



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



***Βιοχημική μελέτη της επίδρασης της αγγειογενίνης (hAng) στις
κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες κυττάρων HEK293T***



***Biochemical study of the effects of human angiogenin (hAng) on the
cytoplasmic proteins of HEK293T cells***

Μυρτώ Εμμ. Βρέντζου

Λάρισα, 2021

Τριμελής συμβουλευτική επιτροπή

Δρ. Μαρία Κοντού, επίκουρος καθηγήτρια Πρωτεϊνικής Χημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Δρ. Λεωνίδας Δημήτριος, καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Δρ. Μπαλατσός Νικόλαος, επίκουρος καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ευχαριστίες

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας με επιβλέπουσα την επίκουρο καθηγήτρια, κα. Κοντού Μαρία, το διάστημα μεταξύ Δεκεμβρίου 2019 και Νοεμβρίου 2020.

Παρ' όλο που, στο σύνολό της, κατέληξε να μοιάζει περισσότερο με μια συλλογή συμβουλών προς ναυτιλομένους, έναν οδηγό από «στραβοτιμονιές» προς μελέτη και αποφυγή (σαφώς, η εμφάνιση μιας πανδημίας δεν κάνει τα πράγματα καθόλου εύκολα), μόνο ευγνωμοσύνη και υπερηφάνεια μπορώ να νιώσω για την εργασία αυτή, καθώς τα πράγματα που έμαθα εκπονώντας την είναι ανεκτίμητης αξίας. Χάρη στο project αυτό, και τους ανθρώπους που το στήριξαν, είχα την τιμή να γίνω κι εγώ ένα μικρό γρανάζι στη θαυμαστή μηχανή που λέγεται Ερευνητικό Εργαστήριο.

Ευχαριστώ από καρδιάς την Δρ^α. Κοντού Μαρία, που με προθυμία με ενέταξε στην ομάδα της και μου ανέθεσε το δύσκολο αυτό θέμα, χωρίς στιγμή να μου αρνηθεί την επικοινωνία και την καθοδήγησή της. Ευχαριστώ, επίσης, τον Δρ^α. Λεωνίδα Δημήτριο και τον Δρ^α. Μπαλατσό Νικόλαο, για τις πολύτιμες συμβουλές τους, τις υποδείξεις τους και το χρόνο που περάσαμε στα γραφεία τους, λύνοντας στρατηγικά κάθε πρόβλημα που προέκυπτε στην πορεία.

Το αποτέλεσμα αυτό δε θα ήταν σε καμία, *μα καμία* περίπτωση δυνατό χωρίς το άγρυπνο μάτι και το έμπειρο χέρι της υποψήφιας διδάκτορα, Όλγας Παπαϊωάννου, που έγινε φίλη και μέντορας καθ' όλη την πορεία της διπλωματικής αυτής. Γιατί η Κυρία, ξέρει...

Ευχαριστώ τη Χριστίνα Αλεξοπούλου, το «άλλο μισό» της εργασίας αυτής. Για τη γκρίνια, τις συζητήσεις, για τις στιγμές διαύγειας.

Ευχαριστώ, επίσης, τις υποψήφιες διδάκτορες Ραφαέλα Μπέτα και Ζωή Αρσενοπούλου, που πρόθυμα μοιράστηκαν συμβουλές για διάφορες τεχνικές και γνώσεις περί διαφόρων θεμάτων, και όλα τα μέλη του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας, που συνέβαλαν στη διαμόρφωση μιας δημιουργικής και ευχάριστης καθημερινότητας για το διάστημα που ήμουν εκεί.

Καθοριστική ήταν και η συμβολή της Δρ^{ος} Μαρτίνας Σαμιωτάκη, υπεύθυνης του τμήματος Πρωτεομικής του ΕΚΕΒΕ «Αλέξανδρος Φλέμινγκ», σε μία όμορφη και αποτελεσματική συνεργασία, έστω και από απόσταση.

Για το τέλος μένουν οι ευχαριστίες που, όπως και να διατυπωθούν, θα είναι λίγες. Αφού φτάσαμε, όμως, ως εδώ, ευχαριστώ τους φίλους και την οικογένειά μου. Για τη στήριξη, την αναπτέρωση του ηθικού στις δύσκολες στιγμές, τη δημιουργική πίεση, την αγάπη.

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	5
Abstract	5
1. Εισαγωγή	6
1.1. Ριβονουκλεάσες	6
1.2. Αγγειογένεση.....	8
1.3. Αγγειογένεση και ασθένειες	10
1.4.1. Δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά	12
1.4.2. Δομή του γονιδίου της αγγειογενίνης	15
1.4.3. Μηχανισμός κατάλυσης.....	16
1.4.4. Δράσεις της αγγειογενίνης.....	19
1.4.5. Αγγειογενίνη και ασθένειες	22
1.5. Μέθοδοι και τεχνολογίες πρωτεομικής.....	24
Σκοπός της εργασίας	27
Υλικά και μέθοδοι	28
Μεθοδολογία-Πρωτόκολλα	31
Αποτελέσματα.....	46
Συζήτηση	54
Βιβλιογραφία	56

Περίληψη

Η αγγειογενίνη (hAng, RNase 5) είναι μια ριβονουκλεάση ομόλογη με την RNase A. Παρουσιάζει ιδιαίτερα χαμηλή ριβονουκλεολυτική δράση, η οποία είναι ωστόσο απαραίτητη για τη συνολική λειτουργικότητά της. Η χαρακτηριστική της ιδιότητα είναι αυτή του ισχυρού αγγειογενετικού παράγοντα, που κατέχει ρόλους σε ποικίλες φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις. Από την κυτταρική ανάπτυξη και αύξηση, τη ρύθμιση της ανοσολογικής ανοχής, ως την ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών, αλλά και την ανάπτυξη και μετάσταση καρκινικών όγκων, η αγγειογενίνη αποτελεί ένα σημαντικό μόριο στον κυτταρικό κύκλο και την ομοιόσταση των ιστών. Παρά τις πολλαπλές λειτουργίες της και το ερευνητικό ενδιαφέρον που παρουσιάζει, πολλές από τις αλληλεπιδράσεις της παραμένουν άγνωστες. Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η διερεύνηση των αλληλεπιδράσεων της αγγειογενίνης με τις πρωτεΐνες του κυτταροπλάσματος με αξιοποίηση μεθόδων και τεχνικών πρωτεομικής.

Στο πλαίσιο της εργασίας αυτής, κύτταρα HEK 293T διαμολύνθηκαν με πλασμιδιακό φορέα που περιείχε το γονίδιο που κωδικοποιεί για την αγγειογενίνη σε συνδυασμό με το κατιονικό πολυμερές PEI. Τα δείγματα των κυττάρων υπέστησαν λύση και ηλεκτροφόρηση υπό αποδιατακτικές συνθήκες. Για την επιβεβαίωση της υπερέκφρασης, πραγματοποιήθηκε PCR πραγματικού χρόνου (qPCR), καθώς και στύπωμα κατά Western, για τη διερεύνηση της πρωτεϊνικής έκφρασης. Τα δείγματα υποβλήθηκαν, έπειτα, σε φασματομετρία μάζας (ESI-MS/MS) και πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση και οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων. Οι πρωτεΐνες που παρουσίασαν διαφορά στην έκφρασή τους αφορούσαν βιοσυνθετικά μονοπάτια δομικών στοιχείων των κυττάρων, παράγοντες ρύθμισης ογκογονιδίων και ρυθμιστές της διαμόρφωσης του κυτταροσκελετού. Η υπερέκφραση της αγγειογενίνης, ωστόσο, δεν ήταν δυνατό να ανιχνευτεί, επομένως και τα συμπεράσματα που προέκυψαν από την πρωτεομική ανάλυση δεν μπορούν να θεωρηθούν βιολογικά αξιόπιστα. Ως εκ τούτου, συνιστάται η επανάληψη ή/και τροποποίηση των πειραματικών πρωτοκόλλων, με σκοπό τη βελτιστοποίηση των συνθηκών διαμόλυνσης και ποσοτικοποίησης και τη λήψη στατιστικά σημαντικών και περαιτέρω αξιοποιήσιμων βιολογικών αποτελεσμάτων.

Abstract

Angiogenin (hAng, RNase 5) is a ribonuclease that is homologous to RNase A. It exhibits low ribonucleolytic activity, which is nonetheless indispensable for its total function. Its characteristic identity is that of a formidable angiogenetic factor that possesses roles in various physiological as well as pathological conditions. From cell development and growth, regulation of immune tolerance, to the activation of signaling pathways, but also the development and metastasis of cancer, angiogenin constitutes an important component of the cell cycle and tissue homeostasis. Despite its plentiful functions and the research interest it presents, many of the interactions of angiogenin remain unknown. The aim of this thesis project was to elucidate the interactions of angiogenin with the cytoplasmic proteins using classic proteomic methods.

For the needs of this project, HEK 293T cells were transfected with a plasmid vector containing the angiogenin gene, combined with the cationic polymer PEI. The cell samples were lysed and underwent SDS Polyacrylamide gel electrophoresis. To ascertain the overexpression of angiogenin, qPCR was used, along with Western blotting to detect protein expression. The samples were then subjected to tandem mass spectrometry and statistic analysis and visualization were performed. Proteins that exhibited differential expression included enzymes in cell component biosynthetic pathways, oncogene regulation factors, as well as effectors of cytoskeletal structure. However, overexpression of angiogenin was not detectable, rendering the results of the proteomic analysis inconclusive. It is thus suggested that the experiments be repeated and/or modified to perfect transfection and quantification conditions, so as to obtain meaningful biological results.

1. Εισαγωγή

1.1. Ριβονουκλεάσες

Ο γενετικός κώδικας, το σύνολο κανόνων που ακολουθούν οι ζωντανοί οργανισμοί για να εκφράσουν την πληροφορία που περιέχεται στο γενετικό τους υλικό (είτε αυτό είναι DNA, είτε mRNA) αποτελεί μια μορφή οικουμενικού «λεξικού», που αξιοποιείται από κάθε φυλογενετική οικογένεια οργανισμών για να διασφαλίσουν την έκφραση απαραίτητων δομικών και λειτουργικών μορίων (Shu, 2017).

Μια διαδικασία τόσο ζωτικής σημασίας είναι αναγκαίο να υπόκειται σε λεπτομερή και πολυεπίπεδη ρύθμιση. Για το λόγο αυτό, ομάδες ενζύμων με διαφορετικές λειτουργίες συμμετέχουν στην ομαλή εκτύλιξη της γονιδιακής έκφρασης, που περιλαμβάνει την αντιγραφή του DNA (στην οποία συμμετέχουν ένζυμα όπως DNA ελικάσες, πολυμεράσες, κ.ά.), η μεταγραφή του σε RNA (που καταλύεται από την RNA πολυμεράση) και η μετάφραση αυτού σε μία πεπτιδική αλυσίδα (που επιτυγχάνεται με τη συμβολή ριβοσωμάτων και μορίων μεταφορικού RNA) (Danino et al., 2015 & Bryan, 2019).

Ωστόσο, εξίσου σημαντική είναι και η άλλη πλευρά της διαδικασίας της γονιδιακής έκφρασης –η αποδόμηση και απομάκρυνση των προϊόντων που προκύπτουν από αυτήν, ή εκφράζονται έκτοπα ή υπέρμετρα λόγω παθολογικών καταστάσεων. Σε αυτή την ομάδα ενζύμων περιλαμβάνονται και οι ριβονουκλεάσες, ένζυμα κατάτμησης μορίων RNA που ευθύνονται μεταξύ άλλων για τον έλεγχο του αριθμού των μορίων RNA, την ωρίμανση του RNA, καθώς και τον χαρακτηριστικά μικρό χρόνο ζωής του. (Worrall & Luisi, 2007)

Η πιο ολοκληρωμένα χαρακτηρισμένη, και πιθανώς πιο γνωστή ριβονουκλεάση, είναι η Ριβονουκλεάση A (EC 3.1.26.2, ενδοριβονουκλεάση μοριακού βάρους 13.7 kDa), το βόειο ανάλογο της ανθρώπινης Ριβονουκλεάσης 1, και κατ' επέκταση τα μέλη της υπεροικογένειάς της, που μοιράζονται ορισμένα κοινά στοιχεία με αυτήν. Η υπεροικογένεια της Ριβονουκλεάσης A είναι γνωστή με το αρκτικόλεξο RISBASES (**R**ibonucleases with **S**pecial **B**iological **A**ctions). Πιο συγκεκριμένα, για τα μέλη της υπεροικογένειας των RISBASES ισχύουν:

- α. οι γονιδιακές αλληλουχίες που ευθύνονται για την έκφραση των RISBASES βρίσκονται στην πλειοψηφία τους σε ένα μοναδιαίο εξόνιο στο 14^ο χρωμόσωμα
- β. κάθε ώριμη RISBASE περιέχει έξι έως οκτώ κατάλοιπα κυστεΐνης, που σχηματίζουν δισουλφιδικούς δεσμούς σε κατάλληλες τοποθεσίες, που τους προσδίδουν μοναδική τριτοταγή δομή

γ. στο μηχανισμό κατάλυσης των ενζύμων αυτών συμμετέχουν δύο ιστιδίνες (H) και μία λυσίνη (K), που αποτελούν τμήματα ενός υψηλά συντηρημένου μοτίβου καταλοίπων (CKXXNTF), και

δ. εμφανίζουν εξειδικευμένη εκλεκτικότητα στη νουκλεοτιδική αλληλουχία των προς υδρόλυση μορίων RNA, ανεξαρτήτως των θέσεων στις οποίες αυτά εν τέλει θα υδρολυθούν. (Rosenberg, 2008)

Η υπεροικογένεια των RISBASES περιλαμβάνει τις: νευροτοξίνη των ηωσινοφίλων (EDN, ριβονουκλεάση 2), κατιονική πρωτεΐνη των ηωσινοφίλων (ECP, ριβονουκλεάση 3), αγγειογενίνη (ANG, ριβονουκλεάση 5) και ορισμένες κυτταροτοξίνες.

Ακριβώς λόγω των υδρολυτικών τους ιδιοτήτων, της συχνά κατιονικής τους φόρτισης καθώς και της καίριας θέσης που κατέχουν στην πορεία και διακοπή του κυτταρικού κύκλου, οι ριβονουκλεάσες μπορούν, υπό προϋποθέσεις, να θεωρηθούν τοξίνες, με τις δράσεις τους να κυμαίνονται από βακτηριοτοξικότητα και ελμινθοτοξικότητα, έως και κυτταροτοξικότητα (Sorrentino, 1992, Rosenberg, 2008). Η αντιμετώπιση αυτή κάνει τη μελέτη τους αρκετά ενδιαφέρουσα, αλλά και αισθητά δυσκολότερη, λόγω της πιθανής εξώθησης ή εξουδετέρωσης εξωγενώς προστιθέμενων ριβονουκλεασών σε κυτταρικά μοντέλα κατά την κινητοποίηση προϋπαρχόντων αμυντικών μηχανισμών.

Οι δράσεις των RISBASES δεν περιορίζονται μόνο εκεί, καθώς η ριβονουκλεολυτική τους ικανότητα τους προσδίδει ένα εύρος ιδιοτήτων που εκτείνεται από νευροτοξικότητα και αγγειογενετικές δράσεις, έως και αντικαρκινική δράση.

Η αγγειογενίνη, πρωταγωνιστικό μόριο στην εργασία αυτή, αποτελεί έναν από τους πιο σημαντικούς παράγοντες στο σχηματισμό και την ανάπτυξη όγκων, καθώς δύναται να επάγει ισχυρά την αγγειογένεση και επίσης εμπλέκεται, μεταξύ άλλων, στη μετάσταση του καρκίνου.

1.2. Αγγειογένεση

Το αγγειακό σύστημα του ανθρώπου, και όχι μόνο, είναι ένα πολύπλοκο δίκτυο από φλέβες, αρτηρίες και τριχοειδή αγγεία που εξυπηρετούν την αιμάτωση ιστών, τη διασφάλιση της πρόσβασής τους σε οξυγόνο και θρεπτικά στοιχεία, καθώς και την απομάκρυνση άχρηστων συστατικών. Εξετάζοντας μία διατομή ενός αγγείου, μπορούν να παρατηρηθούν διαφορετικές στοιβάδες, όπως αυτή του συνδετικού ιστού, και οι πολλαπλές στρώσεις λείων μυϊκών κυττάρων. Το εσωτερικό τμήμα των αγγείων, ο αυλός, επενδύεται από μία λεπτή στοιβάδα ενδοθηλιακών κυττάρων μεσοδερμικής προέλευσης, το ενδοθήλιο, το οποίο με τη σειρά του διαχωρίζεται από τις υπόλοιπες στοιβάδες μέσω της βασικής μεμβράνης. Τα τριχοειδή αγγεία, που απαντώνται στις λεπτές διακλαδώσεις του αγγειακού συστήματος, αποτελούνται δε αποκλειστικά από ενδοθηλιακά κύτταρα, βασική μεμβράνη και μικρό αριθμό περικεντρικών κυττάρων (Mazurek et al., 2017).

Τα ενδοθηλιακά κύτταρα παρουσιάζουν ιδιαίτερο κλινικό και ερευνητικό ενδιαφέρον, καθώς διαθέτουν τη δυνατότητα να ελέγχουν τον αριθμό τους και τη διεύθεσή τους ώστε να γεφυρώνουν τυχόν χάσματα και να συμβάλλουν στην ανάπλαση του αγγειακού δικτύου. Ως εκ τούτου, είναι ζωτικής σημασίας για τη βιωσιμότητα των ιστών.

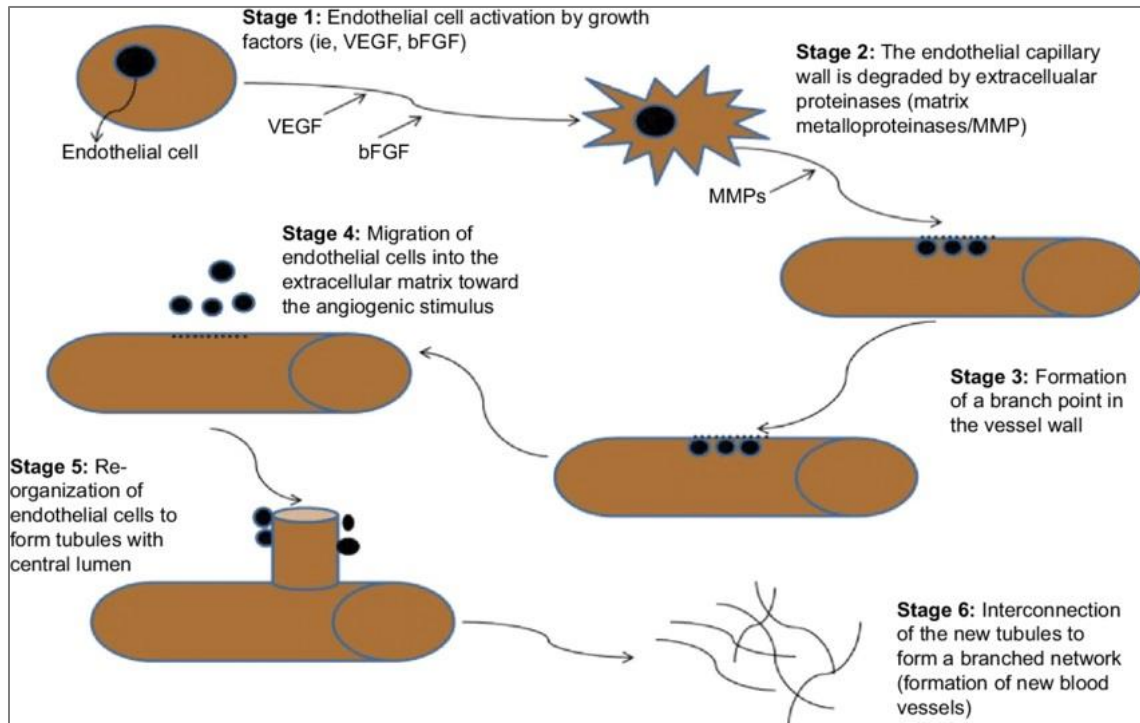
Η διαδικασία της αγγειογένεσης διακρίνεται σε δύο επιμέρους κατηγορίες (Poole & Coffin, 1989):

- Την *de novo* αγγειογένεση, ή νεοαγγειογένεση (vasculogenesis), κατά την οποία νέα αγγεία συγκροτούνται από ενδοθηλιακά κύτταρα που σχηματίζονται εκ του μηδενός και
- Την αγγειογένεση (angiogenesis, arteriogenesis), κατά την οποία τα νέα προκύπτοντα αγγεία αποτελούν προϊόντα «ανακύκλωσης» κυττάρων από προϋπάρχοντα αγγεία

και χωρίζεται στα εξής στάδια (Mthembu et al., 2017):

1. Ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων από σήματα έκκρισης αυξητικών παραγόντων (VEGF, bFGF)
2. Αποδόμηση της βασικής μεμβράνης από εξωκυτταρικές πρωτεΐνάσες (μεταλλοπρωτεΐνάσες της κυτταρικής μήτρας)
3. Σχηματισμός σημείων διακλάδωσης στα τοιχώματα των αγγείων
4. Μετανάστευση ενδοθηλιακών κυττάρων προς τον εξωκυττάριο χώρο, με κατεύθυνση το σήμα έναρξης της αγγειογένεσης

5. Αναδιοργάνωση των ενδοθηλιακών κυττάρων προς σχηματισμό σωληνοειδών δομών
6. Γεφύρωση των νεοσχηματισμένων αυλών με ώριμη βασική μεμβράνη και αποκατάσταση αγγειακού δικτύου (Senger & Davis, 2011)



Εικόνα 1: Σχηματική απεικόνιση των κύριων σταδίων της αγγειογένεσης (Senger & Davis, 2011)

Οι παράγοντες που συμβάλλουν στη ρύθμιση της διαδικασίας της αγγειογένεσης είναι ζεύγη αυξητικών παραγόντων και των υποδοχέων τους, κυρίως μέλη των οικογενειών των VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) και TNF (Tumor Necrosis Factor). Όπως και κάθε άλλη βιολογική διαδικασία υψηλών επιπέδων οργάνωσης, η αγγειογένεση υπάγεται και σε αρνητική ρύθμιση από πρωτεΐνες-καταστολείς, ή σηματοδοτικές πρωτεΐνες καταστολής. Μια τέτοια πρωτεΐνη είναι και ο παράγοντας p53, ο οποίος οδηγεί στην καταστολή του παράγοντα VEGF-A, επάγοντας παράλληλα την έκφραση μιας κατασταλτικής πρωτεΐνης (TSP-1, Thrombospondin 1), που ελέγχει τη δραστηριότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων (Bussolino et al., 1997). Άλλοι παράγοντες που μπορούν να συμμετάσχουν στη ρύθμιση της αγγειογένεσης είναι τα μικρά μη-κωδικοποιούντα RNA (miRNAs), η διαθεσιμότητα του οξυγόνου και της γλυκόζης στο αίμα σε μια δεδομένη στιγμή, οι χημειοκίνες, καθώς και μηχανικά σήματα, που κατέχουν ιδιαίτερη σημασία σε παθολογικές καταστάσεις.

