



Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Βιοχημική μελέτη ενός μεταλλάγματος της ανθρώπινης αγγειογενίνης

Νάκης Άγγελος
Εργαστήριο Δομικής
και Λειτουργικής
Βιοχημείας
Σεπτέμβριος 2019

*Βιοχημική μελέτη ενός μεταλλάγματος της ανθρώπινης
αγγειογενίνης (hAng – S28A)*

*Biochemical study on a mutant of Human Angiogenin
(hAng – S28A)*

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Λεωνίδας Δημήτριος (Επιβλέπων Καθηγητής)

Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας

Μπαλατσός Νικόλαος

Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας

Κοντού Μαρία

Επίκουρος Καθηγήτρια Πρωτεϊνικής Χημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ευχαριστίες

..ευ λέγειν τον ευ λέγοντα και ευ ποιείν τον ευ ποιούντα...
Ξενοφών, 430-355 π.Χ

Σε λιγές γραμμές, και μάλιστα στις πρώτες γραμμές κάθε διπλωματικής διατριβής, αρμόζεται ο φοιτητής να ευχαριστήσει τους κύριους παράγοντες που τον οδήγησαν να ολοκληρώσει με επιτυχία την πτυχιακή του εργασία. Η εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας στη Λάρισα την περίοδο 2018-2019, μια διαδικασία γεμάτη αξέχαστες στιγμές.

Έτσι θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες και την ευγνωμοσύνη μου στους ανθρώπους που συνεισφέραν με το δικό τους τρόπο στην προσπάθεια μου.

Πρώτα από όλα όμως, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στον κ. Λεωνίδα, επιβλέποντα καθηγητή της πτυχιακής μου εργασίας για την ευκαιρία που μου προσέφερε να «έχω» την πρώτη επαφή με το χώρο της επιστήμης και να φέρω εις πέρας το δικό μου πείραμα, με τις δικές μου προσωπικές επιτυχίες και αποτυχίες. Τον ευχαριστώ θερμά για την ανάθεση του θέματος, την πολύτιμη βοήθεια του και το ενδιαφέρον του. Με αυτόν τον τρόπο μου έδειξε την εμπιστοσύνη του στο πρόσωπο μου και να μπω και εγώ με τη σειρά μου στον μαγικό κόσμο της Δομικής Βιοχημείας.

Ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ, μέσα από την καρδιά μου θέλω να δώσω στην υποψήφια διδάκτορα, Όλγα Παπαϊωάννου. Ένας πολύ ξεχωριστός και όμορφος άνθρωπος που ήταν δίπλα μου κάθε στιγμή και χάρη σε αυτήν πραγματοποίησα την διπλωματική μου. Οι κατάλληλες συμβουλές και οι οδηγίες της με κατεύθυναν με επιτυχία στον προγραμματισμό και την εκτέλεση όλου του πειραματικού μέρους. Πολλά βράδια, ξενύχτια, κούραση, δυσκολίες, ατυχήματα, όταν όμως έχεις ανθρώπους που σέβονται και αγαπάνε τον κόσμο της βιοχημείας το μόνο που μένει στο τέλος είναι ένα μεγάλο χαμόγελο.. Η αγάπη, η υπομονή και ο ζήλος της είναι αξιοσημείωτα. Όλγα σε ευχαριστώ για όλα!

Επιπλέον, οφείλω ευχαριστώ σε όλο τα μέλη του εργαστηρίου, τους υποψήφιους διδάκτορες Θύμιο Κυριάκη και τη Θεοδώρα Σολοβού καθώς και το διδάκτορα Γιώργο Στραβοδήμο, την Αναστασία, το Συμεών και τον Μπάμπη.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους δικούς μου ανθρώπους που είναι κάθε στιγμή εκεί για μένα, την οικογένεια μου, τη Χριστίνα καθώς και τους φίλους μου... χωρίς αυτούς δεν θα ήμουν αυτό που είμαι σήμερα, επομένως τους οφείλω πολλά..

Πίνακας Περιεχομένων

Περίληψη	6
Summary	6
1.Εισαγωγή.....	7
1.1 Η υπεροικογένεια των ριβονουκλεασών	7
1.2 Ανθρώπινη αγγειογενίνη	8
1.2.1 Δομή και χαρακτηριστικά.....	10
1.3 Βιολογικοί ρόλοι της ανθρώπινης αγγειογενίνης.....	12
1.3.1 Μηχανισμοί δράσης.....	12
1.3.1.1 Μεταβολισμός νουκλεϊκών οξέων	12
1.3.1.2 Ενεργοποίηση μονοπατιών διακυτταρικής επικοινωνίας	13
1.3.1.3 Ενεργοποίηση της αποικοδόμησης της βασικής ενδοθηλιακής μεμβράνης.....	13
1.3.2 Φυσιολογικές λειτουργίες	15
1.3.2.1 Αγγειογένεση.....	15
1.3.2.2 Ανοσοαπόκριση.....	17
1.3.3 Ρύθμιση της δράσης της hAng	18
1.3.4 Συσχετισμός με ασθένειες	20
1.3.4.1 hAng και ογκογένεση.....	20
1.3.4.2 hAng και νευροεκφυλιστικές ασθένειες	21
1.3.4.3 hAng και άλλες ασθένειες	22
2. Σκοπός.....	23
3. Υλικά και Μέθοδοι	24

3.1 Διαλύματα	24
3.2 Δημιουργία μεταλλάγματος με κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση	25
3.2.1 Μετασχηματισμός και καλλιέργεια κυττάρων κλωνοποίησης E. coli XL1-Blue	28
3.3 Υπερέκφραση της ανθρώπινης αγγειογενίνης.....	28
3.3.1 Μετασχηματισμός κυττάρων υπερέκφρασης E. coli BL21-Gold και υπερέκφραση της αγγειογενίνης.....	28
3.4 Απομόνωση και καθαρισμός της μεταλλαγμένης αγγειογενίνης.....	29
3.5 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών	31
3.6 Κρυσταλλογραφία.....	32
4. Αποτελέσματα.....	37
4.1 Αποτελέσματα χρωματογραφικού καθαρισμού της hAng S28A.....	37
4.2 Αποτελέσματα κρυσταλλογραφίας	39
5. Συζήτηση	39
6. Βιβλιογραφία.....	40

Περίληψη

Η ανθρώπινη αγγειογενίνη (Human Angiogenin, hAng) είναι μια πρωτεΐνη, 123 αμινοξέων και μοριακού βάρους 14,4 kDa. Αποτελεί το πέμπτο μέλος της υπερικογένειας των παγκρεατικών ριβονουκλεασών και είναι γνωστή και ως ριβονουκλεάση 5, RNase 5. Η hAng αποτελεί έναν ισχυρό αγγειογενετικό παράγοντα με καθοριστικό ρόλο σε πληθώρα φυσιολογικών και παθολογικών καταστάσεων και στην εγκατάσταση και μετάσταση μεγάλου εύρους όγκων. Φυσιολογικά, συμμετέχει σε διαδικασίες όπως η αγγειογένεση, η ανοσολογική απόκριση και η φλεγμονή. Παράλληλα όμως έχει παρατηρηθεί ότι συμμετέχει και σε παθολογικές καταστάσεις όπως η ογκογένεση και η Αμυοτροφική Πλάγια Σκλήρυνση ALS. Η hAng υπόκειται σε ρύθμιση από τον ανθρώπινο αναστολέα ριβονουκλεασών 1 (HR1). Μεταλλάγματα της hAng σε κατάλοιπα αμινοξέων που υπόκεινται σε φωσφορυλίωση, έχουν δείξει αλλαγές στη συγγένεια δέσμευσης του HR1 και της hAng και άνοιξαν το δρόμο για το σχεδιασμό αντικαρκινικών φαρμάκων. Στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η μελέτη ενός μεταλλάγματος της hAng στο οποίο η σερίνη 28 (S28) αντικαθίσταται από αλανίνη (S28A). Το μετάλλαγμα δημιουργήθηκε με κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση και ακολούθησε απομόνωση και καθαρισμός της μεταλλαγμένης hAng-S28A από βακτηριακά στελέχη καθώς και ανάπτυξη κρυστάλλων.

Summary

Human Angiogenin, (hAng) is a protein of 123 amino acids, with molecular weight 14.4 kDa. It is the fifth member of the superfamily of pancreatic ribonucleases and is also known as Ribonuclease 5, RNase 5. hAng is a potent angiogenic factor that plays a decisive role in a variety of physiological and pathological conditions and in the installation and metastasis of a wide range of tumors. Physiologically, it participates in processes such as angiogenesis, immune response and inflammation. However, it has also been observed to play key a key role in pathological conditions such as tumor genesis and ALS. hAng as a ribonuclease is regulated by Human Ribonuclease Inhibitor 1 (HR1). hAng mutations in residues that are phosphorylated have shown changes in its binding affinity for HR1 and paved the way for designing new anticancer drugs. The aim of this diploma thesis is to study a hAng variant where serine 28 (S28) is replaced by alanine (S28A). The mutant was generated by site directed mutagenesis, and the isolation and purification of hAng-S28A variant from bacterial strains and growth of protein crystal, followed.

1.Εισαγωγή

1.1 Η υπεροικογένεια των ριβονουκλεασών

Οι ριβονουκλεάσες (RNases) αποτελούν ένζυμα της ευρείας κατηγορίας των νουκλεασών, οι οποίες καταλύουν ειδικά την υδρόλυση των ριβονουκλεϊκών οξέων, δηλαδή την αποικοδόμηση μορίων RNA και την παραγωγή μικρότερων τμημάτων RNA. Οι ριβονουκλεάσες διακρίνονται σε δύο κατηγορίες: α. τις ενδοριβονουκλεάσες και β. τις εξωριβονουκλεάσες, οι οποίες διακρίνονται περαιτέρω σε δυο υποκατηγορίες: i. τα φωσφορολυτικά ένζυμα (EC 2.7) και ii. τα υδρολυτικά ένζυμα (EC 3.1). Η βόεια παγκρεατική ριβονουκλεάση A (RNase A) είναι μια ενδοριβονουκλεάση μοριακού βάρους 13,7 kDa και απομονώθηκε αρχικά από βόειο παγκρεατικό ιστό, στον οποίο εντοπίζεται σε υψηλή συγκέντρωση και αποτελεί το καλύτερα χαρακτηρισμένο μέλος μιας οικογένειας ριβονουκλεασών με διαφορετικά χαρακτηριστικά και βιολογικές λειτουργίες, γνωστές και ως RISBASES (Ribonucleases with Special Biological Actions)¹. Τα μέλη της υπεροικογένειας της RNase A παρουσιάζουν σημαντική ομολογία με την παγκρεατική ριβονουκλεάση A. Στον άνθρωπο η υπεροικογένεια της ριβονουκλεάσης A συγκροτείται από οχτώ εκκρινόμενες πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται όλες από γονίδια που βρίσκονται στο χρωμόσωμα 14 και έχει καθιερωθεί να αναφέρονται ως κανονικές ριβονουκλεάσες (canonical RNases). Οι πρωτεΐνες αυτές, εκκρίνονται από ποικίλους και διαφορετικούς τύπους ιστών και κυττάρων και σε κάθε μια από αυτές αποδίδονται διάφοροι βιολογικοί ρόλοι που περιλαμβάνουν δράση ενάντια σε ιούς, βακτήρια καθώς και μύκητες, αλλά και κυτοτοξική δράση έναντι κυττάρων ξενιστών και παρασίτων².

1.2 Ανθρώπινη αγγειογενίνη

Η ανθρώπινη αγγειογενίνη (hAng) είναι μια βασική πρωτεΐνη, μοριακού βάρους 14.400 Da που αποτελείται από 123 αμινοξέα. Η hAng απομονώθηκε αρχικά από το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας ανθρώπινων κυττάρων αδενοκαρκινώματος του παχέος εντέρου, HT-29³. Το γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη βρίσκεται σε ένα αντίγραφο για κάθε απλοειδές γονιδίωμα και εδράζεται στην περιοχή q11 του χρωμοσώματος 14⁴. Έχει βρεθεί ότι κατανέμεται ευρέως στους ιστούς, με το ήπαρ να αποτελεί την κύρια πηγή για την κυκλοφορία της hAng στο πλάσμα του ανθρώπινου, ενώ το mRNA που κωδικοποιεί την hAng εκφράζεται σε ένα σε εύρος κυττάρων ανάμεσα στα οποία τα νεοπλασματικά, αλλά και φυσιολογικά επιθηλιακά, ινοβλάστες, περιφερικά αιμοκύτταρα και αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα⁵⁻⁶. Αποτελεί το πέμπτο μέλος της υπερικογένειας των παγκρεατικών ριβονουκλεασών (RNase), και για αυτό το λόγο συναντάται και ως RNase 5 και παρουσιάζει 65 % ομοιότητα στην αμινοξική της αλληλουχία με αυτήν της RNase A⁷.

Η ριβονουκλεολυτική δραστηριότητα της hAng είναι αρκετές τάξεις μεγέθους (10^5 - 10^6) χαμηλότερη από εκείνη της RNase A. Ωστόσο, η ριβονουκλεολυτική δραστηριότητα είναι απαραίτητη για τη βιολογική της δραστηριότητα⁸. Η hAng σε αντίθεση με την RNase A, αποτελεί έναν ισχυρό αγγειογενετικό παράγοντα και αυτό οφείλεται κυρίως, σε δύο σημαντικές δομικές διαφορές μεταξύ των δύο πρωτεϊνών⁹: α. στη διαφορετική διαμόρφωση της θέσης πρόσδεσης στον υποδοχέα και β. στο ότι η hAng διαθέτει ένα σήμα πυρηνικού εντοπισμού (NLS - Nuclear Localization Signal/Sequence).

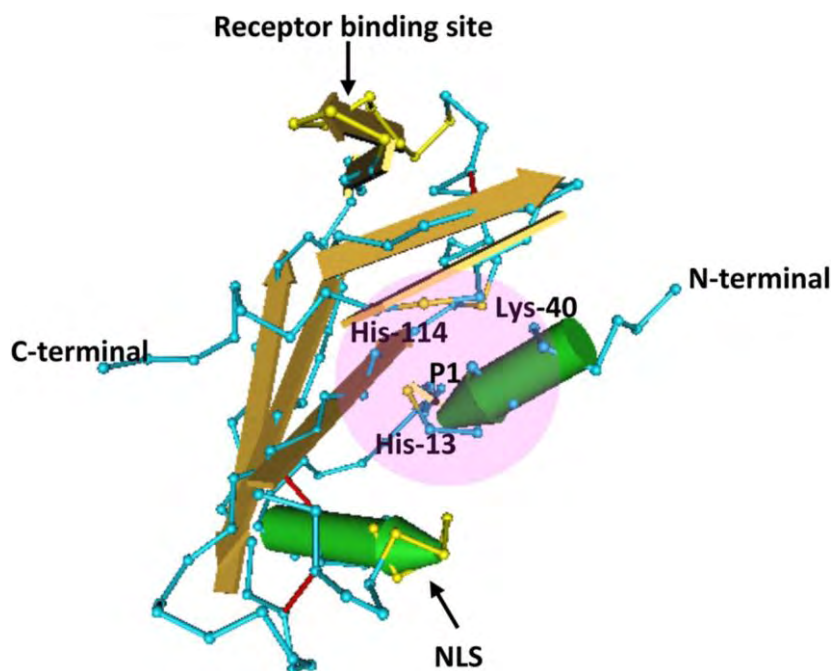
Η αγγειογενίνη είναι ένας ισχυρός αγγειογενετικός παράγοντας, καθώς μπορεί να προκαλέσει τον σχηματισμό νέων αιμοφόρων αγγείων σε χοριοαλλαντοϊκή μεμβράνη όρνιθας και σε κερατοειδή χιτώνα κονίκλου, χορηγούμενη σε δόσεις της τάξεως των fM. Η αγγειογενίνη αποτελεί το πρώτο βήμα για την επαγόμενη αγγειογένεση. Οι παράγοντες που επάγουν την αγγειογένεση είναι ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF), ο βασικός αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών (FGF-β), ο αυξητικός παράγοντας των όξινων ινοβλαστών (FGF-1) και ο επιδερμικού αυξητικός παράγοντας (EGF)¹⁰. Η αγγειογενίνη συνιστά μια εκκρινόμενη

πρωτεΐνη, η οποία εντοπίζεται σε διάφορους ιστούς και υγρά του ανθρώπινου σώματος όπως το πλάσμα, το αμνιακό υγρό, το μικροπεριβάλλον των όγκων και το εγκεφαλονωτιαίο υγρό. Το πρότυπο έκφρασής της υποδεικνύει ότι οι φυσιολογικές αλλά και οι παθολογικές της λειτουργίες δεν περιορίζονται μόνο στην αγγειογένεση. Συγκεκριμένα, η αγγειογενίνη εμπλέκεται σε πολλές φυσιολογικές και μη διεργασίες, συμπεριλαμβανομένης της ογκογένεσης, της έμφυτης ανοσίας, της νευροπροστασίας, της φλεγμονής και της αναγέννησης των ιστών που έχουν υποστεί βλάβη⁹. Επιπλέον, μεταλλάξεις του ανθρώπινου γονιδίου της αγγειογενίνης που οδηγούν στην παραγωγή ανενεργής πρωτεΐνης, έχουν ταυτοποιηθεί σε νευροεκφυλιστικές ασθένειες, όπως η αμυοτροφική πλευρική σκλήρυνση (ALS) και η ασθένεια του Parkinson¹⁰. Η εκκρινόμενη αγγειογενίνη προσδένεται στο εξωτερικό των κυττάρων σε μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη μοριακού βάρους 170 kDa, η οποία δεν έχει χαρακτηριστεί ακόμη πλήρως και ενεργοποιεί με αυτόν τον τρόπο διάφορα διακυτταρικά μονοπάτια. Η εξωκυττάρια αγγειογενίνη αλληλεπιδρά με την ακτίνη στην επιφάνεια των κυττάρων οδηγώντας έτσι, στην αποικοδόμηση της εξωκυττάριας μήτρας επιτρέποντας με αυτόν τον τρόπο την κυτταρική μετανάστευση και διήθηση.

