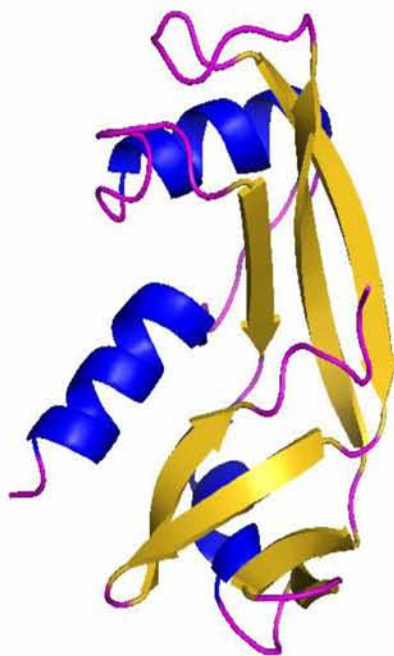




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ – ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ, ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ
ΔΕΙΚΤΕΣ»

Μελέτες ανοσοκατακρήμνισης της ανθρώπινης αγγειογενίνης

ΛΙΓΓΡΗ ΠΑΝΑΓΙΩΤΑ



ΛΑΡΙΣΑ 2015

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

❖ **Λεωνίδας Δημήτριος**, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας,
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, (επιβλέπων)

❖ **Μπαλατσός Νικόλαος**, Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα
Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

❖ **Σκαμνάκη Βασιλική**, Λέκτορας Βιοχημείας- Μεταβολισμού, Τμήματος
Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

*Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής
Βιοχημείας, του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου
Θεσσαλίας*

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους με βοήθησαν για την
διεκπεραίωση της παρούσας εργασίας. Την τριμελή επιτροπή και ιδιαίτερα τον
καθηγητή μου, κ. Δημήτρη Λεωνίδα για τις πολύτιμες συμβουλές καθώς και για
την ηθική και επιστημονική συμπαράστασή του καθ' όλη τη διάρκεια της

συνεργασίας μας. Επίσης, τον κ. Μπαλατσό για την καθοδήγηση στο θέμα των κυτταροκαλλιιεργειών. Ακόμα, την Δρ. Μαρτίνα Σαμιωτάκη από το Ινστιτούτο Αλέξανδρος Φλέμινγκ αλλά και την κ. Κοντού για την πολύ καλή συνεργασία μας στην ανάλυση με φασματομετρία μάζας.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στην υποψήφια διδάκτορα του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας και φίλη μου Δήμητρα Χατζηλεοντιάδου για την άψογη συνεργασία, για την επιστημονική καθοδήγηση και την ψυχολογική συμπαράσταση όλο αυτό το διάστημα. Χωρίς την καθοριστική βοήθειά της δεν θα μπορούσα να ολοκληρώσω την διεξαγωγή της εργασίας μου.

Επίσης, ευχαριστώ ιδιαίτερα τους γονείς μου για την δυνατότητα που μου παρείχαν να παρακολουθήσω το συγκεκριμένο μεταπτυχιακό πρόγραμμα. Επίσης τους φίλους μου και κυρίως τον Γεώργιο Στραβοδήμο. Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας για το ευχάριστο και φιλικό περιβάλλον.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	6
ABSTRACT	7
A.ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
1.ΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΑΣΕΣ	8
2.ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ	12
2.1 Μηχανισμοί νεοαγγειογένεσης	13
2.2 Μηχανισμός αγγειογένεσης	14
2.3 Στάδια αγγειογένεσης	16
2.4 Ρύθμιση της αγγειογένεσης	19
A. αγγειογενετικοί παράγοντες	19
B. Αντιαγγειογενετικοί παράγοντες	21

3. ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΙΝΗ	22
3.1 Εισαγωγικά	22
3.2 Δομή της αγγειογενίνης	23
3.3 Δράση και Μηχανισμοί	24
4. ΚΡΥΣΤΑΛΛΩΣΕΙΣ	33
4.1 Φυσικοχημεία της κρυστάλλωσης	33
4.2 Συνθήκες για την κρυστάλλωση μακρομορίων	34
4.3 Παράγοντες που επηρεάζουν τη διαλυτότητα των πρωτεϊνών	37
4.4 Διαλύτης συγκρυστάλλωσης	39
B. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	40
Γ. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	41
1. Ανοσοκατακρήμνιση πρωτεϊνών	41
1. Ανακαλλιέργεια πρωτεϊνών	43
2. Λύση κυττάρων	46
3. Δημιουργία συμπλόκου σφαιριδίων αгарόξης με πρωτεΐνες A/G και μονοκλωνικού αντισώματος έναντι hAng	47
4. Προσθήκη ανασυνδυασμένης ανθρώπινης αγγειογενίνης σφαιριδίων αгарόξης με πρωτεΐνες A/G και μονοκλωνικού αντισώματος έναντι hAng	48
5. Επεξεργασία πρωτεϊνικού εκχυλίσματος κυττάρων	48
6. Προ-εκκαθάριση	49
7. Προσθήκη πρωτεϊνών στο σύμπλοκο ανασυνδυασμένη ανθρώπινη αγγειογενίνη(hAng)/Μονοκλωνικό Αντίσωμα έναντι αγγειογενίνης/σφαιρίδια αгарόξης με πρωτεΐνες A/G	50
8. Προετοιμασία δειγμάτων	50
9. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE)	51
10. Ανοσοαποτύπωση (Western blotting)	53
11. Χρώση με νιτρικό άργυρο	57
12. Φασματομετρία Μάζας (Mass Spectrometry)	58
2. Απομόνωση και καθαρισμός ανθρώπινης αγγειογενίνης (hANG).	61
i. Ανάπτυξη των E. coli BL21-Gold(DE3) βακτηριακών στελεχών που φέρουν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο (pET-Ang).	61
ii. Λύση βακτηριακών κυττάρων	63
iii. Χρωματογραφικός καθαρισμός της hANG με τη χρήση του συστήματος FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography).	64
iv. Κυκλοποίηση της Met (-1)- ANG στην pyro-Glu ανθρώπινη μορφή της	67
v. Διαπίδυση και συμπύκνωση κλασμάτων έκλουσης	68
4. ΚΡΥΣΤΑΛΛΩΣΗ Met (-1)- ANG	70
Δ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	78
1. Ανοσοκατακρήμνιση πρωτεϊνών	78

2. Απομόνωση και καθαρισμός της ανθρώπινης αγγειογενίνης (hANG). 84

3. Κρυστάλλωση της Met(-1)ANG. 87

Ε. ΣΥΖΗΤΗΣΗ 102

ΣΤ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 107

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ανθρώπινη αγγειογενίνη (hANG) αποτελεί έναν ισχυρό επαγωγέα της αγγειογένεσης και διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην ανάπτυξη και την μετάσταση των όγκων. Η hANG είναι ένα ιδανικό μόριο- στόχος που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανάπτυξη νέων αντι-αγγειογενετικών παραγόντων. Η ριβονουκλεολυτική δράση της αγγειογενίνης αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την επαγωγή της αγγειογένεσης. Ωστόσο, ο μηχανισμός με τον οποίο η hANG επάγει την αγγειογένεση καθώς και το πώς σχετίζεται η ενζυμική της δράση με την επαγωγή, δεν είναι γνωστά.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, διερευνήθηκε το ανοσοκατακρημνιστικό προφίλ της hANG, με στόχο την ταυτοποίηση των πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με την αγγειογενίνη μέσα στο κύτταρο. Παράλληλα, πραγματοποιήθηκαν κρυσταλλογραφικές μελέτες της Met(-1)Ang, σε μία προσπάθεια κρυστάλλωσής της στην ανοιχτή/ ενεργή της διαμόρφωση.

ABSTRACT

Human angiogenin (hANG) is a potent inducer of neovascularization and plays a major role in tumor growth and metastasis. hANG is a validated pharmaceutical target for the development of novel anti-angiogenic agents. The ribonucleolytic activity of hANG is an absolute prerequisite for its angiogenicity. However, the mechanism by which hANG induces angiogenesis and how this is related to its enzymatic activity is still unclear.

In this project we investigated the immunoprecipitation profile of hANG, with the aim to determine the proteins that interact with hANG within the cell.

Furthermore, crystallization screening trials were performed to crystallize Met(-1)Ang in its open/ active conformation.

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. ΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΑΣΕΣ

Οι ριβονουκλεάσες είναι μια οικογένεια ενζύμων, οι οποίες έχουν ως κύρια δράση την αποικοδόμηση του μη ωφέλιμου RNA των κυττάρων, διαδραματίζοντας παράλληλα σημαντικό ρόλο και στην ωρίμανση των μορίων RNA (D' Alessio *et al.*, 1991). Η αποικοδόμηση του RNA από τις ριβονουκλεάσες αποτελεί επίσης μηχανισμό άμυνας του οργανισμού έναντι σε RNA ιούς.

Με βάση τη θέση διάσπασης του RNA, οι ριβονουκλεάσες μπορούν να ταξινομηθούν σε δυο κατηγορίες: τις ενδοριβονουκλεάσες και τις

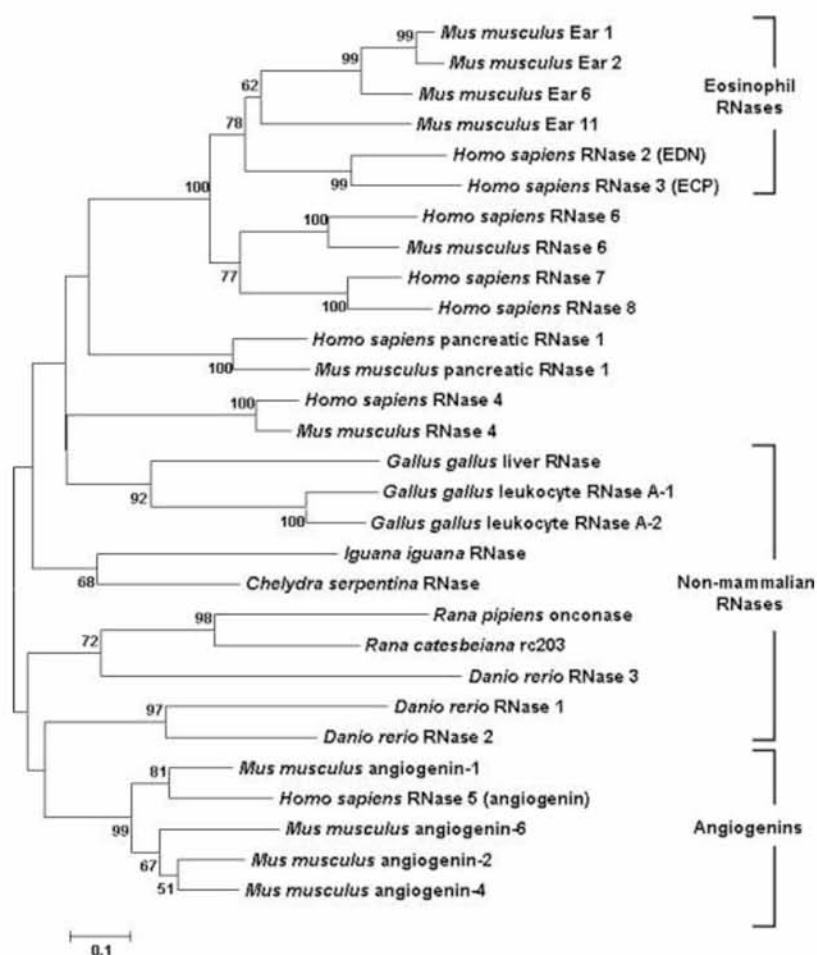
εξωριβονουκλεάσες, οι οποίες απαρτίζονται από αρκετές υποκατηγορίες ενζύμων. Οι ενδοριβονουκλεάσες κατακερματίζουν είτε μονόκλωνο είτε δίκλωνο RNA, ανάλογα με το ένζυμο, διασπώντας δεσμούς στο εσωτερικό των μορίων δημιουργώντας ξεχωριστά, μικρότερα τμήματα. Οι εξωριβονουκλεάσες αποικοδομούν το RNA αφαιρώντας νουκλεοτίδια είτε από το 5' άκρο ή στο 3' άκρο του μορίου RNA (Yuhong Z., *et al.* 2001).

Το 2001 πραγματοποιήθηκε μια προσπάθεια ταξινόμησης των ριβονουκλεασών με βάση τις υπεροικογένειες πρωτεϊνών και όχι τις λειτουργικές τους ιδιότητες (*Εικόνα 1*). Παρόλο που οι λειτουργικές ιδιότητες των πρωτεϊνών δεν αποτέλεσαν κριτήρια ταξινόμησης, το τελικό αποτέλεσμα συμφωνεί με τις χημικές και καταλυτικές ιδιότητές τους. Τα μέλη κάθε υπεροικογένειας εμφανίζουν τμήματα συντηρημένων αλληλουχιών και κοινό μοτίβο αναδίπλωσης του καταλυτικού τους κέντρου. Στη συνέχεια, ομαδοποιούνται σύμφωνα με τα επικρατέστερα στοιχεία δευτεροταγούς δομής.

Οι ριβονουκλεάσες διακρίνονται στις τάξεις α/β και α+β. Η κατηγορία α/β περιλαμβάνει πρωτεΐνες οι οποίες χαρακτηρίζονται από περιοχές με παράλληλα β πτυχωτά φύλλα μέσω β-α-β μοτίβων. Αντίθετα, οι πρωτεΐνες της κατηγορίας α+β χαρακτηρίζονται από αντιπαράλληλα β πτυχωτά φύλλα με διακριτές α και β περιοχές (Neira J.L., *et al.* 1997).

Οι παγκρεατικού τύπου ριβονουκλεάσες (Pancreatic-type ribonucleases (RNases)) είναι μια οικογένεια ενζύμων αποικοδόμησης RNA μορίων, η οποία όπως φανερώνει το όνομά της εκκρίνεται στο πάγκρεας. Τα μέλη της συγκεκριμένης κατηγορίας εμφανίζουν παρόμοια δομή, αλλά ποικίλα ποσοστά ομοιότητας ως προς την αλληλουχία τους. Σημαντικότερος εκπρόσωπος είναι η ριβονουκλεάση Α (RNase A), μια πρωτεΐνη που έχει μελετηθεί σε μεγάλο βαθμό. Λίγα χρόνια μετά τον χαρακτηρισμό της RNase A, απομονώθηκαν και μελετήθηκαν άλλες πρωτεΐνες φαινομενικά άσχετες με την ριβονουκλεάση Α. Η κλωνοποίηση και η αλληλούχηση των γονιδίων τους απέδειξε πως εμφανίζουν

ομοιότητα αλληλουχίας σε μεγάλο βαθμό με την παγκρεατική RNase A. Οι πρωτεΐνες αυτές πλέον αποτελούν μέλη της υπεροικογένειας της *ριβονουκλεάσης A (RNase A family)*. Στην οικογένεια αυτή ανήκουν η αγγειογενίνη (RNase 5), η ηωσινόφιλη κατιονική πρωτεΐνη (ECP ή RNase 3), η ηωσινόφιλη νευροτοξίνη (EDN ή RNase 2) και ορισμένες κυτταροτοξίνες. Χαρακτηριστικό στοιχείο των συγκεκριμένων πρωτεϊνών είναι η ύπαρξη 6 ή 8 κυστεϊνών που σχηματίζουν δισουλφιδικούς δεσμούς, 2 καταλοίπων ιστιδινών και ενός καταλοίπου λυσίνης. Τέλος, τα μέλη της οικογένειας RNase A εντοπίζονται σε ένα μόνο εξώνιο στο χρωμόσωμα 14 (Rosenberg HF, *et al.* 2008).

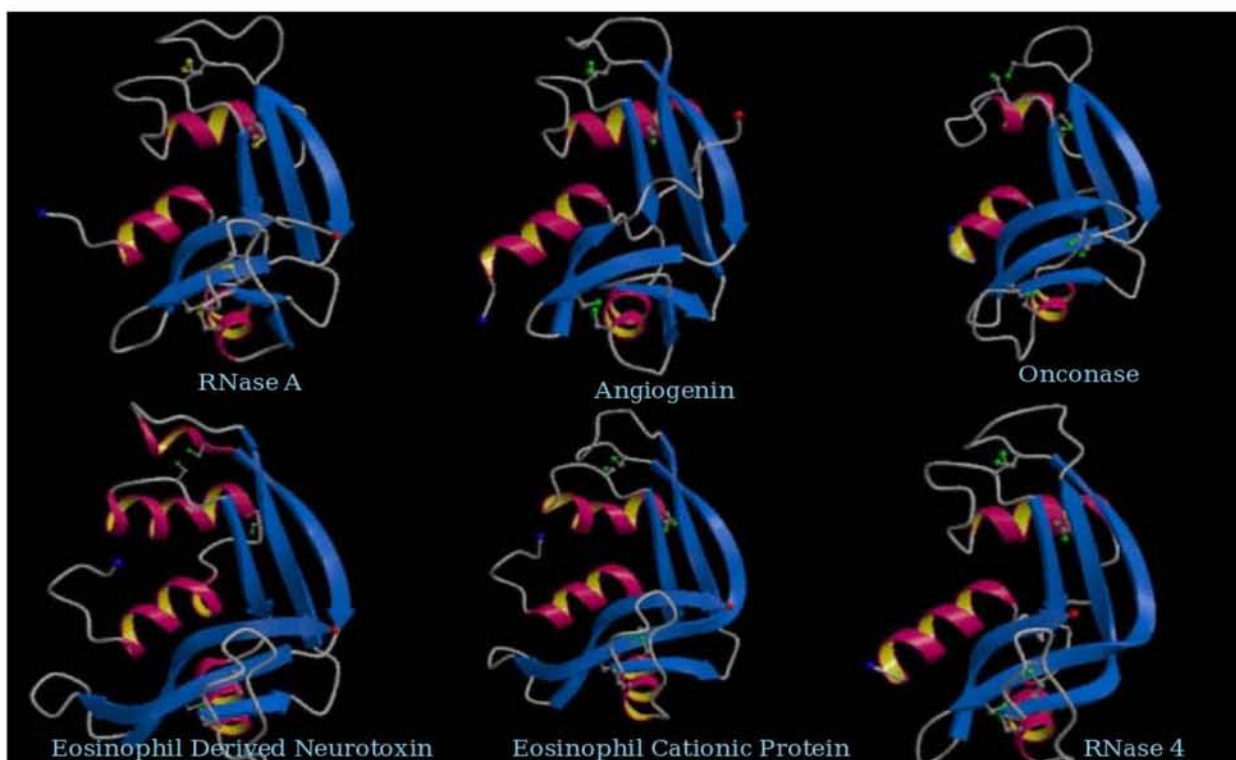


Εικόνα 1: Φυλογενετικό δέντρο των μελών της οικογένειας RNase A σε θηλαστικά και μη θηλαστικά.

Τα τελευταία χρόνια, το ενδιαφέρον για τη μελέτη των ριβονουκλεασών έχει αυξηθεί επειδή τα διάφορα μέλη αυτής της οικογένειας παρουσιάζουν ιδιαίτερες βιολογικές λειτουργίες (*Εικόνα 2*). Λόγω της ικανότητάς τους να αποικοδομούν το RNA και να επάγουν τον κυτταρικό θάνατο, οι ριβονουκλεάσες μπορούν να θεωρηθούν ως τοξίνες. Πρόσφατες έρευνες έχουν δείξει ότι πολλά μέλη αυτής της υπεροικογένειας έχουν σημαντικές βιολογικές δράσεις συμπεριλαμβανομένων νευροτοξικότητα, αγγειογενετική δραστηριότητα, και αντικαρκινική δράση (Sorrentino S., *et al.* 1997).

Ομόλογα της RNase A με αξιοσημείωτη βιολογική δράση είναι τα εξής:

- Αγγειογενίνη (ANG), η οποία μέσω επαγωγής της αγγειογένεσης έχει αποδειχθεί ότι εμπλέκεται στην αύξηση και μετάσταση του καρκίνου καθώς και σε αγγειακές και ρευματοειδείς ασθένειες .
- Ηωσινόφιλη νευροτοξίνη (EDN), και ηωσινοφιλική κατιονική πρωτεΐνη (ECP), δύο νευροτοξίνες που εμπλέκονται στα υπερηωσινοφιλικά σύνδρομα και στην αλλεργία. Η EDN έχει αποδειχθεί πως συμμετέχει στην αναστολή της δράσης του HIV-1 (Leonidas D.D, *et al.* 2003).
- Βοειδής ριβονουκλεάση σπέρματος (BS-RNase), η οποία εμφανίζει ανοσοκατασταλτική, εμβρυοτοξική, αντισπερματογόνο (aspermatic) αλλά και αντικαρκινική δράση (Leland P., *et al.* 1998).
- Ογκονάση (ONC), μια ριβονουκλεάση από τα ωκύτταρα και τα πρώιμα έμβρυα του *Rana pipiens* (είδος βατράχου). Αποτελεί μια κυτταροτοξίνη σε αρκετές μετασχηματισμένες κυτταρικές σειρές (Kao RY, *et al.* 2002).



Εικόνα 2: Ριβονουκλεάσες της οικογένειας RNase A

Η βιολογική δράση των ριβονουκλεασών είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με την ενζυμική τους δραστηριότητα. Όπως έχουν αποδείξει προηγούμενες μελέτες, παρουσία αναστολέων ή μεταλλάξεων που παρεμποδίζουν την ριβονουκλεολυτική τους δραστηριότητα σχεδόν εξαλείφει τη βιολογική τους δράση. Με λίγες εξαιρέσεις, για να προκαλέσουν το θάνατο των κυττάρων, οι ριβονουκλεάσες πρέπει να είναι καταλυτικά δραστικές και, ως εκ τούτου, πρέπει να αποφεύγεται η παρεμπόδιση τους από τον αναστολέα ριβονουκλεάσης (RI), του οποίου η συγγένεια ως προς τις ριβονουκλεάσες είναι η μεγαλύτερη που έχει ταυτοποιηθεί ποτέ για πρωτεϊνικά σύμπλοκα, με μία σταθερά αποδιάταξης της τάξεως των femtomolar (fM) (Makarov A., *et al.* 2003). Μονομερείς ριβονουκλεάσες, όπως η ογκονάση ή μερικές ισομορφές της RNase A, που παρουσιάζουν χαμηλή συγγένεια με τον RI, πιθανολογείται ότι είναι εξαιρετικά τοξικές (Merlino A, *et al.* 2009).

2. ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ

Αγγειογένεση είναι η διαδικασία σχηματισμού νέων αιμοφόρων αγγείων από προϋπάρχοντα. Μέσω των αιμοφόρων αγγείων μεταφέρονται θρεπτικά συστατικά, οξυγόνο και άλλα μόρια, όπως κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος σε όλους τους ιστούς του σώματος (Folkman, *et al.*, 2001). Η αγγειογένεση εμπλέκεται τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε παθολογικές καταστάσεις. Οι φυσιολογικές καταστάσεις στις οποίες συμμετέχει η αγγειογένεση είναι η ανάπτυξη των εμβρύων, η επούλωση πληγών και ο επανασχηματισμός του ενδομητρίου κατά τον έμμηνο κύκλο. Η συνεχής και ανεξέλεγκτη αγγειογένεση, όμως, μπορεί να οδηγήσει σε ένα πλήθος ασθενειών:

- Στην αρθρίτιδα, νέα τριχοειδή αγγεία του αίματος εισβάλλουν στις αρθρώσεις και καταστρέφουν τους χόνδρους.
- Στο διαβήτη, παρατηρείται εισβολή νέων τριχοειδών του αμφιβληστροειδή χιτώνα στον υαλώδη, προκαλώντας αιμορραγία και τύφλωση, η οφθαλμική νεοαγγειογένεση είναι η πιο συχνή αιτία τύφλωσης σε αρκετές ασθένειες του οφθαλμού.
- Αύξηση και μετάσταση όγκων εξαρτώνται άμεσα από την αγγειογένεση. Οι όγκοι προκειμένου να αυξηθούν, διεγείρουν τη δημιουργία νέων τριχοειδών αιμοφόρων αγγείων. Επιπλέον, τα νέα αιμοφόρα αγγεία που αιματώνουν έναν όγκο, επιτρέπουν στα καρκινικά κύτταρα να εισέλθουν στην κυκλοφορία, με αποτέλεσμα την μετάσταση του όγκου σε απομακρυσμένα σημεία του σώματος (συκώτι, πνεύμονες, οστά).
- Αθηροσκλήρωση, ψωρίαση, ρευματοειδής αρθρίτιδα είναι μερικές ακόμη από τις παθολογικές καταστάσεις στις οποίες παρατηρείται σχηματισμός νέων αιμοφόρων αγγείων.

Η δημιουργία νέων αιμοφόρων αγγείων μπορεί να γίνει μέσω δυο μηχανισμών: της νεοαγγειογένεσης (*de novo* σχηματισμός αγγείων) και της αγγειογένεσης (δημιουργία νέων αγγείων από προϋπάρχοντα) (Folkman, *et al.*,

2007).

2.1 Μηχανισμός νεοαγγειογένεσης

Η διεργασία της νεοαγγειογένεσης λαμβάνει χώρα κατά την εμβρυική ανάπτυξη. Τα αιμοφόρα αγγεία σχηματίζονται από τα πρόδρομα κύτταρα των ενδοθηλιακών κυττάρων, τους αγγειοβλάστες, οι οποίοι προέρχονται από το μεσόδερμα. Τα πρόδρομα αυτά κύτταρα, μεταναστεύουν, διαφοροποιούνται και πολλαπλασιάζονται σε έναν ιστό σχηματίζοντας ένα αγγειακό πλέγμα. Στη συνέχεια, σχηματίζουν κανάλια, που λαμβάνουν την ακριβή τοποθεσία των μελλοντικών αγγείων. Από τη στιγμή που έχει διαμορφωθεί ο συγκεκριμένος σχηματισμός, το ενδοθήλιο περιβάλλεται από βασική μεμβράνη, λεία μυϊκά κύτταρα και περικύτταρα και έτσι αποκτά τη μορφή των ώριμων αγγείων. Η διαδικασία της αγγειογένεσης ελέγχεται από την οικογένεια του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGF) και των υποδοχέων του (Carmeliet *et al.*, 1996).

2.2 Μηχανισμός της αγγειογένεσης

Όταν δημιουργηθεί το κυρίως αγγειακό πλέγμα μέσω της νεοαγγειογένεσης, τότε τα νέα τριχοειδή αγγεία μπορούν να δημιουργηθούν από προϋπάρχοντα. Η αγγειογένεση μπορεί να συμβεί μέσω δυο μηχανισμών, με εκβλάστηση ή με διάσπαση των υπαρχόντων αγγείων.

- **Αγγειογένεση με εκβλάστηση:** Η αγγειογένεση με εκβλάστηση ήταν η πρώτη αναγνωρισμένη μορφή αγγειογένεσης και η οποία επέρχεται σε αρκετά καλά αναγνωρισμένα στάδια. Πρώτον, βιολογικά σήματα γνωστά ως αγγειογενετικοί αυξητικοί παράγοντες ενεργοποιούν υποδοχείς που βρίσκονται στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Δεύτερον, τα ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα αρχίζουν να εκκρίνουν ένζυμα που καλούνται πρωτεάσες τα οποία υποβαθμίζουν τη βασική μεμβράνη και επιτρέπουν στα ενδοθηλιακά κύτταρα να διαφύγουν από

τον υπάρχοντα ενδοθηλιακό τοίχο. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα στη συνέχεια πολλαπλασιάζονται στην περιβάλλουσα θεμέλια ουσία και δημιουργούν στερεές εκβλαστήσεις οι οποίες συνδέονται με γειτονικά αγγεία. Όσο μεγαλώνουν οι εκβλαστήσεις προς τη πηγή του αγγειογενετικού διεγέρτη, τα ενδοθηλιακά κύτταρα μεταναστεύουν το ένα μετά το άλλο χρησιμοποιώντας μόρια προσκόλλησης οι οποίες καλούνται ιντεγκρίνες. Αυτές οι εκβλαστήσεις στη πορεία σχηματίζουν θηλιές προκειμένου να φτιάξουν έναν πλήρες αυλό αγγείου όσο τα κύτταρα μεταναστεύουν στη περιοχή της αγγειογένεσης. Η εκβλάστηση πραγματοποιείται σε ένα ποσοστό αρκετών χιλιοστών την ημέρα και καθιστά ικανά τα νέα αγγεία να μεγαλώνουν κατά μήκος του αγγειακού δικτύου. Είναι σημαντικά διαφοροποιημένες από την διαδικασία της διαχωριστικής αγγειογένεσης. (Xu *et al.*, 2002).

- **Αγγειογένεση με εγκολεασμό:** Ο εγκολεασμός, γνωστός ως αγγειογένεση με διαχωρισμό, πρωτοπαρατηρήθηκε σε νεογνά αρουραίων. Σε αυτή τη μορφή αγγειακού σχηματισμού, το τριχοειδικό τοίχωμα εκτείνεται μέσα στον αυλό προκειμένου να απλό αγγείο σε δύο νέα. Υπάρχουν τέσσερις φάσεις αγγειογένεσης με εγκολεασμό. Πρώτον τα δύο αντιτιθέμενα τριχοειδικά τοιχώματα εγκαθιστούν μία ζώνης σύνδεσης. Δεύτερον, οι κόμβοι των ενδοθηλιακών κυττάρων αναγνωρίζονται και η αγγειακή διπλοστιβάδα διατρυπάτε προκειμένου να επιτρέψει τους αυξητικούς παράγοντες και τα κύτταρα να διεισδύσουν μέσα στον αυλό. Τρίτον, ένας πυρήνας δημιουργείται μεταξύ των δύο νέων αγγείων στη ζώνη σύνδεσης η οποία συμπληρώνεται με περικύτταρα και μυοϊνοβλάστες. Αυτά τα κύτταρα αρχίζουν να σχηματίζουν ίνες κολλαγόνου μέσα στον πυρήνα προκειμένου να ωθήσουν την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία για ανάπτυξη του αγγειακού αυλού. Τέλος, ο πυρήνας μετασχηματίζεται χωρίς αλλαγές σε μία βασική δομή. Ο εγκολεασμός είναι βασικός επειδή αναδιοργανώνει τα υπάρχοντα κύτταρα. Επίσης, επιτρέπει μία

συντριπτική αύξηση στον αριθμό των τριχοειδών χωρίς να πραγματοποιεί αύξηση στον αριθμό των ενδοθηλιακών κυττάρων. Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό στην εμβρυϊκή ανάπτυξη εξαιτίας του γεγονότος που δεν υπάρχουν αρκετές πηγές στο να δημιουργήσουν ένα πλούσιο μικροαγγειακό δίκτυο με νέα κύτταρα (Burri P., *et al.* 2004)

2.3 Στάδια αγγειογένεσης

Τα κύτταρα διαθέτουν έναν αγγειογενετικό διακόπτη, ο οποίος ρυθμίζεται μέσω της ισορροπίας ανάμεσα στους αναστολείς και επαγωγείς της αγγειογένεσης. Η ενεργοποίηση του διακόπτη εξαρτάται από διάφορα σήματα, όπως: μεταβολικό στρες (υποξία, pH, υπογλυκαιμία), μηχανικό στρες που προκαλεί ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων, ανοσολογικές αντιδράσεις και γενετικές μεταλλάξεις που ενεργοποιούν ογκογονίδια ή εξαλείφουν ογκοκατασταλτικά γονίδια, τα οποία ελέγχουν την έκφραση ρυθμιστικών γονιδίων της αγγειογένεσης (Carmeliet and Jain, *et al.* 2000). Ο μηχανισμός της αγγειογένεσης είναι ο εξής (Εικόνα 3):

1. Αγγειοδιαστολή του υπάρχοντος αγγείου. Το υπάρχον αγγείο, από το οποίο θα δημιουργηθεί ένας νέος αγγειακός κλάδος (νέο τριχοειδές), είναι συνήθως ένα μικρό φλεβίδιο ή ένα ολοκληρωμένο τριχοειδές. Αυτό το αγγείο υφίσταται παρατεταμένη διαστολή πριν την έναρξη της αγγειογένεσης. Με την αγγειοδιαστολή τα ενδοθηλιακά κύτταρα εκτείνονται, με αποτέλεσμα να αυξάνεται η ευαισθησία τους στους παράγοντες αύξησης (Yamagami A., *et al.*

1970).

