

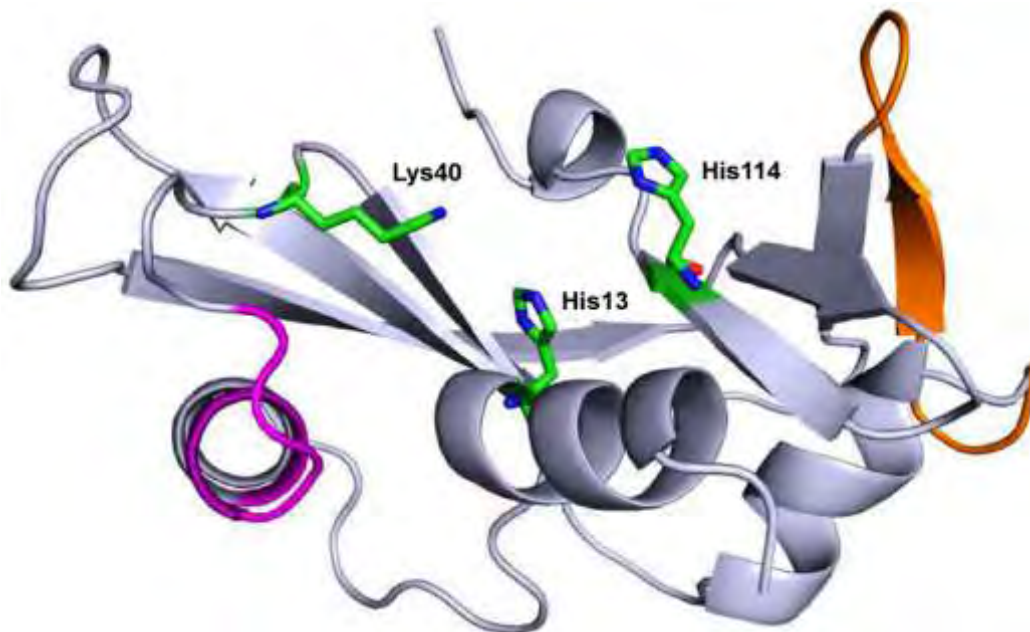


*Τμήμα Βιοχημείας &
Βιοτεχνολογίας
Σχολή Επιστημών
Υγείας*



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

*Υπερέκφραση της ανθρώπινης αγγειογενίνης (hAng)
σε κύτταρα θηλαστικών.*



Βασιλική Ε. Κουκουλιάτρα

Λάρισα 2019



*Department of
Biochemistry &
Biotechnology
School of Health Sciences*



DIPLOMA THESIS

*Overexpression of the human angiogenin (hAng)
in mammals' cells.*

**Vasiliki E. Koukouliatra
Larissa 2019**

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Δρ. Νικόλαος Μπαλατσός (Επιβλέπων)

Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Δρ. Δημήτριος Λεωνίδας

Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας

Δρ. Άννα-Μαρία Ψαρρά

Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας με επιβλέποντα καθηγητή τον Δρ. Νικόλαο Μπαλατσό, από το Μάρτιο του 2018 έως το Φεβρουάριο του 2019.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου Δρ. Νικόλαο Μπαλατσό για την υπόδειξη του θέματος, την εμπιστοσύνη του και την καθοδήγησή του καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων στο εργαστήριο. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή και μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής Δρ. Δημήτριο Λεωνίδα για τις συμβουλές του και την καθοδήγησή του, καθώς και την Δρ. Άννα-Μαρία Ψαρρά που δέχτηκε να είναι μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής του θέματός μου. Δε θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του τμήματός μου και ιδιαίτερα την υποψήφια Διδάκτορα του τμήματος Ραφαέλα Μπέτα για την αμέριστη βοήθειά της, τις συμβουλές της καθώς και για τις ευχάριστες στιγμές καθ' όλη τη διάρκεια της παραμονής μου στο εργαστήριο. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια Διδάκτορα του τμήματος Όλγα Παπαϊωάννου για τις πολύτιμες συμβουλές της και την πρόθυμη βοήθεια που μου προσέφερε επί του θέματος της διπλωματικής μου εργασίας. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς τους φίλους μου και, ιδιαίτερα, την οικογένειά μου για την υποστήριξή τους καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

I. ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	6
II. ABSTRACT.....	6
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ^ο	
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	7
1.1. ΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΑΣΕΣ.....	7
1.2. ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ.....	8
1.3. ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ.....	10
1.4. ΑΝΘΡΩΠΙΝΗ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΙΝΗ.....	12
1.4.1. ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ hAng.....	12
1.4.2. Ο ΚΑΤΑΛΥΤΙΚΟΣ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΤΗΣ hAng.....	16
1.4.3. hAng ΚΑΙ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ.....	18
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ^ο	
2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	20
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ^ο	
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....	21
3.1. ΥΛΙΚΑ.....	21
3.1.1 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ.....	21
3.1.2. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ.....	23
3.2. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....	24
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ^ο	
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	38
4.1. ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΝΔΟΓΕΝΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΙΝΗΣ ΣΤΑ HEK-293T.....	38
4.2. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΚΑΤΑΛΛΗΛΟΤΕΡΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΔΙΑΜΟΛΥΝΣΗΣ ΓΙΑ ΤΑ HEK-293T.....	38
4.3. ΠΑΡΟΔΙΚΗ ΔΙΑΜΟΛΥΝΣΗ HEK-293T ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΚΑΤΙΟΝΙΚΟΥ ΠΟΛΥΜΕΡΟΥΣ.....	40
4.4. ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΙΝΗΣ ΜΕ ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ ΚΑΤΑ WESTERN.....	41
4.5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	42
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	42

