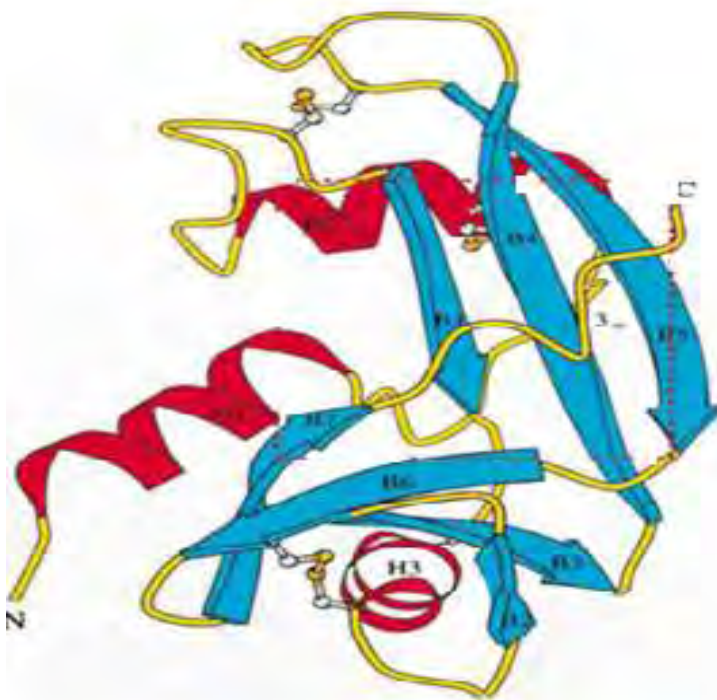


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

*ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΚΡΥΣΤΑΛΛΩΣΗ ΤΗΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗΣ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΙΝΗΣ
ΣΤΗΝ ΕΝΕΡΓΟ ΤΗΣ ΜΟΡΦΗ.*

*ISOLATION AND CRYSTALLIZATION OF HUMAN ANGIOGENIN IN ITS
ACTIVE FORM.*



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ - ΚΑΣΟΥΝΗ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ
ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΛΕΩΝΙΔΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ

ΛΑΡΙΣΑ, ΑΚΑΔΗΜΑΙΚΟ ΕΤΟΣ 2015

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας, του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, στο Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Υπεύθυνος Καθηγητής:

Λεωνίδας Δ. Δημήτριος, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Τριμελής επιτροπή:

Λεωνίδας Δ. Δημήτριος, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Μπαλατσός Νικόλαος, Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Σκαμνάκη Βασιλική, Λέκτορας Βιοχημείας-Μεταβολισμού του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Ευχαριστίες,

Θα ήθελα αρχικά να ευχαριστήσω την τριμελή μου επιτροπή, και ιδιαίτερα τον επιβλέποντα καθηγητή μου, κ.Λεωνίδα, για την ευκαιρία που μου έδωσε να συνεργαστώ στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε με την ανάθεση του συγκεκριμένου θέματος. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την διδακτορική φοιτήτρια, Δήμητρα Χατζηλεοντιάδου, καθοδηγήτριά μου στη διεξαγωγή των πειραματικών διαδικασιών, για την υπομονή της και τις πολύτιμες συμβουλές και γνώσεις που μου έδωσε. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλο το επιστημονικό προσωπικό του εργαστηρίου για την πολύτιμη βοήθειά του.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ABSTRACT.....	6
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	7
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	8
1. Ριβονουκλεάσες.....	8
1.1 Γενικά.....	8
1.2 Ριβονουκλεάσες και καρκίνος.....	9
1.3 Παγκρεατική ριβονουκλεάση A.....	10
1.4 Ριβονουκλεάση A- Αγγειογενίνη.....	11
1.5 Αγγειογενίνη.....	13
1.5.1 Γενικά.....	13
1.5.2 Η δομή της αγγειογενίνης.....	18
1.5.3 Ενεργό κέντρο αγγειογενίνης-Καταλυτικός μηχανισμός.....	23
1.5.4 Met(-1)-Ang.....	24
1.5.5 Αναστολείς αγγειογενίνης.....	25
1.6 Κρυσταλλογραφία.....	29
1.6.1 Γενικά.....	29
1.6.2 Κρύσταλλοι πρωτεϊνών.....	30
1.6.3 Παράγοντες που επηρεάζουν την κρυστάλλωση.....	31
1.6.4 Διαγράμματα διαλυτότητας.....	32
1.6.5 Σχεδιασμός κρυστάλλωσης.....	34
1.6.6 Στάδια κρυστάλλωσης.....	37
1.6.7 Διαλύτης συγκρυστάλλωσης.....	39
1.6.8 Παράγοντες καθίζησης.....	39
1.6.9 Συλλογή κρυσταλλογραφικών δεδομένων.....	40
ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	43
2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	44
2.1 Καλλιέργειες κυττάρων-Βακτηριακή ανάπτυξη.....	44
2.2 Έκφραση πρωτεϊνών και επαγωγή.....	45
2.3 Απομονώσεις αγγειογενίνης.....	46
2.3.1 Περιγραφή διαδικασίας.....	46
2.4 Απομόνωση rγγo-GluAng.....	47

2.4.1	Υλικά-Προετοιμασία συστατικών.....	47
2.4.2	Παραγωγή θρεπτικών μέσων για τις καλλιέργειες.....	48
2.4.3	Παρασκευή καλλιεργειών.....	49
2.4.4	Λύση κυττάρων.....	50
2.4.5	Χρωματογραφικός καθαρισμός ργο-GluAng.....	52
2.4.6	Κυκλοποίηση πρωτεΐνης.....	54
2.4.7	Συμπύκνωση πρωτεΐνης.....	54
2.5	Απομόνωση Met(-1)-Ang.....	55
2.5.1	Υλικά-Προετοιμασία συστατικών.....	55
2.5.2	Παραγωγή θρεπτικών μέσων για τις καλλιέργειες.....	56
2.5.3	Παρασκευή καλλιεργειών.....	56
2.5.4	Συλλογή κυττάρων.....	57
2.5.5	Λύση και πλύση κυττάρων.....	57
2.5.6	Χρωματογραφικός καθαρισμός Met(-1)-Ang.....	58
2.5.7	Λυοφιλίωση πρωτεΐνης.....	58
2.6	Αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακριλαμιδίου παρουσία SDS (SDSPAGE).....	59
2.7	Κρυσταλλώσεις.....	62
2.7.1	Τεχνικές κρυστάλλωσης.....	62
2.7.1.1	Διάχυση ατμών.....	62
2.7.1.2	Τεχνική κρεμάμενης σταγόνας (Hanging drop).....	62
2.8	Εισαγωγή κρυσταλλώσεων.....	64
2.9	Όργανα και Υλικά.....	65
2.10	Συνθήκες κρυστάλλωσης Met(-1)-Ang.....	65
2.10.1	Μέθοδος κρεμάμενης σταγόνας.....	65
2.10.2	Μέθοδος καθήμενης σταγόνας.....	66
2.10.3	Συγκρυστάλλωση Met(-1)-Ang με αναστολείς.....	68
2.10.4	Ανάπτυξη νέων συνθηκών συγκρυστάλλωσης του συμπλόκου Ang/NADPH	69
2.10.5	Πυρήνωση (Microseeding).....	69
3.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	73
3.1	Χρωματογραφικός καθαρισμός της αγγιογενίνης με στήλες ιοντοανταλλαγής.....	73
3.1.1	Αποτελέσματα χρωματογραφικού καθαρισμού ργο-GluAng.....	73
3.1.2	Αποτελέσματα χρωματογραφικού καθαρισμού Met(-1)-Ang.....	77

3.2 Ηλεκτροφόρηση κλασμάτων.....	79
3.3 Αποτελέσματα κρυσταλλώσεων.....	80
3.3.1 Μέθοδος κρεμάμενης σταγόνας.....	81
3.3.2 Μέθοδος καθήμενης σταγόνας.....	83
3.3.3 Συγκρυστάλλωση Met(-1)-Ang με αναστολείς.....	86
3.3.4 Ανάπτυξη νέων συνθηκών συγκρυστάλλωσης του συμπλόκου Ang/NADPH.....	91
3.3.5 Πυρήνωση.....	94
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	99
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	101

ABSTRACT

Human Angiogenin (hAng) is an unusual ribonuclease that plays a major role in the growth and establishment of human tumors, since is a potent stimulator of new blood vessels through the process of angiogenesis. The ribonucleolytic activity of hAng although low, is essential for the induction of angiogenesis. Therefore, the development of small molecular-weight compounds, such as nucleotide based inhibitors of hAng, that block it'sribonucleolytic activity, would lead to the discovery of potential antiangiogenic agents for human therapy. However, the development of such inhibitors has been hampered by the lack of direct structural information on hAng-nucleotide inhibitor complexes. In this effort, we expressed and purified hAng, using two different constructs, and performed an extensive screening of crystallization conditions to grow hAng crystals either in its native active form or in the presence of an inhibitor. The isolation and purification procedures resulted in a significant high yield (10 mg/ L of bacterial culture) production of hAng. Moreover, many of the crystallization conditions of hANG, with nucleotides, such as 5'-triphosphate adenosine, 5'-diphosphate adenosine and NADPH, led to the formation of new crystal forms. X-ray diffraction data analysis will be used to reveal the structural details that govern ligand recognition by Ang with the aim to initiate structure-based ligand design studies.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η αγγειογενίνη είναι μία πρωτεΐνη που κατέχει σημαντικό ρόλο στην αγγειογένεση, μία φυσική και ζωτικής σημασίας διαδικασία για την αύξηση και την ανάπτυξη καθώς και για την ίαση τραυμάτων. Η αγγειογενίνη κατατάσσεται στις ριβονουκλεάσες, ωστόσο διαθέτει μικρή ριβονουκλεολυτική ενεργότητα, η οποία όμως της είναι απολύτως απαραίτητη για την επαγωγή της αγγειογένεσης. Μιας και η βιολογική δράση της αγγειογενίνης εξαρτάται απόλυτα από την ενζυμική της δραστικότητα, η ανάπτυξη χαμηλού μοριακού βάρους αναστολέων, όπως νουκλεοσιδικά ανάλογα, που παρεμποδίζουν τη ριβονουκλεολυτική της δραστικότητα, θα μπορούσε να οδηγήσει στην ανακάλυψη πιθανών αντικαρκινικών φαρμάκων. Εντούτοις, μέχρι σήμερα δεν υπάρχουν δομικές πληροφορίες συμπλόκων αγγειογενίνης- αναστολέα.

Στην προσπάθειά μας αυτή, προχωρήσαμε στην απομόνωση και τον καθαρισμό της αγγειογενίνης, μετά από κλωνοποίησή της σε νέο φορέα καθώς και στην εφαρμογή ποικίλων δοκιμών κρυστάλλωσής της είτε στη φυσιολογική δραστική της διαμόρφωση είτε παρουσία αναστολέων. Η απομόνωση και ο καθαρισμός οδήγησαν στην παραγωγή σημαντικών ποσοτήτων πρωτεΐνης (10mg/L βακτηριακής καλλιέργειας). Επιπλέον, αρκετές από τις συνθήκες κρυστάλλωσης της αγγειογενίνης, παρουσία νουκλεοσιδικών αναλόγων, όπως 5'-τριφωσφορική αδενοσίνη (5'-ATP), 5'-διφωσφορική αδενοσίνη (5'-ADP) και NADPH, οδήγησαν στην ανάπτυξη νέων κρυστάλλων. Οι μελέτες δεδομένων περίθλασης ακτίνων-X που θα ακολουθήσουν, πιθανόν να οδηγήσουν στην αποκάλυψη των δομικών χαρακτηριστικών που διέπουν την πρόσδεση μορίων αναστολέων στο καταλυτικό κέντρο της αγγειογενίνης, με σκοπό το σχεδιασμό με βάση τη δομή, μορίων αναστολέων.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Ριβονουκλεάσες

1.1 Γενικά

Οι ριβονουκλεάσες (RNases) είναι ένζυμα που καταλύουν τη διάσπαση μορίων RNA. Το γεγονός ότι όλοι οι οργανισμοί φαίνεται να διαθέτουν RNάσες διαφορετικών κατηγοριών υποδηλώνει ότι η αποικοδόμηση του RNA αποτελεί μια θεμελιώδη διεργασία, στην πορεία της εξέλιξης. Οι RNάσες εκτός από την αποικοδόμηση διαδραματίζουν επίσης σημαντικό ρόλο και στην ωρίμανση των μορίων RNA. Ταυτόχρονα, η αποικοδόμηση του RNA από τις RNάσες αποτελεί μηχανισμό άμυνας του οργανισμού ενάντια σε RNA ιούς (Wai Ming Li *et al.*, 2009).

Οι ριβονουκλεάσες διασπούν φωσφοδιεστερικούς δεσμούς μεταξύ των σακχάρων και των φωσφορικών ομάδων του RNA. Περιέχουν συντηρημένα μοτίβα, τα οποία αποτελούνται συνήθως από όξινα και βασικά αμινοξέα, που σχηματίζουν το ενεργό κέντρο. Αυτά τα αμινοξέα των ενεργών κέντρων σε κάποιες περιπτώσεις αλληλεπιδρούν με δισθενή κατιόντα, όπως το μαγνήσιο, το ασβέστιο, το μαγγάνιο ή τον ψευδάργυρο, που δρουν ως συνένζυμα και ενεργοποιούν την καταλυτική δράση της ριβονουκλεάσης. Παρόλα αυτά, ο ακριβής ρόλος των μετάλλων είναι περίπλοκος και διαφέρει μεταξύ των ριβονουκλεασών. Πιστεύεται ότι ο σημαντικότερος ρόλος τους είναι να σταθεροποιούν τα ενδιάμεσα μόρια, διευκολύνοντας με αυτό το τρόπο τις αντιδράσεις διάσπασης (Avey H.P. *et al.*, 1967). Οι ριβονουκλεάσες μπορούν να διακριθούν με βάση τη θέση διάσπασης του RNA (Aravind L. & E.V. Koonin, 2001). Συγκεκριμένα:

- Οι ενδονουκλεάσες διασπούν δεσμούς στο εσωτερικό των μορίων RNA δημιουργώντας μικρότερα τμήματα πολυνουκλεοτιδίων.
- Οι εξωνουκλεάσες αφαιρούν νουκλεοτίδια, ένα προς ένα, από το άκρο του μορίου RNA απελευθερώνοντας μονονουκλεοτίδια. Το υπόστρωμά τους είναι πάντοτε μονόκλωνες αλυσίδες νουκλεϊκών οξέων. Κάθε εξωνουκλεάση προχωρά προς μία συγκεκριμένη

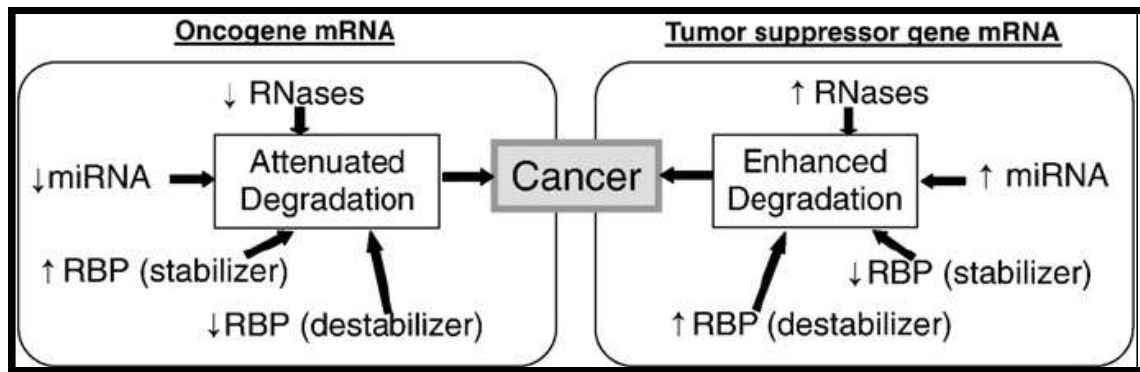
κατεύθυνση, ξεκινώντας είτε από το 5' άκρο είτε από το 3' άκρο και συνεχίζει προς το άλλο άκρο, <<ψαλιδίζοντας>> τα άκρα.

1.2 Ριβονουκλεάσες και καρκίνος

Ύστερα από μελέτες που έγιναν σχετικά με τη διερεύνηση της σχέσης μεταξύ καρκινογένεσης και ριβονουκλεασών, αποδείχθηκε ότι πράγματι οι ριβονουκλεάσες εμπλέκονται στην καρκινογένεση και έχουν σημαντική επίδραση στον μετα-μεταγραφικό έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης. Οι ριβονουκλεάσες μπορούν να δρουν ως ογκοπρωτεΐνες ή καταστολείς όγκων παρεμβαίνοντας με αυτόν τον τρόπο στην αφθονία των mRNAs και στους ρυθμούς μετάφρασης (Kim W.C. *et al*, 2009).

Οι ένδο- και έξω- ριβονουκλεάσες έχουν έναν συγκεκριμένο τρόπο δράσης, όπως αναφέρεται παραπάνω, ο οποίος απουσία ρυθμιστικών μηχανισμών έχει ως αποτέλεσμα την ανώμαλη αποικοδόμηση του mRNA και συνεπώς σοβαρό αντίκτυπο στη γονιδιακή έκφραση.

Το γεγονός αυτό έχει άμεση σχέση με την καρκινογένεση καθώς, η μειωμένη αποικοδόμηση ογκογόνων mRNAs μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη καρκίνου. Στην **Εικόνα 1** φαίνεται πως η μείωση της δραστηριότητας των ριβονουκλεασών και των miRNA (μικρά μόρια RNA που δεν κωδικοποιούν για πρωτεΐνες και παίζουν ρόλο στην αποσιώπηση και στην μετα-μεταγραφική ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων) που αναστέλλουν την μετάφραση ογκογόνων mRNAs οδηγεί σε μειωμένη αποικοδόμησή τους. Παρόμοιες επιδράσεις έχουν η αυξημένη δραστηριότητα των σταθεροποιητικών πρωτεϊνών που συνδέονται με το mRNA ή η μειωμένη δραστηριότητα των αποσταθεροποιητικών RBPs (πρωτεΐνες πρόσδεσης στο RNA που βοηθούν στη στρατολόγηση ριβονουκλεοπρωτεϊνικών συμπλόκων). Επιπλέον, υπάρχει και το ενδεχόμενο η αυξημένη αποικοδόμηση των ογκοκατασταλτικών mRNAs να οδηγήσει στην ανάπτυξη καρκίνου σε περίπτωση που έχουμε αυξημένη δραστηριότητα ριβονουκλεασών ή miRNA μορίων (Kim W.C. *et al*, 2009) (**Εικόνα 1**).



Εικόνα 1. Μετα-μεταγραφικός έλεγχος στον καρκίνο.

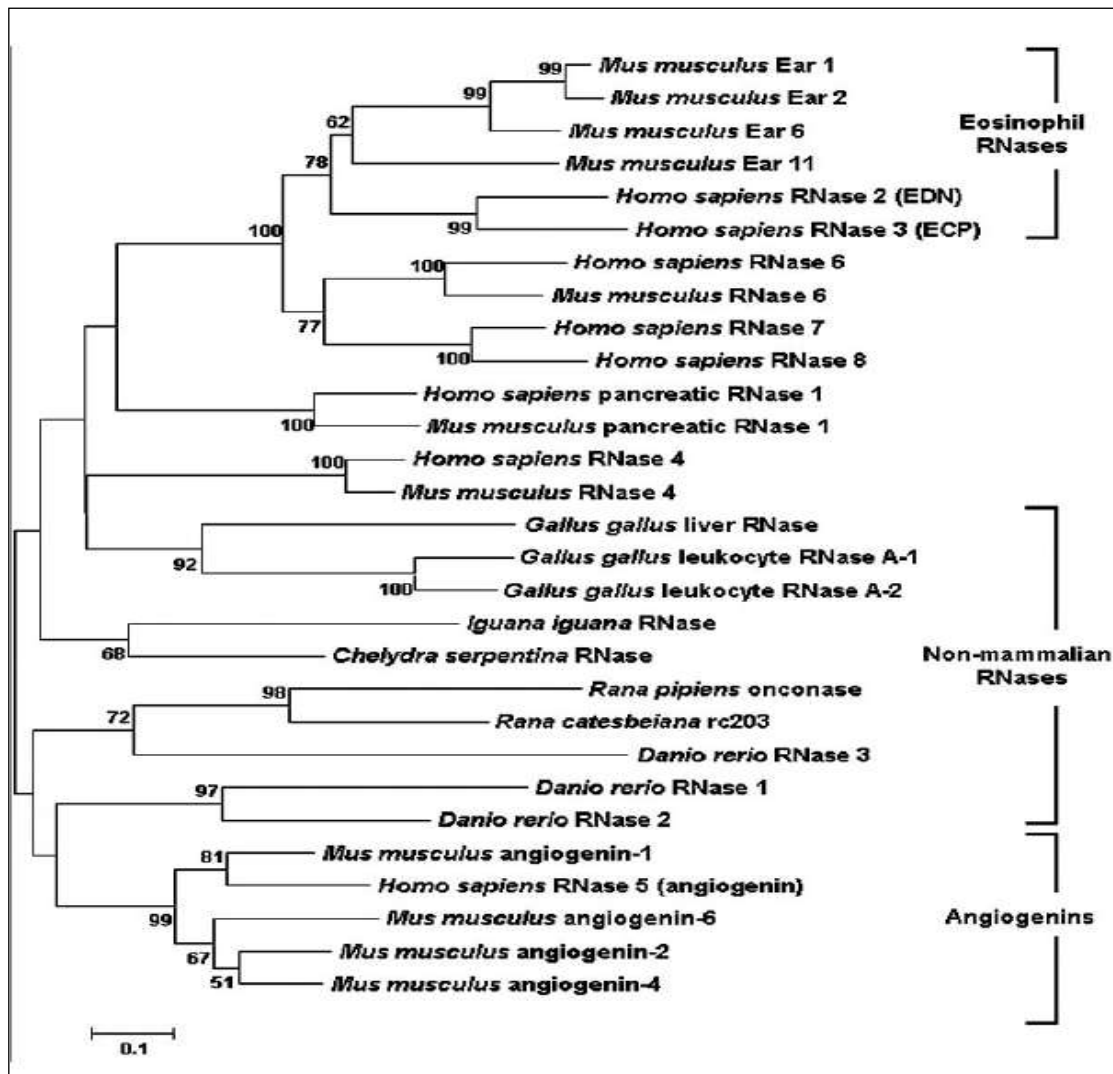
1.3 Παγκρεατική ριβονουκλεάση A

Η ριβονουκλεάση A (RNάση A), είναι μία παγκρεατική ενδονουκλεάση μοριακού βάρους 13,7 kDa, η οποία καταλύει την υδρόλυση των φωσφοδιεστερικών δεσμών στις μονόκλωνες αλυσίδες του RNA μέσω δύο διαδοχικών αντιδράσεων, μίας τρانشφωσφορυλίωσης και μίας υδρόλυσης (Rosenberg, H.F., 2008). Επίσης, η πολυπεπτιδική της αλυσίδα αποτελείται από 124 κατάλοιπα, τα περισσότερα από τα οποία είναι βασικά (Leland P.A. *et al.*, 1998).

Η παγκρεατική ριβονουκλεάση A είναι ίσως η πιο καλά χαρακτηρισμένη από όλες τις γνωστές πρωτεΐνες των θηλαστικών. Το 1980 απομονώθηκαν πολλές πρωτεΐνες, φαινομενικά μη σχετιζόμενες με την παγκρεατική ριβονουκλεάση A, από άλλους ιστούς. Τα γονίδιά τους κλωνοποιήθηκαν και αλληλουχήθηκαν και βρέθηκε τελικά ότι παρουσιάζουν σημαντική ομολογία με την RNάση A. Οι πρωτεΐνες αυτές έγιναν μέλη της υπεροικογένειας της ριβονουκλεάσης A. Σε αυτές συμπεριλαμβάνονται η αγγειογενίνη (ριβονουκλεάση 5), η ηωσινόφιλη κατιονική πρωτεΐνη (ECP: ριβονουκλεάση 3), η ηωσινόφιληνευροτοξίνη (EDN: ριβονουκλεάση 2) και μερικές ακόμα κυτταροτοξίνες (Rosenberg, H.F., *et al.*, 2008).

Ένα φυλογενετικό δένδρο των ριβονουκλεασών αυτής της υπεροικογένειας φαίνεται στον **Πίνακα 1**.

Πίνακας 1. Φυλογενετικό δέντρο ριβονουκλεασών.



1.3 Ριβονουκλεάση A – Αγγειογενίνη

Η Αγγειογενίνη (Ang) είναι ένα τυπικό μέλος της υπεροικογένειας της RNάσης A που διακρίνεται για την *in vivo* αγγειογενετική της ενεργότητα και την ασθενή ριβονουκλεολυτική της δραστηριότητα (Strydan D.J. *et al*, 1985; Fett J.W. *et al*, 1985).

Ύστερα από μελέτες μεταλλαγμένης στα αμινοξέα His-13, His-114 και Lys-40 αποδείχτηκε ότι η ριβονουκλεολυτική ενεργότητα της Ang είναι απαραίτητη για την αγγειογενετική της δράση (Shapiro, R. *et al*, 1989). Ωστόσο, η ενεργότητα αυτή της Ang υπολογίζεται πως είναι αρκετά μικρότερη συγκριτικά με αυτή της RNάσης A (Shapiro, R. *et al*, 1986). Χαρακτηριστικά, παρόλο που

όπως η RNάση A έτσι και η Ang καταλύει το ενδονουκλεολυτική διάσπαση του RNA στην 3' περιοχή των πυριμιδινών μέσω ενός μηχανισμού υδρόλυσης/ τρανσφωσφορυλίωσης, ωστόσο η Ang παρουσιάζει 10^4 έως 10^6 φορές χαμηλότερη δραστικότητα συγκριτικά με την RNάση A (Shapiro, R. *et al*, 1986., Rybak, S.M. & Valle, B.L., 1988., Harper, J.W. & Valle, B.L., 1989). Η χαμηλή ενζυμική ενεργότητα της Ang αντανakλά τόσο τη χαμηλή συγγένεια για τα υποστρώματα όσο και τον αριθμό των μορίων υποστρώματος που καταλύονται ανά μονάδα χρόνου από ποσότητα ενζύμου που αντιστοιχεί σε μία ενεργό περιοχή: η K_m και K_{cat} για το υποστρώμα της, το CrA, είναι 120 φορές μεγαλύτερη και 6500 φορές μικρότερη, αντίστοιχα, από αυτές της RNάσης A (Russo N. *et al*, 1996a).

Παρά αυτή την προφανή αδυναμία, η ριβονουκλεολυτική ενεργότητα της Ang είναι απαραίτητη για την αγγειογένεση, καθώς αποδείχθηκε, όπως προαναφέρθηκε, ότι οι μεταλλάξεις που μειώνουν την ενζυμική ενεργότητα εξαλείφουν την ικανότητα της Ang να προάγει τη δημιουργία αιμοφόρων αγγείων (Shapiro, R. *et al*, 1989., Curran, T.P. *et al*, 1993). Οι δομικές και βιοχημικές μελέτες που έχουν γίνει αποκάλυψαν ποικίλα διαφορετικά χαρακτηριστικά ανάμεσα στο μόριο της Ang και της RNάσης A και παρείχαν λεπτομέρειες σχετικά με την περιοχή κυτταρικής πρόσδεσης, το ενεργό κέντρο, την αλληλουχία πυρηνικής μετατόπισης και τους ρόλους των καταλοίπων στο RNA που προσδέονται και διασπούν οι πρωτεΐνες αυτές (Nethaji Thiyagarajan *et al*, 2012).

Έτσι συμπεραίνεται ότι παρόλο που η δομή της Ang παρουσιάζει κάποια κοινά χαρακτηριστικά με αυτή της RNάσης A, ωστόσο παρουσιάζει και αρκετές διαφορές (Harper, J.W. *et al*, 1989). Αυτές οι βασικές διαφορές και ομοιότητες αντικατοπτρίζονται στην τρισδιάστατη δομή των δύο πρωτεϊνών.

Αναλυτικά, από τις δομικές μελέτες προέκυψαν τα εξής:

- i. παρόλο που το καταλυτικό κέντρο P_1 είναι όμοιο και στις δύο πρωτεΐνες τα τμήματα B_1 και B_2 διαφέρουν σημαντικά (Acharya *et al*, 1994).
- ii. στην RNάση A, η B_1 περιοχή είναι μία ανοιχτή δομή έχοντας την Thr-45 στο ένα άκρο και την Ser-123 στο άλλο. Αντίθετα, τέτοια δομή δεν υπάρχει στην Ang καθώς στη θέση αυτή παρεμβάλλεται το αμινοξύ

Gln-117. Επίσης, η B₂ περιοχή δεν είναι τόσο συντηρημένη στη δομή της Ang (Borah, B. *et al*, 1985., Gilliland, G.L. *et al*, 1990., Russo, N. *et al*, 1994., Faming, Z. *et al*, 1991) ενώ και οι κινητικές μελέτες έδειξαν ότι η περιοχή αυτή παρουσιάζει την ίδια επιλεκτικότητα στη σειρά των βάσεων, όπως συμβαίνει και στην RNάση A (A>G>C>U)(Harper&Valle, 1989; Russo N. *et al*, 1996a).

- iii. επιπλέον, από τα τέσσερα τμήματα της RNάσης A, που όπως αποδείχθηκε αλληλεπιδρούν με πουρίνες, μόνο η Gln-111 συντηρείται αντίστοιχα και στην Ang ως Gln-108, η οποία όπως αποδείχθηκε παίζει δευτερεύοντα ρόλο στην Ang (Curran, T.P. *et al*, 1991). Από τα δεδομένα αυτά προκύπτει, πως η πρόσδεση πουρινικών νουκλεοτιδίων είτε στην Ang είτε στην RNάση A δεν προκαλεί αλλαγές στη διαμόρφωση καμίας από τις δύο πρωτεΐνες (Acharya *et al*, 1993).
- iv. η παρεμπόδιση του καρβοξυτελικού άκρου της Ang (μέρος του ενεργού κέντρου) σε αντίθεση με την RNάση A (Nethaji Thiyagarajan *et al*, 2012).

Τέλος, η RNάση A έχει τρεις δισουλφιδικούς δεσμούς ισοδύναμους με αυτούς της Ang και έναν τέταρτο ανάμεσα στα κατάλοιπα 65-72 που απουσιάζει από την Ang και επιβεβαιώνει μία ακόμη διαφορά στην τεταρτοταγή δομή των δύο πρωτεϊνών (Acharya *et al*, 1993).

2. Αγγειογενίνη

2.1 Γενικά

Η αγγειογένεση είναι η φυσιολογική διαδικασία σχηματισμού νέων αιμοφόρων αγγείων. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι υπάρχει διαμάχη με την ορολογία καθώς, η αγγειοποίηση (vasculogenesis) είναι ο όρος που χρησιμοποιείται για τη φυσική δημιουργία αιμοφόρων αγγείων ενώ ο εγκολεασμός είναι ο όρος που χρησιμοποιείται για τη δημιουργία νέων αιμοφόρων αγγείων από διαχωρισμό των ήδη υπαρχόντων (Folkman J. & Shing Y., 1992).

Η αγγειογένεση είναι μία φυσική και ζωτικής σημασίας διαδικασία για την αύξηση και την ανάπτυξη καθώς και για την ίαση τραυμάτων. Παρόλα αυτά, είναι και ένα βασικό βήμα για την μετάπτωση των όγκων από κατάσταση

ηρεμίας σε μία κακοήθη κατάσταση, οδηγώντας στη χρήση αναστολέων της αγγειογένεσης (Iwaguchi T.).

Σύγχρονη ορολογία αγγειογένεσης: εκτός της διαφοροποίησης μεταξύ της αγγειογένεσης με εκβλάστηση και της αγγειογένεσης με εγκολεασμό, σήμερα υπάρχουν περισσότερες διαφοροποιήσεις μεταξύ των ακόλουθων τύπων αγγειογένεσης. Έτσι διακρίνονται στις εξής:

- i. Αγγειοποίηση (vasculogenesis): η δημιουργία αγγειακών δομών από τα κυκλοφορούντα ή από ιστούς ενδοθηλιακά βλαστοκύτταρα, τα οποία πολλαπλασιάζονται *de novo* σε ενδοθηλιακά κύτταρα (Patan.S, 2004).
- ii. Αγγειογένεση (Angiogenesis): η δημιουργία μιας λεπτής ενδοθηλιακής δομής με λεία μυϊκά κύτταρα και περικύτταρα (ινοβλάστες). Αυτός ο σχηματισμός παίζει σημαντικό ρόλο κατά την ενήλικη ζωή και συνδέεται επίσης ως μηχανισμός επιδιόρθωσης των κατεστραμμένων αγγείων.
- iii. Αρτηριογένεση (arteriogenesis): η δημιουργία ενός μεσαίου μεγέθους αιμοφόρου αγγείου.

Η αγγειογενίνη, μία πρωτεΐνη με μοριακό βάρος 14kDa, απομονώθηκε πρώτη φορά το 1985 από ανθρώπινα κύτταρα αδενοκαρκινώματος HT-29, εξαιτίας της αγγειογενετικής της ενεργότητας (Fett J.W.,1985). Μελέτες έδειξαν ότι η πρωτεΐνη αποτελείται από 123 αμινοξέα και περιλαμβάνει ένα ριβονουκλεολυτικό ενεργό κέντρο, μία περιοχή πρόσδεσης στα κύτταρα-στόχους και μία αλληλουχία NLS για την μετατόπισή της στον πυρήνα (Lili Chen and Guo-fu Hu ,2010).

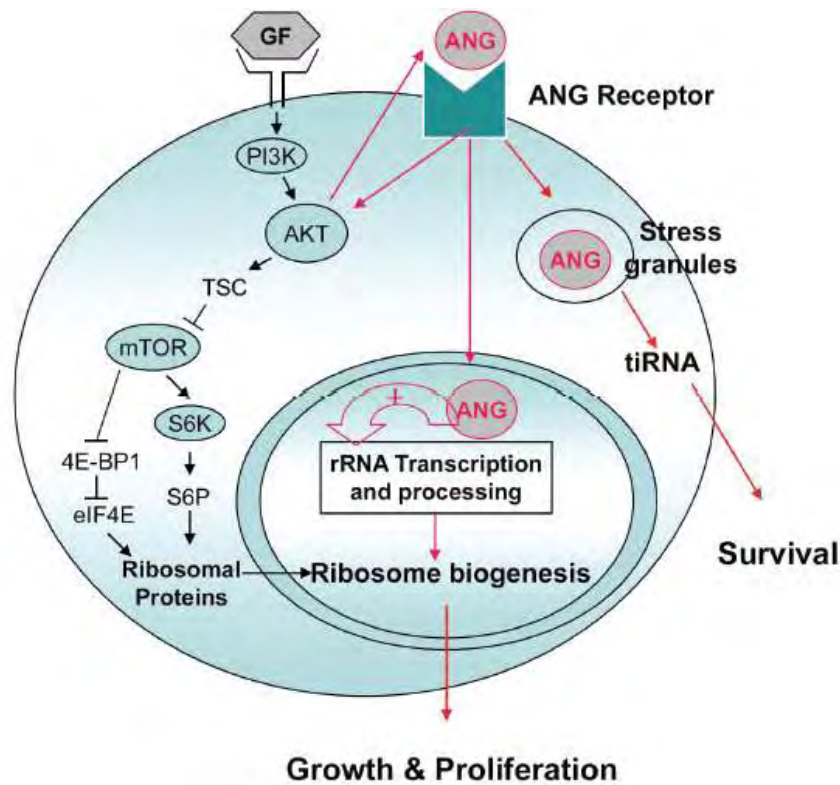
Η αγγειογενίνη κατατάσσεται στις ριβονουκλεάσες, ωστόσο διαθέτει μικρή ριβονουκλεολυτική ενεργότητα, αλλά απαραίτητη για την επαγωγή της αγγειογένεσης (Shapiro R. *et al*,1986). Η βιολογική δράση της αγγειογενίνης εξαρτάται απόλυτα από την ενζυμική της δραστηριότητα. Επομένως, αναστολείς ή μεταλλάξεις που παρεμποδίζουν τη ριβονουκλεολυτική της δραστηριότητα ταυτόχρονα εμποδίζουν και την αγγειογενετική της δράση επιβραδύνοντας την ανάπτυξη των όγκων (Kao RY *et al.*, 2002). Αντίστοιχα,

μεταλλάξεις οι οποίες ενισχύουν την δράση του ενζύμου, ενισχύουν την αγγειογένεση (Curran *et al*, 1993; Rybak *et al*, 1989).

