

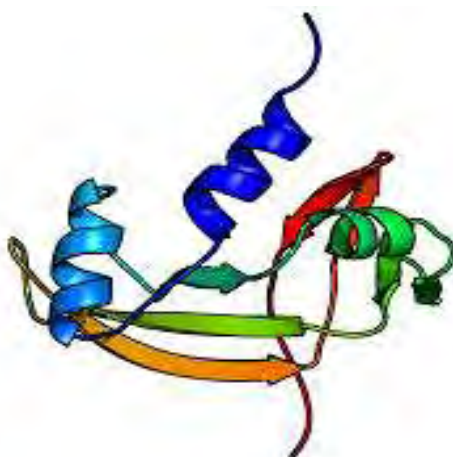


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ – ΜΟΡΙΑΚΗ
ΓΕΝΕΤΙΚΗ, ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ»

Αναστολείς της ανθρώπινης αγγειογενίνης (hAng) ως εν
δυνάμει ογκοκατασταλτικά φάρμακα

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΙΩΑΝΝΗΣ Θ. ΑΛΕΒΙΖΑΚΗΣ



ΛΑΡΙΣΑ 2014

Τριμελής επιτροπή

Δημήτριος Δ. Λεωνίδας, Αν. Καθηγητής

Μαρία Κοντού, Επίκ. Καθηγήτρια

Νικόλαος Μπαλατσός, Επίκ. Καθηγητής

Το πειραματικό μέρος της παρούσας εργασίας πραγματοποιήθηκε εν μέρει στο εργαστήριο Δομικής Βιολογίας και Χημείας του Ινστιτούτου Οργανικής και Φαρμακευτικής Χημείας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών και εν μέρει στο Εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας.

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη της τριμελούς επιτροπής τόσο για την ανάθεση σε μένα της παρούσης εργασίας όσο και για τη συνεισφορά τους στην πραγματοποίησή της. Ιδίως δε, ευχαριστώ την Δρα Β. Σκαμνάκη για την άμεση υποστήριξη της στην διεξαγωγή του πειραματικού τμήματος της εργασίας αρχικά στο Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω το προσωπικό του εργαστηρίου Δομικής Βιολογίας και Χημείας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών καθώς και του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του τμήματος μας για τη συνεργασία τους.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η αγγειογενίνη είναι μέλος της υπερικογένειας των ριβονουκλεασών με ιδιαίτερη εξειδίκευση υποστρώματος, αλλά ποικίλες λειτουργικές δυνατότητες. Η αγγειογενίνη είναι ένα φυσιολογικό συστατικό στον ορό του αίματος και ανιχνεύεται και σε αγγειακές δομές που δεν υφίστανται αύξηση. Ωστόσο, σε κάποιες φυσιολογικές αλλά και παθολογικές καταστάσεις τα επίπεδα της αυξάνουν, προάγοντας την αγγειογένεση. Ως εκ τούτου, η αγγειογένεση είναι ένα κοινό χαρακτηριστικό όσον αφορά την παθοφυσιολογία της αγγειογενίνης. Ιδίως σε κακοήθειες παρατηρούνται υψηλά επίπεδα αγγειογενίνης. Η μελέτη της αγγειογενίνης έχει επομένως ιδιαίτερο ενδιαφέρον και από κλινική άποψη, τόσο ως διαγνωστικός και προγνωστικός δείκτης σε κακοήθειες όσο και ως στόχος φαρμάκων - αναστολέων αυτής ως πιθανών χημειοθεραπευτικών παραγόντων. Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε ετερόλογη έκφραση της ανθρώπινης αγγειογενίνης και απομόνωση αυτής.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Εισαγωγή	3
Πειραματικό μέρος	14
Αποτελέσματα	22
Συζήτηση	27
Βιβλιογραφία	31

• Εισαγωγή

Ο άνθρωπος όπως και κάθε άλλος ζωντανός οργανισμός πλήττεται από μια πλειάδα ασθενειών τόσο από εξωγενείς παράγοντες όσο και από ενδογενείς. Με την πρόοδο της επιστήμης έχουμε κατανοήσει αρκετούς από τους μηχανισμούς που εμπλέκονται στην εκδήλωση αυτών των παθολογικών καταστάσεων, μια εκ των οποίων είναι και οι νεοπλασματικές ασθένειες. Από τους παράγοντες που έχουν ανακαλυφθεί και ταυτοποιηθεί ως προς την συμβολή τους στην εκδήλωση μετάστασης κακοηθειών είναι και η αγγειογενίνη. Η παρουσία κάποιου παράγοντα που να προωθεί την αγγειογένεση είχε πρωτοαναφερθεί ήδη από το 1971 (Judah Folkman et al, 1971) ενώ η παρουσία του υπήρχε ήδη στη σκέψη του Goldman από το 1907 (Ribatti, 2004). Ο δε συσχετισμός μεταξύ όγκου και αγγειογένεσης χρονολογείται ήδη από το 1865 και τον πατέρα της παθολογοανατομίας Virchow (Ribatti, 2004).

1.α Αγγειογένεση

Αγγειογένεση καλείται η διαδικασία δημιουργίας αιμοφόρων αγγείων. Η πρώτη καταγραφή του συμβάντος ανήκει στον Σκοτσέζο χειρουργό John Hunter ο οποίος στην «Πραγματεία» του (Treatise το όνομα του έργου) που εκδόθηκε το 1794 αναφέρει «Εν συντομία, οποτεδήποτε η φύση διενεργεί σημαντικές λειτουργίες, και αυτές είναι εσπευσμένες, τότε το κυκλοφορικό σύστημα βρίσκεται μεγεθυμένο σε σημαντικό βαθμό». Ο όρος αγγειογένεση δεν αναφέρεται στο έργο του Hunter, ωστόσο αυτός ήταν ο πρώτος που αναγνώρισε ότι η αγγειογένεση ακολουθεί τον βασικό νόμο του Αριστοτέλη περί φύσης «η μορφή ακολουθεί την λειτουργία». Η σύγχρονη ιστορία του όρου ξεκινά με το έργο του Judah Folkman, ο οποίος υπέθεσε και εξέδωσε το 1971 ότι η ανάπτυξη του όγκου είναι εξαρτώμενη από την αγγειογένεση (Thomas et al., 2010).

Το καρδιαγγειακό σύστημα είναι το πρώτο που αναπτύσσεται στο έμβρυο. Η κοίλη επιφάνεια του κυκλοφορικού που έρχεται σε επαφή με το αίμα είναι μια μονή στοιβάδα ενδοθηλιακών κυττάρων που προέρχονται από το μεσόδερμα. Οι αιμαγγειοβλάστες διαφοροποιούνται από βλαστοκύτταρα του μεσοδέρματος και μετατρέπονται σε αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα και αγγειοβλάστες. Η νεοαγγειογένεση είναι ο de novo σχηματισμός αιμοφόρων αγγείων από αγγειοβλάστες και συμβαίνει σε εξωεμβρυικούς και ενδοεμβρυικούς ιστούς του εμβρύου. Πρόκειται για μια δυναμική διαδικασία που εμπεριέχει αλληλεπιδράσεις κυττάρου-κυττάρου και κυττάρου-εξωκυττάριας μήτρας καθοδηγούμενες χωρικά και χρονικά από παράγοντες ανάπτυξης και μορφογόνα.

Η αγγειογένεση εκβλάστησης και η αγγειογένεση διαχωρισμού συμβαίνουν τόσο στα έμβρυα όσο και στα ενήλικα άτομα. Η αγγειογένεση εκβλάστησης είναι περισσότερο κατανοητή λόγω της ανακάλυψης της 200 χρόνια πριν σε αντίθεση με την αγγειογένεση διαχωρισμού που ανακαλύφθηκε από τον Burti περίπου 2 δεκαετίες πριν. Όπως υποδηλώνει το όνομα η αγγειογένεση εκβλάστησης χαρακτηρίζεται από εκβλαστήσεις

αποτελούμενες από ενδοθηλιακά κύτταρα τα οποία αναπτύσσονται προς την κατεύθυνση κάποιου αγγειογενετικού ερεθίσματος (όπως πχ του VEGF-A). Η διαδικασία αυτή μπορεί να προσθέσει αιμοφόρα αγγεία σε τμήματα ιστών που προηγουμένως στερούνταν αιμοφόρων αγγείων. Από την άλλη πλευρά η αγγειογένεση διαχωρισμού περιλαμβάνει το σχηματισμό αιμοφόρων αγγείων μέσω μιας διαχωριστικής διαδικασίας κατά την οποία στοιχεία των περιβαλλόντων ιστών εισβάλλουν σε προϋπάρχοντα αγγεία, σχηματίζοντας στήλες δια-αγγειακού ιστού που επεκτείνονται. Πιστεύεται ότι και οι δύο τύποι αγγειογένεσης συμβαίνουν σε όλους τους ιστούς και σε όλα τα όργανα.

Υπάρχουν πλείστοι παράγοντες που δύνανται να επηρεάσουν την αγγειογένεση θετικά (αγγειογενετικοί) είτε αρνητικά (αντιαγγειογενετικοί)(Papetti & Herman, 2002)

Αγγειογενετικοί Παράγοντες	Αντιαγγειογενετικοί Παράγοντες
VEGF	Αρρεστίνη
PIGF	Κουνστατίνη
FGF-1 , FGF-2	Τμήματα κολλαγόνου
HARP	EFC-XV
PDGF	Ενδορεπελίνη
HGF/SF	Ενδοστατίνη
TGF- α	Τμήματα ινδονεκτίνης
TGF- β	Φιμπουλίνη
EGF	Θρομβοσπονδίνη-1 και -2
IGF-1	Τουμστατίνη
TNF- α	Ιντερφερόνες
IL-8	Ιντερλευκίνες
IL-3	PEDF
Προσταγλαδίνη E1, E2	Παράγοντας αιμοπεταλίων-4
COX-2	Αγγειοστατίνη
Αγγειογενίνη	Αγγειοθρομβίνη III
Οιστρογόνα	2-Μεθοξυοιστραδιόλη
Προλιφερίνη	PEX
Τμήματα υαλουρονικού οξέος	Τμήματα προλακτίνης
Ολιγοσακχαρίτες	sFLT-1
Ερυθροποιητίνη	TMPs
G-CSF	Τροπονίνη-1
GM-CSF	Βασοστατίνη
VCAM-1	Plasminogen kringle-5
E-σελεκτίνη	
NO	
Αγγειοποιητίνη-1	

Πίνακας 1.1 Ρυθμιστές αγγειογένεσης



Εικόνα 1.1 Θέση γονιδίου ANG

1.β. Η αγγειογενίνη

Η αγγειογενίνη (ή όπως είναι το πλήρες όνομά της: αγγειογενίνη, ριβονουκλεάση, RNAase A οικογένεια, 5) είναι μια μικρή πρωτεΐνη 123 αμινοξέων η οποία προάγει την δημιουργία νέων αιμοφόρων αγγείων. Το κωδικό της όνομα είναι ANG και το γονίδιο που την κωδικοποιεί βρίσκεται στην περιοχή 14q11.1-q11.2 του χρωμοσώματος 14. Έχει την ικανότητα να υδρολύει μόρια t-RNA γεγονός που επηρεάζει την πρωτεϊνοσύνθεση και να αλληλεπιδρά με το DNA (Xu, Tsuji, Riordan, & Hu, 2003)(Tello-Montoliu, Patel, & Lip, 2006). Το γονίδιο αυτό και το γονίδιο που κωδικοποιεί τη ριβονουκλεάση 4 μοιράζονται τους ίδιους εκκινητές και τα εξώνια του 5' άκρου αλλά με εναλλακτικό μάτισμα παράγονται 2 ξεχωριστά μετάγραφα που κωδικοποιούν τις 2 αυτές πρωτεΐνες

Εικόνα 1.2 3D Δομή Αγγειογενίνης (Leonidas et al.,1999)



