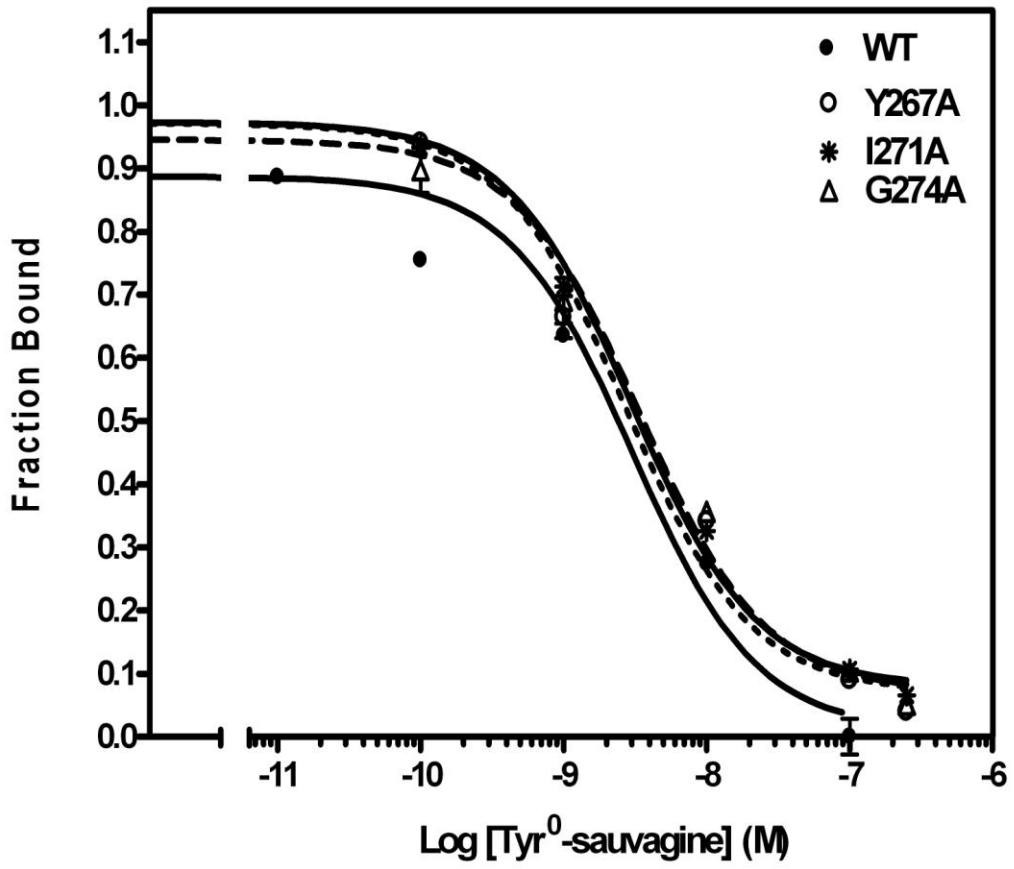
Όπως φαίνεται στις εικόνες 25 και 28 η μετάλλαξη των Tyr267, Ile271, και Gly274 σε αλανίνη, δεν επηρέασε σημαντικά τη συγγένεια δέσμευσης της σοβαγίνης στον CRF_1. Συγκεκριμένα η σοβαγίνη δεσμευόταν στον άγριο τύπο CRF_1 (WT) και στις μεταλλαγμένες μορφές του, Y267A, I271A και G274A με συγγένειες δέσμευσης ($-\log K_D$) 8,90 ± 0,07, 8,52 ± 0,01, 8,48 ± 0,003 και 8,55 ± 0,13 αντίστοιχα.

Επίδραση των μεταλλάξεων T268A, Y270A, Y272A, Q273 και P275A στη δέσμευση της σοβαγίνης

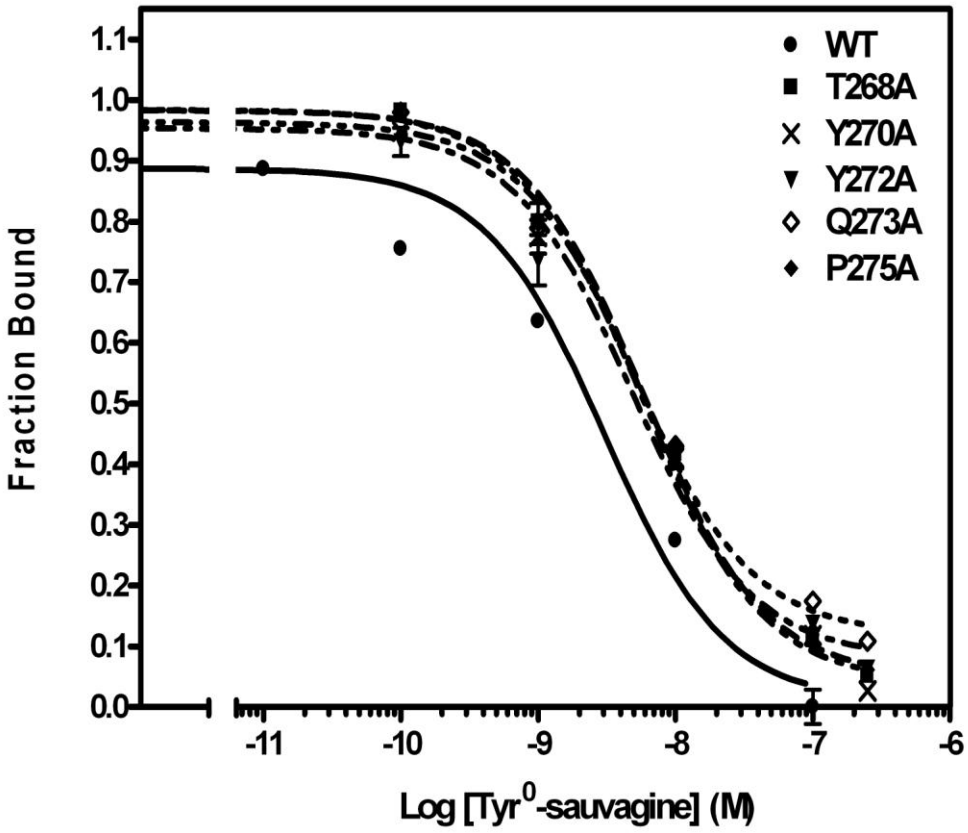
Αντίθετα με τις μεταλλάξεις, Y267A, I271A και G274A, οι αντικαταστάσεις των Thr268, Tyr270, Tyr272, Gln273, και Pro275 από αλανίνη μείωσαν τη συγγένεια δέσμευσης της σοβαγίνης στον CRF_1. Συγκεκριμένα η σοβαγίνη δεσμευόταν στον άγριο τύπο CRF_1 (WT) και στις μεταλλαγμένες μορφές του, T268A, Y270A, Y272A, Q273A και P275A με συγγένειες δέσμευσης ($-\log K_D$) 8,90 ± 0,07, 8,30 ± 0,09, 8,25 ± 0,05, 8,29 ± 0,03, 8,42 ± 0,17 και 8,40 ± 0,24 αντίστοιχα (εικόνες 26 και 28).

Επίδραση της μετάλλαξης D269A στη δέσμευση της σοβαγίνης

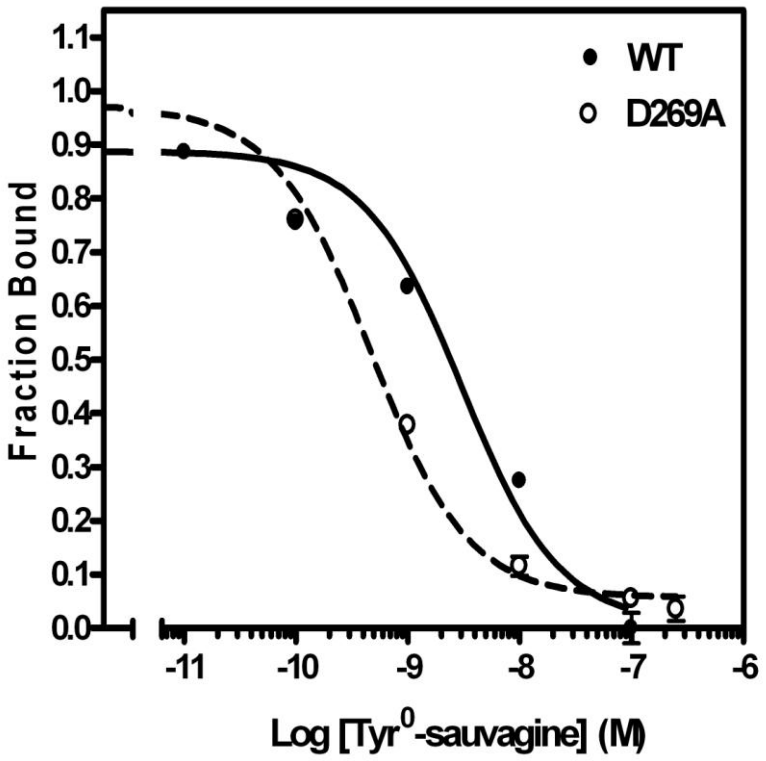
Ενώ οι προηγούμενες μεταλλάξεις των αμινοξέων της TM5 είτε δεν επηρέασαν ή μείωσαν τη συγγένεια δέσμευσης της σοβαγίνης, η μετάλλαξη του Asp269 σε αλανίνη αύξησε σημαντικά τη συγγένεια δέσμευσης της σοβαγίνης στον CRF_1 (εικόνες 27 και 28). Συγκεκριμένα η σοβαγίνη δεσμευόταν στον άγριο τύπο CRF_1 (WT) και στη μεταλλαγμένη μορφή του, D269A με συγγένειες δέσμευσης ($-\log K_D$) 8,90 ± 0,07 και 9,27 ± 0,06 αντίστοιχα.



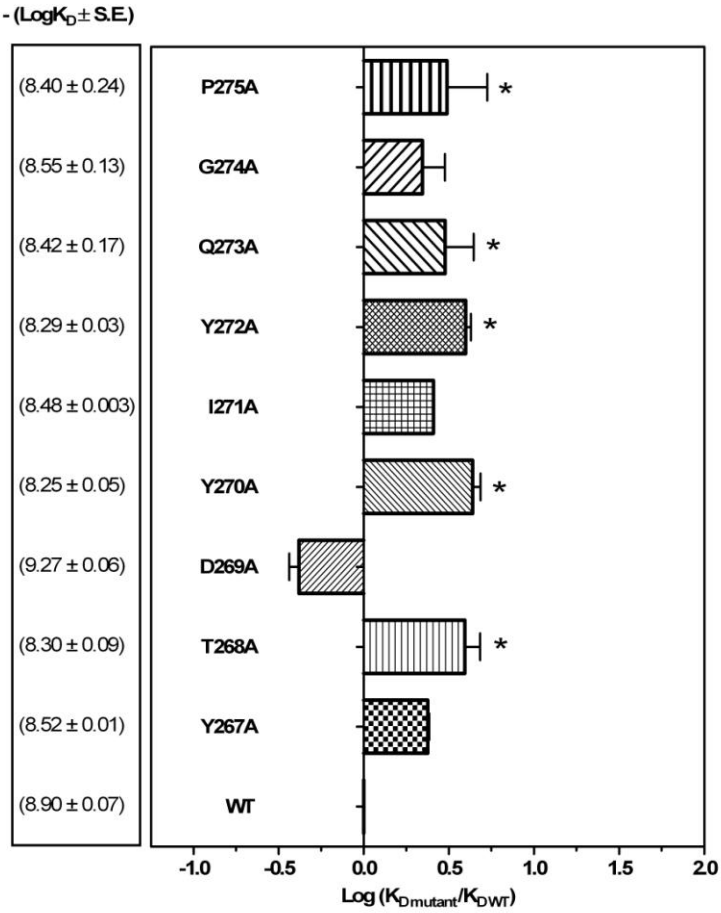
Εικόνα 25. Συναγωνιστική δέσμευση της Tyr^0 – σοβαγίνης στον άγριο τύπο CRF_1 και στους μεταλλαγμένους υποδοχείς, Y267A, I271A και G274A. *Ο συναγωνισμός της δέσμευσης της [^{125}I] – Tyr^0 – σοβαγίνης από τη σοβαγίνη, επιτεύχθηκε όπως αναφέρεται στο κεφάλαιο ΄΄Υλικά και Μέθοδοι΄΄, σε μεμβρανικά ομογενοποιήματα κυττάρων HEK 293 που εκφράζανε σταθερά τον άγριο τύπο CRF_1 (WT), ή τους μεταλλαγμένους υποδοχείς, Y267A, I271A και G274A. Οι μέσοι όροι των τιμών (εις διπλούν) και τα σταθερά λάθη τους προέρχονται από ένα χαρακτηριστικό πείραμα που έγινε 2-5 φορές με παρόμοια αποτελέσματα. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων του κάθε πειράματος έγινε μη γραμμικά και οι τιμές -logK_D υπολογίστηκαν σύμφωνα με τη μέθοδο των Motulsky και Christopoulos [202] και αναγράφονται στο κυρίως κείμενο και στην εικόνα 28.*



Εικόνα 26. Συναγωνιστική δέσμευση της Tyr^0 – σοβαγίνης στον άγριο τύπο CRF$_1$ και στους μεταλλαγμένους υποδοχείς, T268A, Y270A, Y272A, Q273A και P275A. *Ο συναγωνισμός της δέσμευσης της [^{125}I] – Tyr^0 – σοβαγίνης από τη σοβαγίνη, επιτεύχθηκε όπως αναφέρεται στο κεφάλαιο ΄΄Υλικά και Μέθοδοι΄΄, σε μεμβρανικά ομογενοποιήματα κυττάρων HEK 293 που εκφράζανε σταθερά τον άγριο τύπο CRF$_1$ (WT), ή τους μεταλλαγμένους υποδοχείς, T268A, Y270A, Y272A, Q273A και P275A. Οι μέσοι όροι των τιμών (εις διπλούν) και τα σταθερά λάθη τους προέρχονται από ένα χαρακτηριστικό πείραμα που έγινε 2-5 φορές με παρόμοια αποτελέσματα. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων του κάθε πειράματος έγινε μη γραμμικά και οι τιμές -logK$_D$ υπολογίστηκαν σύμφωνα με τη μέθοδο των Motulsky και Christopoulos [202] και αναγράφονται στο κυρίως κείμενο και στην εικόνα 28.*



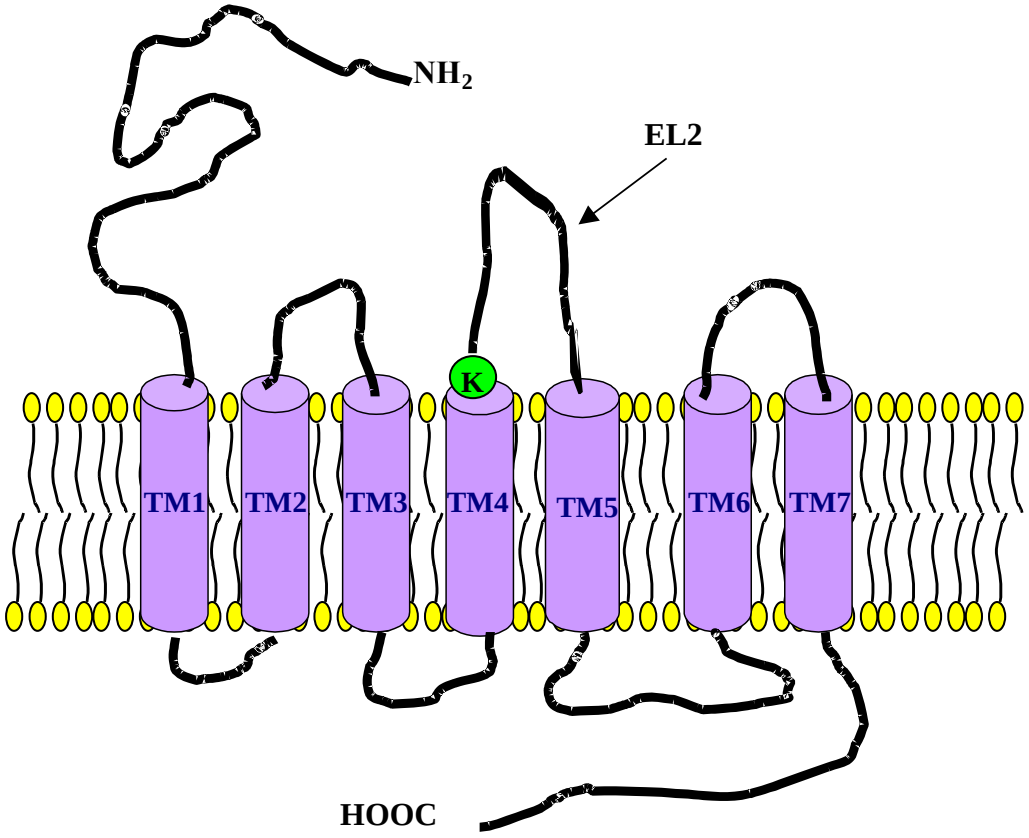
Εικόνα 27. Συναγωνιστική δέσμευση της Tyr^0 – σοβαγίνης στον άγριο τύπο CRF_1 και στο μεταλλαγμένο υποδοχέα, D269A. *Ο συναγωνισμός της δέσμευσης της [^{125}I] – Tyr^0 – σοβαγίνης από τη σοβαγίνη, επιτεύχθηκε όπως αναφέρεται στο κεφάλαιο ΄΄Υλικά και Μέθοδοι΄΄, σε μεμβρανικά ομογενοποιήματα κυττάρων HEK 293 που εκφράζανε σταθερά τον άγριο τύπο CRF_1 (WT), ή το μεταλλαγμένο υποδοχέα, D269A. Οι μέσοι όροι των τιμών (εις διπλούν) και τα σταθερά λάθη τους προέρχονται από ένα χαρακτηριστικό πείραμα που έγινε 2-5 φορές με παρόμοια αποτελέσματα. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων του κάθε πειράματος έγινε μη γραμμικά και οι τιμές -logK_D υπολογίστηκαν σύμφωνα με τη μέθοδο των Motulsky και Christopoulos [202] και αναγράφονται στο κυρίως κείμενο και στην εικόνα 28.*



Εικόνα 28. Επίδραση των μεταλλάξεων σε αλανίνη των αμινοξέων της πέμπτης διαμεμβρανικής περιοχής του CRF_1 στη συγγένεια δέσμευσης της Tyr^0 – σοβαγίνης. *Οι τιμές -logK_D (συγγένειες δέσμευσης Tyr^0 – σοβαγίνης) για τον άγριο τύπο CRF_1 (WT) και τους μεταλλαγμένους υποδοχείς Y267A, T268A, D269A, Y270A, I271A, Y272A, Q273A, G274A και P275A, υπολογίστηκαν από τα αποτελέσματα των πειραμάτων στις εικόνες 25, 26 και 27. Οι στήλες αντιπροσωπεύουν την αλλαγή στη συγγένεια δέσμευσης της Tyr^0 – σοβαγίνης για τον CRF_1, που είναι αποτέλεσμα της κάθε μετάλλαξης. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των τιμών logK_D της Tyr^0 – σοβαγίνης για τον WT και τον κάθε μεταλλαγμένο υποδοχέα, υπολογίστηκαν με τη χρήση της ανάλυσης διασποράς (ANOVA) και στη συνέχεια με Bonferoni's post hoc test (* $p<0.05$ στατιστικώς σημαντική διαφορά).*

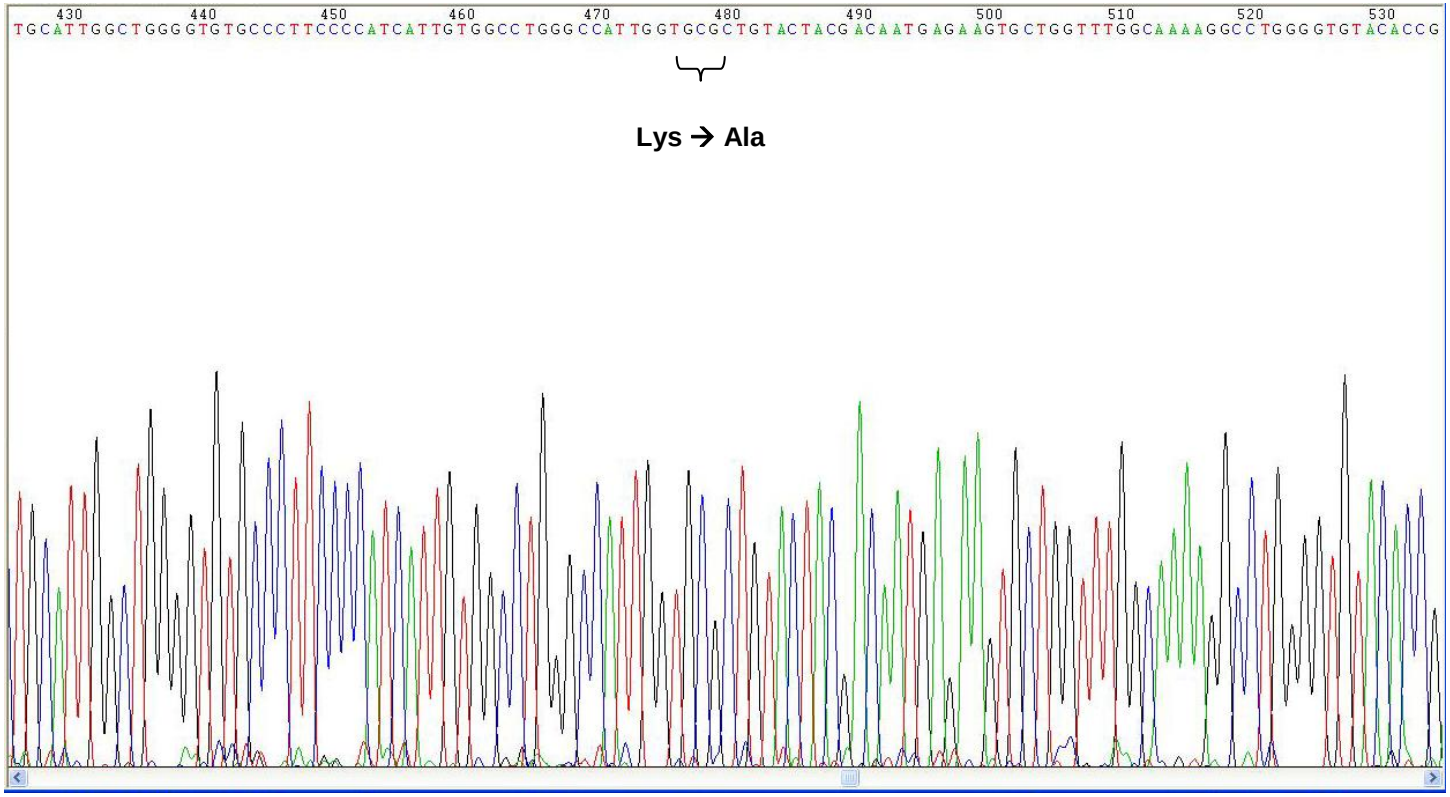
Γ) ΤΕΤΑΡΤΗ ΔΙΑΜΕΜΒΡΑΝΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ ΤΟΥ CRF_1

Το επόμενο βήμα μας ήταν να εξετάσουμε τη λειτουργική σημασία του αμινοξέος Lys250 που βρίσκεται στην τέταρτη διαμεμβρανική περιοχή του CRF_1 (εικόνα 29) και συγκεκριμένα στα σύνορα της περιοχής αυτής με το δεύτερο εξωκυττάριο βρόγχο του υποδοχέα.



Εικόνα 29. Σχηματική αναπαράσταση της τέταρτης διαμεμβρανικής περιοχής του CRF_1. *Η Lys250 στα όρια της τέταρτης διαμεμβρανικής περιοχής (TM4) και του δεύτερου εξωκυττάριου βρόγχου του CRF_1, της οποίας ο ρόλος στη δέσμευση των πεπτιδίων της οικογένειας του CRF εξετάστηκε στην παρούσα εργασία, είναι χρωματισμένη πράσινη.*

Μετάλλαξη K250A του CRF_1



Εικόνα Γ.Χ1. Μετάλλαξη της Lys250 σε Ala. *Στο χρωματογράφημα διακρίνεται η περιοχή των νουκλεοτιδίων μέσα στην οποία υπάρχει η αλληλουχία GCG που κωδικοποιεί το αμινοξύ της μετάλλαξης αλανίνη. Τα νουκλεοτίδια αυτά αντικατέστησαν τα AAG του* $hCRF_1$.

Μελέτη του ρόλου της Lys250 στις φαρμακολογικές ιδιότητες του CRF_1

Επιπρόσθετα των αμινοξέων 267-275 της πέμπτης διαμεβρανικής περοχής του CRF_1, εξετάσαμε το ρόλο της λυσίνης 250 (Lys250) που βρίσκεται στα όρια του δεύτερου εξωκυττάριου βρόγχου και της τέταρτης διαμεμβρανικής περιοχής του CRF_1 (εικόνα 29) στις φαρμακολογικές ιδιότητες του υποδοχέα.

Για το σκοπό αυτό αντικαταστήσαμε την Lys250 σε αλανίνη, αργινίνη και γλουταμικό οξυ (δημιουργώντας έτσι τους μεταλλαγμένους υποδοχείς K250A, K250R και K250E, αντίστοιχα) και εξετάσαμε την επίδραση των μεταλλάξεων αυτών στις φαρμακολογικές ιδιότητες του υποδοχέα. Εκτελέσαμε τα πειράματα αυτά αρχίζοντας από την μετάλλαξη της Lys250 σε αλανίνη.

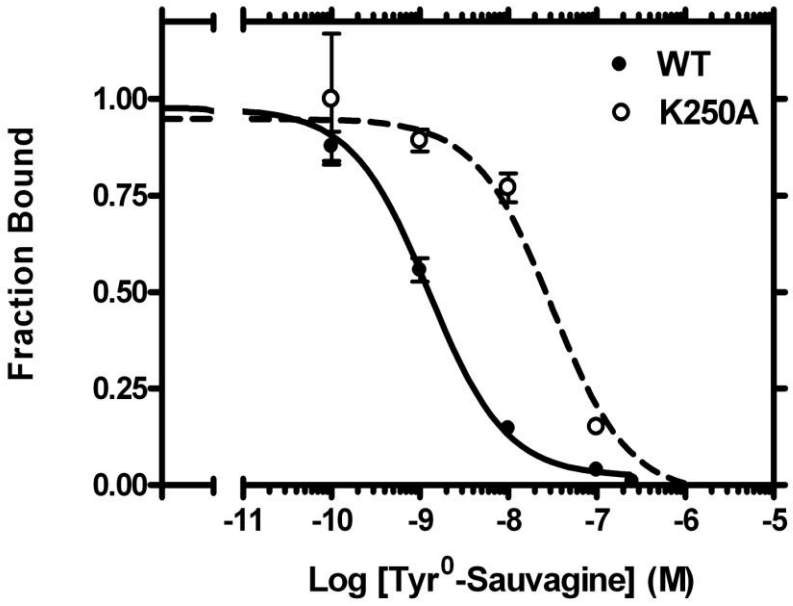
Α. Επίδραση της K250A μετάλλαξης στις φαρμακολογικές ιδιότητες του CRF_1

Η εξέταση της επίδρασης της K250A μετάλλαξης στις φαρμακολογικές ιδιότητες του CRF_1, επιτεύχθηκε με τον προσδιορισμό της συγγένειας δέσμευσης της σοβαγίνης, του CRF και άλλων αναλόγων τους, στον άγριο τύπο CRF_1 (WT) και στον μεταλλαγμένο υποδοχέα K250A, καθώς και της ικανότητας των πεπτιδίων αυτών να διεγείρουν τη παραγωγή ενδοκυττάριου κυκλικού AMP σε HEK 293 κύτταρα που εκφράζουν μόνιμα τους WT, ή K250A.

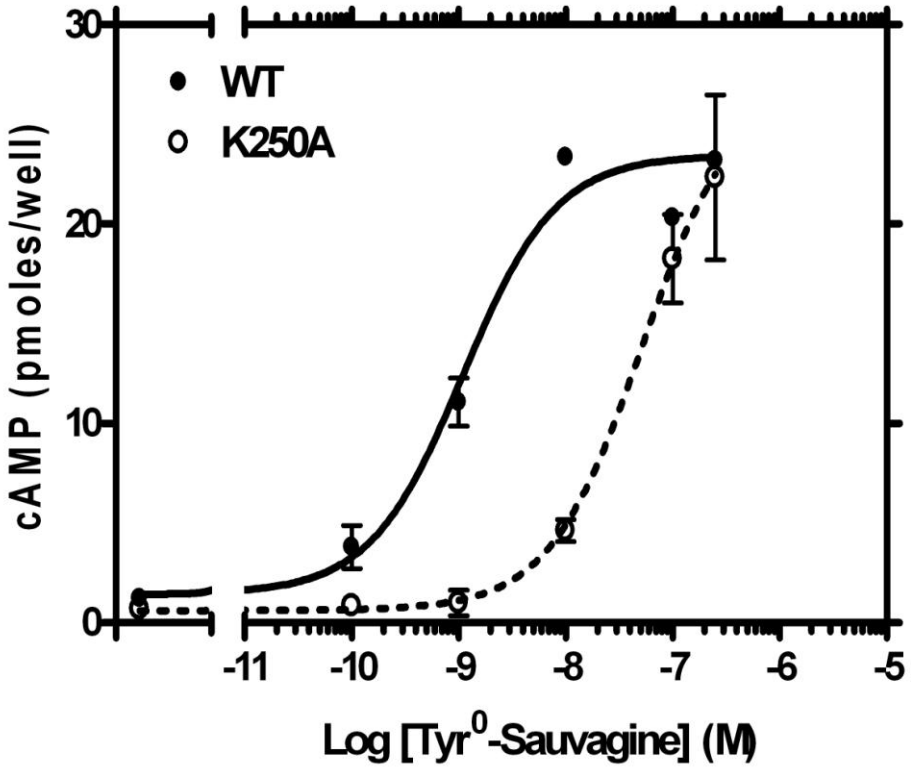
Επίδραση της μετάλλαξης K250A στη δέσμευση της σοβαγίνης

Όπως φαίνεται στις εικόνες 30 και 38, η μετάλλαξη της Lys250 σε αλανίνη μείωσε σημαντικά τη συγγένεια δέσμευσης της σοβαγίνης στον CRF_1. Συγκεκριμένα η σοβαγίνη δεσμευόταν στον άγριο τύπο CRF_1 (WT) και στη

μεταλλαγμένη μορφή του, K250A με συγγένειες δέσμευσης (-logK_D) 8,90 ± 0,07 και 7,80 ± 0,16 αντίστοιχα. Δηλαδή η μετάλλαξη αυτή μείωσε τη συγγένεια δέσμευσης της σοβαγίνης 13 φορές.



Εικόνα 30. Συναγωνιστική δέσμευση της Tyr^0 - σοβαγίνης στον άγριο τύπο CRF$_1$ και στο μεταλλαγμένο υποδοχέα, K250A. *Ο συναγωνισμός της δέσμευσης της [^{125}I] – Tyr^0 – σοβαγίνης από την Tyr^0 – σοβαγίνη, επιτεύχθηκε όπως αναφέρεται στο κεφάλαιο ΄΄Υλικά και Μέθοδοι΄΄, σε μεμβρανικά ομογενοποιήματα κυττάρων HEK 293 που εκφράζανε σταθερά τον άγριο τύπο CRF$_1$ (WT), ή το μεταλλαγμένο υποδοχέα, K250A. Οι μέσοι όροι των τιμών (εις διπλούν) και τα σταθερά λάθη τους προέρχονται από ένα χαρακτηριστικό πείραμα που έγινε 3-5 φορές με παρόμοια αποτελέσματα. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων του κάθε πειράματος έγινε μη γραμμικά και οι τιμές -logK_D υπολογίστηκαν σύμφωνα με τη μέθοδο των Motulsky και Christopoulos [202] και αναγράφονται στο κυρίως κείμενο και στην εικόνα 38.*



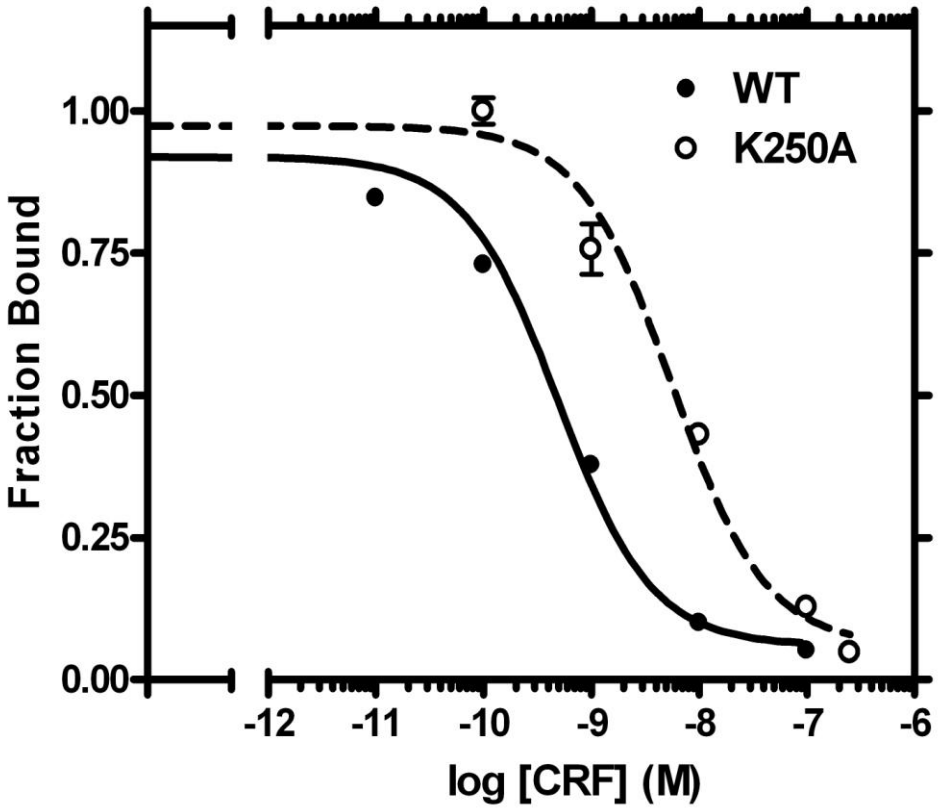
Εικόνα 31. Διέγερση παραγωγής ενδοκυττάριου κυκλικού AMP από την Tyr^0-σοβαγίνη. *Η διέγερση παραγωγής ενδοκυττάριου κυκλικού AMP από αυξανόμενες συγκεντρώσεις Tyr^0-σοβαγίνης, επιτεύχθηκε όπως αναφέρεται στο κεφάλαιο ΄΄Υλικά και Μέθοδοι΄΄, σε άθικτα HEK 293 κύτταρα που εκφράζανε σταθερά τον άγριο τύπο (WT) CRF$_1$ ή το μεταλλαγμένο υποδοχέα, K250A. Οι μέσοι όροι των τιμών (εις διπλούν) και τα σταθερά λάθη τους προέρχονται από ένα χαρακτηριστικό πείραμα που έγινε 3-22 φορές με παρόμοια αποτελέσματα. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων του κάθε πειράματος έγινε μη γραμμικά και οι τιμές logEC$_{50}$ και EC$_{50}$ προσδιορίστηκαν όπως αναφέρεται στη μεθοδολογία και αναγράφονται στο κυρίως κείμενο και στην εικόνα 41.*

Επίδραση της μετάλλαξης K250A στην ικανότητα της σοβαγίνης να διεγείρει την παραγωγή ενδοκυττάριου κυκλικού AMP

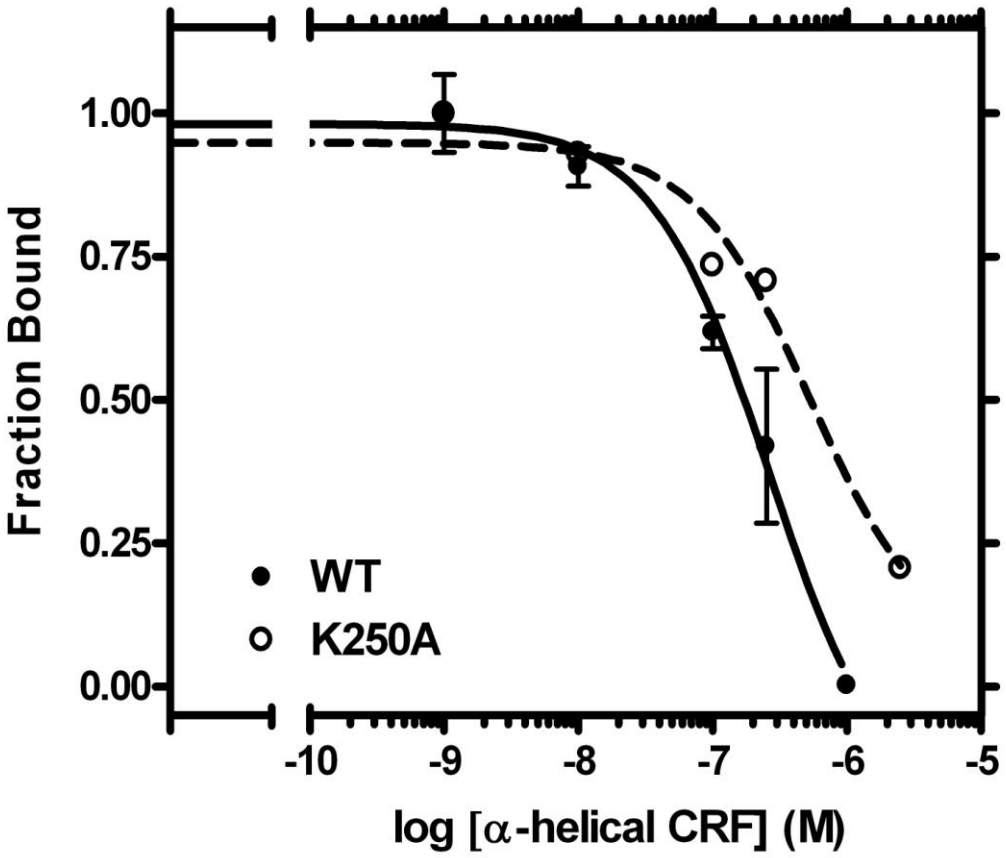
Παρόμοια με τη συγγένεια δέσμευσης της σοβαγίνης για τον CRF_1, η μετάλλαξη της Lys250 του CRF_1 σε αλανίνη ελάττωσε σημαντικά την ισχύ με την οποία η σοβαγίνη διέγειρε την παραγωγή ενδοκυττάριου κυκλικού AMP σε HEK 293 κύτταρα τα οποία εκφράζανε τον υποδοχέα αυτόν. Συγκεκριμένα η ισχύς με την οποία η σοβαγίνη διέγειρε την παραγωγή ενδοκυττάριου κυκλικού AMP σε HEK 293 κύτταρα, τα οποία εκφράζανε σταθερά τον άγριο τύπο (WT) CRF_1 και το μεταλλαγμένο υποδοχέα K250A ήταν ($-\log EC_{50}$) 9,07 ± 0,08 και 7,44 ± 0,24, αντίστοιχα (εικόνες 31, 41 και 42). Δηλαδή η μετάλλαξη αυτή μείωσε (σημαντικά) την ισχύ της σοβαγίνης 43 φορές.

Επίδραση της μετάλλαξης K250A στη δέσμευση του CRF

Παρόμοια με τη σοβαγίνη, η μετάλλαξη της Lys250 σε αλανίνη (δημιουργώντας έτσι το μεταλλαγμένο υποδοχέα K250A), επηρέασε σημαντικά τη συγγένεια δέσμευσης του CRF στον CRF_1 (εικόνες 32 και 36). Συγκεκριμένα ο CRF δεσμευόταν στον άγριο τύπο CRF_1 (WT) και στη μεταλλαγμένη μορφή του, K250A, με συγγένειες δέσμευσης ($-\log K_I$) 9,14 ± 0,07 και 7,94 ± 0,20 αντίστοιχα.



Εικόνα 32. Συναγωνιστική δέσμευση του CRF στον άγριο τύπο CRF_1 και στο μεταλλαγμένο υποδοχέα, K250A. *Ο συναγωνισμός της δέσμευσης της [^{125}I] – Tyr^0 – σοβαγίνης από τον CRF, επιτεύχθηκε όπως αναφέρεται στο κεφάλαιο ΄΄Υλικά και Μέθοδοι΄΄, σε μεμβρανικά ομογενοποιήματα κυττάρων HEK 293 που εκφράζανε σταθερά τον άγριο τύπο CRF_1 (WT), ή το μεταλλαγμένο υποδοχέα, K250A. Οι μέσοι όροι των τιμών (εις διπλούν) και τα σταθερά λάθη τους προέρχονται από ένα χαρακτηριστικό πείραμα που έγινε 2-5 φορές με παρόμοια αποτελέσματα. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων του κάθε πειράματος έγινε μη γραμμικά και οι τιμές $-\log K_i$ υπολογίστηκαν από τις αντίστοιχες τιμές $-\log IC_{50}$, σύμφωνα με τη μέθοδο Cheng και Prusoff [201] και αναγράφονται στο κυρίως κείμενο και στην* εικόνα 36



Εικόνα 33. Συναγωνιστική δέσμευση του άλφα-ελικοειδή CRF (9-41) στον άγριο τύπο CRF_1 και στο μεταλλαγμένο υποδοχέα, K250A. *Ο συναγωνισμός της δέσμευσης της [^{125}I] – Tyr^0 – σοβαγίνης από τον άλφα-ελικοειδή CRF (9-41), επιτεύχθηκε όπως αναφέρεται στο κεφάλαιο ΄΄Υλικά και Μέθοδοι΄΄, σε μεμβρανικά ομογενοποιήματα κυττάρων HEK 293 που εκφράζανε σταθερά τον άγριο τύπο CRF_1 (WT), ή το μεταλλαγμένο υποδοχέα, K250A. Οι μέσοι όροι των τιμών (εις διπλούν) και τα σταθερά λάθη τους προέρχονται από ένα χαρακτηριστικό πείραμα που έγινε 3-8 φορές με παρόμοια αποτελέσματα. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων του κάθε πειράματος έγινε μη γραμμικά και οι τιμές -logK_i υπολογίστηκαν από τις αντίστοιχες τιμές -logIC_{50}, σύμφωνα με τη μέθοδο Cheng και Prusoff [201] και αναγράφονται στο κυρίως κείμενο και στην εικόνα 36*

Επίδραση της μετάλλαξης K250A στη δέσμευση του άλφα-ελικοειδή CRF (9-41)

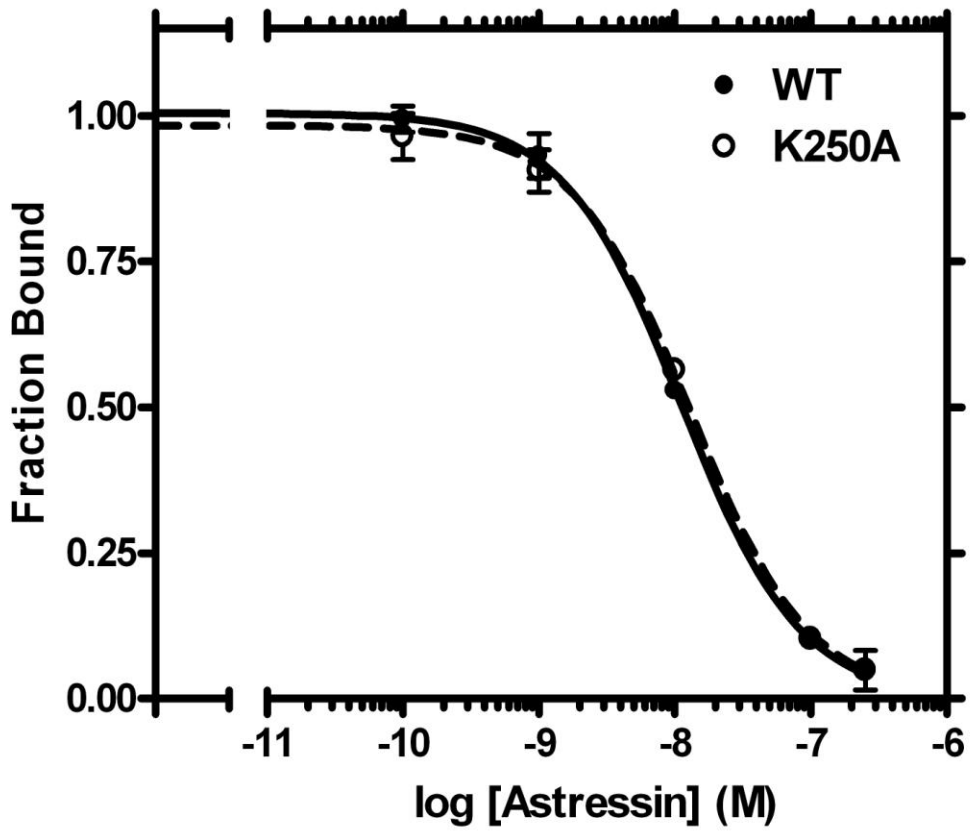
Στη συνέχεια εξετάστηκε η επίδραση της μετάλλαξης της Lys250 σε αλανίνη στη συγγένεια δέσμευσης του άλφα-ελικοειδή CRF (9-41) για τον CRF_1. Όπως φαίνεται στις εικόνες 33 και 36 η μετάλλαξη της Lys250 σε αλανίνη μείωσε τη συγγένεια δέσμευσης του άλφα-ελικοειδή CRF (9-41) αν και σε μικρότερο βαθμό από εκείνον με τον οποίο μείωσε τη συγγένεια δέσμευσης του CRF για τον CRF_1. Συγκεκριμένα ο άλφα-ελικοειδής CRF (9-41) δεσμευόταν στον άγριο τύπο CRF_1 (WT) και στη μεταλλαγμένη μορφή του, K250A με συγγένειες δέσμευσης ($-\log K_I$) 6,80 ± 0,08 και 6,37 ± 0,21 αντίστοιχα.

Επίδραση της μετάλλαξης K250A στη δέσμευση της αστρεσίνης

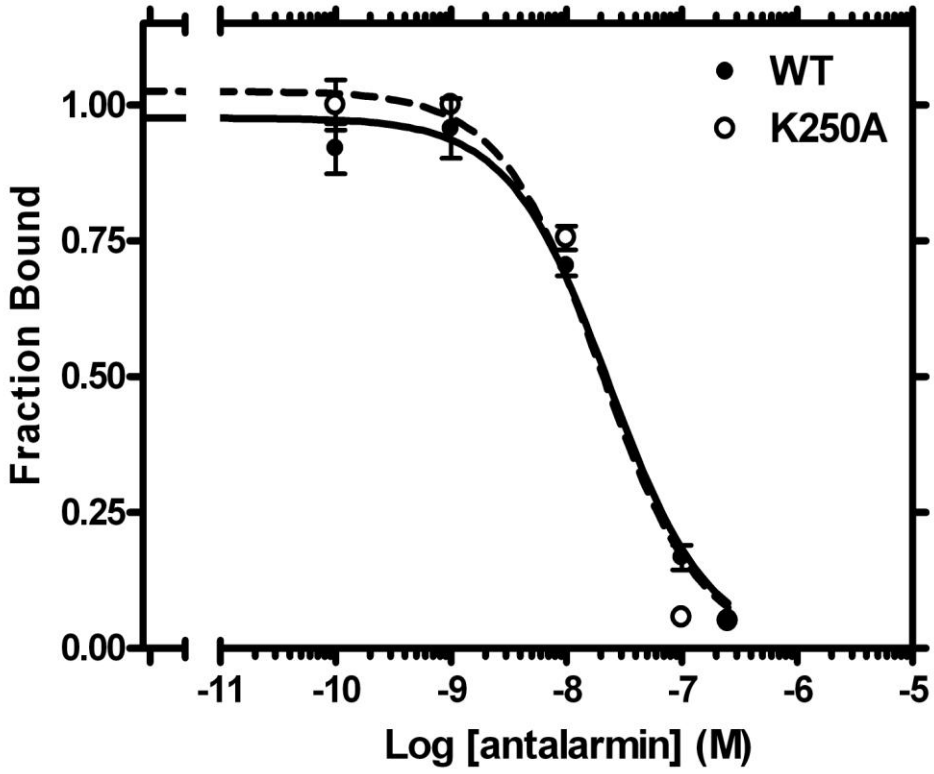
Σε αντίθεση με τη σοβαγίνη, τον CRF και τον άλφα-ελικοειδή CRF η μετάλλαξη της Lys250 σε αλανίνη δεν επηρέασε καθόλου τη συγγένεια δέσμευσης του πεπτιδικού ανταγωνιστή αστρεσίνης για τον CRF_1 (εικόνες 34 και 36). Συγκεκριμένα η αστρεσίνη δεσμευόταν στον άγριο τύπο CRF_1 (WT) και στη μεταλλαγμένη μορφή του, K250A με συγγένειες δέσμευσης ($-\log K_I$) 8,00 ± 0,08 και 8,11 ± 0,17 αντίστοιχα.

Επίδραση της μετάλλαξης K250A στη δέσμευση της ανταλαρμίνης

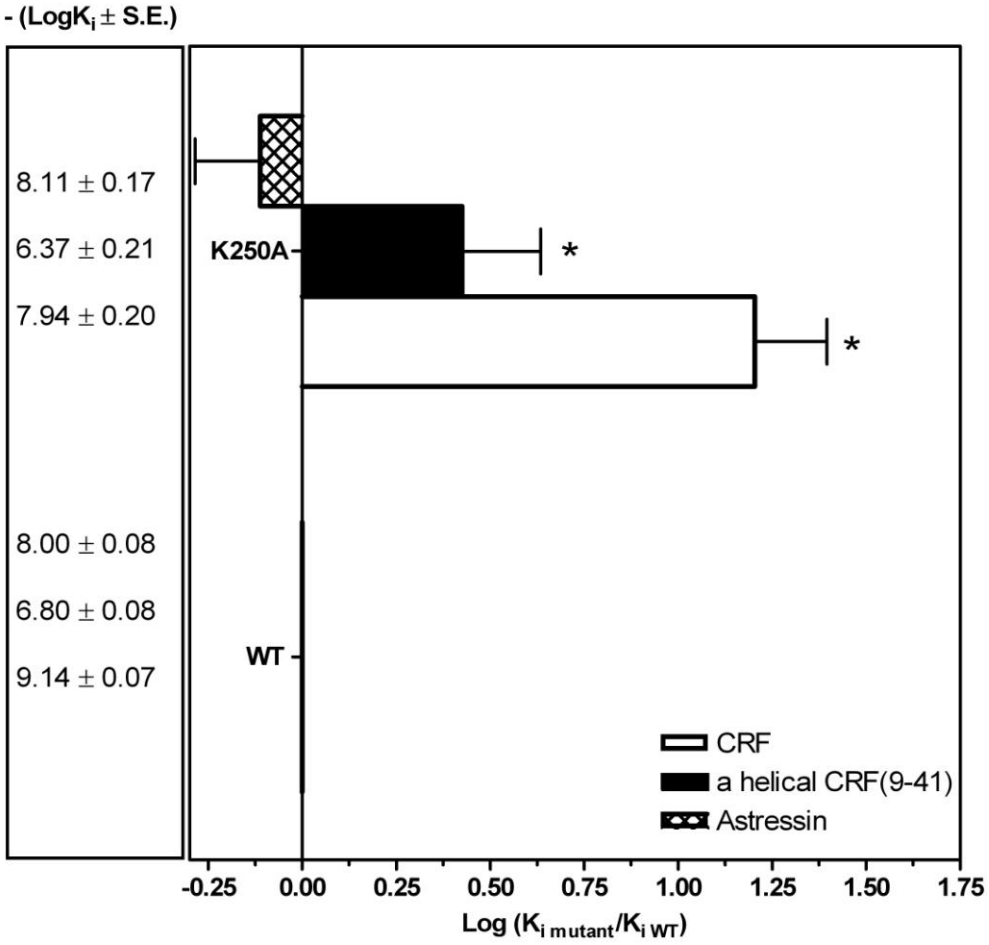
Παρόμοια με την αστρεσίνη, η μετάλλαξη της Lys250 σε αλανίνη δεν επηρέασε καθόλου τη συγγένεια δέσμευσης του μη πεπτιδικού μικρομοριακού ανταγωνιστή ανταλαρμίνη για τον CRF_1 (εικόνα 35). Συγκεκριμένα η ανταλαρμίνη δεσμευόταν στον άγριο τύπο CRF_1 (WT) και στη μεταλλαγμένη μορφή του, K250A με συγγένειες δέσμευσης ($-\log K_I$) 7,81 ± 0,06 και 7,71 ± 0,01 αντίστοιχα.



Εικόνα 34. Συναγωνιστική δέσμευση της αστρεσίνης στον άγριο τύπο CRF_1 και στο μεταλλαγμένο υποδοχέα, K250A. *Ο συναγωνισμός της δέσμευσης της [^{125}I] – Tyr^0 – σοβαγίνης από την αστρεσίνη, επιτεύχθηκε όπως αναφέρεται στο κεφάλαιο ΄΄Υλικά και Μέθοδοι΄΄, σε μεμβρανικά ομογενοποιήματα κυττάρων HEK 293 που εκφράζανε σταθερά τον άγριο τύπο CRF_1 (WT), ή το μεταλλαγμένο υποδοχέα, K250A. Οι μέσοι όροι των τιμών (εις διπλούν) και τα σταθερά λάθη τους προέρχονται από ένα χαρακτηριστικό πείραμα που έγινε 3-5 φορές με παρόμοια αποτελέσματα. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων του κάθε πειράματος έγινε μη γραμμικά και οι τιμές -logK_i υπολογίστηκαν από τις αντίστοιχες τιμές -logIC_{50}, σύμφωνα με τη μέθοδο Cheng και Prusoff [201] και αναγράφονται στο κυρίως κείμενο και στην* εικόνα 36.



Εικόνα 35. Συναγωνιστική δέσμευση της ανταλαρμίνης στον άγριο τύπο CRF_1 και στο μεταλλαγμένο υποδοχέα, K250A. *Ο συναγωνισμός της δέσμευσης της [^{125}I] – Tyr^0 – σοβαγίνης από την ανταλαρμίνη, επιτεύχθηκε όπως αναφέρεται στο κεφάλαιο ΄΄Υλικά και Μέθοδοι΄΄, σε μεμβρανικά ομογενοποιήματα κυττάρων HEK 293 που εκφράζανε σταθερά τον άγριο τύπο CRF_1 (WT), ή το μεταλλαγμένο υποδοχέα, K250A. Οι μέσοι όροι των τιμών (εις διπλούν) και τα σταθερά λάθη τους προέρχονται από ένα χαρακτηριστικό πείραμα που έγινε 2-4 φορές με παρόμοια αποτελέσματα. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων του κάθε πειράματος έγινε μη γραμμικά και οι τιμές -logK_i υπολογίστηκαν από τις αντίστοιχες τιμές -logIC_{50}, σύμφωνα με τη μέθοδο Cheng και Prusoff [201] και αναγράφονται στο κυρίως κείμενο.*

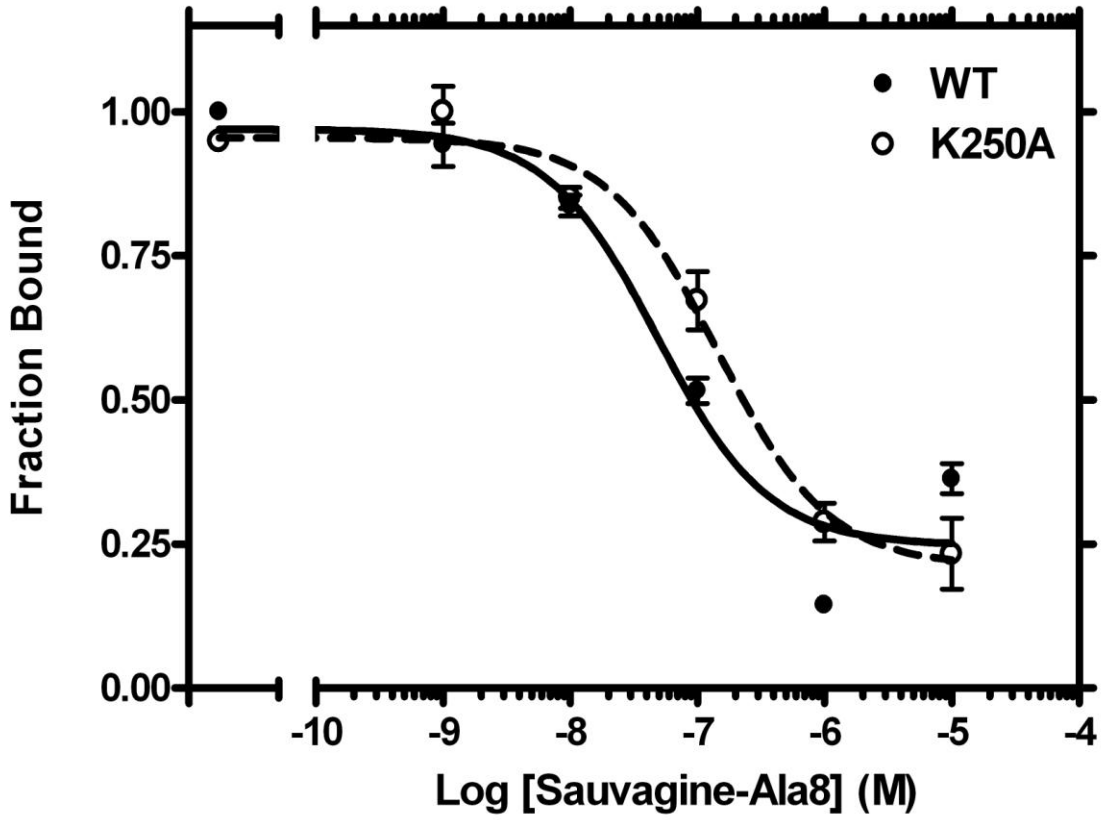


Εικόνα 36. Επίδραση της μετάλλαξης K250A του CRF_1 στις συγγένειες δέσμευσης των πεπτιδίων, CRF, άλφα-ελικοειδή CRF (9-41) και αστρεσίνης. *Οι τιμές $-logK_i$ (συγγένειες δέσμευσης πεπτιδίων) για τον άγριο τύπο CRF_1 (WT) και το μεταλλαγμένο υποδοχέα K250A, υπολογίστηκαν από τα αποτελέσματα των πειραμάτων στις εικόνες 32, 33 και 34. Οι στήλες αντιπροσωπεύουν την αλλαγή στη συγγένεια δέσμευσης των πεπτιδίων για τον CRF_1, που είναι αποτέλεσμα της K250A μετάλλαξης. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των τιμών $logK_i$ του καθε πεπτιδίου για τον WT και το μεταλλαγμένο υποδοχέα, υπολογίστηκαν με τη χρήση της ανάλυσης διασποράς (ANOVA) και στη συνέχεια με Bonferoni's post hoc test (* $p<0.05$ στατιστικώς σημαντική διαφορά).*

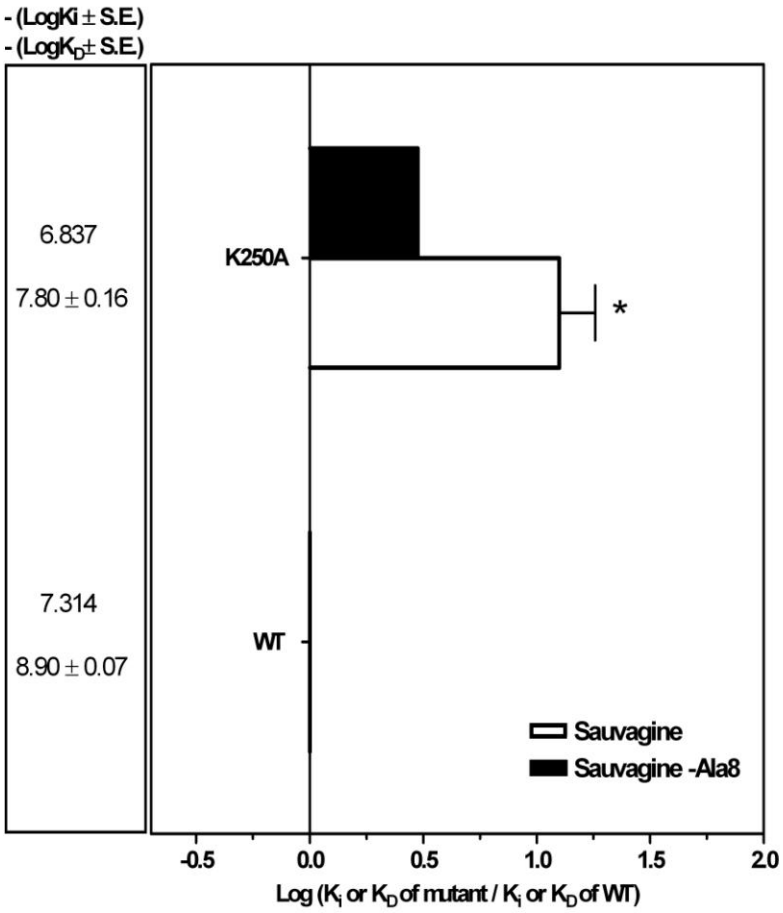
Επίδραση της μετάλλαξης K250A στη συγγένεια δέσμευσης της Ala^8-σοβαγίνης

Στη συνέχεια αντικαταστήσαμε το Asp8 της σοβαγίνης με αλανίνη, δημιουργώντας έτσι το συνθετικό ανάλογο Ala^8-σοβαγίνη και εξετάσαμε την επίδραση της μετάλλαξης της Lys250 του CRF_1 σε αλανίνη στη δέσμευση της Ala^8-σοβαγίνης στον CRF_1 καθώς και στην ικανότητα του τροποποιημένου αυτού πεπτιδίου να διεγείρει την παραγωγή κυκλικού AMP σε κύτταρα που εκφράζανε τον CRF_1.

