



Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Σχολή Επιστημών Υγείας

Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας

**Μελέτη πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων ανθρώπινης
αγγειογενίνης με μεθόδους πρωτεομικής**

Διπλωματική εργασία

Μελίνα Σταματιάδη

Κοντού Μαρία

Επίκουρος Καθηγήτρια Πρωτεϊνικής Χημείας,
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας.

Λεωνίδας Δημήτριος

Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας,
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας.

Μαρτίνα Σαμιωτάκη

Ειδική Λειτουργική Επιστήμονας,
Ερευνητικό Κέντρο Βιοϊατρικών Επιστημών «Αλέξανδρος Φλέμινγκ».

Λάρισα 2016



University of Thessaly

School of Health Sciences

Department of Biochemistry & Biotechnology

**Study of protein interactions of human angiogenin
by a proteomics approach**

Diploma Thesis

Melina Stamatiadi

Kontou Maria

Assistant Professor of Protein Chemistry,
Department of Biochemistry & Biotechnology.

Leonidas Demetres

Associate Professor of Biochemistry,
Department of Biochemistry & Biotechnology.

Martina Samiotaki

Senior Research Officer,
Biomedical Sciences Research Center “Alexander Fleming”.

Περιεχόμενα

| | |
|---|----|
| Περίληψη / Abstract..... | 1 |
| A. Εισαγωγή..... | 2 |
| 1. Αγγειογένεση..... | 2 |
| 2. Αγγειογενίνη..... | 3 |
| 2.1 Η θέση της στην οικογένεια ριβονουκλεασών..... | 3 |
| 2.2 Δομή, τρόπος δράσης και λειτουργίες..... | 4 |
| 3. Πρωτεομική ανάλυση και μετα-ανάλυση..... | 12 |
| B. Υλικά και μέθοδοι..... | 13 |
| 1. Ανοσοκατακρήμνιση ανθρώπινης αγγειογενίνης..... | 13 |
| 2. Προετοιμασία δειγμάτων για φασματογραφία μάζας..... | 15 |
| 3. Φασματομετρία μάζας..... | 17 |
| 4. Λογισμικά ανάλυσης δεδομένων..... | 18 |
| 4.1 MaxQuant..... | 19 |
| 4.2 Perseus..... | 19 |
| 4.3 DAVID..... | 22 |
| Γ. Αποτελέσματα..... | 22 |
| 1. Αποτελέσματα αλληλεπιδράσεων στο κυτταρόπλασμα..... | 23 |
| 1.1 Αγγειογενίνη και Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA).... | 23 |
| 1.2 Συσχέτιση με τη ρύθμιση της έκφρασης και το πρωτεάσωμα.. | 25 |
| 1.3 Συσχέτιση με τον κυτταροσκελετό..... | 28 |
| 1.4 Αγγειογενίνη και T-complex..... | 29 |
| 2. Αποτελέσματα αλληλεπιδράσεων στον πυρήνα..... | 31 |
| 2.1 Συσχέτιση με το spliceosome..... | 31 |
| Δ. Συζήτηση..... | 34 |
| Βιβλιογραφία..... | 35 |
| Συμπληρωματικό υλικό..... | 40 |
| A. Αλφαβητική λίστα επιλεγμένων πρωτεϊνών στο κυτταρόπλασμα και τα ονόματα των γονιδίων..... | 40 |
| B. Αλφαβητική λίστα επιλεγμένων πρωτεϊνών στον πυρήνα και τα ονόματα των γονιδίων..... | 45 |

Περίληψη

Η παρούσα μελέτη είχε ως σκοπό να διερευνήσει τις πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις της ανθρώπινης αγγειογενίνης με μια γενική προσέγγιση, χρησιμοποιώντας μεθόδους πρωτεομικής και βιοπληροφορικής. Το αντικείμενο μελέτης, η αγγειογενίνη, είναι μια μικρή, βασική πρωτεΐνη που αποτελείται από μια καταλυτική επικράτεια με δράση ριβονουκλεάσης και μια μη-καταλυτική που είναι όμως απαραίτητη για την αγγειογένεση, που αποτελεί και το βασικό της βιολογικό ρόλο. Η λειτουργία της, ωστόσο, έχει συσχετιστεί με τον καρκίνο και διάφορες άλλες παθολογικές καταστάσεις και ως εκ τούτου η γνώση των αλληλεπιδράσεών της με άλλες πρωτεΐνες θα ήταν χρήσιμη για τον σχεδιασμό νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων. Η πειραματική διαδικασία έγινε σε τέσσερα στάδια. Αρχικά, έγινε ανάπτυξη κυττάρων απ' όπου προέκυψε το πρωτεϊνικό εκχύλισμα και προσθήκη αγγειογενίνης *in vitro* και ακολούθησε ανοσοκατακρήμνιση. Σε δεύτερο στάδιο, τα δείγματα προετοιμάστηκαν με κατάλληλο πρωτόκολλο για φασματομετρία μάζας. Ακολούθησε ανάλυση με φασματομετρία μάζας και τέλος έγινε μετα-ανάλυση των αποτελεσμάτων με κατάλληλα λογισμικά. Από τα δεδομένα της ανάλυσης επιλέχθηκαν 100 πρωτεΐνες ως πιθανές αλληλεπιδράσεις της αγγειογενίνης, οι οποίες μελετήθηκαν ως προς την οντολογία τους και τις κυτταρικές διεργασίες στις οποίες εμπλέκονται.

Abstract

The purpose of this study was to investigate protein-protein interactions of human angiogenin using a proteomics and bioinformatics approach. Angiogenin is a small, basic protein and it consists of a ribonucleolytical domain and a non-catalytic domain that is essential for the role in angiogenesis, which is the main biological role of angiogenin. However, it has been found that angiogenin has a prominent role in a variety of diseases, including cancer and therefore the knowledge of protein interactions of angiogenin would be very useful for the design of new therapeutical strategies. The experimental procedure was carried out in four steps. Firstly, the cells were cultured and the protein extract in which the human angiogenin was added *in vitro* was taken. In the second step, the samples were prepared for mass spectrometry with a suitable protocol. Subsequently, the mass spectrometry analysis was performed and finally the results were meta-analyzed with suitable softwares. After this analysis, we chose 100 proteins that possibly interact with angiogenin and were analyzed according to the metabolic pathways and the biological processes that they are involved in.

A. Εισαγωγή

1. Αγγειογένεση και παθολογικές καταστάσεις

Η αγγειογένεση είναι η διαδικασία κατά την οποία σχηματίζονται νέα αγγεία από τα προϋπάρχοντα. Τα αιμοφόρα αγγεία είναι οι οδοί μέσω των οποίων μεταφέρονται θρεπτικά συστατικά, νερό, οξυγόνο και άλλα μόρια και κύτταρα του ανοσοποιητικού μας συστήματος. Η αγγειογένεση συμβαίνει τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε παθολογικές καταστάσεις. Φυσιολογικά συμβαίνει κατά την ανάπτυξη των εμβρύων, κατά τον επανασχηματισμό του ενδομητρίου στον έμμηνο κύκλο, κατά την επούλωση ιστών από τραύματα κ.α. Ωστόσο, η συνεχής και ανεξέλεγκτη αγγειογένεση μπορεί να προκαλέσει διάφορες παθολογικές καταστάσεις όπως αρθρίτιδα, αμφιβληστροειδοπάθεια από εισβολή τριχοειδών του αμφιβληστροειδούς στον υαλώδη, αθηροσκλήρωση, καθώς και ανάπτυξη όγκων και μετάστασή τους. Όπως οι φυσιολογικοί ιστοί, έτσι και οι καρκινικοί για να αναπτυχθούν απαιτείται παροχή αίματος. Για το λόγο αυτό, οι όγκοι πρέπει συνεχώς να διεγείρουν την αγγειογένεση ώστε να μπορούν να αυξηθούν σε μέγεθος. Επίσης, τα αγγεία που αιματώνουν έναν καρκινικό όγκο δίνουν την δυνατότητα στα καρκινικά κύτταρα να εισέλθουν στην κυκλοφορία και να κάνουν μετάσταση ακόμα και στα πιο απομακρυσμένα σημεία του σώματος. Οι αγγειογενετικοί παράγοντες χωρίζονται σε επαγωγείς και αναστολείς. Ιδιαίτερα οι αυξητικοί παράγοντες που ανήκουν στους επαγωγείς, είναι τα βασικά σηματοδοτικά μόρια στην εξέλιξη των φάσεων της αγγειογένεσης και συνεπώς για την ομαλή ή όχι ανάπτυξη των αγγείων. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα εκφράζουν διάφορους αυξητικούς παράγοντες και τους αντίστοιχους υποδοχείς τους, οι οποίοι επάγουν την αγγειογένεση *in vivo*^{1,2}. Σε παθολογικές καταστάσεις, όπως στον καρκίνο, η ισορροπία μεταξύ αγγειογενετικών αναστολέων και επαγωγέων είναι διαταραγμένη και προκαλεί διαφορετική ρύθμιση της αγγειογένεσης σύμφωνα με τις ανάγκες του όγκου. Μια από τις πρωτεΐνες που έχει βασικό ρόλο στην αγγειογένεση είναι η αγγειογενίνη, η οποία αποτελεί και το αντικείμενο μελέτης αυτής της εργασίας.

2. Αγγειογενίνη

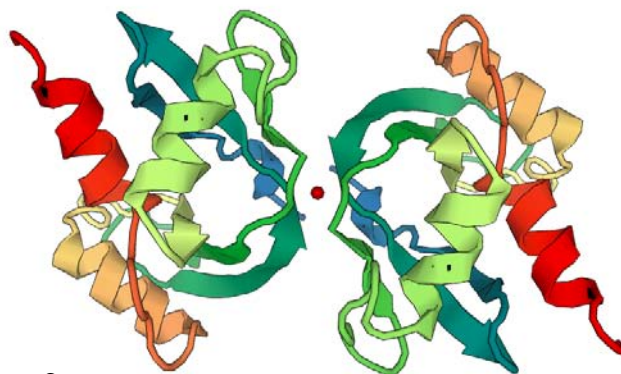
2.1 Η θέση της στην οικογένεια ριβονουκλεασών

Η αγγειογενίνη είναι μια μικρή πρωτεΐνη μοριακού βάρους 14kDa. Αποτελείται από μια περιοχή με ριβονουκλεολυτική δράση και μια μη καταλυτική περιοχή οι οποίες είναι εξίσου σημαντικές για την διαδικασία της αγγειογένεσης. Για την αγγειογενετική της δραστηριότητα είναι απαραίτητα τα κατάλοιπα 60-68 της επιφάνειας βρόχου καθώς και η ασπαραγίνη-109. Μεταλλάγματα της πρωτεΐνης που προκαλούν μεταβολές σε αυτά τα κατάλοιπα δεν έχουν καμία αγγειογενετική δραστηριότητα, ενώ η ενζυμική τους δραστηριότητα δεν επηρεάζεται.

Η αγγειογενίνη αποτελεί το πέμπτο μέλος της υπεροικογένειας των παγκρεατικών ριβονουκλεασών (RNase), γι' αυτό ονομάζεται και RNase 5 και παρουσιάζει 33% αμινοξική ομολογία και μία συνολική ομολογία 65% με την RNase A³. Όπως όλες οι ριβονουκλεάσες (RNases), η αγγειογενίνη καταλύει την αποικοδόμηση μορίων RNA και έτσι συμμετέχει στον μετα-μεταγραφικό έλεγχο του πληθυσμού των RNAs στο κύτταρο. Εκτός από την αγγειογενίνη (ριβονουκλεάση 5), η οικογένεια των ριβονουκλεασών περιλαμβάνει την ηωσινόφιλη κατιονική πρωτεΐνη (ECP, ριβονουκλεάση 3), την ηωσινόφιλη νευροτοξίνη (EDN, ριβονουκλεάση 2) και μερικές ακόμα κυτταροτοξίνες οι οποίες παρουσιάζουν πλήθος βιολογικών δράσεων όπως νευροτοξικότητα, αγγειογενετική δραστηριότητα και αντικαρκινική δράση⁴. Η αγγειογενίνη (hAng) είναι από τους πιο σημαντικούς παράγοντες ανάπτυξης όγκων, καθώς επάγει την αγγειογένεση και έχει αποδειχθεί ότι εμπλέκεται στην αύξηση και μετάσταση του καρκίνου καθώς και σε αγγειακές και ρευματοειδείς ασθένειες⁵.

Χάρης στην πληθώρα νεοπλασματικών και μολυσματικών ασθενειών στις οποίες εμπλέκονται, τα μέλη της οικογένειας των ριβονουκλεασών έχουν προσελκύσει μεγάλο βιοϊατρικό ενδιαφέρον.

Δομή της αγγειογενίνης από το εργαλείο PV- JavaScript Protein Viewer της βάσης δεδομένων PDB.



Η hAng, εκτός από διάφορους τύπους καρκίνου, έχει συσχετιστεί επίσης με άλλες παθολογικές καταστάσεις, όπως η περιφερική αγγειακή νόσος, η φλεγμονώδης νόσος του εντέρου, η ρευματοειδής αρθρίτιδα, η παχυσαρκία, η παραγωγική διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια και κάποιες νευροεκφυλιστικές νόσους, με τα επίπεδά της να είναι αυξημένα σε σχέση με τα υγιή άτομα ελέγχου.

Η αγγειογενίνη, η οποία αποτελεί και το βασικό αντικείμενο μελέτης αυτής της εργασίας, θα μπορούσε να αποτελέσει στόχο αντικαρκινικών αλλά και άλλων φαρμάκων και ως εκ τούτου ανοίγεται ένας νέος ορίζοντας για το σχεδιασμό μορίων-αναστολέων έναντι της ανθρώπινης αγγειογενίνης που θα έχουν ως αποτέλεσμα την καταπολέμηση διάφορων τύπων καρκίνου.

2.2 Δομή, τρόπος δράσης και λειτουργίες

Η ανθρώπινη αγγειογενίνη (hAng) είναι μια βασική, μονομερής πρωτεΐνη που περιέχει 123 αμινοξέα, και, όπως προαναφέρθηκε, έχει μοριακό βάρος 14.400 Da. Απομονώθηκε αρχικά από το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας ανθρώπινων κυττάρων αδενοκαρκινώματος του παχέος εντέρου, HT-29, βάσει αποκλειστικά της αγγειογενετικής της δράσης στην *in vivo* δοκιμασία αγγειογένεσης στη χοριοαλλαντοϊκή μεμβράνη εμβρύου όρνιθας². Το γονίδιο που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη βρίσκεται στην περιοχή q11 του χρωμοσώματος 14. Η hAng κατανέμεται σε πολλούς ιστούς, αλλά το ήπαρ είναι το κύριο όργανο όπου παράγεται η αγγειογενίνη και στη συνέχεια εισέρχεται στην κυκλοφορία, με συγκέντρωση στο πλάσμα 250-360 ng /mL. Το mRNA που κωδικοποιεί για την hAng εκφράζεται σε πολλούς τύπους κυττάρων, όπως των νεοπλασματικών και φυσιολογικών επιθηλιακών, ινοβλαστών, περιφερικών αιμοκυττάρων, και αγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων⁶⁻⁸.

Σχετικά με τον υποδοχέα της hAng σε ενδοθηλιακά κύτταρα, έχει βρεθεί ότι η αγγειογενίνη συνδέεται με την α -ακτίνη των λείων μυών, μια πρωτεΐνη 42kDa⁹⁻¹⁰. Η ακτίνη της κυτταρικής επιφάνειας φαίνεται να εμπλέκεται στην αποικοδόμηση της βασικής μεμβράνης διότι το σύμπλοκο hAng- α -ακτίνη αποκολλάται από την επιφάνεια του κυττάρου και επιταχύνει την παραγωγή πλασμίνης από το πλασμινογόνο¹¹.

Η παρουσία του συμπλόκου hAng-α-ακτίνη αυξάνει την καταλυτική δραστικότητα της πλασμίνης, η οποία διασπά λαμινίνη, φιμπρονεκτίνη και τη βασική μεμβράνη. Έτσι, η αγγειογενίνη προωθεί την αποικοδόμηση της βασικής μεμβράνης και του εξωκυττάριου ιστού και επιτρέπει στα ενδοθηλιακά κύτταρα να διεισδύουν και να μεταναστεύουν εντός του περιαγγειακού ιστού, που είναι κύριο χαρακτηριστικό της αγγειογένεσης¹².

Επιπλέον η φιμπουλίνη-1, ένα σημαντικό μόριο για τη σταθεροποίηση του τοιχώματος των αιμοφόρων αγγείων, προσδένεται στην αγγειογενίνη, υποδηλώνοντας ότι το σύμπλοκο hAng-φιμπουλίνη-1 ρυθμίζει το σχηματισμό και τη σταθεροποίηση νέων αιμοφόρων αγγείων¹³. Τέλος, η αλληλεπίδραση hAng-ακτίνης επάγει αλλαγές στον κυτταροσκελετό, όπως την αναστολή του πολυμερισμού της G-ακτίνης (μονομερής, σφαιρική) και αλλαγές των φυσικών ιδιοτήτων της F-ακτίνης (πολυμερής, νηματοειδής)¹⁴.

Η hAng διαθέτει επίσης ένα σήμα πυρηνικού εντοπισμού (NLS), μια αλληλουχία που αποτελείται από τα αμινοξέα ₃₀MRRRGL₃₅ με το κατάλοιπο R33 να έχει κρίσιμο ρόλο. Το πρώτο βήμα που απαιτείται για την πυρηνική μετατόπιση της εξωγενούς hAng είναι η είσοδος της πρωτεΐνης στο εσωτερικό του κυττάρου, γεγονός που δεν εξαρτάται από τους μικροσωληνίσκους και τα λυσοσωμάτα και δεν απαιτούνται ιμπορτίνες και RAN πρωτεΐνες (RAs-related Nuclear protein)¹⁵. Αντίθετα, στην είσοδο της hAng στο κύτταρο φαίνεται να εμπλέκεται ένας υποδοχέας ενδοκυττάρωσης¹⁶. Η έκφραση των υποδοχέων στην επιφάνεια του κυττάρου που εμπλέκονται στην ενδοκυττάρωση και την πυρηνική μετατόπιση της hAng έχει βρεθεί πως εξαρτάται από την πυκνότητα των κυττάρων¹⁷, διότι μελέτες σε ενδοθηλιακά κύτταρα έδειξαν ότι η πυρηνική μετατόπιση ελαττώνεται όσο η πυκνότητα των κυττάρων αυξάνει και σταματά όταν τα κύτταρα είναι πλήρη. Ωστόσο, σε καρκινικά κύτταρα του τραχήλου της μήτρας HeLa, η hAng μετατοπίζεται διαρκώς στον πυρήνα, ανεξάρτητα της πυκνότητας των κυττάρων¹⁸. Για την είσοδο της hAng στον πυρήνα, είναι πολύ πιθανό ότι απαιτείται η ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης C (PLC), γιατί όταν αναστέλλεται η PLC, η hAng συσσωρεύεται στο κυτταρόπλασμα και πέφτουν τα επίπεδά της στον πυρήνα.