1.γ. Δράση

Η αγγειογενίνη είναι η βασική πρωτεΐνη που εμπλέκεται στην διαδικασία της αγγειογένεσης τόσο σε φυσιολογικές συνθήκες όσο και στην ανάπτυξη όγκων. Αλληλεπιδρά με λεία μυϊκά κύτταρα και με ενδοθηλιακά με αποτέλεσμα την κυτταρική μετανάστευση, εισβολή, τον πολλαπλασιασμό και το σχηματισμό των σωληνοειδών δομών (Gao & Xu, 2008). Η αγγειογενίνη συνδέεται στην ακτίνη των λείων μυϊκών καθώς και των ενδοθηλιακών κυττάρων και σχηματίζει σύμπλοκα που ενεργοποιούν πρωτεολυτικούς καταρράκτες, οι οποίοι ρυθμίζουν την παραγωγή πρωτεασών και πλασμίνης οι οποίες αποδομούν μόρια λαμινίνης και φιβρονεκτίνης της βασικής μεμβράνης (Tello-Montoliu et al., 2006). Η αποδόμηση της βασικής μεμβράνης και του εξωκυττάριου χώρου επιτρέπει στα ενδοθηλιακά κύτταρα να διεισδύσουν και να μεταναστεύσουν εντός του περιαγγειακού ιστού (Gao & Xu, 2008). Τα μονοπάτια μεταγωγής σήματος που ενεργοποιούνται από τις αντιδράσεις την Αγγειογενίνης με την

Natural variations

<input type="checkbox"/>	Natural variant	12	1	F → S in ALS9. Ref.30		VAR_044145
<input type="checkbox"/>	Natural variant	20	1	P → S in ALS9. Ref.28 Ref.30		VAR_044146
<input type="checkbox"/>	Natural variant	36	1	Q → L in ALS9; reduced ribonucleolytic activity; low angiogenic activity; reduced mitogenic activity; wild type far-UV CD spectra. Ref.27 Ref.29		VAR_044147
<input type="checkbox"/>	Natural variant	41	1	K → E in ALS9; reduced ribonucleolytic activity. Ref.27 Ref.29		VAR_044148
<input type="checkbox"/>	Natural variant	41	1	K → I in ALS9; loss of angiogenic activity; reduced ribonucleolytic activity; retains nuclear translocation. Ref.27 Ref.28 Ref.29		VAR_044149
<input type="checkbox"/>	Natural variant	52	1	S → N in ALS9; loss of angiogenic activity; reduced ribonucleolytic activity; unable to translocate to the nucleus. Ref.28		VAR_044150
<input type="checkbox"/>	Natural variant	55	1	R → K in ALS9; marginally reduced ribonucleolytic activity; wild type far-UV CD spectra. Ref.27 Ref.29		VAR_044151
<input type="checkbox"/>	Natural variant	63	1	C → W in ALS9; reduced ribonucleolytic activity; low angiogenic activity; reduced mitogenic activity; reduced thermal stability. Ref.27 Ref.29		VAR_044152
<input type="checkbox"/>	Natural variant	64	1	K → I in ALS9; reduced ribonucleolytic activity; low angiogenic activity; reduced mitogenic activity; moderate reduction of thermal stability. Ref.28 Ref.27 Ref.29		VAR_044153
<input type="checkbox"/>	Natural variant	70	1	I → V in some ALS9 patients; pathogenicity uncertain; reduced ribonucleolytic activity; moderate reduction of thermal stability. Ref.27 Ref.29 Ref.30		VAR_044154
<input type="checkbox"/>	Natural variant	84	1	K → E. Ref.2 Corresponds to variant rs17560 [dbSNP Ensembl].		VAR_013148
<input type="checkbox"/>	Natural variant	136	1	P → L in ALS9; loss of angiogenic activity; reduced ribonucleolytic activity; unable to translocate to the nucleus. Ref.28		VAR_044155
<input type="checkbox"/>	Natural variant	137	1	V → I in ALS9. Ref.30		VAR_044156
<input type="checkbox"/>	Natural variant	138	1	H → R in ALS9. Ref.30		VAR_044157

Experimental info

<input type="checkbox"/>	Mutagenesis	29	1	R → A: Significantly decreases binding affinity for RNH1. Ref.13 Ref.15		
<input type="checkbox"/>	Mutagenesis	32	1	H → A: Significantly decreases binding affinity for RNH1. Ref.12 Ref.15		
<input type="checkbox"/>	Mutagenesis	36	1	Q → A: Slightly decreases binding affinity for RNH1. Ref.12 Ref.15		
<input type="checkbox"/>	Mutagenesis	64	1	K → Q: Significantly decreases binding affinity for RNH1. Ref.12 Ref.13 Ref.15		
<input type="checkbox"/>	Mutagenesis	92	1	N → A: Slightly decreases binding affinity for RNH1. Ref.12 Ref.15		
<input type="checkbox"/>	Mutagenesis	109 – 110	2	GG → RR: Significantly decreases binding affinity for RNH1. Ref.15		
<input type="checkbox"/>	Mutagenesis	132	1	E → A: Slightly decreases binding affinity for RNH1. Ref.12 Ref.15		
<input type="checkbox"/>	Mutagenesis	140	1	D → H, S or A: 15- to 18-fold increase in RNase activity. Ref.15 Ref.21		
<input type="checkbox"/>	Mutagenesis	141	1	Q → G: Over 18-fold increase in RNase activity. Ref.15 Ref.21		
<input type="checkbox"/>	Mutagenesis	143 – 144	2	IF → AA: 3- to 5-fold increase in RNase activity. Ref.15		
<input type="checkbox"/>	Sequence conflict	59	1	L → P in AAH62698. Ref.7		

Εικόνα 1.3 Φυσικές παραλλαγές και μεταλλάξεις της Ang

κυτταρική μεμβράνη των ενδοθηλιακών κυττάρων παράγουν εξωκυττάριο σήμα σχετιζόμενο με την κινάση $\frac{1}{2}$ (ERK $\frac{1}{2}$) και με πρωτεϊνική κινάση B / Akt. Η ενεργοποίηση αυτών των πρωτεϊνών οδηγεί στην εισβολή της βασικής μεμβράνης και στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό που σχετίζεται με την περαιτέρω διαδικασία της αγγειογένεσης. Το σημαντικότερο βήμα στην διαδικασία της αγγειογένεσης είναι η μετατόπιση της Ang στον πυρήνα του κυττάρου. Η Ang προκαλεί ενίσχυση της μεταγραφής του rRNA μέσω της πρόσδεσής της σε CT πλούσιες περιοχές στο συνδετικό στοιχείο αγγειογενίνης (ABE) που βρίσκεται ανοδικά της περιοχής του rRNA και ενεργοποιεί και άλλους παράγοντες αγγειογένεσης.

Η αμινοξική αλληλουχία της Ang είναι ταυτόσημη κατά 33% με την αλληλουχία της βόειας παγκρεατικής ριβονουκλεάσης A (Gao & Xu, 2008). Η Ang έχει τις ίδιες γενικές καταλυτικές ιδιότητες όπως η RNase A: διασπά κατά προτίμηση την 3' πλευρά του των πυριμιδινών και ακολουθεί ένα μηχανισμό διαφωσφορυλίωσης/υδρόλυσης. Αν και το καταλυτικό κέντρο της RNase A είναι συντηρημένο στην αγγειογενίνη εντούτοις η αγγειογενίνη διασπά τα υποστρώματα RNA 105-106 φορές λιγότερο αποτελεσματικά από ό,τι η RNase A (Leland, Staniszewski, Park, Kelemen, & Raines, 2002). Ο λόγος για

αυτή την αναποτελεσματικότητα είναι ένα κατάλοιπο γλουταμίνης (Glu117), το οποίο εμποδίζει τη θέση πρόσδεσης του υποστρώματος στο ενεργό κέντρο της πρωτεΐνης. Απομάκρυνση αυτού του αμινοξέος μέσω μεταλλάξης αυξάνει την δραστικότητα της αγγειογενίνης 11 έως 30 φορές. Παρά τη χαμηλή της τιμή η ενζυμική δραστικότητα της Ang είναι απολύτως απαραίτητη για τη βιολογική της δράση: μεταλλάξεις των καταλυτικών αμινοξέων His13 και His114 μειώνει τη ριβονουκλεολυτική της δραστικότητα κατά 10.000 φορές και καταργεί σχεδόν εντελώς την αγγειογενετική της δράση (Shapiro & Vallee, 1989).

Η ενζυματική δράση και η ικανότητα αγγειογένεσης της Ang αναστέλλονται πλήρως από τον ανθρώπινο πλακουντιακό αναστολέα RNAασης hRi ο οποίος είναι μια πρωτεΐνη 50-kDa πλούσια σε επαναλαμβανόμενες λευκίνες η οποία σχηματίζει σύμπλοκο με την Ang (Iyer, Holloway, & Acharya, 2013).

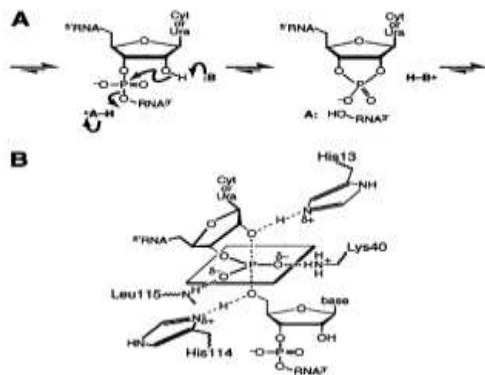


FIGURE 6: (A) Putative mechanism of the transphosphorylation reaction catalyzed by angiogenin. "B" is His13, and "A" is His114. (B) Putative structure of the transition state during the transphosphorylation reaction catalyzed by angiogenin. The structure is based on the three-dimensional structure of crystalline angiogenin (56), and is by analogy to the putative structure of the transition state during the transphosphorylation reaction catalyzed by ribonuclease A (17).

Εικόνα 1.4 Δράση της αγγειογενίνης (Leland et al., 2002)

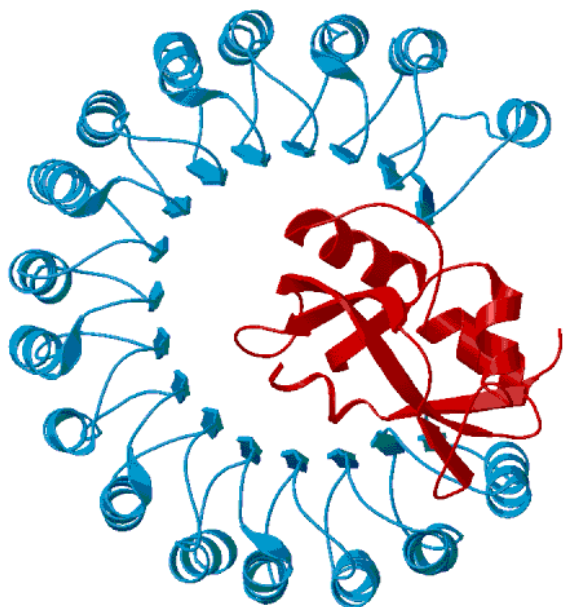
1.δ Καταλυτικό κέντρο

Η RNase A περιέχει 3 κεντρικά κέντρα σύνδεσης του RNA: την περιοχή P₁ που περιλαμβάνει τα κατάλοιπα His-13, Lys-40 και His-114 (όπου συμβαίνει η σχάση του φωσφοδιεστερικού δεσμού), την περιοχή B₁ που περιλαμβάνει το κατάλοιπο Thr-44 (όπου συμβαίνει η δέσμευση της πυριμιδίνης του νουκλεοτιδίου με το οξυγόνο του 3' άκρου) και την περιοχή B₂ (όπου συμβαίνει η σύνδεση της βάσης του νουκλεοτιδίου με το οξυγόνο στο 5' άκρο). Στην ANG η περιοχή P₁ είναι απολύτως συντηρημένη (Russo, Acharya, Vallee, & Shapiro, 1996). Η περιοχή B₁ εμφανίζει μερική παρεμπόδιση από το Gln-117 και αυτός είναι ο λόγος για τη χαμηλότερη συγγένεια του υποστρώματος στην περιοχή αυτή. Η περιοχή B₂ είναι αυτή μερικώς συντηρημένη.

1.ε. Αναστολείς

Η ANG έχει προσελκύσει εδώ και αρκετά χρόνια το ενδιαφέρον πολυάριθμων ερευνητικών κέντρων εξαιτίας του γεγονότος πως η βιολογική της δράση εξαρτάται απόλυτα από την ενζυμική της δραστηριότητα. Επομένως, αναστολείς ή μεταλλάξεις που παρεμποδίζουν τη ριβονουκλεολυτική της δραστηριότητα ταυτόχρονα εμποδίζουν και την αγγειογενετική της δράση επιβραδύνοντας την ανάπτυξη των όγκων (Kao et al., 2002) Γίνονται λοιπόν μελέτες αναστολής με στόχο την χαρτογράφηση της εξειδίκευσης του καταλυτικού της κέντρου αλλά και της διαλεύκανσης του καταλυτικού της μηχανισμού. Αρωγοί στην εύρεση των κατάλληλων αναστολέων, στέκονται τα δεδομένα μελετών που αφορούν την RNase A, με την οποία η ANG μοιράζεται πολλά κοινά δομικά χαρακτηριστικά.