Μηχανισμός δράσης: Βάσει πολλών ερευνών διατυπώθηκαν τρεις διακριτοί τρόποι δράσης της Ang στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και επιβίωση (Shuping Li *et al*, 2010), όπως παρουσιάζονται στην **Εικόνα 3**.

Αναλυτικά, σε ένα αρχικό στάδιο η Ang προσδένεται στον υποδοχέα της στην επιφάνεια του κυττάρου. Στη συνέχεια μπορεί να ακολουθήσει τρεις οδούς:

- i. Μεταφέρεται στον πυρήνα (το πιο σημαντικό στάδιο στην αγγειογένεση) όπου συσσωρεύεται στον πυρηνίσκο και ενεργοποιεί τη μεταγραφή του ριβοσωμικού RNA (rRNA), γεγονός που οδηγεί στην κυτταρική ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό (Moroiianu J. 1994a; Moroiianu J. 1994b).
- ii. Σε συνθήκες στρες, η Ang συσσωρεύεται σε κυτταροπλασματικά διαμερίσματα και επάγει την παραγωγή του tiRNA, μία νέα κατηγορία μικρών μορίων RNA που παράγονται σε καταστάσεις στρες (Ivanov P. *et al*, 2011; Emara M.M. *et al*, 2010). Τα tiRNAs που ελέγχονται από την Ang παίζουν ρόλο στη ρύθμιση της μετάφρασης των πρωτεϊνών, εξοικονομώντας απαιτούμενη ενέργεια και βοηθώντας στην επιβίωση των κυττάρων (Yamasaki S. *et al*, 2009).
- iii. Ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση B (AKT) (Kieran D. *et al*, 2008), η οποία ρυθμίζει θετικά τη δράση της Ang μέσω ενός επανατροφοδοτικού μηχανισμού AKT-Ang. Αυτή η σχέση συντονίζει την παραγωγή των ριβοσωμικών πρωτεϊνών που είναι απαραίτητες για τη βιοσύνθεση των ριβοσωμάτων (Kim H.M. *et al*, 2007). Η παραγωγή των ριβοσωμικών πρωτεϊνών πυροδοτείται από το σηματοδοτικό μονοπάτι AKT-mTOR και η παραγωγή των rRNAs εξαρτάται από την Ang.



Εικόνα 3. Μηχανισμός δράσης της ANG.

Βάσει βιοχημικών και δομικών πληροφοριών αποδείχθηκε ότι η Ang αποτελείται από τρεις διακριτές λειτουργικές περιοχές:

- α) Μία περιοχή πρόσδεσης σε υποδοχέα
- β) Μία αλληλουχία πυρηνικής μετατόπισης (NLS)
- γ) Ένα καταλυτικό κέντρο (Acharya K.R. et al., 1994)

Η περιοχή βρόγχου από τη Lys60 στην Asn68 διαμορφώνει την περιοχή πρόσδεσης στον υποδοχέα της κυτταρικής επιφάνειας (Hallahan T.W. et al, 1991). Από τη στιγμή που η Ang προσδένεται στον υποδοχέα αυτό, ενδοκυτταρώνεται και μεταφέρεται στον πυρήνα (Moroianu J. et al, 1994). Η διαδικασία της πυρηνικής μετατόπισης διαμεσολαβείτε από μία NLS αλληλουχία, η οποία βρίσκεται ανάμεσα στα αμινοξέα Met30 και Gly34 (Moroianu J. et al, 1994).

Η ριβονουκλεολυτική ενεργότητα της Ang θεωρείται πως παίζει ρόλο στην ενεργοποίηση της μεταγραφής του rRNA αφού η Ang έχει ήδη εγκατασταθεί

στον πυρήνα. Έτσι λοιπόν, αποδεικνύεται πως και οι τρεις περιοχές είναι απαραίτητες για την αγγειογενετική δράση της Ang και τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων (Shapiro R. *et al*, 1989).

Κύτταρα-στόχοι: τα κύτταρα στόχοι στα οποία δρα η Ang είναι τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα καρκινικά κύτταρα και οι κινητικοί νευρώνες. Αυτοί οι τύποι κυττάρων ανταποκρίνονται στο ερέθισμα της Ang, αλλά διαθέτουν διαφορετικούς υποδοχείς. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα, ο πρώτος τύπος κυττάρων ανταποκρινόμενων στην Ang που έχουν μελετηθεί εκτενώς (HuG.F. *et al*, 1997). Σε αυτά αποδείχθηκε ότι η Ang έχει πλειοτροπική δράση καθώς:

- ✓ Προσδένεται στην επιφάνεια των κυττάρων
- ✓ Αλληλεπιδρά με έναν υποδοχέα 170kDa
- ✓ Επάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και
- ✓ Ενεργοποιεί πρωτεάσες (Hu GF *et al*, 1993).

Η Ang έχει αποδειχθεί να είναι ένας θετικός ρυθμιστής της ανάπτυξης πολλών ανθρώπινων μορφών καρκίνου (Fett J.W. *et al*, 1985). Θεωρείται ως αναγκαία πρωτεΐνη για τη μετάβαση μιας αβλαβούς συστάδας κυττάρων σε μεγάλο όγκο αλλά και για την μετάσταση του όγκου αυτού (Greenblatt M., Shubik P., 1968). Στους περισσότερους τύπους καρκίνου που έχουν μελετηθεί, παρατηρείται αυξημένη έκφραση της Ang στους ιστούς και στον ορό του αίματος. Ένας βασικός μηχανισμός μέσω του οποίου η Ang προάγει την αγγειογένεση σχετίζεται με την μετατόπισή της στον πυρήνα και τη δράση της στην ενεργοποίηση της μεταγραφής του rRNA (Fett J.W. *et al*, 1985).

Τα καρκινικά κύτταρα χρησιμοποιούν αυτό το μηχανισμό της Ang για συνεχή μεταγραφή του rRNA ώστε να καλυφθούν οι υψηλές ενεργειακές απαιτήσεις του κυττάρου (Shuping Li *et al*, 2010). Συνεπώς, οι μελέτες για την ανάπτυξη αντικαρκινικών φαρμάκων στοχεύουν κυρίως στην παρεμπόδιση του μηχανισμού αυτού, δηλαδή της πυρηνικής μετατόπισης της Ang και της μεταγραφής του rRNA (Chen & Guo-fu-Hu, 2010).

Εκτός από τη συσχέτιση της Ang με τις λειτουργίες των αιμοφόρων αγγείων, έχει αποδειχθεί πως σχετίζεται και με πολλές νευροεκφυλιστικές νόσους (Greenway M.J. *et al*, 2006). Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν η

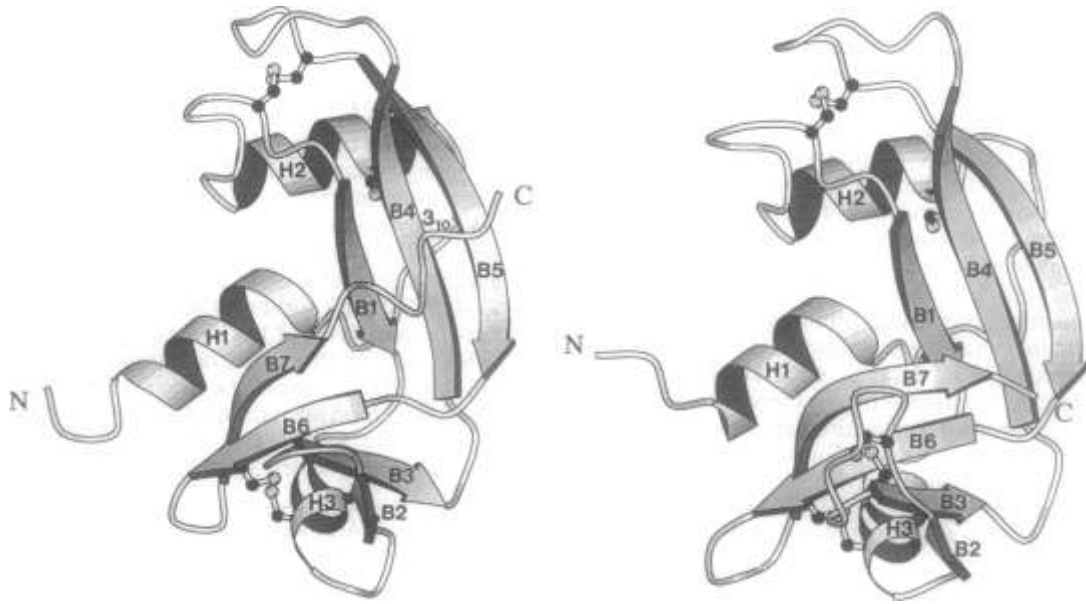
αμυοτροφική πλευρική σκλήρυνση (ALS) και η νόσος Parkinson (Rayaprolu S. *et al*, 2012). Μεταλλάξεις απώλειας λειτουργίας της Ang έχουν βρεθεί σε ασθενείς με ALS (van Es M.A. *et al*, 2011). Αυτό μπορεί να εξηγηθεί ως εξής: μία δυσλειτουργία της Ang μπορεί να οδηγήσει σε ανεπάρκεια μεταγραφής του rRNA στους κινητικούς νευρώνες, οι οποίοι απαιτούν υψηλά επίπεδα βιογένεσης ριβοσωμάτων λόγω των απαιτήσεων τους για τη μεταφορά μηνυμάτων στον επιμήκη νευρώνα, ενώ επαγωγή της έκφρασης της φυσιολογικής πρωτεΐνης οδηγεί σε αποκατάσταση του προβλήματος (Shuring Li *et al*, 2010).

2.2 Η δομή της Αγγειογενίνης

Τα βασικά δομικά χαρακτηριστικά που υποδηλώνουν την αδυναμία της ριβονουκλεολυτικής δράσης της Ang είναι τα εξής:

- i. Η παρεμπόδιση της πυριμιδινικής περιοχής πρόσδεσης από την Gln117
- ii. Η παρουσία ενός δεσμού υδρογόνου ανάμεσα στην Thr44 και Thr80 που καταστέλλει την αποτελεσματικότητα της πυριμιδινικής περιοχής
- iii. Η έλλειψη ενός δεσμού υδρογόνου μεταξύ της His119 και Asp121 που πιθανόν βοηθά την κατάλυση στην RNάση A
- iv. Η έλλειψη δομικών ομολόγων για τα δύο σημαντικά κατάλοιπα της RNάσης A στα οποία προσδένεται πουρίνη (D.D. Leonidas *et al*, 1999).

Η τρισδιάστατη δομή της ανθρώπινης Ang προσομοιάζει με αυτή της RNάσης A με ανάλογες διαστάσεις 38 Å x 43 Å x 34 Å. Οι δομές των δύο πρωτεϊνών παρουσιάζονται στην **Εικόνα 4** (D.D. Leonidas *et al*, 1999).



Εικόνα 4. Δεξιά: Δομή RNάσης A , Αριστερά: Δομή ANG

Ο κεντρικός πυρήνας του μορίου έχει χαρακτηριστική β δομή με ένα ζεύγος αντιπαράλληλων ελικοειδών β-ελασμάτων των καταλοίπων 69-84 (B3-B4) και 93-108 (B5-B6) με τα κατάλοιπα Ser72 και Gly99 να βρίσκονται στις κορυφές (D.D. Leonidas *et al*, 1999). Στην άλλη πλευρά αυτών των κεντρικών αλυσίδων εντοπίζονται δύο επιπρόσθετα β-ελάσματα (κατάλοιπα 41-47 που αποτελούν την περιοχή σύνδεσης B1 και κατάλοιπα 111-116 που αποτελούν την επικράτεια B7) ολοκληρώνοντας τη δομή του β-πτυχωτού φύλλου (Fett J.W. *et al*, 1985). Τα κατάλοιπα 62-65 της B2 αλυσίδας δημιουργούν ένα επιπλέον μικρό έλασμα στη μία πλευρά του κεντρικού ικρίωματος. Μία επιπλέον έλικα, η έλικα H1 είναι γειτονική με μία μικρή 3_{10} -έλικα, η οποία απουσιάζει από την RNάση A (Strydom D.J. *et al*, 1985). Η έλικα H2 (κατάλοιπα 22-23) και η H3 (κατάλοιπα 49-58) προσανατολίζονται με κλίση 70° ως προς στο επίπεδο του β-πτυχωτού φύλλου σε κάθε πλευρά της κύριας δομής. Αυτές οι δύο έλικες συνδέονται δια μέσω του διαλυτού τμήματος του β-ελάσματος B1. Τα εναπομείναντα κατάλοιπα διαμορφώνουν τη δομή θηλιάς (Shapiro R. *et al*, 1989).

Αναλυτικότερα οι υποπεριοχές που απαρτίζουν τη δομή της Ang είναι οι εξής:

- P1 περιοχή: στην Ang τα κατάλοιπα His13, Lys40 και His114 έχουν τόσο όμοιο ρόλο όσο και όμοιο προσανατολισμό με τα αντίστοιχα αμινοξέα της RNάσης A (Borah *et al*, 1985; Ladner *et al*, 1997). Ωστόσο,

οι αντικαταστάσεις της His13 και His114 από Ala (Shapiro *et al.*, 1989) μειώνουν τη ριβονουκλεολυτική ενεργότητα της Ang όπως και η αντικατάσταση της Lys40 από Arg (Trautwein *et al.*, 1991). Επίσης, η P1 περιοχή της Ang αποτελείται από πληθώρα μορίων νερού που δημιουργούν ένα δίκτυο, το οποίο συνδέει τα αμινοξέα His114, His13, τα άτομα του οξυγόνου της καρβονυλικής ομάδας της Val113 και της Leu115 και την κύρια αμινοτελική αλυσίδα της Gln117 (D.D.Leonidas *et al.*, 1999).

- **B1 περιοχή:** η περιοχή της Ang που αντιπροσωπεύει τη B1 περιοχή της RNάσης A αποτελείται από κάποια όμοια αμινοξέα με αυτά της RNάσης A, όπως Thr44 (αντίστοιχη της Thr45), Ile42 (αντίστοιχη της Val43), Asn43 (αντίστοιχη της Asn44), Thr80 (αντίστοιχη της Asp83) και Leu115 (αντίστοιχη της Phe120) αλλά παρεμποδίζεται από την Gln117, η οποία καλύπτει τη θέση ένωσης των πυριμιδινών στην RNάση A (Acharya *et al.*, 1994). Η B1 περιοχή μπορεί να υπάρξει σε δύο μορφές: ανοιχτή και κλειστή, οι οποίες εναλλάσσονται ανάλογα με την πρόσδεση του υποστρώματος (D.D.Leonidas *et al.*, 1999). Η μετάβαση στην ανοιχτή μορφή ελέγχθηκε με μελέτες μεταλλαξιγένεσης και αποδείχθηκε ότι στο τμήμα αυτό η Ang προτιμά την τοποθέτηση κυτοσίνης αντί ουρακίλης (Harper, J.W. *et al.*, 1989). Η δομική αναδιάταξη που οδηγεί στο άνοιγμα του B1 τμήματος της Ang δεν αλλάζει τις θέσεις των στοιχείων της P1 περιοχής που θέτει φραγμούς στη θέση του πυριμιδινικού δακτυλίου ή στο β-πτυχωτό φύλλο που περιέχει τη Thr40 και τη Thr80, γεγονός λογικό εξαιτίας του μεγάλου αριθμού των δεσμών υδρογόνου που χαρακτηρίζουν το β-πτυχωτό φύλλο και την εκτενή διαταραχή της συνολικής δομής της πρωτεΐνης που θα προέκυπτε από την αλλαγή (D.D. Leonidas *et al.*, 1999).
- **B2 περιοχή:** η περιοχή αυτή παρουσιάζει την ίδια σειρά προτίμησης στις βάσεις όπως η RNάση A, αλλά διακρίνεται μεταξύ των βάσεων λιγότερη αποτελεσματικότητα (Russo N. *et al.*, 1996a). Στη δεδομένη περιοχή, χαρακτηριστικό ρόλο παίζουν τα αμινοξέα His114 (κύριο συστατικό της B2) και Asp116. Η Asp116 φαίνεται πως βρίσκεται στην ευρύτερη

περιοχή εκτός της κύριας περιοχής B2 και είναι πολύ σημαντική, βάσει μελετών μεταλλαξιγένεσης (Curran *et al*, 1993b).

- P2 περιοχή: η περιοχή αυτή αποτελεί μία κινητικά αποδεδειγμένη περιοχή της Ang που προσδένει υποστρώματα. Προσδένει, αποδεδειγμένα, το υπόστρωμα 3',5'-ADP 6 φορές πιο ισχυρά από το 5'-AMP και διασπά το νουκλεοτίδιο CrAp 9 φορές πιο αποτελεσματικά από το CrA (Russo N. *et al*, 1996a).

Χαρακτηριστικό της P2 περιοχής είναι η παρουσία ενός σημαντικού αμινοξέος, της Arg5, όπως απέδειξαν οι μελέτες μεταλλαξιγένεσης και οι κινητικές μελέτες (D.D.Leonidas *et al*, 1999). Η σημαντικότητα της Arg5 αποδεικνύεται όταν μετά από την αντικατάστασή της από Ala μειώνεται η ενεργότητα ως προς τα πολυνουκλεοτίδια έως και 4 φορές (Shapiro&Vallee, 1992). Ωστόσο, η αλλαγή αυτή έχει μικρό αντίκτυπο στο σπάσιμο των μικρών υποστρωμάτων γεγονός που δηλώνει ότι το κατάλοιπο της Arg5 εμπλέκεται στην πρόσδεση κάποιων επουσιωδών συστατικών υποστρώματος (Shapiro&Vallee, 1992). Επιπλέον, η Arg5, όπως απέδειξαν οι αναλύσεις της δομής της Ang, εμπλέκεται στις αλληλεπιδράσεις δόμησης του κρυστάλλου και δημιουργεί δεσμούς υδρογόνου με τα άτομα του οξυγόνου της καρβονυλομάδας της Thr89 και Pro91 ενός συμμετρικά δομημένου μορίου.

- Η περιοχή πυρινικής μετατόπισης: συμπληρωματικά με το ριβονουκλεολυτικό κέντρο και την περιοχή πρόσδεσης της Ang, υπάρχει και μία τρίτη περιοχή, η περιοχή πυρινικής μετατόπισης που είναι απαραίτητη για την αγγειογενετική ενεργότητα. Αυτή η περιοχή συνιστά ένα σήμα πυρινικής μετατόπισης (NLS) που εμπλέκεται στη μεταφορά της Ang στον πυρινίσκο (Moroiianu & Riordan, 1994a,b).

Ο βασικός τύπος NLS, όπως αυτός της Ang, περιλαμβάνει ένα σύνολο βασικών αμινοξέων, εκτίθεται στην κυτταρική επιφάνεια και είναι μέρος εύκαμπτων θηλιών (D.D.Leonidas *et al*, 1999).

- Περιοχή κυτταρικής πρόσδεσης: πολλές δομικές αλλαγές που μπορούν να συμβούν στα αμινοξέα της Ang καταργούν την αγγειογενετική της ενεργότητα χωρίς ωστόσο να επηρεάζουν την ενζυμική της ενεργότητα (Hallahan *et al*, 1991)., χωρίς ωστόσο να είναι σαφές εάν η περιοχή

αυτή αντιστοιχεί στην περιοχή πρόσδεσης Ang BP/ακτίνης, στην περιοχή του υποδοχέα ή και στις δύο.

Τα πιο σημαντικά αμινοξέα της περιοχής αυτής θεωρείται πως είναι η Asn61, η Arg66 και η Asn109. Συγκεκριμένα, η κύρια αλυσίδα του καταλοίπου Asn61 σχηματίζει τρεις δεσμούς υδρογόνου και μπορεί να σχηματίσει μόνο έναν επιπλέον δεσμό με την ακτίνη ή τον υποδοχέα της (Hallahan *et al*, 1992). Η Arg66 το άλλο σημαντικό κατάλοιπο, αλληλεπιδρά με την καρβοξυλική ομάδα της Gln67 αλλά αυτό το τμήμα της αλυσίδας της Arg είναι πολύ εύκαμπτο. Τέλος, το αμινοξύ Asn109 είναι τοποθετημένο στη θηλιά 108-111 που συνδέει τα δύο ελάσματα B6-B7. Αυτή η θηλιά, που είναι πολύ καλά καθορισμένη στους χάρτες ηλεκτρονιακής πυκνότητας της Pyl1 και Met-1 Ang, είναι εκτεθειμένη στο διαλύτη και οι πλευρικές αλυσίδες της δεν αναπτύσσουν ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις. Επιπλέον, συγκρίνοντας την αντικατάσταση του καταλοίπου Asn109 και του Asn61 από την isoAsp θεωρήθηκε πως η πρώτη είναι λιγότερο αποδιοργανωτική συγκριτικά με τη δεύτερη, ωστόσο μπορεί να επηρεάσει τις αλληλεπιδράσεις της κύριας αλυσίδας ανάμεσα στα ελάσματα B6-B7 (D.D. Leonidas *et al*, 1999).

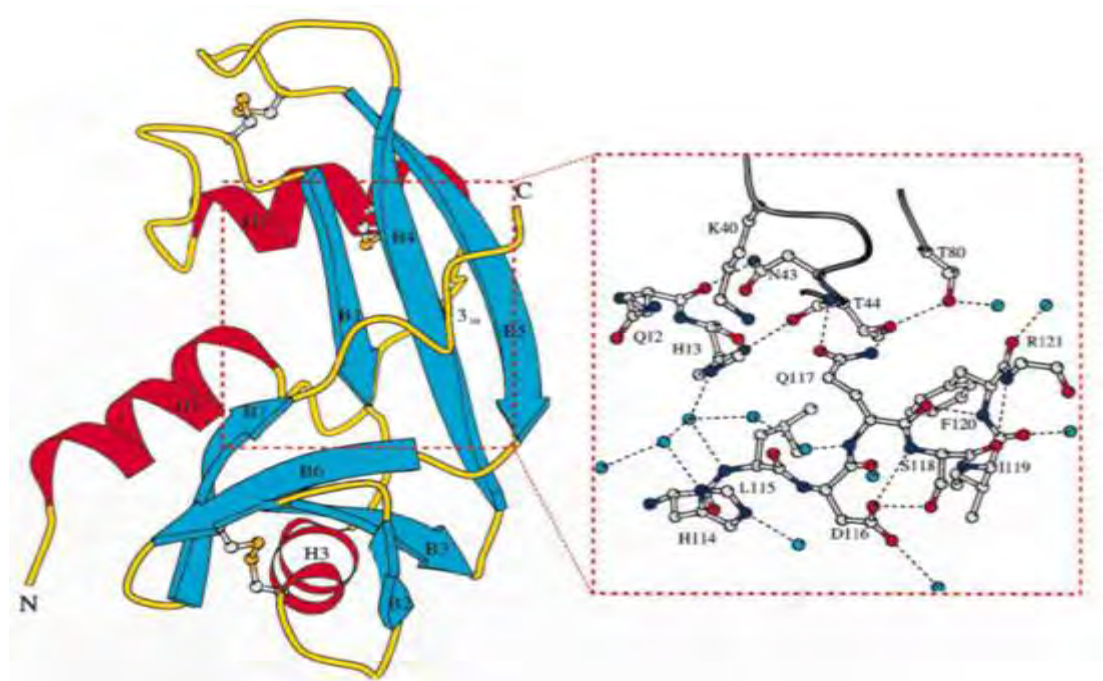
Συμπερασματικά, δεν υπάρχει καμία ομοιότητα ανάμεσα στην περιοχή κυτταρικής πρόσδεσης της Ang με την ανάλογη περιοχή της RNάσης A τόσο στη διάταξη της αμινοξικής ακολουθίας όσο και στην τρισδιάστατη δομή (Russo N. *et al*, 1996b). Στην Ang υπάρχει έλλειψη ενός δισουλφιδικού δεσμού και δύο καταλοίπων, στο τμήμα 60-68 που αντιστοιχεί στο τμήμα 61-71 της RNάσης A. Επιπλέον, το κατάλοιπο Asn109 έχει αντικατασταθεί στην RNάση A από Gly και η θηλιά στην οποία είναι τοποθετημένη διαθέτει δύο επιπλέον κατάλοιπα (Richardson R. *et al*, 1988). Έτσι λοιπόν, συμπεραίνεται ότι η περιοχή αυτή παρουσιάζει διαφορές μεταξύ των δύο πρωτεϊνών καθώς στην Ang δρα ως περιοχή κυτταρικής πρόσδεσης ενώ στην RNάση A ως περιοχή αναγνώρισης πουρινών.

2.3 Ενεργό κέντρο Αγγειογενίνης- Καταλυτικός μηχανισμός

Ύστερα από έρευνες που έγιναν για τη χαρτογράφηση του ριβονουκλεολυτικού κέντρου της Ang προέκυψε ότι το ενεργό κέντρο της όπως και της RNάσης A (Richards F.M. & Wyckoff H.W., 1971) φέρει την εξής δομή:

- i. Την P1 περιοχή, η οποία αποτελείται από τα κατάλοιπα His13, Lys40 και His114, όπου συμβαίνει η διάσπαση του φωσφοδιεστερικού δεσμού (Shapiro R. *et al*, 1989; Shapiro R. & Vallee B.L, 1989).
- ii. Την B1 περιοχή, η οποία περιλαμβάνει Thr44, η πλευρική ομάδα της οποίας σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου με πυριμιδίνες (Curran, T.P. *et al*, 1993).
- iii. Την B2 περιοχή, όπου γίνεται η πρόσδεση της βάσης του νουκλεοτιδίου που βρίσκεται καθοδικά του φωσφοδιεστερικού δεσμού.

Στην **Εικόνα 5**, παρουσιάζεται η δομή του ενεργού κέντρου της Ang:



Εικόνα 5. Δομή του ενεργού κέντρου της Ang.

Η Ang εμφανίζει μία 10-30% προτίμηση για υποστρώματα που στο δινουκλεοτίδιο NpN' στη θέση N υπάρχουν κυτοσίνες αντί για ουρακίλες και

στη θέση Ν'γουανίνες αντί για αδενοσίνες, όπως συμβαίνει και στην RNάση A (Harper, J.W. *et al*, 1989).

Η Ang διασπά τους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς του RNA μέσω υδρόλυσης: οι δύο His, είναι υπεύθυνες για την υδρόλυση του φωσφοδιεστερικού δεσμού, ενώ η Lys λόγω του θετικού της φορτίου αλληλεπιδρά με τις αρνητικά φορτισμένες φωσφορικές ομάδες. Η υδρόλυση αυτή λοιπόν, όπως και στη ριβονουκλεάση A, συντελείται σε δύο στάδια μέσω ενός 2',3'-κυκλικού φωσφοδιεστέρα. Στο πρώτο στάδιο, γίνεται η τρανσφωσφορυλίωση του 3',5'-φωσφοδιεστερικού δεσμού από την 5'θέση του ενός νουκλεοτιδίου στην 2'θέση του γειτονικού. Αποτέλεσμα είναι η διάσπαση του δεσμού του υποστρώματος, ο σχηματισμός ενός 2',3'-κυκλικού-φωσφοδιεστέρα με ελεύθερο το 3'-φωσφορικό άκρο και η απελευθέρωση μιας 5'-OH ομάδας. Στο δεύτερο στάδιο, γίνεται η υδρόλυση του 2',3'-κυκλικού-φωσφοδιεστέρα δίνοντας μια 3'-μονοφωσφορική ομάδα 44. Η αντίδραση τρανσφωσφορυλίωσης είναι ταχύτερη και αντιστρεπτή σε σχέση με την υδρόλυση, η οποία είναι πρακτικά μη αντιστρεπτή. Ο 2',3'-κυκλικός-φωσφοδιεστέρας δεν είναι ένα ενδιάμεσο, αλλά κανονικό προϊόν, καθώς απελευθερώνεται μετά την τρανσφωσφορυλίωση 45. Το στάδιο της υδρόλυσης δεν ξεκινά παρά μόνο όταν δεν υπάρχει πλέον υπόστρωμα για τρανσφωσφορυλίωση. Το νουκλεοτίδιο, το οποίο βρίσκεται στην 3'-πλευρά του δεσμού του υποστρώματος που διασπάται από το ένζυμο πρέπει να είναι μια πυριμιδίνη, γιατί ο πουρινικός δακτύλιος είναι πολύ μεγάλος για να χωρέσει στο ενεργό κέντρο χωρίς να το στρεβλώσει. (Russo N. *et al*, 1994).

1.4 Met(-1) ANG

Η κύρια πηγή για την απομόνωση της Ang είναι τα HT-29 κύτταρα αδενοκαρκινώματος, το ανθρώπινο πλάσμα και τα ηπατικά κύτταρα (Fett, J.W. *et al*, 1985; Kurachi, K. *et al*, 1988; Shapiro, R. *et al*, 1987). Η απόδοση της Ang από τις πηγές αυτές υπολογίζεται περίπου στα 0,5 μg/l, 60-150 μg/l και 400μg/l, αντίστοιχα (Shapiro R. *et al*, 1988a). Για την παραγωγή όμως

επαρκούς ποσότητας αγγειογενίνης για πειραματικούς σκοπούς έχουν απομονωθεί δύο μορφές της πρωτεΐνης σε βακτηριακά συστήματα έκφρασης *E.coli*, η Pyl-1-Ang ή αλλιώς η ανθρώπινη μορφή της Ang και η Met(-1)-Ang.

Η αυθεντική Ang διαφέρει από τη Met(-1) μόνο στο N-τελικό άκρο, όπου η αυθεντική Pyl1 περιέχει ένα κατάλοιπο πυρογλουταμινικού οξέος στη θέση 1, ενώ η Met(-1) έχει γλουταμίνη στη θέση 1 και ένα επιπλέον κατάλοιπο μεθειονίνης στη θέση -1 (Shapiro *et al*, 1988a). Παρά το γεγονός αυτής της μοναδικής διαφοράς, οι κρύσταλλοι της Pyl1 Ang είναι πιο σταθεροί στην ακτινοβολία με ακτίνες X και προτιμάται για υψηλής ανάλυσης δομικές μελέτες (D.D. Leonidas *et al*, 1999).

Παρόλο που η Met(-1) Ang είναι δραστική, ωστόσο η χρήση της περιορίζεται σε συγκεκριμένες έρευνες και θεωρείται απαραίτητη η απόκτηση της αυθεντικής <Glu-1 Ang για ποικίλους λόγους (Shapiro R. *et al*, 1988a). Χαρακτηριστικά, αποδείχθηκε ότι το κατάλοιπο της μεθειονίνης προκαλεί προβλήματα στη θεραπευτική χρήση λόγω πιθανών ανοσολογικών αποκρίσεων. Επιπρόσθετα, το α-αμινοτελικό άκρο θα μπορούσε να δυσκολέψει τις μελέτες για χημικές τροποποιήσεις ή την ενεργότητα των παραγόμενων μεταλλαγμάτων (Shapiro R. *et al*, 1988a).

Προκειμένου να περιοριστούν τα προβλήματα αυτά, εξετάστηκαν μέθοδοι για τη μετατροπή της Met(-1) μετά το πέρας των ερευνών στην αυθεντική της <Glu-1. Η μετατροπή αυτή επιτεύχθηκε με ενζυμική μετατόπιση της μεθειονίνης υπό συνθήκες όπου η γλουταμίνη του N-τελικού άκρου κυκλοποιείται μη ενζυμικά (Shapiro R. *et al*, 1986).

1.5 Αναστολείς της Αγγειογενίνης

Καθώς η αγγειογενίνη αποτελεί σημαντικό αγγειογενετικό παράγοντα, έχει αποτελέσει το ενδιαφέρον των ερευνητών για τη δημιουργία μικρών μορίων αναστολέων αυτής και συνεπώς της αγγειογένεσης (D.D. Leonidas *et al*, 1999).

Γενικά, έχουν ταυτοποιηθεί διάφοροι αναστολείς της Ang, όπως μικρά δίκλινα μόρια siRNA, μονοκλωνικά αντισώματα, διαλυτές πρωτεΐνες πρόσδεσης, ενζυμικοί αναστολείς και απενεργοποιητές πυρηνικής μετατόπισης που αναστέλλουν τη δημιουργία όγκων και τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων (Ibaragi S. *et al*, 2009; Olson K.A. *et al*, 1995; Kao R.Y. *et al*, 2002). Επιπλέον, με δομικές και βιοφυσικές μελέτες και μελέτες μεταλλαξιγένεσης ταυτοποιήθηκαν μικρά μόρια αναστολείς της Ang που έχουν αποδειχθεί ταυτόχρονα αναστολείς της RNάσης A (Harper J.W. *et al*, 1988).

Ωστόσο, κύριος στόχος έχει τεθεί η μελέτη και ανάπτυξη νουκλεοτιδικών αναστολέων που στοχεύουν το ενεργό κέντρο της Ang (D.D. Leonidas *et al*, 1999). Η αγγειογενετική ενεργότητα της Ang είναι απόλυτα εξαρτημένη από την ενζυμική της δραστηριότητα και οι αναστολείς που προσδένονται στο ενζυμικό ενεργό κέντρο αναστέλλουν την αγγειογενετική της ενεργότητα. Με βάση όμως τις δομικές μελέτες, ο σχεδιασμός μικρών μορίων νουκλεοτιδικών αναστολέων είναι πολύ δύσκολος λόγω της παρεμπόδισης του ενεργού κέντρου από τη Gln117 και το C-τελικό τμήμα του μορίου της Ang (Acharya K.R. *et al*, 1994; Acharya K.R. *et al*, 1995; Holloway D.E. *et al*, 2005).

Μετάλλαξη της Gln117 σε Gly/Ala οδηγεί σε αύξηση της ριβονουκλεολυτικής ενεργότητας της Ang (Russo N. *et al*, 1995). Ωστόσο, η δομή της Ang σε σύμπλοκο με τον φυσικό πρωτεϊνικό αναστολέα της, τον αναστολέα ριβονουκλεάσης (RI) 50kDa (Papageorgiou A.C. *et al*, 1997) και ένα τμήμα αντισώματος (Chavali G.B. *et al*, 2003) παρουσιάζει σημαντικές αλλαγές στην περιοχή κυτταρικής πρόσδεσης. Αυτή η περιοχή βρίσκεται κοντά στο ενεργό κέντρο της Ang και προβλέφθηκε ότι η εισαγωγή μίας όμοιας δομικής αλλαγής θα επιτρέψει στο καρβοξυτελικό β-έλασμα να υποστεί μικρή μετακίνηση ώστε να διευκολύνει την πρόσδεση του υποστρώματος/αναστολέα χωρίς ιδιαίτερη αλλαγή στις καταλυτικές ιδιότητες του μορίου (Nethaji Thiyagarajan *et al*, 2012).

Ο RI συνδέεται στην πρωτεΐνη με K_i $7 \times 10^{-16} M$, δημιουργώντας τον ισχυρότερο δεσμό αλληλεπίδρασης πρωτεΐνης-πρωτεΐνης (Chang-Zheng Chen *et al*, 1997). Ο RI αποδείχθηκε ότι καταστέλλει την ανάπτυξη μαστικών όγκων στους

ποντικούς (Polakowski *et al*, 1993) και εμπλέκεται στη ρύθμιση της φυσιολογικής λειτουργίας της Ang *in vivo*.

Προκειμένου να δοθεί μία βάση για το σχεδιασμό βελτιωμένων νουκλεοτιδικών αναστολέων, εξετάστηκαν λεπτομερώς οι περιοχές B1, P1 και B2 της Ang καθώς και η παρουσία των περιφερειακών περιοχών πρόσδεσης για επιπλέον φωσφορικά (περιοχές P0 και P2) και βάσεις (περιοχή B3) (Russo N. *et al*, 1995).