2. Αποικοδόμηση των βασικών μεμβρανών του υπάρχοντος αγγείου. Ένας αγγειογενετικός παράγοντας όπως οι αυξητικοί παράγοντες και οι κυτταροκίνες, εκκρίνεται και δεσμεύεται σε ειδικούς υποδοχείς στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα διεγείρουμε από τα μόρια αυτά, αυξάνουν την έκφραση του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου και κολλαγενασών. Ο πιθανός ρόλος του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου είναι η αναστολή θρόμβωσης στο νεοσχηματιζόμενο άκρο του τριχοειδούς και η μετατροπή του πλασμινογόνου σε πλασμίνη. Η πλασμίνη ενεργοποιεί την ανενεργό μορφή της κολλαγενάσης. Η κολλαγενάση με την σειρά της αποικοδομεί την βασική μεμβράνη του αγγειακού τοιχώματος. Στη διαδικασία της αγγειογένεσης, συνεισφέρουν εκτός από τα ίδια τα πρωτεολυτικά ένζυμα και τα προϊόντα αποικοδόμησης των βασικών μεμβρανών και του ινώδους πλέγματος. Εξάλλου, η αυξημένη αγγειακή διαπερατότητα που χαρακτηρίζει το συγκεκριμένο στάδιο, έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ινώδους πλέγματος στον εξωαγγειακό χώρο (Rifkin *et al.* 1982).

3. Μετανάστευση ενδοθηλιακών κυττάρων. Μετά την τοπική αποικοδόμηση και τον σχηματισμό οπών στη βασική μεμβράνη του υπάρχοντος αγγείου, τα ενδοθηλιακά κύτταρα υπό την επίδραση αγγειογενετικού ερεθίσματος, αυξάνουν τον αριθμό των οργανιδίων τους και σχηματίζουν προεξοχές στην επιφάνειά τους (ψευδοπόδια). Τα ενδοθηλιακά κύτταρα που ελευθερώνονται από τις αποδομημένες βασικές μεμβράνες, εκτίθενται στο κολλαγόνο τύπου I και II, την ινονεκτίνη και τη βινκουλίνη και μεταναστεύουν προς το αγγειογενετικό ερέθισμα. Το ινώδες πλέγμα παίζει ρόλο στο σχηματισμό νέων τριχοειδών διακλαδώσεων, κυρίως όταν η αγγειογένεση είναι αποτέλεσμα φλεγμονώδους αιτίας ή κατά την ανάπτυξη καρκινικού όγκου (Sholley, *et al.* 1984).

4. Πολλαπλασιασμός των ενδοθηλιακών κυττάρων. Πλησίον της άκρης της προεξοχής τα ενδοθηλιακά κύτταρα αρχίζουν να πολλαπλασιάζονται (Auspruk *et*

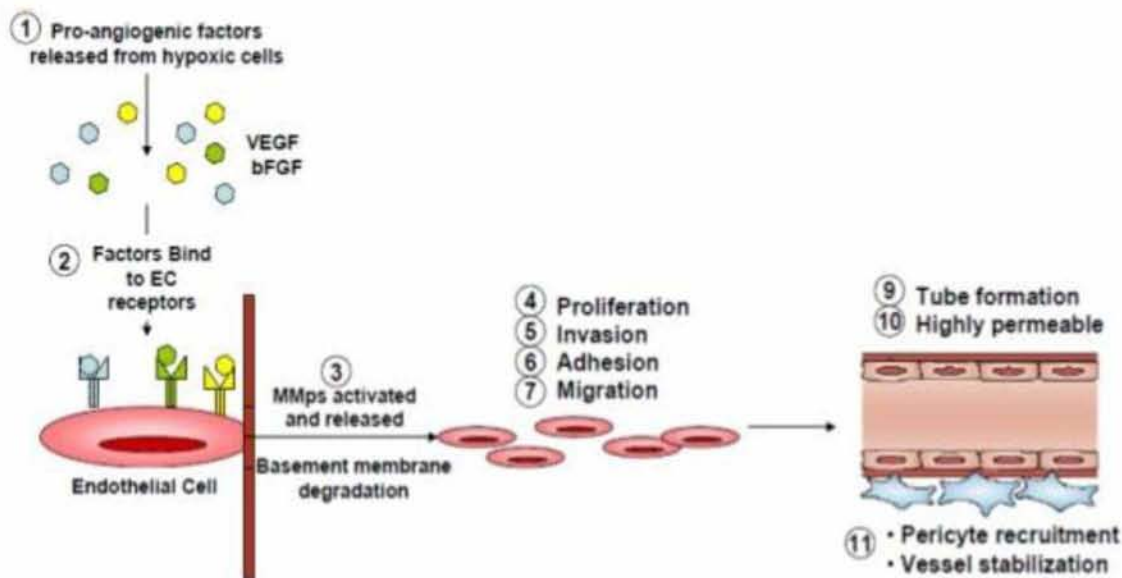
al. 1977).

5. Σχηματισμός του αυλού. Τα πολλαπλασιαζόμενα ενδοθηλιακά κύτταρα σχηματίζουν τον αυλό των νέων αγγείων (Folkman *et al.* 1980).

6. Σχηματισμός της νέας βασικής μεμβράνης. Το τελικό στάδιο για το σχηματισμό ενός ολοκληρωμένου νέου τριχοειδούς αγγείου, είναι η παραγωγή από τα ενδοθηλιακά κύτταρα και η εναπόθεση της νέας βασικής μεμβράνης. Το πρώτο συστατικό που εμφανίζεται είναι η ινονεκτίνη, ενώ σε διάστημα λίγων ημερών εμφανίζεται η λαμινίνη και τελικά το κολλαγόνο τύπου IV (Sage, *et al.* 1981).

7. Ενσωμάτωση περικύτταρων και λείων μυϊκών κυττάρων στο νέο τριχοειδές αγγείο. Τα περικύτταρα συναθροίζονται και συνδέονται στενά στην επιφάνεια των νεοσχετιζόμενων τριχοειδών. Τα περικύτταρα έλκονται προς τα ενδοθηλιακά κύτταρα από αυξητικούς παράγοντες που εκκρίνονται από το ενδοθήλιο. Τα περικύτταρα και τα λεία μυϊκά κύτταρα στηρίζουν δομικά τα νέα αγγεία.

8. Ωρίμανση των νέων αγγείων. Οι άκρες παράλληλα αυξανόμενων τριχοειδικών διακλαδώσεων αναστομώνονται και σχηματίζουν κυκλικά τριχοειδή (θηλιές), μέσα στις οποίες αρχίζει η ροή του αίματος. Οι θηλιές καθώς επιμηκύνονται συγκλίνοντας προς το αγγειογενετικό ερέθισμα και μπορούν να αποτελέσουν την αρχή νέων διακλαδώσεων. Η ωρίμανση των νέων αγγείων ολοκληρώνεται με την έναρξη ροής αίματος (Karamysheva A.F. *et al.*, 2007).



Εικόνα 3: Μηχανισμός αγγειογένεσης

2.4 Ρύθμιση αγγειογένεσης

Έχουν προσδιοριστεί ορισμένοι παράγοντες, οι οποίοι επηρεάζουν είτε θετικά (αγγειογενετικοί) είτε αρνητικά (αντιαγγειογενετικοί) την διαδικασία της αγγειογένεσης (Papetti and Herman, *et al.* 2002).

A. Αγγειογενετικοί παράγοντες

Οι σημαντικότεροι εκπρόσωποι της συγκεκριμένης κατηγορίας είναι οι αυξητικοί παράγοντες. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα εκφράζουν ένα ευρύ φάσμα αυξητικών παραγόντων και των αντίστοιχων υποδοχέων τους, οι οποίοι επάγουν την αγγειογένεση *in vivo* (Ferrara *et al.*, 2003).

- **Αυξητικός παράγοντας του αγγειακού ενδοθηλίου (VEGF):** έχουν βρεθεί οι εξής ισομορφές του: VEGF121, VEGF145, VEGF165, VEGF189 και VEGF206. Ο VEGF165 είναι μια γλυκοπρωτεΐνη μοριακού βάρους 45kDa, με

ικανότητα δέσμευσης στην ηπαρίνη, ενώ ο VEGF121 είναι ασθενές όξινο πολυπεπτίδιο, που δεν διαθέτει αυτή την ικανότητα. Και οι δυο ισομορφές εκκρίνονται στο εξωκυττάριο περιβάλλον και είναι διαλυτές, αν και ένα τμήμα του VEGF165 δεσμεύεται στην επιφάνεια του κυττάρου και παραμένει στο εξωκυτταρικό υλικό. Αντίθετα, οι VEGF189 και VEGF206 δεσμεύονται σε πρωτεογλυκάνες θεικής ηπαράνης, απελευθερώνοντας έτσι άλλους αγγειογενετικούς παράγοντες, οι οποίοι αποθηκεύονται σε μόρια θεικής ηπαράνης του εξωκυτταρικού υλικού. Οι VEGF121, VEGF145 και VEGF165 επάγουν τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων και την αγγειογένεση *in vivo* (Εικόνα 4) (Ferrara *et al.*, 2003).

- **Αυξητικός παράγοντας ινοβλαστών (FGF):** υπάρχουν δυο είδη, ο βασικός (bFGF) και ο όξινος (aFGF). Η διαφορά τους εντοπίζεται στο ισοηλεκτρικό τους σημείο (pI). Παρουσιάζουν υψηλή χημική συγγένεια για την ηπαρίνη και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην αγγειογένεση. Οι FGFs εμφανίζουν πλειοτροπική δράση, αφού επάγουν την αύξηση των ενδοθηλιακών κυττάρων, λείων μυϊκών και ινοβλαστών. Επίσης, προάγουν την επέκταση νευριτών. Κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες, δρουν ως παράγοντες διαφοροποίησης και συντήρησης των νευρώνων, ενώ παράλληλα αναστέλλουν τη διαφοροποίηση των μυοβλαστών (Ferrara *et al.*, 2003).
- **Αυξητικός παράγοντας αιμοπεταλίων (PDGF):** αποτελείται από δυο πολυπεπτιδικές αλυσίδες A και B και έχει μοριακό βάρος 45kDa. Όταν ο PDGF διεγείρει ενδοθηλιακά κύτταρα που εκφράζουν τον υποδοχέα του, επάγει τη σύνθεση DNA και τη δημιουργία ψευδοαγγείων *in vitro*. Επίσης, επηρεάζει με έμμεσο τρόπο την αγγειογένεση, επάγοντας την έκφραση αγγειογενετικών παραγόντων όπως ο VEGF (Battegay *et al.*, 1994).
- **Αγγειογενίνη:** Η αγγειογενίνη θεωρείται πολύ ικανή να προάγει την αγγειογένεση ακόμη και συγκριτικά με τους άλλους αγγειογενετικούς

παράγοντες. Η δράση αυτή πραγματοποιείται σε διάφορα στάδια της αγγειογένεσης μέσα από συγκεκριμένες λειτουργίες της αγγειογενίνης όπως είναι η αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης (St Clair DK., *et al.* 1987) και η προσκόλληση της στα ενδοθηλιακά κύτταρα και τους ινοβλάστες (Soncin F., *et al.* 1992). Η δεσμευτική αυτή ικανότητα είναι ανεξάρτητη από τα στοιχεία του εξωκυττάριου στρώματος, όπως η λαμινίνη, η φιβρονεκτίνη, το κολλαγόνο και το ινωδογόνο. Οι δράσεις της αγγειογενίνης εμπλέκονται σε όλες τις φάσεις της αγγειογένεσης (δέσμευση από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, ενεργοποίηση πρωτεασών, μεσολάβηση της προσκόλλησης των κυττάρων, δημιουργία σωληνωδών κατασκευών μέσα στα ενδοθηλιακά κύτταρα και κυτταρικός πολλαπλασιασμός μέσω μιτογένεσης). Η πυρηνική μετατόπιση της αγγειογενίνης επάγει την είσοδο των αυξητικών παραγόντων στον πυρήνα.

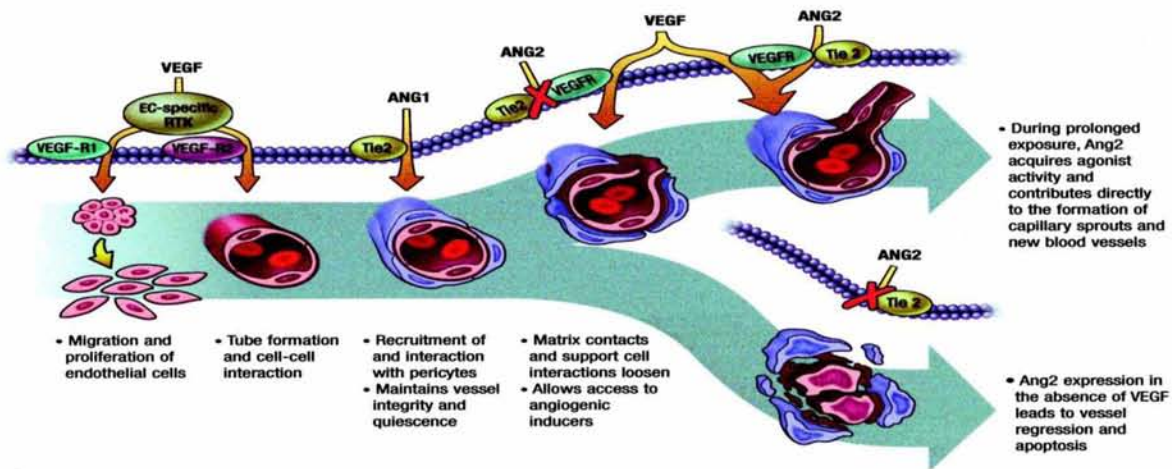
Άλλοι σημαντικοί αγγειογενετικοί παράγοντες είναι ο TGF- α , TGF- β , TNF- α , IL3, IL8, προσταγλαδίνες, οιστρογόνα κλπ

B. Αντιαγγειογενετικοί παράγοντες

Από τους σημαντικότερους αναστολείς της αγγειογένεσης είναι η αγγειοστατίνη και η ενδοστατίνη. Τα δυο μόρια ανήκουν σε μια κατηγορία παραγόντων που έχουν αντιαγγειογενετική δράση και προκύπτουν από πρωτεολυτική διάσπαση άλλων μεγαλύτερων -φυσικά παραγόμενων- πρωτεϊνών. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι τα συγκεκριμένα μόρια προκύπτουν από διάσπαση πρωτεϊνών του εξωκυτταρικού υλικού, όπως η ινονεκτίνη και το κολλαγόνο.

- **Αγγειοστατίνη:** είναι μια πρωτεΐνη μοριακού βάρους 38 kDa και αποτελεί τμήμα του πλασμινογόνου. Αναστέλλει την ανάπτυξη των ενδοθηλιακών κυττάρων *in vitro* και την αγγειογένεση *in vivo* (Εικόνα 4).
- **Ενδοστατίνη:** πρωτεΐνη μοριακού βάρους 20kDa και αποτελεί τμήμα του κολλαγόνου VIII . Όπως και η αγγειοστατίνη, αναστέλλει την ανάπτυξη των

ενδοθηλιακών κυττάρων *in vitro* και την αγγειογένεση *in vivo* (Papetti and Herman, *et al.* 2002).



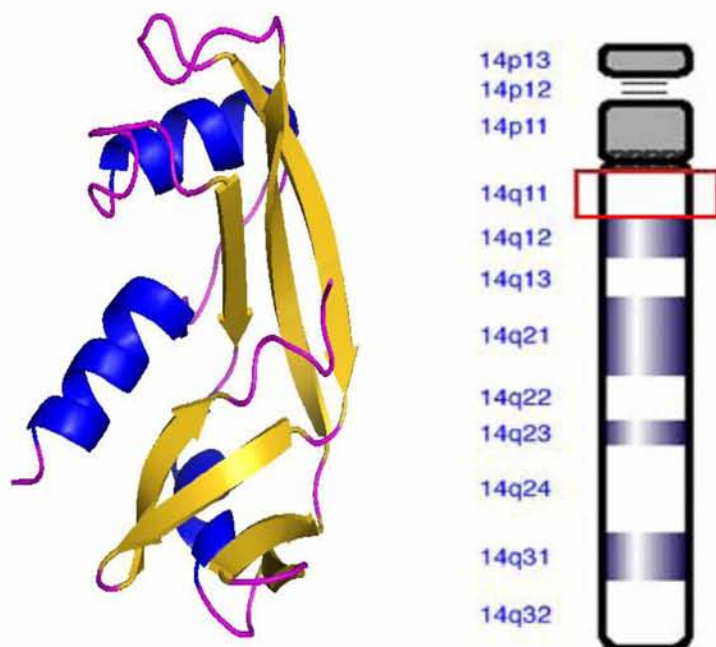
Εικόνα 4: Ρύθμιση αγγειογένεσης

3. ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΙΝΗ

3.1 Εισαγωγικά

Η ανθρώπινη αγγειογενίνη (ANG) είναι μια μονομερής πρωτεΐνη 123 αμινοξέων και μοριακού βάρους 14kDa. Ανήκει στην οικογένεια των ριβονουκλεασών και παρουσιάζει 33% ομοιότητα αλληλουχίας και 65% ομολογία με την παγκρεατική RNase A. Επίσης, η τριτοταγής δομή της ANG παρουσιάζει πολλές ομοιότητες με την αντίστοιχη της RNase A, διατηρώντας όμοια όλες τις βασικές α-έλικες και τα β-πτυχωτά φύλλα (Tello-Montoliu A., *et al.* 2006). Η αγγειογενίνη αρχικά απομονώθηκε το 1985 από καλλιέργειες ανθρώπινων κυττάρων HT-29 από αδενοκαρκίνωμα του κόλον. Το γονίδιο που κωδικοποιεί για την ANG βρίσκεται σε ένα μόνο αντίγραφο ανά απλοειδές γονιδίωμα, και εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 14q11 (Εικόνα 5) (Xiangwei G. *et al.*, 2008). Η αγγειογενίνη κυκλοφορεί ελεύθερα στο πλάσμα, σε συγκέντρωση περίπου 250-360 ng/ ml, συμμετέχοντας στην επούλωση πληγών καθώς και στην

ανάπτυξη νέων αιμοφόρων αγγείων. Σε παθολογικές καταστάσεις, έχει αποδειχθεί ότι διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην ανάπτυξη όγκων και στον πολλαπλασιασμό καρκινικών κυττάρων. Η έκφρασή της είναι αυξημένη σε ένα ευρύ φάσμα ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων, γεγονός που την καθιστά ιδανικό μόριο- στόχο για αντικαρκινική θεραπεία (Leonidas D.D.*et al.*, 2001).



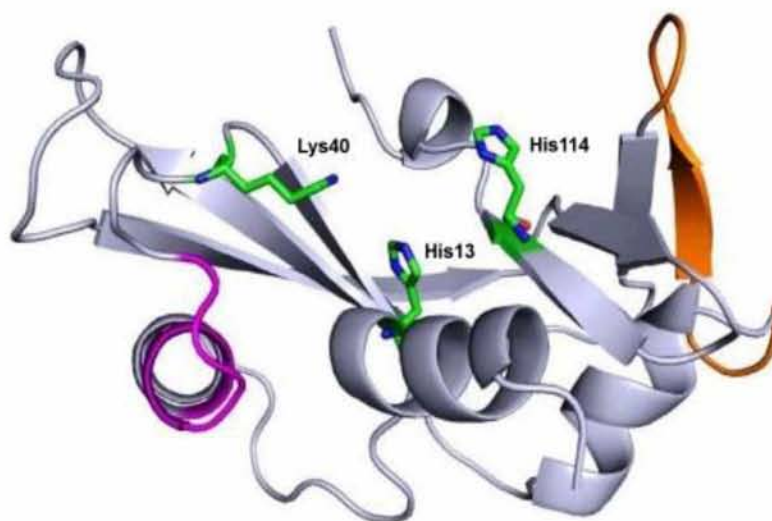
Εικόνα 5: Η δομή της αγγειογενίνης και το χρωμόσωμα 14q11 και (Leonidas D.D., et al., 2001)

3.2Η δομή της αγγειογενίνης

Η αγγειογενίνη αποτελείται από μια πολυνουκλεοτιδική αλυσίδα μοριακού βάρους 14.124 Da με 3 δισουλφιδικές γέφυρες. Ανάλυση της αλληλουχίας των αμινοξέων αποδεικνύει ότι η ANG ανήκει στην οικογένεια των ριβονουκλεασών. Πάνω από 40 RNases έχουν αλληλουχηθεί και παρουσιάζουν 30-70% ομολογία αλληλουχίας με την ANG. Καμία, όμως, δεν παρουσιάζει αγγειογενετική δράση. Η πιο σημαντική διαφορά μεταξύ αγγειογενίνης και των υπόλοιπων ριβονουκλεασών, είναι η απουσία ενός τέταρτου δισουλφιδίου

δεσμός (μεταξύ Cys65 και Cys72) στην αγγειογενίνη, γεγονός που προσδίδει στην ANG την αγγειογενετική λειτουργία της.

Η ANG αποτελείται από 3 α -έλικες, 7 β -πτυχωτά φύλλα και μια έλικα 310 στο C-τελικό άκρο. Ο πυρήνας του μορίου σταθεροποιείται με τρεις δισουλφιδικές γέφυρες, όπως προαναφέρθηκε. Η καταλυτική περιοχή [που σχηματίζεται από τα υπολείμματα His13 (α 1), 40- (βρόχος που συνδέει α 2 και β 1) και His114 (β 7) βρίσκεται στην κοίλη δομή του μορίου (Εικόνα 8). Τα κατάλοιπα NLS βρίσκονται στην α 2 έλικα, τα κατάλοιπα RI προσδένονται στο βρόγχο που συνδέει τα β 4 και β 5 φύλλα ενώ η θέση σύνδεσης του υποδοχέα βρίσκεται στο βρόγχο που συνδέει την α 3 έλικα με τη β 2- β 2 αλυσίδα (Adams & Subramanian, *et al.* 1999).

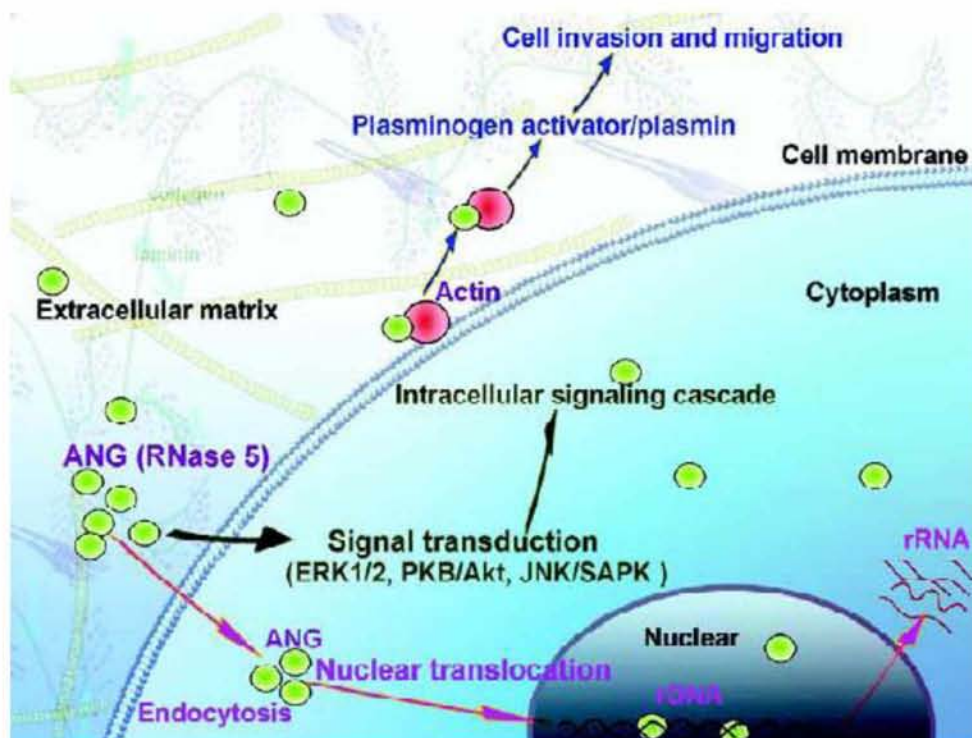


Εικόνα 8: Δομή αγγειογενίνης (Kumar,et al.2012)

3.3 Δράση και μηχανισμοί

Η αγγειογενίνη δρα κυρίως μέσω τεσσάρων μονοπατιών: 1. Μέσω της ριβονουκλεολυτικής δράσης της, 2. της σύνδεσής της με την ακτίνη της μεμβράνης και επαγωγή της αποικοδόμησης της μεμβράνης, 3. της δέσμευσής της σε μια 170-kDa μεμβρανική πρωτεΐνη και στη συνέχεια τη μεταγωγή σήματος στο κυτταρόπλασμα και 4. μέσω της μετατόπισής της στον πυρήνα και

στον πυρηνίσκο των κυττάρων-στόχων και της μετέπειτα επαγωγής της μεταγραφής του rRNA (Εικόνα 9). Η μετατόπιση μέσα στον πυρήνα καρκινικών κυττάρων επάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Παράλληλα, η ANG παρουσιάζει νευροπροστατευτική δράση στο κεντρικό νευρικό σύστημα, ενώ η απώλεια της λειτουργίας της φαίνεται να σχετίζεται με την πλάγια μυοτροφική σκλήρυνση (Tello – Montoliu A., *et al.* 2006).



Εικόνα 9: Δράση της αγγειογένινης

i. Λειτουργίες και οι μηχανισμοί της ANG στην αγγειογένεση

Η αγγειογένεση, η διαδικασία ανάπτυξης νέων αιμοφόρων αγγείων, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στις κανονικές φυσιολογικές διεργασίες, όπως η ανάπτυξη και αναπαραγωγή. Ωστόσο, παθολογική αγγειογένεση συμβαίνει σε πολλές ασθένειες όπως όγκους και άλλες μη νεοπλασματικές νόσους. Η έλλειψη ενός δισουλφιδικού δεσμού -σε σχέση με τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας των ριβονουκλεασών- προσδίδει στην αγγειογενίνη μια επιπλέον λειτουργία: την

επαγωγή της αγγειογένεσης (Tello-Moliu A., *et al.* 2006). Ως βασικός αγγειογενετικός παράγοντας, η ANG πιστεύεται να είναι ένας ιδανικός στόχος για θεραπεία αντι-αγγειογένεσης. Ως εκ τούτου, η αποκάλυψη του μηχανισμού δράσης της ANG θα διευκολύνει όχι μόνο στην κατανόηση της αγγειογένεσης, αλλά και στην ανάπτυξη κατάλληλων μορίων αναστολέων. Έχει αναφερθεί ότι η ANG αλληλεπιδρά με ενδοθηλιακά και λεία μυϊκά κύτταρα επάγοντας ένα ευρύ φάσμα κυτταρικών αποκρίσεων συμπεριλαμβανομένης της μετανάστευσης κυττάρων, τον πολλαπλασιασμό, και τον σχηματισμό των σωληνοειδών δομών. Τέσσερις δράσεις της ANG έχουν ανακαλυφθεί να είναι απαραίτητες για τη διαδικασία της επαγόμενης από την ANG αγγειογένεσης, συμπεριλαμβανομένης της δραστηριότητας ριβονουκλεάσης, της αποικοδόμησης της βασικής μεμβράνης, της μεταγωγής σηματοδότησης, και της πυρηνικής μετατόπισης (Kishimoto, *et al.* 2005).

ii. Ριβονουκλεοτική δραστηριότητα

Οι κρυσταλλικές δομές της ανθρώπινης ANG και της παγκρεατικής RNase A έχουν υψηλή ομοιότητα. Υπάρχει, όμως, μια αξιοσημείωτη διαφορά στο ριβονουκλεολυτικό ενεργό κέντρο. Η θέση πρόσδεσης της ANG σε μια πυριμιδίνη παρεμποδίζεται από ένα κατάλοιπο γλουταμίνης (Gln 117), γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα να μειώνεται αισθητά η ριβονουκλεολυτική δράση της σε σχέση με αυτή της RNase A. Κατά τη σύνδεση της ANG στο υπόστρωμα απαιτείται μετακίνηση του Gln117 καθώς και γειτονικών καταλοίπων. Σύμφωνα με πρόσφατα πειράματα, μετάλλαξη στο συγκεκριμένο κατάλοιπο είχε ως αποτέλεσμα να αυξηθεί σε μεγάλο βαθμό η ριβονουκλεολυτική δράση της ANG, χωρίς παράλληλα να αλλάζει την ιδιαιτερότητά της. Ακόμα και μειωμένη, η ριβονουκλεολυτική δραστηριότητα της ANG είναι απαραίτητη για τη δράση της, όπως αποδεικνύουν πειράματα που πραγματοποιήθηκαν κατά τα οποία, μεταλλάξεις σε απαραίτητα, για τη ριβονουκλεολυτική δραστηριότητα, αμινοξέα

(His13, Lys40, or His114) οδήγησαν σε μείωση της αγγειογενετικής δράσης της ANG (Thiyagarajan, *et al.* 2012).

iii. Η ANG διεγείρει την αποικοδόμηση της βασικής μεμβράνης

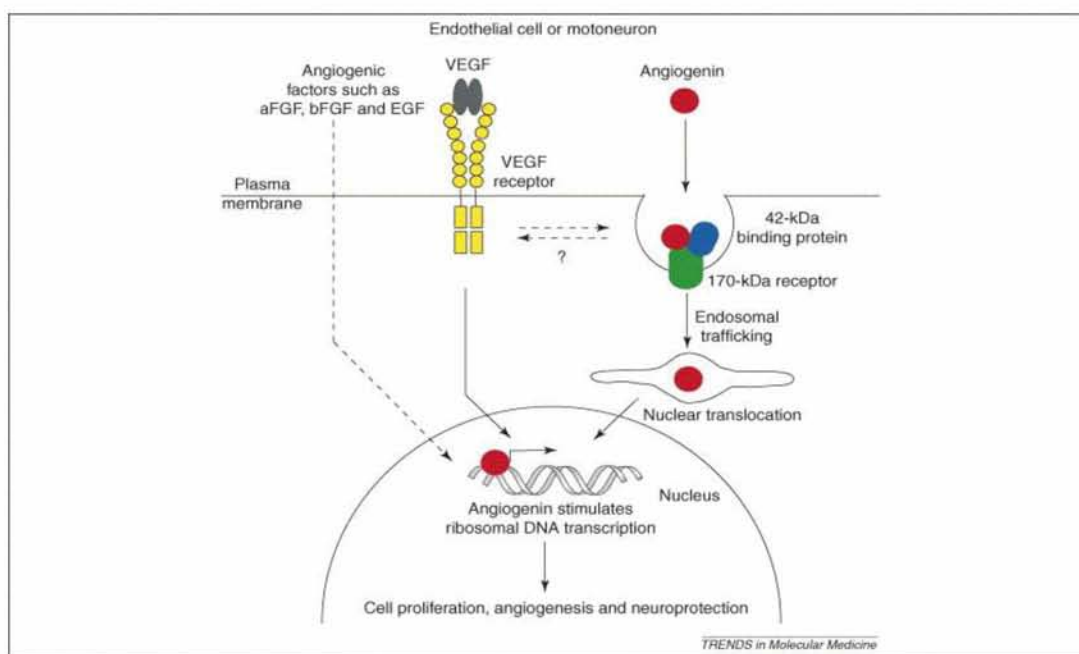
Η δέσμευση της ANG στη μεμβράνη ενδοθηλιακών κυττάρων είναι απαραίτητη για τις βιολογικές διεργασίες των κυττάρων. Κατά την προσπάθεια προσδιορισμού του υποδοχέα της ANG σε ενδοθηλιακά κύτταρα, βρέθηκε ως μόριο σύνδεσης μια μεμβρανική πρωτεΐνη 42kDa. Στην συνέχεια, όμως, αποδείχθηκε πως είναι ένας τύπος α-ακτίνης, η οποία φαίνεται να εμπλέκεται στην αποικοδόμηση της μεμβράνης. Κατά την σύνδεση της ANG στην ακτίνη, ορισμένα σύμπλοκα ακτίνης-ANG αποκολλώνται από την επιφάνεια του κυττάρου. Στη συνέχεια, αυτό το σύμπλοκο επιταχύνει την καταλυόμενη από τον ιστικό ενεργοποιητή πλασμινογόνου (tPA)- παραγωγή της πλασμίνης από το πλασμινογόνο. Με τον τρόπο αυτό, η ANG προάγει την αποικοδόμηση της βασικής μεμβράνης και του εξωκυτταρικού πλέγματος, επιτρέποντας έτσι, στα ενδοθηλιακά κύτταρα να διεισδύσουν και να μεταναστεύσουν στον περιαγγειακό ιστό (βασικό χαρακτηριστικό της αγγειογένεσης) (Xiangwei G., *et al.* 2008).

iv. Η ANG ενεργοποιεί τη μεταγωγή σήματος

Η ακτίνη, όμως, δεν αποτελεί υποδοχέα της ANG για την μεταγωγή σήματος. Έχει ταυτοποιηθεί ένα μόριο 170 kDa στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων, ως εν δυνάμει υποδοχέας της ANG, ο οποίος εκφράζεται μόνο ως απόκριση σε ANG (*Εικόνα 10*). Η φύση του συγκεκριμένου μορίου είναι ασαφής. Παρόλο που οι γνώσεις σχετικά με τους υποδοχείς της ANG είναι περιορισμένες, αρκετά σηματοδοτικά μονοπάτια έχει παρατηρηθεί πως ενεργοποιούνται παρουσία της ANG. Έχει παρατηρηθεί πως σε ανθρώπινα κύτταρα ομφαλικής φλέβας (HUVEC), παρουσία αγγειογενίνης, γίνεται ενεργοποίηση εξωκυτταρίου σήματος που σχετίζεται με την κινάση ERK1 / 2 καθώς και με την πρωτεϊνική κινάση B / Akt . Επίσης, σε ανθρώπινα λεία μυικά

κύτταρα ομφαλικής αρτηρίας (HuASM) παρατηρήθηκε φωσφορυλίωση της πρωτεϊνικής κινάσης SAPK/JNK. Οι ενεργοποιήσεις των συγκεκριμένων μονοπατιών παρουσία της ANG, οδηγούν σε κυτταρικό πολλαπλασιασμό και σε περαιτέρω αγγειογένεση (Xiangwei G., *et al.* 2008).