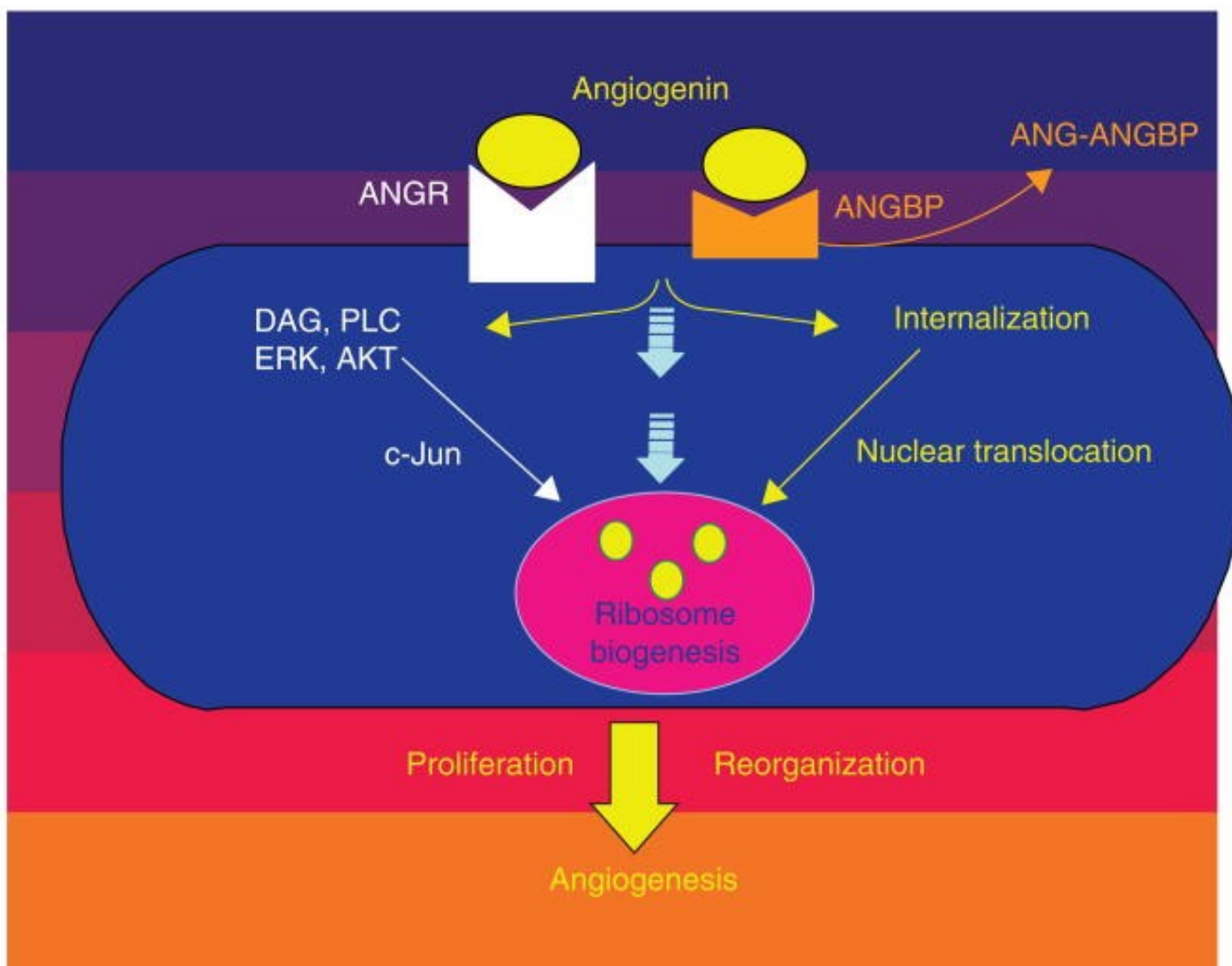
Επίσης, μεταξύ PLC και hAng πιθανώς λειτουργεί ένας μηχανισμός ανάδρασης διότι η hAng ενεργοποιεί την PLC μέσω πρόσδεσής της στους υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας¹⁹. Αν και οι μηχανισμοί δράσης της αγγειογενίνης στον πυρήνα παραμένουν άγνωστοι, η μεταφορά της στον πυρήνα είναι απαραίτητη για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, καθώς και τη γονιδιακή ενεργοποίηση και μεταγραφή και αν ανασταλεί, εξαλείφεται η αγγειογενετική δράση της hAng.

Ωστόσο, δεδομένου ότι το μοριακό βάρος της hAng είναι μικρότερο από το μέγεθος του πυρηνικού πόρου (50 kDa), ο πιο πιθανός μηχανισμός για την εισαγωγή της στον πυρήνα είναι η παθητική διάχυση. Μετά την είσοδό της στον πυρήνα, η hAng συσσωρεύεται στον πυρηνίσκο όπου λαμβάνει χώρα η βιογένεση των ριβοσωμάτων¹⁶. Η πυρηνική hAng έχει δειχθεί ότι προσδένεται στην περιοχή του υποκινητή του ριβοσωμικού DNA (rDNA)²⁰ και προάγει τη μεταγραφή του ριβοσωμικού RNA (rRNA)^{18,21}, δρώντας ως μεταγραφικός παράγοντας.

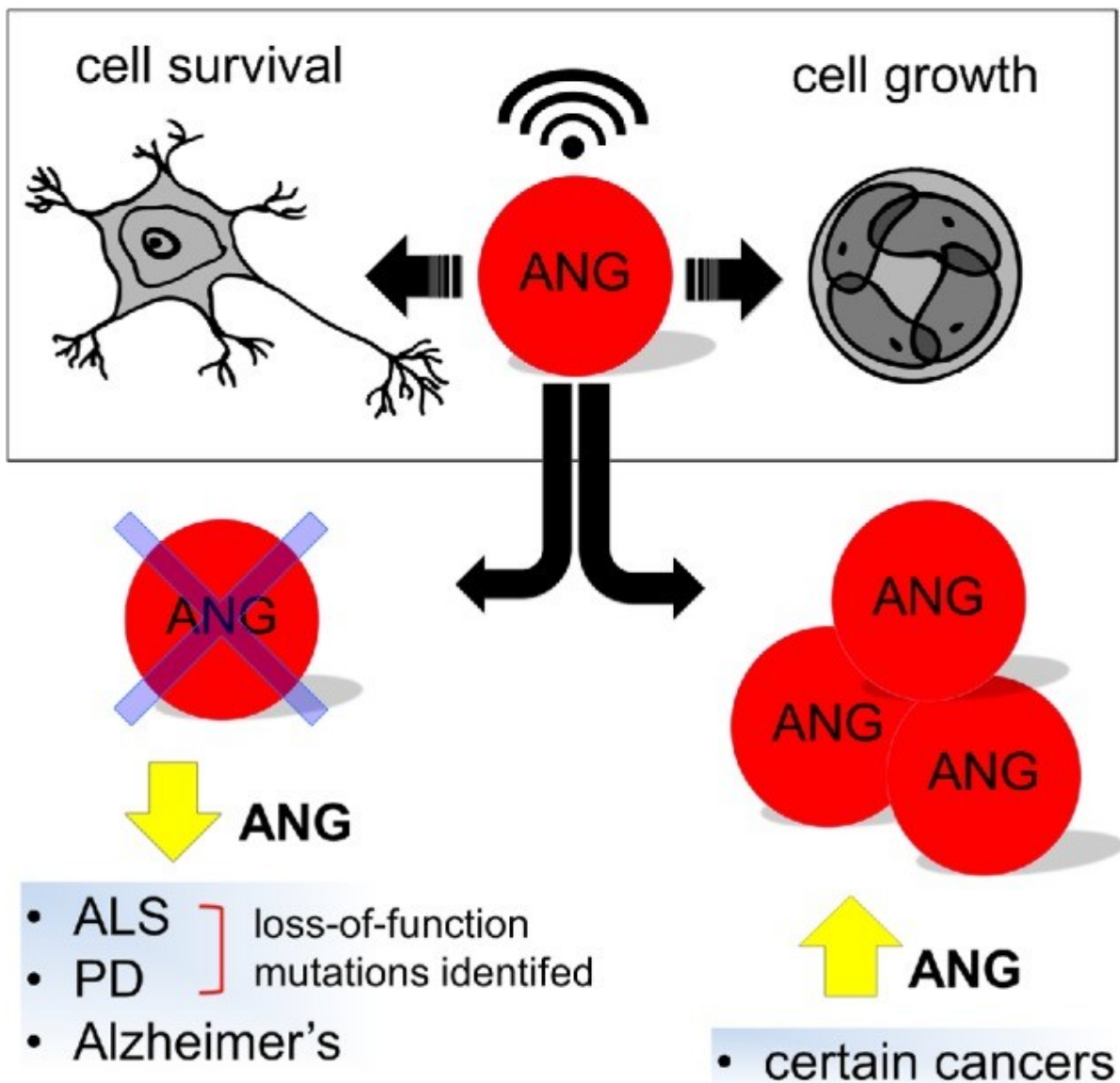
Για τη θεωρία του υποδοχέα της αγγειογενίνης υπάρχουν και επιπλέον δεδομένα. Η α-ακτίνη, που αναφέρθηκε ως πιθανός υποδοχέας της hAng, αποτελεί μία ιδιοστατικά εκφραζόμενη δομική πρωτεΐνη, συνεπώς δεν μπορεί να αποτελεί ειδικό υποδοχέα της αγγειογενίνης με εξειδίκευση ανάλογη του τόσο σημαντικού ρόλου της hAng στα βιολογικά συστήματα. Έτσι, ταυτοποιήθηκε αργότερα ένα μεμβρανικό μόριο 170 kDa ως δυνητικός υποδοχέας της hAng, ο οποίος εκφράζεται μόνο σε αραιά καλλιεργημένα ενδοθηλιακά κύτταρα αποκρινόμενα στην hAng²².

Η ύπαρξη δύο πιθανών υποδοχέων για την hAng υποδηλώνει ότι δεν εκφράζονται ταυτόχρονα στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων, αλλά η έκφρασή τους ρυθμίζεται από τις διαφορετικές συνθήκες στις οποίες βρίσκονται τα κύτταρα στα διάφορα στάδια της επαγόμενης από τη hAng αγγειογένεσης²². (Εικόνα 4) Έτσι, μπορούμε να θεωρήσουμε ότι όταν τα κύτταρα δεν είναι σε πλήρη κάλυψη, η hAng προσδένεται στην α-ακτίνη και προκαλεί μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων, και όσο μειώνεται η τοπική κυτταρική πυκνότητα ενεργοποιείται η έκφραση του δυνητικού υποδοχέα της hAng προκειμένου να πολλαπλασιαστούν τα κύτταρα και να καλύψουν το κενό.

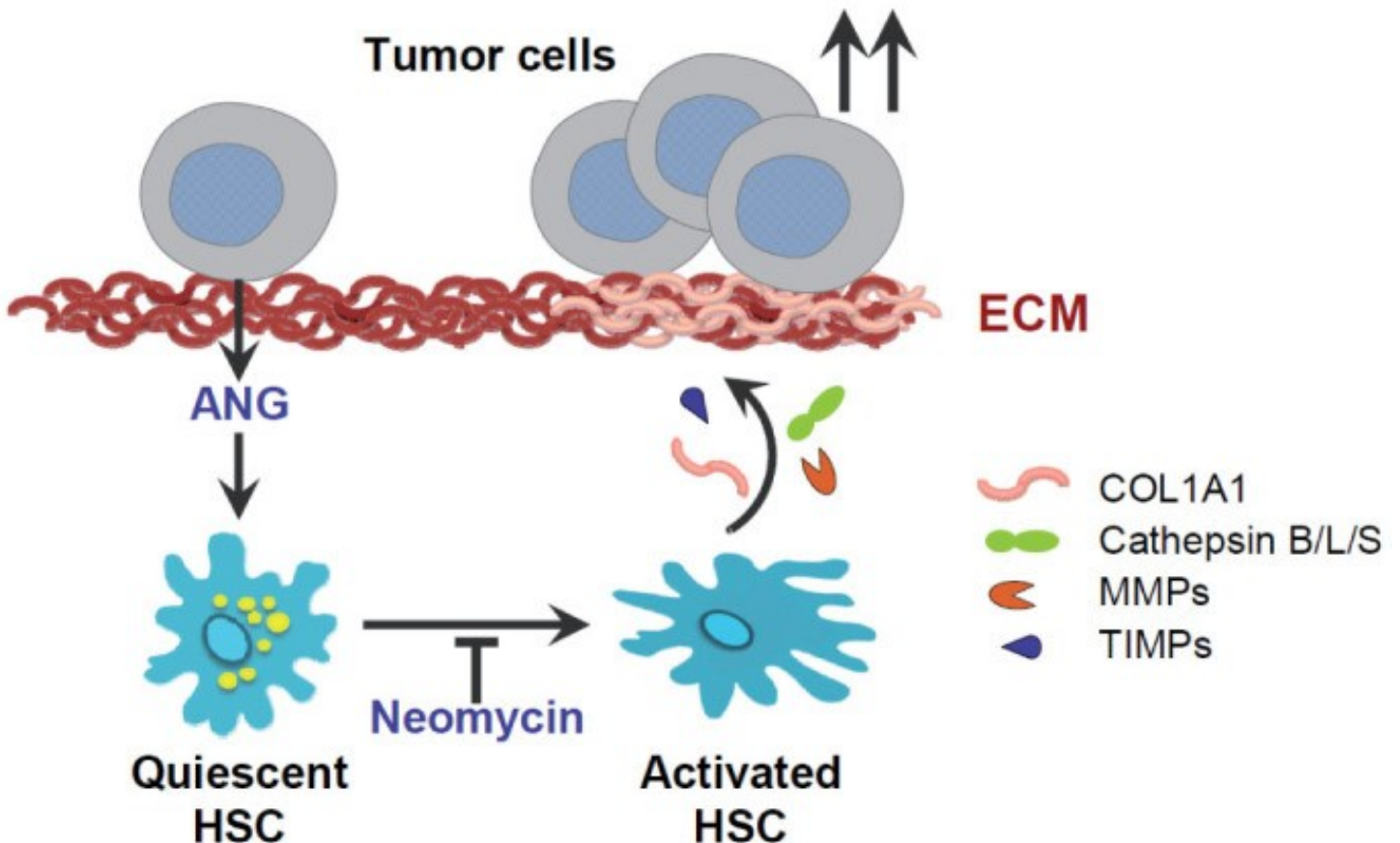
Εικόνα 1 (β). Η αγγειογενίνη, που φαίνεται με κίτρινο, μπορεί να δεσμεύσει τόσο τον υποδοχέα όσο και με την πρωτεΐνη πρόσδεσης, που φαίνονται με λευκό και πορτοκαλί, αντίστοιχα. Το μεγαλύτερο ποσό αγγειογενίνης και της πρωτεΐνης-πρόσδετή της, αποσυνδέονται από την κυτταρική επιφάνεια με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου για την παραγωγή πλασμίνης, και έτσι επάγουν κυτταρική εισβολή στο εξωκυτταρικό πλέγμα. Η σύνδεση με τον υποδοχέα 170 kDa επάγει τη δράση δευτέρων αγγελιοφόρων και ενεργοποιεί την μεταγωγή σήματος. Με τη δέσμευση, η αγγειογενίνη μπορεί επίσης να εσωτερικεύεται και να μετατοπίζεται στον πυρήνα όπου συσσωρεύεται στο πυρηνίσκο. Όλα αυτά τα μεμονωμένα βήματα είναι αναγκαία για την αγγειογένεση.



Εικόνα 2 ⁴⁶ . Η αγγειογενίνη μπορεί να επηρεάσει την ανάπτυξη και την επιβίωση των κυττάρων των θηλαστικών. Η αγγειογενίνη (ANG) δρα ως αισθητήρας του στρες και μπορεί να επηρεάζει την ανάπτυξη των κυττάρων (όπως έχει βρεθεί σε ορισμένους καρκίνους) ή την επιβίωση των κυττάρων (όπως έχει βρεθεί με τους νευρώνες). Η αγγειογενίνη είναι αυξημένη σε διάφορους καρκίνους και μειωμένη στις νευροεκφυλιστικές ασθένειες που εμπλέκται (ALS, αμυοτροφική πλευρική σκλήρυνση, νόσος του Parkinson). Η εικόνα απεικονίζει μόνο δύο από τις σημαντικότερες διαδικασίες που επηρεάζονται από αγγειογενίνη σε αυτόν τον αναδυόμενο τομέα, μιας και δεν είναι γνωστές όλες οι βιολογικές λειτουργίες της.