1.3. Αγγειογένεση και ασθένειες

Τα κύτταρα των θηλαστικών απαιτούν πρόσβαση σε οξυγόνο και θρεπτικά στοιχεία για την επιβίωσή τους. Αυτό επιτυγχάνεται με τη διέλευση αγγείων από θέσεις που δεν απέχουν παραπάνω από 100 με 200 μm από τα κύτταρα τα οποία δέχονται την αιμάτωση (το οξυγόνο δεν μπορεί να διαχυθεί σε αποστάσεις μεγαλύτερες από αυτές). Για τη στήριξη του επιτυχούς κυτταρικού πολλαπλασιασμού και την αύξηση μεγέθους πάνω από τα όρια αυτά, απαιτούνται, επομένως, νέα αγγεία, που θα προκύψουν μέσω της αγγειογένεσης, όπως αυτή περιγράφηκε παραπάνω (Carmeliet & Jain, 2000).

Υπό φυσιολογικές συνθήκες, παρατηρείται έντονη αγγειογενετική δραστηριότητα κυρίως κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ζωής και εντός του γυναικείου αναπαραγωγικού κύκλου. Η διαδικασία της αγγειογένεσης εξακολουθεί να συμβάλλει στην ανάπτυξη και αύξηση των οργάνων ακόμα και μετά τη γέννηση, ωστόσο τα περισσότερα πλήρως σχηματισμένα αγγεία παραμένουν ως έχει καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα, παρόλα αυτά, διατηρούν τη δυνατότητά τους να πολλαπλασιάζονται ταχύτατα ως απόκριση σε εξωτερικά σήματα (π.χ. υποξία, φλεγμονή, μηχανική καταπόνηση). Η αγγειογένεση, επομένως, ενεργοποιείται ξανά κατά τη διάρκεια της διαδικασίας επούλωσης πληγών.

Σε πολλές περιπτώσεις η έκτοπη και έκρυθμη αγγειογένεση αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμα ποικίλων ασθενειών, καθώς τα σήματα ενεργοποίησής της υπερεκφράζονται. Έτσι, το ισοζύγιο επαγωγικών και ανασταλτικών σημάτων για την αγγειογένεση ανατρέπεται, ενεργοποιώντας κατ' αυτόν τον τρόπο μια μορφή αγγειογενετικού «διακόπτη». Αξίζει να σημειωθεί ότι παθολογική κατάσταση δεν αποτελεί μόνο η υπέρμετρη ενεργοποίηση του διακόπτη αυτού, αλλά και η ανεπαρκής κινητοποίηση της διαδικασίας. Ως αποτέλεσμα αυτής της ανεπαρκούς σηματοδότησης, τα ενδοθηλιακά κύτταρα υπολειπώνονται, προκύπτουν κακώς σχηματισμένα αγγεία, ή τα ήδη υπάρχοντα καταρρέουν. Στην ανεπαρκή αυτή σηματοδότηση οφείλονται παθήσεις όπως η ισχαιμική καρδιοπάθεια, η προεκλαμψία (Carmeliet, 2005), καθώς και ποικίλες νευροεκφυλιστικές διαταραχές, λόγω της διπλής (αγγειογενετικής και νευροτροφικής) ιδιότητας του VEGF (Lambrechts et al., 2004).

Παθοφυσιολογικές καταστάσεις όπως η αθηροσκλήρωση, η διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια, η ρευματοειδής αρθρίτιδα, αλλά και ποικίλες μορφές καρκίνου χαρακτηρίζονται από επίμονη και ανεπαρκούς ρύθμισης ενεργοποίηση του διακόπτη αγγειογένεσης (Fan et al., 1995). Πιο συγκεκριμένα, υποθέσεις ότι:

- Παρατηρούνται γεγονότα έντονης αγγειογένεσης στο άμεσο περιβάλλον όγκων (Goldman, 1907) και ότι

- Για την ανάπτυξη στερεών όγκων πάνω από 1 με 2 κυβικά χιλιοστά, καθώς και για τη μετέπειτα μετάστασή τους είναι απαραίτητη συμπληρωματική αγγειογένεση (Folkman, 1971)

έχουν διατυπωθεί –και αποδειχθεί- εδώ και δεκαετίες.

Κατά την ανάπτυξη ενός όγκου, όπου τα καρκινικά κύτταρα αδράττουν τον έλεγχο του κύκλου ζωής τους και πολλαπλασιάζονται ταχύτατα, οι συνθήκες άμεσης υποξίας και οι μεγάλες πιέσεις που αναπτύσσονται λόγω του μεγέθους του όγκου δημιουργούν τις προϋποθέσεις για την έκρυθμη ενεργοποίηση του διακόπτη αγγειογένεσης. . Δημιουργούνται έτσι νέες διακλαδώσεις σε προϋπάρχοντα αγγεία, στρατολογούνται ενδοθηλιακά και προγονικά ενδοθηλιακά κύτταρα που αποκολλώνται από αγγειακά τοιχώματα ή κινητοποιούνται εκ νέου από το μυελό των οστών, και εκφράζεται πληθώρα επαγωγικών και κατασταλτικών αγγειογενετικών παραγόντων από το μικροπεριβάλλον του όγκου. Καθώς ο οργανισμός καλείται, σε σχετικά μικρό χρονικό διάστημα, να κινητοποιήσει τη διαδικασία αγγειογένεσης υπό επείγουσες συνθήκες, τα νέα αγγεία που δημιουργούνται δεν είναι πάντα δομικά αkéραια και δεν παρουσιάζουν τις αναμενόμενες φυσιολογικές ιδιότητες. Τα νέα αγγεία μπορεί να μη διαθέτουν, για παράδειγμα, περιαγγειακά κύτταρα για τη διατήρηση της ομοιόστασής τους και την προστασία τους από αλλαγές των εξωτερικών συνθηκών (παροχή οξυγόνου, ορμονική και σηματοδοτική ισορροπία). Ακόμα, το ενδοθήλιό τους μπορεί να μην αποτελείται εξ' ολοκλήρου από ενδοθηλιακά κύτταρα. Δεν είναι ασυνήθιστο, το ενδοθήλιο ενός τέτοιου αγγείου να αποτελείται από συνδυασμό ενδοθηλιακών και καρκινικών κυττάρων, ή ακόμα και εξ' ολοκλήρου από καρκινικά κύτταρα (Benjamin et al., 1999).

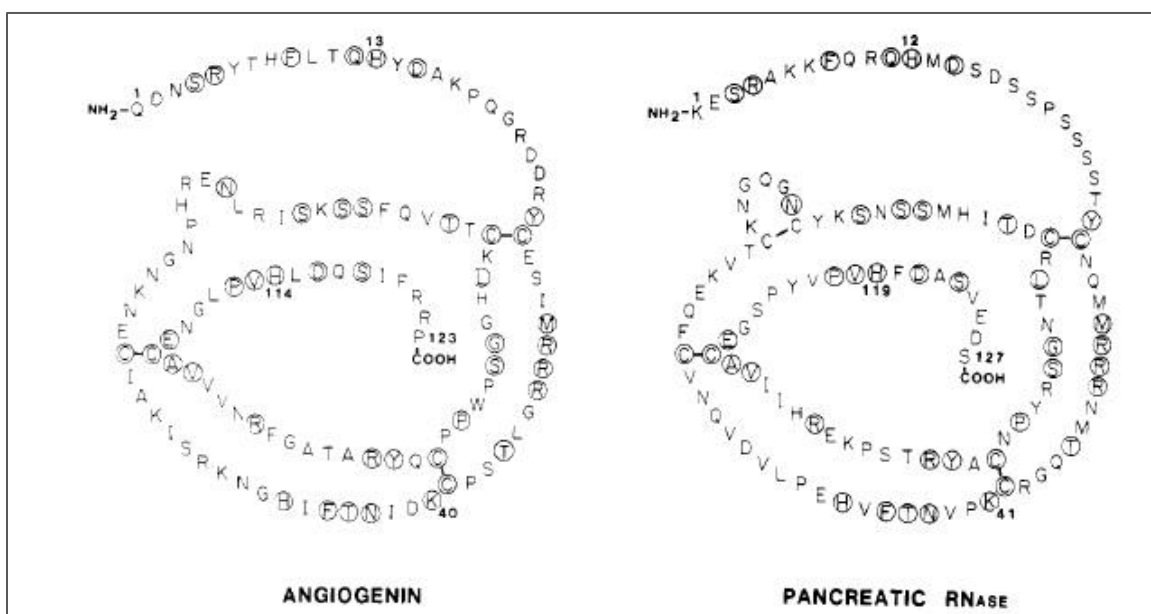
Ο σχηματιζόμενος όγκος, κατά την ανάπτυξή του, δέχεται εξωτερική σηματοδότηση, τόσο επαγωγική όσο και ανασταλτική. Ωστόσο, παράλληλα, εκκρινόμενες ουσίες και μόρια από τα ταχέως διαιρούμενα κύτταρα μπορούν να συμβάλλουν σε μία υποτυπώδη μορφή «αυτορρύθμισης» της ανάπτυξης του όγκου.

Ένα από αυτά τα εκκρινόμενα μόρια είναι και η ριβονουκλεάση 5, αλλιώς γνωστή ως αγγειογενίνη (Fett et al., 1985).

1.4. Αγγειογενίνη

1.4.1. Δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά

Η αγγειογενίνη (ριβονουκλεάση 5) είναι μία μονομερής πρωτεΐνη μοριακού βάρους περίπου 14.4 kDa και μήκους αλυσίδας 123 αμινοξέων που ανήκει στην υπερικογένεια της βόειας παγκρεατικής ριβονουκλεάσης A. Οι δύο ριβονουκλεάσες μοιράζονται την αμινοξική τους αλληλουχία κατά 33%, έχουν ομολογία που ανέρχεται στο 67% και διαθέτουν σε γενικές γραμμές τα ίδια καταλυτικά κατάλοιπα στο ενεργό τους κέντρο P1 (His-13, Lys-40 και His-114), που ευθύνονται για την υδρόλυση των φωσφοδιεστερικών δεσμών των ριβονουκλεϊκών οξέων.

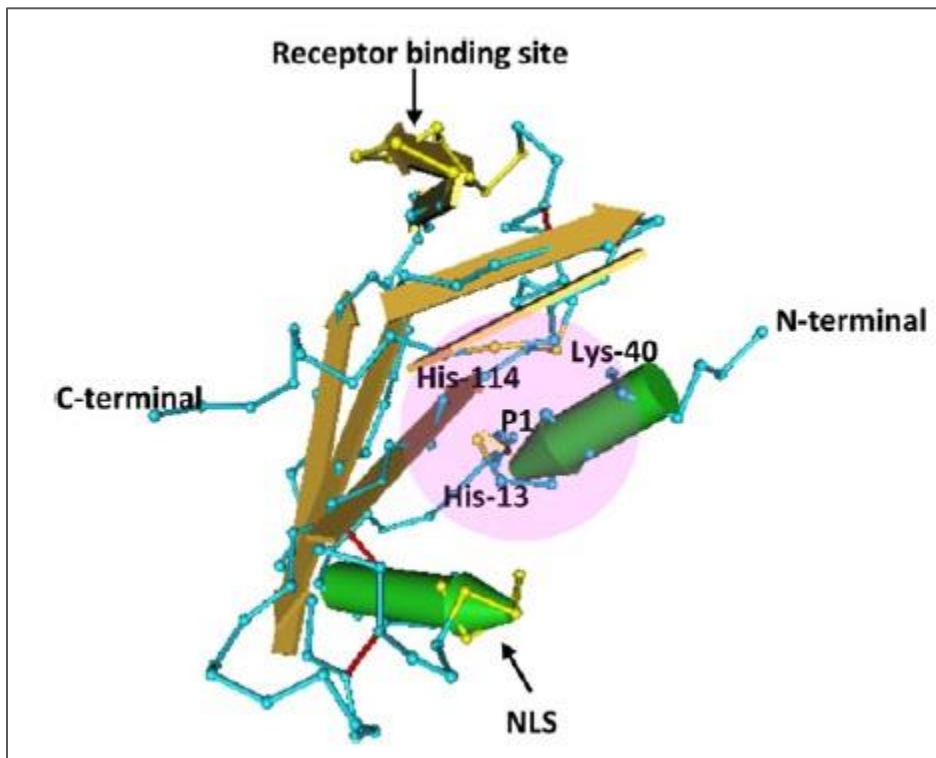


Εικόνα 2: Σύγκριση των αμινοξικών αλληλουχιών της αγγειογενίνης και της παγκρεατικής ριβονουκλεάσης A (Kurachi et al., 1985)

Η αγγειογενίνη, όπως και η ομόλογη σε αυτήν ριβονουκλεάση A, διαθέτει επιπλέον ένα κέντρο πρόσδεσης πυριμιδινών B1, καθώς κι ένα κέντρο πρόσδεσης πουρινών B2. Το κέντρο B1, ωστόσο, βρίσκεται κλειστό από την πλευρική αλυσίδα ενός καταλοίπου γλουταμίνης (Gln-117) στην περίπτωση της αγγειογενίνης. Η φραγή αυτή ενισχύεται, μάλιστα, από δύο κατάλοιπα ισολευκίνης (Ile-119) και φαινυλαλανίνης (Phe-120), τα οποία μέσω υδρόφοβων διαμοριακών αλληλεπιδράσεων ασφαλίζουν τη γλουταμίνη στη θέση εμπλοκής. (Russo et al., 1996)

Όσον αφορά τη δομή της, η αγγειογενίνη επίσης διαφέρει ως προς τον αριθμό των δισουλφιδικών δεσμών που παρατηρούνται στην τριτοταγή δομή της. Χαρακτηριστική

είναι η έλλειψη (σε σύγκριση με άλλα μόρια της υπερικογένειας της Ριβονουκλεάσης A) ενός δισουλφιδικού δεσμού με αποτέλεσμα την ύπαρξη μιας δομής βρόχου μεταξύ των καταλοίπων Lys-60 έως Lys-68. Εικάζεται ότι ο βρόχος αυτός είναι καίριας σημασίας στην αλληλεπίδραση του μορίου της αγγειογενίνης με έναν υποδοχέα (Angiogenin receptor, ANGR) ή αντίστοιχα μια πρωτεΐνη κυτταρικής επιφάνειας στην οποία δεσμεύεται (Angiogenin binding protein, ANGBP), μόρια που, προς το παρόν, δεν έχουν χαρακτηριστεί πλήρως. Καθώς η είσοδος της αγγειογενίνης στο κύτταρο φαίνεται να είναι ανεξάρτητη από μικροσωληνίσκους και ιμπορτίνες, το ερευνητικό ενδιαφέρον για τη διαδικασία εισόδου της αγγειογενίνης είναι στραμμένο στον υποδοχέα αυτό.

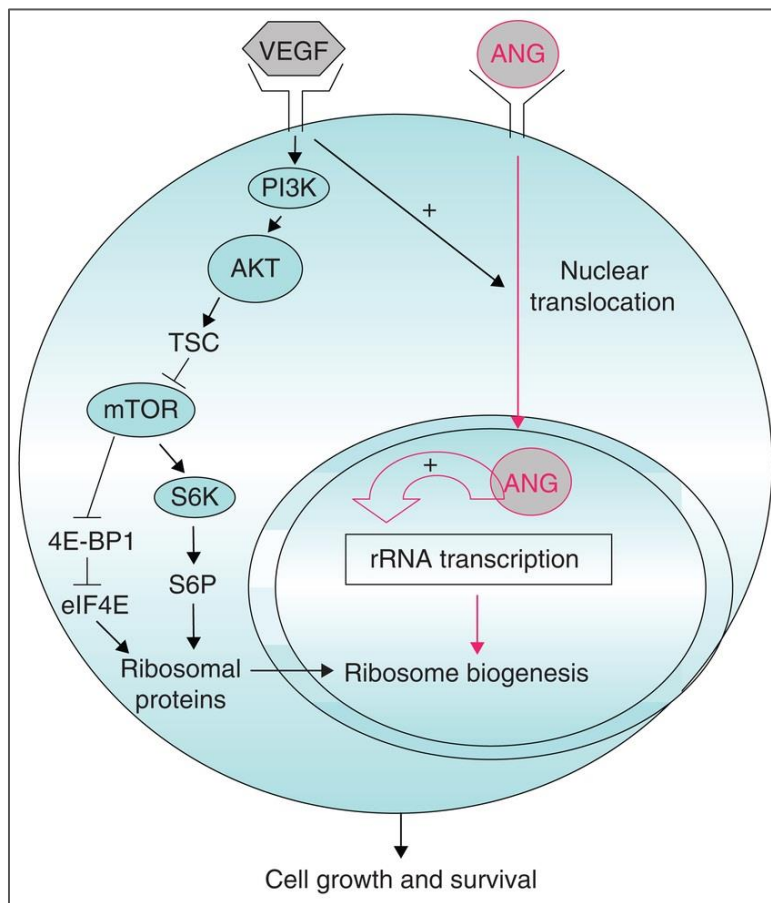


Εικόνα 3: Αναπαράσταση της κρυσταλλικής δομής της αγγειογενίνης σε ανάλυση 1.8 Å. Επισημαίνονται το αμινοτελικό και καρβοξυτελικό άκρο, η περιοχή σύνδεσης στον υποδοχέα της αγγειογενίνης, η αλληλουχία πυρηνικού εντοπισμού, καθώς και το ενεργό κέντρο P1. (Leonidas et al., 1999)

Η αγγειογενίνη διαθέτει επίσης μια αλληλουχία πυρηνικού εντοπισμού (NLS, Nuclear Localisation Sequence), η οποία απαρτίζεται από τα αμινοξέα $^{30}\text{Met-Arg-Arg-Arg-Gly}^{35}$. Η συγκεκριμένη αλληλουχία κατέχει βασικό ρόλο στη ρύθμιση της αγγειογένεσης καθώς, προκειμένου να ασκήσει τις αγγειογενετικές της δράσεις, η αγγειογενίνη είναι απαραίτητο να εισέλθει στον πυρήνα (Lixin et al., 2001). Στη διαδικασία αυτή φαίνεται να εμπλέκεται και η φωσφολιπάση C (PLC), καθώς αναστολή της οδηγεί στη συσσώρευση της αγγειογενίνης στο κυτταρόπλασμα, αντί για τον πυρήνα και αποτελεί χαρακτηριστικό παθολογικών καταστάσεων. Η ίδια η αγγειογενίνη φαίνεται να

ρυθμίζει την είσοδό της στον πυρήνα, καθώς φαίνεται να είναι υπαίτια για την ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης C, που συμβαίνει όταν η αγγειογενίνη συνδέεται στους υποδοχείς κυτταρικής επιφάνειας (Sadagoran et al., 2011).

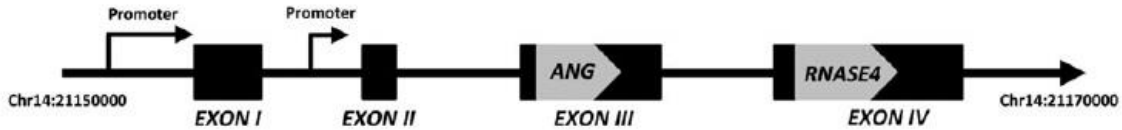
Εφόσον αφιχθεί στον πυρήνα, μελέτες έχουν δείξει ότι η αγγειογενίνη ασκεί τη δράση της προς ενίσχυση της μεταγραφής του ριβοσωμικού RNA (rRNA). Αυτό επιτυγχάνεται με την πρόσδεσή της σε στοιχεία ελέγχου ανοδικά του υποκινητή (upstream control element, UCE και Angiogenin binding element, ABE) του γονιδίου υπεύθυνου για την κωδικοποίηση του ριβοσωμικού RNA, ενισχύοντας έτσι το σχηματισμό του συμπλόκου PIC (pre-initiation complex) της RNA πολυμεράσης I. Παράλληλα, εικάζεται ότι η αγγειογενίνη επάγει και επιγενετικές αλλαγές στην περιοχή του υποκινητή αυτού, κυρίως με την επαγωγή τροποποιήσεων στις ιστόνες (μεθυλίωση και ακετυλίωση) καθώς και την αλλαγή των ήδη υπάρχουσών τροποποιήσεων (Sheng et al., 2014).



Εικόνα 4: Η δράση της αγγειογενίνης στον πυρήνα και η συσχέτισή της με τον παράγοντα VEGF (Kishikawa et al., 2008)

1.4.2. Δομή του γονιδίου της αγγειογενίνης

Το γονίδιο που ευθύνεται για την κωδικοποίηση της ανθρώπινης αγγειογενίνης, βρίσκεται στο μακρύ βραχίονα του 14^{ου} χρωμοσώματος (14q11.2). Σε κάθε μονάδα απλοειδούς γονιδιώματος αντιστοιχεί ένα αντίγραφο του γονιδίου αυτού, το οποίο δε διαθέτει ιντρόνια.