Ύστερα από μελέτες σχετικά με τις περιοχές-στόχους των αναστολέων της Ang, αποκαλύφθηκε από την κρυσταλλική της δομή ότι η B1 περιοχή είναι καλυμμένη από τη Gln117 και συνεπώς την καθιστά αδύναμο στόχο αναστολής (Shapiro R. &Vallee B.L., 1989). Η έλλειψη μίας αποτελεσματικής περιοχής πρόσδεσης φωσφορικών στο 5' άκρο της B1 καθώς και η ασθενής πρόσδεση των πυριμιδινικών καταλοίπων αντανάκλα το υψηλό ενεργειακό κόστος της αλλαγής στη διαμόρφωση και μαζί με την απουσία της P0 περιοχής επιβεβαιώνει ότι η B1 περιοχή της Ang δεν είναι καλός στόχος αναστολής (Russo N. *et al*, 1996). Η B2 περιοχή της Ang, η οποία είναι λιγότερο αποτελεσματική από το αντίστοιχο τμήμα της RNάσης A, δείχνει να παρέχει ένα χρήσιμο πυρήνα πρόσδεσης και η προσθήκη 5'-φωσφορικών στη ριβόζη ενισχύει την αναστολή (Russo N. *et al*, 1996a). Παρόλο που η B2 περιοχή που προσδένει πουρίνες στο 3' άκρο της B1 περιοχής είναι επίσης αδύναμη, ωστόσο οι φωσφορικές υποπεριοχές συνεισφέρουν σημαντικά καθώς τόσο το 3',5'-ADP όσο και το 5'-ADP έχουν τιμές K_i έξι φορές μικρότερες από αυτή του 5'-AMP και η προσθήκη 3' φωσφορικού στο υπόστρωμα CrA αυξάνει το λόγο K_{cat}/K_m 9 φορές (Russo N. *et al*, 1996a). Η P2 περιοχή που περιέχει την Arg5 και την His8, συνεισφέρει και αυτή σημαντικά: πρόσδεση 3'-φωσφορικού μειώνει την K_i 5,5 φορές ενώ η πρόσδεση 2'-φωσφορικού βελτιώνει την πρόσδεση περισσότερο από 18 φορές (Russo N. *et al*, 1996a).

Η ανάπτυξη μικρών μορίων αναστολέων που χρησιμοποιούνται για την RNάση A μπορούν να χρησιμοποιηθούν και για τη μελέτη σε ομόλογες πρωτεΐνες, όπως η EDN, η ECP και η Ang (Shapiro & Vallee, 1989).

Τα τελευταία χρόνια ανακαλύφθηκε μία νέα τάξη αναστολέων, τα παράγωγα της 5'-πυροφωσφορικής αδενοσίνης (D.D. Leonidas *et al*, 1997, 1999).

Κρυσταλλογραφικές μελέτες σχετικά με την πρόσδεση κάθε παραγώγου, όπως του ppA-3'-p, ppA-2'-p και dUppA, στην RNάση A έδειξαν ότι οι φωσφορικές ομάδες αποτελούν τις κύριες περιοχές πρόσδεσης για τη σύνδεση των αναστολέων αυτών (Russo *et al*, 1997; Russo and Shapiro, 1999). Η 5'-πυροφωσφορική ομάδα συνδέεται με τη β-φωσφορική ομάδα της P1 περιοχής, ενώ τα 2' και 3' αδενυλικά φωσφορικά προσδένονται στις περιφερειακές περιοχές πρόσδεσης φωσφορικών P0 και P2, αντίστοιχα. Η αδενίνη υιοθετεί μία διαμόρφωση syn και προσδένεται στη B2 ενώ η ουριδίνη στη B1 (D.D. Leonidas, 2003). Αυτοί οι αναστολείς ενδέχεται να έχουν ανασταλτική δράση και έναντι της EDN, της RNάσης A και της Ang (Shapiro 1998; Russo & Shapiro, 1999). Ωστόσο, πρόσφατες δομικές μελέτες της EDN σε σύμπλοκο με τρεις αναστολείς αδενυλικών φωσφονουκλεοτιδίων (D.D. Leonidas *et al*, 2001a), της ECP σε σύμπλοκο με το 2',5'-ADP (Mohan *et al*, 2002) και της Ang σε σύμπλοκο με τα φωσφορικά και πυροφωσφορικά ιόντα (D.D. Leonidas *et al*, 2001b), έδειξαν ότι ο τρόπος πρόσδεσης των φωσφονουκλεοτιδίων σε αυτά τα ένζυμα διαφέρει σημαντικά συγκριτικά με αυτόν στην RNάση A (D.D. Leonidas *et al*, 2001a; Mohan *et al*, 2002).

Συγκεκριμένα, στην Ang το πυροφωσφορικό ιόν συνδέεται με μία από τις φωσφορικές ομάδες στην P1 περιοχή και με ένα άλλο που κατευθύνεται προς την πυριμιδινική θέση πρόσδεσης B1, αντίθετα με τον τρόπο πρόσδεσης των παραγώγων των πυροφωσφορικών στην RNάση A (D.D. Leonidas *et al*, 2001b).

Τα παράγωγα της 5'-φωσφορικής αδενοσίνης που ελέγχθηκαν εκτενώς ως πιθανοί αναστολείς ήταν το μόριο ppA-2'-p με K_i 110 μ M, το οποίο από κινητικές μελέτες αποδείχθηκε ότι αποτελεί αναστολέα της δράσης της Ang (Russo., 2001) και το μόριο 3',5'-ADP με K_i 1,3mM (Russo *et al*, 1996).

Επίσης, αναλύθηκε και η σύνδεση των 5'-ATP, 5'-ADP και NADPH στην RNάση A. Συγκεκριμένα, η 5'-ATP αποτελεί ισχυρότερο αναστολέα της RNάσης A συγκριτικά με τη 5'-AMP και η περιοχή της Ang που προσδένει αυτά τα φωσφορικά ιόντα είναι δομικά πολύ όμοια με αυτή της RNάσης A και γι' αυτό το λόγο τα δύο αυτά μόρια μελετήθηκαν εκτενώς (Russo *et al*, 1995). Κρυσταλλογραφικές μελέτες με περίθλαση ακτίνων X έδειξε ότι η 5'-ATP

προσδέεται, στην RNάση A, με την αδενίνη που να καταλαμβάνει τη B2 περιοχή όπως ένα RNA υπόστρωμα και με τη γ-φωσφορική ομάδα να συνδέεται στην P1 περιοχή.

Η 5'-ATP είναι γνωστή ως πιο αποτελεσματικός αναστολέας της RNάσης A συγκριτικά με τη 5'-AMP (Ukita T. *et al*, 1961). Η ισχύς της αναστολής της RNάσης A από τις 5'-φωσφορικές αδενosίνες αυξάνει καθώς ο αριθμός των φωσφορικών ομάδων αυξάνεται. Η σύνδεση των αναστολέων αυτών έχει μελετηθεί και έναντι της Ang και βρέθηκε ότι οι τιμές K_i για τη 5'-AMP(pA), τη 5'-ADP (ppA) και την 5'-ATP (pppA) είναι 7,2, 1,2 και 0,8 μM , αντίστοιχα (Russo N. *et al*, 1996; Kumar K. *et al*, 2003).

Το μόριο της 5'-ADP βρέθηκε ότι προσδέεται στην P1-B2 περιοχή του ενεργού κέντρου της RNάσης A.

Το μόριο ppA-2'-p βρίσκεται ανάμεσα στους πιο ισχυρούς αναστολείς της RNάσης A με $K_i=0,52 \text{ M}\mu$ (Russo N. *et al*, 1997). Το NADPH και NADP^+ είναι νουκλεοτίδια που περιέχουν κατά το ήμισυ ppA-2'-p και γι αυτό θεωρούνται σχετικά λιγότερο αποτελεσματικοί αναστολείς με τιμές K_i 12 και 63 μM , αντίστοιχα (Kumar K. *et al*, 2003). Στην RNάση A, η αδενίνη του NADPH στοιβάζεται έναντι του ιμιδαζολικού δακτυλίου της His119 και η 2'-φωσφορική ομάδα καταλαμβάνει την περιοχή P1. Αυτό συμβαδίζει με τον τρόπο πρόσδεσης του ppA-2'-p στην RNάση, την EDN και την Ang, ωστόσο πάλι εντοπίζονται διαφορές συγκριτικά με τον τρόπο πρόσδεσης του μορίου στις αλυσίδες των τριών ομόλογων πρωτεϊνών (D.D. Leonidas *et al*, 2003; Tonan K. *et al*, 2003). Τέλος, παρόλο που τόσο το NADPH όσο και το NADP^+ περιλαμβάνουν το ppA-2'-p σαν βασικό στοιχείο, τα αδενυλικά τμήματα αυτών των δινουκλεοτιδίων δεν υιοθετούν τη διαμόρφωση *syn* που παρατηρείται κατά την πρόσδεση της ppA-2'-p στην RNάση A (D.D. Leonidas *et al*, 1997).

1.6 Κρυσταλλογραφία

1.6.1 Γενικά

Κρυστάλλωση είναι η βιοχημική τεχνική που αρχικά χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση και τον έλεγχο καθαρότητας των πρωτεϊνών καθώς η μικροκρυσταλλικότητα των μορίων είναι ένδειξη της καθαρότητάς τους. Για τη δομική μελέτη μορίων χρησιμοποιείται η περίθλαση με ακτίνες Χ. Η ένταση των περιθλώμενων ακτίνων Χ είναι ανάλογη με τον όγκο του κρυστάλλου και αντίστροφα ανάλογη με τον όγκο της στοιχειώδους κυψελίδας που δεν είναι μικρότερος από μία πρωτεϊνική υπομονάδα. Οι ακτίνες Χ σκεδάζονται ασθενώς από ένα μόνο μόριο σε αντίθεση με ότι συμβαίνει με έναν κρύσταλλο που περιέχει μεγάλο αριθμό μορίων διευθετημένων σε συγκεκριμένη σειρά. Σήμερα με την βοήθεια των εργαλείων της βιοτεχνολογίας είναι μάλλον ευκολότερο να αποκτήσει ο ερευνητής τις απαιτούμενες ποσότητες πρωτεΐνης για κρυσταλλώσεις (μάλιστα σε κάποιες περιπτώσεις αρκετά mg), καθώς ο στόχος δεν είναι μόνο η ανάπτυξη κρυστάλλων αλλά και το κατάλληλο μέγεθος αυτών (McPherson, 2004).

1.6.2 Κρύσταλλοι πρωτεϊνών

Οι κρύσταλλοι είναι μια φάση της στερεάς κατάστασης, στην οποία τα μόρια (ή άτομα) που αποτελούν τον κρύσταλλο είναι περιοδικά διευθετημένα στο χώρο. Ωστόσο κάθε περιοδική διευθέτηση μορίων δεν αποτελεί σίγουρα κρύσταλλο. Η διάκριση των κρυστάλλων βασίστηκε αρχικά στα εξωτερικά τους γνωρίσματα και στις ιδιαίτερες φυσικοχημικές ιδιότητες που μπορεί να εμφανίζουν. Τα κυριότερα γνωρίσματα των κρυστάλλων είναι: η συμμετρία, η περιοδικότητα και το γεγονός ότι παρουσιάζουν διαφορετικά φυσικοχημικά χαρακτηριστικά ανάλογα με τη διευθέτησή τους, με αποτέλεσμα να χαρακτηρίζονται ανισότροπα υλικά. Ένας κρύσταλλος αποτελείται από μόρια που είναι τοποθετημένα σε τάξη, δηλαδή κανονικά, συμμετρικά και επαναλαμβανόμενα. Η ασύμμετρη μονάδα ενός κρυστάλλου είναι εκείνο το μέρος που δεν εμφανίζει καμία συμμετρία. Ένας τελεστής συμμετρίας παράγει το μοτίβο του δικτυωτού πλέγματος. Η επανάληψη αυτού του μοτίβου από τη μετατόπιση

παράγει της κορυφές της μοναδιαίας κυψελίδας, η οποία είναι η βασική μονάδα επανάληψης του πλέγματος του κρυστάλλου. Το μοτίβο του κρυσταλλικού πλέγματος μετατοπίζεται και προς τις τρεις διαστάσεις σχηματίζοντας μία κανονική και επαναλαμβανόμενη διάταξη, το κρυσταλλικό πλέγμα. Κάθε επαναλαμβανόμενο μοτίβο καταλαμβάνει ένα σημείο μέσα στο κρυσταλλικό πλέγμα. Τα γειτονικά σημεία μπορούν να συνδεθούν μεταξύ τους για να αποτελέσουν τις κορυφές τρισδιάστατων κουτιών, τις μοναδιαίες κυψελίδες. Οι ακμές της μοναδιαίας κυψελίδας ορίζουν ένα σύνολο μοναδιαίων διανυσματικών αξόνων **a**, **b**, **c** (K.E. vanHoldeet al, 2010).

Ένας κρύσταλλος είναι μία επαναλαμβανόμενη σε τρεις διαστάσεις διάταξη των μοναδιαίων κυψελίδων που οικοδομεί ένα κρυσταλλικό πλέγμα (**Εικόνα 6**). Οι μοναδιαίες κυψελίδες μετατοπίζονται σε τρεις διαστάσεις ώστε να γεμίσει ένας όγκος. Επειδή όλες οι μοναδιαίες κυψελίδες μέσα σ' έναν κρύσταλλο είναι ίδιες, η μορφολογία ενός κρυστάλλου καθορίζεται από το μέγεθος και τη μορφή μιας μοναδιαίας κυψελίδας και τη συμμετρία του μοτίβου. Η επίλυση της κρυσταλλικής δομής απαιτεί τον προσδιορισμό των θέσεων των ατόμων στην ασύμμετρη μονάδα.



Εικόνα 6. Δομές μορίου, κυψελίδας και κρυστάλλου.

Ένα διάνυσμα προσδιορίζεται πλήρως, όταν εκτός από το μέτρο, είναι γνωστή και η γωνία η οποία σχηματίζει με κάποιο άξονα αναφοράς. Συνεπώς, το σύνολο των ανυσμάτων a , b , c και των γωνιών α , β , γ , που σχηματίζουν μεταξύ τους, ονομάζονται πλεγματικές παράμετροι και ορίζουν πλήρως τη στοιχειώδη κυψελίδα. Αντίστοιχα, το σημειακό πλέγμα του κρυστάλλου της πρωτεΐνης

είναι δυνατό να ορισθεί με ακρίβεια αν μετατοπιστούν διαδοχικά τα διανύσματα *a, b, c*.

Οι αλληλεπιδράσεις που κρατούν τις πρωτεΐνες στο κρυσταλλικό πλέγμα ονομάζονται κρυσταλλικές επαφές και είναι ίδιες σε κάθε οργανωμένη βασική μονάδα μορίων που περιέχεται στην στοιχειώδη κυψελίδα του κρυσταλλικού πλέγματος.

Απαιτείται η μεγαλύτερη δυνατή καθαρότητα των πρωτεϊνών για τα πειράματα κρυστάλλωσης, καθώς η ανομοιογένεια λόγω βιοχημικών τροποποιήσεων (πρωτεόλυση, φωσφορυλίωση, γλυκοζυλίωση) ή άλλων παραγόντων οδηγεί τις πρωτεΐνες να μην κρυσταλλώνουν ή να κρυσταλλώνουν δύσκολα.

1.6.3 Παράγοντες που επηρεάζουν την κρυστάλλωση

Η δημιουργία πυρήνων κρυστάλλωσης και η αύξηση των κρυστάλλων εξαρτάται από πολλές παραμέτρους που αναφέρονται παρακάτω (Blundell, T.L. & Johnson, L.N., 1976):

- *Ενδογενείς φυσικοχημικές παράμετροι:* όπως υπερκορεσμός (συγκέντρωση πρωτεΐνης και παραγόντων κατακρήμνισης), θερμοκρασία, pH (μεταβολές), ιοντική ισχύς και καθαρότητα των χημικών (φύση των παραγόντων κατακρήμνισης, ρυθμιστικά διαλύματα, επιπρόσθετες χημικές ουσίες).
- *Βιοχημικές και βιοφυσικές παράμετροι:* όπως η ευαισθησία της δομής της πρωτεΐνης σε φυσικές παραμέτρους (θερμοκρασία, pH, ιοντική ισχύς, διαλύτες) και η δέσμευση άλλων υποκαταστατών (υποστρώματα, συμπαραγόντες, μεταλλικά ιόντα, άλλα ιόντα).
- *Βιολογικοί παράμετροι:* όπως βιολογικές πηγές και φυσιολογική κατάσταση των οργανισμών ή των κυττάρων που περιέχουν τις πρωτεΐνες (θερμόφιλοι, ψυχρόφιλοι, αλλόφιλοι, μεσόφιλοι οργανισμοί, στατική ή αναπτυσσόμενη φάση κυττάρων) και βακτηριακές μολύνσεις.

1.6.4 Διαγράμματα διαλυτότητας

Καθώς η διαλυτότητα των πρωτεϊνών εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, (κυριότεροι: η συγκέντρωση της πρωτεΐνης, η ιοντική ισχύς, το pH, η θερμοκρασία, η φύση των διαλυτών που χρησιμοποιούνται), ένα δισδιάστατο διάγραμμα διαλυτότητας σε σχέση με μια παράμετρο είναι αντιπροσωπευτικό για κάθε βιομόριο, εφ' όσον οι άλλες παράμετροι παραμένουν σταθεροί (**Εικόνα 7**).



Εικόνα 7. Διάγραμμα διαλυτότητας.

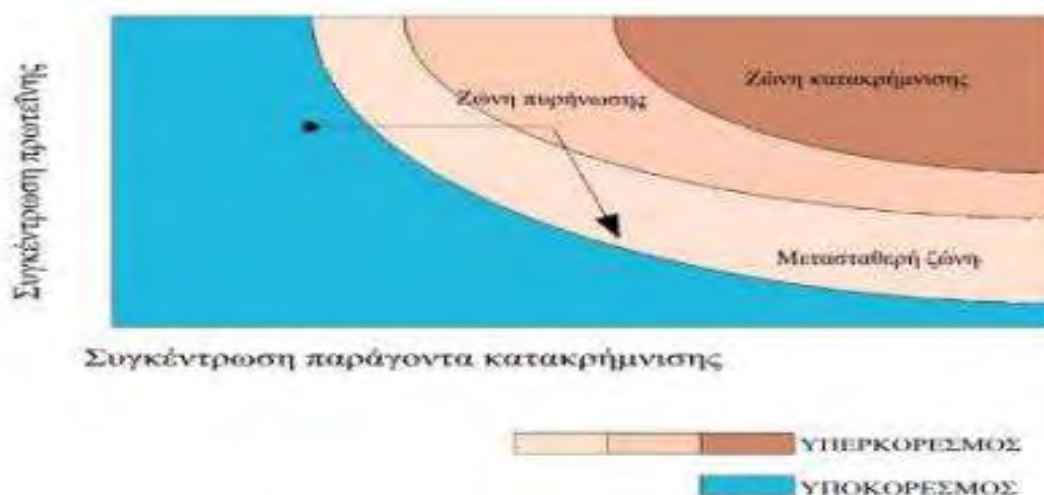
Η καμπύλη διαλυτότητας (S) ορίζει τις ζώνες υποκορεσμού και υπερκορεσμού και καθορίζει την κατάσταση εξισορρόπησης μεταξύ κορεσμένης πρωτεΐνης και κρυσταλλωμένης πρωτεΐνης στο διάλυμα (Σ.Ι.Χαμόδρακα, 1987). Κάτω από την καμπύλη κορεσμού η πρωτεΐνη δεν πρόκειται ποτέ να κρυσταλλωθεί (υποκορεσμός), ενώ πάνω από την καμπύλη διαλυτότητας η συγκέντρωση της πρωτεΐνης είναι υψηλότερη από την συγκέντρωση εξισορρόπησης για δεδομένη συγκέντρωση ηλεκτρολύτη (υπερκορεσμός) και υποδιαιρείται σε τρεις άλλες ζώνες (**Εικόνα 8**):

Ζώνη κατακρήμνισης: η πρωτεΐνη μετατρέπεται σε άμορφη μάζα.

Ζώνη πυρήνωσης (πυρήνες κρυστάλλωσης): Πυρήνες κρυστάλλωσης ονομάζονται οι πιο μικρές οργανωμένες μορφές πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων και σχηματίζονται στην περιοχή όπου η περίσσεια της πρωτεΐνης παίρνει κρυσταλλική μορφή. Κοντά στην ζώνη κατακρήμνισης

βρίσκεται πλήθος μικροκρυστάλλων οι οποίοι μπορούν να μπερδευτούν με το άμορφο ίζημα πρωτεΐνης. Η εύρεση της ζώνης πυρήνωσης αποτελεί πρωταρχικό σκοπό των πειραμάτων κρυστάλλωσης.

Μετασταθερή ζώνη (αύξηση κρυστάλλων): ένα υπέρκορο διάλυμα πρωτεΐνης μπορεί να μην δημιουργεί πυρήνες κρυστάλλωσης για μακρύ χρονικό διάστημα, εκτός αν βοηθηθεί μηχανικά. Η ζώνη αυτή αντιστοιχεί ιδανικά στην αύξηση κρυστάλλων από πυρήνες κρυστάλλωσης που προϋπάρχουν χωρίς την δημιουργία νέων.

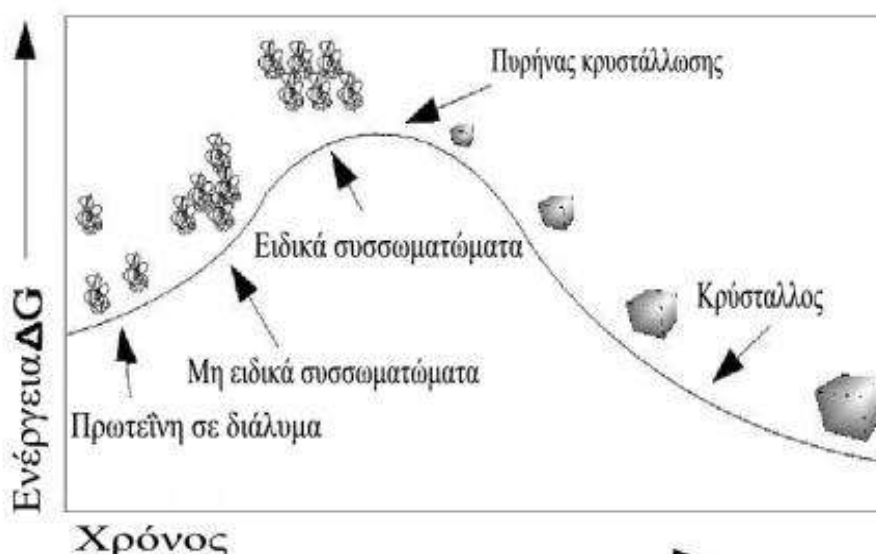


Εικόνα 8. Ζώνες υπερκορεσμού.

1.6.5 Σχεδιασμός Κρυστάλλωσης

Για την κρυσταλλογραφική μελέτη μίας πρωτεΐνης απαιτούνται μεγάλοι και καλοσχηματισμένοι κρύσταλλοι, γι αυτό σε πρώτη φάση πρέπει να δημιουργηθούν πυρήνες κρυστάλλωσης και να αφεθούν στην μετασταθερή ζώνη για να μεγαλώσουν. Αυτό προϋποθέτει ότι η πρωτεΐνη θα υπερβεί ένα φράγμα ενέργειας προκειμένου να μπορέσει να κρυσταλλώσει, ανάλογο με

αυτό των τυπικών χημικών αντιδράσεων, όπως φαίνεται στην **Εικόνα**



9:

Εικόνα 9. Γράφημα της ελεύθερης ενέργειας σε σχέση με το χρόνο κατά τη διάρκεια της κρυστάλλωσης.

Δηλαδή το διάλυμα της πρωτεΐνης πρέπει να περάσει από την διαλυτή φάση στην ζώνη πυρήνωσης και να παραμείνει εκεί για σύντομο χρονικό διάστημα έτσι ώστε να μην δημιουργηθούν πολλοί πυρήνες κρυστάλλωσης που οδηγούν σε πολλούς και μικρότερου όγκου κρυστάλλους. (Η αύξηση του όγκου των κρυστάλλων σε διάλυμα με πολλούς πυρήνες κρυστάλλωσης οδηγεί σε επικαλύψεις κρυσταλλικών πλεγμάτων, άρα σε κακοσχηματισμένους κρυστάλλους). Στην συνέχεια, το πρωτεϊνικό διάλυμα όταν μεταπέσει στην μετασταθερή ζώνη, οι πυρήνες θα συνεχίσουν να μεγαλώνουν και θα δώσουν καλοσχηματισμένους κρυστάλλους. Όσο οι κρύσταλλοι μεγαλώνουν τόσο η συγκέντρωση της διαλελυμένης πρωτεΐνης μικραίνει, με αποτέλεσμα η μετασταθερή ζώνη να μετατοπίζεται. Έτσι κυριότερο μέλημα στα πειράματα κρυστάλλωσης είναι η δημιουργία συνθηκών συνεχούς παρακολούθησης της μετασταθερής ζώνης (McPherson, 1999).

Από τα παραπάνω στοιχεία προκύπτει ότι ο τρόπος ελάττωσης της διαλυτότητας της πρωτεΐνης στο διάλυμα πρέπει να είναι ελεγχόμενος. Ταχεία ελάττωση της διαλυτότητας οδηγεί σε άμορφα ιζήματα, γι αυτό η προσέγγιση

του σημείου υπερκορεσμού γίνεται αργά, αλλάζοντας βαθμιαία παράγοντες όπως η συγκέντρωση, η ιοντική ισχύς, το pH, ή η διηλεκτρική σταθερά του πρωτεϊνικού διαλύματος (McMurry, 2001).

Συγκέντρωση πρωτεΐνης: πολλές πρωτεΐνες έχουν κρυσταλλωθεί από διαλύματα που περιέχουν ένα έως εκατοντάδες mg/ml πρωτεΐνης. Ωστόσο για πειραματικές δοκιμές είναι επιθυμητή συγκέντρωση 10-20 mg/ml, εάν αυτό είναι δυνατόν.

Ιοντική ισχύς: η ιοντική ατμόσφαιρα μεταβάλλει την διαλυτότητα των πρωτεϊνών μέσω των φαινομένων

Salting in: οι πρωτεΐνες είναι πιο διαλυτές παρουσία μικρής ποσότητας ηλεκτρολύτη παρά σε καθαρό νερό καθώς τα ιόντα του ηλεκτρολύτη δεσμεύονται στην επιφάνεια της πρωτεΐνης και αυξάνουν την υδροφιλικότητά της. Σ' αυτή την περίπτωση η πρωτεΐνη μπορεί να κρυσταλλωθεί ελαττώνοντας την συγκέντρωση του ηλεκτρολύτη (άλατος).

Salting out: εάν ένας ισχυρός ηλεκτρολύτης (πχ θειικό αμμώνιο) προστεθεί στο διάλυμα της πρωτεΐνης, (όπου η διαλυτότητά του είναι μεγαλύτερη από αυτήν της πρωτεΐνης), αυξάνεται ο ανταγωνισμός των ιόντων για τα μόρια του νερού τόσο μεταξύ τους όσο και με τα μόρια της πρωτεΐνης και έτσι απομακρύνονται μόρια νερού από το διάλυμα της πρωτεΐνης με αποτέλεσμα να μειώνεται η διαλυτότητά της (Ι. Παπανικολάου, 1995).

pH: Το καθαρό φορτίο της πρωτεΐνης μπορεί να μεταβληθεί με την μεταβολή των πρωτονίων, αλλάζοντας το pH ή με την δέσμευση ιόντων σε πολικές ομάδες της πρωτεΐνης. Όσο μεγαλύτερο καθαρό φορτίο έχει η πρωτεΐνη τόσο πιο ευδιάλυτη είναι, ενώ όταν έχει καθαρό φορτίο μηδέν βρίσκεται στο σημείο ελάχιστης διαλυτότητας. Αυτό συμβαίνει όταν η πρωτεΐνη βρίσκεται στο ισοηλεκτρικό της σημείο (pI). Το pH είναι πολύ σημαντικός παράγοντας για την κρυστάλλωση και απαιτεί την χρήση κατάλληλων ρυθμιστικών διαλυμάτων.

Θερμοκρασία: η διαλυτότητα της πρωτεΐνης έχει άμεση εξάρτηση από την θερμοκρασία, αλλά ποικίλει σημαντικά από πρωτεΐνη σε πρωτεΐνη σε συνδυασμό με την ιοντική ισχύ, την παρουσία οργανικών διαλυτών και τις ειδικότερες πειραματικές συνθήκες. Οι δοκιμασίες γίνονται σε θερμοκρασία ψυγείου (4-6 °C) είτε σε σταθερή θερμοκρασία δωματίου (17-24 °C).

Οργανικοί-μη πολικοί διαλύτες: διαλύματα που χρησιμοποιούνται είναι η αιθανόλη ή η πεντανοδιόλη σε ανάμειξη με υδατικό διάλυμα και ελαττώνουν την διαλυτότητα της πρωτεΐνης. Δεσμεύονται σε πολικές ομάδες της επιφάνειας της πρωτεΐνης, έτσι ώστε να φαίνεται λιγότερο πολική, ή απλώς ελαττώνουν τον αποτελεσματικό αριθμό πολικών ομάδων του διαλύτη (McMurry, 2001).

1.6.6 Στάδια κρυστάλλωσης

Το πιο σημαντικό ίσως σημείο στην κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ είναι η ανάπτυξη κρυστάλλων άριστης ποιότητας. Για να είναι ένας κρύσταλλος «καλός» πρέπει να είναι απαλλαγμένος από προσμίξεις, να είναι απόλυτα συμμετρικός και να έχει τρισδιάστατη επαναλαμβανόμενη δομή. Τα σχήματα των κρυστάλλων μπορεί να ποικίλουν, από τέλειους κύβους μέχρι και μακριές λεπτές βελόνες. Ο χρόνος που απαιτείται για να προκύψει ένας πρωτεϊνικός κρύσταλλος μπορεί να είναι αρκετά μεγάλος (από μερικές εβδομάδες μέχρι και κάποιους μήνες) γι' αυτό απαιτείται συχνά αρκετή προσπάθεια και υπομονή από τον ερευνητή καθώς και συνεχής έλεγχος, εφόσον οι αλλαγές σε κάποιες παραμέτρους μπορούν να επιφέρουν οπτικά παρατηρήσιμες μεταβολές στους κρυστάλλους (Acharya&Rees, 1997).

Η κρυστάλλωση των πρωτεϊνών πραγματοποιείται σε τρία στάδια:

1. **Πυρήνωση.** Σ' ένα υπερκορεσμένο διάλυμα τα πρωτεϊνικά μόρια μπορούν να αλληλεπιδράσουν μεταξύ τους και να σχηματίσουν συσσωματώματα γύρω από συγκεκριμένα κέντρα σύνδεσης. Το μέγεθος του συσσωματώματος προσδιορίζει τη συνολική ελεύθερη ενέργεια, η οποία παρουσιάζει μέγιστο όταν σχηματιστεί ο πυρήνας, δηλαδή αποκτήσει κρίσιμο μέγεθος. Προκειμένου λοιπόν να επιτευχθεί

η ανάπτυξη μιας νέας φάσης στο υπερκορεσμένο διάλυμα, πρέπει το σύστημα να υπερπηδήσει το ενεργειακό φράγμα το οποίο καλείται ελεύθερη ενέργεια πυρήνωσης. Η πυρήνωση αποτελεί το πιο κατανοητό στάδιο της κρυστάλλωσης. Η ποιοτική και ποσοτική περιγραφή της μπορεί να γίνει μέσω θερμοδυναμικών εξισώσεων. Σ' ένα υπερκορεσμένο διάλυμα η πυρήνωση θεωρείται ως μια αλυσιδωτή αντίδραση σχηματισμού συσσωματωμάτων. Δυο συναγωνιστικές διαδικασίες λαμβάνουν χώρα κατά το στάδιο της πυρήνωσης. Η μία οδηγεί στο σχηματισμό της κρυσταλλικής δομής και η άλλη στη δημιουργία άμορφου ιζήματος (Kamet al., 1978).

2. **Ανάπτυξη πυρήνων.** Μετά το στάδιο της πυρήνωσης αρχίζει η διαδικασία ανάπτυξης κρυστάλλων με επικάθιση μορίων πρωτεΐνης στους πυρήνες, ενώ ταυτόχρονα μειώνεται και η πρωτεϊνική συγκέντρωση του διαλύματος. Μεγαλύτερη μείωση της συγκέντρωσης αυτής επιτυγχάνεται στην περιοχή κοντά στην επιφάνεια του κρυστάλλου με αποτέλεσμα νέα μόρια να διαχέονται προς αυτή και να υπάρχει μια διαρκής μεταφορά μάζας (Kamet al., 1978).

3. **Α**
ναστολή της ανάπτυξης. Με βάση το νόμο του Fick για τη διάχυση μάζας, αν ο μέσος συντελεστής διάχυσης είναι μεγαλύτερος του συντελεστή ταχύτητας ανάπτυξης, τότε η ταχύτητα ανάπτυξης καθορίζεται από τη μορφολογία του κρυστάλλου. Στην αντίθετη περίπτωση η ταχύτητα καθορίζεται από τη διάχυση των πρωτεϊνικών μορίων. Δεδομένου ότι τα συστήματα κρυστάλλωσης είναι συνήθως κλειστά, δηλαδή δεν μπορεί να προστεθεί πρωτεΐνη από εξωτερικούς παράγοντες, η ταχύτητα ανάπτυξης ελαττώνεται με το χρόνο και τελικά μηδενίζεται. Η ύπαρξη ξένων σωματιδίων, τα οποία λειτουργούν ως κέντρα σύνδεσης, επιταχύνουν τη διαδικασία της πυρήνωσης και γι' αυτό το λόγο η χρησιμοποιούμενη πρωτεΐνη είναι απαραίτητο να έχει όσο το δυνατόν υψηλότερο βαθμό καθαρότητας. Αποτέλεσμα της ύπαρξης προσμίξεων είναι να αναπτύσσονται γρηγορότερα οι κρύσταλλοι, οι οποίοι όμως είναι μικρότερου μεγέθους, κάτι το οποίο δεν είναι επιθυμητό (Blundell&Johnson, 1976).

1.6.7 Διαλύτης συγκρυστάλλωσης

Η πιο σημαντική διαφορά μεταξύ των πρωτεϊνικών κρυστάλλων και των κρυστάλλων που σχηματίζουν τα μικρότερα μόρια είναι ότι οι κρύσταλλοι πρωτεΐνης περιέχουν σημαντική ποσότητα υγρού διαλύτη (συνήθως ύδωρ). Οι κρύσταλλοι γενικά αποτελούνται από δυο φάσεις: μια στερεή, που αποτελείται από τα σημεία επαφής των μακρομορίων και δημιουργεί το ανοιχτό πλέγμα και μια υγρή, που συμπληρώνει τα κενά μεταξύ του πλέγματος. Τα μόρια του διαλύτη που βρίσκονται πιο κοντά στα πρωτεϊνικά μακρομόρια, είναι σαφώς πιο οργανωμένα και συνδέονται με τις επιφανειακές πολικές ομάδες της πρωτεΐνης με ισχυρές αλληλεπιδράσεις, ενώ εκείνα που εισχωρούν στα κανάλια που σχηματίζει η πρωτεΐνη είναι αποδιοργανωμένα (Blundell&Johnson, 1976).