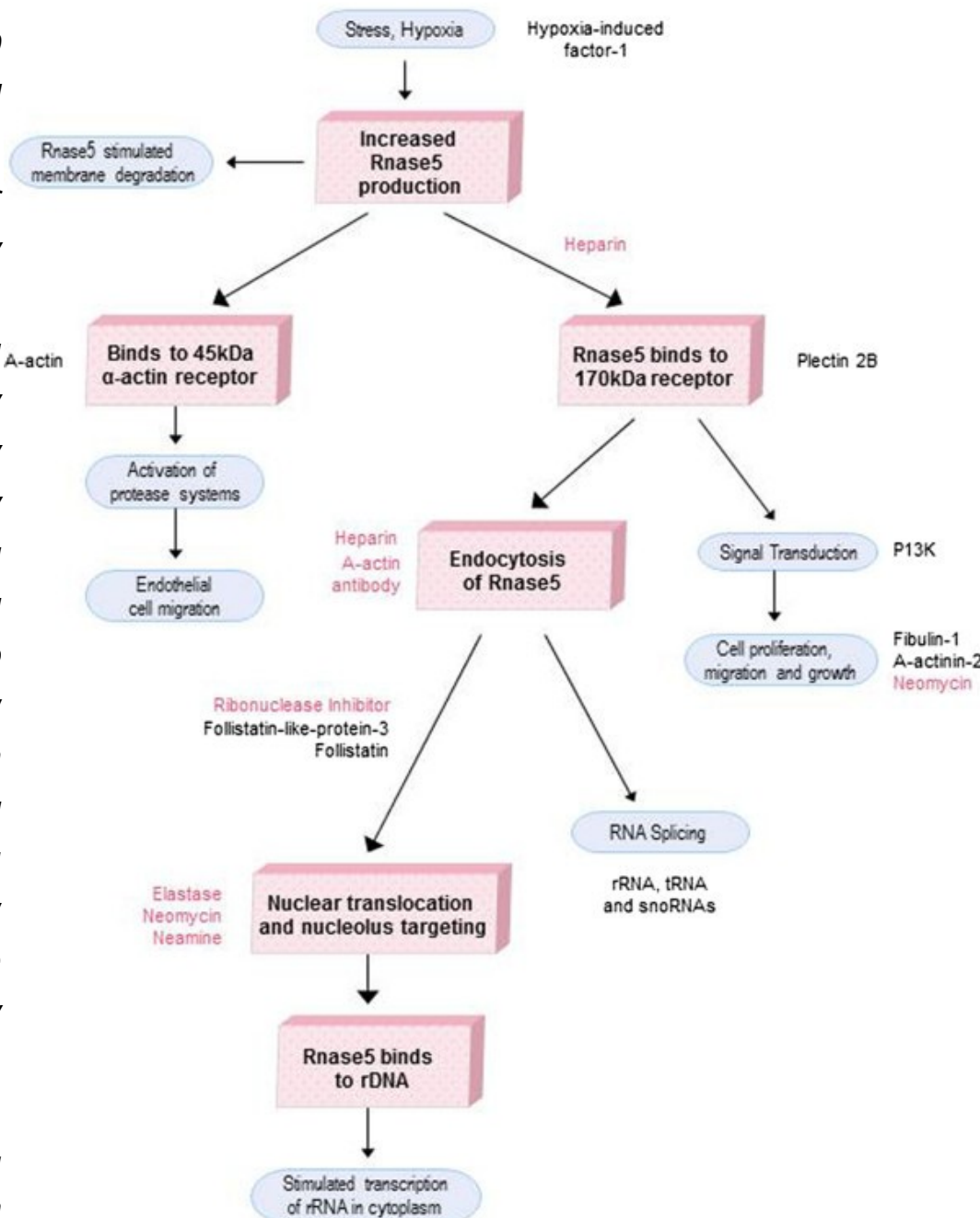
Εικόνα 3 ⁴⁷ . Παράδειγμα της δράσης της αγγειογενίνης σε έναν τύπο καρκίνου Η αγγειογενίνη που εκκρίνεται από τα κύτταρα του ήπατος είναι επαγωγέας του μετασχηματισμού αιμοποιητικών βλαστοκυττάρων (HSC) σε καρκινικά κύτταρα επηρεάζοντας πολλές πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην της εξωκυτταρικής μήτρας (ECM, ExtraCellular Matrix). Μεταξύ αυτών, είναι το κολλαγόνο-1A1 που κωδικοποιείται από το COL1A1 γονίδιο, καθώς και η ανώμαλη έκφραση των ενζύμων που αποδομούν τα κολλαγόνα τύπου IV και V και άλλες πρωτεΐνες εξωκυτταρικής μήτρας, όπως η MMP9, οι αναστολείς μεταλλοπρωτεϊνών (TIMP) ή πρωτεάσες κυστεΐνης όπως η καθεψίνη B. Κατά συνέπεια, ο σχηματισμός φυσιολογικής ECM (ExtraCellular Matrix) μεταβάλλεται λόγω της μετατροπής HSC σε καρκινικά, παρέχοντας ένα περιβάλλον που διευκολύνει την ανάπτυξη του όγκου. Εν ολίγοις, ο ηπατικός όγκος προωθεί την ανάπτυξη του μέσω αγγειογενίνο-εξαρτώμενης μετατροπής των HSC, και ο ανταγωνισμός της σηματοδότησης της αγγειογενίνης, από άλλα μόρια όπως η νεομυκίνη, μπορεί να είναι μια ενδιαφέρουσα προσέγγιση για τον έλεγχο της ανάπτυξης του καρκίνου του ήπατος.



Εικόνα 4 ⁴⁹ . Η άμεσες δράσεις της hAng/RNASE5. Ο προτεινόμενος μηχανισμός δράσης, όπως καθορίζεται από μια ανασκόπηση στη βιβλιογραφία. Το υποξικό στρες ενεργοποιεί τη μεταγραφή της hAng. Η hAng ενεργοποιεί την έκφραση δύο υποδοχέων ανάλογα με την κυτταρική πυκνότητα. Σε υψηλή κυτταρική πυκνότητα, η hAng συνδέεται στην επιφάνεια ενδοθηλιακών κυττάρων μέσω ενός 42-kDa υποδοχέα-ακτίνης που διεγείρει αποικοδόμηση της βασικής μεμβράνης. Αυτό το σύμπλοκο προκαλεί ενεργοποίηση του πλασμινογόνου που με τη σειρά του διεγείρει τη μετανάστευση ενδοθηλιακών κυττάρων και την αγγειογένεση.

The Direct Actions of Rnase5

Όταν η κυτταρική πυκνότητα μειώνεται, συντίθεται ο 170 kDa υποδοχέας hAng. Η σύνδεση με αυτόν το 170kDa υποδοχέα της κυτταρικής επιφάνειας προάγει την ενδοκυττάρωση της hAng. Μόλις εσωτερικευθεί η hAng πυροδοτεί μια σειρά οδών σηματοδότησης που οδηγούν στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, τη μετανάστευση και την ανάπτυξή τους. Η hAng μετατοπίζεται από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα όπου ενισχύει την μεταγραφή του rRNA. Τέλος, η hAng διασπά τα rRNA και tRNA και έχειδειχθεί ότι στη συνέχεια δρα ως κυτταροτοξική tRNase η οποία αναστέλει την πρωτεϊνοσύνθεση.



*Σε ροζ πλαίσια είναι οι διαδικασίες που συμμετέχει η hAng, σε μπλε οι διεργασίες που ενεργοποιεί. Με ροζ και μαύρα γράμματα εκτός των πλαισίων είναι οι αναστολείς και οι ενεργοποιητές αντίστοιχα.

3. Πρωτεομική ανάλυση και μετα-ανάλυση

Η πρωτεομική είναι ένας κλάδος της βιολογίας και βιοχημείας που περιλαμβάνει μεθόδους ανάλυσης της δομής και της λειτουργίας των πρωτεϊνών. Δεδομένου ότι οι πρωτεΐνες είναι ο τελικός αποδέκτης της γενετικής πληροφορίας, και συνεπώς προσδίδουν το φαινοτυπικό αποτέλεσμα, η πρωτεομική αποτελεί πολύ σημαντικό κλάδο για τις βιοεπιστήμες. Ο όρος πρωτεομική χρησιμοποιήθηκε για τον παραλληλισμό με τον όρο γονιδιωματική που αφορά τη μελέτη του γονιδιώματος. Ωστόσο, η πρωτεομική δίνει νέο επιπέδο στην κατανόηση των βιολογικών λειτουργιών για πολλούς λόγους, κάμποιοι από τους οποίους αναφέρονται παρακάτω.

Αρχικά, η έκφραση και η παραγωγή πρωτεϊνών σε έναν οργανισμό, διαφέρει από ιστό σε ιστό, από κύτταρο σε κύτταρο και από τη μια στιγμή στην άλλη καθώς οι διακριτές μονάδες του οργανισμού αποκρίνονται σε διάφορες καταστάσεις και καταπονήσεις. Επίσης, έχει βρεθεί ότι η ποσότητα του mRNA δεν αντιπροσωπεύει επαρκώς την ποσότητα της πρωτεΐνης διότι μπορεί να υφίσταται αποσιώπηση, να αποικοδομείται ή να μεταφράζεται ανεπαρκώς, παράγοντας διαφορετική ποσότητα πρωτεΐνης απ' ό τι θα περιμέναμε. Επιπλέον, λόγω των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων πολλές πρωτεΐνες ρυθμίζονται και ενεργοποιούνται από τροποποιήσεις όπως γλυκοζυλίωση, φωσφορυλίωση, μεθυλίωση κ.α. Τέλος, εξ' αιτίας του εναλλακτικού ματίσματος, μιά πρωτεϊνική αλληλουχία μπορεί να παράγει περισσότερες από μια πρωτεΐνες οι οποίες πιθανόν να έχουν διαφορετική βιολογική δράση^{25,26}.

Οι πρωτεομικές αναλύσεις περιλαμβάνουν τεχνικές που δίνουν μεγάλη ποσότητα πληροφορίας για τα επίπεδα έκφρασης, τις μετά-μεταφραστικές τροποποιήσεις, το σχηματισμό συμπλόκων και τον καθορισμό της ενζυμικής ενεργότητας και είναι είτε ποιοτικές είτε ποσοτικές. Οι ποιοτικές αναλύσεις αποσκοπούν στην αναγνώριση και τον ποιοτικό χαρακτηρισμό των πρωτεϊνών ενός περίπλοκου πρωτεϊνικού μείγματος, ενώ οι ποσοτικές, όπως υποδηλώνει η ονομασία τους, έχουν στόχο την ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών οι οποίες συμμετέχουν σε γνωστά σύμπλοκα και συνήθως έχουν ήδη μελετηθεί ποιοτικά. Οι δύο πιο βασικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται για πρωτεομικές αναλύσεις είναι η υγρή χρωματογραφία και η φασματογραφία μάζας.

Μια πρωτεομική ανάλυση αποτελείται από πολλά επιμέρους πειραματικά στάδια και ακολουθείται από το στάδιο της μετα-ανάλυσης κατά το οποίο η γνώση που προέρχεται από την πρωτεομική εμπλουτίζεται, με τη βοήθεια εργαλείων της βιοπληροφορικής, από πληροφορία που βρίσκεται σε βάσεις δεδομένων, οντολογίες αλλά και την βιβλιογραφία . Συνεπώς, στο τέλος ενός πειράματος διαθέτουμε πληθώρα ασύνδετων πρωτεομικών χαρακτηριστικών τα οποία πρέπει να οργανωθούν, να συσχετιστούν και να κατηγοριοποιηθούν ώστε να προκύψουν νέες γνώσεις που σχετίζονται με τον βιολογικό σκοπό μιας μελέτης. Ο σύγχρονος εξοπλισμός φασματομέτρων μάζας, σε συνδυασμό με τα ολοένα και πιο εξελιγμένα λογισμικά βιοπληροφορικής για την ανάλυση των δεδομένων, είναι τα πλέον πολύτιμα εργαλεία στη μελέτη και τη διερεύνηση του πρωτεόματος.

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να αξιοποιηθεί η πληθώρα βιολογικής πληροφορίας που προσφέρουν οι μέθοδοι πρωτεομικής προκειμένου να διερευνηθούν τα κυτταρικά μονοπάτια στα οποία μπορεί να συμμετέχει η αγγειογενίνη. Οι μελέτη των μονοπατιών στα οποία συμμετέχουν οι πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με την αγγειογενίνη μπορεί να δώσει μια αρχική εκτίμηση και για του βιολογικούς ρόλους της.

B. Υλικά και μέθοδοι

1. Ανοσοκατακρήμνιση ανθρώπινης αγγειογενίνης

Στο πείραμα ανοσοκατακρήμνισης, η ανθρώπινη αγγειογενίνη (hAng) αποτελεί την πρωτεΐνη στόχο. Λόγω του γεγονότος, πως στην κυτταρική σειρά που χρησιμοποιήθηκε (EA.hy926), τα ενδογενή επίπεδα της αγγειογενίνης είναι πολύ χαμηλά, τα πειράματα διεξήχθησαν με εξωγενή προσθήκη του συμπλόκου της hAng με το ειδικό μονοκλωνικό αντίσωμα απ' ευθείας στα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα (in vitro). Για το λόγο αυτό, πριν την ανοσοκατακρήμνιση πραγματοποιείται δημιουργία συμπλόκου σφαιριδίων αγαρόζης με πρωτεΐνες A/G και μονοκλωνικού αντισώματος έναντι της hAng και προσθήκη ανασυνδυασμένης ανθρώπινης αγγειογενίνης στο σύμπλοκο.

Η πειραματική διαδικασία αποτελείται από τα εξής στάδια :

- ✓ Συλλογή κυττάρων
- ✓ Διαχωρισμός πυρήνων-κυτταροπλάσματος²⁷.
- ✓ Εκτίμηση της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών στα κυτταρικά εκχυλίσματα μέσω της μεθόδου Bradford και πρότυπης καμπύλης.
- ✓ Πέψη των μορίων DNA και RNA στα κυτταρικά εκχυλίσματα.

Επειδή στόχος των πειραμάτων ανοσοκατακρήμνισης είναι ο προσδιορισμός των πιθανών αλληλεπιδράσεων που σχηματίζει η hAng με άλλες πρωτεΐνες και λαμβάνοντας υπ' όψη πως η hAng αποτελεί μία ριβονουκλεάση, κρίθηκε απαραίτητο να γίνει διάσπαση των μορίων RNA και DNA, προκειμένου να αποκλειστούν οι μη ειδικές αλληλεπιδράσεις που οφείλονται στην πρόσδεση της hAng στα μόρια αυτά. Στο πυρηνικό εκχύλισμα έγινε πέψη με βενζονάση η οποία διασπα DNA και RNA, ενώ στο κυτταροπλασματικό εκχύλισμα χρησιμοποιήθηκε μόνο RNase A.

- ✓ Προ-εκκαθάριση των εκχυλισμάτων

Στόχος του συγκεκριμένου βήματος, είναι η απομάκρυνση πρωτεϊνών που δεσμεύονται μη ειδικά σε ανοσοσφαιρίνες και στην αгарόζη.

Με τον τρόπο αυτό, χρησιμοποιώντας ένα μη-ειδικό αντίσωμα ελέγχου (IgG), ίδιου είδους με το ειδικό αντίσωμα (ποντικού), αποφεύγονται από τη μία οι μη-ειδικές αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών με το ειδικό αντίσωμα και από την άλλη, το δείγμα αυτό λειτουργεί ως δείγμα ελέγχου. Οι πρωτεΐνες δηλαδή, που κατακρημνίζονται στο βήμα αυτό και είναι κοινές και για το ειδικό αντίσωμα στη συνέχεια, δε λαμβάνονται υπόψη κατά την ανάλυση των δεδομένων φασματομετρίας μάζας.

→ Τέλος, στα εκχυλίσματα πυρήνα και κυτταροπλάσματος προστίθεται το σύμπλοκο ανασυνδυασμένης ανθρώπινης αγγειογενίνης/σφαιριδίων αγαρόζης με πρωτεΐνες A/G και μονοκλωνικού αντισώματος έναντι της hAng και ακολούθησε πρωτόκολλο ανοσοκατακρήμνισης από το οποίο παρέλαβα τα δείγματα για την πρωτεομική ανάλυση με φασματογράφο μάζας.

→ Η παραπάνω διαδικασία επαναλήφθηκε για 3 βιολογικές επαναλήψεις και παρασκευάστηκαν έτσι 3 σετ δειγμάτων.

Για κάθε μια απ' τις 3 βιολογικές επαναλήψεις παρασκευάστηκαν :

- 1 κυτταροπλασματικό δείγμα με hAηg και αντίσωμα έναντι αυτής,
- 1 κυτταροπλασματικό δείγμα control με αντίσωμα IgG,
- 1 πυρηνικό δείγμα με hAηg και αντίσωμα έναντι αυτής και
- 1 πυρηνικό δείγμα control με αντίσωμα IgG.

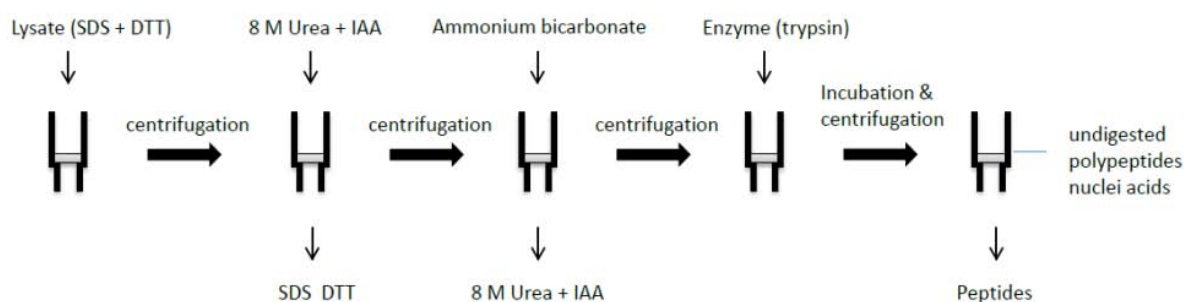
Συνεπώς το FASP πραγματοποιήθηκε συνολικά σε 12 δείγματα.

2. Προετοιμασία δειγμάτων για φασματογραφία μάζας

Η προετοιμασία των δειγμάτων για την ανάλυση με φασματογραφία μάζας έγινε με την τεχνική FASP (Filter Aided Sample Preparation) (εικόνα 5)^{28,29}. Για την εφαρμογή του πρωτοκόλλου FASP χρησιμοποιήθηκαν ειδικά φίλτρα για την απομάκρυνση ανεπιθύμητων μορίων από το πρωτεϊνικό δείγμα (όπως άλατα και μόρια απορρυπαντικών ουσιών π.χ. DTT), που είτε εμποδίζουν τη σωστή πρωτεολυτική πέψη του δείγματος, είτε παρεμβάλλονται στη διαδικασία φασματογραφίας μαζών, και την επαναιώρηση των πρωτεϊνών σε διαλύματα συμβατά με την διεργασία της πρωτεολυτικής πέψης.

Οι πρωτεΐνες μπορούν να αναχθούν, να αλκυλιωθούν, και να υποστούν πέψη πάνω στα ειδικά φίλτρα επεξεργασμένης κυτταρίνης και τα πεπτίδια που θα προκύψουν να συλλεχθούν με φυγοκέντρηση. Τα φίλτρα αυτά επιτρέπουν μόρια μόνο κάτω από ένα ορισμένο όριο μοριακού βάρους (cut-off) να περάσουν, έτσι ώστε αρχικά να συγκρατηθούν οι πρωτεΐνες για την επεξεργασία και την πέψη τους, και έπειτα να εκλουστούν μόνο επιθυμητού μεγέθους πεπτίδια.

Εικόνα 5: Διαδικασία προετοιμασίας πρωτεϊνικού δείγματος με τη μέθοδο FASP.



Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν :

- Διάλυμα UA με σύσταση: 8 M ουρία σε 0,1 M Tris/HCl pH 8,5
- Διάλυμα IAA με σύσταση: 0,05 M ιωδοακεταμίδιο σε διάλυμα UA
- Διάλυμα θρυψίνης, stock 0,4 µg/mL
- Διάλυμα ABC με σύσταση: 0,05M NH₄ HCO₃ σε dH₂O.
- 12 φίλτρα cut off 30kDa και 24 πλαστικά φιαλίδια τύπου Eppendorf των 1,5 mL
- Επιτραπέζια ψυχόμενη μικροφυγόκεντρος
- Αναδευτήρας με ρύθμιση θερμοκρασίας στους 37° C

Η διαδικασία είχε ως εξής :

1. Πρώτα τοποθετήθηκε 1 φίλτρο σε καθένα από τα 12 eppendorfs, ένα για κάθε δείγμα.
2. Στο φίλτρο προστέθηκαν 30µL πρωτεϊνικού εκχυλίσματος και 200µL διαλύματος UA και τα φιαλίδια φυγοκεντρήθηκαν για 15 λεπτά στα 14.000g.
3. Το υγρό που διαπέρασε το φίλτρο απορρίφθηκε και προστέθηκαν 200µL UA στο φίλτρο και τα φιαλίδια φυγοκεντρήθηκαν για 15 λεπτά στα 14.000g.
4. Το υγρό που διαπέρασε το φίλτρο απορρίφθηκε και προστέθηκαν 100µL διαλύματος IAA και τα φιαλίδια επώαστηκαν υπό ανάδευση στους 37°C για 1 λεπτό και στη συνέχεια χωρίς ανάδευση για 20 λεπτά.
5. Τα φιαλίδια φυγοκεντρήθηκαν για 10 λεπτά στα 14.000 g.
6. Προστέθηκαν 100µL διαλύματος UA και ακολούθησε φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στα 14.000 g. Το βήμα επαναλήφθηκε δύο φορές.
7. Προστέθηκαν 100µL διαλύματος ABC και ακολούθησε φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στα 14.000 g. Το βήμα επαναλήφθηκε δύο φορές.
8. Προστέθηκαν 40µL διαλύματος ABC με 1µL θρυψίνη και τα φιαλίδια αναδεύτηκαν για 1 λεπτό.
9. Τα φίλτρα μεταφέρθηκαν σε καινούργια φιαλίδια eppendorf και στη συνέχεια επώαστηκαν στους 37°C μέχρι την επόμενη μέρα.
10. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στα 14.000 g και διατηρήθηκε το διήθημα το οποίο περιείχε τα πεπτίδια.

11. Προστέθηκαν 100 μL dH_2O και τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 10 λεπτά στα 14.000 g.

12. Τα δείγματα εξατμίστηκαν μέχρι ξηρού σε Speedvac.

13. Προστέθηκαν 30 μl διαλύματος 2% ακετονιτρίλιο σε 0.1% μυρμηκικό οξύ και τα δείγματα επωάστηκαν σε υδατόλουτρο υπερήχων για 3 λεπτά.

14. Τέλος, προσδιορίστηκε η συγκέντρωση των πεπτιδίων από την απορρόφηση τους σε μήκος κύματος 280 nm σε συσκευή nanodrop.

→ Στη συνέχεια τα δείγματα υποβλήθηκαν σε ανάλυση με φασματογραφία μαζών έπειτα από κλασμάτωση με υγρή χρωματογραφία αντίστροφης φάσης.

3. Φασματομετρία μάζας

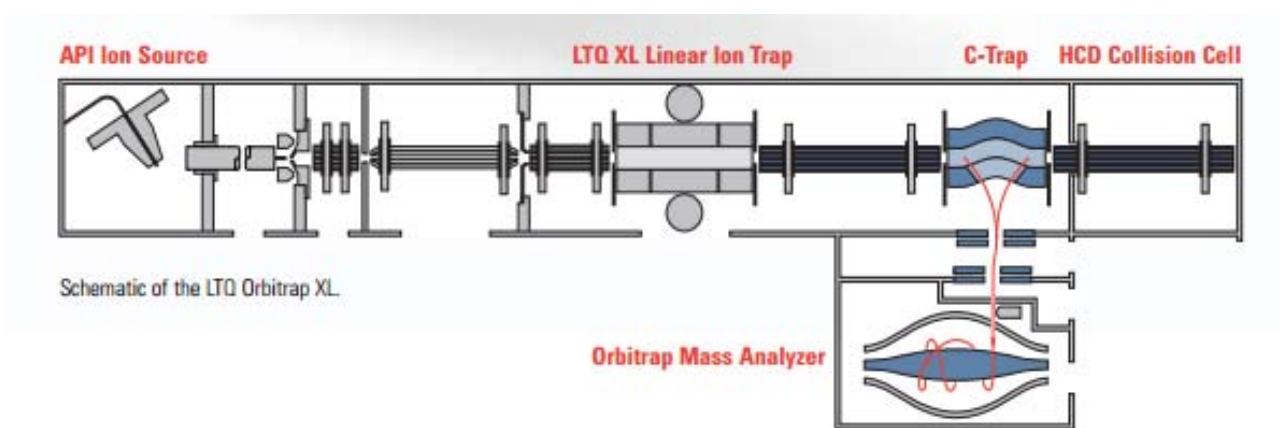
Η ανάλυση των δειγμάτων με φασματομετρία μάζας πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Πρωτεϊνικής Χημείας του Ερευνητικού Κέντρου Βιοϊατρικών επιστημών "Αλέξανδρος Φλέμινγκ" και το σύστημα που έγινε η ανάλυση ήταν το Thermo Scientific LTQ Orbitrap XL hybrid FTMS το οποίο διαθέτει στήλη υγρής χρωματογραφίας πολύ υψηλής πίεσης.

Η αρχή της μεθόδου είναι η εξής :

Αρχικά, τα πεπτίδια διαχωρίζονται με την τεχνική της nano υγρής χρωματογραφίας πολύ υψηλής πίεσης (ultra high pressure nano LC) η οποία είναι εφοδιασμένη με μια προ-στήλη συμπύκνωσης C18, μια στήλη C18 , 50 cm μήκους, 75 μm ID, 2 μm μεγεθος σωματιδίων υλικού πλήρωσης, 100 Å, Acclaim PepMap RSLC, Thermo Scientific) και αντλία δυο καναλιών (RSLCnano, Thermo Scientific). Η κινητή φάση αποτελούταν από τα διαλύματα A (2% ακετονιτρίλιο σε 0.1% μυρμηκικό οξύ) και B (80% ακετονιτρίλιο σε 0.1% μυρμηκικό οξύ). Μέχρι 2.5 μg πεπτιδίων πραγματοποιήθηκε συμπύκνωση στην προ-στήλη με ταχύτητα ροής 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ για 10 min και στη συνέχεια κλασμάτωση στην nano στήλη με ταχύτητα ροής 300 nL/min για 8 h με γραμμική βαθμίδωση εκλουστικού διαλύματος B από 4% έως 40%. Στη συνέχεια ακολούθησε η φασματομετρία μάζας.

Το παραπάνω φασματοόμετρο μάζας συνδυάζει μια γραμμική παγίδα ιόντων MS και τον αναλυτή μάζας Orbitrap (Εικόνα 6). Τα ιόντα που παράγονται (API ion source) συλλέγονται στο LTQ XL και ακολουθεί εξώθησή τους προς την παγίδα-C αποθήκευσης ιόντων. Τα ιόντα μεταφέρονται από την C-παγίδα σε τροχιακή παγίδα με αποτέλεσμα την ταχεία αύξηση του ηλεκτρικού πεδίου. Αφού η τάση σταθεροποιηθεί τα σήματα από τα εξωτερικά ηλεκτρόδια τροχιακής παγίδας ενισχύονται και μετατρέπονται σε ένα φάσμα συχνοτήτων το οποίο με μετασχηματισμό Fourier μετατρέπεται σε ένα φάσμα μάζας³⁰.

Εικόνα 6. Σχηματική απεικόνιση της λειτουργίας του LTQ Orbitrap XL hybrid FTMS



→ Ο έλεγχος του συστήματος και η αποθήκευση των δεδομένων σε αρχεία με μορφή .raw, έγινε με το λογισμικό Xcalibur (Thermo Scientific) και τα raw files αναλύθηκαν περαιτέρω με τα προγράμματα που θα αναφερθούν παρακάτω.

4. Λογισμικά ανάλυσης δεδομένων

Για την ανάλυση των δεδομένων που λήφθηκαν από τη φασματομετρία μάζας χρησιμοποιήθηκαν 3 λογισμικά. Αρχικά έγινε ανάλυση με το πρόγραμμα MaxQuant 1.5.3.30 από το οποίο έγινε εξαγωγή του αρχείου Protein Groups που στη συνέχεια φορτώθηκε στο πρόγραμμα Perseus 1.5.4.0 με το οποίο έγινε στατιστική ανάλυση των δεδομένων. Τέλος, χρησιμοποιήθηκε το online λογισμικό DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery, <https://david.ncifcrf.gov/>) για την ομαδοποίηση και κατηγοριοποίηση των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων που εμφανίστηκαν.

4.1 MaxQuant ³¹

Με το πρόγραμμα πραγματοποιήθηκε πρωτόκολλο για την διαφορική ανάλυση πρωτεωμικής έκφρασης χωρίς σήμανση (Label-Free Quantification, LFQ). Το πρωτόκολλο για την LFQ ανάλυση είναι μία μέθοδος της πρωτεομικής που έχει ως στόχο να προσδιοριστεί η σχετική ποσότητα των πρωτεϊνών σε δύο ή περισσότερα βιολογικά δείγματα ώστε να είναι άμεσα συγκρίσιμα μεταξύ τους. Σε αντίθεση με άλλες μεθόδους ποσοτικοποίησης, η LFQ δεν χρησιμοποιεί κάποιο είδος σήμανσης, μεταβολικής ή χημικής των πρωτεϊνών, για παράδειγμα ισότοπα.

Η ανάλυση με το MaxQuant είναι αρκετά χρονοβόρα διότι μπορεί να διαρκέσει ακόμα και μέρες, προσφέρει όμως αξιόπιστα και πλήρη αποτελέσματα.

Η ανάλυση έγινε ως εξής :

1. Αρχικά ανοίξαμε το πρόγραμμα, φορτώσαμε τα raw files όπως βγαίνουν από το φασματογράφο μάζας και τα ονομάσαμε σύμφωνα με το πείραμα.

2. Επιλέχθηκε LFQ ανάλυση και προσδιορίστηκαν οι τροποποιήσεις που ήταν επιθυμητό να ληφθούν υπ' όψιν. Αυτές ήταν Oxidation, Acetylation, Deamidation, Carbamethylation.

3. Έγινε εισαγωγή (configuration) της βάσης δεδομένων που θέλαμε να χρησιμοποιήσουμε, η οποία ήταν η UniProt για τον οργανισμό Homo Sapiens. Η προσθήκη της βάσης δεδομένων έγινε με αρχείο fasta το οποίο περιέχει όλες τις πρωτεϊνικές αλληλουχίες για τον ανθρώπινο οργανισμό.

4. Ορίστηκε False Discovery Rate (FDR) 0,1.

5. Φορτώθηκε το .fasta αρχείο της βάσης δεδομένων και ξεκίνησε η ανάλυση.

→ Τα αποτελέσματα της ανάλυσης αποθηκεύτηκαν σε φακέλους.

4.2 Perseus ³²

Για την στατιστική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Perseus.

Η ανάλυση έγινε ως εξής :

1. Στο πρόγραμμα Perseus φορτώσαμε το αρχείο ProteinGroups από το φάκελο στην τοποθεσία /combined/txt που προκύπτει από την ανάλυση με το Maxquant.

2. Προσθέσαμε για ανάλυση τις τιμές LFQ intensity των δειγμάτων.
3. Απομακρύναμε όσες πρωτεΐνες θεωρούνται μη ειδικές κάνοντας “filtering based on categorical column”.
4. Δημιουργήσαμε groups με τα αποτελέσματα των επαναλήψεων, δίνοντας τους το ίδιο όνομα (categorical annotation of rows). Οι επαναλήψεις control ομαδοποιήθηκαν μαζί και οι επαναλήψεις που περιείχαν hAng μαζί.
5. Κάναμε λογαριθμικές όλες τις τιμές των LFQ intensities.
6. Κάναμε “imputation”, δηλαδή θέσαμε μια πολύ χαμηλή τιμή στις NaN θέσεις με βάση την κανονική κατανομή, επιλέγοντας “replace missing values from normal distribution”.
7. Πραγματοποιήσαμε paired student’s t-test για να ξεχωρίσουν οι πρωτεΐνες που παρουσίαζαν σημαντική διαφορά στο δείγμα με hAng σε σχέση με το control.
8. Έγινε οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων με volcano τα οποία παριστάνουν διαγραμματικά τις πρωτεΐνες με λογαριθμική τιμή p-value στον κάθετο άξονα και student’s difference στον οριζόντιο. Το student’s t-test difference είναι μια στατιστική εκτίμηση της διαφοράς ανάμεσα σε δύο ομάδες δειγμάτων, στη συγκεκριμένη περίπτωση μεταξύ των control και των δειγμάτων με hAng.
9. Τέλος, στο πρόγραμμα προστέθηκε annotation για τις πρωτεΐνες που επιλέχθηκαν ως σημαντικές και μελετήθηκαν ως προς τη στήλη corum, που περιείχε τα σύμπλοκα στα οποία συμμετέχουν οι επιλεγμένες πρωτεΐνες για περεταίρω οργάνωση της πληροφορίας.

Εικόνα 7 (α). Ενδεικτικές εικόνες από το ανέβασμα αρχείων και την επιλογή παραμέτρων στο MaxQuant.

The screenshot shows the MaxQuant software interface. The 'Raw files' tab is active, displaying a table of loaded files. The table has columns for File, Size, Exists, Parameter group, Experiment, Fraction, and Type. There are 6 rows of data, each representing a different raw file with its corresponding size and other parameters.

| | File | Size | Exists | Parameter group | Experiment | Fraction | Type |
|---|---|-----------|--------|-----------------|------------|----------|------|
| 1 | D:\all raw data\18111501cyto ang 2.raw | 766 MB | True | Group 0 | | 32767 | raw |
| 2 | D:\all raw data\18111504cyto control ang 2.raw | 825.4 MB | True | Group 0 | | 32767 | raw |
| 3 | D:\all raw data\21111501cyto ang 3.raw | 735.8 MB | True | Group 0 | | 32767 | raw |
| 4 | D:\all raw data\21111502cyto control ang 3.raw | 633.4 MB | True | Group 0 | | 32767 | raw |
| 5 | D:\all raw data\14071601 cyto ang 4.raw | 997 MB | True | Group 0 | | 32767 | raw |
| 6 | D:\all raw data\14071602 cyto control ang 4.raw | 1022.2 MB | True | Group 0 | | 32767 | raw |

Session1 - MaxQuant

Raw files | Group-specific parameters | Global parameters | Performance | Viewer | Configuration

Group 0

Type: Label-free quantification | Misc.

Digestion: Instrument

Modifications: First search

Parameter group | Parameter section

Variable modifications

- Amidated (C-term)
- Amidated (Protein C-term)
- Carbamidomethyl (C)
- Carbonyl (N-term)
- Cation:Na (DE)
- Cys-Cys
- Deamidation (N)
- Deamidation (NQ)
- Deamidation 18O (N)
- Dehydrated (ST)
- Delta:H(2)C(2) (N-term)
- Nepsilon-methyl (M)
- Oxidation (M)
- Acetyl (Protein N-term)
- Deamidation (N)

Max. number of modifications per peptide: 5

Group 0

Type: Label-free quantification | Misc.

Digestion: Instrument

Modifications: First search

Parameter group | Parameter section

Digestion mode

Specific

Enzyme: Trypsin/P

- ArgC
- AspC
- AspN
- Chymotrypsin
- Chymotrypsin+
- D.P
- GluC
- GluN
- LysC
- LysC/P
- LysN
- Trypsin

Max. missed cleavages: 2

Εικόνα 7 (β). Ενδεικτική εικόνα από την επεξεργασία των αποτελεσμάτων με το Perseus.

cyto ang 2,3,4 - Perseus

Matrix

Basic | Filter rows | Annot. columns | Imputation | Outliers | Visualization | Basic |

Rearrange | Filter columns | Annot. rows | Modifications | Learning | Clustering/PCA |

Normalization | Quality | Tests | Time series | Clustering | Misc. | Multi-proc. | Export

matrix1 | matrix2 | matrix3 | matrix4 | matrix5 | matrix6 | matrix7 | matrix9 | matrix8 | matrix10 | matrix11 | matrix13 | matrix12 | matrix15 | matrix14 | matrix16 | matrix17

| Type | LFQ intensity cyto ang | LFQ intensity cyto | LFQ intensity cyto | LFQ intensity cyto | C: Corum | N: -Log Student T-test | N: Student T-test | T: Protein names | T: Gene names |
|--------|------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--|------------------------|-------------------|-----------------------------------|---------------|
| Group1 | ANG | CONT... | CONT... | CONT... | Category | Numeric | Numeric | Text | Text |
| 83 | 35.0127 | 21.2304 | 25.3722 | 19.4207 | | 2.11841 | 10.621 | Angiogenin | RAA1;... |
| 84 | 21.3063 | 19.9465 | 20.3614 | 20.3991 | | 1.35242 | 1.11316 | A-kinase anchor protein 13 | AKAP13 |
| 85 | 25.6765 | 21.855 | 21.7905 | 20.2456 | Arp2/3 protein complex | 2.67086 | 4.56208 | Actin-related protein 2 | ACTR2 |
| 86 | 33.7565 | 30.7252 | 31.8204 | 29.361 | Profilin 1 complex | 1.61783 | 2.81623 | Actin, cytoplasmic 2; Actin, c... | ACTG1 |
| 87 | 27.3923 | 22.2994 | 20.4507 | 21.0982 | | 2.59518 | 5.19521 | Acidic leucine-rich nuclear p... | ANP32B |
| 88 | 27.6973 | 21.7793 | 20.9068 | 20.9677 | | 2.3376 | 5.8591 | Acetyl-CoA acetyltransferas... | ACAT1 |
| 89 | 29.8637 | 29.121 | 28.9045 | 27.6471 | CEN complex; DGCR8 multiprotein complex; H2A... | 1.25095 | 1.22944 | 78 kDa glucose-regulated pr... | HEL-S... |
| 90 | 24.4329 | 22.4233 | 19.2108 | 20.0467 | 17S U2 snRNP; Frataxin complex | 1.8149 | 5.37725 | 60 kDa heat shock protein, m... | HSPD1 |
| 91 | 25.6165 | 21.7333 | 21.324 | 19.4997 | NDFKA-AMPKalpha 1 complex | 1.73879 | 3.63105 | 5-AMP-activated protein kina... | PRKAA1 |
| 92 | 24.7986 | 22.7144 | 20.1464 | 19.3394 | | 1.89245 | 4.45485 | 45 kDa calcium-binding prot... | SDF4 |
| 93 | 26.208 | 22.6506 | 25.297 | 20.3195 | PA700 complex; PA700-20S-PA28 complex | 1.38378 | 4.98618 | 26S proteasome non-ATPas... | PSMD... |
| 94 | 24.2967 | 22.747 | 20.1737 | 20.2934 | PA700 complex; PA700-20S-PA28 complex | 1.04929 | 2.96615 | 26S proteasome non-ATPas... | PSMD... |
| 95 | 25.0365 | 23.2284 | 23.4519 | 20.4235 | 26S proteasome; PA700 complex; PA700-20S-PA... | 1.11339 | 3.43364 | 26S protease regulatory sub... | PSMC2 |
| 96 | 25.1047 | 22.7158 | 25.0689 | 20.4434 | 26S proteasome; PA700 complex; PA700-20S-PA... | 1.05822 | 3.64615 | 26S protease regulatory sub... | PSMC1 |
| 97 | 23.3784 | 21.8458 | 22.3073 | 20.9632 | BRAF-RAF1-14-3-3 complex; Emerin complex 52... | 1.87962 | 2.49517 | 14-3-3 protein theta | YWHAQ |
| 98 | 24.4937 | 22.0445 | 20.5186 | 21.3328 | BRAF-RAF1-14-3-3 complex; Kinase maturation c... | 2.73539 | 3.66637 | 14-3-3 protein eta | YWHAH |

98 items 4 selected

Version 1.5.4.0

4.3 DAVID³³

Το λογισμικό DAVID χρησιμοποιήθηκε για να προσδιορίσει την οντολογία σημαντικών γονιδίων που προέκυψαν από την παραπάνω ανάλυση, στις βιολογικές διεργασίες και σε μεταβολικά μονοπάτια. Το DAVID αποτελείται από μια ολοκληρωμένη βάση δεδομένων βιολογικής πληροφορίας καθώς επίσης και “εργαλεία” ανάλυσης μεγάλου αριθμού γονιδίων ή πρωτεϊνών.