Εικόνα 5: Ο γενετικός τόπος του γονιδίου της ανθρώπινης αγγειογενίνης και της ριβονουκλεάσης 4. Τα εξόνια αναπαρίστανται με γκριζα βέλη (Sheng & Xu, 2016)

Το γονίδιο της αγγειογενίνης, επίσης, διακρίνεται από τα εξής γνωρίσματα:

- α. 12 βάσεις γουανίνης (G) στο 5' άκρο του
- β. 175 νουκλεοτίδια στην 3' αμετάφραστη περιοχή, εκ των οποίων τα 23 είναι βάσεις κυτοσίνης (C)
- γ. poly(A) ουρά
- δ. χαρακτηριστικά βραχεία κωδικοποιούσα αλληλουχία
- ε. αλληλουχία τερματισμού
- στ. τα 369 νουκλεοτίδια που διαθέτει, κωδικοποιούν για το ώριμο μόριο της αγγειογενίνης, μήκους 123 αμινοξέων
- ζ. ένα πεπτίδιο-σινιάλο (signal peptide) που απαρτίζεται από 24 αμινοξέα

```
-200  AGTGAGAGTG GATTTTGTAA TGTTACGACT GATAGAGAAA TACTCAGTGA TTCTAAGGGA TGGGGARGAA CGGTTGGAGC TAGAGGTTGT GCTCAGGAAA
-100  CTATTAATAA GACGTTCCGC AGGAAGGGAT TGACGAAAGTG TGAGGTTAAT GAOGAAGGGA AAATAGAA TA TAATATTGG TGGTGGAAA GATCTGATTC
  1   ATGATGCCGT GTCAGAGAGC AAAGCTCCCTG TCCTTTTGGC CTAATTTGGT GATGCTGTTC TTGGGCTCAC CACACCTCCT TTTGCCCTCC GCAGGAGCCT
      -24      -20      -10      -1
      Met Val Met Gly Leu Gly Val Leu Leu Leu Val Phe Val Leu Gly Leu Thr Pro Pro Thr Leu Ala
101  GTGTTGGAAG AG ATG GTG ATG GGC CTG GGC GTT TTG TTG TTG GTC TTC GTG CTG GGT CTG GGT CTG ACC CCA CCG ACC CTG GCT
      +1      10      20
      Gln Asp Asn Ser Arg Tyr Thr His Phe Leu Thr Gln His Tyr Asp Ala Lys Pro Gln Gly Arg Asp Asp Arg Tyr Cys Glu
185  CAG GAT AAC TCC AGG TAC ACA CAC TTC CTG ACC CAG CAC TAT GAT GCC AAA CCA CAG GGC CGG GAT GAC AGA TAC TGT GAA
      30      40      50
      Ser Ile Met Arg Arg Arg Gly Leu Thr Ser Pro Cys Lys Asp Ile Asn Thr Phe Ile His Gly Asn Lys Arg Ser Ile Lys
266  AGC ATC ATG AGG AGA CGG GGC CTG ACC TCA CCC TGC AAA GAC ATC AAC ACA TTT ATT CAl GGC AAC AAG CGC AGC ATC AAG
      60      70      80
      Ala Ile Cys Glu Asn Lys Asn Gly Asn Pro His Arg Glu Asn Leu Arg Ile Ser Lys Ser Ser Phe Gln Val Thr Thr Cys
347  GCC ATC TGT GAA AAC AAG AAT GGA AAC CCT CAC AGA GAA AAC CTA AGA ATA AGC AAG TCT TCT TTC CAG GTC ACC ACT TGC
      90      100
      Lys Leu His Gly Gly Ser Pro Trp Pro Pro Cys Gln Tyr Arg Ala Thr Ala Gly Phe Arg Asn Val Val Val Ala Cys Glu
428  AAG CTA CAT GGA GGT TCC CCC TGG CCT CCA TGC CAG TAC CGA GCC ACA GCG GGG TTC AGA AAC GTT GTT GTT GCT TGT GAA
      110      120      123
      Asn Gly Leu Pro Val His Leu Asp Gln Ser Ile Phe Arg Arg Pro STOP
509  AAT GGC TTA CCT GTC CAC TTG GAT CAG TCA ATT TTC CGT CGT CCG TAA CCAGCGGGCC CCTGGTCAAAG TGCTGGCTCT GCTGTCCTTG
```

Εικόνα 6: Τμήμα της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του γονιδίου της αγγειογενίνης. Επισημαίνεται το TATA Box (-32) και η θέση έναρξης της μεταγραφής (+1) (Kurachi et al., 1985)

1.4.3. Μηχανισμός κατάλυσης

Η αγγειογενίνη αποτελεί έναν ισχυρότατο παράγοντα αγγειογένεσης. Παράλληλα, η ικανότητά της να υδρολύει μόρια RNA την κατατάσσουν στην οικογένεια των ριβονουκλεασών. Η ενζυμική δραστηριότητα της αγγειογενίνης, ωστόσο, είναι εξαιρετικά χαμηλή. Η διαφορά της καταλυτικής της δραστηριότητας σε σχέση με τη ριβονουκλεάση A (περίπου 10^5 με 10^6 φορές μικρότερη δραστηριότητα), καθώς και η χαρακτηριστικές διαφορές μεταξύ των δομών των δύο μορίων, αφήνουν να εννοηθεί ότι η αγγειογενίνη διαθέτει υποστρώματα και λειτουργίες εντελώς διαφορετικά από άλλα μέλη της υπεροικογένειας (Lee et al., 1989). Πιο συγκεκριμένα, σε αντίθεση με τη ριβονουκλεάση A, η οποία δεν εμφανίζει κάποια εξειδίκευση ως προς το υπόστρωμα που υδρολύει, η αγγειογενίνη φαίνεται να εκδηλώνει προτίμηση

α. σε μονόκλινα μόρια RNA

β. στα 3' άκρα καταλοίπων κυτιδίνης ή ουριδίνης, όταν αυτά ακολουθούνται από αδενίνη, με σειρά «προτίμησης» την CpA > CpG > UpA > UpG (Rybak et al., 1988)

γ. σε μόρια 18S και 28S rRNA

δ. σε μόρια μη-κωδικοποιητικών RNA, κυρίως μεταφορικών RNA (tRNA), μία ιδιότητα που παρατηρείται έντονα σε συνθήκες στρες (Ivanov et al., 2011)

με το φυσιολογικό της υπόστρωμα να παραμένει, ωστόσο, ακόμα άγνωστο.

Η ενζυμική δραστηριότητα της αγγειογενίνης ως ριβονουκλεάση, είναι απαραίτητη για την ομαλή λειτουργία της και ως αγγειογενετικός παράγοντας (Leland et al., 2002) και, αν και έχει παρατηρηθεί η πρόσδεσή της σε DNA σε συνθήκες *in vivo*, η υδρόλυση μορίων DNA δεν υπάγεται στις ενζυμικές δραστηριότητες της αγγειογενίνης (Hu et al., 2000).

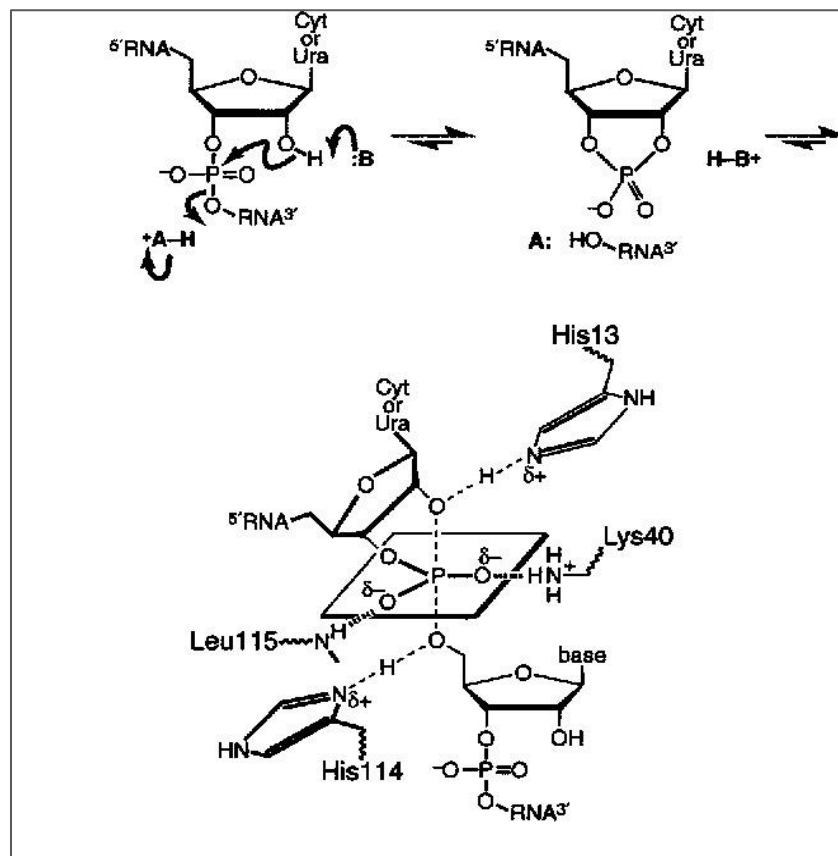
Ο μηχανισμός κατάλυσης της ενδονουκλεολυτικής διάσπασης μορίων χωρίζεται σε δύο στάδια:

1. Τρανσφωσφορυλίωση του 3'-5' φωσφοδιεστερικού δεσμού μεταξύ νουκλεοτιδίων, από τη θέση 5' ενός νουκλεοτιδίου προς τη θέση 2' του επόμενου. Δημιουργείται έτσι, παράλληλα με τη διάσπαση του δεσμού, μία ελεύθερη υδροξυλομάδα στο 5' άκρο (5'-OH), καθώς και ένας 2', 3'-κυκλικός φωσφοδιεστέρας με ελεύθερο το 3'-φωσφορικό άκρο. Η αντίδραση αυτή είναι αντιστρεπτή και ταχεία.

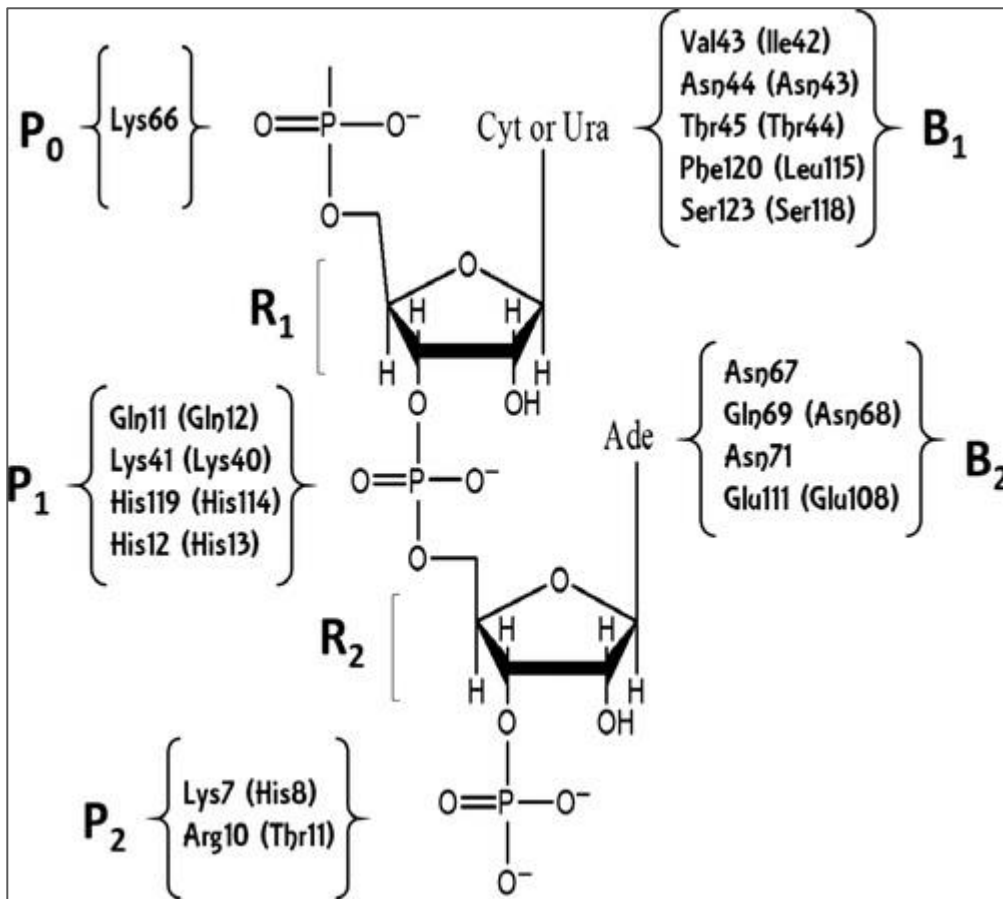
- Υδρόλυση του παραγόμενου 2',3'-κυκλικού-φωσφοδιεστέρα προς παραγωγή μιας 3'-μονοφωσφορικής ομάδας. Η αντίδραση αυτή είναι δύσκολα αντιστρεπτή.

Τα παραπάνω στάδια απεικονίζονται και στην Εικόνα 7 και λαμβάνουν χώρα στις τρεις κρίσιμες περιοχές του ενεργού ριβονουκλεολυτικού κέντρου της αγγειογενίνης, που είναι κοινές με αυτές της ριβονουκλεάσης A (Εικόνα 8):

- Στο κέντρο P1 (κατάλοιπα Gln12, Lys40, His114 και His13) πραγματοποιείται η διάσπαση του φωσφοδιεστερικού δεσμού
- Στο κέντρο B1 (κατάλοιπα Ile42, Asp43, Thr44, Leu115 και Ser118) προσδένεται κατά τη διάσπαση ο δακτύλιος πυριμιδίνης του νουκλεοτιδίου που φέρει το 3'-O
- Το κέντρο B2 (κατάλοιπα Asn68 και Glu108) αλληλεπιδρά με τη βάση του νουκλεοτιδίου που φέρει το 5'-O



Εικόνα 7: Καταλυτικός μηχανισμός της αγγειογενίνης. Άνω επίπεδο: πρώτο στάδιο. Β: His 13, Α: His114. Κάτω επίπεδο: Το μεταβατικό στάδιο κατά την τρανσφοσφορλίωση (Leland et al., 2002)



Εικόνα 8: Το ενεργό κέντρο της ριβονουκλεάσης A και οι κρίσιμες περιοχές του. Σε παρενθέσεις παρατίθενται τα αντίστοιχα κατάλοιπα για την αγγειογενίνη (Chatzileontiadou et al., 2016)

Η ριβονουκλεολυτική δράση της αγγειογενίνης φαίνεται, τέλος, να εξαρτάται και από:

α. τη συγκέντρωση ιόντων νατρίου, καθώς για τη σύνδεση των κατιονικών περιοχών του ενζύμου με το ανιονικό υπόστρωμα είναι απαραίτητη η διασφάλιση των κατάλληλων ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων και

β. από το μήκος του υποστρώματος,

γεγονότα που υποστηρίζονται και από κινητικά δεδομένα, καθώς η ελάττωση της συγκέντρωσης ιόντων νατρίου, όπως και η κατάλυση ενός μεγαλύτερου σε αριθμό νουκλεοτιδίων υποστρώματος, οδηγεί σε αισθητά υψηλότερες τιμές του λόγου K_{cat}/K_m (Leland et al., 2002).

1.4.4. Δράσεις της αγγειογενίνης

Με την πάροδο του χρόνου από την ανακάλυψή της έως και σήμερα, έχουν γίνει γνωστές αρκετές ιδιότητες και μηχανισμοί δράσης της αγγειογενίνης. Όπως και η φύση του, οι δράσεις του πολύπλευρου αυτού ενζύμου είναι ιδιαίτερα ποικιλόμορφες.

Έλεγχος του μεταβολισμού νουκλεϊκών οξέων

Η εκκρινόμενη, εξωκυττάρια αγγειογενίνη υφίσταται πιθανώς ενδοκύττωση μέσω του υποδοχέα της, μεταβαίνει από το κυτοσόλιο στον πυρήνα και, από εκεί, προσδένεται στα στοιχεία ABE και UCE και ασκεί τη δράση της ενισχύοντας τη μεταγραφή του DNA που κωδικοποιεί για ριβοσωμικό RNA. Περίσσεια αγγειογενίνης στον πυρήνα μπορεί επίσης να συνδέεται με αλλαγές στα επίπεδα μεταγραφής αγγελιαφόρου RNA (mRNA), όπως στην περίπτωση της αναστολής του ER γ (Estrogen receptor-related receptor gamma), στην κωδικεύουσα περιοχή του οποίου προσδένεται η αγγειογενίνη (Saikia et al., 2012)

Η αγγειογενίνη παίζει, επίσης, σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό των tRNAs, με αυξημένα επίπεδα υδρόλυσης του συντηρημένων, μονόκλωνων 3'-άκρων τους προς σχηματισμό μη κωδικοποιητικών tiRNAs (tRNA-derived, stress-induced small RNA). Η διαδικασία αυτή φαίνεται να έχει λεπτή ρύθμιση, αφού τα μοτίβα δημιουργίας των μορίων αυτών είναι ειδικά για περιπτώσεις στρες ή εξαρτώνται από την ένταση του σήματος κινδύνου (Fu et al., 2009).

Επιπλέον, η αγγειογενίνη ενδέχεται να εμπλέκεται και στο μεταβολισμό και άλλων μορφών RNA, καθώς ορισμένοι κινητικοί νευρώνες εκκρίνουν το ένζυμο, που ενδοκυτταρώνεται στη συνέχεια από αστροκύτταρα, με απώτερο σκοπό την υδρόλυση ενός προς το παρόν άγνωστου τύπου RNA (Skorupa et al., 2012).

Ενεργοποίηση μονοπατιών μεταγωγής σήματος

Με την πρόσδεσή της σε μία ακόμα άγνωστη διαμεμβρανική πρωτεΐνη, η αγγειογενίνη δύναται να ενεργοποιήσει σηματοδοτικά μονοπάτια που περιλαμβάνουν την κινητοποίηση μορίων όπως οι κινάσες ERK 1/2, B/Akt και SAPK/JNK σε διάφορους τύπους κυττάρων-στόχων (Peng et al., 2014). Αυτή η αυξημένη ένταση της σηματοδότησης είναι πιθανό να έχει ως στόχο της την αύξηση των ριβοσωμικών πρωτεϊνών, ώστε να επαχθεί κυτταρική αύξηση. Σημαντικό φαινόμενο είναι επίσης η επαγωγή της σύνθεσης μονοξειδίου του αζώτου στο ενδοθήλιο των αγγείων, ενός κύριου ρυθμιστή της αγγειακής φυσιολογίας. Άλλα χαρακτηριστικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται από την αγγειογενίνη είναι τα αντιαποπτωτικά μονοπάτια κυτταρικής επιβίωσης στα οποία εμπλέκονται οι παράγοντες NF- κ B και Bcl-2, τονίζοντας περαιτέρω

τη σημασία του μορίου της αγγειογενίνης σε περιστατικά έκρυθμου κυτταρικού πολλαπλασιασμού (Li et al., 2010).

Διέγερση της αποδόμησης βασικής μεμβράνης

Στα μικροπεριβάλλοντα καρκινικών όγκων, η αγγειογενίνη εφάπτεται με την επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων που του παρέχουν αιμάτωση, προσδένεται στην ακτίνη του κυτταροσκελετού, και αποδομείται ως σύμπλοκο AngBP. Το σύμπλοκο αυτό επάγει τη δημιουργία πλασμίνης από την πρωτεόλυση του πλασμινογόνου μέσω της ενεργοποίησης σηματοδοτικών αλυσίδων που περιλαμβάνουν πρωτεάσες (Hu et al., 1994). Η σύζευξη αγγειογενίνης και ακτίνης επάγει και αλλαγές στον κυτταροσκελετό, καθώς αποτρέπει τον πολυμερισμό της G-ακτίνης και οδηγεί σε αποδιάταξη της δομής της F-ακτίνης (Pyatibratov et al., 2012). Με τον τρόπο αυτό, η αγγειογενίνη μπορεί να συμβάλλει στη διάτρηση και αποδόμηση της βασικής μεμβράνης των αγγείων, με αποτέλεσμα τη διαφυγή, μετανάστευση, αλλά και τη διευκόλυνση της συγκόλλησης των ενδοθηλιακών κυττάρων προς άλλα σημεία που χρήζουν της συμβολής τους (Soncin et al., 1994 και Wei et al., 2011).

Ρύθμιση ανοσολογικών αποκρίσεων

Η αγγειογενίνη είναι ένα μόριο το οποίο χαρακτηρίζεται από ιδιαίτερη ανοσολογική αξία. Ως συστατικό των κυττάρων, η αγγειογενίνη συμβάλλει στην προστασία επιφάνειας του οφθαλμού από μικρόβια και ξένα σώματα. Εκκρίνεται, επίσης, από τα κύτταρα Paneth στις κρύπτες του λεπτού εντέρου, δρώντας και εκεί ως αντιμικροβιακό πεπτίδιο (Hooper et al., 2003). Στο οπλοστάσιο των δράσεων της αγγειογενίνης συγκαταλέγεται και η αντιϊκή προστασία, αφού διαθέτει τη δυνατότητα αναστολής της αντιγραφής συγκεκριμένων στελεχών του ιού HIV, και των ιών της ηπατίτιδας Β και C, είτε εκκρινόμενη από πρόδρομα T-λεμφοκύτταρα (Cocchi et al., 2012), είτε ως μεσάζων στη σηματοδότηση εισβολής κατά του ιού (Selitsky et al., 2015).

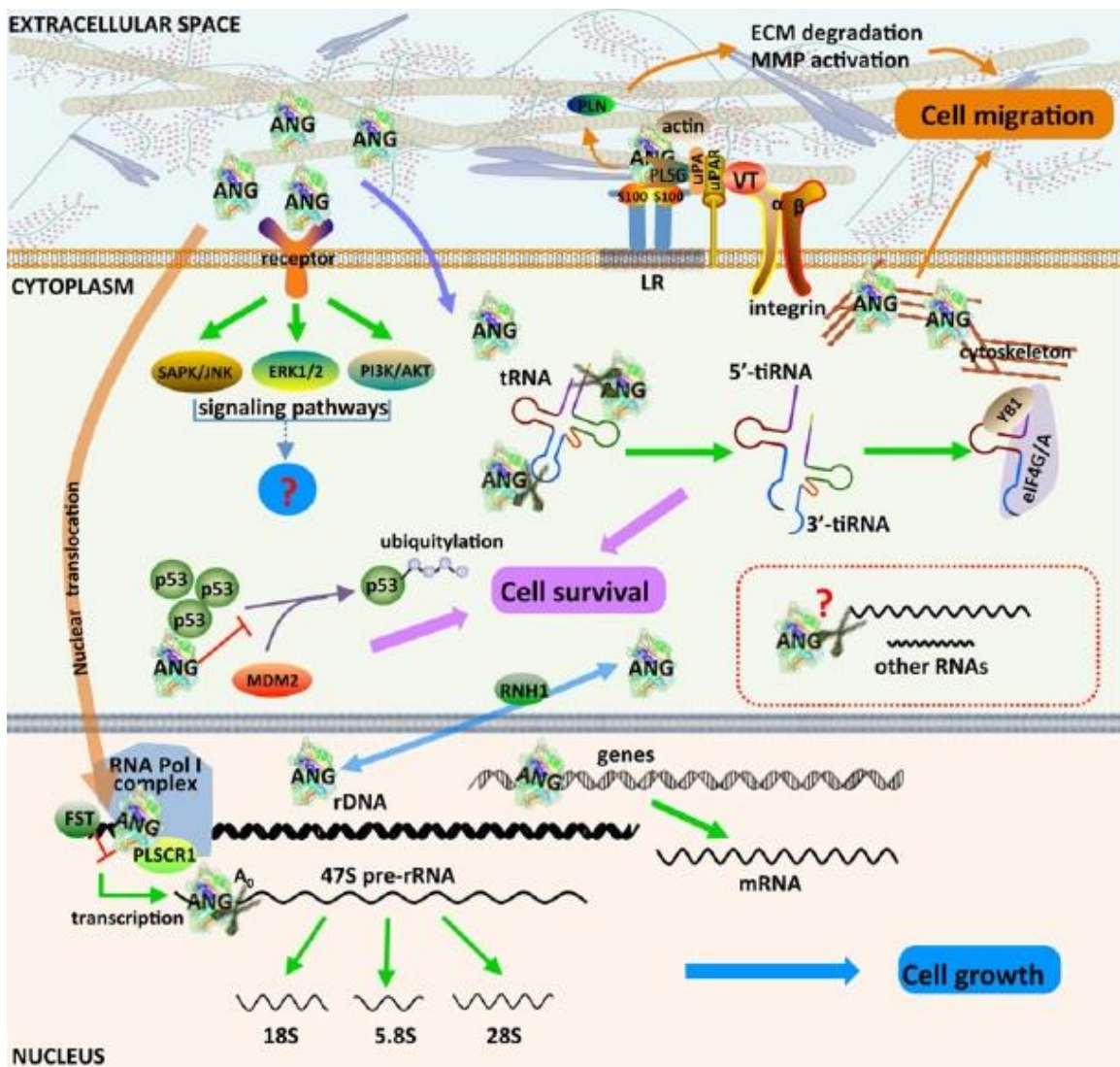
Καθώς οι συγκεντρώσεις της στον ορό είναι αυξημένες κατά την εκδήλωση φλεγμονωδών αποκρίσεων, η αγγειογενίνη δύναται, επίσης, να διαθέτει αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες, κινητοποιώντας το μονοπάτι του NF-κΒ και μετατοπιζόμενη στον πυρήνα (Lee et al., 2014). Τα χαρακτηριστικά αυτά, καθώς και η ικανότητά της να αποτρέπει την αποκοκκίωση των πολυμορφοπύρηνων λευκοκυττάρων (Tschesche et al., 1994), αναδεικνύουν την αγγειογενίνη ως έναν ισχυρό ρυθμιστή του ανοσοποιητικού συστήματος.