Όπως φαίνεται στις εικόνες 37 και 38 η μετάλλαξη της Lys250 σε αλανίνη μείωσε τη συγγένεια δέσμευσης της Ala^8-σοβαγίνης για τον CRF_1. Συγκεκριμένα η Ala^8-σοβαγίνη δεσμευόταν στον άγριο τύπο CRF_1 (WT) και στη μεταλλαγμένη μορφή του, K250A, με συγγένειες δέσμευσης ($-\log K_D$) 7,314 (n=1) και 6,837 (n=1) αντίστοιχα. Όμως το μέγεθος της μείωσης της συγγένειας δέσμευσης της Ala^8-σοβαγίνης από τη μετάλλαξη K250A ήταν πολύ μικρότερο από εκείνο της αντίστοιχης ελάττωσης της συγγένειας δέσμευσης της σοβαγίνης. Δηλαδή η συγγένεια δέσμευσης της Ala^8-σοβαγίνης για τον CRF_1 μειώθηκε από τη μετάλλαξη K250A μόνο 3 φορές, ενώ εκείνη της σοβαγίνης μειώθηκε (όπως αναφέρθηκε παραπάνω) 13 φορές.



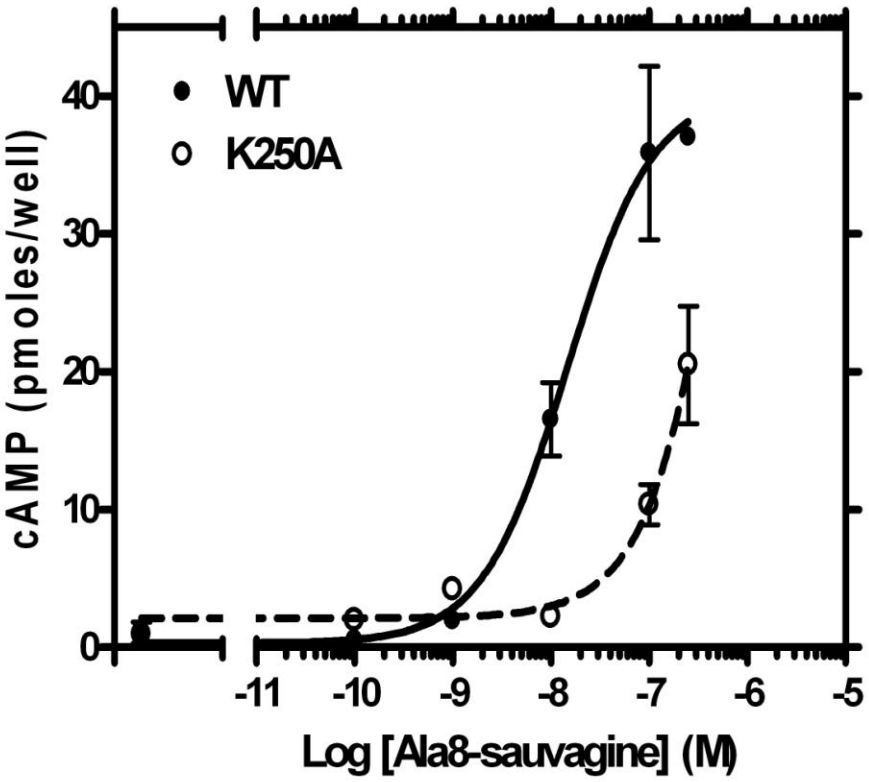
Εικόνα 37. Συναγωνιστική δέσμευση της Ala^{8}-σοβαγίνης στον άγριο τύπο CRF$_1$ και στο μεταλλαγμένο υποδοχέα, K250A. *Ο συναγωνισμός της δέσμευσης της [^{125}I] – Tyr^{0} – σοβαγίνης από την Ala^{8}-σοβαγίνη, επιτεύχθηκε όπως αναφέρεται στο κεφάλαιο ΄΄Υλικά και Μέθοδοι΄΄, σε μεμβρανικά ομογενοποιήματα κυττάρων HEK 293 που εκφράζανε σταθερά τον άγριο τύπο CRF$_1$ (WT), ή το μεταλλαγμένο υποδοχέα, K250A. Οι μέσοι όροι των τιμών (εις διπλούν) και τα σταθερά λάθη τους προέρχονται από ένα χαρακτηριστικό πείραμα που έγινε 1 φορά. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων του κάθε πειράματος έγινε μη γραμμικά και οι τιμές -logK$_i$ υπολογίστηκαν από τις αντίστοιχες τιμές -logIC$_{50}$, σύμφωνα με τη μέθοδο Cheng και Prusoff [201] και αναγράφονται στο κυρίως κείμενο και στην* εικόνα 38.



Εικόνα 38. Επίδραση της μετάλλαξης K250A του CRF_1 στις συγγένειες δέσμευσης των Tyr^0-σοβαγίνης και Ala^8-σοβαγίνης. *Οι τιμές -logK_I και logK_D (συγγένειες δέσμευσης πεπτιδίων) για τον άγριο τύπο CRF_1 (WT) και το μεταλλαγμένο υποδοχέα K250A, υπολογίστηκαν από τα αποτελέσματα των πειραμάτων στις εικόνες 30 και 37. Οι στήλες αντιπροσωπεύουν την αλλαγή στη συγγένεια δέσμευσης των πεπτιδίων για τον CRF_1, που είναι αποτέλεσμα της K250A μετάλλαξης. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των τιμών logK_I και logK_D της Ala^8-σοβαγίνης και Tyr^0-σοβαγίνης, αντίστοιχα, για τον WT και το μεταλλαγμένο υποδοχέα, υπολογίστηκαν με τη χρήση της ανάλυσης διασποράς (ANOVA) και στη συνέχεια με Bonferoni's post hoc test (* $p<0.05$ στατιστικώς σημαντική διαφορά).*

Επίδραση της μετάλλαξης K250A στην ικανότητα της Ala^8-σοβαγίνης να διεγείρει την παραγωγή ενδοκυττάριου κυκλικού AMP

Παρόμοια με τη συγγένεια δέσμευσης της Ala^8-σοβαγίνης για τον CRF_1, η μετάλλαξη της Lys250 σε αλανίνη μείωσε την ισχύ με την οποία η Ala^8-σοβαγίνη διέγειρε την παραγωγή ενδοκυττάριου κυκλικού AMP σε HEK 293 κύτταρα που εκφράζανε τον CRF_1. Συγκεκριμένα η ισχύς της Ala^8-σοβαγίνης να διεγείρει την παραγωγή ενδοκυττάριου κυκλικού AMP σε HEK 293 κύτταρα που εκφράζανε σταθερά τον άγριο τύπο CRF_1 (WT) και τη μεταλλαγμένη μορφή του, K250A, ήταν (-logEC_{50}) 7,59 ± 0,25 (n=2) και 6,97 ± 0,17 (n=2) αντίστοιχα. Όμως η μείωση της ισχύος της Ala^8-σοβαγίνης από την K250A μετάλλαξη ήταν μη στατιστικά σημαντική και πολύ μικρότερη σε μέγεθος από την αντίστοιχη ελάττωση της ισχύος της σοβαγίνης, που ήταν στατιστικά σημαντική (εικόνες 43, 41). Δηλαδή η ισχύς της Ala^8-σοβαγίνης μειώθηκε από την K250A μετάλλαξη μόνο 4 φορές, ενώ εκείνη της σοβαγίνης μειώθηκε (όπως αναφέρθηκε παραπάνω) 43 φορές. Η σύγκριση αυτή της ισχύος της Ala^8-σοβαγίνης με εκείνης της σοβαγίνης περιγράφεται αναλυτικά παρακάτω και φαίνεται στην εικόνα 42.

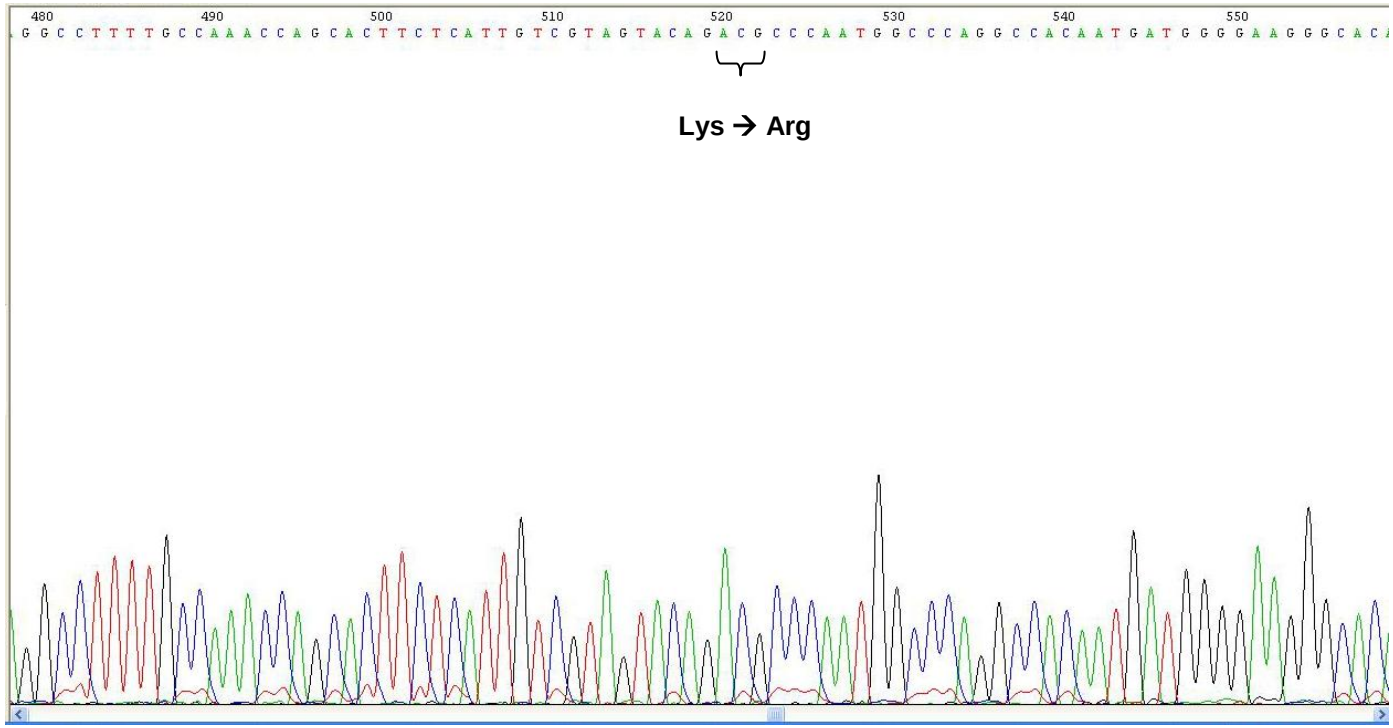


Εικόνα 43. Διέγερση παραγωγής ενδοκυττάριου κυκλικού AMP από την Ala^{8}-σοβαγίνη. *Η διέγερση της παραγωγής ενδοκυττάριου κυκλικού AMP από αυξανόμενες συγκεντρώσεις Ala^{8}-σοβαγίνης, επιτεύχθηκε όπως αναφέρεται στο κεφάλαιο ΄΄Υλικά και Μέθοδοι΄΄, σε άθικτα HEK 293 κύτταρα που εκφράζανε σταθερά τον άγριο τύπο (WT) CRF_1 ή το μεταλλαγμένο υποδοχέα, K250A. Οι μέσοι όροι των τιμών (εις διπλούν) και τα σταθερά λάθη τους προέρχονται από ένα χαρακτηριστικό πείραμα που έγινε 2 φορές με παρόμοια αποτελέσματα. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων του κάθε πειράματος έγινε μη γραμμικά και οι τιμές $logEC_{50}$ και EC_{50} προσδιορίστηκαν όπως αναφέρεται στη μεθοδολογία και αναγράφονται στο κυρίως κείμενο και στην εικόνα 41.*

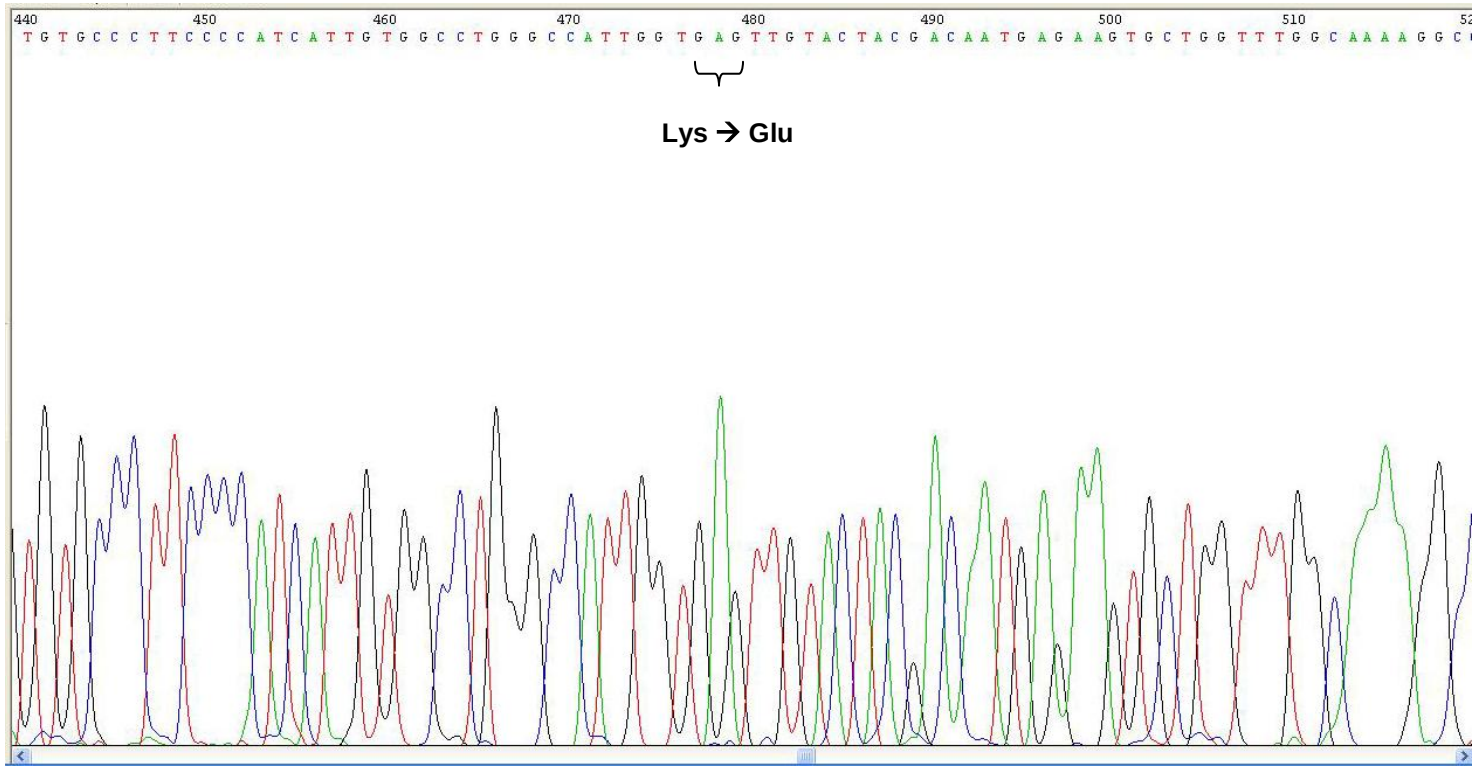
Β. Επίδραση των μεταλλάξεων K250R και K250E στις λειτουργικές ιδιότητες του CRF_1

Στη συνέχεια μεταλλάξαμε τη Lys250 του CRF_1 στην επίσης θετικά φορτισμένη αλλά μεγαλύτερη Arg και στο αρνητικά φορτισμένο Glu δημιουργώντας έτσι τους μεταλλαγμένους υποδοχείς K250R και K250E, αντίστοιχα και προσδιορίσαμε τις επιπτώσεις των μεταλλάξεων αυτών στις λειτουργικές ιδιότητες του υποδοχέα. Συγκεκριμένα, προσδιορίσαμε την ισχύ με την οποία η σοβαγίνη καθώς και το τροποποιημένο ανάλογό της, Ala^8-σοβαγίνη διέγειραν την παραγωγή του ενδοκυττάριου κυκλικού AMP σε κύτταρα που εκφράζανε σταθερά τον άγριο τύπο CRF_1 (WT) και τις μεταλλαγμένες μορφές του, K250R και K250E.

Μετάλλαξεις K250R και K250E του CRF_1



Εικόνα Γ.Χ2. Μετάλλαξη της Lys250 σε Arg. *Στο χρωματογράφημα διακρίνεται η περιοχή των νουκλεοτιδίων μέσα στην οποία υπάρχει η αλληλουχία ACG η οποία είναι η αντίστροφη και συμπληρωματική της αλληλουχίας CGT που κωδικοποιεί το αμινοξύ της μετάλλαξης αργινίνη. Τα νουκλεοτίδια αυτά αντικατέστησαν τα AAG του $hCRF_1$.*



Εικόνα Γ.Χ3. Μετάλλαξη της Lys250 σε Glu. *Στο χρωματογράφημα διακρίνεται η περιοχή των νουκλεοτιδίων μέσα στην οποία υπάρχει η αλληλουχία GAG που κωδικοποιεί το αμινοξύ της μετάλλαξης γλουταμικό οξύ. Τα νουκλεοτίδια αυτά αντικατέστησαν τα AAG του hCRF$_1$.*

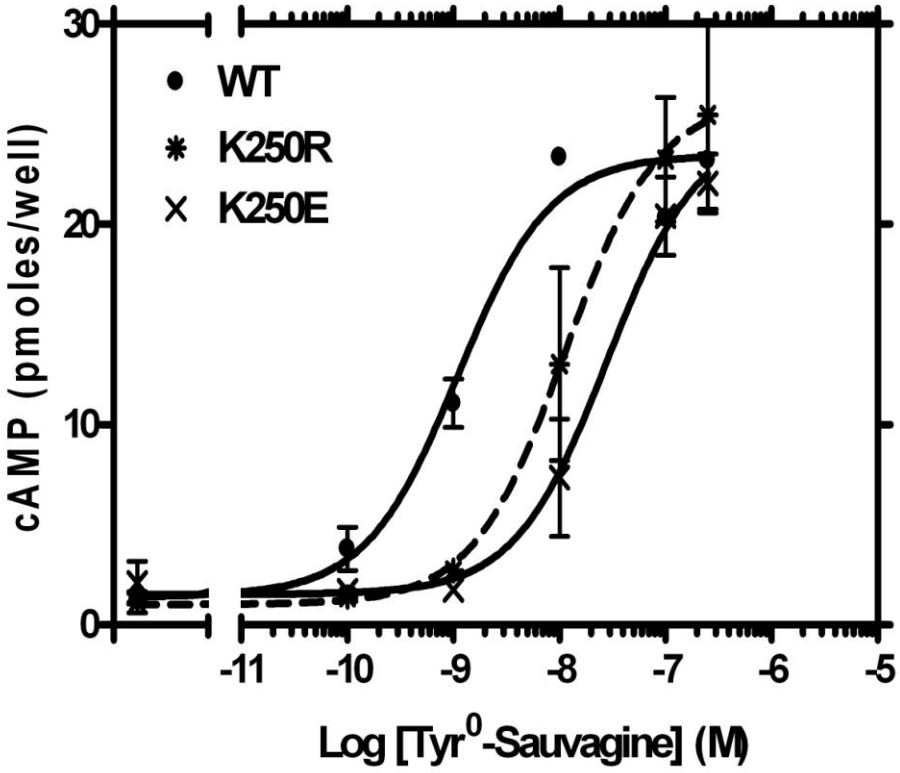
Επίδραση των μεταλλάξεων K250R και K250E στην ικανότητα της σοβαγίνης να διεγείρει την παραγωγή ενδοκυττάριου κυκλικού AMP

Όπως φαίνεται στις εικόνες 39, 41 και 42 οι μεταλλάξεις K250R και K250E, παρόμοια με την K250A μετάλλαξη, μείωσαν σημαντικά την ισχύ της σοβαγίνης με την οποία διέγειρε την παραγωγή κυκλικού AMP σε κύτταρα που εκφράζανε τον CRF_1, από ($-logEC_{50}$) 9,07 ± 0,08 (σε κύτταρα που εκφράζανε τον WT) σε 8,06 ± 0,12 και 7,17 ± 0,38 (σε κύτταρα που εκφράζανε τους μεταλλαγμένους υποδοχείς K250R και K250E, αντίστοιχα) (εικόνα 39). Από τις δύο αυτές μεταλλάξεις η K250R επέφερε τη μικρότερη μείωση στην ισχύ της σοβαγίνης.

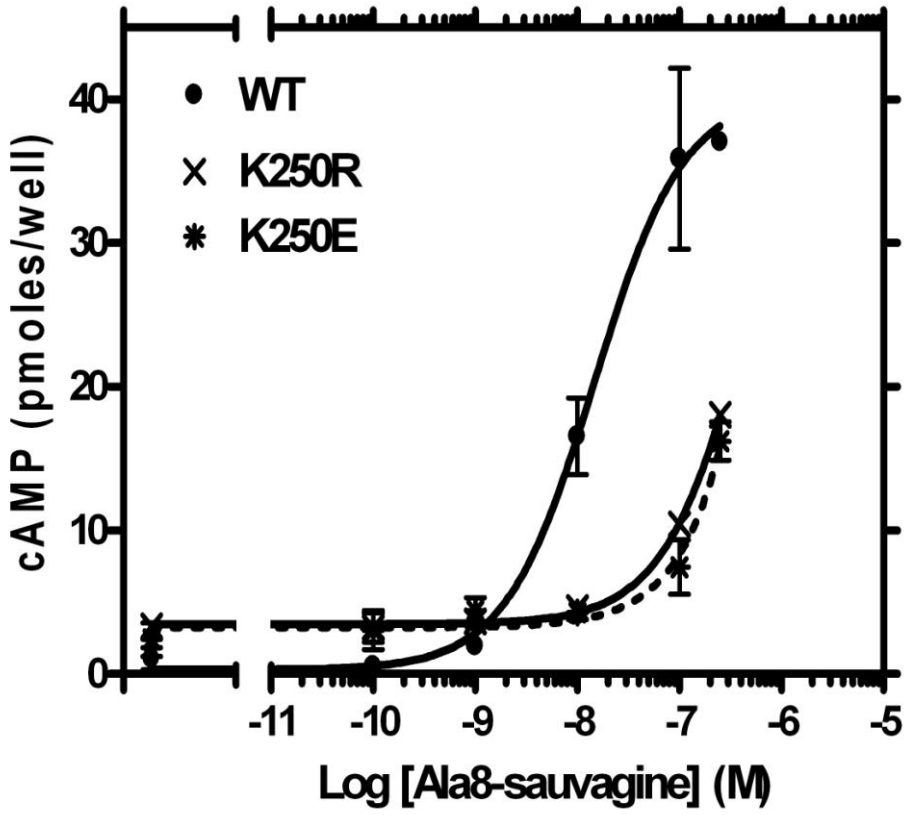
Επίδραση των μεταλλάξεων K250R και K250E στην ικανότητα της Ala^8-σοβαγίνης να διεγείρει την παραγωγή ενδοκυττάριου κυκλικού AMP

Μετά τις επιπτώσεις των μεταλλάξεων K250R και K250E στην ισχύ της σοβαγίνης, εξετάσαμε το κατά πόσο οι μεταλλάξεις αυτές επηρέασαν την ισχύ με την οποία η Ala^8-σοβαγίνη διέγειρε την παραγωγή του ενδοκυττάριου κυκλικού AMP σε κύτταρα που εκφράζανε τον CRF_1. Όπως φαίνεται στις εικόνες 40 και 41 οι μεταλλάξεις K250R και K250E, αν και μείωσαν την ισχύ της Ala^8-σοβαγίνης από ($-logEC_{50}$) 7,59 ± 0,25 (σε κύτταρα που εκφράζανε τον WT) σε ($-logEC_{50}$) 7,15 ± 0,05 και 7,11 ± 0,05 (σε κύτταρα που εκφράζανε τους μεταλλαγμένους υποδοχείς K250R και K250E, αντίστοιχα), εντούτοις η ελάττωση αυτή (παρόμοια με τη μετάλλαξη K250A) δεν ήταν στατιστικά σημαντική (εικόνα 41). Αντίθετα όπως αναφέραμε παραπάνω και όπως φαίνεται στην εικόνα 41, όλες οι μεταλλάξεις αυτές επέφεραν σημαντική μείωση στην ισχύ της σοβαγίνης. Η

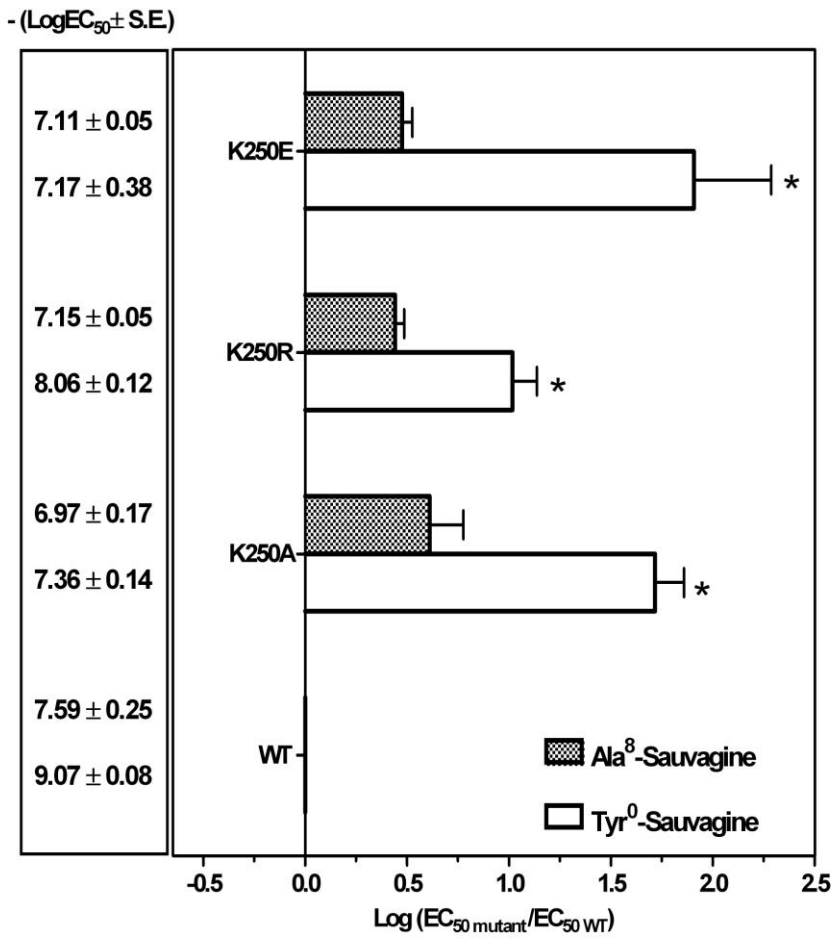
διαφορετική επίπτωση των μεταλλάξεων αυτών στην ισχύ της Ala^8-σοβαγίνη και της σοβαγίνης φαίνεται καλύτερα με τη σύγκριση της ισχύος των πεπτιδίων αυτών όπως φαίνεται στην εικόνα 42 και περιγράφεται αναλυτικά παρακάτω.



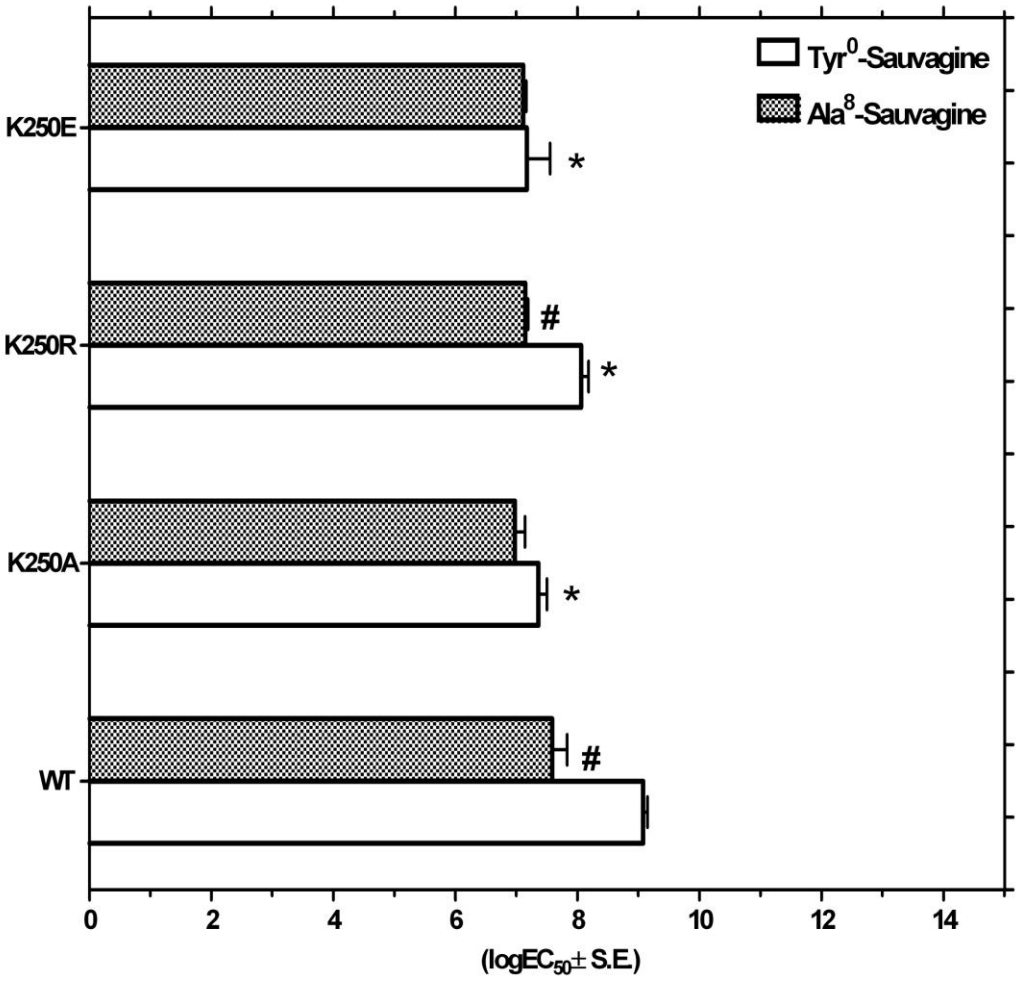
Εικόνα 39. Διέγερση παραγωγής ενδοκυττάριου κυκλικού AMP από την Tyr^0-σοβαγίνη. *Η διέγερση της παραγωγής ενδοκυττάριου κυκλικού AMP από αυξανόμενες συγκεντρώσεις Tyr^0-σοβαγίνης, επιτεύχθηκε όπως αναφέρεται στο κεφάλαιο ΄΄Υλικά και Μέθοδοι΄΄, σε άθικτα HEK 293 κύτταρα που εκφράζανε σταθερά τον άγριο τύπο (WT) CRF$_1$ ή τους μεταλλαγμένους υποδοχείς, K250R ή K250E. Οι μέσοι όροι των τιμών (εις διπλούν) και τα σταθερά λάθη τους προέρχονται από ένα χαρακτηριστικό πείραμα που έγινε 2-22 φορές με παρόμοια αποτελέσματα. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων του κάθε πειράματος έγινε μη γραμμικά και οι τιμές logEC$_{50}$ και EC$_{50}$ προσδιορίστηκαν όπως αναφέρεται στη μεθοδολογία και αναγράφονται στο κυρίως κείμενο και στην εικόνα 41.*



Εικόνα 40. Διέγερση παραγωγής ενδοκυττάριου κυκλικού AMP από την Ala^{8}-σοβαγίνη. *Η διέγερση της παραγωγής ενδοκυττάριου κυκλικού AMP από αυξανόμενες συγκεντρώσεις Ala^{8}-σοβαγίνης, επιτεύχθηκε όπως αναφέρεται στο κεφάλαιο ΄΄Υλικά και Μέθοδοι΄΄, σε άθικτα HEK 293 κύτταρα που εκφράζανε σταθερά τον άγριο τύπο (WT) CRF_1 ή τους μεταλλαγμένους υποδοχείς, K250R ή K250E. Οι μέσοι όροι των τιμών (εις διπλούν) και τα σταθερά λάθη τους προέρχονται από ένα χαρακτηριστικό πείραμα που έγινε 2 φορές με παρόμοια αποτελέσματα. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων του κάθε πειράματος έγινε μη γραμμικά και οι τιμές logEC_{50} και EC_{50} προσδιορίστηκαν όπως αναφέρεται στη μεθοδολογία και αναγράφονται στο κυρίως κείμενο και στην εικόνα 41.*



Εικόνα 41. Επίδραση των μεταλλάξεων K250A, K250R και K250E του CRF_1 στην ισχύ των Tyr^0-σοβαγίνης και Ala^8-σοβαγίνης. *Η ισχύς (τιμές -logEC_{50}) με την οποία τα πεπτίδια διέγειραν τη παραγωγή κυκλικού AMP σε κύτταρα που εκφράζανε τον άγριο τύπο CRF_1 (WT) ή τους μεταλλαγμένους υποδοχείς K250A, K250R και K250E, υπολογίστηκε από τα αποτελέσματα των πειραμάτων στις εικόνες 31, 43, 39 και 40. Οι στήλες αντιπροσωπεύουν την αλλαγή στην ισχύ των πεπτιδίων που είναι αποτέλεσμα των μεταλλάξεων. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των τιμών logEC_{50} του καθενός πεπτιδίου για τον WT και τον κάθε μεταλλαγμένο υποδοχέα, υπολογίστηκαν με τη χρήση της ανάλυσης διασποράς (ANOVA) και στη συνέχεια με Bonferoni's post hoc test (* p<0.05 στατιστικώς σημαντική διαφορά.*



Εικόνα 42. Σύγκριση της ισχύος της Ala[8]-σοβαγίνης με εκείνη της Tyr[0]-σοβαγίνης. *Η ισχύς (τιμές -logEC$_{50}$) με την οποία η Tyr[0]-σοβαγίνη (κενές στήλες) και η Ala[8]-σοβαγίνη (γκρί στήλες) διέγειραν τη παραγωγή κυκλικού AMP σε κύτταρα που εκφράζανε τον άγριο τύπο CRF$_1$ (WT) ή τους μεταλλαγμένους υποδοχείς K250A, K250R και K250E, υπολογίστηκε από τα αποτελέσματα των πειραμάτων στις εικόνες 31, 43, 39 και 40 και αναγράφεται στην εικόνα 41. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των τιμών logEC$_{50}$ των πεπτιδίων μεταξύ τους και επίσης μεταξύ των τιμών logEC$_{50}$ του καθενός πεπτιδίου για τον WT και τον κάθε μεταλλαγμένο υποδοχέα, υπολογίστηκαν με τη χρήση της ανάλυσης διασποράς (ANOVA) και στη συνέχεια με Bonferoni's post hoc test. Οι διέσεις (# p<0.05) σημαίνουν ότι η ισχύς της Ala8-σοβαγίνης να διεγείρει την παραγωγή*

κυκλικού AMP, μέσω ενός υποδοχέα είναι στατιστικώς σημαντικά διαφορετική από την ισχύ της Tyr^0-σοβαγίνης να διεγείρει την παραγωγή κυκλικού AMP μέσω του ίδιου υποδοχέα. Οι αστερίσκοι (p<0.05) σημαίνουν (όπως και στην εικόνα 42) ότι η ισχύς της Tyr^0-σοβαγίνης ή της Ala^8-σοβαγίνης να διεγείρει την παραγωγή κυκλικού AMP μέσω κάποιου μεταλλαγμένου υποδοχέα, είναι στατιστικώς σημαντικά διαφορετική από την αντίστοιχη της διέγερσης παραγωγής κυκλικού AMP μέσω του WT.*

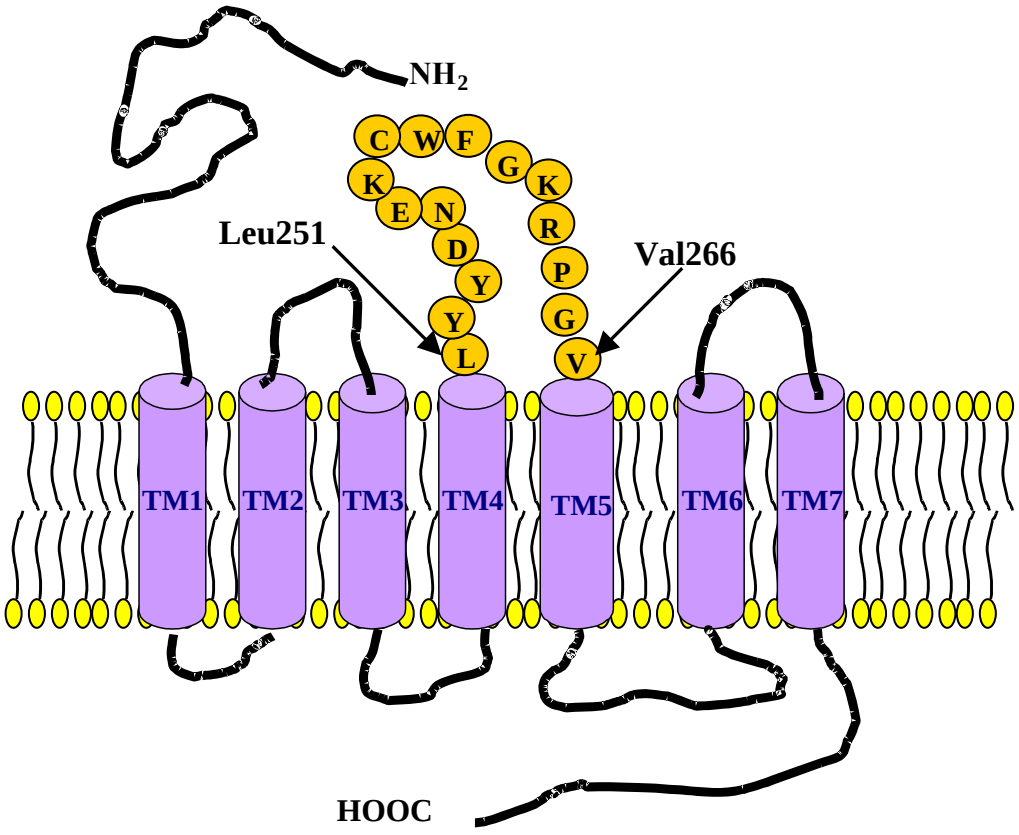
Σύγκριση της ισχύος της Ala^8-σοβαγίνης με εκείνη της σοβαγίνης.

Από όλα τα παραπάνω αποτελέσματα καθίσταται επίσης φανερό ότι η ισχύς με την οποία η Ala^8-σοβαγίνη διέγειρε την παραγωγή κυκλικού AMP σε κύτταρα που εκφράζανε σταθερά τον άγριο τύπο CRF_1 (WT), ήταν πολύ μικρότερη (στατιστικά σημαντική) εκείνης της σοβαγίνης. (εικόνα 42). Παρόμοια, η ισχύς με την οποία η Ala^8-σοβαγίνη διέγειρε την παραγωγή κυκλικού AMP σε κύτταρα που εκφράζανε σταθερά το μεταλλαγμένο υποδοχέα K250R, ήταν μικρότερη (στατιστικά σημαντική) εκείνης της σοβαγίνης (εικόνα 42).

Αντίθετα η ισχύς με την οποία η σοβαγίνη διέγειρε την παραγωγή κυκλικού AMP σε κύτταρα που εκφράζανε σταθερά τους μεταλλαγμένους υποδοχείς K250A και K250E, δε διέφερε σημαντικά από εκείνη της Ala^8-σοβαγίνης (εικόνα 42).

Δ) ΔΕΥΤΕΡΟΣ ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΟΣ ΒΡΟΓΧΟΣ ΤΟΥ CRF_1

Επεκτείνοντας τη μελέτη μας στο δεύτερο εξωκυττάριο βρόγχο (EL2) του CRF_1 προσδιορίσαμε το ρόλο των αμινοξέων του, Leu251-Val266 (εικόνα 43), στη λειτουργία του υποδοχέα.



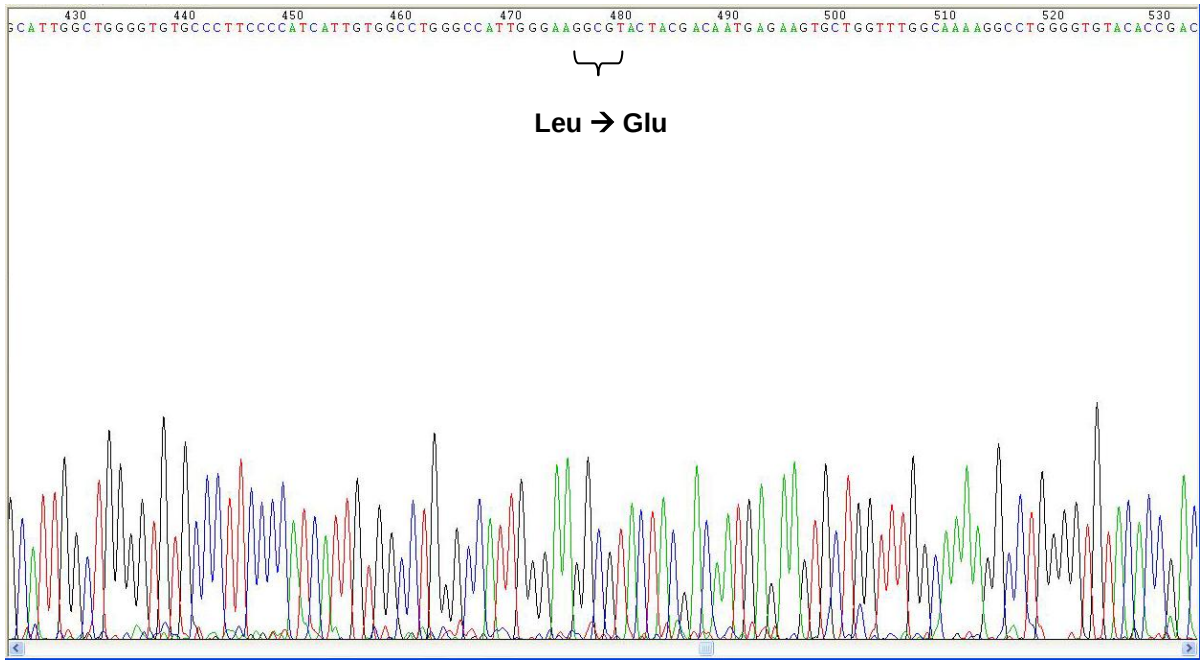
Εικόνα 43. Σχηματική αναπαράσταση του δεύτερου εξωκυττάριου βρόγχου του CRF_1. *Τα αμινοξέα του δεύτερου εξωκυττάριου βρόγχου του υποδοχέα, είναι εκείνα που βρίσκονται μεταξύ των Leu251-Val266 (συμπεριλαμβανομένων και αυτών) και είναι χρωματισμένα πορτοκαλί. Επίσης αναπαριστάνονται οι διαμεβρανικές περιοχές του υποδοχέα TM1-TM7 (μωβ κύλινδροι).*

Επίδραση της μετάλλαξης σε αλανίνη των αμινοξέων του δεύτερου εξωκυττάριου βρόγχου του CRF_1 στις φαρμακολογικές ιδιότητες του υποδοχέα.

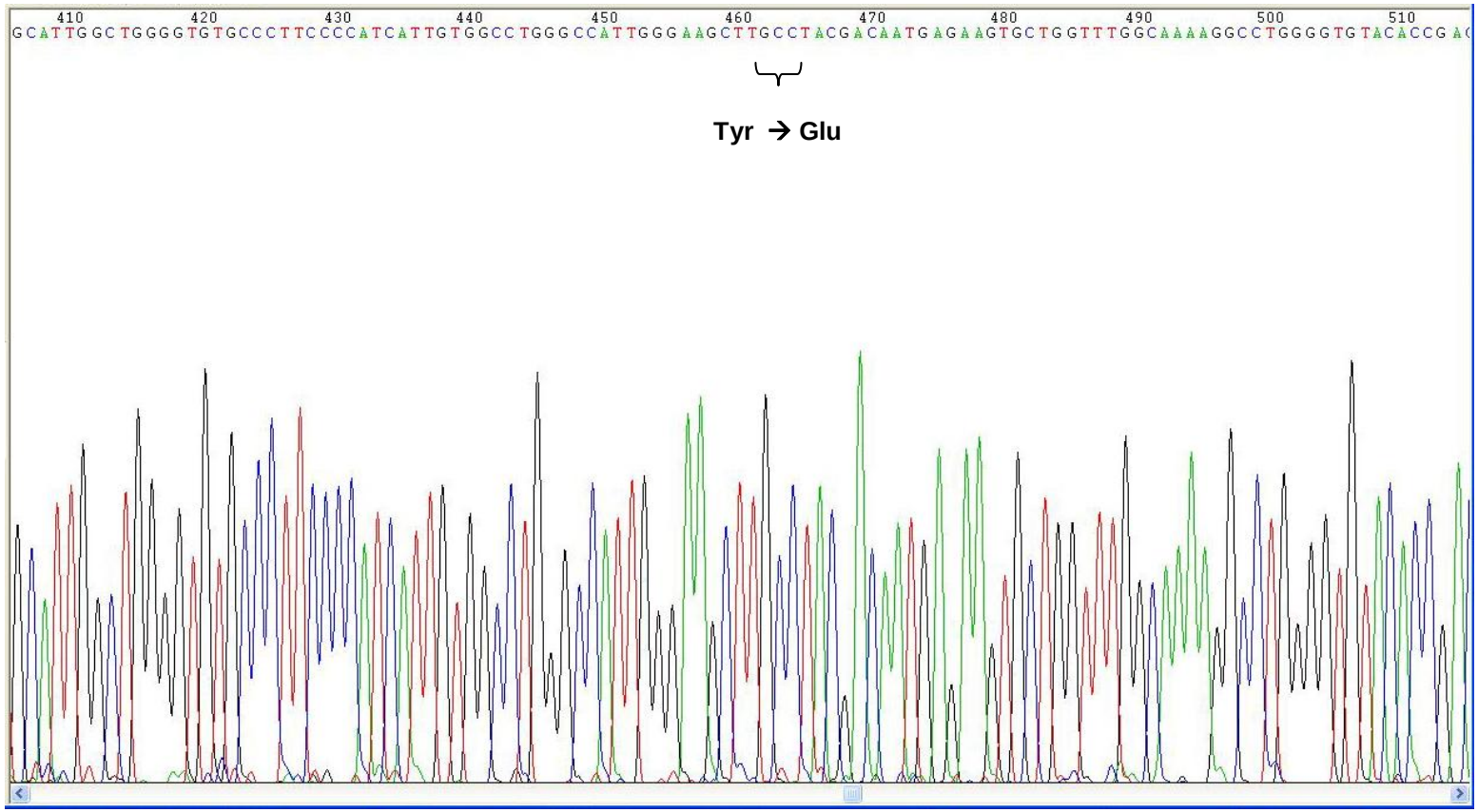
Για να προσδιορίσουμε το ρόλο των αμινοξέων του δεύτερου εξωκυττάριου βρόγχου (EL2) του CRF_1 στη λειτουργία του υποδοχέα, αντικαταστήσαμε αυτά με αλανίνη (ένα την κάθε φορά) και εξετάσαμε την επίδραση των μεταλλάξεων στις φαρμακολογικές ιδιότητες του υποδοχέα. Αυτό επιτεύχθηκε με τον προσδιορισμό της συγγένειας δέσμευσης της σοβαγίνης, του CRF, και συγγενών πεπτιδίων τους για τον άγριο τύπο (WT) CRF_1 και τους μεταλλαγμένους υποδοχείς, καθώς και της ισχύος (και μέγιστου αποτελέσματος) με την οποία η σοβαγίνη και ο CRF διέγειραν την παραγωγή ενδοκυττάριου κυκλικού AMP σε HEK 293 κύτταρα που εκφράζανε τους υποδοχείς αυτούς.

Συγκεκριμένα μεταλλάξαμε τα αμινοξέα του EL2 του CRF_1 (εικόνα 43), Leu251, Tyr252, Tyr253, Asp254, Asn255, Glu256, Lys257, Trp259, Phe260, Gly261, Lys262, Arg263, Pro264, Gly265 και Val266 σε αλανίνη δημιουργώντας έτσι τους μεταλλαγμένους υποδοχείς, L251A, Y252A, Y253A, D254A, N255A, E256A, K257A, W259A, F260A, G261A, K262A, R263A, P264A, G265 και V266A. Δε μεταλλάξαμε την Cys258 γιατί βρήκαμε ότι η μετάλλαξή της σε σερίνη καταργεί τη δέσμευση της σοβαγίνης.

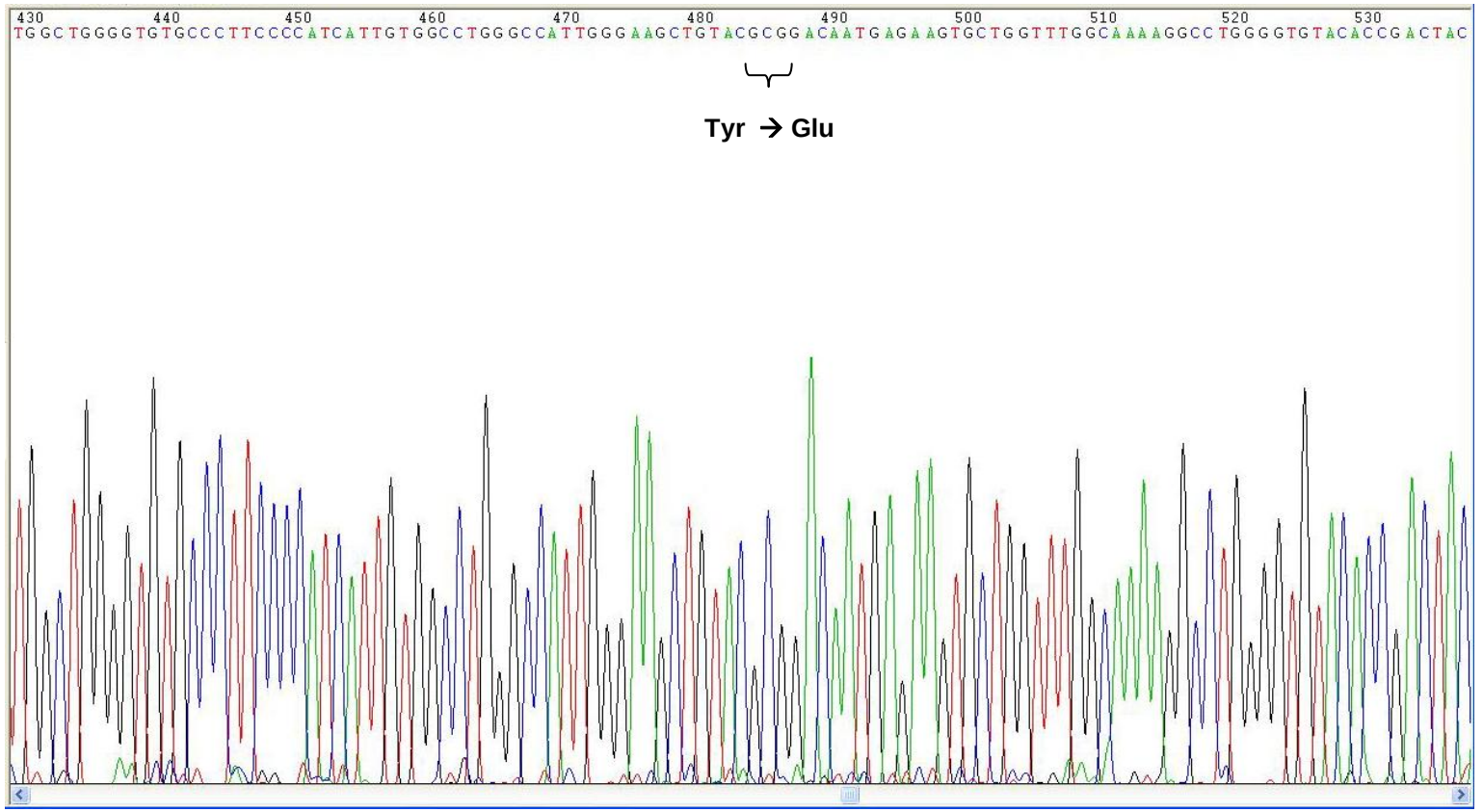
Μετάλλαξεις L251A, Y252A, Y253A, D254A, N255A, E256A, K257A, W259A, F260A, G261A, K262A, R263A, P264A, G265 και V266A του CRF_1



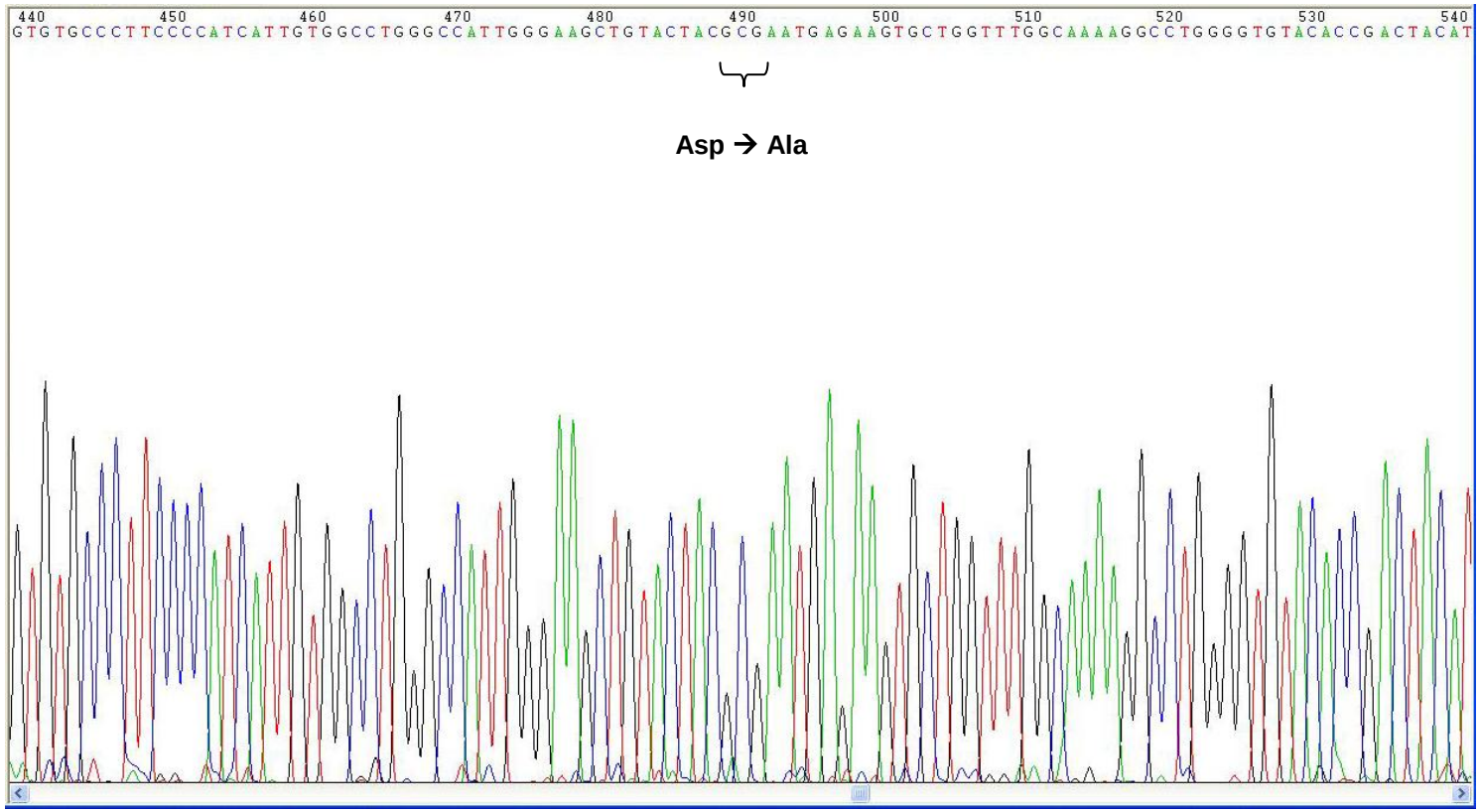
Εικόνα ΔΧ1. Μετάλλαξη της Leu251 σε Ala. *Στο χρωματογράφημα διακρίνεται η περιοχή των νουκλεοτιδίων μέσα στην οποία υπάρχει η αλληλουχία GCG που κωδικοποιεί το αμινοξύ της μετάλλαξης αλανίνη. Τα νουκλεοτίδια αυτά αντικατέστησαν τα CTG του $hCRF_1$.*



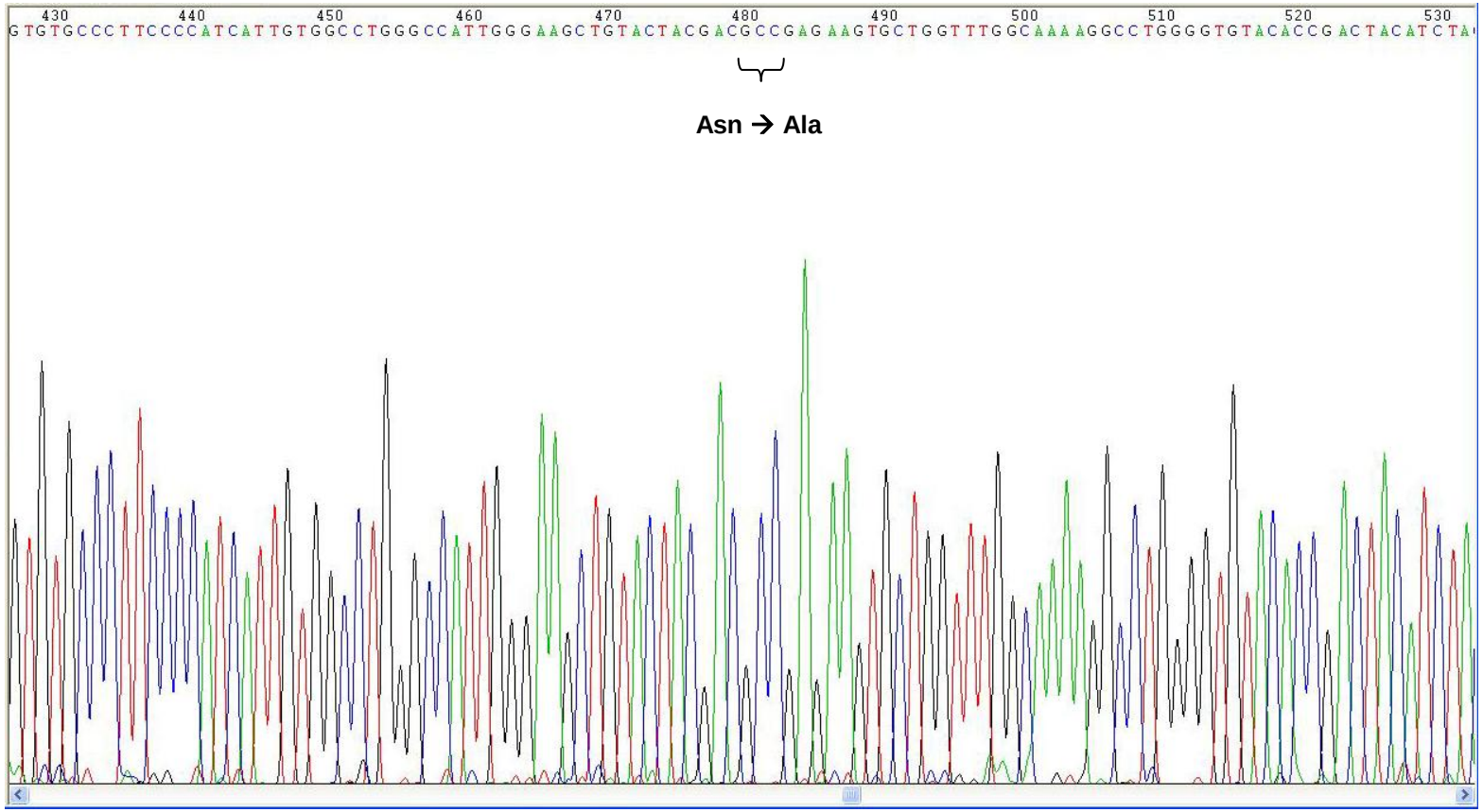
Εικόνα ΔΧ2. Μετάλλαξη της Tyr252 σε Ala. *Στο χρωματογράφημα διακρίνεται η περιοχή των νουκλεοτιδίων μέσα στην οποία υπάρχει η αλληλουχία GCC που κωδικοποιεί το αμινοξύ της μετάλλαξης αλανίνη. Τα νουκλεοτίδια αυτά αντικατέστησαν τα TAC του* $hCRF_1$.