I.ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ανθρώπινη αγγειογενίνη (hAng) είναι ένας ισχυρός αγγειογενετικός παράγοντας με σημαντικό ρόλο σε πληθώρα φυσιολογικών και παθολογικών καταστάσεων όπως η κυτταρική αύξηση και ανάπτυξη, η επούλωση τραυμάτων, αλλά και η εγκατάσταση και μετάσταση καρκινικών όγκων. Παρουσιάζει ριβονουκλεολυτική δραστικότητα, η οποία αν και χαμηλότερη από της ομόλογής της RNase A, είναι απαραίτητη για την αγγειογενετική της δράση. Η εξωκυττάρια hAng έχει την ιδιότητα να ενεργοποιεί διάφορα μονοπάτια μεταγωγής σήματος και επιπλέον να εμπλέκεται στην αποικοδόμηση του εξωκυττάριου ιστού επάγοντας την κυτταρική μετανάστευση και την εισβολή. Φυσιολογικά, συσσωρεύεται στον πυρήνα/πυρηνίσκο προάγοντας τη μεταγραφή μορίων mRNA και τη μεταγραφή και επεξεργασία μορίων rRNA, ενώ κάτω από συνθήκες στρες, στο κυτταρόπλασμα, προάγοντας το σχηματισμό μορίων tiRNA αναστέλλοντας έτσι την έναρξη της μετάφρασης.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, πραγματοποιήθηκε υπερέκφραση της αγγειογενίνης στην κυτταρική σειρά HEK-293T με σκοπό τη μελέτη των πρωτεϊνικών της αλληλεπιδράσεων. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε έλεγχος των ενδογενών επιπέδων έκφρασης του γονιδίου στη συγκεκριμένη κυτταρική σειρά από τον οποίο διαπιστώθηκε ότι εκφράζεται σε κανονικά επίπεδα μέσα στο κύτταρο. Έπειτα, διερευνήθηκε η καταλληλότερη μέθοδος διαμόλυνσης για την υπερέκφραση του γονιδίου της hAng, μεταξύ της χρήσης χλωριούχου ασβεστίου και κατιονικού πολυμερούς (PEI). Διαπιστώθηκε ότι η διαμόλυνση με το κατιονικό πολυμερές επέφερε καλύτερα αποτελέσματα από το χλωριούχο ασβέστιο. Πραγματοποιήθηκε διαμόλυνση σε μεγαλύτερη κλίμακα με το κατιονικό πολυμερές PEI και επιβεβαιώθηκε η αυξημένη έκφραση του γονιδίου στα διαμολυμένα κύτταρα με τη χρήση qPCR. Τέλος, για τον έλεγχο της παραγωγής της πρωτεΐνης πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση υπό αποδιατακτικές συνθήκες και ανοσοαποτύπωση κατά Western. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν χρήζουν περαιτέρω ανάλυσης γι' αυτό και θα αποτελέσουν στόχο διπλωματικής εργασίας στο άμεσο μέλλον.

II.ABSTRACT

Human angiogenin (hAng) is a potent angiogenic factor, playing major roles in physiological and pathological states such as cell growth and survival, trauma healing, but also the growth and establishment of cancer tumors. hAng presents ribonucleolytic activity which is lower than that of RNase A, but essential for its angiogenic activity. The extracellular hAng activates many signal transduction pathways, and it is also implicated in the extracellular matrix degradation, promoting thus cell migration and invasion. Normally, hAng accumulates in the nucleus/nucleoli promoting mRNA transcription and rRNA transcription/procession. Under stress conditions it accumulates in the cytoplasm, where it mediates the generation of tiRNAs leading to the inhibition of translational initiation.

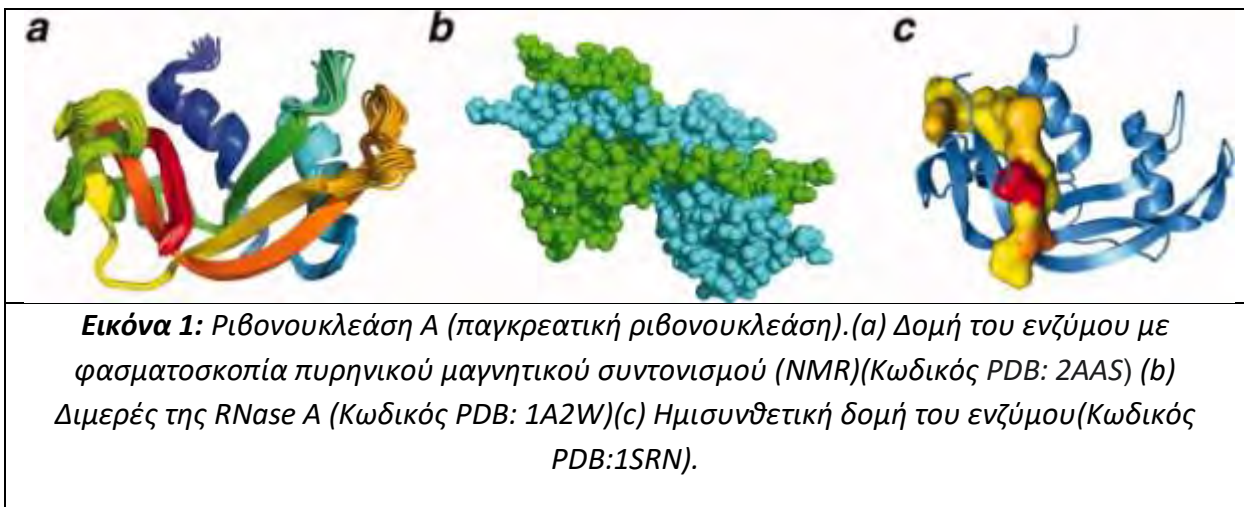
In the present Diploma Thesis, hAng was overexpressed in the human cell line HEK-293T, with the overarching goal to study its protein interactions. The endogenous levels of expression in this cell line were checked and it was ascertained that the gene is expressed in normal levels inside the cell. Furthermore, transfection methods for the overexpression of the hAng gene were investigated, including calcium chloride and the cationic polymer (PEI) methods. It was found that transfection with the cationic polymer yielded better results than the calcium chloride. The previous conclusion led to large scale transfection with cationic polymer PEI and it was confirmed with q PCR that the level of gene expression was augmented. Finally, SDS-PAGE and Western Blot was performed to evaluate the production of the protein in the cells. The results have to be analyzed even further, and for that reason, they will be overarching goal in another diploma thesis in near future.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. ΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΑΣΕΣ

Οι ριβονουκλεάσες (RNases) είναι ένζυμα τα οποία καταλύουν την υδρόλυση των μορίων RNA στα κύτταρα αποικοδομώντας τα και ελέγχοντας έτσι μετα-μεταγραφικά τον αριθμό τους μέσα στο κύτταρο. Η καλύτερα χαρακτηρισμένη ριβονουκλεάση είναι η Ριβονουκλεάση Α (RNase A) η οποία είναι μια ενδοριβονουκλεάση μοριακού βάρους 13,7 kDa που απομονώθηκε αρχικά από βόειο παγκρεατικό ιστό στον οποίο βρίσκεται σε υψηλή συγκέντρωση. Η RNase A είναι μέλος μιας οικογένειας ριβονουκλεασών με διαφορετικά χαρακτηριστικά και βιολογικές λειτουργίες γνωστές και ως RISBASES (Ribonucleases with Special Biological Actions)[1].



Τα μέλη της υπεροικογένειας της ριβονουκλεάσης Α (Εικόνα 1) παρουσιάζουν σημαντική ομολογία με την παγκρεατική ριβονουκλεάση Α και έχουν τα εξής κοινά χαρακτηριστικά: (α) οι γονιδιακές αλληλουχίες που κωδικοποιούν για τις ριβονουκλεάσες της οικογένειας βρίσκονται κατά κανόνα σε ένα μόνο εξόνιο στο χρωμόσωμα 14, (β) κάθε ώριμη πρωτεΐνη περιέχει έξι με οκτώ κατάλληλα τοποθετημένες κυστεΐνες που σχηματίζουν δισουλφιδικούς δεσμούς, (γ) στον καταλυτικό μηχανισμό συμμετέχουν δύο καταλυτικές ιστιδίνες (H) και μία λυσίνη (K) η οποία βρίσκεται εντός ενός συντηρημένου μοτίβου αλληλουχίας (CKXXNTE) και (δ) εμφανίζουν συγκεκριμένη εκλεκτικότητα στη νουκλεοτιδική αλληλουχία των υποστρωμάτων RNA ανεξάρτητα της θέσης υδρόλυσης του RNA[2].

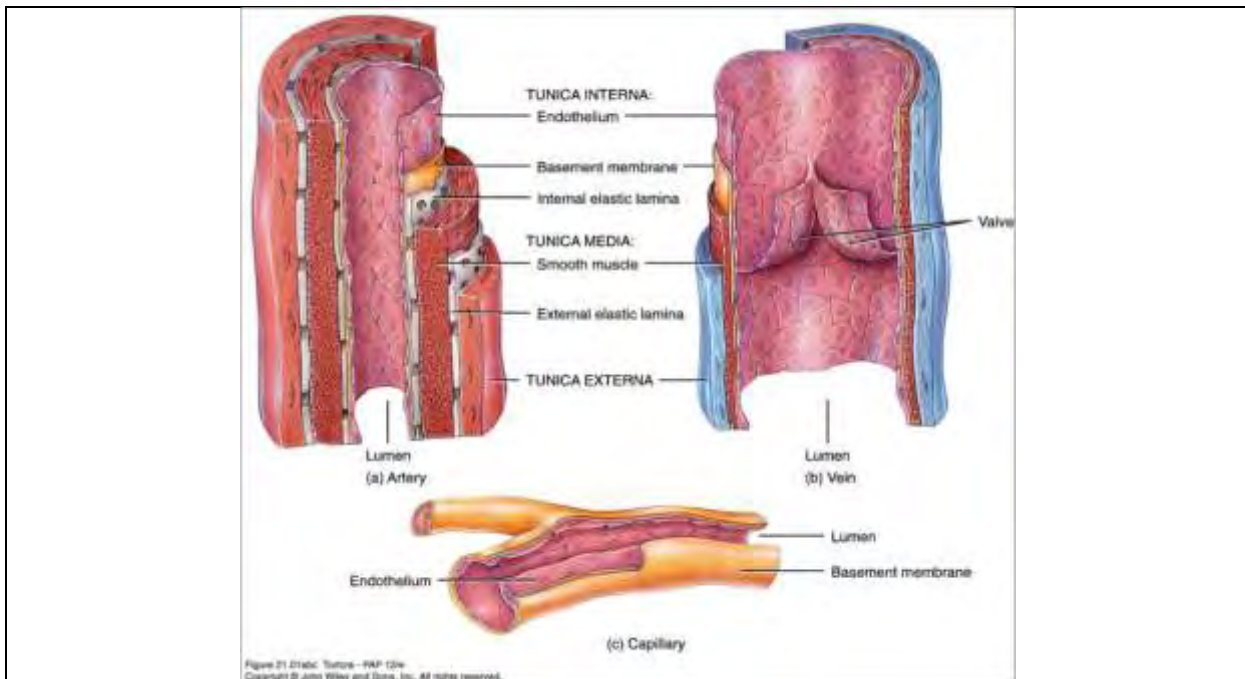
Στα μέλη αυτή της υπεροικογένειας συμπεριλαμβάνονται: η αγγειογενίνη (ριβονουκλεάση 5), ηωσινόφιλη κατιονική πρωτεΐνη (ECP, ριβονουκλεάση 3), η ηωσινόφιλη νευροτοξίνη (EDN, ριβονουκλεάση 2) και μερικές ακόμα κυτταροτοξίνες. Οι ριβονουκλεάσες εξαιτίας της δράσης τους να αποικοδομούν το RNA και να επάγουν τον κυτταρικό θάνατο, μπορούν να θεωρηθούν ως τοξίνες. Οι δράσεις των συγκεκριμένων ριβονουκλεασών ποικίλλουν και εκτείνονται από νευροτοξικότητα και αγγειογενετική ικανότητα έως αντικαρκινική δράση[3]. Οι βιολογικές αυτές δράσεις εξαρτώνται σχεδόν απόλυτα από τη ριβονουκλεολυτική τους ικανότητα και γι' αυτό το λόγο έχουν προσελκύσει μεγάλο βιοϊατρικό ενδιαφέρον.