Αγγειογένεση στην εμβρυϊκή ηλικία, ανοσοανοχή και διατήρηση της ομοιόστασης

Κατά τη διάρκεια μιας φυσιολογικής εγκυμοσύνης, τόσο η de novo αγγειογένεση, όσο και η αναδιάταξη αγγείων παρατηρούνται σε αυξημένα επίπεδα. Αυτό συνεπάγεται άνοδο και στα επίπεδα της αγγειογενίνης στον ορό, μιας και η βιοσύνθεση της αγγειογενίνης είναι έντονη κατά την ανάπτυξη του πλακούντα, και το ένζυμο είναι παρόν στα κύτταρα του στρώματος και του επιθηλίου της δομής αυτής, που έχει προκύψει από φθαρτοποίηση (decidualization) της επιφάνειας του ενδομητρίου. Είναι γνωστό ότι το φθαρτοποιημένο ενδομήτριο χαρακτηρίζεται από αυξημένα επίπεδα έκκρισης αγγειογενίνης. (Koga et al., 2001). Η παρουσία του ανοσολογικού αυτού ρυθμιστή στο ενδομήτριο, σε συνδυασμό με τον περίσσεια του ιστού σε λευκοκύτταρα και τις ανοσοκατασταλτικές του ιδιότητες (Heikkinen et al., 2003), υπονοούν μια σύνδεση μεταξύ της αγγειογενίνης και της ανάπτυξης ανοσολογικής ανοχής του οργανισμού της μητέρας προς το αναπτυσσόμενο έμβρυο (Matousek et al., 1995).

Στην ενήλικη ζωή, τα επίπεδα της αγγειογενίνης που παρατηρούνται στον ορό παραμένουν σταθερά στα 200-400 ng/ml, όμως η αγγειογενετική δράση του ενζύμου είναι μάλλον εξασθενημένη. Μάλιστα, ο υποδοχέας της αγγειογενίνης φαίνεται να είναι παρών στις μεμβράνες των ενδοθηλιακών κυττάρων, όταν αυτά βρίσκονται αποκλειστικά σε κυτταροκαλλιέργεια όπου *δεν καλύπτουν πλήρως* την επιφάνεια στην οποία αναπτύσσονται (sparsely cultured endothelial cells). Σε πυκνώς καλλιεργούμενα ενδοθηλιακά κύτταρα, ο υποδοχέας παύει να είναι ανιχνεύσιμος (Strydom et al., 1998).

Απεναντίας, η αγγειογενίνη επιδεικνύει ξανά την ισχυρή της δράση σε περίπτωση τραυματισμών. Όταν η πυκνότητα των μεμβρανών των ενδοθηλιακών κυττάρων διαταράσσεται από την ύπαρξη μιας πληγής, οι υψηλές τιμές της αγγειογενίνης του ορού διευκολύνουν την επούλωσή της και την αποκατάσταση της ομοιόστασης της φυσιολογίας των αγγείων (Pan et al., 2012).



Εικόνα 9: Σχηματική περίληψη των δράσεων της αγγειογενίνης (Sheng & Xu, 2016)

1.4.5. Αγγειογενίνη και ασθένειες

Οι πολλαπλοί, κρίριοι ρόλοι της αγγειογενίνης στην αγγειογένεση, τις ανοσολογικές αποκρίσεις ποικίλων μορφών, την επούλωση πληγών και τη διαμεσολάβηση σε σηματοδοτικά μονοπάτια, την καθιστούν ένα μόριο-κλειδί για πολλές φυσιολογικές διεργασίες. Την ίδια στιγμή, η ισχύς του μορίου αυτού καθιστά τις συνέπειες μιας πιθανής απορρύθμισης των δράσεών του εξαιρετικά αρνητικές. Ακριβώς γι αυτό, μεταλλάξεις στο γονίδιο της αγγειογενίνης, ανεπάρκειες στη ρύθμισή της ή απώλεια της λειτουργίας της εντάσσονται συχνά στα χαρακτηριστικά παθολογικών καταστάσεων.

Η αγγειογενίνη συμμετέχει πολύ συχνά σε περιπτώσεις καρκίνου, συμμετέχοντας στη σύνθεση νέων αγγείων και «κλειδώνοντας» τη διασφάλιση του συνεχούς κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Ορισμένοι τύποι καρκίνου στους οποίους παρατηρείται αύξηση των επιπέδων της αγγειογενίνης είναι ο καρκίνος του ενδομητρίου, του μαστού, των ωοθηκών, του προστάτη, του παχέος εντέρου (Li et al., 2019), του παγκρέατος, του τραχήλου της μήτρας, των νεφρών, καθώς και το πολλαπλούν μυέλωμα, το μελάνωμα, το αστροκύτωμα και το λεμφαγγείωμα (Idriss et al., 2015). Τα επίπεδα της αγγειογενίνης είναι επίσης υψηλά σε ασθένειες όπως οι χρόνιες μυελοπολλαπλασιαστικές διαταραχές (CMDs) (Musolino et al., 2004) η οξεία μυελοειδής λευχαιμία και το μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο. Τα υψηλά επίπεδα αγγειογενίνης στον ορό που παρατηρούνται σε περιπτώσεις καρκίνων και στερεών όγκων μπορούν, παράλληλα, να χρησιμοποιηθούν ως δείκτης για τη διάγνωση και την εκτίμηση της πρόγνωσης σε ασθενείς που πιθανώς πάσχουν από ορισμένες μορφές της ασθένειας (Landt et al., 2011).

Υψηλά επίπεδα αγγειογενίνης παρατηρούνται και σε παθήσεις όπως η ενδομητρίωση (Suzumori et al., 2004), η φλεγμονώδης νόσος του εντέρου (Inflammatory Bowel Disease, IBD), η ρευματοειδής αρθρίτιδα (Hosaka et al., 1995), ο σακχαρώδης διαβήτης (Neubauer-Geryk et al., 2012) και η υπέρταση (Marek-Trzonkowska et al., 2015), όμως οι μελέτες περιορίζονται στην ανίχνευση των επιπέδων της στον ορό ως δείκτη, παρά στην άμεση σύνδεσή της με την παθογένεια.

Άλλες ασθένειες με τις οποίες η αγγειογενίνη παρουσιάζει πιθανή σύνδεση είναι η σποραδική και οικογενής πλάγια αμυοτροφική σκλήρυνση (Amyotrophic Lateral Sclerosis, ALS), και η νόσος Parkinson, ασθένειες που αφορούν τον εκφυλισμό και την απώλεια ελέγχου των κινητικών νευρώνων. Στην περίπτωση αυτή, ωστόσο, τα επίπεδα της αγγειογενίνης είναι χαρακτηριστικά χαμηλά. Πιο συγκεκριμένα, στη νόσο ALS συμμετέχουν τόσο ο παράγοντας VEGF, όσο και η αγγειογενίνη, στη γονιδιακή αλληλουχία της οποίας έχουν βρεθεί ως τώρα περίπου είκοσι (20) μεταλλάξεις (με ορισμένες να είναι χαρακτηριστικές συγκεκριμένων γεωγραφικών πληθυσμιακών ομάδων). Αντίστοιχα, για τη νόσο Parkinson έχουν ταυτοποιηθεί είκοσι επτά (27) μεταλλάξεις του γονιδίου της αγγειογενίνης, και άλλες τρεις (3) μεταλλάξεις σχετίζονται και με τις δύο ασθένειες (Bradshaw et al., 2017 και Prehn & Jirstrom, 2020). Ο ρόλος της, ωστόσο, ως πιθανός νευροπροστατευτικός παράγοντας (καθώς συστηματική θεραπεία με φυσικού τύπου αγγειογενίνη δείχνει να καθυστερεί τον εκφυλισμό των κινητήριων νευρώνων στις δύο ασθένειες και προάγει την επιβίωσή τους) δεν έχει διασαφηνιστεί πλήρως (Kieran et al., 2008).

1.5. Μέθοδοι και τεχνολογίες πρωτεομικής

Ο επιστημονικός τομέας της πρωτεομικής (proteomics) αναφέρεται στην εφαρμογή τεχνολογιών που ως σκοπό έχουν την ποιοτική και ποσοτική ανίχνευση του συνόλου των πρωτεϊνών που είναι παρούσες σε ένα δείγμα υποκυτταρικού διαμερίσματος, κυττάρου, ιστού ή οργανισμού. Σε αυτή την ολιστική προσέγγιση της ανίχνευσης πρωτεϊνών οφείλει το συνθετικό *-omics* στην ονομασία της, και μπορεί να αντιμετωπιστεί ως αυτοδύναμη ή, σε συνδυασμό με τους τομείς της μεταγραφομικής και της γονιδιωματικής, ως συμπληρωματική προσέγγιση στον ολοκληρωμένο χαρακτηρισμό της βιοχημικής ταυτότητας ενός ζωντανού οργανισμού. Μάλιστα, το πρωτόμα ενός οργανισμού είναι συχνά πολύ πιο περίπλοκο από το γονιδιώμα του, καθώς οι πρωτεΐνες υπόκεινται σε μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις (φωσφορυλίωση, γλυκοσυλίωση, λιπιδίωση, πρωτεόλυση, μεθυλίωση, πολυμερισμός κ.ά.) για να καταστούν λειτουργικές και για την καλύτερη ρύθμιση του κύκλου ζωής τους (Zhang et al., 2014).

Στο φάσμα των δυνατοτήτων του τομέα της πρωτεομικής περιλαμβάνονται ο χαρακτηρισμός της έκφρασης, της δομής, των λειτουργιών, των αλληλεπιδράσεων, καθώς και πιθανών τροποποιήσεων των πρωτεϊνών σε κάθε φάση του κύκλου ζωής τους. Με αυτόν τον τρόπο μπορούν να αντληθούν πληροφορίες και για τη δομή, λειτουργία και οργάνωση του γονιδιώματος, καθώς οι πρωτεΐνες δεν είναι παρά η υλική πραγμάτωση της πληροφορίας που κωδικοποιείται από αυτό. Οι τεχνικές και μεθοδολογίες πρωτεομικής αποτελούν επίσης πολύτιμα εργαλεία στη διάγνωση, πρόγνωση και παρακολούθηση της εξέλιξης ποικίλων ασθενειών (Domon & Aebersold, 2006).

Την εδραίωση της πρωτεομικής ως ερευνητικό τομέα χαρακτηρίζει η έλευση μεθόδων υψηλής ευαισθησίας και διακριτικής ικανότητας που συμπληρώνουν και ενοποιούν τις δυνατότητες των παραδοσιακών εργαστηριακών δοκιμασιών (ELISA, χρωματογραφικές μέθοδοι, δοκιμασίες ηλεκτροφόρησης, στύπωμα κατά Western κ.ά.) υπό το πρίσμα της βιοχημικής έρευνας οργανισμών σε μεγάλη κλίμακα.

Προηγμένες μέθοδοι, όπως αυτές της φασματοσκοπίας μάζας (mass spectrometry), της αλληλούχησης κατά Edman, τεχνικές ποσοτικοποίησης με χρήση σημάτων όπως οι SILAC, ICAT και iTRAQ, βιοπληροφορικές αναλύσεις και μέθοδοι όπως η κρυσταλλογραφία με ακτίνες X και η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) δίνουν τη δυνατότητα ανίχνευσης συγκεκριμένων πρωτεϊνών, αποσαφήνισης της αμινοξικής αλληλουχίας ενός πεπτιδίου ενδιαφέροντος σε ένα ανομοιογενές δείγμα, καθώς και της εις βάθος μελέτης δομικών στοιχείων πρωτεϊνών (Aslam et al., 2017).

Η φασματομετρία μάζας είναι μια αναλυτική τεχνική ταυτοποίησης και προσδιορισμού μιας ένωσης με βάση τις πληροφορίες που λαμβάνονται από το φάσμα μάζας της. Η αναλυτική της ικανότητα στηρίζεται στην παραγωγή δεσμών ιοντικών θραυσμάτων στην αέρια φάση. Τα θραύσματα που προκύπτουν διαχωρίζονται κατά κύριο λόγο με την εφαρμογή ηλεκτρικού ή μαγνητικού πεδίου, και ο διαχωρισμός γίνεται με βάση το λόγο της μάζας m κάθε ιοντικού θραύσματος προς το φορτίο z που του έχει δοθεί (λόγος m/z). Το φάσμα μάζας που εν τέλει προκύπτει, παρουσιάζει την ένταση του σήματος κάθε ιοντικού θραύσματος ως συνάρτηση του λόγου μάζας προς φορτίο, m/z (Han et al., 2008).

Οι μέθοδοι πρωτεομικής υψηλής απόδοσης που βασίζονται στη φασματοσκοπία μάζας (mass spectrometry-based high-throughput proteomics) χρησιμοποιούνται κατά κόρον στα πειράματα χαρακτηρισμού πρωτεϊνών και των μετα-μεταφραστικών τους τροποποιήσεων σε μεγάλη κλίμακα. Τέτοια ερευνητικά εγχειρήματα έχουν τεράστιες απαιτήσεις σε ικανότητα διαχωρισμού, κάλυψη, δυναμικό εύρος και ευαισθησία. Για το σκοπό αυτό έχουν αναπτυχθεί εξαιρετικά πολύπλοκα μηχανήματα και οργανολογία που καλύπτουν αυτές τις ανάγκες, χρησιμοποιώντας διάφορες αρχές και συνδυάζοντας τη φασματοσκοπία μάζας με τεχνικές που διευκολύνουν περαιτέρω το διαχωρισμό των πρωτεϊνών. Η έννοια της φασματοσκοπία μάζας, επομένως, δεν αναφέρεται σε μία μεμονωμένη τεχνική ή στρατηγική. Αντιθέτως, αποτελεί ένα πεδίο όπου πολυάριθμα διαφορετικά εργαλεία και διεργασίες συμπράττουν για να εξυπηρετήσουν αφενός στη λύση του εκάστοτε ερευνητικού ερωτήματος, αφετέρου στον όσο το δυνατόν καταλληλότερο και λιγότερο καταστρεπτικό χειρισμό του δείγματος (Savaryn et al., 2016). Οι συνηθέστεροι συνδυασμοί συμπληρωματικών τεχνολογιών με φασματομετρία μάζας είναι:

- AMS (Accelerator Mass Spectrometry), όπου γίνεται χρήση ειδικού επιταχυντή ιόντων και ανιχνεύονται επιλεκτικά ιοντικά θραύσματα με συγκεκριμένη μάζα και κινητική ενέργεια.
- GC-MS (Gas Chromatography-Mass Spectrometry), όπου τα συστατικά ενός μείγματος πεπτιδίων διαχωρίζονται μέσω αέριας χρωματογραφίας και εισέρχονται στον φασματογράφο μάζας με τη βοήθεια κινητής φάσης αδρανούς αερίου.
- LC-MS (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry), όπου τα πεπτίδια διαχωρίζονται με υγρή χρωματογραφία σε μια υγρή κινητή φάση (συνήθως μείγμα νερού και οργανικών διαλυτών), η οποία μετατρέπεται σε αερόλυμα πριν εισέλθει στον φασματογράφο μάζας.

- IRMS (Isotope Ratio Mass Spectrometry), όπου αναλύονται μείγματα σταθερών ισοτόπων μέσω επαναλαμβανόμενων μετρήσεων υπό συνεχή ροή δείγματος στην αέρια φάση.
- MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight), όπου ο πρωτεϊνικός αναλύτης αναμειγνύεται με μία κρυσταλλικής φύσης μήτρα και εκτίθεται σε ακτινοβολήση με λέιζερ για την αερόλυση και τον ιονισμό του. Ο λόγος m/z υπολογίζεται από το χρόνο (*Time Of Flight*) που ξοδεύουν τα ιοντικά θραύσματα για να διανύσουν συγκεκριμένη απόσταση στον φασματογράφο μάζας.
- Tandem MS (MS/MS), όπου δύο φασματογράφοι μάζας συνδέονται μεταξύ τους με τη χρήση ενός συμπληρωματικού βήματος, προκειμένου να αυξηθεί η συνολική αναλυτική ικανότητα. Συνήθως, τα ιοντικά θραύσματα διαχωρίζονται με βάση το λόγο m/z στον πρώτο φασματογράφο, κατατέμνονται σε μικρότερα τμήματα και εισέρχονται στο δεύτερο φασματογράφο, όπου διαχωρίζονται περαιτέρω και, εν τέλει, ανιχνεύονται.
- ESI-MS (Electrospray Ionization-Mass Spectrometry), όπου παρασκευάζεται αερόλυμα από το υγρής φάσης δείγμα με την εφαρμογή εξαιρετικά υψηλής διαφοράς δυναμικού από συσκευή ηλεκτροψεκασμού.

Σκοπός της εργασίας

Η παρούσα εργασία είχε ως στόχο την υπερέκφραση του γονιδίου ANG της ανθρώπινης αγγειογενίνης (hAng) στην κυτταρική σειρά HEK293-T, ώστε να ανιχνευτούν και να μελετηθούν οι αλληλεπιδράσεις της με πρωτεΐνες του κυτταροπλάσματος.

Για την επίτευξη της υπερέκφρασης της αγγειογενίνης αξιοποιήθηκε πρωτόκολλο κυτταρικής διαμόλυνσης με χρήση του κατιονικού πολυμερούς PEI, όπως είχε διατυπωθεί σε προηγούμενη πτυχιακή εργασία που εκπονήθηκε στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Εφόσον η διαμόλυνση κρίθηκε επιτυχής και η υπερέκφραση δυνατή, τα κύτταρα υπέστησαν λύση και τα κυτταρικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν με φασματοσκοπία μάζας (Υποδομή Πρωτεομικής του Ε.ΚΕ.Β.Ε. «Αλέξανδρος Φλέμινγκ») για την εύρεση των αλληλεπιδράσεων της αγγειογενίνης με τις κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες των κυττάρων HEK293-T.

Υλικά και μέθοδοι

Υλικά

Αντιδραστήριο	Πάροχος
Acetic Acid	Sigma Aldrich
Acrylamide	SERVA
Ammonium Persulfate	SERVA
Ampicillin	Sigma
Bradford Protein Assay	Bio-Rad
Coomassie Brilliant Blue R-250	Panreac
Disodium Hydrogen Phosphate	MERCK
Dithiothreitol	SERVA
EDTA	Panreac
Ethanol, absolute	Sigma
Glycerol	Panreac
Glycine	SERVA
HEPES	Sigma
Hydrochloric Acid (HCl)	MERCK
Ilfosol 3 Film Developer	Ilford
Methanol	Sigma
N',N'-methylene-bisacrylamide	SERVA
NP-40	Sigma
NucleoSpin Plasmid Extraction Kit	Macherey-Nagel
PMSF	Applichem
POTASIAM DIHYDROGEN PHOSPHATE	MERCK
FastGene Scriptase II cDNA Synthesis Kit	NIPPON Genetics
Protease Inhibitors, Set X	MERCK
Protein Quantification Kit	Macherey-Nagel
Rapid Fixer	Ilford
Skimmed Milk Powder	RÉGILAIT
Sodium Chloride (NaCl)	ChemLab
Sodium Deoxycholate (DOC)	SERVA
Sodium Dodecyl Sulfate	SERVA-Panreac
Sodium Hydroxide (NaOH)	MERCK
Tetramethylethylenediamine (TEMED)	Research Organics
Triton X-100	MERCK
TWEEN-20	Euroclone
Water For Injection (WFI)	BIOSEP
Protein Marker	NIPPON Genetics
2-propanol	Scharlau

Αντιδραστήρια, όργανα και αναλώσιμα εργαστηρίου

Αναλώσιμα-Υλικά	Πάροχος
Fuji Medical X-Ray Film	FUJIFILM
Pasteur pipettes, borosilicate glass	Corning
Pasteur pipettes, plastic	Corning
PVDF Membrane 0.2μm	Macherey-Nagel
Whatmann 3mm paper	Whatmann
Φυγοκεντρικοί σωλήνες τύπου Eppendorf (1.5 ml)	Eppendorf
Φυγοκεντρικοί σωλήνες τύπου Falcon (50 ml, 15 ml)	SPL

Όργανα	Πάροχος
FastGene Mini Dry Bath	NIPPON Genetics
Hypercasette	Amersham Biosciences
Mini Centrifuge	NIPPON Genetics
MJ Mini Thermocycler	Bio-Rad
Shaking Incubator	Labtech
StepOne Real-Time PCR System	Applied Biosystems
Ultrasonic Processor UP 400S	Hielscher
Yrdimes Semi-Dry Blotter	Wealtec
Αναλυτικός ζυγός	Kern & Sohn GmbH
Αυτόματες πιπέτες	Gilson, Eppendorf
Επωαστήρας	Binder
Κάθετη συσκευή ηλεκτροφόρησης Mini-Protean Tetra Cell	Bio-Rad
Μετρητής pH	Metrohm
Συσκευές φυγοκέντρησης	Eppendorf

Αντιδραστήρια, όργανα και αναλώσιμα κυτταροκαλλιεργειών

Αντιδραστήρια	Πάροχος
Dimethyl Sulfoxide (DMSO)	Panreac Applichem
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), High Glucose wil L-Glutamine, 4500 mg/L D-Glucose, Sodium Pyruvate	Biosera
Fetal Bovine Serum (FBS)	Gibco
Penicillin-Streptomycin	Biosera
Polyethylenimine (PEI)	Sigma
Trypsin-PBS 0.25% w/v Mg ²⁺ , Ca ²⁺	Gibco

Αναλώσιμα-Υλικά	Πάροχος
20 cm diameter plates	SPL
Cell Scrapers	Orange Scientific
Disposable Serological Pipettes, sterile (25 ml, 10 ml, 5 ml, 2 ml)	Corning, Costar
Flasks (75 cm ² , 25cm ²), cap-filtered	Orange Scientific
Minisart syringe filters 0.2 μm	Sartorius
Pasteur pipettes, borosilicate glass	Corning
Φυγοκεντρικοί σωλήνες τύπου Eppendorf (1.5 ml)	Eppendorf
Φυγοκεντρικοί σωλήνες τύπου Falcon (50 ml, 15 ml)	SPL

Όργανα	Πάροχος
Αυτόματες πιπέτες	Gilson, Eppendorf
Συσκευή καθέτου νηματικής ροής (AV-30/70)	TELSTAR
Επωαστήρας CO ₂ (Galaxy 170S)	New Brunswick
Μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης	A. Krüss Optronic GmbH
Υδατόλουτρο	Wisebath

Κυτταρικές σειρές

HEK-293T (Human Embryonic Kidney)

HeLa (αθάνατα καρκινικά κύτταρα τραχήλου της μήτρας)

Πλασμιδιακός φορέας

pcDNA4-TO

Βακτηριακό στέλεχος

XL1 Blue (*E. coli*)

Αντισώματα

Πρωτογενή αντισώματα:

- Μονοκλωνικό έναντι hAng (C-1), προέλευση: ποντικός
- Μονοκλωνικό έναντι β-ακτίνης, προέλευση: ποντικός
- Πολυκλωνικό έναντι hAng, προέλευση: κόνικλος

Δευτερογενές αντίσωμα:

- Αντίσωμα έναντι IgG ποντικού συζευγμένο με υπεροξειδάση του χρένου (HRP), προέλευση: αίγα

PBS (Phosphate Buffered Saline, Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών), pH 7.4

130 mM NaCl

2.0 mM KCl

8.0 mM Na₂HPO₄

1.5 mM KH₂PO₄

απεσταγμένο νερό, πλήρωση έως τον τελικό απαιτούμενο όγκο
(το διάλυμα αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο και επανέρχεται σε
θερμοκρασία δωματίου πριν τη χρήση)

Πλήρες θρεπτικό μέσο (DMEM +/+)

High-glucose DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, 4.5 mg/L
glucose)

10% v/v FBS (Fetal Bovine Serum, ορός εμβρύου μόσχου)

1 % v/v Penicillin-Streptomycin (αντιβιοτικό-αντιμυκητιακό μέσο)

Κρυοπροστατευτικό μέσο

DMEM

10% v/v FBS

10% v/v DMSO (Dimethyl Sulfoxide, αντιδραστήριο για την προστασία
των κυττάρων από τις χαμηλές θερμοκρασίες και την αποφυγή
σχηματισμού κρυστάλλων κατά την ψύξη)

Μεθοδολογία-Πρωτόκολλα

Για τα πειράματα που περιελάμβαναν κύτταρα, χρησιμοποιήθηκαν οι ανθρώπινες
κυτταρικές σειρές HEK 293T και HeLa.