Είναι πλέον αποδεδειγμένο ότι η αγγειογενίνη υφίσταται πυρηνική μετατόπιση με αποτέλεσμα να διεγείρεται η μεταγραφή του mRNA καθώς και η μεταγραφή και επεξεργασία του ριβοσωμικού RNA¹¹, δυο δράσεις που είναι απαραίτητες για την κυτταρική ανάπτυξη και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό¹². Επιπρόσθετα, έχει βρεθεί ότι η αγγειογενίνη, ως απόκριση στο στρες, εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και συσσωρεύεται στα κοκκία του στρες (SGs) διασπώντας το tRNA σε μικρά τμήματα (tiRNAs), τα οποία μπορούν να αναστείλουν την έναρξη της μετάφρασης. Η συγκεκριμένη δράση συνιστά ένα καθοριστικό σημείο στην απόκριση στο στρες και στην κυτταρική επιβίωση, καθώς οδηγεί στον επαναπρογραμματισμό της πρωτεϊνικής έκφρασης και συνεπώς στην επιβίωση του κυττάρου. Επομένως, η αγγειογενίνη συνιστά μια ριβονουκλεάση αποκρινόμενη στο στρες¹³.

1.2.1 Δομή και χαρακτηριστικά

Η τριτοταγής δομή της hAng αποτελείται από επτά αντιπαράλληλα β-ελάσματα και συγκεκριμένα τα εξής αμινοξικά κατάλοιπα: 42-46, 62-65, 69-72, 76-84, 104-108, 115-117 και 117-121. Επιπλέον, τα αμινοξικά κατάλοιπα 3-13 και 50-57 σχηματίζουν δύο έλικες αντίστοιχα. Τέλος, στη hAng σχηματίζονται τρεις δισουλφιδικοί δεσμοί¹⁴.



Εικόνα 1. Η hAng αποτελείται από 123 αμινοξέα με δύο α-έλικες (πράσινο σωληνωτό βέλος), επτά β-φύλλα (κίτρινο βέλος φύλλων) και τρεις δισουλφιδικούς δεσμούς (κόκκινη γραμμή). Η πρωτεΐνη περιέχει τρία κύρια καταλυτικά κατάλοιπα (His-13, Lys-40 και His-114) που συνθέτουν το καταλυτικό κέντρο (P1) στο οποίο λαμβάνει χώρα διάσπαση φωσφοδιεστερικού δεσμού. Η αλληλουχία πυρηνικού εντοπισμού NLS καθώς και η αλληλουχία πρόσδεσης στον υποδοχέα είναι χρωματισμένες με κίτρινο χρώμα⁹.

Η αγγειογενίνη εμφανίζει μια ταύτιση αμινοξικής αλληλουχίας με την RNase A της τάξης του 30% ενώ η συνολική ομολογία είναι διπλάσια και συγκεκριμένα 65%⁶⁷. Το ενεργό κέντρο της είναι ιδιαίτερα συντηρημένο και αποτελείται από διάφορα υποκέντρα σύνδεσης αζωτούχων βάσεων, φωσφορικών ιόντων, καθώς και ριβοζών. Από αυτά, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το P1 όπου βρίσκονται τα τρία καταλυτικά κατάλοιπα (His-13, Lys-40, His-114) και εκεί επιτελείται η διάσπαση του φωσφοδιεστερικού δεσμού¹⁴.

Παρότι η hAng έχει απόλυτη συντήρηση με την RNase A στο καταλυτικό κέντρο, η ριβονουκλεολυτική της δραστηριότητα είναι σημαντικά μικρότερη. Μελέτες μεταλλαξιγένεσης σε συνδυασμό με κρυσταλλογραφικές μελέτες υπέδειξαν τα δομικά χαρακτηριστικά που προκαλούν μειωμένη ενζυμική δραστηριότητα. Καθοριστικό στοιχείο αποτελεί η παρεμποδιστική διαμόρφωση της Gln117 στο υπο- κέντρο πρόσδεσης των πυριμιδινών (B1). Το συγκεκριμένο χαρακτηριστικό της hAng προκαλεί αδυναμία πρόσδεσης και επομένως διάσπασης του RNA⁶⁸.

Η ανενεργή διαμόρφωση της hAng και η διαμόρφωση του καρβοξυτελικού άκρου στην κλειστή φάση, εκεί που βρίσκεται και η Gln117 υποστηρίζεται από αλληλεπιδράσεις με τα υπόλοιπα κατάλοιπα της πρωτεΐνης. Συγκεκριμένα, η πλευρική αλυσίδα της Gln117 σχηματίζει δυο δεσμούς υδρογόνου με την Thr44, ενώ ταυτόχρονα η Asp116 και η Ser118 συνδέονται με δύο επίσης δεσμούς υδρογόνου. Επιπλέον, ο προσανατολισμός της Gln117 επηρεάζεται περισσότερο από τη δευτεροταγή δομή του τμήματος των αμινοξικών καταλοίπων 117-121 και συγκεκριμένα μια έλικα 3₁₀, στην οποία οι δεσμοί υδρογόνου της κύριας αλυσίδας συνδέουν την Gln117 με την Phe120, και την Ser118 με την Arg121. Ακόμη, φαίνεται πως οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις της Ile119 με τη Phe120 συμβάλλουν περαιτέρω στη διατήρηση της παρεμποδιστικής θέσης αυτής της έλικας. Όταν τα αμινοξικά κατάλοιπα 121 - 123 αποκοπούν από τη δομή, δημιουργείται μια πρωτεΐνη με μειωμένη δραστηριότητα έναντι του RNA κατά 10 τάξεις μεγέθους. Έτσι, συμπεραίνεται ότι τα συγκεκριμένα κατάλοιπα παίζουν θετικό ρόλο στη διάσπαση του RNA, συμμετέχοντας στην πρόσδεσή του σε κέντρα πέρα από τον κεντρικό πυρήνα του ενεργού κέντρου. Συνεπώς, προκειμένου το RNA να προσδεθεί στην αγγειογενίνη, θα πρέπει εκείνη να υποστεί τις κατάλληλες δομικές μεταβολές, έτσι ώστε να αποσταθεροποιηθούν οι δεσμοί που συγκροτούν την έλικα 3₁₀ και ακολούθως να μετακινηθεί η πλευρική αλυσίδα της Gln117 από το υπο-κέντρο B1 προκειμένου να απελευθερωθεί η θέση πρόσδεσης της 3' - πυριμιδίνης αλλά και να εμποδιστούν οι αλληλεπιδράσεις των Ile119 - Phe120⁶⁸. Αξίζει να τονιστεί πως η παρεμπόδιση του B1 δεν είναι ο μοναδικός παράγοντας που μειώνει τη ριβονουκλεολυτική δραστηριότητα της hAng, καθώς και η δομή του κέντρου B2 όπου προσδέονται τα μόρια των πουρινών διαφέρει από το αντίστοιχο της RNase A⁷⁰.

1.3 Βιολογικοί ρόλοι της ανθρώπινης αγγειογενίνης

1.3.1 Μηχανισμοί δράσης

1.3.1.1 Μεταβολισμός νουκλεϊκών οξέων

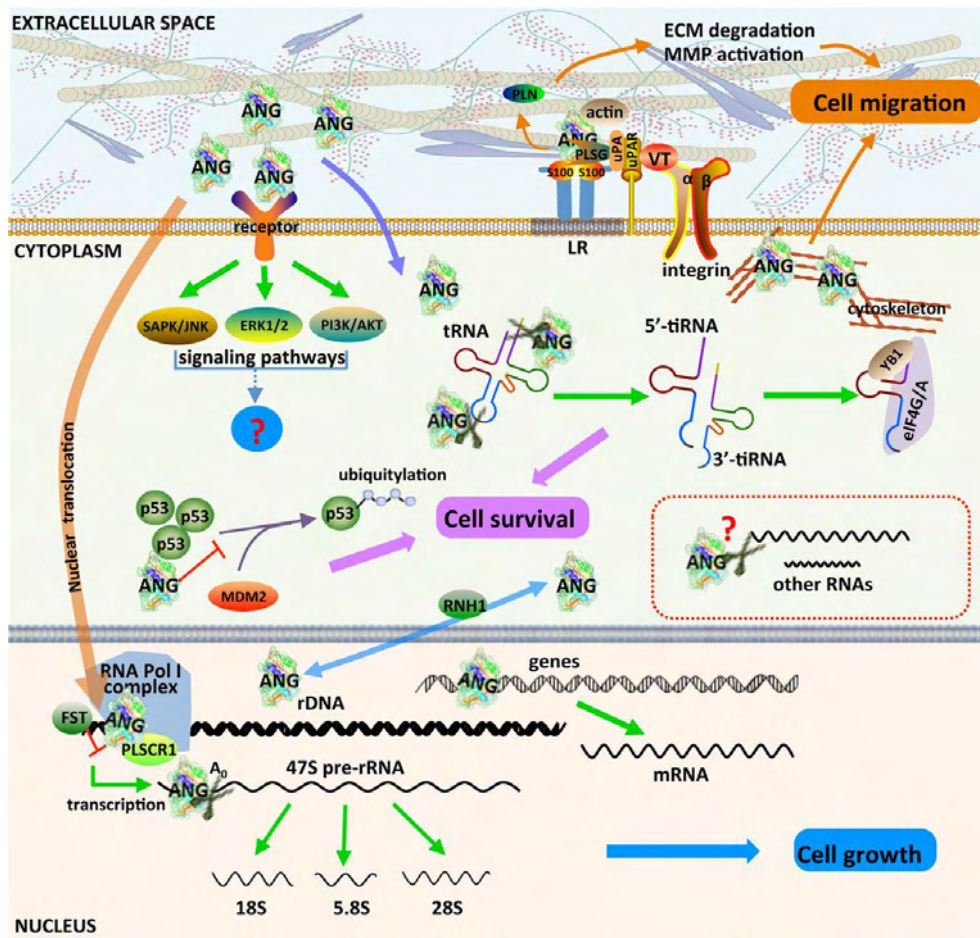
Σύμφωνα με μελέτες σχετικά με τη δράση της αγγειογενίνης, είναι πλέον βέβαιο πως η μετατόπιση της αγγειογενίνης στον πυρήνα έχει ως αποτέλεσμα τη συμμετοχή της στο μεταβολισμό των νουκλεϊκών οξέων. Είναι πλέον σαφές ότι η αγγειογενίνη επάγει την μεταγραφή του 47s pre-rRNA, το οποίο στη συνέχεια παράγει το 18S rRNA, το 28S rRNA και το 5,8S rRNA καθώς προσδένεται στην ABE περιοχή (Angiogenin Binding Element) και στην UCE περιοχή (Upstream Core Element) του εκκινητή του rDNA και πυροδοτεί την συναρμολόγηση του συμπλόκου έναρξης της μεταγραφής μέσω μεθυλίωσης και τροποποίησης των ιστονών¹⁵. Πέρα από τη συμμετοχή της αγγειογενίνης στη μεταγραφή και την επεξεργασία του rRNA υπάρχουν αρκετές ενδείξεις ότι το πλεόνασμα της αγγειογενίνης στον πυρήνα σχετίζεται και με τη μεταγραφή του mRNA. Μελέτες ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης κατέδειξαν 699 γονίδια που ενδέχεται να ρυθμίζονται από την αγγειογενίνη. Σύμφωνα με κάποιες παρατηρήσεις σχετικά με την αγγειογενίνη και τη δυνατότητα εκείνης να μεταβάλλει τη διαμόρφωση και τη δομή των ιστονών μέσω σύνδεσης μαζί τους, είναι πιθανό να δρα και ως ενεργοποιητής αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης⁹. Η επαγόμενη από την αγγειογενίνη παραγωγή tiRNAs, αναπρογραμματίζει το μοτίβο έκφρασης των πρωτεϊνών συμβάλλοντας στην κυτταρική επιβίωση. Από τα 2 τμήματα tRNA που παράγονται από την αγγειογενίνη, μόνο τα 5' tiRNA και όχι τα 3' tiRNA μπορούν να αναστείλουν την μετάφραση, γεγονός που μπορεί να οφείλεται στο διαφορετικό μέγεθος των δύο τμημάτων. Ωστόσο, ο μοριακός ρόλος των τμημάτων αυτών και ο εντοπισμός τους δεν έχουν αποκαλυφθεί λεπτομερώς¹⁶.

1.3.1.2 Ενεργοποίηση μονοπατιών διακυτταρικής επικοινωνίας

Στο εξωκυττάριο περιβάλλον, η hAng προσδένεται στον υποδοχέα κυτταρικής επιφάνειας. Η σύνδεση αυτή μπορεί να προκαλέσει μια σειρά από διακυτταρικές αποκρίσεις. Μπορεί να ενεργοποιήσει μόρια-τελεστές που έχουν καθοριστικό ρόλο στην παραγωγή ριβοσωμικών πρωτεϊνών και ενισχύουν την κυτταρική ανάπτυξη, μόρια όπως είναι: η σηματοεξαρτώμενη κινάση ERK(1/2), η πρωτεϊνική κινάση B/Akt, η σχετιζόμενη με το στρες πρωτεϊνική κινάση και η c-Jun κινάση (SAPK/JNK). Τέλος, η hAng φαίνεται να έχει τη δυνατότητα να ενεργοποιεί το σηματοδοτικό μονοπάτι κυτταρικής επιβίωσης που μεσολαβείται από τον NF-κΒ καθώς και να αλληλεπιδρά με την p53, να εμποδίζει τη δράση της κι έτσι να ενισχύεται το αντιαποπτωτικό μονοπάτι της¹⁷.