Είναι γνωστό πως η ακτίνη και ο 170kDa υποδοχέας της ANG δεν εκφράζονται ταυτόχρονα στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων, αλλά εκφράζονται υπό διαφορετικές συνθήκες και συμμετέχουν σε διαφορετικά στάδια της επαγόμενης από την ANG αγγειογένεσης. Σε κύτταρα αυξημένης πληρότητας, η ακτίνη εκφράζεται και συνδέεται ειδικά με την ANG, με αποτέλεσμα να προάγεται η κυτταρική διήθηση. Στη συνέχεια, τα κύτταρα μεταναστεύουν και εισέρχονται στο εσωτερικό της μεμβράνης, η πυκνότητα των κυττάρων μειώνεται γεγονός που οδηγεί στην έκφραση του 170kDa υποδοχέα της ANG. Τα γειτονικά κύτταρα διεγείρονται, ενεργοποιείται ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, με αποτέλεσμα να αυξάνεται και πάλι η πυκνότητα των κυττάρων. Μόλις αποκατασταθεί η πληρότητα των κυττάρων σταματά η έκφραση του υποδοχέα των 170kDa της ANG (Tello-Moliu A., *et al.* 2006).

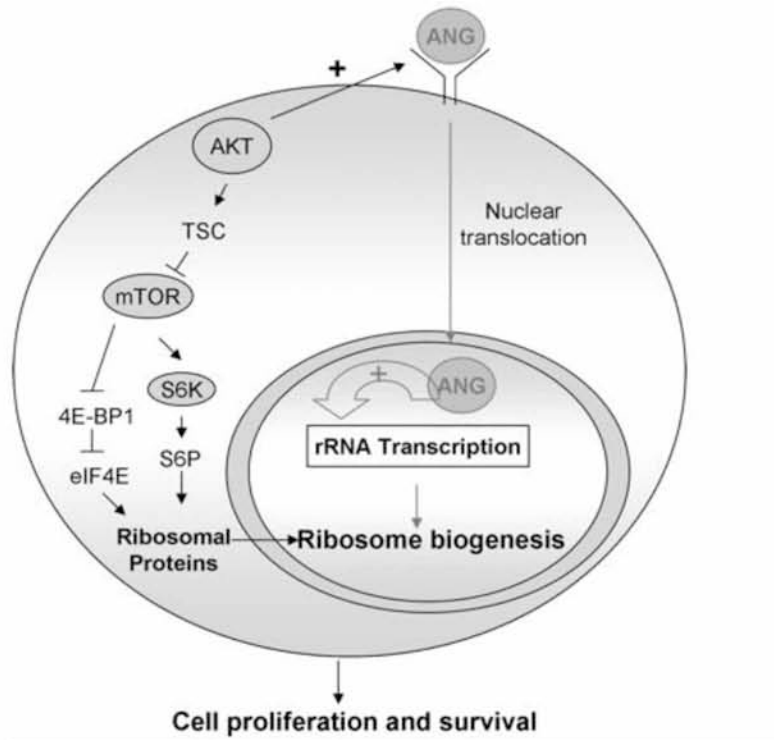


Εικόνα 10: Η αγγειογενίνη ως εναρκτήριο σηματοδοτικό μόριο

v. Πυρηνική μετατόπιση της ANG και επαγωγή της μεταγραφής του rRNA

Η ANG υφίσταται πυρηνική μετατόπιση σε ενδοθηλιακά και σε λεία μυϊκά κύτταρα, μια διεργασία απαραίτητη για την επαγωγή της αγγειογένεσης. Αναστολή της πυρηνικής μετατόπισης της ANG ή μετάλλαξη στην αλληλουχία που λειτουργεί ως σήμα πυρηνικού εντοπισμού οδηγεί σε διακοπή της αγγειογένεσης (*Εικόνα 11*). Στα ενδοθηλιακά κύτταρα η πυρηνική μετατόπιση εξαρτάται από την πληρότητα των κυττάρων.

Η πυρηνική μετατόπιση της ANG, και κατ' επέκταση η μετατόπισή της στον πυρηνίσκο όπου και εδράζεται έχει αποδειχθεί, πως οδηγεί σε επαγωγή της μεταγραφής του rRNA. Ένα στοιχείο δέσμευσης της αγγειογενίνης- ABE- γνωστό και ως επανάληψη CTCT- έχει αναγνωριστεί από την περιοχή IGS του rRNA ((Xiangwei G., *et al.* 2008). Το ABE δεσμεύει την ANG ειδικά και παρουσιάζει δράση εξαρτώμενου από την αγγειογενίνη προαγωγέα στο σύστημα της λουσιφεράσης. Αποδεικνύεται ότι η πυρηνική ANG κατέχει ένα σημαντικό ρόλο στον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων και είναι απαραίτητη για την αγγειογένεση που επάγεται από άλλους αγγειογενετικούς παράγοντες, όπως aFGF, bFGF, και VEGF. Απουσία αγγειογενίνης οι υπόλοιποι αγγειογενετικοί παράγοντες δεν επάγουν την αγγειογένεση. Η επαγωγή της μεταγραφής του rRNA αποτελεί κομβικό σημείο στη διαδικασία της αγγειογένεσης. Ωστόσο, η διαδικασία της πυρηνικής μετατόπισης της ANG είναι σε μεγάλο βαθμό άγνωστη. Δεδομένου ότι το μοριακό βάρος της ANG είναι μικρότερο από το μέγεθος των πόρων της πυρηνικής μεμβράνης (50-kDa), ο πιθανότερος μηχανισμός πυρηνικής μετατόπισης, είναι η παθητική διάχυση της ANG μέσω του πυρηνικού πόρου (Tello-Moliu A., *et al.* 2006).



Εικόνα 11: Επαγωγή της μεταγραφής του rRNA μέσω αγγειογενίνης

vi. Ρόλοι της ANG στις ασθένειες

1. Ανάπτυξη του όγκου

Έχει αναφερθεί ότι η έκφραση της ANG αυξάνεται σε διάφορους τύπους ανθρώπινων καρκίνων, συμπεριλαμβανομένου του μαστού, του τραχήλου της μήτρας, του παχέος εντέρου, ορθοκολικό, ενδομητριοειδές, γαστρικό, ήπατος, νεφρού, των ωοθηκών, του παγκρέατος, του προστάτη, καθώς και αστροκύτωμα, λευχαιμία (οξεία μυελοειδή λευχαιμία και μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο), λέμφωμα, μελάνωμα, οστεοσάρκωμα, και του όγκου του Wilms, γεγονός που αποδεικνύει την άρρηκτη σχέση ανάμεσα στην ANG και την ανάπτυξη όγκων. Αρχικά επικρατούσε η άποψη πως η αγγειογενίνη προάγει την εξέλιξη του καρκίνου- λόγω της αγγειογενετικής της δράσης- έχοντας ως στόχο τα κύτταρα HUVE και HuASM. Πρόσφατες μελέτες, όμως, έδειξαν πως η ANG μετατοπίζεται συνεχώς προς τον πυρήνα των HeLa κυττάρων ανεξάρτητα από την πυκνότητά τους. Μείωση της έκφρασης της ANG σε HeLa κύτταρα μείωσε τα επίπεδα της μεταγραφής του rRNA, της βιογένεσης των ριβοσωμάτων, του πολλαπλασιασμού των κυττάρων και της ογκογένεσης. Τα αποτελέσματα αυτά

δείχνουν μια άμεση επίδραση της ANG σε καρκινικά κύτταρα, για πρώτη φορά με ένα παρόμοιο τρόπο δράσης (Xiangwei G. *et al.*, 2008).

Τελευταίες μελέτες σε καρκινικά κύτταρα προστάτη (PC-3) έδειξαν ότι η ANG επάγει τον πολλαπλασιασμό των PC-3 μέσω πυρηνικής μετατόπισης (Kishimoto *et al.*, 2013). Η παρεμπόδιση της πυρηνικής μετατόπισης της ANG μέσω της νεομυκίνης είχε ως αποτέλεσμα την μείωση του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων, της αγγειογένεσης καθώς επίσης περιόρισε την ανάπτυξη όγκων. Αποδεικνύεται, λοιπόν, πως η αγγειογενίνη συμβάλλει στην ανάπτυξη όγκων μέσω επαγωγής της αγγειογένεσης καθώς και του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων (Xiangwei G. *et al.*, 2008).

2. Πλάγια μυατροφική σκλήρυνση (ALS)

Η μυατροφική πλάγια σκλήρυνση είναι μια προοδευτική νευροεκφυλιστική πάθηση που επηρεάζει τα νευρικά κύτταρα στον εγκέφαλο και στην σπονδυλική στήλη. Ο VEGF ήταν ο πρώτος αγγειογενετικός παράγοντας που αποδείχθηκε να σχετίζεται με την ALS. Η ANG είναι ο δεύτερος αγγειογενετικός παράγοντας ο οποίος, όπως έδειξαν πρόσφατες μελέτες, συμμετέχει στην εκδήλωση της συγκεκριμένης ασθένειας. Αρκετές παρερμηνεύσιμες μεταλλάξεις στην κωδική περιοχή του γονιδίου της αγγειογενίνης έχουν ταυτοποιηθεί σε ασθενείς με πλάγια μυοτροφική σκλήρυνση. Οι μεταλλάξεις αυτές οδηγούν σε απώλεια της δράσης ριβονουκλεάσης της ANG, ή σε παρεμπόδιση της πυρηνικής μετατόπισής της ή και στα δύο προκαλώντας ALS. Έχει αποδειχθεί ότι αλλαγή στη διαμόρφωση του καταλοίπου His114 οδηγεί σε απώλεια ριβονουκλεολυτικής δράσης, ενώ μεταλλαξιγένεση στο πεπτίδιο ³¹RRR³³ (το οποίο συμμετέχει στη σηματοδότηση της μετατόπισης στον πυρήνα) προκαλεί μείωση της πυρηνικής μετατόπισης της ANG. (Padhi, *et al.* 2012).

3. Δράση της ANG σε άλλες ασθένειες

Η αγγειογενίνη μπορεί επίσης να παίζει ρόλους σε μια ποικιλία από μη κακοήθεις εξαρτώμενες από αγγειογένεση ασθένειες, όπως στην ενδομητρίωση, την περιφερική αγγειακή νόσο, τη νόσο του φλεγμονώδους εντέρου (IBD), τη ρευματοειδή αρθρίτιδα και τον διαβήτη. Σε αυτές τις διαταραχές, τα επίπεδα έκφρασης της ANG αυξάνονται και η ANG μπορεί να συμβάλει στις τοπικές παθολογικές καταστάσεις αγγειογένεσης (Tello – Montoliu A., *et al.* 2006).

vii. Δράση της ANG κατά την εγκυμοσύνη

Κατά την εγκυμοσύνη, τα επίπεδα αγγειογενίνης αυξάνονται από 150 ng/ml ως 250 ng/ml ανάμεσα στην 10η και 40η εβδομάδα. Στις 4 πρώτες μέρες μετά την γέννηση, τα επίπεδα της ANG στον μητρικό ορό αυξάνονται απότομα, καθώς συμμετέχει ενεργά στην ανάπτυξη αγγείων. Σε περιπτώσεις προεκλαμψίας, από όπου προκύπτουν λιποβαρή βρέφη, τα επίπεδα της ANG είναι αυξημένα. Επίσης, σε ασθενείς παθολογικούς σε Doppler test (έλεγχος της ροής των αγγείων της μητροπλακουντιακής αλλά και της εμβρυϊκής κυκλοφορίας), η έκφραση της ANG είναι μειωμένη. Κατά τη διάρκεια της ανθρώπινης ανάπτυξης, η αγγειογενίνη έχει ανιχνευθεί σε όργανα όπως: καρδιά (σε ένα έμβρυο 19 εβδομάδων), σπλήνα (έμβρυο 19 και 20 εβδομάδων), πνεύμονα (έμβρυο 19 ανάπτυξης, η αγγειογενίνη έχει ανιχνευθεί σε όργανα όπως: καρδιά (σε ένα έμβρυο 19 εβδομάδων και ενήλικες), ήπαρ (έμβρυο 20 εβδομάδων και ενηλίκων), παχύ έντερο, προστάτη, μαστό, εγκέφαλο και αμφιβληστροειδή.

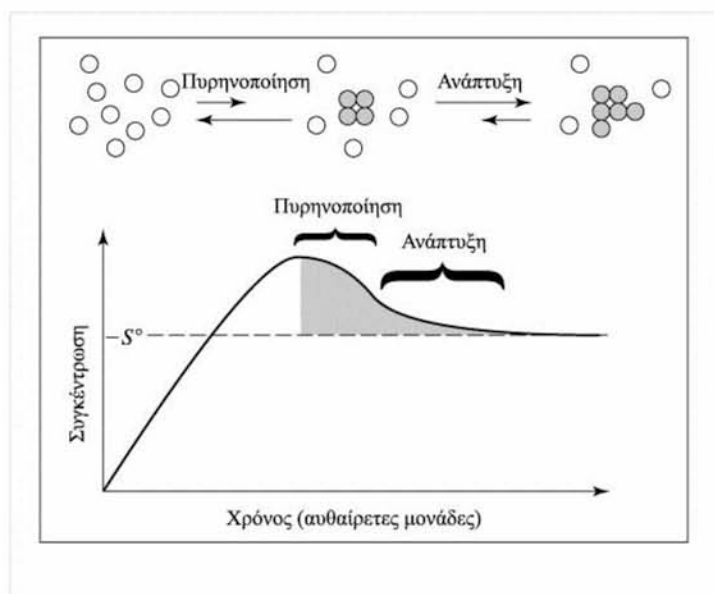
4.ΚΡΥΣΤΑΛΛΩΣΕΙΣ

4.1 Φυσικοχημεία κρυστάλλωσης

Για να δημιουργήσουμε έναν κρύσταλλο, πρέπει να οδηγήσουμε τα διαλυμένα μόρια εκτός διαλύματος ή να τα κατακρημνίσουμε με έναν ελεγχόμενο τρόπο που να ευνοεί την τάξη τους.

Ένα μόριο εγκαταλείπει το διάλυμα, όταν η συγκέντρωση του υπερβεί την εγγενή του διαλυτότητα S^0 (η S^0 δεν είναι πραγματικά μια εγγενής ιδιότητα, αλλά εξαρτάται από εξωγενείς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένης της θερμοκρασίας, της πίεσης και του διαλύτη). Η ανάπτυξη ενός κρυστάλλου απαιτεί την αύξηση της συγκέντρωσης του υλικού που είναι στην υπέρκορη κατάσταση (Εικόνα 12). Ακόμη η ανάγκη για υπέρκορο διάλυμα θα γίνει εμφανής, όταν αργότερα ασχοληθούμε με τον μηχανισμό της αύξησης του κρυστάλλου. Επίσης, η συγκέντρωση του μορίου μπορεί να αυξηθεί με την αφαίρεση μέρους του διαλύτη, προκειμένου να μειωθεί ο συνολικός όγκος του διαλύματος. Ακόμη, για τις μικρές οργανικές και ανόργανες ενώσεις, οι κρύσταλλοι μπορούν να αναπτυχθούν απλά εξατμίζοντας τον διαλύτη από το διάλυμα.

Μια δεύτερη στρατηγική για την κατακρήμνιση ενός μορίου είναι να μειωθεί η εγγενής του διαλυτότητα S^0 για μια σταθερή συγκέντρωση του υλικού. Εναλλακτικά, μπορούμε να επιδράσουμε στην εγγενή διαλυτότητα S^0 με την τροποποίηση του διαλύτη (όπως με την αύξηση ή τη μείωση της ιοντικής ισχύος του διαλύματος). Η βέλτιστη διαλυτότητα πολύ-ηλεκτρολυτών, όπως πολυπεπίδια ή πολυνουκλεοτίδια, εμπίπτει σε μια συγκεκριμένη περιοχή των συγκεντρώσεων αλάτων. Εάν η ιοντική του διαλύματος αυξηθεί πέραν αυτής της περιοχής με την προσθήκη άλατος ή με εξάτμιση, ή μειωθεί κάτω από αυτήν με διαπύδωση, η εγγενής διαλυτότητα θα μειωθεί και το μόριο θα κατακρημνισθεί. Αυτές είναι οι τυπικές διαδικασίες εναλάτωσης (salting in) και εξαλάτωσης (salting out) που χρησιμοποιούνται σε πολλές τεχνικές καθαρισμού μορίων [Kensal E. van Holde].



Εικόνα 12. Μηχανισμός της κρυστάλλωσης.

4.2 Συνθήκες για κρυστάλλωση μακρομορίων

Υπάρχουν διάφοροι σημαντικοί παράγοντες (Πίνακας 1), που επηρεάζουν την κρυστάλλωση ενός μορίου. Ίσως ο σημαντικότερος είναι η καθαρότητα του δείγματος, όπου μπορεί να διακριθεί η καθαρότητα από βιοχημική και δομική άποψη. Ένα δείγμα θεωρείται ως *βιοχημικά καθαρό*, όταν κάθε μακομόριο στο δείγμα έχει τον ίδιο μοριακό τύπο. Αυτή είναι σαφώς η ιδανική κατάσταση και γενικά δεν επιτυγχάνεται. Στις περισσότερες περιπτώσεις, ένα μακρομόριο πρέπει να είναι περισσότερο από 95% καθαρό για να παράγει ένα κρύσταλλο. Η *δομική καθαρότητα* αναφέρεται στη διαμόρφωση των μορίων σε ένα συγκεκριμένο δείγμα. Η ενεργειακή διαφορά μεταξύ των διαφόρων διαμορφώσεων ενός μακρομορίου μπορεί να είναι πολύ μικρή. Ακόμη και ένα χημικά καθαρό δείγμα μπορεί να αντιπροσωπεύει έναν ιδιαίτερα ετερογενή πληθυσμό διαμορφώσεων. Κατά συνέπεια, τα διαλύματα και οι μέθοδοι κρυστάλλωσης επιλέγονται έτσι, ώστε να ευνοήσουν τη φυσική διαμόρφωση του μακρομορίου.

Διαπιστώνεται ακόμη, ότι η κρυστάλλωση ενός μακρομορίου απαιτεί την εύρεση συνθηκών που ισορροπούν τη διαλυτότητα με τη δομική ομοιογένεια. Ο προσδιορισμός όμως των συγκεκριμένων συνθηκών κρυστάλλωσης, είναι δύσκολος ακόμη και αν είναι γνωστές οι συνθήκες υπό τις οποίες το μακρομόριο είναι αδιάλυτο και έτσι η εύρεση των συνθηκών κρυστάλλωσης είναι ουσιαστικά μια μέθοδος εμπειρικών δοκιμών.

Για να κατανοηθούν οι τεχνικές κρυστάλλωσης μακρομορίων, πρέπει να συγκριθούν οι μηχανισμοί ανάπτυξης κρυστάλλων με εκείνους της άμορφης κατακρήμνισης. Η υψηλή τάξη των μορίων σε ένα κρυσταλλικό πλέγμα μειώνει σημαντικά την εντροπία σε σχέση με το διάλυμα. Οι εξωτερικοί βαθμοί περιστροφικής και μεταφορικής ελευθερίας (κίνηση ολόκληρου μορίου) σε ένα κρυσταλλικό πλέγμα είναι κατά πολύ λιγότεροι από εκείνους στο διάλυμα. Για παράδειγμα δύο μόρια στο διάλυμα έχουν το καθένα πλήρη μεταφορική και περιστροφική ελευθερία σε τρεις διαστάσεις. Εάν τα δύο μόρια συναθροισθούν, ώστε να *σχηματίσουν τον πυρήνα* ενός κρυσταλλικού πλέγματος οι μετατοπίσεις τους γίνονται απόλυτα συσχετισμένες και οι εξωτερικοί βαθμοί ελευθερίας γίνονται 9 φορές λιγότεροι.

Σ' ένα επόμενο στάδιο, η αύξηση του κρυστάλλου θεωρείται ως προθήκη μορίων στις ήδη υπάρχουσες επιφάνειες του κρυσταλλικού πλέγματος πυρηνοποίησης. Η απώλεια στην εντροπία σε αυτά τα επόμενα βήματα αναμένεται να είναι μικρότερη απ' ότι για το βήμα σχηματισμού του πυρήνα

Επιπλέον παρατηρείται, ότι το στάδιο πυρηνοποίησης απαιτεί μια πολύ μεγάλη οδηγό δύναμη. Η απαραίτητη οδηγός δύναμη για την πυρηνοποίηση προέρχεται από την αύξηση της συγκέντρωσης των μακρομορίων σε τιμή αρκετά υψηλότερη από την εγγενή διαλυτότητά τους (υπερκορεσμένη). Η επακόλουθη προσθήκη μορίων στις κρυσταλλικές επιφάνειες λαμβάνει χώρα σε συγκεντρώσεις χαμηλότερες από τον υπερκορεσμό, κοντά στην εγγενή διαλυτότητα.

Η πυρηνοποίηση που αναφέρθηκε παραπάνω είναι το σημαντικότερο από τα δύο βήματα. Εάν το διάλυμα δεν προσεγγίσει τον υπερκορεσμό, ο πυρήνας δεν σχηματίζεται και ο κρύσταλλος δεν μπορεί να δημιουργηθεί. Από την άλλη, ένα υπέρκορο διάλυμα θα σχηματίσει πολύ γρήγορα πολλαπλούς πυρήνες, που θα εξαντλήσουν τα μόρια από το διάλυμα κρυστάλλωσης. Αυτό οδηγεί σε μία πληθώρα μικροσκοπικών κρυστάλλων. Πρέπει να υπάρξει μια ισορροπία μεταξύ των δύο ακραίων καταστάσεων, προκειμένου να αναπτυχθούν αρκούντως μεγάλοι μονοκρύσταλλοι, οι οποίοι να παράσχουν υψηλής ευκρίνειας, δεδομένα περίθλασης ακτίνων-X. Κατά συνέπεια, το διάλυμα των μακρομορίων πρέπει να συμπυκνωθεί με έναν πολύ καλό ελεγχόμενο τρόπο [Kensal E. van Holde].

4.3 Παράγοντες που επηρεάζουν την διαλυτότητα των πρωτεϊνών

Πίνακας 1: Παρουσίαση φυσικών, χημικών και βιολογικών παραγόντων που επηρεάζουν την κρυστάλλωση πρωτεϊνών.

Φυσικοί παράγοντες	Χημικοί παράγοντες	Βιοχημικοί παράγοντες
θερμοκρασία/ διακυμάνσεις θερμοκρασίας Μεθοδολογία/τρόπος προσέγγισης της ισορροπίας Βαρύτητα Πίεση Χρόνος Δονήσεις / ήχος / μηχανική διαταραχή Ηλεκτρικό/ μαγνητικό πεδίο Διηλεκτρικές ιδιότητες του μέσου Ιξώδες (viscosity) Κατάσταση ισορροπίας Ομοιογένεια/ετερογένεια πυρήνων κρυστάλλωσης	PH Είδος παράγοντα καθίζησης Συγκέντρωση παράγοντα καθίζησης Ιοντική ισχύς Ειδικά ιόντα Βαθμός υπερκορεσμού Αναγωγικό/οξειδωτι κό περιβάλλον Συγκέντρωση πρωτεΐνης Μεταλλικά ιόντα Σταυροδεσμοί Απορρυπαντικά/επι φανειοδραστικές ουσίες/αμφολύτες Προσμίξεις	Καθαρότητα Επίδραση προσδέτη Στάδιο σχηματισμού συσσωματωμάτων ν Μετα- μεταγραφικές τροποποιήσεις Πηγή Πρωτεόλυση /υδρόλυση Χημική τροποποίηση Γενετικές τροποποιήσεις Συμμετρία Σταθερότητα Ισοηλεκτρικό σημείο Ιστορικό δείγματος

❖ **Θερμοκρασία:** Η αύξηση της θερμοκρασίας έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της αταξίας των διαλυμένων μορίων, με αποτέλεσμα να είναι επιτρεπτές μακρομοριακές διευθετήσεις υψηλότερης ελεύθερης ενέργειας ,

εφόσον οι παράμετροι της εντροπίας τείνουν να επικρατήσουν αυτών της ενθαλπίας. Επιπλέον η διηλεκτρική σταθερά μειώνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας [McMurry, 2001].

❖ **pH:** Αλλαγές στο pH επηρεάζουν τόσο το διαλύτη, όσο και τη διαλυμένη ουσία. Το pH εκείνο στο οποίο η πρωτεΐνη δεν παρουσιάζει φορτίο ονομάζεται ισοηλεκτρικό σημείο και η διαλυτότητάς της σ' αυτό είναι η ελάχιστη δυνατή. Παράλληλα σε αυτό το σημείο η πρωτεΐνη διογκώνεται και η ποσότητα του δεσμευμένου νερού ελαχιστοποιείται. Η ρύθμιση του pH γίνεται με τη χρησιμοποίηση κατάλληλων ρυθμιστικών διαλυμάτων [McMurry, 2001].

❖ **Άλατα:** Τα άλατα μπορούν να δράσουν με διάφορους τρόπους κάποιοι από τους οποίους είναι οι εξής:

1. Είναι υπεύθυνα για την ιοντική ισχύ και επηρεάζουν τις μακρομοριακές ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις. Η άπωση μεταξύ ηλεκτρολυτών του ίδιου φορτίου μειώνεται.
2. Μπορούν να σχηματίσουν απ' ευθείας αλληλεπιδράσεις με φορτισμένα αμινοξέα (αργινίνη, λυσίνη, ασπαρτικό, γλουταμικό) στην επιφάνεια των πρωτεϊνών.
3. Δρουν με διπολικές – μονοπολικές αλληλεπιδράσεις με τις διπολικές ομάδες των μακρομορίων (πεπτιδικοί δεσμοί, αμινο-, υδροξυ-, καρβοξυλικές ομάδες και αμίδια) και μπορούν να οδηγήσουν σε μερική αποδιάταξη της πρωτεΐνης.
4. Σχηματίζουν μη πολικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των υδρόφοβων αμινοξέων εκτεθειμένων στο διαλύτη και των υδρόφοβων τμημάτων των οργανικών αλάτων (σουλφονικών, καρβοξυλικών, αμμωνιακών) [McMurry, 2001].

4.4 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. 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 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, *et al.* 1976].

Β.ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η αγγειογενίνη, όπως προαναφέρθηκε, είναι μια πρωτεΐνη που παίζει σημαντικό ρόλο σε ποικίλες διεργασίες του οργανισμού και κυρίως στην επαγωγή της αγγειογένεσης. Παρόλο που έχει μελετηθεί αρκετά, πολλά από τα σηματοδοτικά μονοπάτια στα οποία συμμετέχει καθώς και οι ακριβείς μηχανισμοί δράσης της δεν έχουν ακόμα γίνει γνωστά. Υπάρχουν πολλά

αναπάντητα ερωτήματα σχετικά με τις πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις που δημιουργεί κατά τη μεταφορά της στα διάφορα διαμερίσματα του κυττάρου αλλά και κατά την παραμονή της στον πυρηνίσκο καθώς και με τους υποδοχείς στους οποίους προσδένεται κατά την ενδοκυττάρωσή της και τη μετέπειτα εισαγωγή της στον πυρήνα στα κύτταρα στόχους.