1.6.8 Παράγοντες καθίζησης

Για να κρυσταλλωθεί μια πρωτεΐνη είναι απαραίτητη η χρήση κάποιων ουσιών, οι οποίες ονομάζονται παράγοντες καθίζησης. Οι παράγοντες καθίζησης μπορούν να χωριστούν σε τρεις μεγάλες κατηγορίες:

- | | |
|-----------------------------------|---|
| i. | Α |
| λατα (π.χ. θειικό αμμώνιο) | |
| ii. | Ο |
| ργανικοί διαλύτες (π.χ. αιθανόλη) | |
| iii. | Π |
| ολυαιθυλενογλυκόλες | |

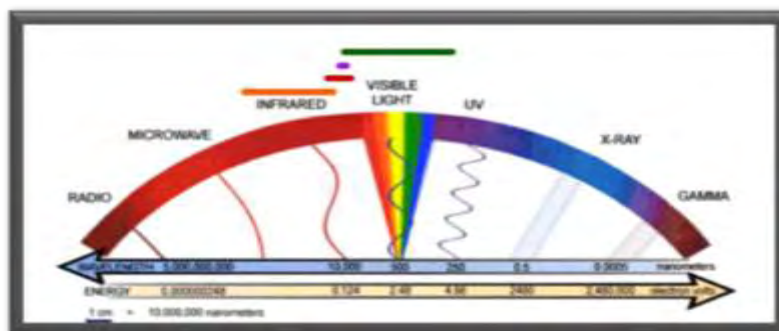
Εάν τοποθετήσουμε μια καθαρή πρωτεΐνη σε διάλυμα υψηλής ιοντικής ισχύος τότε αυτή θα υποστεί εξαλάτωση. Αυτό σημαίνει πρακτικά ότι θα μειωθεί η διαλυτότητα της πρωτεΐνης επειδή τα μόρια του νερού, που υπό άλλες συνθήκες θα συνδέονταν στην επιφάνεια της και θα τη διαλυτοποιούσαν, σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με τα μικρά ιόντα του άλατος. Αν η

συγκέντρωση των ιόντων γίνει αρκετά μεγάλη, τότε τα μακρομόρια εξουδετερώνουν τα επιφανειακά τους φορτία αλληλεπιδρώντας μεταξύ τους. Τα δισθενή ή τρισθενή ιόντα σχηματίζουν πιο εύκολα δεσμούς υδρογόνου με τα μόρια του νερού και επομένως είναι περισσότερο αποτελεσματικά (McPherson, 1999).

Παρόμοια δράση με τα άλατα έχουν και οι οργανικοί διαλύτες. Τα μόριά τους ενώνονται με τα μόρια του νερού και μειώνουν τη διαλυτότητα των πρωτεϊνών. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την καθίζηση των πρωτεϊνών ή την κρυστάλλωσή τους. Φυσικά, η χρήση των οργανικών διαλυτών απαιτεί ιδιαίτερη προσοχή γιατί πολλές φορές οι διαλύτες αυτοί μπορούν και να μετουσιώσουν τις πρωτεΐνες. Γι' αυτό το λόγο οι επιλογές στην χρήση του παράγοντα καθίζησης είναι σημαντικές (McPherson, 1999).

1.6.9 Συλλογή κρυσταλλογραφικών δεδομένων

Ακτίνες X (Röntgen): η μελέτη των κρυσταλλογραφικών δομών γίνεται με τη βοήθεια των ακτίνων X. Οι ακτίνες X αποτελούν ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία μήκους κύματος 100-0.1 Å. Το φάσμα της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας φαίνεται στην **Εικόνα10**.

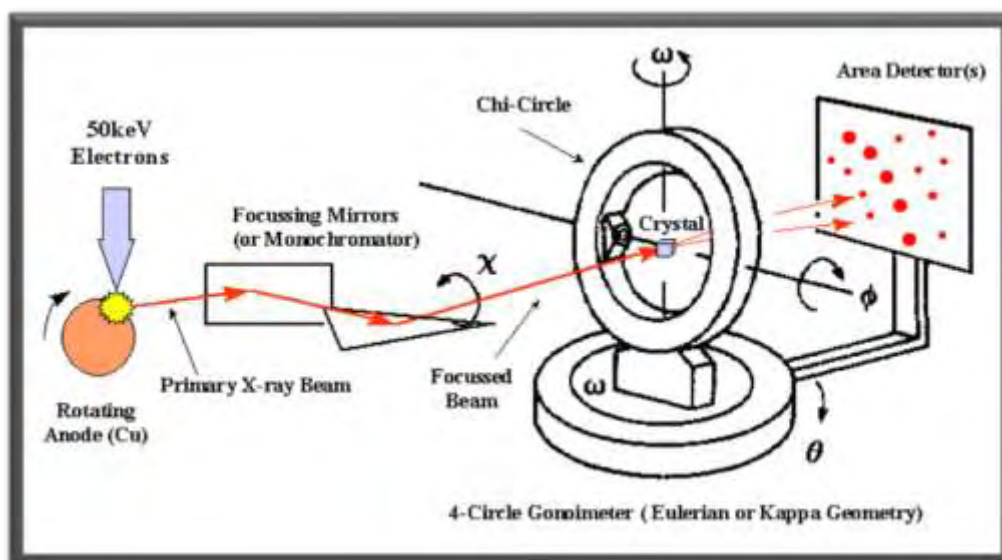


Εικόνα 10. Ηλεκτρομαγνητικό φάσμα.

Η κρυσταλλογραφία ακτίνων X βασίζεται στο φαινόμενο της περίθλασης ακτίνων X από τα διάφορα επίπεδα που ορίζονται από τις θέσεις των συστατικών των κρυσταλλικών σωμάτων. Έχουν αναπτυχθεί κατάλληλες συσκευές και μεθοδολογίες που έχουν τη δυνατότητα να ταυτοποιούν, να μετρούν και να υπολογίζουν τις σταθερές του πλέγματος των κρυσταλλικών σωμάτων από την περίθλαση ακτίνων X (G. Rhodes, 2006). Για να επιτευχθεί

ατομική ευκρίνεια είναι απαραίτητη ακτινοβολία με διαστάσεις μήκους κύματος ανάλογες με τις διαστάσεις του πρωτεϊνικού μορίου που μελετάται. Το ορατό φως είναι ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία με μήκη κύματος μεταξύ 400-700nm με αποτέλεσμα να μην μπορεί να διακρίνει τα άτομα στις πρωτεΐνες (Rhodes, 2006).

Το πείραμα περίθλασης ακτίνων Χ από κρυστάλλους απαιτεί δύο κύρια όργανα, την πηγή και τον ανιχνευτή ακτίνων Χ. Στην **Εικόνα 11** παρουσιάζεται η διάταξη κατά το πείραμα της περίθλασης ακτίνων Χ από κρυστάλλους.



Εικόνα 11. Παρουσίαση της διάταξης κατά την περίθλαση ακτίνων Χ.

Η πηγή ακτίνων Χ εκπέμπει δέσμη ακτινοβολίας που προσπίπτει στον κρύσταλλο. Ο κρύσταλλος περιθλά ακτινοβολία ίσου μήκους κύματος προς όλες τις κατευθύνσεις. Με τη βοήθεια του ανιχνευτή καταγράφεται το περιθλασίγραμμα, στο οποίο εντοπίζονται οι κηλίδες έντασης των περιθλάσεων και τελικά με τη χρήση ειδικών προγραμμάτων βρίσκουμε τη δομή της πρωτεΐνης (Rhodes, 2006).

Ο προσδιορισμός της δομής μιας πρωτεΐνης με περίθλαση ακτίνων Χ απαιτεί την καταγραφή όλων των σκεδαζόμενων ακτίνων. Αυτό επιτυγχάνεται μόνο όταν όλα τα κρυσταλλικά σημεία του αντίστροφου πλέγματος να βρεθούν σε κατάσταση περίθλασης, δηλαδή εντός σφαίρας ακτίνας $1/\lambda$, με περιστροφή του κρυστάλλου. Έτσι λοιπόν, ένα κρυσταλλογραφικό πείραμα απαιτεί δύο

συσκευές: το μηχανισμό περιστροφής του κρυστάλλου και μία συσκευή μέτρησης της έντασης της περιθλώμενης ακτινοβολίας.

Τις τελευταίες δεκαετίες η συλλογή των δεδομένων έχει βελτιωθεί σημαντικά. Αρχικά, η καταγραφή γινόταν σε φωτογραφικό φιλμ ενώ σήμερα χρησιμοποιούνται συστήματα που μπορούν αυτόματα να μετατρέπουν το σήμα σε ψηφιακή μορφή, αμέσως μετά την έκθεση του κρυστάλλου (Dreath, 2002).

Σκοπός εργασίας

Σκοπό της παρούσας διπλωματικής εργασίας αποτελεί η μελέτη της δομής της Ang και μία πιθανή κρυστάλλωσή της στην ανοιχτή της διαμόρφωση, στην ενεργή της μορφή *in vivo* καθώς και η συγκρυστάλλωσή της με κινητικά μελετημένους αναστολείς της δράσης της. Η μελέτη περιλαμβάνει αρχικά την απομόνωση και τον καθαρισμό της πρωτεΐνης (Ang) και στη συνέχεια την εισαγωγή της σε ποικίλες συνθήκες κρυσταλλώσεων. Το μεγαλύτερο μέρος των κρυσταλλογραφικών πειραμάτων που διεξήχθησαν αποτελείται από το σύμπλοκο της Ang με τρία ανάλογα πυριμιδίνης: το 5'-ATP, το 5'-ADP και το NADPH.

Απώτερος στόχος της έρευνας που διεξάγεται, μέρος της οποίας είναι και η παρούσα εργασία, είναι η κατανόηση της μοριακής αναγνώρισης μικρών μορίων που μπορούν να δράσουν ως αναστολείς της δράσης της αγγειογενίνης και κατ' επέκταση της διαδικασίας της αγγειογένεσης και η αξιοποίηση αυτής της γνώσης στο σχεδιασμό νέων εν δυνάμει ογκοκατασταλτικών φαρμάκων.

Ο σχεδιασμός εξειδικευμένων αναστολέων αποτελεί σήμερα έναν από τους πλέον δύσκολους, αλλά και πρωταρχικούς στόχους στην έρευνα για την ανακάλυψη νέων φαρμάκων, αφού απαιτεί τη γνώση της δομής και της λειτουργίας, αλλά και των παραγόντων που καθορίζουν την πρόσδεση του αναστολέα. Κρίνεται απαραίτητος ο προσδιορισμός της τρισδιάστατης δομής της πρωτεΐνης καθώς παρέχει άμεσες πληροφορίες για το πώς τα υποστρώματα ή οι ενζυμικοί αναστολείς συνδέονται στα ειδικά κέντρα σύνδεσης μακρομορίων. Επομένως, η γνώση της τρισδιάστατης δομής, οδηγεί στην κατανόηση του μηχανισμού δράσης του μακρομοριακού στόχου και μπορεί να βοηθήσει στο σχεδιασμό νέων και πλέον ενεργών φαρμάκων.

2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

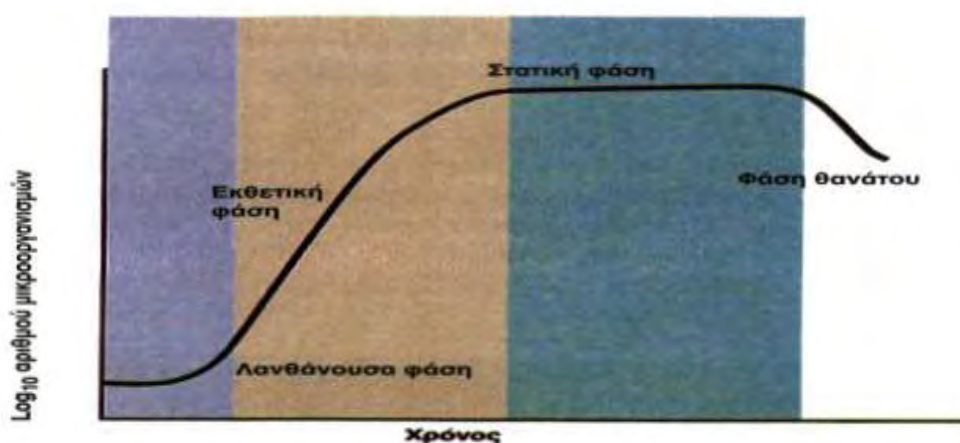
2.1 Καλλιέργειες κυττάρων- Βακτηριακή ανάπτυξη

Με τον όρο βακτηριακή ανάπτυξη αναφερόμαστε στην αύξηση του αριθμού των κυττάρων μιας καλλιέργειας υπό συγκεκριμένες συνθήκες επώασης.

Η γενική εξίσωση που χρησιμοποιείται για την περιγραφή του πολλαπλασιασμού των βακτηριακών κυττάρων σε μία καλλιέργεια είναι η εξής $N = 2^t (N_0)$, όπου N_0 ο αρχικός αριθμός βακτηρίων, N ο αριθμός βακτηρίων μετά από t γενιές και t ο αριθμός των γενεών.

Η καμπύλη ανάπτυξης (**Εικόνα 1**) εκφράζει τη βακτηριακή ανάπτυξη σε συνάρτηση με το χρόνο και διακρίνεται σε τέσσερα κύρια στάδια:

- τη φάση προσαρμογής
- την εκθετική (ή λογαριθμική) φάση
- τη στατική φάση
- και τη φάση ύφεσης (ή φάση θανάτου).



Εικόνα 1. Καμπύλη των φάσεων της βακτηριακής ανάπτυξης.

Στη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία, η ανάπτυξη των κυττάρων σταματά στην εκθετική φάση, όπου τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται εκθετικά και

θεωρούνται πλήρως ενεργά. Έτσι εξασφαλίζεται η μεγαλύτερη ποσότητα πρωτεΐνης. Ο προσδιορισμός της φάσης στην οποία βρίσκεται η καλλιέργεια των κυττάρων γίνεται μέσω φασματοφωτομέτρησης στα 600nm σε τακτά χρονικά διαστήματα, όπου σε ειδική κυψελίδα μετράται η οπτική πυκνότητα 1ml καλλιέργειας, έτσι ώστε η οπτική απορρόφηση να μην υπερβεί το φάσμα OD= 0,6-0,8. Ο εμβολιασμός όλων των καλλιεργειών γίνεται σε θερμοκρασία δωματίου, σε στείρες συνθήκες και η επώαση στους 37 °C.

2.2 Έκφραση πρωτεϊνών και επαγωγή

Κατά τη διαδικασία της έκφρασης και απομόνωσης της πρωτεΐνης υπάρχουν τρία βασικά στάδια τα οποία πρέπει να ληφθούν υπόψη πριν από την τελική παραγωγή της πρωτεΐνης:

- Οι παράγοντες ανάπτυξης της καλλιέργειας, δηλαδή η θερμοκρασία, ο αερισμός, το θρεπτικό μέσο και ο χρόνος επώασης
- Η συγκέντρωση του επαγωγέα
- Ο καθορισμός για να το αν η πρωτεΐνη εκφράζεται σε διαλυτή μορφή ή σε έγκλειστα σωματίδια

Αρχικά, πραγματοποιείται ένας προκαταρκτικός έλεγχος των επιπέδων έκφρασης της πρωτεΐνης σε μικρές υγρές καλλιέργειες και έπειτα γίνεται επέκταση σε μεγαλύτερες. Στη συνέχεια, ακολουθείται ένα πρωτόκολλο για τον καθαρισμό της πρωτεΐνης, το οποίο απαρτίζεται από ποικίλα στάδια μέχρι τον τελικό καθαρισμό της πρωτεΐνης. Η μετάβαση από το ένα στάδιο στο επόμενο πρέπει να γίνεται με γρήγορους ρυθμούς και σε συγκεκριμένη θερμοκρασία ώστε να αποφευχθεί, όσο είναι δυνατό, η απώλεια μεγάλης ποσότητας πρωτεΐνης.

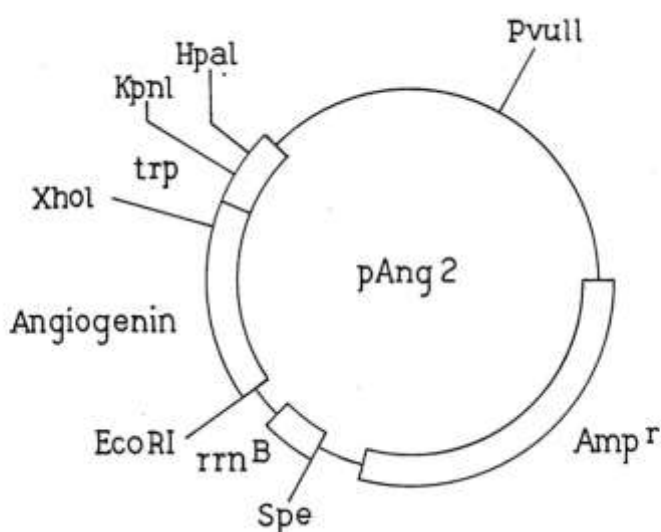
Ως επαγωγείς για την παραγωγή της αγγειογενίνης χρησιμοποιήθηκαν οι ενώσεις IPTG (isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside) και ινδόλιο. Το IPTG αποτελεί ανάλογο της λακτόζης και παρουσιάζει δομικές ομοιότητες με την αλλολακτόζη, έναν μεταβολίτη της λακτόζης που ενεργοποιεί τη μεταγραφή του οπερονίου *lac* και χρησιμοποιείται για να επάγει την έκφραση της πρωτεΐνης όταν το γονίδιο βρίσκεται υπό τον έλεγχο του χειριστή *lac*. Το

ινδόλιο είναι μία ετεροκυκλική ένωση και συντίθεται από το αμινοξύ τρυπτοφάνη. Το ινδολο-3-οξικό οξύ είναι ικανό να αναστείλει την παραγωγή του κυκλικού AMP (cAMP) ώστε να επιτευχθεί η επαγωγή του araBAD οπερονίου, το οποίο εμπλέκεται στο μεταβολισμό της L-αραβινόζης σε στελέχη K-12 της *E. coli* (C. Bianco *et al.*, 2006).

2.3 Απομονώσεις αγγειογενίνης

2.3.1 Περιγραφή διαδικασίας

Για τον καθαρισμό της Ang πραγματοποιήθηκαν δύο διαφορετικές διαδικασίες απομόνωσης. Κατά τη διαδικασία της πρώτης απομόνωσης ο πλασμιδιακός φορέας pANG3 που φέρει το γονίδιο της Ang έχει εισαχθεί σε κύτταρα στελέχους W3110 της *E.coli*. Το γονίδιο που κωδικοποιεί για την Ang συντέθηκε χημικά και τοποθετήθηκε στο φορέα pANG2 για ακριβή έκφραση της πρωτεΐνης Met(-1)-Met-30, υπό τον έλεγχο του προαγωγέα της τρυπτοφάνης (Kunkel T.A., 1985). Από τον pANG2 προέκυψε ο pANG3 με τις εξής τροποποιήσεις: παρά την ομοιότητα που έχουν οι δύο φορείς, ο pANG3 εκτός από ένα αρχικό κωδικόνιο μεθειονίνης που διαθέτει, έχει επίσης αντικατασταθεί από μία αλληλουχία DNA (GTGAAACAAAGCACTATTGCACTGGCACTATTACCGTTACTGTTTACCCC TGTGACAAAAGCC) που κωδικοποιεί το σηματοδοτικό πεπτιδίο rhoA της *E.coli*, το οποίο την κάνει διαλυτή-εκκρινόμενη στο κυτταρόπλασμα. Ο φορέας pANG3 παράγει τη μορφή <Glu-1 της αγγειογενίνης (Dodt *et al.*, 1986). Η δομή του φορέα pANG2 παρουσιάζεται στην **Εικόνα 2**. Από την απομόνωση της αγγειογενίνης, η ποσότητα πρωτεΐνης που ανακτήθηκε δεν επαρκούσε για την κρυστάλωσή της. Για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκε κλωνοποίηση του γονιδίου της αγγειογενίνης σε νέο πλασμιδιακό φορέα, τον pET-28A (5300bp) που παρουσιάζει ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό καναμυκίνη και εισαγωγή του σε κύτταρα υπερέκφρασης BL21-Gold-DE3 της *E.coli*. Από τον φορέα αυτό προκύπτει η Met(-1)-Ang όχι σε διαλυτή μορφή αλλά μέσα σε έγκλειστα σωματίδια.



Εικόνα 2. Δομή του φορέα pANG2. (U.S. Patent Oct.30, 1990, 4,966,849)

2.4 Απομόνωση ρυγο-Glu-Angiogenin (Riordan J.F. et al, 2001)

2.4.1 Υλικά-Προετοιμασία συστατικών

1. *Trans indole-3-acrylic acid* 99% (ινδόλιο) (Merck): 100mg ινδόλιο διαλυμένο σε 5ml 100% αιθυλική αλκοόλη
2. 10 x άλατα M9 : 1lt, pH 7.4 –αποστειρωμένο (Sigma)
3. $MgSO_4$: 1M, 100lt- αποστειρωμένο (ApplichemPanreac)
4. $CaCl_2$: 100mM, 50ml-αποστειρωμένο (Merck)
5. $Na_2 EDTA$ 0,5M: 0,5M, 100ml, pH 8,0-αποστειρωμένο (Panreac)
6. *LB-Broth*: 1lt, αποθηκεύεται σε θερμοκρασία 4°C-αποστειρωμένο (Applichem Panreac)
7. 20% (+) γλυκόζη: 500ml-αποστειρωμένο με φίλτρο 0,22μm (Serva)
8. $NaCl$ 5M: 5M,250ml (Merck)
9. *Ampicillin sodium salt*: 25mg/ml, 50ml-αποστειρωμένο (Serva)
10. 10% *Casamino acids*: 250ml αποστειρωμένο (Becton Dickinson and Co)
- 11.2 Lt κωνικές φιάλες καλλιέργειας- αποστειρωμένες
12. *PMSF*: βρίσκεται σε μορφή σκόνης και έτσι ζυγίζονται 0,5487gr και διαλυτοποιούνται σε διάλυμα που αποτελείται από 10% DMF 0,7ml και

- 90% ισοπροπανόλη 6,3ml. Ο τελικός όγκος του διαλύματος βρίσκεται στα 7ml (Applichem Panreac)
13. *TSOPB*: 1lt, pH 9,0. Το διάλυμα αυτό αποτελείται από 20mM Tris, 10% σουκρόζη (ChemLab), 10mM 1,10-phenanthroline (Sigma), 0,25mM benzimidine (Sigma) και Na₂ EDTA 0,5mM
14. *Λυσοζύμη*: 2,5ml 25mg/ml. Ζυγίζονται 12mg λυσοζύμης (Applichem Panreac) και διαλύονται σε 6ml TSOBP.
15. *0,4M Φωσφορικό κάλιο pH 7,2*- αποστειρωμένο (Merck)

Διαλύματα για τις στήλες καθαρισμού της Ang

SPFF 16/10 (20ml), (GE Healthcare)

Διάλυμα A: 10mM Tris-HCl και 0,2M NaCl V=1lt, pH 8,0

Διάλυμα B: 10mM Tris-HCl και 0,6M NaCl V=1lt, pH 8,0

Resource S (1ml), (GE Healthcare)

Διάλυμα A: 10mM Tris-HCl, V=1lt, pH 8,0

Διάλυμα B: 10mM Tris-HCl και 1M NaCl V=1lt, pH 8,0

Resource RPC (3ml), (GE Healthcare)

Διάλυμα A: 0,1 % v/v TFA διαλυμένο σε ύδωρ V=1lt

Διάλυμα B: 0,08 % v/v TFA διαλυμένο σε ισοπροπανόλη:ακετονιτρίλιο:H₂O αναλογίας 3:2:2 σε συνολικό όγκο 700ml.

2.4.2 Παραγωγή θρεπτικών μέσων για τις καλλιέργειες

Το θρεπτικό υλικό αποτελεί πηγή θρεπτικών ουσιών για τους μικροοργανισμούς. Για την *E.coli* το κατάλληλο θρεπτικό μέσο είναι το LB Broth για τις μικρές καλλιέργειες ενώ για τις μεγάλες που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή μεγάλης ποσότητας πρωτεΐνης χρησιμοποιούνται τα άλατα M9. Στο συγκεκριμένο πείραμα δημιουργήθηκαν αρχικά μικρές υγρές καλλιέργειες, οι

οποίες στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε μεγάλες καλλιέργειες συνολικού όγκου 4lt (Riordan J.F., 2001).

2.4.3 Παρασκευή καλλιεργείων

Παρασκευή έξι μικρών υγρών καλλιεργείων

- ✓ 3ml LB-Broth (αποστειρωμένο)
- ✓ 6ml αντιβιοτικού αμπικιλίνης συγκέντρωσης 25mg/ml. Η τελική συγκέντρωση της αμπικιλίνης στην καλλιέργεια είναι 50 mg/ml.
- ✓ μικρή ποσότητα βακτηρίων αποθηκευμένων σε -80 °C με γλυκερόλη
- ✓ εμβολιασμός με τα βακτηριακά στελέχη και επώαση σε θερμοκρασία 37°C σε στροφές ταχύτητας 250rpm για 17 ώρες.

Παρασκευή μεγάλων καλλιεργείων

Σε τέσσερις αποστειρωμένες κωνικές φιάλες των 2lt που περιέχουν 900ml νερό προσθέτουμετα εξής:

- ✓ 100ml 10 x άλατα M9 (αποστειρωμένα)
- ✓ 2ml 1M MgSO₄ (αποστειρωμένα)
- ✓ 1ml 100mM CaCl₂ (αποστειρωμένο)
- ✓ 21ml 20% w/v γλυκόζη (αποστειρωμένη)
- ✓ 40ml 10% w/v Casamino acids (αποστειρωμένο)

και ακολουθεί εμβολιασμός από τις μικρές βακτηριακές υγρές καλλιέργειες σε αναλογία 1:100, και προσθήκη:

- ✓ 2ml αντιβιοτικού αμπικιλίνη συγκέντρωσης 25mg/ml
- ✓ 1ml indole-3-acid (ινδόλιο)
- ✓ 3ml μικρής υγρής καλλιέργειας

Έπειτα οι καλλιέργειες τοποθετούνται για επώαση στους 37 °C, σε στροφές ταχύτητας 200 rpm για 17 ώρες. Μετά το πέρας των 17 ωρών, γίνεται προσθήκη:

- ✓ 10ml 20% w/v γλυκόζη (αποστειρωμένη)

- ✓ 20ml 10% w/v Casamino acids (αποστειρωμένα)
- ✓ 1ml indole-3-acid (ινδόλιο) συγκέντρωσης 20mg/ml

και επώαση των καλλιιεργειών για επιπλέον 2,5 ώρες.

Από τις μικρές υγρές βακτηριακές καλλιέργειες οι δύο χρησιμοποιούνται για τη δημιουργία πυκνό διάλυμα γλυκερόλης (-80°C) που αποτελείται από 500ml βακτηριακής καλλιέργειας και 500ml γλυκερόλης.

Πρέπει να τονιστεί ότι όλες οι διαδικασίες για την παραγωγή των μικρών και των μεγάλων καλλιιεργειών γίνονται σε στείρες συνθήκες, με τη χρήση αποστειρωμένων μέσων.

2.4.4 Λύση κυττάρων

Η λύση των κυττάρων αποτελεί ένα από τα πιο κρίσιμα στάδια κατά τη διάρκεια της απομόνωσης της πρωτεΐνης καθώς μπορεί να επηρεάσει τόσο την ποσότητα της παραγόμενης πρωτεΐνης όσο και την βιολογική της ενεργότητα. Η λύση των κυττάρων μπορεί να γίνει ενζυμικά, μηχανικά ή με την εφαρμογή οσμωτικής πίεσης. Στην παρούσα εργασία επιλέχθηκε ο μηχανικός τρόπος λύσης των κυττάρων με χρήση υπερήχων και η διαδικασία έχει ως εξής:

1. Μετά την ολοκλήρωση της επώασης, αφήνονται οι καλλιέργειες σε θερμοκρασία 4°C προκειμένου να σταματήσει η ανάπτυξη των βακτηρίων και έπειτα οι καλλιέργειες κυττάρων φυγοκεντρούνται σε χαμηλές στροφές(5800g) για 25min σε θερμοκρασία 4°C. Το υπερκείμενο απορρίπτεται ενώ κρατάμε το ίζημα, στο οποίο έχουν καθιζάνει τα βακτηριακά κύτταρα. Σε περίπτωση που το υπερκείμενο δεν είναι διαυγές γίνεται κατανοητό πως δεν έχει γίνει επιτυχής καθίζηση των κυττάρων και έτσι η φυγοκέντριση επαναλαμβάνεται.
2. Το κυτταρικό ίζημα που συλλέγεται επαναδιαλύεται πρώτα σε ρυθμιστικό διάλυμα λύσης (lysis buffer) και στη συνέχεια πραγματοποιείται λύση των κυττάρων. Το διάλυμα λύσης αποτελείται

από δύο επιμέρους διαλύματα. Αναλυτικά, το *διάλυμα A* αποτελείται από:

- ✓ 62ml παγωμένο TSOBP, που αποτελείται από benzamidine (Sigma), σουκρόζη (ChemLab) και phenanthroline (Sigma)
- ✓ 330μl PMSF, το οποίο δρα ως αναστολέας πρωτεασών

Οι παραπάνω ποσότητες προστίθενται σε κάθε ένα από τα falcon ξεχωριστά και με τη βοήθεια γυάλινης ράβδου γίνεται η διαλυτοποίηση του ιζήματος.

Το *διάλυμα B* αποτελείται από:

- ✓ 4ml 0,5M EDTA, το οποίο δρα ως χηλικός συμπλοκοποιητής που ενώνει ιόντα για τη δράση των πρωτεασών
- ✓ 8ml 5M χλωριούχο νάτριο
- ✓ 2,5ml 25mg/ml λυσοζύμη, η οποία χρησιμεύει για τη διάσπαση των κυτταρικών τοιχωμάτων των βακτηρίων μέσω υδρόλυσης των β (1-4) γλυκοζιτικών δεσμών ανάμεσα στα κατάλοιπα N-ακέτυλο-μουραμικού οξέος (NAM) και N-ακέτυλο-γλυκοζαμίνης (NAG) σε κάποιους πολυσακχαρίτες.

- ✓ 1ml 0,45MPMSF

3. Το πλέον διαλυτοποιημένο ίζημα σε διάλυμα A ενώνεται σε 2 falcon και σε κάθε ένα προστίθεται διάλυμα B και αναδεύονται ήπια σε θερμοκρασία 4°C.
4. Μετά το πέρας της 1 ώρας προστίθεται επιπλέον 1ml PMSF και τα διαλύματα των κυττάρων υφίστανται την επίδραση υπερήχων διάρκειας 40sec για τρεις φορές με ενδιάμεσες παύσεις των 40sec αντίστοιχα (τέσσερις κύκλοι). Η λύση των κυττάρων γίνεται σε χαμηλή θερμοκρασία (διατήρηση σε πάγο) για την αποφυγή υπερθέρμανσης που θα οδηγήσει σε μετουσίωση των πρωτεϊνών.
5. Τέλος, τα διαλύματα φυγοκεντρώνται σε υψηλές στροφές(23.400g) για 30min σε θερμοκρασία 4°C και μετά το τέλος της φυγοκέντρησης αποθηκεύεται το υπερκείμενο σε θερμοκρασία -20°C, καθώς όπως έχουμε προαναφέρει, η αγγειογενίνη είναι διαλυτή πρωτεΐνη και βρίσκεται σε αυτό.

2.4.5 Χρωματογραφικός καθαρισμός αγγειογενίνης

Ο διαχωρισμός βιολογικών μορίων από σύνθετα μίγματα αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα στη βιοχημική έρευνα. Για το λόγο αυτό, απαιτείται η χρήση τεχνικών υψηλής διακριτικής ικανότητας. Οι χρωματογραφικές μέθοδοι έχουν αποδειχθεί εξαιρετικά χρήσιμες σε τέτοιου είδους διαχωρισμούς. Με βάση το μηχανισμό διαχωρισμού, οι χρωματογραφικές μέθοδοι κατηγοριοποιούνται σε πέντε μεγάλες ομάδες. Στις χρωματογραφίες προσρόφησης, ιοντοανταλλαγής, κατανομής, μοριακής διήθησης, και συγγένειας. Στην παρούσα μελέτη, για τον καθαρισμό της αγγειογενίνης χρησιμοποιήθηκε η χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής. Βάσει αυτής της μεθόδου, ο διαχωρισμός πραγματοποιείται με αντιστρεπτή προσρόφηση ιόντων σε δύο στάδια. Στο πρώτο στάδιο, προστίθεται το δείγμα το οποίο και προσροφάται και ουσίες που δε συγκρατούνται από τη στήλη απομακρύνονται με προσθήκη κατάλληλου διαλύτη. Το μίγμα των συστατικών που έχουν συγκρατηθεί από τη στήλη απομακρύνονται από αυτή σε διαφορετικές χρονικές στιγμές ανάλογα με το φορτίο που φέρουν με την προσθήκη κατάλληλων διαλυτών. Η στατική φάση της χρωματογραφικής στήλης μπορεί να αποτελείται από πολυμερείς ενώσεις μεγάλου μοριακού βάρους, όπως οι ιοντοανταλλάκτες της δεξτράνης (Sephadex) και της αγαρόζης (Sephacrose). Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε ως στατική φάση για τη στήλη η ρητίνη αγαρόζης. Ανάλογα με το είδος των ιοντίσιμων ομάδων που φέρουν διακρίνονται σε ανιονανταλλάκτες και κατιονανταλλάκτες. Γνωρίζοντας ότι η αγγειογενίνη είναι μία θετικά φορτισμένη πρωτεΐνη χρησιμοποιήθηκε κατιονανταλλακτική στήλη, όπου οι κατιονανταλλάκτες διαθέτουν όξινες ομάδες με κατιόντα ικανά να ανταλλάγουν με κατιόντα του διαλύματος. Ειδικότερα, ο καθαρισμός έγινε από τρεις κατά σειρά στήλες: τις κατιοντοανταλλακτικές GE Healthcare HiPrep SPFF 16/10 20ml και Resource S 1ml καθώς και την αντίστροφης φάσης Resource RPC 18 column.

- Πρώτο στάδιο καθαρισμού SPFF 16/10

Η εξισορρόπηση της στήλης γίνεται με το διάλυμα A (10mM Tris-HCl και 0,2M χλωριούχο νάτριο V=1lt, pH 8,0), έτσι ώστε να είναι δυνατή η πρόσδεση της αγγειογενίνης σε αυτή, η ροή του πρωτεϊνικού δείγματος είναι 1ml/min και η έκλουση της αγγειογενίνης γίνεται με το διάλυμα B (10mM Tris-HCl και 0,6M χλωριούχο νάτριο, pH 8.0). Αυτό επιτυγχάνεται μέσω σταδιακής αύξησης της ιονικής ισχύος. Όσο αυξάνεται η ιονική ισχύς, απομακρύνονται πρωτεΐνες από τη στήλη ανάλογα με την ισχύ πρόσδεσής τους σε αυτή. Επομένως, αρχικά θα παρατηρηθεί έκλουση των ασθενώς προσδεδεμένων πρωτεϊνών και στη συνέχεια εκλούνται οι ισχυρότερα προσδεδεμένες. Στη συγκεκριμένη στήλη δεν εφαρμόζουμε διαβάθμιση συγκέντρωσης του παράγοντα έκλουσης (χλωριούχο νάτριο) αλλά απευθείας διέλευση 100% του διαλύματος B (0,6M χλωριούχο νάτριο). Καθώς το έκλουσμα εξέρχεται από τη στήλη διέρχεται από φωτόμετρο υπεριώδους που ελέγχει την περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη με μέτρηση της οπτικής απορρόφησης σε μήκος κύματος 280nm. Έτσι συλλέγονται τα κλάσματα που παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη οπτική πυκνότητα.

Διαπίδωση: μετά την ανάκτηση της πρωτεΐνης από τη στήλη SPFF 16/10 εφαρμόζεται η τεχνική της διαπίδωσης. Πρόκειται για μία τεχνική διάχυσης διαχωρισμού των πρωτεϊνών από μικρότερα μόρια, μέσα από μία ημιδιαπερατή μεμβράνη κυτταρίνης με πόρους. Τα μόρια που έχουν διαστάσεις σημαντικά μεγαλύτερες από τη διάμετρο των πόρων διατηρούνται μέσα στο σάκο διαπίδωσης, ενώ τα μικρότερα μόρια και τα ιόντα περνούν από τους πόρους τις μεμβράνης και εμφανίζονται στο διάλυμα εκτός σάκου. Η τεχνική αυτή είναι χρήσιμη για την απομάκρυνση του άλατος ή άλλων μικρών μορίων αλλά δεν είναι αποδοτική για το διαχωρισμό πρωτεϊνών (Stryer L. *et al.*, 2009). Για τη διαπίδωση στο συγκεκριμένο στάδιο τοποθετήθηκε το διάλυμα της πρωτεΐνης μέσα σε μεμβράνες, οι οποίες κατόπιν τοποθετήθηκαν σε Resource S Buffer A της δεύτερης στήλης. Με αυτό τον τρόπο μπορεί να επιτευχθεί η έξοδος του χλωριούχου νατρίου από το διάλυμα της πρωτεΐνης και η είσοδος του Resource S Buffer A έτσι ώστε να μπορέσει αυτή να προσδεθεί στη στήλη Resource S.