Στον άνθρωπο ο κύριος αναστολέας της αγγειογενίνης είναι το μόριο ριβονουκλεάση RNH1. Πρόκειται για μια πρωτεΐνη μεγέθους 50 kDa που παράγεται από το γονίδιο RHN1 το οποίο βρίσκεται στην θέση 11p15.5 του χρωμοσώματος 11. Είναι μέρος μιας οικογένειας πρωτεϊνικών κυτταροπλασματικών αναστολέων RNAσης που εντοπίζονται σε πολλούς ιστούς και δεσμεύονται σε ενδοκυττάρια και εξωκυττάρια RNAσες, σχηματίζοντας κατ'αυτόν τον τρόπο μια δομή σχήματος λύχνου. Εφόσον, κατά πάσα πιθανότητα, ουδέτερες και αλκαλικές ριβονουκλεάσες παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην αναδίπλωση του RNA στα ευκαρυωτικά κύτταρα, τότε ίσως ο αναστολέας έχει ουσιαστικό ρόλο στην αναδίπλωση του mRNA και πιθανότατα η αλληλεπίδραση αυτή να είναι αντιστρέψιμη.

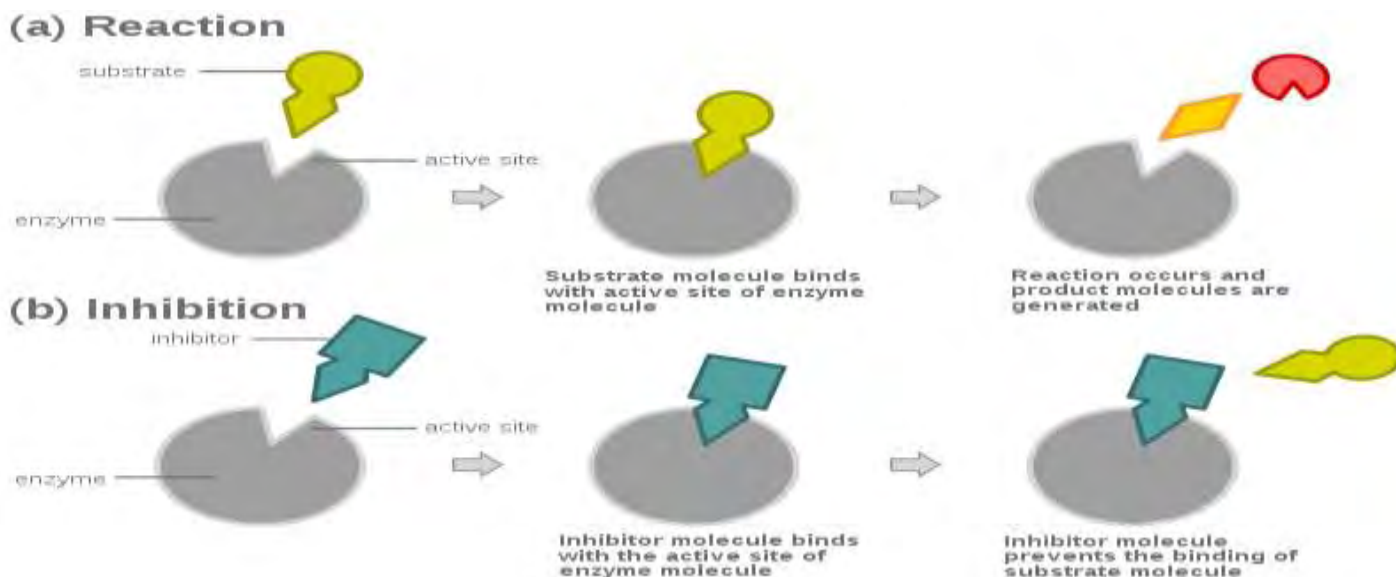


Εικόνα 1.5 Σύμπλεγμα αγγειογενίνης και αναστολέα αυτής (Parageorgiou et al, 1997)

1.στ Τύποι αναστολής

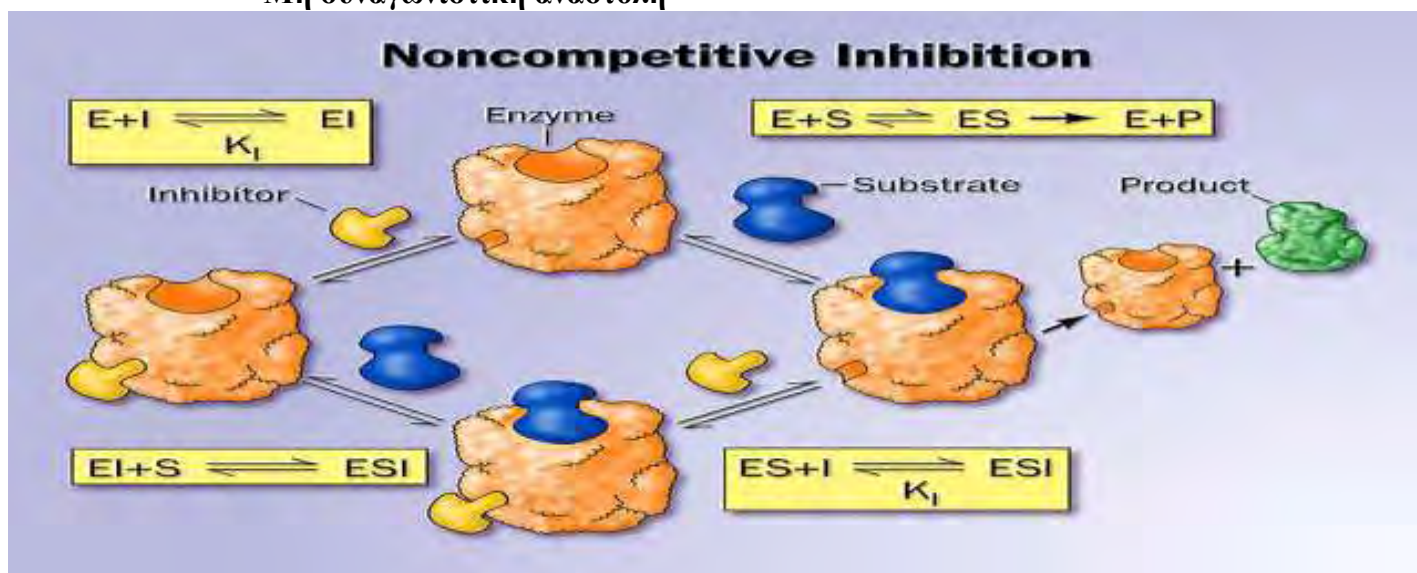
- **Συναγωνιστική αναστολή**

Εάν ο αναστολέας I δεσμεύεται αμφίδρομα στο ενεργό κέντρο του ενζύμου και παρεμποδίζει τη δέσμευση του υποστρώματος S , τότε τα I και S συναγωνίζονται για δέσμευση στο ενεργό κέντρο και ο αναστολέας καλείται συναγωνιστικός αναστολέας. Με τη συμμετοχή πλέον του αναστολέα στην καταλυτική αντίδραση παρατηρούμε πως από τη μια μεριά η τιμή της V_{max} δεν μεταβάλλεται, ενώ αντίθετα η τιμή της K_m μεγαλώνει.



Εικόνα 1.6 Συναγωνιστική αναστολή

- Μη συναγωνιστική αναστολή



Εικόνα 1.7 Μη συναγωνιστική αναστολή

Στην περίπτωση αυτή, αν αντί ο αναστολέας I να συναγωνίζεται με το υπόστρωμα S για δέσμευση στην ίδια περιοχή του ενζύμου, δηλαδή στο ενεργό κέντρο, δεσμεύεται σε διαφορετική περιοχή, τότε αναφερόμαστε σε μη συναγωνιστική αναστολή. Ενώ λοιπόν στη συναγωνιστική αναστολή η ταυτόχρονη δέσμευση αναστολέα και υποστρώματος στο ένζυμο αποκλείεται, στη μη συναγωνιστική αναστολή δεν αποκλείεται και μπορεί να δημιουργηθεί ένα τριπλό σύμπλοκο του τύπου EIS. Ως αποτέλεσμα των παραπάνω, η τιμή της V_{max} να μειώνεται, ενώ αντίθετα η τιμή της K_m παραμένει σταθερή.

- **Μικτή αναστολή**

Είναι ένας τύπος αναστολής στην οποία ο αναστολέας μπορεί να συνδέεται με το ένζυμο ανεξαρτήτως εάν το ένζυμο έχει δεσμευθεί ήδη με το υπόστρωμα ή όχι, εμφανίζει όμως μία μεγαλύτερη προτίμηση για την μία κατάσταση από την άλλη. Λέγεται "μικτή" επειδή μπορεί να θεωρηθεί ως ένα εννοιολογικό «μείγμα» της ανταγωνιστικής αναστολής, στην οποία ο αναστολέας μπορεί να δεσμεύσει το ένζυμο μόνον εάν το υπόστρωμα δεν έχει ήδη δεσμευθεί, και της μη ανταγωνιστικής αναστολής, στην οποία ο αναστολέας μπορεί να δεσμεύσει το ένζυμο μόνο αν το υπόστρωμα έχει ήδη δεσμευθεί. Εάν η ικανότητα του αναστολέα να δεσμεύει το ένζυμο είναι ακριβώς η ίδια, είτε ή όχι το ένζυμο έχει δεσμευθεί ήδη το υπόστρωμα, ονομάζεται μη-ανταγωνιστικός αναστολέας. Η μη ανταγωνιστική αναστολή μερικές φορές μπορεί να θεωρηθεί ως μια ειδική περίπτωση της μικτής αναστολής.

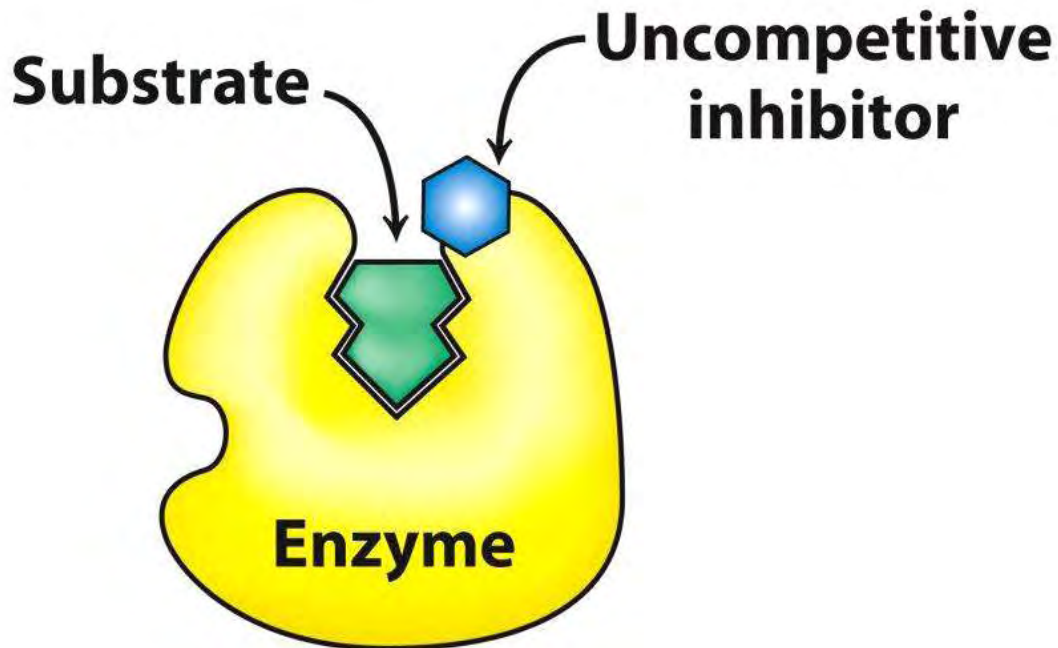
Στη μικτή αναστολή, ο αναστολέας δεσμεύεται σε μια αλλοστερική θέση, δηλαδή μια θέση διαφορετική από την ενεργό θέση όπου δεσμεύεται το υπόστρωμα. Ωστόσο, δεν είναι όλοι οι αναστολείς που προσδένονται σε αλλοστερική περιοχή είναι μικτοί αναστολείς

Στην μικτή αναστολή η τιμή της K_m μπορεί να αυξηθεί ή να μειωθεί, ενώ η τιμή της V_{max} πάντα θα μειώνεται.