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι ο προσδιορισμός και η ταυτοποίηση των πρωτεϊνών που σχηματίζουν σύμπλοκα με την αγγειογενίνη και για το λόγο αυτό, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοκατακρήμνισης από καρκινικά ενδοθηλιακά κύτταρα του πνεύμονα (EA.hy926). Οι πρωτεΐνες ανιχνεύθηκαν μέσω χρώσης της πηκτής με νιτρικό άργυρο και ο έλεγχος της ανοσοκατακρήμνισης έγινε με αποτύπωση κατά Western. Τέλος, η ταυτοποίηση των πρωτεϊνών που πιθανόν σχηματίζουν πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις με την πρωτεΐνη στόχο έγινε με φασματομετρία μάζας.

Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε απομόνωση και καθαρισμός της ανασυνδυασμένης ανθρώπινης αγγειογενίνης με χρωματογραφικές μεθόδους, με σκοπό αρχικά την εξωγενή προσθήκη της στην αθανατοποιημένη ανθρώπινη κύτταρική σειρά EA.hy926 για την πραγμάτωση των πειραμάτων ανοσοκατακρήμνισης και στη συνέχεια τη χρήση της για την εφαρμογή ποικίλων συνθηκών κρυστάλλωσής της στην ανοιχτή της διαμόρφωση. Στην προσπάθεια κρυστάλλωσης της αγγειογενίνης χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος διάχυσης ατμών χρησιμοποιώντας τις τεχνικές της κρεμάμενης και καθήμενης σταγόνας.

Γ. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1.Ανοσοκατακρήμνιση πρωτεϊνών

Αντιδραστήρια

- Acetic acid (Merck)
- Acrylamide (SERVA)
- Ammonium Persulfate (APS) (SIGMA)

- Antibiotic-Antimycotic (Biosera)
- Bovine Serum Albumin (BSA) (New England Biolabs)
- Bradford protein assay (Bio-rad)
- Dimethyl sulfoxide DMSO (SIGMA)
- DMEM (Biosera)
- ECL(GenScript)
- Fetal Bovine Serum FBS (Gibco)
- Formaldehyde (Applichem)
- Glycerol (Panreac)
- Glycine (Biochemica)
- Hydrochloric Acid (HCl) (Merck)
- Magnesium Chloride Hexahydrate ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (Panreac)
- Methanol (Applichem)
- Potassium Chloride (KCl) (Merck)
- Protease Inhibitors (Roche)
- protein marker (Nippon Genetics)
- SDS (Sodium dodecyl Sulfate) (SERVA)
- Silver Nitrate (AgNO_3) (Panreac)
- Sodium Bicarbonate (NaHCO_3) (Merk)
- Sodium Carbonate Anhydrous (Na_2CO_3) (Panreac)
- Sodium Chloride (NaCl) (Applicem)
- Sodium diHydrogen Phosphate (Merck)
- Sodium Thiosulfate pentahydrate ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) (ChemLab)
- Sucrose(Duchefa Biochemie)
- TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine)(Research Organics)
- Tris Base (Merck)
- Triton X-100(Merck)
- Trypsin-EDTA 5% 10x (Gibco)
- Tween- 20 (Biochemica)
- Αντίσωμα ελέγχου ποντικού IgG (Santa Cruz)
- β - Mercaptoethanol (Riedel de Haën)
- Μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού έναντι ανθρώπινης αγγειογενίνης (hAng) (Santa

Cruz)

- σφαιρίδια αγαρόζης με πρωτεΐνες A/G (Santa Cruz)

Αρχή μεθόδου

Η ανοσοκατακρήμνιση αποτελεί μια τεχνική κατά την οποία πρωτεϊνικά αντιγόνα προσδένονται σε αντισώματα δημιουργώντας σύμπλοκα τα οποία ανοσοκατακρημνίζονται (Εικόνα 13). Στη συνέχεια απομονώνεται το αντιγόνο από το ανοσο-σύμπλοκο για να επιτευχθεί ηλεκτροφορητική ανάλυση. Η συγκεκριμένη τεχνική στηρίζεται στην παρουσία πρωτεϊνών G ή A οι οποίες δεσμεύονται σε σφαιρίδια αγαρόζης που μπορούν να αλληλεπιδρούν με το Fc τμήμα των ανοσοσφαιρινών τάξης G και σχηματίζουν σύμπλοκα με τις πρωτεΐνες. Με τον τρόπο αυτό είναι δυνατή η κατακρήμνιση των συμπλόκων και η απομόνωση των πρωτεϊνών από κυτταρικά εκχυλίσματα (Ausubel, *et al.* 1987).



Εικόνα 13: Σχηματική αναπαράσταση ανοσοκατακρήμνισης

1. Ανακαλλιέργεια κυττάρων

Για την τεχνική της ανοσοκατακρήμνισης χρησιμοποιήθηκε η υβριδική ανθρώπινη καρκινική κυτταρική σειρά ενδοθηλιακών κυττάρων ομφαλίου λώρου με καρκινικά κύτταρα πνεύμονα A547, EA.hy926. Η κυτταρική σειρά

EAhy926 αναπτύχθηκε και διατηρήθηκε σε υγρή ατμόσφαιρα 37°C με 5 % CO₂ σε μονόστρωμα προσκολλημένης καλλιέργειας παρουσία θρεπτικού υλικού DMEM εμπλουτισμένο με 10% FBS (ορός εμβρύου μόσχου) και 1% αντιβιοτικό/ αντιμυκητιακό (Πίνακας 2).

*Οι διαδικασίες των κυτταροκαλλιιεργειών πραγματοποιήθηκαν σε αποστειρωμένες συνθήκες και σε απαγωγό καθέτου νηματικής ροής.

Πίνακας 2: Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν κατά την ανακαλλιέργεια της κυτταρικής σειράς *Ea.hy926*

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ		
FBS		Ορός εμβρύου μόσχου(Gibco)
DMEM		[+] 4,5gl L-D- Glycose [+] L- Glutamine [+] Pyruvate
Trypsin-EDTA 5% 10x		
Αντιβιοτικό/Αντιμυκητιακό		
PBS	137mM NaCl 2,7mM KCl 10mM Na ₂ HPO ₄ 1.8mM KH ₂ PO ₄	pH: 7,4

❖ Απόψυξη κυττάρων *Ea.hy926*

Τα φιαλίδια (cryovials) με τα κύτταρα είναι αποθηκευμένα σε υγρό άζωτο. Αρχικά, τα φιαλίδια εμβαπτίστηκαν σε υδατόλουτρο (37ο C) με ήπια ανάδευση για να ξεπαγώσουν ομοιόμορφα τα κύτταρα. Μόλις ξεπαγώσουν, το φιαλίδιο καθαρίστηκε εξωτερικά με 70% αιθανόλη. Τα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν για 5 λεπτά σε 1000 στροφές στους 20° C. Στη συνέχεια, απομακρύνθηκε το αρχικό κρυοπροστατευτικό θρεπτικό υλικό των κυττάρων, το οποίο περιείχε DMSO, το οποίο δρα ανασταλτικά στην ανάπτυξή τους.

Επόμενο βήμα, ήταν η επαναδιάλυση του ιζήματος των κυττάρων σε 10ml θρεπτικό υλικό DMEM με 10% FBS και 1% αντιβιοτικό/ αντιμυκοτικό. Τα κύτταρα μεταφέρθηκαν σε πλαστική φλάσκα (75T) και μεταφέρθηκαν σε υγρή ατμόσφαιρα 37°C με 5 % CO₂ (επωαστήρας).

❖ *Ανακαλλιέργεια μονόστιβης καλλιέργειας-Τρυψινοποίηση*

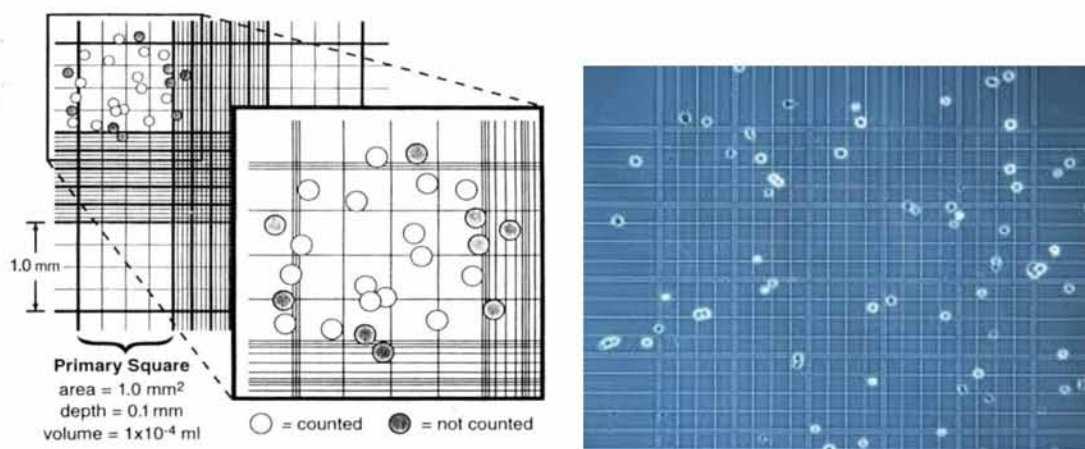
Η θρυψινοποίηση είναι απαραίτητη για την ανακαλλιέργεια των κυττάρων. Για να πραγματοποιηθεί θρυψινοποίηση, η πληρότητα των κυττάρων στο ταπήτιο της φλάσκας ανάπτυξης θα πρέπει να είναι 90-100%. Αρχικά, παρατηρήθηκε η μορφολογία και η πληρότητα των κυττάρων στο μικροσκόπιο. Στη συνέχεια, απομακρύνθηκε με αναρρόφηση το θρεπτικό υλικό. Έπειτα, πραγματοποιήθηκαν 2 πλύσεις των κυττάρων με διάλυμα PBS 1X (Πίνακας 3). Μετά τις πλύσεις, προστέθηκε 0,5ml διαλύματος θρυψίνης-EDTA 0.05% 1X. η φλάσκα (T75) ανακινήθηκε ώστε το διάλυμα θρυψίνης να καλύψει όλο το ταπήτιο της φλάσκας. Τα κύτταρα επώαστηκαν για 1 λεπτό περίπου με το διάλυμα θρυψίνης, το οποίο στη συνέχεια αφαιρέθηκε με αναρρόφηση. Η φλάσκα μεταφέρθηκε στον επωαστήρα για 2-3 λεπτά. Το σχήμα των κυττάρων παρατηρήθηκε στο μικροσκόπιο. Στη συνέχεια, τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε 10 ml θρεπτικού υλικό. Στο σημείο αυτό, τα κύτταρα είτε χωρίστηκαν σε 2 ή

περισσότερες φλάσκες είτε απομακρύνθηκαν τα μισά κύτταρα στην ήδη υπάρχουσα φλάσκα, ανάλογα με την επιθυμητή πληρότητα.

❖ Συλλογή κυττάρων

Για την συλλογή των κυττάρων πραγματοποιήθηκε η διαδικασία της θρυψιμοποίησης. Μετά των επαναιώρηση τους, τα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν για 5 λεπτά σε 1000 στροφές στους 20° C. Πριν την φυγοκέντρωση, λήφθηκαν 10μl από το δείγμα των κυττάρων για τον υπολογισμό του αριθμού των κυττάρων στο αιμοκυτταρόμετρο Neubauer (*Εικόνα 14*). Μετά την φυγοκέντρωση, απομακρύνθηκε το θρεπτικό υλικό και το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλυτοποιήθηκε σε 1,5ml PBS 1X και 1mM PMSF. Τέλος, τα κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν (5', 1000 στροφές, 20° C) και το ίζημα αποθηκεύτηκε στους -80° C.

Για την ψύξη των κυττάρων για μετέπειτα καλλιέργεια ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία. Όμως, μετά την πρώτη φυγοκέντρωση, το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλυτοποιήθηκε σε διάλυμα θρεπτικού υλικού που περιείχε 5% DMSO, το οποίο όπως προαναφέρθηκε δρα ως κρυοπροστατευτικό για τα κύτταρα. Τα κύτταρα αποθηκεύτηκαν σε cryobox (στο οποίο πραγματοποιείται αργή ψύξη των κυττάρων (1°C/1 min) λόγω της παρουσίας της ισοπροπανόλης, η οποία περιβάλλει τις ειδικές θέσεις για cryovials που υπάρχουν στο cryobox) στους -80°C.



Εικόνα 14: Αιμοκυτταρόμετρο Neubauer

2. Λύση κυττάρων (σύμφωνα με πρωτόκολλο *abcam RIP*)

Κατά τη διαδικασία αυτή, τα κύτταρα μιας φλάσκας 75 cm² (7-10 x 10⁶ κύτταρα) λύνονται με διάλυμα (1ml PBS, 1ml nuclear isolation buffer (NIB) και 3ml υπερκάθαρο νερό (MilliQ H₂O)) το οποίο περιέχει απορρυπαντικό, προκειμένου να σπάσουν οι μεμβράνες των κυττάρων και αναστολείς πρωτεϊνών για να προστατευθούν οι πρωτεΐνες από πρωτεολυτική διάσπαση. Τα κύτταρα επώαστηκαν για 30 λεπτά στον πάγο. Κατόπιν, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση και το υπερκείμενο περιλαμβάνει το διαλυτό κλάσμα των ολικών πρωτεϊνών των κυττάρων. Η διαδικασία πραγματοποιείται σε πάγο προκειμένου να ανασταλεί η δράση των πρωτεϊνών και να παραταθεί η διατήρηση των πρωτεϊνών. Τέλος, το διάλυμα φυγοκεντρήθηκε και συλλέχθηκε το υπερκείμενο το οποίο περιέχει τις πρωτεΐνες του κυτταροπλάσματος.

Πίνακας 3: Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για την λύση των κυττάρων

PBS	137mM NaCl 2,7mM KCl 10mM Na ₂ HPO ₄ 1,8mM KH ₂ PO ₄	pH: 7,4
Nuclear Isolation Buffer	1,28M sucrose	

	40mM Tris-Hcl pH: 7,5 20mM MgCl ₂ 2% Triton X-100 + μίγμα αναστολέων πρωτεασών (PI cocktail tablets, Roche)
MilliQ	

3.Δημιουργία συμπλόκου σφαιριδίων αγαρόζης με πρωτεΐνες A/G και μονοκλωνικού αντισώματος έναντι hAng.

Σε 0,5 mL διαλύματος λύσης των κυττάρων προστέθηκαν 40μl σφαιριδίων αγαρόζης με πρωτεΐνες A/G και 4μg μονοκλωνικού αντισώματος ποντικού (1-2μg/ 500μg πρωτεϊνών) έναντι της hAng (καθώς η συγκέντρωση των πρωτεϊνών στο κυτταρόπλασμα είναι περίπου 1mg, μετά από ποσοτικοποίηση με τη μέθοδο Bradford). Το διάλυμα επώαστηκε για 6 ώρες στους 4°C υπό ανάδευση. Μετά την επώαση πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρωση σε 2500g για 2 λεπτά στους 4°C, καθώς και 2 πλύσεις του ιζήματος με το διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε για την λύση των κυττάρων (φυγοκέντρωση σε 2500g για 2 λεπτά στους 4°C).

4.Προσθήκη ανασυνδυασμένης ανθρώπινης αγγειογενίνης στο σύμπλοκο σφαιριδίων αγαρόζης με πρωτεΐνες A/G και μονοκλωνικού αντισώματος έναντι hAng

Σε 0,5ml διαλύματος λύσης που περιέχει τα σύμπλοκα πρωτεϊνών A/G-αντισώματος, προστέθηκαν 4μg αγγειογενίνης. Δεδομένου ότι το μοριακό βάρος του αντισώματος είναι 150kDa και της αγγειογενίνης 14kDa και ότι 1 μόριο αντισώματος προσδένει θεωρητικά 1 μόριο αγγειογενίνης, η αναλογία αγγειογενίνης προς αντίσωμα είναι περίπου 1:10. Το διάλυμα επώαστηκε για 7 ώρες στους 4°C υπό ανάδευση.

5.Επεξεργασία πρωτεϊνικού εκχυλίσματος κυττάρων

Στο διάλυμα που περιείχε τις πρωτεΐνες του κυτταροπλάσματος

πραγματοποιήθηκε υπολογισμός της συγκέντρωσης μέσω της μεθόδου Bradford.

❖ *Εκτίμηση της συγκέντρωσης πρωτεϊνών σε διάλυμα*

Η εύρεση της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών που περιέχονται σε ένα διάλυμα γίνεται εύκολα με χρωματομετρικές μεθόδους, ή με τη μέτρηση της οπτικής απορρόφησης των δειγμάτων σε μήκος κύματος 280 nm. Τα τελευταία χρόνια ως μέθοδος εκλογής χρησιμοποιείται η μέθοδος Bradford, λόγω της ευκολίας και της ταχύτητας με την οποία μπορεί να πραγματοποιηθεί. Η μέθοδος αυτή εξαρτάται από τη δέσμευση της χρωστικής Coomassie G-250, κυρίως στα βασικά αμινοξέα των πρωτεϊνών, αλλάζοντας ταυτόχρονα το μήκος κύματος της μέγιστης απορρόφησης τους. Η δέσμευση αυτή είναι ανάλογη της ποσότητας των πρωτεϊνών (Bradford 1976). Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης αγνώστου δείγματος χρησιμοποιείται πρότυπη καμπύλη, η οποία κατασκευάζεται με τη βοήθεια γνωστών συγκεντρώσεων της πρωτεΐνης αλβουμίνης ορού βοός (BSA). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η πρότυπη πρωτεΐνη διαλύεται σε ίδιας σύστασης ρυθμιστικό διάλυμα, στο οποίο είναι διαλυμένες οι άγνωστες πρωτεΐνες (Bradford et al., 1976).

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης κάθε δείγματος, λαμβάνεται μικρή ποσότητα πρωτεϊνών από κάθε δείγμα (π.χ 10μl) και προστίθεται σε τελικό όγκο 1mL αντιδραστηρίου Bradford 1X και τα διαλύματα επωάζονται για 10 λεπτά στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, υπολογίζεται η φασματοφωτομετρική τους απορρόφηση σε μήκος κύματος $\lambda = 595\text{nm}$. Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών σε κάθε διάλυμα έχει πραγματοποιηθεί προηγουμένως προσδιορισμός της πρότυπης καμπύλης με γνωστές συγκεντρώσεις της βόειας αλβουμίνης ορού (BSA). Χρησιμοποιώντας την εξίσωση της πρότυπης καμπύλης ($OD_{595\text{nm}} = f(CBSA)$) γίνεται ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών που εμπεριέχονται στα διαλύματα σε μονάδες mg/mL.

Στο συγκεκριμένο δείγμα βρέθηκε πως η συγκέντρωση των πρωτεϊνών είναι 2mg/ml.

6. Προ-εκκαθάριση

Στόχος του συγκεκριμένου βήματος, είναι η δέσμευση πρωτεϊνών –εκτός της αγγειογενίνης- στο μη-ειδικό αντίσωμα. Με τον τρόπο αυτό, αποφεύχθηκαν οι μη-ειδικές συνδέσεις πρωτεϊνών με το ειδικό αντίσωμα. Η πλειοψηφία των πρωτεϊνών που δεν σχηματίζουν σύμπλοκα με την αγγειογενίνη προσδέθηκε στο αντίσωμα IgG και κατακρημνίστηκε με τα σφαιρίδια αγαρόζης. Το δείγμα που επώαστηκε με το μη-ειδικό αντίσωμα IgG λειτούργησε ως δείγμα ελέγχου.

Στο πρωτεϊνικό διάλυμα προστέθηκαν 2μg (0,5μg/ 500μg πρωτεϊνών) του πρώτου μη-ειδικού αντισώματος IgG και ακολούθησε επώαση για 1 ώρα στον πάγο. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 60μl σφαιριδίων αγαρόζης με πρωτεΐνες A/G και επώαστηκαν για 30 λεπτά στους 4° C υπό ανάδευση, για να συνδεθεί το αντίσωμα στα σφαιρίδια αγαρόζης. Στη συνέχεια, το διάλυμα φυγοκεντρήθηκε (2500 rpm, 5', 4° C). Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και αποθηκεύτηκε για την συνέχεια της διαδικασίας. Το σύμπλοκο σφαιριδίων αγαρόζης και αντισώματος ελέγχου κατακρημνίστηκε και ακολούθησαν 2 πλύσεις με PBS και αναστολείς πρωτεασών (total PIs). Μετά τη φυγοκέντρωση της δεύτερης πλύσης (2500 rpm, 5', 4° C), το υπερκείμενο απομακρύνθηκε, προστέθηκαν 40μl ρυθμιστικού διαλύματος φόρτωσης 1X, το δείγμα επώαστηκε για 15 λεπτά στους 95°C ώστε να επιτευχθεί η πλήρης αποδιάταξη των πρωτεϊνών που περιέχονται στο δείγμα ελέγχου (IgG) και αποθηκεύτηκε στους -20° C για μετέπειτα χρήση.

7. Προσθήκη πρωτεϊνών στο σύμπλοκο ανασυνδυασμένη ανθρώπινη αγγειογενίνη(hAng)/Μονοκλωνικό Αντίσωμα έναντι αγγειογενίνης/σφαιρίδια αγαρόζης με πρωτεΐνες A/G

Το σύμπλοκο hAng/ πρωτεϊνών A/G μετά την επώαση των 7 ωρών

κατακρημνίστηκε και πλύθηκε με το διάλυμα λύσης των κυττάρων που περιέχει αναστολείς πρωτεασών (total PIs) δύο φορές (φυγοκέντρωση σε 2500g, 2 λεπτά, 4°C). Στη συνέχεια, στο σύμπλοκο αυτό προστέθηκαν οι πρωτεΐνες που ανακτήθηκαν μετά τη διαδικασία του προ-καθαρισμού με το αντίσωμα ελέγχου IgG. Το δείγμα επώαστηκε για 12 ώρες στους 4°C υπό ανάδευση και έπειτα προστέθηκε ριβονουκλεάση A (RNase A) σε συγκέντρωση 5μg/ml και το δείγμα παρέμεινε για επιπλέον 2 ώρες στον πάγο προκειμένου να γίνει πέψη του RNA.

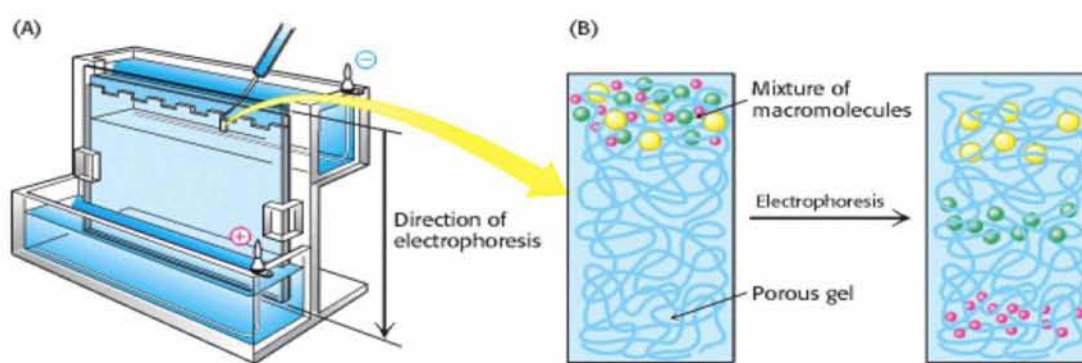
8. Προετοιμασία δειγμάτων

Τελευταίο στάδιο ήταν η φυγοκέντρωση του πρωτεϊνικού δείγματος (2500 rpm, 5 λεπτά, 4°C) και οι πλύσεις του με το διάλυμα λύσης που περιέχει αναστολείς πρωτεασών 3 φορές. Στο δείγμα προστέθηκαν 40μl ρυθμιστικού διαλύματος φόρτωσης 1X και ακολούθησε επώασή του για 15 λεπτά στους 95°C, ώστε να επιτευχθεί η πλήρης αποδιάταξη των πρωτεϊνών που περιέχονται σε αυτό. Τα δείγματα (ανοσοκατακρήμνισμα αγγειογενίνης και ανοσοκατακρήμνισμα ελέγχου) ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου υπό συνθήκες αποδιάταξης με στόχο την εμφάνιση των πρωτεϊνών που συμμετέχουν στο σχηματισμό των συμπλόκων είτε μη ειδικά (δείγμα ελέγχου) είτε ειδικά με την αγγειογενίνη..

9. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE)

Η ηλεκτροφόρηση πηκτής ακρυλαμίδιου είναι μια αναλυτική μέθοδος διαχωρισμού των συστατικών ενός μίγματος πρωτεϊνών βάσει του μεγέθους τους. Η τεχνική αυτή βασίζεται στην αρχή πως ένα φορτισμένο μόριο θα μεταναστεύσει σε ένα ηλεκτρικό πεδίο. Η κοινή πορεία, από την κάθοδο προς την άνοδο, όλων των μορίων που περιέχονται σε κάθε δείγμα, εξασφαλίζεται με την προσθήκη του αποδιατακτικού παράγοντα SDS, ο οποίος θα καταργήσει τις

ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μορίων φορτίζοντάς τα αρνητικά και προσδίδοντάς τους ένα σταθερό λόγο ανιονικού φορτίου προς μάζα, ώστε να μεταναστεύσουν όλα προς την άνοδο, και να διαχωριστούν όχι βάσει του φορτίου τους, αλλά βάσει του μοριακού τους βάρους. Καθώς οι πρωτεΐνες ανάλογα με το μέγεθός τους εμφανίζουν αντίστοιχη αύξηση της τριβής κατά την κίνησή τους διαμέσου των πόρων της πηκτής, όσο μεγαλύτερο είναι το μοριακό βάρος μιας πρωτεΐνης, άρα και όσο μεγαλύτερο το μέγεθός της, τόσο μικρότερη είναι η κινητικότητα του μορίου αυτού στην πηκτή (*Εικόνα 15*) (Stryer L.,2012).



Εικόνα15: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου

Στο συγκεκριμένο πείραμα, χρησιμοποιήθηκε 10% συγκέντρωση πηκτής πολυακρυλαμιδίου. Για την ανοσοαποτύπωση και για την χρώση με νιτρικό άργυρο χρειάστηκαν 2 πηκτές πολυακρυλαμιδίου, στις οποίες φορτώθηκαν 10μl κάθε δείγματος σε κάθε μία πηκτή.

Πίνακας 4: Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν κατά την παρασκευή των πηκτών

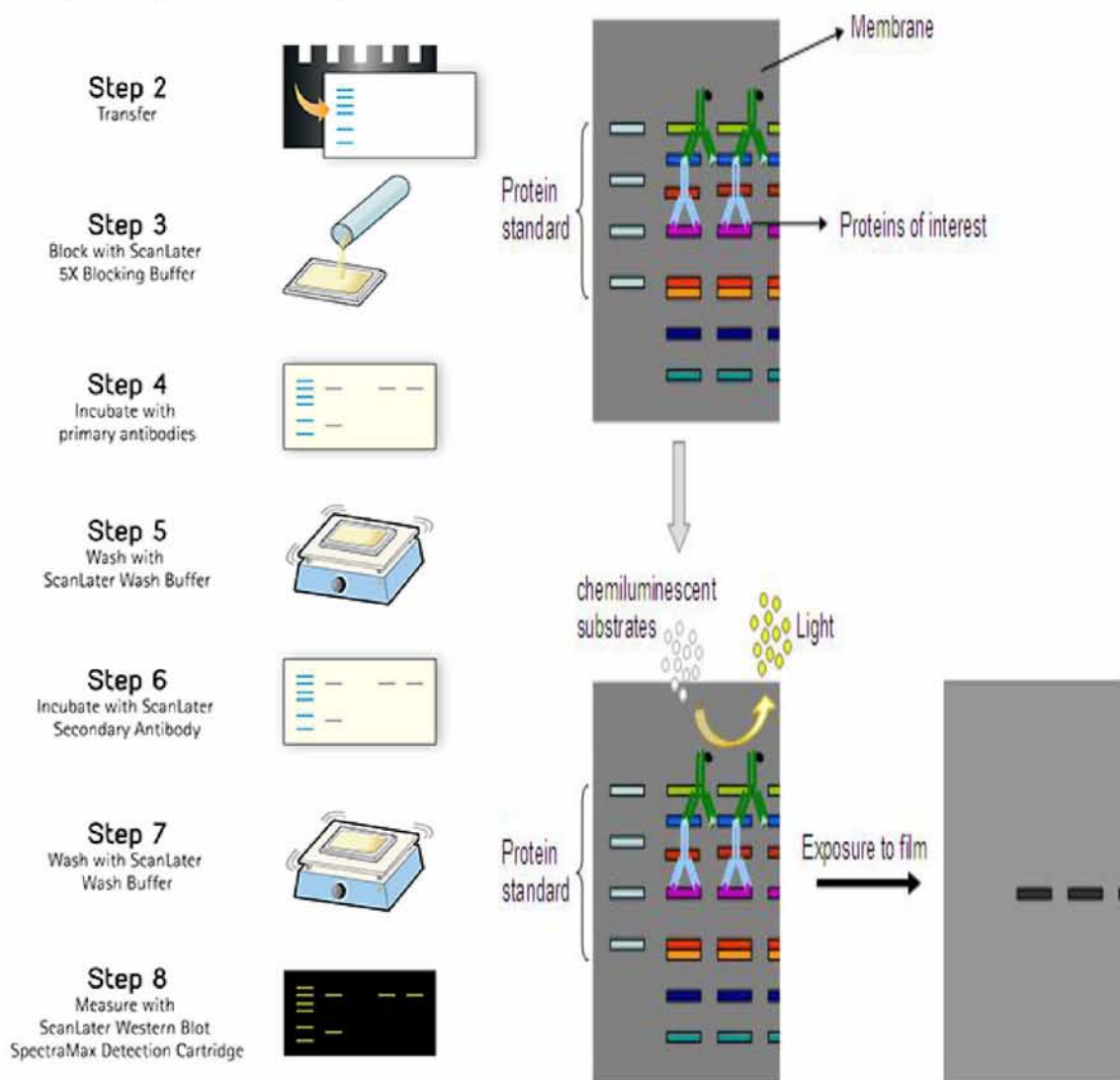
ΠΗΚΤΗ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ		ΠΗΚΤΗ ΕΠΙΣΤΟΙΒΑΞΗΣ	
10%		5%	
dH ₂ O	1.9ml	dH ₂ O	2.1ml
Tris-HCl 1.5M	1.3ml	Tris-HCl 1.5M	380μl
pH:8.8		pH:6.8	
SDS 10%	50μl	SDS 10%	30μl
Acrylamide mix	1.7ml	Acrylamide mix	500μl

30%		30%	
APS 10%	50μl	APS 10%	30μl
TEMED	2μl	TEMED	3μl

10.Ανοσοαποτύπωση (Western blotting)

Η τεχνική της ανοσοαποτύπωσης στηρίζεται στο γεγονός ότι τα σύμπλοκα πρωτεϊνών-SDS (τα οποία είναι αρνητικά φορτισμένα), μετακινούνται με την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου προς την άνοδο, εξέρχονται από την πηκτή και καθιλώνονται στη μεμβράνη λόγω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων. Στη μεμβράνη, οι πρωτεΐνες αντιδρούν πιο εύκολα με το αντίσωμα που προστίθεται μετά και είναι ειδικό για την πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει. Το σύμπλοκο αντισώματος- αντιγόνου στην επιφάνεια μπορεί να ανιχνευθεί με την προσθήκη ενός δεύτερου αντισώματος ειδικού για το πρώτο. Με σκοπό να οπτικοποιήσουμε την ειδική πρόσδεση του πρωτογενούς αντισώματος χρησιμοποιούμε τη μέθοδο της χημειοφωταύγειας (*Εικόνα 16*). Με τη μέθοδο αυτή, το ένζυμο της υπεροξειδάσης, το οποίο είναι δεσμευμένο στο δευτερογενές αντίσωμα, αντιδρά με το υπόστρωμα, το υπεροξείδιο του υδρογόνου-H₂O₂ και ένα συστατικό που έχει την ικανότητα να εκπέμπει φως, όπως είναι η λουμινόλη. Αυτή η αντίδραση έχει ως συνέπεια την εκπομπή

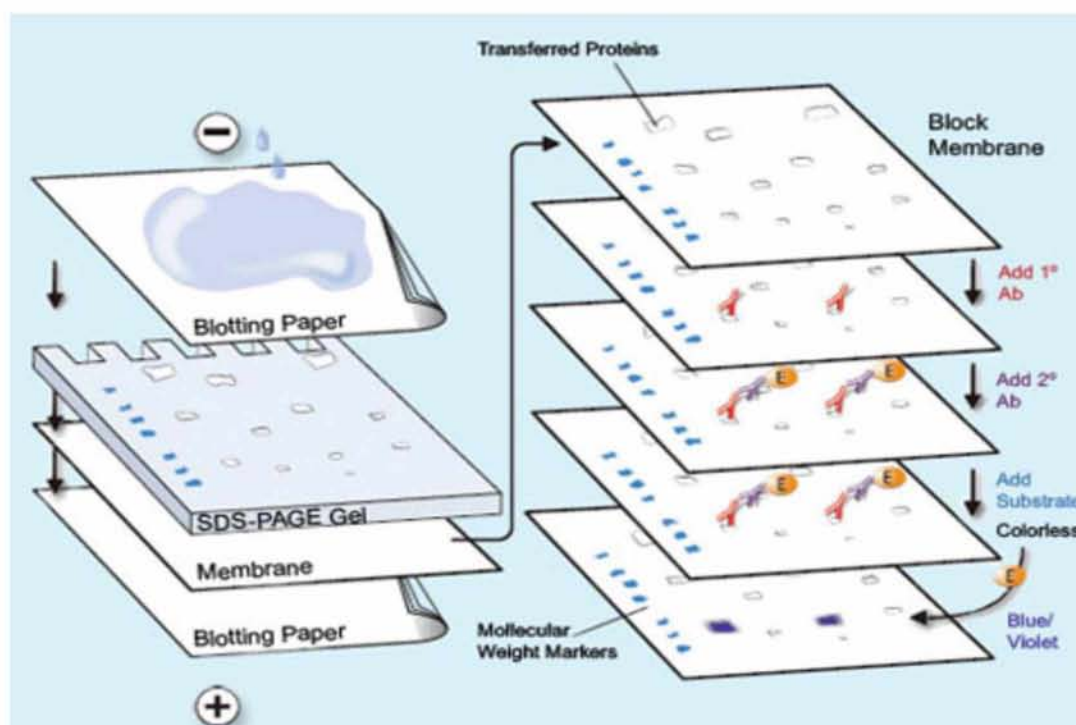
φωτός, η οποία μπορεί να ανιχνευθεί χρησιμοποιώντας ένα φωτοευαίσθητο φιλμ. (Stryer L.,2012).