- Δεύτερο στάδιο καθαρισμού ResourceS:

Η εξισορρόπηση της στήλης γίνεται με το διάλυμα A (10mM Tris-HCl, V=1lt, pH 8,0), η ροή διέλευσης του πρωτεϊνικού δείγματος είναι 1 ml/min και η έκλουση της αγγειογενίνης γίνεται με διαβάθμιση συγκέντρωσης διαλύματος B (10mM Tris-HCl και 1M χλωριούχο νάτριο, pH 8,0), από 15 έως 55%.

- Τρίτο στάδιο καθαρισμού ResourceRPC:

Η εξισορρόπηση της στήλης γίνεται με 5% διαλύματος B (διάλυμα A: 0,1% TFA, διάλυμα B: 0,08 % TFA σε ισοπροπανόλη:ακετονιτρίλιο:H₂O σε αναλογία 3:2:2), η ροή διέλευσης του πρωτεϊνικού δείγματος είναι 1 ml/min, ακολουθεί έκπλυση της στήλης με 25% διαλύματος B για 5 όγκους στήλης και έκλουση της πρωτεΐνης με διαβάθμιση συγκέντρωσης διαλύματος B από 25 έως 45% για 16min.

2.4.6 Κυκλοποίηση πρωτεΐνης

Αφού ολοκληρωθεί ο καθαρισμός της πρωτεΐνης και από τη δεύτερη στήλη, η αγγειογενίνη υφίσταται κυκλοποίηση. Με βάση αυτή τη διαδικασία η ποσότητα της ανασυνδυασμένης Gln-1Ang που αποκτήθηκε μετατρέπεται στην αυθεντική <Glu-1 ανθρώπινη μορφή, όπου η γλουταμίνη μετατρέπεται σε πυρο-γλουταμινικό (pyroGlu) με κυκλοποίηση του αμινοτελικού της άκρου μη ενζυμικά. Η διαδικασία πραγματοποιείται με την προσθήκη 0.4M φωσφορικού καλίου όγκου ίσου με τον όγκο της πρωτεΐνης. Αφήνεται σε ηρεμία σε θερμοκρασία 37°C για 21 ώρες και ακολουθεί διαπίδυση σε Resource S Διάλυμα έκλουσης (B), έτσι ώστε να απομακρυνθούν τα φωσφορικά και να μπορέσουμε να προχωρήσουμε στον καθαρισμό της από την τρίτη στήλη.

2.4.7 Συμπύκνωση πρωτεΐνης

Μετά τον καθαρισμό της πρωτεΐνης και από τις τρεις στήλες γίνεται διαπίδυση σε νερό MilliQ και έπειτα ακολουθεί η συμπύκνωσή της με ειδικό φίλτρο στη φυγόκεντρο για διαχωρισμό πρωτεϊνών μοριακού βάρους 3000 Da και άνω,

(3000 MW CO) μέχρι μία συγκεκριμένη συγκέντρωση ικανοποιητική για την εφαρμογή κρυσταλλώσεων.

2.5 Απομόνωση Met(-1)-ANG (Holloway D.E. *et al.*, 2001)

2.5.1 Υλικά- Προετοιμασία συστατικών

1. *LB-Broth*: 1lt, αποθηκεύεται σε θερμοκρασία 4°C-αποστειρωμένο (Applichem Panreac)
2. *TB-Medium*: αποτελείται από 12gr Τρυπτόνης, 24gr Εκχύλισμα Ζύμης, 4ml γλυκερόλη, 12,54gr όξινου φωσφορικού καλίου και 2,31gr δισόξινου φωσφορικού καλίου διαλυμένα σε ddH₂O 1lt-αποστειρωμένο (Applichem Panreac)
3. Αντιβιοτικό καναμυκίνη 50mg/mL (Applichem Panreac)
4. Επαγωγέας IPTG 1M (Serva)
5. Διάλυμα λύσης κυττάρων: 50mM Tris-HCl (Applichem Panreac), 2mM EDTA, pH 8.0 (Panreac)
6. Αποδιατακτικό 1% TritonX-100 (Merck)
7. Διάλυμα αποδιάταξης: 7M υδροχλωρική γουανιδίνη (Sigma-Aldrich), 0.15M ανηγμένη γλουταθειόνη (Applichem Panreac), 0.1M Tris-HCl, 2mM EDTA, pH 8.0
8. Διάλυμα αναδίπλωσης: 0.5M L-αργινίνη-HCl (Serva), pH 8.0, 0.6mM οξειδωμένη γλουταθειόνη (Applichem Panreac).

Διαλύματα για τις στήλες καθαρισμού της Ang

SPFF 16/10

Διάλυμα A: 25mM Tris-HCl και 0,2M χλωριούχο νάτριο V=1lt, pH 8,0

Διάλυμα B: 25mM Tris-HCl και 0,8M χλωριούχο νάτριο V=1lt, pH 8,0

Resource RPC

Διάλυμα A: 0,1% v/v TFA διαλυμένο σε νερό V=1lt

Διάλυμα B: 0,08% v/v TFA διαλυμένο σε ισοπροπανόλη:ακετονιτρίλιο:H₂O αναλογίας 3:2:2 σε συνολικό όγκο 700ml.

2.5.2 Παραγωγή θρεπτικών για τις καλλιέργειες

Το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιείται για την ανάπτυξη των κυττάρων είναι το LB-Broth για τις μικρές καλλιέργειες και το TB-Medium για τις μεγάλες. Στο συγκεκριμένο πείραμα, δημιουργήθηκαν αρχικά, όπως και στην προηγούμενη απομόνωση, μικρές υγρές βακτηριακές καλλιέργειες και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε μεγαλύτερες.

2.5.3 Παρασκευή καλλιεργείων

- ✓ Παρασκευή μικρών καλλιεργείων 5mL
 - μία βακτηριακή αποικία από καλλιέργειες που βρίσκονται σε τρυβλίο
 - 5μl αντιβιοτικό καναμικίνης 50mg/mL
 - 5ml LB-Broth

Γίνεται επώαση για 16 ώρες σε στροφές ταχύτητας 210rpm και θερμοκρασία 37°C.

- ✓ Παρασκευή μεσαίας καλλιέργειας 200mL TB- Medium
 - 2ml μικρής καλλιέργειας
 - 200μl αντιβιοτικού καναμικίνης 50mg/mL

Γίνεται επώαση σε 210rpm και θερμοκρασία 37°C, μέχρι η τιμή της οπτικής απορρόφησης να είναι 0,6.

- ✓ Παρασκευή μεγάλων καλλιεργείων

Σε δύο κωνικές φιάλες 1lt με 800mL TB- Medium γίνεται εμβολιασμός:

- 8ml μεσαίας καλλιέργειας
- 800μl αντιβιοτικού καναμικίνης 50mg/mL

Γίνεται επώαση σε 210rpm και θερμοκρασία 37°C, μέχρι η τιμή της οπτικής απορρόφησης να είναι 0,6-0,8 και έπειτα προστίθεται 1mM του επαγωγέα IPTG και οι καλλιέργειες επωάζονται για δύο ώρες επιπλέον.

2.5.4 Συλλογή κυττάρων

Στη δεδομένη απομόνωση η αγγειογενίνη παράγεται με τη μορφή έγκλειστων σωματίων και ύστερα από φυγοκέντρηση κυττάρων για 15min, σε στροφές 2500g και θερμοκρασία 4°C συλλέγεται από το κυτταρικό ίζημα και αποθηκεύεται τους -20°C.

2.5.5 Λύση και πλύση κυττάρων

Στην παρούσα απομόνωση, όπως και στην προηγούμενη, επιλέχθηκε ο μηχανικός τρόπος για τη λύση των κυττάρων με χρήση υπερήχων και η διαδικασία έχει ως εξής:

- Το βακτηριακό ίζημα που αντιστοιχεί σε 0.5Lt καλλιέργειας, διαλυτοποιείται σε 25mL ρυθμιστικού διαλύματος λύσης των κυττάρων (lysis buffer), αποτελούμενο από 50mM Tris-HCl και 2mM EDTA, pH 8.0
- Ακολουθεί χρήση υπερήχων για το σπάσιμο των κυττάρων για 5 κύκλους των 40sec με ενδιάμεσες παύσεις των 40sec αντίστοιχα.
- Φυγοκέντρηση των δειγμάτων για 20 λεπτά, σε 20000g, στους 4°C, και συλλογή κυτταρικού ιζήματος.
- Επανάληψη των τριών προηγούμενων βημάτων για ακόμη δύο φορές, με τη μόνη διαφορά πως τη δεύτερη φορά στο διάλυμα λύσης προστείνεται και απορρυπαντικό Triton 1% (v/v).

Ομογενοποίηση και αποδιάταξη πρωτεΐνης: Μετά τη φυγοκέντρηση απορρίπτεται το υπερκείμενο και το ίζημα επαναδιαλύεται με τη βοήθεια ομογενοποιητή σε 10ml διαλύματος αποδιάταξης (7M υδροχλωρική γουανιδίνη, 0.15M ανηγμένη γλουταθειόνη, 0.1M Tris-HCl, 2mM EDTA, pH 8.0) και αφήνεται για δύο ώρες υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου.

Αναδίπλωση πρωτεΐνης: Μετά το πέρας των δύο ωρών, το δείγμα προστίθεται σταγόνα-σταγόνα σε 500ml διαλύματος αναδίπλωσης (0.5M L-αργινίνη-HCl, pH 8.0, 0.6mM οξειδωμένη γλουταθειόνη) και αφήνεται σε ήπια ανάδευση για 24 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.

- Μετά το πέρας των 24 ωρών, το δείγμα φυγοκεντρείται σε 10.000g για 30 λεπτά και αραιώνεται σε τριπλάσιο όγκο (1,5L) με υπερκάθαρο (MilliQ) νερό απαερωμένο.

2.5.6 Χρωματογραφικός καθαρισμός αγγειογενίνης

Η διαδικασία του χρωματογραφικού καθαρισμού της αγγειογενίνης είναι όμοια με εκείνη που περιγράφηκε παραπάνω για την πρώτη απομόνωση. Η διαφορά μεταξύ των δύο απομονώσεων σε αυτό το στάδιο, έγκειται στο γεγονός ότι μετά την κλωνοποίηση σε νέο φορέα ο καθαρισμός της πρωτεΐνης πραγματοποιείται από δύο μόνο στήλες, την κατιοντοανταλλακτική GE Healthcare HiPrep SPFF 16/10 20ml καθώς και την αντίστροφης φάσης Resource RPC C18 column. Τα διαλύματα έκλουσης που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση είναι ακριβώς ίδιας σύστασης με εκείνα της πρώτης απομόνωσης.

2.5.8 Λυοφιλίωση πρωτεΐνης

Μετά τη διαπίδυση της πρωτεΐνης σε νερό MilliQ ακολουθεί λυοφιλίωση, δηλαδή ένας τρόπος αφύγρανσης των ευαίσθητων υλικών γενικά, αλλά και των πρωτεϊνών ειδικότερα. Οι πρωτεΐνες μέσω αυτής της διαδικασίας ψύχονται σε χαμηλή θερμοκρασία και στη συνέχεια το νερό μπορεί να απομακρυνθεί από αυτές με εξάχνωση. Μετά τον καθαρισμό της Ang μέσω των στηλών ακολουθήθηκε η παραπάνω διαδικασία, ώστε να ληφθεί η Ang σε μορφή σκόνης και να διατηρηθεί για μεγάλο χρονικό διάστημα σε θερμοκρασία -20°C για τη χρήση σε μετέπειτα διαδικασίες.

2.6 Αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου παρουσία SDS(SDSPAGE)

Η ηλεκτροφόρηση είναι το φαινόμενο της κίνησης χημικών ενώσεων (κυρίως πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων) μέσα σε ένα πήκτωμα (gel) με την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Η κίνηση των ουσιών μέσα στο ηλεκτρικό πεδίο εξαρτάται από το ηλεκτρικό φορτίο και το μοριακό βάρος των ουσιών. Η ηλεκτροστατική δύναμη που αναπτύσσεται κατευθύνει τα φορτισμένα μόρια προς το ηλεκτρόδιο του αντίθετου φορτίου. Εξαιτίας των διαφορετικών φορτίων και μαζών, τα διάφορα μόρια θα κινηθούν με διαφορετικές ταχύτητες.

Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε πηκτώματα αγαρόζης ή πολυακρυλαμιδίου και η επιλογή εξαρτάται κυρίως από τη φύση του δείγματος που πρόκειται να διαχωριστεί. Στην παρούσα πειραματική διαδικασία, έγινε χρήση πηκτής πολυακρυλαμιδίου, η οποία χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό μορίων όταν είναι αναγκαία μεγάλη διακριτική ικανότητα.

Η τεχνική SDS-PAGE που εφαρμόζεται λειτουργεί ως εξής: η πηκτή αποτελείται από δύο τμήματα, την πηκτή επιστοίβαξης (stacking gel) και την πηκτή διαχωρισμού (running gel) οι οποίες διαφέρουν μεταξύ τους ως προς το μέγεθος των πόρων, το pH και την ιονική ισχύ. Ο ρόλος της πηκτής επιστοίβαξης, η οποία έχει μεγαλύτερο μέγεθος πόρων και μικρότερο pH από την πηκτή διαχωρισμού, είναι να συσσωρεύσει τις πρωτεΐνες σε μια στενή περιοχή, ώστε να εισέλθουν στη πηκτή διαχωρισμού ως μια λεπτή ταινία και να επιτευχθεί καλύτερος διαχωρισμός των πρωτεϊνών.

Μετά την ηλεκτροφόρηση οι διαχωρισμένες πρωτεΐνες είναι δυνατόν να ανιχνευθούν με χρώση Coomassie Blue. Η χρώση αυτή γίνεται σε ελαφρώς όξινο περιβάλλον, που ευνοεί τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στη χρωστική και τις αμινομάδες των πρωτεϊνών, ενώ γίνονται και αλληλεπιδράσεις χρωστικής-πρωτεϊνών μέσω δυνάμεων van der Waals. Με τη μέθοδο αυτή ανιχνεύονται μέχρι 0,1 μg πρωτεΐνης. Εναλλακτικά, η χρώση μπορεί να γίνει με χρώση αργύρου, η οποία χαρακτηρίζεται από εξαιρετικά μεγάλη ευαισθησία (ικανότητα ανίχνευσης ng πρωτεΐνης). Η χρώση αυτή χρησιμοποιείται μόνο σε περιπτώσεις που είναι επιθυμητή η ανίχνευση πολύ

μικρών ποσοτήτων πρωτεϊνών, καθώς η τεχνική αυτή είναι αρκετά χρονοβόρα και πολύπλοκη, συγκριτικά με την Coomassie Blue.

Πειραματική διαδικασία

Με βάση το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης (σχετίζεται με τη συγκέντρωση του πολυακρυλαμιδίου) παρασκευάστηκε πηκτή σύστασης 10% SDS και ηλεκτροφορήθηκε στα 110V. Η σύσταση της πηκτής δίνεται στον **Πίνακα 1**.

Πίνακας 1. Σύσταση Running και StackingGel 10% SDS.

Running Gel (10ml)		Stacking Gel (6ml)
H ₂ O	4,0ml	4,1ml
30% Acryl/Bisacrylamide Mix	3,3ml	1,0ml
1,5M Tris HCl pH=8,8	2,5ml	1 M Tris HCl pH=6.8 0,75ml
10% SDS	0,1ml	60μl
10% APS	0,1ml	60μl
TEMED	4μl	6μl

Τα αντιδραστήρια APS και TEMED προστίθενται στο τέλος ακριβώς πριν να μεταφερθούν τα διαλύματα εντός των πλακών ώστε να μην αρχίσει ο πολυμερισμός πολύ νωρίς. Η πηκτή διαχωρισμού παρασκευάζεται πρώτη και μεταφέρεται στο χώρο μεταξύ των πλακών γεμίζοντας το 75% του χώρου. Η πηκτή καλύπτεται με ισοπροπανόλη για προστασία της πηκτής από το οξυγόνο. Η ισοπροπανόλη αφαιρείται όταν ο πολυμερισμός έχει τελειώσει και οι δυο φάσεις έχουν διαχωριστεί. Στη συνέχεια παρασκευάζεται η πηκτή

επιστοίβασης και διαβιβάζεται στο χώρο μεταξύ των πλακών σχηματίζοντας μια στοιβάδα πάνω από την πηκτή διαχωρισμού, μέχρι την επιφάνεια. Αμέσως τοποθετείται κατάλληλο πλαστικόχτενάκι για το σχηματισμό καθορισμένου αριθμού πηγαδιών. Οι πηκτές παραμένουν σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά περίπου μέχρι να πολυμεριστούν πλήρως.

Τα δείγματα φορτώνονται αφού έχει πήξει το gel. Ως δείγματα για την ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιούνται τα κλάσματα που προέκυψαν από τον χρωματογραφικό καθαρισμό με την μεγαλύτερη οπτική απορρόφηση στα 280nm, δείγμα από τα έγκλειστα σωμάτια καθώς και από το συνολικό διάλυμα των κυττάρων. Έτσι, τοποθετείται σε κάθε σωλήνα τύπου erpendorf κατάλληλη ποσότητα από το υπό εξέταση δείγμα, μαζί με loading buffer, το οποίο αποτελείται από μερκαπτοαιθανόλη και SDS για αποδιάταξη, γλυκερόλη για καθίζηση των πρωτεϊνών και χρωστική μπλε της βρωμοφαινόλης ώστε να βάφει το δείγμα και να γίνονται ορατά τα πηγαδάκια. Στη συνέχεια, θερμαίνουμε τα δείγματα σε θερμοκρασία 95°C για 5min και φορτώνονται στο δείγμα. Μαζί με τα δείγματα στο gel φορτώνεται κατάλληλη ποσότητα μάρτυρα.

Στη συσκευή τοποθετείται στη συνέχεια ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (25mM Tris, 250mM γλυκίνη, 0,1% w/v SDS, pH 8.3-SDS Running Buffer) έτσι ώστε να διαβρέχονται οι ελεύθερες επιφάνειες της πηκτής μεταξύ των πλακών και να σχηματιστεί κλειστό κύκλωμα με την τοποθέτηση των ηλεκτροδίων. Στη συνέχεια φορτώνονται τα δείγματα στα πηγαδάκια, συνδέονται τα ηλεκτρόδια και εφαρμόζεται διαφορά δυναμικού 110V. Αφού τα δείγματα εισέλθουν στη πηκτή διαχωρισμού η τάση αυξάνεται σε 120-150 V και τερματίζεται όταν το μέτωπο της χρωστικής διατρέξει όλο το μήκος της πηκτής.

Χρώση της πηκτής: Η πηκτή (gel) τοποθετείται για 20 λεπτά υπό ανάδευση σε διάλυμα χρώσης (0,1% w/v Coomassie Blue R-250, 50% v/v μεθανόλη, 5% v/v οξικό οξύ-staining solution). Στη συνέχεια μεταφέρεται σε διάλυμα αποχρωματισμού (5% v/v μεθανόλη, 5% v/v οξικό οξύ-destaining solution) υπό ανάδευση, μέχρι να απομακρυνθεί η μη ειδικά συνδεδεμένη με την πηκτή χρωστική.

2.7 Κρυσταλλώσεις

2.7.1 Τεχνικές κρυστάλλωσης

2.7.1.1 Διάχυση ατμών

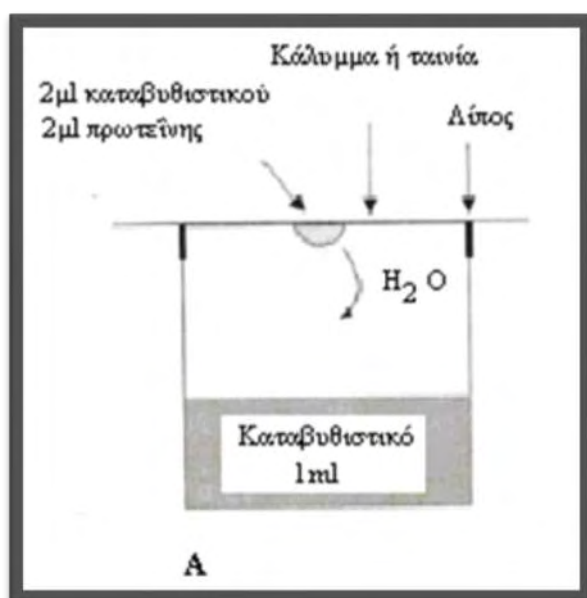
Η μέθοδος της διάχυσης ατμών είναι η πλέον συνηθισμένη μέθοδος κρυστάλλωσης πρωτεϊνών και εφαρμόζεται συνήθως με τις τεχνικές της κρεμάμενης σταγόνας (hanging drop), της καθήμενης σταγόνας (sitting drop) και της σταγόνας sandwich. Για την επίτευξη της κρυστάλλωσης το καθαρό υδατικό πρωτεϊνικό διάλυμα αναμιγνύεται με διάλυμα ενός καταβυθιστικού (precipitant) που είναι συνήθως κάποιο άλας, PEG (πολυαιθυλενική γλυκόλη) ή μικρά οργανικά μόρια και το σύστημα αφήνεται να ισορροπήσει. Αρχικά, το διάλυμα πρωτεΐνης περιέχει συγκριτικά χαμηλές συγκεντρώσεις κατακρημνιστικού παράγοντα και πρωτεΐνης, αλλά καθώς γίνεται καθίζηση και η δεξαμενή ισορροπεί, οι συγκεντρώσεις του ιζήματος και των πρωτεϊνών αυξάνουν κατά την πτώση. Εάν οι συνθήκες κρυστάλλωσης που χρησιμοποιήθηκαν για τη δεδομένη πρωτεΐνη είναι κατάλληλες, τότε θα εμφανιστεί ανάπτυξη κρυστάλλων. Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιείται, επειδή επιτρέπει τις ήπιες και σταδιακές αλλαγές στη συγκέντρωση της πρωτεΐνης και του κατακρημνιστικού παράγοντα, που βοηθούν την ανάπτυξη των μεγάλων και καλά οργανωμένων κρυστάλλων. Η μέθοδος της καθήμενης σταγόνας προϋποθέτει την τοποθέτηση της πρωτεΐνης σε ένα βάθρο που διαχωρίζεται από τη δεξαμενή και απαιτεί τη σφράγιση του περιβάλλοντος, έτσι ώστε να επέλθει ισορροπία μεταξύ της σταγόνας και της δεξαμενής απουσία μορίων O₂.

2.7.1.2 Τεχνική της κρεμάμενης σταγόνας (hanging drop)

Η συγκεκριμένη μέθοδος εφαρμόστηκε για την πραγματοποίηση των κρυσταλλώσεων της αγγειογενίνης. Πρόκειται για μία εύκολα χρησιμοποιούμενη τεχνική όπου απαιτούνται μικρές ποσότητες πρωτεΐνης, με χαμηλό κόστος και ευκολία στην παρακολούθηση. Είναι ευρέως διαδεδομένη και αποτελεσματική για την παραγωγή κρυστάλλων. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

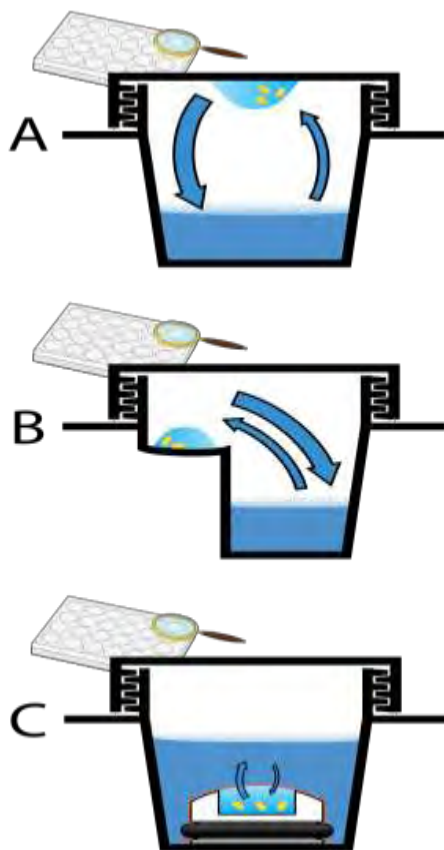
Μια σταγόνα μίγματος πρωτεϊνικού διαλύματος και διαλύματος καταβυθιστικού τοποθετείται στο μέσο μιας υδρόφοβης καλυπτρίδας (σταγόνα κρυστάλλωσης). Η σταγόνα αποτελείται από διάλυμα της πρωτεΐνης και του καταβυθιστικού σε αναλογία 1:1 (συνήθως αναμιγνύονται 2-5 μl από το κάθε διάλυμα). Η καλυπτρίδα τοποθετείται πάνω από έναν όγκο 700μl διαλύματος εξισορρόπησης και το σύστημα κλείνεται αεροστεγώς δημιουργώντας έτσι ένα κλειστό σύστημα όπου δεν λαμβάνει χώρα ανταλλαγή ύλης και ενέργειας (**Εικόνα 3**).

Αποτέλεσμα των πιο πάνω είναι, η συγκέντρωση του καταβυθιστικού να είναι μεγαλύτερη στο διάλυμα εξισορρόπησης από ότι στη σταγόνα. Αυτό σημαίνει ότι για την αποκατάσταση της ισορροπίας απομακρύνεται νερό από το αραιό διάλυμα, δηλαδή τη σταγόνα, και μετατοπίζεται προς το διάλυμα εξισορρόπησης μέχρι η τάση ατμών αυτού και της σταγόνας να εξισωθούν. Η απομάκρυνση νερού όμως έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσης των συστατικών της σταγόνας. Όταν η συγκέντρωση του καταβυθιστικού και της πρωτεΐνης φτάσει στην βέλτιστη τιμή τότε η πρωτεΐνη κρυσταλλώνεται.



Εικόνα 3. Διαδικασία κρυστάλλωσης πρωτεΐνης.

Στην **Εικόνα 4** παρουσιάζονται οι τεχνικές κρυσταλλώσεων.



Εικόνα 4. Τρεις μέθοδοι κρυσταλλώσεων: A) Τεχνική κρεμάμενης σταγόνας B) Καθήμενης σταγόνας C) Μικροδιαπίδυση

2.8 Εισαγωγή κρυσταλλώσεων

Στο πλαίσιο της παρούσας πειραματικής διαδικασίας πραγματοποιήθηκε μία σειρά από τεχνικές κρυστάλλωσης της αγγειογενίνης. Σε ένα αρχικό στάδιο, έγινε προσπάθεια κρυστάλλωσης της Ang στην ανοιχτή της διαμόρφωση ενώ σε δεύτερο στάδιο πραγματοποιήθηκε συγκρυστάλλωση της Ang με αναστολείς που αποτελούν νουκλεοτιδικά ανάλογα. Η ποσότητα της λυοφιλιωμένης Ang που ανακτήθηκε από την απομόνωση και τον καθαρισμό χρησιμοποιείται για την εφαρμογή των κρυσταλλώσεων.

Σε κάθε συνθήκη κρυστάλλωσης που εφαρμόζεται κρίνεται απαραίτητος ο έλεγχος των παρακάτω συνθηκών :

- η συγκέντρωση της πρωτεΐνης

- η συγκέντρωση του κατακρημνιστικού παράγοντα
- το pH
- η συγκέντρωση του ρυθμιστικού διαλύματος
- η θερμοκρασία

οι οποίοι τροποποιούνται ανάλογα κάθε φορά με σκοπό τη βελτιστοποίηση και την καλύτερη απόδοση.

2.9 Όργανα και Υλικά

Για τις κρυσταλλογραφικές μελέτες χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω όργανα:

- Ρομπότ κρυστάλλωσης Oryx Nano (Douglas Instruments, Αγγλία)
- Στερεοσκόπιο
- Καλυπτρίδες
- Σιλικόνη (GE Bayer)

2.10 Διαδικασίες Κρυστάλλωσης Met(-1) ANG

Για τη διαδικασία των κρυσταλλώσεων, η αγγειογενίνη ήταν διαλυμένη σε υπερκάθαρο νερό.

2.10.1 Μέθοδος HangingDrop

Η πρώτη μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε στη διαδικασία κρυστάλλωσης της Ang ήταν η μέθοδος της κρεμάμενης σταγόνας (hanging drop). Στον **Πίνακα 2** παρουσιάζονται οι συνθήκες κρυστάλλωσης, οι ποσότητες των ρυθμιστικών διαλυμάτων και των κατακρημνιστικών παραγόντων.

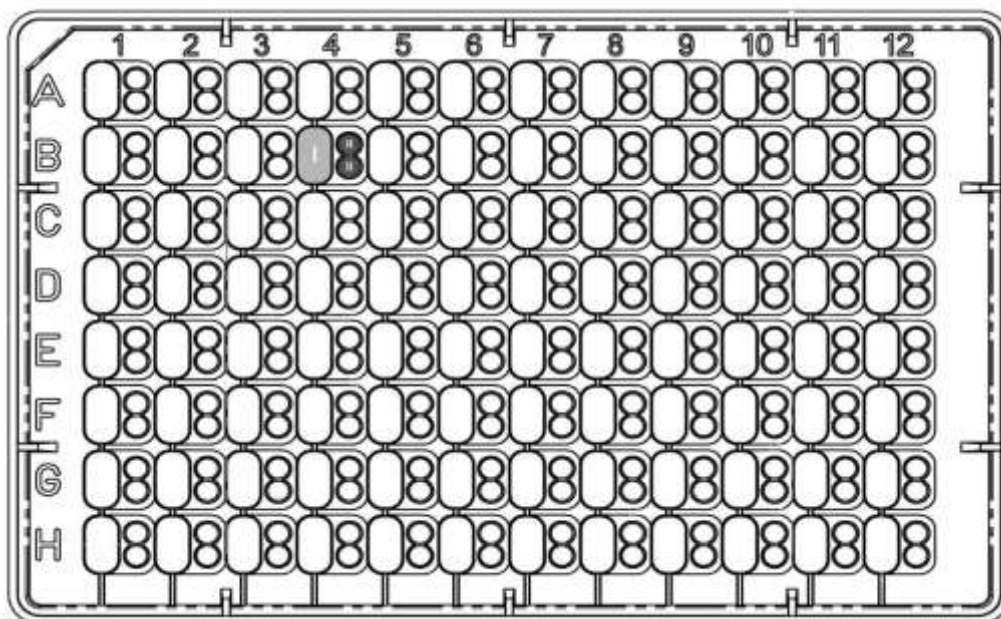
Πίνακας 2. Συνθήκες κρυστάλλωσης Ang με τη μέθοδο της κρεμάμενης σταγόνας.

ΣΥΝΘΗΚΕΣ	ΠΟΣΟΤΗΤΑ
ΚΡΥΣΤΑΛΛΩΣΗΣ	
1. 20mM Κιτρικό νάτριο pH 5.2	6 σταγόνες
0,2M Τρυγικό καλιονάτριο	
10% PEG6000	
2. 20mM Κιτρικό νάτριο pH 5.2	6 σταγόνες (εις διπλούν
0,2M Τρυγικό καλιονάτριο	για κάθε συγκέντρωση
12% PEG6000	κατακρημνιστικού
15% PEG6000	παράγοντα)
18% PEG6000	
3. 150mM Μηλικό οξύ pH 7.0	6 σταγόνες
20% PEG3350	

2.10.2 Μέθοδος Καθήμενης σταγόνας (Sitting Drop)

Η τεχνική της καθήμενης σταγόνας (sitting drop), που αποτελεί μέθοδο της διάχυσης ατμών, εφαρμόστηκε με τη χρήση της συσκευής του ρομπότ Oryx Nano, το οποίο χρησιμοποιεί πολύ μικρές ποσότητες τόσο πρωτεΐνης όσο και διαλύματος εξισορρόπησης. Με τη μέθοδο της καθήμενης σταγόνας γίνεται τοποθέτηση της σταγόνας σε ένα βοθρίο που διαχωρίζεται από το φρεάτιο που περιέχει το διάλυμα εξισορρόπησης.

Στην **Εικόνα5** παρουσιάζεται ένα πιάτο κρυσταλλώσεων 96 θέσεων. Με ανοιχτό (I) και σκούρο γκρι (II) υποδεικνύονται τα φρεάτια όπου τοποθετείται το διάλυμα εξισορρόπησης και τα βοθρία που περιέχουν το αναμεμιγμένο από το ρομπότ διάλυμα κρυστάλλωσης με το πρωτεϊνικό διάλυμα αντίστοιχα.



Εικό

να5 : Πιάτο κρυσταλλώσεων καθημερινής σταγόνας 96 θέσεων.

Χρησιμοποιήθηκαν τρεις διαφορετικές τιμές pH και δύο διαφορετικά άλατα: το θειικό αμμώνιο και το χλωριούχο νάτριο σε έξι διαφορετικές συγκεντρώσεις. Δημιουργήθηκαν, 36 διαφορετικές συνθήκες τελικού όγκου 10ml. Με βάση το pH που επιθυμείται να χρησιμοποιηθεί κάθε φορά, επιλέγεται και το κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα. Αυτό γίνεται με την εύρεση της K_a (σταθερά ιοντισμού που εκφράζει πόσο είναι μετατοπισμένη αριστερά η ισορροπία ιοντισμού μιας αντίδρασης) βάσει της βιβλιογραφίας και στη συνέχεια την εύρεση του pH που αντιστοιχεί σε κάθε διάλυμα. Συγκεκριμένα, τα ρυθμιστικά διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής:

- 1) 0,1M οξικό νάτριο pH 4.6 (Merck)
- 2) 0,1M κιτρικό νάτριο pH 5.2 (AppllichemPanreac)
- 3) 0,1M κακοδυλικό νάτριο pH 6.0 (Sigma)

2.10.3 Συγκρυστάλλωση Met(-1)-Ang με αναστολείς

Έπειτα από μία σειρά κρυσταλλώσεων που πραγματοποιήθηκαν για την φυσιολογική αγγειογενίνη, ακολούθησε μία προσπάθεια συγκρυστάλλωσής της με ανάλογα αδενোসίνης.

Αναστολέας 5'-ATP και αναστολέας 5'-ADP

- ✚ Σε ένα πρώτο στάδιο, οι δοκιμές κρυστάλλωσης της αγγειογενίνης σε συνδυασμό με τους δύο αναστολείς έγιναν με τη μέθοδο της καθήμενης σταγόνας με τη χρήση του μηχανήματος ρομπότ OryxNano και την εφαρμογή 96 τυποποιημένων συνθηκών (Crystallization Screen, Structure Screen I&II HT-96, Molecular Dimensions), οι οποίες διαθέτουν το ρυθμιστικό διάλυμα σε συγκεκριμένο pH, το άλας και τον κατακρημνιστικό παράγοντα, τα οποία δίνονται σε αναλυτικούς πίνακες από τη συγκεκριμένη εταιρεία.

- ✚ Σε δεύτερο στάδιο, θεωρήθηκε σκόπιμο να γίνει νέα δοκιμή κρυστάλλωσης των συνθηκών που έδωσαν θετικά αποτελέσματα από το σύνολο των 96 συνθηκών. Έτσι, με τη χρήση της μεθόδου της καθήμενης σταγόνας χειροκίνητα έγινε κρυστάλλωση της αγγειογενίνης τόσο σε συνδυασμό με τον κάθε αναστολέα ξεχωριστά όσο και χωρίς αναστολέα. Οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής:
 - Για το σύμπλοκο Ang/5'-ATP:
 - (α) 0.2M θειικό αμμώνιο, 0.1M κακοδυλικό νάτριο pH 6.5, 30% w/v PEG 8000
 - (β) 0.1M χλωριούχο κάδμιο, 0.1M όξινο νάτριο pH 4.6, 30% v/v PEG 400
 - (γ) 0.2M θειικό αμμώνιο, 0.1M όξινο νάτριο pH 4.6, 30% w/v PEG 2000.
 - Για το σύμπλοκο Ang/5'-ADP:
 - (α) 0.2M θειικό αμμώνιο, 0.1M κακοδυλικό νάτριο pH 6.5, 30% w/v PEG 8000
 - (β) 0.1M Na HEPES pH 7.5, 0.8M τρυγικό καλιονάτριο.