Εικόνα ΔΧ3. Μετάλλαξη της Tyr253 σε Ala. *Στο χρωματογράφημα διακρίνεται η περιοχή των νουκλεοτιδίων μέσα στην οποία υπάρχει η αλληλουχία GCG που κωδικοποιεί το αμινοξύ της μετάλλαξης αλανίνη. Τα νουκλεοτίδια αυτά αντικατέστησαν τα TAC του* $hCRF_1$.

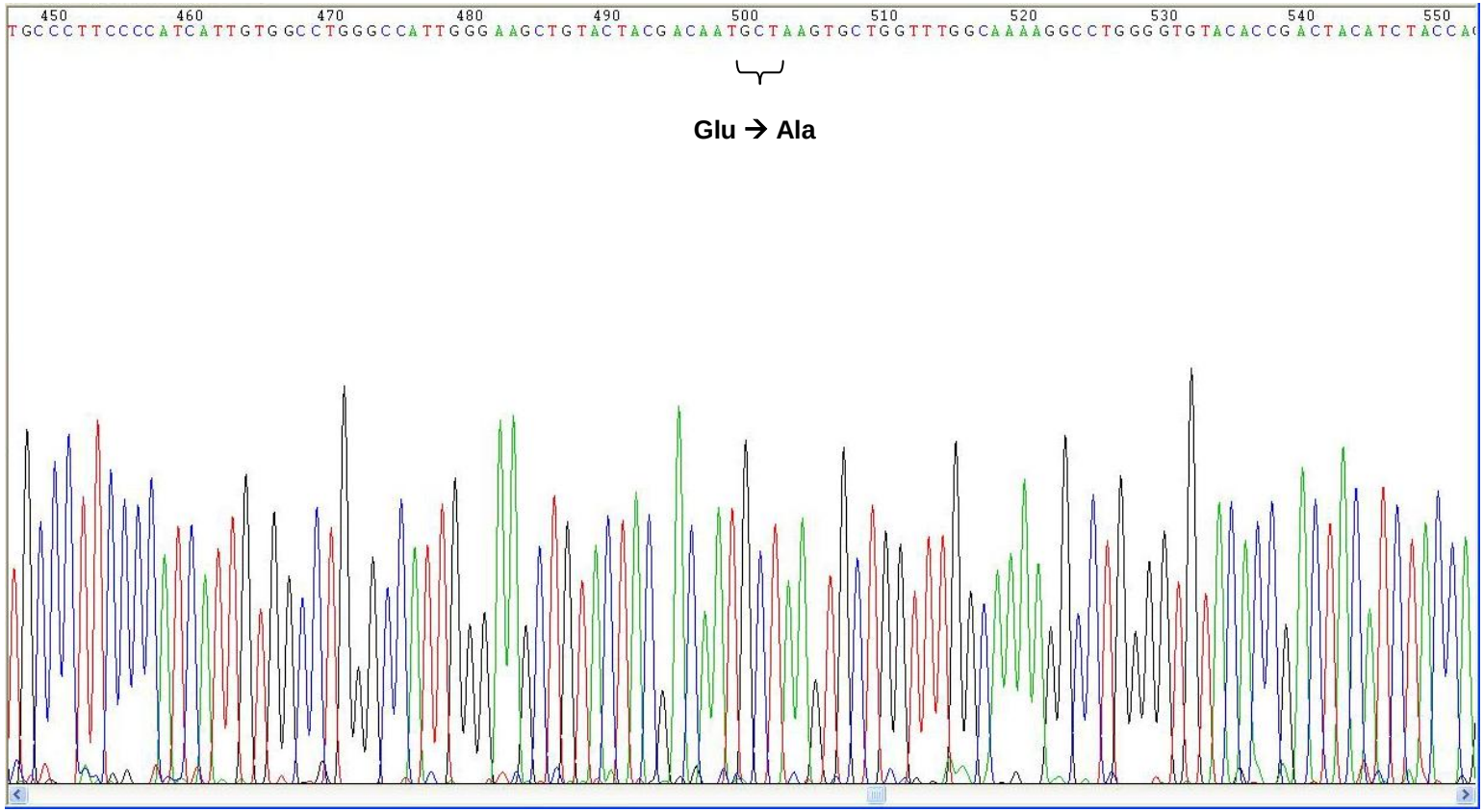


Εικόνα ΔΧ4. Μετάλλαξη του Asp254 σε Ala. *Στο χρωματογράφημα διακρίνεται η περιοχή των νουκλεοτιδίων μέσα στην οποία υπάρχει η αλληλουχία GCG που κωδικοποιεί το αμινοξύ της μετάλλαξης αλανίνη. Τα νουκλεοτίδια αυτά αντικατέστησαν τα TAC του* $hCRF_1$.

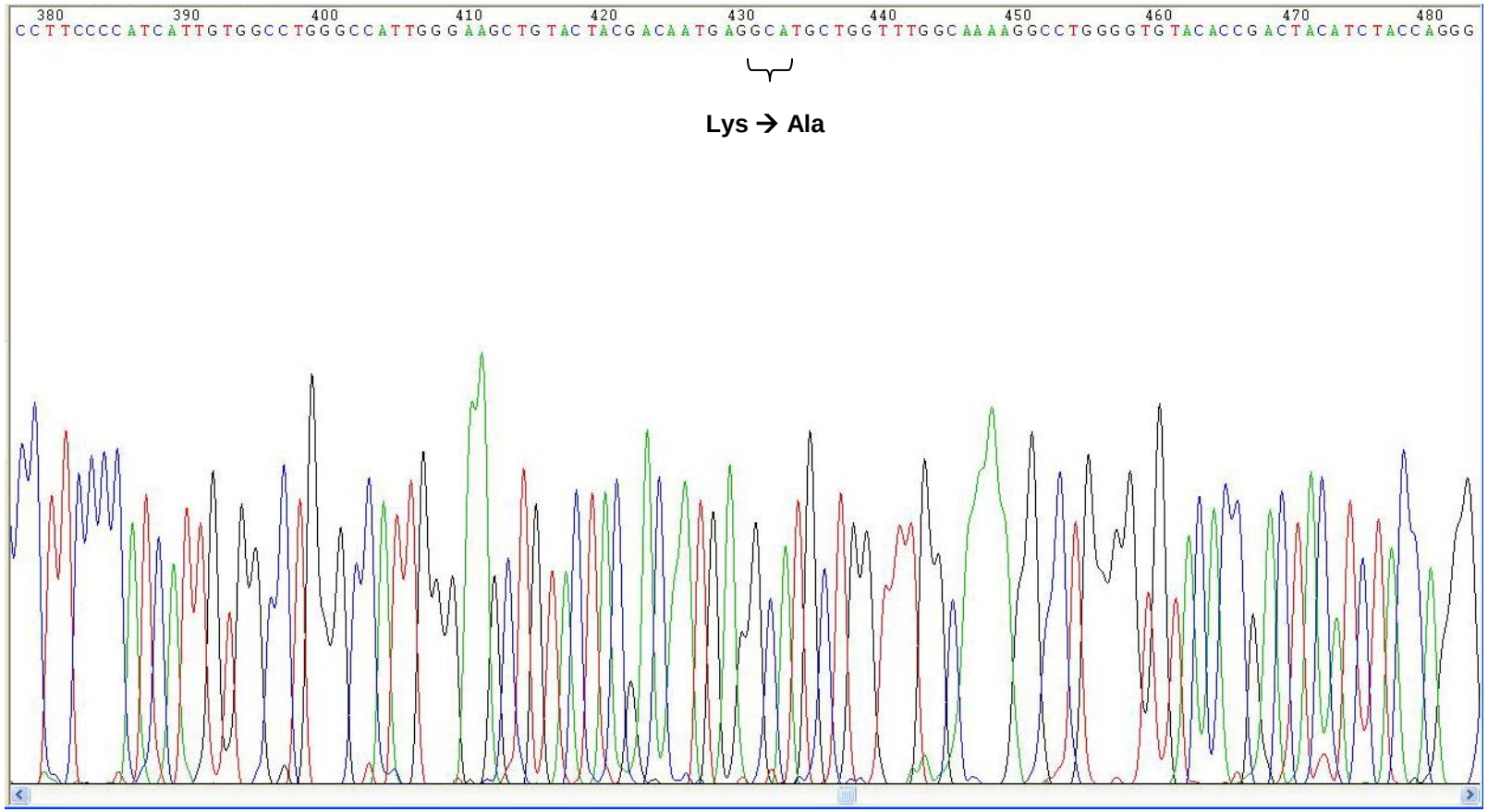


Εικόνα ΔΧ5. Μετάλλαξη της Asn255 σε Ala. *Στο χρωματογράφημα διακρίνεται η περιοχή των νουκλεοτιδίων μέσα στην οποία υπάρχει η αλληλουχία GCC που κωδικοποιεί το αμινοξύ της μετάλλαξης αλανίνη. Τα νουκλεοτίδια αυτά αντικατέστησαν τα AAT του* $hCRF_1$.

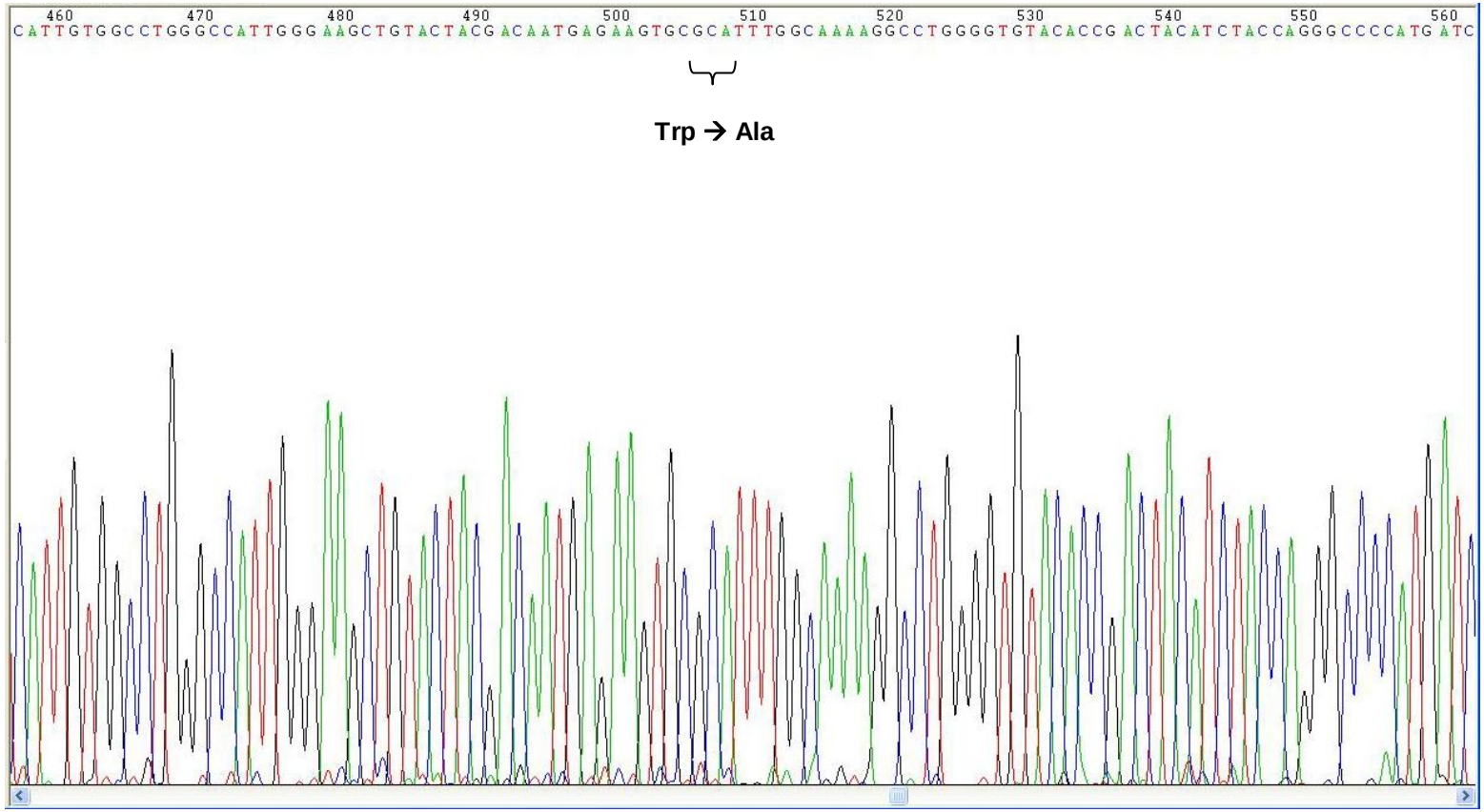
Asn → Ala



Εικόνα ΔΧ6. Μετάλλαξη του Glu256 σε Ala. *Στο χρωματογράφημα διακρίνεται η περιοχή των νουκλεοτιδίων μέσα στην οποία υπάρχει η αλληλουχία GCT που κωδικοποιεί το αμινοξύ της μετάλλαξης αλανίνη. Τα νουκλεοτίδια αυτά αντικατέστησαν τα GAG του* $hCRF_1$.

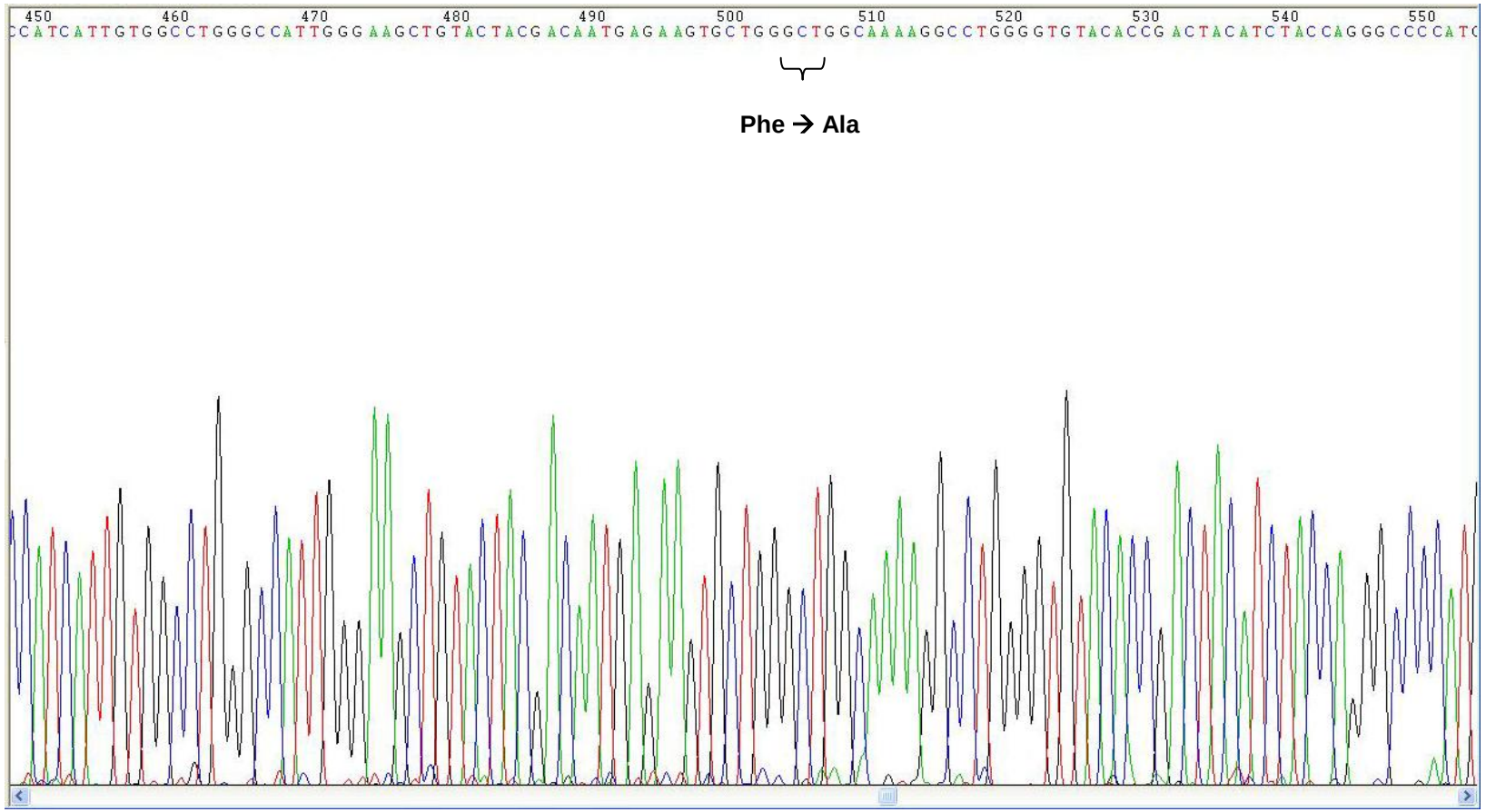


Εικόνα ΔΧ7. Μετάλλαξη της Lys 257 σε Ala. *Στο χρωματογράφημα διακρίνεται η περιοχή των νουκλεοτιδίων μέσα στην οποία υπάρχει η αλληλουχία GCA που κωδικοποιεί το αμινοξύ της μετάλλαξης αλανίνη. Τα νουκλεοτίδια αυτά αντικατέστησαν τα AAG του* $hCRF_1$.

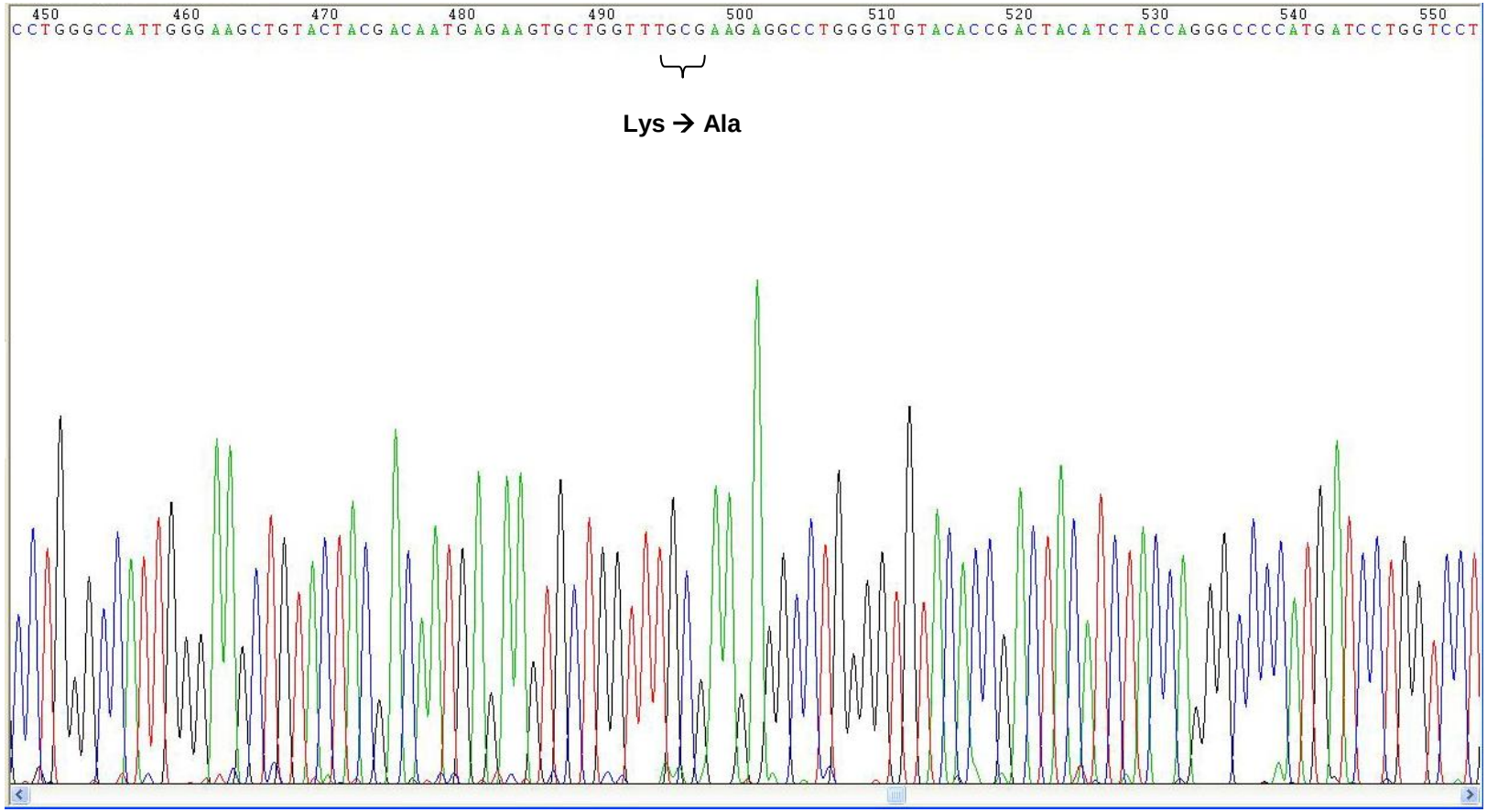


Εικόνα ΔΧ8. Μετάλλαξη της Trp259 σε Ala. *Στο χρωματογράφημα διακρίνεται η περιοχή των νουκλεοτιδίων μέσα στην οποία υπάρχει η αλληλουχία GCA που κωδικοποιεί το αμινοξύ της μετάλλαξης αλανίνη. Τα νουκλεοτίδια αυτά αντικατέστησαν τα TGG του* $hCRF_1$.

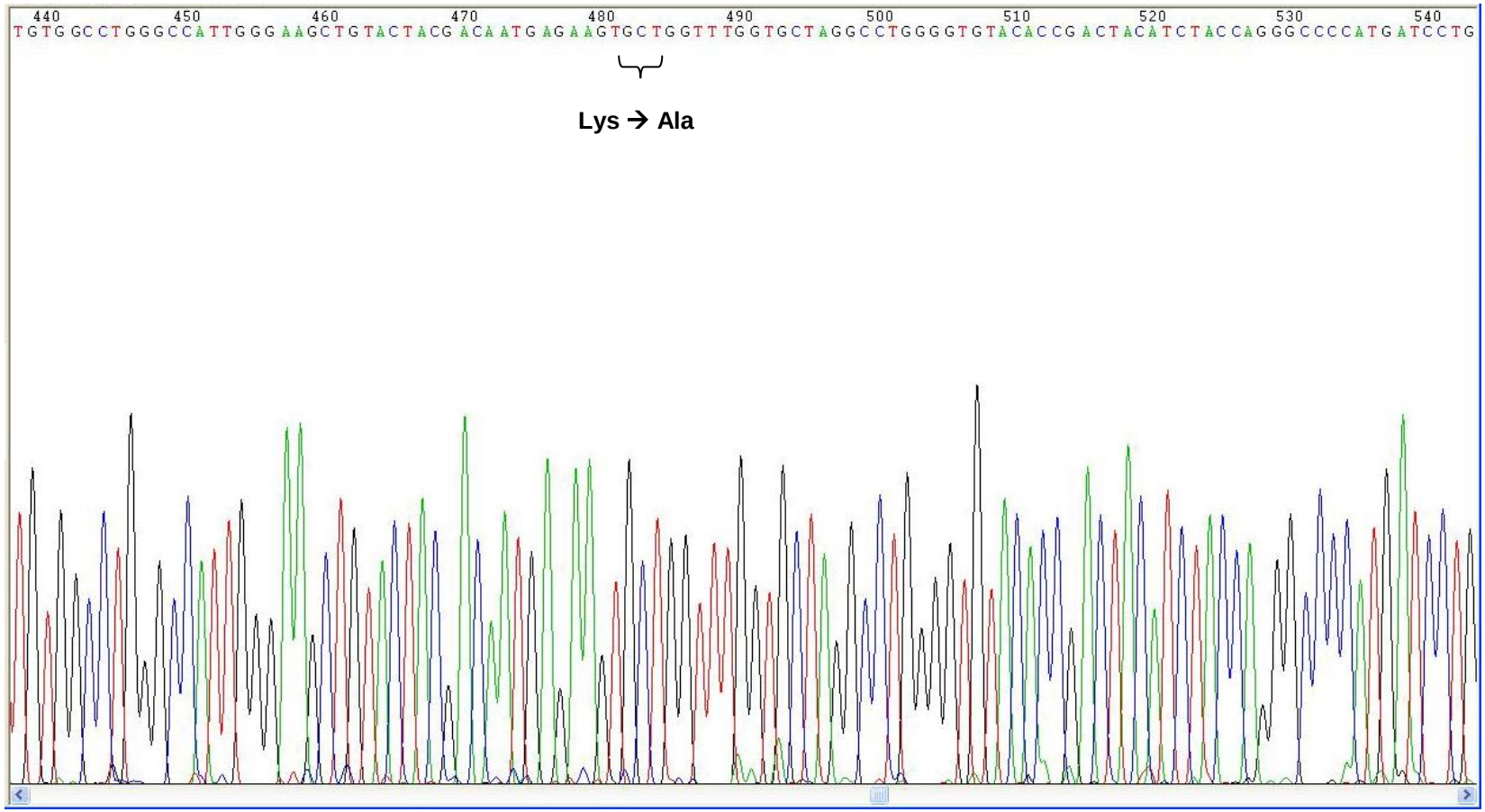
Trp → Ala



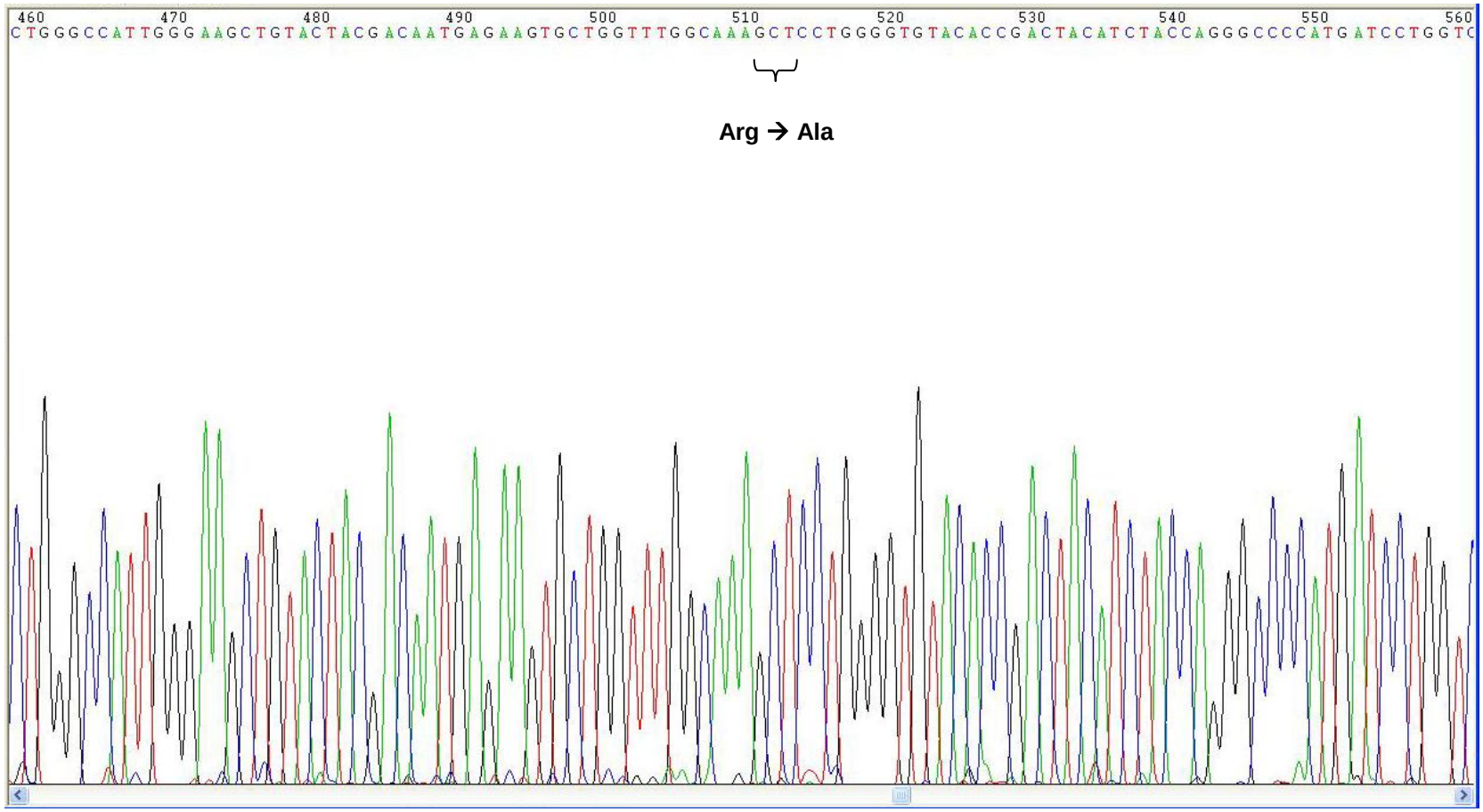
Εικόνα ΔΧ9. Μετάλλαξη της Phe260 σε Ala. *Στο χρωματογράφημα διακρίνεται η περιοχή των νουκλεοτιδίων μέσα στην οποία υπάρχει η αλληλουχία GCT που κωδικοποιεί το αμινοξύ της μετάλλαξης αλανίνη. Τα νουκλεοτίδια αυτά αντικατέστησαν τα TTT του* $hCRF_1$.



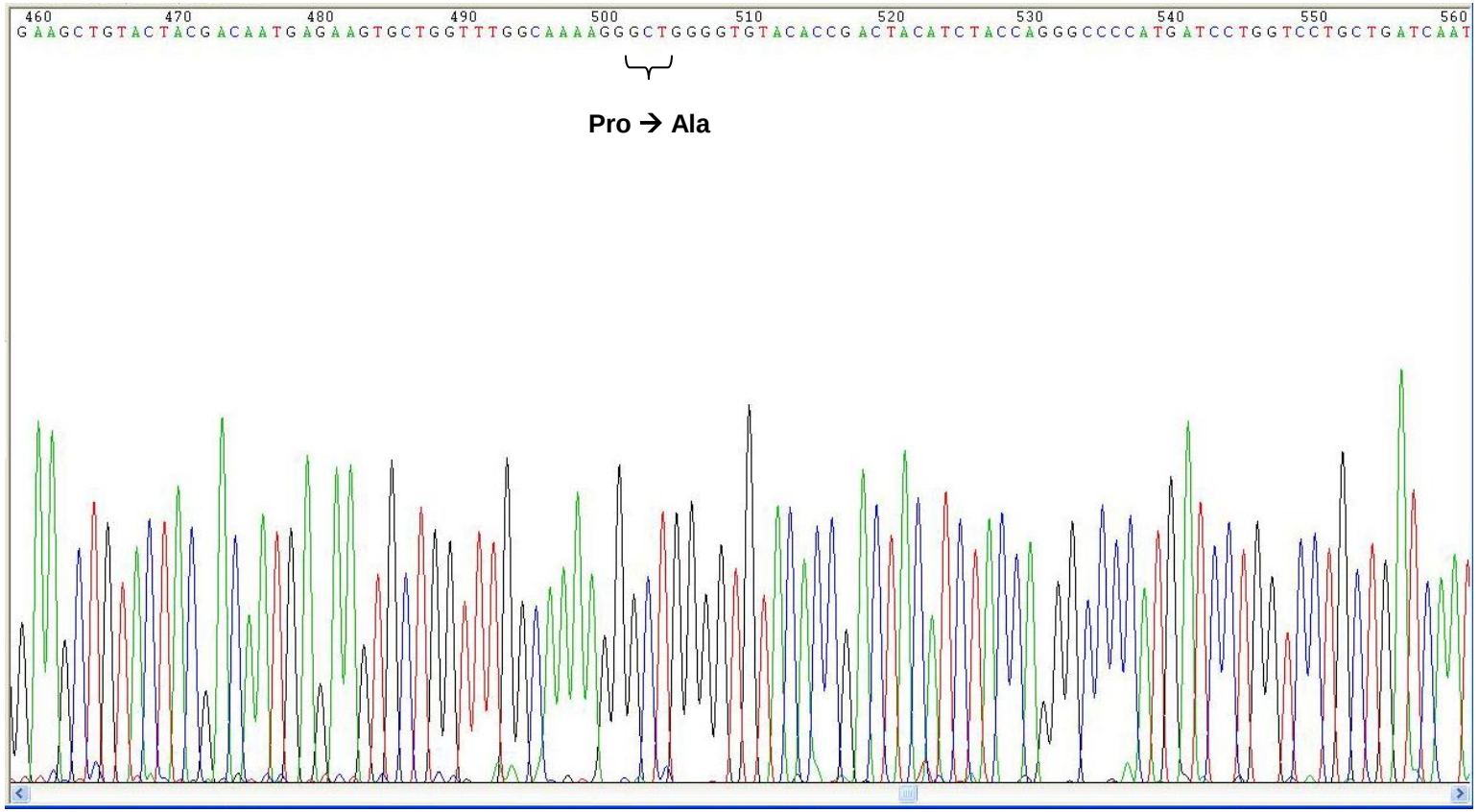
Εικόνα ΔΧ10. Μετάλλαξη της Gly261 σε Ala. *Στο χρωματογράφημα διακρίνεται η περιοχή των νουκλεοτιδίων μέσα στην οποία υπάρχει η αλληλουχία GCG που κωδικοποιεί το αμινοξύ της μετάλλαξης αλανίνη. Τα νουκλεοτίδια αυτά αντικατέστησαν τα GGC του* $hCRF_1$.



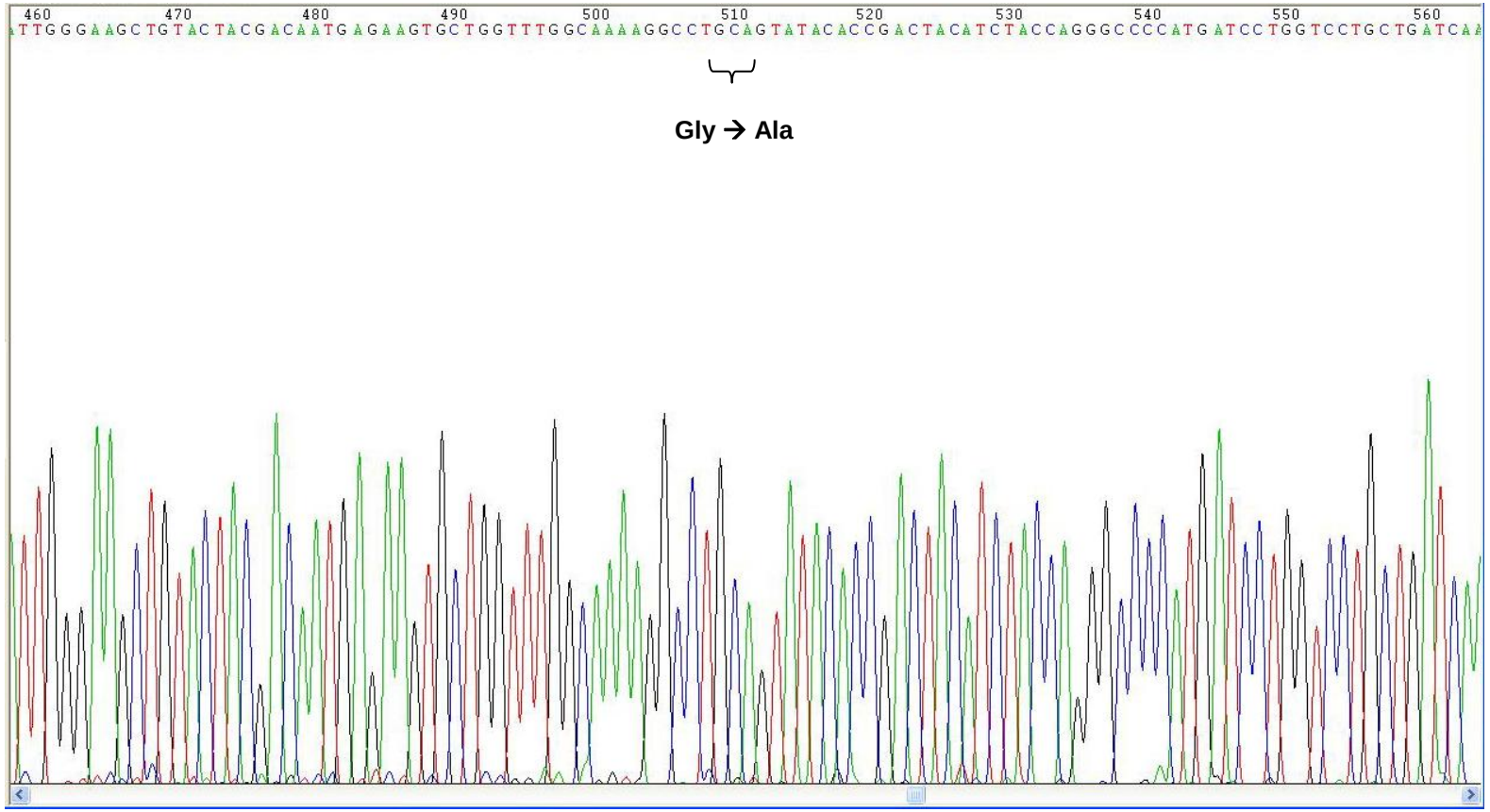
Εικόνα ΔΧ11. Μετάλλαξη της Lys262 σε Ala. *Στο χρωματογράφημα διακρίνεται η περιοχή των νουκλεοτιδίων μέσα στην οποία υπάρχει η αλληλουχία GCT που κωδικοποιεί το αμινοξύ της μετάλλαξης αλανίνη. Τα νουκλεοτίδια αυτά αντικατέστησαν τα AAA του* $hCRF_1$.



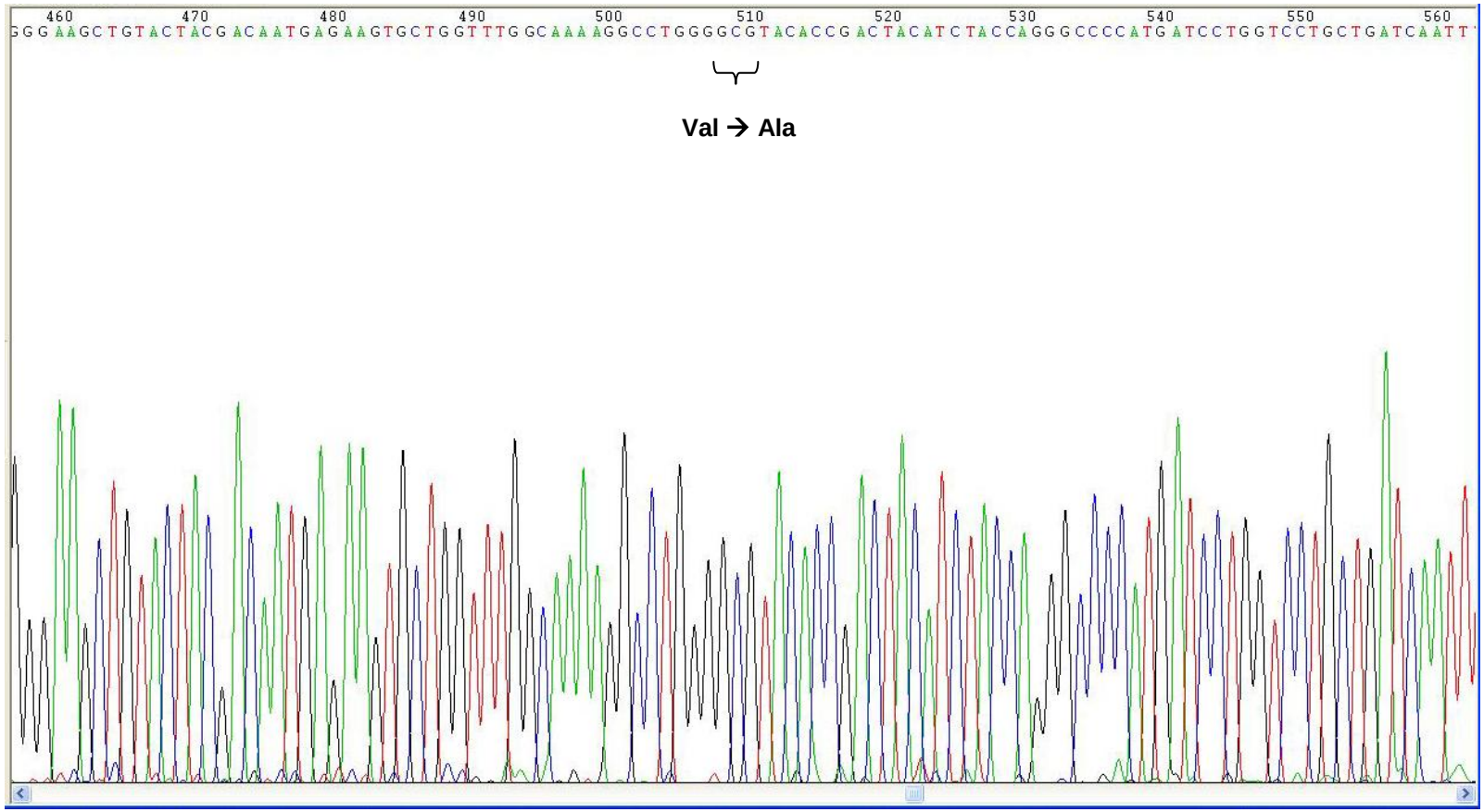
Εικόνα ΔΧ12. Μετάλλαξη της Arg263 σε Ala. *Στο χρωματογράφημα διακρίνεται η περιοχή των νουκλεοτιδίων μέσα στην οποία υπάρχει η αλληλουχία GCT που κωδικοποιεί το αμινοξύ της μετάλλαξης αλανίνη. Τα νουκλεοτίδια αυτά αντικατέστησαν τα AGG του* $hCRF_1$.



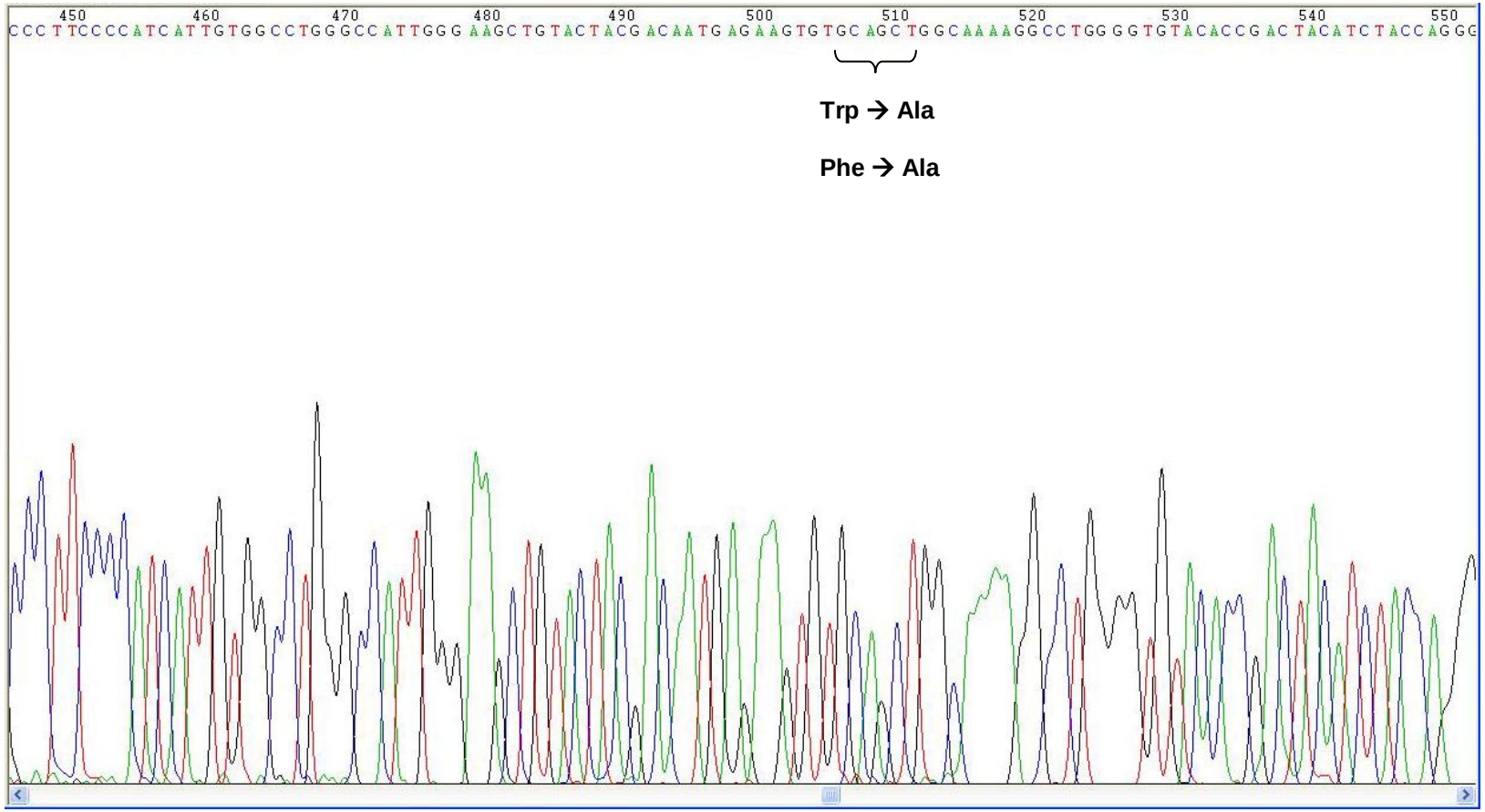
Εικόνα ΔΧ13. Μετάλλαξη της Pro264 σε Ala. *Στο χρωματογράφημα διακρίνεται η περιοχή των νουκλεοτιδίων μέσα στην οποία υπάρχει η αλληλουχία GCT που κωδικοποιεί το αμινοξύ της μετάλλαξης αλανίνη. Τα νουκλεοτίδια αυτά αντικατέστησαν τα CCT του* $hCRF_1$.



Εικόνα ΔΧ14. Μετάλλαξη της Gly265 σε Ala. *Στο χρωματογράφημα διακρίνεται η περιοχή των νουκλεοτιδίων μέσα στην οποία υπάρχει η αλληλουχία GCA που κωδικοποιεί το αμινοξύ της μετάλλαξης αλανίνη. Τα νουκλεοτίδια αυτά αντικατέστησαν τα GGG του* $hCRF_1$.



Εικόνα ΔΧ15. Μετάλλαξη της Val266 σε Ala. *Στο χρωματογράφημα διακρίνεται η περιοχή των νουκλεοτιδίων μέσα στην οποία υπάρχει η αλληλουχία GCG που κωδικοποιεί το αμινοξύ της μετάλλαξης αλανίνη. Τα νουκλεοτίδια αυτά αντικατέστησαν τα GTG του* $hCRF_1$.



Εικόνα ΔΧ16. Μετάλλαξη των Trp259 και Phe260 σε Ala. *Στο χρωματογράφημα διακρίνεται η περιοχή των νουκλεοτιδίων μέσα στην οποία υπάρχει η αλληλουχία GCA GCT που κωδικοποιεί το αμινοξύ της μετάλλαξης αλανίνη. Τα νουκλεοτίδια αυτά αντικατέστησαν τα TGG και TTT του* $hCRF_1$.

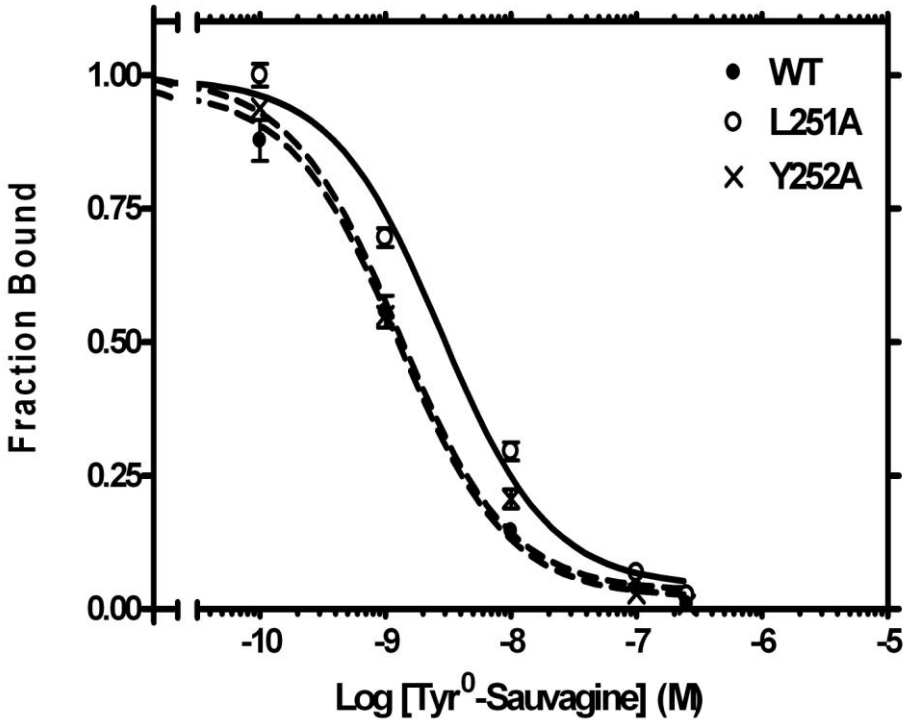
Επίδραση των L251A και Y252A μεταλλάξεων στη συγγένεια δέσμευσης και ισχύ της σοβαγίνης

Επίδραση των μεταλλάξεων στη δέσμευση της σοβαγίνης

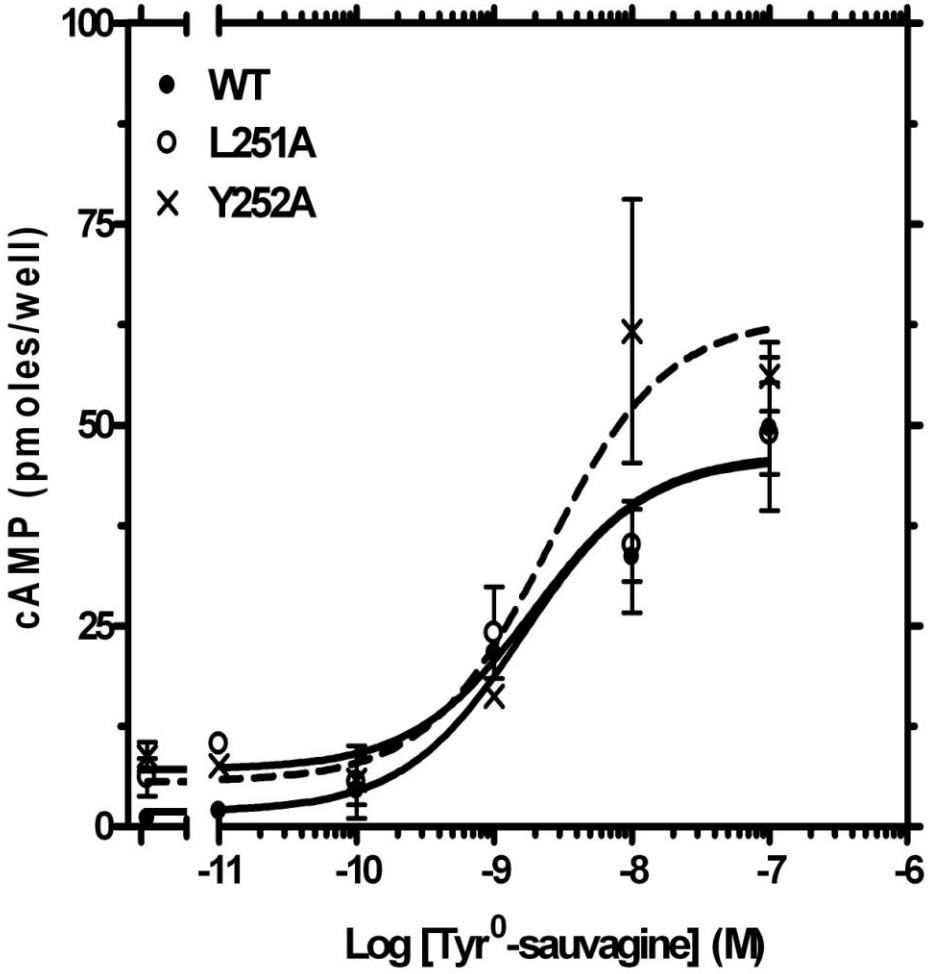
Όπως φαίνεται στην εικόνα 44 και εικόνα 57, η μετάλλαξη των Leu251 και Tyr252 σε αλανίνη δεν επηρέασε σημαντικά τη συγγένεια δέσμευσης της σοβαγίνης για τον CRF_1 (εικόνες 44, 57). Συγκεκριμένα η σοβαγίνη δεσμευόταν στον άγριο τύπο CRF_1 (WT) και στις μεταλλαγμένες μορφές του, L251A και Y252A με συγγένειες δέσμευσης ($-\log K_D$) 8,90 ± 0,07, 8,64 ± 0,13 και 8,66 ± 0,17 αντίστοιχα.