Εικόνα16 : Αποτύπωση Western. Αριστερά παρουσιάζονται τα στάδια της ανοσοαποτύπωσης και αριστερά η μέθοδος της χημειοφωταύγειας

Η πρώτη πηκτή χρησιμοποιήθηκε για την αποτύπωση Western. Αρχικά, τοποθετήθηκε η πηκτή και η μεμβράνη PVDF στη συσκευή ηλεκτρομεταφοράς ανάμεσα σε 6 χαρτιά Whatman (Εικόνα 17), αφού είχε προηγηθεί η μεταφορά τους σε ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς (transfer buffer, Πίνακας 5) και η εμβάπτιση της μεμβράνης σε 100% μεθανόλη για 30 δευτερόλεπτα, για ενεργοποίηση της μεμβράνης. Πιο συγκεκριμένα, στο θετικό πόλο της συσκευής

τοποθετήθηκαν τα 3 πρώτα χαρτιά Whatman, τα οποία περιχύνονταν με διάλυμα μεταφοράς. Έπειτα, τοποθετήθηκε η μεμβράνη και από πάνω της η πηκτή. Τέλος, από πάνω τοποθετήθηκαν τα υπόλοιπα 3 χαρτιά Whatman. Η επαφή μεταξύ πηκτής και μεμβράνης πρέπει να είναι άμεση χωρίς την παρεμβολή φυσαλίδων που παρεμποδίζουν την διέλευση του ηλεκτρικού ρεύματος. Η μεταφορά γίνεται κάτω από σταθερή ένταση ρεύματος 270mA για 50 λεπτά.



Εικόνα 17: Διαδικασία ηλεκτρομεταφοράς

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε η τεχνική της ανοσοανίχνευσης, δηλαδή ο εντοπισμός της καθηλωμένης στη μεμβράνη πρωτεΐνης με τη βοήθεια αντισώματος. Η μεμβράνη PVDF (φθοριούχο πολυβινυλιδένιο), μετά την ηλεκτρομεταφορά εμβαπτίστηκε υπό ήπια ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα σε διάλυμα κορεσμού (Blocking buffer), ώστε να κορεστεί η μεμβράνη από την καζεΐνη του γάλακτος και να αποφευχθούν μη ειδικές αλληλεπιδράσεις της μεμβράνης με το αντίσωμα. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε

επώαση της μεμβράνης με το πρώτο αντίσωμα (μονοκλωνικό, ειδικό έναντι της ανθρώπινης αγγειογενίνης) σε αναλογία 1:200, σε διάλυμα κορεσμού υπό συνεχή ανακίνηση για 16 ώρες στους 4° C. Ακολούθησαν 3 πλύσεις των 30 λεπτών με διάλυμα έκπλυσης, ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια του πρώτου αντισώματος.

Επόμενο βήμα, είναι η επώαση της μεμβράνης με το δεύτερο αντίσωμα σε αναλογία 1:7000 σε διάλυμα κορεσμού για 1 ώρα υπό συνεχή ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, ακολούθησαν 3 πλύσεις των 30 λεπτών με διάλυμα έκπλυσης. Τελευταίο βήμα είναι η εμφάνιση των πρωτεϊνών με την μέθοδο της χημειοφωταύγειας. Η μεμβράνη καλύφθηκε με διάλυμα των αντιδραστηρίων ECL (H_2O_2 -λουμινόλη) για περίπου 3 λεπτά. Ακολούθως, καλύφθηκε με μεμβράνη απλής χρήσης και τοποθετήθηκε στο μηχάνημα εμφάνισης FluorChem™ E System. Το μηχάνημα χρησιμοποιεί τη μέθοδο της χημειοφωταύγειας. Ο χρόνος εμφάνισης ποικίλλει από 30 δευτερόλεπτα μέχρι 20 λεπτά.

Πίνακας 5: Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν κατά την αποτύπωση Western

Διάλυμα μεταφοράς	25mM Tris-HCl 192mM Γλυκίνη 0.1% SDS 10%Μεεθανόλη	
Διάλυμα κορεσμού	5% γάλα σε σκόνη 0,1% Tween 20	
PBS	137mM NaCl 2,7mM KCl 10mM Na ₂ HPO ₄ 1,8mM KH ₂ PO ₄	pH: 7,4
Διάλυμα έκπλυσης 0,1%	PBS Tween 20	

11.Χρώση με νιτρικό άργυρο

Η χρώση με νιτρικό άργυρο βασίζεται στην εξειδικευμένη δέσμευση ιόντων σιδήρου στις σουλφιδικές και καρβοξυτελικές ομάδες των πρωτεϊνικών μορίων. Αποτελεί μια υπερευαίσθητη μέθοδο ανίχνευσης πρωτεϊνών, 10-100 φορές πιο ευαίσθητη από τη χρώση με Coomassie Blue.

Μετά την ηλεκτροφόρηση η δεύτερη πηκτή επωάστηκε για 20 λεπτά υπό ανάδευση με διάλυμα σταθεροποίησης (fixation buffer, Πίνακας 6). Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε επώαση με 50% μεθανόλη για 10 λεπτά και ακολούθησαν 6 πλύσεις των 10 λεπτών με απιονισμένο νερό. Έπειτα, προστέθηκε διάλυμα ευαισθητοποίησης (sensitize buffer, Πίνακας 6) για 1 λεπτό και πραγματοποιήθηκαν 2 πλύσεις με απιονισμένο νερό. Στη συνέχεια η πηκτή επωάστηκε για 20 λεπτά στο διάλυμα νιτρικού αργύρου υπό ανάδευση και σε σκοτεινό περιβάλλον. Τέλος, κατά την επώαση με το διάλυμα εμφάνισης (developer buffer, Πίνακας 6) που ακολουθεί εμφανίστηκαν οι πρωτεϊνικές ζώνες. Η αντίδραση τερματίστηκε με προσθήκη διαλύματος οξικού οξέος, και η πηκτή αποθηκεύεται σε απιονισμένο νερό.

Πίνακας 6: Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν κατά την χρώση με νιτρικό άργυρο

Διάλυμα σταθεροποίησης	50% Methanol 5% acetic acid
Διάλυμα ευαισθητοποίησης	0,775gr Na ₂ S ₂ O ₃ 250ml ddH ₂ O
Διάλυμα εμφάνισης	5gr Na ₂ CO ₃ 100μl φορμαλδεΰδη 250ml ddH ₂ O

12. Φασματομετρία Μάζας (Mass Spectrometry)

Η φασματομετρία μάζας αποτελεί μια αναλυτική τεχνική ταυτοποίησης και προσδιορισμού μιας ένωσης από τις πληροφορίες που παρέχει το φάσμα μάζας της. Πιο συγκεκριμένα, στη φασματομετρία μάζας τα μόρια μιας ένωσης που βρίσκονται σε αέρια φάση, βομβαρδίζονται από ένα ρεύμα ηλεκτρονίων υψηλής ενεργειακής στάθμης σε συνθήκες υψηλού κενού. Η πρόσκρουση των ηλεκτρονίων στα μόρια μιας ένωσης, έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία θετικά φορτισμένων ιόντων. Τα θετικά ιόντα με την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου ευθυγραμμίζονται σε λεπτή δέσμη. Στη συνέχεια, η διέλευση της δέσμης των θετικών ιόντων μέσω ηλεκτρομαγνητικού πεδίου γίνεται βάσει του λόγου μάζας προς φορτίο (m/z). Με κατάλληλο ανιχνευτή καταγράφεται το ηλεκτρικό ρεύμα που παρέχουν τα ιόντα με διαφορετικό λόγο m/z , οπότε το διάγραμμα έντασης του ρεύματος που καταγράφεται (σε σχετικές μονάδες) ως προς τον λόγο m/z ονομάζεται φάσμα μαζών της ουσίας. Το κάθε φασματογράφημα είναι χαρακτηριστικό για κάθε ουσία και χρησιμοποιείται για την ταυτοποίησή της.

Τα κυριότερα πλεονεκτήματα της φασματομετρίας μάζας είναι η υψηλή ευαισθησία και η ειδικότητα κατά την ταυτοποίηση ουσιών. Το κυριότερο μειονέκτημά της είναι το μεγάλο κόστος αγοράς και συντήρησης των οργάνων.

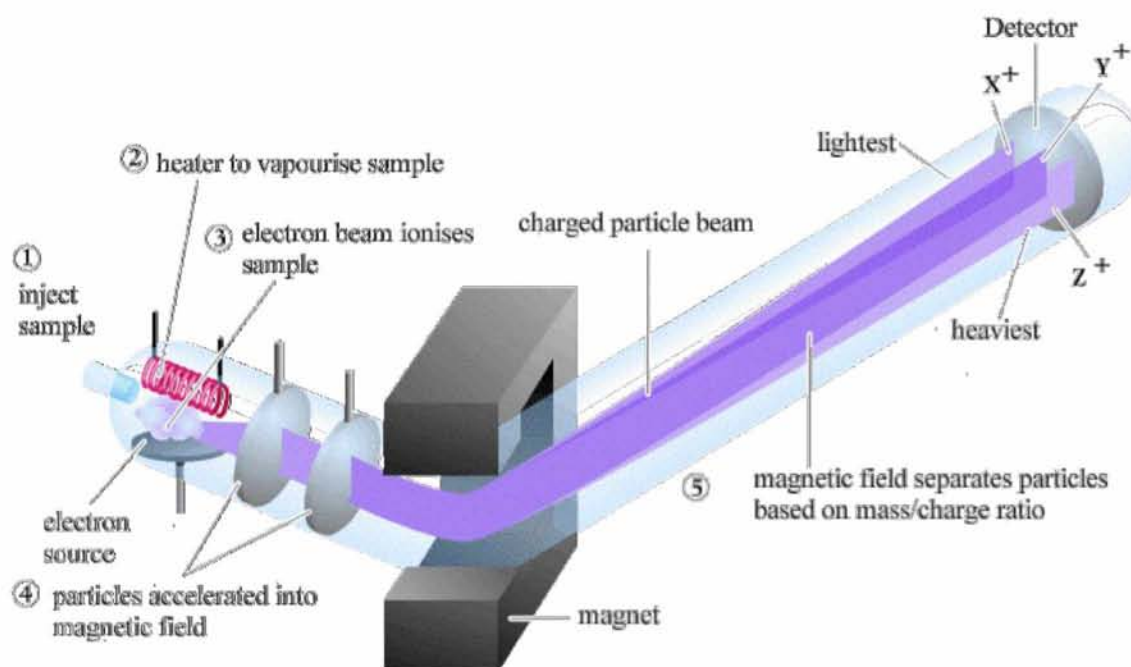
❖ *Τρόπος λειτουργίας φασματομέτρου μάζας*

Η ανάλυση με φασματομετρία μάζας περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια: 1) εξαέρωση δείγματος, 2) δημιουργία ιόντων, 3) διαχωρισμός των ουσιών με βάσει τον λόγο m/z και 4) μέτρηση του ηλεκτρικού ρεύματος των ιόντων που παράγεται όταν προσπίπτει σε κατάλληλο μεταλλάκτη. Επειδή τα περισσότερα

ιόντα που σχηματίζονται κατά το δεύτερο στάδιο έχουν φορτίο +1, ο λόγος m/z ισούται με την μάζα του ιόντος.

Στην *Εικόνα 18* παρουσιάζεται το συνοπτικό διάγραμμα ενός φασματομέτρου μάζας. Ο ρόλος του σημείου εισόδου (1) είναι η εισαγωγή μικροποσότητας δείγματος στην πηγή ιόντων σε αέρια κατάσταση και με σταθερή ροή. Η εξαέρωση δειγμάτων περιορισμένης πτητικότητας επιτυγχάνεται με θέρμανση σε υψηλές συνθήκες υψηλού κενού (2). Υπάρχουν δυο κατηγορίες πηγών ιονισμού α) πηγές αέριας φάσης και β) πηγές εκρόφησης. Στην πρώτη κατηγορία, το δείγμα πρώτα εξαερώνεται και έπειτα ιονίζεται, ενώ στη δεύτερη το δείγμα σε στερεή ή υγρή φάση, μετατρέπεται απευθείας σε ιόντα σε αέρια φάση. Στις πηγές εκρόφησης ανήκουν οι πηγές ιονισμού πεδίου, ιονισμού ηλεκτροσπεκασμού, ιονισμού εκρόφησης με τη βοήθεια υλικού μήτρας και βομβαρδισμού με άτομα μεγάλης ταχύτητας.

Μετά την εξαέρωση του δείγματος, ακολουθεί η δημιουργία ιόντων, μέσω ενός νέφους ιόντων το οποίο ιονίζει το δείγμα (3). Τα σωματίδια περνούν από το μαγνητικό πεδίο (4), και στη συνέχεια διαχωρίζονται βάσει του λόγου m/z (5). Τέλος, καταγράφεται το ηλεκτρικό ρεύμα που παράγεται (Hardinger S., 2006).



Εικόνα 18: Δομή φασματομέτρου μάζας

Η ανάλυση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε στο Ινστιτούτο Μοριακής Ογκολογίας του Ερευνητικού Κέντρου Βιοϊατρικών Επιστημών "Αλέξανδρος Φλέμινγκ", με την υποστήριξη της Δρ. Μαρτίνα Σαμιωτάκη και της Επίκουρου Καθηγήτριας Μαρία Κοντού.

2. Απομόνωση και καθαρισμός ανθρώπινης αγγειογενίνης (hANG).

Η απομόνωση και ο καθαρισμός της πρωτεΐνης έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Holloway, D.E., et al. 2001.

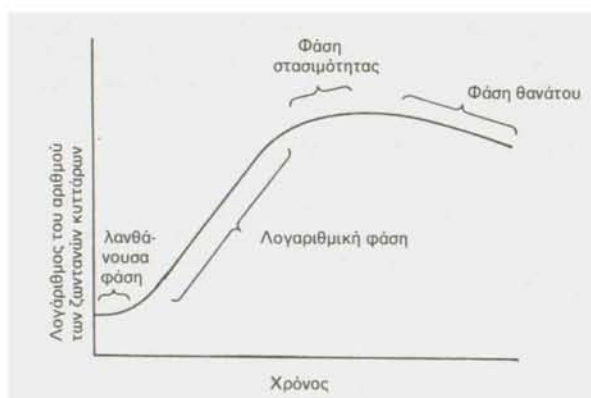
Αντιδραστήρια

- L- Arginini- HCl (SERVA)
- Coomassie Brilliant Blue R-250 (Fluka)
- EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) (Panreac)
- Glycerol (Panreac)
- Hydrochloric Acid (HCl) (Merck)
- Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) (Fermentas)
- LB Broth (Merck)
- Magnesium Chloride Hexahydrate ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$) (Panreac)
- PMSF (phenylmethanesulfonylfluoride) (Applichem)
- protein marker (Nippon Genetics)
- Sodium Chloride (NaCl) (Applichem)
- TFA(Sigma)
- Tris Base (Merck)
- Triton X-100 (Merck)
- Tryptone (Fluka)
- Yeast extract (SERVA)
- αηγγμένη γλουταθειόνη (Applichem)
- β - Mercaptoethanol (Riedel de Haën)
- Καναμυκίνη (Applichem)
- Λυσοζύμη (Applichem)
- Οξειδωμένη γλουταθειόνη (Applichem)
- υδροχλωρική γουανιδίνη (Sigma)

i. Ανάπτυξη των E. coli BL21-Gold(DE3) βακτηριακών στελεχών που φέρουν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο (pET-Ang).

Αρχικά, αναπτύχθηκαν καλλιέργειες βακτηριακών στελεχών σε 5ml θρεπτικού υλικού LB-Broth που περιέχει καναμυκίνη. Πραγματοποιήθηκε επώαση των καλλιεργειών για 16 ώρες στους 37°C υπό ανάδευση (210rpm). Στη συνέχεια, λήφθηκαν 2ml από τις καλλιέργειες για εμβολιασμό με αναλογία 1:100 νέας καλλιέργειας 200mL θρεπτικού υλικού Terrific Broth (TB) που περιέχει καναμυκίνη. Η καλλιέργεια επώαστηκε στους 37°C υπό ανάδευση (210rpm), έως ότου η οπτική της πυκνότητα να φτάσει την τιμή $OD_{600nm} = 0.6$. Ακολούθησε η παρασκευή μεγάλης καλλιέργειας 1Lt θρεπτικού υλικού Terrific Broth (TB) που περιέχει καναμυκίνη, η οποία εμβολιάστηκε σε αναλογία 1:100 με το βακτηριακό πληθυσμό της μεσαίας καλλιέργειας και επώαστηκε στους

37°C υπό ανάδευση (210rpm). Παράλληλα, η καλλιέργεια παρακολουθείται φασματοφωτομετρικά λαμβάνοντας 1mL καλλιέργειας ανά τακτά χρονικά διαστήματα και γνωρίζοντας ότι τα βακτήρια ανά 20 λεπτά διαιρούνται, μπορεί να υπολογιστεί ο χρόνος επώασης της καλλιέργειας (Εικόνα 19) μέχρι να φτάσει να έχει $OD_{600nm} = 0.6-0.8$ A, όπου και θεωρείται, για το συγκεκριμένο βακτηριακό στέλεχος, πως η καλλιέργεια θα βρίσκεται στο απόγειο της εκθετικής φάσης ανάπτυξης. Είναι επιθυμητό, η καλλιέργεια να φτάσει στο μέγιστο σημείο της εκθετικής φάσης όπου και θα ξεκινήσει η επαγωγή της έκφρασης της προς μελέτη πρωτεΐνης. Μόλις η απορρόφηση της καλλιέργειας είναι η κατάλληλη γίνεται προσθήκη του επαγωγέα IPTG τελικής συγκέντρωσης 1mM και η καλλιέργεια επωάζεται για δύο επιπλέον ώρες στους 37 °C υπό ανάδευση (180-210 rpm). Ο ισοπροπυλοθειογαλακτοζίτης (IPTG) είναι ένας γαλακτοζίτης και αποτελεί ισχυρό επαγωγέα της έκφρασης της β-γαλακτοσιδάσης, δεσμεύοντας τον καταστολέα του ρυθμιστή lac. Ο IPTG είναι χρήσιμος στην εργαστηριακή έρευνα ως εργαλείο για την επαγωγή της γονιδιακής έκφρασης. Μετά το πέρας της επαγωγής, οι φλάσκες τοποθετούνται στους 4 °C ώστε να σταματήσει η βακτηριακή ανάπτυξη. Η καλλιέργεια των βακτηρίων φυγοκεντρείται σε δοχεία συλλογής στις 2500g, στους 4°C για 15min. Το υπερκείμενο απορρίπτεται καθώς αποτελεί το θρεπτικό μέσο και το κυτταρικό ίζημα φυλάσσεται στους -20 °C.



Εικόνα 19: Διαγραμματική απεικόνιση της βακτηριακής ανάπτυξης (σε αριθμό κυττάρων) στο πέρασμα του χρόνου

ii. Λύση βακτηριακών κυττάρων

Το κυτταρικό ίζημα που συλλέχθηκε μετά τη φυγοκέντρηση, επαναδιαλύεται σε ρυθμιστικό διάλυμα λύσης (Πίνακας 7). Στη συνέχεια το διάλυμα υποβάλλεται σε μηχανική λύση μέσω υπερήχων. Η πλήρης λύση των κυττάρων γίνεται σε 5 κύκλους των 40 sec, όπου η συσκευή υπερήχων επί 40 sec παράγει υπερήχους εύρους 80%, σε συνεχόμενους κύκλους, οι οποίοι διαπερνούν το κυτταρόλυμα. Κατά τη διάρκεια της λύσης με υπερήχους αυξάνεται κατά πολύ η θερμοκρασία του διαλύματος, για το λόγο αυτό, η λύση γίνεται ενώ ο σωλήνας, στον οποίο εμπεριέχεται το διάλυμα προς λύση, βρίσκεται σε πάγο ώστε να αποφευχθεί η ανεπιθύμητη αυτή αύξηση της θερμοκρασίας. Στη συνέχεια, το διάλυμα των λυμένων κυττάρων υποβάλλεται σε φυγοκέντρηση στις 20000g στους 4°C για 20 λεπτά. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται για 2 ακόμη φορές. Κατά τη δεύτερη πλύση η επαναδιάλυση γίνεται σε 25mL διαλύματος λύσης στο οποίο εμπεριέχεται και Triton X-100 1%, ώστε να γίνει διάσπαση των κυτταρικών τοιχωμάτων και λυσοζύμη για τη διάσπαση των πεπτιδογλυκανών του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων και να καθίσταται πιο ευπαθής η κυτταρική μεμβράνη του βακτηρίου στα υπόλοιπα συστατικά του διαλύματος. Κάθε φορά απορρίπτουμε το υπερκείμενο και συνεχίζουμε με το κυτταρικό ίζημα το οποίο δεν είναι τίποτα άλλο από τα λεγόμενα έγκλειστα σωματίδια, δηλαδή ειδικές δομές που σχηματίζουν κάποιες πρωτεΐνες που δεν είναι διαλυτές στο κυτταρόπλασμα, τα μόρια των οποίων αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και εγκλείονται μέσα σε φωσφολιπίδια.

Επόμενο βήμα, είναι η επαναδιάλυση του ιζήματος σε 10mL διαλύματος αποδιάταξης με τη χρήση συσκευής ομογενοποιητή και ανάδευση του δείγματος σε συσκευή roller σε θερμοκρασία δωματίου για 2 ώρες. Τέλος,

πραγματοποιήθηκε αναδίπλωση της πρωτεΐνης σε διάλυμα 0,5M L-αργινίνης-HCl, pH 8,0 και 0,6mM οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSSG), υπό ανάδευση για 24 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος, το πρωτεϊνικό δείγμα φυγοκεντρήθηκε σε 10.000g, για 30 λεπτά και αραιώθηκε τρεις φορές με υπερκάθαρο νερό (MilliQ) (τελικός όγκος 1500mL).

Πίνακας 7: Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν κατά την προετοιμασία των βακτηριακών καλλιιεργειών

Διάλυμα λύσης κυττάρων	0,5M NaCl 10% Glycerol 5mM MgCl ₂ 5mM β-μερκαπτεθανόλη 1mM PMSF Ίχνη λυσοζύμης 100mM phosphate buffer	
Διάλυμα αποδιάταξης κυττάρων	7M υδροχλωρική γουανιδίνη 0,15M ανηγμένη γλουταθειόνη 0,1M Tris-HCl 2mM EDTA	pH: 8

iii. Χρωματογραφικός καθαρισμός της hANG με τη χρήση του συστήματος FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography).

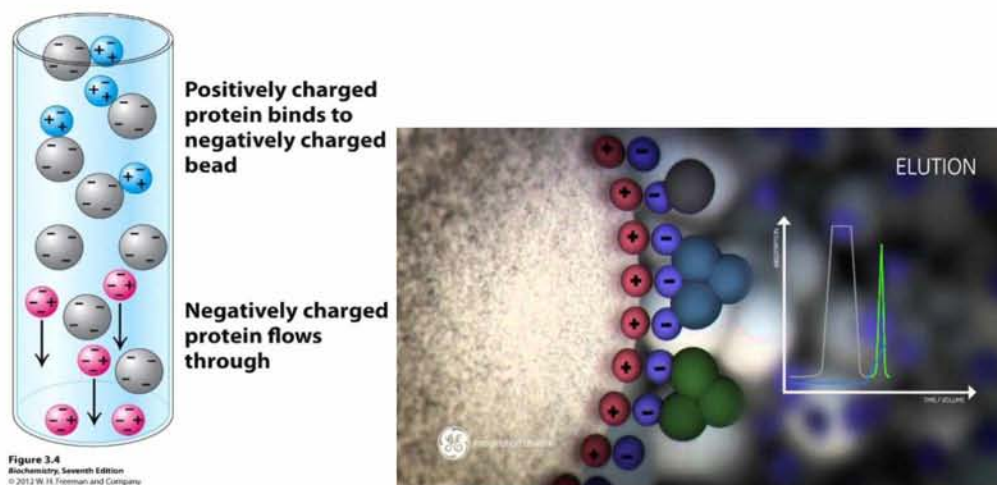
Η απομόνωση της πρωτεΐνης βασίζεται στο γεγονός ότι τα διάφορα συστατικά ενός διαλύματος έχουν διαφορετική συγγένεια για την κινητή και τη σταθερή, πορώδη, φάση της στήλης. Η κινητή φάση είναι το υγρό ρυθμιστικό διάλυμα και η σταθερή φάση είναι μια ρητίνη σφαιριδίων πακεταρισμένων μέσα σε μια κυλινδρική γυάλινη ή πλαστική στήλη. Το μέγεθος των πόρων, η φύση των σφαιριδίων, καθώς και οι παράγοντες που είναι προσδεδεμένοι στα σφαιρίδια, εξαρτάται από τη χρήση για την οποία προορίζεται.

Το σύστημα FPLC είναι ένας τύπος υγρής χρωματογραφίας που χρησιμοποιείται για την απομόνωση πρωτεϊνών από ένα μίγμα. Η βασική αρχή της δεν διαφέρει από αυτή της απλής υγρής χρωματογραφίας συγγένειας, με τη διαφορά ότι το σύστημα είναι πιο αυτοματοποιημένο και τα διαλύματα περνούν

μέσα από το σύστημα χρησιμοποιώντας αντλίες θετικής μετατόπισης, οι οποίες μεταφέρουν υγρό μέσα στο σύστημα υπό υψηλή πίεση. Για την απομόνωση τα διαλύματα που χρησιμοποιούνται είναι τα διαλύματα εξισορρόπησης-έκλυσης και έκλουσης, τα οποία πριν χρησιμοποιηθούν για την απομόνωση φιλτράρονται υπό κενό με φίλτρο 0.45μm και απαερώνονται με χρήση υπερήχων. Τα διαλύματα εξισορρόπησης-έκλυσης και έκλουσης τοποθετούνται στις αντίστοιχες αντλίες του μηχανήματος ÄKTA purifier (GE Healthcare). Η πορεία της χρωματογραφίας ελέγχεται από το υπολογιστικό πρόγραμμα Unicorn™. Το πρωτεϊνικό δείγμα, μετά την διαδικασία της αναδίπλωσης, φυγοκεντρήθηκε για 30 λεπτά σε 10000g στους 25°C. Με τον τρόπο αυτό, όσες πρωτεΐνες δεν έχουν αναδιπλωθεί θα μείνουν στο ίζημα. Στη συνέχεια, το υπερκείμενο αραιώθηκε με MilliQ (υπερκάθαρο νερό).