- Για τη φυσιολογική Ang:
 - (α) 0.2M θειικό αμμώνιο, 0.1M κακοδυλικό νάτριο pH 6.5, 30% w/v PEG 8000
 - (β) 0.1M Na HEPES pH 7.5, 0.8M τρυγικό καλιονάτριο
 - (γ) 0.1M χλωριούχο κάδμιο, 0.1M όξινο νάτριο pH 4.6, 30% v/v PEG 400
 - (δ) 0.2M θειικό αμμώνιο, 0.1M όξινο νάτριο pH 4.6, 30% w/v PEG 2000.

Αναστολέας NADPH: Για την συγκρυστάλλωση χρησιμοποιήθηκε η συνθήκη 0.1M κακοδυλικό νάτριο pH 6.0, 2.2M θειικό αμμώνιο, η οποία εφαρμόστηκε χειροκίνητα με την τεχνική της καθημερινής σταγόνας.

2.10.4 Ανάπτυξη νέων συνθηκών συγκρυστάλλωσης του συμπλόκου Ang/NADPH.

- ✚ Ακολούθησε δημιουργία νέων συνθηκών για τιμές pH 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0 και 8.5 χρησιμοποιώντας τα κατάλληλα ρυθμιστικά διαλύματα, βάσει της pKa, ενώ τα άλλα παρέμειναν ίδια για όλες τις τιμές pH. Η μέθοδος που εφαρμόστηκε ήταν αυτή της καθημερινής σταγόνας χρησιμοποιώντας το ρομπότ Oryx Nano.
- ✚ Στη συνέχεια ακολούθησε η δημιουργία νέων συνθηκών κρυστάλλωσης με βασικό χαρακτηριστικό τη διακύμανση του pH από 4.5 μέχρι 8.5 και χρησιμοποιώντας υψηλές συγκεντρώσεις θειικού αμμωνίου ως άλας στις 10 πρώτες συνθήκες και PEG4000 στις 10 επόμενες.

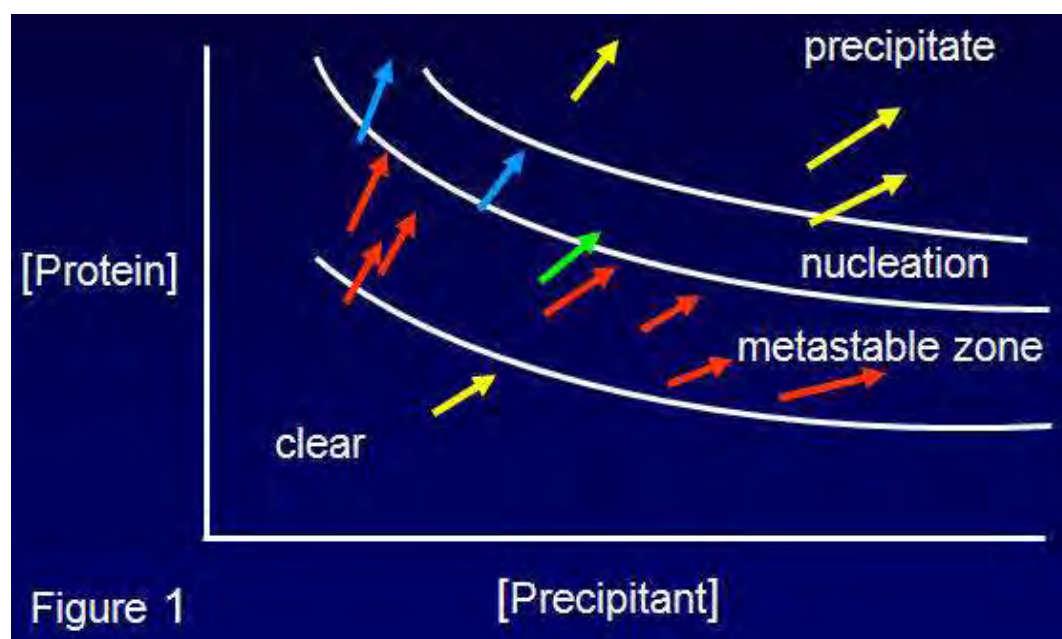
2.10.5 Πυρήνωση (Microseeding)

Η κρυστάλλωση διακρίνεται σε δύο στάδια: το στάδιο διαλογής, όπου τα αποτελέσματα που λαμβάνονται από προηγούμενο στάδιο κρυστάλλωσης χρησιμοποιούνται για την εύρεση νέων συνθηκών κρυστάλλωσης της πρωτεΐνης και το στάδιο της βελτιστοποίησης, όπου οι κρύσταλλοι που

λαμβάνονται βελτιστοποιούνται έπειτα από μικρές αλλαγές στις συνθήκες. Για τη βελτιστοποίηση τροποποιείται η θερμοκρασία, το ρυθμιστικό διάλυμα, η συγκέντρωση του άλατος και η ιοντική ισχύς.

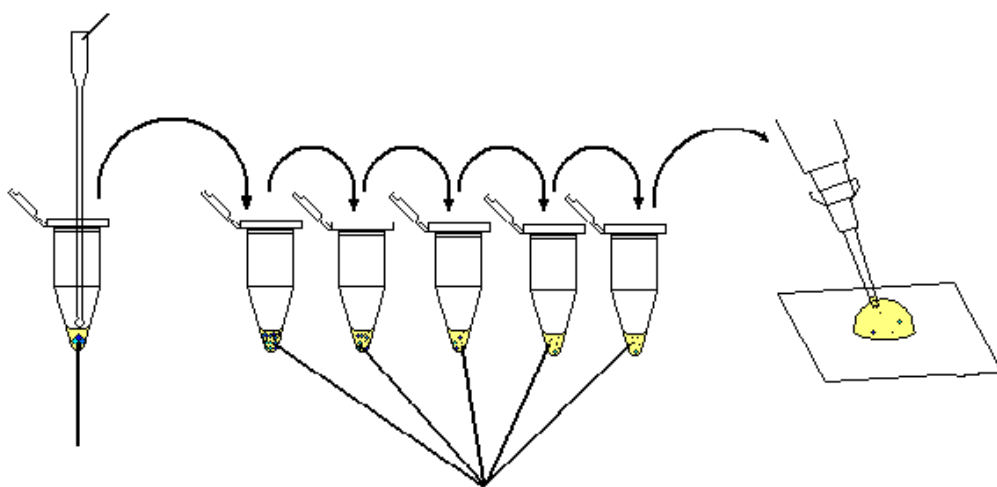
Η τεχνική κρυστάλλωσης “microseeding screening” χρησιμοποιείται για τη βελτιστοποίηση των συνθηκών της πυρήνωσης (G.C. Ireton & B.L. Stoodard, 2004). Με αυτή τη μέθοδο μπορεί να επιτευχθεί η μεταφορά των κρυστάλλων από το στάδιο της πυρήνωσης και η τοποθέτησή τους σε νέες συνθήκες. Η πρωτεΐνη, το διάλυμα και οι πυρήνες κρυστάλλων τοποθετούνται ταυτόχρονα σε ένα βοθρίο του πιάτου κρυσταλλώσεων. Η μέθοδος αυτή θεωρείται ότι έχει εφαρμογή σε πρωτεΐνες όπου παρατηρείται μικρή ή καθόλου πυρήνωση (A. D’Arcy et al, 2007).

Στο στάδιο αυτό κρίθηκε απαραίτητο να χρησιμοποιηθούν οι κρύσταλλοι που εμφανίστηκαν μετά τη μέθοδο της καθημερινής σταγόνας στη συνθήκη 0.1M Tris pH 8, 2.4M θειικό αμμώνιο ως υπόστρωμα για την ανάπτυξη μεγαλύτερων κρυστάλλων Ang. Έτσι λοιπόν, μέσω της μεθόδου της πυρήνωσης (seeding) οι λεπτοί και μικροί κρύσταλλοι που λήφθηκαν από τις προαναφερθείσες συνθήκες θρυμματίζονται με τη βοήθεια ειδικού σφαιριδίου και εισάγονται στις αντίστοιχες συνθήκες κρυστάλλωσης. Η εισαγωγή των κρυστάλλων γίνεται στη μετασταθερή ζώνη, στην οποία αναπτύσσονται οι κρύσταλλοι (Εικόνα 6).



Εικόνα 6. Διάγραμμα φάσης, όπου διακρίνονται τα στάδια ανάπτυξης των κρυστάλλων.

Η δεδομένη συνθήκη (0.1M Tris pH 8, 2.4M θειικό αμμώνιο) εφαρμόζεται εκ νέου αλλά πλέον μέσω της μεθόδου *microseeding*. Από μία αρχική συγκέντρωση αναλογίας 1:1 *seeding*:διάλυμα εξισορρόπησης πραγματοποιείται μία σειρά έξι διαδοχικών αραιώσεων. Μετά τις αραιώσεις, πάνω σε κάθε καλυπτρίδα τοποθετείται 1.5μl ANG/NADPH, 1.5μl διάλυμα εξισορρόπησης καθώς και 0.5μl *seeding*, δηλαδή θρυμματισμένοι κρύσταλλοι. Η διαδικασία του *microseeding* παρουσιάζεται στην **Εικόνα7**.



Εικόνα7. Microseeding.

- ✚ Στις νέες συνθήκες που δημιουργήθηκαν έγινε αλλαγή του άλατος. Το νέο άλας επιλέγεται με βάση την ιονική ισχύ. Επιλέγεται, δηλαδή, ένα εκείνο που φέρει ίδια ιονική ισχύ με το θειικό αμμώνιο. Το άλας που επιλέχθηκε ήταν το θειικό λίθιο. Το pH ρυθμίζεται σε όλες τις συνθήκες στο 8.
- ✚ Εν συνεχεία ακολούθησε ρύθμιση του pH του συμπλόκου Ang/NADPH στην τιμή 7.0 με προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος Tris-Acetate pH 7.0. Για την εφαρμογή των κρυσταλλώσεων δημιουργήθηκε η συνθήκη 0.1M Tris, 2.4M θειικό αμμώνιο, σε τιμές pH: 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5. Η

συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία, όπως και η προηγούμενη πραγματοποιήθηκε με την τεχνική της καθήμενης σταγόνας με τη βοήθεια του μηχανήματος ρομπότ. Οι συνθήκες που δώσανε θετικά αποτελέσματα επαναλήφθηκαν χειροκίνητα με τη μέθοδο της καθήμενης σταγόνας.

✚ Τέλος, μετά τα αποτελέσματα που λήφθηκαν από το προηγούμενο πείραμα ακολούθησε και πάλι η διαδικασία της πυρήνωσης. Για τη συγκεκριμένη διαδικασία πυρήνωσης με μία λεπτή τρίχα λαμβάνεται μικρή ποσότητα θρυμματισμένων κρυστάλλων διαπερνώντας τη κατά μήκος της σταγόνας και τοποθετούνται σε σταγόνα που περιέχει το διάλυμα εξισορρόπησης και το σύμπλοκο και έχει επωαστεί ήδη για 24 ώρες. Στο στάδιο αυτό το σύμπλοκο Ang/NADPH ρυθμίζεται σε pH 7 με την προσθήκη Tris acetate ρυθμισμένου στο pH 7. Στο πείραμα αυτό, χρησιμοποιήθηκε μόνο η συνθήκη 0.1M Tris, 2.4M Θεικό αμμώνιο σε τιμές pH 8 και 8.5. Η εφαρμογή του συγκεκριμένου πειράματος πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της καθήμενης σταγόνας χειροκίνητα.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

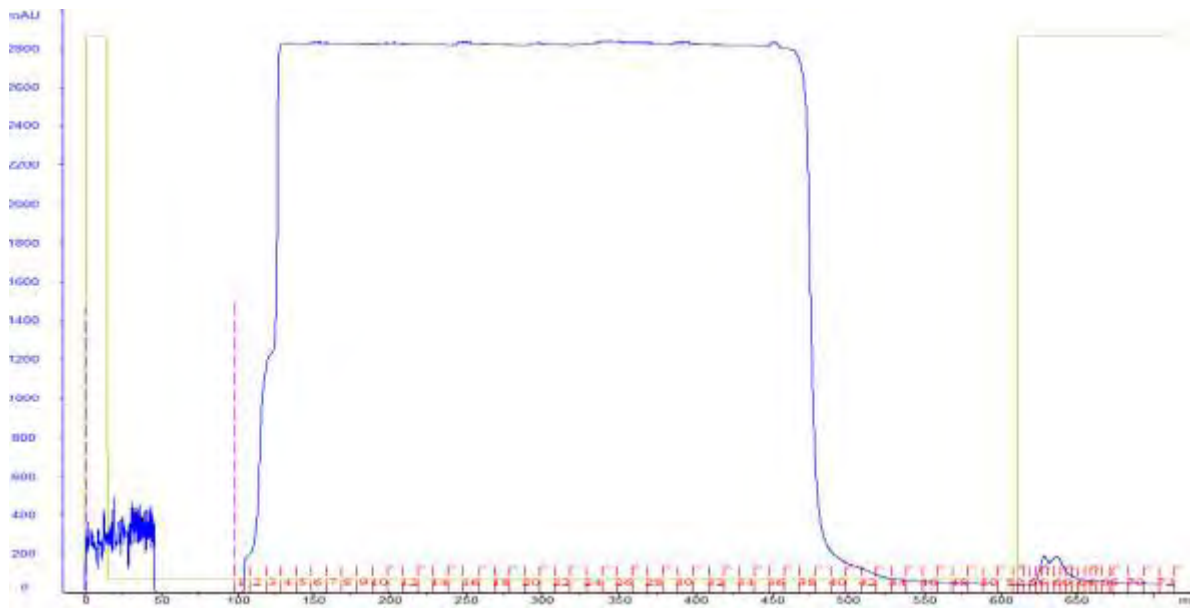
4.1 Χρωματογραφικός καθαρισμός της αγγειογενίνης με στήλες ιοντοανταλλαγής.

3.1.1 Αποτελέσματα απομόνωσης ργγο-GluAng

Στην πρώτη απομόνωση της Ang, το διάλυμα της πρωτεΐνης που ανακτήθηκε από τη λύση των κυττάρων καθαρίστηκε με τρεις κατά σειρά στήλες.

- **Αποτελέσματα καθαρισμού από τη στήλη SPFF 16/10**

Στην πρώτη στήλη, την SPFF 16/10 εξισορροπήθηκε με ρυθμιστικό διάλυμα 10mM Tris-HCl και 0.2M NaCl V=1L, pH 8.0 και χρησιμοποιήθηκαν 5 όγκοι στήλης. Στη συνέχεια, έγινε έκλουση της πρωτεΐνης με ρυθμιστικό διάλυμα 10mM Tris-HCl και 0.6M NaCl V=1L, pH 8.0 και ροή 1ml/min. Τα αποτελέσματα του καθαρισμού της Ang από τη στήλη αυτή φαίνονται στην **Εικόνα1**, όπου στον οριζόντιο άξονα παρουσιάζονται τα ml της πρωτεΐνης που ανακτήθηκαν και στον κατακόρυφο άξονα φαίνεται η τιμή απορρόφησης του UV σε mAU. Η μπλε γραμμή της εικόνας παρουσιάζει τις τιμές απορρόφησης των πρωτεϊνών στα 280nm ενώ η πράσινη παρουσιάζει τη συγκέντρωση του διαλύματος έκλουσης (B).



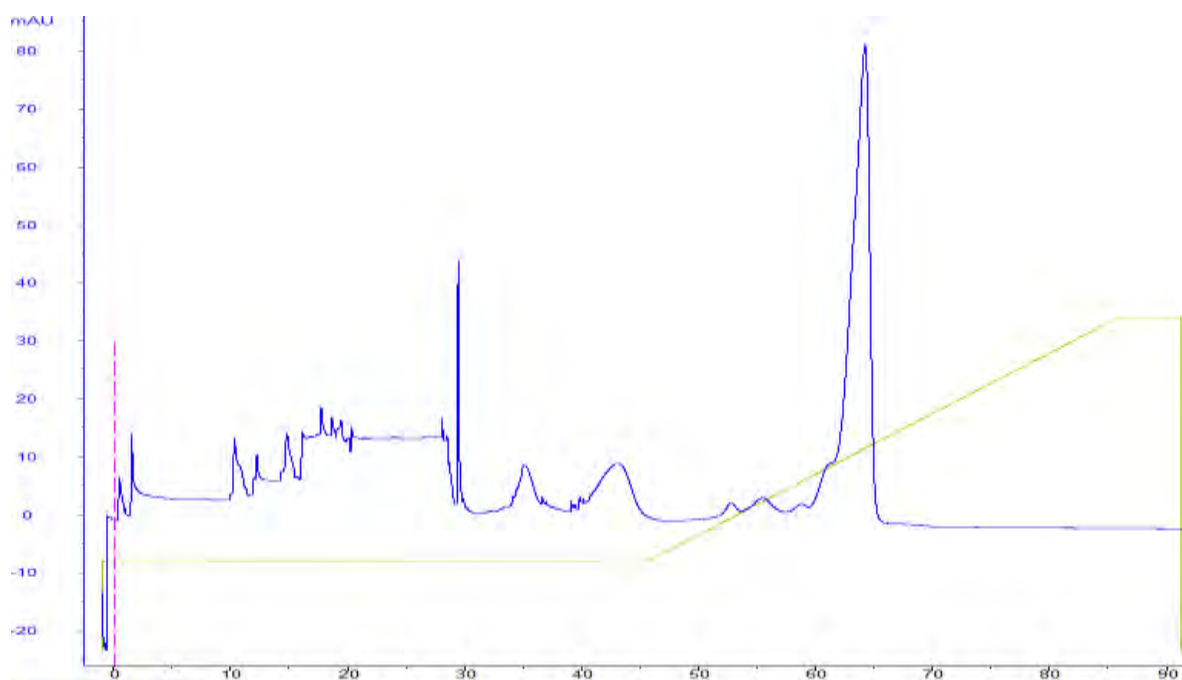
Εικόνα 1. Αποτελέσματα καθαρισμού ANG από τη στήλη SPFF 16/10. Μπλε γραμμή: τιμές απορρόφησης πρωτεϊνών στα 280nm. Πράσινη γραμμή: Συγκέντρωση του διαλύματος έκλουσης (B).

Συλλέχθηκαν 4 κλάσματα (56-59) συνολικού όγκου 4ml τα οποία εμφάνισαν τη μέγιστη τιμή απορρόφησης στα 280nm, στο 100% του διαλύματος έκλουσης (B). Με τη βοήθεια της εξίσωσης Lambert-Beer $A=εxbxC$ υπολογίζεται η ποσότητα της πρωτεΐνης που ανακτήθηκε. Για $ε=0,83mg/mlxcm$ και $b=1cm$, από τη στήλη SPFF 16/10 λαμβάνονται 4mg πρωτεΐνης. Τα κλάσματα συλλέχθηκαν, ενώθηκαν και ακολούθησε ο δεύτερος καθαρισμός τους.

- Αποτελέσματα καθαρισμού από τη στήλη Resource S

Ακολούθησε δεύτερος καθαρισμός της Ang με τη στήλη Resource S μετά από τη συμπύκνωσή της. Στη στήλη χρησιμοποιήθηκε το διάλυμα 10mM Tris-HCl, $V=1L$, pH 8.0 για την εξισορρόπησή της και το διάλυμα 10mM Tris-HCl και 1M NaCl $V=1L$, pH 8.0 για έκλουση της Ang. Η ροή ρυθμίζεται στα 0.8ml/min. Στην **Εικόνα 2** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που αποδόθηκαν μετά τον καθαρισμό από τη στήλη αυτή με απορρόφηση του UV στον κατακόρυφο άξονα και τα ml της πρωτεΐνης που διαπερνούν τη στήλη. Η μπλε γραμμή αντιπροσωπεύει τις τιμές απορρόφησης της πρωτεΐνης στα 280nm καθώς

περνά από τη στήλη. Στα σημεία όπου η απορρόφηση είναι μεγάλη σημαίνει ότι διαπερνά τη στήλη μεγάλη ποσότητα πρωτεΐνης. Η πράσινη γραμμή αντιπροσωπεύει τη συγκέντρωση του διαλύματος έκλουσης (B), το οποίο χρησιμοποιείται στη δεδομένη στήλη με διαβάθμιση συγκέντρωσης από 15 έως 55% για την έκλουση της πρωτεΐνης.



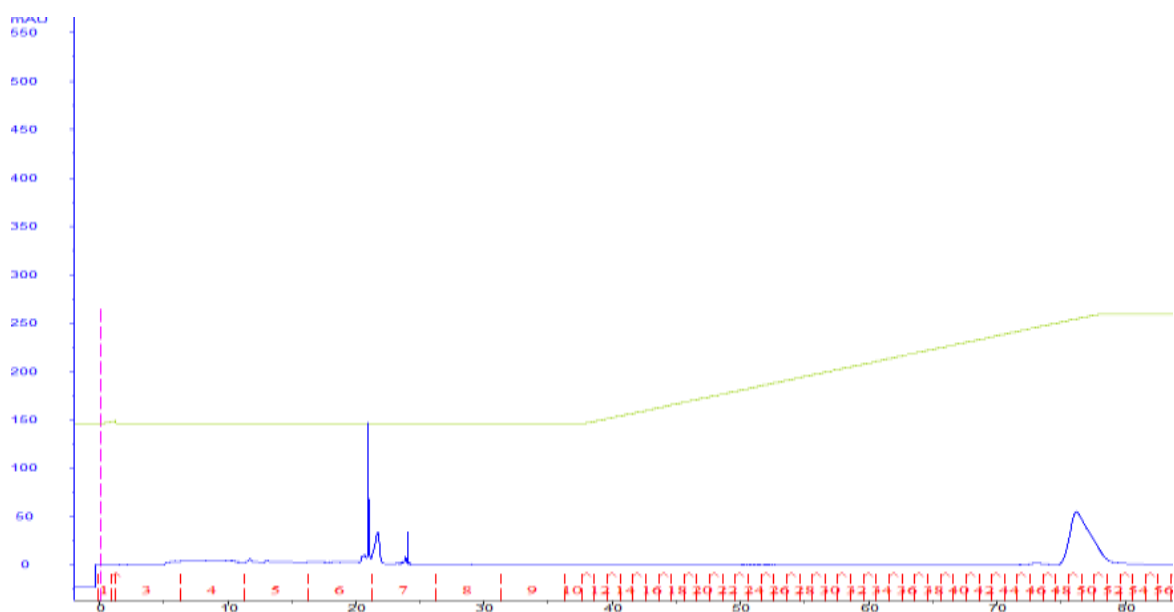
Εικόνα 2. Αποτελέσματα καθαρισμού ANG μετά από τη στήλη ResourceS. Μπλε γραμμή: τιμές απορρόφησης πρωτεϊνών στα 280nm. Πράσινη γραμμή: Συγκέντρωση του διαλύματος έκλουσης (B) με διαβάθμιση συγκέντρωσης από 15 έως 55%.

Συλλέχθηκαν 5 κλάσματα (34-38) συνολικού όγκου 4ml, τα οποία εμφάνισαν μέγιστη τιμή απορρόφησης στα 280nm σε συγκέντρωση 35% του διαλύματος έκλουσης (B). Η ποσότητα της πρωτεΐνης που ανακτήθηκε από τη στήλη Resource S, υπολογίζεται μέσω του τύπου $\epsilon=0,83\text{mg/ml}\times\text{cm}$ και $b=1\text{cm}$, ότι είναι 0.75mg πρωτεΐνης. Τα κλάσματα συλλέχθηκαν, ενώθηκαν και ακολούθησε ο τρίτος καθαρισμός τους.

- Αποτελέσματα καθαρισμού από τη στήλη ResourceRPC

Για την εξισορρόπηση της στήλης Resource RPC χρησιμοποιήθηκε το διάλυμα 0.1% v/v TFA διαλυμένο σε νερό V=1L και η έκλουση της Ang έγινε με 0.08% v/v TFA διαλυμένο σε ισοπροπανόλη:ακετονιτρίλιο:H₂O αναλογίας 3:2:2 σε συνολικό όγκο 700ml.

Τα αποτελέσματα του καθαρισμού παρουσιάζονται παρακάτω στην **Εικόνα 3**, όπου η μπλε γραμμή αντιπροσωπεύει τιμές απορρόφησης πρωτεϊνών στα 280nm ενώ η πράσινη γραμμή αντιπροσωπεύει τη συγκέντρωση του διαλύματος έκλουσης (B), το οποίο χρησιμοποιείται αρχικά με συγκέντρωση 5% για την εξισορρόπηση της στήλης, έπειτα για έκπλυση της με συγκέντρωση 25% και τέλος για την έκλουση της πρωτεΐνης με διαβάθμιση συγκέντρωσης από 25 έως 45% για 16min.



Εικόνα 3. Αποτελέσματα καθαρισμού ANG έπειτα από τη στήλη ResourceRPC.Μπλε γραμμή: τιμές απορρόφησης πρωτεϊνών στα 280nm. Πράσινη γραμμή: Συγκέντρωση του διαλύματος έκλουσης (B) 5% για εξισορρόπηση, 25% για έκπλυση και 25-45% για έκλουση πρωτεΐνης.

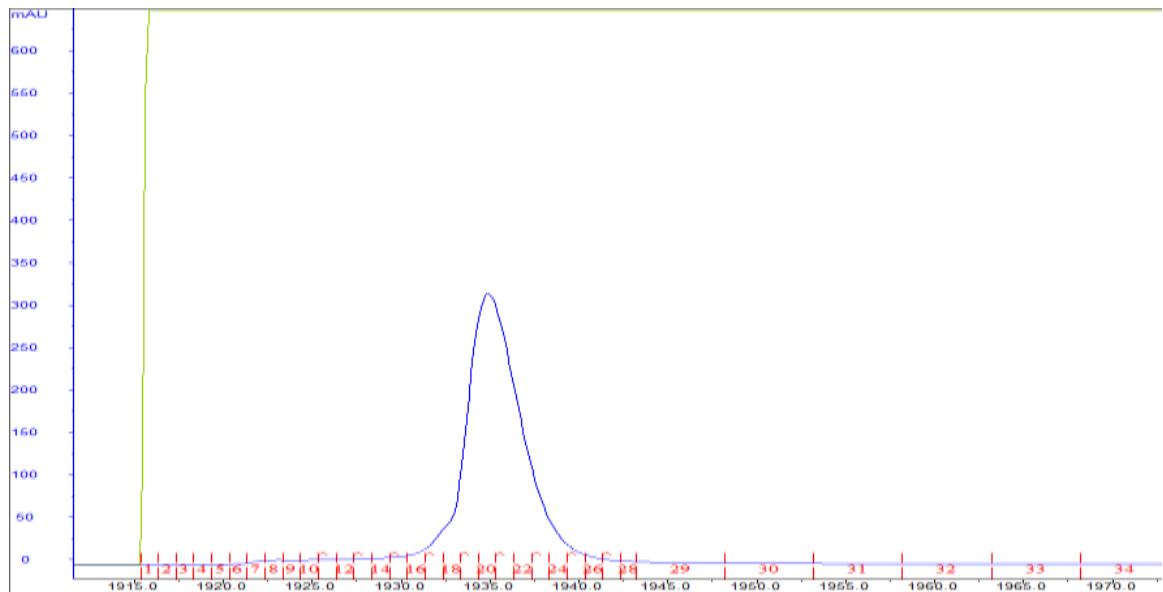
Συλλέχθηκαν 5 κλάσματα (48-52) συνολικού όγκου 5ml, τα οποία εμφάνισαν μέγιστη τιμή απορρόφησης σε μήκος κύματος 280nm σε συγκέντρωση 45% v/v του διαλύματος έκλουσης B. Η ποσότητα της πρωτεΐνης που ανακτήθηκε από τη στήλη Resource RPC, υπολογίζεται μέσω του τύπου

$\epsilon=0,83\text{mg/ml}\times\text{cm}$ και $b=1\text{cm}$, ότι είναι 0.26mg πρωτεΐνης. Η τελική απόδοση της πρωτεΐνης υπολογίζεται στα $0.26\text{mg}/4\text{Lt}$ καλλιέργειας.

3.1.2 Αποτελέσματα απομόνωσης Met(-1)-Ang

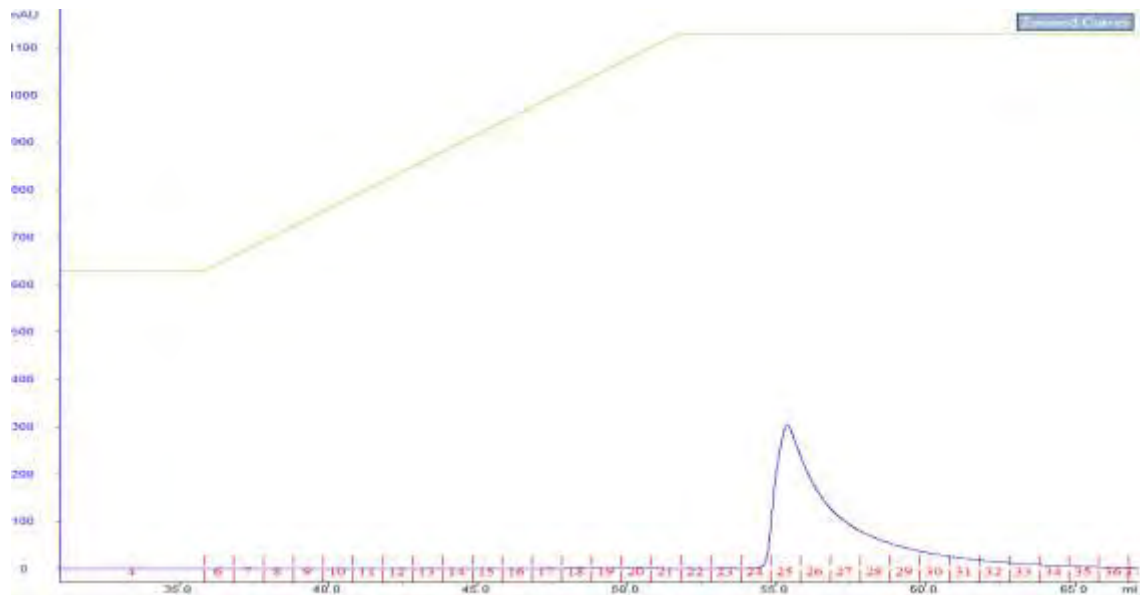
- Αποτελέσματα καθαρισμού από τη στήλη SPFF 16/10 και τη στήλη Resource RPC

Μετά την κλωνοποίηση της Ang σε νέο φορέα χρησιμοποιήθηκαν για τον καθαρισμό της οι στήλες SPFF 16/10 κατιοντοανταλλακτική και Resource RPC αντίστροφης φάσης, οι οποίες απαιτούσαν για εξισορρόπησή τους και έκλουση τις πρωτεΐνης τα διαλύματα που αναφέρθηκαν παραπάνω. Στις **Εικόνες 4** και **5** που παρουσιάζονται οι διαδικασίες καθαρισμού της Ang από τις δύο στήλες. Η μπλε γραμμή, και στις δύο εικόνες, αντιπροσωπεύει τις τιμές απορρόφησης πρωτεϊνών σε μήκος κύματος 280nm ενώ η πράσινη γραμμή αντιπροσωπεύει τη συγκέντρωση του διαλύματος έκλουσης (B). Στην πρώτη στήλη (**Εικόνα 4**) η συγκέντρωση του διαλύματος έκλουσης (B) είναι 100% ενώ στην δεύτερη στήλη (**Εικόνα 5**) το διάλυμα έκλουσης (B) χρησιμοποιείται αρχικά για την εξισορρόπηση της στήλης σε συγκέντρωση 5% v/v, έπειτα για έκπλυσή της σε συγκέντρωση 25% v/v και τέλος για την έκλουση της πρωτεΐνης με διαβάθμιση συγκέντρωσης από 25% v/v έως 45% v/v για 16min.



Εικόνα 4. Αποτελέσματα καθαρισμού ANG έπειτα από τη στήλη SPFF 16/10. Μπλε γραμμή: τιμές απορρόφησης πρωτεϊνών στα 280nm. Πράσινη γραμμή: Συγκέντρωση του διαλύματος έκλουσης (B).

Συλλέχθηκαν 7 κλάσματα 17-23 συνολικού όγκου 7ml, τα οποία εμφάνισαν μέγιστη τιμή απορρόφησης σε μήκος κύματος 280nm σε συγκέντρωση 100% του διαλύματος έκλουσης (B). Η ποσότητα της πρωτεΐνης που ανακτήθηκε από τη στήλη SPFF 16/10, υπολογίζεται μέσω του τύπου $\epsilon=0,83\text{mg/ml}\cdot\text{cm}$ και $b=1\text{cm}$, ότι είναι 3.5mg πρωτεΐνης. Τα κλάσματα συλλέχθηκαν, ενώθηκαν και ακολούθησε ο δεύτερος καθαρισμός τους.

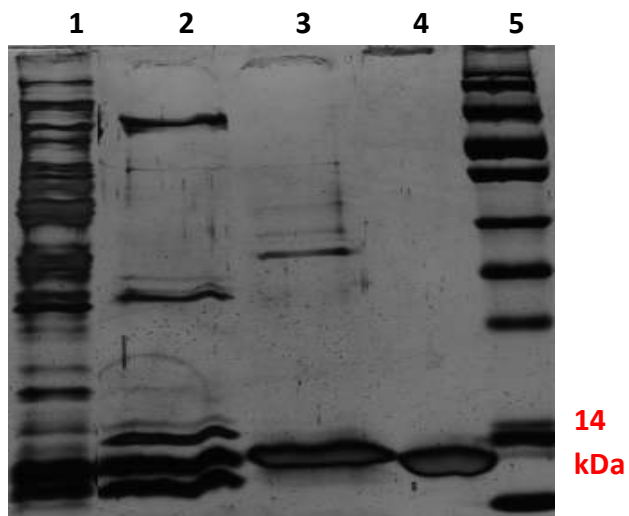


Εικόνα 5. Αποτελέσματα καθαρισμού ANG έπειτα από τη στήλη Resource RPC. Μπλε γραμμή: τιμές απορρόφησης πρωτεϊνών στα 280nm. Πράσινη γραμμή: Συγκέντρωση του διαλύματος έκλουσης (B) 5% v/v για εξισορρόπηση, 25% v/v για έκπλυση και 25-45% v/v για έκλουση πρωτεΐνης.

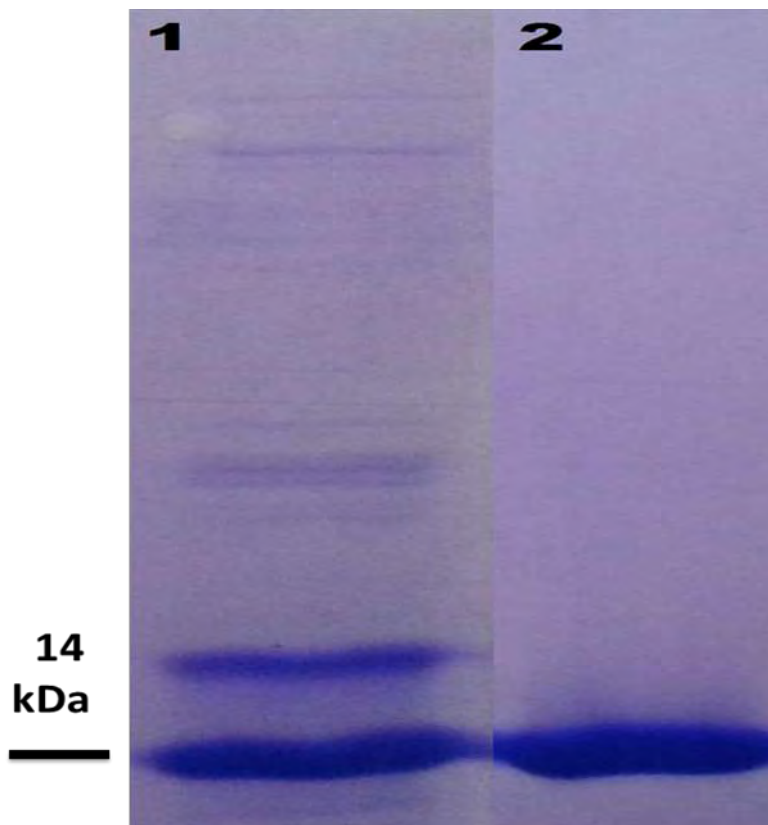
Συλλέχθηκαν 4 κλάσματα (24-27) συνολικού όγκου 4ml, τα οποία εμφάνισαν μέγιστη τιμή απορρόφησης σε μήκος κύματος 280nm σε συγκέντρωση 45% v/v του διαλύματος έκλουσης (B). Η ποσότητα της πρωτεΐνης που ανακτήθηκε από τη στήλη Resource RPC, υπολογίζεται μέσω του τύπου $\epsilon=0,83\text{mg/ml}\cdot\text{cm}$ και $b=1\text{cm}$, ότι είναι 2.43mg πρωτεΐνης. Άρα η τελική απόδοση της Ang υπολογίζεται πως είναι 4.86mg σε 1Lt βακτηριακής καλλιέργειας.