1.3.1.3 Ενεργοποίηση της αποικοδόμησης της βασικής ενδοθηλιακής μεμβράνης

Στο κυτταρικό περιβάλλον των όγκων η hAng φτάνει στην κυτταρική επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων όπου συνδέεται στην ακτίνη και υφίσταται πλέον ως σύμπλοκο (AngBP). Το σύμπλοκο αυτό διεγείρει τη παραγωγή πλασμίνης από το πλασμινογόνο, μια διαδικασία στην οποία μεσολαβεί ο ενεργοποιητής πλασμινογόνου, μια πρωτεάση σερίνης. Η πλασμίνη είναι ένα ένζυμο του πλάσματος που συμμετέχει στη διάσπαση των θρόμβων αλλά και στη διάσπαση της λαμινίνης, της φιβρονεκτίνης και της βασικής ενδοθηλιακής μεμβράνης, προάγοντας έτσι τη μετανάστευση των κυττάρων. Η αλληλεπίδραση αγγειογενίνης και ακτίνης προκαλεί αλλαγές στον κυτταροσκελετό, όπως η αναστολή του πολυμερισμού της G-ακτίνης (ελεύθερο μονομερές) καθώς και αλλαγές στις φυσικές ιδιότητες της F-ακτίνης (γραμμικό πολυμερές). Οι δράσεις αυτές επάγουν την αποικοδόμηση της βασικής ενδοθηλιακής μεμβράνης και της εξωκυττάριας μήτρας, επιτρέποντας έτσι στα ενδοθηλιακά κύτταρα να διηθούνται και να μεταναστεύουν στον περιαγγειακό ιστό, ένα σημαντικό χαρακτηριστικό της αγγειογένεσης⁹.



Εικόνα 2. Μηχανισμοί δράσης της hAng⁹. Η εκκρινόμενη αγγειογενίνη προσδένεται στον υποδοχέα που εντοπίζεται στην εξωκυτταρική μεμβράνη των κυττάρων και με ενδοκύτωση εισέρχεται στο εσωτερικό του κυττάρου. Εκεί συσσωρεύεται: α) στον πυρηνίσκο, υπό συνθήκες ανάπτυξης και β) στο κυτταρόπλασμα υπό συνθήκες στρες.

- A. Η εξωκυττάρια hAng ενεργοποιεί μονοπάτια μεταγωγής σήματος που περιλαμβάνουν τις σηματοδοτικές οδούς των SAPK/JNK, ERK1/2 και των PI3K/AKT σε διαφορετικά κύτταρα αλλά και σε διαφορετικές κυτταρικές συνθήκες. Η αλληλεπίδραση της αγγειογενίνης και του συμπλόκου κυτταρικής επιφάνειας (AngBP) μπορεί να οδηγήσει στην αποικοδόμηση της εξωκυτταρικής μεμβράνης και την ενεργοποίηση των μεταλλοπρωτεϊνών με αποτέλεσμα τη μετανάστευση των κυττάρων καθώς και την εισβολή τους
- B. Η κυτταροπλασματική αγγειογενίνη ως απόκριση στο στρες, διασπά το tRNA προς σχηματισμό tiRNAs. Τα 5'tiRNAs αλληλεπιδρούν με τον μεταφραστικό αναστολέα YB-1, ο οποίος στρατολογεί τον eIF4G/A από τα mRNAs που δεν έχουν καλύπτρα στο 5' άκρο. Η αγγειογενίνη επιπλέον, αναστέλλει την φωσφορυλίωση στη Ser15 της p53 και την επακόλουθη πρόσδεση της Mdm2 που έχει ως αποτέλεσμα την ουβικιτίνωση της p53.
- C. Σε συνθήκες ανάπτυξης, η πυρηνική αγγειογενίνη συμμετέχει στην επεξεργασία/μεταγραφή του rRNA και τη μεταγραφή του mRNA.

1.3.2 Φυσιολογικές λειτουργίες

1.3.2.1 Αγγειογένεση

Τα αιμοφόρα αγγεία διοχετεύουν το αίμα της καρδιάς σε όλα τα σημεία του σώματος. Υπάρχουν τρεις τύποι αιμοφόρων αγγείων. Οι αρτηρίες, οι φλέβες και τα τριχοειδή αγγεία. Τα μεγάλα αγγεία αποτελούνται από τρεις στιβάδες ή χιτώνες, τον έσω, τον μέσο και τον έξω. Ο έσω χιτώνας αποτελείται από μία μονή σειρά κυττάρων δημιουργώντας ένα πρώτο φραγμό για το αίμα που κυκλοφορεί μέσα στα αγγεία και ονομάζεται ενδοθήλιο, το οποίο διαχωρίζεται από τα περιβάλλοντα εξωτερικά στρώματα με τη βασική μεμβράνη. Ο έσω χιτώνας στις μεγάλες κυρίως αρτηρίες περιέχει και λεία μυϊκά κύτταρα. Ο μέσος χιτώνας είναι η πιο παχιά στοιβάδα, περιέχει λεία μυϊκά κύτταρα και χωρίζεται με τον έσω χιτώνα με το έσω ελαστικό πέταλο. Ο έξω χιτώνας περιέχει την νεύρωση και την αγγείωση των αγγείων αλλά και την στήριξη των αγγείων με κολλαγόνο. Η ελασίνη που προσδίδει την ικανότητα στα αγγεία να συστέλλονται και να διαστέλλονται είναι κυρίως χαρακτηριστικό των αρτηριών. Οι φλέβες έχουν περισσότερη σθηρικτική ουσία με τη μορφή μιας δομικής πρωτεΐνης, του κολλαγόνου.

Τα ενδοθηλιακά κύτταρα σχηματίζουν την εσωτερική επιφάνεια των αιμοφόρων αγγείων και προσαρμόζουν τον αριθμό τους και τη διεύθυνση τους ώστε να καλύπτουν τις ανάγκες του οργανισμού στα επιμέρους σημεία ανάλογα με τις συνθήκες. Δημιουργούν ένα προσαρμοζόμενο σύστημα που υποστηρίζει τη ζωή, το οποίο μέσω κυτταρικής μετανάστευσης εκτείνεται σε κάθε περιοχή του σώματος. Αν τα ενδοθηλιακά κύτταρα δεν είχαν την ικανότητα να επεκτείνουν και να αναδιαμορφώνουν το δίκτυο των αιμοφόρων αγγείων, η ανάπτυξη και η επιδιόρθωση των διαφόρων ιστών θα ήταν αδύνατη. Το γεγονός ότι τόσο οι φυσιολογικοί όσο και οι καρκινικοί ιστοί εξαρτώνται από την παροχή αίματος, έχει προκαλέσει αυξανόμενο ενδιαφέρον για τη βιολογία των ενδοθηλιακών κυττάρων καθώς φάρμακα που στοχεύουν τα κύτταρα αυτά είναι πιθανό να εμποδίζουν την ανάπτυξη των καρκινικών όγκων¹⁸.

Η δημιουργία νέων αιμοφόρων αγγείων μπορεί να γίνει μέσω δυο μηχανισμών: της νεοαγγειογένεσης (de novo σχηματισμός αγγείων) και της

αγγειογένεσης. Η διαδικασία της νεοαγγειογένεσης λαμβάνει χώρα κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη, κατά την οποία τα αιμοφόρα αγγεία σχηματίζονται από τα πρόδρομα κύτταρα των ενδοθηλιακών κυττάρων, τους αγγειοβλάστες.

Όταν δημιουργηθεί το κυρίως αγγειακό πλέγμα μέσω της νεοαγγειογένεσης, τότε νέα τριχοειδή αγγεία μπορούν να δημιουργηθούν από τα ήδη προϋπάρχοντα μέσω της αγγειογένεσης. Η αγγειογένεση, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στις κανονικές φυσιολογικές διεργασίες, όπως στην επούλωση τραυμάτων, την εμβρυϊκή ανάπτυξη και την αναπαραγωγή. Ωστόσο δεν περιορίζεται μόνο εκεί καθώς παθολογική αγγειογένεση εμφανίζεται σε πολλά νοσήματα, μεταξύ αυτών, η ρευματοειδής αρθρίτιδα, η διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια, η αθηροσκλήρωση, η ψωρίαση καθώς και η ανάπτυξη των όγκων και η μετάσταση τους¹⁹. Η απρόσκοπτη αύξηση των νεοπλασμάτων εξαρτάται από την τοπική αιμάτωση που είναι ανάλογη του αριθμού των τριχοειδών αγγείων²⁰. Τα νεοσχηματισμένα αγγεία δημιουργούνται από τα προϋπάρχοντα τριχοειδή μέσω της επίδρασης αγγειογενετικών παραγόντων που εκκρίνονται από τα νεοπλασματικά κύτταρα²¹. Η αγγειογένεση είναι απαραίτητη προϋπόθεση κατά τη διάρκεια της κακοήθους εξαλλαγής ενός ιστού. Μελέτες σε πειραματόζωα αλλά και σε ανθρώπινους ιστούς έδειξαν ότι η αγγειογένεση σχετίζεται άμεσα με την καρκινογένεση²² και για το λόγο αυτό αποτελεί στόχο για την ανάπτυξη αντικαρκινικών φαρμάκων²³.

Υπάρχουν δύο μηχανισμοί που εξασφαλίζουν ότι το δίκτυο των αιμοφόρων αγγείων θα διακλαδιστεί και θα προσαρμοστεί στις τοπικές ανάγκες των ιστών, τόσο σε φυσιολογικές συνθήκες όσο και σε παθολογικές καταστάσεις. Οι μηχανισμοί με τους οποίους μπορεί να συμβεί αυτό είναι δύο, με εκβλάστηση και με διάσπαση των ήδη υπάρχοντων αγγείων. Σε κάθε περίπτωση, τα ενδοθηλιακά κύτταρα ανταποκρίνονται σε μηνύματα από τον ιστό στον οποίο διεισδύουν.

Η αγγειογένεση περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

1) *Εναρκτήρια φάση*, κατά την οποία παρατηρείται η αγγειοδιαστολή και ο σχηματισμός αγγειωδών οργανιδίων (vesiculo-vacuolarorganelle) στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Ο πιο σημαντικός τελεστής αυτού του σταδίου είναι ο αγγειακός ενδοθηλιακός αναπτυξιακός παράγοντας (VEGF),

2) Προοδευτική φάση, η οποία χαρακτηρίζεται από την αποικοδόμηση και αναδιαμόρφωση της βασικής μεμβράνης και του εξωκυττάριου ιστού από πρωτεάσες που εκκρίνονται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων, το σχηματισμό εκβλαστήσεων και τη μετανάστευσή τους, την αλληλεπίδρασή τους με νεοσυντεθημένες ιντεγκρίνες και τέλος, τη ρύθμιση της έκφρασης των υποδοχέων αυξητικών παραγόντων,

3) Φάση διαφοροποίησης, η οποία περιλαμβάνει πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων και μετανάστευση τους, επομένως ακολουθεί και ο σχηματισμός του αυλού. Ταυτόχρονα πραγματοποιούνται και διαβαθμίσεις χημειοτακτικών παραγόντων κατά μήκος της αποσαρθωμένης ενδοθηλιακής μεμβράνης προς τον αναδιαμορφωμένο περιαγγειακό χώρο. Τελεστές αυτού του βήματος είναι η hAng, ο VEGF, οι αγγειοποιητίνες, καθώς και μόρια όπως ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας και οι χημειοκίνες.

4) Φάση ωρίμανσης, που χαρακτηρίζεται από τη στρατολόγηση των περιαγγειακών και λείων μυϊκών κυττάρων και την εναπόθεση νέων πρωτεϊνών της εξωκυττάριας ουσίας²⁴. Στη σηματοδότηση και τη μεταγωγή των μηνυμάτων αυτών σημαντικό ρόλο παίζουν ποικίλες πρωτεΐνες, γνωστές ως αγγειογενετικοί παράγοντες, με σημαντικότερους εκπροσώπους τους αυξητικούς παράγοντες. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα εκφράζουν ένα ευρύ φάσμα αυξητικών παραγόντων και των αντίστοιχων υποδοχέων τους, οι οποίοι επάγουν την αγγειογένεση *in vivo*^{25,26}.

1.3.2.2 Ανοσοαπόκριση

Η αγγειογενίνη παράγεται σε αφθονία στα κύτταρα του ενδοθηλίου του εντέρου δρώντας και εκεί ως αντιμικροβιακός παράγοντας. Εκτός από τις αντιβακτηριδιακές της δράσεις η αγγειογενίνη ενεργεί και ως ανοϊκός παράγοντας καθώς είναι μια από τις δύο ριβονουκλεάσες που παράγονται από τα T-λεμφοκύτταρα. Επιπλέον, η αγγειογενίνη ενδέχεται να έχει αντιφλεγμονώδη δράση καθώς έχει παρατηρηθεί πως η συγκέντρωσή της στον ορό αυξάνεται σημαντικά

κατά τη διάρκεια της αντιφλεγμονώδους απόκρισης καθώς και κατά τη χορήγηση ιντερλευκίνης 1β⁹.

1.3.3 Ρύθμιση της δράσης της hAng

Η hAng όπως προαναφέρθηκε, εμφανίζει τόσο αγγειογενετική δραστηριότητα όσο και ριβονουκλεολυτική. Πώς ρυθμίζεται όμως η δράση της προκειμένου να ανταποκρίνεται στις εκάστοτε ανάγκες του ανθρώπινου οργανισμού και να διατηρείται επομένως η ομοιόσταση; Αναφορικά με τη ρύθμιση της αγγειογενετικής της δράσης, έχει αποδειχθεί πως σε μεταγραφικό επίπεδο, η υπερέκφραση του miR-409-3p καταστέλλει την μεταγραφή του γονιδίου, ενώ αντίστοιχα η υπερπαραγωγή IL-6 οδηγεί σε αύξηση της μεταγραφής αλλά και της έκφρασης της αγγειογενίνης²⁷.

Εκτός όμως από ισχυρό αγγειογενετικό παράγοντα, η αγγειογενίνη αποτελεί μία ενεργή ριβονουκλεάση και η ιδιότητά της αυτή αποτελεί προαπαιτούμενο για την αγγειογενετική της δράση. Αν και λίγα είναι γνωστά για τα μόρια-στόχους της πρωτεΐνης αυτής, γεννάται το ερώτημα πως ελέγχεται η ριβονουκλεολυτική της δράση, ώστε να αποφευχθεί η τυχαία και ανεξέλεγκτη διάσπαση των μορίων RNA.

Επιπλέον, πως ρυθμίζεται η δράση της ώστε να διεγείρει τη μεταγραφή των μορίων rRNA και την παραγωγή των tiRNAs κάτω από φυσιολογικές και συνθήκες στρες αντίστοιχα;

Η διαφορετική υποκυτταρική διαμερισματοποίηση της hAng κάτω από διαφορετικές συνθήκες αποτελεί έναν ρυθμιστή της δράσης της, καθώς σε φυσιολογικές συνθήκες η hAng εντοπίζεται στον πυρηνίσκο επάγοντας τη μεταγραφή του rRNA, ενώ σε συνθήκες στρες εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και συσσωρεύεται στα κοκκία του stress SGs⁶⁹.

Ταυτόχρονα, έχει βρεθεί ότι η αγγειογενίνη ρυθμίζεται από τον ανθρώπινο αναστολέα ριβονουκλεασών (hRI), ο οποίος αναστέλλει αποτελεσματικά και εξειδικευμένα τόσο την ενζυμική όσο και την αγγειογενετική της δράση, μέσω της πρόσδεσής του στην hAng σε στοιχειομετρική αναλογία 1:1. Ο hRI αποτελεί μέλος μίας οικογένειας κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών πλούσιων σε λυσίνες, μοριακού βάρους 50 kDa, εντοπίζεται σε όλους τους ιστούς των θηλαστικών και συγκροτείται

από μία πολυπεπτιδική αλυσίδα 460 αμινοξέων²⁸. Ο hRI συνδέεται στην hAng με μία σταθερά διάστασης (Kd) μικρότερη του 1fM, δημιουργώντας έναν από τους ισχυρότερους δεσμούς αλληλεπίδρασης πρωτεΐνης-πρωτεΐνης που υπάρχει στη φύση^{29,30}. Σε συνθήκες ανάπτυξης των κυττάρων, ο hRI προσδένεται στην κυτταροπλασματική hAng καθιστώντας την ανενεργή, προκειμένου να αποτρέπεται η τυχαία αποικοδόμηση του κυτταρικού RNA. Με αυτόν τον τρόπο όμως η πυρηνική παραμένει ενζυμικά ενεργή ώστε να διασφαλίζεται η μεταγραφή του rRNA. Αντίθετα, κάτω από συνθήκες στρες προσδένει την πυρηνική hAng αναστέλλοντας την ενζυμική της δράση ώστε να σταματήσει να παράγεται μη αναγκαίο rRNA και να εξοικονομείται ενέργεια, αλλά όχι την κυτταροπλασματική, η οποία συγκεντρώνεται στα κοκκία του στρες (SGs), παράγοντας μόρια tiRNAs. Αναστολή της έκφρασης του hRI δεν επιτρέπει την επαγόμενη από το στρες μεταφορά της hAng σε άλλο κυτταρικό διαμέρισμα και μειώνει την κυτταρική ανάπτυξη και επιβίωση³¹.