Η αγγειογενίνη, η οποία μελετάται στην παρούσα εργασία, έχει χαρακτηριστεί ως ένας από τους πιο σημαντικούς παράγοντες ανάπτυξης όγκων[4]. Έχει την ιδιότητα να

επάγει την αγγειογένεση και έχει αποδειχθεί ότι εμπλέκεται στην αύξηση και τη μετάσταση του καρκίνου καθώς και σε πολλές ρευματοειδείς ασθένειες.

1.2. ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ

Ένας πολύπλοκος ευκαρυωτικός οργανισμός διαθέτει ένα σύστημα αγγείων το οποίο αποτελείται από φλέβες και αρτηρίες. Τα αγγεία αυτά συγκροτούν το δίκτυο μέσα από το οποίο μεταφέρεται πληθώρα συστατικών σε όλη την έκταση του οργανισμού. Τα αγγεία αποτελούνται από ένα παχύ στρώμα συνδετικού ιστού και από πολλές στρώσεις λείων μυϊκών κυττάρων. Το εσωτερικό των αγγείων, το οποίο ονομάζεται αυλός, επενδύεται από μια εξαιρετικά λεπτή, μονή στιβάδα ενδοθηλιακών κυττάρων, το ενδοθήλιο, το οποίο διαχωρίζεται από τα εξωτερικά περιβάλλοντα κύτταρα με τη βασική μεμβράνη. Το αγγειακό δίκτυο στις πιο λεπτές διακλαδώσεις του αποτελείται από λεπτά αγγεία, τα τριχοειδή. Τα συγκεκριμένα αγγεία αποτελούνται μόνο από ενδοθηλιακά κύτταρα και βασική μεμβράνη καθώς και από ορισμένα περικεντρικά κύτταρα. Στην *Εικόνα 2* παρουσιάζεται η βασική δομή των φλεβών, των αρτηριών και των τριχοειδών αγγείων.



Εικόνα 2: Δομή αγγείων: αρτηρίας (αριστερά), φλέβας (δεξιά) και τριχοειδούς αγγείου (κάτω).

Τα ενδοθηλιακά κύτταρα έχουν την ιδιότητα να προσαρμόζουν τον αριθμό τους και τη διεύθεσή τους ώστε να καλύπτουν τις εκάστοτε τοπικές ανάγκες για αγγεία. Αν δεν διέθεταν αυτή την ικανότητα να επεκτείνουν και να αναδιαμορφώνουν το δίκτυο των αιμοφόρων αγγείων, η ανάπτυξη και η επιδιόρθωση των διαφόρων ιστών θα ήταν αδύνατη, καθώς η παροχή αίματος είναι αυτή που εξασφαλίζει τη βιωσιμότητα τόσο των φυσιολογικών όσο και των καρκινικών ιστών. Το γεγονός αυτό έχει μεγάλο επιστημονικό ενδιαφέρον γι' αυτό και η μελέτη των παραγόντων που συμμετέχουν στην αγγειογένεση αποδεικνύεται εξαιρετικά σημαντική.