3.2 Ηλεκτροφόρηση κλασμάτων

Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμιδίου παρουσία SDS στα 120V και στη συνέχεια, ακολούθησε χρώση της πηκτής αυτής με χρωστική Coomassie Blue R-250. Στην **Εικόνα 6** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της απομόνωσης της pyro-Glu Ang ενώ στην **Εικόνα 7**, της απομόνωσης της Met(-1)-Ang.



Εικόνα 6. Πηκτική ηλεκτροφόρησης της *pyro-GluAng*. 1: ολικό δείγμα πρωτεϊνών, 2: δείγμα μετά από πρώτη στήλη, 3: δείγμα μετά τη δεύτερη στήλη, 4: δείγμα μετά την τρίτη στήλη, 5: μάρτυρας.



Εικόνα 7. Πηκτική ηλεκτροφόρησης της *Met(-I)-Ang*. 1: Δείγμα μετά την πρώτη στήλη, 2: Δείγμα μετά τη δεύτερη στήλη.

3.3 Αποτελέσματα Κρυσταλλώσεων

Κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας κρυστάλλωσης της Αηγυπήρξαν συνθήκες οι οποίες δεν οδήγησαν σε δημιουργία κρυστάλλων και άλλες που φάνηκαν να είναι ευνοϊκές για την ανάπτυξη κρυστάλλων. Οι κρύσταλλοι λαμβάνονται σε θερμοκρασία 16°C. Η μορφολογία των κρυστάλλων που προκύπτουν από τις διαφορετικές συνθήκες ποικίλλει.

Τα αναλυτικά αποτελέσματα της κάθε συνθήκης που ήταν θετική στη δημιουργία κρυστάλλων δίνονται παρακάτω.

3.3.1 Μέθοδος κρεμάμενης σταγόνας

Χαρακτηριστικά πειράματος: Ίση ποσότητα πρωτεϊνικού διαλύματος (Αηγ διαλυμένη σε υπερκάθαρο νερό) συγκέντρωσης 1.4mM αναμεμιγμένη με ίση ποσότητα διαλύματος εξισορρόπησης τοποθετείται στο μέσο μίας υδρόφοβης καλυπτρίδας, η οποία τοποθετείται πάνω από 700μl διαλύματος εξισορρόπησης. Η αναλογία της πρωτεΐνης και του διαλύματος εξισορρόπησης στη μέθοδο αυτή είναι 1:1, σε σταγόνα όγκου 3μl. Η επιθυμητή συγκέντρωση της πρωτεΐνης στη σταγόνα είναι 10mg/ml και η διαδικασία γίνεται στους 16°C.

Στο συγκεκριμένο στάδιο οι συνθήκες κρυστάλλωσης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι παρακάτω:

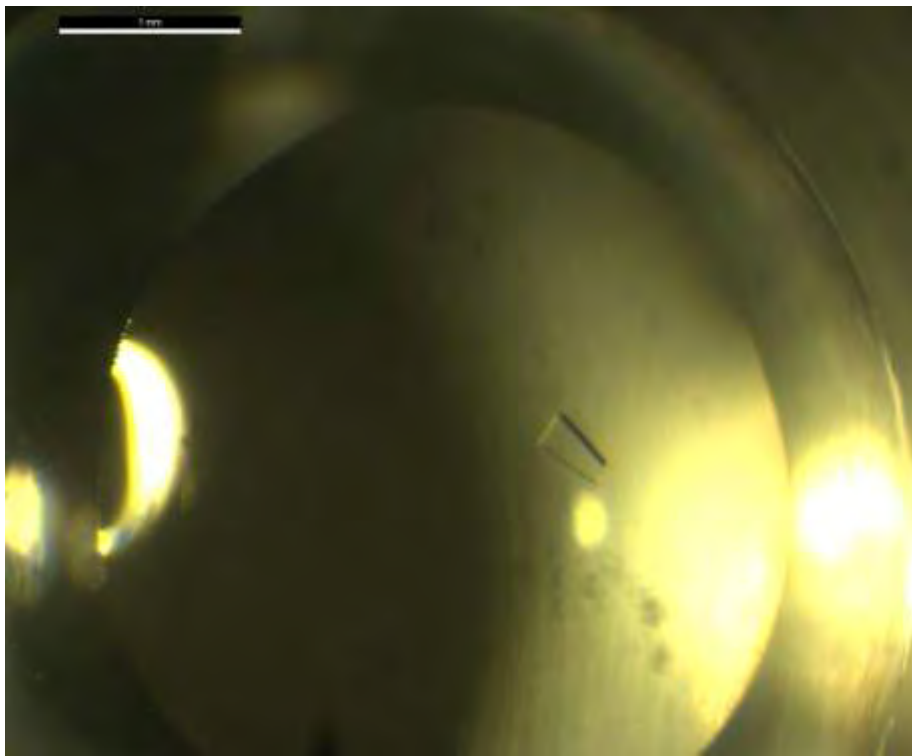
- Συνθήκη (Α): 20mM κιτρικό νάτριο pH 5.2
0.2M τρυγικό καλιονάτριο
10% PEG 6000
- Συνθήκη (Β): 20mM κιτρικό νάτριο pH 5.2
0.2M τρυγικό καλιονάτριο
12% PEG 6000
- Συνθήκη (Γ): 20mM κιτρικό νάτριο pH 5.2
0.2M τρυγικό καλιονάτριο
15% PEG 6000
- Συνθήκη (Δ): 20mM κιτρικό νάτριο pH 5.2

0.2M τρυγικό καλιονάτριο

18% PEG 6000

- Συνθήκη (E): 150mM μηλικό οξύ pH 7.0
20% PEG 3350

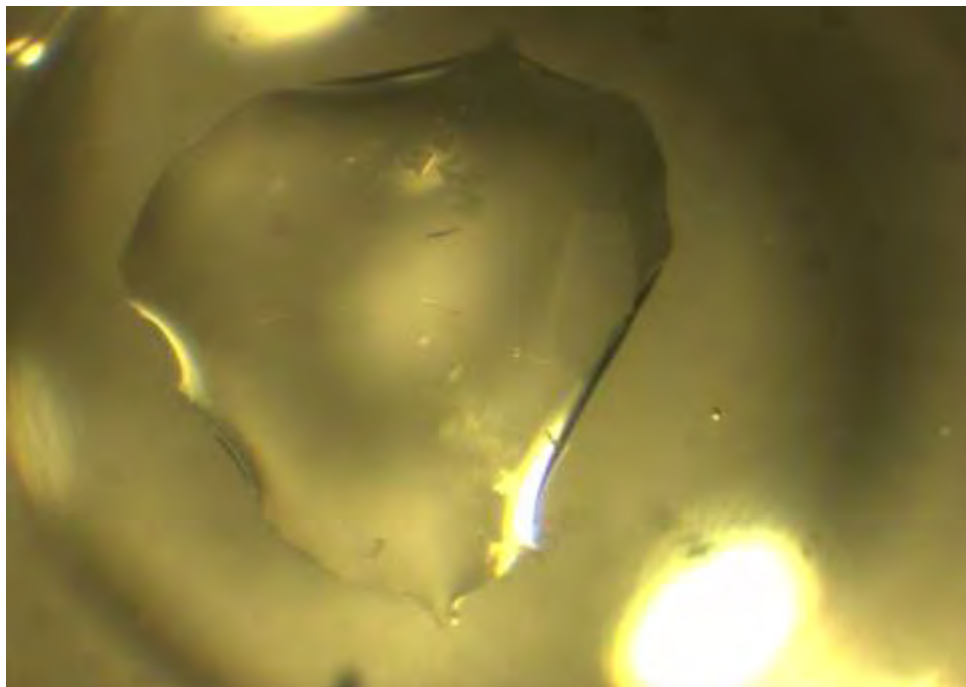
Αποτέλεσμα: Από τη συνθήκη (A) παράχθηκε κρύσταλλος μικρού μεγέθους που πιθανόν να οφείλεται στον κατακρημνιστικό παράγοντα 10% PEG 6000. Ο κρύσταλλος που δημιουργήθηκε φαίνεται στην **Εικόνα 8**.



Εικόνα 8. Κρύσταλλος που δημιουργήθηκε στη συνθήκη 20mM κιτρικό νάτριο pH 5.2, 0.2M τρυγικό καλιονάτριο, 10% PEG 6000.

Οι υπόλοιπες Β, Γ, Δ συνθήκες έδωσαν κρυστάλλους Ang, ωστόσο το μέγεθός τους ήταν πολύ μικρό. Κοινό χαρακτηριστικό όλων των παραπάνω συνθηκών ήταν η παρουσία μεγάλης ποσότητας ιζήματος, γεγονός που χαρακτηρίζεται ως ανασταλτικός παράγοντας για την ανάπτυξη κρυστάλλων εφόσον η πρωτεΐνη λόγω της μεγάλης συγκέντρωσης κατακρημνιστικού παράγοντα καθιζάνει.

Στη συνθήκη (E), παρά τον ικανοποιητικό αριθμό κρυστάλλων, οι κρύσταλλοι είναι ιδιαίτερα εύθραυστοι και για το λόγο αυτό η συνθήκη δεν μπορεί να θεωρηθεί ιδανική. Οι κρύσταλλοι που δημιουργήθηκαν παρουσιάζονται στην **Εικόνα 9**.



Εικόνα 9. Κρύσταλλοι που παρατηρήθηκαν στη συνθήκη 150mM μηλικό οξύ pH 7.0, 20% PEG 3350.

3.3.2 Μέθοδος καθήμενης σταγόνας

Σε δεύτερο στάδιο κρίθηκε απαραίτητο να ελεγχθεί η πιθανότητα κρυστάλλωσης της Ang μεταβάλλοντας το pH και τα άλατα. Η τεχνική που εφαρμόστηκε ήταν αυτή της καθήμενης σταγόνας (sitting drop) με τη χρήση της συσκευής του ρομπότ OryxNano.

Χαρακτηριστικά πειράματος: Δημιουργήθηκαν 36 συνθήκες κρυστάλλωσης, όπου η αναλογία ήταν 2:1, δηλαδή 66,6% Ang (από πυκνό διάλυμα πρωτεΐνης 1.4mM) και 33,3% διάλυμα εξισορρόπησης και ο όγκος της

σταγόνας 0,4μl. Οι συνθήκες κρυστάλλωσης που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον **Πίνακα 1**.

Πίνακας 1. Συνθήκες κρυσταλλώσεων.

ΜΗΤΡΕΣ ΚΡΥΣΤΑΛΛΩΣΗΣ	ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ	ΆΛΑΣ
A1	0.1M οξικό νάτριο pH 4.6	0.5M θειικό αμμώνιο
A2	0.1M οξικό νάτριο pH 4.6	0.8M θειικό αμμώνιο
A3	0.1M οξικό νάτριο pH 4.6	1M θειικό αμμώνιο
A4	0.1M οξικό νάτριο pH 4.6	1.2M θειικό αμμώνιο
A5	0.1M οξικό νάτριο pH 4.6	1.6M θειικό αμμώνιο
A6	0.1M οξικό νάτριο pH 4.6	2M θειικό αμμώνιο
A7	0.1M οξικό νάτριο pH 4.6	1M χλωριούχο νάτριο
A8	0.1M οξικό νάτριο pH 4.6	1.2M χλωριούχο νάτριο
A9	0.1M οξικό νάτριο pH 4.6	1.5M χλωριούχο νάτριο
A10	0.1M οξικό νάτριο pH 4.6	1.8M χλωριούχο νάτριο
A11	0.1M οξικό νάτριο pH 4.6	2.2M χλωριούχο νάτριο
A12	0.1M οξικό νάτριο pH 4.6	2.5M χλωριούχο νάτριο
B1	0.1M κιτρικό νάτριο pH 5.2	0.5M θειικό αμμώνιο
B2	0.1M κιτρικό νάτριο pH 5.2	0.8M θειικό αμμώνιο
B3	0.1M κιτρικό νάτριο pH 5.2	1M θειικό αμμώνιο
B4	0.1M κιτρικό νάτριο pH 5.2	1.2M θειικό αμμώνιο
B5	0.1M κιτρικό νάτριο pH 5.2	1.6M θειικό αμμώνιο
B6	0.1M κιτρικό νάτριο pH 5.2	2M θειικό αμμώνιο
B7	0.1M κιτρικό νάτριο pH 5.2	1M χλωριούχο νάτριο
B8	0.1M κιτρικό νάτριο pH 5.2	1.2M χλωριούχο νάτριο
B9	0.1M κιτρικό νάτριο pH 5.2	1.5M χλωριούχο νάτριο
B10	0.1M κιτρικό νάτριο pH 5.2	1.8M χλωριούχο νάτριο
B11	0.1M κιτρικό νάτριο pH 5.2	2.2M χλωριούχο νάτριο
B12	0.1M κιτρικό νάτριο pH 5.2	2.5M χλωριούχο νάτριο
C1	0.1M κακοδυλικό νάτριο pH 6.0	0.5M θειικό αμμώνιο

C2	0.1M κακοδυλικό νάτριο pH 6.0	0.8M θειικό αμμώνιο
C3	0.1M κακοδυλικό νάτριο pH 6.0	1M θειικό αμμώνιο
C4	0.1M κακοδυλικό νάτριο pH 6.0	1.2M θειικό αμμώνιο
C5	0.1M κακοδυλικό νάτριο pH 6.0	1.6M θειικό αμμώνιο
C6	0.1M κακοδυλικό νάτριο pH 6.0	2M θειικό αμμώνιο
C7	0.1M κακοδυλικό νάτριο pH 6.0	1M χλωριούχο νάτριο
C8	0.1M κακοδυλικό νάτριο pH 6.0	1.2M χλωριούχο νάτριο
C9	0.1M κακοδυλικό νάτριο pH 6.0	1.5M χλωριούχο νάτριο
C10	0.1M κακοδυλικό νάτριο pH 6.0	1.8M χλωριούχο νάτριο
C11	0.1M κακοδυλικό νάτριο pH 6.0	2.2M χλωριούχο νάτριο
C12	0.1M κακοδυλικό νάτριο pH 6.0	2.5M χλωριούχο νάτριο

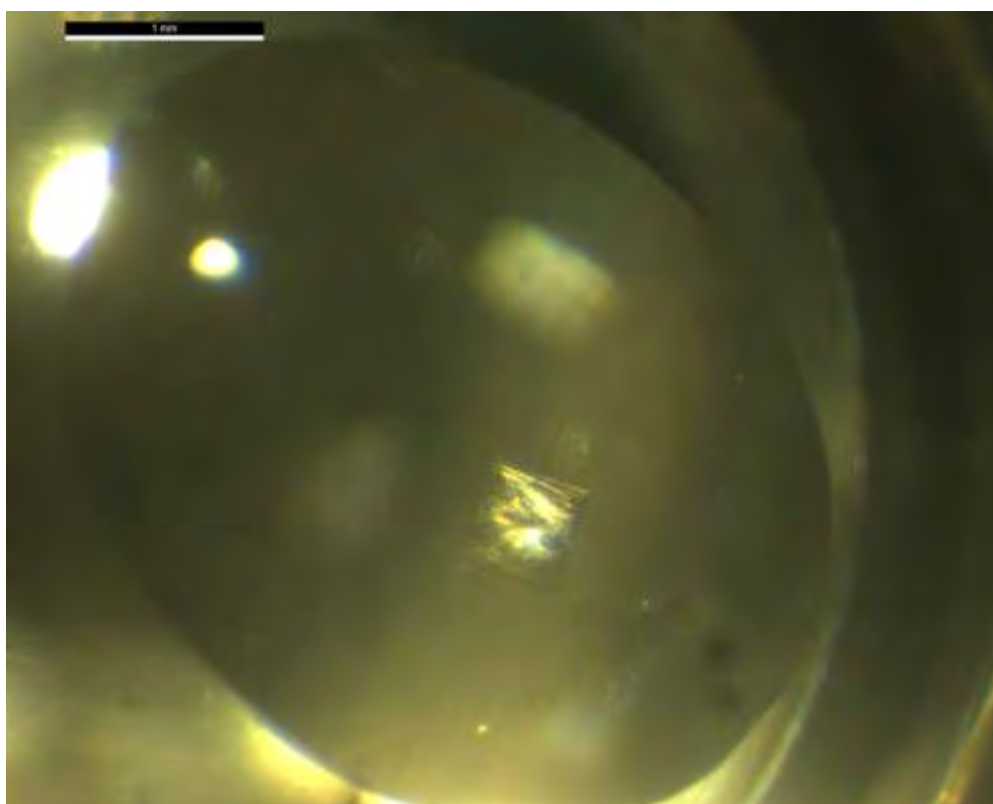
Αποτελέσματα πειράματος: Έπειτα από παρατήρηση των κρυσταλλώσεων μετά από 24 ώρες θετικό αποτέλεσμα έδωσαν οι συνθήκες 0.1M κιτρικό νάτριο pH 5.2, 2M θειικό αμμώνιο και 0.1M κακοδυλικό νάτριο pH 6.0, 2M θειικό αμμώνιο. Οι κρύσταλλοι που εμφανίστηκαν στις συγκεκριμένες συνθήκες παρουσίασαν μία μικρή ανάπτυξη του μεγέθους τους μετά από παρατήρηση στις 48 και 72 ώρες.

- Συνθήκη (B6): 0.1M κιτρικό νάτριο pH 5.2
2M θειικό αμμώνιο

Από τη δεδομένη συνθήκη κρυστάλλωσης το αποτέλεσμα ήταν η εμφάνιση ευδιάκριτων κρυστάλλων που διέθεταν καλή μορφολογία.

- Συνθήκη (C6): 0.1M κακοδυλικό νάτριο pH 6.0
2M θειικό αμμώνιο

Οι κρύσταλλοι που παρατηρήθηκαν στη συγκεκριμένη συνθήκη παρουσιάζονται παρακάτω στην **Εικόνα 10**.



Εικόνα 10. Κρύσταλλοι που δημιουργήθηκαν στη συνθήκη 0.1M κακοδυλικό νάτριο pH 6.0, 2M θειικό αμμώνιο.

3.4 Συγκρυστάλλωση ANG με αναστολείς

Έπειτα από μία σειρά κρυσταλλώσεων που πραγματοποιήθηκαν για τη φυσιολογική αγγειογενίνη, ακολούθησε μία προσπάθεια συγκρυστάλλωσής της με αναστολείς. Στη δεδομένη πειραματική μελέτη, έγινε έλεγχος με ανάλογα

αδενοσίνης για πιθανή πρόσδεσή τους στην αγγειογενίνη. Μελετήθηκαν οι εξής αναστολείς της Ang:

- Ο αναστολέας 5' τριφωσφορική αδενοσίνη (5'-ATP), ο οποίος έχει $K_i=0,8\text{mM}$ (σταθερά αναστολής για την αγγειογενίνη)
- Ο αναστολέας 5' διφωσφορική αδενοσίνη (5'-ADP), ο οποίος έχει $K_i=1,2\text{mM}$
- Ο αναστολέας NADPH, ο οποίος έχει $K_i=160\mu\text{M}$ (KapilKumaret al., 2002)

Αναστολείς 5'-ATP, 5'-ADP

Χαρακτηριστικά πειράματος: οι δοκιμές κρυστάλλωσης της αγγειογενίνης σε συνδυασμό με τους δύο αναστολείς έγιναν με τη μέθοδο της καθήμενης σταγόνας με τη χρήση του μηχανήματος ρομπότ OryxNano, με αναλογία 2:1 (66,6% σύμπλοκο πρωτεΐνης/αναστολέα και 33,3% διάλυμα εξισορρόπησης), σε σταγόνα όγκου 0,4μl. Ως διάλυμα εξισορρόπησης στο δεδομένο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν 96 τυποποιημένες συνθήκες (Crystallization Screen, Structure Screen I&II HT-96, Molecular Dimensions), οι οποίες διαθέτουν το ρυθμιστικό διάλυμα σε συγκεκριμένο pH, το άλας και τον κατακρημνιστικό παράγοντα, τα οποία δίνονται σε αναλυτικούς πίνακες από τη συγκεκριμένη εταιρεία.

Για τον αναστολέα 5'-ATP το αρχικό πυκνό διάλυμα που δημιουργήθηκε αποτελούνταν από αναστολέα συγκέντρωσης 4mM και Ang συγκέντρωσης 0.63mM με διαλύτη υπερκάθαρο νερό. Για τον αναστολέα 5'-ADP το αρχικό πυκνό διάλυμα που δημιουργήθηκε αποτελούνταν από αναστολέα συγκέντρωσης 6mM και Ang συγκέντρωσης 0.60mM με διαλύτη υπερκάθαρο νερό. Οι μελέτες των δύο αναστολέων είναι ανεξάρτητες μεταξύ τους.

Αποτέλεσμα:Θετικά αποτελέσματα εμφάνισαν οι εξής συνθήκες:

- Για τον αναστολέα 5'-ATP οι συνθήκες 0.1M κακοδυλικό νάτριο pH 6.5, 0.2M θειικό αμμώνιο, 30% w/v PEG 8000 η συνθήκη 0.1M όξινο νάτριο pH 4.6, 0.1M χλωριούχο κάδμιο, 30% v/v PEG 400 καθώς

και η συνθήκη 0.1M όξινο νάτριο pH 4.6, 0.2M θειικό αμμώνιο, 30% w/v PEG 2000 mme.

- Για τον αναστολέα 5'-ADP οι συνθήκες 0.1M κακοδυλικό νάτριο pH 6.5, 0.2M θειικό αμμώνιο, 30% w/v PEG 8000 καθώς και 0.1M Na Hesperes pH 7.5, 0.8M τρυγικό καλιονάτριο.

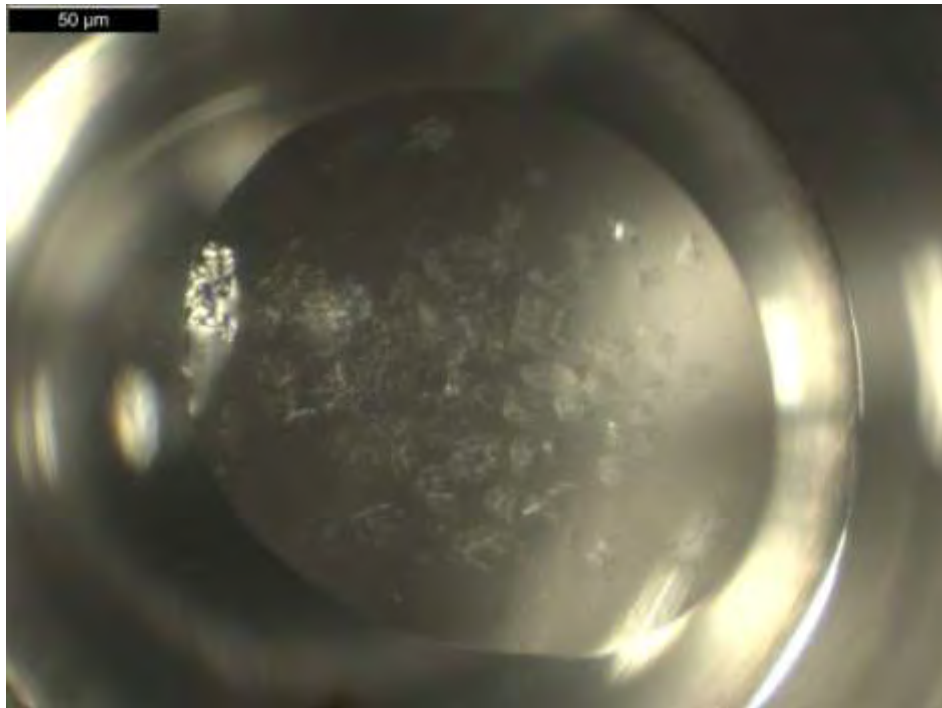
Χαρακτηριστικά πειράματος: Εν συνεχεία, μετά τα αποτελέσματα που λήφθηκαν από τη συγκρυστάλλωση των δύο αναστολέων με την πρωτεΐνη, θεωρήθηκε σκόπιμο να γίνει νέα κρυσταλλογραφική μελέτη των συνθηκών που έδωσαν θετικά αποτελέσματα από το σύνολο των 96 συνθηκών (**Πίνακας 2**) Έτσι, με τη χρήση της μεθόδου της καθημερινής σταγόνας χειροκίνητα έγινε κρυστάλλωση της αγγειογενίνης τόσο σε συνδυασμό με τον κάθε αναστολέα ξεχωριστά όσο και χωρίς. Η αναλογία ήταν 1:1 (αναστολέας+Ang):διάλυμα εξισορρόπησης σε σταγόνα όγκου 3μl. Για τη φυσιολογική Ang, χωρίς αναστολέα η αναλογία ήταν ίδια και το πυκνό διάλυμα της πρωτεΐνης ήταν 0.70mM.

Πίνακας 2. Συνθήκες συγκρυστάλλωσης Angπαρουσία ή απουσία αναστολέων.

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΚΡΥΣΤΑΛΛΩΣΗΣ	STRUCTURE SCREEN	ΆΛΑΣ	ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ	ΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ
Ang + 5'-ATP (2 σταγόνες κάθε συνθήκη)	B2: SS1-14	0.2M θειικό αμμώνιο	0.1M κακοδυλικό νάτριο pH 65	30% w/v PEG 8000
	H2: SS2-38	0.1M χλωριούχο κάδμιο	0.1M όξινο νάτριο pH 4.6	30% v/v PEG 400
	H3: SS2-39	0.2M θειικό αμμώνιο	0.1M όξινο νάτριο pH 4.6	30% w/v PEG 2000 mme
Ang + 5'-ADP(2 σταγόνες κάθε	B2: SS1-14	0.2M θειικό αμμώνιο	0.1M κακοδυλικό	30% w/v PEG 8000

συνθήκη)			νάτριο pH 6.5	
	C2: SS1-26	-	0.1M NaHepespH 7.5	0.8M καλιονάτριο τρογικό
Ang (2 σταγόνες κάθε συνθήκη)	B2: SS1-14	0.2M θειικό αμμώνιο	0.1M κακοδυλικό νάτριο pH 6.5	30% w/v PEG 8000
	C2: SS1-26	-	0.1M NaHepespH 7.5	0.8M καλιονάτριο τρογικό
	H2: SS2-38	0.1M χλωριούχο κάδμιο	0.1M όξινο νάτριο pH 4.6	30% v/v PEG 400
	H3: SS2-39	0.2M θειικό αμμώνιο	0.1M όξινο νάτριο pH 4.6	30% w/v PEG 2000

Αποτέλεσμα: Κρύσταλλοι παρατηρήθηκαν στη συνθήκη 0.1M κακοδυλικό νάτριο pH 6.50, 2M θειικό αμμώνιο, 30% w/v PEG 800 για το 5'-ADP και στη συνθήκη 0.1M όξινο νάτριο pH 4.6, 0.2M θειικό αμμώνιο και 30% w/v PEG 2000 mme για το 5'-ATP. Παρακάτω παρουσιάζονται στην **Εικόνα 11** οι κρύσταλλοι του 5'-ADP και στην **Εικόνα 12** οι κρύσταλλοι του 5'-ATP.



Εικόνα 11. Κρύσταλλοι που δημιουργήθηκαν στη συνθήκη 0.1M κακοδυλικό νάτριο pH 6.50, 2M θεικό αμμώνιο, 30% w/v PEG 800. Η σταγόνα της κρυστάλλωσης αποτελείται από Ang+5'-ADP.



Εικόνα 12. Κρύσταλλοι που δημιουργήθηκαν στη συνθήκη 0.1M όξινο νάτριο pH 4.6, 0.2M θεικό αμμώνιο και 30% w/v PEG 2000 mme. Η σταγόνα της κρυστάλλωσης περιέχει Ang+5'-ATP.


Αναστολέας NADPH

Χαρακτηριστικά πειράματος: Οι κρυσταλλογραφικές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν με τον αναστολέα NADPH ήταν εκτενέστερες. Αρχικά, υπολογίζεται ότι στο αρχικό πυκνό διάλυμα πρωτεΐνης /αναστολέα, η συγκέντρωση του αναστολέα πρέπει να είναι $5x[Ang]$, δηλαδή 5mM. Για την συγκρυστάλλωση με την αγγειογενίνη χρησιμοποιήθηκε αρχικά η συνθήκη 0.1M κακοδυλικό νάτριο pH 6.0, 2.2M θειικό αμμώνιο, η οποία εφαρμόστηκε χειροκίνητα με την τεχνική της καθημένης σταγόνας. Στη διαδικασία αυτή η αναλογία πρωτεΐνης:διαλύματος εξισορρόπησης ήταν 1:1, σε σταγόνα όγκου 3μl. Το αρχικό stock Ang/NADPH περιείχε τον αναστολέα NADPH σε συγκέντρωση 5mM και την Ang σε συγκέντρωση 0.9mM με διαλύτη υπερκάθαρο νερό.

Αποτελέσματα: Οι συνθήκες αυτές δεν έδωσαν θετικά αποτελέσματα. Για το λόγο αυτό κρίθηκε απαραίτητη η βελτιστοποίηση των συνθηκών με σκοπό την εύρεση των καταλληλότερων για την ανάπτυξη κρυστάλλων.

3.3.3 Ανάπτυξη νέων συνθηκών κρυστάλλωσης του συμπλόκου Ang/NADPH

Ακολούθησε βελτιστοποίηση των συνθηκών συγκρυστάλλωσης της πρωτεΐνης με τον NADPH, μεταβάλλοντας τόσο την τιμή του pH όσο και τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης στο σύμπλοκο με τον αναστολέα.

-  Χαρακτηριστικά πειράματος: Σε αυτό το στάδιο της βελτιστοποίησης κρίθηκε σκόπιμο να δοκιμαστεί μία διακύμανση στο pH. Για το σκοπό αυτό δημιουργήθηκαν συνθήκες για τιμές pH από 4.5 έως και 8.5 και σε κάθε αλλαγή του pH κατά μισή μονάδα μεταβάλλεται το ρυθμιστικό διάλυμα ενώ τα άλατα παραμένουν ίδια σε όλες τις τιμές pH. Στο συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν δύο συγκεντρώσεις άλατος: η συγκέντρωση 150mM που θεωρείται χαμηλή και βοηθά την πρωτεΐνη να μην καθιζάνει αλλά να διαλυτοποιηθεί και η συγκέντρωση 1.2M που


βοηθάει την πρωτεΐνη να κρυσταλλωθεί αφού συναγωνίζεται για τα μόρια του νερού.

Εφαρμόστηκαν 45 συνθήκες με τη χρήση του ρομπότ, σε αναλογίες 2:1 και 1:1 συμπλόκου Ang/NADPH:διαλύματος εξισορρόπησης, σε σταγόνα όγκου 0.4μl. Το αρχικό πυκνό διάλυμα Ang/NADPH που δημιουργήθηκε αποτελούνταν από NADPH συγκέντρωσης 5mM και Ang συγκέντρωσης 0.93mM. Στον **Πίνακα 3** παρουσιάζονται οι 45 συνθήκες κρυστάλλωσης της Ang με τον αναστολέα.

Πίνακας 3. Συνθήκες κρυστάλλωσης Ang-NADPH.

pH 4.5 pH 5	0.1M οξικό νάτριο
	0.1M οξικό νάτριο + 1.2M θειικό αμμώνιο
	0.1M οξικό νάτριο + 150mM θειικό αμμώνιο
	0.1M οξικό νάτριο + 10% PEG4000
	0.1M οξικό νάτριο + 10% PEG4000 + 150mM θειικό αμμώνιο
pH 5.5	0.1M κιτρικό νάτριο
	0.1M κιτρικό νάτριο + 1.2M θειικό αμμώνιο
	0.1M κιτρικό νάτριο + 150mM θειικό αμμώνιο
	0.1M κιτρικό νάτριο + 10% PEG4000
	0.1M κιτρικό νάτριο + 10% PEG4000 + 150mM θειικό αμμώνιο
pH 6 pH 6.5 pH 7	0.1M κακοδυλικό νάτριο
	0.1M κακοδυλικό νάτριο + 1.2M θειικό αμμώνιο
	0.1M κακοδυλικό νάτριο + 150mM θειικό αμμώνιο
	0.1M κακοδυλικό νάτριο + 10% PEG4000
	0.1M κακοδυλικό νάτριο + 10% PEG4000 + 150mM θειικό αμμώνιο
pH 7.5 pH 8 pH 8.5	0.1M Tris
	0.1M Tris + 1.2M θειικό αμμώνιο
	0.1M Tris + 150mM θειικό αμμώνιο
	0.1M Tris + 10% PEG4000
	0.1M Tris + 10% PEG4000 + 150mM θειικό αμμώνιο

Αποτελέσματα: Κατόπιν 48 ωρών έγινε παρατήρηση των συνθηκών κρυστάλλωσης, από τις οποίες εμφάνισαν κρυστάλλους οι εξής: 0.1M οξικό νάτριο pH 4.5 και η συνθήκη 0.1M κακοδυλικό νάτριο, pH 6 +150mM θειικό αμμώνιο σε αναλογία 2:1. Κρυστάλλους σε αναλογία 2:1 και 1:1 εμφάνισε η συνθήκη 0.1M κακοδυλικό νάτριο + 10% PEG4000 σε pH 4.5, 5 και 6.

 Χαρακτηριστικά πειράματος: Σε επόμενο στάδιο πραγματοποιήθηκε βελτιστοποίηση των συνθηκών κρυστάλλωσης με μία σειρά νέων συνθηκών που παρουσιάζονται στον **Πίνακα 4**. Η μέθοδος που εφαρμόστηκε ήταν αυτή της καθήμενης σταγόνας με τη χρήση του ρομπότ, σε αναλογία 2:1 σύμπλοκο Ang/NADPH:διάλυμα εξισορρόπησης, σε σταγόνα όγκου 0,4μl. Στο αρχικό πυκνό διάλυμα Ang/NADPH η συγκέντρωση του NADPH είναι 5mM ενώ της Ang είναι 0.68mM.

Πίνακας 4. Συνθήκες νέων συνθηκών κρυστάλλωσης.

A₁ pH 4.5	0.1M οξικό νάτριο
	2.4 M θειικό αμμώνιο
A₂ pH 5	0.1M οξικό νάτριο
	2.4 M θειικό αμμώνιο
A₃ pH 5.5	0.1M κιτρικό νάτριο
	2.4 M θειικό αμμώνιο
A₄ pH 6	0.1M κιτρικό νάτριο
	2.4 M θειικό αμμώνιο
A₅ pH 6	0.1M κακοδυλικό νάτριο
	2.4 M θειικό αμμώνιο
A₆ pH 6.5	0.1M κακοδυλικό νάτριο
	2.4 M θειικό αμμώνιο
A₇ pH 7	0.1M κακοδυλικό νάτριο
	2.4 M θειικό αμμώνιο

A₈pH 7.5	0.1MTris
	2.4 M θειικό αμμώνιο
A₉pH 8	0.1MTris
	2.4 M θειικό αμμώνιο
A₁₀pH 8.5	0.1MTris
	2.4 M θειικό αμμώνιο
B₁pH 4.5	0.1M οξικό νάτριο
	20 % PEG 4000
B₂pH 5	0.1M οξικό νάτριο
	20 % PEG 4000
B₃pH 5.5	0.1M κιτρικό νάτριο
	20 % PEG 4000
B₄pH 6	0.1M κιτρικό νάτριο
	20 % PEG 4000
B₅pH 6	0.1M κακοδυλικό νάτριο
	20 % PEG 4000
B₆pH 6.5	0.1M κακοδυλικό νάτριο
	20 % PEG 4000
B₇ pH 7	0.1M κακοδυλικό νάτριο
	20 % PEG 4000
B₈pH 7.5	0.1MTris
	20 % PEG 4000
B₉pH 8	0.1MTris
	20 % PEG 4000
B₁₀pH 8.5	0.1MTris
	20 % PEG 4000

Αποτελέσματα: Από τη συγκεκριμένη διαδικασία καλή ποιότητα και ποσότητα κρυστάλλων έδωσαν μετά από παρατήρηση στις 24 ώρες οι εξής συνθήκες:

- I. 0.1M κακοδυλικό νάτριο pH 6.5, 2.4M θειικό αμμώνιο
- II. 0.1M κακοδυλικό νάτριο pH 7, 2.4M θειικό αμμώνιο
- III. 0.1M Tris pH 7.5, 2.4M θειικό αμμώνιο

- IV. 0.1M Tris pH 8, 2.4M θειικό αμμώνιο
- V. 0.1M Tris pH 8.5, 2.4M θειικό αμμώνιο

Μετά το πέρας 72 ωρών παρουσιάστηκαν κρύσταλλοι και στη συνθήκη 0.1M κακοδυλικό νάτριο pH 6, 2.4M θειικό αμμώνιο.