Η κυτταρική σειρά HEK 293T προέρχεται από την επιθηλιακή σειρά HEK (Human
Embryonic Kidney) 293, και εκφράζει επιπλέον ένα μετάλλαγμα του μεγάλου T-
αντιγόνου του ιού SV40 (Simian Vacuolating Virus 40). Τα κύτταρα αυτά αναπτύσσονται
ως μονόστιβη καλλιέργεια με προσκόλληση στον πυθμένα του δοχείου καλλιέργειας.
Οι ιδανικές συνθήκες διατήρησής τους είναι σε πλήρες (+/+) υγρό θρεπτικό μέσο σε
θερμοκρασία 37°C και σε περιβάλλον με κορεσμό 5% σε διοξείδιο του άνθρακα (CO₂).

Οι ίδιες συνθήκες εφαρμόστηκαν και για την κυτταρική σειρά HeLa (ονομάζονται έτσι
χάρη στην Henrietta Lacks, από βιοψία ιστού της οποίας απομονώθηκαν τα πρώτα
κύτταρα, αθανатоποιήθηκαν και καθιερώθηκαν ως κυτταρική σειρά), η οποία
προέρχεται από καρκινικά κύτταρα τραχήλου της μήτρας.

Όλοι οι χειρισμοί που αφορούν και τις δύο κυτταρικές σειρές πραγματοποιούνται υπό άσηπτες συνθήκες με αποστειρωμένα αναλώσιμα και εργαλεία, και σε συσκευή καθέτου νηματικής ροής. Η επιφάνεια εργασίας της συσκευής καθέτου νηματικής ροής, όπως και τα υλικά που εισέρχονται σε αυτήν, απολυμαίνεται εξωτερικά με υδατικό διάλυμα αιθανόλης 70% v/v.

Απόψυξη κυττάρων

1. Τοποθέτηση των φιαλιδίων (cryovials) που περιέχουν τα κύτταρα σε υδατόλουτρο στους 37 °C και ήπια ανάδευσή τους.
2. Μεταφορά του κυτταρικού εναιωρήματος σε δοχείο καλλιέργειας (φλάσκα), προσθήκη κατάλληλης ποσότητας θρεπτικού υλικού και ζωηρή ανάδευση με σιφώνιο για διάσπαση τυχόν συσσωματωμάτων.
3. Τοποθέτηση των κυττάρων στον επωαστήρα για 16 ώρες.
4. Απομάκρυνση του υπερκειμένου θρεπτικού (που περιέχει ακόμα το κρουπροστατευτικό και υπό συνθήκες κυτταροτοξικό DMSO) και πλύση των κυττάρων με PBS με ήπιες κινήσεις.
5. Προσθήκη φρέσκου θρεπτικού υλικού και επανατοποθέτηση της φλάσκας στον επωαστήρα.

Ανακαλλιέργεια κυττάρων σε προσκόλληση

Τα κύτταρα που αναπτύσσονται σε προσκόλληση, πολλαπλασιάζονται και καλύπτουν το διαθέσιμο χώρο στον πυθμένα της φλάσκας. Η ανάπτυξή τους, ωστόσο, σε αντίθεση με τη διαθεσιμότητα του χώρου, δε σταματά εκεί, με αποτέλεσμα, σε έλλειψη χώρου και θρεπτικών στοιχείων, τα κύτταρα να ξεκινούν να αποπίπτουν. Για την πρόληψη τέτοιων καταστάσεων είναι απαραίτητη η ανακαλλιέργεια των κυττάρων, όταν η κάλυψη της επιφάνειας του πυθμένα της φλάσκας (cell confluence) φτάσει σε ποσοστό έως 90%-100%.

1. Αναρρόφηση του θρεπτικού υλικού της καλλιέργειας.
2. Πλύση των κυττάρων με PBS και αναρρόφηση αυτού.
3. Προσθήκη της κατάλληλης ποσότητας τριψίνης (ανάλογα με το μέγεθος της φλάσκας).
4. Ανακίνηση της φλάσκας με ζωηρές, αλλά προσεκτικές κινήσεις και τοποθέτησή της είτε στην επιφάνεια του απαγωγού καθέτου νηματικής ροής (στην περίπτωση των κυττάρων HEK 293T), είτε στον επωαστήρα (στην περίπτωση των κυττάρων HeLa) για 2-3 λεπτά.
5. Έλεγχος των κυττάρων στο μικροσκόπιο (η μορφολογία τους αλλάζει από την προσκόλλησή τους, όπου παρουσιάζονται πεπλατυσμένα με

ακανθώδεις απολήξεις, προς την εναιώρησή τους, κατά την οποία υιοθετούν σφαιρικό σχήμα).

6. Προσθήκη ποσότητας πλήρους θρεπτικού μέσου, τουλάχιστον τετραπλάσιας από αυτήν της τριψίνης, ώστε αυτή να εξουδετερωθεί.
7. Πλήρης επαναιώρηση των κυττάρων με τη χρήση σιφωνίου και διαμοιρασμός τους εκ νέου σε φλάσκες που περιέχουν τον κατάλληλο όγκο πλήρους θρεπτικού υλικού (ανάλογα με την επιθυμητή αραιώση της νέας καλλιέργειας) και επιστροφή στον επωαστήρα.

Κατάψυξη κυττάρων για μελλοντική χρήση

1. Εκτέλεση των βημάτων 1-6 της παραπάνω διαδικασίας.
2. Φυγοκέντρηση των κυττάρων στις 1000 rpm για 15 λεπτά.
3. Αναρρόφηση του υπερκειμένου και επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος σε κυτοπροστατευτικό μέσο (DMEM +/-, 10% v/v DMSO).
4. Διαμοιρασμός του εναιωρήματος σε cryovials και τοποθέτησή τους στους -80 °C σε δοχείο κατάψυξης που διαβρέχεται από ισοπροπανόλη, με σκοπό την αργή και ομαλή μείωση της θερμοκρασίας (1 °C/λεπτό).
5. Προσωρινή αποθήκευση των cryovials στους -80 °C ή μακροπρόθεσμα σε δεξαμενή υγρού αζώτου.

Παροδική διαμόλυνση κυττάρων HEK293T με χρήση κατιονικού πολυμερούς PEI

Προετοιμασία Transfection Mix (οι ποσότητες αφορούν ένα τρυβλίο διαμόλυνσης με 7 εκατ. κύτταρα)

- 30 μg πλασμιδίου pcDNA4-TO (ο προστιθέμενος όγκος καθορίζεται από τη συγκέντρωση του διαθέσιμου διαλύματος πλασμιδίου. Για κάθε τρυβλίο παρασκευάζεται και το αντίστοιχο Transfection Mix, που περιέχει είτε κενό πλασμιδιακό φορέα pcDNA4-TO, είτε πλασμιδιακό φορέα pcDNA4-TO που φέρει το γονίδιο της αγγειογενίνης)
 - 60 μL PEI (20 μL PEI ανά 10 μg πλασμιδιακού DNA)
 - DMEM -/- (χωρίς FBS και Penicillin-Streptomycin) έως τελικό όγκο 3mL
1. Παρασκευή Transfection Mix. Προσθήκη του πλασμιδιακού DNA στο DMEM και ανάδευση με vortex. Προσθήκη του PEI, ήπια ανάδευση και παραμονή του Transfection Mix σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά

2. Αλλαγή θρεπτικού υλικού στα τρυβλία (17 mL DMEM, 5% FBS), χωρίς ενδιάμεση πλύση με PBS, για αποφυγή αποκόλλησης κυττάρων από τον πυθμένα
3. Προσθήκη 3 mL Transfection Mix στο αντίστοιχο τρυβλίο. **Ήπια** ανάδευση χωρίς πολλές αναταράξεις. Παρατήρηση στο μικροσκόπιο για ανίχνευση τυχόν αποκολλήσεων
4. Τοποθέτηση των τρυβλίων σε επωαστήρα (37°C, 5% CO₂) για 4 ώρες
5. Αλλαγή θρεπτικού μέσου και αντικατάστασή του με DMEM **+/+** χωρίς ενδιάμεση πλύση με PBS
6. Τοποθέτηση των τρυβλίων σε επωαστήρα για 36 ώρες

Συλλογή κυττάρων μετά το πέρας της διαδικασίας διαμόλυνσης

1. Μετά το πέρας των 36 ωρών, παρατήρηση των κυττάρων στο μικροσκόπιο και έλεγχος για σημαντικό ποσοστό τυχόν αιωρούμενων κυττάρων
2. Τοποθέτηση των τρυβλίων στον πάγο (πλέον η τήρηση των ασηπτικών συνθηκών δεν είναι απαραίτητη. Η παρακάτω διαδικασία μπορεί να πραγματοποιηθεί και σε έναν καθαρό εργαστηριακό πάγκο)
3. Προσεκτική αναρρόφηση όλου του θρεπτικού μέσου **από το πλάι του τρυβλίου**, ώστε η απώλεια κυττάρων να είναι όσο το δυνατόν πιο μικρή
4. Πλύση με 3-5 mL PBS με μαλακές κινήσεις (σε όλη τη διάρκεια της συλλογής κυττάρων, το PBS θα πρέπει να είναι δροσερό, ή και παγωμένο)
5. Προσεκτική αναρρόφηση του PBS
6. Προσθήκη περίπου 3 mL PBS και προσεκτική απόξυση των κυττάρων από τον πυθμένα του τρυβλίου με χρήση cell scraper (το scraper θα πρέπει να διατηρείται καθαρό κατά τη διάρκεια συλλογής των κυττάρων και να αντικαθίσταται με καινούριο ή να απολυμαίνεται με 70% αιθανόλη και απεσταγμένο νερό μεταξύ συλλογής κυττάρων από διαφορετικά τρυβλία, για αποφυγή επιμολύνσεων)
7. Μεταφορά των αιωρούμενων σε PBS κυττάρων σε σωλήνα Falcon. Αν χρειαστεί, προσθήκη περαιτέρω PBS και επανάληψη της απόξυσης
8. Φυγοκέντρηση των κυττάρων στις 1000 rpm για 5 λεπτά στους 4°C
9. Απομάκρυνση του PBS και προσθήκη καινούριου
10. Επαναιώρηση κυττάρων στο καινούριο PBS
11. Διαχωρισμός εναιωρήματος σε σωλήνες erpendorf
12. Φυγοκέντρηση των erpendorf στις 1000 rpm για 5 λεπτά στους 4°C
13. Απομάκρυνση του PBS
14. Αποθήκευση των κυτταρικών pellets στους -80°C

Καταμέτρηση κυττάρων με χρήση αιμοκυτταρομέτρου (πλάκα Neubauer)

Η πλάκα Neubauer είναι μια τροποποιημένη αντικειμενοφόρος πλάκα που φέρει δύο υπερυψωμένες, λείες επιφάνειες που μπορούν να υποστηρίξουν μία καλυπτρίδα. Κάθε μια από τις επιφάνειες αυτές διαθέτει ένα πλέγμα τετράγωνου σχήματος, που αποτελείται από εννέα επιμέρους τετράγωνα. Κάθε ένα από τα τέσσερα ακραία γωνιακά τετράγωνα είναι χωρισμένο σε ακόμα μικρότερα τετράγωνα, ενώ από τα υπόλοιπα τετράγωνα διέρχονται πυκνές γραμμές που σχηματίζουν ένα σταυρό. Μεταξύ του τετραγωνικού πλέγματος και της καλυπτρίδας, υπάρχει χώρος (0.1mm^3) στον οποίο διοχετεύεται (με χρήση πιπέτας) το εναιώρημα των προς μέτρηση κυττάρων.

Η συγκέντρωση των κυττάρων ορίζεται με την καταμέτρηση των κυττάρων στα τέσσερα ακραία τετράγωνα, διαίρεση του αριθμού αυτού με το 4 (για εύρεση του μέσου όρου κυττάρων σε κάθε τετράγωνο) και πολλαπλασιασμό του αριθμού αυτού με το 10^4 , καθώς και με τυχόν συντελεστή αραιώσης του κυτταρικού εναιωρήματος πριν τη διεξαγωγή της μέτρησης.

Λύση κυττάρων και προετοιμασία τους για φασματοσκοπία μάζας

Σύσταση διαλύματος λύσης:

- 4% SDS
- 100 mM Tris-HCl, pH 7.6
- 0,1 M DTT
- 1 mM PMSF

1. Προσθήκη του διαλύματος λύσης σε κάθε erpendorf με δείγμα κυττάρων
2. Ανάδευση με πιπέτα
3. Επώαση στους 95°C για 3 λεπτά
4. Κατάτμηση με υπερήχους (3 κύκλοι των 10 δευτερολέπτων σε 35% amplitude)
5. Φυγοκέντρηση στις 16.000 rcf για 5 λεπτά
6. Ανάκτηση υπερκειμένου και φύλαξή του σε καινούριο erpendorf στους 4°C

Λύση κυττάρων και προετοιμασία δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση

Σύσταση διαλύματος λύσης RIPA:

- 150 mM NaCl
 - 1% v/v διάλυμα λύσης NP-40
 - 0.5% w/v DOC (Sodium Deoxycholate)
 - 0.1% v/v SDS
 - 25 mM Tris-HCl, pH 7.4
1. Προσθήκη του διαλύματος στο δείγμα κυττάρων* (30-50 μ L ανά pellet κυττάρων)
 2. Ανάδευση με πιπέτα έως ότου να μην υπάρχουν ορατά στερεά κυτταρικά συσσωματώματα στο εναιώρημα
 3. Επώαση των δειγμάτων στον πάγο για 20 λεπτά
 4. Κατάτμηση με υπερήχους (2 κύκλοι των 10 δευτερολέπτων σε 20% amplitude)
 5. Φυγοκέντρηση του δείγματος σε 15.000 rpm για 20 λεπτά στους 4 °C
 6. Συλλογή του προκύπτοντος υπερκειμένου και τοποθέτησή του σε καινούριο, καθαρό δοχείο Eppendorf

*Το πρωτόκολλο λύσης των κυττάρων είναι ενδεικτικό. Ανάλογα με τον όγκο των κυττάρων σε μορφή pellet, μπορεί να χρειαστούν μεγαλύτεροι ή μικρότεροι χρόνοι ανάδευσης, περισσότεροι κύκλοι στη συσκευή κατάτμησης με υπερήχους, κ.ο.κ.

Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα ακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE)

Η ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE είναι μία ευρέως χρησιμοποιούμενη αναλυτική μέθοδος κατά την οποία τα πρωτεϊνικής φύσης συστατικά ενός δείγματος διαχωρίζονται βάσει του μεγέθους τους. Ο διαχωρισμός αυτός εξασφαλίζεται μέσω των αποδιατακτικών συνθηκών που δημιουργεί η παρουσία του ανιονικής φύσης απορρυπαντικού SDS. Το SDS καταργεί τις ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις των πρωτεϊνικών μορίων, καθιστώντας τα γραμμικά και προσδίδοντάς τους αρνητικό φορτίο. Προκύπτει έτσι ένας σταθερός λόγος ανιονικού φορτίου προς μάζα (καταργώντας τη συνεισφορά του φυσικού φορτίου της πρωτεΐνης στην κινητικότητά της), βάσει του οποίου τα μόρια μεταναστεύουν προς την άνοδο (θετικά φορτισμένος πόλος) του ηλεκτρικού πεδίου όπου βρίσκονται, με μοναδικό κριτήριο το μοριακό τους βάρος. Λόγω της ανάλογης σχέσης τριβής και μοριακού βάρους, όσο μεγαλύτερο είναι το μέγεθος μιας πρωτεΐνης

(επομένως όσο μεγαλύτερο είναι το μοριακό της βάρος), τόσο μικρότερη θα είναι η κινητικότητά της στο πορώδες πήκτωμα. (Laemmli, 1970).

Στις περισσότερες περιπτώσεις, η ηλεκτροφόρηση είναι ασυνεχής, καθώς το πήκτωμα συνίσταται από δύο επιμέρους πηκτές-φάσεις, αυτήν της επιστοιβάξης (stacking gel) και αυτήν του διαχωρισμού (separating-resolving gel). Στην πηκτική επιστοιβάξης τοποθετούνται αρχικά οι πρωτεΐνες και δεν υφίστανται διαχωρισμό, αλλά αντιθέτως «συμπυκνώνονται» (επιστοιβάζονται) σε μία ενιαία, μικρή ζώνη, διασφαλίζοντας έτσι ότι όλα τα συστατικά του πρωτεϊνικού δείγματος θα εισέλθουν ταυτόχρονα στην πηκτική διαχωρισμού. Εφόσον οι πηκτές πολυμεριστούν και στερεοποιηθούν στο κατάλληλο εκμαγείο, τοποθετούνται κάθετα σε ειδική δεξαμενή ηλεκτροφόρησης, που πληρώνεται με ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (running buffer) σε άμεση επαφή με το πήκτωμα. Στα ηλεκτρόδια της δεξαμενής εφαρμόζεται ρεύμα σταθερής έντασης με τη βοήθεια τροφοδοτικού, για τη διασφάλιση της αμετάβλητης αντίστασης του υλικού καθ' όλη τη διάρκεια της διαδικασίας.

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, η πηκτική μπορεί να υποστεί χρώση με διάλυμα νιτρικού αργύρου ή διάλυμα χρωστικής Coomassie Brilliant Blue R-250, ή ηλεκτρομεταφορά (transfer) σε μεμβράνη PVDF ή νιτροκυτταρίνης, για τη διεξαγωγή ανοσοαποτύπωσης κατά Western (Western blot).

Για τη δημιουργία των πρωτεϊνικών δειγμάτων πραγματοποιήθηκε λύση κυττάρων όπως περιγράφηκε παραπάνω.

Οι δύο πηκτές παρασκευάζονται με την κατάλληλη πυκνότητα, ανάλογα με το μέγεθος των πρωτεϊνών προς διαχωρισμό, και σε ποσότητες που αρμόζουν στη χωρητικότητα του εκάστοτε εκμαγείου. Η σύσταση της κάθε πηκτής του διφασικού συστήματος ηλεκτροφόρησης παρατίθεται παρακάτω.

Πηκτική επιστοιβάξης, 5% (3 ml)	Πηκτική διαχωρισμού 12% (10 ml)
2.1 mL dH ₂ O	3.3 mL dH ₂ O
0.5 mL 30% acrylamide mix (acrylamide/bis-acrylamide)	4.0 mL 30% acrylamide mix (acrylamide/bis-acrylamide)
0.38 mL Tris-HCl, pH 6.8	2.5 mL Tris-HCl, pH 8.8
0.03 mL 10% SDS	0.1 mL 10% SDS
0.03 mL 10% APS (Ammonium persulfate)	0.1 mL 10% APS (Ammonium persulfate)
0.003 mL TEMED	0.004 mL TEMED

Η πηκτή διαχωρισμού παρασκευάζεται και εισέρχεται πρώτη στο εκμαγείο και καλύπτεται από ισοπροπανόλη (ή απιονισμένο νερό) έως ότου πολυμεριστεί, προκειμένου να παραμείνει ενυδατωμένη. Η πηκτή επιστοιβάξης παρασκευάζεται και προστίθεται στο εκμαγείο μετά την αφαίρεση της ισοπροπανόλης. Σε αυτό το σημείο, στο μη πολυμερισμένο διάλυμα της πηκτής επιστοιβάξης, τοποθετείται ένα χτένι, το οποίο δημιουργεί βοθρία κατά την πήξη του διαλύματος, που θα δράσουν ως σημεία υποδοχής του προς διαχωρισμό πρωτεϊνικού δείγματος.

Μετά την εισαγωγή της πηκτής σε αυτή, η συσκευή ηλεκτροφόρησης πληρώνεται με ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (running buffer), και τα δείγματα αναμειγνύονται με κατάλληλο διάλυμα (loading buffer), θερμαίνονται στους 95 °C για τη διασφάλιση της πλήρους αποδιάταξης των πρωτεϊνών και φορτώνονται στις υποδοχές-βοθρία της πηκτής επιστοιβάξης μαζί με τον μάρτυρα μοριακού βάρους (marker). Στα ηλεκτρόδια εφαρμόζεται διαφορά δυναμικού 100-130 Volt και η ηλεκτροφόρηση έχει τόση χρονική διάρκεια, όση χρειάζεται για τον επαρκή διαχωρισμό των πρωτεϊνών των δειγμάτων (παρατηρείται το «μέτωπο» της ηλεκτροφόρησης, που σχηματίζεται από έναν έγχρωμο μικρομοριακό δείκτη που αποτελεί συστατικό του ρυθμιστικού διαλύματος φόρτωσης).

Σύσταση ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης (Running Buffer) 10X

- 25mM Tris
- 192mM Glycine
- 0.1% SDS

Το διάλυμα χρησιμοποιείται σε συγκέντρωση 1X, επομένως το διάλυμα 10X αραιώνεται με κατάλληλο όγκο απιονισμένου νερού πριν τη χρήση.

Μέθοδος ποσοτικού ελέγχου πρωτεϊνών με χρήση της μεθόδου Bradford

Η μέθοδος ποσοτικοποίησης πρωτεϊνών Bradford στηρίζεται στο γεγονός ότι το χρώμα της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250, που είναι το κύριο συστατικό του αντιδραστηρίου Bradford, αλλάζει κατά τη σύζευξη της χρωστικής με πρωτεΐνες σε αραιά όξινα διαλύματα. Η χρωστική αυτή συνδέεται σε σημεία της πρωτεΐνης που διαθέτουν βασικά και αρωματικά αμινοξέα. Το σύμπλοκο που προκύπτει, απορροφά ακτινοβολία μήκους κύματος 595nm και διαφορετικές πρωτεΐνες δίνουν διαφορετικές απορροφήσεις (Bradford, 1976).

Ανοσοαποτύπωση κατά Western (Western Blot)

Μετά τη διεξαγωγή της ηλεκτροφόρησης, στην οποία οι πρωτεΐνες μετακινούνται κατά μήκος της πηκτής παρουσία ηλεκτρικού πεδίου με βάση το μοριακό τους βάρος, οι πρωτεΐνες καθιλώνονται σε μία μεμβράνη κατασκευασμένη από κατάλληλο πολυμερές. Η μετάβαση αυτή διευκολύνεται μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων και εφαρμογής, ξανά, ηλεκτρικού πεδίου, σε μια διαδικασία που ονομάζεται ηλεκτρομεταφορά (transfer).

Η μεμβράνη, εφόσον φέρει πλέον τις προς ανάλυση πρωτεΐνες, υφίσταται επώαση με ειδικό αντίσωμα ενάντια της πρωτεΐνης που χρήζει ανίχνευσης. Δημιουργείται έτσι ένα στενά συνδεδεμένο σύμπλοκο. Η μεμβράνη υφίσταται έπειτα μία περαιτέρω επώαση με δεύτερο αντίσωμα, το οποίο αυτή τη φορά παρουσιάζει εξειδίκευση για τη σταθερή περιοχή του πρώτου αντισώματος. Το δεύτερο αντίσωμα είναι συζευγμένο με έναν παράγοντα που, υπό συνθήκες, δίνει ανιχνεύσιμο σήμα που μπορεί έπειτα να ποσοτικοποιηθεί. Συνήθως, αυτός ο παράγοντας είναι το ένζυμο υπεροξειδάση του χρένου (HRP, Horseradish Peroxidase). Το ένζυμο αυτό, παρουσία υποστρώματος υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) σε αλκαλικό περιβάλλον, καταλύει την οξείδωση της λουμινόλης η οποία μεταπίπτει σε ενεργειακά σταθερότερη κατάσταση, εκπέμποντας φωτόνια στην πορεία. Η προκύπτουσα ακτινοβολία από την εκπομπή φωτονίων έχει μήκος κύματος 428nm και μεγιστοποιείται σε ένταση εντός 5 έως 20 λεπτών μετά την προσθήκη του υποστρώματος.