Επίδραση των μεταλλάξεων στην ισχύ της σοβαγίνης

Παρόμοια με τη συγγένεια δέσμευσης της σοβαγίνης, οι μεταλλάξεις των Leu251 και Tyr252 σε αλανίνη δεν επηρέασαν σημαντικά την ισχύ (και το μέγιστο αποτέλεσμα) με την οποία το πεπτίδιο αυτό διέγειρε την παραγωγή ενδοκυττάριου κυκλικού AMP σε HEK 293 κύτταρα τα οποία εκφράζανε τον CRF_1 (εικόνες 45, 58). Συγκεκριμένα η ισχύς με την οποία η σοβαγίνη διέγειρε την παραγωγή ενδοκυττάριου κυκλικού AMP σε HEK 293 κύτταρα τα οποία εκφράζανε σταθερά τον άγριο τύπο (WT) CRF_1 και τους μεταλλαγμένους υποδοχείς ήταν ($-\log EC_{50}$) 9,07 ± 0,08, 8,92 ± 0,15 και 8,78 ± 0,09 αντίστοιχα.



Εικόνα 44. Συναγωνιστική δέσμευση της Tyr^0 – σοβαγίνης στον άγριο τύπο CRF$_1$ και στους μεταλλαγμένους υποδοχείς, L251A, Y252A. *Ο συναγωνισμός της δέσμευσης της [^{125}I] – Tyr^0 – σοβαγίνης από την Tyr^0 – σοβαγίνη, επιτεύχθηκε όπως αναφέρεται στο κεφάλαιο ΄΄Υλικά και Μέθοδοι΄΄, σε μεμβρανικά ομογενοποιήματα κυττάρων HEK 293 που εκφράζανε σταθερά τον άγριο τύπο CRF$_1$ (WT), ή τους μεταλλαγμένους υποδοχείς, L251A, Y252A. Οι μέσοι όροι των τιμών (εις διπλούν) και τα σταθερά λάθη τους προέρχονται από ένα χαρακτηριστικό πείραμα που έγινε 3-5 φορές με παρόμοια αποτελέσματα. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων του κάθε πειράματος έγινε μη γραμμικά και οι τιμές -logK$_D$ υπολογίστηκαν σύμφωνα με τη μέθοδο των Motulsky και Christopoulos [202] και αναγράφονται στο κυρίως κείμενο και στην εικόνα 57.*



Ε***ικόνα 45. Διέγερση παραγωγής ενδοκυττάριου κυκλικού AMP από την Tyr^0-σοβαγίνη.*** *Η διέγερση της παραγωγής ενδοκυττάριου κυκλικού AMP από αυξανόμενες συγκεντρώσεις Tyr^0-σοβαγίνης, επιτεύχθηκε όπως αναφέρεται στο κεφάλαιο ΄΄Υλικά και Μέθοδοι΄΄, σε άθικτα HEK 293 κύτταρα που εκφράζανε σταθερά τον άγριο τύπο (WT) CRF$_1$ ή τους μεταλλαγμένους υποδοχείς, L251A και Y252A. Οι μέσοι όροι των τιμών (εις διπλούν) και τα σταθερά λάθη τους προέρχονται από ένα χαρακτηριστικό πείραμα που έγινε 3-22 φορές με παρόμοια αποτελέσματα. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων του κάθε πειράματος έγινε μη γραμμικά και οι τιμές logEC$_{50}$ και EC$_{50}$ προσδιορίστηκαν όπως αναφέρεται στη μεθοδολογία και αναγράφονται στο κυρίως κείμενο και στην εικόνα 58*

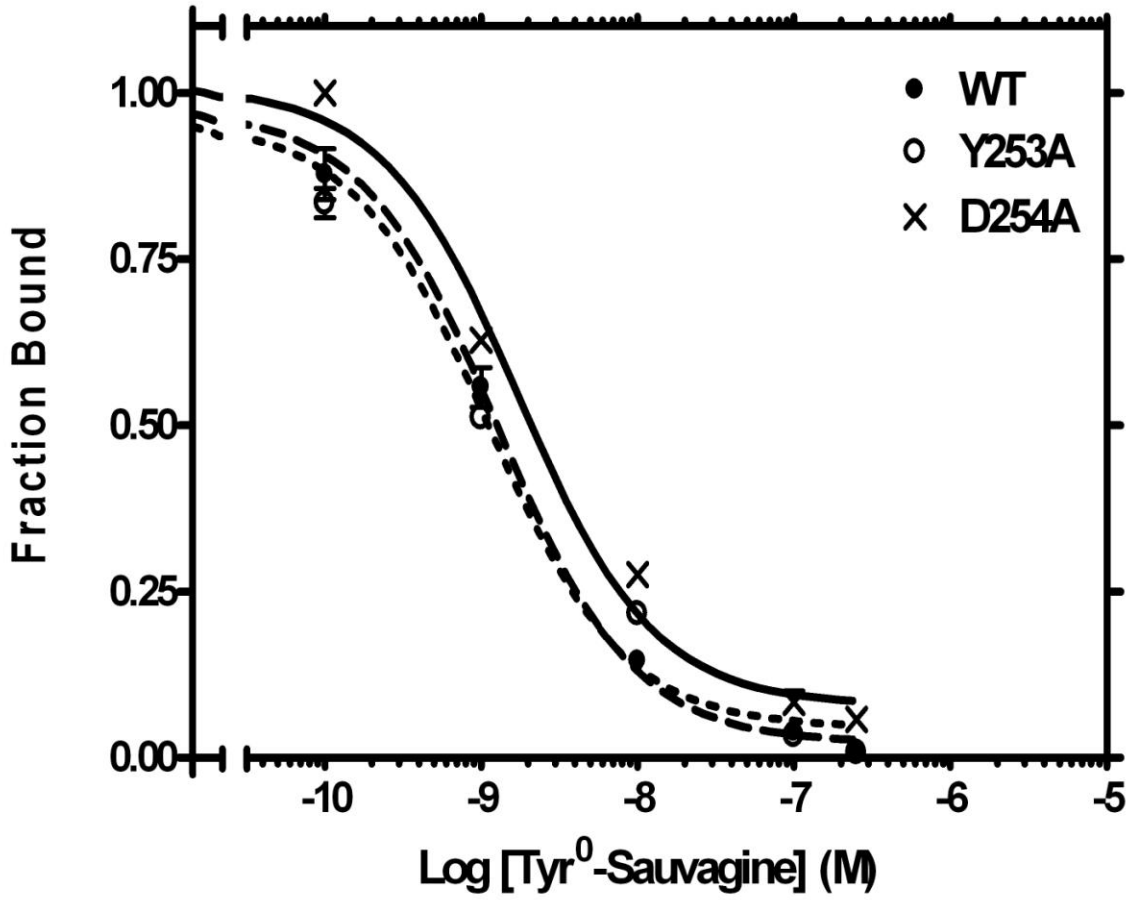
Επίδραση των Y253A και D254A μεταλλάξεων στη συγγένεια δέσμευσης και ισχύ της σοβαγίνης

Επίδραση των μεταλλάξεων στη δέσμευση της σοβαγίνης

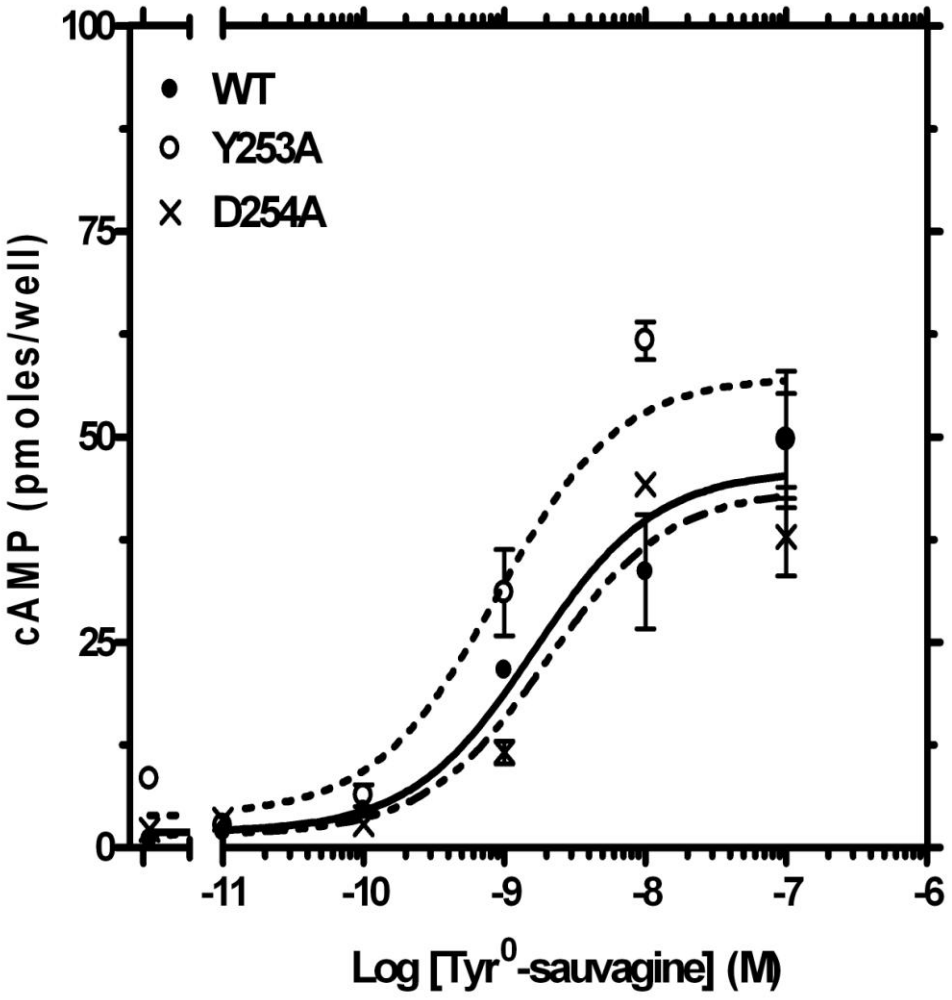
Παρόμοια με τις μεταλλάξεις των Leu251 και Tyr252 οι μεταλλάξεις των Tyr253 και Asp254 σε αλανίνη δεν επηρέασαν σημαντικά τη συγγένεια δέσμευσης της σοβαγίνης για τον CRF_1 (εικόνες 46, 57). Συγκεκριμένα η σοβαγίνη δεσμευόταν στον άγριο τύπο CRF_1 (WT) και στις μεταλλαγμένες μορφές του, Y253A και D254A με συγγένειες δέσμευσης ($-\log K_D$) 8,90 ± 0,07, 8,90 ± 0,27 και 9,02 ± 0,26, αντίστοιχα.

Επίδραση των μεταλλάξεων στην ισχύ της σοβαγίνης

Παρόμοια με τη συγγένεια δέσμευσης της σοβαγίνης, οι μεταλλάξεις των Tyr253 και Asp254 σε αλανίνη δεν επηρέασαν σημαντικά την ισχύ (και το μέγιστο αποτέλεσμα) με την οποία το πεπτίδιο αυτό διέγειρε την παραγωγή ενδοκυττάριου κυκλικού AMP σε HEK 293 κύτταρα τα οποία εκφράζανε τον CRF_1 (εικόνες 47, 58). Συγκεκριμένα η ισχύς με την οποία η σοβαγίνη διέγειρε την παραγωγή ενδοκυττάριου κυκλικού AMP σε HEK 293 κύτταρα τα οποία εκφράζανε σταθερά τον άγριο τύπο (WT) CRF_1 και τους μεταλλαγμένους υποδοχείς Y253A και D254A ήταν ($-\log EC_{50}$) 9,07 ± 0,08, 8,91 ± 0,11 και 8,86 ± 0,07, αντίστοιχα.



Εικόνα 46. Συναγωνιστική δέσμευση της Tyr^0 – σοβαγίνης στον άγριο τύπο CRF_1 και στους μεταλλαγμένους υποδοχείς, Y253A και D254A. *Ο συναγωνισμός της δέσμευσης της [^{125}I] – Tyr^0 – σοβαγίνης από την Tyr^0 – σοβαγίνη, επιτεύχθηκε όπως αναφέρεται στο κεφάλαιο ΄΄Υλικά και Μέθοδοι΄΄, σε μεμβρανικά ομογενοποιήματα κυττάρων HEK 293 που εκφράζανε σταθερά τον άγριο τύπο CRF_1 (WT), ή τους μεταλλαγμένους υποδοχείς, Y253A και D254A. Οι μέσοι όροι των τιμών (εις διπλούν) και τα σταθερά λάθη τους προέρχονται από ένα χαρακτηριστικό πείραμα που έγινε 3-5 φορές με παρόμοια αποτελέσματα. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων του κάθε πειράματος έγινε μη γραμμικά και οι τιμές $-logK_D$ υπολογίστηκαν σύμφωνα με τη μέθοδο των Motulsky και Christopoulos [202] και αναγράφονται στο κυρίως κείμενο και στην εικόνα 57*



Εικόνα 47. Διέγερση παραγωγής ενδοκυττάριου κυκλικού AMP από την Tyr^0-σοβαγίνη. *Η διέγερση της παραγωγής ενδοκυττάριου κυκλικού AMP από αυξανόμενες συγκεντρώσεις Tyr^0-σοβαγίνης, επιτεύχθηκε όπως αναφέρεται στο κεφάλαιο ΄΄Υλικά και Μέθοδοι΄΄, σε άθικτα HEK 293 κύτταρα που εκφράζανε σταθερά τον άγριο τύπο (WT) CRF$_1$ ή τους μεταλλαγμένους υποδοχείς, Y253A και D254A. Οι μέσοι όροι των τιμών (εις διπλούν) και τα σταθερά λάθη τους προέρχονται από ένα χαρακτηριστικό πείραμα που έγινε 4-22 φορές με παρόμοια αποτελέσματα. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων του κάθε πειράματος έγινε μη γραμμικά και οι τιμές logEC$_{50}$ και EC$_{50}$ προσδιορίστηκαν όπως αναφέρεται στη μεθοδολογία και αναγράφονται στο κυρίως κείμενο και στην εικόνα 58*

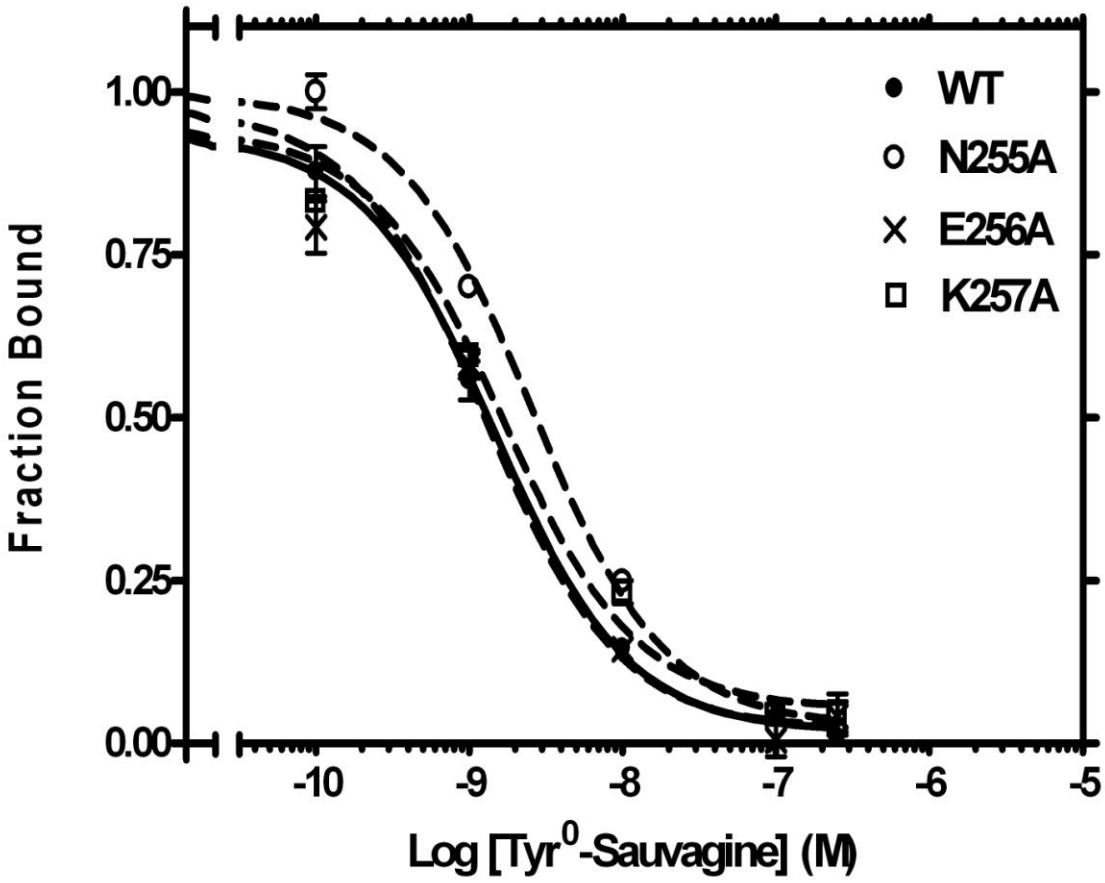
Επίδραση των N255A, E256A και K257A μεταλλάξεων στη συγγένεια δέσμευσης και ισχύ της σοβαγίνης

Επίδραση των μεταλλάξεων στη δέσμευση της σοβαγίνης

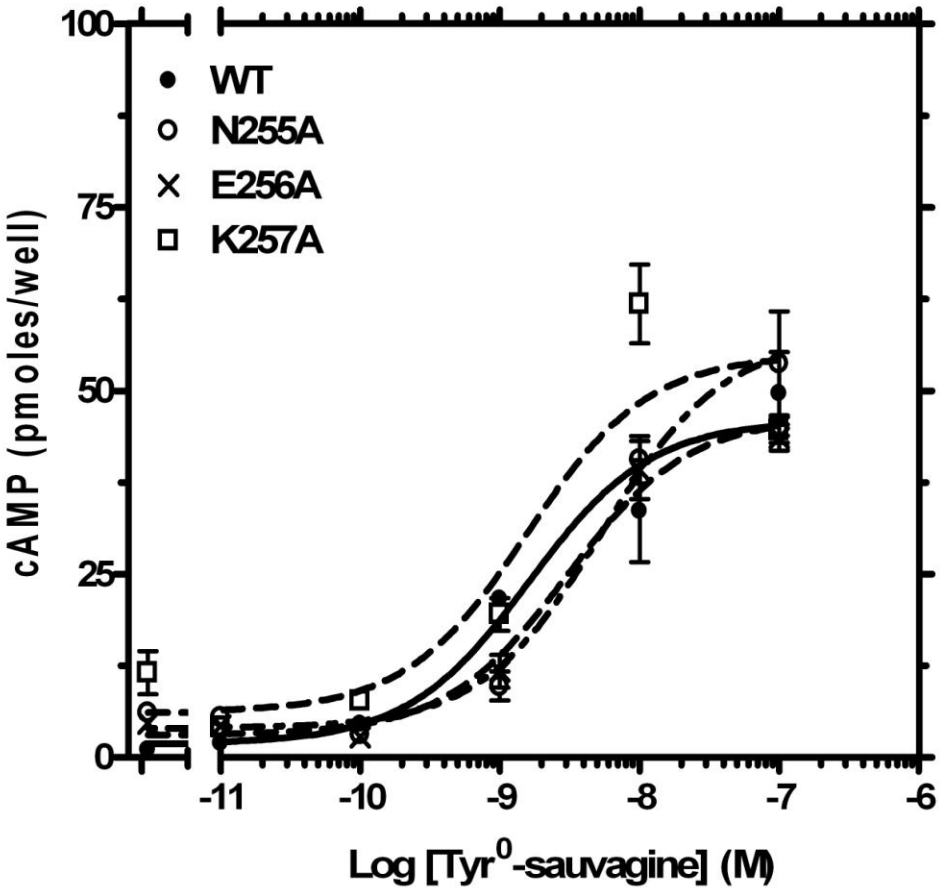
Παρόμοια με τις μεταλλάξεις των Leu251, Tyr252, Tyr253 και Asp254 οι μεταλλάξεις των Asn255, Glu256 και Lys257 σε αλανίνη δεν επηρέασαν σημαντικά τη συγγένεια δέσμευσης της σοβαγίνης για τον CRF_1 (εικόνες 48, 57). Συγκεκριμένα η σοβαγίνη δεσμευόταν στον άγριο τύπο CRF_1 (WT) και στις μεταλλαγμένες μορφές του, N255A, E256A και K257A με συγγένειες δέσμευσης ($-\log K_D$) 8,90 ± 0,07, 8,96 ± 0,19, 8,89 ± 0,05 και 8,65 ± 0,15, αντίστοιχα.

Επίδραση των μεταλλάξεων στην ισχύ της σοβαγίνης

Παρόμοια με τη συγγένεια δέσμευσης της σοβαγίνης, οι μεταλλάξεις των Asn255, Glu256 και Lys257 σε αλανίνη δεν επηρέασαν σημαντικά την ισχύ (και το μέγιστο αποτέλεσμα) με την οποία η σοβαγίνη διέγειρε την παραγωγή ενδοκυττάριου κυκλικού AMP σε HEK 293 κύτταρα τα οποία εκφράζανε τον CRF_1 (εικόνες 49, 58). Συγκεκριμένα η ισχύς με την οποία η σοβαγίνη διέγειρε την παραγωγή ενδοκυττάριου κυκλικού AMP σε HEK 293 κύτταρα τα οποία εκφράζανε σταθερά τον άγριο τύπο (WT) CRF_1 και τους μεταλλαγμένους υποδοχείς N255A, E256A και K257A ήταν ($-\log EC_{50}$) 9,07 ± 0,08, 8,49 ± 0,12, 8,68 ± 0,06 και 9,09 ± 0,13, αντίστοιχα.



Εικόνα 48. Συναγωνιστική δέσμευση της Tyr^0 – σοβαγίνης στον άγριο τύπο CRF_1 και στους μεταλλαγμένους υποδοχείς, N255A, E256A και K257A. *Ο συναγωνισμός της δέσμευσης της [^{125}I] – Tyr^0 – σοβαγίνης από την Tyr^0 – σοβαγίνη, επιτεύχθηκε όπως αναφέρεται στο κεφάλαιο ΄΄Υλικά και Μέθοδοι΄΄, σε μεμβρανικά ομογενοποιήματα κυττάρων HEK 293 που εκφράζανε σταθερά τον άγριο τύπο CRF_1 (WT), ή τους μεταλλαγμένους υποδοχείς, N255A, E256A και K257A. Οι μέσοι όροι των τιμών (εις διπλούν) και τα σταθερά λάθη τους προέρχονται από ένα χαρακτηριστικό πείραμα που έγινε 3-5 φορές με παρόμοια αποτελέσματα. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων του κάθε πειράματος έγινε μη γραμμικά και οι τιμές $-\log K_D$ υπολογίστηκαν σύμφωνα με τη μέθοδο των Motulsky και Christopoulos [202] και αναγράφονται στο κυρίως κείμενο και στην* εικόνα 57



Εικόνα 49. Διέγερση παραγωγής ενδοκυττάριου κυκλικού AMP από την Tyr^0-σοβαγίνη. *Η διέγερση της παραγωγής ενδοκυττάριου κυκλικού AMP από αυξανόμενες συγκεντρώσεις Tyr^0-σοβαγίνης, επιτεύχθηκε όπως αναφέρεται στο κεφάλαιο ΄΄Υλικά και Μέθοδοι΄΄, σε άθικτα HEK 293 κύτταρα που εκφράζανε σταθερά τον άγριο τύπο (WT) CRF$_1$ ή τους μεταλλαγμένους υποδοχείς, N255A, E256A και K257A. Οι μέσοι όροι των τιμών (εις διπλούν) και τα σταθερά λάθη τους προέρχονται από ένα χαρακτηριστικό πείραμα που έγινε 3-22 φορές με παρόμοια αποτελέσματα. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων του κάθε πειράματος έγινε μη γραμμικά και οι τιμές logEC$_{50}$ και EC$_{50}$ προσδιορίστηκαν όπως αναφέρεται στη μεθοδολογία και αναγράφονται στο κυρίως κείμενο και στην εικόνα 5.*

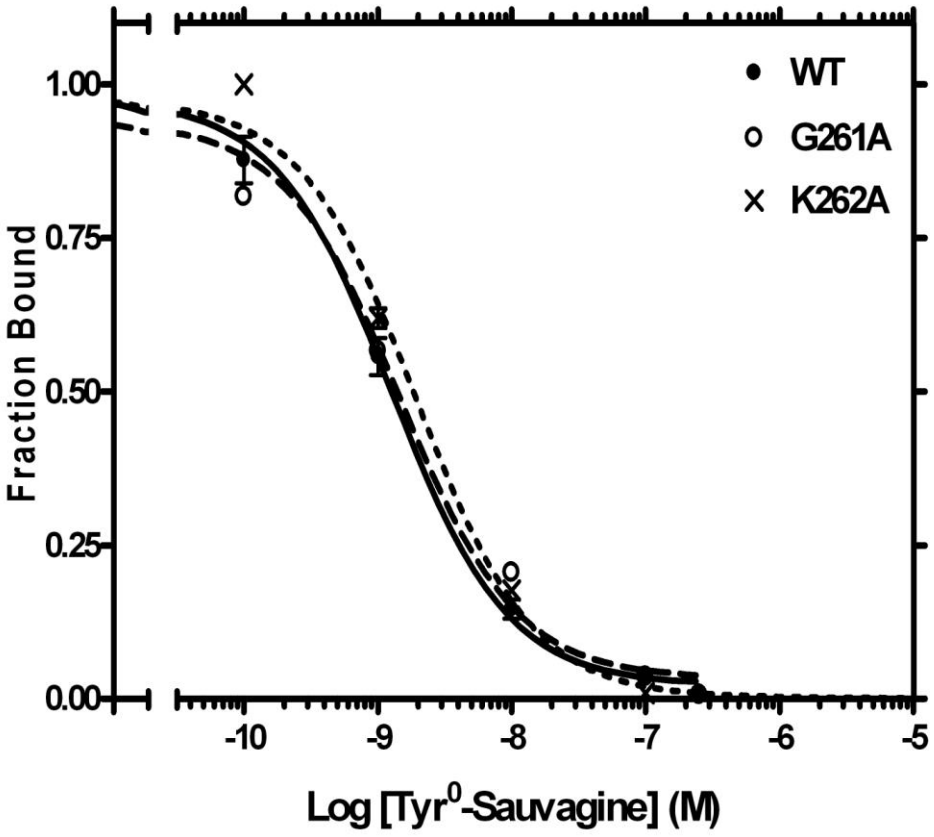
Επίδραση των G261A και K262A μεταλλάξεων στη συγγένεια δέσμευσης και ισχύ της σοβαγίνης

Επίδραση των μεταλλάξεων στη δέσμευση της σοβαγίνης

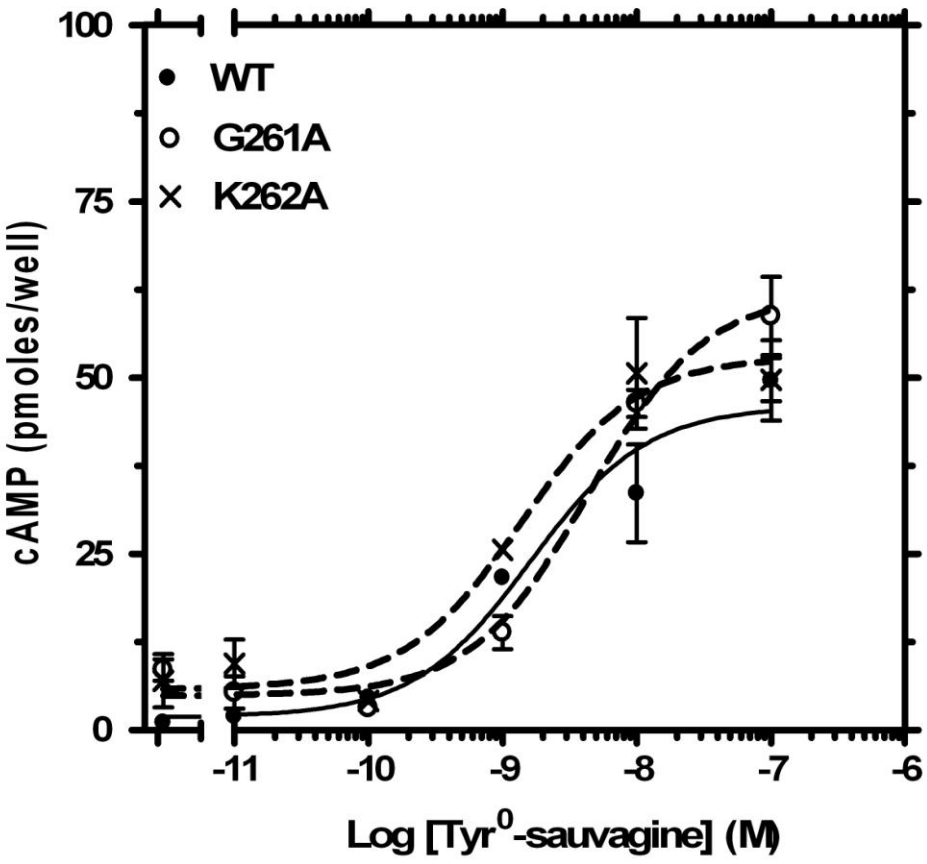
Παρόμοια με τις μεταλλάξεις των Leu251, Tyr252 Tyr253, Asp254, Asn255, Glu256 και Lys257 οι μεταλλάξεις των Gly261 και Lys262 σε αλανίνη δεν επηρέασαν σημαντικά τη συγγένεια δέσμευσης της σοβαγίνης για τον CRF_1 (εικόνες 50, 57). Συγκεκριμένα η σοβαγίνη δεσμευόταν στον άγριο τύπο (WT) CRF_1 και στις μεταλλαγμένες μορφές του, G261A και K262A με συγγένειες δέσμευσης ($-\log K_D$)8,90 ± 0,07, 8,66 ± 0,17 και 8,95 ± 0,12, αντίστοιχα.

Επίδραση των μεταλλάξεων στην ισχύ της σοβαγίνης

Παρόμοια με τη συγγένεια δέσμευσης της σοβαγίνης, οι μεταλλάξεις των Gly261 και Lys262 σε αλανίνη, δεν επηρέασαν σημαντικά την ισχύ (και το μέγιστο αποτέλεσμα) με την οποία η σοβαγίνη διέγειρε την παραγωγή ενδοκυττάριου κυκλικού AMP σε HEK 293 κύτταρα τα οποία εκφράζανε τον CRF_1 (εικόνες 51, 58). Συγκεκριμένα η ισχύς με την οποία η σοβαγίνη διέγειρε την παραγωγή ενδοκυττάριου κυκλικού AMP σε HEK 293 κύτταρα τα οποία εκφράζανε σταθερά τον άγριο τύπο (WT) CRF_1 και τους μεταλλαγμένους υποδοχείς G261A και K262A ήταν ($-\log EC_{50}$) 9,07 ± 0,08, 8,42 ± 0,14 και 8,92 ± 0,08, αντίστοιχα.



Εικόνα 50. Συναγωνιστική δέσμευση της Tyr^0 – σοβαγίνης στον άγριο τύπο CRF$_1$ και στους μεταλλαγμένους υποδοχείς, G261A και K262A. *Ο συναγωνισμός της δέσμευσης της [^{125}I] – Tyr^0 – σοβαγίνης από την Tyr^0 – σοβαγίνη, επιτεύχθηκε όπως αναφέρεται στο κεφάλαιο ΄΄Υλικά και Μέθοδοι΄΄, σε μεμβρανικά ομογενοποιήματα κυττάρων HEK 293 που εκφράζανε σταθερά τον άγριο τύπο CRF$_1$ (WT), ή τους μεταλλαγμένους υποδοχείς, G261A και K262A. Οι μέσοι όροι των τιμών (εις διπλούν) και τα σταθερά λάθη τους προέρχονται από ένα χαρακτηριστικό πείραμα που έγινε 3-5 φορές με παρόμοια αποτελέσματα. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων του κάθε πειράματος έγινε μη γραμμικά και οι τιμές -logK$_D$ υπολογίστηκαν σύμφωνα με τη μέθοδο των Motulsky και Christopoulos [202] και αναγράφονται στο κυρίως κείμενο και στην* εικόνα 57



Εικόνα 51. Διέγερση παραγωγής ενδοκυττάριου κυκλικού AMP από την Tyr^0-σοβαγίνη. *Η διέγερση της παραγωγής ενδοκυττάριου κυκλικού AMP από αυξανόμενες συγκεντρώσεις Tyr^0-σοβαγίνης, επιτεύχθηκε όπως αναφέρεται στο κεφάλαιο ΄΄Υλικά και Μέθοδοι΄΄, σε άθικτα HEK 293 κύτταρα που εκφράζανε σταθερά τον άγριο τύπο (WT) CRF$_1$ ή τους μεταλλαγμένους υποδοχείς, G261A και K262A. Οι μέσοι όροι των τιμών (εις διπλούν) και τα σταθερά λάθη τους προέρχονται από ένα χαρακτηριστικό πείραμα που έγινε 3-22 φορές με παρόμοια αποτελέσματα. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων του κάθε πειράματος έγινε μη γραμμικά και οι τιμές logEC$_{50}$ και EC$_{50}$ προσδιορίστηκαν όπως αναφέρεται στη μεθοδολογία και αναγράφονται στο κυρίως κείμενο και στην εικόνα 58*

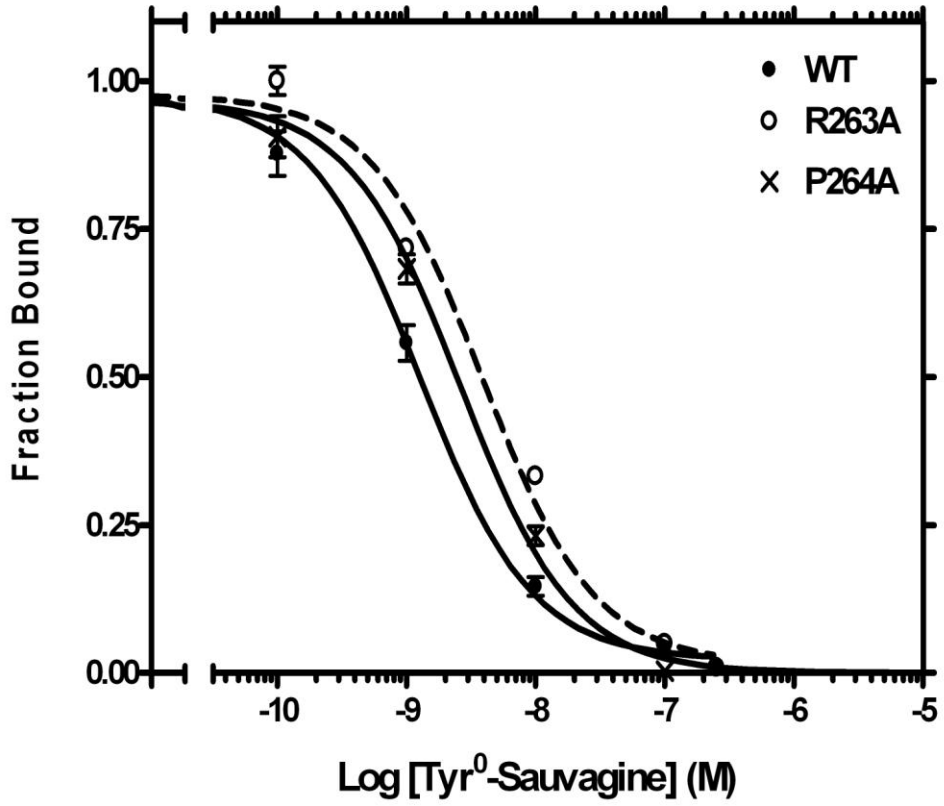
Επίδραση των R263A και P264A μεταλλάξεων στη συγγένεια δέσμευσης και ισχύ της σοβαγίνης

Επίδραση των μεταλλάξεων στη δέσμευση της σοβαγίνης

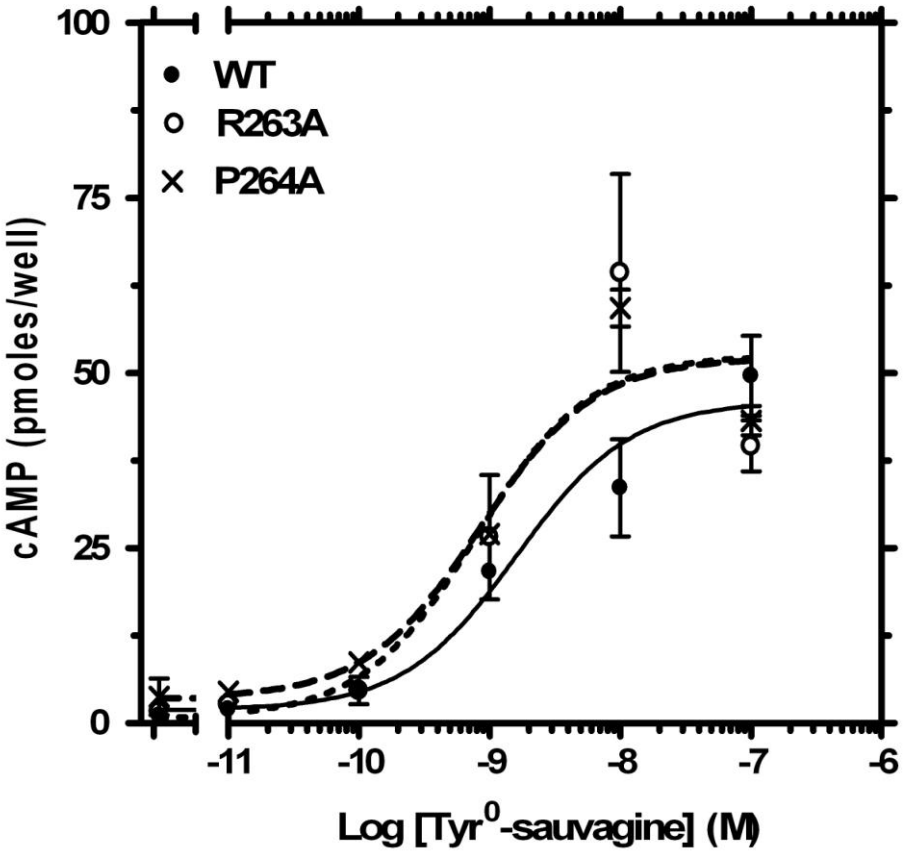
Παρόμοια με τις μεταλλάξεις των Leu251, Tyr252 Tyr253, Asp254, Asn255, Glu256, Lys257, Gly261 και Lys262 οι μεταλλάξεις των Arg263 και Pro264 σε αλανίνη δεν επηρέασαν σημαντικά τη συγγένεια δέσμευσης της σοβαγίνης για τον CRF_1 (εικόνες 52, 57). Συγκεκριμένα η σοβαγίνη δεσμευόταν στον άγριο τύπο CRF_1 (WT) και στις μεταλλαγμένες μορφές του, R263A και P264A με συγγένειες δέσμευσης ($-\log K_D$) 8,90 ± 0,07, 8,55 ± 0,20 και 8,68 ± 0,17, αντίστοιχα.

Επίδραση των μεταλλάξεων στην ισχύ της σοβαγίνης

Παρόμοια με τη συγγένεια δέσμευσης της σοβαγίνης, οι μεταλλάξεις των Arg263 και Pro264 σε αλανίνη, δεν επηρέασαν σημαντικά την ισχύ (και το μέγιστο αποτέλεσμα) με την οποία η σοβαγίνη διέγειρε την παραγωγή ενδοκυττάριου κυκλικού AMP σε HEK 293 κύτταρα τα οποία εκφράζανε τον CRF_1 (εικόνες 53, 58). Συγκεκριμένα η ισχύς με την οποία η σοβαγίνη διέγειρε την παραγωγή ενδοκυττάριου κυκλικού AMP σε HEK 293 κύτταρα τα οποία εκφράζανε σταθερά τον άγριο τύπο (WT) CRF_1 και τους μεταλλαγμένους υποδοχείς R263A και P264A ήταν ($-\log EC_{50}$) 9,07 ± 0,08, 9,51 ± 0,53 και 9,14 ± 0,18, αντίστοιχα.



Εικόνα 52. Συναγωνιστική δέσμευση της Tyr^0 – σοβαγίνης στον άγριο τύπο CRF_1 και στους μεταλλαγμένους υποδοχείς, R263A και P264A. *Ο συναγωνισμός της δέσμευσης της [^{125}I] – Tyr^0 – σοβαγίνης από την Tyr^0 – σοβαγίνη, επιτεύχθηκε όπως αναφέρεται στο κεφάλαιο ΄΄Υλικά και Μέθοδοι΄΄, σε μεμβρανικά ομογενοποιήματα κυττάρων HEK 293 που εκφράζανε σταθερά τον άγριο τύπο CRF_1 (WT), ή τους μεταλλαγμένους υποδοχείς, R263A και P264A. Οι μέσοι όροι των τιμών (εις διπλούν) και τα σταθερά λάθη τους προέρχονται από ένα χαρακτηριστικό πείραμα που έγινε 3-5 φορές με παρόμοια αποτελέσματα. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων του κάθε πειράματος έγινε μη γραμμικά και οι τιμές -logK_D υπολογίστηκαν σύμφωνα με τη μέθοδο των Motulsky και Christopoulos [202] και αναγράφονται στο κυρίως κείμενο και στην εικόνα 57*



Εικόνα 53. Διέγερση παραγωγής ενδοκυττάριου κυκλικού AMP από την Tyr^0-σοβαγίνη. *Η διέγερση της παραγωγής ενδοκυττάριου κυκλικού AMP από αυξανόμενες συγκεντρώσεις Tyr^0-σοβαγίνης, επιτεύχθηκε όπως αναφέρεται στο κεφάλαιο ΄΄Υλικά και Μέθοδοι΄΄, σε άθικτα HEK 293 κύτταρα που εκφράζανε σταθερά τον άγριο τύπο (WT) CRF$_1$ ή τους μεταλλαγμένους υποδοχείς, R263A και P264A. Οι μέσοι όροι των τιμών (εις διπλούν) και τα σταθερά λάθη τους προέρχονται από ένα χαρακτηριστικό πείραμα που έγινε 3-22 φορές με παρόμοια αποτελέσματα. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων του κάθε πειράματος έγινε μη γραμμικά και οι τιμές logEC$_{50}$ και EC$_{50}$ προσδιορίστηκαν όπως αναφέρεται στη μεθοδολογία και αναγράφονται στο κυρίως κείμενο και στην* εικόνα 58

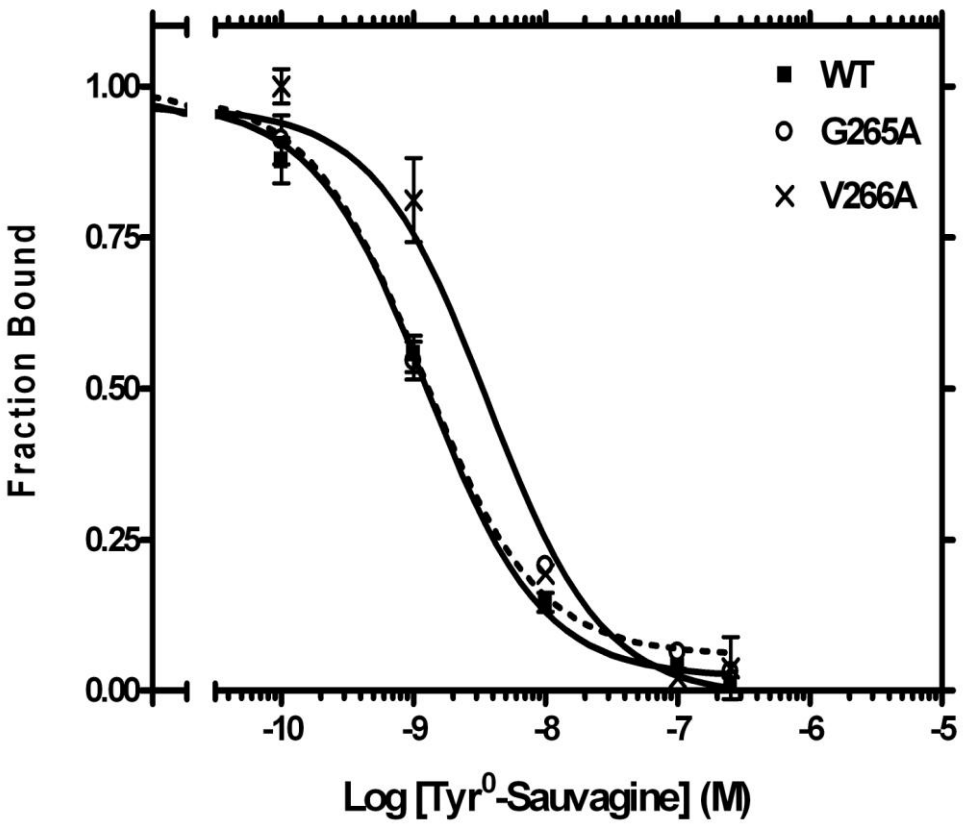
Επίδραση των G265A και V266A μεταλλάξεων στη συγγένεια δέσμευσης και ισχύ της σοβαγίνης

Επίδραση των μεταλλάξεων στη δέσμευση της σοβαγίνης

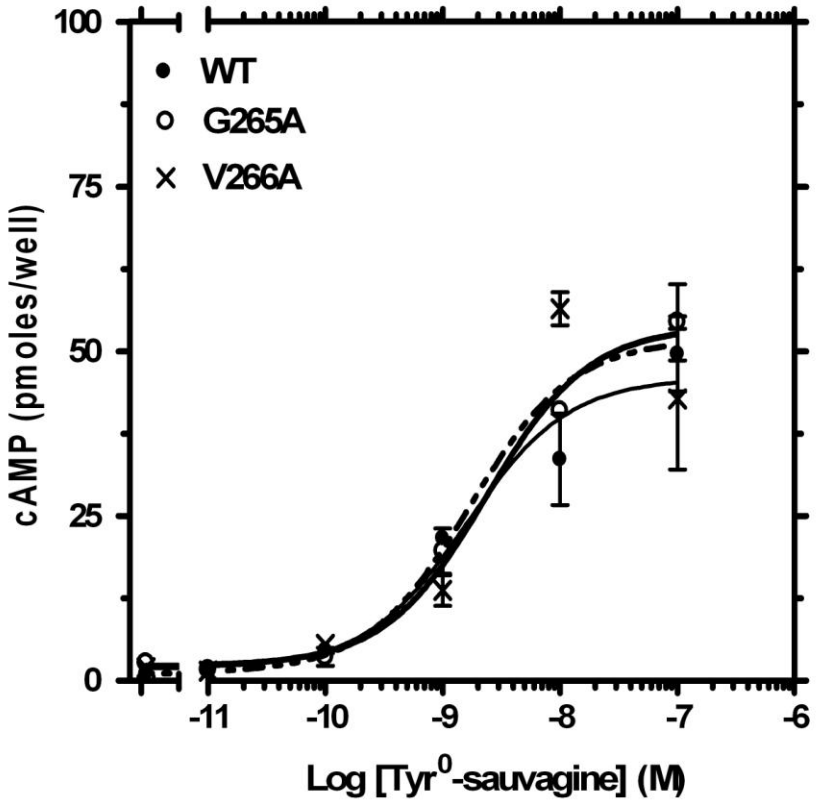
Παρόμοια με τις μεταλλάξεις των Leu251, Tyr252 Tyr253, Asp254, Asn255, Glu256, Lys257, Gly261 Lys262, Arg263 και Pro264 οι μεταλλάξεις των Gly265 και Val266 σε αλανίνη δεν επηρέασαν σημαντικά τη συγγένεια δέσμευσης της σοβαγίνης για τον CRF_1 (εικόνες 54, 57). Συγκεκριμένα η σοβαγίνη δεσμευόταν στον άγριο τύπο CRF_1 (WT) και στις μεταλλαγμένες μορφές του, G265A και V266A με συγγένειες δέσμευσης ($-\log K_D$) 8,90 ± 0,07, 8,82 ± 0,14 και 8,67 ± 0,22, αντίστοιχα.

Επίδραση των μεταλλάξεων στην ισχύ της σοβαγίνης

Παρόμοια με τη συγγένεια δέσμευσης της σοβαγίνης, οι μεταλλάξεις των Gly265 και Val266 σε αλανίνη, δεν επηρέασαν σημαντικά την ισχύ (και το μέγιστο αποτέλεσμα) με την οποία η σοβαγίνη διέγειρε την παραγωγή ενδοκυττάριου κυκλικού AMP σε HEK 293 κύτταρα τα οποία εκφράζανε τον CRF_1 (εικόνες 55, 58). Συγκεκριμένα η ισχύς με την οποία η σοβαγίνη διέγειρε την παραγωγή ενδοκυττάριου κυκλικού AMP σε HEK 293 κύτταρα τα οποία εκφράζανε σταθερά τον άγριο τύπο (WT) CRF_1 και τους μεταλλαγμένους υποδοχείς G265A και V266A ήταν ($-\log EC_{50}$) 9,07 ± 0,08, 9,09 ± 0,48 και 9,00 ± 0,12, αντίστοιχα.



Εικόνα 54. Συναγωνιστική δέσμευση της Tyr^0 – σοβαγίνης στον άγριο τύπο CRF_1 και στους μεταλλαγμένους υποδοχείς, G265A και V266A. *Ο συναγωνισμός της δέσμευσης της [^{125}I] – Tyr^0 – σοβαγίνης από την Tyr^0 – σοβαγίνη, επιτεύχθηκε όπως αναφέρεται στο κεφάλαιο ΄΄Υλικά και Μέθοδοι΄΄, σε μεμβρανικά ομογενοποιήματα κυττάρων HEK 293 που εκφράζανε σταθερά τον άγριο τύπο CRF_1 (WT), ή τους μεταλλαγμένους υποδοχείς, G265A και V266A. Οι μέσοι όροι των τιμών (εις διπλούν) και τα σταθερά λάθη τους προέρχονται από ένα χαρακτηριστικό πείραμα που έγινε 3-5 φορές με παρόμοια αποτελέσματα. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων του κάθε πειράματος έγινε μη γραμμικά και οι τιμές - $logK_D$ υπολογίστηκαν σύμφωνα με τη μέθοδο των Motulsky και Christopoulos [202] και αναγράφονται στο κυρίως κείμενο και στην εικόνα 57*



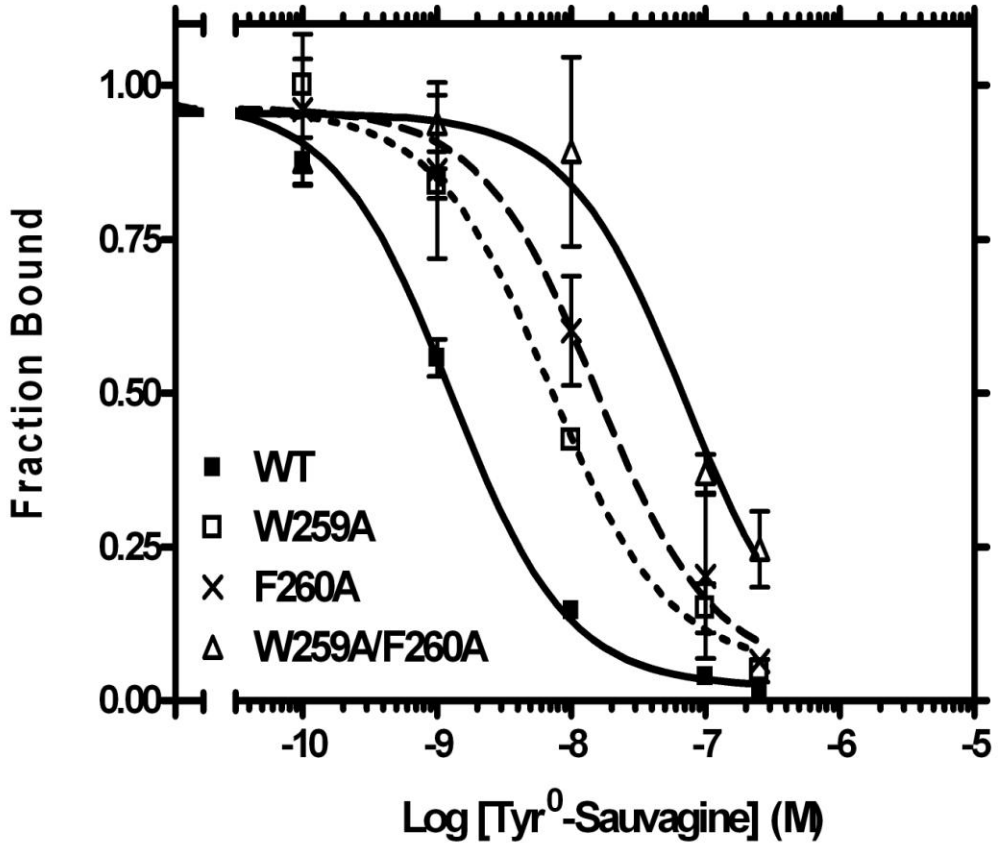
Εικόνα 55. Διέγερση παραγωγής ενδοκυττάριου κυκλικού AMP από την Tyr^0-σοβαγίνη. *Η διέγερση της παραγωγής ενδοκυττάριου κυκλικού AMP από αυξανόμενες συγκεντρώσεις Tyr^0-σοβαγίνης, επιτεύχθηκε όπως αναφέρεται στο κεφάλαιο ΄΄Υλικά και Μέθοδοι΄΄, σε άθικτα HEK 293 κύτταρα που εκφράζανε σταθερά τον άγριο τύπο (WT) CRF_1 ή τους μεταλλαγμένους υποδοχείς, G265A και V266A. Οι μέσοι όροι των τιμών (εις διπλούν) και τα σταθερά λάθη τους προέρχονται από ένα χαρακτηριστικό πείραμα που έγινε 3-22 φορές με παρόμοια αποτελέσματα. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων του κάθε πειράματος έγινε μη γραμμικά και οι τιμές logEC_{50} και EC_{50} προσδιορίστηκαν όπως αναφέρεται στη μεθοδολογία και αναγράφονται στο κυρίως κείμενο και στην εικόνα 58*

Επίδραση των W259A, F260A και W259A/F260A μεταλλάξεων στη συγγένεια δέσμευσης και ισχύ της σοβαγίνης

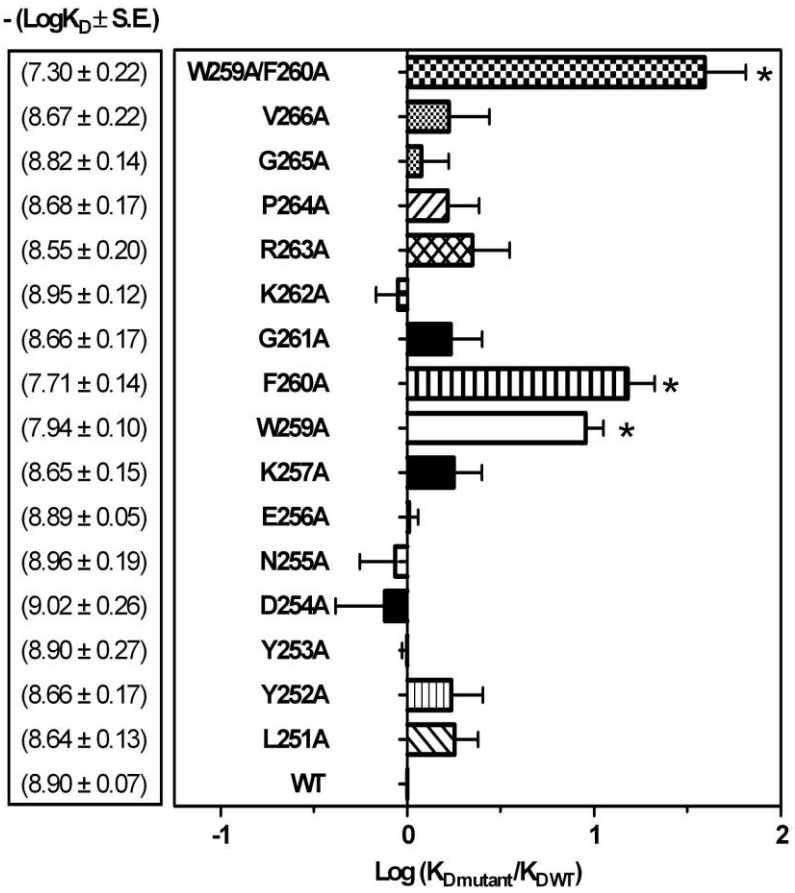
Επίδραση των μεταλλάξεων W259A, F260A και W259A/F260A στη δέσμευση της σοβαγίνης

Αντίθετα με τις μεταλλάξεις των Leu251, Tyr252, Tyr253, Asp254, Asn255, Glu256, Lys257, Gly261, Lys262, Arg263, Pro264, Gly265 και Val266 οι μεταλλάξεις των Trp259 και Phe260 σε αλανίνη επηρέασαν σημαντικά τη συγγένεια δέσμευσης της σοβαγίνης για τον CRF_1 (εικόνες 56, 69 και 57 και πίνακας 2). Συγκεκριμένα η σοβαγίνη δεσμευόταν στον άγριο τύπο CRF_1 (WT) και στις μεταλλαγμένες μορφές του, W259A και F260A με συγγένειες δέσμευσης ($-\log K_D$) 8,90 ± 0,07, 7,94 ± 0,10 και 7,71 ± 0,14, αντίστοιχα. Δηλαδή οι μεταλλάξεις W259A και F260A μείωσαν τη συγγένεια δέσμευσης της [^{125}I] – Tyr^0 – σοβαγίνης 9 και 15 φορές αντίστοιχα.