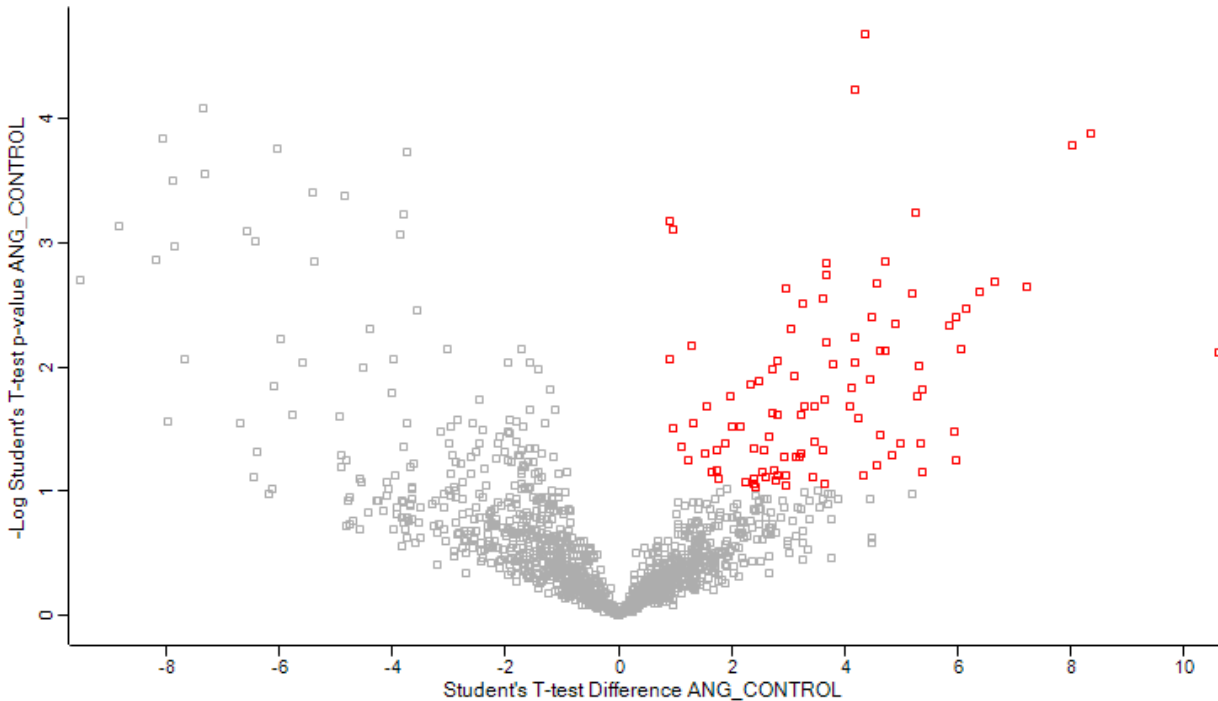
Η διαδικασία απαιτεί πρώτα το φόρτωμα μιας λίστας αναγνωριστικών (identifiers) που αντιπροσωπεύει τη λίστα των γονιδίων που επιθυμούμε. Στην παρούσα ανάλυση φορτώθηκε λίστα των official gene names και στη συνέχεια επιλέχθηκε ο συγκεκριμένος τύπος αναγνωριστικού (OFFICIAL_GENE_SYMBOL). Ακολούθησε ανάλυση χρησιμοποιώντας το εργαλείο functional annotation tool, το οποίο συσχέτισε τα γονίδια που φορτώσαμε, με μεταβολικά μονοπάτια και βιολογικές διεργασίες όπως θα δούμε παρακάτω.

Γ. Αποτελέσματα

Για την διερεύνηση και την οργάνωση των αποτελεσμάτων αρχικά έγινε επιλογή των πρωτεϊνών για τις οποίες οι μετρήσεις ήταν στατιστικά σημαντικές. Αυτό έγινε με τη χρήση του διαγράμματος volcano του προγράμματος Perseus. Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 8 και Εικόνα 13, επιλέχθηκαν οι πρωτεΐνες για τις οποίες τα στατιστικά από το συνδυασμό των τριών πειραμάτων έδιναν $p\text{-value} < 0,1$, δηλαδή $-\log_{p\text{-value}} > 1$ και difference μεταξύ του control και του δείγματος με hAng μεγαλύτερη από 1. Τα όρια αυτά αποφασίστηκαν να είναι λιγότερο αυστηρά απ' όσο επιβάλλει η στατιστική σημαντικότητα διότι τα αποτελέσματα προέκυψαν από πειράματα ανοσοκατακρήμνισης που σημαίνει ότι οι μικρές αλλαγές συνθηκών κατά την πειραματική διαδικασία μπορεί να επηρεάσουν τις αλληλεπιδράσεις και έτσι αποφασίζοντας με αυστηρότερα κριτήρια να “χάσουμε” κάποια ενδιαφέρουσα αλληλεπίδραση. Με βάση τα παραπάνω λήφθηκε μια λίστα ~100 γονιδίων για το κυτταρόπλασμα και ~100 για τον πυρήνα τα οποία οργανώθηκαν με βάση τη μοριακή λειτουργία, τα σύμπλοκα και τα μονοπάτια στα οποία συμμετέχουν.

1. Αποτελέσματα αλληλεπιδράσεων στο κυτταρόπλασμα

Εικόνα 8. Volcano πρωτεϊνών κυτταροπλάσματος (με κόκκινο χρώμα εμφανίζονται οι πρωτεΐνες που επιλέχθηκαν για ανάλυση).

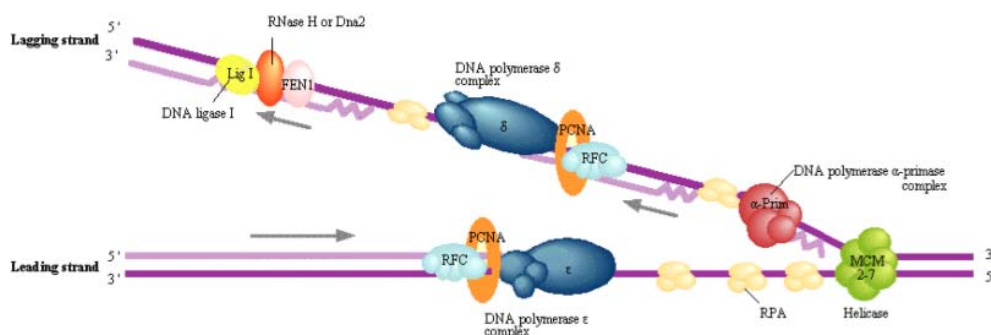


1.1 Αγγειογενίνη και Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA)

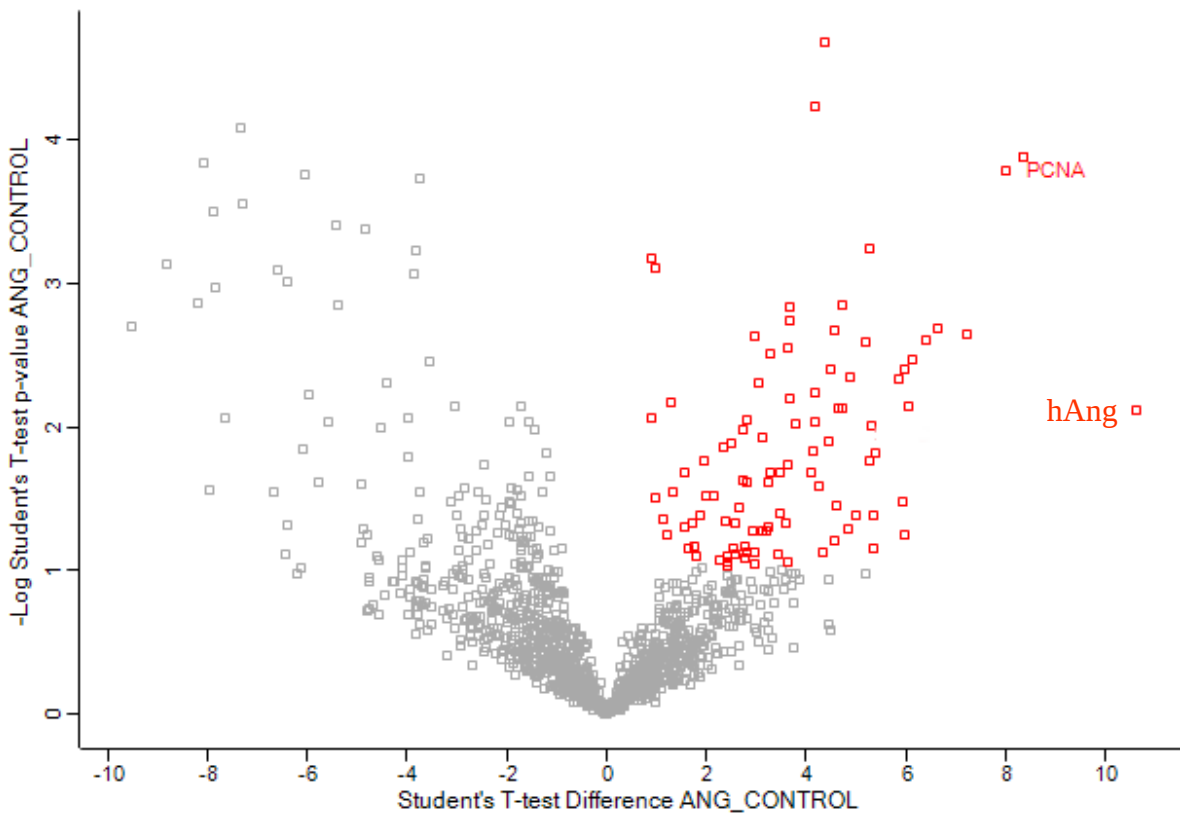
Σ' αυτό το σημείο αξίζει να αναφερθεί ότι η αγγειογενίνη βρέθηκε να αλληλεπιδρά με το PCNA στο κυτταρόπλασμα και όχι στον πυρήνα και μάλιστα η αλληλεπίδραση μεταξύ hANG-PCNA ήταν μια αλληλεπίδραση που ξεχώρισε με διαφορά, δίνοντας τα καλύτερα στατιστικά από κάθε άλλη αλληλεπίδραση.

Το PCNA είναι το βασικό μόριο του clamp της DNA πολυμεράσης (εικόνα 9) και γενικότερα του σωματίου αντιγραφής χρωμοσωμικού DNA. Μεταγενέστερες μελέτες, ωστόσο, έχουν αποκαλύψει την εντυπωσιακή ικανότητά του να αλληλεπιδρά με πληθώρα μορίων, τα οποία εμπλέκονται σε διάφορα μεταβολικά μονοπάτια.

Εικόνα 9. (Από KEGG pathways). Αντιγραφή του DNA.



Εικόνα 10. Το PCNA και η αγγειογενίνη στο κυτταροπλασματικό volcano.



Το PCNA είναι κεντρικής σημασίας για πολλές βασικές κυτταρικές διεργασίες όπως η αντιγραφή του DNA και η επιδιόρθωση βλαβών, η μεταγραφή, ο διαχωρισμός των χρωμοσωμάτων, και η πρόοδος του κυτταρικού κύκλου. Όλες αυτές οι λειτουργίες πραγματοποιούνται από το PCNA στον πυρήνα. Ωστόσο, μια σημαντική ποσότητα του PCNA υπάρχει στο κυτταρόπλασμα αν και η λειτουργία τους είναι προς το παρόν άγνωστη^{38,40}. Έχει βρεθεί πρόσφατα ότι το PCNA περιέχει μια αλληλουχία πυρηνικού εντοπισμού (NLS) και για την μεταφορά του στον πυρήνα φαίνεται να μεσολαβεί η ιμπορτίνη β, μιας και το PCNA αλληλεπιδρά με την ιμπορτίνη β αλλά όχι με την ιμπορτίνη α³⁸. Αυτά τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι τα κύτταρα έχουν ενεργό μηχανισμό για τον κυτταροπλασματικό εντοπισμό του PCNA, η οποία δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί. Με αυτό συμφωνούν και τα αποτελέσματα της παρούσας ανάλυσης καθώς πέρα από την αξιοπρόσεκτη αλληλεπίδραση της hAng με το PCNA, η hAng βρέθηκε να αλληλεπιδρά με την ιμπορτίνη β σε στατιστικά σημαντικά επίπεδα.

Κάτι επίσης ενδιαφέρον στο συγκεκριμένο συνδυασμό αλληλεπιδράσεων είναι η ισχυρή αλληλεπίδραση της hAng με τον συντελεστή επιμήκυνσης 1-α (Elongation factor 1-alpha, EF1A). Ο συγκεκριμένος πρωτεϊνικός παράγοντας είχε την υψηλότερη έκφραση μεταξύ των δεκατεσσάρων πρωτεϊνών που σχετίζονται με το PCNA σε καρκινικά κύτταρα, σε σύγκριση με τα φυσιολογικά. Αυτή η παρατήρηση ενισχύει την υπόθεση ότι ο EF1A μπορεί να λειτουργήσει ως ογκοπρωτεΐνη³⁹. Τα παραπάνω φαίνεται να συνδέονται σαν κομμάτια από ένα παζλ αλληλεπιδράσεων με καταλυτικό ρόλο στην ανάπτυξη όγκων και την ρύθμιση της κυτταρικής λειτουργίας.

Τέλος, αξίζει να αναφερθεί, χωρίς να μπούμε σε ένα λαβύρινθο υποθέσεων, ότι στις στατιστικά σημαντικές αλληλεπιδράσεις του κυτταροπλάσματος βρέθηκαν αρκετές πρωτεΐνες που συμμετέχουν στο μονοπάτι του PCNA κατά την αντιγραφή του DNA. Βέβαια είναι προφανές ότι είναι δύσκολο να κατανοηθεί και να ερμηνευθεί κάτι τέτοιο εφόσον είναι αδύνατον να συμβαίνει αντιγραφή του DNA στο κυτταρόπλασμα! Ωστόσο, αυτό μπορεί να υποδεικνύει κάποια ισχυρή αλληλεπίδραση, η οποία ενισχύεται από την υπόθεση “επιμόλυνσης” του κυτταροπλάσματος με πυρήνες κατά το διαχωρισμό, και μπορεί να μελετηθεί περαιτέρω.