Η πρώτη στήλη που χρησιμοποιήθηκε είναι η SP-Sepharose Fast Flow cation-exchange resin 16/10, μια κατιονανταλλακτική στήλη, η οποία εξισορροπείται με 5 όγκους στήλης από το αντίστοιχο διάλυμα (*Εικόνα 20*). Στη συνέχεια, ρυθμίζοντας την πίεση και το ρυθμό ροής στο 1ml/ min, το δείγμα πρωτεϊνών αρχίζει να διαπερνάει τη στήλη, ώστε να προσδεθεί η αγγειογενίνη η οποία είναι θετικά φορτισμένη σε κόκκους της στήλης που περιέχουν καρβοξυλικά ιόντα. Επόμενο βήμα, είναι η έκλυση της στήλης με το διάλυμα εξισορρόπησης (διάλυμα A, *Πίνακας 8*) ώστε να απομακρυνθούν οι πρωτεΐνες που έχουν προσδεθεί μη ειδικά σε αυτή και αφού η τιμή της υπεριώδους απορρόφησης (280nm) φτάσει στο μηδέν, ακολουθεί η έκλυση με το διάλυμα B (διάλυμα έκλουσης, *Πίνακας 8*) και συλλέγονται κλάσματα των 4ml. Κατά την έκλυση, αποδεσμεύεται η πρωτεΐνη από την στήλη καθώς έχει αυξηθεί η συγκέντρωση του χλωριούχου νατρίου μέσω του διαλύματος B. Για τη συγκεκριμένη στήλη, δεν χρησιμοποιούμε διαβάθμιση συγκέντρωσης του παράγοντα έκλουσης (NaCl) αλλά το 100% του διαλύματος B (0,8M NaCl). Τα ιόντα νατρίου ανταγωνίζονται με τα θετικά φορτία της πρωτεΐνης για τη

δέσμευση στη στήλη. Οι πρωτεΐνες που έχουν χαμηλή συγκέντρωση θετικών φορτίων θα εμφανιστούν πρώτες. Τέλος, συλλέγουμε τα κλάσματα στα οποία έγινε η έκλυση της πρωτεΐνης σύμφωνα με την τιμή της απορρόφησης σε μήκος κύματος 280nm και τα εισάγουμε στον κύλινδρο superloop για το δεύτερο στάδιο καθαρισμού.



Εικόνα 20: χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής, διαχωρισμός πρωτεϊνών βάσει του καθαρού φορτίου τους.

Η δεύτερη στήλη καθαρισμού που χρησιμοποιήθηκε είναι η αντίστροφης φάσης C18 (reversed-phase) resin. Επαναλαμβάνεται η ίδια διαδικασία εξισορρόπησης της στήλης, διέλευσης των πρωτεϊνών που συλλέχθηκαν από τη πρώτη στήλη, έκπλυσης, έκλυσης της πρωτεΐνης και συλλογής κλασμάτων. Η εξισορρόπηση της στήλης έγινε με 5% διαλύματος B, η έκπλυση με 25% διαλύματος B, η έκλυση της πρωτεΐνης με διαβάθμιση συγκέντρωσης 25-45% του διαλύματος B για 16 λεπτά και συλλέχθηκαν κλάσματα του 1mL. Η ροή της στήλης ήταν 1ml/min. Τα κλάσματα στα οποία πραγματοποιήθηκε η έκλυση, σύμφωνα με την τιμή της απορρόφησης σε μήκος κύματος 280nm, συλλέχθηκαν και μετά από διαπίδυση σε υπερκάθαρο νερό (MilliQ) ακολούθησε λυοφιλίωση της πρωτεΐνης.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ποσοτικός προσδιορισμός των

πρωτεϊνών τόσο με το νόμο Beer-Lambert σύμφωνα με την εξίσωση $A=e.b.c$, όσο και με τη μέθοδο Bradford και ηλεκτροφόρηση των συλλεχθέντων κλασμάτων σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE), μέθοδοι που έχουν ήδη αναλυθεί.

iv. Κυκλοποίηση της Met (-I)- ANG στην pyro-Glu ανθρώπινη μορφή της

Η αγγειογενίνη που απομονώθηκε διαθέτει στην -1 θέση της ένα κατάλοιπο Met το οποίο θα πρέπει να απομακρυνθεί και το κατάλοιπο Gln που ακολουθεί να κυκλοποιηθεί ώστε η πρωτεΐνη να βρίσκεται στη μορφή που απαντάται φυσικώς στον άνθρωπο (<Glu-ANG). Για το πρώτο βήμα, χρησιμοποιήθηκε μια αμινοπεπτιδάση, ένα ένζυμο που αφαιρεί επιλεκτικά υδρόφοβα κατάλοιπα όπως είναι η μεθειονίνη από αμινοτελικά άκρα. Η αμινοπεπτιδάση αφαιρεί το κατάλοιπο της μεθειονίνης ύστερα από επώαση για 2 ώρες στους 37° C σε Tris-HCl (0,1M και pH= 8). Όμως, υπό αυτές τις συνθήκες μειώνεται η κυκλοποίηση του νέου αμινοτελικού άκρου της αγγειογενίνης, προς πυρογλουταμινικό οξύ. Για το λόγο αυτό, η αμινοπεπτιδάση (1nM αμινοπεπτιδάσης για 9,25 nM ANG) επώαστηκε για 24 ώρες με την Met(-1)-ANG στους 37° C σε 200 mM φωσφορικού καλίου και pH 7.4. Η αγγειογενίνη πλέον έχει πλήρη ενζυμική και καταλυτική δράση.

v. Διαπίδυση και συμπύκνωση κλασμάτων έκλυσης

Τα κλάσματα έκλυσης που έχουν τη μεγαλύτερη συγκέντρωση και καθαρότητα μετά την απομόνωση, συλλέγονται σε μεμβράνη διαπίδυσης και γίνεται αλλαγή διαλύματος, σε διάλυμα διαπίδυσης το οποίο είναι υπερκάθαρο νερό, στο οποίο θα αποθηκευτεί η πρωτεΐνη. Η διαπίδυση γίνεται στον ψυκτικό θάλαμο υπό ανάδευση για περίπου 12 ώρες.

Στη συνέχεια η πρωτεΐνη τοποθετείται σε ειδικά φυγοκεντρικά φίλτρα

συμπύκνωσης ninaspin 6 με ανώτατο όριο μοριακού μεγέθους (cut off) 4 kDa ώστε να μην διαφύγει η προς μελέτη πρωτεΐνη από τους πόρους του φίλτρου (MWAng= 14 kDa). Η συμπύκνωση και η αλλαγή διαλύματος στην πρωτεΐνη μπορούν να γίνουν και ταυτόχρονα στο φίλτρο ninaspin 6. Η συμπύκνωση της πρωτεΐνης γίνεται μέχρι τον επιθυμητό όγκο. Μετά το πέρας της συμπύκνωσης λαμβάνεται όλος ο όγκος του δείγματος και από τον όγκο αυτόν, λαμβάνεται μικρή ποσότητα για να προσδιοριστεί η συγκέντρωσή του με τη μέθοδο Bradford. Στη συνέχεια, η πρωτεΐνη (hANG) αναμιγνύεται με γλυκερόλη σε τελική συγκέντρωση 50% και διαμοιράζεται σε σωλήνες τύπου erppendorf και αποθηκεύεται στους -20oC. Προστίθεται γλυκερόλη λόγω της δράσης της σαν κρυοπροστατευτικό, αφού δεν παγώνει, έτσι ώστε η πρωτεΐνη να μη χάσει τη δραστηριότητά της κατά την ψύξη και την απόψυξη.

Εναλλακτικά, για την εφαρμογή των κρυσταλλώσεων, όπου το πρωτεϊνικό διάλυμα δεν μπορεί να περιέχει γλυκερόλη, η πρωτεΐνη (Met(-1)-ANG) μετά το πέρας της συμπύκνωσης και της αλλαγής διαλύματος, αφού προσδιοριστεί η συγκέντρωσή της με τη μέθοδο Bradford, διαμοιράζεται σε μικρά κλάσματα και καταψύχεται στους -80oC με ταχεία ψύξη (flash freeze), δηλαδή την εναπόθεση του σωλήνα τύπου erppendorf σε N2 και αποθήκευση των κλασμάτων στους -80oC.

Πίνακας 8: Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν κατά την απομόνωση της hANG

Διάλυμα A 1 ^{ης} Στήλης	25mM Tris-HCl 0,2M NaCl	} pH: 8
Διάλυμα B 1 ^{ης} Στήλης	25mM Tris-HCl 0,8M NaCl	
Διάλυμα A 2 ^{ης} Στήλης	0,1% TFA	

Διάλυμα Β 2 ^{ης} Στήλης	0,08% TFA in acetonitrile
----------------------------------	---------------------------

4.ΚΡΥΣΤΑΛΛΩΣΗ Met (-1)- ANG

Αντιδραστήρια

- Ammunium sulphate (Chem Lab)
- Glycerol (Panreac)
- Hepes (SERVA)
- Lithium sulphate (Sigma)
- Maleic acid (Sigma)
- MPD (Sigma)
- Sodium Chloride (NaCl) (Applichem)
- (πολυαιθυλενική γλυκόλη) PEG 3350 (Sigma)
- (πολυαιθυλενική γλυκόλη) PEG 6000 (Sigma)
- sodium acetate (Merck)
- Sodium cacodylate (Sigma)
- Sodium citrate (Applichem)
- Sodium potassium tartrate (Sigma)
- Tris Base (Merck)

Μέθοδος

Η αγγειογενίνη που απομονώθηκε στη μορφή Met (-1)- ANG, χωρίς να γίνει μετατροπή της στην pyro-Glu-ANG, δοκιμάστηκε σε διάφορες συνθήκες κρυστάλλωσης. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε ήταν η μέθοδος διάχυσης ατμών.

➤ *Διάχυση ατμών*

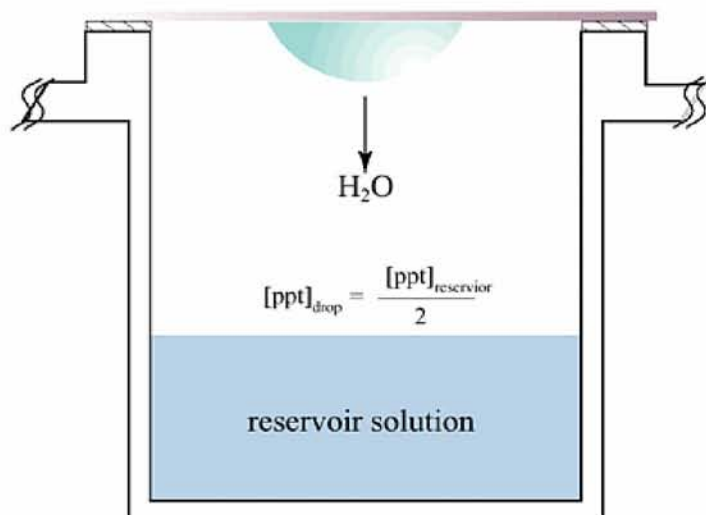
Η μέθοδος αυτή, είναι η πλέον συνηθισμένη μέθοδος κρυστάλλωσης πρωτεϊνών και εφαρμόζεται συνήθως με τις τεχνικές της κρεμάμενης σταγόνας(hangingdrop), της καθήμενης σταγόνας(sittingdrop) και της σταγόνας sandwich. Για την επίτευξη της κρυστάλλωσης το καθαρό υδατικό πρωτεϊνικό διάλυμα αναμιγνύεται με ένα διάλυμα εξισορρόπησης που περιέχει ένα ρυθμιστικό διάλυμα, άλας, έναν κατακρημνιστικό παράγοντα όπως το PEG (πολυαιθυλενική γλυκόλη), ή μικρά οργανικά μόρια και το σύστημα αφήνεται να ισορροπήσει.

Ένα διάλυμα πρωτεΐνης με συγκέντρωση άλατος 10% μικρότερη από αυτή που απαιτείται για κατακρήμνιση, εξισορροπείται με διάχυση ατμών από ένα μεγάλο όγκο διαλύματος άλατος μεγαλύτερης συγκέντρωσης. Τα δύο διαλύματα βρίσκονται σε ανοιχτά δοχεία μέσα σε ένα μεγαλύτερο καλά κλεισμένο δοχείο. Το διάλυμα μεταφέρεται σταδιακά μέσω της φάσης των ατμών από το πρωτεϊνικό διάλυμα στο πιο συγκεντρωμένο διάλυμα άλατος έως ότου επέλθει ισορροπία και οι κρύσταλλοι σχηματίζονται καθώς το πρωτεϊνικό διάλυμα αποκτά μεγαλύτερη συγκέντρωση. 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.

➤ *Τεχνική της κρεμάμενης σταγόνας (hangingdrop)*

Μια από τις μεθόδους που εφαρμόστηκαν για την πραγματοποίηση των κρυσταλλώσεων της αγγειογενίνης, ήταν η μέθοδος της κρεμάμενης σταγόνας. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

Μια σταγόνα μίγματος πρωτεϊνικού διαλύματος και διαλύματος εξισορρόπησης τοποθετείται στο μέσο μιας υδρόφοβης καλυπτρίδας (σταγόνα κρυστάλλωσης). Η σταγόνα αποτελείται από διάλυμα της πρωτεΐνης και της εξισορρόπησης 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 21).



Εικόνα 21: Η τεχνική της κρεμάμενης σταγόνας

Αρχικά, δοκιμάστηκαν συνθήκες που βρέθηκαν βάσει της βιβλιογραφίας, συνθήκες κρυστάλλωσης της Met (-1)- ANG και της hANG. Σύμφωνα με την βάση δεδομένων *Biological Macromolecule Crystallization Database*, οι συνθήκες για την κρυστάλλωση των Met (-1)- ANG και hANG είναι οι εξής:

Met (-1)- ANG: 20mM Κιτρικό νάτριο pH 5.2

0,2M Τρυγικό καλιόνάτριο

10% PEG6000

hANG: 150mM Μηλικό οξύ pH 7.0

20% PEG3350

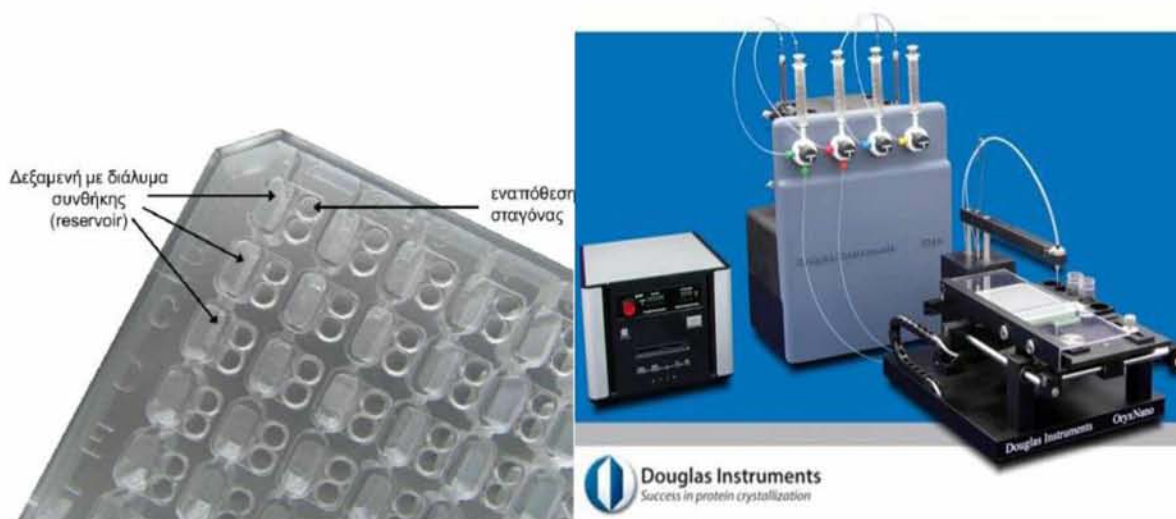
Χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της κρεμάμενης σταγόνας, κατά την οποία η αναλογία πρωτεΐνης- διαλύματος εξισορρόπησης στη σταγόνα ήταν 1:1.

Τεχνική καθήμενης σταγόνας (sittingdrop)

Η δεύτερη τεχνική που εφαρμόστηκε ήταν αυτή της καθήμενης σταγόνας (sittingdrop) με τη χρήση της συσκευής ρομπότ OryxNano, το οποίο λειτουργεί με τη μέθοδο της διάχυσης ατμών και 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 και η αναλογία όγκου πρωτεΐνης- διαλύματος εξισορρόπησης είναι 2:1 σε σταγόνα όγκου 0,4μl, δηλαδή 66,6% ANG (από πυκνό διάλυμα πρωτεΐνης 14,6mg/ml) και 33,3% διάλυμα εξισορρόπησης.

Στην παρούσα εργασία έγινε προσπάθεια κρυστάλλωσης της αγγειογενίνης στην ανοιχτή της διαμόρφωση. Για τις κρυσταλλογραφικές μελέτες χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω όργανα:

- Ρομπότ κρυστάλλωσης OryxNano (Douglas Instruments, Protein Crystallization Robot for sitting drop screening with optimization-Αγγλία- *Εικόνα 22*)
- Πιάτα κρυσταλλώσεων 96 θέσεων (*Εικόνα 22*)
- Στερεοσκόπιο



Εικόνα 22: Αριστερά φαίνεται ένα πιάτο κρυσταλλώσεων 96 θέσεων και δεξιά το Ρομπότ κρυστάλλωσης OryxNano

Αρχικά κρίθηκε απαραίτητο να ελεγχθεί η πιθανότητα κρυστάλλωσης της ANG με βάση αλλαγές στο pH και στους στις συγκεντρώσεις των αλάτων που περιέχονται στο διάλυμα εξισορρόπησης. Οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν βασίζονται σε συνθήκες κρυσταλλώσεων πρωτεϊνών που φέρουν συγγενικό μοριακό βάρος με την αγγειογενίνη και έχει χρησιμοποιηθεί η ανάλογη μέθοδος κρυστάλλωσης που εφαρμόζεται και στη συγκεκριμένη πειραματική μελέτη.

Δημιουργήθηκαν συνθήκες για τιμές pH 7.5 και 8.5 χρησιμοποιώντας τα κατάλληλα ρυθμιστικά διαλύματα, βάσει της pKα και δυο άλατα σε 6 διαφορετικές συγκεντρώσεις. Για κάθε ρυθμιστικό διάλυμα δημιουργούνται δώδεκα συνθήκες κρυστάλλωσης εκ των οποίων οι έξι περιέχουν ως άλας το θειικό αμμώνιο σε συγκεντρώσεις: 0.5M, 0.8M, 1M, 1.2M, 1.6M και 2M και οι άλλες έξι το χλωριούχο νάτριο σε συγκεντρώσεις: 1M, 1.2M, 1.5M, 2M, 2.2M και 2.5M.

Το πείραμα πραγματοποιήθηκε με την τεχνική της καθημένης σταγόνας με χρήση του OryxNano.

➤ Βελτιστοποίηση κρυσταλλώσεων

Μετά την λήψη αποτελεσμάτων, πραγματοποιείται βελτιστοποίηση των συνθηκών που έδωσαν θετικό αποτέλεσμα. Στη δεδομένη πειραματική διαδικασία έγινε προσπάθεια για βελτιστοποίηση με αλλαγές για την εύρεση ενός κατάλληλου pH και με αλλαγές στη συγκέντρωση της πρωτεΐνης.

Στο δεδομένο πειραματικό στάδιο κρίθηκε απαραίτητη η δοκιμή συνθηκών με διακύμανση στο pH. Έτσι λοιπόν, δημιουργήθηκαν συνθήκες για τιμές pH 5,2 και 6 χρησιμοποιώντας τα κατάλληλα ρυθμιστικά διαλύματα, βάσει της pK_a, ενώ τα υπόλοιπα συστατικά του διαλύματος εξισορρόπησης παραμένουν ίδια για όλες τις τιμές pH. Η τεχνική που εφαρμόστηκε και σε αυτή την περίπτωση ήταν αυτή της καθήμενης σταγόνας με τη χρήση του ρομπότ. Για την κάθε συνθήκη δημιουργούνται δύο σταγόνες όγκου 0.4μl η κάθε μία με αναλογία πρωτεΐνης:διαλύματος εξισορρόπησης 1:1 και 2:1 αντίστοιχα.

Ακολούθησε νέα σειρά πειραμάτων βελτιστοποίησης των συνθηκών κρυστάλλωσης χρησιμοποιώντας την τεχνική της πυρήνωσης (Microseeding) αλλά και δυο καινούριους κατακρημνιστικούς παράγοντες, το MPD και τη γλυκερόλη.

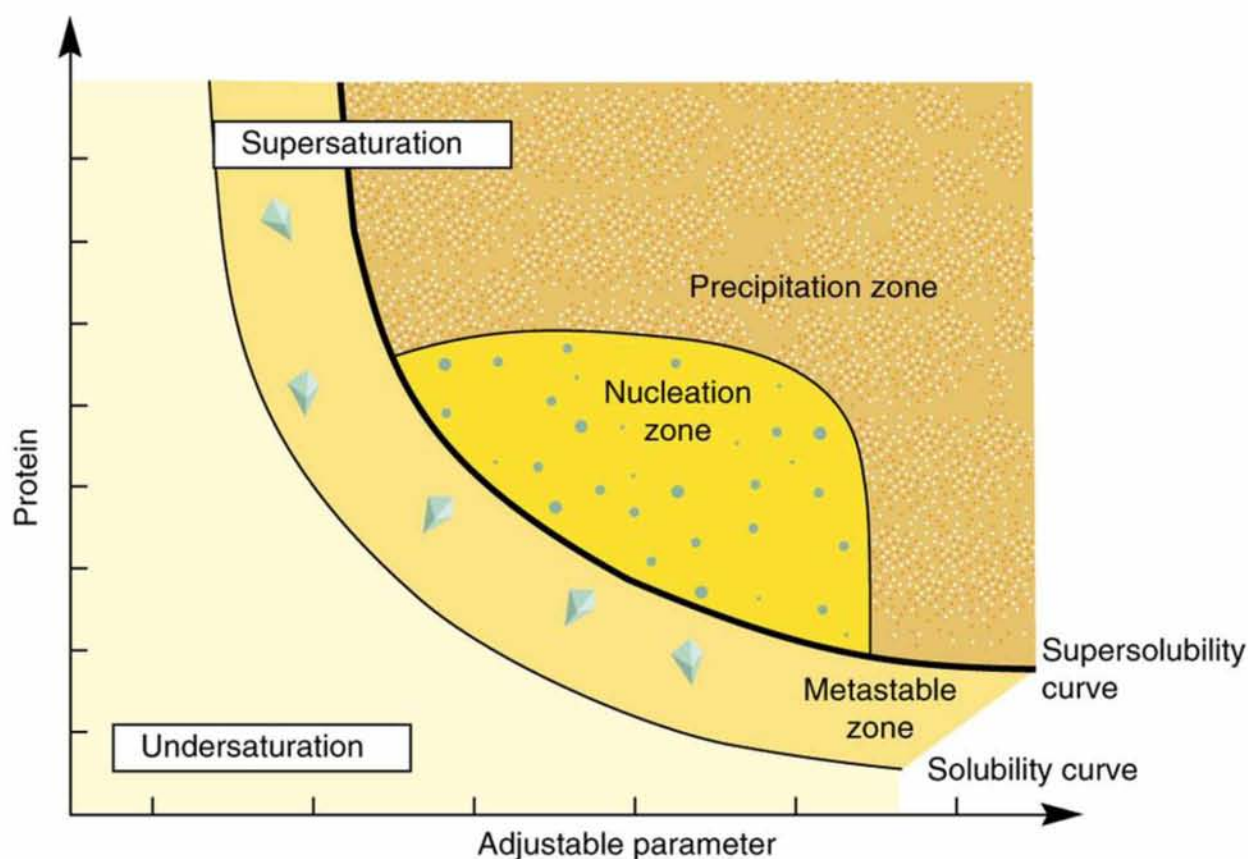
➤ *Πυρήνωση (Microseeding)*

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 κατακρημνιστικού 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 καθήμενης σταγόνας 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 μετασταθήρη ζώνη, στην οποία αναπτύσσονται οι κρύσταλλοι (Εικόνα 23).



Εικόνα 23: Διάγραμμα φάσης, όπου διακρίνονται τα στάδια ανάπτυξης των κρυστάλλων

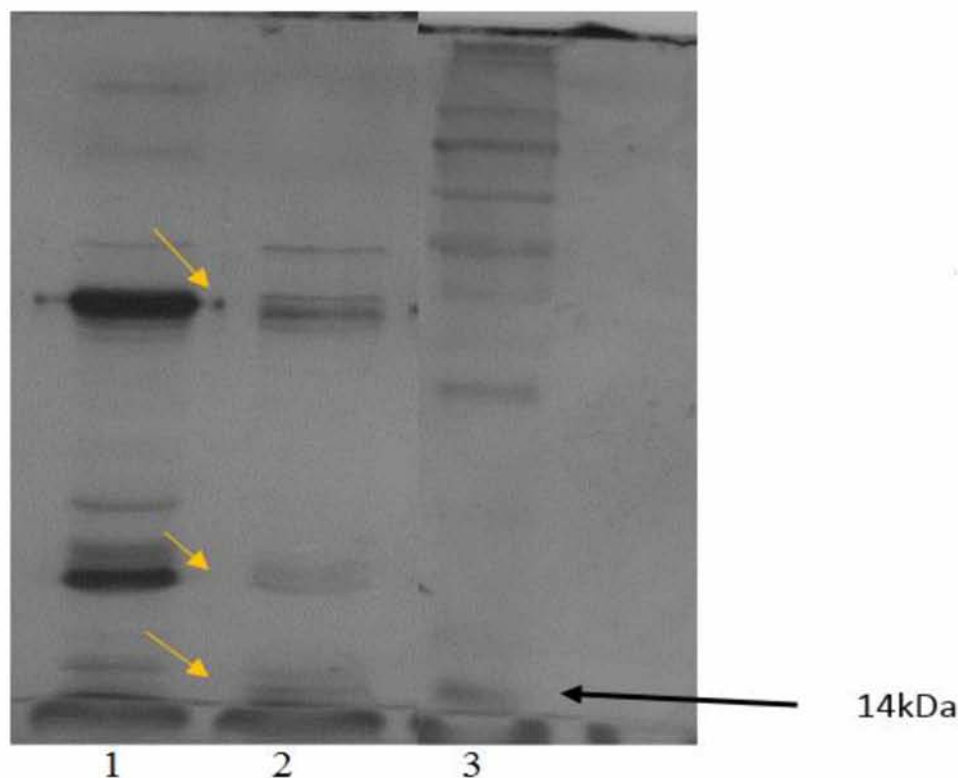
Οι συνθήκες που δοκιμάστηκαν είχαν τιμή pH 6.0 και υψηλές συγκεντρώσεις θειικού αμμωνίου: 1,6M, 1,8M και 2M, ενώ ως κατακρημνιστικός παράγοντας χρησιμοποιήθηκε το MPD σε συγκέντρωση 2%. Οι αναλογίες στη σταγόνα ήταν οι ακόλουθες: 66,6% πρωτεΐνη, 23,3% reservoir και 10% πυρήνες. Στη συνέχεια, αυξήθηκε η συγκέντρωση του MPD σε 10% καθώς και η αναλογία της πρωτεΐνης με το διάλυμα εξισορρόπησης σε 1:1 (από πυκνό διάλυμα πρωτεΐνης 9,5mg/ml).

Επειδή τα αποτελέσματα δεν ήταν τα επιθυμητά, έγινε αντικατάσταση του MPD από τη γλυκερόλη σε συγκέντρωση 1% (από πυκνό διάλυμα πρωτεΐνης 9mg/ml στη μια συνθήκη και από πυκνό διάλυμα πρωτεΐνης 7mg/ml) στη δεύτερη. Κατά την τελευταία προσπάθεια βελτιστοποίησης, η τιμή του pH παρέμεινε σταθερή στο 6.0, αλλά το θειικό αμμώνιο αντικαταστήθηκε από ένα άλας με ίδια ιοντική ισχύ, το θειικό λίθιο σε συγκέντρωση 2,2M.

Δ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

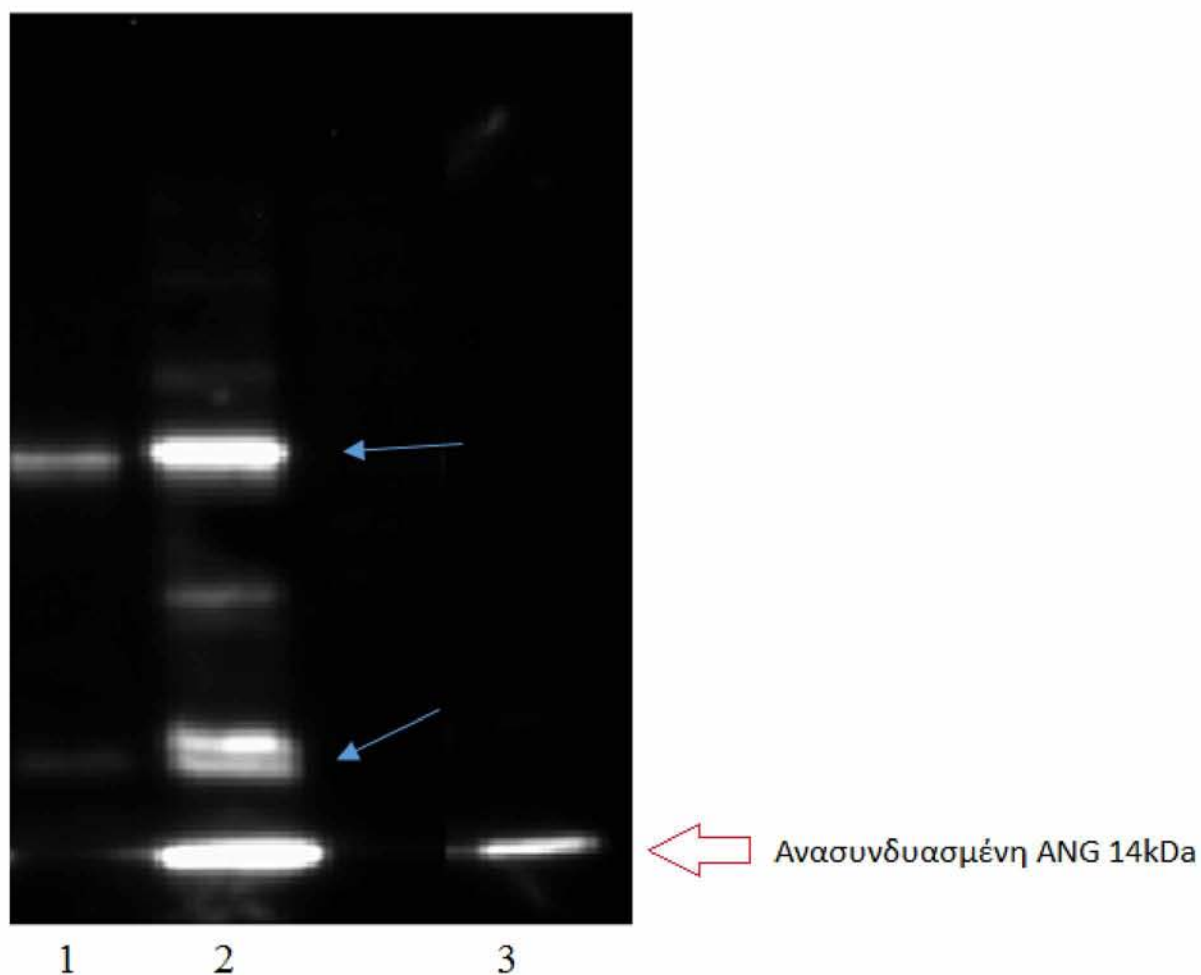
1. Ανοσοκατακρήμνιση πρωτεϊνών

Το πρωτεϊνικό εκχύλισμα των κυττάρων ανοσοκατακρημνίστηκε με ειδικό μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού έναντι της αγγειογενίνης, όπως προαναφέρθηκε. Οι πρωτεΐνες που πιθανώς σχηματίζουν σύμπλοκα με την αγγειογενίνη, έγιναν ορατές με χρώση της πηκτής με νιτρικό άργυρο. Στην πηκτή αυτή (Εικόνα 24), παρουσιάζονται οι διαφορές μεταξύ του δείγματος του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος του κυτταροπλάσματος που ανοσοκατακρημνίστηκε με το αντίσωμα ελέγχου (Pre-clearing, IgG- control antibody) και του δείγματος που ανοσοκατακρημνίστηκε με το ειδικό αντίσωμα έναντι της αγγειογενίνης (anti-Ang antibody). Στο δείγμα που επωάστηκε με το ειδικό αντίσωμα παρατηρήθηκε η εμφάνιση ζωνών οι οποίες απουσίαζαν από το δείγμα ελέγχου. Οι ζώνες αυτές αντιστοιχούν σε πρωτεΐνες, οι οποίες είναι πιθανό να σχηματίζουν ειδικά σύμπλοκα με την αγγειογενίνη, σε αντίθεση με αυτές που εμφανίζονται και στο δείγμα ελέγχου, οι οποίες είναι δυνατό να αλληλεπιδρούν μη ειδικά με ανοσοσφαιρίνες και όχι εξειδικευμένα με την πρωτεΐνη στόχο, γι' αυτό και δεν συνυπολογίζονται κατά την ανάλυση των αποτελεσμάτων (Εικόνα 24).