Επιπρόσθετα, ταυτόχρονη μετάλλαξη των Trp259 και Phe260 σε αλανίνη δημιουργώντας έτσι το μεταλλαγμένο υποδοχέα W259A/F260A ελάττωσε συνεργιστικά (σε σχέση με τις απλές μεταλλάξεις) τη συγγένεια δέσμευσης της σοβαγίνης για τον CRF_1 (εικόνες 56, 69 και 57 και πίνακας 2). Συγκεκριμένα, η διπλή αυτή μετάλλαξη μείωσε τη συγγένεια της [^{125}I] – Tyr^0 – σοβαγίνης 39,5 φορές με αποτέλεσμα η σοβαγίνη να δεσμευόταν στον W259A/F260A με συγγένεια δέσμευσης ίση με ($-\log K_D$) 7,30 ± 0,22.



Εικόνα 56. Συναγωνιστική δέσμευση της Tyr^0 – σοβαγίνης στον άγριο τύπο CRF$_1$ και στους μεταλλαγμένους υποδοχείς, W259A, F260A και W259A/F260A. *Ο συναγωνισμός της δέσμευσης της [^{125}I] – Tyr^0 – σοβαγίνης από την Tyr^0 – σοβαγίνη, επιτεύχθηκε όπως αναφέρεται στο κεφάλαιο ΄΄Υλικά και Μέθοδοι΄΄, σε μεμβρανικά ομογενοποιήματα κυττάρων HEK 293 που εκφράζανε σταθερά τον άγριο τύπο CRF$_1$ (WT), ή τους μεταλλαγμένους υποδοχείς, W259A, F260A και W259A/F260A. Οι μέσοι όροι των τιμών (εις διπλούν) και τα σταθερά λάθη τους προέρχονται από ένα χαρακτηριστικό πείραμα που έγινε 3-5 φορές με παρόμοια αποτελέσματα. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων του κάθε πειράματος έγινε μη γραμμικά και οι τιμές -logK$_D$ υπολογίστηκαν σύμφωνα με τη μέθοδο των Motulsky και Christopoulos [202] και αναγράφονται στο κυρίως κείμενο, στην εικόνα 69 και στην εικόνα 57και πίνακα 2*

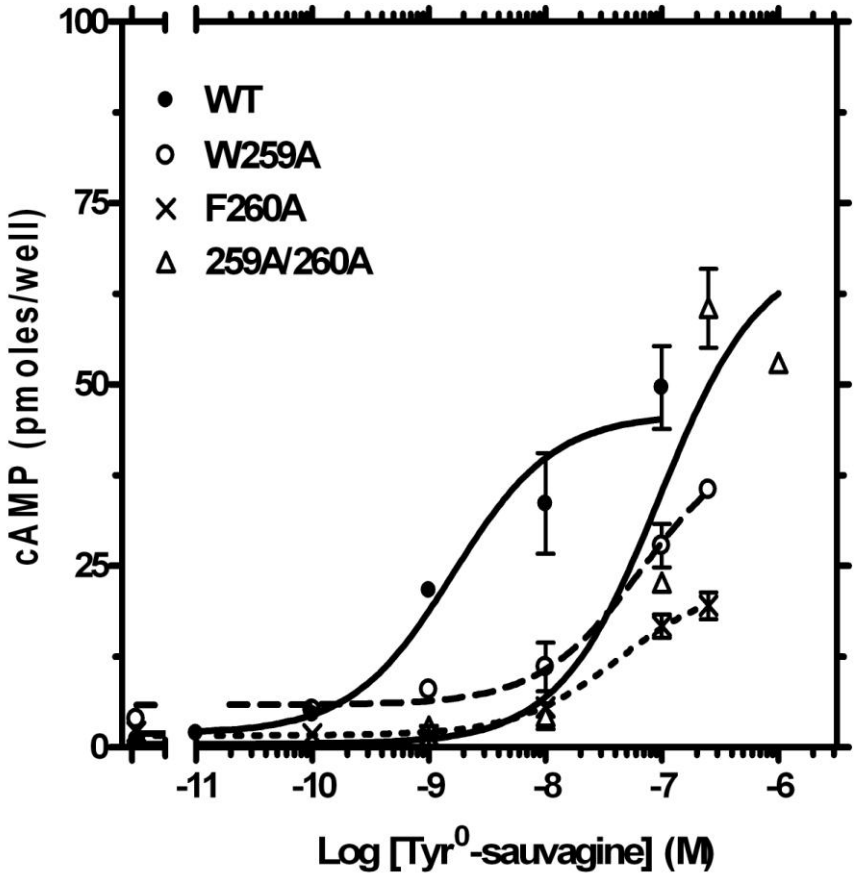


Εικόνα 57. Επίδραση των μεταλλάξεων σε αλανίνη των αμινοξέων του δεύτερου εξωκυττάριου βρόγχου του CRF$_1$ στη συγγένεια δέσμευσης της Tyr^0 – σοβαγίνης. *Οι τιμές -logK$_D$ (συγγένειες δέσμευσης Tyr^0 – σοβαγίνης) για τον άγριο τύπο CRF$_1$ (WT) και τους μεταλλαγμένους υποδοχείς L251A-V266A υπολογίστηκαν από τα αποτελέσματα των πειραμάτων στις εικόνες 44, 46, 48, 50, 52, 54 και 56. Οι στήλες αντιπροσωπεύουν την αλλαγή στη συγγένεια δέσμευσης της Tyr^0 – σοβαγίνης για τον CRF$_1$, που είναι αποτέλεσμα της κάθε μετάλλαξης. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των τιμών logK$_D$ της Tyr^0 – σοβαγίνης για τον WT και τον κάθε μεταλλαγμένο υποδοχέα, υπολογίστηκαν με τη χρήση της ανάλυσης διασποράς (ANOVA) και στη συνέχεια με Bonferoni's post hoc test (* p<0.05 στατιστικώς σημαντική διαφορά).*

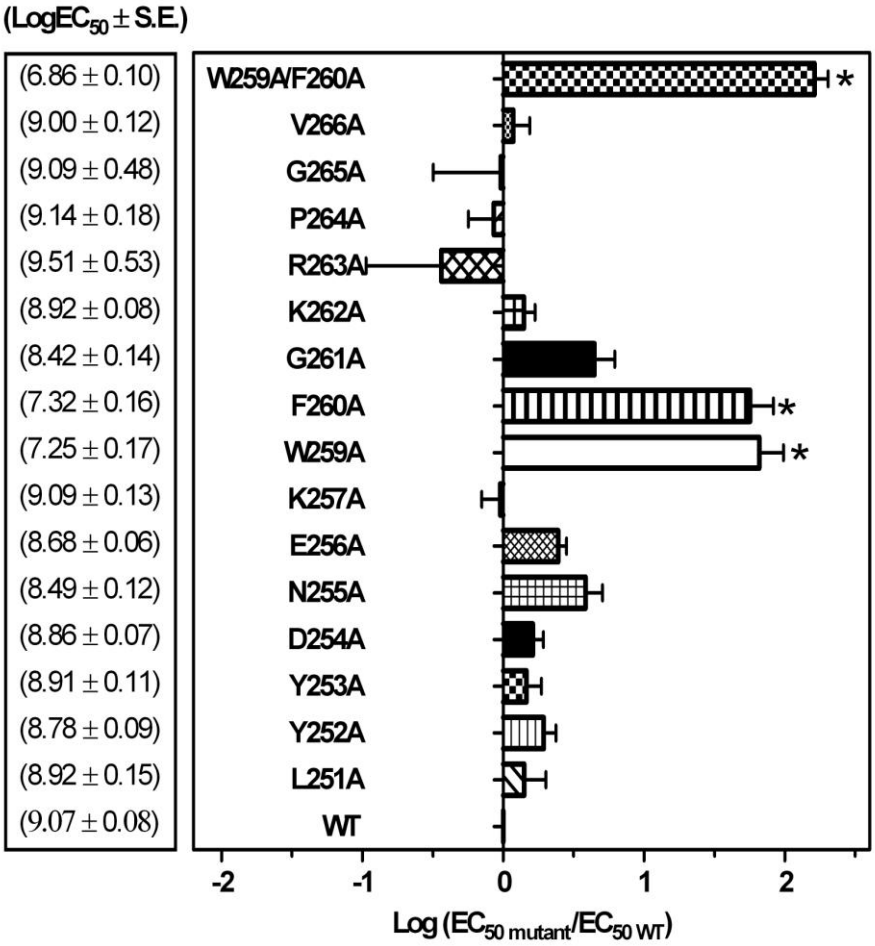
Επίδραση των μεταλλάξεων W259A, F260A και W259A/F260A στην ισχύ της σοβαγίνης.

Παρόμοια με τη συγγένεια δέσμευσης της σοβαγίνης, οι μεταλλάξεις των Trp259 και Phe260 σε αλανίνη μείωσαν σημαντικά την ισχύ με την οποία η σοβαγίνη διέγειρε την παραγωγή ενδοκυττάριου κυκλικού AMP σε HEK 293 κύτταρα τα οποία εκφράζανε τον CRF_1 (εικόνες 59 και 58). Συγκεκριμένα η ισχύς με την οποία η σοβαγίνη διέγειρε την παραγωγή ενδοκυττάριου κυκλικού AMP σε HEK 293 κύτταρα τα οποία εκφράζανε σταθερά τον άγριο τύπο (WT) CRF_1 και τους μεταλλαγμένους υποδοχείς W259A και F260A ήταν (-logEC_{50}) 9,07 ± 0,08, 7,25 ± 0,17 και 7,32 ± 0,16, αντίστοιχα. Δηλαδή οι μεταλλάξεις W259A και F260A μείωσαν την ισχύ της Tyr^0-σοβαγίνης 65,5 και 56,5 φορές αντίστοιχα.

Επιπρόσθετα ταυτόχρονη μετάλλαξη των Trp259 και Phe260 σε αλανίνη δημιουργώντας έτσι το μεταλλαγμένο υποδοχέα W259A/F260A ελάττωσε συνεργιστικά (σε σχέση με τις απλές μεταλλάξεις) την ισχύ της σοβαγίνης (εικόνες 59 και 58). Συγκεκριμένα η διπλή αυτή μετάλλαξη μείωσε την ισχύ της σοβαγίνης 161,5 φορές, με αποτέλεσμα η ισχύς του πεπτιδίου αυτού με την οποία διέγειρε τη παραγωγή κυκλικού AMP να ήταν ίση με (-logEC_{50}) 6,86 ± 0,10



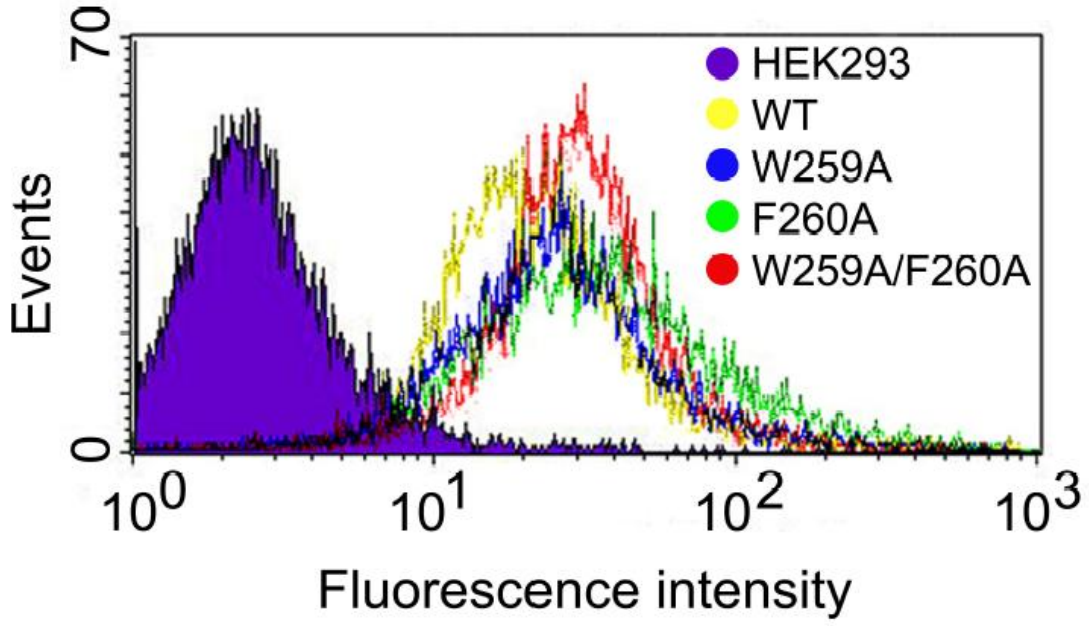
Εικόνα 59. Διέγερση παραγωγής ενδοκυττάριου κυκλικού AMP από την Tyr^0-σοβαγίνη. *Η διέγερση της παραγωγής ενδοκυττάριου κυκλικού AMP από αυξανόμενες συγκεντρώσεις Tyr^0-σοβαγίνης, επιτεύχθηκε όπως αναφέρεται στο κεφάλαιο ΄΄Υλικά και Μέθοδοι΄΄, σε άθικτα HEK 293 κύτταρα που εκφράζανε σταθερά τον άγριο τύπο CRF$_1$ (WT) ή τους μεταλλαγμένους υποδοχείς, W259A,F260A και W259A/F260A. Οι μέσοι όροι των τιμών (εις διπλούν) και τα σταθερά λάθη τους προέρχονται από ένα χαρακτηριστικό πείραμα που έγινε 5-22 φορές με παρόμοια αποτελέσματα. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων του κάθε πειράματος έγινε μη γραμμικά και οι τιμές logEC$_{50}$ και EC$_{50}$ προσδιορίστηκαν όπως αναφέρεται στη μεθοδολογία και αναγράφονται στο κυρίως κείμενο και στην εικονα 58*



Εικόνα 58. Επίδραση των μεταλλάξεων σε αλανίνη των αμινοξέων του δεύτερου εξωκυττάριου βρόγχου του CRF_1 στην ισχύ της Tyr^0-σοβαγίνης.*Η ισχύς (τιμές -logEC_{50}) με την οποία η Tyr^0-σοβαγίνη διέγειρε την παραγωγή κυκλικού AMP σε κύτταρα που εκφράζανε τον άγριο τύπο CRF_1 (WT) ή τους μεταλλαγμένους υποδοχείς L251A-V266A, υπολογίστηκε από τα αποτελέσματα των πειραμάτων στις εικόνες 45, 47, 49, 51, 53, 55 και 59. Οι στήλες αντιπροσωπεύουν την αλλαγή στην ισχύ της Tyr^0-σοβαγίνης που είναι αποτέλεσμα των μεταλλάξεων. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των τιμών logEC_{50} της Tyr^0-σοβαγίνης για τον WT και το κάθε μεταλλαγμένο υποδοχέα, υπολογίστηκαν με τη χρήση της ανάλυσης διασποράς (ANOVA) και στη συνέχεια με Bonferoni's post hoc test (* $p<0.05$ στατιστικώς σημαντική διαφορά.*

Έκφραση των υποδοχέων του CRF στην πλασματική μεμβράνη των κυττάρων πριν και μετά τις μεταλλάξεις W259A, F260A και W259A/F260A

Η έκφραση του άγριου τύπουCRF$_1$ (WT), καθώς και των μεταλλαγμένων μορφών του, W259A, F260A και W259A/F260A στην πλασματική μεμβράνη των HEK 293 κυττάρων τους, προσδιορίστηκε με τη χρήση της κυτταρομετρίας ροής και με τη βοήθεια του φθορίζοντος αντισώματος anti-goat IgG το οποίο ήταν συζευγμένο με ισοθειοκυανική φθορισεΐνη. Όπως φαίνεται στην εικόνα 60 η έκφραση όλων των παραπάνω υποδοχέων στην πλασματική μεμβράνη των κυττάρων τους ήταν παρόμοια.



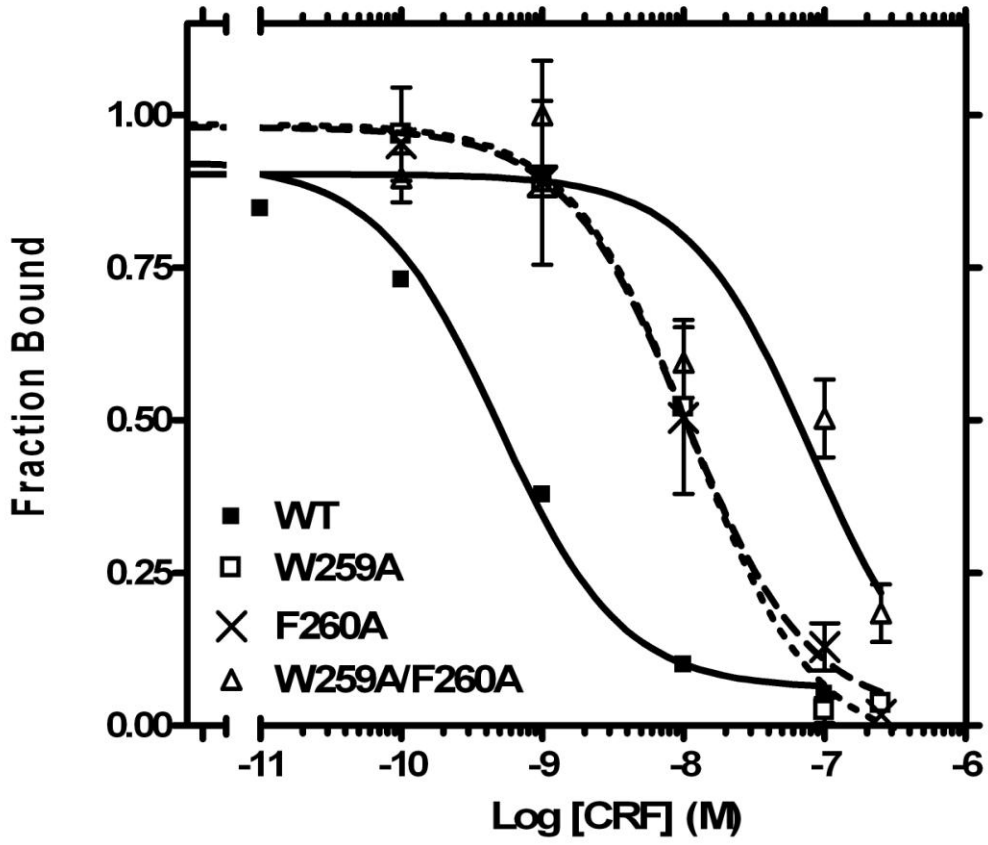
Εικόνα 60. Έκφραση του άγριου τύπου CRF_1 και των μεταλλαγμένων υποδοχέων W259A, F260A και W259A/F260A στην πλασματική μεμβράνη κυττάρων HEK293. *Κύτταρα HEK 293 τα οποία εκφράζανε τον άγριο τύπο CRF_1 (WT) και τους μεταλλαγμένους υποδοχείς W259A, F260A ή W259A/F260A, καθώς και κύτταρα που δεν έκφραζανε τους υποδοχείς αυτούς (HEK 293), επωάστηκαν με το αντίσωμα anti-CRF_1 και στη συνέχεια έγινε χρώση τους με αντίσωμα όρνιθας anti-goat IgG. Η χρώση των κυττάρων αναλύθηκε με τη χρήση του κυτταρομετρητή τύπου Beckton-Dickinson FACSArray και με τη βοήθεια του προγράμματος CellQuest software.*

Επίδραση των μεταλλάξεων W259A, F260A και W259A/F260A στη συγγένεια δέσμευσης και ισχύ του CRF

Επίδραση των μεταλλάξεων W259A, F260A και W259A/F260A στη δέσμευση του CRF

Παρόμοια με τη σοβαγίνη, οι μεταλλάξεις των Trp259 και Phe260 σε αλανίνη επηρέασαν σημαντικά τη συγγένεια δέσμευσης του CRF για τον CRF_1 (εικόνες 61 και 66 και πίνακας 1). Συγκεκριμένα ο CRF δεσμευόταν στον άγριο τύπο CRF_1 (WT) και στις μεταλλαγμένες μορφές του, W259A και F260A με συγγένειες δέσμευσης ($-\log K_i$) 9,14 ± 0,07, 7,85 ± 0,07 και 7,90 ± 0,07, αντίστοιχα. Δηλαδή οι μεταλλάξεις W259A και F260A μείωσαν τη συγγένεια δέσμευσης του CRF 19 και 17 φορές αντίστοιχα.

Επιπρόσθετα ταυτόχρονη μετάλλαξη των Trp259 και Phe260 σε αλανίνη δημιουργώντας έτσι το μεταλλαγμένο υποδοχέα W259A/F260A ελάττωσε συνεργιστικά (σε σχέση με τις απλές μεταλλάξεις) τη συγγένεια δέσμευσης του CRF για τον CRF_1 (εικόνες 61 και 66 και πίνακας 1). Συγκεκριμένα, η διπλή αυτή μετάλλαξη μείωσε τη συγγένεια του CRF 47,5 φορές με αποτέλεσμα ο CRF να δεσμευόταν στον W259A/F260A με συγγένεια δέσμευσης ίση με ($-\log K_i$) 7,46 ± 0,22.

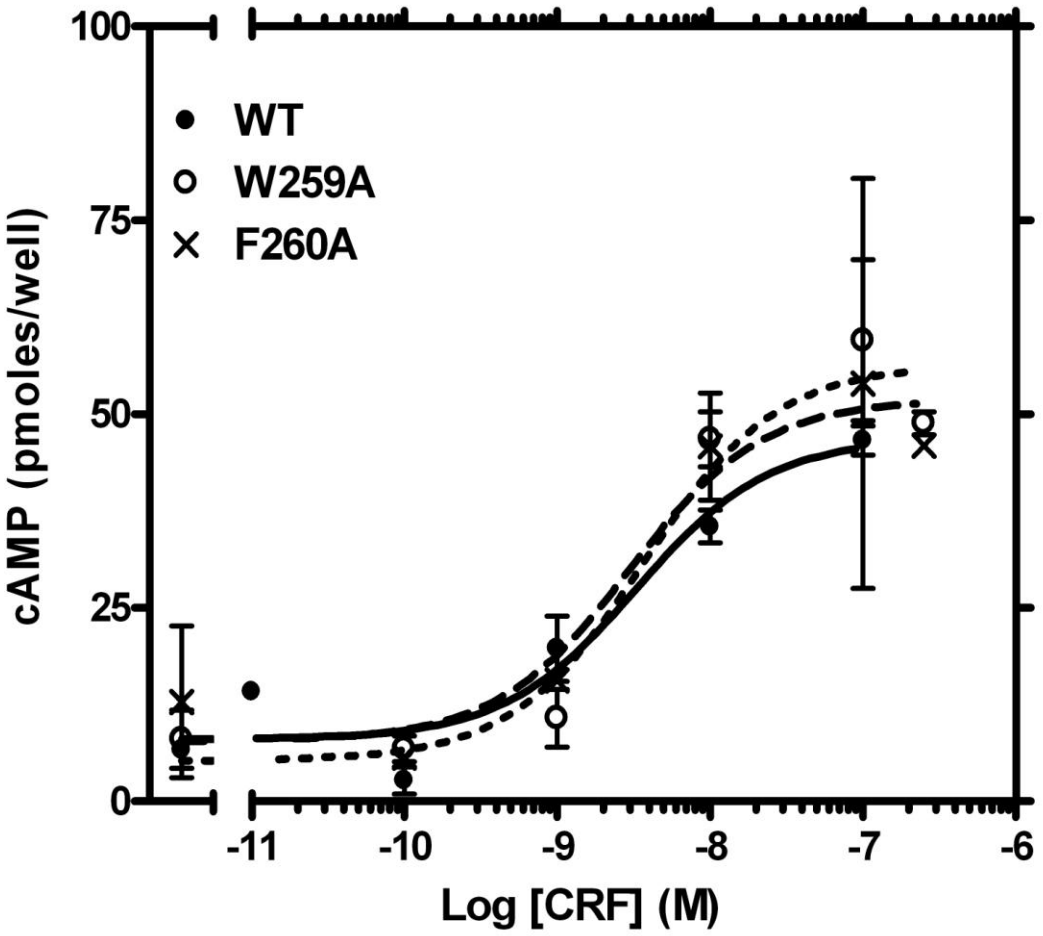


Εικόνα 61. Συναγωνιστική δέσμευση του CRF στον άγριο τύπο CRF_1 και στους μεταλλαγμένους υποδοχείς, W259A, F260A και W259A/F260A. *Ο συναγωνισμός της δέσμευσης της [^{125}I] – Tyr^0 – σοβαγίνης από τον CRF, επιτεύχθηκε όπως αναφέρεται στο κεφάλαιο ΄΄Υλικά και Μέθοδοι΄΄, σε μεμβρανικά ομογενοποιήματα κυττάρων HEK 293 που εκφράζανε σταθερά τον άγριο τύπο CRF_1 (WT), ή τους μεταλλαγμένους υποδοχείς, W259A, F260A και W259A/F260A. Οι μέσοι όροι των τιμών (εις διπλούν) και τα σταθερά λάθη τους προέρχονται από ένα χαρακτηριστικό πείραμα που έγινε 3-6 φορές με παρόμοια αποτελέσματα. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων του κάθε πειράματος έγινε μη γραμμικά και οι τιμές -logK_i υπολογίστηκαν από τις αντίστοιχες τιμές -logIC_{50}, σύμφωνα με τη μέθοδο Cheng και Prusoff [201] και αναγράφονται στο κυρίως κείμενο,στην εικόνα 66 και στον πίνακα 1.*

Επίδραση των μεταλλάξεων W259A και F260A στην ισχύ του CRF

Σε αντίθεση με τη συγγένεια δέσμευσης του CRF, οι μεταλλάξεις των Trp259 και Phe260 σε αλανίνη, δεν επηρέασαν σημαντικά την ισχύ (και το μέγιστο αποτέλεσμα) με την οποία το πεπτίδιο αυτό διέγειρε την παραγωγή ενδοκυττάριου κυκλικού AMP σε HEK 293 κύτταρα τα οποία εκφράζανε τον CRF_1 (εικόνα 62). Συγκεκριμένα η ισχύς με την οποία ο CRF διέγειρε την παραγωγή ενδοκυττάριου κυκλικού AMP σε HEK 293 κύτταρα τα οποία εκφράζανε σταθερά τον άγριο τύπο (WT) CRF_1 και τους μεταλλαγμένους υποδοχείς W259A και F260A ήταν ($-\log EC_{50}$) 8,83 ± 0,18, 8,50 ± 0,06 και 8,60 ± 0,13, αντίστοιχα.

Αφού οι μεταλλάξεις W259A και F260A δεν επηρέασαν σημαντικά την ισχύ και αποτελεσματικότητα του CRF να διεγείρει την παραγωγή ενδοκυττάριου κυκλικού AMP σε κύτταρα που εκφάζουν τον CRF_1 δεν προσδορίσαμε την επίδραση της διπλής μετάλλαξης W259A/F260A στην ισχύ (και στο μέγιστο αποτέλεσμα) του CRF.



Εικόνα 62. Διέγερση της παραγωγής ενδοκυττάριου κυκλικού AMP από τον CRF. *Η διέγερση της παραγωγής ενδοκυττάριου κυκλικού AMP από αυξανόμενες συγκεντρώσεις CRF, επιτεύχθηκε όπως αναφέρεται στο κεφάλαιο ΄΄Υλικά και Μέθοδοι΄΄, σε άθικτα HEK 293 κύτταρα που εκφράζανε σταθερά τον άγριο τύπο CRF_1 (WT), ή τους μεταλλαγμένους υποδοχείς,, W259 και F260A. Οι μέσοι όροι των τιμών (εις διπλούν) και τα σταθερά λάθη τους προέρχονται από ένα χαρακτηριστικό πείραμα που έγινε 3 φορές με παρόμοια αποτελέσματα. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων του κάθε πειράματος έγινε μη γραμμικά και οι τιμές $logEC_{50}$ και EC_{50} προσδιορίστηκαν όπως αναφέρεται στη μεθοδολογία και αναγράφονται στο κυρίως κείμενο*

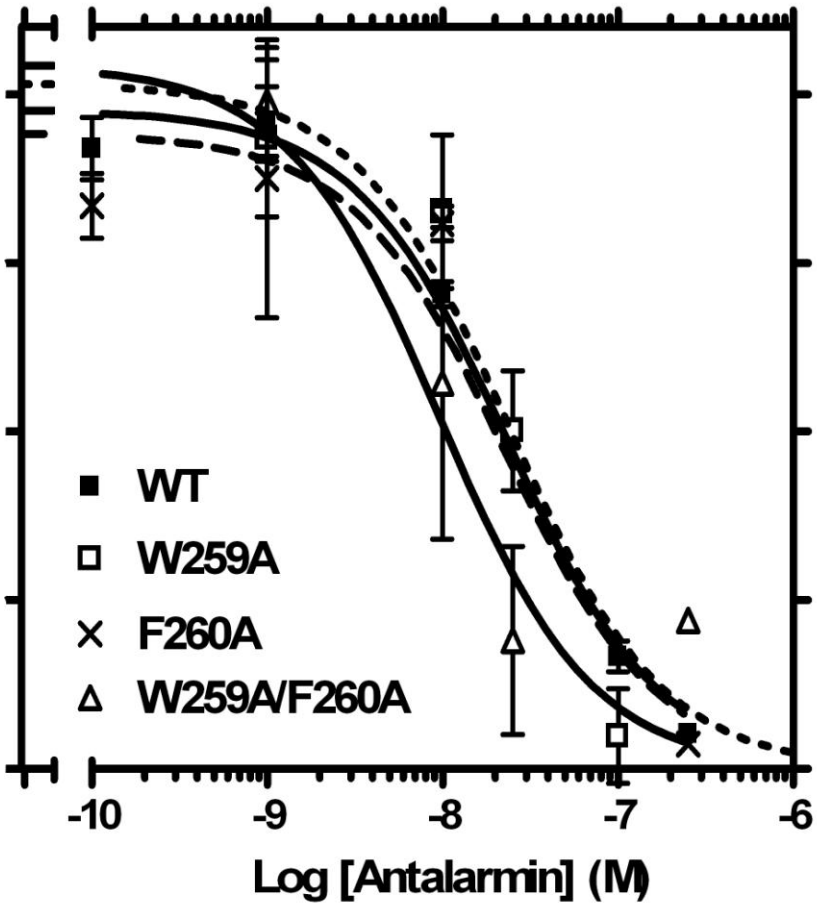
Επίδραση των μεταλλάξεων W259A, F260A και W259A/F260A στις συγγένειες δέσμευσης των ανταγωνιστών ανταλαρμίνη και αστρεσίνη

Επίδραση των μεταλλάξεων W259A, F260A και W259A/F260A στη δέσμευση της ανταλαρμίνης

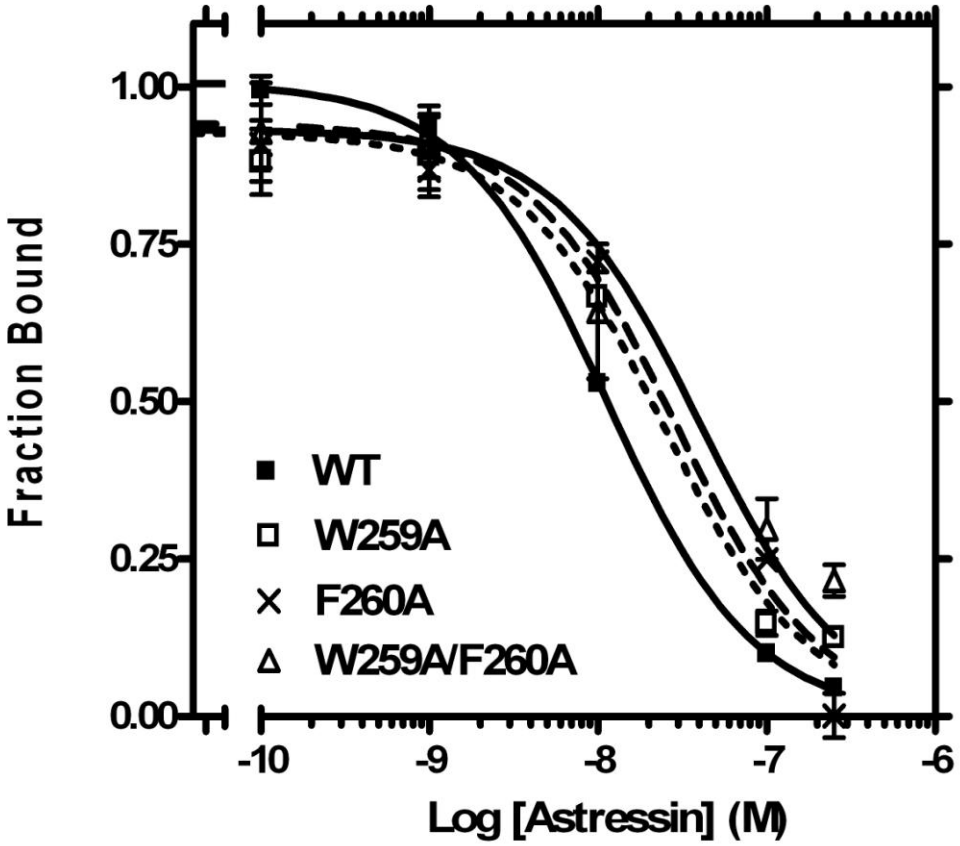
Σε αντίθεση με τους αγωνιστές CRF και σοβαγίνη, η μετάλλαξη (μια τη κάθε φορά) των Trp259 (W259A) και Phe260 (F260A) σε αλανίνη, καθώς και η ταυτόχρονή τους μετάλλαξη σε αλανίνη (W259A/F260A), δεν επηρέασε σημαντικά τη συγγένεια δέσμευσης του μικρομοριακού μη πεπτιδικού ανταγωνιστή ανταλαρμίνη για τον CRF_1 (εικόνα 63). Συγκεκριμένα η ανταλαρμίνη δεσμευόταν στον άγριο τύπο CRF_1 (WT) και στις μεταλλαγμένες μορφές του, W259A, F260A και W259A/F260A με συγγένειες δέσμευσης ($-\log K_i$) 7,81 ± 0,06, 7,57 ± 0,09, 7,61 ± 0,17 και 7,86 ± 0,12, αντίστοιχα.

Επίδραση των μεταλλάξεων W259A, F260A και W259A/F260A στη δέσμευση της αστρεσίνης

Παρόμοια με την ανταλαρμίνη, η μετάλλαξη (μια την κάθε φορά) των Trp259 (W259A) και Phe260 (F260A) σε αλανίνη καθώς και η ταυτόχρονή τους μετάλλαξη σε αλανίνη (W259A/F260A), δεν επηρέασε σημαντικά τη συγγένεια δέσμευσης του πεπτιδικού ανταγωνιστή, αστρεσίνη για τον CRF_1 (εικόνες 64 και 66, πίνακας 1), η οποία δημιουργήθηκε από την απαλοιφή των πρώτων 11 αμινοτελικών αμινοξέων του CRF (πίνακας 1). Συγκεκριμένα η αστρεσίνη δεσμευόταν στον άγριο τύπο CRF_1 (WT) και στις μεταλλαγμένες μορφές του, W259A, F260A και W259A/F260A με συγγένειες δέσμευσης ($-\log K_i$) 8,00 ± 0,08, 7,60 ± 0,05, 7,64 ± 0,09 και 7,46 ± 0,16, αντίστοιχα.



Εικόνα 63. Συναγωνιστική δέσμευση της ανταλαρμίνης στον άγριο τύπο CRF_1 και στους μεταλλαγμένους υποδοχείς, W259A, F260A και W259A/F260A. *Ο συναγωνισμός της δέσμευσης της [^{125}I] – Tyr^0 – σοβαγίνης από την ανταλαρμίνη, επιτεύχθηκε όπως αναφέρεται στο κεφάλαιο ΄΄Υλικά και Μέθοδοι΄΄, σε μεμβρανικά ομογενοποιήματα κυττάρων HEK 293 που εκφράζανε σταθερά τον άγριο τύπο CRF_1 (WT), ή τους μεταλλαγμένους υποδοχείς, W259A, F260A και W259A/F260A. Οι μέσοι όροι των τιμών (εις διπλούν) και τα σταθερά λάθη τους προέρχονται από ένα χαρακτηριστικό πείραμα που έγινε 3-4 φορές με παρόμοια αποτελέσματα. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων του κάθε πειράματος έγινε μη γραμμικά και οι τιμές -logK_i υπολογίστηκαν από τις αντίστοιχες τιμές -logIC_{50}, σύμφωνα με τη μέθοδο Cheng και Prusoff [201] και αναγράφονται στο κυρίως κείμενο.*

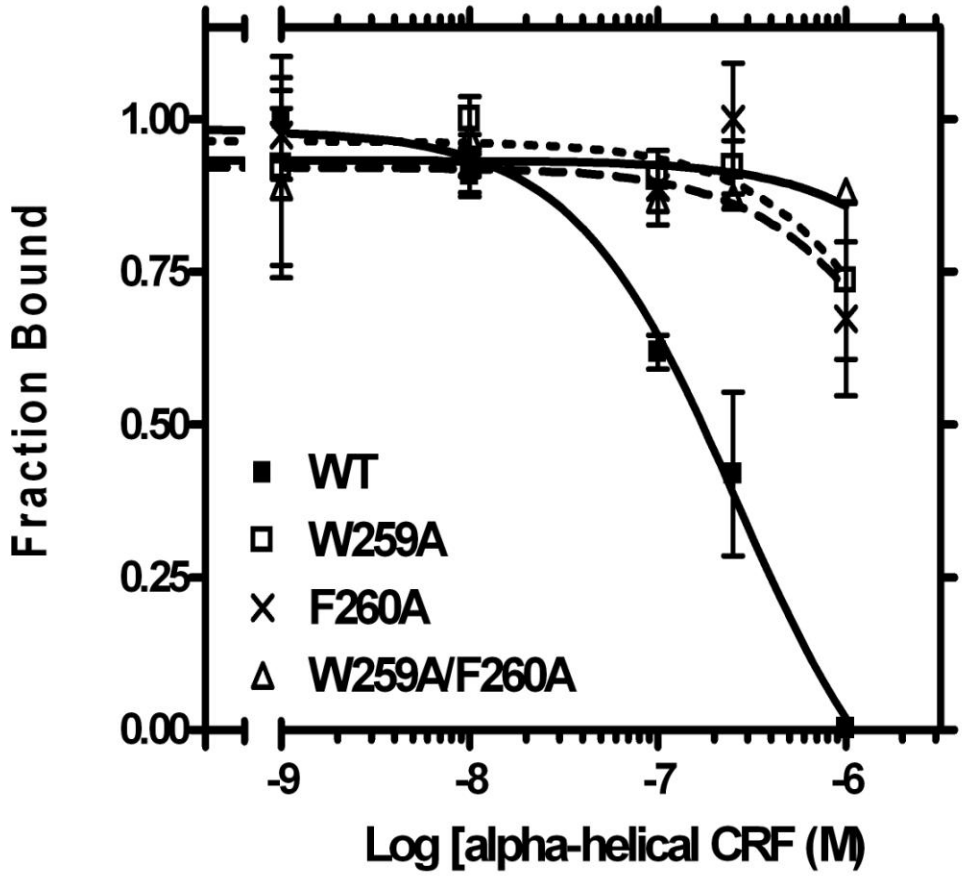


Εικόνα 64. Συναγωνιστική δέσμευση της αστρεσίνης στον άγριο τύπο CRF_1 και στους μεταλλαγμένους υποδοχείς, W259A, F260A και W259A/F260A. *Ο συναγωνισμός της δέσμευσης της [^{125}I] – Tyr^0 – σοβαγίνης από την αστρεσίνη, επιτεύχθηκε όπως αναφέρεται στο κεφάλαιο ΄΄Υλικά και Μέθοδοι΄΄, σε μεμβρανικά ομογενοποιήματα κυττάρων HEK 293 που εκφράζανε σταθερά τον άγριο τύπο CRF_1 (WT), ή τους μεταλλαγμένους υποδοχείς, W259A, F260A και W259A/F260A. Οι μέσοι όροι των τιμών (εις διπλούν) και τα σταθερά λάθη τους προέρχονται από ένα χαρακτηριστικό πείραμα που έγινε 4-7 φορές με παρόμοια αποτελέσματα. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων του κάθε πειράματος έγινε μη γραμμικά και οι τιμές -logK_i υπολογίστηκαν από τις αντίστοιχες τιμές -logIC_{50}, σύμφωνα με τη μέθοδο Cheng και Prusoff [201] και αναγράφονται στο κυρίως κείμενο, στην* εικόνα 66 *και στον πίνακα 1.*

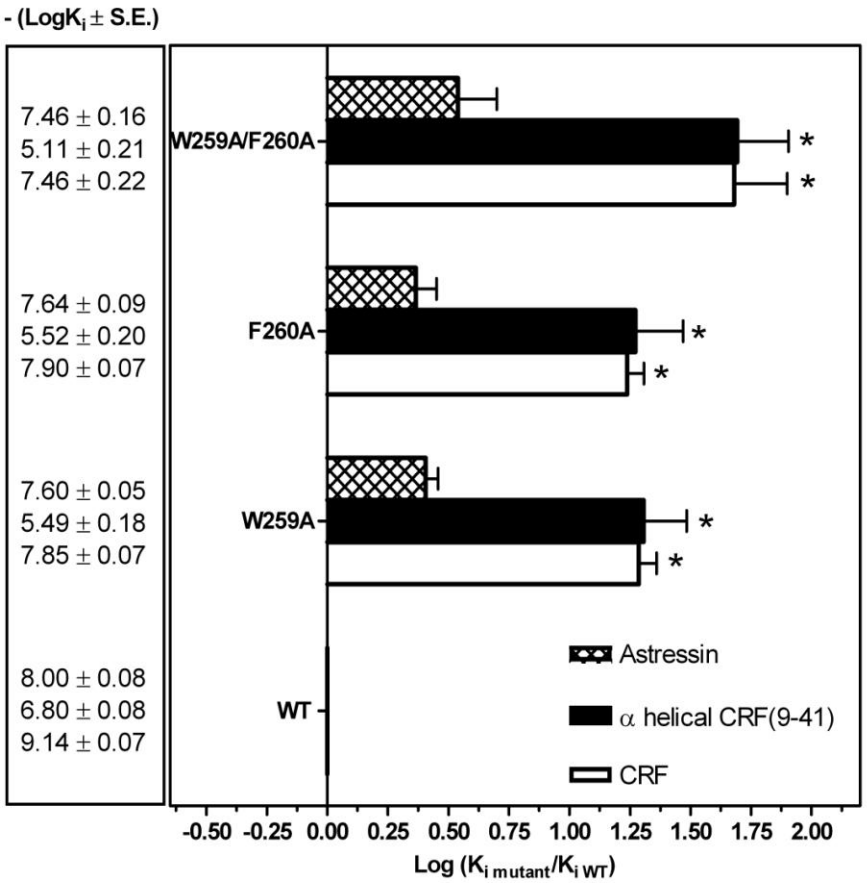
Επίδραση των μεταλλάξεων W259A, F260A και W259A/F260A στη συγγένεια δέσμευσης του άλφα-ελικοειδή CRF (9-41)

Σε αντίθεση με την απαλοιφή των πρώτων 11 αμινοτελικών αμινιξέων του CRF που δημιούργησε την αστρεσίνη της οποίας η δέσμευση δεν επηρεάστηκε από τις μεταλλάξεις (μια τη κάθε φορά) των Trp259 (W259A) και Phe260 (F260A) σε αλανίνη, καθώς και από το συνδυασμό τους (W259A/F260A), η απαλοιφή των πρώτων 8 αμινοτελικών αμινοξέων του CRF δημιούργησε τον άλφα–ελικοειδή CRF (9-41) του οποίου η συγγένεια δέσμευσης για τον CRF_1 (παρόμοια με τους CRF και σοβαγίνη) επηρεάστηκε σημαντικά από όλες τις παραπάνω μεταλλάξεις (εικόνες 65, 66 και πίνακας 1).

Συγκεκριμένα ο άλφα–ελικοειδής CRF (9-41) δεσμευόταν στον άγριο τύπο CRF_1 (WT), W259A, F260A και W259A/F260A με συγγένειες δέσμευσης ($-\log K_i$) 6,80 ± 0,08, 5,49 ± 0,18, 5,52 ± 0,20 και 5,11 ± 0,21, αντίστοιχα.



Εικόνα 65. Συναγωνιστική δέσμευση του άλφα-ελικοειδή CRF (9-41) στον άγριο τύπο CRF_1 και στους μεταλλαγμένους υποδοχείς, W259A, F260A και W259A/F260A. *Ο συναγωνισμός της δέσμευσης της [^{125}I] – Tyr^0 – σοβαγίνης από τον άλφα-ελικοειδή CRF (9-41), επιτεύχθηκε όπως αναφέρεται στο κεφάλαιο ΄΄Υλικά και Μέθοδοι΄΄, σε μεμβρανικά ομογενοποιήματα κυττάρων HEK 293 που εκφράζανε σταθερά τον άγριο τύπο CRF_1 (WT), ή τους μεταλλαγμένους υποδοχείς, W259A, F260A και W259A/F260A. Οι μέσοι όροι των τιμών (εις διπλούν) και τα σταθερά λάθη τους προέρχονται από ένα χαρακτηριστικό πείραμα που έγινε 3-8 φορές με παρόμοια αποτελέσματα. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων του κάθε πειράματος έγινε μη γραμμικά και οι τιμές -logK_i υπολογίστηκαν από τις αντίστοιχες τιμές -logIC_{50}, σύμφωνα με τη μέθοδο Cheng και Prusoff [201] και αναγράφονται στο κυρίως κείμενο, στην* εικόνα 66 *και στον πίνακα 1.*



Εικόνα 66. Επίδραση των μεταλλάξεων W259A, F260A και W259A/F260A του CRF_1 στις συγγένειες δέσμευσης των CRF, άλφα-ελικοειδή CRF(9-41) και αστρεσίνης.*Οι τιμές –logK_i (συγγένειες δέσμευσης των πεπτιδίων) για τον άγριο τύπο CRF_1 (WT) και τους μεταλλαγμένους υποδοχείς W259A, F260A και W259A/F260A υπολογίστηκαν από τα αποτελέσματα των πειραμάτων στις εικόνες 61, 64 και 65 (και αναγράφονται επίσης στον πίνακα 1). Οι στήλες αντιπροσωπεύουν την αλλαγή στη συγγένεια δέσμευσης των πεπτιδίων για τον CRF_1, που είναι αποτέλεσμα της κάθε μετάλλαξης. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των τιμών logK_i του καθενός πεπτιδίου για τον WT και τον κάθε μεταλλαγμένο υποδοχέα, υπολογίστηκαν με τη χρήση της ανάλυσης διασποράς (ANOVA) και στη συνέχεια με Bonferoni's post hoc test (* $p<0.05$ στατιστικώς σημαντική διαφορά).*

ΠΙΝΑΚΑΣ 1 : Οι μελέτες συναγωνιστικής δέσμευσης, επιτεύχθηκαν όπως αναφέρεται στο κεφάλαιο ΄΄Υλικά και Μέθοδοι΄΄, σε μεμβρανικά ομογενοποιήματα από κύτταρα HEK 293 που εκφράζανε σταθερά τον άγριο τύπο CRF_1 (WT), ή τις μεταλλαγμένες μορφές του, W259A, F260A και W259A/F260A. Οι μέσοι όροι των τιμών και τα σταθερά λάθη τους προέρχονται από 3-8 πειράματα. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων του κάθε πειράματος έγινε μη γραμμικά και οι τιμές $-\log K_i$ υπολογίστηκαν από τις αντίστοιχες τιμές $-\log IC_{50}$, σύμφωνα με τη μέθοδο Cheng και Prusoff [201]. Οι τιμές στις παρενθέσεις είναι οι τιμές K_i του καθενός πεπτιδίου για τον κάθε μεταλλαγμένο υποδοχέα διαιρούμενες από την τιμή K_i του πεπτιδίου αυτού για τον WT. Τα βέλη σημαίνουν μείωση στις συγγένειες των πεπτιδίων μετά τις μεταλλάξεις στον υποδοχέα.

Πεπτίδιο	Αμινοτελικά αμινοξέα των πεπτιδίων																				$-\log K_i$			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	WT	W259A	F260A	W259A/ F260A
CRF	S	E	E	P	P	I	S	L	D	L	T	F	H	L	L	R	E	V	L	E	9,14 ± 0,07	7,85 [b] ± 0,07 (19,0 ↓)	7,90 [b] ± 0,07 (17,0 ↓)	7,46 [b] ± 0,22 (47,5 ↓)
Αλφα-ελκικοειδής CRF(9-41)									D	L	T	F	H	L	L	R	E	M	L	E	6,80 ± 0,08	5,49 [b] ± 0,18 (20,0 ↓)	5,52 [b] ± 0,20 (19,0 ↓)	5,11 [b] ± 0,21 (49,0 ↓)
Αστρεσίνη												F[a]	H	L	L	R	E	V	L	E	8,00 ± 0,08	7,60 ± 0,05 (2,5 ↓)	7,64 ± 0,09 (2,5 ↓)	7,46 ± 0,16 (3,5 ↓)

[a] *το f δηλώνει τη D ισομορφή του αμινοξέος φαινυλαλανίνη*

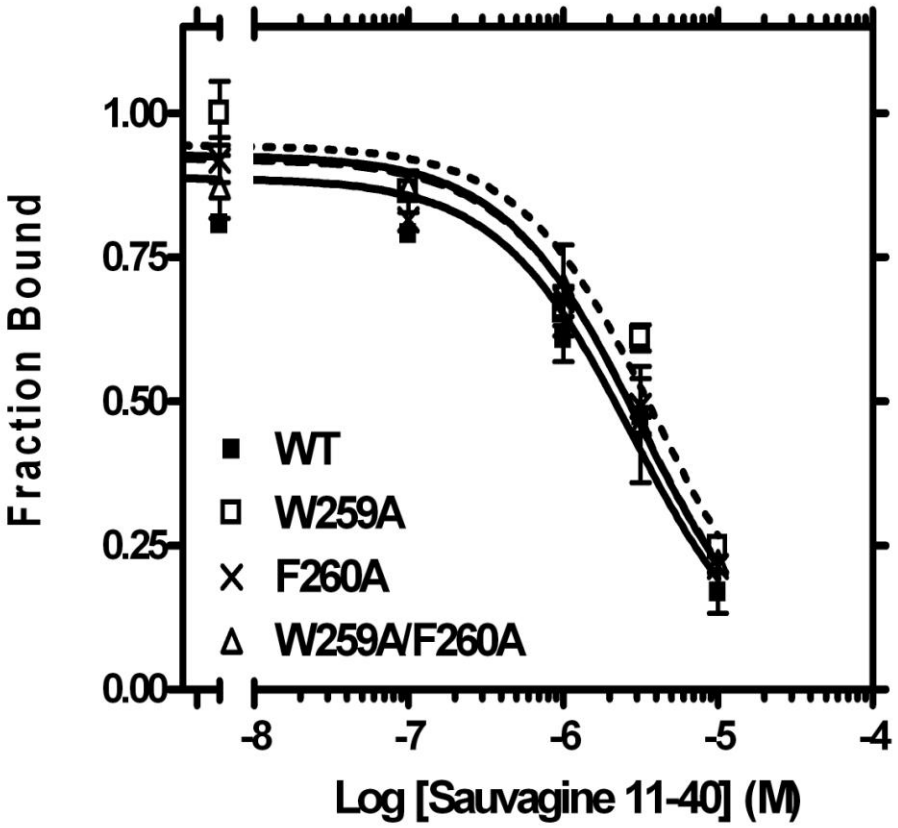
[b] *P < 0.05 συγκρινόμενο με τον άγριου τύπου (WT) CRF_1 (one-way ANOVA ακολουθούμενη από Bonferoni's post hoc test).*

Επίδραση των W259A, F260A και W259A/F260A μεταλλάξεων στη συγγένεια δέσμευσης της σοβαγίνης 8-40 και της σοβαγίνης 11-40

Στη συνέχεια δημιουργήσαμε τα τροποποιημένα πεπτίδια σοβαγίνη 8-40 και σοβαγίνη 11-40 με απαλοιφή διαφόρων τμημάτων του αμινοτελικού άκρου της σοβαγίνης και εξετάσαμε την επίδραση των W259A, F260A και W259A/F260A μεταλλάξεων του CRF_1 στη συγγένεια δέσμευσης των τροποποιημένων αυτών πεπτιδίων στον υποδοχέα.

Επίδραση των μεταλλάξεων στη δέσμευση της σοβαγίνης 11-40

Παρόμοια με την απαλοιφή των πρώτων 11 αμινοτελικών αμινοξέων του CRF που δημιούργησε την αστρεσίνη η οποία δεν ήταν ευαίσθητη στις μεταλλάξεις (μιας την κάθε φορά) των Trp259 (W259A) και Phe260 (F260A) σε αλανίνη, καθώς και στο συνδυασμό τους (W259A/F260A), αντίστοιχη απαλοιφή στη σοβαγίνη δημιούργησε τη σοβαγίνη 11-40, της οποίας η δέσμευση για τον CRF_1 δεν επηρεάστηκε από τις παραπάνω μεταλλάξεις, (εικόνες 67 και 69 και πίνακας 2). Συγκεκριμένα η σοβαγίνη 11-40 δεσμευόταν στον άγριο τύπο CRF_1 (WT) και στους μεταλλαγμένους υποδοχείς, W259A, F260A και W259A/F260A με συγγένειες δέσμευσης ($-\log K_i$) 5,76 ± 0,11, 5,36 ± 0,03, 5,71 ± 0,17 και 5,36 ± 0,10, αντίστοιχα.



Εικόνα 67. Συναγωνιστική δέσμευση της σοβαγίνης 11-40 στον άγριο τύπο CRF_1 και στους μεταλλαγμένους υποδοχείς, W259A, F260A και W259A/F260A. *Ο συναγωνισμός της δέσμευσης της [^{125}I] – Tyr^0 – σοβαγίνης από τη σοβαγίνη 11-40, επιτεύχθηκε όπως αναφέρεται στο κεφάλαιο ΄΄Υλικά και Μέθοδοι΄΄, σε μεμβρανικά ομογενοποιήματα κυττάρων HEK 293 που εκφράζανε σταθερά τον άγριο τύπο CRF_1 (WT), ή τους μεταλλαγμένους υποδοχείς, W259A, F260A και W259A/F260A. Οι μέσοι όροι των τιμών (εις διπλούν) και τα σταθερά λάθη τους προέρχονται από ένα χαρακτηριστικό πείραμα που έγινε 3-5 φορές με παρόμοια αποτελέσματα. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων του κάθε πειράματος έγινε μη γραμμικά και οι τιμές -logK_i υπολογίστηκαν από τις αντίστοιχες τιμές -logIC_{50}, σύμφωνα με τη μέθοδο Cheng και Prusoff [201] και αναγράφονται στο κυρίως κείμενο, στην* εικόνα 69 *και στον πίνακα 2.*

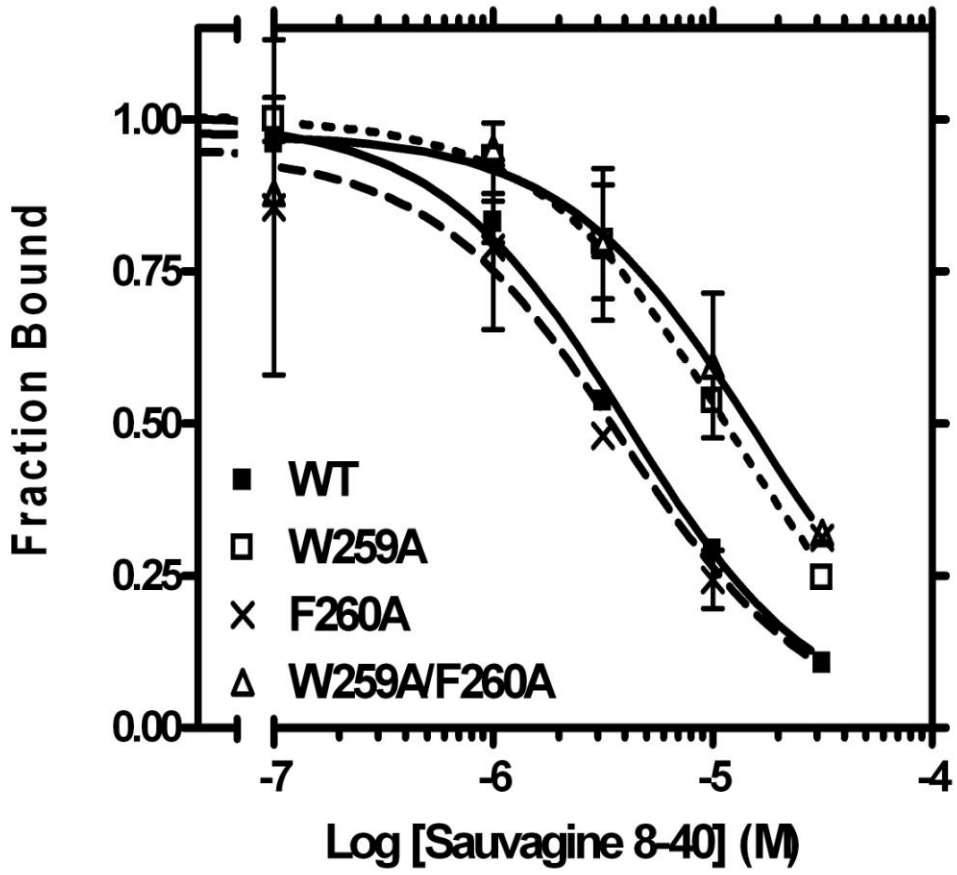
Επίδραση των μεταλλάξεων στη δέσμευση της σοβαγίνης 8-40

Σε αντίθεση με την απαλοιφή των πρώτων 11 αμινοτελικών αμινοξέων της σοβαγίνης που δημιούργησε τη σοβαγίνη 11-40 της οποίας η δέσμευση δεν επηρεάστηκε από τις μεταλλάξεις των Trp259 (W259A) και Phe260 (F260A) σε αλανίνη, η απαλοιφή των πρώτων 8 αμινοτελικών αμινοξέων της δημιούργησε τη σοβαγίνη 8-40 της οποίας η συγγένεια δέσμευσης για τον CRF_1 (όπως οι CRF και σοβαγίνη) επηρεάστηκε σημαντικά από τη μετάλλαξη W259A (εικόνες 68 και 69 πίνακας 2). Συγκεκριμένα η σοβαγίνη 8-40 δεσμευόταν στον άγριο τύπο CRF_1 (WT) και στη μεταλλαγμένη μορφή του, W259A, με συγγένειες δέσμευσης ($-\log K_i$) 5,46 ± 0,12 και 4,86 ± 0,07, αντίστοιχα. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήσαμε και με την απαλοιφή των αντίστοιχων αμινοξέων του CRF, όπως αναφέρθηκε παραπάνω.