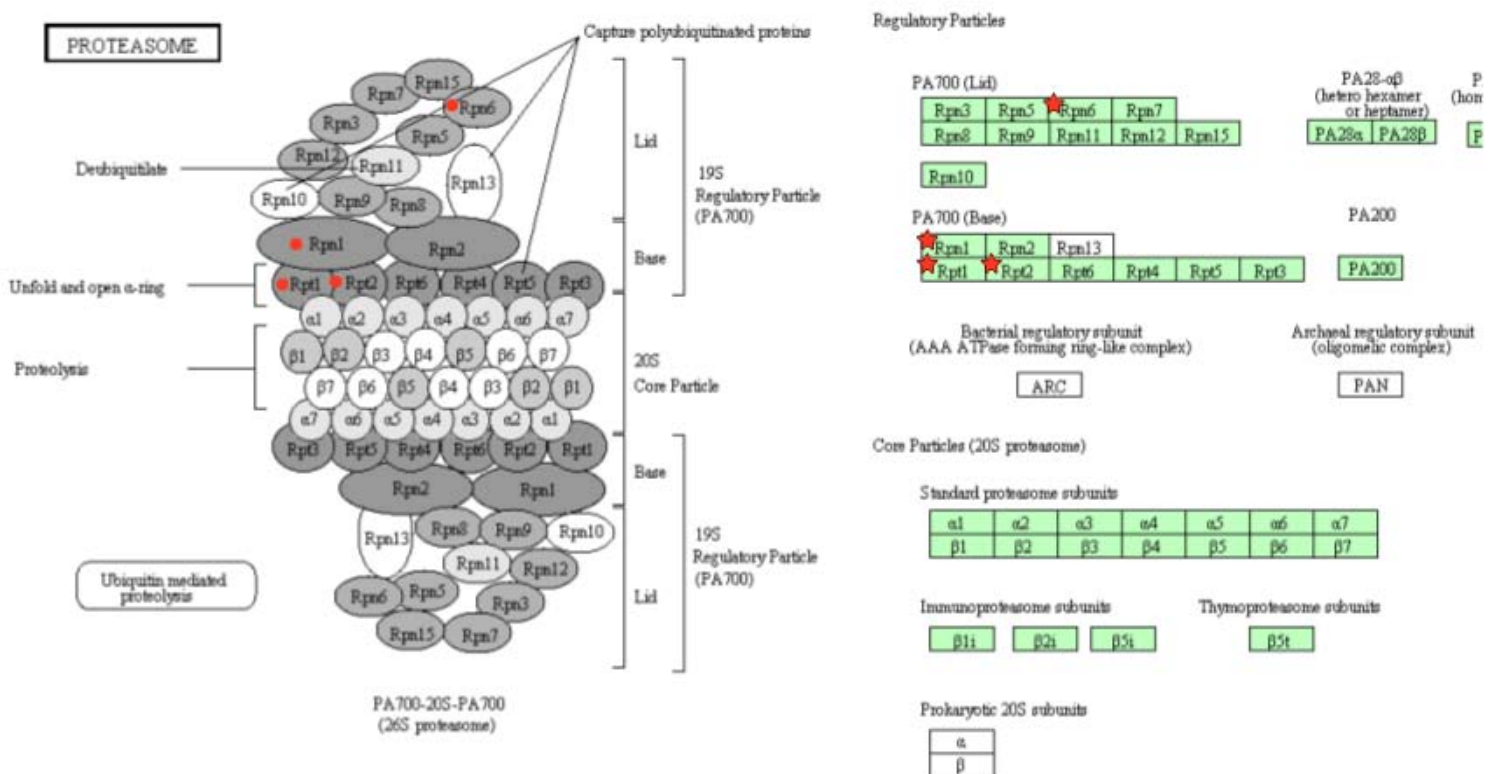
1.2 Συσχέτιση με τη ρύθμιση της έκφρασης και το πρωτεάσωμα

Βασικό σύμπλοκο στο οποίο βρέθηκαν να συμμετέχουν αρκετές πρωτεΐνες από τις κυτταροπλασματικές αλληλεπιδράσεις τη αγγειογενίνης είναι το πρωτεάσωμα. Αφ’ ενός η υπόθεση αυτή έχει βάση λόγω της ριβονουκλεολυτικής φύσης της αγγειογενίνης και αφ’ ετέρου είναι γνωστό ότι η αγγειογενίνη ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων σε παθολογικές καταστάσεις^{23,34}. Οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από τα παρακάτω γονίδια και βρέθηκαν να αλληλεπιδρούν με την hAng σχετίζονται με τη ρύθμιση των mRNAs.

| OFFICIAL_GENE_SYMBOL | GENE NAME |
|----------------------|---|
| HSPA1A | heat shock protein family A (Hsp70) member 1A(HSPA1A) |
| HSPA8 | heat shock protein family A (Hsp70) member 8(HSPA8) |
| HSPB1 | heat shock protein family B (small) member 1(HSPB1) |
| PSMC1 | proteasome 26S subunit, ATPase 1(PSMC1) |
| PSMC2 | proteasome 26S subunit, ATPase 2(PSMC2) |
| PSMD11 | proteasome 26S subunit, non-ATPase 11(PSMD11) |
| PSMD2 | proteasome 26S subunit, non-ATPase 2(PSMD2) |

Στην παραπάνω λίστα υπάρχουν και γονίδια τα οποία κωδικοποιούν για πρωτεΐνες του πρωτεασώματος και είναι τα proteasome 26s subunits ATPase 1, ATPase 2, non-ATPase 11, non-ATPase 2, τα οποία φαίνονται στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 11.).

Εικόνα 11. Το σύμπλοκο του πρωτεασώματος. Με κόκκινο σημειώνονται οι πρωτεΐνες οι οποίες βρέθηκαν να αλληλεπιδρούν με τη hAηg στο κυτταρόπλασμα.

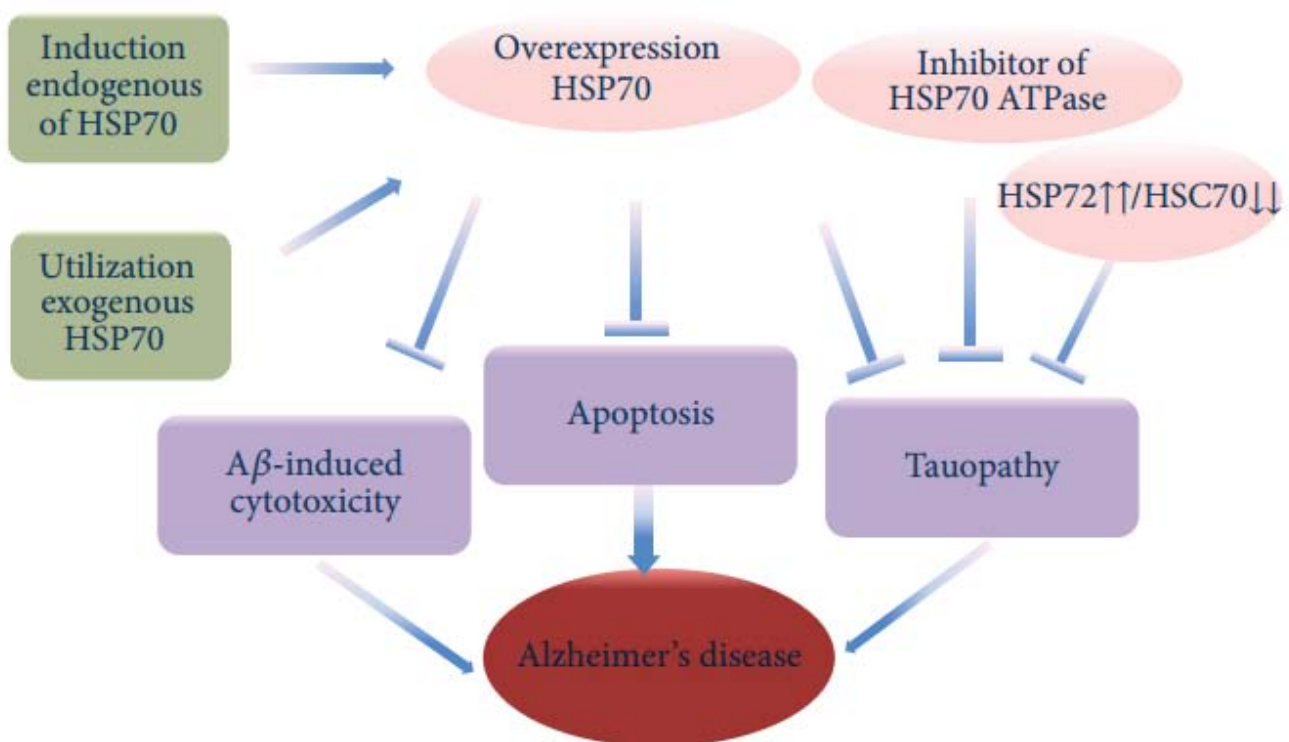


Επίσης έχει βρεθεί ότι τα μέλη της HSP70 έχουν κυτταροπροστατευτικό ρόλο που είναι ιδιαίτερα σημαντικός στην εξέλιξη της νόσου του Alzheimer (AD) ⁴⁸. Στην νόσο του Alzheimer παρατηρείται αυξημένη εξωνευρωνική απόθεση της πρωτεΐνης αμυλοειδούς-βήτα (Aβ) και είναι το κύριο παθολογικό χαρακτηριστικό στην ανάπτυξη της AD. Η HSP70 καταστέλλει τη συσσωμάτωση Aβ και έτσι μπορεί να εμποδίζει την παθολογική διαδικασία στην AD. Η υπερέκφραση της

HSP70 που αναστέλλει τη συσσωμάτωση των Αβ και βελτιώνει τα αντίστοιχα συμπτώματα της νόσου είναι ευρέως αποδεκτή. Η υπερέκφραση της HSP70 παρέχει αποτελεσματική προστασία στους νευρώνες από την ενδοκυτταρική συσσώρευση της Αβ μέσω της προώθησης της ενζυμικής αποδόμησής της ⁴⁸.

Η HSP70 έχει κυτταροπροστατευτικό ρόλο στην AD και μέσω της αποκατάστασης της ομοιόστασης της Tau. Η πρωτεΐνη tau είναι η κύρια νευρωνική πρωτεΐνη που σχετίζεται με μικροσωληνίσκους (MAP) και παίζει κεντρικό ρόλο στη διατήρηση και σταθεροποίηση των μικροσωληνίσκων εντός των νευραξόνων στην AD.

Εικόνα 12 ⁴⁸. Η βιολογική δράση της HSP70 στην νόσο του Alzheimer (AD). Η ενδογενής διέγερση και η αξιοποίηση των εξωγενών επιπέδων αυξάνουν την ποσότητα της HSP70 η οποία αναστέλλει την κυτταροτοξικότητα από συσσωμάτωση της Αβ, ρυθμίζει την ομοιόσταση της tau στον εγκέφαλο, και αποτρέπει την απόπτωση νευρώνων στην AD. Η προώθηση της έκφρασης HSP70 θα μπορούσε να επιταχύνει την αποδόμηση περίσσειας tau, η οποία εξασθενεί την νόσο. Οι αναστολείς της δραστηριότητας ATPάσης της HSP70 μειώνουν την παθογένεια της tau.



→ Stimuli
 T Inhibition

Η ομοιοστάση της tau κανονικά ελέγχεται μέσω της δράσης μοριακών συνοδών, όπως η HSP70. Έχει βρεθεί ότι η HSP70 μπορεί να προάγει την πρόσδεση της tau σε μικροσωληνίσκους, να μπλοκάρει τη συσσωμάτωσή της και να προωθεί την αποδόμησή της αποτρέποντας την απορρύθμιση της ομοιοστάσής της. Η HSP70 αναστέλλει άμεσα τη συσσωμάτωση της tau μέσω ενός μηχανισμού που περιλαμβάνει την σύνδεσή της με διαλυτές, μονομερείς, και ινώδεις μορφές της tau. Στη συνέχεια η HSP70 προάγει την αποδόμηση αυτών των ενώσεων από το σύστημα του πρωτεασώματος ⁴⁸.

Βλέπουμε λοιπόν ότι η αγγειογενίνη μέσω της αλληλεπίδρασής της με τις heat shock αλλά και πρωτεΐνες του πρωτεασώματος και δεδομένου του νευροπροστατευτικού της ρόλου να συμμετέχει στην εξέλιξη της νευροεκφυλιστικής νόσου του Alzheimer αλλά και άλλων, όπως η πλευρική αμυοτροφική σκλήρυνση και η νόσος του Parkinson που αποτελούν γνωστές δράσεις της αγγειογενίνης ⁴⁶ (και εικόνα 2). Επίσης, η υπόθεση ότι η αγγειογενίνη εμπλέκεται σε αυτές τις νευροεκφυλιστικές νόσους ενισχύεται από τις αλληλεπιδράσεις τις με πρωτεΐνες που σχετίζονται με τους μικροσωληνίσκους, που θα τις δούμε παρακάτω, αλλά και από τη βιβλιογραφία καθώς έχει επιβεβαιωθεί ο ρόλος της στην προώθηση δημιουργίας μικροσωληνίσκων ²³.

1.3 Συσχέτιση με τον κυτταροσκελετό

Είναι γνωστό ότι η αγγειογενίνη αλληλεπιδρά με την ακτίνη και επάγει αλλαγές στον κυτταροσκελετό, όπως την αναστολή του πολυμερισμού της G-ακτίνης και αλλαγές των φυσικών ιδιοτήτων της F-ακτίνης ^{23,14}. Στην παρούσα μελέτη η αγγειογενίνη βρέθηκε να αλληλεπιδρά με ποικίλες πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού, κυρίως τις τουμπουλίνες άλφα και βήτα. Έτσι, στην παρακάτω λίστα φαίνονται τα γονίδια που κατηγοριοποιήθηκαν με βάση τον υποκυτταρικό εντοπισμό τους σε γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού αλλά και με βάση τη μοριακή τους λειτουργία σε γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες που εμπλέκονται σε διαδικασίες που βασίζονται στους μικροσωληνίσκους (microtubule based processes).

| OFFICIAL_GENE_SYMBOL | GENE NAME |
|----------------------|---|
| ACTR2 | ARP2 actin-related protein 2 homolog (yeast)(ACTR2) |
| ACTG1 | actin gamma 1(ACTG1) |
| TUBA1B | tubulin alpha 1b(TUBA1B) |
| TUBA1C | tubulin alpha 1c(TUBA1C) |
| TUBA4A | tubulin alpha 4a(TUBA4A) |
| TUBB3 | tubulin beta 3 class III(TUBB3) |
| TUBB4B | tubulin beta 4B class IVb(TUBB4B) |
| TUBB6 | tubulin beta 6 class V(TUBB6) |
| TUBB8 | tubulin beta 8 class VIII(TUBB8) |
| TUBB | tubulin beta class I(TUBB) |
| MAP1B | microtubule associated protein (MAP1B) |

Στις παρακάτω εικόνες φαίνεται η αλληλεπίδραση της αγγειογενίνης με την ακτίνη αλλά και η επίδραση που έχει στον σχηματισμό ινιδίων F-ακτίνης.

1.4 Αγγειογενίνη και T-complex

Μια αλληλεπίδραση με πρωτεΐνες μοριακούς συνοδούς ίσως να φαίνεται αδιάφορη, ίσως όμως και να σχετίζεται με πιθανή συμμετοχή της αγγειογενίνης στην αναδίπλωση πρωτεϊνών ή να συμμετέχει σε άλλες δράσεις του T-complex που ανακαλύπτονται συνεχώς.

Στην παρακάτω λίστα φαίνονται τα γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες του T-complex, και συγκεκριμένα του CCT microcomplex το οποίο είναι ένα υπο-σύμπλοκο του T-complex που περιλαμβάνει πρωτεΐνες μοριακούς συνοδούς (Chaperonins Containig T-complex,CCT).

| Protein name | Gene name |
|-------------------------------------|-----------------|
| T-complex protein 1 subunit gamma | CCT3 |
| T-complex protein 1 subunit alpha | TCP1 |
| T-complex protein 1 subunit epsilon | HEL-S-69;CCT5 |
| T-complex protein 1 subunit theta | CCT8 |
| T-complex protein 1 subunit beta | HEL-S-100n;CCT2 |
| T-complex protein 1 subunit eta | CCT7 |

Το CCT είναι ένας μοριακός συνοδός που παίζει σημαντικό ρόλο στην αναδίπλωση των πρωτεϊνών στο κυτταρόπλασμα. Είναι γνωστό ότι το CCT συμμετέχει στην αναδίπλωση της ακτίνης, της τουμπουλίνης, και άλλων πρωτεϊνών ενώ εκτιμάται ότι το 15% των πρωτεϊνών που μεταφράζονται σε κύτταρα θηλαστικών αναδιπλώνονται με τη βοήθεια της CCT ³⁷.

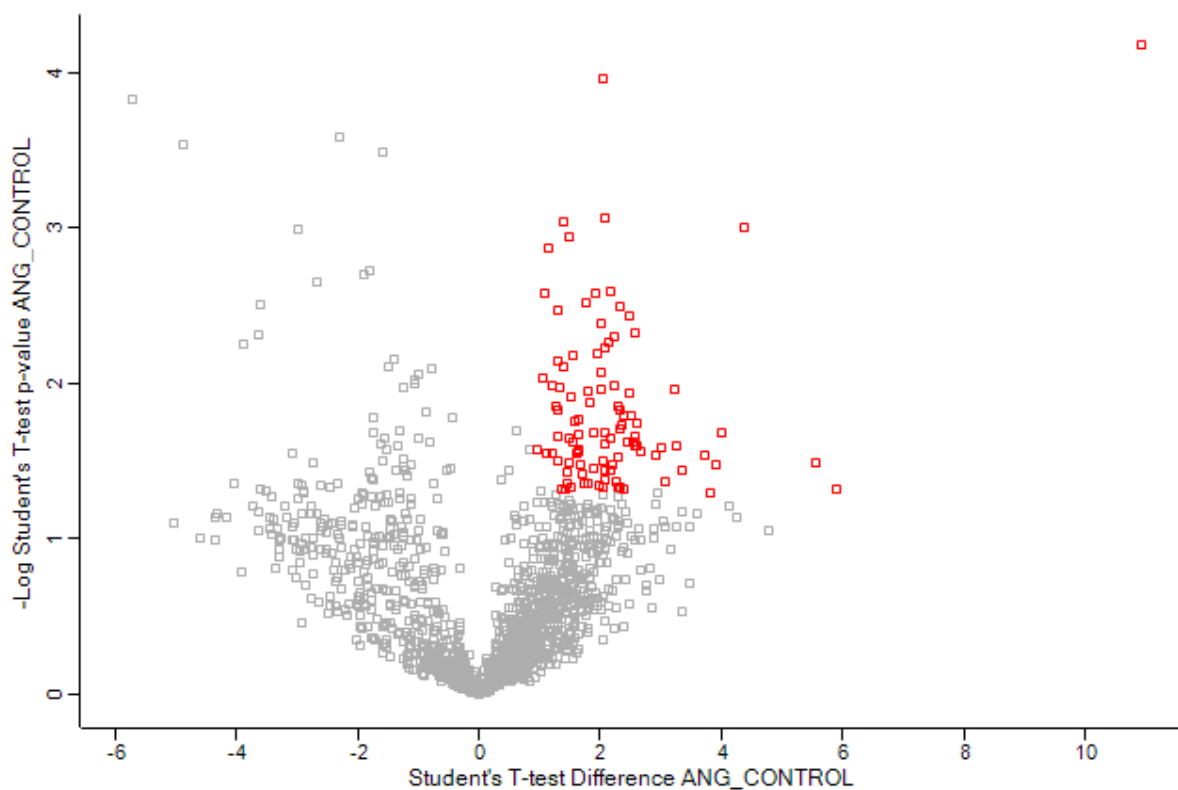
Σε διάφορες μελέτες έχει δειχθεί ότι η έκφραση των CCT γονιδίων συσχετίζεται με την κυτταρική ανάπτυξη³⁵. Σε μια ανάλυση των ανθρώπινων κυττάρων K562 ερυθρολευχαιμίας υπό την επίδραση στρεσογόνων παραγόντων, διαπιστώθηκε ότι οι υπομονάδες CCT αυξάνονται δραματικά και ταχύτατα. Αυτά τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι οι υπομονάδες CCT μπορεί να παίζουν ρόλο στον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση κυττάρων λευχαιμίας. Έχει επίσης δειχθεί ότι τα επίπεδα έκφρασης του CCT2 σε ιστούς όγκων είναι σημαντικά υψηλότερα από ό,τι σε φυσιολογικούς ιστούς σε ασθενείς με ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα ή καρκίνωμα στο κόλον.