Ένας ακόμη παράγοντας που φαίνεται να ρυθμίζει τη δράση της hAng είναι ο χαλκός. Τα μεταλλικά ιόντα γενικά εμφανίζουν καθοριστικό ρόλο σε νευροεκφυλιστικές ασθένειες και ειδικά ο χαλκός εμπλέκεται σε διάφορες αγγειογενετικές διεργασίες. Τα ιόντα χαλκού (II) αυξάνουν την πρόσδεση της hAng στα ενδοθηλιακά κύτταρα και επηρεάζουν την ενδοκυτταρική της διαμερισματοποίηση, μειώνοντας με αυτόν τρόπο την πυρηνική της μετατόπιση. Επιπλέον, το σύμπλοκο hAng-χαλκού (III) έχει αρνητική επίδραση στην αγγειογένεση και τη μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων. Επιπρόσθετα, ο χαλκός έχει την ικανότητα να ρυθμίζει και τη μεταγραφή του γονιδίου της hAng. Όπως φαίνεται υπάρχει ισχυρή συσχέτιση μεταξύ χαλκού και hAng, η οποία εμπλέκεται στη ρύθμιση της λειτουργίας των ενδοθηλιακών κυττάρων³².

Πρόσφατες μελέτες έδειξαν πως η φωσφορυλίωση μιας εκ τριών συγκεκριμένων σερινών (S37, S28 και S87) και μια θρεονίνης (T36), δίνει στην hAng τη δυνατότητα να αποφεύγει τον hRI και να εισέρχεται στον πυρήνα. Η φωσφορυλίωση αυτή γίνεται από την πρωτεϊνική κινάση A και την κυκλινοεξαρτώμενη κινάση και ενδεχομένως να αποτελεί ένα μηχανισμό που χρησιμοποιείται από τα ενδοθηλιακά και τα καρκινικά κύτταρα ώστε να ενισχυθεί ο πολλαπλασιασμός τους.

1.3.4 Συσχετισμός με ασθένειες

Η hAng φυσιολογικά επάγεται σε περιπτώσεις φλεγμονής, προάγοντας την επούλωση των τραυμάτων, παρουσιάζοντας μικροβιοκτόνο δράση έναντι παθογόνων βακτηρίων και μυκήτων, ενώ ταυτόχρονα προσδίδει ανοσία στον ξενιστή³⁴. Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του ανθρώπου, ανιχνεύεται σε όργανα όπως η καρδιά, ο σπλήνας, ο πνεύμονας, το ήπαρ, ο προστάτης, ο μαστός, ο εγκέφαλος, το παχύ έντερο, ο αμφιβληστροειδής χιτώνας και άλλα³⁵. Η παραγωγή της πραγματοποιείται κυρίως στο νωτιαίο μυελό τόσο κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη όσο και κατά την ενηλικίωση³⁶, ωστόσο, η αγγειογένεση δεν πραγματοποιείται διαρκώς σε όλους του ιστούς.

1.3.4.1 hAng και ογκογένεση

Η hAng έχει συσχετιστεί με μία πληθώρα κακοήθων και μη, παθολογικών καταστάσεων. Οι καλοήθεις καταστάσεις περιλαμβάνουν την περιφερική αγγειακή νόσος, τη φλεγμονώδη νόσο του εντέρου (IBD), τη ρευματοειδή αρθρίτιδα, την παχυσαρκία και την παραγωγική διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια. Επιπλέον, συμμετέχει στη φυσιολογική ανάπτυξη των αγγείων, καθώς τα επίπεδά της είναι ιδιαίτερα μειωμένα σε ασθενείς με παθολογικά ευρήματα³⁷. Η αγγειογένεση σχετίζεται και με τις καρδιαγγειακές διαταραχές και συγκεκριμένα τη θρομβογένεση και την αρτηριογένεση. Αναφορικά με τις κακοήθεις καταστάσεις, τα επίπεδα της hAng ποικίλουν μεταξύ των διαφόρων τύπων καρκίνου και το όριο το οποίο αποτελεί σημείο πρόγνωσης προκύπτει από τη μέση τιμή των διαφόρων ομάδων μελετών και ποικίλει μεταξύ 330 – 600 ng/ mL³⁵. Αύξηση των επιπέδων της εντοπίζεται σε πολλούς τύπους καρκίνου ανάμεσα στους οποίους ο καρκίνος του προστάτη³⁸, του μαστού³⁹, του παχέος εντέρου⁴⁰, του ενδομητρίου⁴¹, των ωοθηκών⁴², των νεφρών⁴³, του παγκρέατος⁴⁴, του ουροθηλίου⁴⁵, του τραχήλου της μήτρας⁴⁶, του γαστρικού⁴⁷. Επιπλέον, αύξηση της hAng παρατηρείται στη λευχαιμία⁴⁸, στο πιλοκυτταρικό αστροκύτωμα, έναν χαμηλής κακοήθειας όγκος του εγκεφάλου⁴⁹, στο λεμφαγγείωμα⁵⁰, στο μελάνωμα⁵¹ και στο νεφροβλάστωμα, τον όγκο Wilms⁵². Υψηλά

επίπεδα της hAng παρατηρούνται ακόμη σε ασθενείς με οξεία μυελοειδή λευχαιμία (AML), χρόνιες μυελοπολλαπλασιαστικές διαταραχές (CMD)⁵³ και στο πολλαπλούν μυέλωμα, τον καρκίνο των πλασματοκυττάρων⁵⁴. Τα επίπεδα της hAng επιπλέον, έχουν σχετιστεί και με τη χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία (CLL). Ακόμη, πιθανολογείται ότι η hAng αλληλεπιδρά με την αγγειοποιητίνη 2 (Ang-2), τον b-FGF, τον VEGF καθώς και τη φολιστατίνη⁵⁵ προκειμένου να ρυθμίσει την επιβίωση και αδρανοποίηση στο περιβάλλον των καρκινικών κυττάρων⁵⁶. Τέλος, μειωμένα επίπεδα αγγειογενίνης έχουν παρατηρηθεί και σε ασθενείς με τη νόσο Alzheimer⁵⁷.

1.3.4.2 hAng και νευροεκφυλιστικές ασθένειες

Πολλές σημειακές μεταλλάξεις της hAng έχουν συσχετιστεί με τη νευροεκφυλιστική νόσο, την πλευρική αμυοτροφική σκλήρυνση (ALS) τόσο τη σποραδική όσο και την οικογενή^{58,59}. Η φυσιολογική αγγειογενίνη μειώνει το θάνατο των νευρώνων σε μοντέλα ALS *in vitro* ενώ η αποσιώπησή της επιφέρει τον κυτταρικό θάνατο⁶⁰. Αντίθετα, μεταλλάγματα της hAng αναστέλλουν την επιμήκυνση των νευριτών και προωθούν τον επαγόμενο από την υποξία κυτταρικό θάνατο των κινητικών νευρώνων^{61,62}. Σε *in vivo* συστηματική θεραπεία με φυσιολογική αγγειογενίνη αυξήθηκε η επιβίωση των κινητικών νευρώνων και επιβραδύνθηκε η κινητική δυσλειτουργία. Σε αυτήν τη νευροπροστατευτική δράση εμφανίζει καθοριστικό ρόλο η ενεργοποίηση του μονοπατιού PI3K/ Akt, καθώς η *in vitro* αναστολή του διαταράσσει την προστασία των νευρώνων από την hAng. Οι μεταλλάξεις της hAng που έχουν ταυτοποιηθεί σε ασθενείς με ALS σχετίζονται κυρίως με απώλεια λειτουργίας της αγγειογενετικής της δραστηριότητας λόγω είτε απώλειας της ριβονουκλεολυτικής της δράσης είτε της μετατόπισής της στον πυρήνα είτε και των δύο και αποτελεί το πρώτο γονίδιο που ταυτοποιήθηκε μέχρι τώρα του οποίου η απώλεια λειτουργίας σχετίζεται με την ALS. Η hAng αποτελεί επίσης, τον δεύτερο αγγειογενετικό παράγοντα που έχει σχέση με την ALS μετά τον VEGF. Προκειμένου ο VEGF να πυροδοτήσει την αγγειογένεση, είναι απαραίτητη η επαγόμενη από την hAng μεταγραφή του rRNA. Είναι πιθανόν δηλαδή μία δυσλειτουργία της hAng να είναι σε θέση να εμποδίσει το φυσιολογικό ρόλο που διαθέτει ο VEGF στους

κινητικούς νευρώνες⁶³. Καταληκτικά, η hAng αποτελεί μία σημαντική νευροαναπτυξιακή πρωτεΐνη και εμφανίζει καθοριστικό νευροπροστατευτικό ρόλο, καθώς εκτός από την ALS υπάρχουν ενδείξεις ότι εμπλέκεται και στη νόσο του Πάρκινσον (PD).

1.3.4.3 hAng και άλλες ασθένειες

Η hAng συμμετέχει όμως και σε διάφορες μη κακοήθεις παθολογικές καταστάσεις. Σε αυτές περιλαμβάνονται ο διαβήτης, η ρευματοειδής αρθρίτιδα, η ενδομητρίωση, η περιφερειακή αγγειακή νόσος αλλά και η ασθένεια του φλεγμονώδους εντέρου (inflammatory bowel disease, IBD). Στις συγκεκριμένες διαταραχές η συγκέντρωση της hAng είναι αυξημένη στον ορό του αίματος. Επομένως, καθίσταται δυνατή η ανίχνευση των αλλαγών στην συγκέντρωσή της. Με τον τρόπο αυτό, η hAng δίνει τη δυνατότητα παρακολούθησης της εξέλιξης των παραπάνω ασθενειών ⁶⁴.

2. Σκοπός

Η φωσφορυλίωση ενός εκ των τριών συγκεκριμένων καταλοίπων σερίνης (S37, S28 και S87) και μια θρεονίνης (T36), δίνει στην hAng τη δυνατότητα να αποφεύγει τον κυτοσολικό hRI και να εισέρχεται στον πυρήνα. Με τον τρόπο αυτό η hAng παραμένει ενεργή και επομένως η λειτουργία της είναι πλήρης. Η φωσφορυλίωση αυτή γίνεται από την πρωτεϊνική κινάση A (PKA) και την κυκλινοεξαρτώμενη κινάση (CDK) και ενδεχομένως να αποτελεί ένα μηχανισμό που χρησιμοποιείται από τα ενδοθηλιακά και τα καρκινικά κύτταρα ώστε να ενισχυθεί ο πολλαπλασιασμός τους³³.

Η εξαιρετικά στενή δέσμευση μεταξύ του RI και της hAng οφείλεται σε μεγάλο βαθμό σε ευνοϊκές αλληλεπιδράσεις Κουλόμπ, καθώς ο RI είναι πολύ αρνητικά φορτισμένος και η hAng εξαιρετικά θετικά φορτισμένη. Σύνδεση φωσφορικών ομάδων στα αμινοξικά κατάλοιπα της hAng απωθούν τις δυνάμεις Κουλόμπ και να μειώνουν τη συγγένεια για τον RI. Ανάμεσα στα δεκαέξι κατάλοιπα σερίνης και θρεονίνης της hAng, τέσσερις είχαν ιδιαίτερο ενδιαφέρον: η Ser87, η οποία βρίσκεται στη μοριακή επιφάνεια του συμπλόκου RI και hAng και είναι γνωστό 'Hotspot' για υποκαταστάσεις αμινοξέων που προκαλούν διαφυγή του RI κι ένα σύμπλεγμα τριών καταλοίπων κοντά στο NLS: Ser28, Thr36 και Ser37³³.

Με στόχο τη διερεύνηση της συμβολής των καταλοίπων αυτών στη δομή και λειτουργία της ANG, σχεδιάστηκε και δημιουργήθηκε πλασμίδιο για την ετερόλογη έκφραση μιας μεταλλαγμένης μορφής της ANG, όπου το αμινοξύ σερίνης (S) 28 αντικαταστάθηκε από αλανίνη (A).

3. Υλικά και Μέθοδοι

3.1 Διαλύματα

Οι συστάσεις των διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στις πειραματικές διαδικασίες αναγράφονται στους παρακάτω πίνακες:

Lb Broth	S.O.C. Θρεπτικό	Terrific Broth
Τρυπτόνη 10 gr/L	Γλυκόζη 20 mM	Γλυκερόλη 4 ml/L
Εκχύλισμα ζύμης 5 gr/L	Εκχύλισμα ζύμης 0.5% w/v	Εκχύλισμα ζύμης 0.5% w/v
NaCl 10 gr/L	Τρυπτόνη 2% w/v	Τρυπτόνη 12 gr/L
	KCl 2,5 mM	KH ₂ PO ₄ 0.017 M
	MgCl ₂ 10 mM	K ₂ HPO ₄ 0.072 M
	MgSO ₄ 10mM	
	NaCl 10 mM	

Διάλυμα αναδίπλωσης pH 8	Διάλυμα αποδιάταξης pH 8	Διάλυμα λύσης pH 8
Οξειδωμένη γλουταθειόνη 0.6 mM	Ανηγγμένη γλουταθειόνη 150 mM	EDTA 2 Mm
L-αργινίνη 500 mM	Υδροχλωρική γουανιδίνη 7 M	Tris-HCL 50 mM
	EDTA 2 mM	
	Tris-HCL 100 mM	

Διάλυμα εξισορρόπησης της στήλης SPFF pH=8	Διάλυμα έκλουσης της στήλης SPFF pH=8
NaCl 200 mM	NaCl 800 mM
Tris 25 mM	Tris 25 mM

Διάλυμα εξισορρόπησης της στήλης RPC 18 pH=8	Διάλυμα έκλουσης της στήλης RPC 18 pH=8
Τριφθοροαιθανικό οξύ 0.1% v/v	Τριφθοροαιθανικό οξύ 0.8% v/v σε ισοπροπανόλη: ακετονιτρίλιο : νερό σε αναλογία 3:2:2

3.2 Δημιουργία μεταλλάγματος με κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση

Η νουκλεοτιδική αλληλουχία ενός κλωνοποιημένου τμήματος DNA μπορεί να αλλάξει κατά βούληση μέσω της στοχευμένης μεταλλαξιγένεσης χρησιμοποιώντας συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια. Η πιο κοινή προσέγγιση είναι να γίνει χρήση ενός ολιγονουκλεοτιδίου συμπληρωματικού προς ένα τμήμα του DNA μήτρα αλλά να εμπεριέχει μια εσωτερική αναντιστοιχία στο σημείο όπου θα δημιουργηθεί η μετάλλαξη.