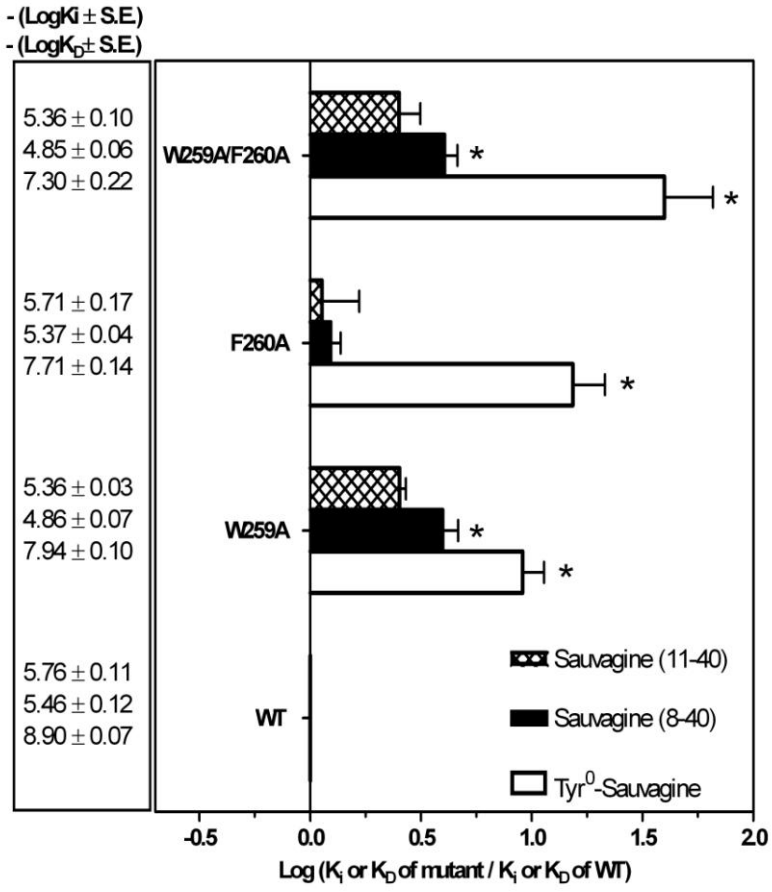
‘Ομως σε αντίθεση με τον CRF του οποίου η απαλοιφή των πρώτων 9 αμινοτελικών αμινοξέων του (που αντιστοιχούν στα πρώτα 8 αμινοτελικά αμινοξέα της σοβαγίνης) δημιούργησε τον ευαίσθητο στη μετάλλαξη F260A άλφα-ελικοειδή CRF (9-41), η αντίστοιχη απαλοιφή στη σοβαγίνη δημιούργησε τη σοβαγίνη 8-40 της οποίας η συγγένεια δέσμευσης για τον CRF_1 δεν επηρεάστηκε σημαντικά από τη μετάλλαξη F260A (εικόνες 68 και 69 πίνακας 2). Συγκεκριμένα η σοβαγίνη 8-40 δεσμευόταν στον WT και στη μεταλλαγμένη μορφή του F260A με συγγένειες δέσμευσης ($-\log K_i$) 5,46 ± 0,12 και 5,37 ± 0,04, αντίστοιχα.

Επιπρόσθετα ο μεταλλαγμένος υποδοχέας W259A/F260A που προήλθε από τη ταυτόχρονη αντικατάσταση των Trp259 και Phe260 σε αλανίνη δέσμευε την σοβαγίνη 8-40 με μικρότερη συγγένεια (ίση με ($-\log K_i$) 4,85 ± 0,06) από εκείνη με την οποία το εν λόγω πεπτίδιο δεσμευόταν στον WT και παρόμοια με

τη συγγένεια που δέσμευε το πεπτίδιο αυτό ο μεταλλαγμένος υποδοχέας W259A (εικόνες 68 και 69 και πίνακας 2)



Εικόνα 68. Συναγωνιστική δέσμευση της σοβαγίνης 8-40 στον άγριο τύπο CRF_1 και στους μεταλλαγμένους υποδοχείς, W259A, F260A και W259A/F260A. *Ο συναγωνισμός της δέσμευσης της [^{125}I] – Tyr^0 – σοβαγίνης από τη σοβαγίνη 8-40, επιτεύχθηκε όπως αναφέρεται στο κεφάλαιο ΄΄Υλικά και Μέθοδοι΄΄, σε μεμβρανικά ομογενοποιήματα κυττάρων HEK 293 που εκφράζανε σταθερά τον άγριο τύπο CRF_1 (WT), ή τους μεταλλαγμένους υποδοχείς, W259A, F260A και W259A/F260A. Οι μέσοι όροι των τιμών (εις διπλούν) και τα σταθερά λάθη τους προέρχονται από ένα χαρακτηριστικό πείραμα που έγινε 3 φορές με παρόμοια αποτελέσματα. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων του κάθε πειράματος έγινε μη γραμμικά και οι τιμές -logK_i υπολογίστηκαν από τις αντίστοιχες τιμές -logIC_{50}, σύμφωνα με τη μέθοδο Cheng και Prusoff [201] και αναγράφονται στο κυρίως κείμενο, στην εικόνα 69 και στον πίνακα 2.*



Εικόνα 69. Επίδραση των μεταλλάξεων W259A, F260A και W259A/F260A του CRF_1 στις συγγένειες δέσμευσης των σοβαγίνης, σοβαγίνης 8-40 και σοβαγίνης 11-40. *Οι τιμές $-logK_D$ και $-logK_i$ (συγγένειες δέσμευσης των πεπτιδίων) για τον άγριο τύπο CRF_1 (WT) και τους μεταλλαγμένους υποδοχείς W259A, F260A και W259A/F260A υπολογίστηκαν από τα αποτελέσματα των πειραμάτων στις εικόνες 56, 67 και 68 (και αναγράφονται επίσης στον πίνακα 2). Οι στήλες αντιπροσωπεύουν την αλλαγή στη συγγένεια δέσμευσης των πεπτιδίων για τον CRF_1, που είναι αποτέλεσμα της κάθε μετάλλαξης. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των τιμών $-logK_D$ (της σοβαγίνης) και $-logK_i$ (των άλλων πεπτιδίων) για τον WT και τον κάθε μεταλλαγμένο υποδοχέα, υπολογίστηκαν με τη χρήση της ανάλυσης διασποράς (ANOVA) και στη συνέχεια με Bonferoni's post hoc test (* $p<0.05$ στατιστικώς σημαντική διαφορά).*

ΠΙΝΑΚΑΣ 2 : Οι μελέτες συναγωνιστικής δέσμευσης, επιτεύχθηκαν όπως αναφέρεται στο κεφάλαιο ΄΄Υλικά και Μέθοδοι΄΄, σε μεμβρανικά ομογενοποιήματα κυττάρων που εκφράζανε τον άγριο τύπο CRF_1 (WT), ή τις μεταλλαγμένες μορφές του, W259A, F260A και W259A/F260A. Οι μέσοι όροι των τιμών και τα σταθερά λάθη τους προέρχονται από 3-5 πειράματα. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων του κάθε πειράματος έγινε μη γραμμικά και οι τιμές $-\log K_i$ υπολογίστηκαν από τις αντίστοιχες τιμές $-\log IC_{50}$, σύμφωνα με τη μέθοδο Cheng και Prusoff [201]. Οι τιμές $-\log K_D$ της Tyr^0-σοβαγίνης λήφθησαν από την εικόνα 57. Οι τιμές στις παρενθέσεις είναι οι τιμές K_i ή K_D του καθενός πεπτιδίου για τον κάθε μεταλλαγμένο υποδοχέα διαιρούμενες από την τιμή K_i ή K_D του πεπτιδίου αυτού για τον WT. Τα βέλη σημαίνουν μείωση στις συγγένειες των πεπτιδίων μετά τις μεταλλάξεις στον υποδοχέα.

Πεπτίδιο	**Αμινοτελικά αμινοξέα των πεπτιδίων**																				**-log K_D or -log K_i**			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	WT	W259A	F260A	W259A/ F260A
Tyr^0-Σοβαγίνη[a]	Y	Q	G	P	P	I	S	I	D	L	S	L	E	L	L	R	K	M	I	E	*8,90 ± 0,07*	*7,94*[c] *± 0,10* (9,0 ↓)	*7,71*[c] *± 0,14* (15,0 ↓)	*7,30*[c] *± 0,22* (39,5 ↓)
Σοβαγίνη (8-40)									D	L	S	L	E	L	L	R	K	M	I	E	5,46 ± 0,12	4,86[c] ± 0,07 (4,0 ↓)	5,37 ± 0,04 (1,0)	4,85[c] ± 0,06 (4,0 ↓)
Σοβαγίνη (11-40)												f[b]	H	L	L	R	K	M	I	E	5,76 ± 0,11	5,36 ± 0,03 (2,5 ↓)	5,71 ± 0,17 (1,0)	5,36 ± 0,10 (2,5 ↓)

[a] *Η Tyr^0-Σοβαγίνη είναι ένα ανάλογο της σοβαγίνης το οποίο έχει μια επιπλέον Tyr(Tyr^0) μια θέση πιο μπροστά από το αμινοτελικό αμινοξύ της, Gln*

[b] *το f δηλώνει τη D ισομορφή του αμινοξέος φαινυλαλανίνη*

[c] *$P < 0.05$ συγκρινόμενο με τον άγριου τύπου (WT) CRF_1 (one-way ANOVA ακολουθούμενη από Bonferoni's post hoc test)*

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο τύπος 1 (CRF_1), όπως και ο τύπος 2 (CRF_2), υποδοχέας του CRF ανήκει στην οικογένεια Β των GPCRs, και όπως όλοι οι GPCRs έτσι και αυτός είναι μια πρωτεΐνη που εντοπίζεται στη πλασματική μεμβράνη του κυττάρου την οποία διαπερνά (όπως φαίνεται από το προφίλ υδροφιλικότητας / υδροφοβικότητας των αμινοξέων του), επτά φορές, σχηματίζοντας έτσι επτά υποθετικές διαμεμβρανικές περιοχές που ενώνονται μεταξύ τους με τρεις εξωκυττάριους βρόγχους [128]. Οι τρεις εξωκυττάριοι βρόγχοι του CRF_1 μαζί με την αμινοτελική εξωκυττάρια περιοχή του (N-περιοχή) έχουν δειχθεί σε προηγούμενες μελέτες ότι δεσμεύουν τον CRF και τα συγγενή του πεπτίδια [191, 193-198]. Αντίθετα οι διαμεμβρανικές περιοχές του έχει προταθεί ότι πιθανόν δεσμεύουν μικρά μη πεπτιδικά CRF ανάλογα, συμπεριλαμβανομένου και της ανταλαρμίνης [192, 203]. Όμως στις προηγούμενες αυτές μελέτες ο ακριβής ρόλος συγκεκριμένων αμινοξέων στις εξωκυττάριες περιοχές (με εξαίρεση τη N-περιοχή) του CRF_1 στη δέσμευση του CRF και των αναλόγων του δεν είχε προσδιοριστεί. Στη παρούσα ερευνητική εργασία προσδιορίστηκε ο ρόλος στη δέσμευση των πεπτιδίων διαφόρων αμινοξέων του CRF_1 που βρίσκονται στη τρίτη, τέταρτη και πέμπτη διαμεμβρανική περιοχή του υποδοχέα καθώς και στο δεύτερο εξωκυττάριο βρόγχο του.

ΤΡΙΤΗ ΔΙΑΜΕΜΒΡΑΝΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ ΤΟΥ CRF_1 - ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΗΣ

Προσδιορισμός του ρόλου της τρίτης διαμεμβρανικής περιοχής του CRF_1 στη δέσμευση μη πεπτιδικών αναλόγων του CRF

Προηγούμενη μελέτη έδειξε ότι μετάλλαξη της His199 της τρίτης διαμεμβρανικής περιοχής (TM3) του CRF_1 στην αντίστοιχη Val του CRF_2 μείωσε σημαντικά την δέσμευση του μικρομοριακού μη πεπτιδικού αναλόγου του CRF, NBI 27914, οδηγώντας έτσι στο συμπέρασμα ότι το αμινοξύ αυτό παίζει ρόλο, άμεσο ή έμμεσο, στη δέσμευση του NBI 27914 καθώς και των άλλων χημικά συγγενών του μορίων, συμπεριλαμβανομένης της ανταλαρμίνης [195]. Με

σκοπό να εξετάσουμε περαιτέρω το ρόλο της His199 στη δέσμευση των μικρομοριακών μη πεπτιδικών αναλόγων του CRF, μεταλλάξαμε το αμινοξύ αυτό του υποδοχέα σε αλανίνη και προσδιορίσαμε την επίδραση της μετάλλαξης στη δέσμευση της ανταλαρμίνης.

Επιλέξαμε την αλανίνη σαν αμινοξύ αντικατάστασης διότι δεν έχει πλευρική αλυσίδα, δημιουργώντας έτσι ένα κενό στη θέση της πλευρικής αλυσίδας του αμινοξέος που έχει αντικαταστήσει ενώ ταυτόχρονα δεν επηρεάζει σημαντικά τη δομή του υποδοχέα [204]. Επιπρόσθετα η αντικατάσταση με αλανίνη είναι μια πολύ καλά ανεκτή μετάλλαξη, διότι το αμινοξύ αυτό είναι το πλέον διαδεδομένο στις πρωτείνες και βρίσκεται συχνά σε όλες δευτεροταγείς δομές των πρωτεϊνών καθώς και σε όλες τις θέσεις μέσα σε αυτές, τόσο σε εκτεθειμένες στον περιβάλλοντα χώρο όσο και στο εσωτερικό τους [205, 206].

Έτσι λοιπόν αν η πλευρική αλυσίδα της His199 του CRF_1 αλληλεπιδρούσε με την ανταλαρμίνη τότε θα περιμέναμε η αντικατάσταση του αμινοξέος αυτού από αλανίνη να αφαιρούσε τη πλευρική του αλυσίδα αφήνοντας με αυτό το τρόπο μια κοιλότητα στη θέση της και μειώνοντας σημαντικά τη συγγένεια δέσμευσης της ανταλαρμίνης. Όμως, η μετάλλαξη της His199 δεν επηρέασε σημαντικά την συγγένεια δέσμευσης της ανταλαρμίνης για τον CRF_1 οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι το αμινοξύ αυτό δεν αλληλεπιδρούσε με το μικρομοριακό αυτό ανάλογο του CRF. Από τα παραπάνω συμπεραίνεται επίσης ότι η αντικατάσταση της His199 από Val, στη μελέτη των Liaw et al. (1997), μείωσε τη συγγένεια δέσμευσης του, χημικά συγγενούς με την ανταλαρμίνη, NBI 27914, με έμμεσο τρόπο, μέσω κάποιας τοπικής αλλαγής στη στερεοδιαμόρφωση της TM3 [195]. Η ελάττωση της συγγένειας δέσμευσης του NBI 27914 από τη μετάλλαξη της His199 σε Val δεν πρέπει να οφειλόταν σε κάποια γενική αλλαγή όλης της δομής του υποδοχέα αφού η δέσμευση του CRF (το οποίο είναι πολύ μεγαλύτερο από το NBI 27914 και δεσμεύεται κυρίως στις εξωκυττάριες περιοχές του υποδοχέα) δεν επηρεάστηκε από τη μετάλλαξη αυτή [195]. Παρόμοια σε πολλές πρωτείνες έχει βρεθεί ότι διάφορες μεταλλάξεις τους μπορεί να επηρεάσουν έμμεσα τη δέσμευση προσδεμάτων τους μέσω αλλαγής της στερεοδιαμόρφωσης της πρωτείνης. Για παράδειγμα αμινοξέα της μαλτοπορίνης

(υποδοχέας του λ φάγου), που έχουν δειχτεί στη δομή της πρωτείνης αυτής ότι βρίσκονται στο εσωτερικό της, όταν μεταλλαχθούν επηρεάζουν τη δέσμευση του λ φάγου στη μαλτοπορίνη έμμεσα μέσω αλλαγής της στερεοδιαμόρφωσης της [207]. Παρόμοια, οι κρυσταλλικές δομές διαφόρων μεταλλαγμένων διυδροφυλικών αναγωγασών έδειξαν ότι μια μετάλλαξη περίπου 15 Å από την περιοχή δέσμευσης του υποστρώματος επηρεάζει την καταλυτική δραστηριότητα τους έμμεσα μέσω μιας εκτεταμένης δομικής αλλαγής [208].

Το γεγονός ότι η His199 της TM3 του CRF_1 δεν αλληλεπιδρά με τους μικρομοριακούς μη πεπτιδικούς ανταγωνιστές ενώ ταυτόχρονα παίζει έμμεσο ρόλο στη δέσμευση τους μας οδήγησε στην υπόθεση ότι αμινοξέα της TM3 του CRF_1 που είναι γειτονικά της His199 ή αμινοξέα σε άλλη γειτονική διαμεμβρανική περιοχή του υποδοχέα που όμως βρίσκονται στην εγγύς περιοχή της His199 πιθανόν αλληλεπιδρούν με τους μικρομοριακούς ανταγωνιστές. Για εξακριβώσουμε την υπόθεση αυτή ήταν απαραίτητο πρώτα να αποκτήσουμε πληροφορίες για τη δομή των διαμεβρανικών περιοχών του CRF_1.

Υποθέσεις για τη δομή των διαμεβρανικών περιοχών του CRF_1

Το γεγονός ότι τα μικρομοριακά μη πεπτιδικά ανάλογα του CRF πολύ πιθανόν δεσμεύονται στις διαμεμβρανικές περιοχές του CRF_1, όπως συμβαίνει με τη δέσμευση διαφόρων μικρομοριακών προσδεμάτων στους υποδοχείς της οικογένειας Α των GPCRs, και σε συνδυασμό με το ότι οι περιοχές αυτές του CRF_1, όπως και οι αντίστοιχες των υποδοχέων της οικογένειας Α των GPCRs, διαπερνούν τη πλασματική μεμβράνη του κυττάρου μας οδήγησε στη παρακάτω υπόθεση [4, 127, 209]. Παρόμοια με την οικογένεια Α των GPCRs, οι διαμεμβρανικές περιοχές του CRF_1 σχηματίζουν μια κοιλότητα η οποία ονομάζεται κοιλότητα θέσεων δέσμευσης του CRF_1 [4, 179-185]. Η κοιλότητα αυτή εκτείνεται από την εξωκυττάρια επιφάνεια του υποδοχέα ως το τμήμα του που βρίσκεται μέσα στη φωσφολιπιδική διπλοστιβάδα της πλασματικής

μεμβράνης του κυττάρου. Η επιφάνεια της κοιλότητας αυτής βρίσκεται σε επαφή με το υδατικό εξωκυττάριο υγρό και περιέχει αμινοξέα που αλληλεπιδρούν με τα μικρομοριακά ανάλογα του CRF (συμπεριλαμβανομένων της ανταλαρμίνης και του NBI 27914) που βρίσκονται στο εξωκυττάριο υγρό, καθώς και από αμινοξέα που παίζουν δομικό ρόλο. Όμως η έλλειψη οποιασδήποτε πληροφορίας για τη δομή του CRF_1 καθώς και όλων των άλλων υποδοχέων πού ανήκουν στην οικογένεια Β των GPCRs αποτρέπει την επαλήθευση της υπόθεσης αυτής.

Σε αντίθεση με τους υποδοχείς της οικογένειας Β των GPCRs, η δομή των υποδοχέων της οικογένειας Α, όπως της ροδοψίνης, του β_2-αδρενεργικού και του D2-ντοπαμινεργικού, είναι γνωστή τόσο από κρυσταλλογραφικές όσο και από βιοχημικές μελέτες [176-185]. Αν και η πρόβλεψη της δευτεροταγούς δομής του CRF_1 καθώς και των άλλων υποδοχέων της οικογένειας Β των GPCRs θα μπορούσε να βασιστεί στην δομή των υποδοχέων της οικογένειας Α των GPCRs ωστόσο αυτή θα ήταν το πιθανότερο εσφαλμένη επειδή οι υποδοχείς αυτοί ανήκουν σε διαφορετικές οικογένειες που έχουν αλληλουχίες αμινοξέων με πολύ μικρές ομοιότητες, και χωρίς να υπάρχουν στους υποδοχείς της οικογένειας Β τα αμινοξέα που είναι κοινά για όλους της υποδοχείς της οικογένειας Α και παίζουν κύριο ρόλο στη δομή και λειτουργία τους [127, 210, 211]. Έτσι ενώ έχουν δημιουργηθεί διάφορα μοριακά μοντέλα των υποδοχέων της οικογένειας Β των GPCRs με βάση τη δομή της ροδοψίνης στα οποία φαίνεται η ύπαρξη της κοιλότητας θέσεων δέσμευσης που σχηματίζεται από τις διαμεμβρανικές περιοχές τους εντούτοις είναι ανακριβή αφού οι ακριβείς προσανατολισμοί των αμινοξέων στις περιοχές αυτές δεν συμβαδίζουν με ορισμένα πειραματικά δεδομένα. Για παράδειγμα προηγούμενη μελέτη στον υποδοχέα της παραθυρεοειδούς ορμόνης (που επίσης ανήκει στην οικογένεια Β GPCRs) χρησιμοποιώντας ψευδάργυρο για να γεφυρώσει ιστιδίνες των κυτταροπλασματικών άκρων των τρίτης (TM3) και έκτης (TM6) διαμεμβρανικής περιοχής του, βρήκε ότι η His301 της TM3 είναι προσανατολισμένη προς τη κοιλότητα θέσεων δέσμευσης του υποδοχέα και συγκεκριμένα προς τις ιστιδίνες των θέσεων 401 και 402 της TM6, από τις οποίες βρίσκεται σε μικρή απόσταση [212]. Σε αντίθεση η Tyr252 του GLP1 (glycagon like peptide 1) υποδοχέα (που

επίσης ανήκει στην οικογένεια B GPCRs), η οποία αντιστοιχεί στην His301 του υποδοχέα της παραθυρεοειδούς ορμόνης, δεν φαίνεται τόσο στο μοριακό μοντέλο του Donnelly όσο και σε εκείνο των Frimurer και Bywater να είναι προσανατολισμένη προς τη κοιλότητα θέσεων δέσμευσης αλλά προς τη λιπιδική διπλοστιβάδα του υποδοχέα [210, 211].

Με σκοπό να επαληθεύσουμε τη παραπάνω υπόθεση (δηλαδή ότι οι διαμεμβρανικές περιοχές του CRF_1 σχηματίζουν μια κοιλότητα θέσεων δέσμευσης), και έτσι να αποκτήσουμε πληροφορίες σχετικά με τη δομή του υποδοχέα αυτού προσδιορίσαμε τα αμινοξέα των επτά διαμεβρανικών περιοχών του που σχηματίζουν μέρος της κοιλότητας θέσεων δέσμευσης του υποδοχέα και τα οποία είναι διαθέσιμα για πιθανή αλληλεπίδραση με μικρά μόρια, όπως εκείνα της ανταλαρμίνης και του NBI 27914 που βρίσκονται στο εξωκυττάριο υδατικό περιβάλλον. Αυτό το επιτύχαμε ξεκινώντας από τη τρίτη διαμεμβρανική περιοχή (TM3) του CRF_1 και εφαρμόζοντας τη μέθοδο της διαθεσιμότητας των κυστεϊνών-υποκαταστατών (substituted-cysteine accessibility method, SCAM) η οποία περιλαμβάνει, 1) μετάλλαξη των αμινοξέων των TM3 σε κυστεΐνες (τεχνητές Cys), ένα την κάθε φορά, 2) έκφραση των μεταλλαγμένων υποδοχέων σε κύτταρα, 3) αντίδραση των υποδοχέων με τα MTS-αντιδραστήρια (που αντιδρούν με τις σουλφυδρυλικές ομάδες των κυστεινών) και 4) ανίχνευση της αντίδρασης με βάση την ικανότητα των αντιδραστηρίων αυτών να ελαττώνουν μη αντιστρεπτά τη δέσμευση της ραδιοσημασμένης σοβαγίνης στον μεταλλαγμένο με τεχνητή Cys υποδοχέα. [186, 213]. Ελάττωση της δέσμευσης της ραδιοσημασμένης σοβαγίνης σε έναν μεταλλαγμένο με τεχνητή Cys υποδοχέα μετά από αντίδραση του με τα MTS-αντιδραστήρια οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η τεχνητή Cys και κατά συνέπεια το αμινοξύ του άγριου τύπου υποδοχέα το οποίο αντικατέστησε η Cys αυτή βρίσκεται στην επιφάνεια της κοιλότητας θέσεων δέσμευσης του υποδοχέα και έχει τη πλευρική του αλυσίδα προσανατολισμένη στο εξωκυττάριο υδατικό περιβάλλον.

Όμως πριν την εφαρμογή της μεθόδου SCAM ήταν απαραίτητο να διαπιστώσουμε αν κάποια ή κάποιες από τις 13 ενδογενείς κυστεΐνες του CRF_1 αντιδρούν με τα MTS-αντιδραστήρια. Στη περίπτωση αυτή δεν μπορεί να

εφαρμοστεί η μέθοδος SCAM, παρά μόνο αφού βρεθούν οι ενδογενείς κυστεΐνες του CRF_1 που αντιδρούν με τα MTS-αντιδραστήρια και αντικατασταθούν με την σερίνη. Η σερίνη δεν αντιδρά με τα MTS-αντιδραστήρια και έχει παραπλήσιες φυσικοχημικές ιδιότητες με εκείνες της κυστεΐνης [214].

Αντίδραση MTS-αντιδραστηρίων με τον CRF_1

Για να διαπιστώσουμε αν οι ενδογενείς κυστεΐνες του CRF_1 αντιδρούν με τα MTS-αντιδραστήρια προσδιορίσαμε το κατά πόσο το θετικά φορτισμένο MTS-αντιδραστήριο, MTSEA, μετά από αντίδραση του με τον υποδοχέα επηρέασε τη δέσμευση του ραδιοσημασμένου αγωνιστή, $[^{125}I]$ – Tyr^0 – σοβαγίνη, σε αυτόν. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε επωάζοντας άθικτα κύτταρα που εκφράζανε τον υποδοχέα με 2.5 mM MTSEA για 2 λεπτά της ώρας, συνθήκες που επιλέξαμε με βάση προηγούμενες μελέτες σε άλλους GPCRs [182]). Αποφύγαμε να χρησιμοποιήσουμε κάποιο ραδιοσημασμένο ανταγωνιστή για την ανίχνευση της αντίδρασης γιατί υπάρχει ο κίνδυνος να μην μπορεί να επιτευχθεί αυτό αφού η δέσμευση των ανταγωνιστών είναι γενικά λιγότερο ευαίσθητη από εκείνη των αγωνιστών σε στερεοχημικές αλλαγές του υποδοχέα που θα μπορούσαν να προκληθούν από την τροποποίηση του από το MTSEA. Για παράδειγμα, σε προηγούμενη μελέτη ενώ η αντίδραση του MTSEA με την κυστεΐνη 327 της έβδομης διαμεμβρανικής περιοχής του β_2-αδρενεργικού υποδοχέα δεν επηρέασε τη δέσμευση του ανταγωνιστή, CGP-12177, εντούτοις μείωσε σημαντικά τη συγγένεια δέσμευσης του αγωνιστή, ισοπροτερενόλη [186, 215].

Αν και ένας ραδιοσημασμένος αγωνιστής είναι προτιμότερος από έναν ανταγωνιστή για την ανίχνευση της αντίδρασης του MTSEA με τον CRF_1, εν τούτοις πριν τη χρήση του πρέπει να ληφθεί πολύ σοβαρά υπόψη ότι, σε αντίθεση με τον ανταγωνιστή, η δέσμευση του στους υποδοχείς άθικτων κυττάρων προκαλεί ενδοκυττάρωση τους μειώνοντας έτσι τον αριθμό αυτών που υπάρχουν στην επιφάνεια της πλασματικής μεμβράνης και έτσι των διαθέσιμων για αλληλεπίδραση με το ραδιοσημασμένο αγωνιστή [151, 152, 216-218]. Βάσει αυτού και λαμβάνοντας υπόψη τη πιθανότητα ότι το MTSEA μπορεί να

επηρεάσει το βαθμό ενδοκυττάρωσης του CRF_1, αντιδρώντας με κυστεΐνες των πρωτεϊνών του μηχανισμού ενδοκυττάρωσης του, όπως έχει αναφερθεί σε άλλους GPCRs, ανίχνευση της αντίδρασης του MTSEA με τον CRF_1 προσδιορίζοντας τη δέσμευση του ραδιοσημασμένου αγωνιστή, $[^{125}I]$ – Tyr^0 – σοβαγίνη σε άθικτα κύτταρα που εκφράζανε αυτόν πολύ πιθανόν να έδινε αποτελέσματα που θα οδηγούσαν σε εσφαλμένα συμπεράσματα.

Όλα τα παραπάνω μας οδήγησαν στο να εκτελέσουμε την αντίδραση του MTSEA με τον CRF_1 σε άθικτα κύτταρα που εκφράζανε αυτόν και στη συνέχεια να ανιχνεύσουμε την αντίδραση σε μεμβρανικά ομογενοποιήματα των κυττάρων αυτών. Επιλέξαμε να εκτελέσουμε την αντίδραση του MTSEA με τον CRF_1 σε άθικτα κύτταρα, και όχι σε μεμβρανικά ομογενοποιήματα τους γιατί στη δεύτερη περίπτωση το MTSEA θα είχε ελεύθερη πρόσβαση στις ενδοκυττάριες G-πρωτεΐνες και θα αντιδρούσε με τις σουλφυδρυλικές ομάδες των κυστεινών τους. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι αντιδραστήρια-τροποποιητές σουλφυδρυλικών ομάδων (χημικά συγγενή με το MTSEA) αντιδρούν με τις G-πρωτεΐνες και επηρεάζουν τη λειτουργία τους [219-222] Αντίστοιχα, αντίδραση του MTSEA με τις G-πρωτεΐνες είναι πολύ πιθανόν ότι θα επηρέαζε την αλληλεπίδραση τους με τον CRF_1 η οποία θεωρείται άκρως απαραίτητη για την διατήρηση του υποδοχέα στην στερεοδιαμόρφωση εκείνη που δεσμεύει με υψηλή συγγένεια τους αγωνιστές, συμπεριλαμβανομένου και της $[^{125}I]$ – Tyr^0 – σοβαγίνης [52, 192, 223]. Η ελάττωση της δέσμευσης της $[^{125}I]$ – Tyr^0 – σοβαγίνης λόγω τροποποίησης από το MTSEA της αλληλεπίδρασης του CRF_1 με τις G-πρωτείνες θα ήταν σοβαρό εμπόδιο στο προσδιορισμό του κατά πόσο μια κυστεΐνη του υποδοχέα αντέδρασε με το MTSEA.

Τέλος επιλέξαμε να ξεκινήσουμε τα πειράματα μας με το MTSEA αντί με άλλα MTS-αντιδραστήρια (MTSES, MTSET) γιατί είναι το μικρότερο σε μέγεθος και θα μπορούσε να αντιδράσει με κάποια κυστεΐνη με την οποία δεν θα μπορούσαν τα άλλα λόγω στερεοχημικής παρεμπόδισης [186].

Αντίδραση του MTSEA με τον CRF_1 ελάττωσε τη δέσμευση της $[^{125}I]$ - Tyr^0-σοβαγίνης, οδηγώντας έτσι στο συμπέρασμα ότι το MTSEA αντέδρασε με μια ή περισσότερες από τις 13 ενδογενείς κυστεΐνες του CRF_1. Από τις κυστεΐνες αυτές

έξι (Cys30, Cys44, Cys54, Cys68, Cys87, Cys102) βρίσκονται στην εξωκυττάριο Ν-περιοχή, δύο (Cys188, Cys258) στο πρώτο (EL1) και στο δεύτερο (EL2) εξωκυττάριο βρόγχο, τέσσερις (Cys128, Cys211, Cys233, Cys364) στη πρώτη (TM1), στη τρίτη (TM3) στη τέταρτη (TM4) και στην έβδομη (TM7) διαμεμβρανική περιοχή και μια (Cys150) στο πρώτο ενδοκυττάριο βρόγχο (IL1) του υποδοχέα.

Από τις ενδογενείς κυστεΐνες του CRF_1, οκτώ (Cys30, Cys44, Cys54, Cys68, Cys87, Cys102, Cys188 και Cys258) σχηματίζουν δισουλφιδικούς δεσμούς μεταξύ τους και έτσι δεν είναι διαθέσιμες για αντίδραση με το MTSEA, αφού αυτό αντιδρά μόνο με τις ελεύθερες σουλφυδρυλικές ομάδες των κυστεινών [130, 169, 186, 213]. Επίσης φαίνεται να είναι απίθανο το αδιαπέραστο από τη πλασματική μεμβράνη του κυττάρου, MTSEA να αντέδρασε με την ενδοκυττάριο κυστεΐνη του CRF_1, Cys150. Με βάση τα παραπάνω η ελάττωση της δέσμευσης της $[^{125}I]$ - Tyr^0- σοβαγίνης στον CRF_1 από το MTSEA πολύ πιθανόν οφειλόταν στην αντίδραση του με μια ή περισσότερες από τις υπόλοιπες 4 κυστεΐνες (Cys128, Cys211, Cys233 και Cys364) που βρίσκονται στις διαμεμβρανικές περιοχές του υποδοχέα.

Με σκοπό να προσδιορίσουμε ποια ή ποιες από τις 4 ενδογενείς διαμεμβρανικές κυστεΐνες του CRF_1 (Cys128, Cys211, Cys233 και Cys364) αντέδρασαν με το MTSEA μεταλλάξαμε αυτές, μια τη κάθε φορά, σε σερίνη, προσδιορίσαμε τις φαρμακολογικές ιδιότητες των μεταλλαγμένων υποδοχέων και στη συνέχεια εξετάσαμε αν αυτοί αντέδρασαν με το MTSEA (2.5 mM - 2 λεπτά - θερμοκρασία δωματίου).

Καμία από τις των Cys128, Cys211, Cys233 ή Cys364 σε σερίνη δεν στάθηκε ικανή να καταργήσει την ελάττωση της ειδικής δέσμευσης της $[^{125}I]$ - Tyr^0-σοβαγίνης στον CRF_1. Το αποτέλεσμα αυτό σε συνδυασμό με το γεγονός ότι οι μεταλλάξεις των Cys128, Cys211, Cys233 ή Cys364 σε σερίνη δεν επηρέασαν σημαντικά τις φαρμακολογικές ιδιότητες του CRF_1 και άρα τη δομή του οδηγούν στις εξής υποθέσεις :

1. *Το MTSEA είναι πολύ πιθανόν ότι ελάττωσε την δέσμευση της [^{125}I] - Tyr^{0}-σοβαγίνης στον CRF_1 αντιδρώντας ταυτόχρονα με περισσότερες από μια ενδογενείς κυστεΐνες του υποδοχέα*
2. *Καμία από τις ενδογενείς κυστεΐνες του CRF_1 δεν αντέδρασε με το MTSEA. Αντίθετα το MTSEA αντέδρασε με κάποια πρωτείνη που αλληλεπιδρά με τον CRF_1 και έτσι "αλλοστερικά" επηρέασε τη δέσμευση της [^{125}I] - Tyr^{0}-σοβαγίνης στον CRF_1*
3. *Και οι δύο παραπάνω υποθέσεις ισχύουν*

Αντίδραση του MTSEA με τον ΔCys υποδοχέα

Με σκοπό να αποδείξουμε τις παραπάνω υποθέσεις, αλλά και να δημιουργήσουμε τις πειραματικές εκείνες συνθήκες κάτω από τις οποίες το MTSEA δεν αντιδρά με τον CRF_1 (με σκοπό να τις χρησιμοποιήσουμε στις μελέτες SCAM) εκτελέσαμε μια σειρά πειραμάτων ξεκινώντας από τη ταυτόχρονη αντικατάσταση με σερίνη όλων των ενδογενών διαμεβρανικών κυστεϊνών (Cys128, Cys211, Cys233 και Cys364), καθώς και της κυτταροπλασματικής κυστεΐνης (Cys150) του CRF_1. Αντικαταστήσαμε τη κυτταροπλασματική κυστεΐνη (Cys150) με σερίνη για να εξαλείψουμε ακόμα και τη παραμικρή πιθανότητα αντίδρασης της με το MTSEA στη περίπτωση που μετά την αντίδραση του με τον CRF_1 σε άθικτα κύτταρα υπάρχουν ίχνη αντιδραστηρίου κατά τη διάρκεια της ομογενοποίησης των κυττάρων (για τη παρασκευή μεμβρανών και προσδιορισμού της δέσμευσης της [^{125}I] - Tyr^{0}-σοβαγίνης σε αυτές).

Η ταυτόχρονη αντικατάσταση των Cys128, Cys211, Cys233, Cys364 και Cys150 δημιούργησε τον μεταλλαγμένο υποδοχέα ΔCys, που ήταν παρόμοιος με τον άγριο τύπο CRF_1 στη δομή και λειτουργία του (αφού η μεταλλάξεις αυτές δεν άλλαξαν σημαντικά τη συγγένεια δέσμευσης της [^{125}I] - Tyr^{0}-σοβαγίνης) και θεωρητικά αδρανής στο MTSEA αφού δεν είχε ενδογενείς κυστεΐνες για να αντιδράσουν με αυτό. Παρά ταύτα επώαση του ΔCys με το MTSEA για 2 λεπτά (ακόμα και για 1 λεπτό της ώρας) ελάττωσε την ειδική δέσμευση της [^{125}I] - Tyr^{0}-σοβαγίνης. Το αποτέλεσμα αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ΔCys

αλληλεπιδρούσε με κάποια πρωτείνη (πρωτείνη Χ) με την οποία αντέδρασε το MTSEA και έτσι επηρέασε 'αλλοστερικά' τις λειτουργικές ιδιότητες του CRF_1. Η πιθανότητα αλληλεπιδράσεων του CRF_1 με άλλες πρωτείνες έχει ήδη προταθεί, ενώ η ύπαρξης τους έχει αποδειχτεί σε άλλους GPCRs [129, 224, 225].

Αντίθετα με την αντίδραση του 1 και των 2 λεπτών, επώαση του ΔCys με το MTSEA (2.5 mM) για 15 δευτερόλεπτα της ώρας δεν επηρέασε σημαντικά τη δέσμευση του ραδιοσημασμένου αγωνιστή στον υποδοχέα αυτόν. Θεωρώντας ότι ο ΔCys αλληλεπιδρά με μια άγνωστη πρωτείνη (πρωτείνη Χ), όπως αναφέρθηκε παραπάνω, είναι πιθανόν ότι τα 15 δευτερόλεπτα αντίδρασης δεν επηρέασαν τη δέσμευση της σοβαγίνης, γιατί είτε δεν επαρκούσαν για να αντιδράσει το MTSEA με τη πρωτείνη Χ και έτσι να επηρεάσει ''αλλοστερικά'' τις λειτουργικές του ιδιότητες του ΔCys, ή επέτρεψαν στο MTSEA να αντιδράσει με κάποιο ποσοστό της πρωτείνης Χ που όμως δεν ήταν αρκετό για να επηρεάσει σημαντικά το λειτουργικό φαινότυπο του ΔCys.

Συμπερασματικά, στα 15 δευτερόλεπτα επώασης του ΔCys με 2.5 mM MTSEA ο υποδοχέας δεν φάνηκε να αντιδρά με το MTSEA, συμβαδίζοντας με το γεγονός ότι ο υποδοχέας αυτός δεν έχει καμιά ενδογενή κυστεΐνη που να έχει ελεύθερη τη σουλφυδρυλική ομάδα της και έτσι διαθέσιμη στο αντιδραστήριο

Χρονοεξαρτώμενη και δοσοεξαρτώμενη αντίδραση του MTSEA με τον άγριο τύπο CRF_1

Αντίδραση του MTSEA με τον άγριο τύπο CRF_1 μείωσε με χρονοεξαρτώμενο και δοσοεξαρτώμενο τρόπο τη δέσμευση της [^{125}I] - Tyr^0-σοβαγίνης σε αυτόν, όπως έχει παρατηρηθεί και σε άλλους υποδοχείς, όπως εκείνους της νευροκινίνης-2, του δ-οπιοειδή, του CB2-καναβινοειδή, της ακτετυλοχολίνης, του GABA και του D2-ντοπαμινεργικού [226-231].

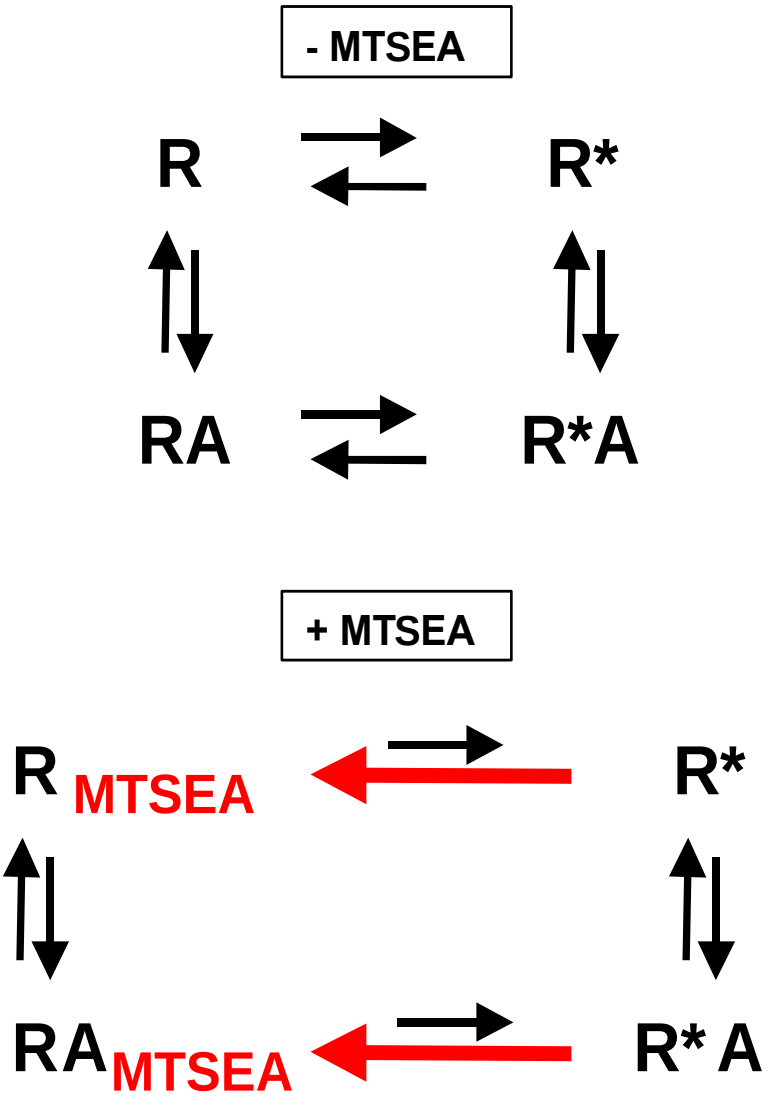
Αντίθετα με τον ΔCys, αντίδραση 15 δευτερολέπτων του MTSEA (2.5 mM) με, τον δομικά και λειτουργικά όμοιο με τον ΔCys, άγριο τύπου CRF_1 ελάττωσε σημαντικά τη δέσμευση της [^{125}I] - Tyr^0-σοβαγίνης Το αποτέλεσμα αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η μείωση της δέσμευσης στον άγριο τύπο CRF_1 από

το MTSEA οφείλεται στην αντίδραση του με μια ή περισσότερες από τις 4 ενδογενείς κυστεΐνες του που βρίσκονται στις διαμεμβρανικές περιοχές του υποδοχέα και λείπουν από τον ΔCys. Οι κυστεΐνες αυτές που αντέδρασαν με το MTSEA πρέπει να είναι προσανατολισμένες προς μια κοιλότητα, τη κοιλότητα των θέσεων δέσμευσης του υποδοχέα, που επικοινωνεί με το εξωκυκυττάριο υγρό και άρα είναι διαθέσιμες για αντίδραση με το MTSEA που βρίσκεται διαλυμένο στο υγρό αυτό.

Μηχανισμός ελάττωσης της δέσμευσης της σοβαγίνης στον CRF_1 μετά από αντίδραση του με το MTSEA

Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι όλοι οι GPCRs, συμπεριλαμβανομένου και του CRF_1, βρίσκονται σε ισορροπία (R <-> R*) ανάμεσα σε (χαμηλής συγγένειας για τους αγωνιστές) ανενεργές καταστάσεις, R, και (υψηλής συγγένειας για τους αγωνιστές) ενεργές καταστάσεις R* με τις ανενεργές να κυριαρχούν απουσία αγωνιστή [232-235] (εικόνα 1). Οι αγωνιστές αντιδρούν με τις ενεργές καταστάσεις R* (δημιουργώντας έτσι το σύμπλοκο R*A) με πολύ μεγαλύτερη συγγένεια, από ότι με τις ανενεργές, R (δημιουργώντας έτσι το σύμπλοκο RA), και έτσι μετατοπίζουν την ισορροπία προς το R*A, εμπλουτίζοντας με αυτό το τρόπο το ποσοστό των υποδοχέων στις ενεργές καταστάσεις.

Αφού η αντίδραση με το MTSEA με τον CRF_1 έγινε πριν τη δέσμευση του αγωνιστή σε άθικτα κύτταρα, το πιθανότερο είναι ότι το MTSEA αντέδρασε κυρίως με τις ανενεργές καταστάσεις, R, του CRF_1. Σε αντίθεση με την αντίδραση του MTSEA με τις ανενεργές καταστάσεις η ανίχνευση της πραγματοποιήθηκε με το προσδιορισμό της επίδρασης της αντίδρασης, στις υψηλής συγγένειας δέσμευσης για τον αγωνιστή [^{125}I] - Tyr^0-σοβαγίνη, ενεργές καταστάσεις, R* του CRF_1. Η χαμηλής συγγένειας δέσμευση του ραδιοσημασμένου αγωνιστή στις ανενεργές καταστάσεις, R, δε μπορούσε να προσδιοριστεί κάτω από τις πειραματικές συνθήκες της παρούσας μελέτης.



Εικόνα 1. Επίδραση του MTSEA στην κατάσταση ισορροπίας μεταξύ διαφορετικών δομικών-ενεργειακών καταστάσεων του CRF_1

Το γεγονός ότι η αντίδραση του CRF_1 με το MTSEA μείωσε τον αριθμό των θέσεων υψηλής συγγένειας δέσμευσης της [^{125}I] - Tyr^0-σοβαγίνης χωρίς να έχει επηρεάσει την ίδια τη συγγένεια, μπορεί να εξηγηθεί με βάση τα παραπάνω ως εξής. Το MTSEA αντέδρασε μόνο με τις ανενεργές καταστάσεις (ή μέρος αυτών) του CRF_1, με αποτέλεσμα να μετατοπιστεί η ισορροπία R <-> R*, και κατ' επέκταση η RA <-> R*A προς το R και RA και έτσι να μειωθεί ο αριθμός των

συμπλόκων R*A, δηλαδή των θέσεων υψηλής συγγένειας δέσμευσης της [^{125}I] - Tyr^{0}-σοβαγίνης (εικόνα 1). Εφ' όσον βάσει του μοντέλου αυτού το MTSEA δεν αντέδρασε με τις R* τότε δεν αναμενόταν να επηρεάσει τη συγγένεια δέσμευσης της [^{125}I] - Tyr^{0}-σοβαγίνης για αυτές, όπως και παρατηρήσαμε στα πειράματα μας. Παρόμοια τα MTS-αντιδραστήρια επηρέασαν την ισορροπία του διαύλου του NMDA υποδοχέα, μετατοπίζοντας την ισορροπία του μεταξύ κλειστών και ανοικτών καταστάσεων (εικόνα 1) [236].

Αντίδραση των MTSET και MTSES με τον CRF_1

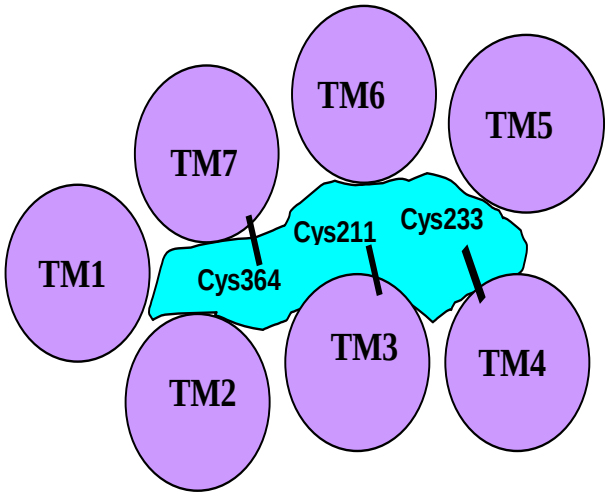
Σε αντίθεση με το MTSEA, τα αντιδραστήρια MTSET και MTSES, δεν ήταν ικανά να ελαττώσουν σημαντικά τη δέσμευση της [^{125}I] - Tyr^{0}-σοβαγίνης στον CRF_1. Μία πιθανή εξήγηση για το γεγονός αυτό είναι ότι οι ενδογενείς κυστεΐνες βρίσκονται κοντά στα κυτταροπλασματικά άκρα των διαμεβρανικών περιοχών και βαθιά μέσα στη κοιλότητα θέσεων δέσμευσης του CRF_1 με αποτέλεσμα η προσέγγισή τους από τα μεγαλύτερα σε όγκο (από το MTSEA) MTSET και MTSES να παρεμποδίζεται στερεοχημικά. Παρόμοια, στον υποδοχέα D_2 της ντοπαμίνης βρέθηκε ότι οι κυστεΐνες στις θέσεις 129 και 378 της τρίτης και έκτης διαμεμβρανικής περιοχής, ενώ ήταν διαθέσιμες για αντίδραση με το MTSEA, δεν αντέδρασαν με τα μεγαλύτερα σε όγκο MTSET και MTSES [180, 182].

Αντίδραση των Cys211, Cys233 Cys364, του CRF_1 με το MTSEA. Κοιλότητα θέσεων δέσμευσης CRF_1

Με σκοπό να διαπιστώσουμε ποια ή ποιες από τις ενδογενείς κυστεΐνες, Cys128, Cys211, Cys233 Cys364, του CRF_1 αντέδρασαν με 2.5 mM MTSEA για 15 δευτερόλεπτα σε θερμοκρασία δωματίου, μεταλλάξαμε αυτές μια τη κάθε φορά σε σερίνη (δημιουργώντας έτσι τους μεταλλαγμένους υποδοχείς C128S, C211S, C233S και C364S) και προσδιορίσαμε την επίδραση της αντίδρασης του MTSEA με τους μεταλλαγμένους υποδοχείς στη δέσμευση της [^{125}I] - Tyr^{0}-σοβαγίνης.

Σε αντίθεση με τον υποδοχέα C128S η αντίδραση του MTSEA με τους C211S, C233S και C364S δεν επηρέασε τη δέσμευση της [^{125}I] - Tyr^{0}-σοβαγίνης. Αυτό σε συνδυασμό με το γεγονός ότι οι υποδοχείς C128S, C211S, C233S και C364S έχουν παρόμοια δομή και λειτουργία με εκείνη του άγριου τύπου CRF_1 (αφού δεσμεύουν τη [^{125}I] - Tyr^{0}-σοβαγίνη με παρόμοια συγγένεια με εκείνης για τον άγριο τύπο CRF_1), οδηγεί στο συμπέρασμα ότι οι Cys211, Cys233 και Cys364 έχουν τις πλευρικές αλυσίδες προσανατολισμένες προς μια κοιλότητα, τη κοιλότητα των θέσεων δέσμευσης του υποδοχέα, που επικοινωνεί με το εξωκυκυττάριο υγρό και άρα είναι διαθέσιμες για αντίδραση με το MTSEA που βρίσκεται διαλυμένο στο υγρό αυτό (εικόνα 2). Αντίθετα, η πλευρική αλυσίδα της Cys128 είναι προσανατολισμένη είτε προς τη λιπιδική διπλοστιβάδα της πλασματικής μεμβράνης του κυττάρου ή προς μια άλλη διαμεμβρανική περιοχή.

Σε δύο μοριακά μοντέλα του GLP1 υποδοχέα που έχουν δημιουργηθεί, τα αμινοξέα του που αντιστοιχούν στα Cys211, Cys233 και Cys364 του CRF_1 δεν φαίνεται να είναι προσανατολισμένα προς το υδατικό περιβάλλον της κοιλότητας των θέσεων δέσμευσης του υποδοχέα [210, 211]. Παρόμοια με την ασυμβατότητα αυτή, πειραματικά δεδομένα από προηγούμενη μελέτη στους υποδοχείς της οικογένειας Β των GPCRs (συγκεκριμένα στον υποδοχέα της παραθυρεοειδούς ορμόνης) δεν συμφωνούν με τα μοριακά αυτά μοντέλα, αποδεικνύοντας έτσι πόσο ανακριβή είναι αυτά και αναδεικνύοντας την εξαιρετική σημασία των πειραμάτων της μελέτης μας με σκοπό τη συλλογή πληροφοριών για τη δομή των υποδοχέων της οικογένειας αυτής [212].



Εικόνα 2. Γραφική απεικόνιση της κοιλότητας θέσεων δέσμευσης του CRF_1. *Οι ενδογενείς κυστεΐνες, Cys211, Cys233 και Cys364, του CRF_1 βρίσκονται πάνω στην επιφάνεια της κοιλότητας θέσεων δέσμευσης του υποδοχέα (γαλάζιο χρώμα) και έτσι να είναι διαθέσιμες για αντίδραση με το MTSEA. Οι μωβ κύλινδροι παριστάνουν τις διαμεμβρανικές περιοχές (TM1-TM7) του υποδοχέα.*

Συμπερασματικά, για πρώτη φορά ανακαλύψαμε ότι παρόμοια με την οικογένεια Α των GPCRs, οι διαμεμβρανικές περιοχές του CRF_1 και κατ' επέκταση των άλλων υποδοχέων της οικογένειας Β των GPCRs σχηματίζουν μια κοιλότητα η οποία ονομάζεται κοιλότητα θέσεων δέσμευσης του CRF_1 και η οποία εκτείνεται από την εξωκυττάρια επιφάνεια του υποδοχέα ως το τμήμα του που βρίσκεται μέσα στη φωσφολιπιδική διπλοστιβάδα της πλασματικής μεμβράνης του κυττάρου. Η επιφάνεια της κοιλότητας αυτής βρίσκεται σε επαφή με το υδατικό εξωκυττάριο υγρό και περιέχει αμινοξέα που είναι διαθέσιμα για αντίδραση με ουσίες, όπως το MTSEA ή οι CRF_1-αγωνιστές και ανταγωνιστές, που βρίσκονται στο υγρό αυτό.

Συνεργιστικό αποτέλεσμα της αντίδρασης του MTSEA με τις ενδογενείς κυστεΐνες του CRF_1 στη δέσμευση της σοβαγίνης.

Ενώ ο άγριος τύπος CRF_1 (που περιέχει τις 4 ενδογενείς κυστεΐνες, Cys128, Cys211, Cys233 και Cys364) ήταν ευαίσθητος στο MTSEA η αντικατάσταση μιας μόνο από τις ενδογενείς κυστεΐνες του, Cys211, Cys233 και Cys364, σε σερίνη, (αφήνοντας έτσι τις υπόλοιπες 3 στον υποδοχέα) μετέτρεψε αυτόν σε έναν ΄΄αδρανή στο MTSEA΄΄ υποδοχέα, και οδήγησε στο συμπέρασμα ότι οι Cys211, Cys233 και Cys364 αντέδρασαν με το MTSEA . Το αποτέλεσμα όμως αυτό έθεσε τα εξής ερωτήματα:

1) αφού μια κυστεΐνη του CRF_1 (για παράδειγμα η Cys211) φάνηκε να αντιδρά με το MTSEA, γιατί αυτή ενώ βρίσκεται στον υποδοχέα μετά την μετάλλαξη σε σερίνη μιας άλλης κυστεΐνης (για παράδειγμα της Cys233 ή της Cys364) δεν φαίνεται πλέον να αντιδρά με το MTSEA;

2) ποια θα ήταν η συμπεριφορά της κάθε ενδογενούς κυστεΐνης από τις Cys211, Cys233 και Cys364 του CRF_1 αν ήταν μόνη της στον υποδοχέα;

Με σκοπό να απαντήσουμε στα παραπάνω ερωτήματα εξετάσαμε την επίδραση του MTSEA (2.5 mM, 15 δευτερόλεπτα) στη δέσμευση της [^{125}I] - Tyr^0-σοβαγίνης σε υποδοχείς που έχουν μόνο μια από τις τέσσερις ενδογενείς διαμεμβρανικές κυστεΐνες (μεταλλαγμένοι υποδοχείς, ΔCys+128C, ΔCys+211C, ΔCys+233C και ΔCys+364C) Αν και οι λειτουργικές ιδιότητες και άρα η δομή των μεταλλαγμένων αυτών υποδοχέων δεν φάνηκε να έχουν επηρεαστεί αρκετά (όπως φάνηκε από τις συγγένειες με τις οποίες δέσμευαν τη [^{125}I] - Tyr^0-σοβαγίνη) εντούτοις σε κανέναν από τους υποδοχείς αυτούς η δέσμευση της [^{125}I] - Tyr^0-σοβαγίνης δεν επηρεάστηκε από την αντίδραση τους με το MTSEA.

Τα παραπάνω οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η αντίδραση του MTSEA με τις ενδογενείς κυστεΐνες του CRF_1 όταν αυτές είναι μόνες τους δεν είναι ικανή να επηρεάσει σημαντικά τη δέσμευση της [^{125}I] - Tyr^0-σοβαγίνης. Έτσι λοιπόν το πιο πιθανό είναι ότι η ταυτόχρονη αντίδραση του MTSEA με περισσότερες των μια κυστεινών από τις Cys211, Cys233, και Cys364 του άγριου τύπου CRF_1 συνεργιστικά ελάττωσε την ειδική δέσμευση της [^{125}I]-σοβαγίνης σε αυτόν.

Λήψη πληροφοριών για τη δομή της τρίτης διαμεμβρανικής περιοχής του CRF1.