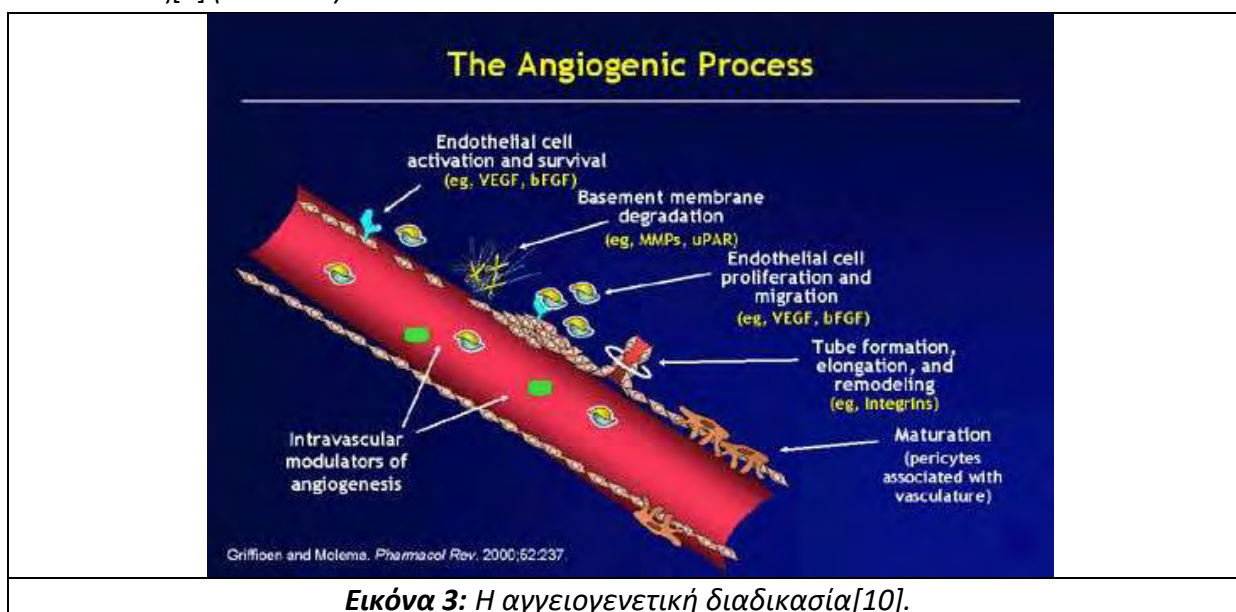
Η δημιουργία νέων αιμοφόρων αγγείων πραγματοποιείται με δύο τρόπους: τη νεοαγγειογένεση (σχηματισμός αγγείων *de novo*) και την αγγειογένεση. Η αγγειογένεση ορίζεται ως η βιολογική διαδικασία κατά την οποία σχηματίζονται νέα αγγεία από ένα σύνολο αγγείων που προϋπάρχει. Η αγγειογένεση είναι μια φυσιολογική διαδικασία που εμπλέκεται σε γεγονότα όπως η επούλωση τραυμάτων, η εμβρυϊκή ανάπτυξη και η

αναπαραγωγή. Εντούτοις, εμφανίζεται και σε παθολογικές καταστάσεις όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα, η διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια, η ψωρίαση, η αθηροσκλήρωση καθώς και η ανάπτυξη όγκων και η μετάστασή τους[5].

Ένα από τα κύρια χαρακτηριστικά των καρκινικών ιστών είναι η αυξημένη αιμάτωση και κατά συνέπεια αγγείωσή τους. Η αύξηση και η ανάπτυξή τους εξαρτάται από την τοπική αγγείωση, δηλαδή από τον αριθμό των τριχοειδών που βρίσκονται εκεί. Όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των τριχοειδών αγγείων, τόσο πλουσιότερη είναι και η αιμάτωση σε εκείνο το σημείο. Για τον σχηματισμό των νέων αγγείων είναι απαραίτητα επαγωγικά σήματα από προϋπάρχοντα αγγεία. Τα κύτταρα που αποκρίνονται στα σήματα αυτά είναι τα ενδοθηλιακά κύτταρα των τριχοειδών[6]. Η αγγειογένεση είναι απαραίτητη κατά τη διάρκεια της κακοήθους εξαλλαγής ενός ιστού. Μελέτες σε πειραματόζωα αλλά και σε ανθρώπινους ιστούς έδειξαν ότι η αγγειογένεση σχετίζεται άμεσα με την καρκινογένεση[7] και για το λόγο αυτό αποτελεί στόχο για την ανάπτυξη αντικαρκινικών φαρμάκων[8]. Όπως όλες οι διεργασίες μέσα σε ένα κύτταρο, έτσι και η αγγειογένεση διαθέτει μηχανισμούς που εξασφαλίζουν ότι η διακλάδωση και η ανάπτυξη των αγγείων προσαρμόζονται στις ανάγκες τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε παθολογικές καταστάσεις.