Εικόνα 24: Στην εικόνα παρουσιάζεται η 2^η πηκτή πολυακρυλαμίδιου υπό αποδιατακτικές συνθήκες, η οποία χρησιμοποιήθηκε για χρώση με νιτρικό άργυρο. Στην 1^η διαδρομή απεικονίζεται το δείγμα που ανοσοκατακρημνίστηκε με το μη ειδικό αντίσωμα IgG (δείγμα ελέγχου), στη 2^η το δείγμα που ανοσοκατακρημνίστηκε με το ειδικό αντίσωμα ποντικού έναντι της hANG και στην 3^η διαδρομή ο μάρτυρας για πρωτεϊνικά δείγματα.

Η πρώτη πηκτή, όπως προαναφέρθηκε, χρησιμοποιήθηκε για τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης. Στην ανοσοαποτύπωση, χρησιμοποιήθηκε εκτός από τον μάρτυρα, ανασυνδυασμένη αγγειογενίνη, η οποία υποδείκνυε τη θέση στην οποία θα εμφανιζόταν και στα δείγματα (Εικόνα 25). Με τον τρόπο αυτό, ταυτοποιήθηκε η ύπαρξη της αγγειογενίνης στο δείγμα μας.



Εικόνα 25: Στην εικόνα απεικονίζονται τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης όπως προκύπτουν από το μηχάνημα ανίχνευσης φθορισμού FluorChem e. Στην 1^η διαδρομή παρουσιάζεται το δείγμα που ανοσοκατακρημνίστηκε με το μη ειδικό αντίσωμα IgG (δείγμα ελέγχου), στη 2^η το δείγμα που ανοσοκατακρημνίστηκε με το ειδικό αντίσωμα ποντικού έναντι της hANG και στην 3^η διαδρομή η ανασυνδυασμένη αγγειογενίνη, που λειτούργησε ως μάρτυρας.

Όπως ήταν αναμενόμενο, η αγγειογενίνη παρουσίασε το πιο δυνατό και έντονο σήμα. Η αγγειογενίνη εμφανίστηκε μόνο στο δείγμα που επεξεργάστηκε με το ειδικό αντίσωμα, και όχι στο δείγμα ελέγχου όπου έγινε ανοσοκατακρήμνιση με το μη ειδικό αντίσωμα IgG. Οι ζώνες που σημαίνονται με το βέλος, είναι η βαριά και ελαφριά αλυσίδα του αντισώματος, γι' αυτό και διακρίνονται και στα δυο δείγματα, αλλά και οι πρωτεΐνες A/G, οι οποίες έχουν μοριακό βάρος 50kDa. Όπως διαπιστώνεται λοιπόν, η κατακρήμνιση της αγγειογενίνης ήταν επιτυχής και επόμενο βήμα ήταν η ταυτοποίηση των

πρωτεϊνών που σχηματίζουν σύμπλοκα με αυτή.

Όπως προαναφέρθηκε, στο Ινστιτούτο Μοριακής Ογκολογίας του Ερευνητικού Κέντρου Βιοϊατρικών Επιστημών "Αλέξανδρος Φλέμινγκ", με την υποστήριξη της Δρ. Μαρτίνας Σαμιωτάκη και της Επίκουρου Καθηγήτριας Μαρίας Κοντού, πραγματοποιήθηκε η ανάλυση των δειγμάτων μέσω φασματομετρίας μάζας. Πραγματοποιήθηκε επεξεργασία των ολικών δειγμάτων, τόσο του δείγματος ελέγχου, όσο και του δείγματος που ανοσοκατακρημνίστηκε με το ειδικό αντίσωμα. Στη συνέχεια, έγινε σύγκριση των δυο δειγμάτων και απορρίφθηκαν οι πρωτεΐνες που εμφανίστηκαν στο δείγμα ελέγχου. Τέλος, για επαλήθευση των αποτελεσμάτων, πραγματοποιήθηκε πέψη των συγκεκριμένων ζωνών, οι οποίες αφαιρέθηκαν από την 2^η πηκτή. Τα δεδομένα που προέκυψαν, παρουσιάζονται στον πίνακα 9. Οι συγκεκριμένες πρωτεΐνες (εκτός της αγγειογενίνης) αλληλεπιδρούν με την αγγειογενίνη και σχηματίζουν πρωτεϊνικά σύμπλοκα.

Πίνακας 9: οι πρωτεΐνες που ταυτοποιήθηκαν από την ανάλυση με φασματομετρία μάζας

Κωδικός πρωτεΐνης UniProt	Όνομα πρωτεΐνης	Αριθμός πεπτιδίων	%Επικάλυψη
P19474	E3 ubiquitin- protein ligase	2	3,79
P68366	Tubulin alpha chain	5	9,80
Q13509	Tubulin beta-3 chain	3	8,09
O00303	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit F	2	7,84
P63244	Guanine nucleotide- binding protein subunit beta-2	3	10,73
P08865	40S ribosomal protein SA	4	15,25
P15880	40S ribosomal	2	7,85

protein S2			
Q96CT7	Coiled-coil domain-containing protein 124	2	13,90
P62701	40S ribosomal protein S4 - x isoform	3	12,37
P62913	60S ribosomal protein L11	2	12,92
P62269	40S ribosomal protein S18	5	13,16
P03950	Angiogenin	16	46,26
P62841	40S ribosomal protein S15	2	17,69

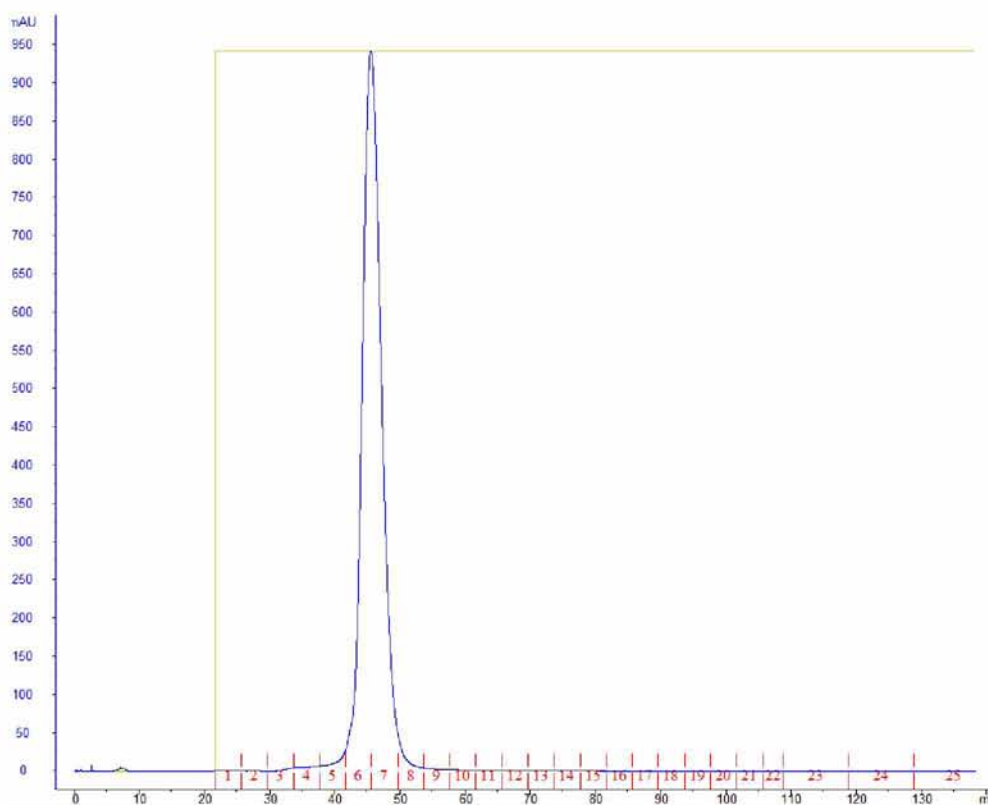
Σύμφωνα με τα αποτελέσματα από την φασματομετρία μάζας, η πρώτη πρωτεΐνη που βρέθηκε ήταν η E3 πρωτεϊνική λιγάση της ουβικουιτίνης, η οποία είναι γνωστό και σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (*Πίνακας 10*). Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη συμμετέχει στη διαδικασία της ουβικουιτινίωσης, μεταφέροντας την ουβικιτίνη σε ένα κατάλοιπο λυσίνης στην πρωτεΐνη- στόχο (Stryer L, 2012). Επόμενη ήταν η τουμπουλίνη (α και β3 αλυσίδα), κύριο συστατικό των μικροσωληνίσκων. Μέσω των αλυσίδων α και β επιτυγχάνεται η πρόσδεση σε

μόρια GTP, συμμετέχοντας στη ρύθμιση πολυμερισμού της ακτίνης. Μονομερή α- και β-τουμπουλίνης πολυμερίζονται και σχηματίζουν συγκεκριμένες δομές, τους μικροσωληνίσκους (Cooper G, 2011). Ακόμη, είναι γνωστό πως η τουμπουλίνη αλληλεπιδρά με την ακτίνη, η οποία όπως προαναφέρθηκε στην εισαγωγή αποτελεί μία πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά άμεσα με την αγγειογενίνη. Επόμενη πρωτεΐνη είναι ο παράγοντας έναρξης της μετάφρασης eIF-3, ο οποίος αποτελεί συστατικό του προεναρκτήριου συμπλόκου της μετάφρασης. Ο eIF-3 αλληλεπιδρά με τον eIF-4G προωθώντας την πρόσδεση του συμπλόκου πρόσδεσης στην καλύπτρα των mRNA μορίων (Brown T, 2007). Ακολουθεί η β-υπομονάδα της πρωτεΐνης δέσμευσης γουανίνης, η οποία συμμετέχει στην πρόσληψη, τη συναρμολόγηση ή / και τη ρύθμιση μιας ποικιλίας μορίων σηματοδότησης. Αλληλεπιδρά με μια ευρεία ποικιλία πρωτεϊνών και παίζει ρόλο σε πολλές κυτταρικές διεργασίες. Αποτελεί συστατικό της υπομονάδας 40S του ριβοσώματος και εμπλέκεται στην καταστολή της μετάφρασης. Επιπλέον, μία ακόμη πρωτεΐνη που ταυτοποιήθηκε αποτελεί η CCDC124, μία πρωτεΐνη με δομή σπειρωμένου σπειράματος που περιλαμβάνει την πρωτεΐνη 124, απαραίτητη για την ολοκλήρωση των τελευταίων κυτοκινητικών σταδίων. Κατά την ανάλυση των αποτελεσμάτων, παρατηρήθηκε ένας σημαντικός αριθμός ριβοσωμικών πρωτεϊνών οι οποίες φαίνεται να αλληλεπιδρούν με την αγγειογενίνη, όπως η SA, η S2, η S4, η S15 και S18, οι οποίες αποτελούν συστατικά της υπομονάδας 40S του ριβοσώματος. Επίσης, βρέθηκαν και συστατικά της υπομονάδας 60S του ριβοσώματος όπως η L11.

2. Απομόνωση και καθαρισμός της ανθρώπινης αγγειογενίνης (hANG).

Για την απομόνωση και τον καθαρισμό της ανθρώπινης αγγειογενίνης ακολουθήθηκε η διαδικασία που προαναφέρθηκε. Το πρωτεϊνικό εκχύλισμα που συλλέχθηκε από την καλλιέργεια των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε για την

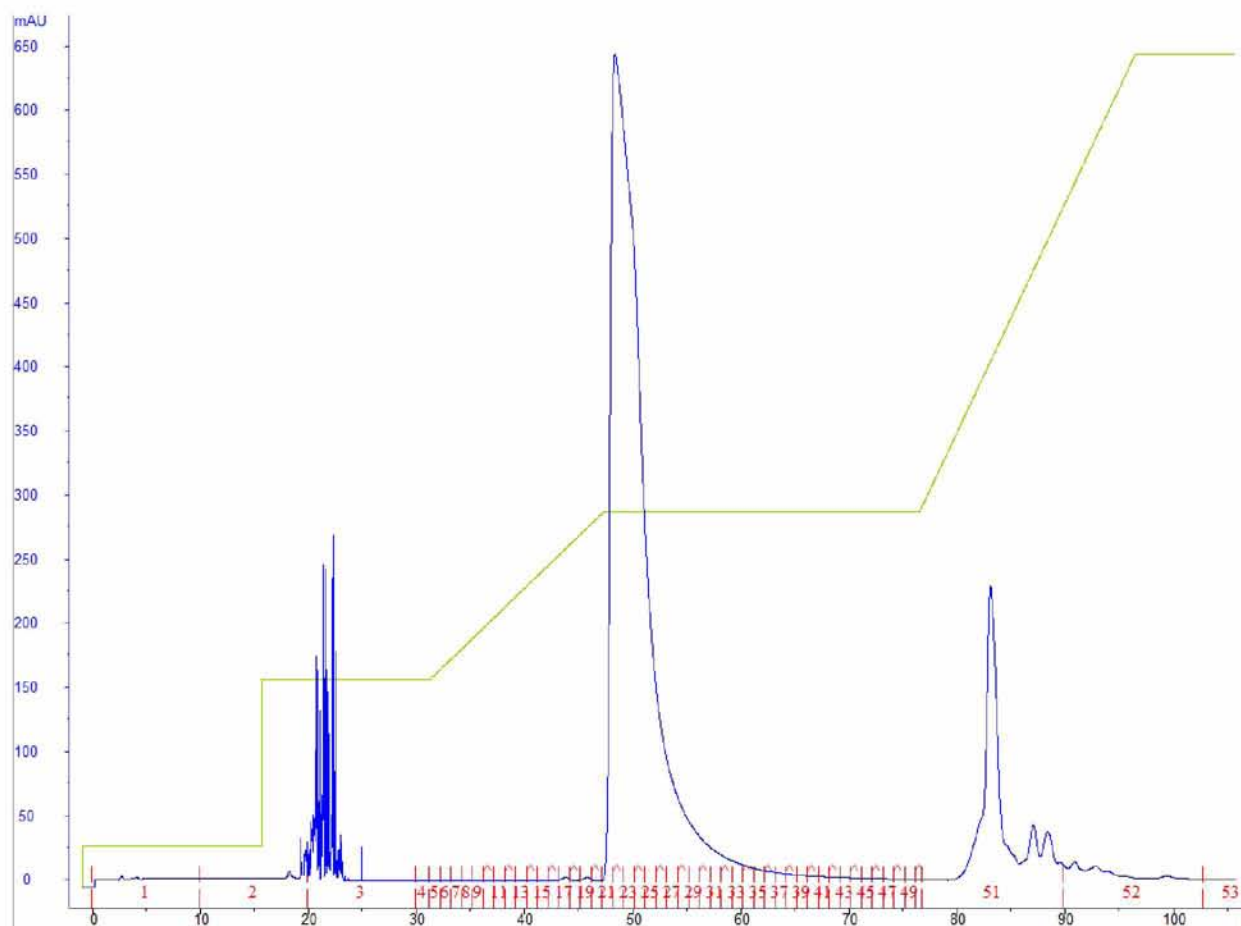
απομόνωση της αγγειογενίνης μέσω του συστήματος FPLC. Η πρώτη στήλη που χρησιμοποιήθηκε είναι η SP-Sepharose Fast Flow cation-exchange resin 16/10, μια κατιονανταλλακτική στήλη(Εικόνα 26). Η έκλουση της πρωτεΐνης έγινε με εφαρμογή 100% διαλύματος B και συλλέχθηκαν 4 κλάσματα (5,6,7 και 8) 1mL το κάθε ένα, που παρουσίασαν την υψηλότερη απορρόφηση. Η απόδοση καθαρισμού μετά την 1^η στήλη ήταν 3mg ανά 0,5L βακτηριακής καλλιέργειας.



Εικόνα 26: Χρωματογράφημα της στήλης SPFF. Με μπλε γραμμή απεικονίζεται η τιμή της απορρόφησης σε μήκος κύματος 280nm και με πράσινη γραμμή η συγκέντρωση του διαλύματος B.

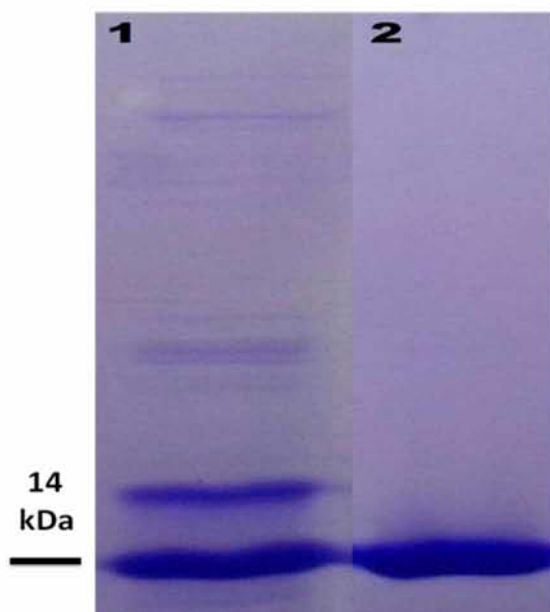
Τα κλάσματα που συλλέχθηκαν, αφού ενώθηκαν, φορτώθηκαν στη δεύτερη στήλη καθαρισμού τη C18 reversed-phase resin (αντίστροφης φάσης). Τα κλάσματα στα οποία πραγματοποιήθηκε η έκλουση- με διαβάθμιση συγκέντρωσης 25-45% του διαλύματος B- σύμφωνα με την τιμή της

απορρόφησης σε μήκος κύματος 280nm, ήταν τα 20-34, όγκου 1mL το κάθε ένα. Η απόδοση καθαρισμού μετά την 2^η στήλη ήταν 2mg ανά 0,5L βακτηριακής καλλιέργειας (Εικόνα 27).



Εικόνα 27: Χρωματογράφημα στήλης RPC18. Με μπλε γραμμή απεικονίζεται η τιμή της απορρόφησης σε μήκος κύματος 280nm και με πράσινη γραμμή η συγκέντρωση διαλύματος B

Μετά την ολοκλήρωση του καθαρισμού της πρωτεΐνης, πραγματοποιήθηκε αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου (10%) παρουσία SDS και χρώση με Coomassie Blue (Εικόνα 28).



Εικόνα 28: Δείγμα με την πρώτη στήλη (1) και δείγμα μετά την δεύτερη στήλη (2).

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ποσοτικός προσδιορισμός της πρωτεΐνης και με την μέθοδο Bradford. Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης ήταν 0,133 mg/mL, σε συνολικό όγκο 15mL. Επειδή, όμως, το δείγμα θα χρησιμοποιηθεί για την εφαρμογή κρυσταλλώσεων της πρωτεΐνης, η συγκέντρωση της πρωτεΐνης είναι μικρή. Για το λόγο αυτό, πραγματοποιήθηκε συμπύκνωση της αγγειογενίνης, ώστε η τελική της συγκέντρωση να είναι 20 mg/ mL.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford και ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE).

3. Κρυστάλλωση της Met(-1)ANG.

➤ Μέθοδος της κρεμάμενης σταγόνας (hangingdrop)

Στο συγκεκριμένο πείραμα, χρησιμοποιήθηκαν 2 συνθήκες βάσει βιβλιογραφίας (Πίνακας 11). Η αναλογία πρωτεΐνης- διαλύματος εξισορρόπησης στη σταγόνα ήταν 1:1 και το πυκνό διάλυμα πρωτεΐνης είχε συγκέντρωση 20 mg/ml.

Πίνακας 11: Συνθήκες κρυστάλλωσης της αγγειογενίνης με την μέθοδο της κρεμάμενης σταγόνας

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

Από τη συνθήκη 1. παράγεται μεγάλος αριθμός κρυστάλλων μικρού μεγέθους που πιθανόν να οφείλεται στον κατακρημνιστικό παράγοντα 10% w/v PEG6000. Για το λόγο αυτό, αυξήθηκε η συγκέντρωση του κατακρημνιστικού παράγοντα (2, Πίνακας 11).

Σε αυτές τις συνθήκες σχηματίστηκαν κρύσταλλοι Ang, ωστόσο ο αριθμός και το μέγεθός τους ήταν πολύ μικρό. Σε όλες τις συνθήκες παρατηρήθηκε μεγάλη ποσότητα ιζήματος, γεγονός που χαρακτηρίζεται ως ανασταλτικός παράγοντας για την ανάπτυξη κρυστάλλων εφόσον η πρωτεΐνη λόγω της μεγάλης συγκέντρωσης κατακρημνιστικού παράγοντα καθιζάνει.

➤ **Μέθοδος καθημένης σταγόνας**

Στο συγκεκριμένο πείραμα, χρησιμοποιήθηκαν 24 συνθήκες κρυστάλλωσης με τη χρήση του ρομπότ. Η αναλογία πρωτεΐνης/ διαλύματος εξισορρόπησης ήταν 2:1 σε σταγόνα όγκου 0.4 μ l. Το αρχικό stock από το οποίο λαμβάνεται η πρωτεΐνη είναι 14.6 mg/ml. Στον πίνακα 12 παρουσιάζονται οι συνθήκες κρυστάλλωσης που χρησιμοποιήθηκαν.

Πίνακας 12: Συνθήκες Κρυστάλλωσης με την μέθοδο της καθημένης σταγόνας

<u>Αριθμός δ/τος</u> <u>εξισορρόπησης</u>	<u>Ρυθμιστικό</u> <u>Διάλυμα</u>	<u>Αλάτι</u>
D1	0,1M Hepes pH=7,5	0,5M θθειϊκό αμμώνιο
D2	0,1M Hepes pH=7,5	0,8M θθειϊκό αμμώνιο
D3	0,1M Hepes pH=7,5	1M θθειϊκό αμμώνιο
D4	0,1M Hepes pH=7,5	1,2M θθειϊκό αμμώνιο
D5	0,1M Hepes pH=7,5	1,6M θθειϊκό αμμώνιο
D6	0,1M Hepes pH=7,5	2M θθειϊκό αμμώνιο

D7	<i>0,1M Hepes pH=7,5</i>	<i>1M χλωριούχο νάτριο</i>
D8	<i>0,1M Hepes pH=7,5</i>	<i>1,2M χλωριούχο νάτριο</i>
D9	<i>0,1M Hepes pH=7,5</i>	<i>1,5M χλωριούχο νάτριο</i>
D10	<i>0,1M Hepes pH=7,5</i>	<i>1,8M χλωριούχο νάτριο</i>
D11	<i>0,1M Hepes pH=7,5</i>	<i>2,2M χλωριούχο νάτριο</i>
D12	<i>0,1M Hepes pH=7,5</i>	<i>2,5M χλωριούχο νάτριο</i>
E1	<i>0,1M Tris pH= 8,5</i>	<i>0,5M θθειϊκό αμμώνιο</i>
E2	<i>0,1M Tris pH= 8,5</i>	<i>0,8M θθειϊκό αμμώνιο</i>
E3	<i>0,1M Tris pH= 8,5</i>	<i>1M θθειϊκό αμμώνιο</i>

E4	0,1M Tris pH= 8,5	1,2M θθειϊκό αμμώνιο
E5	0,1M Tris pH= 8,5	1,6M θθειϊκό αμμώνιο
E6	0,1M Tris pH= 8,5	2M θθειϊκό αμμώνιο
E7	0,1M Tris pH= 8,5	1M χλωριούχο νάτριο
E8	0,1M Tris pH= 8,5	1,2M χλωριούχο νάτριο
E9	0,1M Tris pH= 8,5	1,5M χλωριούχο νάτριο
E10	0,1M Tris pH= 8,5	1,8M χλωριούχο νάτριο
E11	0,1M Tris pH= 8,5	2,2M χλωριούχο νάτριο
E12	0,1M Tris pH= 8,5	2,5M χλωριούχο νάτριο

Στις συγκεκριμένες συνθήκες δεν παρατηρήθηκε σχηματισμός κρυστάλλων. Για το λόγο αυτό, δοκιμάστηκαν διαφορετικά ρυθμιστικά διαλύματα, ενώ οι κατακρημνιστικοί παράγοντες και η αναλογία πρωτεΐνης/ διαλύματος εξισορρόπησης παρέμειναν ίδια (Πίνακας 13).

Πίνακας 13: Συνθήκες κρυσταλλώσεων με την μέθοδο της καθήμενης σταγόνας.

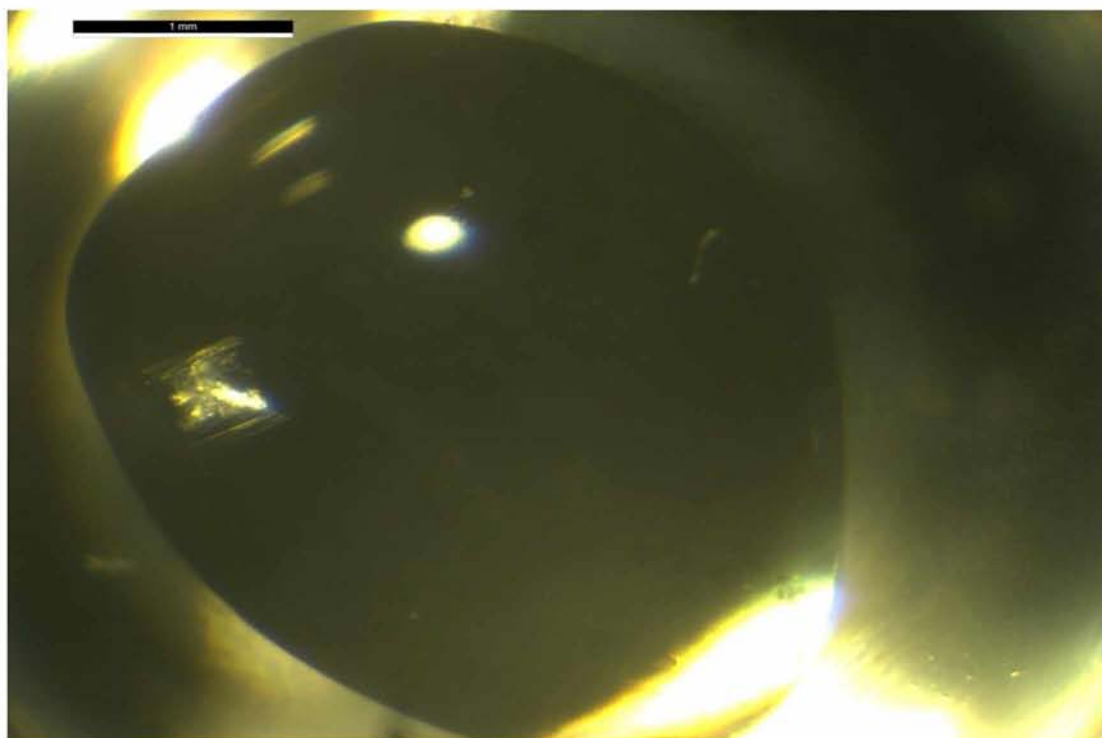
<u>Αριθμός δ/τος</u> <u>εξισορρόπησης</u>	<u>Ρυθμιστικό</u> <u>Διάλυμα</u>	<u>Αλάτι</u>
B1	0,1M Κιτρικό Νάτριο pH=5,2	0,5M Θειϊκό Αμμώνιο
B2	0,1M Κιτρικό Νάτριο pH=5,2	0,8M Θειϊκό Αμμώνιο
B3	0,1M Κιτρικό Νάτριο pH=5,2	1M Θειϊκό Αμμώνιο
B4	0,1M Κιτρικό Νάτριο pH=5,2	1,2M Θειϊκό Αμμώνιο
B5	0,1M Κιτρικό Νάτριο pH=5,2	1,6M Θειϊκό Αμμώνιο
B6	0,1M Κιτρικό Νάτριο pH=5,2	2M Θειϊκό Αμμώνιο
B7	0,1M Κιτρικό Νάτριο pH=5,2	1M Χλωριούχο Νάτριο
B8	0,1M Κιτρικό	1,2M

	<i>Νάτριο pH=5,2</i>	<i>Χλωριούχο Νάτριο</i>
B9	<i>0,1M Κιτρικό Νάτριο pH=5,2</i>	<i>1,5M Χλωριούχο Νάτριο</i>
B10	<i>0,1M Κιτρικό Νάτριο pH=5,2</i>	<i>1,8M Χλωριούχο Νάτριο</i>
B11	<i>0,1M Κιτρικό Νάτριο pH=5,2</i>	<i>2,2M Χλωριούχο Νάτριο</i>
B12	<i>0,1M Κιτρικό Νάτριο pH=5,2</i>	<i>2,5M Χλωριούχο Νάτριο</i>
C1	<i>0,1M κακοδυλικό νάτριο pH=6</i>	<i>0,5M Θειικό Αμμώνιο</i>
C2	<i>0,1M κακοδυλικό νάτριο pH=6</i>	<i>0,8M Θειικό Αμμώνιο</i>
C3	<i>0,1M κακοδυλικό νάτριο pH=6</i>	<i>1M Θειικό Αμμώνιο</i>

C4	0,1M κακοδυλικό νάτριο pH=6	1,2M Θειϊκό Αμμώνιο
C5	0,1M κακοδυλικό νάτριο pH=6	1,6M Θειϊκό Αμμώνιο
C6	0,1M κακοδυλικό νάτριο pH=6	2M Θειϊκό Αμμώνιο
C7	0,1M κακοδυλικό νάτριο pH=6	1M Χλωριούχο Νάτριο
C8	0,1M κακοδυλικό νάτριο pH=6	1,2M Χλωριούχο Νάτριο
C9	0,1M κακοδυλικό νάτριο pH=6	1,5M Χλωριούχο Νάτριο
C10	0,1M κακοδυλικό νάτριο pH=6	1,8M Χλωριούχο Νάτριο
C11	0,1M κακοδυλικό	2,2M Χλωριούχο

	νάτριο $pH=6$	Νάτριο
C12	0,1M	2,5M
	κακοδυλικό	Χλωριούχο
	νάτριο $pH=6$	Νάτριο

Παρατηρήθηκαν κρύσταλλοι στις συνθήκες B6 και C6 ύστερα από 24 ώρες. Το μέγεθος τους, καθώς και η μορφολογία τους δεν ήταν κατάλληλα. Μετά από 48 και 72 ώρες παρατηρήθηκε μικρή αύξηση του μεγέθους τους.