- **Ανταγωνιστική αναστολή**

Στις προηγούμενες τρεις περιπτώσεις αναστολής, οι αναστολείς μπορούν να δεσμεύονται απευθείας με το ένζυμο. Στην περίπτωση της ανταγωνιστικής αναστολής, η δέσμευση του αναστολέα γίνεται αποκλειστικά στο σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος και αυτό συνεπάγεται μείωση των τιμών τόσο της K_m , όσο και της V_{max} .

Εικόνα 1.8 Σύμπλοκο Ενζύμου υποστρώματος και ανταγωνιστικού αναστολέα



1.ζ Σκοπός

Συνοψίζοντας τα παραπάνω ο σκοπός αυτής της εργασίας είναι να μελετηθεί η αγγειογενίνη, ώστε να μπορέσουμε μέσω της κατανόησης του ίδιου του μορίου να επέμβουμε στις δράσεις που αυτό εμφανίζει σε παθολογικές κυρίως αλλά όχι μόνο καταστάσεις. Έτσι στόχος της παρούσας εργασίας απετέλεσε η ετερόλογη έκφραση της ανθρώπινης αγγειογενίνης σε βακτηριακά στελέχη και ο καθαρισμός της ώστε να υπάρχουν επαρκείς ποσότητες για τη μελέτη της.

Είναι γνωστό (Ribatti, 2004) ότι η αγγειογένεση συμπορεύεται με την ογκογένεση (Ribatti, 2004)(Papetti & Herman, 2002), οπότε είναι φυσικό επόμενο η αγγειογενίνη να διαδραματίζει τον δικό της ρόλο στην διαδικασία αυτή (Rozman, Silar, & Kosnik, 2012)(Papetti & Herman, 2002)(Gao & Xu, 2008). Εντονότερη δε, εμφανίζεται η δράση της σε μεταστατικούς όγκους του παγκρέατος (Shimoyama et al., 1996) του προστάτη (Yoshioka, Wang, Kishimoto, Tsuji, & Hu, 2006)(Jones, Ewing, Isaacs, & Getzenberg, 2012) και του καρκίνου του μαστού (Montero, Guzmán, Cortés-Funes, & Colomer, 1998). Η δράση της αγγειογενίνης σε τέτοιες παθολογικές καταστάσεις είναι ταυτόσημη με την φυσιολογική της λειτουργία –προκαλεί αγγειογένεση στο σημείο του σώματος όπου και εκφράζεται. Η διαφορά έγκειται στον σκοπό της παραγωγής της. Στις παθολογικές αυτές καταστάσεις η αγγειογενίνη παράγεται από τα καρκινικά κύτταρα ώστε αυτά να μπορέσουν να προκαλέσουν αγγειογένεση στο σημείο όπου βρίσκονται.

Τα κύτταρα αυτά βρίσκονται μονίμως στην φάση πολλαπλασιασμού και απαιτούν από τον οργανισμό περισσότερη ενέργεια και οξυγόνωση από τα υγιή που συνήθως βρίσκονται στην φάση αναμονής G₀.

Υπό φυσιολογικές συνθήκες ένας όγκος αρχίζει την ανάπτυξη του στον χώρο ενός προϋπάρχοντος οργάνου όπου υπάρχει ήδη μια στοιχειώδη έστω αγγείωση. Στην περίπτωση όμως που ο όγκος αυτός εξελιχθεί σε κακοήγη τότε εμφανίζεται η επικινδυνότητα της δράσης της αγγειογενίνης. Ο όγκος σχάζεται αρχικά σε μικρότερα τμήματα και αυτά μπαίνουν στην κυκλοφορία του αίματος. Κατόπιν αυτά εναποθέτονται στο στόμιο κάποιου τριχοειδούς αγγείου φράζοντας το. Έτσι ολοκληρώνεται η πρώτη φάση της μετάστασης του όγκου και αρχίζει ξανά ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός των κυττάρων του. Επειδή όμως το σημείο όπου βρίσκεται το τριχοειδές έχει ελλειπή αιμάτωση για τις ανάγκες του αναπτυσσόμενου όγκου, τα κύτταρα του υπερεκφράζουν το γονίδιο της αγγειογενίνης για να προκαλέσουν αγγειογένεση στο σημείο αυτό.

Άρα είναι φανερή η επιτακτική η ανάγκη για την μελέτη όλων των παραγόντων που προκαλούν αγγειογένεση ή είναι αναστολείς αυτής ώστε συνδιαστικά με άλλες θεραπείες να έχουμε μια αποτελεσματικότερη αντιμετώπιση τέτοιων καταστάσεων.

• ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Χρησιμοποιήθηκε το πειραματικό πρωτόκολλο του Shapiro με τις αναλογες τροποποιήσεις όπου χρειάστηκε (Riordan & Shapiro, 2001)

- Υλικά
- Ετερόλογη έκφραση της αγγειογενίνης
- Συλλογή και λύση των κυττάρων
- Χρωματογραφικός καθαρισμός αγγειογενίνης
- Ενζυματική μελέτη

2.1.ΥΛΙΚΑ

Αντιδραστήρια για την έκφραση και τον καθαρισμό της αγγειογενίνης

- 10x M9 Salts pH:7.4 – 500ml(autoclave) σε απεσταγμένο νερό
- 1M MgSO₄- 50 ml(autoclave) σε απεσταγμένο νερό

- 100 mM CaCl₂ -50 ml(autoclave) σε απεσταγμένο νερό
- Διάλυμα γλυκόζης 20% w/v σε 250 ml απεσταγμένο νερό (αποστείρωση με φίλτρο με διάμετρο πόρων 0.22μm)
- 10% w/v casamino acid σε 250 ml απεσταγμένο νερό (αποστείρωση με φίλτρο με διάμετρο πόρων 0.22μm)
- Ampicillin (sodium salt) 25mg/ml- 50 ml(αποστείρωση με φίλτρο με διάμετρο πόρων 0.22μm)
- 20mg/ml trans-indole-3-acrylic acid, 5ml διάλυμα αιθανόλης 100% w/v
- **TSOPB** pH: 9.0-500ml (μη αποστειρωμένο)

T(20 mM Tris)- 1,2114 gr

SO(10% w/v Sucrose)-50 gr

P(10 mM Phenanthroline)-1,1734 gr

B(0,25 mM Benzamidine)-0,0150 gr

0,5 mM EDTA(autoclaved)-stock

Τιτλοποίηση σε pH: 9.0 με 10 N NaOH

- SP Sepharose Buffers (αποστείρωση με φίλτρο με διάμετρο πόρων 0.22μm - απαέρωση)
- Buffer A 2 lt, pH: 8 (αποστείρωση με φίλτρο με διάμετρο πόρων 0.22μm) αποτελούμενο από 10 mM Tris HCL & 0,2 M NaCl σε υπερκάθαρο νερό.
- Buffer B 500 ml, pH: 8 (αποστείρωση με φίλτρο με διάμετρο πόρων 0.22μm) αποτελούμενο από 10 mM Tris HCL & 0,6 M NaCl σε υπερκάθαρο νερό.
- Mono-S Buffers ((αποστείρωση με φίλτρο με διάμετρο πόρων 0.22μm
- Buffer A 1 lt, pH: 8 (αποστείρωση με φίλτρο με διάμετρο πόρων 0.22μm) αποτελούμενο από 10 mM Tris HCL σε υπερκάθαρο νερό.

- Buffer B 1 L, pH: 8 (διήθηση από στείρο φίλτρο) αποτελούμενο από 10 mM Tris HCL & 1 M NaCL σε υπερκάθαρο νερό.
- C18 Buffers (Απαέρωση με He)
- 1 Lt 0,1 % TFA σε υπερκάθαρο νερό απαερωμένο με He.
- 700 ml 0,08 % TFA σε 2-propanol- acetonitrite-υπερκάθαρο νερό (αναλογία 3:2:2) απαερωμένο με He.
- 0,4 M KH_2PO_4 , pH:7,2, 50 ml ((αποστείρωση με φίλτρο με διάμετρο πόρων 0.22 μm).

• ΕΤΕΡΟΛΟΓΗ ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΙΝΗΣ

Streaking-Προκαλλιέργειες

Σε τριβλίο Petri με 50 ml άγαρ LB και 50 μl διαλύματος αμπικιλίνης 25mg/ml επιστρώνουμε βακτήρια E. Coli W3110/pAng3. Επωάζονται για 16 ώρες στους 37 βαθμούς Κελσίου.

Ανάπτυξη αρχικών καλλιιεργειών

Η όλη διαδικασία γίνεται σε λίγνο ώστε να εξασφαλιστούν οι άσηπτες συνθήκες. Σε falcon tube προστίθενται 25 ml θρεπτικού υλικού LB και 50 μL διαλύματος αμπικιλίνης συγκέντρωσης 25 mg/ml. Τελική συγκέντρωση αμπικιλίνης 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Το ανωτέρω διάλυμα χωρίζεται σε πέντε μέρη των 5ml (4 προς καλλιέργεια και 1 control). Κάθε σωλήνας με θρεπτικό υλικό εμβολιάζεται με 1 μόνο αποικία από τις προκαλλιέργειες. Οι 4 σωλήνες με τις καλλιέργειες και ο σωλήνας ελέγχου επωάζονται στους 37° C για 5 ώρες.

Καλλιέργειες προς ετερόλογη έκφραση

Σε 4 φιάσκες των 2 Lt προστίθενται σε κάθε μια:

- 900 ml ddH₂O
- 100 ml 10x M9 salts
- 2 ml 1 M MgSO₄
- 1 ml 100 mM CaCl₂
- 40 ml 10% casaminoacids
- 2 ml ampicillin 25mg/ml
- 1 ml 20mg/ml trans-idole-3-acrylic acid

Επιπλέον σε κάθε μια προστίθεται το υλικό από τις αρχικές καλλιέργειες, η όλη διαδικασία γίνεται σε λίγνο. Αφήνονται να επωαστούν για 16 ώρες στους 37 βαθμούς Κελσίου. Εν συνεχεία προστίθενται σε κάθε μια:

- 10 ml 20 % γλυκόζη
- 20 ml 10% casaminoacids
- 1 ml 20mg/ml trans-idole-3-acrylic acid

Αφήνονται να επωαστούν για άλλες 2 ώρες στους 37° C.

2.3 Συλλογή-λύση των κυττάρων

Φυγοκεντρείται το περιεχόμενο των δυο πρώτων φιασκών για 25 λεπτά στις 5800 στροφές, εκχύεται το υπερκείμενο από τα δοχεία φυγοκέντρισης και προστίθεται στα δοχεία το περιεχόμενο των δυο υπολοίπων φιασκών. Φυγοκεντρούνται εκ νέου για 25 λεπτά στις ίδιες στροφές, εκχύεται το υπερκείμενο από τα δοχεία φυγοκέντρισης.

Σε κάθε δοχείο φυγοκέντρισης προστίθενται 62 ml κρύο TSOPB, 30 μL PMSF και επαναδιαλύονται τα κατακρημνισμένα κύτταρα. Στη συνέχεια το περιεχόμενο των 6 δοχείων φυγοκέντρισης συγκεντρώνεται σε δυο δοχεία. Σε κάθε δοχείο από αυτά προστίθενται 8 ml 5 M NaCl, 2,5 ml 2mg/ml λυσοζύμη σε διάλυμα TSOPB και 1 ml 0,45 M PMSF.

Αφήνονται να επωαστούν για 1 ώρα στο παγόλουτρο. Εν συνεχεία σε κάθε δοχείο προστίθεται 1 ml PMSF. Μετά τοποθετούνται σε συσκευή υπερήχων για sonication (5 φορές για 40 δευτερόλεπτα ανά φορά). Το περιεχόμενο των δυο δοχείων μεταφέρεται σε μικρά δοχεία προς υπερφυγοκέντριση για 30 λεπτά στις 23 400 στροφές ανά λεπτό. Συγκεντρώνεται το υπερκείμενο και αποθηκεύεται στους -20° C.

Για επιβεβαίωση της έκφρασης αγγειογενίνης πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση των αποθηκευμένων δειγμάτων και δείγματος των επαναδιαλυτοποιημένων κυτταρικών υπολοίπων, πριν την φυγοκέντριση.