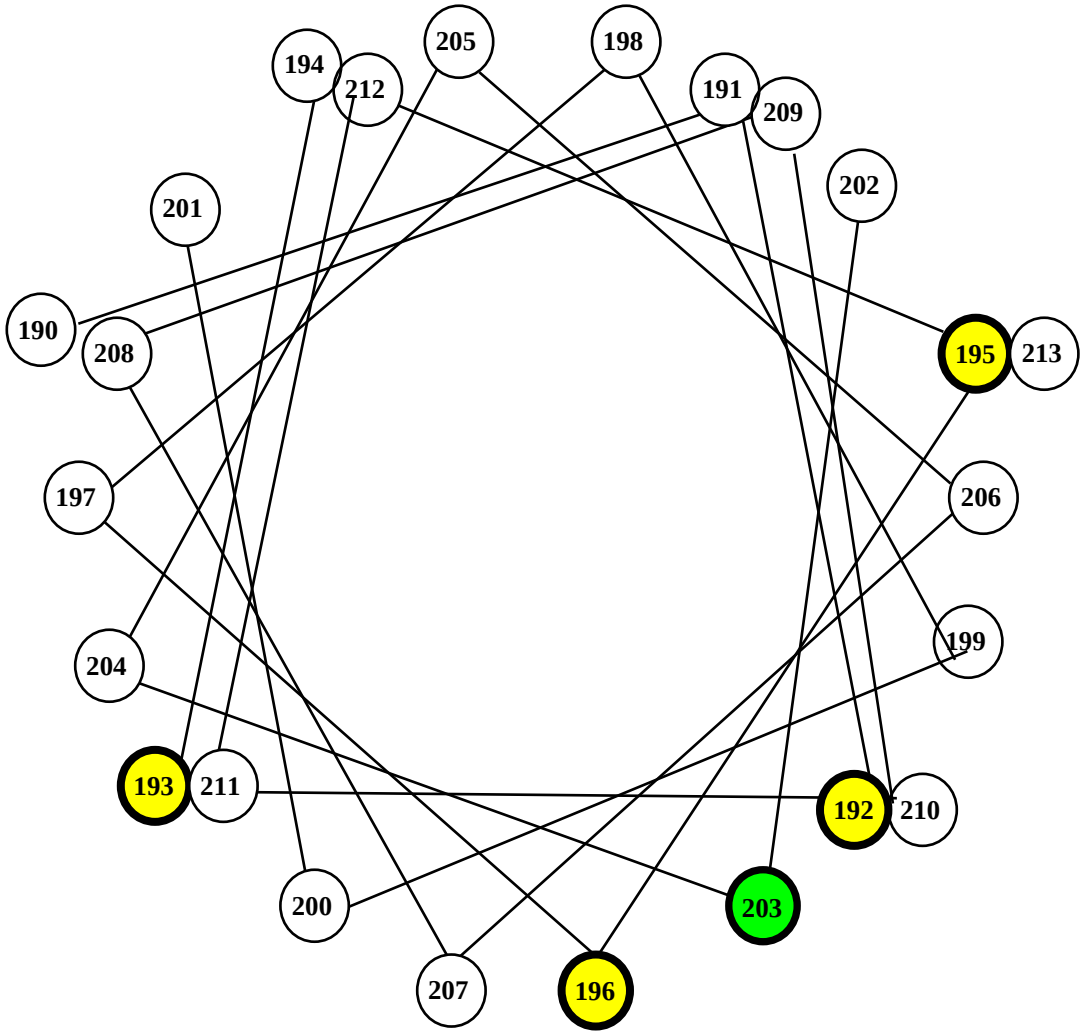
Στη συνέχεια προσδιορίσαμε τα αμινοξέα της τρίτης διαμεμβρανικής περιοχής (TM3) του CRF_1 που σχηματίζουν μέρος της κοιλότητας θέσεων δέσμευσης του υποδοχέα, εφαρμόζοντας τη μέθοδο SCAM. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιώντας τον υποδοχέα ΔCys, μεταλλάξαμε τα αμινοξέα (ένα τη κάθε φορά) της τρίτης διαμεμβρανικής περιοχής του σε κυστεΐνες, (τεχνητές κυστεΐνες), δημιουργώντας έτσι τους TM3-μεταλλαγμένους υποδοχείς, R189C, L190C, V191C, T192C, A193C, A194C, Y195C, N196C, Y197C, F198C, H199C, V200C, T201C, N202C, F203C, F204C, W205C και M206C, και εξετάσαμε αν η αντίδραση του MTSEA με τους υποδοχείς αυτούς επηρέασε την δέσμευση της [^{125}I] - Tyr^0-σοβαγίνης.

Όλες οι παραπάνω μεταλλάξεις εκτός εκείνης της F203C δεν επηρέασαν την ειδική δέσμευση της [^{125}I] - Tyr^0-σοβαγίνης στον CRF_1. Το γεγονός αυτό βρίσκεται σε συμφωνία με το ότι γενικά οι μεταλλάξεις των αμινοξέων σε κυστεΐνη δεν επηρεάζουν σημαντικά τις λειτουργικές ιδιότητες του υποδοχέα και κατά συνέπεια τη στερεοδιαμόρφωση του [186, 187]. Παρόμοια στον υποδοχέα D2 της ντοπαμίνης, οι 144 από τις 157 αντικαταστάσεις αμινοξέων με κυστεΐνες στις επτά διαμεμβρανικές περιοχές του δεν επηρέασαν σημαντικά τη δέσμευση του ραδιοσημασμένου ανταγωνιστή και άρα τη δομή του υποδοχέα [179-185]. Οι 144 αυτές αντικαταστάσεις αφορούσαν όλα τα είδη των αμινοξέων όπως υδρόφοβα αμινοξέα (αλανίνη, λευκίνη, ισολευκίνη, μεθειονίνη και βαλίνη) πολικά (ασπαραγίνη, σερίνη και θρεονίνη) ουδέτερα (προλίνη) αρνητικά φορτισμένα (ασπαρτικό και γλουταμινικό οξύ) αρωματικά (φαινυλαλανίνη, τρυπτοφάνη και τυροσίνη) τη θετικά φορτισμένη ιστιδίνη και το αμινοξύ γλυκίνη. Οι περισσότερες από τις υπόλοιπες 7 από τις 157 αντικαταστάσεις επηρέασαν τη δέσμευση του ανταγωνιστή γιατί απλά ήταν αμινοξέα με τα οποία αυτός αλληλεπιδρούσε.

. Η αντίδραση του MTSEA με τους TM3-μεταλλαγμένους υποδοχείς ελάττωσε σημαντικά την ειδική δέσμευση της [^{125}I] - Tyr^0-σοβαγίνης μόνο στους R189C, T192C, A193C, Y195C, N196C, ενώ αύξησε σημαντικά τη δέσμευση

στον F203C. Αντίθετα η δέσμευση του ραδιοσημασμένου πεπτιδίου στους άλλους μεταλλαγμένους υποδοχείς που εξετάστηκαν δεν επηρεάστηκε σημαντικά από τη αντίδραση τους με το MTSEA. Το γεγονός ότι η αντίδραση του MTSEA με τους R189C, T192C, A193C, Y195C, N196C και F203C επηρέασε σημαντικά την δέσμευση της [^{125}I] - Tyr^{0}-σοβαγίνης σημαίνει ότι οι τεχνητές κυστεΐνες στις θέσεις 189, 192, 193, 195, 196, 199 και 203 του ΔCys βρίσκονται πάνω στην επιφάνεια της κοιλότητας θέσεων δέσμευσης του υποδοχέα και είναι διαθέσιμες για αντίδραση με το MTSEA που βρίσκεται στο εξωκυττάριο υδατικό περιβάλλον. Παρόμοια με τις τεχνητές Cys στις θέσεις 189, 192, 193, 195, 196, 199 και 203 του ΔCys έτσι και τα αμινοξέα του άγριου τύπου CRF_1 που αντικαταστάθηκαν από αυτές (αφού ο άγριος τύπος CRF_1 και ο ΔCys είναι λειτουργικά και δομικά παρόμοιοι, όπως αναφέρθηκε παραπάνω) βρίσκονται πάνω στην επιφάνεια της κοιλότητας θέσεων δέσμευσης του υποδοχέα.

Αντίθετα με τα αμινοξέα στις θέσεις 189, 192, 193, 195, 196, 199 και 203 του CRF_1, τα υπόλοιπα της TM3 που εξετάστηκαν στη παρούσα εργασία δεν βρίσκονται πάνω στην επιφάνεια της κοιλότητας θέσεων δέσμευσης του υποδοχέα. Στα αμινοξέα αυτά συγκαταλέγεται και η His199. Αφού η His199 δεν έχει τη πλευρική αλυσίδα της προσανατολισμένη προς τη κοιλότητα των θέσεων δέσμευσης του υποδοχέα τότε δεν μπορεί να αλληλεπιδράσει με τα μικρομοριακά μη πεπτιδικά ανάλογα του CRF, όπως τη ανταλαρμίνη και το χημικά συγγενές της ανάλογο, NBI 27914. Έτσι λοιπόν η αντικατάσταση της His199 από τη Val, όπως βρέθηκε από τους Liaw et al. (1997) ελάττωσε την δέσμευση του NBI 27914 έμμεσα μέσω στερεοχημικής αλλαγής του υποδοχέα [195]. Τα παραπάνω βρίσκονται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας στην οποία βρέθηκε ότι η μετάλλαξη της His199 στη καλά δομικά ανεκτή αλανίνη δεν επηρέασε τη δέσμευση της ανταλαρμίνης.



Εικόνα 3. Γραφική άλφα ελικοειδής αναπαράσταση των αμινοξέων της τρίτης διαμεμβρανικής περιοχής του CRF_1. *Τα αμινοξέα που είναι διαθέσιμα για αντίδραση με MTSEA είναι χρωματισμένα. Στα κίτρινα χρωματισμένα αμινοξέα η αντίδραση με το MTSEA ελάττωσε την ειδική δέσμευση της [^{125}I] – Tyr^{0} – σοβαγίνης, ενώ στα πράσινα η αντίδραση ενίσχυσε την ειδική δέσμευση. Το αμινοξύ Arg189 το οποίο βρέθηκε στις μελέτες μας ότι είναι διαθέσιμο για αντίδραση με το MTSEA δεν υπάρχει στην αναπαράσταση αυτή γιατί θεωρείται ότι ανήκει στον πρώτο εξωκυττάριο βρόγχο.*

Αν τοποθετήσουμε τα αμινοξέα της TM3 του CRF_1 πάνω σε μια αναπαράσταση α-έλικας τότε θα διαπιστώσουμε ότι κάθε τρίτο ή/και τέταρτο αμινοξύ βρίσκεται στη μια επιφάνεια της α-ελικοειδούς αναπαράστασης (Εικόνα 3) . Παρόμοια α-ελικοειδή δομή της TM3 εμφανίζουν και όλοι οι GPCRs των οποίων η δομή αποσαφηνίστηκε είτε εφαρμόζοντας τη μέθοδο SCAM ή μέσω κρυστάλλωσης τους [176-178, 182].

Αξιοσημείωτο αποτελεί το γεγονός ότι ενώ η F203C μετάλλαξη ελάττωσε τη συγγένεια δέσμευσης της [^{125}I] - Tyr^0-σοβαγίνης η αντίδραση του MTSEA με τον υποδοχέα αυτόν ανέτρεψε το παραπάνω αποτέλεσμα αυξάνοντας σημαντικά τη δέσμευση. Παρόμοια, μετάλλαξη σε κυστεΐνη του αρνητικά φορτισμένου Asp108 της TM3 του D2-ντοπαμινεργικού υποδοχέα μείωσε τη συγγένεια του υποδοχέα για τον ανταγωνιστή [182]. Αντίδραση του μεταλλαγμένου υποδοχέα με το αρνητικά φορτισμένο MTSES επανέφερε το αρνητικό φορτίο στη θέση 108 και ανέτρεψε το αποτέλεσμα της μετάλλαξης του Asp108 στη δέσμευση του ανταγωνιστή αυξάνοντας αυτή σημαντικά [182].

Μια από τις πιθανές εξηγήσεις για την “αποκατάσταση της λειτουργίας ” του F203C μετά από αντίδραση του με το MTSEA θα μπορούσε να βασιστεί στο ότι η Phe203 παίζει έμμεσο ρόλο στη δέσμευση της [^{125}I] - Tyr^0-σοβαγίνης συμμετέχοντας σε δεσμούς με άλλα αμινοξέα του υποδοχέα που είναι απαραίτητοι για την υψηλής συγγένειας δέσμευση του ραδιοσημασμένου πεπτιδίου. Τέτοιου είδους λειτουργικά σημαντικές αλληλεπιδράσεις έχουν δειχτεί σε άλλους GPCRs, όπως τον α2-αδρενεργικό, τον υποδοχέα της αγγειοτενσίνης ΙΙ, εκείνον της γοναδοτροπίνης, του υποδοχέα της θυροτροπίνης καθώς και εκείνου της ακτετυλοχολίνης [237-243]. Σε μια τέτοια περίπτωση το πιο πιθανόν είναι ο αρωματικός δακτύλιος της Phe203 να αλληλεπιδρά με άλλα αρωματικά αμινοξέα του υποδοχέα μέσω π-π αλληλεπιδράσεων όπως έχει δειχτεί σε άλλες πρωτεΐνες [244]. Μετάλλαξη της Phe203 σε κυστεΐνη θα καταργούσε τις αλληλεπιδράσεις αυτές που θα μπορούσαν όμως να ξαναδημιουργηθούν με προσθήκη θετικού φορτίου στη θέση 203, αφού η αντίδραση του MTSEA με μια κυστεΐνη προσδίδει σε αυτή θετικό φορτίο και πλευρική αλυσίδα τύπου λυσίνης [186, 213]. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι αρωματικά αμινοξέα μπορούν

να αλληλεπιδράσουν με θετικά φορτισμένα αμινοξέα μέσω κατιόν-π αλληλεπιδράσεων [245-247]

Εναλλακτικά, θα μπορούσε η μετάλλαξη της Phe203 σε κυστεΐνη και στη συνέχεια η αντίδραση της τελευταίας με το MTSEA να επηρέασαν άμεσα τη δέσμευση της [^{125}I] - Tyr^{0}-σοβαγίνης γιατί η θέση 203 του υποδοχέα αποτελεί σημείο επαφής του με το ραδιοσημασμένο πεπτίδιο. Έχει δειχθεί σε αρκετούς πεπτιδικούς GPCRs ότι τμήματα των πεπτιδίων μπορούν να εισέλθουν ανάμεσα στις διαμεμβρανικές περιοχές τους και να αλληλεπιδράσουν με αμινοξέα τους [248-253]

Όλα τα παραπάνω αποτελέσματα είναι εξαιρετικά σημαντικά γιατί ενώ έχει διασαφηνιστεί η δομή της εξωκυττάριας N-περιοχής σε πολλούς υποδοχείς της οικογένειας Β των GPCRs, συμπεριλαμβανόμενων και εκείνων του CRF, για πρώτη φορά στη παρούσα ερευνητική εργασία παρέχονται πληροφορίες για τη δομή των διαμεβρανικών περιοχών των υποδοχέων αυτών [162, 163, 166, 168, 254, 255]. Επιπρόσθετα τα παραπάνω αποτελέσματα θα βοηθήσουν στο σχηματισμό μοριακού μοντέλου του CRF_1 το οποίο θα αποτελέσει τη βάση για το σχεδιασμό νέων πειραμάτων με σκοπό την διαλεύκανση των αλληλεπιδράσεων των μικρομοριακών μη πεπτιδικών ανταγωνιστών του CRF με τον CRF_1 ενώ παράλληλα θα συμβάλλει σημαντικά στη κατασκευή μοριακών μοντέλων των άλλων υποδοχέων της οικογένειας Β των GPCRs .

ΤΕΤΑΡΤΗ ΚΑΙ ΠΕΜΠΤΗ ΔΙΑΜΕΜΒΡΑΝΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ ΤΟΥ CRF_1 - ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΟΥΣ

Προσδιορισμός του ρόλου των αμινοξέων της πέμπτης διαμεμβρανικής περιοχής στη δέσμευση των πεπτιδίων της οικογένειας του CRF.

Προηγούμενες μελέτες στον CRF_1 έδειξαν ότι δύο αμινοξέα (Tyr267, Thr268) στην πέμπτη διαμεμβρανική περιοχή (TM5) και συγκεκριμένα στα σύνορα μεταξύ της περιοχής αυτής και του δεύτερου εξωκυττάριου βρόγχου παίζουν ρόλο στη δέσμευση του CRF και της σοβαγίνης, χωρίς όμως να διευκρινίζεται αν ο ρόλος αυτός είναι έμμεσος ή άμεσος [194, 195]. Αδιευκρίνιστη είναι επίσης η λειτουργική σημασία των γειτονικών με τα Tyr267 και Thr268 αμινοξέων στη πέμπτη διαμεμβρανική περιοχή του CRF_1 (Asp269, Tyr270, Ile271, Tyr272, Gln273, Gly274 και Pro275). Με σκοπό να προσδιορίσουμε το ρόλο των αμινοξέων αυτών στη δέσμευση των πεπτιδίων της οικογένειας του CRF μεταλλάξαμε αυτά σε αλανίνη, ένα τη κάθε φορά, και προσδιορίσαμε τη δέσμευση της σοβαγίνης στους μεταλλαγμένους υποδοχείς. Επιλέξαμε την αλανίνη σαν αμινοξύ αντικατάστασης γιατί δεν προκαλεί σημαντικές αλλαγές τη στερεοδιαμόρφωση ενός υποδοχέα ενώ ταυτόχρονα μπορεί να καταργήσει αλληλεπιδράσεις του με τα προσδέματα του [204].

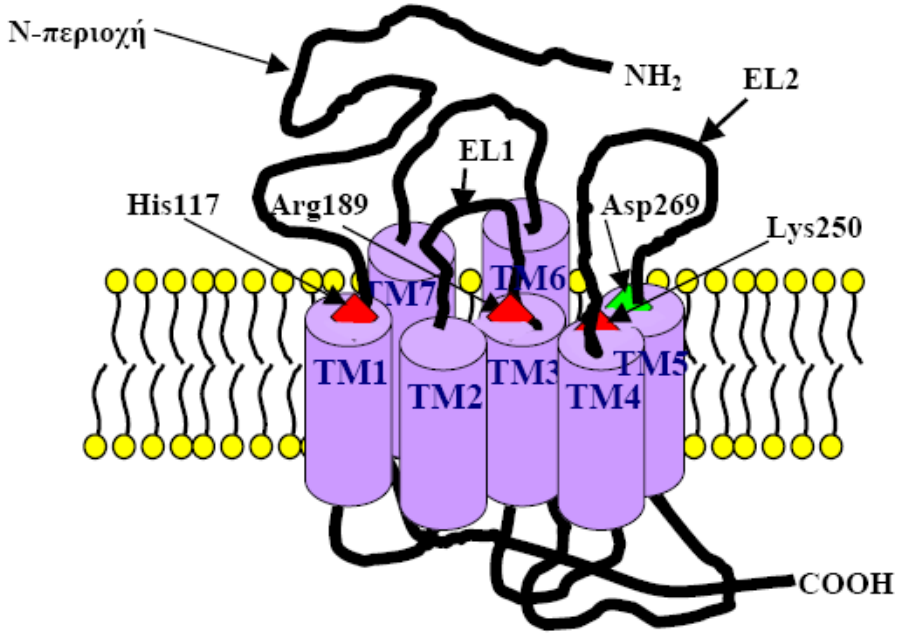
Εκτός από τα αμινοξέα Tyr267, Thr268 επιλέξαμε να μελετήσουμε επίσης το ρόλο των αμινοξέων που βρίσκονται στη πέμπτη διαμεμβρανική περιοχή του CRF_1 (Asp269, Tyr270, Ile271, Tyr272, Gln273, Gly274 και Pro275) στη δέσμευση της σοβαγίνης γιατί έχει βρεθεί ότι σε αρκετούς άλλους πεπτιδικούς GPCRs τμήματα των πεπτιδίων μπορούν να εισέλθουν ανάμεσα στις διαμεμβρανικές περιοχές τους και να αλληλεπιδράσουν με αμινοξέα τους [248-253]. Επιπρόσθετα ένα σημαντικό χαρακτηριστικό γνώρισμα της TM5 είναι ο πάρα πολύ υψηλός βαθμός συντήρησης της αλληλουχίας των αμινοξέων της ανάμεσα στους δύο τύπους όλων των ζωικών ειδών των υποδοχέων του CRF, γεγονός από το οποίο συμπεραίνεται ότι η περιοχή αυτή πρέπει να παίζει

σημαντικό ρόλο σε κοινές λειτουργίες των υποδοχέων αυτών, συμπεριλαμβανομένου και του CRF_1.

Μετάλλαξη σε αλανίνη των Thr268, Tyr270, Tyr272, Gln273 και Pro275 ελάττωσε τη συγγένεια δέσμευσης της σοβαγίνης για τον CRF_1, οδηγώντας έτσι στο συμπέρασμα ότι τα αμινοξέα αυτά παίζουν ρόλο στη δέσμευση του πεπτιδίου. Αντίθετα με τα αμινοξέα αυτά, μετάλλαξη του Asp269 σε αλανίνη αύξησε τη συγγένεια δέσμευσης της σοβαγίνης. Μια πιθανή εξήγηση θα μπορούσε να στηριχτεί στην υπόθεση ότι το Asp269 αλληλεπιδρά ηλεκτροστατικά με τη γειτονική του (εικόνα 4) θετικά φορτισμένη Lys250 του CRF_1 η οποία επίσης αποτελεί σημείο επαφής της σοβαγίνης, δεσμεύοντας ένα αρνητικά φορτισμένο αμινοξύ της. Κατά τη δέσμευση της σοβαγίνης στον CRF_1 επέρχεται κατάργηση ή/και αναδιάταξη δεσμών έτσι ώστε η Lys250 να βρεθεί στη κατάλληλη θέση αλληλεπίδρασης με το αρνητικά φορτισμένο αμινοξύ της σοβαγίνης, διαδικασία που ενεργειακά θα ήταν περισσότερο προτιμητέα αν η Lys250 ήταν ελεύθερη της επίδρασης της ηλεκτροστατικής έλξης του επίσης αρνητικά φορτισμένου Asp269, δηλαδή αν το Asp269 είχε αντικατασταθεί από την ουδέτερη αλανίνη. Σε μια τέτοια περίπτωση αντικατάσταση του Asp269 από αλανίνη θα ενίσχυε τη δέσμευση της σοβαγίνης στον CRF_1 αυξάνοντας έτσι τη συγγένεια δέσμευσης της σε αυτόν.

Προσδιορισμός του ρόλου της Lys250 στη δέσμευση των πεπτιδίων της οικογένειας του CRF.

Με σκοπό να εξακριβώσουμε τη παραπάνω υπόθεση αρχικά έπρεπε να πρώτα να εξετάσουμε το ρόλο της Lys250 στη δέσμευση της σοβαγίνης. Αυτό το πραγματοποιήσαμε αντικαθιστώντας το αμινοξύ αυτό με άλλα, ξεκινώντας από αλανίνη, και προσδιορίζοντας τις φαρμακολογικές ιδιότητες του CRF_1 πριν και μετά τις μεταλλάξεις.



Εικόνα 4. Σχηματική αναπαράσταση αμινοξέων στα όρια διαμεβρανικών και εξωκυττάριων περιοχών του CRF$_1$. *Οι διαμεμβρανικές περιοχές του CRF$_1$ (μωβ κύλινδροι) σχεδιάστηκαν με βάση τη διάταξη των αντίστοιχων περιοχών των υποδοχέων της οικογένειας Α και λαμβάνοντας υπόψη προηγούμενες μελέτες στις οποίες προτάθηκε ότι η γενική διάταξη των περιοχών αυτών των παραπάνω υποδοχέων είναι παρόμοια μεταξύ τους [210, 211]. Τα αμινοξέα Lys250 (κόκκινος ρόμβος) και Asp269 (πράσινος ρόμβος) βρίσκονται κοντά μεταξύ τους και στα όρια του δεύτερου εξωκυττάριου βρόγχου (EL2) με τη τέταρτη (TM4) και πέμπτη (TM5) διαμεμβρανική περιοχή του CRF$_1$, αντίστοιχα. Αν και υπάρχουν θετικά φορτισμένα αμινοξέα του υποδοχέα που είναι τοποθετημένα και αυτά στα όρια μεταξύ των διαμεβρανικών περιοχών και των εξωκυττάριων βρόγχων του εντούτοις αυτά βρίσκονται σε μεγαλύτερη απόσταση από το Asp269 σε σχέση με εκείνη της Lys250. Τα θετικά αυτά αμινοξέα (κόκκινοι ρόμβοι) είναι η Arg189 που βρίσκεται στα όρια του πρώτου εξωκυττάριου βρόγχου (EL1) με την τρίτη διαμεμβρανική περιοχή (TM3) και η His117 που βρίσκεται στα όρια της εξωκυττάριας αμινοτελικής περιοχής (N-περιοχής) με την πρώτη διαμεμβρανική περιοχή (TM1) του CRF1.*

Μετάλλαξη της Lys250 σε αλανίνη (K250A) μείωσε σημαντικά τη συγγένεια δέσμευσης της σοβαγίνης και του CRF, καθώς και την ισχύ με την οποία διέγειραν τα πεπτίδια αυτά τη παραγωγή κυκλικού AMP σε κύτταρα που εκφράζανε τον CRF_1. Αντίθετα η μετάλλαξη αυτή δεν επηρέασε τη συγγένεια δέσμευσης του πεπτιδικού αναλόγου του CRF, αστρεσίνης, για την οποίο έχει δειχθεί ότι δεσμεύεται κυρίως στην εξωκυττάριο N-περιοχή του CRF_1 [190]. Τα αποτελέσματα αυτά οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η μετάλλαξη K250A πολύ πιθανόν κατήργησε την αλληλεπίδραση της Lys250 με τη σοβαγίνη και τον CRF χωρίς όμως να επηρεάσει σημαντικά τη στερεοδιαμόρφωση του υποδοχέα CRF_1.

Παρόμοια με την αστρεσίνη, η μετάλλαξη K250A δεν επηρέασε τη δέσμευση του μικρομοριακού μη πεπτιδικού ανταγωνιστή, ανταλαρμίνη, για τον οποίο έχει προταθεί ότι δεσμεύεται κυρίως στις διαμεμβρανικές περιοχές του CRF_1 [192, 194, 195]. Είναι πολύ πιθανόν ότι το ανάλογο αυτό δεσμεύεται σε τμήματα των διαμεβρανικών περιοχών του υποδοχέα που βρίσκονται βαθύτερα στη πλασματική μεμβράνη από ότι η Lys250. Αυτό βρίσκεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα που αναφέραμε παραπάνω και τα οποία οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι οι διαμεμβρανικές περιοχές του υποδοχέα σχηματίζουν μια κοιλότητα θέσεων δέσμευσης στην επιφάνεια της οποίας βρίσκονται αμινοξέα που πιθανόν δεσμεύουν μικρομοριακά μη πεπτιδικά μόρια, όπως εκείνο της ανταλαρμίνης.

Με σκοπό το προσδιορισμό του ρόλου των φυσικοχημικών ιδιοτήτων της θέσης 250 του CRF_1 στη δέσμευση της σοβαγίνης και του CRF, αντικαταστήσαμε τη Lys250 από τη θετικά φορτισμένη αλλά ογκωδέστερη Arg (K250R) και το αρνητικά φορτισμένο Glu (K250E). Παρόμοια με τη μετάλλαξη K250A οι μεταλλάξεις K250R και K250E μείωσαν σημαντικά τη ισχύ με την οποία διέγειρε η σοβαγίνη τη παραγωγή κυκλικού AMP σε κύτταρα που εκφράζανε τον CRF_1. Η διατήρηση του θετικού φορτίου και αλλαγή μόνο του μεγέθους της πλευρικής αλυσίδας στη θέση 250 του CRF_1 (K250R μετάλλαξη) είχε τη μικρότερη επίδραση στην ισχύ της σοβαγίνης. Αντίθετα τη μεγαλύτερη επίδραση στην ισχύ της σοβαγίνης είχε η εισαγωγή αρνητικού φορτίου στη θέση 250 του υποδοχέα (K250E μετάλλαξη). Τα αποτελέσματα αυτά οδηγούν στο συμπέρασμα ότι

πιθανόν το θετικό φορτίο στη θέση 250 του CRF_1 παίζει σημαντικό ρολό στη δέσμευση των πεπτιδίων της οικογένειας του CRF, αλληλεπιδρώντας ηλεκτροστατικά με κάποιο αρνητικά φορτισμένο αμινοξύ τους.

Ο σημαντικός ρόλος της ύπαρξης θετικού φορτίου στη θέση 250 στη λειτουργία του CRF_1 φαίνεται επίσης από το πολύ υψηλό βαθμό διατήρησης του στους υποδοχείς της οικογένειας Β των GPCRs στην οποία ανήκει ο CRF_1. Σχεδόν σε όλους τους υποδοχείς αυτούς (271 από τους 309) το αντίστοιχο αμινοξύ της Lys250 του CRF_1 είναι είτε λυσίνη ή η επίσης θετικά φορτισμένη αργινίνη. Επίσης, όπως και στον CRF_1, έτσι αντικατάσταση της (αντίστοιχης με τη Lys250 του CRF_1) Arg255 του υποδοχέα της σεκρετίνης από Gln ή Asp μείωσε σημαντικά την ισχύ του πεπτιδίου για πρόκληση βιολογικού αποτελέσματος [256].

Αλληλεπίδραση της Lys250 του CRF_1 με το Asp8 της σοβαγίνης και το Asp9 του CRF.

Το αμινοξύ εκείνο της σοβαγίνης και του CRF που αλληλεπιδρά με τη Lys250 του CRF_1 πολύ πιθανόν βρίσκεται στη περιοχή του CRF (και την αντίστοιχη της σοβαγίνης) που περιλαμβάνει τα αμινοξέα, Asp9, Leu10 και Thr11 (Εικόνα 5), γιατί σε αντίθεση με την αστρεσίνη (που δημιουργήθηκε από απαλοιφή των πρώτων 11 αμινοτελικών αμινοξέων του CRF), η συγγένεια δέσμευσης του α-ελικοειδή CRF(9-41), (που προέκυψε από απαλοιφή των πρώτων 8 αμινοτελικών αμινοξέων του CRF πεπτιδίων) μειώθηκε σημαντικά από την K250A μετάλλαξη.

Από τα αμινοξέα Asp9, Leu10 και Thr11 του CRF (και τα αντίστοιχα της σοβαγίνης) το μοναδικό που έχει αρνητικό φορτίο και με το οποίο θα μπορούσε να αλληλεπιδράσει ηλεκτροστατικά η θετικά φορτισμένη Lys250 είναι το Asp9. Μάλιστα, από τα 19 αμινοτελικά αμινοξέα του CRF (και τα αντίστοιχα της σοβαγίνης) που έχουν προταθεί ότι πιθανόν αλληλεπιδρούν με τους εξωκυττάριους βρόγχους και τις διαμεμβρανικές περιοχές του CRF_1 το μοναδικό που φέρει αρνητικό φορτίο είναι το Asp9 (εικόνα 5) [191, 192].

Πεπτίδιο / Θέση αμινοξέος	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
h/rCRF	S	E	E	P	P	I	S	L	D	L	T	F	H	L	L	R	E	V	L
Astressin												f[b]	H	L	L	R	E	V	L
a-hel-CRF									D	L	T	F	H	L	L	R	E	M	L
OCRF	S	Q	E	P	P	I	S	L	D	L	T	F	H	L	L	R	E	V	L
BCRF	S	Q	E	P	P	I	S	L	D	L	T	F	H	L	L	R	E	V	L
PCRF	S	E	E	P	P	I	S	L	D	L	T	F	H	L	L	R	E	V	L
SCRF	S	E	E	P	P	I	S	L	D	L	T	F	H	L	L	R	E	V	L
XCRF	A	E	E	P	P	I	S	L	D	L	T	F	H	L	L	R	E	V	L
HUcn		D	N	P	S	L	S	I	D	L	T	F	H	L	L	R	T	L	L
r/mUcn		D	D	P	P	L	S	I	D	L	T	F	H	L	L	R	T	L	L
suUtn1	N	D	D	P	P	I	S	I	D	L	T	F	H	L	L	R	N	M	I
cUtn1	N	D	D	P	P	I	S	I	D	L	T	F	H	L	L	R	N	M	I
solUtn1	S	E	E	P	P	M	S	I	D	L	T	F	H	M	L	R	N	M	I
mUtn1	S	E	E	P	P	M	S	I	D	L	T	F	H	M	L	R	N	M	I
fUtn1	S	E	D	P	P	M	S	I	D	L	T	F	H	M	L	R	N	M	I
Sauv		Q	G	P	P	I	S	I	D	L	S	L	E	L	L	R	K	M	I
Sauv (11-40)												f[b]	H	L	L	R	K	M	I
Sauv (8-40)									D	L	S	L	E	L	L	R	K	M	I

h/rCRF : human/rat CRF
oCRF: ovine CRF
Sauv: frog Sauvagine
pCRF : porcine CRF
sCRF: suckerfish CRF
Sauv(8-40) : Sauvagine(8-40)
r/mUcn: rat/mouse Urocortin
sUtn1: suckerfish Urotensin-1
Sauv(11-40) : Sauvagine(11-40)
cUtn1: carp Urotensin-1
sUtn1: sole Urotensin-1
mUtn1: maggy Urotensin-1
fUtn1: flounder Urotensin-1
bCRF: bovine CRF
hUcn: human Urocortin
a-hel-CRF : Alpha-helical CRF(9-41)
xCRF: xenopus CRF

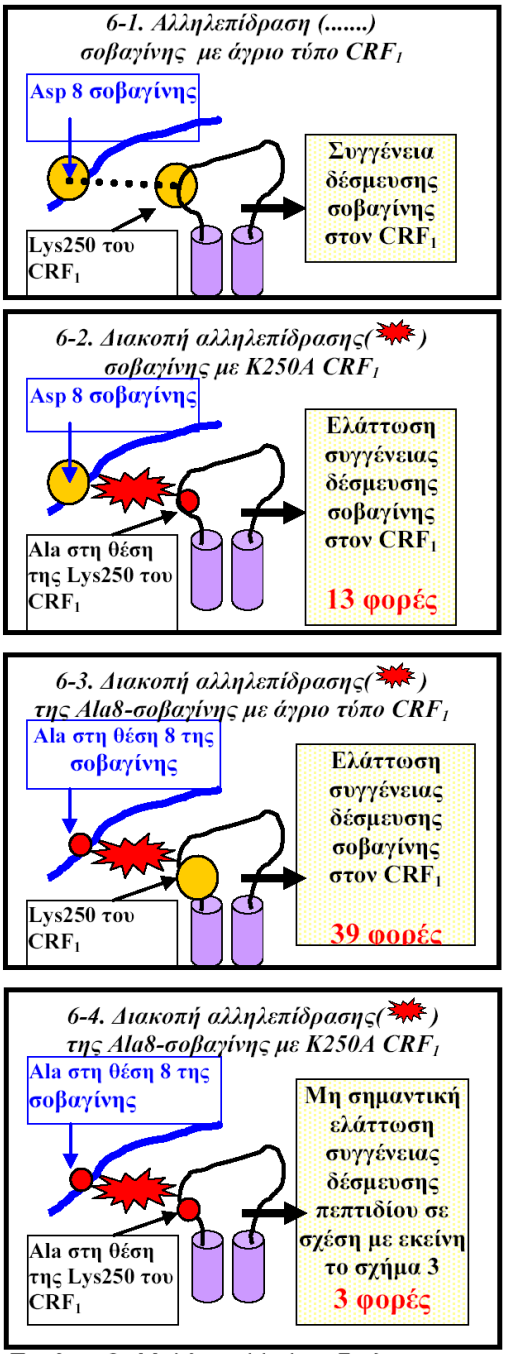
[b]f denotes the D-Phe

Εικόνα 5. *Αλληλουχία αμινοτελικών αμινοξέων των πεπτιδίων της οικογένειας του CRF και των συνθετικών πεπτιδικών αναλόγων του, αστρεσίνη, άλφα-ελικοειδή CRF(9-41), σοβαγίνη 8-40 και σοβαγίνη 11-40. Το Asp9 (κόκκινο) του CRF (και το αντίστοιχο Asp8 της σοβαγίνης) διατηρείται σε όλα τα πεπτίδια της οικογένειας του CRF.*

Ο σημαντικός λειτουργικός ρόλος του Asp9 του CRF (και του αντίστοιχου Asp8 της σοβαγίνης) φαίνεται από το γεγονός ότι το αμινοξύ αυτό διατηρείται σε όλα τα πεπτίδια της οικογένειας του CRF (εικόνα 5), Αυτό επιβεβαιώνεται από το ότι αντικατάσταση του Asp9 του CRF από αλανίνη ελάττωσε τη ικανότητα του πεπτιδίου να διεγείρει την έκκριση ACTH, διαδικασία που επιτελείται μέσω αλληλεπίδρασης του πεπτιδίου με τον CRF_1 [32, 105].

Για να διαπιστώσουμε ότι το αρνητικά Asp8 της σοβαγίνης (και το αντίστοιχο Asp9 του CRF) αλληλεπιδρά με τη Lys250 του CRF_1 (εικόνα 6-1) αντικαταστήσαμε το Asp8 με διαφορετικά αμινοξέα, ξεκινώντας από αλανίνη (δημιουργώντας έτσι το πεπτιδικό ανάλογο Ala^8-σοβαγίνη), και προσδιορίσαμε τις συγγένειες δέσμευσης του τροποποιημένων πεπτιδίων για τον άγριο τύπο CRF_1 και τους μεταλλαγμένους υποδοχείς K250A, K250R και K250E, καθώς και την ισχύ με την οποία τα πεπτίδια αυτά διέγειραν τη παραγωγή κυκλικού AMP σε κύτταρα που εκφράζανε τους υποδοχείς αυτούς.

Αντικατάσταση του Asp8 της σοβαγίνης με αλανίνη μείωσε σημαντικά την ισχύ καθώς και τη συγγένεια δέσμευσης της για τον CRF_1, οδηγώντας έτσι στο συμπέρασμα ότι πιθανόν το αμινοξύ αυτό του πεπτιδίου αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα (εικόνα 6-3). Μετάλλαξη της Lys250 του CRF_1 επίσης μείωσε σημαντικά τη δέσμευση και ισχύ της σοβαγίνης πιθανόν λόγω κατάργησης της αλληλεπίδρασης του αμινοξέος αυτού του υποδοχέα με το Asp8 της σοβαγίνης (εικόνα 6-2).



Εικόνα 6. *Μελέτη αλληλεπιδράσεων του Asp8 της σοβαγίνης με τη Lys250 του CRF_1*

Αν πράγματι η Lys250 του CRF_1 αλληλεπιδρά με το Asp8 της σοβαγίνης τότε περιμένουμε η ισχύς και η συγγένεια δέσμευσης της σοβαγίνης για τον CRF_1, που μειώθηκε μετά από αντικατάσταση του Asp8 του πεπτιδίου αυτού από αλανίνη να μην ελαττωθεί περαιτέρω (ή έστω να μην μειωθεί αρκετά) από την επιπρόσθετη μετάλλαξη σε αλανίνη της Lys250 του υποδοχέα (εικόνα 6-4). Δηλαδή, περιμένουμε η ελάττωση της ισχύος και της συγγένειας δέσμευσης της σοβαγίνης από αντικατάσταση του Asp8 του πεπτιδίου αυτού να μην διαφέρει στατιστικά σημαντικά από την μείωση της τιμής αυτής από το συνδυασμό της παραπάνω τροποποίησης του πεπτιδίου με τη μετάλλαξη της Lys250 του CRF_1 σε αλανίνη. Πράγματι, αυτό παρατηρήσαμε στα πειράματα μας, γεγονός που αποδεικνύει ότι η Lys250 του CRF_1 αλληλεπιδρά με το Asp8 της σοβαγίνης. Παρόμοια αποτελέσματα με εκείνα της μετάλλαξης της Lys250 σε Ala, παρατηρήσαμε και όταν το αμινοξύ αυτό αντικαταστάθηκε από Arg, ή Glu, επιβεβαιώνοντας έτσι το συμπέρασμα της αλληλεπίδρασης της Lys250 του CRF_1 με το Asp8 της σοβαγίνης.

ΔΕΥΤΕΡΟΣ ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΟΣ ΒΡΟΓΧΟΣ ΤΟΥ CRF_1 - ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΟΥ

Προσδιορισμός του ρόλου των αμινοξέων του δεύτερου εξωκυττάριου βρόγχου στη δέσμευση των πεπτιδίων της οικογένειας του CRF.

Επιπρόσθετα των αμινοξέων στα όρια της τέταρτης και πέμπτης διαμεμβρανικής περιοχής με τον δεύτερο εξωκυττάριο βρόγχο (EL2) του CRF_1, σημαντικό ρόλο στη δέσμευση των πεπτιδίων πρέπει επίσης να παίζει ο ίδιος ο βρόγχος αυτός. Η υπόθεση μας αυτή βασίστηκε σε μια μελέτη στην οποία βρέθηκε ότι κατά τη δέσμευση της σοβαγίνης στον CRF_1 το αμινοξύ Lys257 του EL2 του υποδοχέα βρίσκεται πολύ κοντά στη δεσμευμένη σοβαγίνη [196]. Όμως στη μελέτη αυτή δεν προσδιορίστηκαν οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αμινοξέων του πεπτιδίου και του υποδοχέα. Τα παραπάνω οδήγησαν στην υπόθεση ότι η σοβαγίνη πρέπει να αλληλεπιδρά με τη Lys257 ή/και τα γειτονικά της αμινοξέα.

Για να επαληθεύσουμε την υπόθεση αυτή και να προσδιορίσουμε τα αμινοξέα εκείνα του EL2 του CRF_1 που δεσμεύουν τη σοβαγίνη καθώς και άλλα πεπτίδια της οικογένειας του CRF αντικαταστήσαμε όλα τα αμινοξέα της περιοχής αυτής του υποδοχέα, ένα την κάθε φορά, με αλανίνη και προσδιορίσαμε τη συγγένεια δέσμευσης της σοβαγίνης, του CRF και άλλων συγγενών αναλόγων τους για τον άγριο τύπο CRF_1 και τους μεταλλαγμένους υποδοχείς καθώς και την ισχύ με την οποία τα πεπτίδια αυτά διέγειραν τη παραγωγή κυκλικού AMP σε κύτταρα που εκφράζανε τους παραπάνω υποδοχείς.

Αντικατάσταση με αλανίνη των περισσότερων από τα αμινοξέα του δεύτερου εξωκυττάριου βρόγχου του υποδοχέα CRF_1 (από τη λευκίνη στη θέση 251 έως τη λευκίνη στη θέση 257 και από τη γλυκίνη στη θέση 261 έως τη προλίνη στη θέση 275), δεν επηρέασε σημαντικά τη συγγένεια δέσμευσης της σοβαγίνης καθώς και την ισχύ με την οποία διέγειρε τη παραγωγή κυκλικού AMP σε κύτταρα που εκφράζανε τον CRF_1. Το αποτέλεσμα αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι τα αμινοξέα 251-257 και 261-266 δεν δεσμεύουν τη σοβαγίνη. Ανάμεσα στα αμινοξέα αυτά είναι και η Lys257 η οποία έχει βρεθεί σε προηγούμενη μελέτη ότι βρίσκεται σε πολύ μικρή απόσταση από τη δεσμευμένη με τον CRF_1, σοβαγίνη [196]. Αυτό σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η Lys257 αν και είναι τοποθετημένη μεταξύ της σοβαγίνης και του υποδοχέα, εντούτοις δεν συνεισφέρει σημαντικά στην ενέργεια δέσμευσης της. Το γεγονός αυτό συμβαδίζει με τις μελέτες των Clackson και Wells (1995), πάνω στη δομή του συμπλέγματος της αυξητικής ορμόνης και του υποδοχέα της, οι οποίες βρήκαν ότι μόνο ένα μικρό ποσοστό των αμινοξέων που βρίσκονται στην επιφάνεια επαφής μεταξύ του συμπλέγματος πρόσδεμα / υποδοχέας συμβάλει σημαντικά στην ολική ενέργεια δέσμευσης[257].

Σε αντίθεση με τα αμινοξέα 251-257 και 261-266, η μετάλλαξη σε αλανίνη των Trp259 (W259A) και Phe260 (F260A) του EL2 του CRF_1, μείωσε σημαντικά τη συγγένεια δέσμευσης και την ισχύ της σοβαγίνης. Οι μεταλλάξεις αυτές δεν φάνηκε να έχουν τροποποιήσει τη στερεοδιαμόρφωση του CRF_1 γιατί δεν επηρέασαν σημαντικά τις συγγένειες δέσμευσης της αστρεσίνης, και της

ανταλαρμίνης, οι οποίες δεσμεύονται σε περιοχές του CRF_1 διαφορετικές από τον EL2 [190, 192, 195].

Τα παραπάνω αποτελέσματα οδηγούν στο συμπέρασμα ότι οι μεταλλάξεις W259A και F260A πιθανόν μείωσαν (άμεσα) τη συγγένεια δέσμευσης και ισχύ της σοβαγίνης, καταργώντας αλληλεπιδράσεις με το πεπτίδιο, και όχι έμμεσα μέσω κάποιας αλλαγής στη στερεοδιαμόρφωση του υποδοχέα. Η πιθανότητα αυτή ενισχύεται από το γεγονός ότι τα Trp259 και Phe260 είναι τοποθετημένα μόνο 1-2 αμινοξέα μακριά από τη Lys257 η οποία έχει δειχθεί ότι βρίσκεται κοντά στη σοβαγίνη όταν αυτή είναι δεσμευμένη στον υποδοχέα [196]. Επιπρόσθετα, σε μελέτες που έχουν γίνει, έχει βρεθεί ότι μόνο λίγες από τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ υποδοχέων και προσδετών τους παίζουν σημαντικό ρόλο στη συγγένεια δέσμευσής τους και αυτές είναι μεταξύ υδρόφοβων αμινοξέων, όπως η Trp και η Phe [257, 258]. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης είναι επίσης σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες σε διαφορετικούς GPCRs, στις οποίες έχει δειχθεί ότι ο δεύτερος εξωκυττάριος βρόγχος παίζει σημαντικό ρόλο στη δέσμευση των πεπτιδίων [175, 252, 259-262]. Παρόμοια με τη σοβαγίνη, οι μεταλλάξεις W259A και F260A ελάττωσαν τη συγγένεια δέσμευσης και ισχύ του CRF, φανερώνοντας έτσι ένα κοινό ρόλο των δύο αυτών αμινοξέων του CRF_1 στη δέσμευση διάφορων πεπτιδίων της οικογένειας του CRF, αποτελώντας πιθανόν θέσεις δέσμευσης για όλα αυτά.

Επίδραση των W259A και F260A μεταλλάξεων στη κυτταρική σηματοδότηση του CRF

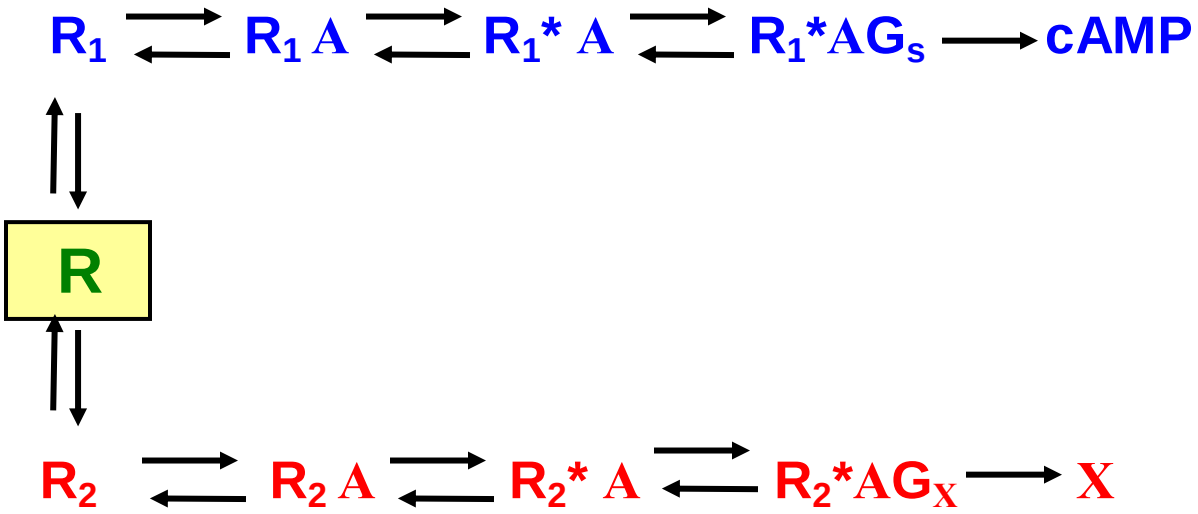
Ενώ οι μεταλλάξεις W259A και F260A ελάττωσαν σημαντικά τη φαινομενική υψηλή συγγένεια δέσμευσης του CRF για τον CRF_1 εντούτοις δεν επηρέασαν την ικανότητα του (ισχύ και μέγιστο αποτέλεσμα) να διεγείρει το ένζυμο της αδενυλοκυκλάσης σε κύτταρα που εκφράζανε τον υποδοχέα αυτόν. Το αποτέλεσμα αυτό πιθανόν οφείλεται στο ότι ο CRF_1, όπως οι άλλοι GPCRs, (στο πιο απλό σενάριο) βρίσκεται σε δύο διαφορετικές στερεοδιαμορφώσεις που δεσμεύουν τον CRF με υψηλή συγγένεια, τις R_1* και R_2* και οι οποίες

διεγείρουν τουλάχιστον δύο διαφορετικές σηματοδοτικές οδούς, την Gs-cAMP και την Gx-X (όπου X μια σηματοδοτική οδός διαφορετικής εκείνης του cAMP) , αντίστοιχα (Εικόνα 7) [234, 263-270]. Η ικανότητα του CRF_1 να διεγείρει διαφορετικές σηματοδοτικές οδούς με διαφορετικό τρόπο έχεί ήδη αναφερθεί σε προηγούμενες μελέτες [134, 142, 144-146, 271-273].

Μετάλλαξη των Trp259 και Phe260 σε αλανίνη πιθανόν μείωσε τη συγγένεια δέσμευσης του CRF για την R_2* , χωρίς όμως να επηρεάζεται η συγγένεια του πεπτιδίου για την R_1* και κατ ’επέκταση η ισχύ με την οποία αυτό διέγειρε τις Gs-πρωτείνες και έτσι τη παραγωγή κυκλικού AMP. Όμως σε αντίθεση με την ισχύ διέγερσης παραγωγής κυκλικού AMP, οι μεταλλάξεις W259A και F260A ελάττωσαν τη φαινομενική υψηλή συγγένεια δέσμευσης του CRF, η οποία απαρτίζεται από τις επιμέρους συγγένειες για τις καταστάσεις R_1* και R_2*, λόγω της μείωσης της συγγένειας του πεπτιδίου για την R_2*. Παρόμοια προηγούμενες μελέτες σε διαφορετικούς GPCRs έχουν δείξει ότι διάφορες μεταλλάξεις των υποδοχέων μπορούν να τροποποιήσουν διαφορετικές σηματοδοτικές οδούς που διεγείρονται από τους υποδοχείς αυτούς με διαφορετικό τρόπο [274-280].

Τα παραπάνω φανερώνουν ότι η αλληλεπίδραση του CRF με τα αμινοξέα Trp259 και Phe260 του EL2 του CRF_1 δεν είναι απαραίτητη για τη διέγερση παραγωγής κυκλικού AMP. Αντίθετα η διέγερση της κυτταρικής αυτής σηματοδοτικής οδού σχετίζεται άμεσα με την αλληλεπίδραση των Trp259 και Phe260 με τη σοβαγίνη, αφού κατάργηση της αλληλεπίδρασης αυτής (με μετάλλαξη των αμινοξέων αυτών σε αλανίνη) ελάττωσε σημαντικά την ισχύ της σοβαγίνης να διεγείρει τη παραγωγή κυκλικού AMP.

Βάσει των παραπάνω τα Trp259 και Phe260 θα μπορούσαν να ενεργήσουν σαν μοριακοί διακόπτες που να επιτρέπουν στον υποδοχέα να διεγείρει διαφορετικούς κυτταρικές σηματοδοτικές οδούς όταν ο υποδοχέας διεγείρεται από διαφορετικά πεπτίδια. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι ο CRF_1 έχει την ικανότητα να διεγείρει διαφορετικές κυτταρικές σηματοδοτικές οδούς με διαφορετικό τρόπο όταν αυτός διεγείρεται από διαφορετικά πεπτίδια [145, 148, 271].



Εικόνα 7. *Σχηματική αναπαράσταση μοντέλου στο οποίο ο CRF_1 υπάρχει σε διαφορετικές δομικές-ενεργειακές καταστάσεις του, όπως εκείνων των ανενεργών μορφών του (R, R_1 και R_2) και των ενεργών του (R_1* και R_2*) σε ελεύθερη μορφή και δεσμευμένων με ένα αγωνιστή (A), εκ των οποίων μόνο οι τελευταίες μπορούν να διεγείρουν διαφορετικές G-πρωτείνες (G_s, G_X) και έτσι να τροποποιήσουν τη δραστηριότητα διαφορετικών κυτταρικών σηματοδοτικών οδών (cAMP και X). Για απλούστευση δεν αναπαριστάνονται όλες οι καταστάσεις του υποδοχέα που υπάρχουν και συμπληρώνουν θερμοδυναμικά το μοντέλο αυτό.*

Αλληλεπίδραση των αμινοξέων 9-11 του CRF και των αντίστοιχων της σοβαγίνης με τα Trp259 και Phe260 του CRF_1

Με σκοπό το προσδιορισμό των αμινοξέων της σοβαγίνης και του CRF τα οποία αλληλεπιδρούν με τα αμινοξέα Trp259 και Phe260 του CRF_1, προσδιορίσαμε τις συγγένειες δέσμευσης στον άγριο τύπο και στους μεταλλαγμένους υποδοχείς W259A και F260A διαφόρων τροποποιημένων πεπτιδίων του CRF και της σοβαγίνης τα οποία έχουν προκύψει από απαλοιφή διαφόρων τμημάτων του αμινοτελικού τους άκρου (δημιουργώντας έτσι τα πεπτίδια, αστρεσίνη, σοβαγίνη(11-40), άλφα-ελικοειδή CRF(9-41) και

σοβαγίνη(8-40) (εικόνα 5)). Από τα αποτελέσματα της συγγένειας με την οποία ο άγριος τύπος CRF_1 και οι W259A και F260A, δέσμευαν τα πεπτίδια αυτά, καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι γενικά η τρυπτοφάνη στη θέση 259 και/ή φαινυλαλανίνη στη θέση 260, αλληλεπιδρούν με το αμινοτελικό τμήμα των πεπτιδίων, το οποίο αντιστοιχεί στα αμινοξέα 8 έως 10 και 9 έως 11 για τη σοβαγίνη και τον CRF αντίστοιχα, και το οποίο διατηρείται σε μεγάλο βαθμό, ανάμεσα στην οικογένεια των πεπτιδίων του CRF (εικόνα 5). Όμως ακόμα και στη περίπτωση που οι περιοχές αυτές των CRF και σοβαγίνης αλληλεπιδρούν με άλλα αμινοξέα του CRF_1 διαφορετικά από τα Trp259 και Phe260, πάλι αυτές παίζουν σημαντικό ρόλο στη δέσμευση των πεπτιδίων, τοποθετώντας αυτά στον υποδοχέα με το πλέον κατάλληλο τρόπο που τους επιτρέπει να αλληλεπιδράσουν με τα Trp259 και Phe260.

Άξιον προσοχής είναι ότι ενώ η μετάλλαξη F260A, μείωσε τη συγγένεια δέσμευσης του άλφα-ελικοειδή CRF (9-41) αυτή δεν είχε καμία επίδραση στη συγγένεια δέσμευσης του αντίστοιχου αναλόγου της σοβαγίνης, της σοβαγίνης (8-40). Μια πιθανή εξήγηση για τα διαφορετικά αυτά αποτελέσματα θα μπορούσε να ήταν ότι τα παραπάνω τροποποιημένα πεπτίδια δεσμεύονται με διαφορετικό τρόπο στον CRF_1. Παρόμοια, οι διαφορετικές συγγένειες δέσμευσης μεταξύ του άλφα ελικοειδή CRF (9-41), της αστρεσίνης και του CRF, θα μπορούσαν επίσης να αποδοθούν στο διαφορετικό τρόπο δέσμευσης τους στον CRF_1. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι η υψηλή συγγένεια δέσμευσης του αγωνιστή CRF, οφείλεται σε δύο διαφορετικές ομάδες αλληλεπιδράσεων [191, 192]. Η πρώτη ομάδα περιλαμβάνει τη δέσμευση του αμινοτελικού άκρου του CRF στους εξωκυττάριους βρόγχους και στις διαμεμβρανικές περιοχές του υποδοχέα, ενώ η δεύτερη περιλαμβάνει τη δέσμευση του καρβοξυτελικού άκρου του CRF στην εξωκυττάρια αμινοτελική περιοχή (N-περιοχή) του CRF_1. Η απαλοιφή των έντεκα πρώτων αμινοξέων του CRF (δημιουργώντας με τον τρόπο αυτό τον ανταγωνιστή αστρεσίνη) πιθανό να κατήργησε τη πρώτη ομάδα αλληλεπιδράσεων (και ίσως τη σημαντικότερη για τη βιολογική δράση του CRF) και επανατοποθέτησε το πεπτίδιο στον υποδοχέα έτσι ώστε να διατηρεί την υψηλή συγγένεια δέσμευσης του, αλλά να έχει χάσει την ιδιότητα να ενεργοποιεί

τον CRF_1 . Αντίθετα, η απαλοιφή ορισμένων, αλλά όχι όλων, από τα πρώτα έντεκα αμινοτελικά αμινοξέα του CRF (δημιουργώντας με τον τρόπο αυτό το μερικό αγωνιστή, άλφα-ελικοειδή CRF(9-41)) πιθανό να κατήργησε μέρος των αλληλεπιδράσεων της πρώτης ομάδας με τις εναπομείναντες να τοποθετούν το πεπτίδιο στον CRF_1 με τέτοιο τρόπο (πολύ πιθανόν διαφορετικό από εκείνον του CRF) ώστε να δεσμεύεται με μικρότερη συγγένεια και να έχει ιδιότητες μερικού αγωνιστή. Η έννοια ότι διαφορετικά πεπτίδια της οικογένειας του CRF δεσμεύονται με διαφορετικό τρόπο στον CRF_1, έχει επίσης προταθεί και σε προηγούμενη μελέτη, στην οποία οι φαρμακολογικές ιδιότητες διάφορων πεπτιδίων, επηρεάστηκαν με διαφορετικό τρόπο από μεταλλάξεις του υποδοχέα [188].