Εικόνα 29: Κρύσταλλοι που σχηματίστηκαν παρουσία 0,1M κακοδυλικού νατρίου $te\ pH: 6$ και 2M Θειικούαμμωνίου

➤ **Βελτιστοποίηση Κρυσταλλώσεων**

Στηριζόμενοι στις συνθήκες όπου παρατηρήθηκε σχηματισμός κρυστάλλων (B6,C6) δημιουργήθηκαν καινούριες συνθήκες κρυστάλλωσης. Σε πρώτη φάση, το κιτρικό νάτριο αντικαταστήθηκε από όξινο νάτριο, διότι το κιτρικό νάτριο εμποδίζει την αγγειογενίνη να μεταβεί στην ανοιχτή της διαμόρφωση. Η

αναλογία πρωτεΐνης / διαλύματος εξισορρόπησης παραμένει ίδια (Πίνακας 14).

Πίνακας 14: Συνθήκες κρυστάλλωσης

<u>Αριθμός δ/τος</u> <u>εξισορρόπησης</u>	<u>Ρυθμιστικό</u> <u>Διάλυμα</u>	<u>Αλάτι</u>
A1	0,1M οξικό νάτριο pH=5,2	1,8M Θειϊκό Αμμώνιο
A2	0,1M οξικό νάτριο pH=5,2	2M Θειϊκό Αμμώνιο
A3	0,1M οξικό νάτριο pH=5,2	2,2M Θειϊκό Αμμώνιο
A4	0,1M οξικό νάτριο pH=5,2	2,4M Θειϊκό Αμμώνιο
B1	0,1M κακοδυλικό νάτριο pH=6	1,8M Θειϊκό Αμμώνιο
B2	0,1M κακοδυλικό νάτριο pH=6	2M Θειϊκό Αμμώνιο
B3	0,1M κακοδυλικό νάτριο pH=6	2,2M Θειϊκό Αμμώνιο
B4	0,1M	2,4M Θειϊκό

κακοδυλικό
νάτριο pH=6

Αμμώνιο

Σχηματισμός κρυστάλλων παρατηρήθηκε σε συνθήκες με pH:6 ύστερα από 72 ώρες. Οι κρύσταλλοι, όμως, ήταν λεπτοί, μικροί και σχημάτιζαν συσσωματώματα.

➤ Πυρήνωση

Επομένη μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για τη βελτιστοποίηση των συνθηκών κρυστάλλωσης ήταν η πυρήνωση. Ως υπόστρωμα για την ανάπτυξη μεγαλύτερων κρυστάλλων αγγειογενίνης, χρησιμοποιήθηκαν κρύσταλλοι που αναπτύχθηκαν στις προηγούμενες συνθήκες. Η τεχνική που εφαρμόστηκε ήταν αυτή της καθημερινής σταγόνας με τη χρήση του ρομπότ, κατά την οποία σε όγκο σταγόνας 0.4μl οι αναλογίες ήταν οι ακόλουθες: 66,6% πρωτεΐνη, 23,3% reservoir και 10% πυρήνες, δηλαδή θρυμματισμένοι κρύσταλλοι. Οι θρυμματισμένοι κρύσταλλοι προέκυψαν από τους κρυστάλλους που συλλέχθηκαν από τις προηγούμενες συνθήκες B1-B4, οι οποίοι θρυματίστηκαν με ειδική μπίλια σε σωληνάκι τύπου erpendorf, με τη χρήση vortex, σε 10μl διαλύματος εξισορρόπησης (0,1M κακοδυλικό νάτριο pH=6, 1,6M Θεικό αμμώνιο). Το MPD χρησιμοποιήθηκε ως κατακρημνιστικός παράγοντας σε αναλογία 2% (Πίνακας 15)

Πίνακας 15: Συνθήκες κρυσταλλώσεων με την μέθοδο της πυρήνωσης

<u>Αριθμός</u> <u>δ/τος</u> <u>εξισορρόπισ</u> <u>ης</u>	<u>Ρυθμιστικό</u> <u>Διάλυμα</u>	<u>Αλάτι/</u> <u>Κατακρημνιστ</u> <u>ικός</u> <u>παράγοντας</u>
---	-------------------------------------	--

<i>A1</i>	<i>0,1M κακοδυλικό νάτριο pH=6</i>	<i>1,6M Θειϊκό αμμώνιο 2%MPD</i>
<i>A2</i>	<i>0,1M κακοδυλικό νάτριο pH=6</i>	<i>1,8M Θειϊκό αμμώνιο 2%MPD</i>
<i>A3</i>	<i>0,1M κακοδυλικό νάτριο pH=6</i>	<i>2M Θειϊκό αμμώνιο 2%MPD</i>

Η εικόνα των αποτελεσμάτων ήταν η ίδια με την προηγούμενη. Για το λόγο αυτό, επαναλήφθηκε η ίδια μέθοδος διατηρώντας ίδιες τις συνθήκες αλλά αυξάνοντας την αναλογία του MPD σε 10% (Πίνακας 16). Οι αναλογίες παρέμειναν ίδιες (66,6% πρωτεΐνη, 23,3% reservoir και 10% πυρήνες).

Πίνακας 16: Συνθήκες κρυστάλλωσης με την μέθοδο της πυρήνωσης

<i>Αριθμός μήτρας</i>	<i>Ρυθμιστικό Διάλυμα</i>	<i>Κατακρήμνι στικός παράγοντας</i>
<i>A1</i>	<i>0,1M κακοδυλικό νάτριο pH=6</i>	<i>1,6M Θειικό αμμώνιο 10%MPD</i>
<i>A2</i>	<i>0,1M κακοδυλικό νάτριο pH=6</i>	<i>1,8M Θειικό αμμώνιο 10%MPD</i>
<i>A3</i>	<i>0,1M κακοδυλικό νάτριο pH=6</i>	<i>2M Θειικό αμμώνιο 10%MPD</i>

Το αποτέλεσμα ήταν και πάλι αρνητικό καθώς η αύξηση της αναλογίας του MPD είχε ως αποτέλεσμα την κατακρήμνιση του θειικού αμμωνίου. Επαναλήφθηκαν οι προηγούμενες συνθήκες κρυστάλλωσης (Πίνακας 15), αλλά μεταβλήθηκε η συγκέντρωση της πρωτεΐνης (πυκνό διάλυμα πρωτεΐνης 9,5 mg/ml). Η εικόνα των κρυστάλλων παρέμεινε ίδια.

Επόμενη προσπάθεια ήταν η αντικατάσταση του MPD από την γλυκερόλη, αλλά και η μεταβολή της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης (Πίνακας 17). Το πείραμα πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας την τεχνική της κρεμάμενης σταγόνας, χειροκίνητα. Ο όγκος του κάθε διαλύματος εξισορρόπησης στο πηγαδάκι ήταν 700μl και ο όγκος της σταγόνας 3μl. Η

αναλογία πρωτεΐνης/ διαλύματος εξισορόπησης ήταν 1:1. Πιο συγκεκριμένα, σε μερικές συνθήκες προστέθηκε 1% γλυκερόλη. Επίσης, στις 2 πρώτες συνθήκες η αρχική συγκέντρωση της πρωτεΐνης ήταν 9mg/ml (συγκέντρωση πρωτεΐνης στη σταγόνα 4,5mg/ml), ενώ στις 2 επόμενες ήταν 7mg/ml η αρχική συγκέντρωση της πρωτεΐνης (3,5mg/ml συγκέντρωση πρωτεΐνης στη σταγόνα).

Πίνακας 17: Συνθήκες κρυσταλλώσεων

<i>Αριθμός μήτρας</i>	<i>Ρυθμιστικό Διάλυμα</i>	<i>Κατακρημνιστικός Παράγοντας</i>	<i>Πυκνό διάλυμα πρωτεΐνης</i>
A1	0,1M κακοδυλικό νάτριο pH=6	2M Θειϊκό αμμώνιο	9mg/ml
A2	0,1M κακοδυλικό νάτριο pH=6	2,2M Θειϊκό αμμώνιο	9mg/ml
B1	0,1M κακοδυλικό νάτριο pH=6	2M Θειϊκό αμμώνιο	7mg/ml
B2	0,1M κακοδυλικό	2,2M Θειϊκό αμμώνιο	7mg/ml

κό νάτριο

pH=6

C1	0,1M κακοδυλι κό νάτριο pH=6	2M Θειϊκό αμμώνιο 1% γλυκερόλη	9mg/ml
-----------	---------------------------------------	--------------------------------------	--------

C2	0,1M κακοδυλι κό νάτριο pH=6	2,2M Θειϊκό αμμώνιο 1% γλυκερόλη	9mg/ml
-----------	---------------------------------------	--	--------

Τα αποτελέσματα ήταν αρνητικά και σε αυτή την προσπάθεια. Τελευταία δοκιμή ήταν η αλλαγή του κατακρημνιστικού παράγοντα (Πίνακας 18). Αντί για θειϊκό αμμώνιο χρησιμοποιήθηκε θειϊκό λίθιο, αλλά δεν σχηματίστηκαν κρύσταλλοι.

Πίνακας 18: Συνθήκες κρυστάλλωσεις με θειϊκό λίθιο

Αριθμός μήτρας	Ρυθμιστικό Διάλυμα	Κατακρημνιστικός Παράγοντας
A1	0,1M κακοδυλικό νάτριο pH=6	2,2M Θειϊκό λίθιο

Ε. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η αγγειογενίνη είναι μια πρωτεΐνη η οποία ανήκει στην οικογένεια των ριβονουκλεασών. Η μελέτη της παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον καθώς αποτελεί βασικό επαγωγέα της αγγειογένεσης και συμβάλει στην αύξηση και τον πολλαπλασιασμό όγκων. Όπως έχει όμως ήδη αναφερθεί, υπάρχουν πολλά ακόμη τα οποία δεν έχουν αποσαφηνισθεί για τις βιολογικές της δράσεις.

Στην παρούσα εργασία, πραγματοποιήθηκε μια προσπάθεια ταυτοποίησης των πρωτεϊνών που σχηματίζουν σύμπλοκα με την αγγειογενίνη, προσπαθώντας έτσι να εμπλουτιστούν οι γνώσεις για τα σηματοδοτικά μονοπάτια στα οποία συμμετέχει. Η ανοσοκατακρήμνιση πρωτεϊνών καθώς και η φασματομετρία μάζας, αποτέλεσαν δύο βασικές μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν για την επίτευξη του στόχου μας. Αφού πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανοσοκατακρήμνισης από καρκινικά ενδοθηλιακά κύτταρα του πνεύμονα (EA.hy926), αλλά και η ανάλυση των δειγμάτων μέσω φασματομετρίας μάζας, ταυτοποιήθηκαν 12 πρωτεΐνες οι οποίες αλληλεπιδρούν με την αγγειογενίνη στο κυτταρόπλασμα.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, έχουν ταυτοποιηθεί αρκετές πρωτεΐνες οι οποίες αλληλεπιδρούν άμεσα με την αγγειογενίνη, μια εκ των οποίων είναι η ακτίνη. Η ακτίνη εκφράζεται σε όλα τα είδη ευκαρυωτικών κυττάρων και συμμετέχει σε διάφορους τύπους κυτταρικής κινητικότητας. Όπως προαναφέρθηκε αλληλεπιδρά με την τουμπουλίνη συμμετέχοντας έτσι στο σχηματισμό των μικροσωληνίσκων. Επίσης, έχει αποδειχτεί η αλληλεπίδραση της αγγειογενίνης με κυτοκίνες, οι οποίες επάγουν τον πολλαπλασιασμό των T-

κυττάρων.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, η πλειονότητα των πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με την αγγειογενίνη είναι ριβοσωμικές. Οι ριβοσωμικές πρωτεΐνες, αποτελούν αναπόσπαστο μέρος της βασικής κυτταρικής μηχανής, που εμπλέκεται στην πρωτεϊνική βιοσύνθεση. Μετακινούνται στον πυρηνίσκο, όπου συναντούν τα νεοσυντιθέμενα rRNAs, προκειμένου να λάβει χώρα η συγκρότηση των ριβοσωμικών υπομονάδων. Αλληλεπιδρώντας η αγγειογενίνη με τις συγκεκριμένες πρωτεΐνες, είναι πιθανό να συμμετέχει στη διαδικασία της μετάφρασης. Αν δημιουργεί σύμπλοκα με απαραίτητες για την ριβοσωμική βιοσύνθεση πρωτεΐνες, μπορεί να παρεμποδίζει την σύνθεση των ριβοσωμικών μονάδων και άρα τη διαδικασία της μετάφρασης. Ίσως, όμως, να είναι απαραίτητη η αλληλεπίδραση της αγγειογενίνης με τις συγκεκριμένες πρωτεΐνες για το σχηματισμό των ριβοσωμάτων.

Πρέπει να τονιστεί πως το δείγμα μας παράλληλα με την ανοσοκατακρήμνιση με το ειδικό αντίσωμα έναντι της αγγειογενίνης επώαστηκε με το ένζυμο Ριβονουκλεάση Α. Το βήμα αυτό είναι πολύ σημαντικό, προκειμένου να εξαλειφτούν οι έμμεσες αλληλεπιδράσεις λόγω παρεμβολής RNA μορίων. Βάσει βιβλιογραφίας γνωρίζουμε ότι η αγγειογενίνη αλληλεπιδρά με rRNA μόρια και επάγει την μεταγραφή τους. Η επώαση με RNase Α έχει ως αποτέλεσμα την αποικοδόμηση μορίων rRNA, έτσι ώστε στα αποτελέσματα να εμφανίζονται μόνο πρωτεΐνες που παρουσιάζουν άμεση αλληλεπίδραση με την αγγειογενίνη.

Η τουμπουλίνη είναι μια ακόμα πρωτεΐνη που ταυτοποιήθηκε. Είναι ήδη γνωστή η αλληλεπίδραση της τουμπουλίνης με την ακτίνη, μια πρωτεΐνη η οποία έχει αποδειχθεί πως σχηματίζει σύμπλοκο με την αγγειογενίνη, πράγμα το οποίο μπορεί να σημαίνει ότι υπάρχει η πιθανότητα δημιουργίας ενός συμπλόκου τουμπουλίνης/ ακτίνης/ αγγειογενίνης, καθώς και οι 3 πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν μεταξύ τους. Είναι πιθανόν, μέσω ενός τέτοιου μηχανισμού, η αγγειογενίνη να

συμμετέχει στον σχηματισμό μικροσωληνίσκων.

Τέλος, η E3 λιγάση της ουβικιτίνης, ο παράγοντας έναρξης της μετάφρασης eIF-3 και η CCDC124 πρωτεΐνη- μόρια που συμμετέχουν σε διαφορετικές διεργασίες- αποτελούν τις υπόλοιπες πρωτεΐνες που σχηματίζουν σύμπλοκα με την αγγειογενίνη. Η αλληλεπίδραση της αγγειογενίνης με την E3 λιγάση της ουβικιτίνης, ίσως να παρεμποδίζει την αποικοδόμηση μιας πρωτεΐνης μέσω της διαδικασίας της ουβικουτινίωσης, καθώς παρεμποδίζεται η πρόσδεση της E3 στην πρωτεΐνη στόχο.

Η πιθανή αλληλεπίδραση του παράγοντα έναρξης της μετάφρασης eIF-3 με την αγγειογενίνη, ενισχύει την άποψη πως η αγγειογενίνη επηρεάζει την διαδικασία της μετάφρασης. Είτε σχηματίζοντας σύμπλοκα με ριβοσωμικές πρωτεΐνες, είτε σχηματίζοντας σύμπλοκο με τον eIF-3, επάγει ή καταστέλλει την πρωτεϊνοσύνθεση ή αποτελεί έναν ρυθμιστικό παράγοντα στρατολογώντας άλλους μεταφραστικούς παράγοντες. Απαιτείται, επομένως, περαιτέρω έρευνα για την επαλήθευση αρχικά του σχηματισμού των προαναφερθέντων συμπλόκων και στη συνέχεια εξακρίβωση της δράσης των συμπλόκων αυτών.

Η CCDC124 είναι μία πρωτεΐνη με δομή σπειρωμένου σπειράματος που περιλαμβάνει την πρωτεΐνη 124, απαραίτητη για την ολοκλήρωση των τελευταίων κυτοκινητικών σταδίων, όπως προαναφέρθηκε. Αλληλεπίδραση με την αγγειογενίνη μπορεί να επιφέρει αλλαγή στη διαμόρφωση της CCDC124 στο χώρο, εμποδίζοντας την αλληλεπίδρασή της με την πρωτεΐνη 124, εμποδίζοντας έτσι την ολοκλήρωση των κυτοκινητικών σταδίων.

Η πιθανή αλληλεπίδραση της αγγειογενίνης με τις εξής πρωτεΐνες μπορεί να έχει αρνητικές ή θετικές επιπτώσεις στον οργανισμό. Η ανάγκη για έρευνα είναι μεγάλη, καθώς είναι πολλά τα ερωτήματα που προκύπτουν. Σε πρώτη προσέγγιση, πρέπει να επαληθευτεί η δημιουργία συμπλόκων των πρωτεϊνών που ταυτοποιήθηκαν, με την αγγειογενίνη. Πρέπει, λοιπόν, να πραγματοποιηθούν πειράματα ανοσοκατακρήμνισης χρησιμοποιώντας

αντισώματα ειδικά για τις ταυτοποιημένες πρωτεΐνες. Επίσης, μετά την επαλήθευση της δημιουργίας των συμπλόκων, πρέπει να προσδιοριστεί ο βιολογικός ρόλος και η λειτουργία του εκάστοτε συμπλόκου.

Παράλληλα, δοκιμάστηκαν αρκετές συνθήκες στην προσπάθεια να κρυσταλλωθεί η αγγειογενίνη στην ανοιχτή διαμόρφωση της (δηλαδή σε μια μορφή που έχει αλλάξει η στερεοδιάταξή της στο χώρο) μια διαμόρφωση για την οποία δεν υπάρχουν ακόμα κρυσταλλογραφικά δεδομένα. Αρχικά, παρατηρήθηκε ο σχηματισμός κρυστάλλων μέσω της μεθόδου της καθημερινής σταγόνας στις συνθήκες B6 (0,1M Κιτρικό Νάτριο pH:5,2 και 2M θειικό αμμώνιο) και C6 (0,1M κακοδυλικό νάτριο pH=6 και 2M θειικό αμμώνιο). Οι κρύσταλλοι, όμως, δεν είχαν το επιθυμητό μέγεθος.

Στην πρώτη προσπάθεια βελτιστοποίησης σχηματίστηκαν κρύσταλλοι σε συνθήκες με pH:6 (0,1M κακοδυλικό νάτριο) και με θειικό αμμώνιο σε συγκεντρώσεις 1,8M, 2M, 2,2M, 2,4M. Οι κρύσταλλοι, όμως, ήταν λεπτοί, μικροί και σχηματίζουν συσσωματώματα. Επομένως, επόμενο βήμα είναι η προσπάθεια βελτίωσης της μορφολογίας των κρυστάλλων.

Για το λόγο αυτό, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της πυρήνωσης και η προσθήκη του κατακρημνιστικού παράγοντα MPD σε αναλογία 2%. Η εικόνα των κρυστάλλων παρέμεινε ίδια. Στη συνέχεια, αυξήθηκε η συγκέντρωση του MPD σε 10% καθώς και μεταβολές στην αρχική συγκέντρωση της πρωτεΐνης (9mg/ml και 7mg/ml όπως παρουσιάζεται στα αποτελέσματα). Επειδή τα αποτελέσματα δεν ήταν τα επιθυμητά, το MPD αντικαταστάθηκε από γλυκερόλη. Το MPD, όπως και η γλυκερόλη στη συνέχεια, χρησιμοποιήθηκαν για το σχηματισμό μεγάλων κρυστάλλων. Η συγκέντρωση των κατακρημνιστικών παραγόντων πρέπει να είναι η σωστή, ώστε να μην έχουμε ως αποτέλεσμα να κατακρημνιστεί η πρωτεΐνη με τη μορφή ιζήματος.

Τα αποτελέσματα στην πλειονότητά τους ήταν αρνητικά. Οι κρύσταλλοι που σχηματίστηκαν ήταν λεπτοί, μικροί και πολλοί, με αποτέλεσμα να

σχηματίζουν συσσωματώματα, γεγονός που εμποδίζει την χρήση τους για ανάλυση δομή μέσω κρυσταλλογραφίας με ακτίνες X. Αξίζει να τονιστεί η εύρεση μιας καινούργιας συνθήκης κρυστάλλωσης της αγγειογενίνης (0,1M κακοδυλικό νάτριο pH=6, 2M θειικό αμμώνιο). Επίσης, το ρυθμιστικό διάλυμα κακοδυλικό νάτριο 0,1M pH=6 είναι κατάλληλο για τον σχηματισμό κρυστάλλων. Ως διαλύματα εξισορρόπησης δοκιμάστηκαν σε διάφορες συγκεντρώσεις το θειικό αμμώνιο, το θειικό λίθιο και το χλωριούχο νάτριο. Μόνο το θειικό νάτριο έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση κρυστάλλων. Παρόλο που δεν σχηματίστηκαν οι κατάλληλοι κρύσταλλοι, δημιουργήσαμε μια καλύτερα εικόνα σχετικά με τις συνθήκες κρυστάλλωσης της αγγειογενίνης. Με βάσει τα νέα πλέον δεδομένα, μπορούν να γίνουν νέες προσπάθειες και δοκιμή νέων συνθηκών, ώστε να σχηματιστούν οι κατάλληλοι κρύσταλλοι. Τέλος, οι κρύσταλλοι που προέκυψαν από την νέα συνθήκη θα χρησιμοποιηθούν για κρυσταλλογραφία με ακτίνες X με στόχο την λύση της δομής της αγγειογενίνης στην ανοιχτή διαμόρφωσή της.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Adams A.S. and Subramanian V.: The angiogenins: An emerging family of ribonuclease related proteins with diverse cellular functions. Kluwer Academic Publishers 189±199, 1999.
- Auspruk D.H., Folkman J. : Migration and proliferation of endothelial cells in performed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis. Microvasc. Resc. 14, 1977
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JD, and Struhl K :Current Protocols in Molecular Biology. (John Wiley and Sons, New York), 1987.
- Battegay E.J., Rupp J., Iruela- Aripse L., Sage E.H and Pech M.: PDGF-BB modulates endothelial proliferation and angiogenesis in vitro via PDGF β -receptors. J. Cell Biol. 125, 917-928, 1994
 - Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem; 72: 248-54, 1976.
- Brown T.A. Γονιδιώματα. Εκδόσεις Πασχαλίσσης 2010, Επιμέλεια ελληνικής έκδοσης Παπαβασιλείου Α., Σταματόπουλος Γ., Ανάγνου Ν. Κεφ.13
 - Burri PH¹, Hlushchuk R, Djonov V: Intussusceptive angiogenesis: its emergence, its characteristics, and its significance. Wiley-Liss, Inc. 2004
 - Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. Nature 2000; 407(6801): 249-57.
- Carmeliet P, Mackman N, Moons L, Luther T, Gressens P, Van Vlaenderen I, Demunck H, Kasper M, Breier XX, Evrard P, Muller M, Risau W, Edgington T, Collen D. Role of tissue factor in embryonic blood vessel development. Nature 1996; 383: 73-75.
 - complexed with adenylic and uridylic nucleotide
 - Cooper G., Hausman R. Το κύτταρο, Μια μοριακή προσέγγιση. Ακαδημαϊκές εκδόσεις 2011, Κεφ. 12 Σίμος Γ., Κούκλης Π. Τόμος II
 - D'Arcy Y. : Pain management by the numbers: using rating scales effectively, 2007
 - D'Alessio M¹, Ramirez F, Blumberg BD, Wirtz MK, Rao VH, Godfrey MD, Hollister DW: Characterization of a COL1A1 splicing defect in a case of

- Ehlers-Danlos syndrome type VII: further evidence of molecular homogeneity, 1991.
- Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nature Med* 9: 669-676, 2003.
 - Folkman J. and Haudenschild: Angiogenesis in vitro. *Nature* 288:551-556, 1980
 - Folkman J. Angiogenesis. *Harrison's Principles of International Medicine* (eds. Braunwald E, et al.) 517–530, 2001.
 - Folkman J. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nature* 6: 273-286, 2007.
 - Folkman J.: Angiogenesis. Initiation and control. *Annals of the New York Academy of Science. Endothelium* vol. 401, 1982.
 - Holloway DE¹, Hares MC, Shapiro R, Subramanian V, Acharya KR: High-level expression of three members of the murine angiogenin family in *Escherichia coli* and purification of the recombinant proteins. *Protein Expr Purif.*22(2):307-17, 2001.
 - inhibitors. Implications for structure-based design of
 - Ireton GC¹, Stoddard BL: Microseed matrix screening to improve crystals of yeast cytosine deaminase. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.*60(Pt 3):601-5, 2004.
 - Kao RY¹, Jenkins JL, Olson KA, Key ME, Fett JW, Shapiro R.: A small-molecule inhibitor of the ribonucleolytic activity of human angiogenin that possesses antitumor activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* \ 23;99(15):10066-71. Epub 2002.
 - Karamysheva A.F.: Mechanisms of angiogenesis. *Biochemistry (Mosc)* 73:751-762, 2007
 - Kensal E. van Holde, W. Curtis Johnson P.Shing Ho. Βιοφυσική, αρχές φυσικής Βιοχημείας. Εκδόσεις Έμβρυο 2006, Επιμέλεια Παπαδόπουλος Γ. Κεφ. 6 Ηλιόπουλος Η.
 - Kishimoto K., Luis S., Tsuji T., Olson K. and Hu G.: Endogenous angiogenin in endothelial cells in a general requirement for cell proliferation and angiogenesis. *Oncogene* 24,445-456, *Nature*, 2005.

- Leland PA¹, Schultz LW, Kim BM, Raines RT.: Ribonuclease A variants with potent cytotoxic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1;95(18):10407-12, 1998.
- Leonidas D.D, Chavali G.B, Oikonomakos N., Chrysina E., Kosmopoulou M., Vlassi M., Frankling C and Acharya K.R.: High-resolution crystal structures of ribonuclease A
 - Leonidas D.D., Shapiro R., Subbarao G.V., Russo A, Acharya K.R: Crystallographic studies on the role of the C-terminal segment of human angiogenin in Defining Enzymatic Potency. *Biochemistry* 2002, 41,2552-2562, 2001.
- Makarov A.A, Ilinskaya O.N.: Cytotoxic ribonucleases: molecular weapons and their targets. 2003
 - McMurry, Οργανική Χημεία, Πανεπιστημιακές εκδόσεις 2001, Επιστημονική Επιμέλεια Βάρβογλης Α., Ορφανόπουλος Μ., Σμόνου Ι., Στρατάκης Μ., Κεφ. 27, Τόμος ΙΙ
 - Merlino A¹, Russo Krauss I, Perillo M, Mattia CA, Ercole C, Picone D, Vergara A, Sica F.: Toward an antitumor form of bovine pancreatic ribonuclease: the crystal structure of three noncovalent dimeric mutants. *Biopolymers.* 91(12):1029-37. doi: 10.1002/bip.21183, 2009.
 - Neira JL¹, Rico M.: Folding studies on ribonuclease A, a model protein. *Fold Des.*2(1):R1-11, 1997.
 - Padhi AK¹, Kumar H, Vasaikar SV, Jayaram B, Gomes J.: Mechanisms of loss of functions of human angiogenin variants implicated in amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One.*e32479. doi: 10.1371/journal.pone.0032479. Epub 2012
 - Papetti M, Herman IM. Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 282: C947-C970, 2002.
 - ribonucleolytic inhibitors. 2003
 - Rifkin D.B, Cross J.L, Moscatelli D. and Jaffe E.: Proteases and angiogenesis: Production of plasminogen activator and collagenase by endothelial cells. In: *pathobiology of the endothelial cell.* Nossell, Vogel, New York Academy 191-197, 1982
 - Rosenberg HF¹.: Eosinophil-derived neurotoxin / RNase 2: connecting the past, the present and the future. *Curr Pharm Biotechnol.*9(3):135-40, 2008

- Sage H., Pritzl P. and Bornstein P.: Characterization of cell matrix associated collagens synthesized by aortic endothelial in culture. *Biochemistry* 20(2): 436-442, 1981
- Sholley M.M, Ferguson G.P., Seibel H.R, Montour J.L and Wilson J.D: Mechanism on neovascularization. Vascular spaiting can occur without proliferation of endothelial cell. *J. Cell Biol.* 97-295a, 1984.
- Soncin F: Angiogenin supports endothelial and fibroblast cell adhesion.¹. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 15;89(6):2232-6, 1992
- Sorrentino S¹, Libonati M.: Structure-function relationships in human ribonucleases: main distinctive features of the major RNase types. *FEBS Lett.* 3;404(1):1-5, 1997.
- St Clair DK¹, Rybak SM, Riordan JF, Vallee BL.: Angiogenin abolishes cell-free protein synthesis by specific ribonucleolytic inactivation of ribosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.*84(23):8330-4, 1987.
- Stryer L., Berg J.M, Tymoczko J.L, *Biochemistry*, Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης 2012, Επιστημονική Επιμέλεια Καραμουλίδης Α., Παπαδόπουλος Γ. Κεφ. 23 Αλετράς Α.
- Tello- Monteliu A., Patel J.V and LIP G.Y.H., Angiogenin: a review of the pathophysiology and potential clinical applications. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 4: 1864–1874, 2006
- Thiagarajan N., Acharya K.R.: Crystal structure of human angiogenin with an engineered loop exhibits conformational flexibility at the functional regions of the molecule. *FEBS Open Bio* 3 (2013) 65–70, 2012
- Tsuji T., Sun Y., Kishimoto K.: Angiogenin is translocated to the nucleus of HeLa cells and is involved in Ribosomal RNA transcription and cell Proliferation. In *Cancer Research* 2005.
- Xiangwei Gao and Zhengping Xu. Review: Mechanisms of action of angiogenin. *Institute of Biochemistry and Cell Biology*, 2008
- Xu L, Fukumura D, Jain RK. Acidic extracellular pH induces vascular endothelial growth factor (VEGF) in human glioblastoma cells via ERK1/2 MAPK signaling pathway: mechanism of low pH-induced VEGF. *J. Biol. Chem.* 277: 11368–11374, 2002.

- Yamagami I.: Electron microscopic study on the cornea. The mechanism of experimental new vessel formation. Jap. J. Ophthalmol, 14:41-58, 1970.
- Yuhong Zuo and Murray P. Deutscher: Exoribonuclease superfamilies: structural analysis and phylogenetic distribution. Oxford Journal, Pp. 1017-1026, 2001
 - Steven Hardinger, Chem Courses 2006 Version, Pg. 41