2.4 Χρωματογραφικός καθαρισμός αγγειογενίνης

Το υπερκείμενο υγρό που αποθηκεύτηκε στους -20 ° C και στο οποίο περιέχονται οι υδατοδιαλυτές πρωτεΐνες υποβάλλεται σε χρωματογραφικό καθαρισμό με στήλη SP-sepharose, με ροή 1 mL/min. Εν συνεχεία, αφού ολοκληρωθεί η φόρτωση (loading) της στήλης, διέρχεται από αυτήν Buffer A μέχρι η απορρόφηση A_{280} να είναι κάτω από 0.1 και κατόπιν εκλούεται η αγγειογενίνη με Buffer B. Το υγρό που εκλούεται τοποθετείται σε σωληνάρια (κλάσματα) των 4mL.

Στήλη Resource S

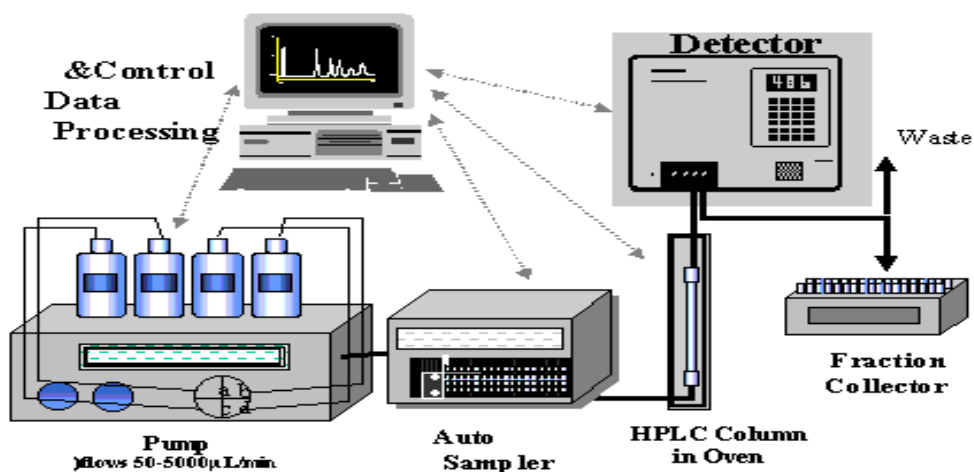
- Καθαρισμός της στήλης και του συστήματος FPLC με εισαγωγή ~2 mL διαλύματος NaOH 2N και λειτουργία για 30 λεπτά με 50% Mono S buffer (ταχύτητα ροής 0,2 mL /λεπτό)
- Αύξηση της ροής στα 0,8 mL/λεπτό και έναρξη εκπλυτικού προγράμματος: 0-100% Mono S Buffer για 15 λεπτά ακολουθούμενο από 15 λεπτά στο 100%.
- Εξισορόπηση συστήματος με 15% B για 25 λεπτά στα 0,8mL/λεπτό.
- Εισαγωγή 2μg αγγειογενίνης σε νερό (50-100 μL) και σταδιακή λειτουργία για 50 λεπτά από 15 έως 55% στα 0,8mL/λεπτό. Απορρόφηση στα 214 nm
- Η αγγειογενίνη πρέπει να εκλουστεί στα 30-36 λεπτά εν μέσω κορυφής 3-4 λεπτών. Εν συνεχεία ακολουθεί επανισορρόπηση του συστήματος με 15% B για τουλάχιστον 25 λεπτά και πιλοτική λειτουργία του συστήματος με το προετοιμαστικό διάλυμα.

- Η πιλοτική προετοιμασία οφείλει να είναι το 0,5% του συνόλου (για διάλυμα 4 λίτρων). Φυγοκέντρηση του υλικού σε Eppendorf tube για 15 λεπτά στους 4° C πριν το φόρτωμα. Παρακολούθηση της απορρόφησης με 1,0 AU σε πλήρη κλίμακα. Η αγγειογενίνη θα εκλουστεί ως ζεύγος ομοιάζοντας με πρωτεΐνη Gln-1 και <Gln-1.
- Εκτίμηση της απόδοσης της πιλοτικής λειτουργίας με σύγκριση των συνδυασμένων κορυφών σε σχέση με το κανονικό και καθορισμός πόσων προπαρασκευαστικών λειτουργιών θα απαιτηθούν (το μέγιστο που μπορεί να χρωματογραφηθεί ανά φορά είναι 4μg). Στο τέλος κάθε λειτουργίας αυξάνεται το B μέχρι το 100% για 10 λεπτά ή μέχρι να εκλουστεί η κορυφή. Έπειτα επαναφορά αρχικών ρυθμίσεων και εξισσορόπηση για 25 λεπτά πριν την επόμενη λειτουργία.
- Για κάθε κλάσμα περιέχον αγγειογενίνη προσθέτεται 0,8 mL φωσφορικού καλίου pH 7,2 και αναδεύεται ήπια. Επώαση στους 37° C για 18-20 ώρες.
- Αποθήκευση σε 0,02% αζιδίου σε νερό ή σε 20% αιθανόλη.

Στήλη C18

- Καθαρισμός της στήλης και του συστήματος HPLC με εισαγωγή αλκοολης και εν συνεχεία ύδατος
- Προγράμμα: 0-100% C18 Buffer B για 15 λεπτά ακολουθούμενο από 15 λεπτά στο 30%.
- Εξισορρόπηση (equilibration) για 20 λεπτά με C18 Buffer B gradient 30%
- Φόρτωση (loading) δείγματος. Έκπλυση με C18 buffer B. Gradient 56% flow 0,8 mL/min.

Συγκέντρωση δείγματος με φίλτρο Sartorius Vivaspin 4



Εικόνα 2.1: Διάγραμμα ροής χρωματογράφησης δείγματος και ανάλυσης δεδομένων

2.5 Ενζυματική μελέτη

- Σε κάθε Eppendorf προσθέεται κατά σειρά 110- x μ L Sep-Pak φιλτραρισμένο νερό, 100 μ L μη αναδευμένο δοκιμαστικό buffer, 30 μ L BSA και x μ L δείγματος. Ανάδευση πολλές φορές.
- Την χρονική στιγμή 0 προστίθενται 60 μ L διαλύματος tRNA στο πρώτο tube και ακολουθεί ισχυρή ανάδευση μετά από κάθε προσθήκη. Τοποθέτηση σε υδατόλουτρο 37°C.
- Σε βολικά διαστήματα (20-30 δευτερολέπτων) προστίθενται 60 μ L διαλύματος tRNA στα εναπομείναντα tubes με ισχυρή ανάδευση και εν συνεχεία τοποθέτηση σε υδατόλουτρο 37° C.
- Τερματισμός αντιδράσεων με προσθήκη 700 μ L 3,4% περχλωρικού οξέος σε θερμοκρασία πάγου ανά διαστήματα ίδια με τα διαστήματα του διαλύματος tRNA.
- Ανάδευση κάθε σωλήνα και τοποθέτηση σε πάγο για 10 λεπτά.
- Φυγοκέντρηση στους 4° C για 10 λεπτά και τοποθέτηση στον πάγο.
- Καθορισμός απορρόφησης στα 260nm κάθε υπερκείμενου.

2.6 Επεξήγηση Τεχνικών

Υγρή καλλιέργεια κυττάρων

Η υγρή καλλιέργεια κυττάρων είναι μια διαδικασία όπου κύτταρα αναπτύσσονται μέσα σε υγρό θρεπτικό μέσον εβρισκόμενο σε ελεγχόμενο περιβάλλον (σταθερή θερμοκρασία, πίεση, σταθερή παροχή αερίων και προαιρετικά σταθερή παροχή θρεπτικών υλικών και ανάδευσης της καλλιέργειας). Χρησιμοποιείται για την παραγωγή διαφόρων ουσιών για ερευνητικούς ή βιομηχανικούς σκοπούς με κύρια διαφορά μεταξύ αυτών να είναι η κλίμακα της καλλιέργειας και σε μικρότερο βαθμό το κόστος των χρησιμοποιούμενων αντιδραστηρίων. Θεωρητικά μια υγρή καλλιέργεια μπορεί να διατηρηθεί επ' άπειρον εφόσον τηρούνται άσηπτες συνθήκες πρακτικά όμως σπάνια εφαρμόζεται προς αποφυγήν κατάρρευσης του πληθυσμού και τυχόν επιμόλυνσης αυτού από άλλους μικροοργανισμούς.

FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography)

Πρόκειται για μια χρωματογραφική τεχνική που χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό, την αναγνώριση και την ποσοτικοποίηση των μερών που απαρτίζουν ένα διάλυμα. Θεωρείται θεμελιώδης τεχνική της αναλυτικής χημείας. Στηρίζεται στην αρχή ότι ένα υγρό διάλυμα που διέρχεται μέσω στερεού πακτωμένου σε στήλη με την βοήθεια κάποιου κατάλληλου υγρού διαλύτη θα διέλθει μέσω αυτού χωρισμένο στα συστατικά του λόγω διαφορετικής αντίδρασης καθενός εξ' αυτών με το στερεό. Αν η αντίδραση είναι ασθενής η διέλευση θα είναι γρήγορη ενώ αν η αντίδραση είναι ισχυρή η διέλευση θα είναι αργή. Το κοκκώδες στερεό υλικό έχει συνήθως μέγεθος 2-50 μm και η σύστασή του καθώς και η θερμοκρασία του έχουν μείζονα ρόλο στην ταχύτητα διέλευσης του δείγματος. Οι αντιδράσεις που πραγματοποιούνται είναι «φυσικές» δηλαδή δίπολο-δίπολο, υδροφοβικές, ιοντικές ή συνδιασμός αυτών. Η FPLC διαχωρίζεται από τις συμβατικές χρωματογραφικές τεχνικές διότι χρησιμοποιεί υψηλές πιέσεις (μέσω αντλιών) για να επιτύχει την διέλευση του δείγματος ενώ οι κλασικές μέθοδοι στηρίζονται κυρίως στην δύναμη της βαρύτητας. Η τεχνική FPLC κάνει χρήση μικρότερου μεγέθους δείγματος καθώς και μικρότερου κόκκου στερεού επιτυγχάνοντας κατ' αυτόν τον τρόπο υψηλότερης τάξης διακριτική ικανότητα σε σύγκριση με τις συμβατικές μεθόδους καθιστώντας την ως την προτιμώμενη χρωματογραφική μέθοδο στην σύγχρονη επιστήμη.

SP Sepharose

Το Sepharose είναι μια εμπορική ονομασία για ένα τύπο αγαρόζης, , ένα πολυμερές υλικό πολυσακχαρίτη εκχυλιζόμενο από φύκια, φέρον σταυροειδείς δεσμούς και έχον κοκκώδη μορφή. Λειτουργικές ομάδες ιωδοακετυλίου μπορούν να προστεθούν για να αποκτήσει την ικανότητα να δεσμεύει επιλεκτικά πλευρικές αλυσίδες κυστεΐνης και αυτή η μέθοδος χρησιμοποιείται συχνά για να ακινητοποιήσει πεπτίδια. Η εμπορική ονομασία του προέρχεται από Separation-Pharmacia-Agarose. Μια κοινή εφαρμογή για το υλικό αυτό είναι σε χρωματογραφικούς διαχωρισμούς βιομορίων. Το Sepharose είναι σήμα κατατεθέν της GE Healthcare (πρώην: Pharmacia, Pharmacia LKB Biotechnology, Pharmacia Biotech, Amersham Pharmacia Biotech, and Amersham Biosciences).

Η αγαρόζη Sepharose, σε συνδυασμό με κάποια μορφή της χημείας ενεργοποίησης, χρησιμοποιείται επίσης για την ακινητοποίηση ενζύμων, αντισωμάτων και άλλων πρωτεϊνών και πεπτιδίων, μέσω ομοιοπολικής συνδέσεως με ρητίνη. Συνήθεις χημείες ενεργοποίησης περιλαμβάνουν ενεργοποίηση με βρωμοκυάνιο (CNBr) και αναγωγική αμίνωση αλδευδών ώστε να παγιδεύουν τις πρωτεΐνες στη ρητίνη της αγαρόζης μέσω των πλευρικών αλυσίδων λυσίνης.

• ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η εκκίνηση αυτής της διπλωματικής εργασίας πραγματοποιήθηκε με την εξοικίωση αρχικά του ερευνητή με την χρωματογραφική μέθοδο FPLC ούτως ώστε να επιτευχθεί αφενός μια ευχέρεια με την εν λόγω τεχνική, αλλά και να πραγματοποιηθεί μια κανονικοποίηση της διαδικασίας μεταφερόμενης από ένα πρωτόκολλο στην πράξη και στην πραγματικότητα του εργαστηρίου που θα διεκπεραιωνόταν τελικά η σειρά των πειραμάτων.

Είδος	Ποσότητα (gr)	Συγκέντρωση	pH	Μοριακό Βάρος	Θερμοκρασία (°C)
M9 Salts	56,4	10x	7,4	-	4
MgSO ₄	6,0185	1M	-	120,366	4
CaCl ₂	0,555	100mM	-	111	4
Glucose	20	20% w/v	-	180,16	4
Casamino acids	25	10% w/v	-	-	4
Ampicillin	0,75	25 mgr/ml	-	371,39	20
Trans-indole-3-acrylic acid	0,1	20 mgr/ml	-	187,19	-
TSOB	52,49	0,1x	9,0	-	4

Πίνακας 3.1 Σύσταση δοκιμαστικού αντιδραστηρίου προς τιτλοποίηση και κανονικοποίηση της διαδικασίας

Ακολούθησε παρασκευή αντιδραστηρίων για την μέθοδο SP sepharose.

Είδος	Ποσότητα (lt)	pH	Θερμοκρασία (°C)
Buffer A	2	8	4
Buffer B	0,5	8	4

Πίνακας 3.2 Σύσταση δοκιμαστικού αντιδραστηρίου προς τιτλοποίηση και κανονικοποίηση της διαδικασίας

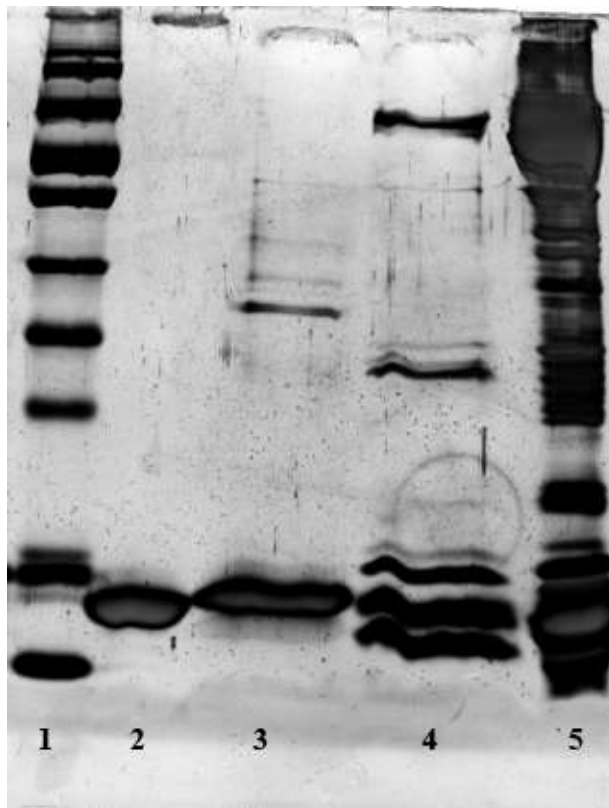
Οι άνωθεν διαδικασίες επαναλήφθηκαν αρκετές φορές μέχρι ο υπογραφών να αποκτήσει σχετική ευχέρεια μαζί τους ώστε να μπορεί να προχωρήσει τα πειράματα ανεπηρρέαστος

από οποιοδήποτε πρόβλημα θα μπορούσε να προκύψει κατά την διάρκεια αυτών των τεχνικών.

Παράλληλα με αυτές τις διαδικασίες είχε ξεκινήσει και η καλλιέργεια κυττάρων ικανών να παράγουν αγγειογενίνη η οποία θα επιχειρείτο να απομονωθεί στη συνέχεια.

Τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το στέλεχος *E.coli* W3110/pAng3 το οποίο φέρει κατάλληλο πλασμίδιο εμπεριέχον το γονίδιο της αγγειογενίνης.

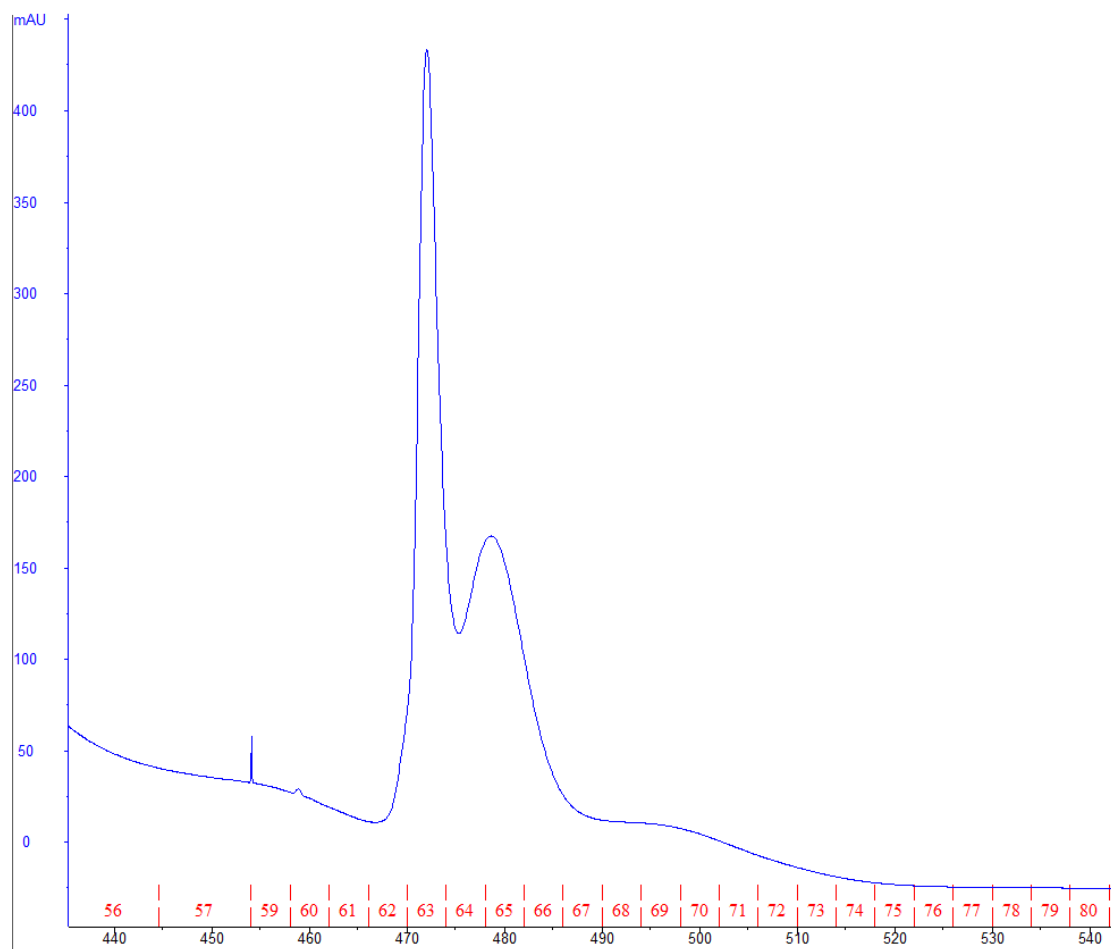
Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων



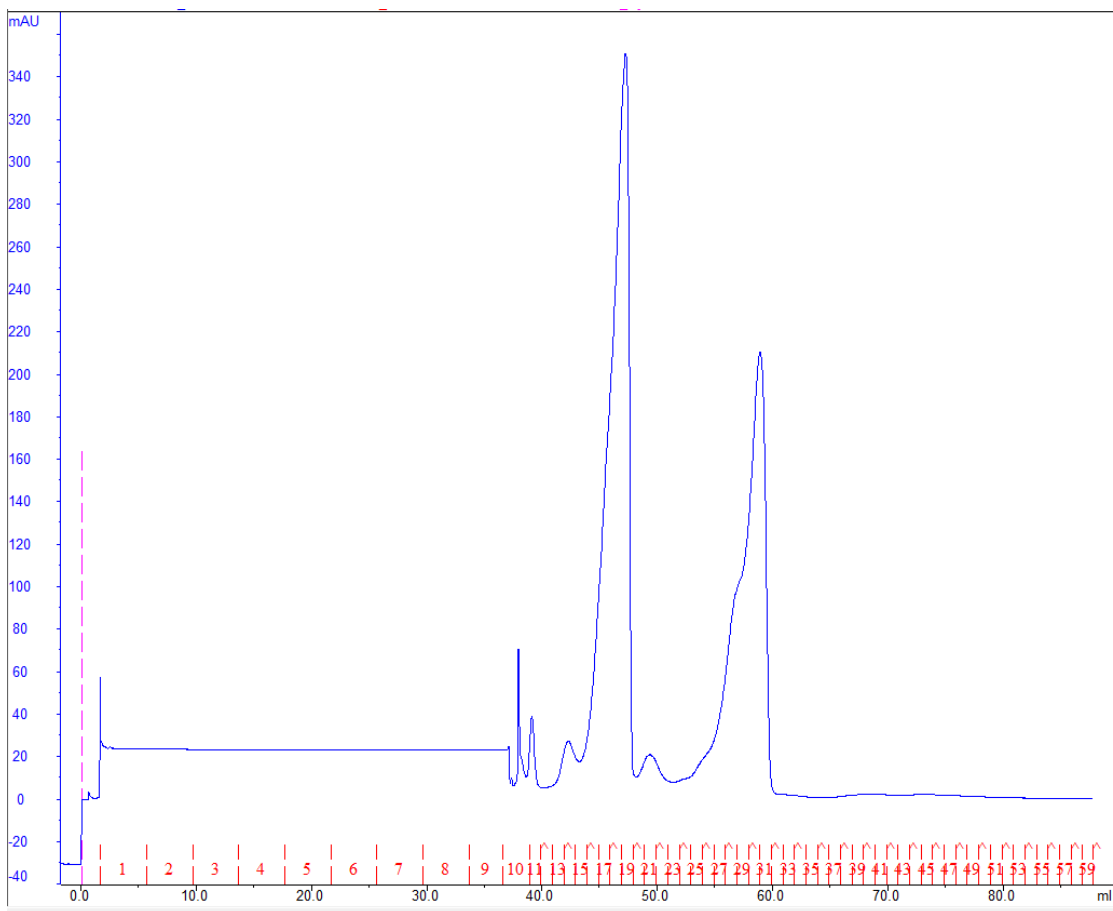
Στα βοθρία 1 έως 5 τοποθετήθηκαν:

- Στο βοθρίο 1 Ladder για να έχουμε μια κλίμακα ως μέτρο σύγκρισης
- Στο βοθρίο 2 2 μl διαλύματος έκλουσης από τη στήλη RPC 18
- Στο βοθρίο 3 2 μl διαλύματος έκλουσης από τη στήλη Resource S
- Στο βοθρίο 4 2 μl διαλύματος έκλουσης από τη στήλη SP sepharose
- Στο βοθρίο 5 2 μl διαλυτοποιημένα κυτταρικά υπολείμματα