Η ενεργειακή μετάπτωση μορίων με αποτέλεσμα την εκπομπή φωτός έπειτα από τη διεξαγωγή χημικής αντίδρασης, ονομάζεται χημειοφωταύγεια. Σε αυτήν στηρίζεται η ανίχνευση του σήματος που προκύπτει από την αλληλεπίδραση πρωτεΐνης – πρώτου αντισώματος – δεύτερου αντισώματος – HRP – υποστρώματος H_2O_2 . Η αποτύπωση της έντασης της χημειοφωταύγειας, επομένως και η ανίχνευση της πρωτεΐνης γίνεται με έκθεση σε ακτινογραφικό φιλμ, ή σε κατάλληλο μηχανήμα ανίχνευσης χημειοφωταύγειας.

Διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς (Transfer Buffer) 10X

- 25mM Tris
- 192mM Glycine
- 0.1% SDS

Το διάλυμα χρησιμοποιείται σε αραιώση 1X, και για την αραιώση του αρχικού διαλύματος γίνεται σε διάλυμα PBS-T 0.1% και με μεθανόλη σε ποσοστό 10% του τελικού όγκου του αραιωμένου διαλύματος.

PBS-T (Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών παρουσία απορρυπαντικού)

- 0.1% v/v Tween-20 σε διάλυμα PBS

Διάλυμα κορεσμού της μεμβράνης (Blocking Buffer)

- 5% w/v γάλα σε σκόνη σε διάλυμα PBS-T 0.1%

Το υλικό της μεμβράνης που χρησιμοποιήθηκε είναι το φθοριούχο πολυβινυλιδένιο (PVDF). Μετά την αφαίρεσή της από τη συσκευή ηλεκτροφόρησης, η πηκτή πολυακρυλαμίδης τοποθετείται σε διάλυμα μεταφοράς 1X. Για την ηλεκτρομεταφορά χρησιμοποιούνται 6 φύλλα χαρτιού Whatmann 3mm, ανάμεσα στα οποία τοποθετείται η πηκτή και η μεμβράνη PVDF, που έχει προηγουμένως κοπεί στις διαστάσεις της πηκτής και ενεργοποιηθεί σε μεθανόλη.

Τα φύλλα Whatmann και η μεμβράνη εμποτίζονται με διάλυμα μεταφοράς 1X πριν εισέλθουν σε οριζόντια συσκευή ηλεκτρομεταφοράς (Yrdimes Semi-Dry Blotter, Wealtec). Τα ηλεκτρόδια της συσκευής αυτής είναι σε μορφή οριζόντιων μεταλλικών πλακών και ανάμεσά τους τοποθετούνται τα φύλλα Whatmann, η πηκτή και η μεμβράνη PVDF. Η σειρά τοποθέτησης, από τον θετικό (+) προς τον αρνητικό (-) πόλο είναι η εξής:

3 φύλλα Whatmann → μεμβράνη PVDF → πηκτή → 3 φύλλα Whatmann

Όλα τα φύλλα Whatmann, η μεμβράνη PVDF και η πηκτή ηλεκτροφόρησης πρέπει να είναι επαρκώς εμποτισμένα με διάλυμα μεταφοράς (κατά την επιστοίβαξή τους στη συσκευή τοποθετείται επιπλέον διάλυμα μεταφοράς ανάμεσά τους), και στο σύνολό τους να είναι ελεύθερα από φυσαλίδες που θα μπορούσαν να ανακόψουν την ομαλή μεταφορά των πρωτεϊνών από την πηκτή στη μεμβράνη. Η ηλεκτρομεταφορά πραγματοποιείται σε ένταση ρεύματος 0.27mA για 39 λεπτά.

Μετά το πέρας της ηλεκτρομεταφοράς, η μεμβράνη που πλέον φέρει τις πρωτεΐνες, επωάζεται για μία ώρα σε διάλυμα κορεσμού, ώστε οι ελεύθερες θέσεις της να καλυφθούν από την καζεΐνη του γάλακτος, προς αποφυγή των μη ειδικών αλληλεπιδράσεων της μεμβράνης με το αντίσωμα. Η μεμβράνη έπειτα επωάζεται με το πρώτο αντίσωμα για 12-16 ώρες υπό ανάδευση στους 4 °C. Ακολουθούν 3 πεντάλεπτες πλύσεις με διάλυμα PBS-T, επώαση της μεμβράνης με το δεύτερο αντίσωμα για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, 3 πεντάλεπτες πλύσεις και ανίχνευση του σήματος. Επειδή η τεχνική ανίχνευσης που χρησιμοποιήθηκε εδώ ήταν αυτή του ακτινογραφικού φιλμ, η ανίχνευση γίνεται σε σκοτεινό θάλαμο. Η μεμβράνη επωάζεται βραχέως (1 min) με το αντιδραστήριο ανίχνευσης ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (ECL, Enhanced

Chemiluminescence), και τοποθετείται σε κασέτα εμφάνισης, μαζί με ένα κομμάτι φιλμ ίδιων διαστάσεων που εφάπτεται ακριβώς πάνω σε αυτήν. Στο τέλος του χρόνου έκθεσης, που καθορίζεται εμπειρικά, το φιλμ υφίσταται διαδοχική κατεργασία με φωτογραφικό διάλυμα εμφάνισης (Film Developer), νερό και φωτογραφικό διάλυμα σταθεροποίησης (Fixer), ώστε το σήμα να γίνει ορατό και το φιλμ να πάψει να είναι φωτοευαίσθητο και να σταθεροποιηθεί.

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Two-step Real-Time PCR)

Για τον προσδιορισμό της γονιδιακής έκφρασης της αγγειογενίνης, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης. Τα επίπεδα ευαισθησίας της μεθόδου είναι εξαιρετικά υψηλά, καθώς μπορεί να ανιχνεύσει μέχρι και ένα μοναδιαίο αντίγραφο ενός μεταγράφου και να βοηθήσει στον προσδιορισμό της διαφοράς έκφρασης μεταξύ δύο διαφορετικών μεταγράφων. Η διαδικασία μπορεί να πραγματοποιηθεί σε ένα (one-step) ή δύο στάδια (two-step) κατά τα οποία η σύνθεση του κλώνου συμπληρωματικού DNA (cDNA) και η ενίσχυση του προϊόντος που προκύπτει γίνονται είτε στον ίδιο δοκιμαστικό σωλήνα, είτε σε διαφορετικούς, με την αντίστοιχη εμπλοκή δύο μηχανημάτων.

Τα βήματα της διαδικασίας περιγράφονται παρακάτω:

- Σύνθεση συμπληρωματικού κλώνου DNA (cDNA)

Η σύνθεση του cDNA κλώνου πραγματοποιήθηκε σε δύο επιμέρους αντιδράσεις με το FastGene Scriptase II cDNA Synthesis kit της NIPPON Genetics, με μήτρα το RNA που απομονώθηκε με το πρωτόκολλο του TRI-Reagent. Οι ποσότητες των αντιδραστηρίων για τα δύο επιμέρους βήματα περιγράφονται στους παρακάτω πίνακες.

Αντιδραστήριο	Ποσότητα ανά αντίδραση (12.5 ml)
Ολικό RNA (ng)	1000
OligoDTs 80 μM (μl)	1
dNTPs, 2 mM each (μl)	2
Water for Injection (μl)	Πλήρωση ως τον τελικό όγκο

Αντιδραστήριο	Ποσότητα ανά σωλήνα αντίδρασης
5X FastGene Scriptase II buffer (μl)	4
DTT 0.1 M (μl)	2
RNAse Inhibitor, 40 U/μl (μl)	0.5

- Real-Time PCR

Στο βήμα αυτό μπορεί να μετρηθεί η ποσότητα των προϊόντων και αν παρακολουθηθεί σε πραγματικό χρόνο ο ρυθμός πολλαπλασιασμού ενός μορίου ενδιαφέροντος. Στο στάδιο έναρξης της διαδικασίας, οι μικρές ποσότητες των μορίων ενδιαφέροντος τα καθιστούν μη ανιχνεύσιμα. Στόχος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης είναι η ενίσχυση του σήματος μέσω του εκθετικού πολλαπλασιασμού των μορίων του προϊόντος. Με την PCR πραγματικού χρόνου μπορούμε όχι μόνο να προσδιορίσουμε ποσοτικά τον αριθμό των μορίων που προκύπτουν και να παρακολουθήσουμε την αντίδραση καθ' όλη τη διάρκεια της πορείας της, αλλά και να προσδιορίσουμε τον αριθμό των μορίων νουκλεϊκού οξέος-μήτρας που υπήρχαν στο δείγμα πριν την έναρξη της ενίσχυσης.

Για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των μορίων χρησιμοποιείται μία φθορίζουσα χρωστική (SYBR Green), η οποία προσδένεται σε κάθε νεοσυντιθέμενο μόριο, επιδεικνύοντας προτίμηση στις αύλακες δίκλωνων μορίων DNA, και η ποσοτικοποίηση του σήματος γίνεται σε σχέση με την έκφραση ενός ιδιόσυστατα εκφραζόμενου γονιδίου. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, το γονίδιο αναφοράς που χρησιμοποιήθηκε ήταν αυτό της αφυδρογονάσης της φωσφορικής γλυκεραλδεϋδης (GAPDH). Ως μήτρα της αντίδρασης χρησιμοποιήθηκε cDNA από ολικό RNA που απομονώθηκε από κύτταρα HEK 293T (πρωτόκολλο TRI-Reagent). Οι ποσότητες των αντιδραστηρίων παρουσιάζονται παρακάτω.

Αντιδραστήριο	Ποσότητα ανά αντίδραση (15 μ l)
PCR Ready Mix (μ l)	7.5
Primer, Forward (μ l)	0.075
Primer, Reverse (μ l)	0.075
cDNA (μ l)	1.5
RNAse-free Water (μ l)	5.85

Απομόνωση ολικού RNA με πρωτόκολλο TRI-Reagent

1. Φυγοκέντρηση των κυττάρων σε 3.000 rcf για 3 λεπτά στους 4 °C (εάν τα κύτταρα δεν βρίσκονται ήδη σε μορφή ιζήματος)
2. Προσθήκη 500 μ l από το TRI-Reagent και έντονη ανάδευση με πιπέτα έως τη λύση των κυττάρων, με το δείγμα να παραμένει σε θερμοκρασία δωματίου έως και 5 λεπτά.
3. Προσθήκη 50 μ l 1-βρωμο-3-χλωροπροπάνιο και έντονη ανάδευση σε vortex για 15 δευτερόλεπτα. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 15λεπτά, έως ότου επέλθει διαχωρισμός των φάσεων του διαλύματος.

4. Φυγοκέντρηση στις 12.000 rcf για 15 λεπτά στους 4 °C
5. Ανάκτηση της υδατικής φάσης σε καθαρό erpendorf και προσθήκη σε αυτήν 250 µl 2-προπανόλης
6. Φυγοκέντρηση στις 12.000 rcf για 10 λεπτά στους 4 °C
7. Αφαίρεση του υπερκλειμένου και πλύση του ιζήματος με 1 mL παγωμένης αιθανόλης 75% υπό έντονη ανάδευση σε vortex
8. Επώαση του δείγματος για 30 λεπτά στους -20 °C με την αιθανόλη 75% που προστέθηκε προηγουμένως, για να επέλθει κατακρήμνιση του RNA
9. Φυγοκέντρηση στις 12.000 rcf για 5 λεπτά στους 4 °C
10. Αφαίρεση του υπερκλειμένου και παραμονή του ιζήματος σε θερμοκρασία δωματίου έως την πλήρη εξάτμιση της αιθανόλης 75%
11. Επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος με 40 µl ddH₂O με ζωηρή ανάδευση με πιπέτα
12. Τοποθέτηση του δείγματος στους 55 °C για 10 λεπτά
13. Αποθήκευση του δείγματος στους -80 °C

Η ποιότητα της απομόνωσης και η ακεραιότητα των δειγμάτων RNA ελέγχεται με ηλεκτροφόρηση μέρους των δειγμάτων σε πηκτή αγαρόζης. Η συγκέντρωση, δε, των δειγμάτων καθορίζεται με τη βοήθεια φασματοφωτόμετρου μικρο-όγκων (συσκευή τύπου NanoDrop 2000™).

Μετασηματισμός επιδεικτικών βακτηριακών κυττάρων XL1-BLUE με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pcDNA4-TO (amp^r)* που φέρει το γονίδιο της αγγειογενίνης

1. Ελαφριά απόψυξη 100 µl κυττάρων XL1-BLUE (τοποθέτηση σε πάγο από τους -80)
2. Προσθήκη 1µl πλασμιδίου στα κύτταρα και ήπια ανάδευση
3. Επώαση για 45 δευτερόλεπτα στους 42 °C σε heat block
4. Παραμονή των κυττάρων στον πάγο για 2 λεπτά
5. Προσθήκη 900 µl αποστειρωμένου LB χωρίς αντιβιοτικό και επώαση για 1 ώρα στους 37 °C υπό ανάδευση στις 210 rpm
6. Επίστρωση τρυβλίων με LB Agar με 50 µg/mL Amp^r με 50-100 µl καλλιέργειας μετασηματισμένων, πλέον, βακτηρίων
7. Επώαση για 12-16 ώρες στους 37 °C

Υγρή καλλιέργεια μετασηματισμένων βακτηρίων XL1-BLUE (ανακαλλιέργεια σε υγρό θρεπτικό υλικό)

1. Τοποθέτηση σε σωλήνα falcon 50mL, 5mL αποστειρωμένου LB Broth 50μg/ml Amp^r
2. Επιλογή μοναδιαίας αποικίας επαρκούς μεγέθους και σχήματος από κάθε τριβλίο που έχει επωαστεί με κύτταρα XL1-BLUE, αφαίρεσή της με αποστειρωμένο tip και εμβολιασμός της υγρής καλλιέργειας
3. Τοποθέτηση της εμβολιασμένης καλλιέργειας σε επωαστήρα υπό ανάδευση για 12-16 ώρες στους 37°C στις 210 rpm

Πρωτεομική ανάλυση των δειγμάτων και επεξεργασία των δεδομένων

Τα πρωτεϊνικά δείγματα των ευκαρυωτικών κυττάρων που υπέστησαν λύση, υποβλήθηκαν σε ανάλυση με φασματογραφία μάζας. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε στην υποδομή πρωτεομικής ανάλυσης του Ινστιτούτου Μοριακής Ογκολογίας του ΕΚΕΒΕ «Αλέξανδρος Φλέμινγκ». Η τεχνική που χρησιμοποιήθηκε ήταν αυτή του ηλεκτροψεκασμού-νανοψεκασμού (electrospray ionization, ESI, nano-ESI) σε συνδυασμό με διπλή φασματομετρίας μάζας (ESI-MS/MS), όπου το πρωτεϊνικό δείγμα μετατρέπεται σε αερόλυμα με την εφαρμογή υψηλής διαφοράς δυναμικού από μία ηλεκτρική πηγή. Τα φορτισμένα θραύσματα που προκύπτουν, διέρχονται από μία παγίδα ιόντων, μέσω της οποίας αναλύονται, και τα θραύσματα που παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη αφθονία υφίστανται περαιτέρω διάσπαση με την τεχνική του κατακερματισμού με σύγκρουση (CID, Collision-Induced Dissociation) ή του κατακερματισμού με συγκρούσεις υψηλής ενέργειας (HCD, Higher energy Collisional Dissociation). Τα θραύσματα που προκύπτουν από τη δεύτερη διάσπαση αναλύονται από τον δεύτερο φασματογράφο μάζας.

Τα πρωτογενή (raw) φάσματα μαζών που προκύπτουν από την ανάλυση, υφίστανται επεξεργασία με το πακέτο λογισμικού MaxQuant (Tyanova et al., 2016). Στο λογισμικό αυτό πραγματοποιείται ανάλυση της ταυτότητας των θραυσμάτων, χρησιμοποιώντας ως οδηγό το ανθρώπινο πρωτέομα αναφοράς (human reference proteome) από τη βάση δεδομένων UNIPROT. Παράλληλα είναι δυνατή και η σχετική ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών του δείγματος. Για τις ανάγκες της συγκεκριμένης εργασίας, αξιοποιήθηκε η διαφορική ανάλυση πρωτεομικής έκφρασης ελεύθερη σήμανσης (LFQ, Label-Free Quantification), καθώς τα πρωτεϊνικά δείγματα δεν είχαν υποστεί επεξεργασία με σηματοδοτικά μόρια ή ισότοπα. Αντιθέτως, κατά την LFQ λαμβάνεται υπόψη η συνολική ένταση από το σήμα του πρόδρομου ιόντος, και εκφράζεται ως χρωματογραφική κορυφή. Η δοκιμή εκτελέστηκε σε μηχάνημα τύπου Orbitrap μετά την

πέψη των δειγμάτων με τριψίνη, και πραγματοποιήθηκαν τρεις τεχνικές επαναλήψεις για κάθε συνθήκη των δύο επαναλήψεων του πειράματος.

Η στατιστική μετα-ανάλυση των δεδομένων που αποκτήθηκαν μέσω του λογισμικού MaxQuant, πραγματοποιήθηκε μέσω του πακέτου λογισμικού Perseus (Tyanova & Cox, 2018). Κατά το χειρισμό του λογισμικού αυτού, αποκλείονται από την ανάλυση οι μη ειδικές πρωτεΐνες, τα συγκρίσιμα χαρακτηριστικά των αποτελεσμάτων ομαδοποιούνται κατάλληλα (δείγματα Control κυττάρων διαμολυσμένων με φορέα ελεύθερο από το γονίδιο της αγγειογενίνης και δείγματα κυττάρων διαμολυσμένων με φορέα που περιέχει το γονίδιο της αγγειογενίνης) και υφίστανται στατιστική ανάλυση.

Αποτελέσματα

Στην παρούσα ενότητα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις αναλυτικές δοκιμασίες κατά τη διάρκεια των πειραμάτων.

Κύτταρα HEK 293T: Διαμόλυνση, ανίχνευση πρωτεϊνών και πρωτεομική ανάλυση

Τα κύτταρα HEK 293T υπέστησαν διαμόλυνση τόσο με πλασμίδιο ελεύθερο από το γονίδιο της αγγειογενίνης, όσο και με πλασμίδιο που περιείχε το γονίδιο που κωδικοποιεί γι αυτήν. Μετά τη διεξαγωγή του πρωτοκόλλου διαμόλυνσης (για το οποίο αξιοποιήθηκε το κατιονικό πολυμερές PEI), τα κύτταρα λύθηκαν και τα υπερκείμενα διαλύματα από τα κύτταρα ελέγχθηκαν μέσω ηλεκτροφόρησης υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE) και στυπώματος κατά Western (Western blot) για τυχόν υπερέκφραση της αγγειογενίνης. Τα δείγματα έπειτα στάλθηκαν στο ΕΚΕΒΕ «Αλέξανδρος Φλέμινγκ» για πρωτεομική ανάλυση μέσω διπλής φασματοσκοπίας μάζας με χρήση ηλεκτροψεκασμού (ESI-MS/MS) και τα αποτελέσματα που προέκυψαν αναλύθηκαν μέσω των πακέτων λογισμικού MaxQuant και Perseus.

Κύτταρα HeLa: Έλεγχος της υπόθεσης ενδοκυττάρωσης της αγγειογενίνης μέσω υποδοχέα της κυτταρικής επιφάνειας

Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων της πτυχιακής εργασίας αυτής, πραγματοποιήθηκε και μία επιπλέον δοκιμή, η οποία στην αρχή της, βασίζεται στην πιθανή εσωτερίκευση της αγγειογενίνης μέσω του υποδοχέα της, που εδράζεται στην εξωτερική επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης. Για το σκοπό αυτό, καλλιεργήθηκαν κύτταρα HeLa και στο υγρό θρεπτικό υλικό που τα περιέβαλλε προστέθηκε εξωγενώς αγγειογενίνη σε μορφή ώριμης πρωτεΐνης. Ορισμένα από τα κύτταρα υπέστησαν λύση για πραγματοποίηση στυπώματος κατά Western, ενώ κάποια από τα εναπομείναντα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν σε αντικειμενοφόρες πλάκες και υπέστησαν χρώση ώστε να παρατηρηθούν σε συνεστιακό μικροσκόπιο. Το τελευταίο σκέλος του πειράματος θα πραγματοποιούταν στην αντίστοιχη υποδομή του ΕΚΕΒΕ «Αλέξανδρος Φλέμινγκ», ωστόσο η χρονική πίεση και η γενικότερη υγειονομική κρίση των τελευταίων μηνών, δεν επέτρεψαν τη διεξαγωγή του.

Στύπωμα κατά Western – κύτταρα HEK 293T και HeLa

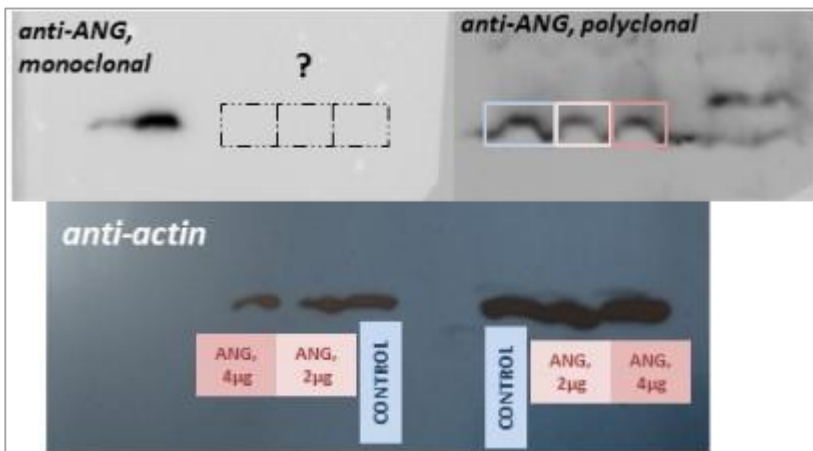
Στην ενότητα αυτή παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τα στυπώματα κατά Western από τις δύο βιολογικές επαναλήψεις της διαμόλυνσης των κυττάρων HEK 293T και από το πείραμα που περιλάμβανε την καλλιέργεια κυττάρων HeLa παρουσία ώριμης αγγειογενίνης στο θρεπτικό υλικό. Παρά τις πολλαπλές προσπάθειες βελτιστοποίησης της διαδικασίας, η υπερέκφραση της αγγειογενίνης δεν κατέστη ανιχνεύσιμη και ο έλεγχος της υπερέκφρασης ενέπεσε περισσότερο στην qPCR, χωρίς αυτό να σημαίνει ότι η συγκεκριμένη μέθοδος υποκαθιστά πλήρως μεθόδους που βασίζονται στην έκφραση πρωτεϊνών



Εικόνα 10: Αποτελέσματα εμφάνισης από την πρώτη (1η) βιολογική επανάληψη της διαμόλυνσης των κυττάρων HEK 293T.