Η κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση (Site-Directed Mutagenesis, SDM) είναι η πλέον ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος για την *in vitro* εισαγωγή σημειακών μεταλλάξεων σε επιθυμητά γονίδια. Η SDM χρησιμοποιεί ολιγονουκλεοτιδικούς εκκινητές σχεδιασμένους ειδικά ώστε να περιέχουν την επιθυμητή μετάλλαξη και με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης εισαγάγει τη μετάλλαξη στο γονίδιο-στόχο. Πιο συγκεκριμένα, σημειακές μεταλλάξεις μπορούν να εισαχθούν σε γονίδια εντός πλασμιδίων με χρήση δύο εκκινητών που φέρουν την επιθυμητή μετάλλαξη και συνήθως είναι συμπληρωματικοί, δηλαδή υβριδίζονται στην ίδια ακριβώς αλληλουχία, ο ένας στην κωδική και ο άλλος στην μη κωδική αλυσίδα. Η αντίδραση ενίσχυσης γίνεται σε δυο ξεχωριστές αντιδράσεις PCR και στις δυο αντιδράσεις το εκμαγείο είναι το πλασμίδιο που περιέχει το γονίδιο-στόχο. Στη μια αντίδραση χρησιμοποιείται ο εκκινητής που υβριδίζεται στην κωδική αλυσίδα, και στη δεύτερη ο εκκινητής που υβριδίζεται στη μη κωδική αλυσίδα. Στη συνέχεια, γίνεται μια τρίτη αντίδραση υβριδοποίησης των ενισχυμένων προϊόντων που προέκυψαν από τις δυο πρώτες αντιδράσεις PCR (δηλαδή τις δυο αλυσίδες του πλασμιδίου) και τέλος γίνεται πέψη με το περιοριστικό ένζυμο DpnI το οποίο αναγνωρίζει και πέπτει μεθυλιωμένες βάσεις, απομακρύνοντας έτσι το DNA εκμαγείο και αφήνοντας ολόκληρο μόνο το πλασμίδιο που προέκυψε από τη διαδικασία της SDM. Ο πλασμιδιακός φορέας που χρησιμοποιήθηκε στην προκειμένη περίπτωση ως εκμαγείο είναι ο pET-28a στον οποίο βρίσκεται και το cDNA του γονιδίου της ανθρώπινης αγγειογενίνης (pET-28a-hAng).

Οι εκκινητές που εισήγαγαν τη συγκεκριμένη μετάλλαξη σχεδιάστηκαν με το πρόγραμμα Primer X και είναι οι εξής :

		<i>T_m</i> (°C)	% GC
S28A	FW GATCGTACTGCGAAGCGATTATGAGACGC	76,5	50
	RW GCGTCTCATAATCGCTTCGCAGTAACGATC		

Η αντίδραση της PCR διεξάγεται σε συνθήκες ευνοϊκότερες από ότι συμβαίνει συνήθως (αυξημένος χρόνος υβριδοποίησης και επέκτασης, χαμηλή θερμοκρασία υβριδοποίησης) καθώς οι εκκινητές έχουν ανόμοια νουκλεοτίδια σε σχέση με το DNA μήτρα (Πίνακας 1 και 2).

Πίνακας 1. Αντίδραση στοχευμένης μεταλλαξιγένεσης στην hAng

Αντιδραστήρια	Όγκος σε μL
2x KAPA HiFi HotStart Ready Mix	22
Εκκινητής (10 μM)	1,3
Πλασμιδιακό DNA	1,5
ddH ₂ O	22,2
Τελικός όγκος αντίδρασης, Vτελ	50

Πίνακας 2. Το θερμικό πρότυπο της αντίδρασης

Στάδιο	Θερμοκρασία $^{\circ}\text{C}$	Χρόνος	Συνθήκες αντίδρασης
Αρχική αποδιάταξη	95	3 min	10 κύκλοι αντίδρασης
Αποδιάταξη	98	20 s	
Υβριδοποίηση	68	1 min	
Επιμήκυνση	72	8 min	

Κατόπιν, οι αντιδράσεις PCR για τους επιμέρους εκκινητές ενώθηκαν σε μια αντίδραση η οποία έλαβε χώρα σε ακόμη πιο ευνοϊκές συνθήκες (Πίνακας 3.) και προστέθηκε ένα βήμα τελικής επέκτασης.

Πίνακας 3. Το θερμικό πρότυπο της αντίδρασης PCR

Στάδιο	Θερμοκρασία $^{\circ}\text{C}$	Χρόνος	Συνθήκες αντίδρασης
Αρχική αποδιάταξη	95	3 min	15 κύκλοι αντίδρασης
Αποδιάταξη	98	20 s	
Υβριδοποίηση	65	1 min	
Επέκταση	72	8 min	
Τελική επέκταση	72	20 min	

Για να διαχωρίσουμε στο δείγμα τους κλώνους που περιέχουν τη νέα αλληλουχία που προστέθηκε μέσω των εκκινήτων γίνεται πέψη με το ένζυμο DpnI.

Πίνακας 4. Τα επιμέρους συστατικά της αντίδρασης πέψης με DpnI

Αντιδραστήρια	Όγκος σε μL	Συνθήκες
DpnI	1	37°C/ 5h
10xBuffer 4	5	
Αντίδραση μεταλλαξιγένεσης (αντίδραση PCR για την εισαγωγή μεταλλαξιγεννέσεων)	44	
Ντελ.	50	

Τέλος έγινε κατακρήμνιση με αιθανόλη έτσι ώστε να αποκτηθεί καθαρό το πλασμίδιο. Τα στάδια της κατακρήμνισης αιθανόλης είναι τα εξής:

1. Προσθήκη 5 μL NaCl 2,5 M στα 50 μL προϊόντος αντίδρασης πέψης (τελική συγκέντρωση NaCl 0,25 M).
2. Προσθήκη 3 όγκων ψυχρής αιθανόλης 100% και γρήγορη ανάδευση στο vortex.
3. Επώαση σε θερμοκρασία -80 °C για 30 λεπτά.
4. Φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία 4 °C σε 15.000 rpm για 5 λεπτά.
5. Απόρριψη υπερκειμένου και προσθήκη στο ίζημα, 200 μL ψυχρής αιθανόλης 70% (v/v).
6. Φυγοκέντρηση σε θερμοκρασία 4o C σε 15.000 rpm για 5 λεπτά.
7. Απόρριψη υπερκειμένου και θέρμανση του ιζήματος σε θερμοκρασία 45 °C μέχρι να εξατμιστεί όλη η αιθανόλη.
8. Επαναδιάλυση του ιζήματος σε 10 μL υπερκάθαρου νερού έγχυσης.

3.2.1 Μετασχηματισμός και καλλιέργεια κυττάρων κλωνοποίησης *E. coli* XL1-Blue

Ο μετασχηματισμός των δεκτικών κυττάρων *E. coli* XL1-Blue με το πλασμίδιο pET-28a-hAng-S28A έγινε με τη μέθοδο του θερμικού σοκ: σε 100 μ L κυττάρων προστέθηκαν 90 ng πλασμιδίου. Τα κύτταρα με το πλασμίδιο επωάστηκαν για 30 λεπτά σε πάγο, στη συνέχεια για 45 δευτερόλεπτα στο υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 42 °C και ξανά σε πάγο για 2 ακόμη λεπτά. Τέλος, προστέθηκαν 900 μ L εμπλουτισμένο θρεπτικό μέσο S.O.C και ακολούθησε επώαση για 1 ώρα σε θερμοκρασία 37 °C υπό ανάδευση σε 210 rpm. Μετά την επώαση επιστρώθηκαν καλλιέργειες βακτηρίων σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό μέσο LB- Άγαρ το οποίο περιείχε το αντιβιοτικό καναμυκίνη σε τελική συγκέντρωση 20 μ g/mL και ακολούθησε επώαση για 17 ώρες σε θερμοκρασία 37 °C. Συνολικά επιστρώθηκαν τρυβλία: δύο με 50 μ L βακτηρίων και δύο με 150 μ L βακτηρίων. Από κάθε τρυβλίο επιλέχθηκε μία αποικία και η κάθε μια ξεχωριστά εμβολιάστηκε σε 5 mL υγρού θρεπτικού μέσου LB-Broth που περιείχε αντιβιοτικό καναμυκίνη τελικής συγκέντρωσης 20 μ g/mL και επωάστηκαν για 16 – 18 ώρες σε θερμοκρασία 37 °C, υπό ανάδευση 210 rpm. Ακολούθησε η απομόνωση του πλασμιδιακού DNA για κάθε μία από τις υγρές βακτηριακές καλλιέργειες με χρήση του PureLink™ QuickPlasmid Miniprep Kit, το οποίο χρησιμοποιεί στήλη με σφαιρίδια σιλικόνης που δεσμεύουν το DNA. Ο έλεγχος της επιτυχίας της μεταλλαξιγένεσης έγινε με αλληλούχηση του πλασμιδίου.

3.3 Υπερέκφραση της ανθρώπινης αγγειογενίνης

3.3.1 Μετασχηματισμός κυττάρων υπερέκφρασης *E. coli* BL21-Gold και υπερέκφραση της αγγειογενίνης

Η υπερέκφραση της μεταλλαγμένης αγγειογενίνης έγινε με βάση το πρωτόκολλο του Holloway D.E. και των συνεργατών του⁷¹. Το πλασμίδιο pET-28a hAng-S28A εισήχθη σε δεκτικά κύτταρα *E. coli* BL21-Gold με τη μέθοδο θερμικού σοκ. Για κάθε υγρή καλλιέργεια έγινε επιλογή μίας μοναδιαίας στικτής αποικίας από το τρυβλίο και εμβολιάστηκε σε σωληνάριο τύπου falcon με υγρό θρεπτικό μέσο LB-Broth 5-15 mL, στο οποίο είχε προστεθεί καναμυκίνη σε τελική συγκέντρωση 50 μ g/mL και επωάστηκε για 16 ώρες σε θερμοκρασία 37 °C υπό ανάδευση (210 rpm). Μετά το πέρας της επώασης και εφόσον είχαν αναπτυχθεί τα κύτταρα, ακολούθησε ανακαλλιέργεια σε μεγαλύτερη κλίμακα. Πιο συγκεκριμένα 0,5 L αποστειρωμένου θρεπτικού μέσου TB Broth, στο οποίο είχε προστεθεί καναμυκίνη με τελική

συγκέντρωση 50 µg/mL, εμβολιάστηκε με 1/100 από μία υγρή καλλιέργεια και επώαστηκαν σε θερμοκρασία 37 °C υπό ανάδευση (210 rpm), ώσπου η οπτική απορρόφηση της οπτικής πυκνότητας να είναι OD_{600nm} = 0,6 - 0,8 όπου και θεωρείται ότι η καλλιέργεια βρίσκεται στην εκθετική φάση ανάπτυξης. Ακολούθησε η προσθήκη IPTG (επαγωγέας υπερέκφρασης του γονιδίου του πλασμιδίου) σε τελική συγκέντρωση 1 mM και επώαση σε θερμοκρασία 37 °C υπό ανάδευση (210 rpm) για δύο επιπλέον ώρες. Τέλος, πραγματοποιήθηκε η συλλογή των κυττάρων έπειτα από φυγοκέντρηση σε 5000 g, σε θερμοκρασία 4 °C, για 45 λεπτά.

3.4 Απομόνωση και καθαρισμός της μεταλλαγμένης αγγειογενίνης

Η μέθοδος που ακολουθήθηκε για την απομόνωση και τον καθαρισμό της μεταλλαγμένης αγγειογενίνης βασίστηκε στο πρωτόκολλο του Holloway D.E και των συνεργατών του (Holloway, Hares, Shapiro, Subramanian, & Acharya, 2001). Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε ως εξής:

1. Λύση του ιζήματος από 500 mL βακτηριακής καλλιέργειας

- Επαναδιάλυση του ιζήματος των κυττάρων σε 25 mL διαλύματος λύσης.
- Περαιτέρω σπάσιμο των κυττάρων με χρήση υπερήχων για 5 κύκλους των 40 δευτερολέπτων.
- Φυγοκέντρηση για 20 λεπτά σε 20.000 g και σε θερμοκρασία 4°C.- Απόρριψη του υπερκειμένου.
- Επανάληψη της παραπάνω διαδικασίας άλλες δυο φορές, με τη δεύτερη φορά να γίνεται προσθήκη Triton X-100 στο διάλυμα λύσης, σε τελική συγκέντρωση 1 % (v/v).

Οι παραπάνω διεργασίες εκτελέστηκαν σε θερμοκρασία 4 °C.

2. Διάσπαση σωματίων εγκλεισμού

Τα σωματία εγκλεισμού (inclusion bodies) είναι δομές που σχηματίζουν οι αδιάλυτες πρωτεΐνες στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων. Ο σχηματισμός των σωματίων εγκλεισμού μπορεί να είναι αποτέλεσμα υπερπαραγωγής μιας πρωτεΐνης σε ένα βακτηριακό σύστημα υπερέκφρασης. Μετά την τελευταία φυγοκέντρηση, το ίζημα στο οποίο υπάρχουν τα σωματία εγκλεισμού επαναδιαλύθηκε σε 15 mL διάλυμα επαναδιάταξης και με τη χρήση ομογενοποιητή υφίσταται μηχανική πίεση, ώστε να σπάσουν τα σωματία εγκλεισμού. Μετά την ομογενοποίηση το διάλυμα ανακινήθηκε για δυο ώρες σε θερμοκρασία δωματίου με χρήση του μηχανήματος StuartTube Rotator.

3. Αναδίπλωση της αποδιατεταγμένης πρωτεΐνης

Το δείγμα προστίθεται σταγόνα – σταγόνα με προσοχή σε 500 mL διαλύματος αναδίπλωσης και αναδεύεται πολύ αργά σε θερμοκρασία δωματίου για 24 ώρες. Μετά το πέρας 24 ωρών, φυγοκεντρήθηκε σε 10.000 g, σε θερμοκρασία 25 °C, για 30 λεπτά και το υπερκείμενο αραιώθηκε τρεις φορές σε απαερωμένο ύδωρ.

4. Χρωματογραφικός καθαρισμός της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης με χρήση του συστήματος FPLC

Ο καθαρισμός της αγγειογενίνης πραγματοποιήθηκε με τη χρήση δυο διαδοχικών χρωματογραφικών στηλών. Η πρώτη στήλη είναι μια κατιοανταλλακτική ρητίνη, η στήλη SP-Sepharose Fast Flow όγκου 20 mL. Η εξισορρόπηση της έγινε με 5 όγκους στήλης διαλύματος έκλουσης και στη συνέχεια με 5 όγκους στήλης διαλύματος εξισορρόπησης. Με την διέλευση του πρωτεϊνικού δείγματος από την στήλη, οι θετικά φορτισμένες πρωτεΐνες του δείγματος, συμπεριλαμβανομένου και της αγγειογενίνης, δεσμεύονται από τις ισχυρά αρνητικά φορτισμένες ομάδες της ρητίνης. Αφού πέρασε στη στήλη όλο το δείγμα, ακολούθησε έκπλυση της στήλης με 5 όγκους διαλύματος εξισορρόπησης έτσι ώστε να αποσυνδεθούν οι μη ειδικά συνδεδεμένες πρωτεΐνες από τη στήλη. Στη συνέχεια, ακολούθησε έκλυση των συνδεδεμένων στη στήλη πρωτεϊνών με 100% διάλυμα έκλουσης και συλλέχθηκαν κλάσματα όγκου 4 mL. Σύμφωνα με την τιμή απορρόφησης σε μήκος κύματος 280 nm συλλέγονται και ενώνονται τα κλάσματα που περιέχουν την πρωτεΐνη, έτσι ώστε να εφαρμοστούν στη δεύτερη στήλη. Η δεύτερη χρωματογραφική στήλη είναι μια στήλη αντίστροφης φάσης RPC 18 όγκου 3 mL, στην οποία η στατική φάση είναι πιο υδρόφοβη από την κινητή και δεσμεύει με μεγαλύτερη συγγένεια υδροφοβικά και λιγότερο πολικά μόρια. Τα προσδεδεμένα στη στήλη μόρια εκλύονται με μείωση της πολικότητας της κινητής φάσης μέσω αύξησης της συγκέντρωσης ενός οργανικού διαλύτη. Η εξισορρόπηση της στήλης γίνεται με 10 όγκους στήλης διαλύματος εξισορρόπησης και στη συνέχεια με 5 όγκους στήλης διαλύματος έκλουσης. Αφού πέρασε το δείγμα από τη στήλη, έγινε έκπλυση της στήλης με 25 % διαλύματος έκλουσης για 5 όγκους στήλης, ώστε να απομακρυνθούν οι μη ειδικά συνδεδεμένες πρωτεΐνες. Τέλος, ακολούθησε έκλυση της αγγειογενίνης με διαβάθμιση συγκέντρωσης από 25 % έως 45 % του διαλύματος έκλουσης για 16 λεπτά.