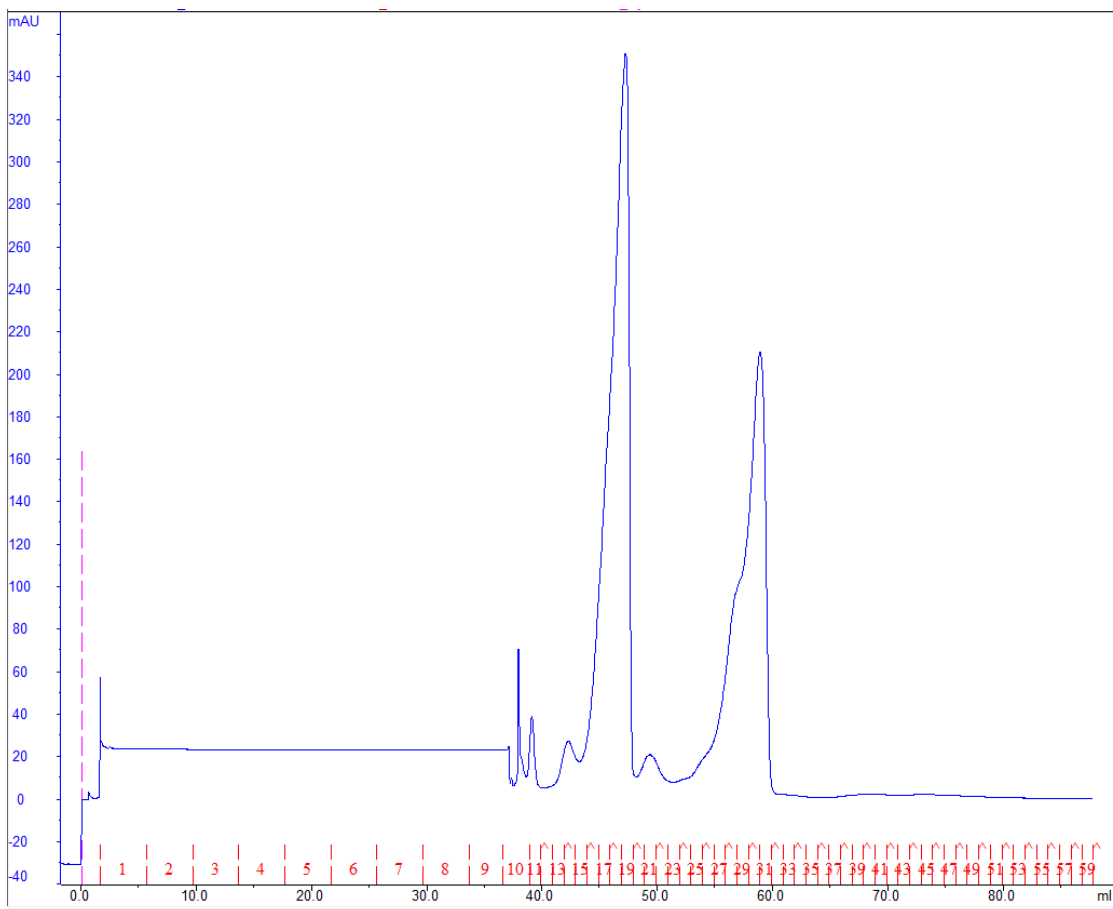
Στη συνέχεια των πειραμάτων ακολούθησε παρασκευή των κατάλληλων αντιδραστηρίων όπως και τις πρώτες εργαστηριακές μέρες και ρύθμιση των μηχανημάτων ως προετοιμασία για την χρωματογραφία.



Εικόνα 3.1 SP sepharose



Εικόνα 3.2 Mono S



Εικόνα 3.3 C18

Από τα ανωτέρω χρωματογραφήματα γίνεται εμφανές ότι από την διαδικασία ετερόλογης έκφρασης - χρωματογραφικού καθαρισμού απομονώνεται σε σημαντική ποσότητα και καθαρότητα.

• ΣΥΖΗΤΗΣΗ

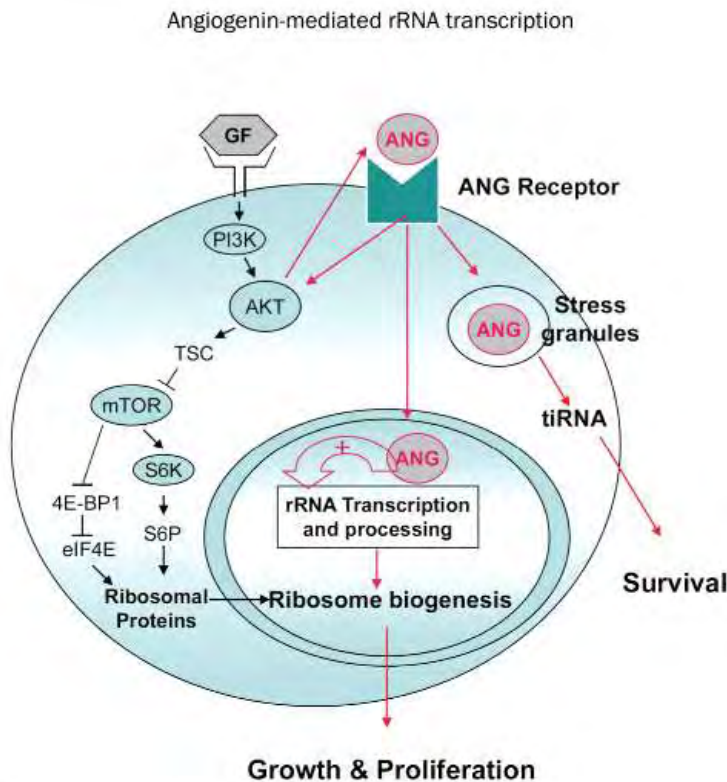
Όπως παρατηρείται από τα εξαχθέντα αποτελέσματα είναι φανερό ότι η ανωτέρω μέθοδος είναι πολύ αποτελεσματική στην απομόνωση του ενζύμου της αγγειογενίνης και μάλιστα σε ικανοποιητικές ποσότητες. Αυτό που δεν κατέστη δυνατόν ήταν η κινητική ανάλυση του ενζύμου. Τα γεγονότα που οδήγησαν σε αυτό το ατυχές συμβάν είναι κατά κύριο λόγο κάποιες θραύσεις σκευών κατά την διαδικασία των διαφόρων χρωματογραφιών. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα την απώλεια σημαντικού μέρους του ενζύμου. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων της φωτομετρίας που ελήφθησαν από το εναπομείναν δείγμα του ενζύμου χαρακτηρίζονται ασαφή και ως εκ τούτου δεν γίνεται να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα για την ενεργότητα και την δραστηριότητα του ενζύμου. Για τον λόγο αυτό παραβλέφθηκε το στάδιο της κινητικής ανάλυσης στην παρούσα εργασία σκοπύμως ώστε να παρουσιασθούν μόνο τα αποτελέσματα εκείνα που είναι σαφή και προσδιορισμένα. Αντικείμενο μελλοντικής έρευνας είναι λοιπόν η επανάληψη του πειράματος αυτού με σκοπό αρχικά την απομόνωση μεγαλύτερου δείγματος ενζύμου και έπειτα προσπάθειας προσδιορισμού της κινητικής συμπεριφοράς αυτού. Ο μελλοντικός ερευνητής οφείλει να είναι ιδιαίτερος προσεκτικός με την όλη διαδικασία ώστε να μην επαναληφθούν τα ατυχή γεγονότα της παρούσης. Επίσης οφείλει να προσδιορίσει ότι το ένζυμο δεν μετουσιώνεται κατά την διάρκεια των σταδίων απομόνωσης και καθαρισμού του ώστε να διασφαλιστεί η ενεργότητα του στον μέγιστο δυνατό βαθμό. Εφόσον πραγματοποιηθεί η κινητική ανάλυση το επόμενο βήμα είναι ο προσδιορισμός της τρισδιάστατης δομής του ενζύμου ώστε να βρεθούν και να προσδιοριστούν επακριβώς τα ενεργά κέντρα και οι τυχόν μεταλλάξεις τους. Τέλος όλα αυτά τα συλλεχθέντα δεδομένα πρέπει να εισαχθούν σε βάσεις δεδομένων και να επεξεργαστούν με μια βιοπληροφορική ανάλυση με σκοπό την εξαγωγή περισσότερων δεδομένων. Απώτερος σκοπός είναι ο σχεδιασμός στοχευμένων αναστολέων του ενζύμου που σκοπό έχουν την πρόληψη και την θεραπεία διαφόρων ασθενειών.

Νέες έρευνες δείχνουν ότι η ANG εμπλέκεται και σε άλλες ασθένειες πέραν των νεοπλασματικών. Τέτοιες ασθένειες είναι η Αμυοτροφική Πλευρική Σκλήρυνση (ALS), η ενδομητρίωση, η περιφερική αγγειοπάθεια, η φλεγμονώσης νόσος του εντέρου, η ρευματοειδής αρθρίτιδα και ο διαβήτης (Gao & Xu, 2008)(Aparicio-Erriu & Prehn, 2012). Από τις προαναφερθείσες ασθένειες η περισσότερο μελετημένη είναι η ALS. Η Αγγειογενίνη μπορεί να ασκήσει νευροπροστατευτικές δράσεις για τους κινητικούς νευρώνες στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Πρώτον, ως αγγειογόνος παράγοντας, η ANG προστατεύει τους κινητήριους νευρώνες (motoneurons MN) αυξάνοντας την νευροαγγειακή αιμάτωση. Μελέτες σχετικά με τη λειτουργική συνέπεια των ανιχνευμένων μεταλλάξεων της ANG που ανιχνεύονται έδειξε ότι οι μεταλλαγμένες έχουν μειωμένη ριβονουκλεολυτική δραστηριότητα ή πυρηνική μετατόπιση, ή και τα

δύο. Μια συνακόλουθη μείωση των HUVE δραστηριοτήτων του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της αγγειογένεσης παρατηρήθηκε, οι οποίες μπορούν να συμβάλλουν στην επαγωγή της ALS. Δεύτερον η ANG μπορεί να προστατεύσει τους MNs μέσω άμεσων επιπτώσεων της στους ίδιους τους νευρώνες. Η αγγειογενίνη ποντικού ANG-1 (mANG-1) βρέθηκε να εκφράζεται έντονα σε κινητικούς νευρώνες του νωτιαίου μυελού και των γαγγλίων της ραχιαίας ρίζας, καθώς και σε μετα-μιτωτικά MNs προερχόμενα από P19 κύτταρα. Η έκφραση του βρέθηκε στους κόνους ανάπτυξης και νευρίτες. Αναστολή της δραστηριότητας του μονοπατιού της ανθρώπινης ριβονουκλεολυτικής δράσης της ANG διαπιστώθηκε σε νευρώνες προερχόμενους από στελέχη P19. Καλλιεργημένα κύτταρα P19 ήταν σε θέση να εσωτερικεύουν τόσο άγριου τύπου ANG όσο και των παραλλαγών που εμπλέκονται στην ALS. Ωστόσο η άγριου τύπου ANG μπορούσε να προκαλέσει την κυτταρική διαφοροποίηση των P19 και τη δυνατότητα επέκτασης της νευρίτιδας, ενώ οι παραλλαγές απώλεσαν αυτές τις ικανότητες. Η άγριου τύπου ANG ήταν σε θέση να προστατεύσει τους νευρώνες από την επαγόμενη υποξία και τον κυτταρικό θάνατο, αλλά στις παραλλαγές έλειπε η νευροπροστατευτική δραστηριότητα. Τα ευρήματα αυτά παρέχουν την ύπαρξη αιτιώδους συνδέσμου μεταξύ των μεταλλάξεων της ANG και της ασθένειας ALS. Επίσης η αγγειογενίνη μπορεί επίσης να παίζει ένα ρόλο σε μια ποικιλία από μη-κακοήθεις παθολογικές καταστάσεις όπως περιφερική αγγειακή νόσος, η φλεγμονώδης νόσος του εντέρου (IBD), η ρευματοειδής αρθρίτιδα, το υπερβολικό βάρος και η παχυσαρκία, η πολλαπλασιαστική διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια και πολλαπλασιαστική βιτρεοπάθεια. Σε αυτές τις διαταραχές τα επίπεδα αγγειογενίνης ήταν υψηλότερα σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες, αλλά δεν υπήρχε σαφής συσχέτιση με την πρόγνωση ή τη δραστηριότητα της νόσου. Η αγγειογενίνη μπορεί να είναι ένας δείκτης των ασθενειών του πλακούντα κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, καθώς η αγγειογενίνη δείχνει μια σημαντική μείωση σε ασθενείς με υψηλά παθολογικά ευρήματα ροής Doppler. Η αγγειογενίνη σχετίζεται επίσης με την ενδομητρίωση και την έκταση της διαταραχής. Οι ασθενείς με προεκλαμψία έχουν επίσης υψηλότερα επίπεδα αγγειογενίνης από το κανονικό, και τη μέτρηση των επιπέδων αγγειογενίνης θα συνιστούσε σαφή διαχωρισμό της ήπιας από την σοβαρή προεκλαμψία. Η αγγειογένεση είναι επίσης κοινή σε καρδιαγγειακή νόσο, με μια σχέση με την θρομβογένεση και αθηρογένεση. Υπάρχει μόνο μια μελέτη σε περιφερική αρτηριακή αποφρακτική νόσο, στην οποία οι ασθενείς με σοβαρή νόσο φέρεται να είχαν υψηλότερα επίπεδα αγγειογενίνης σε σύγκριση με εκείνους με ήπια ή μέτρια σοβαρότητα της ασθένειας, και τους μάρτυρες. Έτσι, η αγγειογενίνη θα μπορούσε δυνητικά να είναι ένας δείκτης ενδοθηλιακής βλάβης, που σχετίζονται με την εξέλιξη της αγγειακής νόσου (Tello-Montoliu et al., 2006)

Το καρκίνωμα πλακωδών κυττάρων της κεφαλής και του τραχήλου (HNSCC) είναι η όγδοη πιο κοινή ασθένεια, που επηρεάζει περίπου 640.000 ασθενείς σε όλο τον κόσμο κάθε χρόνο. Παρά τις πρόσφατες προόδους στην χειρουργική επέμβαση, ακτινοθεραπεία, και τη χημειοθεραπεία, η συνολική ίαση για τους ασθενείς με HNSCC παρέμεινε σε λιγότερο από 50% για πολλές δεκαετίες. Οι ασθενείς με υποτροπιάζοντα και μεταστατικό καρκίνο έχουν μια μέση επιβίωση μόνο 6-10 μήνες. Η συστηματική χημειοθεραπεία είναι η μόνη θεραπευτική επιλογή για τους ασθενείς. Νέες θεραπευτικές επιλογές είναι απαραίτητο να συμπληρώσουν ή να αντικαταστήσει τις τρέχουσες διαθέσιμες θεραπείες.