Επιπλέον, η αύξηση των επιπέδων του CCT2 στον όγκο συσχετίζονται έντονα με την αύξηση των επιπέδων του PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen), η οποία χρησιμοποιείται ως δείκτης της κυτταρικής ανάπτυξης, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι CCT μπορεί να είναι χρησιμεύουν ως πρωτεϊνικός δείκτης των ταχέως αναπτυσσόμενων όγκων³⁵.

Όπως ήδη αναφέρθηκε ο PCNA ήταν η πιο ισχυρή αλληλεπίδραση της αγγειογενίνης, μπορούσαμε λοιπόν να υποθεσούμε ότι ίσως υπάρχει κάποια συσχέτιση μεταξύ της αλληλεπίδρασης της hAng με το PCNA και το CCT microcomplex και συνεπώς των επιπέδων αυτών των πρωτεϊνών με την ανάπτυξη κάποιων τύπων όγκων.

2. Αποτελέσματα αλληλεπιδράσεων στον πυρήνα

Εικόνα 13. Volcano πρωτεϊνών πυρήνα (με κόκκινο χρώμα εμφανίζονται οι πρωτεΐνες που επιλέχθηκαν για ανάλυση).



2.1 Συσχέτιση με το spliceosome

Από τα επιλεγμένα γονίδια, ένα σημαντικό ποσοστό κωδικοποιούν για πρωτεΐνες που συμμετέχουν στο splicing και φαίνονται παρακάτω.

| OFFICIAL_GENE_SYMBOL | GENE NAME |
|----------------------|---|
| KHSRP | KH-type splicing regulatory protein(KHSRP) |
| QKI | QKI, KH domain containing, RNA binding(QKI) |
| CCAR2 | cell cycle and apoptosis regulator 2(CCAR2) |
| CCAR1 | cell division cycle and apoptosis regulator 1(CCAR1) |
| CPSF7 | cleavage and polyadenylation specific factor 7(CPSF7) |
| NCBP2 | nuclear cap binding protein subunit 2(NCBP2) |
| PUF60 | poly(U) binding splicing factor 60KDa(PUF60) |
| PCBP1 | poly(rC) binding protein 1(PCBP1) |
| PCBP2 | poly(rC) binding protein 2(PCBP2) |
| SF3A3 | splicing factor 3a subunit 3(SF3A3) |
| SFPQ | splicing factor proline/glutamine-rich(SFPQ) |
| SMC1A | structural maintenance of chromosomes 1A(SMC1A) |

Κάποια από τα παραπάνω αλλά και μερικά επιπλέον, κωδικοποιούν για παράγοντες του spliceosome και είναι τα παρακάτω.

| OFFICIAL_GENE_SYMBOL | GENE NAME |
|----------------------|---|
| DDX39A | DEAD-box helicase 39A(DDX39A) |
| CACTIN | cactin, spliceosome C complex subunit(CACTIN) |
| CCAR1 | cell division cycle and apoptosis regulator 1(CCAR1) |
| CPSF7 | cleavage and polyadenylation specific factor 7(CPSF7) |
| NCBP2 | nuclear cap binding protein subunit 2(NCBP2) |
| PCBP1 | poly(rC) binding protein 1(PCBP1) |
| PCBP2 | poly(rC) binding protein 2(PCBP2) |
| SF3A3 | splicing factor 3a subunit 3(SF3A3) |
| SMC1A | structural maintenance of chromosomes 1A(SMC1A) |

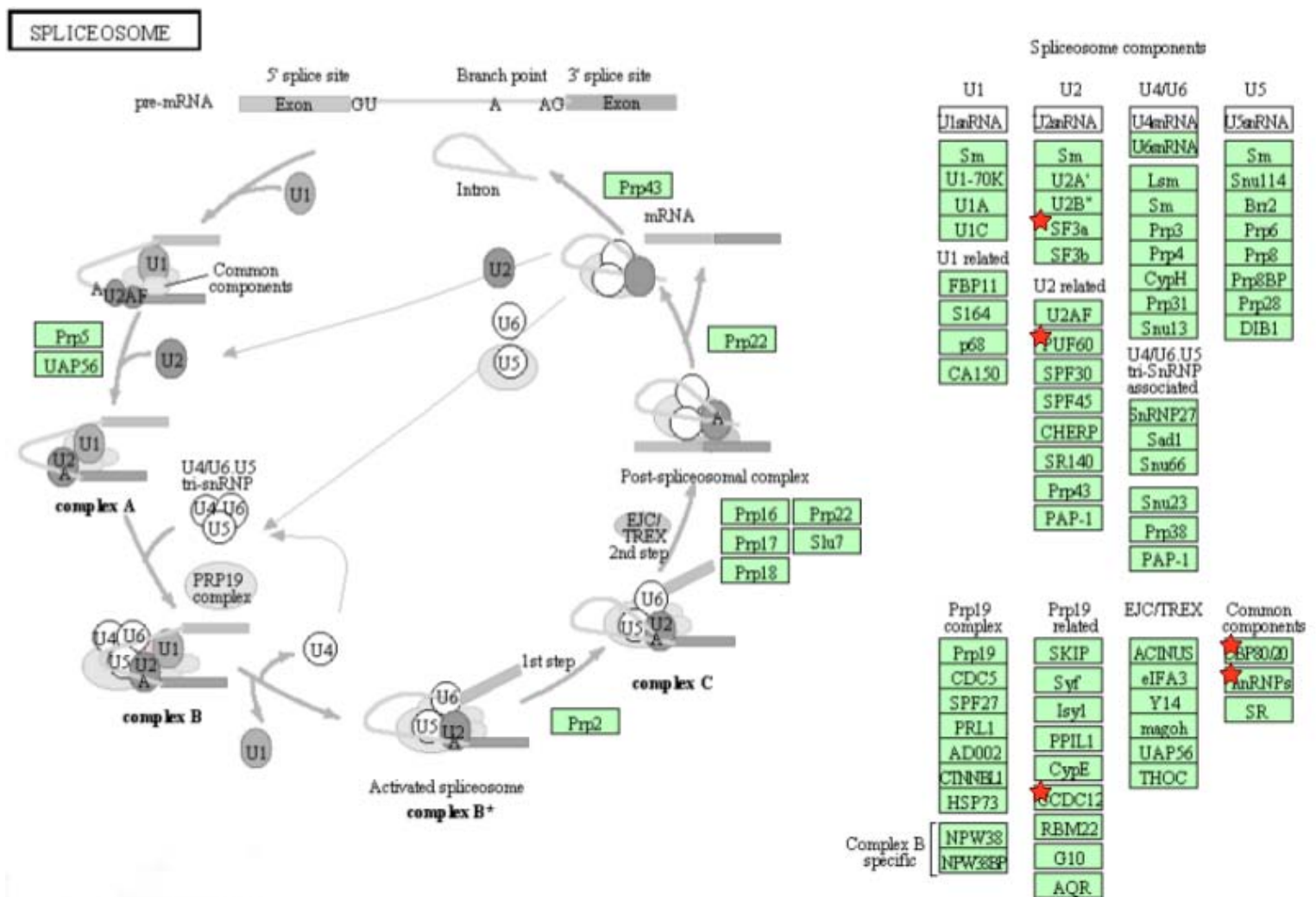
Συνολικά δηλαδή, 14 γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες που σχετίζονται με το μάτισμα. Είναι φανερό ότι είναι ένα σημαντικό εύρημα για τις αλληλεπιδράσεις της αγγειογενίνης μιας και το μάτισμα είναι μια διαδικασία που έχει καταλυτικό ρόλο στη λειτουργία των πρωτεϊνών αλλά και στην ποικιλότητά τους. Το εναλλακτικό μάτισμα αυξάνει τον αριθμό των μοναδικών πρωτεϊνών που εκφράζονται από ένα και μόνο γονίδιο ⁴¹.

Το μάτισμα των pre-mRNAs καταλύεται από το spliceosome (Εικόνα 14), ένα σύνθετο σύμπλοκο ριβονουκλεοπρωτεϊνών (RNP) που αποτελείται από πέντε snRNPs και πολυάριθμες πρωτεΐνες. Τα περίπλοκα RNA-RNA και RNP δίκτυα, τα οποία χρησιμεύουν για την ευθυγράμμιση των επίμαχων τμημάτων του pre-mRNA, σχηματίζονται και αναδιατάσσονται συνεχώς κατά την συναρμολόγησή του.

Η μελέτη του ματίσματος σε μοριακό επίπεδο δεν είναι σημαντική μόνο για την κατανόηση της γονιδιακής έκφρασης, αλλά είναι επίσης ιατρικού ενδιαφέροντος, καθώς η παρέκκλιση από τη φυσιολογική διαδικασία είναι η βάση πολλών ανθρώπινων ασθενειών ή συμβάλλει στην σοβαρότητά τους⁴². Έχει περιγραφεί ένας αριθμός ασθενειών οι οποίες σχετίζονται μια αλλαγή στο μοντέλο εναλλακτικού ματίσματος που δεν οφείλεται σε μεταλλάξεις ή αλλοιώσεις trans παραγόντων. Πρόσφατα αποτελέσματα έδειξαν ότι η εναλλακτική συρραφή του εξονίου tau 10 μεταβάλλεται σημαντικά σε σποραδική νόσο του Alzheimer⁴². Επίσης, έχει αναφερθεί αρκετές φορές ότι αλλαγές στο εναλλακτικό μάτισμα συνδέονται με την ανάπτυξη όγκων, π.χ. όγκος του καρκίνου του μαστού του Wilm, μελάνωμα και καρκίνο του προστάτη⁴².

Ανάμεσα στους αλληλεπιδρώντες παράγοντες που σχετίζονται με το μάτισμα ξεχωρίζει η αλληλεπίδραση hAng με την ATP-dependent RNA helicase (DDX39A) η οποία έχει προταθεί ως πιθανός βιο-δείκτης στον καρκίνο του μαστού ⁴³ και ο splicing factor 3a (SF3A) ο οποίος έχει δειχθεί ότι είναι ο πιο απαραίτητος παράγοντας του spliceosome. Σε κύτταρα που έγινε αποσιώπηση του SF3A προέκυψε συσσώρευση μη ματισμένων pre-mRNAs ⁴⁴.

Εικόνα 14 (από KEGG pathways). Το μονοπάτι του spliceosome. Με κόκκινο σημειώνονται οι πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με την αγγειογενίνη. Για λόγους απλότητας οι πρωτεΐνες εκτός των συμπλόκων, που συμμετέχουν στο μάτισμα δεν αναπαρίστανται στο μονοπάτι. Βλέπουμε ότι δύο αλληλεπιδρώντες παράγοντες συμμετέχουν στο U2 σύμπλοκο, που έχει κυρίαρχο ρόλο στο μάτισμα .



Δ. Συζήτηση

Είναι ενδιαφέρον ότι τα αποτελέσματα των πειραμάτων ανέδειξαν πολλές νέες αλληλεπιδράσεις, πιθανά νέα μεταβολικά μονοπάτια ή βιολογικές δράσεις της αγγειογενίνης και συνεπώς νέες προσεγγίσεις στη μελέτη της. Η πληθώρα χαρακτηριστικών της hAng και οι ολοένα αυξανόμενες πληροφορίες που ανακαλύπτονται συνεχώς για αυτήν υποδεικνύει ότι πρόκειται για ένα μόριο με μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον και μιας και είναι από τις όχι καλά μελετημένες πρωτεΐνες, υπάρχει μεγάλο περιθώριο διερεύνησής της.

Μια από τις πολύ ενδιαφέρουσες αλληλεπιδράσεις που βρέθηκαν είναι αυτή της αγγειογενίνης με το PCNA στο κυτταρόπλασμα αλλά όχι στον πυρήνα. Η αλληλεπίδραση με το PCNA ξεχώρισε κατά πολύ από τις υπόλοιπες και στις 3 βιολογικές επαναλήψεις και μάλιστα με πολύ μεγάλη διαφορά στο student's t-test, ελάχιστα μικρότερη από τη διαφορά της αγγειογενίνης με το control. Για το λόγο αυτό αξίζει να σημειωθεί παρά το παράδοξο εμφάνιση στο κυτταρόπλασμα και όχι στον πυρήνα. Βέβαια, υπάρχουν αρκετές αναφορές για τον κυτταροπλασματικό εντοπισμό του PCNA^{38,40} και επίσης η διαφορά ήταν πάρα πολύ υψηλή και στα 3 πειράματα.

Πέρα από τις γνωστές αλληλεπιδράσεις της αγγειογενίνης που ξαναεμφανίστηκαν (π.χ η ακτίνη), εμφανίστηκαν και πολλές νέες. Τα μεταβολικά μονοπάτια στα οποία συμμετέχει η αγγειογενίνη είναι υπό διερεύνηση και έτσι, μέσω των μονοπατιών που συμμετέχουν οι αλληλεπιδρώντες παράγοντες, οι επιστήμονες προσπαθούν να ακολουθήσουν τον μίτο που οδηγεί στην αποκάλυψη του βιολογικού προφίλ της.

Από εδώ και πέρα η μελέτη θα πρέπει να επικεντρωθεί στην επιβεβαίωση των ισχυρών αλληλεπιδράσεων από την αντίστροφη πλευρά, δηλαδή ξεκινώντας από την πρωτεΐνη που βρέθηκε και αναζητώντας την αγγειογενίνη στις αλληλεπιδράσεις της. Η διαδικασία αυτή έχει ήδη δρομολογηθεί για τις ισχυρές αλληλεπιδράσεις, όπως το PCNA. Από εκεί και πέρα θα πρέπει να ελεγχθούν οι υποθέσεις που κάνουμε και να συσχετιστούν τα δεδομένα με μεγαλύτερη ακρίβεια. Τέλος, αυτό που αξίζει ιδιαίτερα να μελετηθεί είναι η συμμετοχή της αγγειογενίνης στις παθολογικές διεργασίες, που φαίνεται να έχει άμεσο και σημαντικό ρόλο και συνεπώς θα μπορέσουν να σχεδιαστούν νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις, όπως ήδη αναφέρθηκε.

Βιβλιογραφία

1. Risau, W. Mechanisms of angiogenesis. 1997.
2. Chen, L. & Hu, G. F. Angiogenin-mediated ribosomal RNA transcription as a molecular target for treatment of head and neck squamous cell carcinoma.
3. Strydom, D. J. et al. Amino-acid sequence of human-tumor derived angiogenin. 1985.
4. Sorrentino, S. et al. Eosinophil -derived neurotoxin and human liver ribonuclease: Identity of structure and linkage of neurotoxicity to nuclease activity.1992.
5. Fett, J. W., Bethune, J. L. & Vallee, B. L. Induction of angiogenesis by mixtures of two angiogenic proteins, angiogenin and acidic fibroblast growth factor, in the chick chorioallantoic membrane.1987.
6. Shimoyama, S. et al. Increased angiogenin expression in pancreatic cancer is related to cancer aggressiveness.1996.
7. Blaser, J., Triebel, S., Kopp, C. & Tschesche, H. A highly sensitive immunoenzymometric assay for the determination of angiogenin.1993.
8. Weiner, H. L., Weiner, L. H. & Swain, J. L. Tissue distribution and developmental expression of the messenger RNA encoding angiogenin. 1987.
9. Hu, G.-f., Chang, S. I., Riordan, J. F. & Vallee, B. L. An Angiogenin-binding protein from endothelial cells.1991.
10. Hu, G.-F., Strydom, D. J., Fett, J. W., Riordan, J. F. & Vallee, B. L. Actin is a binding protein for angiogenin.1993.
11. Hu, G. F., Riordan, J. F. & Vallee, B. L. Angiogenin promotes invasiveness of cultured endothelial-cells by stimulation of cell-associated proteolytic activities. 1994.

12. Soncin, F. Angiogenin Supports Endothelial and Fibroblast Cell-Adhesion. 1992.
13. Zhang, H., Gao, X., Weng, C. & Xu, Z. Interaction between angiogenin and fibulin 1: evidence and implication. 2008.
14. Pyatibratov, M. G. et al. Binding of human angiogenin inhibits actin polymerization. 2010.
15. Lixin, R., Efthymiadis, A., Henderson, B. & Jans, D. A. Novel properties of the nucleolar targeting signal of human angiogenin. 2001.
16. Moroianu, J. & Riordan, J. F. Nuclear translocation of angiogenin in proliferating endothelial cells is essential to its angiogenic activity. 1994.
17. Hu, G., Xu, C. & Riordan, J. F. Human angiogenin is rapidly translocated to the nucleus of human umbilical vein endothelial cells and binds to DNA. 2000.
18. Tsuji, T. et al. Angiogenin is translocated to the nucleus of HeLa cells and is involved in ribosomal RNA transcription and cell proliferation. 2005.
19. Wiedlocha, A. Following angiogenin during angiogenesis: a journey from the cell surface to the nucleolus. 1999.
20. Xu, Z. P., Tsuji, T., Riordan, J. F. & Hu, G. F. Identification and characterization of an angiogenin-binding DNA sequence that stimulates luciferase reporter gene expression. 2003.
21. Xu, Z. P., Tsuji, T., Riordan, J. F. & Hu, G. F. The nuclear function of angiogenin in endothelial cells is related to rRNA production. 2002.
22. Hu, G.-F., Riordan, J. F. & Vallee, B. L. A putative angiogenin receptor in angiogenin-responsive human endothelial cells. 1997.
23. Gao, X. & Xu, Z. Mechanisms of action of angiogenin. 2008.