Διαπίδυση και συμπύκνωση της αγγειογενίνης

Τα κλάσματα που περιείχαν την πρωτεΐνη συλλέχθηκαν, ενώθηκαν και μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη διαπίδυσης 7.000 cut off σε υπερκάθαρο ύδωρ έγχυσης ώστε να απομακρυνθεί το διάλυμα έκλουσης στο οποίο βρίσκεται η πρωτεΐνη και να αντικατασταθεί με υπερκάθαρο νερό έγχυσης. Για το λόγο αυτό η μεμβράνη διαπίδυσης που περιέχει το πρωτεϊνικό διάλυμα μεταφέρθηκε σε 1L υπερκάθαρου νερού έγχυσης και αφέθηκε για 16 ώρες σε θερμοκρασία 4 °C υπό ανάδευση. Μετά το πέρας των 16 ωρών αντικαταστάθηκε το υπερκάθαρο νερό και η μεμβράνη επώαστηκε στις ίδιες συνθήκες για άλλες 3 ώρες. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε συμπύκνωση της πρωτεΐνης σε τελική συγκέντρωση 20 mg/mL με τη χρήση του συστήματος φυγοκεντρικής εξάτμισης υπό κενό. Τέλος, η πρωτεΐνη μοιράστηκε σε κλάσματα των 20 μL και αποθηκεύεται σε θερμοκρασία -80°C.

Η απόδοση του καθαρισμού της μεταλλαγμένης μορφής S28A είναι 5 mg/L.

3.5 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών

Μετά το τέλος της απομόνωσης και του χρωματογραφικού καθαρισμού της μεταλλαγμένης αγγειογενίνης, έγινε έλεγχος του κάθε σταδίου του καθαρισμού, αλλά και της τελικής καθαρότητας της απομονωμένης πρωτεΐνης με τη χρήση της τεχνικής της ηλεκτροφόρησης υπό αποδιατακτικές συνθήκες σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου.

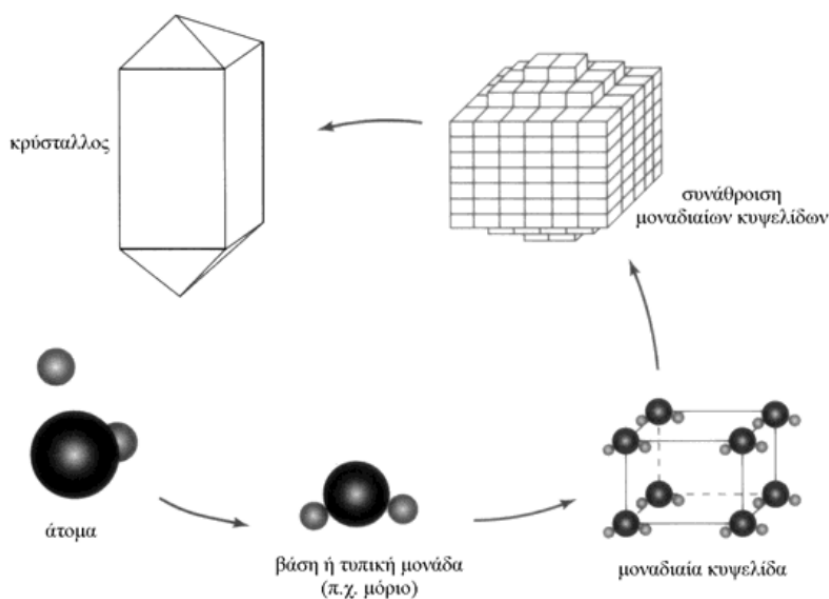
Η ηλεκτροφόρηση πηκτής ακρυλαμίδιου είναι μια αναλυτική μέθοδος διαχωρισμού των συστατικών ενός μίγματος πρωτεϊνών βάσει του μεγέθους τους. Η τεχνική αυτή βασίζεται στην αρχή πως ένα φορτισμένο μόριο θα μεταναστεύσει σε ένα ηλεκτρικό πεδίο. Η κοινή πορεία, από την κάθοδο προς την άνοδο, όλων των μορίων που περιέχονται σε κάθε δείγμα, εξασφαλίζεται με την προσθήκη του αποδιατακτικού παράγοντα SDS, ο οποίος θα καταργήσει τις ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μορίων φορτίζοντάς τα αρνητικά και προσδίδοντάς τους ένα σταθερό λόγο ανιονικού φορτίου προς μάζα, ώστε να μεταναστεύσουν όλα προς την άνοδο και να διαχωριστούν όχι βάσει του φορτίου τους, αλλά βάσει του μοριακού τους βάρους. Καθώς οι πρωτεΐνες ανάλογα με το μέγεθός τους εμφανίζουν αντίστοιχη αύξηση της τριβής κατά την κίνησή τους διαμέσου των πόρων της πηκτής, όσο μεγαλύτερο είναι το μοριακό βάρος μιας πρωτεΐνης, άρα και όσο μεγαλύτερο το μέγεθός της, τόσο μικρότερη είναι η κινητικότητα του μορίου αυτού στην πηκτή⁶⁵. Στις

περισσότερες περιπτώσεις η ηλεκτροφόρηση είναι ασυνεχής (discontinuous), επιτελείται δηλαδή σε δύο διαδοχικές πηκτές: μία πηκτή επιστοίβαξης (stacking gel) στην οποία τοποθετούνται τα δείγματα και μία πηκτή διαχωρισμού (separating gel) η οποία ακολουθεί ακριβώς κάτω από την πηκτή επιστοίβαξης. Σύμφωνα με το πρωτόκολλο ηλεκτροφορητικού διαχωρισμού του Laemmli, η πηκτή επιστοίβαξης δεν διαχωρίζει τις πρωτεΐνες αλλά μάλλον τις «συμπυκνώνει» σε μία μικρή ζώνη, γεγονός που εξασφαλίζει ότι οι πρωτεΐνες κάθε δείγματος θα φθάσουν ταυτόχρονα στην κυρίως πηκτή διαχωρισμού. Μετά την ολοκλήρωση του πολυμερισμού, η πηκτή στερεώνεται κατακόρυφα στην ειδική συσκευή ηλεκτροφόρησης και προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (running buffer) τόσο στο πάνω όσο και στο κάτω μέρος της συσκευής, σε άμεση επαφή με την πηκτή. Διαβιβάζεται ρεύμα σταθερής έντασης (γιατί χρειάζεται πολικότητα) με τη βοήθεια τροφοδοτικού, αντισταθμίζοντας τις αλλαγές που προκαλούνται από το γεγονός ότι η αντίσταση που προβάλλει το υλικό μέσα στο οποίο γίνεται η ηλεκτροφόρηση, μεταβάλλεται με το πέρασμα του χρόνου, κυρίως λόγω της αύξησης της θερμοκρασίας. Μετά την ηλεκτροφόρηση έγινε ανίχνευση των διαχωρισμένων πρωτεϊνών με χρώση της πηκτής με κυανό του Coomassie (Coomassie Brilliant Blue R-250) που γίνεται σε ελαφρώς όξινο περιβάλλον που ευνοεί τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στη χρωστική και τις αμινομάδες των πρωτεϊνών, ενώ σχηματίζονται και αλληλεπιδράσεις Van der Waals. Με τη μέθοδο αυτή ανιχνεύονται $\geq 0,1$ μg πρωτεΐνης.

3.6 Κρυσταλλογραφία

Κρύσταλλος είναι μία φάση της στερεάς κατάστασης που χαρακτηρίζεται από την επαναλαμβανόμενη διευθέτηση των ατόμων ή των μορίων που αποτελούν τον κρύσταλλο σε τρεις διαστάσεις. Ο κρύσταλλος δημιουργείται από την επανάληψη ενός βασικού μοτίβου που έχει το σχήμα παραλληλόγραμμου με πλευρές a , b , c και ονομάζεται στοιχειώδης κυψελίδα. Οι κυψελίδες που αποτελούν τον κρύσταλλο είναι πανομοιότυπες σε διαστάσεις και περιεχόμενο, έχουν τον ίδιο προσανατολισμό και επαναλαμβάνονται με απλή μετάθεση, δηλαδή χωρίς περιστροφή, στις τρεις διαστάσεις, ώστε να δημιουργούν ένα κανονικό τρισδιάστατο πλέγμα. Συνήθως, η κάθε κυψελίδα αποτελείται από δύο ή περισσότερα μόρια συνδεδεμένα με κάποιο είδος συμμετρικής διευθέτησης, έτσι ώστε να συμπληρώνουν το χώρο ικανοποιητικά. Οι αλληλεπιδράσεις που κρατούν τις πρωτεΐνες στο κρυσταλλικό πλέγμα ονομάζονται κρυσταλλικές επαφές και είναι ίδιες σε κάθε οργανωμένη βασική

μονάδα μορίων που περιέχεται στη στοιχειώδη κυψελίδα του κρυσταλλικού πλέγματος. Οι κρύσταλλοι αποτελούνται από τη στερεή φάση, δηλαδή τα σημεία επαφής των μακρομορίων που δημιουργεί το κρυσταλλικό πλέγμα και από την υγρή, που συμπληρώνει τα κενά μεταξύ του πλέγματος. Απαιτείται η μεγαλύτερη δυνατή καθαρότητα των πρωτεϊνών για τα πειράματα κρυστάλλωσης, καθώς η ανομοιογένεια λόγω βιοχημικών τροποποιήσεων (πρωτεόλυση, φωσφορυλίωση, γλυκοζυλίωση) ή άλλων παραγόντων οδηγεί τις πρωτεΐνες να μην κρυσταλλώνονται ή να κρυσταλλώνονται δύσκολα.



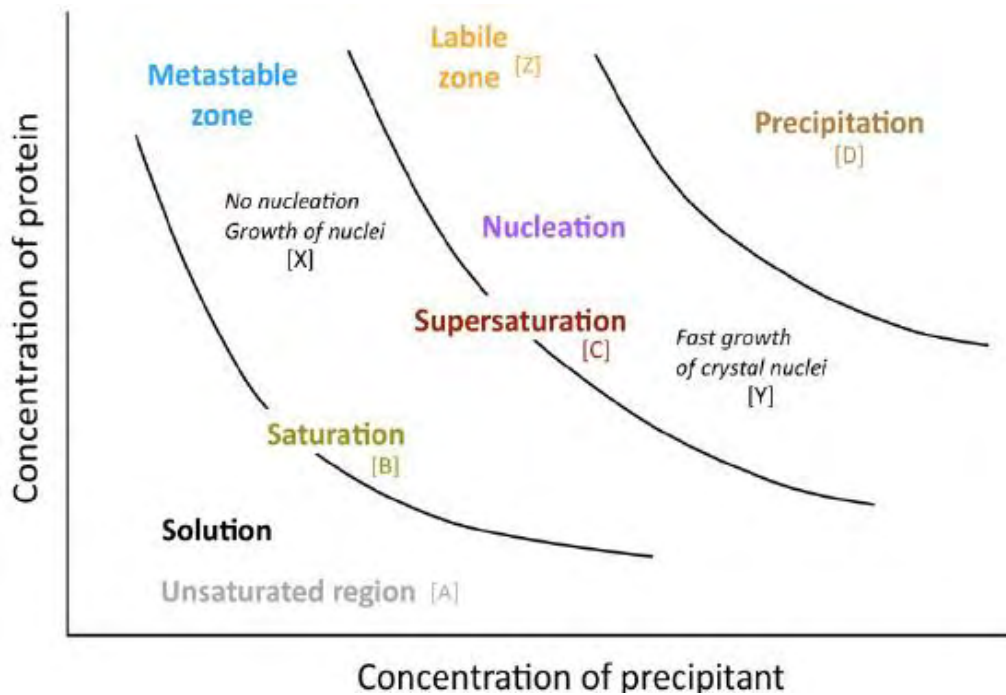
Εικόνα 3. Τα άτομα σχηματίζουν συγκροτήματα (βάσεις) που επαναλαμβάνονται περιοδικά οικοδομώντας τον κρύσταλλο. Η μοναδιαία κυψελίδα είναι το μικρότερο σχήμα που αποδίδει πλήρως τη συμμετρία της κρυσταλλικής δομής.

Για να επιτευχθεί η κρυστάλλωση είναι απαραίτητο να δημιουργηθεί κατάσταση υπερκορεσμού του πρωτεϊνικού μορίου σε ένα διάλυμα. Οι καταστάσεις υπό και υπερκορεσμού καθορίζονται από τη διαλυτότητα των μακρομορίων στα διαγράμματα διαλυτότητας, όπου παράμετροι όπως η ιοντική ισχύς, το pH, η θερμοκρασία, η φύση των διαλυτών παραμένουν σταθερές. Η καμπύλη διαλυτότητας ορίζει τις ζώνες υποκορεσμού και υπερκορεσμού και καθορίζει την κατάσταση εξισορρόπησης μεταξύ κορεσμένης πρωτεΐνης και κρυσταλλωμένης πρωτεΐνης στο διάλυμα. Κάτω από την καμπύλη κορεσμού η πρωτεΐνη δεν μπορεί να κρυσταλλωθεί. Όταν η συγκέντρωση της πρωτεΐνης είναι υψηλότερη από την συγκέντρωση εξισορρόπησης για δεδομένη συγκέντρωση ηλεκτρολύτη επέρχεται η κατάσταση υπερκορεσμού η οποία υποδιαιρείται σε τρεις ζώνες:

1. *Ζώνη κατακρήμνισης (precipitation zone)* : Η πρωτεΐνη μετατρέπεται σε άμορφη μάζα. Αυτό συμβαίνει όταν η κατάσταση υπερκορεσμού προσεγγίζεται με μεγάλη ταχύτητα με αποτέλεσμα τα πρωτεϊνικά μόρια να μην έχουν τον απαιτούμενο χρόνο να αλληλεπιδράσουν με τα γειτονικά τους και να διευθετηθούν κατάλληλα στο χώρο.

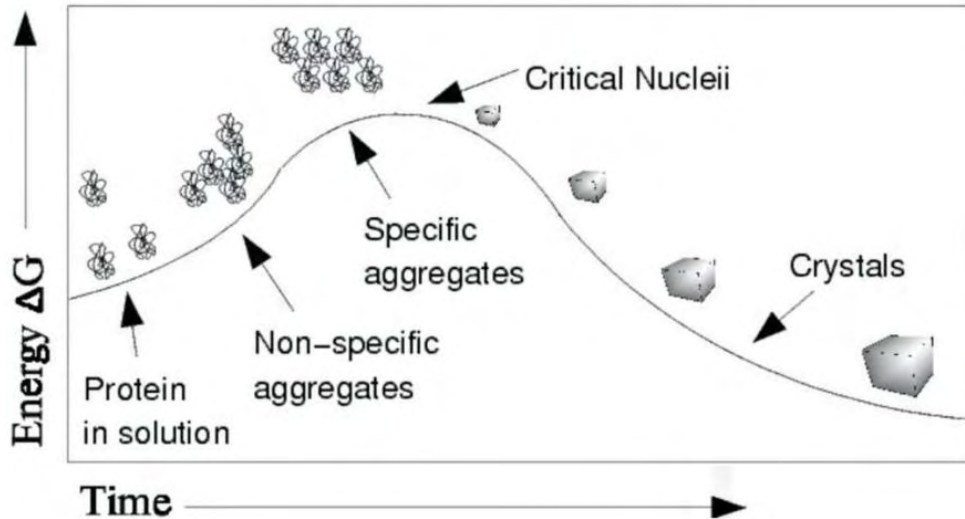
2. *Ζώνη πυρήνωσης (nucleation zone)* : Οι πιο μικρές οργανωμένες μορφές πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων που σχηματίζονται στην περιοχή όπου η περίσσεια της πρωτεΐνης παίρνει κρυσταλλική μορφή, ονομάζονται πυρήνες κρυστάλλωσης. Η δημιουργία των συσσωματωμάτων αυτών, μειώνει την ελεύθερη ενέργεια του συστήματος και η εύρεση της ζώνης πυρήνωσης αποτελεί πρωταρχικό σκοπό των πειραμάτων κρυστάλλωσης.