Οι νέοι παράγοντες που στοχεύουν μοριακά και κυτταρικά μονοπάτια της παθογένεσης της νόσου του HNSCC είναι η ελπίδα των ασθενών της νόσου. Μία κατηγορία αυτών των νέων παραγόντων είναι οι αναστολείς αγγειογένεσης που έχουν αποδειχθεί αποτελεσματικοί στη θεραπεία του προχωρημένου ορθοκολικού, του μαστού, και μη-μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα. Παρόμοια με άλλους συμπαγείς όγκους, η αγγειογένεση παίζει έναν σημαντικό ρόλο στην παθογένεση της HNSCC. Ένας αριθμός των αγγειογενετικών παραγόντων συμπεριλαμβανομένων αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGF) και αγγειογενίνης (ANG) έχουν δείξει να υπερεκφράζονται σημαντικά στην HNSCC. Μεταξύ αυτών, η μοναδικότητα της ANG έγκειται στο γεγονός ότι είναι μία ριβονουκλεάση που ρυθμίζει το ριβοσωματικό RNA (rRNA) της μεταγραφής. Το ANG διεγερόμενο μεταγραφικά rRNA έχει αποδειχθεί ότι είναι προαπαιτούμενο για την αγγειογένεση που επάγεται από άλλους αγγειογόνους παράγοντες. Οι αναστολείς της ANG έχει αποδειχθεί ότι αναστέλλουν την αγγειογένεση και την ανάπτυξη όγκων που προκαλούνται όχι μόνο από ANG αλλά επίσης και από άλλους αγγειογόνους παράγοντες. Δεδομένου του αναδυόμενου ρόλου της ANG στην HNSCC, εγκαινιάζονται οι θεραπευτικές δυνατότητες των αναστολέων ANG στην HNSCC (Li & Hu, 2010)(Chen & Hu, 2010)(Chen & Hu, 2010)(Chen & Hu, 2010).



Current understanding of the mechanism of ANG.

Εικόνα 4.1 Μηχανισμός δράσης μεταγραφής rRNA με παρέμβαση της αγγειογενίνης(Chen & Hu, 2010)

Τέλος υπό συνθήκες στρες, η ANG συσσωρεύεται στα κυτταροπλασματικά διαμερίσματα και ρυθμίζει την παραγωγή tiRNA, μια νέα κατηγορία των μικρών RNA που προέρχεται από tRNA και επάγεται από στρες. Τα tiRNA καταστέλλουν την συνολική μετάφραση πρωτεΐνης με αναστολή της cap-εξαρτώμενης και ανεξάρτητης μετάφρασης συμπεριλαμβανομένης εκείνης που επάγεται από τα αδύναμα IRESes. Ωστόσο, η ισχυρή εξαρτώμενη από IRES μετάφραση (είναι ένας μηχανισμός που χρησιμοποιείται συχνά από τα γονίδια που εμπλέκονται στην προ-επιβίωση και αντι-απόπτωση) δεν επηρεάζεται. Έτσι, η μετάφραση πρωτεϊνών επαναπρογραμματίζεται από την μεσολάβηση της ANG στα tiRNA (εκτός από να μονοπάτια αναβολικής ενέργειας) και να προωθεί την επιβίωση των κυττάρων. Αυτό η πρόσφατα ανακαλυφθήσα λειτουργία της ANG παρουσιάζει ένα νέο μηχανισμό δράσης στη ρύθμιση της ανάπτυξης των κυττάρων και την επιβίωση.

Παράτηρούμε δηλαδή ότι όσο περισσότερο κατανοούμε την δράση και αλληλεπίδραση των διαφόρων γονιδίων που απαρτίζουν το ανθρώπινο γονιδίωμα (μελετώντας δηλαδή και κατασκευάζοντας χάρτες metabolomics και interactomics) έρχονται στην επιφάνεια νέα δεδομένα σχετικά με την συσχέτιση αυτών και διαφόρων ασθενειών. Ως εκ τούτου κρίνεται απαραίτητο να δωθεί συνέχεια στο ερευνητικό έργο της παρούσης εργασίας σε διδακτορικό ίσως επίπεδο. Σίγουρα δεν πρέπει να δωθεί ιδιαίτερη βαρύτητα στο γεγονός ότι το απομονωθέν ένζυμο απεδείχθει ανενεργό και δεν κατέσκει δυνατή η ενζυμική μελέτη αυτού εφόσον πειραματικώς απεδείχθει ικανή μέθοδος απομόνωσης του. Η παρατηρηθείσα ενεργότητα μπορεί να οφείλεται σε πλείστους παράγοντες μεταξύ των οποίων και η τύχη. Εκεί που πρέπει να σταθούμε όμως είναι η προοπτική που παρουσιάζεται στην ολοκλήρωση της έρευνας αυτής για την καλύτερευση του βίου δυνητικά χιλιάδων συνανθρώπων μας. Προτείνω στον μελλοντικό ερευνητή εφόσον καταφέρει να απομονώσει ικανή ποσότητα ενεργού ενζύμου να προχωρήσει αρχικά σε κινητική ανάλυση του ενζύμου, κρυσταλλογραφία αυτού και μοντελοποίηση του. Η βιοπληροφορική ανάλυση που θα ακολουθήσει για να συγκριθεί το ένζυμο με τις διάφορες βάσεις δεδομένων θα πρέπει να ολοκληρωθεί με την κατασκευή ενός χάρτη metabolomics αρχικά και κατόπιν τα ευρήματα να περαστούν στους κατασκευαζόμενους χάρτες interactomics.

• ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- ANG angiogenin, ribonuclease, RNase A family, 5
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=283>). (n.d.). Retrieved from
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=283>
- Aparicio-Erriu, I. M., & Prehn, J. H. M. (2012). Molecular Mechanisms in Amyotrophic Lateral Sclerosis: The Role of Angiogenin, a Secreted RNase. *Frontiers in neuroscience*, 6(November), 167. doi:10.3389/fnins.2012.00167
- Chen, L., & Hu, G. (2010). Angiogenin-mediated ribosomal RNA transcription as a molecular target for treatment of head and neck squamous cell carcinoma. *Oral oncology*, 46(9), 648–53. doi:10.1016/j.oraloncology.2010.06.011
- Folkman J, Merler E, Abernathy C, Williams G (1971) Isolation of a tumor fraction responsible for angiogenesis. *J Exp Med* 133:275–288..
- Gao, X., & Xu, Z. (2008). Mechanisms of action of angiogenin Functions and Mechanisms of ANG in, 619–624. doi:10.1111/j.1745-7270.2008.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/mmdb/mmdbsrv.cgi?uid=55391>. (n.d.). Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/mmdb/mmdbsrv.cgi?uid=55391>
- <http://www.uniprot.org/uniprot/P03950>. (n.d.). Retrieved from <http://www.uniprot.org/uniprot/P03950>
- Iyer, S., Holloway, D. E., & Acharya, K. R. (2013). Crystal structures of murine angiogenin-2 and -3-probing “structure--function” relationships amongst angiogenin homologues. *The FEBS journal*, 280(1), 302–18. doi:10.1111/febs.12071
- Jones, M. L., Ewing, C. M., Isaacs, W. B., & Getzenberg, R. H. (2012). Prostate cancer-derived angiogenin stimulates the invasion of prostate fibroblasts. *Journal of cellular and molecular medicine*, 16(1), 193–201. doi:10.1111/j.1582-4934.2011.01283.x
- Leland, P. A., Staniszewski, K. E., Park, C., Kelemen, B. R., & Raines, R. T. (2002). The Ribonucleolytic Activity of Angiogenin †. *Biochemistry*, 41(4), 1343–1350. doi:10.1021/bi0117899
- Leonidas DD, Shapiro R, Allen SC, Subbarao GV, Veluraja K, Acharya KR. *J. Mol. Biol.* 1999a;285:1209–1233
- Li, S., & Hu, G.-F. (2010). Angiogenin-mediated rRNA transcription in cancer and neurodegeneration. *International journal of biochemistry and molecular biology*, 1(1), 26–35. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2933922&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Montero, S., Guzmán, C., Cortés-Funes, H., & Colomer, R. (1998). Angiogenin expression and prognosis in primary breast carcinoma. *Clinical cancer research : an*

official journal of the American Association for Cancer Research, 4(9), 2161–8.
Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9748135>

- Papetti, M., & Herman, I. M. (2002). Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *American journal of physiology. Cell physiology*, 282(5), C947–70. doi:10.1152/ajpcell.00389.2001
- Papageorgiou AC, Shapiro R, Acharya KR. 1997. Molecular recognition of human angiogenin by placental ribonuclease inhibitor—An X-ray crystallographic study at 2.0 Å resolution. *EMBO J* 16: 5162–5177
- Ribatti, D. (2004). The first evidence of the tumor-induced angiogenesis in vivo by using the chorioallantoic membrane assay dated 1913. *Leukemia*, 18(8), 1350–1. doi:10.1038/sj.leu.2403411
- Riordan, J. F., & Shapiro, R. (2001). Isolation and enzymatic activity of angiogenin. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 160, 375–85. doi:10.1385/1-59259-233-3:375
- RNH1 ribonuclease/angiogenin inhibitor 1 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6050>). (n.d.). Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6050>
- Rozman, A., Silar, M., & Kosnik, M. (2012). Angiogenin and vascular endothelial growth factor expression in lungs of lung cancer patients. *Radiology and oncology*, 46(4), 354–9. doi:10.2478/v10019-012-0031-1
- Russo, N., Acharya, K. R., Vallee, B. L., & Shapiro, R. (1996). A combined kinetic and modeling study of the catalytic center subsites of human angiogenin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(2), 804–8. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=40137&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Shapiro, R., & Vallee, B. L. (1989). Site-directed mutagenesis of histidine-13 and histidine-114 of human angiogenin. Alanine derivatives inhibit angiogenin-induced angiogenesis. *Biochemistry*, 28(18), 7401–7408. doi:10.1021/bi00444a038
- Shimoyama, S., Gansauge, F., Gansauge, S., Negri, G., Oohara, T., & Beger, H. G. (1996). Increased Angiogenin Expression in Pancreatic Cancer Is Related to Cancer Aggressiveness Advances in Brief Increased Angiogenin Expression in Pancreatic Cancer Is Related to Cancer Aggressiveness, 2703–2706.
- Tello-Montoliu, a, Patel, J. V, & Lip, G. Y. H. (2006). Angiogenin: a review of the pathophysiology and potential clinical applications. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*, 4(9), 1864–74. doi:10.1111/j.1538-7836.2006.01995.x
- Thomas, H., Montani, A., & Montani, J.-P. (2010). *Angiogenesis*. Morgan & Claypool Life Sciences. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53242/>
- Xu, Z., Tsuji, T., Riordan, J. F., & Hu, G. (2003). Identification and characterization of an angiogenin-binding DNA sequence that stimulates luciferase reporter gene expression. *Biochemistry*, 42(1), 121–8. doi:10.1021/bi020465x
- Yoshioka, N., Wang, L., Kishimoto, K., Tsuji, T., & Hu, G. (2006). A therapeutic target for prostate cancer based on angiogenin-stimulated angiogenesis and cancer cell

proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(39), 14519–24. doi:10.1073/pnas.0606708103