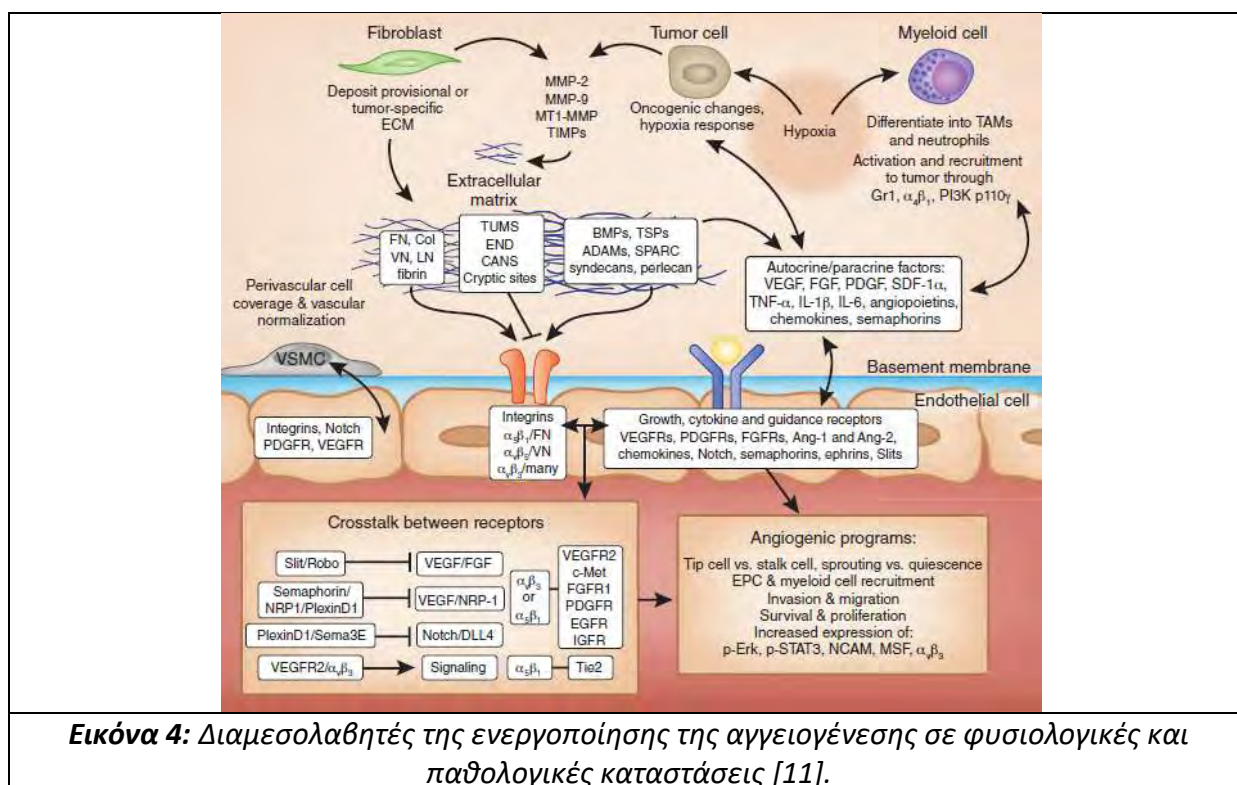
Η αγγειογένεση περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

- 1) Την εναρκτήρια φάση, κατά την οποία παρατηρείται η αγγειοδιαστολή και η αυξημένη «διαρροή» πρωτεϊνών,
- 2) την προοδευτική φάση, η οποία χαρακτηρίζεται από την αποικοδόμηση και αναδιαμόρφωση της βασικής μεμβράνης και του εξωκυττάριου ιστού από πρωτεάσες που εκκρίνονται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων, το σχηματισμό εκβλαστήσεων και τη μετανάστευσή τους, την αλληλεπίδρασή τους με νεοσυντιθέμενες ιντεγκρίνες ($\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$) και τέλος, τη ρύθμιση της έκφρασης των υποδοχέων αυξητικών παραγόντων,
- 3) τη φάση διαφοροποίησης, η οποία περιλαμβάνει αλλαγές στο σχήμα των ενδοθηλιακών κυττάρων για να επιτευχθεί ο σχηματισμός του αυλού και
- 4) τη φάση ωρίμανσης, που χαρακτηρίζεται από τη στρατολόγηση των περιαγγειακών και λείων μυϊκών κυττάρων και την εναπόθεση νέων πρωτεϊνών της εξωκυττάριας ουσίας[9] (Εικόνα 3).



Εικόνα 3: Η αγγειογενετική διαδικασία[10].