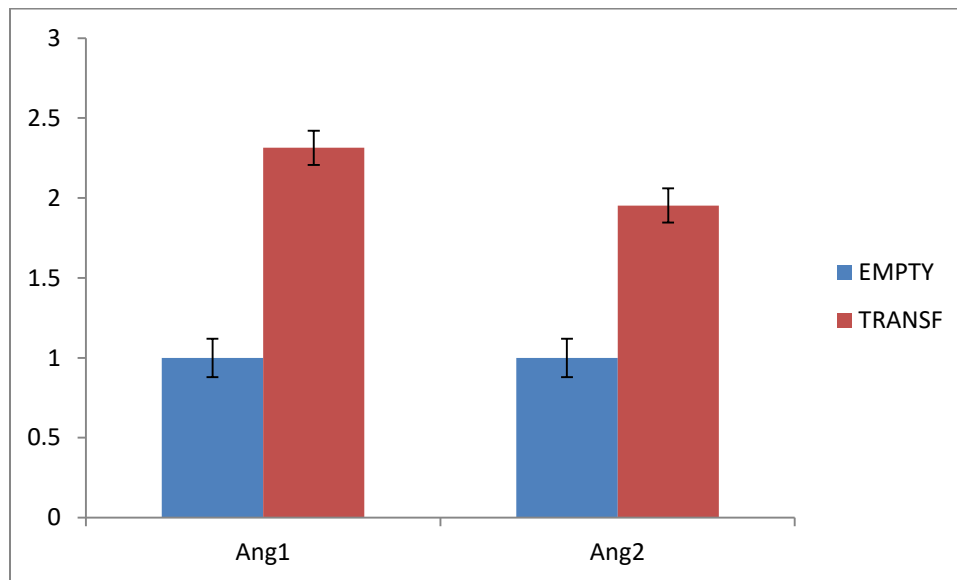
Εικόνα 11: Αποτελέσματα εμφάνισης από την δεύτερη (2η) βιολογική επανάληψη της διαμόλυνσης των κυττάρων HEK 293T



Εικόνα 11: Αποτελέσματα εμφάνισης για τα κύτταρα HeLa, στα οποία προστέθηκε εξωγενώς αγγειογενίνη σε μορφή ώριμης πρωτεΐνης, σε δύο συγκεντρώσεις, για τον έλεγχο της ενδοκυττάρωσής της μέσω του μεμβρανικού της υποδοχέα. Τα δείγματα εισήχθησαν στην πηκτή πολυακρυλαμίδης δύο φορές, και πραγματοποιήθηκε ξεχωριστή επώαση σε επιμέρους τμήματα της μεμβράνης PVDF με μονοκλωνικό και πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της αγγειογενίνης.

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (qPCR) – Κύτταρα HEK 293T

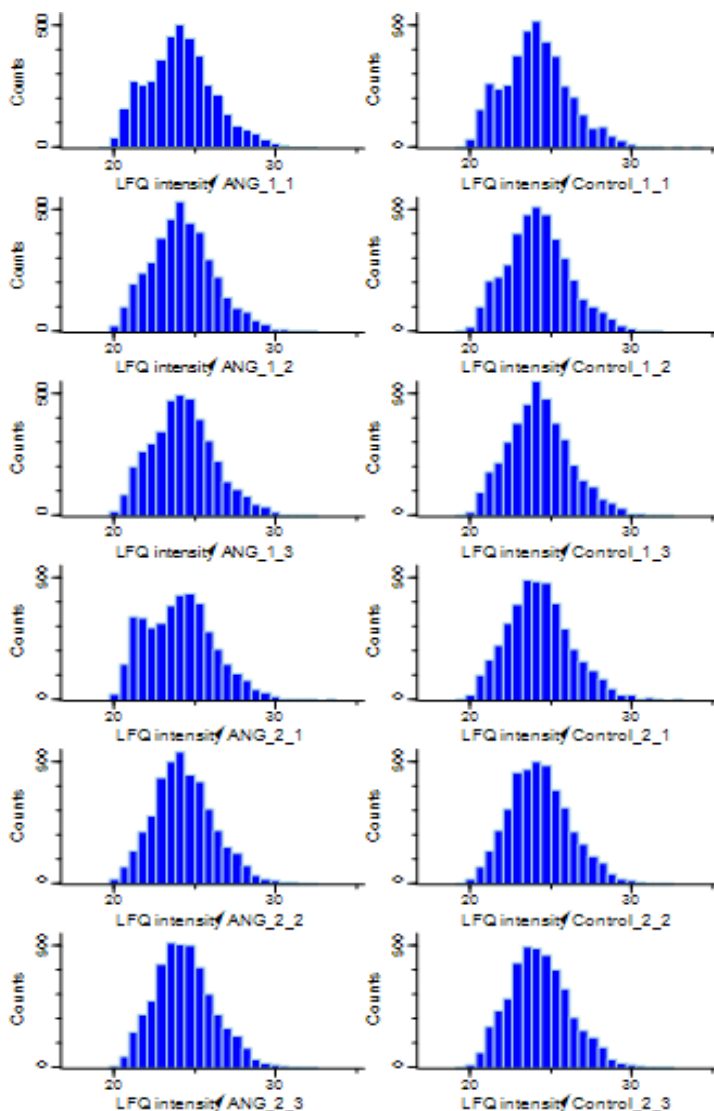
Τα αποτελέσματα της αντίδρασης qPCR για τις δύο βιολογικές επαναλήψεις του πειράματος (πρώτη επανάληψη: ιστοί με τίτλο Ang1 και δεύτερη επανάληψη: ιστοί με τίτλο Ang2) παρουσιάζονται στην Εικόνα 13. Η ένταση του σήματος του mRNA για την κωδικοποίηση της **αγγειογενίνης (TRANSF)** αυξήθηκε περίπου κατά 2.3 και 2 φορές για κάθε βιολογική επανάληψη, αντίστοιχα. Η σύγκριση πραγματοποιείται σε σχέση με την ένταση του σήματος που υπολογίστηκε αντίστοιχα από κύτταρα που είχαν διαμολυνθεί με πλασμιδιακό φορέα που **δεν περιείχε το γονίδιο κωδικοποίησης της αγγειογενίνης (EMPTY)**. Και για τις δύο επαναλήψεις δε, τα επιμέρους δείγματα συγκρίθηκαν με τα επίπεδα έκφρασης του ιδιόσυστατα εκφραζόμενου γονιδίου GAPDH. Η αύξηση της έντασης του σήματος για τα κύτταρα έπειτα από διαμόλυνση με πλασμιδιακό φορέα που περιείχε το επιθυμητό γονίδιο, παρότι ανιχνεύσιμη, δε συνιστάται να αντιμετωπιστεί ως στατιστικώς σημαντική, πολλώ δε μάλλον να ληφθεί ως κάποια ένδειξη για την επικείμενη μετάφραση του mRNA σε πρωτεΐνη.



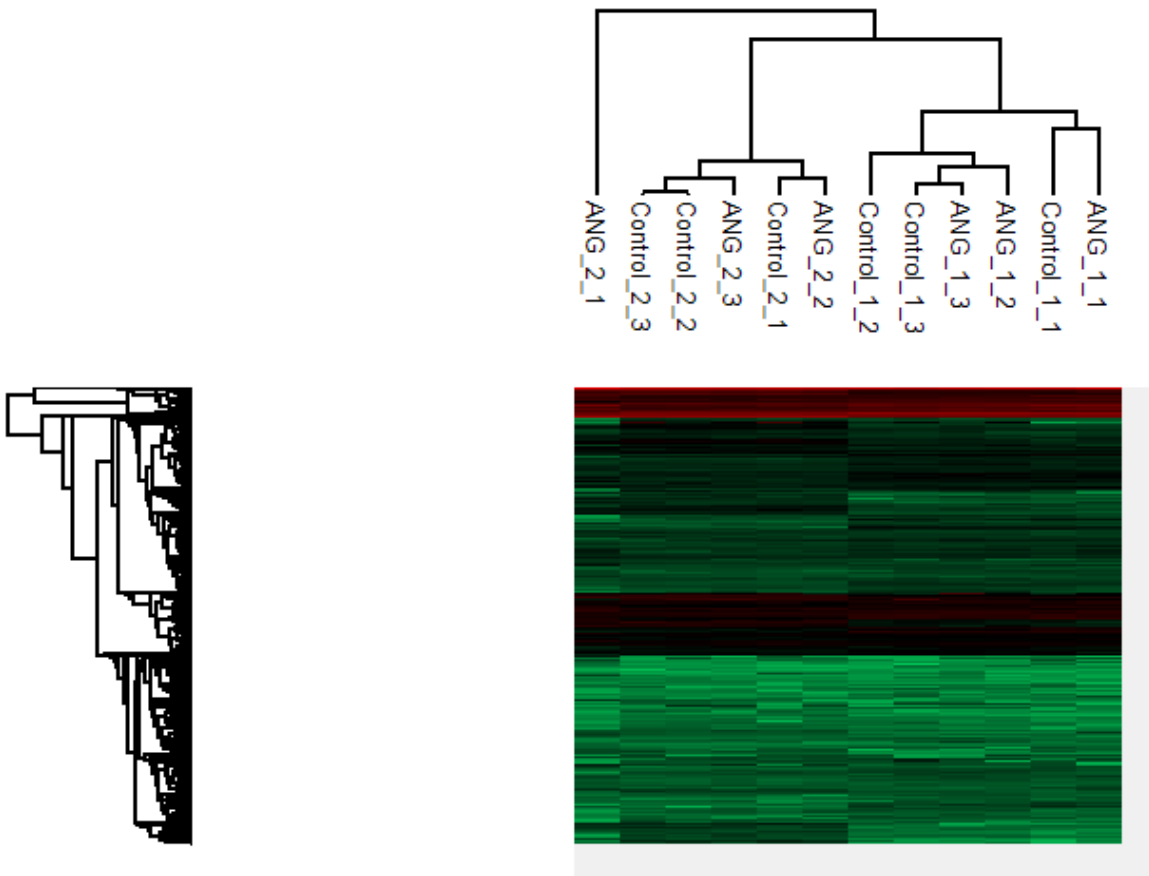
Εικόνα 12: Επίπεδα έκφρασης του mRNA ου κωδικοποιεί για την αγγειογενίνη σε κύτταρα διαμολυσμένα με το γονίδίο της και μη.

Πρωτεομική ανάλυση: Οπτικοποίηση, αξιολόγηση και ποιοτικός έλεγχος αποτελεσμάτων – Κύτταρα HEK 293T

Στα ιστογράμματα της Εικόνας 14 παρουσιάζονται οι κατανομές των εντάσεων των θραυσμάτων για κάθε τεχνική επανάληψη των πειραμάτων φασματομετρίας μάζας. Τα ιστογράμματα διαβάζονται ανά τεχνική επανάληψη (κατακόρυφα και ανά τριάδες, π.χ. ANG_1_1, ANG_1_2 και ANG_1_3). Οι κατανομές των τεχνικών επαναλήψεων είναι σχεδόν στην ολότητά τους κωδωνοειδείς (κανονικές) και όμοιες μεταξύ τους για κάθε τεχνική επανάληψη. Επομένως, οι τεχνικοί χειρισμοί των δειγμάτων είναι ομοιογενείς και θεωρούνται αξιόπιστοι. Για το λόγο αυτό, θεωρείται ασφαλής η άντληση βιολογικών συμπερασμάτων από τα παρόντα δείγματα.



Εικόνα 13: Ιστογράμματα κατανομής των εντάσεων για κάθε τεχνική επανάληψη της διαδικασίας φασματομετρίας μάζας.

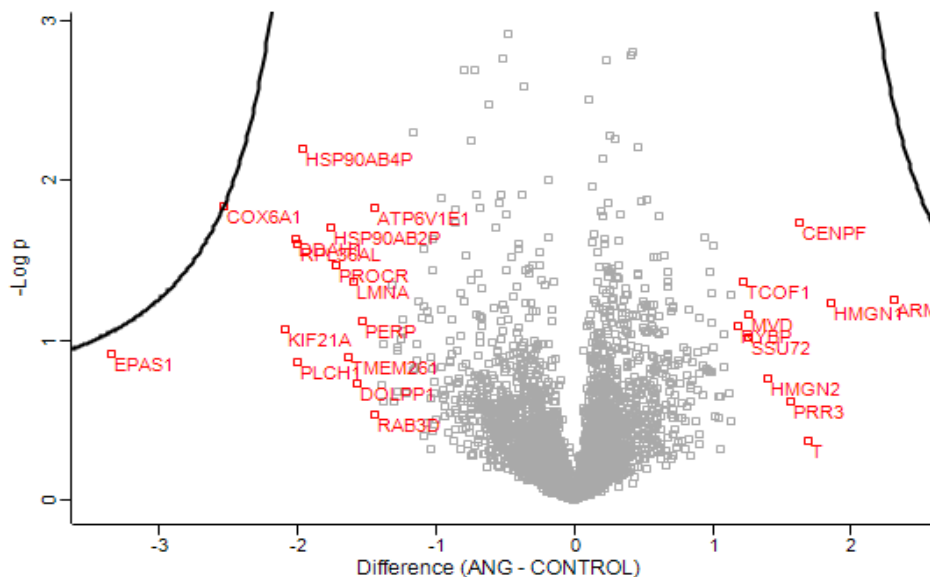


Εικόνα 14: Θερμικός χάρτης (HeatMap), όπου φαίνεται η διαφορική έκφραση των πρωτεϊνών (αυξημένη έκφραση με πράσινο χρώμα, ελαττωμένη με κόκκινο) μεταξύ των, ομαδοποιημένων, πλέον, δειγμάτων.

Οι ενδείξεις για τα βιολογικά δεδομένα του πειράματος, ωστόσο, δεν είναι ιδιαίτερα ενθαρρυντικές. Παρόλο που η τεχνική εκτέλεση και η μηχανική επαναληψιμότητα των πειραμάτων είναι άριστες, η ομαδοποίηση των τεχνικών και βιολογικών επαναλήψεων, όπως παρουσιάζεται στην εικόνα 15, μαρτυρά ότι δεν υπάρχουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των κυττάρων διαμολυσμένων με αγγειογενίνη και των κυττάρων ελέγχου. Συγκεκριμένα, όσον αφορά την ομαδοποίηση των δειγμάτων, φαίνεται να υπάρχει μεγαλύτερη ουσιαστική διαφορά στην πρωτεϊνική έκφραση μεταξύ των δύο βιολογικών επαναλήψεων του πειράματος, παρά μεταξύ των διαμολυσμένων με αγγειογενίνη κυττάρων σε σχέση με τα κύτταρα διαμολυσμένα με πλασμιδιακό φορέα ελεύθερο από αγγειογενίνη. Για το λόγο αυτό, τα αποτελέσματα διαφορικής έκφρασης πρωτεϊνών και η αναφορά σε συγκεκριμένα μόρια ενδιαφέροντος που αναλύονται στις επόμενες σελίδες είναι **αμιγώς ενδεικτικά** και συνιστάται να αναγνωσθούν με κάθε επιφύλαξη.

Πρωτεομική ανάλυση: αξιολόγηση και ανάλυση μορίων με διαφορεική έκφραση

Έπειτα από τη στατιστική επεξεργασία των δεδομένων των δειγμάτων από τα κύτταρα διαμολυσμένα με αγγειογενίνη και μη, το σύνολο των πρωτεϊνών που αναλύθηκαν με το πρόγραμμα Perseus παρουσιάζονται στα παρακάτω διαγράμματα τύπου volcano. Οι συντεταγμένες των σιγμάτων που αντιπροσωπεύουν κάθε πρωτεΐνη διαμορφώνονται ως εξής: στον άξονα x αποτυπώνεται η τιμή του δυαδικού λογαρίθμου (\log_2 Fold Change ANG/CONTROL) του λόγου της έντασης της κάθε πρωτεΐνης στα κύτταρα διαμολυσμένα με αγγειογενίνη (ANG) προς τα κύτταρα διαμολυσμένα με ελεύθερο πλασμιδιακό φορέα (CONTROL). Στον άξονα y απεικονίζεται ο αρνητικός δεκαδικός λογάριθμος της p-value, που υποδεικνύει τη στάθμη σημαντικότητας του παρατηρούμενου αποτελέσματος. Έτσι, όσο πιο ψηλά στον άξονα y βρίσκεται ένα στίγμα, τόσο πιο στατιστικά σημαντική είναι η παρουσία της πρωτεΐνης στα ειδικά δείγματα. Αντίστοιχα, όσο πιο μακριά βρίσκεται ένα στίγμα από το μηδέν στον άξονα x, τόσο στατιστικά σημαντικότερη είναι η διαφορά (Difference) στην έκφραση της εκάστοτε πρωτεΐνης στα δείγματα διαμόλυνσης με αγγειογενίνη σε σχέση με τα δείγματα ελέγχου. Ως εκ τούτου, τα στίγματα που βρίσκονται ψηλά και προς τα αριστερά (αρνητικοί αριθμοί στον άξονα x) αντιστοιχούν σε πρωτεΐνες που παρουσιάζουν ελαττωμένα επίπεδα έκφρασης στα κύτταρα διαμολυσμένα με αγγειογενίνη. Το αντίθετο ισχύει για τα στίγματα που βρίσκονται ψηλά και προς τα δεξιά (θετικοί αριθμοί στον άξονα y).



Εικόνα 16: Διάγραμμα τύπου Volcano του συνόλου των πρωτεϊνών του ανθρώπινου πρωτεόματος, των οποίων η έκφραση παρουσιάζεται αυξημένη (δεξιά) ή ελαττωμένη (αριστερά) στα κύτταρα διαμολυσμένα με αγγειογενίνη. Επισημασμένες με κόκκινο χρώμα βρίσκονται οι πρωτεΐνες με τη μεγαλύτερη διαφορά έκφρασης στα κύτταρα διαμολυσμένα με αγγειογενίνη.

Παρακάτω παρουσιάζονται ορισμένες πρωτεΐνες που παρουσίασαν σημαντική διαφορά έκφρασης στους δύο τύπους δειγμάτων και εντοπίζονται σε τμήματα του κυτοσολίου, της πλασματικής μεμβράνης και του κυτταροσκελετού. Αυτές είναι οι:

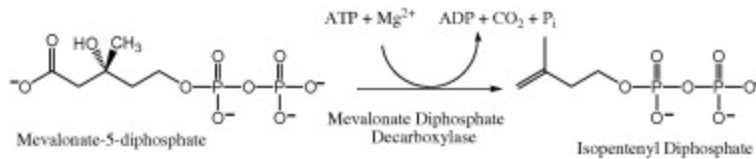
Centromere Protein F (CENPF), με αυξημένη έκφραση στα διαμολυσμένα κύτταρα (πυρήνας και κυτταροσκελετός)

Η CENPF αποτελεί βασικό μέρος του σκελετού του πυρήνα κατά την φάση G2 της μίτωσης, όπου παρατηρείται έντονη πρωτεϊνοσύνθεση, στο τέλος της οποίας η CENPF σχηματίζει μέρος του κινητοχώρου, ενός συμπλέγματος πρωτεϊνών που επιτρέπει την προσκόλληση του κεντρομερούς ενός ζεύγους αδελφών χρωματίδων στους μικροσωληνίσκους. Επίσης, ως πρωτεΐνη του κυτταροσκελετού, κατέχει σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό βλεφαρίδων στην επιφάνεια των κυττάρων, με ρόλο διευκόλυνσης της κυτταρικής μετακίνησης, διαφοροποίησης και σηματοδότησης (Waters et al., 2015). Υπερέκφραση της CENPF παρουσία αγγειογενίνης μπορεί να εξηγήσει ως ένα βαθμό τους αυξημένους ρυθμούς κυτταρικής διαίρεσης και προσκόλλησης προς σχηματισμό νέων αγγείων ή και όγκων, καθώς η CENPF

- πιθανώς δρα και ως αναστολέας των ογκοκατασταλτικών πρωτεϊνών τσέπης (rocket proteins), στις οποίες περιλαμβάνεται η πρωτεΐνη του ρετινοβλαστώματος και
- εφόσον υπερεκφράζεται, αποτελεί κακό προγνωστικό δείκτη σε διάφορους τύπους καρκίνου

Mevalonate Diphosphate Decarboxylase (MDD), με αυξημένη έκφραση στα διαμολυσμένα κύτταρα (κυτταρόπλασμα)

Η αποκαρβοξυλάση του διφωσφορικού μεβαλονικού είναι ένα ένζυμο-κλειδί στο μονοπάτι του μεβαλονικού, στο τέλος του οποίου παράγονται δομικά στοιχεία απαραίτητα για τη σύνθεση βιομορίων όπως η χοληστερόλη, η βιταμίνη K και όλες οι στεροειδείς ορμόνες. Το ένζυμο MVD καταλύει το τελευταίο βήμα του μονοπατιού, αυτό της μετατροπής του 5-διφωσφορικού μεβαλονικού (MVAPP) σε διφωσφορικό ισοπεντενύλιο (IPP) μέσω ATP-εξαρτώμενης αποκαρβοξυλίωσης (Voynova et al., 2008). Οι παράγοντες που συμμετέχουν στο μονοπάτι του μεβαλονικού εμφανίζουν συχνά αυξημένα επίπεδα έκφρασης σε αρκετούς τύπους καρκίνου, καθώς τα προϊόντα του μονοπατιού είναι απαραίτητα για τη συγκρότηση των κυτταρικών μεμβρανών, καθώς και ποικίλες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις πρωτεϊνών που σχετίζονται με την ανάπτυξη όγκων (Bathaie et al., 2017).



Εικόνα 157: Η αντίδραση που καταλύεται από το ένζυμο MDD.

Outer Dynein Arm-Docking Complex Subunit 2 (ODAD2), με αυξημένη έκφραση σε διαμολυσμένα κύτταρα (κυτταροσκελετός)

Η ODAD2 πιστεύεται ότι εμπλέκεται στην κίνηση των βλεφαρίδων και των μαστιγίων, καθώς φαίνεται να εντοπίζεται στα αξονήματα των μαστιγίων και στις βάσεις των βλεφαρίδων στα κύτταρα του αναπνευστικού. Κύτταρα με μεταλλάξεις στο γονίδιο της ODAD2 εμφανίζουν από διαταραχές στη συχνότητα και ένταση της κίνησης έως και πλήρη ακινησία των δομών αυτών (Hjeij et al., 2013).

p53 Apoptosis Effector Related to PMP-22, με ελαττωμένη έκφραση σε διαμολυσμένα κύτταρα (πλασματική μεμβράνη)

Ο PERP διαδραματίζει βασικό ρόλο στη διατήρηση της ομοιόστασης και της ακεραιότητας του στρωματοποιημένου επιθηλίου, ρυθμίζοντας τη διακυτταρική προσκόλληση όντας συστατικό των διακυτταρικών δεσμοσωμάτων. Αποτελεί, επίσης, άμεσο μεταγραφικό στόχο του ογκοκατασταλτικού αποπτωτικού παράγοντα p53 καθώς η επαγωγή του PERP συνδέεται με πρότυπα p53-εξαρτώμενης απόπτωσης. Η αμινοξική ακολουθία του PERP παρουσιάζει ομοιότητες με αυτήν της PMP-22/gas3, μιας μεμβρανικής πρωτεΐνης που εμπλέκεται σε κληρονομικές νευροπάθειες όπως η νόσος Charcot-Marie-Tooth (Attardi et al., 2000). Ελάττωση των επιπέδων έκφρασης του παράγοντα PERP πιθανώς παραπέμπουν σε μία κατάσταση ελαττωμένης απόπτωσης και έντονου κυτταρικού πολλαπλασιασμού και αναδιατάξεων, ενδεχομένως κατά τη διάρκεια της αγγειογένεσης, μιας και οι αντιαποπτωτικές ιδιότητες της αγγειογενίνης είναι γνωστές.