24. Sadagopan, S. et al. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus upregulates angiogenin during infection of human dermal microvascular endothelial cells, which induces 45S rRNA synthesis, antiapoptosis, cell proliferation, migration, and angiogenesis. *J. Virol.* 2009.
25. Wilkins MR, Pasquali C, Appel RD, Ou K, Golaz O, Sanchez J-C, Yan JX, Gooley AA, Hughes G, Humphery-Smith I et al: From Proteins to Proteomes: Large Scale Protein Identification by Two-Dimensional Electrophoresis and Amino Acid Analysis. *Nat Biotech* 1996.
26. Anderson NL, Anderson NG. Proteome and proteomics: new technologies, new concepts and new words. *Electrophoresis*, 1998.
27. Papageorgiou, D. N., Demmers, J. & Strouboulis, J. NP-40 reduces contamination by endogenous biotinylated carboxylases during purification of biotin tagged nuclear proteins. 2013.
28. L. L. Manza et al., Sample preparation and digestion for proteomic analyses using spin filters. 2005
29. J. R. Wisniewski et al., Universal sample preparation method for proteome analysis, 2009
30. LTQ Orbitrap XL™ Hybrid FT Mass Spectrometer , Principle of Operation, Manual from www.thermofischer.com
31. MaxQuant documentation, First steps with MaxQuant tutorial, 2014, <http://www.coxdocs.org/doku.php?id=maxquant:manual:beginner>
32. Perseus documentation, Activities, 2016, <http://www.coxdocs.org/doku.php?id=perseus:noedit:activities>
33. Da Wei Huang, Brad T Sherman & Richard A Lempicki, Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources, 2008

34. M. Miyake, S. Goodison, A. Lawton, E. Gomes-Giacoia and C.J. Rosser. Angiogenin promotes tumoral growth and angiogenesis by regulating matrix metalloproteinase-2 expression via the ERK1/2 pathway, 2014.
35. Rui Huang, Miao Yu, Chang-Yan Li, Yi-Qun Zhan, Wang-Xiang Xu, Feifei Xu, Chang-hui Ge, Wei Li and Xiao-Ming Yang. New insights into the functions and localization of nuclear CCT protein complex in K562 leukemia cells. 2012.
36. Shuping Li and Guo-Fu Hu. Emerging role of angiogenin in stress response and cell survival under adverse conditions. 2012.
37. Kubota H. Function and regulation of cytosolic molecular chaperone CCT. 2002.
38. Stanislav N. Naryzhny, Hoyun Lee. Proliferating cell nuclear antigen in the cytoplasm interacts with components of glycolysis and cancer. 2010.
39. Tomlinson, V.A., Newbery, H.J., Wray, N.R., Jackson, J., Larionov, A., Miller, W.R., Dixon, J.M. and Abbott, C.M. Translation elongation factor eEF1A2 is a potential oncoprotein that is overexpressed in two-thirds of breast tumours. 2005.
40. Dikra Bouayad, Magali Pederzoli-Ribeil, Julie Mocek, Céline Candalh, Jean-Benoît Arlet, Olivier Hermine, Nathalie Reuter, Noélie Davezac and Véronique Witko-Sarsat. Nuclear-to-cytoplasmic Relocalization of the Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) during Differentiation Involves a Chromosome Region Maintenance 1 (CRM1)-dependent Export and Is a Prerequisite for PCNA Antiapoptotic Activity in Mature Neutrophils. 2012.
41. Nilsen TW, Graveley BR. Expansion of the eukaryotic proteome by alternative splicing. 2010.
42. Tatyana Novoyatleva, Yesheng Tang, Ilona Rafalska, Stefan Stamm. Pre-mRNA Missplicing as a Cause of Human Disease. 2006.

43. Calderón-González KG, Valero Rustarazo ML et al. Determination of the protein expression profiles of breast cancer cell lines by quantitative proteomics using iTRAQ labelling and tandem mass spectrometry. 2015.
44. Goranka Tanackovic and Angela Kramer. Human Splicing Factor SF3a, but Not SF1, Is Essential for Pre-mRNA Splicing In Vivo. 2004.
45. Hiroko Kishikawa , David Wu & Guo-fu Hu. Targeting angiogenin in therapy of amyotrophic lateral sclerosis. 2008.
46. Jonathan W. Cruz and Nancy A. Woychik. tRNAs taking charge. 2015.
47. Cristina Bárcena, Milica Stefanovic, Anna Tutusaus, Guillermo A. Martinez-Nieto, Laura Martinez, Carmen García-Ruiz, Alvaro de Mingo, Juan Caballeria, José C. Fernandez-Checa, Montserrat Marí & Albert Morales. Angiogenin Secretion From Hepatoma Cells Activates Hepatic Stellate Cells To Amplify A Self-Sustained Cycle Promoting Liver Cancer. 2015.
48. Rui-Chun Lu, Meng-Shan Tan, Hao Wang, An-Mu Xie, Jin-Tai Yu and Lan Tan. Heat Shock Protein 70 in Alzheimer's Disease. 2014.
49. Lesley-Ann Raven, Benjamin G Cocks, Jennie E Pryce, Jeremy J Cottrell and Ben J Hayes. Genes of the RNASE5 pathway contain SNP associated with milk production traits in dairy cattle. 2013.

Συμπληρωματικό υλικό

A. Αλφαβητική λίστα επιλεγμένων πρωτεϊνών στο κυτταρόπλασμα και τα ονόματα των γονιδίων.

| <u>Gene name</u> | <u>Protein name</u> |
|--------------------------------|--|
| YWHAH | 14-3-3 protein eta |
| YWHAQ | 14-3-3 protein theta |
| PSMC1 | 26S protease regulatory subunit 4 |
| PSMC2 | 26S protease regulatory subunit 7 |
| PSMD11 | 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 11 |
| PSMD2 | 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2 |
| SDF4 | 45 kDa calcium-binding protein |
| PRKAA1 | 5-AMP-activated protein kinase catalytic subunit alpha-1 |
| HSPD1 | 60 kDa heat shock protein, mitochondrial |
| HSPA5 | 78 kDa glucose-regulated protein |
| ACAT1 | Acetyl-CoA acetyltransferase, mitochondrial |
| ANP32B | Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member B |
| ACTG1 | Actin, cytoplasmic 2;Actin, cytoplasmic 2, N-terminally processed |
| ACTR2 | Actin-related protein 2 |
| AKAP13 | A-kinase anchor protein 13 |
| RAA1;ANG | Angiogenin |
| ATP5A1; HEL-S-123m ATP5B | ATP synthase subunit alpha;ATP synthase subunit alpha, mitochondrial |
| HEL-S-271; | ATP synthase subunit beta;ATP synthase subunit beta, mitochondrial |

| | |
|-----------------------------------|---|
| PFKL | ATP-dependent 6-phosphofructokinase, liver type |
| PFKP | ATP-dependent 6-phosphofructokinase, platelet type |
| DDX39A; DDX39; DDX39B | ATP-dependent RNA helicase DDX39A;Spliceosome RNA helicaseDDX39B |
| MTHFD1 | C-1-tetrahydrofolate synthase, cytoplasmic;Methylenetetrahydrofolate dehydrogenase;Methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase; Formyltetrahydrofolate synthetase; C-1-tetrahydrofolate synthase, cytoplasmic, N-terminally processed |
| CANX | Calnexin |
| C1orf57; NTPCR | Cancer-related nucleoside-triphosphatase |
| CTNNA1 | Catenin alpha-1 |
| CAND1 | Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1 |
| ALDH18A1 | Delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthase;Glutamate 5-kinase; Gamma-glutamyl phosphate reductase |
| DCD | Dermcidin;Survival-promoting peptide;DCD-1 |
| DDB1 | DNA damage-binding protein 1 |
| MCM3; HCC5 | DNA helicase;DNA replication licensing factor MCM3 |
| MCM7 | DNA helicase;DNA replication licensing factor MCM7 |
| MSH2 | DNA mismatch repair protein Msh2 |
| MSH6; GTBP | DNA mismatch repair protein Msh6 |
| DNAJA2 | DnaJ homolog subfamily A member 2 |
| DNAJB1 | DnaJ homolog subfamily B member 1 |
| EFEMP1 | EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1 |
| EEF1A1; EEF1A1P5; EEF1A1L14 | Elongation factor 1-alpha;Elongation factor 1-alpha 1; Putative elongation factor 1-alpha-like 3 |
| IKBKAP | Elongator complex protein 1 |
| ENG | Endoglin |
| EIF4A1 | Eukaryotic initiation factor 4A-I |

| | |
|---------------------------------|--|
| EIF4B | Eukaryotic translation initiation factor 4B |
| FADS2 | Fatty acid desaturase 2 |
| HEL-S-103; HSPA1B; HSPA1A | Heat shock 70 kDa protein 1B;Heat shock 70 kDa protein 1A |
| HEL-S-72p; HSPA8 | Heat shock cognate 71 kDa protein |
| HEL-S-102; HSPB1 | Heat shock protein beta-1 |
| KPNB1 | Importin subunit beta-1 |
| IPO7 | Importin-7 |
| LAMP2 | Lysosome-associated membrane glycoprotein 2 |
| GSTZ1 | Maleylacetoacetate isomerase |
| ACADM | Medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial |
| MAGED2 | Melanoma-associated antigen D2 |
| WDR77 | Methylosome protein 50 |
| MAP1B | Microtubule-associated protein 1B;MAP1B heavy chain;MAP1 light chain LC1 |
| SLC25A22; SLC25A18 | Mitochondrial glutamate carrier 2;Mitochondrial glutamate carrier 1 |
| MYCT1 | Myc target protein 1 |
| PBEF1; NAMPT | Nicotinamide phosphoribosyltransferase |
| NAP1L1 | Nucleosome assembly protein 1-like 1 |
| NAP1L4 | Nucleosome assembly protein 1-like 4 |
| PTX3 | Pentraxin-related protein PTX3 |
| SLC25A3 | Phosphate carrier protein, mitochondrial |
| PKP2 | Plakophilin-2 |
| HARS2 | Probable histidine--tRNA ligase, mitochondrial |

| | |
|--------------------------|---|
| PCNA | Proliferating cell nuclear antigen |
| PRMT5 | Protein arginine N-methyltransferase 5; Protein arginine N-methyltransferase 5; Protein arginine N-methyltransferase 5, N-terminally processed |
| OK/SW-cl.19; C17orf75 | Protein Njmu-R1 |
| S100A9 | Protein S100;Protein S100-A9 |
| UNC45A | Protein unc-45 homolog A |
| PCMT1 | Protein-L-isoaspartate O-methyltransferase;Protein-L-isoaspartate (D-aspartate) O-methyltransferase |
| RAB3A | Ras-related protein Rab-3A |
| ARHGEF1 | Rho guanine nucleotide exchange factor 1 |
| RUVBL1 | RuvB-like 1 |
| RUVBL2 | RuvB-like 2 |
| MAT2A | S-adenosylmethionine synthase isoform type-2;S-adenosylmethionine synthase |
| PPP2CA; PPP2CB | Serine/threonine-protein phosphatase; Serine/threonine-protein phosphatase 2A catalytic subunit alpha isoform; Serine/threonine-protein phosphatase 2A catalytic subunit beta isoform |
| SDPR | Serum deprivation-response protein |
| SSBP1 | Single-stranded DNA-binding protein; Single-stranded DNA-binding protein, mitochondrial |
| ATP1A1 | Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1 |
| SUCLG1 | Succinyl-CoA ligase [ADP/GDP-forming] subunit alpha, mitochondrial |
| SMARCAL1 | SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily A-like protein 1 |
| RIC8A | Synembryn-A |
| TBC1D15; | TBC1 domain family member 15 |
| TCP1 | T-complex protein 1 subunit alpha |

HEL-S-100n;

CCT2 T-complex protein 1 subunit beta

HEL-S-69;

CCT5 T-complex protein 1 subunit epsilon

CCT7 T-complex protein 1 subunit eta

CCT3 T-complex protein 1 subunit gamma

CCT8 T-complex protein 1 subunit theta

SHINC3;
TMEM33 Transmembrane protein 33

TUBA1B;
TUBA4A Tubulin alpha-1B chain;Tubulin alpha-4A chain

TUBA1C Tubulin alpha-1C chain

TUBB Tubulin beta chain

TUBB3 Tubulin beta-3 chain

TUBB2C;
TUBB4B Tubulin beta-4B chain

TUBB6 Tubulin beta-6 chain

TUBB8 Tubulin beta-8 chain

MYO1B Unconventional myosin-Ib

UMPS Uridine 5-monophosphate synthase;Orotate phosphoribosyltransferase;
Orotidine 5-phosphate decarboxylase;Orotidine 5-phosphate decarboxylase

VPS51 Vacuolar protein sorting-associated protein 51 homolog

B. Αλφαβητική λίστα επιλεγμένων πρωτεϊνών στον πυρήνα και τα ονόματα των γονιδίων.

| <u>Gene name</u> | <u>Protein name</u> |
|------------------|---|
| SEC61A1 | unidentified protein |
| DKFZp686O1389 | unidentified protein |
| PSMD4; PIPSL | 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 4; Putative PIP5K1A and PSMD4-like protein |
| MRPS35 | 28S ribosomal protein S35, mitochondrial |
| ANLN | Actin-binding protein anillin |
| AP2B1 | AP complex subunit beta;AP-2 complex subunit beta |
| AP3D1 | AP-3 complex subunit delta-1 |
| API5 | Apoptosis inhibitor 5 |
| DDX39A; DDX39 | ATP-dependent RNA helicase DDX39A |
| EPB41L2 | Band 4.1-like protein 2 |
| PAPSS2 | Bifunctional 3-phosphoadenosine 5-phosphosulfate synthase 2; Sulfate adenylyltransferase;Adenylyl- |
| CACTIN | Cactin |
| CACYBP | Calcyclin-binding protein |
| CCAR2 | Cell cycle and apoptosis regulator protein 2 |
| CCAR1 | Cell division cycle and apoptosis regulator protein 1 |
| CDC27 | Cell division cycle protein 27 homolog |
| CETN2 | Centrin-2 |
| CHID1 | Chitinase domain-containing protein 1 |
| CHD1 | Chromodomain-helicase-DNA- |

| | |
|------------------------------------|--|
| CIT | Citron Rho-interacting kinase |
| CMTM6 | CKLF-like MARVEL transmembrane domain-containing protein 6 |
| CPSF7 | Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 7 |
| ARCN1 | Coatmer subunit delta |
| CCDC12 | Coiled-coil domain-containing protein 12 |
| CCDC22 | Coiled-coil domain-containing protein 22 |
| NCAPH | Condensin complex subunit 2 |
| CTBP1 | C-terminal-binding protein 1 |
| CYFIP2 | Cytoplasmic FMR1-interacting protein 2 |
| ALDH18A1 | Delta-1-pyrroline-5- |
| DSTN; HEL32 | Destrin |
| MSH2 | DNA mismatch repair protein Msh2 |
| MCM4 | DNA replication licensing factor MCM4 |
| MPG | DNA-3-methyladenine glycosylase |
| TRIM22 | E3 ubiquitin-protein ligase TRIM22 |
| UFL1 | E3 UFM1-protein ligase 1 |
| EEF1A1; EEF1A1P5; EEF1A1L14; | Elongation factor 1-alpha;Elongation factor 1-alpha 1; Putative elongation factor 1-alpha-like 3 |
| KDEL3 | ER lumen protein-retaining receptor;ER lumen protein-retaining receptor 3 |
| EIF4A1 | Eukaryotic initiation factor 4A-I |
| EIF2S2 | Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 2 |
| EIF5AL1; EIF5A; EIF5A2" | Eukaryotic translation initiation factor 5A-1-like; Eukaryotic translation initiation factor 5A-1; Eukaryotic translation initiation factor 5A; Eukaryotic translation initiation factor 5A-2 |

| | |
|-------------------|---|
| DIS3; KIAA1008 | Exosome complex exonuclease RRP44 |
| KHSRP | Far upstream element-binding protein 2 |
| FHL2; AAG11 | Four and a half LIM domains protein 2 |
| RBBP4; RBBP7 | Histone-binding protein RBBP4;Histone-binding protein RBBP7 |
| SETD3 | Histone-lysine N-methyltransferase setd3 |
| IPO4 | Importin-4 |
| ITPR2 | Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 2 |
| KRT2 | Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal |
| LEPROT | Leptin receptor gene-related protein |
| LARS | Leucine--tRNA ligase, cytoplasmic |
| LPCAT4 | Lysophospholipid acyltransferase LPCAT4 |
| MTA2 | Metastasis-associated protein MTA2 |
| MTCL1 | Microtubule cross-linking factor 1 |
| TOMM70A | Mitochondrial import receptor subunit TOM70 |
| MMS19 | MMS19 nucleotide excision repair protein homolog |
| NELFCD; TH1L | Negative elongation factor C/D |
| NBN; NBS1 | Nibrin |
| NCBP2 | Nuclear cap-binding protein subunit 2 |
| PICALM | Phosphatidylinositol-binding clathrin assembly protein |
| PCBP1 | Poly(rC)-binding protein 1 |
| PCBP2 | Poly(rC)-binding protein 2 |
| PUF60 | Poly(U)-binding-splicing factor PUF60 |

| | |
|--------------------|---|
| DDX49 | Probable ATP-dependent RNA helicase DDX49 |
| PDIA6 | Protein disulfide-isomerase A6 |
| MAX | Protein max |
| NUMB | Protein numb homolog |
| QKI | Protein quaking |
| S100A14 | Protein S100-A14 |
| SEC23B | Protein transport protein Sec23B |
| UNC45A | Protein unc-45 homolog A |
| EIF2S3L; EIF2S3 | Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 3 Putative eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 3-like protein; |
| RABEP1 | Rab GTPase-binding effector protein 1 |
| RIN1 | Ras and Rab interactor 1 |
| RAB3B | Ras-related protein Rab-3B |
| RBM45 | RNA-binding protein 45 |
| RUVBL1 | RuvB-like 1 |
| RUVBL2 | RuvB-like 2 |
| TAOK2; TAOK1 | Serine/threonine-protein kinase TAO2 |
| STRAP | Serine-threonine kinase receptor-associated protein |
| UTP20 | Small subunit processome component 20 homolog |
| SF3A3 | Splicing factor 3A subunit 3 |
| SFPQ | Splicing factor, proline- and glutamine-rich |
| SLIRP | SRA stem-loop-interacting RNA-binding protein, mitochondrial |
| SMC1A | Structural maintenance of chromosomes protein; Structural maintenance of chromosomes protein 1A |

SMARCD2 SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily D member 2

TCP1 T-complex protein 1 subunit alpha

HEL-S-100n;
CCT2 T-complex protein 1 subunit beta

TERF2 Telomeric repeat-binding factor 2

TERF2IP Telomeric repeat-binding factor 2-interacting protein 1

TRIM28 Transcription intermediary factor 1-beta

PURA Transcriptional activator protein Pur-alpha

NSUN2 tRNA (cytosine(34)-C(5))-

YARS2 Tyrosine--tRNA ligase, mitochondrial;Tyrosine--tRNA ligase

USP7 Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase;Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 7

USP3 Ubiquitinyl hydrolase 1;Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase;
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 3

VPS16 Vacuolar protein sorting-associated protein 16 homolog

VPS18 Vacuolar protein sorting-associated protein 18 homolog

WASF2;
WASF3 Wiskott-Aldrich syndrome protein family member 2;
Wiskott-Aldrich syndrome protein family member 3

ZNF185 Zinc finger protein 185