Η ταυτόχρονη μετάλλαξη των Trp259 και Phe260 του CRF_1, επηρέασε συνεργιστικά τις φαρμακολογικές ιδιότητες του υποδοχέα

Η ταυτόχρονη μετάλλαξη σε αλανίνη των Trp259 και Phe260 του CRF_1 μείωσε συνεργιστικά τη συγγένεια δέσμευσης και ισχύ της σοβαγίνης καθώς και τη συγγένεια δέσμευσης του CRF, σε σχέση με τις απλές μεταλλάξεις. Παρόμοια, ταυτόχρονη μετάλλαξη σε αλανίνη των Ser203 και Ser204 του β_2 αδρενεργικού υποδοχέα μείωσε συνεργιστικά (σε σχέση με τις απλές μεταλλάξεις) τη συγγένεια δέσμευσης της επινεφρίνης [4]. Τα αμινοξέα αυτά του β_2 αδρενεργικού υποδοχέα βρέθηκαν ότι συμμετέχουν σε ένα πλέγμα δεσμών υδρογόνου, αλληλεπιδρώντας και τα δύο ταυτόχρονα με την χημική ομάδα, mOH της επινεφρίνης [4]. Έτσι αντίστοιχα με τον β_2 αδρενεργικό υποδοχέα τα υδρόφοβα Trp259 και Phe260 του CRF_1 θα μπορούσαν να συμμετέχουν σε ένα πλέγμα υδρόφοβων δεσμών μεταξύ υποδοχέα και πεπτιδίων, αλληλεπιδρώντας ταυτόχρονα με τη Leu10 των πεπτιδίων, η οποία είναι το μοναδικό υδρόφοβο αμινοξύ στη (σημαντική για αλληλεπίδραση με τα Trp259 και Phe260) περιοχή αμινοξέων 9-11 του CRF (και στην αντίστοιχη της σοβαγίνης)

Γενικό συμπέρασμα

Συμπερασματικά, στην παρούσα εργασία μελετήθηκε διεξοδικά η δομή και λειτουργία του CRF_1 και προσδιορίστηκαν αρκετές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πεπτιδίων της οικογένειας του CRF και του υποδοχέα αυτού, θέτοντας έτσι τις βάσεις για μελλοντικές μελέτες που θα οδηγήσουν στο σχεδιασμό μοριακών μοντέλων του CRF_1 με ή χωρίς τα πεπτίδια δεσμευμένα σε αυτόν. Τα μοριακά αυτά μοντέλα θα δώσουν εξαιρετικά σημαντική ώθηση στο σχεδιασμό και σύνθεση νέων βελτιωμένων CRF_1 αναλόγων που θα ενισχύσουν το φαρμακευτικό οπλοστάσιο εναντίον πολλών παθοφυσιολογικών καταστάσεων στις οποίες εμπλέκεται ο CRF_1, όπως άγχος, κατάθλιψη, καρκίνος και άλλες.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Saffran, M. and A.V. Schally, *The release of corticotrophin by anterior pituitary tissue in vitro.* Can J Biochem Physiol, 1955. 33(3): p. 408-15.
2. Guillemin, R. and B. Rosenberg, *Humoral hypothalamic control of anterior pituitary: a study with combined tissue cultures.* Endocrinology, 1955. 57(5): p. 599-607.
3. Harris, G.W., *Neural control of the pituitary gland.* Physiol Rev, 1948. 28(2): p. 139-79.
4. Liapakis, G., et al., *The forgotten serine. A critical role for Ser-2035.42 in ligand binding to and activation of the beta 2-adrenergic receptor.* J Biol Chem, 2000. 275(48): p. 37779-88.
5. Guillemin, R., *The adenohypophysis and its hypothalamic control.* Annu Rev Physiol, 1967. 29: p. 313-48.
6. Peterson, R.E. and R. Guillemin, *The hormones of the hypothalamus.* Am J Med, 1974. 57(4): p. 591-600.
7. Saffran, M. and A.V. Schally, *The status of the corticotropin releasing factor (CRF).* Neuroendocrinology, 1977. 24(5-6): p. 359-75.
8. Vale, W., et al., *Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin.* Science, 1981. 213(4514): p. 1394-7.
9. Spiess, J., et al., *Primary structure of corticotropin-releasing factor from ovine hypothalamus.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1981. 78(10): p. 6517-21.
10. Kelley, M. and N. Kowall, *Corticotropin-releasing factor immunoreactive neurons persist throughout the brain in Alzheimer's disease.* Brain Res, 1989. 501(2): p. 392-6.
11. Charlton, B.G., I.N. Ferrier, and R.H. Perry, *Distribution of corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in human brain.* Neuropeptides, 1987. 10(4): p. 329-34.
12. Favrod-Coune, C.A., et al., *Anatomical localization of corticotropin-releasing activity in the human brain.* Life Sci, 1986. 39(25): p. 2475-81.

13. Takahashi, K., et al., *Corticotropin-releasing hormone in the human hypothalamus. Free-floating immunostaining method.* Endocrinol Jpn, 1989. 36(2): p. 275-80.
14. Bruhn, T.O., et al., *Corticotropin-releasing factor in the adrenal medulla.* Ann N Y Acad Sci, 1987. 512: p. 115-28.
15. Venihaki, M., A. Gravanis, and A.N. Margioris, *Comparative study between normal rat chromaffin and PC12 rat pheochromocytoma cells: production and effects of corticotropin-releasing hormone.* Endocrinology, 1997. 138(2): p. 698-704.
16. Nicholson, W.E., et al., *Pituitary and hypothalamic hormones in normal and neoplastic adrenal medullae: biologically active corticotropin-releasing hormone and corticotropin.* Regul Pept, 1987. 18(3-4): p. 173-88.
17. Muglia, L.J., et al., *Expression of the mouse corticotropin-releasing hormone gene in vivo and targeted inactivation in embryonic stem cells.* J Clin Invest, 1994. 93(5): p. 2066-72.
18. Kawahito, Y., et al., *Local secretion of corticotropin-releasing hormone by enterochromaffin cells in human colon.* Gastroenterology, 1994. 106(4): p. 859-65.
19. Suda, T., et al., *Immunoreactive corticotropin and corticotropin-releasing factor in human hypothalamus, adrenal, lung cancer, and pheochromocytoma.* J Clin Endocrinol Metab, 1984. 58(5): p. 919-24.
20. Suda, T., et al., *Distribution and characterization of immunoreactive corticotropin-releasing factor in human tissues.* J Clin Endocrinol Metab, 1984. 59(5): p. 861-6.
21. Fabbri, A., J.C. Tinajero, and M.L. Dufau, *Corticotropin-releasing factor is produced by rat Leydig cells and has a major local antireproductive role in the testis.* Endocrinology, 1990. 127(3): p. 1541-3.
22. Makrigiannakis, A., et al., *The corticotropin-releasing hormone (CRH) in normal and tumoral epithelial cells of human endometrium.* J Clin Endocrinol Metab, 1995. 80(1): p. 185-9.

23. Sasaki, A., et al., *Isolation and characterization of a corticotropin-releasing hormone-like peptide from human placenta.* J Clin Endocrinol Metab, 1988. 67(4): p. 768-73.
24. Stephanou, A., et al., *Corticotrophin-releasing factor-like immunoreactivity and mRNA in human leukocytes.* Brain Behav Immun, 1990. 4(1): p. 67-73.
25. Ekman, R., et al., *Biosynthesis of corticotropin-releasing hormone in human T-lymphocytes.* J Neuroimmunol, 1993. 44(1): p. 7-13.
26. Ciocca, D.R., 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): p. 175-84.
27. Raux Demay, M.C., et al., *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): p. 649-57.
28. Montecucchi, P.C. and A. Henschen, *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): p. 113-20.
29. Lederis, K., et al., *Complete amino acid sequence of urotensin I, a hypotensive and corticotropin-releasing neuropeptide from Catostomus.* Science, 1982. 218(4568): p. 162-5.
30. Donaldson, C.J., et al., *Cloning and characterization of human urocortin.* Endocrinology, 1996. 137(9): p. 3896.
31. Vaughan, J., et al., *Urocortin, a mammalian neuropeptide related to fish urotensin I and to corticotropin-releasing factor.* Nature, 1995. 378(6554): p. 287-92.
32. Dautzenberg, F.M. and R.L. Hauger, *The CRF peptide family and their receptors: yet more partners discovered.* Trends Pharmacol Sci, 2002. 23(2): p. 71-7.

33. Reul, J.M. and F. Holsboer, *Corticotropin-releasing factor receptors 1 and 2 in anxiety and depression.* Curr Opin Pharmacol, 2002. 2(1): p. 23-33.
34. Wong, M.L., et al., *Localization of urocortin messenger RNA in rat brain and pituitary.* Mol Psychiatry, 1996. 1(4): p. 307-12.
35. Hillhouse, E.W. and D.K. Grammatopoulos, *The molecular mechanisms underlying the regulation of the biological activity of corticotropin-releasing hormone receptors: implications for physiology and pathophysiology.* Endocr Rev, 2006. 27(3): p. 260-86.
36. Iino, K., et al., *Urocortin expression in human pituitary gland and pituitary adenoma.* J Clin Endocrinol Metab, 1997. 82(11): p. 3842-50.
37. Florio, P., et al., *Urocortin expression is downregulated in human endometrial carcinoma.* J Endocrinol, 2006. 190(1): p. 99-105.
38. Murakami, Y., et al., *Stimulation by urocortin of growth hormone (GH) secretion in GH-producing human pituitary adenoma cells.* Endocr J, 1997. 44(4): p. 627-9.
39. Arcuri, F., et al., *Expression of urocortin mRNA and peptide in the human prostate and in prostatic adenocarcinoma.* Prostate, 2002. 52(3): p. 167-72.
40. Hsu, S.Y. and A.J. Hsueh, *Human stresscopin and stresscopin-related peptide are selective ligands for the type 2 corticotropin-releasing hormone receptor.* Nat Med, 2001. 7(5): p. 605-11.
41. Lewis, K., et al., *Identification of urocortin III, an additional member of the corticotropin-releasing factor (CRF) family with high affinity for the CRF_2 receptor.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. 98(13): p. 7570-5.
42. Reyes, T.M., et al., *Urocortin II: a member of the corticotropin-releasing factor (CRF) neuropeptide family that is selectively bound by type 2 CRF receptors.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. 98(5): p. 2843-8.
43. Yamauchi, N., et al., *Distribution of urocortin 2 in various tissues of the rat.* J Neuroendocrinol, 2005. 17(10): p. 656-63.

44. Li, C., et al., *Urocortin III-immunoreactive projections in rat brain: partial overlap with sites of type 2 corticotrophin-releasing factor receptor expression.* J Neurosci, 2002. 22(3): p. 991-1001.
45. Fekete, E.M. and E.P. Zorrilla, *Physiology, pharmacology, and therapeutic relevance of urocortins in mammals: ancient CRF paralogs.* Front Neuroendocrinol, 2007. 28(1): p. 1-27.
46. Venihaki, M., et al., *Urocortin III, a brain neuropeptide of the corticotropin-releasing hormone family: modulation by stress and attenuation of some anxiety-like behaviours.* J Neuroendocrinol, 2004. 16(5): p. 411-22.
47. Imperatore, A., et al., *Urocortin 2 and urocortin 3 are expressed by the human placenta, deciduas, and fetal membranes.* Am J Obstet Gynecol, 2006. 195(1): p. 288-95.
48. Takahashi, K., et al., *Urocortins as cardiovascular peptides.* Peptides, 2004. 25(10): p. 1723-31.
49. Gulyas, J., et al., *Potent, structurally constrained agonists and competitive antagonists of corticotropin-releasing factor.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. 92(23): p. 10575-9.
50. Ruhmann, A., et al., *Structural requirements for peptidic antagonists of the corticotropin-releasing factor receptor (CRFR): development of CRFR2beta-selective antisauvagine-30.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. 95(26): p. 15264-9.
51. Rivier, J., et al., *Potent and long-acting corticotropin releasing factor (CRF) receptor 2 selective peptide competitive antagonists.* J Med Chem, 2002. 45(21): p. 4737-47.
52. Perrin, M.H., et al., *Comparison of an agonist, urocortin, and an antagonist, astressin, as radioligands for characterization of corticotropin-releasing factor receptors.* J Pharmacol Exp Ther, 1999. 288(2): p. 729-34.
53. Tezval, H., et al., *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): p. 9468-73.

54. McCarthy, J.R., S.C. Heinrichs, and D.E. Grigoriadis, *Recent advances with the CRF1 receptor: design of small molecule inhibitors, receptor subtypes and clinical indications.* Curr Pharm Des, 1999. 5(5): p. 289-315.
55. Webster, E.L., et al., *In vivo and in vitro characterization of antalarmin, a nonpeptide corticotropin-releasing hormone (CRH) receptor antagonist: suppression of pituitary ACTH release and peripheral inflammation.* Endocrinology, 1996. 137(12): p. 5747-50.
56. Chrousos, G.P., *Regulation and dysregulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. The corticotropin-releasing hormone perspective.* Endocrinol Metab Clin North Am, 1992. 21(4): p. 833-58.
57. Plotsky, P.M. and W. Vale, *Hemorrhage-induced secretion of corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity into the rat hypophysial portal circulation and its inhibition by glucocorticoids.* Endocrinology, 1984. 114(1): p. 164-9.
58. Chrousos, G.P., *The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation.* N Engl J Med, 1995. 332(20): p. 1351-62.
59. Brody, T., J. Larner, and K.P. Minneman, *Human Pharmacology. Molecular to Clinical.* 2nd ed. 1994: Mosby-Year Book, Inc., St. Luis, Missouri, USA.
60. De Souza, E.B., *Corticotropin-releasing factor receptors: physiology, pharmacology, biochemistry and role in central nervous system and immune disorders.* Psychoneuroendocrinology, 1995. 20(8): p. 789-819.
61. Nemeroff, C.B., *The role of corticotropin-releasing factor in the pathogenesis of major depression.* Pharmacopsychiatry, 1988. 21(2): p. 76-82.
62. Bremner, J.D., et al., *Elevated CSF corticotropin-releasing factor concentrations in posttraumatic stress disorder.* Am J Psychiatry, 1997. 154(5): p. 624-9.
63. Karalis, K., et al., *CRH and the immune system.* J Neuroimmunol, 1997. 72(2): p. 131-6.

64. Karalis, K., et al., *Autocrine or paracrine inflammatory actions of corticotropin-releasing hormone in vivo.* Science, 1991. 254(5030): p. 421-3.
65. Makrigiannakis, A., et al., *Corticotropin-releasing hormone promotes blastocyst implantation and early maternal tolerance.* Nat Immunol, 2001. 2(11): p. 1018-24.
66. Chrousos, G.P., D.J. Torpy, and P.W. Gold, *Interactions between the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and the female reproductive system: clinical implications.* Ann Intern Med, 1998. 129(3): p. 229-40.
67. Gravanis, A., et al., *Endometrial and myometrial corticotropin-releasing hormone (CRH): its regulation and possible roles.* Peptides, 2001. 22(5): p. 785-93.
68. Martinez, V., J. Rivier, and Y. Tache, *Peripheral injection of a new corticotropin-releasing factor (CRF) antagonist, astressin, blocks peripheral CRF- and abdominal surgery-induced delayed gastric emptying in rats.* J Pharmacol Exp Ther, 1999. 290(2): p. 629-34.
69. Parkes, D.G., R.S. Weisinger, and C.N. May, *Cardiovascular actions of CRH and urocortin: an update.* Peptides, 2001. 22(5): p. 821-7.
70. Venihaki, M. and J.A. Majzoub, *Animal models of CRH deficiency.* Front Neuroendocrinol, 1999. 20(2): p. 122-45.
71. Zoumakis, E., et al., *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): p. 158-67.
72. Nozu, T., et al., *Peripheral urocortin delays gastric emptying: role of CRF receptor 2.* Am J Physiol, 1999. 276(4 Pt 1): p. G867-74.
73. Williams, C.L., et al., *Corticotropin-releasing factor directly mediates colonic responses to stress.* Am J Physiol, 1987. 253(4 Pt 1): p. G582-6.
74. Maillot, C., et al., *Peripheral corticotropin-releasing factor and stress-stimulated colonic motor activity involve type 1 receptor in rats.* Gastroenterology, 2000. 119(6): p. 1569-79.

75. Hermus, A.R., et al., *Hypotensive effects of ovine and human corticotrophin-releasing factors in man.* Eur J Clin Pharmacol, 1987. 31(5): p. 531-4.
76. Orth, D.N., et al., *Effect of synthetic ovine corticotropin-releasing factor. Dose response of plasma adrenocorticotropin and cortisol.* J Clin Invest, 1983. 71(3): p. 587-95.
77. Lenz, H.J., et al., *Corticotropin-releasing factor, sauvagine, and urotensin I: effects on blood flow.* Am J Physiol, 1985. 249(1 Pt 2): p. R85-90.
78. MacCannell, K.L., et al., *Corticotropin releasing factor-like peptides produce selective dilatation of the dog mesenteric circulation.* Gastroenterology, 1984. 87(1): p. 94-102.
79. Heinrich, N., et al., *Corticotropin-releasing factor (CRF) agonists stimulate testosterone production in mouse leydig cells through CRF receptor-1.* Endocrinology, 1998. 139(2): p. 651-8.
80. Huang, B.M., et al., *Corticotropin-releasing hormone stimulates steroidogenesis in mouse Leydig cells.* Biol Reprod, 1995. 53(3): p. 620-6.
81. Benedetto, C., et al., *Corticotropin-releasing hormone increases prostaglandin F2 alpha activity on human myometrium in vitro.* Am J Obstet Gynecol, 1994. 171(1): p. 126-31.
82. Grammatopoulos, D.K. and E.W. Hillhouse, *Role of corticotropin-releasing hormone in onset of labour.* Lancet, 1999. 354(9189): p. 1546-9.
83. Makrigiannakis, A., et al., *Endometrial and placental CRH as regulators of human embryo implantation.* J Reprod Immunol, 2004. 62(1-2): p. 53-9.
84. Makrigiannakis, A., et al., *Uterine and embryonic trophoblast CRH promotes implantation and maintenance of early pregnancy.* Ann N Y Acad Sci, 2003. 997: p. 85-92.
85. Makrigiannakis, A., et al., *Participation of maternal and fetal CRH in early phases of human implantation: the role of antalarmin.* Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord, 2004. 4(1): p. 75-8.
86. Fadalti, M., et al., *Placental corticotropin-releasing factor. An update.* Ann N Y Acad Sci, 2000. 900: p. 89-94.

87. Florio, P., et al., *Levels of maternal plasma corticotropin-releasing factor and urocortin during labor.* J Soc Gynecol Investig, 2002. 9(4): p. 233-7.
88. Petraglia, F., et al., *Secretion and putative role of activin and CRF in human parturition.* Ann N Y Acad Sci, 1994. 734: p. 380-6.
89. Warren, W.B., S.L. Patrick, and R.S. Goland, *Elevated maternal plasma corticotropin-releasing hormone levels in pregnancies complicated by preterm labor.* Am J Obstet Gynecol, 1992. 166(4): p. 1198-204; discussion 1204-7.
90. Skelton, K.H., M.J. Owens, and C.B. Nemeroff, *The neurobiology of urocortin.* Regul Pept, 2000. 93(1-3): p. 85-92.
91. Valdez, G.R., et al., *Locomotor suppressive and anxiolytic-like effects of urocortin 3, a highly selective type 2 corticotropin-releasing factor agonist.* Brain Res, 2003. 980(2): p. 206-12.
92. Hauger, R.L., et al., *Corticotropin releasing factor (CRF) receptor signaling in the central nervous system: new molecular targets.* CNS Neurol Disord Drug Targets, 2006. 5(4): p. 453-79.
93. Chanalaris, A., et al., *Protective effects of the urocortin homologues stresscopin (SCP) and stresscopin-related peptide (SRP) against hypoxia/reoxygenation injury in rat neonatal cardiomyocytes.* J Mol Cell Cardiol, 2003. 35(10): p. 1295-305.
94. Davis, M.E., et al., *Effect of urocortin 1 infusion in humans with stable congestive cardiac failure.* Clin Sci (Lond), 2005. 109(4): p. 381-8.
95. Rademaker, M.T., et al., *Four-day urocortin-I administration has sustained beneficial haemodynamic, hormonal, and renal effects in experimental heart failure.* Eur Heart J, 2005. 26(19): p. 2055-62.
96. Chen, C.Y., et al., *Intravenous urocortin II decreases blood pressure through CRF(2) receptor in rats.* Regul Pept, 2003. 113(1-3): p. 125-30.
97. Mackay, K.B., et al., *Effects of a selective agonist and antagonist of CRF_2 receptors on cardiovascular function in the rat.* Eur J Pharmacol, 2003. 469(1-3): p. 111-5.

98. Wang, L., et al., *Peripheral urocortin inhibits gastric emptying and food intake in mice: differential role of CRF receptor 2.* Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2001. 281(5): p. R1401-10.
99. Martinez, V., et al., *Differential actions of peripheral corticotropin-releasing factor (CRF), urocortin II, and urocortin III on gastric emptying and colonic transit in mice: role of CRF receptor subtypes 1 and 2.* J Pharmacol Exp Ther, 2002. 301(2): p. 611-7.
100. Gravanis, A. and A.N. Margioris, *The corticotropin-releasing factor (CRF) family of neuropeptides in inflammation: potential therapeutic applications.* Curr Med Chem, 2005. 12(13): p. 1503-12.
101. Chatzaki, E., et al., *Urocortin in human gastric mucosa: relationship to inflammatory activity.* J Clin Endocrinol Metab, 2003. 88(1): p. 478-83.
102. Pallai, P.V., et al., *Structural homology of corticotropin-releasing factor, sauvagine, and urotensin I: circular dichroism and prediction studies.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1983. 80(22): p. 6770-4.
103. Beyermann, M., et al., *A role for a helical connector between two receptor binding sites of a long-chain peptide hormone.* J Biol Chem, 2000. 275(8): p. 5702-9.
104. Rivier, J., C. Rivier, and W. Vale, *Synthetic competitive antagonists of corticotropin-releasing factor: effect on ACTH secretion in the rat.* Science, 1984. 224(4651): p. 889-91.
105. Kornreich, W.D., et al., *Alanine series of ovine corticotropin releasing factor (oCRF): a structure-activity relationship study.* J Med Chem, 1992. 35(10): p. 1870-6.
106. Wynn, P.C., et al., *Properties and regulation of high-affinity pituitary receptors for corticotropin-releasing factor.* Biochem Biophys Res Commun, 1983. 110(2): p. 602-8.
107. Mastorakos, G., et al., *Immunoreactive corticotropin-releasing hormone and its binding sites in the rat ovary.* J Clin Invest, 1993. 92(2): p. 961-8.

108. Hillhouse, E.W., et al., *The identification of a human myometrial corticotropin-releasing hormone receptor that increases in affinity during pregnancy.* J Clin Endocrinol Metab, 1993. 76(3): p. 736-41.
109. Aguilera, G., et al., *Corticotropin-releasing factor receptors: distribution and regulation in brain, pituitary, and peripheral tissues.* Ann N Y Acad Sci, 1987. 512: p. 48-66.
110. Audhya, T., R. Jain, and C.S. Hollander, *Receptor-mediated immunomodulation by corticotropin-releasing factor.* Cell Immunol, 1991. 134(1): p. 77-84.
111. Holmes, M.C., F.A. Antoni, and T. Szentendrei, *Pituitary receptors for corticotropin-releasing factor: no effect of vasopressin on binding or activation of adenylate cyclase.* Neuroendocrinology, 1984. 39(2): p. 162-9.
112. De Souza, E.B. and G. Battaglia, *Corticotropin-releasing hormone (CRH) receptors in brain.* Adv Exp Med Biol, 1988. 245: p. 123-36.
113. De Souza, E.B., et al., *Corticotropin-releasing factor receptors are widely distributed within the rat central nervous system: an autoradiographic study.* J Neurosci, 1985. 5(12): p. 3189-203.
114. Antoni, F.A., *Receptors mediating the CRH effects of vasopressin and oxytocin.* Ann N Y Acad Sci, 1987. 512: p. 195-204.
115. Grigoriadis, D.E., et al., *Solubilization of high affinity corticotropin-releasing factor receptors from rat brain: characterization of an active digitonin-solubilized receptor complex.* Endocrinology, 1989. 125(6): p. 3068-77.
116. Wynn, P.C., et al., *Brain and pituitary receptors for corticotropin releasing factor: localization and differential regulation after adrenalectomy.* Peptides, 1984. 5(6): p. 1077-84.
117. Udelsman, R., et al., *Functional corticotropin releasing factor receptors in the primate peripheral sympathetic nervous system.* Nature, 1986. 319(6049): p. 147-50.

118. Grigoriadis, D.E. and E.B. De Souza, *Heterogeneity between brain and pituitary corticotropin-releasing factor receptors is due to differential glycosylation.* Endocrinology, 1989. 125(4): p. 1877-88.
119. Nishimura, E., et al., *Identification and characterization of a pituitary corticotropin-releasing factor binding protein by chemical cross-linking.* J Biol Chem, 1987. 262(27): p. 12893-6.
120. Perrin, M.H., et al., *Corticotropin-releasing factor binding to the anterior pituitary receptor is modulated by divalent cations and guanyl nucleotides.* Endocrinology, 1986. 118(3): p. 1171-9.
121. Chen, R., et al., *Expression cloning of a human corticotropin-releasing-factor receptor.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. 90(19): p. 8967-71.
122. Lovenberg, T.W., et al., *Cloning and characterization of a functionally distinct corticotropin-releasing factor receptor subtype from rat brain.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. 92(3): p. 836-40.
123. Grammatopoulos, D.K. and G.P. Chrousos, *Functional characteristics of CRH receptors and potential clinical applications of CRH-receptor antagonists.* Trends Endocrinol Metab, 2002. 13(10): p. 436-44.
124. Meyer, A.H., et al., *Localization of the human CRF_2 receptor to 7p21-p15 by radiation hybrid mapping and FISH analysis.* Genomics, 1997. 40(1): p. 189-90.
125. Eckart, K., et al., *Pharmacology and biology of corticotropin-releasing factor (CRF) receptors.* Receptors Channels, 2002. 8(3-4): p. 163-77.
126. Harmar, A.J., *Family-B G-protein-coupled receptors.* Genome Biol, 2001. 2(12): p. REVIEWS3013.
127. Gether, U., *Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors.* Endocr Rev, 2000. 21(1): p. 90-113.
128. Grigoriadis, D.E., et al., *The CRF Receptor: Structure, Function and Potential for Therapeutic Intervention.* Curr. Med. Chem. Central Nervous System Agents, 2001. 1: p. 63-97.
129. Perrin, M.H., et al., *The three-dimensional structure of the N-terminal domain of corticotropin-releasing factor receptors: sushi domains and the*

B1 family of G protein-coupled receptors. Ann N Y Acad Sci, 2006. 1070: p. 105-19.

130. Perrin, M.H., et al., *Expression, purification, and characterization of a soluble form of the first extracellular domain of the human type 1 corticotropin releasing factor receptor.* J Biol Chem, 2001. 276(34): p. 31528-34.
131. Arai, M., I.Q. Assil, and A.B. Abou-Samra, *Characterization of three corticotropin-releasing factor receptors in catfish: a novel third receptor is predominantly expressed in pituitary and urophysis.* Endocrinology, 2001. 142(1): p. 446-54.
132. Perrin, M.H. and W.W. Vale, *Corticotropin releasing factor receptors and their ligand family.* Ann N Y Acad Sci, 1999. 885: p. 312-28.
133. Birnbaumer, L., *Heterotrimeric G Proteins: Molecular Diversity and Structural Basis for Their Role in Signal Transduction*. Encyclopedia of Hormones, ed. H.L.a.N. Henry, A.W. Vol. 2. 2003, New York NY: Academic Press. 260-271.
134. Blank, T., et al., *Corticotropin-releasing factor receptors couple to multiple G-proteins to activate diverse intracellular signaling pathways in mouse hippocampus: role in neuronal excitability and associative learning.* J Neurosci, 2003. 23(2): p. 700-7.
135. Dermitzaki, E., et al., *Corticotropin-releasing hormone induces Fas ligand production and apoptosis in PC12 cells via activation of p38 mitogen-activated protein kinase.* J Biol Chem, 2002. 277(14): p. 12280-7.
136. Kiang, J.G., *Corticotropin-releasing factor-like peptides increase cytosolic [Ca2+] in human epidermoid A-431 cells.* Eur J Pharmacol, 1997. 329(2-3): p. 237-44.
137. Cantarella, G., et al., *Divergent effects of corticotropin releasing hormone on endothelial cell nitric oxide synthase are associated with different expression of CRH type 1 and 2 receptors.* Br J Pharmacol, 2001. 134(4): p. 837-44.

138. Grammatopoulos, D.K. and E.W. Hillhouse, *Basal and interleukin-1beta-stimulated prostaglandin production from cultured human myometrial cells: differential regulation by corticotropin-releasing hormone.* J Clin Endocrinol Metab, 1999. 84(6): p. 2204-11.
139. Kostic, T.S., S.A. Andric, and S.S. Stojilkovic, *Spontaneous and receptor-controlled soluble guanylyl cyclase activity in anterior pituitary cells.* Mol Endocrinol, 2001. 15(6): p. 1010-22.
140. Malagoli, D., A. Franchini, and E. Ottaviani, *Synergistic role of cAMP and IP(3) in corticotropin-releasing hormone-induced cell shape changes in invertebrate immunocytes.* Peptides, 2000. 21(2): p. 175-82.
141. Karteris, E., E.W. Hillhouse, and D. Grammatopoulos, *Urocortin II is expressed in human pregnant myometrial cells and regulates myosin light chain phosphorylation: potential role of the type-2 corticotropin-releasing hormone receptor in the control of myometrial contractility.* Endocrinology, 2004. 145(2): p. 890-900.
142. Punn, A., M.A. Levine, and D.K. Grammatopoulos, *Identification of signaling molecules mediating corticotropin-releasing hormone-R1alpha-mitogen-activated protein kinase (MAPK) interactions: the critical role of phosphatidylinositol 3-kinase in regulating ERK1/2 but not p38 MAPK activation.* Mol Endocrinol, 2006. 20(12): p. 3179-95.
143. Teli, T., et al., *Regulation of corticotropin-releasing hormone receptor type 1alpha signaling: structural determinants for G protein-coupled receptor kinase-mediated phosphorylation and agonist-mediated desensitization.* Mol Endocrinol, 2005. 19(2): p. 474-90.
144. Elliott-Hunt, C.R., et al., *Potential signalling pathways underlying corticotrophin-releasing hormone-mediated neuroprotection from excitotoxicity in rat hippocampus.* J Neurochem, 2002. 80(3): p. 416-25.
145. Grammatopoulos, D.K., et al., *Urocortin, but not corticotropin-releasing hormone (CRH), activates the mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway in human pregnant myometrium: an effect mediated*

via R1alpha and R2beta CRH receptor subtypes and stimulation of Gq-proteins. Mol Endocrinol, 2000. 14(12): p. 2076-91.

146. Grammatopoulos, D.K., et al., *Rat cerebral cortex corticotropin-releasing hormone receptors: evidence for receptor coupling to multiple G-proteins.* J Neurochem, 2001. 76(2): p. 509-19.
147. Papadopoulou, N., et al., *Protein kinase A-induced negative regulation of the corticotropin-releasing hormone R1alpha receptor-extracellularly regulated kinase signal transduction pathway: the critical role of Ser301 for signaling switch and selectivity.* Mol Endocrinol, 2004. 18(3): p. 624-39.
148. Mavros, V., et al. *CRH-R1a. Structural domains critical for Gs-protein activation: Evidence for distinct receptor active conformations following CRH and urocortin binding.* in *3rd Annual Meeting of Greek Pharmacology Society*. 2004. Thessaloniki, Greece.
149. Pitcher, J.A., N.J. Freedman, and R.J. Lefkowitz, *G protein-coupled receptor kinases.* Annu Rev Biochem, 1998. 67: p. 653-92.
150. Lefkowitz, R.J., *G protein-coupled receptors. III. New roles for receptor kinases and beta-arrestins in receptor signaling and desensitization.* J Biol Chem, 1998. 273(30): p. 18677-80.
151. Rasmussen, T.N., I. Novak, and S.M. Nielsen, *Internalization of the human CRF receptor 1 is independent of classical phosphorylation sites and of beta-arrestin 1 recruitment.* Eur J Biochem, 2004. 271(22): p. 4366-74.
152. Perry, S.J., et al., *Distinct conformations of the corticotropin releasing factor type 1 receptor adopted following agonist and antagonist binding are differentially regulated.* J Biol Chem, 2005. 280(12): p. 11560-8.
153. Grigoriadis, D.E., et al., *^{125}I-Tyr^{0}-sauvagine: a novel high affinity radioligand for the pharmacological and biochemical study of human corticotropin-releasing factor 2 alpha receptors.* Mol Pharmacol, 1996. 50(3): p. 679-86.
154. Grigoriadis, D.E., et al., *Characterization of corticotropin-releasing factor receptor subtypes.* Ann N Y Acad Sci, 1996. 780: p. 60-80.

155. Chalmers, D.T., T.W. Lovenberg, and E.B. De Souza, *Localization of novel corticotropin-releasing factor receptor (CRF_2) mRNA expression to specific subcortical nuclei in rat brain: comparison with CRF_1 receptor mRNA expression.* J Neurosci, 1995. 15(10): p. 6340-50.
156. Coste, S.C., R.F. Quintos, and M.P. Stenzel-Poore, *Corticotropin-releasing hormone-related peptides and receptors: emergent regulators of cardiovascular adaptations to stress.* Trends Cardiovasc Med, 2002. 12(4): p. 176-82.
157. Ross, P.C., C.M. Kostas, and T.V. Ramabhadran, *A variant of the human corticotropin-releasing factor (CRF) receptor: cloning, expression and pharmacology.* Biochem Biophys Res Commun, 1994. 205(3): p. 1836-42.
158. Vita, N., et al., *Primary structure and functional expression of mouse pituitary and human brain corticotrophin releasing factor receptors.* FEBS Lett, 1993. 335(1): p. 1-5.
159. Grammatopoulos, D., et al., *Human corticotropin-releasing hormone receptor: differences in subtype expression between pregnant and nonpregnant myometria.* J Clin Endocrinol Metab, 1998. 83(7): p. 2539-44.
160. Cao, J., et al., *Human mast cells express corticotropin-releasing hormone (CRH) receptors and CRH leads to selective secretion of vascular endothelial growth factor.* J Immunol, 2005. 174(12): p. 7665-75.
161. Karteris, E., et al., *Expression and signalling characteristics of the corticotrophin-releasing hormone receptors during the implantation phase in the human endometrium.* J Mol Endocrinol, 2004. 32(1): p. 21-32.
162. Grace, C.R., et al., *NMR structure and peptide hormone binding site of the first extracellular domain of a type B1 G protein-coupled receptor.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. 101(35): p. 12836-41.
163. Grace, C.R., et al., *Structure of the N-terminal domain of a type B1 G protein-coupled receptor in complex with a peptide ligand.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. 104(12): p. 4858-63.
164. Hawrot, E., et al., *Demonstration of a tandem pair of complement protein modules in GABA(B) receptor 1a.* FEBS Lett, 1998. 432(3): p. 103-8.

165. Bork, P., et al., *Structure and distribution of modules in extracellular proteins.* Q Rev Biophys, 1996. 29(2): p. 119-67.
166. Lin, H.H., et al., *Molecular analysis of the epidermal growth factor-like short consensus repeat domain-mediated protein-protein interactions: dissection of the CD97-CD55 complex.* J Biol Chem, 2001. 276(26): p. 24160-9.
167. Pioszak, A.A. and H.E. Xu, *Molecular recognition of parathyroid hormone by its G protein-coupled receptor.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. 105(13): p. 5034-9.
168. Pioszak, A.A., et al., *Molecular recognition of corticotropin-releasing factor by its G-protein-coupled receptor CRFR1.* J Biol Chem, 2008. 283(47): p. 32900-12.
169. Qi, L.J., et al., *Extracellular cysteines of the corticotropin-releasing factor receptor are critical for ligand interaction.* Biochemistry, 1997. 36(41): p. 12442-8.
170. Dohlman, H.G., et al., *Role of extracellular disulfide-bonded cysteines in the ligand binding function of the beta 2-adrenergic receptor.* Biochemistry, 1990. 29(9): p. 2335-42.
171. Perlman, J.H., et al., *A disulfide bond between conserved extracellular cysteines in the thyrotropin-releasing hormone receptor is critical for binding.* J Biol Chem, 1995. 270(42): p. 24682-5.
172. Savarese, T.M., C.D. Wang, and C.M. Fraser, *Site-directed mutagenesis of the rat m1 muscarinic acetylcholine receptor. Role of conserved cysteines in receptor function.* J Biol Chem, 1992. 267(16): p. 11439-48.
173. Karnik, S.S. and H.G. Khorana, *Assembly of functional rhodopsin requires a disulfide bond between cysteine residues 110 and 187.* J Biol Chem, 1990. 265(29): p. 17520-4.
174. Cook, J.V., et al., *A disulfide bonding interaction role for cysteines in the extracellular domain of the thyrotropin-releasing hormone receptor.* Endocrinology, 1996. 137(7): p. 2851-8.

175. Moro, S., C. Hoffmann, and K.A. Jacobson, *Role of the extracellular loops of G protein-coupled receptors in ligand recognition: a molecular modeling study of the human P2Y1 receptor.* Biochemistry, 1999. 38(12): p. 3498-507.
176. Cherezov, V., et al., *High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor.* Science, 2007. 318(5854): p. 1258-65.
177. Palczewski, K., et al., *Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor.* Science, 2000. 289(5480): p. 739-45.
178. Rasmussen, S.G., et al., *Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor.* Nature, 2007. 450(7168): p. 383-7.
179. Javitch, J.A., et al., *Electrostatic and aromatic microdomains within the binding-site crevice of the D2 receptor: contributions of the second membrane-spanning segment.* Biochemistry, 1999. 38(25): p. 7961-8.
180. Javitch, J.A., et al., *A cluster of aromatic residues in the sixth membrane-spanning segment of the dopamine D2 receptor is accessible in the binding-site crevice.* Biochemistry, 1998. 37(4): p. 998-1006.
181. Javitch, J.A., D. Fu, and J. Chen, *Residues in the fifth membrane-spanning segment of the dopamine D2 receptor exposed in the binding-site crevice.* Biochemistry, 1995. 34(50): p. 16433-9.
182. Javitch, J.A., et al., *Mapping the binding-site crevice of the dopamine D2 receptor by the substituted-cysteine accessibility method.* Neuron, 1995. 14(4): p. 825-31.
183. Javitch, J.A., et al., *The fourth transmembrane segment of the dopamine D2 receptor: accessibility in the binding-site crevice and position in the transmembrane bundle.* Biochemistry, 2000. 39(40): p. 12190-9.
184. Shi, L., et al., *The first transmembrane segment of the dopamine D2 receptor: accessibility in the binding-site crevice and position in the transmembrane bundle.* Biochemistry, 2001. 40(41): p. 12339-48.

185. Fu, D., et al., *Residues in the seventh membrane-spanning segment of the dopamine D2 receptor accessible in the binding-site crevice.* Biochemistry, 1996. 35(35): p. 11278-85.
186. Javitch, J.A., L. Shi, and G. Liapakis, *Use of the substituted cysteine accessibility method to study the structure and function of G protein-coupled receptors.* Methods Enzymol, 2002. 343: p. 137-56.
187. Liapakis, G., M.M. Simpson, and J.A. Javitch, *The substituted-cysteine accessibility method (SCAM) to elucidate membrane protein structure.* Curr Protoc Neurosci, 2001. Chapter 4: p. Unit 4 15.
188. Assil, I.Q., et al., *Juxtamembrane region of the amino terminus of the corticotropin releasing factor receptor type 1 is important for ligand interaction.* Biochemistry, 2001. 40(5): p. 1187-95.
189. Dautzenberg, F.M., et al., *Mapping of the ligand-selective domain of the Xenopus laevis corticotropin-releasing factor receptor 1: implications for the ligand-binding site.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. 95(9): p. 4941-6.
190. Perrin, M.H., et al., *The first extracellular domain of corticotropin releasing factor-R1 contains major binding determinants for urocortin and astressin.* Endocrinology, 1998. 139(2): p. 566-70.
191. Nielsen, S.M., et al., *Constitutive activation of tethered-peptide/corticotropin-releasing factor receptor chimeras.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. 97(18): p. 10277-81.
192. Hoare, S.R., et al., *Mechanism of corticotropin-releasing factor type I receptor regulation by nonpeptide antagonists.* Mol Pharmacol, 2003. 63(3): p. 751-65.
193. Sydow, S., et al., *The role of the fourth extracellular domain of the rat corticotropin-releasing factor receptor type 1 in ligand binding.* Eur J Biochem, 1999. 259(1-2): p. 55-62.
194. Liaw, C.W., et al., *Localization of ligand-binding domains of human corticotropin-releasing factor receptor: a chimeric receptor approach.* Mol Endocrinol, 1997. 11(7): p. 980-5.

195. Liaw, C.W., et al., *Localization of agonist- and antagonist-binding domains of human corticotropin-releasing factor receptors.* Mol Endocrinol, 1997. 11(13): p. 2048-53.
196. Assil-Kishawi, I. and A.B. Abou-Samra, *Sauvagine cross-links to the second extracellular loop of the corticotropin-releasing factor type 1 receptor.* J Biol Chem, 2002. 277(36): p. 32558-61.
197. Assil-Kishawi, I., et al., *Residue 17 of sauvagine cross-links to the first transmembrane domain of corticotropin-releasing factor receptor 1 (CRFR1).* J Biol Chem, 2008. 283(51): p. 35644-51.
198. Kraetke, O., et al., *Photoaffinity cross-linking of the corticotropin-releasing factor receptor type 1 with photoreactive urocortin analogues.* Biochemistry, 2005. 44(47): p. 15569-77.
199. Graham, F.L., et al., *Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5.* J Gen Virol, 1977. 36(1): p. 59-74.
200. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.* Anal Biochem, 1976. 72: p. 248-54.
201. Cheng, Y. and W.H. Prusoff, *Relationship between the inhibition constant (K1) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I50) of an enzymatic reaction.* Biochem Pharmacol, 1973. 22(23): p. 3099-108.
202. Motulsky, H. and A. Christopoulos, *Fitting models to biological data using linear and nonlinear regression. A practical guide to curve fitting*. 2003, GraphPad Software Inc.: San Diego, CA.
203. Liaw, C.W., et al., *Localization of agonist- and antagonist-binding domains of human corticotropin-releasing factor receptors.* Mol Endocrinol, 1997. 11(13): p. 2048-53.
204. Cunningham, B.C. and J.A. Wells, *High-resolution epitope mapping of hGH-receptor interactions by alanine-scanning mutagenesis.* Science, 1989. 244(4908): p. 1081-5.

205. Chothia, C., *The nature of the accessible and buried surfaces in proteins.* J Mol Biol, 1976. 105(1): p. 1-12.
206. Klapper, M.H., *The independent distribution of amino acid near neighbor pairs into polypeptides.* Biochem Biophys Res Commun, 1977. 78(3): p. 1018-24.
207. Schirmer, T., et al., *Structural basis for sugar translocation through maltoporin channels at 3.1 A resolution.* Science, 1995. 267(5197): p. 512-4.
208. Brown, K.A., E.E. Howell, and J. Kraut, *Long-range structural effects in a second-site revertant of a mutant dihydrofolate reductase.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. 90(24): p. 11753-6.
209. Shi, L. and J.A. Javitch, *The binding site of aminergic G protein-coupled receptors: the transmembrane segments and second extracellular loop.* Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2002. 42: p. 437-67.
210. Donnelly, D., *The arrangement of the transmembrane helices in the secretin receptor family of G-protein-coupled receptors.* FEBS Lett, 1997. 409(3): p. 431-6.
211. Frimurer, T.M. and R.P. Bywater, *Structure of the integral membrane domain of the GLP1 receptor.* Proteins, 1999. 35(4): p. 375-86.
212. Sheikh, S.P., et al., *Similar structures and shared switch mechanisms of the beta2-adrenoceptor and the parathyroid hormone receptor. Zn(II) bridges between helices III and VI block activation.* J Biol Chem, 1999. 274(24): p. 17033-41.
213. Liapakis, G., M. Martin, and J.A. Javitch, *The Substituted-Cysteine Accessibly Method.*, in *Current Protocols in Neuroscience*, D. Sibley, Editor. 1999, John Wiley & Sons, Inc. p. 4.15.1-4.15.10.
214. Creighton, T.E., *Proteins: structures and molecular properties*. 1993, New York: W.H. Freeman and Company.
215. Liapakis, G. and J.A. Javitch, *Reverting the constitutive activity of a CAM b2 adrenergic receptor by modification of a cysteine in TM7.* 28th Soc. for Neurosci., Los Angeles, USA., 1998.

216. Holmes, K.D., et al., *Differential regulation of corticotropin releasing factor 1alpha receptor endocytosis and trafficking by beta-arrestins and Rab GTPases.* J Neurochem, 2006. 96(4): p. 934-49.
217. Milan-Lobo, L., et al., *Subtype-specific differences in corticotropin-releasing factor receptor complexes detected by fluorescence spectroscopy.* Mol Pharmacol, 2009. 76(6): p. 1196-210.
218. Teli, T., et al., *Structural domains determining signalling characteristics of the CRH-receptor type 1 variant R1beta and response to PKC phosphorylation.* Cell Signal, 2007.
219. Giusti, L., et al., *Alkylation of sulfhydryl groups on Galpha(s/olf) subunits by N-ethylmaleimide: regulation by guanine nucleotides.* Biochim Biophys Acta, 2003. 1613(1-2): p. 7-14.
220. Hoshino, S., et al., *Identification of sites for alkylation by N-ethylmaleimide and pertussis toxin-catalyzed ADP-ribosylation on GTP-binding proteins.* FEBS Lett, 1990. 276(1-2): p. 227-31.
221. Kitamura, Y., et al., *Effects of sulfhydryl-modifying reagents, 3-nitro-2-pyridinesulfenyl compounds, on the coupling between inhibitory receptors and GTP-binding proteins Gi/Go in rat brain membranes.* Mol Pharmacol, 1990. 38(2): p. 184-91.
222. Bubis, J., J.O. Ortiz, and C. Moller, *Chemical modification of transducin with iodoacetic acid: transducin-alpha carboxymethylated at Cys(347) allows transducin binding to Light-activated rhodopsin but prevents its release in the presence of GTP.* Arch Biochem Biophys, 2001. 395(2): p. 146-57.
223. Perrin, M.H., et al., *Corticotropin-releasing factor binding to the anterior pituitary receptor is modulated by divalent cations and guanyl nucleotides.* Endocrinology, 1986. 118(3): p. 1171-9.
224. Kristiansen, K., *Molecular mechanisms of ligand binding, signaling, and regulation within the superfamily of G-protein-coupled receptors: molecular modeling and mutagenesis approaches to receptor structure and function.* Pharmacol Ther, 2004. 103(1): p. 21-80.

225. Bockaert, J., et al., *GPCR interacting proteins (GIP).* Pharmacol Ther, 2004. 103(3): p. 203-21.
226. Bhogal, N., et al., *Evidence for the proximity of the extreme N-terminus of the neurokinin-2 (NK2) tachykinin receptor to Cys167 in the putative fourth transmembrane helix.* Biochemistry, 2004. 43(11): p. 3027-38.
227. Shahrestanifar, M.S. and R.D. Howells, *Sensitivity of opioid receptor binding to N-substituted maleimides and methanethiosulfonate derivatives.* Neurochem Res, 1996. 21(11): p. 1295-9.
228. Zhang, R., et al., *Cysteine 2.59(89) in the second transmembrane domain of human CB2 receptor is accessible within the ligand binding crevice: evidence for possible CB2 deviation from a rhodopsin template.* Mol Pharmacol, 2005. 68(1): p. 69-83.
229. Sullivan, D., D.C. Chiara, and J.B. Cohen, *Mapping the agonist binding site of the nicotinic acetylcholine receptor by cysteine scanning mutagenesis: antagonist footprint and secondary structure prediction.* Mol Pharmacol, 2002. 61(2): p. 463-72.
230. Wagner, D.A. and C. Czajkowski, *Structure and dynamics of the GABA binding pocket: A narrowing cleft that constricts during activation.* J Neurosci, 2001. 21(1): p. 67-74.
231. Javitch, J.A., et al., *A cysteine residue in the third membrane-spanning segment of the human D2 dopamine receptor is exposed in the binding-site crevice.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. 91(22): p. 10355-9.
232. Weiss, J.M., et al., *The Cubic Ternary Complex Receptor-Occupancy Model II. Understanding Apparent Affinity.* J Theor Biol, 1996. 178: p. 169-182.
233. Marie, J., et al., *Control of conformational equilibria in the human B2 bradykinin receptor. Modeling of nonpeptidic ligand action and comparison to the rhodopsin structure.* J Biol Chem, 2001. 276(44): p. 41100-11.
234. Vauquelin, G. and I. Van Liefde, *G protein-coupled receptors: a count of 1001 conformations.* Fundam Clin Pharmacol, 2005. 19(1): p. 45-56.

235. Leff, P., *The two-state model of receptor activation [see comments].* Trends Pharmacol Sci, 1995. 16(3): p. 89-97.

236. Sobolevsky, A.I., et al., *Subunit-specific contribution of pore-forming domains to NMDA receptor channel structure and gating.* J Gen Physiol, 2007. 129(6): p. 509-25.

237. Wilson, M.H., H.A. Highfield, and L.E. Limbird, *The role of a conserved inter-transmembrane domain interface in regulating alpha(2a)-adrenergic receptor conformational stability and cell-surface turnover.* Mol Pharmacol, 2001. 59(4): p. 929-38.

238. Ward, R.J. and G. Milligan, *Reciprocal mutations of highly conserved residues in transmembrane helices 2 and 7 of the alpha(2A)-adrenoceptor restore agonist activation of G(i1)alpha.* Cell Signal, 2002. 14(2): p. 139-44.

239. Miura, S., et al., *TM2-TM7 interaction in coupling movement of transmembrane helices to activation of the angiotensin II type-1 receptor.* J Biol Chem, 2003. 278(6): p. 3720-5.

240. Ballesteros, J., et al., *Functional microdomains in G-protein-coupled receptors. The conserved arginine-cage motif in the gonadotropin-releasing hormone receptor.* J Biol Chem, 1998. 273(17): p. 10445-53.

241. Flanagan, C.A., et al., *The functional microdomain in transmembrane helices 2 and 7 regulates expression, activation, and coupling pathways of the gonadotropin-releasing hormone receptor.* J Biol Chem, 1999. 274(41): p. 28880-6.

242. Colson, A.-O., et al., *A hydrophobic cluster between transmembrane helices 5 and 6 constrains the thyrotropin-releasing hormone receptor in an inactive conformation.* Mol Pharmacol, 1998. 54: p. 968-78.

243. Lu, Z.L. and E.C. Hulme, *A network of conserved intramolecular contacts defines the off-state of the transmembrane switch mechanism in a seven-transmembrane receptor.* J Biol Chem, 2000. 275(8): p. 5682-6.

244. Burley, S.K. and G.A. Petsko, *Aromatic-aromatic interaction: a mechanism of protein structure stabilization.* Science, 1985. 229(4708): p. 23-8.

245. Gallivan, J.P. and D.A. Dougherty, *Cation-pi interactions in structural biology.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. 96(17): p. 9459-64.
246. Crowley, P.B. and A. Golovin, *Cation-pi interactions in protein-protein interfaces.* Proteins, 2005. 59(2): p. 231-9.
247. Scrutton, N.S. and A.R. Raine, *Cation-pi bonding and amino-aromatic interactions in the biomolecular recognition of substituted ammonium ligands.* Biochem J, 1996. 319 (Pt 1): p. 1-8.
248. Yamano, Y., et al., *Mutagenesis and the molecular modeling of the rat angiotensin II receptor (AT1).* J Biol Chem, 1995. 270(23): p. 14024-30.
249. Noda, K., Y. Saad, and S.S. Karnik, *Interaction of Phe8 of angiotensin II with Lys199 and His256 of AT1 receptor in agonist activation.* J Biol Chem, 1995. 270(48): p. 28511-4.
250. Renzetti, A.R., et al., *Relevance of aromatic residues in transmembrane segments V to VII for binding of peptide and nonpeptide antagonists to the human tachykinin NK(2) receptor.* J Pharmacol Exp Ther, 1999. 290(2): p. 487-95.
251. Pellegrini, M., et al., *Molecular characterization of the substance P*neurokinin-1 receptor complex: development of an experimentally based model.* J Biol Chem, 2001. 276(25): p. 22862-7.
252. Runge, S., et al., *Three distinct epitopes on the extracellular face of the glucagon receptor determine specificity for the glucagon amino terminus.* J Biol Chem, 2003. 278(30): p. 28005-10.
253. Yang, X., et al., *Modeling and docking of the three-dimensional structure of the human melanocortin 4 receptor.* J Protein Chem, 2003. 22(4): p. 335-44.
254. Parthier, C., et al., *Crystal structure of the incretin-bound extracellular domain of a G protein-coupled receptor.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. 104(35): p. 13942-7.
255. Tan, Y.V., et al., *Peptide agonist docking in the N-terminal ectodomain of a class II G protein-coupled receptor, the VPAC1 receptor. Photoaffinity, NMR, and molecular modeling.* J Biol Chem, 2006. 281(18): p. 12792-8.

256. Di Paolo, E., et al., *Role of charged amino acids conserved in the vasoactive intestinal polypeptide/secretin family of receptors on the secretin receptor functionality.* Peptides, 1999. 20(10): p. 1187-93.
257. Clackson, T. and J.A. Wells, *A hot spot of binding energy in a hormone-receptor interface.* Science, 1995. 267(5196): p. 383-6.
258. Young, L., R.L. Jernigan, and D.G. Covell, *A role for surface hydrophobicity in protein-protein recognition.* Protein Sci, 1994. 3(5): p. 717-29.
259. Holtmann, M.H., et al., *Multiple Extracellular Loop Domains Contribute Critical Determinants for Agonist Binding and Activation of the Secretin Receptor.* J Biol Chem, 1996. 271(25): p. 14944–49.
260. Audoly, L. and R.M. Breyer, *The second extracellular loop of the prostaglandin EP3 receptor is an essential determinant of ligand selectivity.* J Biol Chem, 1997. 272(21): p. 13475-8.
261. Bergwitz, C., et al., *Residues in the membrane-spanning and extracellular loop regions of the parathyroid hormone (PTH)-2 receptor determine signaling selectivity for PTH and PTH-related peptide.* J Biol Chem, 1997. 272(46): p. 28861-8.
262. Shi, L. and J.A. Javitch, *The second extracellular loop of the dopamine D2 receptor lines the binding-site crevice.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. 101(2): p. 440-5.
263. Kenakin, T., *Agonist-receptor efficacy. II. Agonist trafficking of receptor signals [see comments].* Trends Pharmacol Sci, 1995. 16(7): p. 232-8.
264. Kenakin, T., *Ligand-selective receptor conformations revisited: the promise and the problem.* Trends Pharmacol Sci, 2003. 24(7): p. 346-54.
265. Berg, K.A., et al., *Effector pathway-dependent relative efficacy at serotonin type 2A and 2C receptors: evidence for agonist-directed trafficking of receptor stimulus.* Mol Pharmacol, 1998. 54(1): p. 94-104.
266. Berger, H., et al., *Evidence that corticotropin-releasing factor receptor type 1 couples to Gs- and Gi-proteins through different conformations of its J-domain.* Br J Pharmacol, 2006. 149(7): p. 942-7.

267. Leff, P., et al., *A three-state receptor model of agonist action.* Trends Pharmacol Sci, 1997. 18(10): p. 355-62.
268. Riitano, D., T.M. Werge, and T. Costa, *A mutation changes ligand selectivity and transmembrane signaling preference of the neurokinin-1 receptor.* J Biol Chem, 1997. 272(12): p. 7646-55.
269. Urban, J.D., et al., *Functional selectivity and classical concepts of quantitative pharmacology.* J Pharmacol Exp Ther, 2007. 320(1): p. 1-13.
270. Perez, D.M. and S.S. Karnik, *Multiple signaling states of G-protein-coupled receptors.* Pharmacol Rev, 2005. 57(2): p. 147-61.
271. Kokologiannakis, G., et al. *Amino acids in the 3rd intracellular loop of the CRH-R1 receptor are critical for receptor/G-protein interaction. Distinct residues are important for receptor coupling to different G-proteins*. in *7th Annual Meeting of Greek Pharmacology Society*. 2005. Athens, Greece.
272. Liapakis, G., et al. *Distinct structural domains within the 3rd intracellular loop of the CRH-R1 are important for CRH and urocortin signalling properties*. in *ENDO 2004-86th Annual Meeting*. 2004. New Orleans, USA.
273. Beyermann, M., et al., *Achieving signalling selectivity of ligands for the corticotropin-releasing factor type 1 receptor by modifying the agonist's signalling domain.* Br J Pharmacol, 2007. 151(6): p. 851-9.
274. Perez, D.M., et al., *Constitutive activation of a single effector pathway: evidence for multiple activation states of a G protein-coupled receptor.* Mol Pharmacol, 1996. 49(1): p. 112-22.
275. Pauwels, P.J. and F.C. Colpaert, *Heterogeneous ligand-mediated Ca(++) responses at wt and mutant alpha(2A)-adrenoceptors suggest multiple ligand activation binding sites at the alpha(2A)-adrenoceptor.* Neuropharmacology, 2000. 39(11): p. 2101-11.
276. Gilchrist, R.L., et al., *The luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor has distinct transmembrane conductors for cAMP and inositol phosphate signals.* J Biol Chem, 1996. 271(32): p. 19283-7.

277. Holst, B., et al., *Two active molecular phenotypes of the tachykinin NK1 receptor revealed by G-protein fusions and mutagenesis.* J Biol Chem, 2001. 276(23): p. 19793-9.

278. Lecat, S., et al., *Mutations in the extracellular amino-terminal domain of the NK2 neurokinin receptor abolish cAMP signaling but preserve intracellular calcium responses.* J Biol Chem, 2002. 277(44): p. 42034-48.

279. Huang, J., et al., *Single amino acid of an octopamine receptor as a molecular switch for distinct G protein couplings.* Biochem Biophys Res Commun, 2008. 371(4): p. 610-4.

280. Biebermann, H., et al., *A conserved tyrosine residue (Y601) in transmembrane domain 5 of the human thyrotropin receptor serves as a molecular switch to determine G-protein coupling.* Faseb J, 1998. 12(14): p. 1461-71.