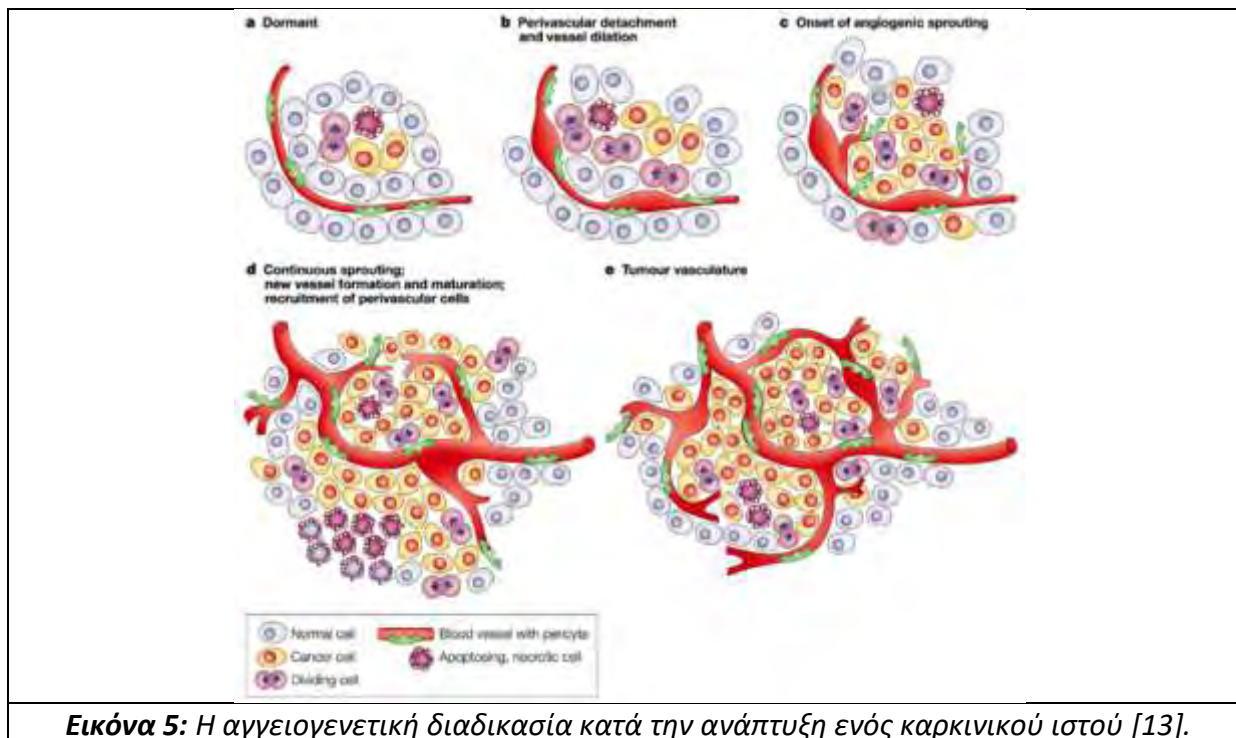
Για την πραγματοποίηση των παραπάνω διαδικασιών είναι απαραίτητη η συμμετοχή σηματοδοτικών πρωτεϊνών και των υποδοχέων τους (Εικόνα 4). Τέτοιες πρωτεΐνες είναι κυρίως οι αυξητικοί παράγοντες όπως η οικογένεια αυξητικών παραγόντων VEGF (vascular endothelial growth factor) που επιδρά με άμεσο τρόπο και των αυξητικών παραγόντων TNF (tumor necrosis factor) που επιδρά με έμμεσο τρόπο[11]. Ωστόσο, στην αγγειογένεση εμπλέκονται και σηματοδοτικές πρωτεΐνες που καταστέλλουν την διαδικασία όπως είναι η πρωτεΐνη p53. Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη καταστέλλει την παραγωγή του αυξητικού παράγοντα VEGF-A και επάγει την παραγωγή της θρομβοσπονδίνης-I (TSP-I), ενός αναστολέα της αγγειογένεσης που ρυθμίζει την προσκόλληση και την πρωτεολυτική δραστηριότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων[9]. Μεταλλάξεις της p53 οδηγούν σε επαγωγή της αγγειογένεσης το οποίο είναι ένα καθοριστικό σημείο για την προοδευτική ανάπτυξη ενός όγκου.



Εικόνα 4: Διαμεσολαβητές της ενεργοποίησης της αγγειογένεσης σε φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις [11].

1.3. ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ

Στον καρκίνο, ο «αγγειογενετικός διακόπτης», δηλαδή το σύνολο των γεγονότων που συμμετέχουν στη ρύθμιση της αγγειογενετικής δραστηριότητας, λειτουργεί μέσω αλλαγών της ισορροπίας μεταξύ αγγειογενετικών επαγωγέων και αναστολέων που είναι παρόντες στο σημείο του όγκου[12]. Συνεπώς, είναι εξαιρετικά σημαντικό να διατηρείται η ισορροπία μεταξύ επαγωγικών και ανασταλτικών σημάτων και να υπάρχει σωστή λειτουργία των ρυθμιστικών μηχανισμών για αποτροπή εμφάνισης καρκινικών όγκων. Στις περιπτώσεις όμως που η ισορροπία αυτή διαταράσσεται, ενεργοποιείται ο αγγειογενετικός διακόπτης και επάγεται η αγγειογένεση.



Βασικό ρόλο στη διατάραξη αυτής της ισορροπίας διακατέχει το μικροπεριβάλλον [11]. Το καρκινικό μικροπεριβάλλον αποτελείται από μία ποικιλία κυτταρικών τύπων που επηρεάζουν την αγγειογενετική απόκριση σε έναν όγκο. Μόλις ο όγκος αναπτυχθεί σε μέγεθος λίγων χιλιοστών, η υποξία και η έλλειψη θρεπτικών συστατικών διεγείρει τον «αγγειογενετικό διακόπτη» επιτρέποντας στον όγκο να αναπτυχθεί περαιτέρω, με τα ενδοθηλιακά κύτταρα να πρωτοστατούν σε όλη τη διαδικασία [14]. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα απομακρύνονται από τις συνδετικές τους συνάψεις με τα γειτονικά τους κύτταρα, διασπείρουν σηματοδοτικούς αγγειογενετικούς παράγοντες σε κύτταρα προϋπαρχόντων αγγείων, πολλαπλασιάζονται για να δημιουργήσουν προσωρινούς σωληνίσκους, προσελκύουν περιαγγειακά κύτταρα, τα οποία παρέχουν σταθερότητα και ωριμότητα και, τέλος, αναδιαμορφώνουν τα αγγεία έτσι ώστε να σχηματιστεί ένα λειτουργικό αγγειακό δίκτυο [15].