3. *Μετασταθερή ζώνη (metastable zone)* : Ένα υπέρκορο διάλυμα πρωτεΐνης μπορεί να μη δημιουργεί πυρήνες κρυστάλλωσης για μεγάλο χρονικό διάστημα, εκτός αν υποβοηθηθεί μηχανικά. Στη ζώνη αυτή οι πυρήνες μετασχηματίζονται σε κρυστάλλους. Μόνο στις περιπτώσεις που ένας ήδη σχηματισμένος πυρήνας βρεθεί στη μετασταθερή περιοχή, μπορεί να συνεχίσει να αναπτύσσεται. Για το λόγο αυτό, όπως φαίνεται και στο διάγραμμα διαλυτότητας, η διαδικασία περιλαμβάνει αρχικά τη μετάβαση από την υποκορεσμένη (ή κορεσμένη) περιοχή στην υπερκορεσμένη και στη συνέχεια πίσω στην κατάσταση ισορροπίας όπου και θα εμφανιστούν οι κρύσταλλοι. Καθώς το μέγεθος των κρυστάλλων αυξάνει, η συγκέντρωση της διαλυμένης πρωτεΐνης μειώνεται, με αποτέλεσμα η μετασταθερή ζώνη να μετατοπίζεται.



Εικόνα 4. Δισδιάστατο διάγραμμα διαλυτότητας σε σχέση με μια παράμετρο της συνθήκης κρυστάλλωσης. Η παράμετρος αυτή, στο συγκεκριμένο διάγραμμα, αποτελεί τη συγκέντρωση του κατακρημνιστικού παράγοντα του διαλύματος κρυστάλλωσης (οριζόντιος άξονας), ενώ στον κατακόρυφο άξονα αναπαριστάται η συγκέντρωση της πρωτεΐνης. Παρουσιάζονται οι τρεις ζώνες της υπερκορεσμένης περιοχής: μετασταθερή (metastable), πυρήνωσης (nucleation) και καθίζησης (precipitation). Η καμπύλη διαλυτότητας αναπαριστάται ως η γραμμή *saturation*⁶⁶.

Για την κρυσταλλογραφική μελέτη μίας πρωτεΐνης απαιτούνται κρύσταλλοι οι οποίοι να παράσχουν υψηλής ευκρίνειας δεδομένα περίθλασης ακτίνων-X. Για το λόγο αυτό θα πρέπει αρχικά να δημιουργηθούν πυρήνες κρυστάλλωσης και να αφεθούν στη μετασταθερή ζώνη για να μεγαλώσουν. Για να κρυσταλλωθεί η πρωτεΐνη δεν αρκεί μόνο να ευνοείται θερμοδυναμικά η αντίδραση, αλλά απαραίτητη προϋπόθεση αποτελεί να ξεπεραστεί και το ενεργειακό φράγμα **Εικόνα 5**. Η ενέργεια που απαιτείται για να δημιουργηθεί αυτή η ενεργειακά αναβαθμισμένη μεταβατική κατάσταση, μέσω της οποίας οδηγούμαστε στα προϊόντα, καλείται ενέργεια ενεργοποίησης και είναι αυτή που καθορίζει την κινητική της χημικής αντίδρασης.



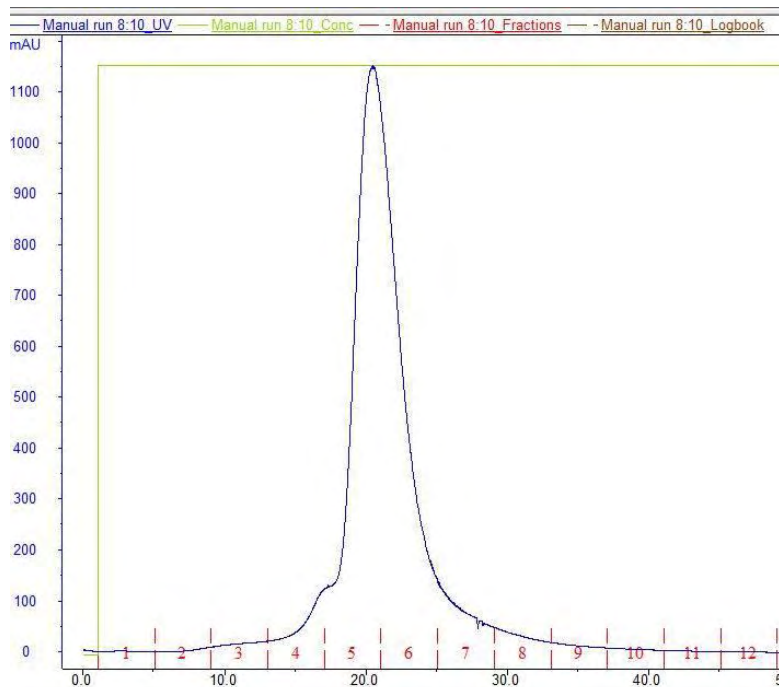
Εικόνα 5. Γραφική αναπαράσταση της ελεύθερης ενέργειας (ΔG) σε σχέση με το χρόνο κατά τη διάρκεια της διαδικασίας κρυστάλλωσης.

Το διάλυμα της πρωτεΐνης λοιπόν πρέπει να περάσει από τη διαλυτή φάση στη ζώνη πυρήνωσης και να παραμείνει εκεί για σύντομο χρονικό διάστημα έτσι ώστε να μη δημιουργηθούν πολλοί πυρήνες κρυστάλλωσης που οδηγούν σε πολλούς μικροσκοπικούς κρυστάλλους (η αύξηση του όγκου/ μεγέθους των κρυστάλλων σε διάλυμα με πολλούς πυρήνες, οδηγεί σε επικαλύψεις κρυσταλλικών πλεγμάτων, άρα σε κακοσχηματισμένους κρυστάλλους). Στη συνέχεια, όταν το πρωτεϊνικό διάλυμα μεταπέσει στην μετασταθερή ζώνη, οι πυρήνες θα συνεχίσουν να μεγαλώνουν και θα δώσουν καλοσχηματισμένους κρυστάλλους.

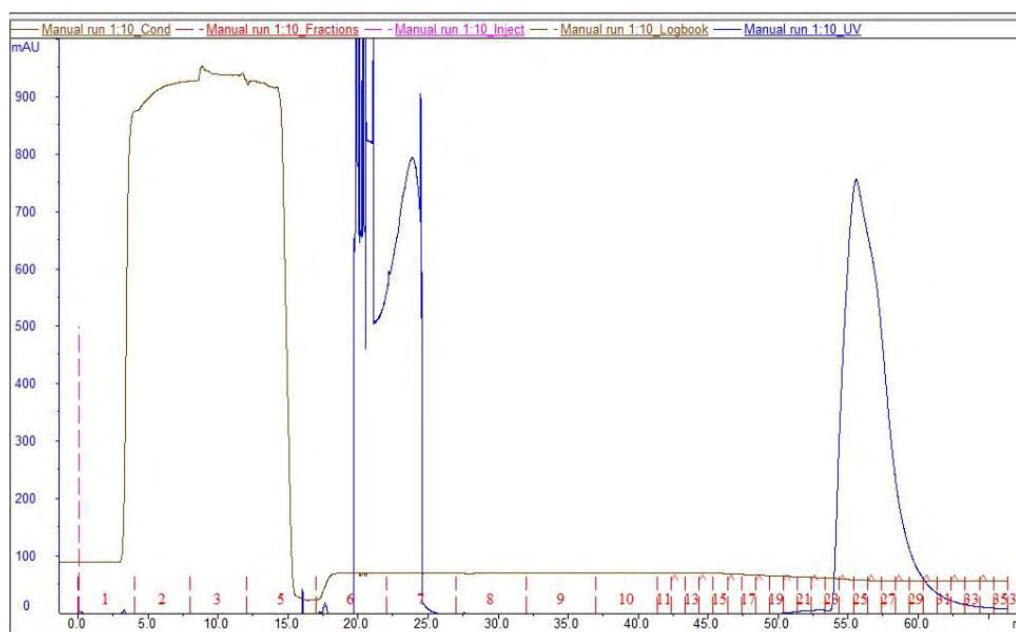
Στο πλαίσιο της διπλωματικής εργασίας, για την ανάπτυξη κρυστάλλων της μεταλλαγμένης αγγειογενίνης, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της καθήμενης σταγόνας. Στη μέθοδο αυτή αναμείχθηκαν ίσοι όγκοι πρωτεΐνης (πρωτεϊνικό διάλυμα συγκέντρωσης 20 mg/mL) και διαλύματος εξισορρόπησης (0.2% (w/v) νατραζίδιο, 20% (v/v) PEG-3350, 150 mM μηλεϊνικό οξύ, pH 7), 2 μ L από το κάθε ένα. Η σταγόνα (4 μ L) τοποθετήθηκε πάνω από το διάλυμα εξισορρόπησης όγκου 700 μ L, το σύστημα κλείστηκε αεροστεγώς και έμεινε να ισορροπήσει σε θερμοκρασία 16 °C.

4. Αποτελέσματα

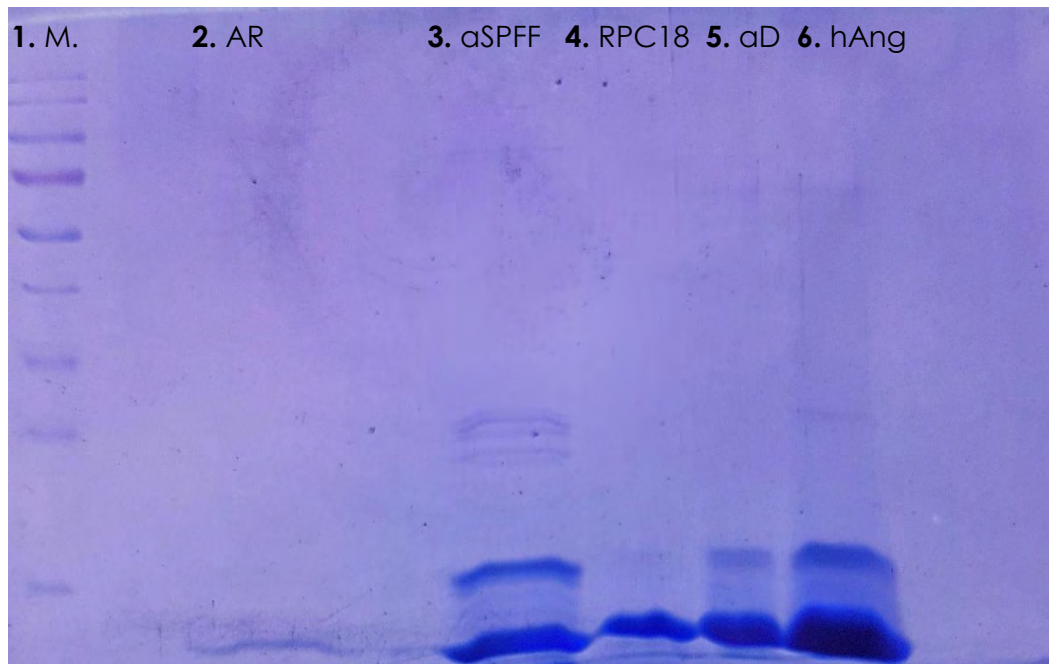
4.1 Αποτελέσματα χρωματογραφικού καθαρισμού της hAng S28A



Εικόνα 6. Κατιονανταλλακτική στήλη SPFF. Έκλυση της πρωτεΐνης με το διάλυμα έκλυσης (πράσινη γραμμή στο γράφημα). Με μπλε γραμμή απεικονίζεται η απορρόφηση σε μήκος κύματος 280 nm.

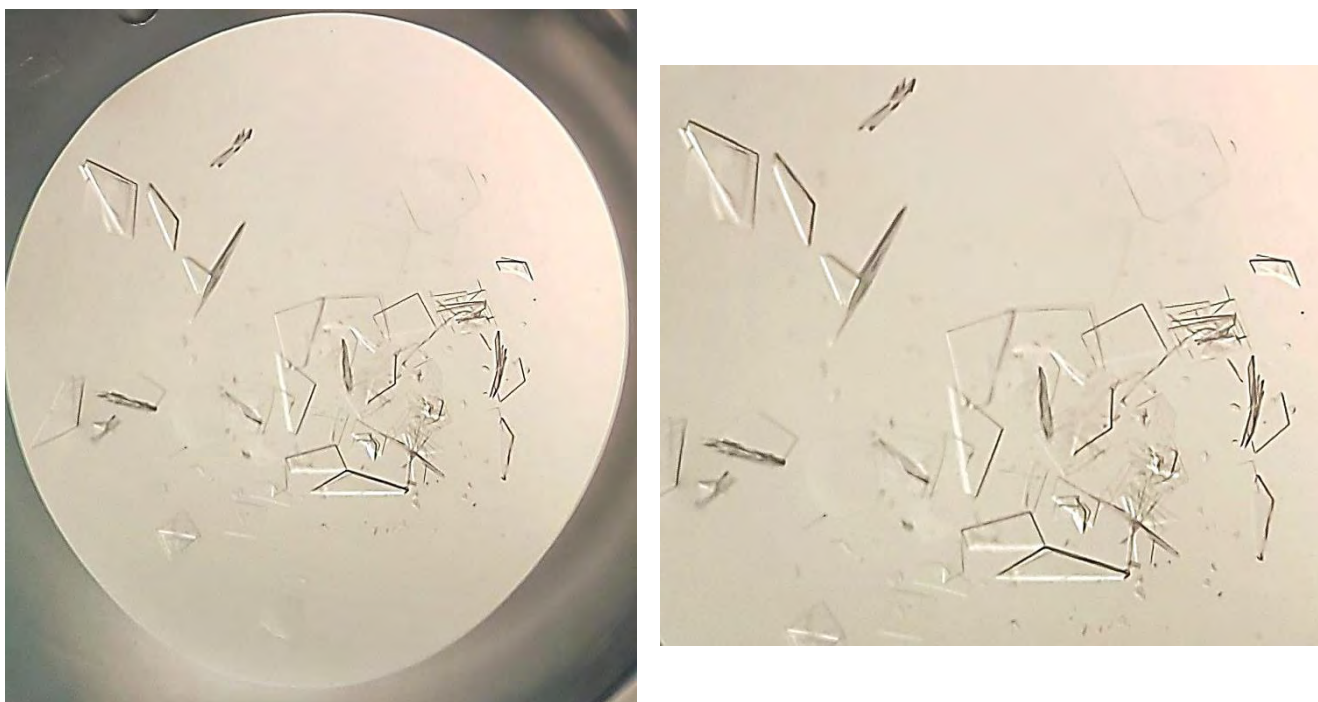


Εικόνα 7. Στήλη αντίστροφης φάσης Resource RPC. Έκλυση της πρωτεΐνης με διαβάθμιση συγκέντρωσης του διαλύματος B 25-45 % (πράσινη γραμμή στο γράφημα). Η πρωτεΐνη συλλέχθηκε στο 45 % του διαλύματος έκλυσης. Με μπλε γραμμή απεικονίζεται η απορρόφηση σε μήκος κύματος 280 nm.



Εικόνα 8. Πηκτή 12 % SDS πολυακρυλαμιδίου, χρώση με Coomassie brilliant blue R-250. Στη διαδρομή 1 (*ladder*) φαίνεται ο πρωτεϊνικός μάρτυρας με την τελευταία μπάντα να αντιστοιχεί στα 14 kDa. Στη διαδρομή 2 (*After Refolding*) φαίνεται το πρωτεϊνικό δείγμα (μεταλλαγμένη μορφή της hAng) μετά την διαδικασία αναδίπλωσης. Στη διαδρομή 3 (*After SPFF*) φαίνεται το πρωτεϊνικό διάλυμα μετά τη στήλη SPFF. Στη διαδρομή 4 (*After RPC18*) φαίνεται το πρωτεϊνικό διάλυμα μετά τη στήλη RPC18. Στη διαδρομή 5 (*After Dialysis*) φαίνεται το πρωτεϊνικό κλάσμα μετά τη διαπίδυση. Στην διαδρομή 6 φαίνεται το πρωτεϊνικό διάλυμα της φυσιολογικής μορφής της hAng S28A.

4.2 Αποτελέσματα κρυσταλλογραφίας



Εικόνα 9α,9β. Κρύσταλλοι της μεταλλαγμένης hAng-S28A.