Οι κρύσταλλοι αυτής της συνθήκης χρησιμοποιήθηκαν έπειτα με τη μέθοδο microseeding για τη βελτιστοποίηση των κρυστάλλων.

4.5 Πυρήνωση

Χαρακτηριστικά πειράματος: Μέσω της μεθόδου της πυρήνωσης οι κρύσταλλοι που λήφθηκαν από τη μέθοδο της καθήμενης σταγόνας στη συνθήκη 0.1M Tris pH 8, 2.4M θειικό αμμώνιο χρησιμοποιήθηκαν ως υπόστρωμα για την ανάπτυξη μεγαλύτερων κρυστάλλων Ang/NADPH. Η συνθήκη αυτή εφαρμόζεται μέσω της μεθόδου microseeding. Η τεχνική που εφαρμόστηκε ήταν αυτή της κρεμάμενης σταγόνας, κατά την οποία σε όγκο σταγόνας 3.5μl τοποθετείται πάνω σε κάθε καλυπτρίδα 1.5μl ANG/NADPH, 1.5μl διάλυμα εξισορρόπησης καθώς και 0.5μl seeding, δηλαδή θρυμματισμένοι κρύσταλλοι. Η σταγόνα αυτή αποτέλεσε την αρχική και στη συνέχεια ακολούθησαν έξι διαδοχικές αραιώσεις ξεκινώντας αρχικά από αναλογία 1:1. Στο αρχικό πυκνό διάλυμα της Ang με τον αναστολέα NADPH η συγκέντρωση της Ang είναι 1.21mM και του NADPH 5mM.

Αποτέλεσμα: Στο συγκεκριμένο πείραμα δεν υπήρχε δημιουργία κρυστάλλων παρά μόνο αρκετών φολίδων στην επιφάνεια της σταγόνας. Για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκε νέα βελτιστοποίηση που είχε ως βασικό χαρακτηριστικό την αντικατάσταση του άλατος.


- ✚ Χαρακτηριστικά πειράματος: Στις νέες συνθήκες κρυστάλλωσης που δημιουργήθηκαν με στόχο τη βελτιστοποίηση έγινε αντικατάσταση του άλατος θειικού αμμωνίου με το θειικό λίθιο. Η μέθοδος που εφαρμόστηκε ήταν αυτή της καθήμενης σταγόνας με τη χρήση του ρομπότ, σε αναλογία 2:1 (Ang/NADPH:διάλυμα εξισορρόπησης), σε

σταγόνα όγκου 0,4μl. Στο αρχικό πυκνό διάλυμα Ang/NADPH η συγκέντρωση του NADPH είναι 5mM ενώ της Ang 0.93mM. Στον **Πίνακα 5** παρουσιάζονται οι συνθήκες κρυστάλλωσης με το θειικό λίθιο.

Πίνακας 5. Συνθήκες κρυστάλλωσης Ang/NADPH με άλας θειικό λίθιο.

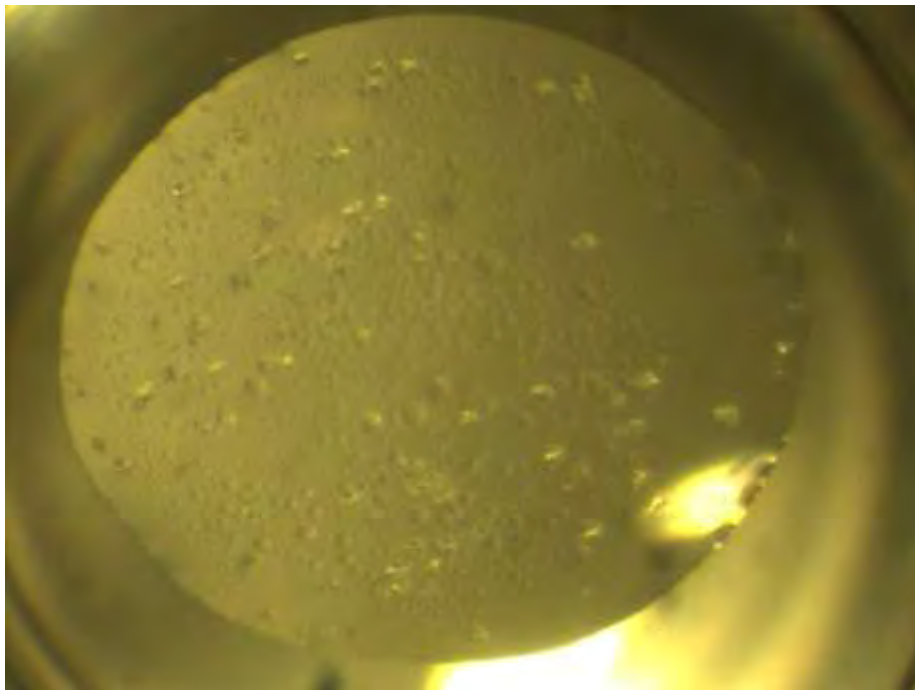
ΣΥΝΘΗΚΕΣ	pH 8
1 ^η	1.6M θειικό λίθιο
	0.1M Tris
2 ^η	1.8M θειικό λίθιο
	0.1M Tris
3 ^η	2M θειικό λίθιο
	0.1M Tris
4 ^η	2.2M θειικό λίθιο
	0.1M Tris
5 ^η	Control
	2.4M θειικό αμμώνιο

Αποτέλεσμα: Η αλλαγή του άλατος δεν φάνηκε ευνοϊκή για τη δημιουργία κρυστάλλων ή ιζήματος αλλά το μόνο αποτέλεσμα που ήταν χαρακτηριστικό στις συγκεκριμένες συνθήκες ήταν η εμφάνιση φολίδων.

 Χαρακτηριστικά πειράματος: Στο συγκεκριμένο στάδιο έγινε προσπάθεια συγκρυστάλλωσης της πρωτεΐνης με τον αναστολέα NADPH μετά από ρύθμιση του pH του συμπλόκου στην τιμή 7.0 ενώ τα συστατικά του διαλύματος εξισορρόπησης ήταν: 0.1M Tris, 2.4M θειικό αμμώνιο, η οποία ρυθμίστηκε σε διαφορετικές τιμές pH: 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5. Η συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία πραγματοποιήθηκε με την τεχνική της καθήμενης σταγόνας με τη βοήθεια του μηχανήματος ρομπότ. Δημιουργήθηκαν δύο συνθήκες με διαφορετική αναλογία:

αρχικά σε όγκο σταγόνας 0,4μl τοποθετήθηκε 100% ποσότητα φυσιολογικής πρωτεΐνης χωρίς διάλυμα εξισορρόπησης ενώ στη συνέχεια με την προσθήκη αναστολέα ρυθμίστηκε η αναλογία στο 2:1(Ang/NADPH:διάλυμα εξισορρόπησης). Στο αρχικό πυκνό διάλυμα Ang/NADPH η συγκέντρωση της Ang είναι 0.97mM ενώ του NADPH 5mM ενώ της φυσιολογικής Ang 1.08mM.

Αποτέλεσμα: Μετά την ρύθμιση της Ang με τον αναστολέα NADPH σε pH 7.0 τα αποτελέσματα που ελήφθησαν ήταν θετικά καθώς έπειτα από 48 ώρες εμφανίστηκαν κρύσταλλοι σε όλες τις τιμές pH όσων αφορά τη φυσιολογική Ang στη σταγόνα, με μεγάλα συσσωματώματα να εμφανίζονται για τις τιμές pH 9 και 9.5. Στις συνθήκες συγκρυστάλλωσης παρουσιάστηκαν κρύσταλλοι στις τιμές pH 8.0 και 8.5. Οι κρύσταλλοι που λήφθησαν είναι μικροί και αποτελούν συσσωματώματα, όπως φαίνονται στην **Εικόνα 13**.



Εικόνα 13. Κρύσταλλοι που παρουσιάστηκαν στη συνθήκη 0.1M Tris pH 8, 2.4M θειικό αμμώνιο που αποτελούνταν από Ang/NADPH.

✚ Χαρακτηριστικά πειράματος: Μετά το πείραμα που προαναφέρθηκε ακολούθησε βελτιστοποίηση για τις τιμές pH 8 και 8.5. Συγκεκριμένα, με τη μέθοδο της καθήμενης σταγόνας χειροκίνητα, δημιουργήθηκαν δύο συνθήκες κρυστάλλωσης για κάθε pH:

A) στην πρώτη διαδικασία η αναλογία Ang/NADPH:διάλυμα εξισορρόπησης είναι 2:1 σε σταγόνα όγκου 3μl. Στο αρχικό πυκνό διάλυμα του συμπλόκου η συγκέντρωση του αναστολέα είναι 5mM και της Ang είναι 0.72mM.

B) στη δεύτερη διαδικασία χρησιμοποιήθηκε η φυσιολογική πρωτεΐνη χωρίς αναστολέα σε αναλογία 1:1 και σταγόνα όγκου 3μl. Στο αρχικό πυκνό διάλυμα η συγκέντρωση της πρωτεΐνης είναι 1.08mM.

Αποτέλεσμα: Θετικά αποτελέσματα έδωσαν μόνο οι συνθήκες που περιείχαν τη φυσιολογική Ang.

✚ Οι κρύσταλλοι της φυσιολογικής Ang που λήφθηκαν από το προηγούμενο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν για τη διαδικασία της πυρήνωσης. Στο στάδιο αυτό το σύμπλοκο Ang/NADPH ρυθμίζεται σε pH 7 με την προσθήκη Tris acetate ρυθμισμένου στο pH 7. Η συγκέντρωση του αναστολέα στο πυκνό διάλυμα αυτό είναι 5mM και της Ang 0.65mM. Στο πείραμα αυτό, χρησιμοποιήθηκε η συνθήκη 0.1M Tris, 2.4M Θειικό αμμώνιο σε τιμές pH 8 και 8.5. Για κάθε pH δημιουργήθηκαν δύο συνθήκες κρυστάλλωσης: α) η αναλογία Ang/NADPH:διάλυμα εξισορρόπησης ήταν 2:1 και β) στην η αναλογία Ang/NADPH:διάλυμα εξισορρόπησης ήταν 1:1. Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της καθήμενης σταγόνας χειροκίνητα.

Αποτέλεσμα: Θετικά αποτελέσματα έδωσαν οι συνθήκες τόσο στο pH 8 όσο και στο 8.5, αλλά μόνο στην αναλογία 1:1 Ang/NADPH:διάλυμα εξισορρόπησης.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η αγγειογενίνη είναι μία πρωτεΐνη που ανήκει στην οικογένεια των ριβονουκλεασών και έχει αποτελέσει στόχο πολλών ερευνών καθώς έχει αποδειχθεί πως παίζει βασικό ρόλο στην επαγωγή της αγγειογένεσης.

Οι ερευνητικοί στόχοι που έχουν τεθεί σχετικά με την αγγειογενίνη είναι από τη μια, η εύρεση των κατάλληλων συνθηκών κρυστάλλωσης στην ανοιχτή/ ενεργό της μορφή, αφού δηλαδή γίνει μετατόπιση του καρβοξυτελικού της άκρου έτσι ώστε να μην προκαλείται πλέον η στερεοχημική παρεμπόδιση του ενεργού της κέντρου από το κατάλοιπο Gln117 και από την άλλη η συγκρυστάλλωσή της με ένα μόριο αναστολέα.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία έγινε προσπάθεια επίτευξης των συγκεκριμένων στόχων. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε αρχικά η απομόνωση της μορφής <Glu-1 της αγγειογενίνης από τον φορέα pANG3 σε διαλυτή μορφή και ακολούθησε ο χρωματογραφικός καθαρισμός της με δύο κατιοντοανταλλακτικές στήλες και μία στήλη αντίστροφης φάσης και η ποσότητα της πρωτεΐνης που ανακτήθηκε ήταν 0.26mg/4Lt βακτηριακής καλλιέργειας, ποσότητα μη επαρκής για την εφαρμογή κρυσταλλώσεων. Για το λόγο αυτό, ακολούθησε δεύτερη απομόνωση της Ang ύστερα από κλωνοποίηση του γονιδίου της σε νέο φορέα, τον pET-28A, από τον οποίο προέκυψε η μορφή Met(-1)-Angσε έγκλειστα σωματίδια. Ακολούθησε ο χρωματογραφικός καθαρισμός της με μία κατιοντοανταλλακτική στήλη και μία στήλη αντίστροφης φάσης και η ποσότητα που ανακτήθηκε ήταν 4.86mg για 1Lt βακτηριακής καλλιέργειας, επαρκής για να χρησιμοποιηθεί στη συνέχεια σε μία σειρά κρυσταλλώσεων.

Για την κρυστάλλωση της Ang δημιουργήθηκαν ποικίλλες συνθήκες, στις οποίες σε πρώτο στάδιο ελέγχθηκε η κρυστάλλωση της φυσιολογικής πρωτεΐνης ενώ σε μετέπειτα στάδιο εξετάστηκε η δυνατότητα συγκρυστάλλωσής της με τρεις αναστολείς ανάλογα αδενοσίνης. Οι αναστολείς που χρησιμοποιήθηκαν για τη συγκρυστάλλωση ήταν η 5' τριφωσφορική αδενοσίνη (5'-ATP), η 5' διφωσφορική αδενοσίνη (5'-ADP) καθώς και oNADPH.

Οι νέες αυτές συνθήκες κρυστάλλωσης που αφορούσαν την φυσιολογική Αη χωρίς αναστολέα έδωσαν στο μεγαλύτερο ποσοστό θετικά αποτελέσματα, δηλαδή κρυστάλλους καλής μορφολογίας. Το γεγονός αυτό αποτελεί θετικό σημάδι καθώς είναι πολύ πιθανό να έχει επιτευχθεί η κρυστάλλωσή της στην ανοιχτή της διαμόρφωση, δηλαδή χωρίς να παρεμποδίζεται το ενεργό της κέντρο.

Όσον αφορά τους αναστολείς που χρησιμοποιήθηκαν, συγκεκριμένα για τον 5'-ATP καθώς και τον 5'-ADP δημιουργήθηκαν αρκετές συνθήκες κρυστάλλωσης, κάποιες εκ των οποίων οδήγησαν στη δημιουργία κρυστάλλων. Για τον αναστολέα NADPH πραγματοποιήθηκε μία εκτενέστερη μελέτη καθώς οι αρχικές συνθήκες κρυστάλλωσης εμφάνισαν κρυστάλλους μικρού μεγέθους, γεγονός που μας ώθησε σε περαιτέρω έρευνα για βελτιστοποίηση των συνθηκών και απόκτηση μεγαλύτερου αριθμού και καλύτερης μορφολογίας. Ο στόχος αυτός επιτεύχθηκε καθώς σε αρκετά από τα πειράματα βελτιστοποίησης που ακολούθησαν οι κρύσταλλοι που προέκυψαν παρουσίαζαν καλύτερη μορφολογία.

Συμπερασματικά, ο βασικός στόχος που τέθηκε εξ αρχής για την παρούσα πειραματική μελέτη έγινε εφικτός σε ικανοποιητικό βαθμό καθώς πολλά από τα αποτελέσματα που λήφθηκαν από τα πειράματα των κρυσταλλώσεων ήταν θετικά και ελπιδοφόρα. Ωστόσο, οι έρευνες δεν σταματούν εδώ καθώς θα ακολουθήσουν μελέτες περίθλασης ακτίνων Χ, που πιθανόν να οδηγήσουν στην αποκάλυψη των δομικών χαρακτηριστικών που διέπουν την πρόσδεση μορίων αναστολέων στο καταλυτικό κέντρο της αγγειογενίνης, με σκοπό το σχεδιασμό με βάση τη δομή, μορίων αναστολέων.

Βιβλιογραφία

- 1) Acharya K.Ravi, Robert Shapiro, Simon C. Allen, James F. Riordan & Bert L. Vallee. "Crystal structure of human Angiogenin reveals the structural basis for its functional divergence from ribonuclease." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 91, pp. 2915-2919, April 1994. *Biochemistry*
- 2) Acharya K.R., Shapiro R., Riordan J.F. & Vallee B.L. (1995). "Crystal structure of bovine Angiogenin at 1.5 Å resolution." *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 92, 2949-2953.
- 3) Aravind L. and E.V. Koonin (2001). "A natural classification of ribonucleases." *Methods Enzymol* 341: 3-28.
- 4) Avey H.P., M.O. Boles et al (1967). "Structure of ribonuclease". *Nature* 213 (5076): 557-562.
- 5) Bianco C., E.Imperlini, R. Calogero, B.Senator, A.Amoresano, A.Carpentieri, P.Pucci, R.Defez, *Arch Microbiol* (2006) 185:373-382.
- 6) Blundell T.L., Elliott G., Gardner S.P., Hubbard T., Islam S., Johnson M., Mantafounis D., Murray-Rust P., Overington J., Pitts J.E. et al. "Protein engineering and design." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1989.
- 7) Borah B., Chen C.W., Egan W., Miler M., Wlodawer A.& Cohen J.S (1985). " Nuclear magnetic resonance and neutron diffraction studies of the complex of ribonuclease A with uridine vanadate , a transition state analogue." *Biochemistry*, 24, 2058-2067.
- 8) Chavali GB, Papageorgiou AC, Olson KA, Fett JW, Hu GF, Shapiro R, Acharya KR. "The crystal structure of human Angiogenin in complex with an antitumor neutralizing antibody." *Structure*. 2003 Jul 11(7):875-85.
- 9) Chang-Zheng Chen & Robert Shapiro. "Site-specific mutagenesis reveals differences in the structural bases for tight binding of RNase inhibitor to Angiogenin and RNase A." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* vol.94, pp, 1761-1766, March 1997. *Biochemistry*.
- 10)Curran TP, Shapiro R, Riordan JF & Vallee BL. "Modulation of the activity of Angiogenin by mutagenesis at Asp-116." *Biochim Biophys Acta* 1993; 1202:281-286.

- 11) Curran T.P., Shapiro R., Riordan J.F. & Vallee B.L. (1993b). "Modulation of the activity of Angiogenin by mutagenesis at Asp-116." *Biochim. Biophys. Acta*, 1202, 281-286.
- 12) D.D. Leonidas, Shapiro R, Irons LI, Russo N, Acharya KR. "Crystal structures of ribonuclease A complexes with 5'-diphosphoadenosine 3'-phosphate and 5'-diphosphoadenosine 2'-phosphate at 1.7 Å resolution." *Biochemistry*. 1997 May 6;36(18):5578-88.
- 13) D.D. Leonidas, Robert Shapiro, Simon C. Allen, Gowtham V. Subbarao, Kasinadar Veluraja & K. Ravi Acharya. "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.* (1999) 285, 1209-1233.
- 14) D.D. Leonidas, Boix E., Prill R., Suzuki M., Turton R, Minson K., Swaminathan GJ, Youle RJ, Acharya KR. "Mapping the ribonucleolytic active site of eosinophil-derived neurotoxin (EDN). High resolution crystal structures of EDN complexes with adenylic nucleotide inhibitors." *J. Biol Chem*. 2001a May 4;276(18):15009-17.
- 15) D.D. Leonidas, Chavali GB, Jardine AM, Li S, Shapiro R., Acharya KR. "Binding of phosphate and pyrophosphate ions at the active site of human Angiogenin as revealed by X-ray crystallography." *Protein Sci* 2001b Aug;10(8): 1669-76.
- 16) D.D. Leonidas, Chavali GB, Oikonomakos NG., Chrysina ED, Kosmopoulou MN, Vlassi M., Frankling C., Acharya KR. "High-resolution crystal structures of ribonuclease A complexed with adenylic and uridylic nucleotide inhibitors. Implications for structure-based design of ribonucleolytic inhibitors." *Protein Sci*. 2003 Nov;12(11):2559-74.
- 17) D.D. Leonidas, Gayatri B. Chavali, Nikos G. Oikonomakos, Evangelia D. Chrysina, Magda N. Kosmopoulou, Metaxia Vlassi, Claire Frankling & K. Ravi Acharya "High-resolution crystal structures of ribonuclease A complexed with adenylic and uridylic nucleotide inhibitors. Implications for structure-based design of ribonucleolytic inhibitors." *Protein Sci*. 2003 Nov;12(11):2559-74.

- 18) Emara M.M., Ivanov P., Hickman T., Dawra N., Tisdale S., Kedersha N., Hu GF & Anderson P.J. "Angiogenin-induced tRNA-derived stress-induced RNAs promote stress-induced stress granule assembly." *Biol Chem* 2010 Apr 2;285:10959-10968.
- 19) Fett J.W., Strydom D.J., Lobb R.R., et al. "Isolation and characterization of Angiogenin, an Angiogenic protein from human carcinoma cells." *Biochemistry* 1985;24:5480-6. [PubMed: 4074709]
- 20) Folkman, J. & Shing Y. "Angiogenesis." *The Journal of Biological Chemistry*, vol.267, No.16, Issue of June 5.p.p. 10931-10934, 1992, 1992 by The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc. Printed in U.S.A.
- 21) Greenway MJ, Andersen PM, Russ C, Ennis S, Cashman S, Donaghy C, Patterson V, Swingler R, Kieran D, Prehn J, Morrison KE, Green A, Acharya KR, Brown RH, Jr. and Hardiman O. "ANG mutations segregate with familial and 'sporadic' amyotrophic lateral sclerosis." *Nat Genet* 2006;38:411-413.
- 22) Greenblatt M., Shubik P. "Tumor Angiogenesis: trans filter diffusion studies by the transparent chamber technique." *J.Natl Cancer Inst.* 41: 111-124, 1968.
- 23) Hallahan TW, Shapiro R & Vallee BL. "Dual site model for the organogenic activity of Angiogenin." *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:2222-2226
- 24) Hallahan T.W., Shapiro R., Strydom D.J.& Vallee B.L. (1992). "Importance of asparagine-61 and asparagine-109 to the Angiogenic activity of Angiogenin." *Biochemistry*, 31, 12477-12485.
- 25) Harper J.W.& Vallee B.L. (1988). "Mutagenesis of aspartic acid-116 enhances the ribonucleolytic activity and Angiogenic potency of Angiogenin." *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 85, 7139-7142.
- 26) Harper J.W. & Vallee BL. (1989). "A covalent Angiogenin/ribonuclease hybrid with a fourth disulfide bond generated by regional mutagenesis." *Biochemistry*, 28, 1875-1884.
- 27) Holloway D.E., Hares M.C., Shapiro R., Subramanian & Acharya K.R. "High-level expression of three members of the murine Angiogenin

- family in *Escherichia coli* and purification of the recombinant proteins.” *Protein expression and purification* 22, 307-317 (2001).
- 28) Hu GF, Riordan JF, Vallee BL. “A putative Angiogenin receptor in Angiogenin-responsive human endothelial cells.” *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:2204-9. [PubMed: 9122172]
- 29) Hu GF, Riordan JF. “Angiogenin enhances actin acceleration of plasminogen activation.” *Biochem Biophys Res Commun* 1993;197:682-7. [PubMed: 8267604]
- 30) Ivanov P., Emara M.M, Villen J., Guqi SP, Anderson P. “Angiogenin-induced tRNA fragments inhibit translation initiation.” *Mol Cell*. 2011 Aug. 19;43(4):613-23.
- 31) Iwaquchi T. “Angiogenesis and its regulation.” *Gan To Kagaku Ryoko*. 1993 Jan;20(1):1-9.
- 32) KamZ., Shore HB., Feher G. “On the crystallization of proteins.” *J. Mol Biol*. 1978 Aug. 25;123(4):539-55.
- 33) Kao RY, Jenkins JL, Olson KA et al. “A small-molecule inhibitor of the ribonucleolytic activity of human Angiogenin that possesses antitumor activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:10066-71. [PubMed: 12118120]
- 34) Kapil Kumar, Jeremy L. Jenkins, Anwar M. Jardine and Robert Shapiro “Inhibition of mammalian ribonucleases by endogenous adenosine dinucleotides”. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 300 (2003) 81–86.
- 35) Kensal E. vanHolde (2010). *Βιοφυσική: αρχές φυσικής βιοχημείας. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Έμβρυο*.
- 36) Kieran D, Sebastia J, Greenway MJ, King MA, Connaughton D, Concannon CG, Fenner B, Hardiman O & Prehn JH. “Control of motoneuron survival of Angiogenin.” *J Neurosci* 2008;28:14056-14061
- 37) Kim HM, KAng DK, Kim HY, KAng SS & ChAng SI. “Angiogenin-induced protein kinase B/Akt activation is necessary for Angiogenesis but is independent of nuclear translocation of Angiogenin in HUVE cells.” *Biochem Biophys Res Commun* 2007;352:509-513

- 38) Kim W.C., Lee C.H. "The role of mammalian ribonucleases (RNases) in cancer." *vol 1796, issue 2, December 2009, Biochimica et Biophysica (BBA) – Reviews on cancer.*
- 39) Kumar K., Jenkins JL., Jardine AM., Shapiro R. "Inhibition of mammalian ribonucleases by endogenous adenosine dinucleotides." *BiochemBiophys Res Commun. 2003 Jan 3;300(1):81-6.*
- 40) Kunkel T.A. (1985) "Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection." *Proc. Natl. Sci. USA 82, 488-492*
- 41) Kurachi K., Davie E.W., Strydom D.J., Riordan J.F. & Vallee B.L. (1985). "Sequence of the cDNA and gene for Angiogenin, a human Angiogenesis factor." *Biochemistry, 24, 5494-5499.*
- 42) Ladner J.E., Wladkoski B.D., Svensson L.A., SJOLIN L. & Gilliland G.L. (1997). "X-ray structure of a ribonuclease A-uridine complex at 1.3 Å resolution." *Acta Crystallog. Sect. D, 53, 290-301.*
- 43) Leland P.A., L.W. Schultz et al (1998) "Ribonuclease A variants with potent cytotoxic activity." *Proc Natl Acad Sci USA 95(18) : 10407-10412, Biochemistry*
- 44) Lili Chen and Guo-fu Hu, "Angiogenin-mediated ribosomal RNA transcription as a molecular target for treatment of head and neck squamous cell carcinoma." *Oral Oncol. 2010 September; 46(9): 648-653.*
- 45) Lubert Stryer, Jeremy M. Berg, John L. Tymoczko. *Βιοχημεία. Τόμος Ι. Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης, 2009.*
- 46) McPherson A. (1999) "The effects of microgravity on protein crystallization: evidence for concentration gradients around growing crystals." *Journal of crystal growth. Vol. 196, Issues 2-4, pages 572-586.*
- 47) McMurry J. (2001). *Οργανική χημεία. Τόμοι Ι&ΙΙ, Έκδοση 2, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο.*
- 48) McPherson A. (2001) "A comparison of salts for the crystallization of macromolecules." *Protein Science vol. 10, issue 2, 418-422.*
- 49) McPherson A. (2004) "Introduction to protein crystallography." *Methods 34, 254-265.*
- 50) Mohan CG, Boix E, Evans HR, Nikolovski Z., Nogues MV., Cuchillo CM, Acharya KR. "The crystal structure of eosinophil cationic protein in

- complex with 2',5'-ADP at 2.0 Å resolution reveals the details of the ribonucleolytic active site." *Biochemistry*. 2002 Oct 8;41(40):12100-6.
- 51)Moroianu J.& Riordan J.F.(1994a). "Identification of the nucleolar targeting signal of human Angiogenin." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 203, 1765-1772.
- 52)Moroianu J.& Riordan J.F.(1994b). "Nuclear translocation of Angiogenin in proliferating endothelial cells is essential to its Angiogenic activity." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*,91, 1677-1681.
- 53)Olson K.A., Fett J.W., French T.C., Key M.E. &Vallee B.L. (1995). "Angiogenin antagonists prevent tumor growth in vivo." *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 92,442-446.
- 54)Papageorgiou A.C., Shapiro R., Acharya K.R. "Molecular recognition of human Angiogenin by placental ribonuclease inhibitor-an X-ray crystallographic study at 2.0 Å resolution." *EMBO J.* 1997 Sept. 1;16(17):5162-77.
- 55)Patan S. "Vasculogenesis and Angiogenesis." *Cancer Treat Res.* 2004;117:3-32.
- 56)Polakowski J, Lewis MK, Muthukkaruppan VR, Erdman B, Kubai L, Auerbach R. "A ribonuclease inhibitor expresses anti-Angiogenic properties and leads to reduced tumor growth in mice." *Am J. Pathol.* 1993 Aug;143(2):507-17.
- 57)Rayaprolu S, Alexandra Soto-Ortolaza, Ratemakers Rosa, Ryan S. Uitti, Zbigniew K., Wszolek, Owen A. Ross. "Angiogenin variation and Parkinson disease." *Ann Neurol* 2012 May; 71(5):725-725
- 58)Richards F.M & Wyckoff H.W.(1971). "Bovine pancreatic ribonuclease." *In The Enzymes*, vol. 4, pp. 647-806.
- 59)Richardson R.M., Pares X., Liorens R., Nogues M.V. &Cuchillo C.M. (1988). "Nucleotide binding and affinity labeling support the existence of the phosphate-binding subsite P2 in bovine pancreatic ribonuclease A." *Biochim. Biophys. Acta*,953, 70-78.
- 60) Riordan J.F. & Robert S. "Isolation and enzymatic activity of Angiogenin." *Methods in Molecular Biology*, vol.160: *Nuclease Methods and Protocols.* 2001;160:375-85.

- 61) Rosenberg H.F. "RNase A ribonucleases and host defense: an evolving story."(2008) *J.LeukocBiol* 83 (5): 1079-1087
- 62) Russo N., Shapiro R., Acharya KR., Riordan JF., Vallee BL. "Role of glutamine-117 in the ribonucleolytic activity of human Angiogenin." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994 April 12;91.
- 63) Russo N., Shapiro R., Acharya K.R., Riordan J.F. &Vallee B.L. " Crystal structure of bovine Angiogenin at 1.5- Å resolution." *Proc. Natl. Acad. Sci USA*.1995 Mar 28;92(7): 2949-53.
- 64) Russo N., Acharya K.R., Vallee B.L. & Shapiro R. (1996a) "A combined kinetic and modelling study of the catalytic center subsites of human Angiogenin." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 804-808.
- 65) Russo N., Nobile V., DiDonato A., Riordan J.F.&Vallee B.L. (1996b). "The C-terminal region of human Angiogenin has a dual role in enzymatic activity." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 3243-3247.
- 66)Russo N., Shapiro R., Vallee BL. "5'-Diphosphoadenosine 3'-phosphate is a potent inhibitor of bovine pancreatic ribonuclease A." *Biochem Biophys Res Commun*, 1997 Feb 24;231(3):671-4.
- 67)Russo N., Shapiro R. "Potent inhibition of mammalian ribonucleases by 3',5'-pyrophosphate-linked nucleotides." *J Biol Chem*. 1999 May 21;274(21):14902-8.
- 68) Russo A, Acharya KR, Shapiro R. "Small molecule inhibitors of RNase A and related enzymes." *Methods Enzymol*. 2001;341:629-48.
- 69)Rybak SM., Auld DS., St Clair DK., Yao QZ., Fett JW. "C-terminal Angiogenin peptides inhibit the biological and enzymatic activities of Angiogenin." *Bio ChemBiophys Res Commun*, 1989 Jul. 14;162(1):535-43.
- 70) Shapiro R., Riordan J.F. &Vallee B.L. (1986). "Characteristic ribonucleolytic activity of human Angiogenin." *Biochemistry*, 25, 3527-3532.
- 71)Shapiro R., Weremowicz S., Riordan J.F. &Vallee B.L. (1987). "Ribonucleolytic activity of Angiogenin-essential histidine, lysine and arginine residues." *ProcNatl Acad. Sci USA*, 84, 8783-8787.
- 72)Shapiro R., Harper J.W., Fox E.A, Jansen H.W., Hein F.&Uhlmann E. (1988a). "Expression of Met(-1) Angiogenin in Escherichia coli.-

- conversion to the authentic α-Glu-1 protein." *Anal. Biochem.* 175, 450-461.
- 73) Shapiro R, Fox EA & Riordan JF. "Role of lysines in human Angiogenin: chemical modification and site-directed mutagenesis." *Biochemistry* 1989;28:1726-1732.
- 74) Shapiro R. & Vallee BL. (1989). "Site-directed mutagenesis of histidine-13 and histidine-114 of human Angiogenin-alanine derivatives inhibit Angiogenin-induced Angiogenesis." *Biochemistry*, 28, 7401-7408.
- 75) Shapiro R. & Vallee B.L. (1992). "Identification of functional arginines in human Angiogenin by site-directed mutagenesis." *Biochemistry*, 31, 12477-12485.
- 76) Shapiro R. (1998). "Structural features that determine the enzymatic potency and specificity of human Angiogenin: Thr-80 and residues 58-70 and 116-123." *Biochemistry*, 37, 6847-6856.
- 77) Shuping Li, Guo-fu Hu. "Angiogenin-mediated rRNA transcription in cancer and neurodegeneration." *Int J BiochemMolBiol* 2010;1(1):26-35
- 78) Strydom D.J., Fett J.W., Lobb R.R, Alderman E.M., Bethune J.L., Riordan J.F. & Vallee B.L. "Amino acid sequence of human tumor derived Angiogenin." (1985) *Biochemistry* 24, 5486-5494.
- 79) Thiagarajan N., Acharya KR. "Crystal structure of human Angiogenin with an engineered loop exhibits conformational flexibility at the functional regions of the molecule." *FEBS Open Bio.* 2012 Dec 26:3:65-70.
- 80) Trautwein K.P., Holliger P., Stackhouse J. & Benner S.A. (1991). "Site – directed mutagenesis of bovine pancreatic ribonuclease. Lysine-41 and aspartate-121." *FEBS Letters*, 281, 275-277.
- 81) Tonan K., Xu P., Jenkins JLL., Russo A., Shapiro R., Ni F. "Unexpected binding mode for 2'-phosphoadenosine-based nucleotide inhibitors in complex with human Angiogenin revealed by heteronuclear NMR spectroscopy." *Biochemistry.* 2003 Sep 30;42(38):11137-49.
- 82) Ukita T., Waku K., Irie M., Hoshino O. "Research on pancreatic ribonuclease I. The inhibition of cyclic phosphor-diesterase activity of bovine pancreatic ribonuclease by several substrate analogues." *J. Biochem.* 1961 Nov; 50:405-15.

- 83) Van Es MA, Diekstra FP, Veldink JH, Baas F, Bourque PR, Schelhaas HJ, Strengman E, Hennekam EA, Lindhout D, Ophoff RA & van den Berg LH. "A case of ALS-FTD in a large FALS pedigree with a K171 ANG mutation." *Neurology* 2009; 72:287-288
- 84) Wai Ming Li, Tavish Barnes and Chow H.Lee. "Endoribonucleases-enzymes gaining spotlight in mRNA metabolism." *FEBS Journal*, vol 277, Issue 3, December 2009.
- 85) Yamasaki S, Ivanov P., Hu GF & Anderson P.J. "Angiogenin cleaves tRNA and promotes stress-induced translational repression." *Cell Biol* 2009;185:35-42.