Συζήτηση

Η αγγειογενίνη είναι ένας ισχυρός αγγειογενετικός παράγοντας με πλειοτροπικές δράσεις. Η ρόλοι που κατέχει σε ποικίλα βιολογικά μονοπάτια, τόσο σε φυσιολογικές, όσο και σε παθολογικές καταστάσεις, την καθιστούν εξαιρετικά γοητευτική από ερευνητικής άποψης. Η πλήρης διαλεύκανση της ταυτότητάς δεν έχει, ωστόσο επιτευχθεί.

Στην παρούσα εργασία έγινε απόπειρα επαγωγής υπερέκφρασης της αγγειογενίνης σε κύτταρα HEK 293T μέσω πρωτοκόλλου διαμόλυνσης με τη χρήση πλασμιδιακού φορέα που περιείχε το γονίδιο της αγγειογενίνης, σε συνδυασμό με το κατιονικό πολυμερές PEI. Μετά τη διαμόλυνση, τα κύτταρα υπέστησαν λύση και πραγματοποιήθηκε στύπωμα κατά Western για την ανίχνευση των επιπέδων έκφρασης της αγγειογενίνης σε πρωτεϊνικό επίπεδο. Η υπερέκφραση δεν κατέστη ανιχνεύσιμη μέσω του στυπώματος, επομένως πραγματοποιήθηκε PCR πραγματικού χρόνου για την ποσοτικοποίηση της έκφρασης του μεταγράφου του γονιδίου της αγγειογενίνης. Η αύξηση της έκφρασης του mRNA της αγγειογενίνης ήταν μεν ανιχνεύσιμη, προφανώς ωστόσο ήταν ανεπαρκής για τη μετέπειτα μετάφρασή του σε πρωτεΐνη. Τα δείγματα των κυτταρικών εκχυλισμάτων αναλύθηκαν με διπλή φασματομετρία μάζας στο EKEBE «Αλέξανδρος Φλέμινγκ» και τα αποτελέσματα που προέκυψαν αναλύθηκαν με τα πακέτα λογισμικού MaxQuant και Perseus. Χαρακτηριστική, ωστόσο, ήταν η απώλεια της αγγειογενίνης καθαυτής από το σύνολο των πρωτεϊνών που αναλύθηκαν, πράγμα που αφαιρεί από την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων της πρωτεομικής ανάλυσης. Υποθέτοντας ότι η διαμόλυνση ήταν επιτυχής, αναλύθηκαν ορισμένες πρωτεΐνες που παρουσίασαν αυξημένη έκφραση στα διαμολυσμένα κύτταρα. Οι πρωτεΐνες αυτές κατέχουν ρόλους στη βιοσύνθεση του μεβαλονικού (MDD), τη διαμόρφωση βλεφαρίδων και του κινητοχώρου κατά τη μίτωση (CENPF) και την κίνηση των δομών των μαστιγίων και των βλεφαρίδων (ODAD2), ενώ μια πρωτεΐνη με ελαττωμένη έκφραση στα διαμολυσμένα κύτταρα αφορά ένα αποπτωτικό μονοπάτι, καθώς και τη ρύθμιση της διακυτταρικής προσκόλλησης (PERP).

Οι πρωτεΐνες αυτές, αν το πειραματικό πρωτόκολλο βελτιωθεί τόσο, ώστε να κατασταθεί επαναλήψιμο, μπορούν να δώσουν παραπάνω στοιχεία για τις αλληλεπιδράσεις της αγγειογενίνης, καθώς και μια πιο πλήρη εικόνα για ορισμένες από τις δράσεις τις και τα μονοπάτια όπου συμμετέχει. Για το λόγο αυτό, προτείνεται η επανάληψη των πειραμάτων και η κατάλληλη τροποποίηση των πρωτοκόλλων σε κάθε βήμα τους, προκειμένου να επιτευχθεί επαναληψιμότητα. Προτείνεται, επίσης, και η δοκιμή εναλλακτικού τρόπου διαμόλυνσης, με χρήση χλωριούχου ασβεστίου (CaCl_2) αντί για το πολυμερές PEI, καθώς και η ανίχνευση τυχόν υπερέκφρασης μέσω ανοσοφθορισμού και παρατήρησης σε συνεστιακό μικροσκόπιο. Σε περίπτωση

αποτυχίας των παραπάνω, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί διαφορετική κυτταρική σειρά για τη διεξαγωγή των πειραμάτων, όπως για παράδειγμα η *EA.hy.926*, που στο παρελθόν έχει δώσει ουσιαστικά αποτελέσματα σε πειράματα πρωτεομικής ανάλυσης των αλληλεπιδράσεων της αγγειογενίνης.

Ένα ενδιαφέρον ερώτημα που προκύπτει από τα πειράματα της παρούσας εργασίας, και θα μπορούσε να αποτελέσει αντικείμενο μελλοντικής πτυχιακής εργασίας, είναι η ενδοκυτταρική μοίρα του γονιδίου της αγγειογενίνης, εφόσον αυτό εισέλθει στο κύτταρο μέσω της διαμόλυνσης με πλασμιδιακό φορέα. Λόγω του ρόλου της ως ριβονουκλεάση, η αγγειογενίνη μπορεί να αντιμετωπίζεται ως τοξίνη από τα κύτταρα-δέκτες, και γι αυτό να επέρχεται ενεργητική αποβολή της από τον ενδοκυτταρικό χώρο μέσω εξωκυττάρωσης. Η αντιμετώπισή της, επομένως, από το κύτταρο και τους μηχανισμούς που στρατολογούνται θα μπορούσε να παράσχει περαιτέρω πληροφορίες για τη φύση και τη δράση του μορίου αυτού.

Η μελέτη της επίδρασης της αγγειογενίνης θα μπορούσε, επίσης, να μελετηθεί με προσέγγιση αντίθετη από αυτήν που ακολουθήθηκε στην παρούσα εργασία. Η έκφραση του γονιδίου της αγγειογενίνης θα μπορούσε, δηλαδή, να σιγηθεί μέσω πρωτοκόλλου RNA παρεμβολής (RNAi). Ωστόσο αυτή τη φορά, τα κύτταρα που θα υπόκειντο στην τεχνική αυτή, θα ήταν κύτταρα που εκφράζουν την αγγειογενίνη ιδιόσυστατα και σε αφθονία. Ένας τέτοιος κυτταρικός τύπος είναι τα κύτταρα του ηπατικού ιστού.

Βιβλιογραφία

- Aslam, B., Basit, M., Nisar, M. A., Khurshid, M., & Rasool, M. H. (2017). Proteomics: Technologies and Their Applications. *Journal of Chromatographic Science*, 55(2), 182–196. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmw167>
- Attardi, L. D., Reczek, E. E., Cosmas, C., Demicco, E. G., McCurrach, M. E., Lowe, S. W., & Jacks, T. (2000). PERP, an apoptosis-associated target of p53, is a novel member of the PMP-22/gas3 family. *Genes & Development*, 14(6), 704–718.
- Bathaie, S. Z., Ashrafi, M., Azizian, M., & Tamanoi, F. (2017). Mevalonate Pathway and Human Cancers. *Current Molecular Pharmacology*, 10(2), 77–85. <https://doi.org/10.2174/1874467209666160112123205>
- Benjamin, L. E., Golijanin, D., Itin, A., Pode, D. & Keshet, E. Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal. *J. Clin. Invest.* **103**, 159–165 (1999).
- Bradford, M. M. (1976). *A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding*. 7.
- Bradshaw, W. J., Rehman, S., Pham, T. T. K., Thiyagarajan, N., Lee, R. L., Subramanian, V., & Acharya, K. R. (2017). Structural insights into human angiogenin variants implicated in Parkinson's disease and Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Scientific Reports*, 7(1), 41996. <https://doi.org/10.1038/srep41996>
- Bryan, T. M. (2019). Mechanisms of DNA Replication and Repair: Insights from the Study of G-Quadruplexes. *Molecules*, 24(19). <https://doi.org/10.3390/molecules24193439>
- Bussolino, F., A. Mantovani, and G. Persico, *Molecular mechanisms of blood vessel formation*. Trends Biochem Sci, 1997. **22**(7): p. 251-6.
- Carmeliet, P., & Jain, R. K. (2000). Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*, 407(6801), 249–257. <https://doi.org/10.1038/35025220>
- Carmeliet, P. (2005). Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature*, 438(7070), 932–936. <https://doi.org/10.1038/nature04478>
- Chatzileontiadou, D. S. M., Tsirkone, V. G., Dossi, K., Kassouni, A. G., Liggri, P. G. V., Kantsadi, A. L., Stravodimos, G. A., Balatsos, N. A. A., Skamnaki, V. T., & Leonidas, D. D. (2016). The ammonium sulfate inhibition of human angiogenin. *FEBS Letters*, 590(17), 3005–3018. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12335>
- Cocchi F, DeVico AL, Lu W, Popovic M, Latinovic O, Sajadi MM, Redfield RR, et al. (2012) Soluble factors from T cells inhibiting X4 strains of HIV are a mixture of beta chemokines and RNases. *Proc Natl Acad Sci USA* 109: 5411–5416.
- Danino, Y. M., Even, D., Ideses, D., & Juven-Gershon, T. (2015). The core promoter: At the heart of gene expression. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1849(8), 1116–1131. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2015.04.003>
- Domon, B., & Aebersold, R. (2006). Mass Spectrometry and Protein Analysis. *Science*, 312(5771), 212–217. <https://doi.org/10.1126/science.1124619>

Fan, T. P., Jaggar, R., & Bicknell, R. (1995). Controlling the vasculature: Angiogenesis, anti-angiogenesis and vascular targeting of gene therapy. *Trends in Pharmacological Sciences*, 16(2), 57–66. [https://doi.org/10.1016/s0165-6147\(00\)88979-8](https://doi.org/10.1016/s0165-6147(00)88979-8)

Fett, J. W., Strydom, D. J., Lobb, R. R., Alderman, E. M., Bethune, J. L., Riordan, J. F., & Vallee, B. L. (1985). Isolation and characterization of angiogenin, an angiogenic protein from human carcinoma cells. *Biochemistry*, 24(20), 5480–5486. <https://doi.org/10.1021/bi00341a030>

Folkman, J. (1971). Tumor Angiogenesis: Therapeutic Implications. *New England Journal of Medicine*, 285(21), 1182–1186. <https://doi.org/10.1056/NEJM197111182852108>

Fu H, Feng J, Liu Q, Sun F, Tie Y, Zhu J, Xing R, et al. (2009) Stress induces tRNA cleavage by angiogenin in mammalian cells. *FEBS Lett*, 583:437–442.

Goldman, E. (1907). The growth of malignant disease in man and the lower animals with special reference to the vascular system. *Lancet* 2, 1236–1240.

Heikkinen J, Mottonen M, Komi J, Alanen A, Lassila O.(2003) Phenotypic characterization of human decidual macrophages. *Clin Exp Immunol* , 131: 498–505.

Han, X., Aslanian, A., & Yates, J. R. (2008). Mass Spectrometry for Proteomics. *Current Opinion in Chemical Biology*, 12(5), 483–490. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2008.07.024>

Hjeij, R., Lindstrand, A., Francis, R., Zariwala, M. A., Liu, X., Li, Y., Damerla, R., Dougherty, G. W., Abouhamed, M., Olbrich, H., Loges, N. T., Pennekamp, P., Davis, E. E., Carvalho, C. M. B., Pehlivan, D., Werner, C., Raidt, J., Köhler, G., Häffner, K., ... Omran, H. (2013). ARMC4 Mutations Cause Primary Ciliary Dyskinesia with Randomization of Left/Right Body Asymmetry. *American Journal of Human Genetics*, 93(2), 357–367. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2013.06.009>

Hooper, L.V., et al., (2003) *Angiogenins: a new class of microbicidal proteins involved in innate immunity*. *Nat Immunol*. 4(3): p. 269-73.

Hosaka S, Shah MR, Barquin N, Haines GK, Koch AE. (1995) Expression of basic fibroblast growth factor and angiogenin in arthritis. *Pathobiology*, 63: 249–256.

Hu G, Riordan JF, Vallee BL. (1994) Angiogenin promotes invasiveness of cultured endothelial cells by stimulation of cell-associated proteolytic activities. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91: 12096–12100.

Hu G, Xu C, Riordan JF. (2000) Human angiogenin is rapidly translocated to the nucleus of human umbilical vein endothelial cells and binds to DNA. *J Cell Biochem*, 76: 452–462.

Idriss, N. K., Sayed, S., Zakhary, M. M., & Hassen, H. A. (2015). Relationship of angiogenin to pathophysiology of diseases. *Comparative Clinical Pathology*, 24(2), 229–239. <https://doi.org/10.1007/s00580-013-1837-y>

Ivanov, P., Emara, M. M., Villen, J., Gygi, S. P., & Anderson, P. (2011). Angiogenin-induced tRNA fragments inhibit translation initiation. *Molecular Cell*, 43(4), 613–623. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.06.022>

Kieran D, Sebastia J, Greenway MJ, King MA, Connaughton D, Concannon CG, Fenner B, Hardiman O, Prehn JH. (2008) Control of motoneuron survival by angiogenin. *J Neurosci.*; 28:14056–14061.

Koga K, Osuga Y, Tsutsumi O, Yano T, Yoshino O, Takai Y, Matsumi H, et al.(2001) Demonstration of angiogenin in human endometrium and its enhanced expression in endometrial tissues in the secretory phase and the decidua. *J Clin Endocrinol Metab*, 86: 5609–5614.

- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Lambrechts, D., Storkebaum, E., & Carmeliet, P. (2004). VEGF: Necessary to prevent motoneuron degeneration, sufficient to treat ALS? *Trends in Molecular Medicine*, 10(6), 275–282. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2004.04.004>
- Landt S, Mordelt K, Schwidde I, Barinoff J, Korlach S, Stoblen F, Lichtenegger W, et al. (2011) Prognostic significance of the angiogenic factors angiogenin, endoglin and endostatin in cervical cancer. *Anticancer Res*, 31: 2651–2655.
- Lee FS, Vallee BL. (1989) Characterization of ribonucleolytic activity of angiogenin towards tRNA. *Biochem Biophys Res Commun*, 161: 121–126.
- Lee SH, Kim KW, Min KM, Kim KW, Chang SI, Kim JC. (2014) Angiogenin reduces immune inflammation via inhibition of TANK-binding kinase 1 expression in human corneal fibroblast cells. *Mediators Inflamm* 2014: 861435.
- Leland, P., Staniszewski, K., Park, C., Kelemen, B. R., & Raines, R. (2002). The ribonucleolytic activity of angiogenin. *Biochemistry*. <https://doi.org/10.1021/BI0117899>
- Leonidas DD, Shapiro R, Allen SC, Subbarao GV, Veluraja K, Acharya KR. (1999) 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 tumour growth. *J Mol Biol*, 285: 1209–1233
- Li, S., Shi, X., Chen, M., Xu, N., Sun, D., Bai, R., Chen, H., Ding, K., Sheng, J., & Xu, Z. (2019). Angiogenin promotes colorectal cancer metastasis via tRNA production. *International Journal of Cancer*, 145(5), 1395–1407. <https://doi.org/10.1002/ijc.32245>
- Li S, Yu W, Kishikawa H, Hu GF. (2010) Angiogenin prevents serum withdrawal-induced apoptosis of P19 embryonal carcinoma cells. *FEBS J*, 277: 3575–3587.
- Lixin, R., Efthymiadis, A., Henderson, B., & Jans, D. A. (2001). Novel Properties of the Nucleolar Targeting Signal of Human Angiogenin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 284(1), 185–193. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.4953>
- Marek-Trzonkowska N, Kwieczynska A, Reiwier-Gostomska M, Kolinski T, Molisz A, Siebert J. (2015) Arterial hypertension is characterized by imbalance of pro-angiogenic versus anti-angiogenic factors. *PLoS One*, 10: e0126190.
- Matousek J, Soucek J, Riha J, Zankel TR, Benner SA. (1995) Immunosuppressive activity of angiogenin in comparison with bovine seminal ribonuclease and pancreatic ribonuclease. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 112: 235–241
- Mazurek, R., Dave, J. M., Chandran, R. R., Misra, A., Sheikh, A. Q., & Greif, D. M. (2017). Vascular cells in blood vessel wall development and disease. *Advances in Pharmacology (San Diego, Calif.)*, 78, 323–350. <https://doi.org/10.1016/bs.apha.2016.08.001>
- Mthembu, N., Mbita, Z., Hull, R., & Dlamini, Z. (2017). Abnormalities in alternative splicing of angiogenesis-related genes and their role in HIV-related cancers. *HIV/AIDS: Research and Palliative Care, Volume 9*. <https://doi.org/10.2147/HIV.S124911>

- Musolino, C., et al.,(2004) *Levels of soluble angiogenin in chronic myeloid malignancies: clinical implications*. *Eur J Haematol*, . **72**(6): p. 416-9.
- Neubauer-Geryk J, Kozera GM, Wolnik B, Szczyrba S, Nyka WM, Bieniaszewski L. (2012) Angiogenin in middle-aged type 1 diabetes patients. *Microvasc Res* 2012, 84: 387–389.
- Pan SC, Wu LW, Chen CL, Shieh SJ, Chiu HY. Angiogenin expression in burn blister fluid: implications for its role in burn wound neovascularization. *Wound Repair Regen* 2012, 20: 731–739.
- Peng Y, Li L, Huang M, Duan C, Zhang L, Chen J.(2014) Angiogenin interacts with ribonuclease inhibitor regulating PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in bladder cancer cells. *Cell Signal* , 26: 2782–2792.
- Poole, T. J., & Coffin, J. D. (1989). Vasculogenesis and angiogenesis: Two distinct morphogenetic mechanisms establish embryonic vascular pattern. *Journal of Experimental Zoology*, 251(2), 224–231. <https://doi.org/10.1002/jez.1402510210>
- Prehn, J. H. M., & Jirström, E. (2020). Angiogenin and tRNA fragments in Parkinson’s disease and neurodegeneration. *Acta Pharmacologica Sinica*, 41(4), 442–446. <https://doi.org/10.1038/s41401-020-0375-9>
- Pyatibratov MG, Kostyukova AS.(2012)New insights into the role of angiogenin in actin polymerization. *Int Rev Cell Mol Biol* , 295: 175–198.
- Rosenberg, H. F. (2008). RNase A Ribonucleases and Host Defense: An Evolving Story. *Journal of Leukocyte Biology*, 83(5), 1079–1087. <https://doi.org/10.1189/jlb.1107725>
- Russo N, Nobile V, Di Donato A, Riordan JF, Vallee BL. (1996) The C-terminal region of human angiogenin has a dual role in enzymatic activity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93: 3243–3247.
- Rybak SM, Vallee BL. (1988) Base cleavage specificity of angiogenin with *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli* 5S RNAs. *Biochemistry* , 27: 2288–2294.
- Sadagopan, S., Valiya Veetil, M., Paudel, N., Bottero, V., & Chandran, B. (2011). Kaposi’s Sarcoma-Associated Herpesvirus-Induced Angiogenin Plays Roles in Latency via the Phospholipase C γ Pathway: Blocking Angiogenin Inhibits Latent Gene Expression and Induces the Lytic Cycle. *Journal of Virology*, 85(6), 2666–2685. <https://doi.org/10.1128/JVI.01532-10>
- Saikia M, Krokowski D, Guan BJ, Ivanov P, Parisien M, Hu GF, Anderson P, et al. (2012) Genome-wide identification and quantitative analysis of cleaved tRNA fragments induced by cellular stress. *J Biol Chem* , 287: 42708–42725.
- Savaryn, J. P., Toby, T. K., & Kelleher, N. L. (2016). A Researcher’s Guide to Mass Spectrometry-Based Proteomics. *Proteomics*, 16(18), 2435–2443. <https://doi.org/10.1002/pmic.201600113>
- Selitsky SR, Baran-Gale J, Honda M, Yamane D, Masaki T, Fannin EE, Guerra B, et al. Small tRNA-derived RNAs are increased and more abundant than microRNAs in chronic hepatitis B and C. *Sci Rep* 2015, 5: 7675.
- Senger, D. R., & Davis, G. E. (2011). Angiogenesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(8). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005090>

Sheng, J., Yu, W., Gao, X., Xu, Z., & Hu, G.-F. (2014). Angiogenin stimulates ribosomal RNA transcription by epigenetic activation of the ribosomal DNA promoter. *Journal of Cellular Physiology*, 229(4), 521–529. <https://doi.org/10.1002/jcp.24477>

Shu, J.-J. (2017). A new integrated symmetrical table for genetic codes. *Bio Systems*, 151, 21–26. <https://doi.org/10.1016/j.biosystems.2016.11.004>

Skorupa A, King MA, Aparicio IM, Dussmann H, Coughlan K, Breen B, Kieran D, et al. (2012) Motoneurons secrete angiogenin to induce RNA cleavage in astroglia. *J Neurosci*, 32: 5024–5038.

Soncin F, Shapiro R, Fett JW.(1994) A cell-surface proteoglycan mediates human adenocarcinoma HT-29 cell adhesion to human angiogenin. *J Biol Chem* , 269: 8999–9005.

Sorrentino, S. *et al.* (1992) Eosinophil -derived neurotoxin and human liver ribonuclease: Identity of structure and linkage of neurotoxicity to nuclease activity. *J. Biol. Chem.* **267**, 14859-14865.

Strydom DJ. (1998) The angiogenins. *Cell Mol Life Sci* , 54: 811–824.

Suzumori N, Zhao XX, Suzumori K. (2004) Elevated angiogenin levels in the peritoneal fluid of women with endometriosis correlate with the extent of the disorder. *Fertil Steril*, 82: 93–96.

Tyanova, S., & Cox, J. (2018). Perseus: A Bioinformatics Platform for Integrative Analysis of Proteomics Data in Cancer Research. In L. von Stechow (Ed.), *Cancer Systems Biology* (Vol. 1711, pp. 133–148). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7493-1_7

Tyanova, S., Temu, T., & Cox, J. (2016). The MaxQuant computational platform for mass spectrometry-based shotgun proteomics. *Nature Protocols*, 11(12), 2301–2319. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.136>

Voynova, N. E., Fu, Z., Battaile, K. P., Herdendorf, T. J., Kim, J.-J. P., & Miziorko, H. M. (2008). Human mevalonate diphosphate decarboxylase: Characterization, investigation of the mevalonate diphosphate binding site, and crystal structure. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 480(1), 58–67. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2008.08.024>

Waters, A. M., Asfahani, R., Carroll, P., Bicknell, L., Lescai, F., Bright, A., Chanudet, E., Brooks, A., Christou-Savina, S., Osman, G., Walsh, P., Bacchelli, C., Chappier, A., Vernay, B., Bader, D. M., Deshpande, C., O’ Sullivan, M., Ocaka, L., Stanescu, H., ... Beales, P. L. (2015). The kinetochore protein, *CENPF*, is mutated in human ciliopathy and microcephaly phenotypes. *Journal of Medical Genetics*, 52(3), 147–156. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2014-102691>

Wei S, Gao X, Du J, Su J, Xu Z. (2011)Angiogenin enhances cell migration by regulating stress fiber assembly and focal adhesion dynamics. *PLoS One*, 6: e28797.

Worrall, J. A., & Luisi, B. F. (2007). Information available at cut rates: Structure and mechanism of ribonucleases. *Current Opinion in Structural Biology*, 17(1), 128–137. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2006.12.001>

Zhang, Z., Wu, S., Stenoien, D. L., & Paša-Tolić, L. (2014). High-throughput proteomics. *Annual Review of Analytical Chemistry (Palo Alto, Calif.)*, 7, 427–454. <https://doi.org/10.1146/annurev-anchem-071213-020216>