5. Συζήτηση

Στην παρούσα διπλωματική εργασία διεξήχθη επιτυχής κλωνοποίηση ενός μεταλλάγματος της hAng όπου η σερίνη 28 αντικαταστάθηκε από αλανίνη. Η μεταλλαγμένη πρωτεΐνη εκφράστηκε σε βακτηριακά στελέχη *E. coli* σε έγκλειστα σωμάτια. Στη συνέχεια επιτεύχθηκε η αναδίπλωση της και απομονώθηκε με μεθόδους υγρής χρωματογραφίας. Το καθαρό μετάλλαγμα S28A της αγγειογενίνης, κρυστάλλωθηκε με χρήση της μεθόδου της διάχυσης ατμών και της τεχνικής της καθήμενης σταγόνας. Το μέγεθος των πρωτεϊνικών κρυστάλλων επιτρέπει την χρήση της κρυσταλλογραφίας ακτίνων X για τον προσδιορισμό της τρισδιάστατης δομής της μεταλλαγμένης πρωτεΐνης, hAng-S28A, και την ανάλυση των τυχόν δομικών μεταβολών που επιφέρει η μετάλλαξη.

6. Βιβλιογραφία

1. D'Alessio, G., DiDonato, A., Parente, A. & Piccoli, R. Seminal RNase - A unique member of the ribonuclease superfamily. *Trends Biochem. Sci.* **16**, 104-106 (1991).
2. Int J Mol Sci. 2016 Aug 5;17(8). pii: E1278. doi: 10.3390/ijms17081278. The Ribonuclease A Superfamily in Humans: Canonical RNases as the Buttress of Innate Immunity. Koczera P1,2, Martin L3, Marx G4, Schuerholz T5
3. Fett, J. W. *et al.* Isolation and characterization of angiogenin, an angiogenic protein from human carcinoma-cells. *Biochemistry* **24**, 5480-5486 (1985).
4. Weremowicz, S., Fox, E. A., Morton, C. C. & Vallee, B. L. Localization of the human angiogenin gene to chromosome band 14q11, proximal to the T cell receptor alpha/delta locus. *Am. J. Hum. Genet.* **47**, 973-981 (1990).
5. Blaser, J., Triebel, S., Kopp, C. & Tschesche, H. A highly sensitive immunoenzymometric assay for the determination of angiogenin. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* **31**, 513-516 (1993).
6. Weiner, H. L., Weiner, L. H. & Swain, J. L. Tissue distribution and developmental expression of the messenger RNA encoding angiogenin. *Science* **237**, 280-282 (1987).
7. Strydom, D. J. *et al.* Amino-acid sequence of human-tumor derived angiogenin. *Biochemistry* **24**, 5486-5494 (1985).
8. Kishimoto, K., Liu, S., Tsuji, T., Olson, K. A. & Hu, G. F. Endogenous angiogenin in endothelial cells is a general requirement for cell proliferation and angiogenesis. *Oncogene* **24**, 445-456, doi:10.1038/sj.onc.1208223 (2005).
9. Sheng, J. & Xu, Z. Three decades of research on angiogenin: a review and perspective. *Acta biochimica et biophysica Sinica* **48**, 399-410, doi:10.1093/abbs/gmv131 (2016).
10. Acharya KR, Bradshaw WJ, Lee RL, Pham TT, Rehman S, Subramanian V, Thiyagarajan N. Structural insights into human angiogenin variants implicated in Parkinson's disease and Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Sci Rep.* Feb 8;7:41996. doi: 10.1038/srep41996. (2017).
11. Lee, F. S., Shapiro, R., & Vallee, B. L. (1989). Tight-binding inhibition of angiogenin and ribonuclease A by placental ribonuclease inhibitor. *Biochemistry*, **28**(1), 225-230.
12. Kishimoto, K., Liu, S., Tsuji, T., Olson, K. A. & Hu, G. F. Endogenous angiogenin in endothelial cells is a general requirement for cell proliferation and angiogenesis. *Oncogene* **24**, 445-456, doi:10.1038/sj.onc.1208223 (2005).
13. Yamasaki, S., Ivanov, P., Hu, G. F. & Anderson, P. Angiogenin cleaves tRNA and promotes stress-induced translational repression. *J. Cell Biol.* **185**, 35-42, doi:10.1083/jcb.200811106 (2009).
14. Leonidas, D. D. *et al.* Refined crystal structures of native human angiogenin and two active site variants: implications for the unique functional properties of an enzyme involved in neovascularisation during tumor growth. *J. Mol. Biol.* **285**, 1209-1233 (1999).

15. Xu, Z. P., Tsuji, T., Riordan, J. F. & Hu, G. F. Identification and characterization of an angiogenin-binding DNA sequence that stimulates luciferase reporter gene expression. *Biochemistry* **42**, 121-128, doi:10.1021/bi020465x (2003).
16. Ivanov, P., Emara, M. M., Villen, J., Gygi, S. P. & Anderson, P. Angiogenin-induced tRNA fragments inhibit translation initiation. *Mol. Cell* **43**, 613-623, doi:10.1016/j.molcel.2011.06.022 (2011).
17. Sadagopan, S. *et al.* Angiogenin functionally interacts with p53 and regulates p53-mediated apoptosis and cell survival. *Oncogene* **31**, 4835-4847, doi:10.1038/onc.2011.648 (2012).
18. Sumpio, B. E., Riley, J. T. & Dardik, A. Cells in focus: endothelial cell. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **34**, 1508-1512 (2002).
19. Folkman, J. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nat Rev Drug Discov* **6**, 273-286, doi:nrd2115 [pii]10.1038/nrd2115 (2007).
20. Folkman, J. How Is Blood-Vessel Growth Regulated In Normal and Neoplastic Tissue Gha Clowes Memorial Award Lecture. *Cancer Res.* **46**, 467-473 (1986).
21. Folkman, J., Watson, K., Ingber, D. & Hanahan, D. Induction Of Angiogenesis During the Transition From Hyperplasia to Neoplasia. *Nature* **339**, 58-61 (1989).
22. Folkman, J., Ingber, D. & Vlodavsky, I. The Role Of Angiogenesis In Tumor-Growth. *Invest. New Drugs* **5**, 103 (1987).
23. Pandya, N. M., Dhalla, N. S. & Santani, D. D. Angiogenesis--a new target for future therapy. *Vascular pharmacology* **44**, 265-274, doi:10.1016/j.vph.2006.01.005 (2006).
24. Bussolino, F., Mantovani, A. & Persico, G. Molecular mechanisms of blood vessel formation. *Trends Biochem. Sci.* **22**, 251-256 (1997).
25. Ferrara, N., Gerber, H. P. & LeCouter, J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat. Med.* **9**, 669-676, doi:10.1038/nm0603-669 (2003).
26. Risau, W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* **386**, 671-674, doi:10.1038/386671a0 (1997).
27. Weng, C. *et al.* miR-409-3p inhibits HT1080 cell proliferation, vascularization and metastasis by targeting angiogenin. *Cancer Lett.* **323**, 171-179, doi:S0304-3835(12)00258-3 [pii]
28. Shapiro, R. & Vallee, B. L. Human placental ribonuclease inhibitor abolishes both angiogenic and ribonucleolytic activities of angiogenin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**, 2238-2241 (1987).
29. Lee, F. S., Shapiro, R. & Vallee, B. L. Tight-binding inhibition of angiogenin and ribonuclease A by placental ribonuclease inhibitor. *Biochemistry* **28**, 225-230 (1989)
30. Chen, C. Z. & Shapiro, R. Site-specific mutagenesis reveals differences in the structural bases for tight binding of RNase inhibitor to angiogenin and RNase A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 1761-1766 (1997).
31. Pizzo, E. *et al.* Ribonuclease/angiogenin inhibitor 1 regulates stress-induced subcellular localization of angiogenin to control growth and survival. *J. Cell Sci.* **126**, 4308-4319, doi:10.1242/jcs.134551 (2013).

32. Giacomelli, C. *et al.* diamondCopper (II) ions modulate Angiogenin activity in human endothelial cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **60**, 185-196, doi:10.1016/j.biocel.2015.01.005 (2015).
33. Hoang, T. T., & Raines, R. T. (2017). Molecular basis for the autonomous promotion of cell proliferation by angiogenin. *Nucleic Acids Research*, **45**(2), 818-831. doi: 10.1093/nar/gkw1192
34. Hooper, L. V., Stappenbeck, T. S., Hong, C. V. & Gordon, J. I. Angiogenins: a new class of microbicidal proteins involved in innate immunity. *Nat Immunol* **4**, 269-273 (2003).
35. Tello-Montoliu, A., Patel, J. V. & Lip, G. Y. Angiogenin: a review of the pathophysiology and potential clinical applications. *J Thromb Haemost* **4**, 1864-1874, doi:10.1111/j.1538-7836.2006.01995.x (2006).
36. Wu, D. *et al.* Angiogenin loss-of-function mutations in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* **62**, 609-617, doi:10.1002/ana.21221 (2007).
37. Kolben, M. *et al.* Angiogenin plasma levels during pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **176**, 37-41 (1997).
38. Majumder, P. K. *et al.* Prostate intraepithelial neoplasia induced by prostate restricted Akt activation: the MPAKT model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 7841-7846, doi:10.1073/pnas.1232229100 (2003).
39. Montero, S., Guzman, C., CortesFunes, H. & Colomer, R. Angiogenin expression and prognosis in primary breast carcinoma. *Clin. Cancer Res.* **4**, 2161-2168 (1998).
40. Li, D. C., Bell, J., Brown, A. & Berry, C. L. The observation of angiogenin and basic fibroblast growth-factor gene-expression in human colonic adenocarcinomas, gastric adenocarcinomas, and hepatocellular carcinomas. *J. Pathol.* **172**, 171-175 (1994).
41. Chopra, V., Dinh, T. V. & Hannigan, E. V. Serum levels of interleukins, growth factors and angiogenin in patients with endometrial cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **123**, 167-172 (1997).
42. Barton, D. P. J. *et al.* Angiogenic protein expression in advanced epithelial ovarian cancer. *Clin. Cancer Res.* **3**, 1579-1586 (1997).
43. Wechsel, H. W. *et al.* Renal cell carcinoma: relevance of angiogenetic factors. *Anticancer Res.* **19**, 1537-1540 (1999).
44. Shimoyama, S. *et al.* Increased angiogenin expression in pancreatic cancer is related to cancer aggressiveness. *Cancer Res.* **56**, 2703-2706 (1996).
45. Miyake, H. *et al.* Increased angiogenin expression in the tumor tissue and serum of urothelial carcinoma patients is related to disease progression and recurrence. *Cancer* **86**, 316-324 (1999).
46. Chopra, V., Dinh, T. V. & Hannigan, E. V. Circulating serum levels of cytokines and angiogenic factors in patients with cervical cancer. *Cancer Investig.* **16**, 152-159 (1998).
47. Shimoyama, S. & Kaminishi, M. Increased angiogenin expression in gastric cancer correlated with cancer progression. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **126**, 468-474 (2000).

48. Verstovsek, S. *et al.* Significance of angiogenin plasma concentrations in patients with acute myeloid leukaemia and advanced myelodysplastic syndrome. *Br. J. Haematol.* **114**, 290-295 (2001).
49. Eberle, K. *et al.* The expression of angiogenin in tissue samples of different brain tumours and cultured glioma cells. *Anticancer Res.* **20**, 1679-1684 (2000).
50. Park, Y. W., Kim, S. M., Min, B. G., Park, I. W. & Lee, S. K. Lymphangioma involving the mandible: immunohistochemical expressions for the lymphatic proliferation. *J. Oral Pathol. Med.* **31**, 280-283 (2002).
51. Hartmann, A. *et al.* Hypoxia-induced up-regulation of angiogenin in human malignant melanoma. *Cancer Res.* **59**, 1578-1583 (1999).
52. Skoldenberg, E. G. *et al.* Angiogenesis and angiogenic growth factors in Wilms tumor. *J. Urol.* **165**, 2274-2279 (2001).
53. Musolino, C. *et al.* Levels of soluble angiogenin in chronic myeloid malignancies: clinical implications. *Eur. J. Haematol.* **72**, 416-419, doi:10.1111/j.1600-0609.2004.00253.x (2004).
54. Alexandrakis, M. G. *et al.* Elevated serum angiogenin in multiple myeloma. *The hematology journal : the official journal of the European Haematology Association / EHA* **4**, 454-455, doi:10.1038/sj.thj.6200331 (2003).
55. Gao, X., Hu, H., Zhu, J. & Xu, Z. Identification and characterization of follistatin as a novel angiogenin-binding protein. *FEBS Lett.* **581**, 5505-5510, doi:10.1016/j.febslet.2007.10.059 (2007).
56. Aguirre Palma, L. M., Gehrke, I. & Kreuzer, K. A. Angiogenic factors in chronic lymphocytic leukaemia (CLL): Where do we stand? *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **93**, 225-236, doi:10.1016/j.critrevonc.2014.10.007 (2015).
57. Kim, Y. N. & Kim do, H. Decreased serum angiogenin level in Alzheimer's disease. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* **38**, 116-120, doi:10.1016/j.pnpbp.2012.02.010 (2012).
58. Kishikawa, H., Wu, D. & Hu, G. F. Targeting angiogenin in therapy of amyotrophic lateral sclerosis. *Expert opinion on therapeutic targets* **12**, 1229-1242, doi:10.1517/14728222.12.10.1229 (2008).
59. McLaughlin, R. L. *et al.* Angiogenin levels and ANG genotypes: dysregulation in amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One* **5**, e15402, doi:10.1371/journal.pone.0015402 (2010).
60. Kieran, D. *et al.* Control of motoneuron survival by angiogenin. *J. Neurosci.* **28**, 14056-14061, doi:10.1523/JNEUROSCI.3399-08.2008 (2008).
61. Sebastia, J. *et al.* Angiogenin protects motoneurons against hypoxic injury. *Cell Death Differ.* **16**, 1238-1247, doi:10.1038/cdd.2009.52 (2009).
62. Subramanian, V., Crabtree, B. & Acharya, K. R. Human angiogenin is a neuroprotective factor and amyotrophic lateral sclerosis associated angiogenin variants affect neurite extension/pathfinding and survival of motor neurons. *Hum. Mol. Genet.* **17**, 130-149, doi:10.1093/hmg/ddm290 (2008).

63. Li, S. & Hu, G. F. Angiogenin-mediated rRNA transcription in cancer and neurodegeneration. *International journal of biochemistry and molecular biology* **1**, 26-35 (2010).
64. Gao, X. & Xu, Z. Mechanisms of action of angiogenin. *Acta biochimica et biophysica Sinica* **40**, 619-624 (2008).
65. Stryer, L., Berg, J. M. & Tymoczko, J. L. Biochemistry. 5th edn, (W.H. Freeman, 2002).
66. Ducruix, A. & Giegé, R. *Crystallization of nucleic acids and proteins: a practical approach*. 2nd edn, (Oxford University Press, 1999).
67. St. Clair, D. K., Rybak, S. M., Riordan, J. F., and Vallee, B. L. (1988). Angiogenin abolishes cell free protein synthesis by specific ribonucleolytic inactivation of 40S ribosomes. *Biochemistry* **27**.
68. Leonidas, D. D., Shapiro, R., Subbarao, G. V., Russo, A. & Acharya, K. R. Crystallographic studies on the role of the C-terminal segment of human Angiogenin in defining enzymatic potency. *Biochemistry* **41**, 2552-2562 (2002).
69. Pizzo, E. *et al.* Ribonuclease/angiogenin inhibitor 1 regulates stress-induced subcellular localization of angiogenin to control growth and survival. *J. Cell Sci.* **126**, 4308-4319, doi:10.1242/jcs.134551 (2013).
70. Russo, N., Nobile, V., DiDonato, A., Riordan, J. F. & Vallee, B. L. The C-terminal region of human angiogenin has a dual role in enzymatic activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 3243-3247 (1996).
71. Holloway, D. E., Hares, M. C., Shapiro, R., Subramanian, V. & Acharya, K. R. High-level expression of three members of the murine angiogenin family in *Escherichia coli* and purification of the recombinant proteins. *Protein Expr. Purif.* **22**, 307-317, doi:10.1006/prev.2001.1434