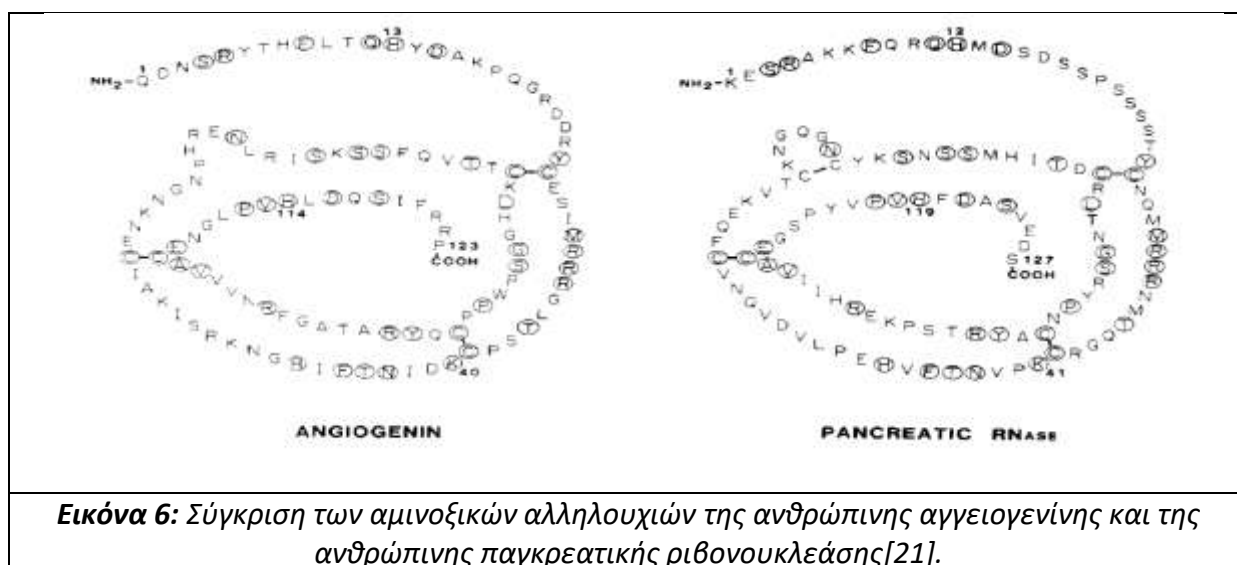
Η αγγειογενετική διαδικασία απαιτεί τη συμμετοχή πολλαπλών κυτταρικών τύπων και μπορεί να ρυθμιστεί από διάφορους ανεξάρτητους και αλληλοεξαρτώμενους παράγοντες. Τα καρκινικά κύτταρα απελευθερώνουν χημειοκίνες, κυτοκίνες και αυξητικούς παράγοντες για να ενεργοποιήσουν φυσιολογικά αδρανή κύτταρα γύρω από αυτά και να ξεκινήσει ένας καταρράκτης γεγονότων που γρήγορα θα οδηγήσει το κύτταρο σε απορρύθμιση [11]. Τα σήματα αυτά, στρατολογούν επίσης, ινοβλάστες που διαθέτουν μια ποικιλία από πρωτεΐνες ECM (extracellular matrix proteins) και ένζυμα σε μία προσπάθεια να αναδιαμορφώσουν το αγγειακό δίκτυο στο σημείο όπου συμβαίνει αγγειογένεση [16-18]. Ειδικότερα, οι παράγοντες της οικογένειας VEGF διεγείρουν τον ραγδαίο πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων [11] ενώ οι παράγοντες PDGF (platelet-derived growth factor) που εκκρίνονται από τα αιμοπετάλια στρατολογούν τα περιαγγειακά κύτταρα [19]. Παρόλο που η επαγωγή της αγγειογένεσης μπορεί αρχικά να παρέχει στον όγκο αρκετό οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά, η καθολική απόκριση είναι ανεπαρκής [15]. Αυτό συμβαίνει διότι ο όγκος αναδιαμορφώνεται συνεχώς και άτακτα, προκαλώντας έτσι μία ακανόνιστη ροή αίματος που φαίνεται να μην μπορεί να «ακολουθήσει» την ταχύτητα πολλαπλασιασμού

των κυττάρων του όγκου σε μετέπειτα στάδιο. Ωστόσο, η αγγειογένεση είναι κύριο χαρακτηριστικό των καρκινικών όγκων, ειδικά στην αρχή της δημιουργίας και της ανάπτυξής τους, γι' αυτό και η μελέτη της κρίνεται απαραίτητη και καθοριστική για την κατανόηση των μηχανισμών της καρκινογένεσης καθώς και για την ανάπτυξη νέων φαρμακευτικών στόχων.

1.4. ΑΝΘΡΩΠΙΝΗ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΙΝΗ (hAng)

1.4.1. ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ hAng

Η ανθρώπινη αγγειογενίνη (hAng) ή αλλιώς ριβονουκλεάση 5, RNase 5, είναι μία βασική μονομερής πρωτεΐνη, μοριακού βάρους 14,4 kDa η οποία αποτελείται από 123 αμινοξέα[20]. Απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1985 με τη δοκιμασία αγγειογένεσης στη χοριοαλλαντοϊκή μεμβράνη εμβρύου όρνιθας (CAM assay) από το υπερκείμενο της κυτταρικής σειράς HT-29 η οποία αποτελείται από κύτταρα ανθρώπινου αδενοκαρκινώματος του παχέος εντέρου[2]. Διαθέτει 3 δισουλφιδικούς δεσμούς μεταξύ των καταλοίπων κυστεΐνης 26-81, 39-92 και 57-107[3]. Το καταλυτικό της κέντρο αποτελείται από υπόκεντρα σύνδεσης φωσφορικών ιόντων, αζωτούχων βάσεων και ριβοζών. Η αλληλουχία της παρουσιάζει ομοιότητα σε ποσοστό 35% με την παγκρεατική ριβονουκλεάση ή αλλιώς ριβονουκλεάση A και πολλά από τα κατάλοιπα είναι συντηρημένα[3] (Εικόνα 6). Το αμινοτελικό κατάλοιπο της ώριμης αγγειογενίνης είναι το πυρο-γλουταμικό οξύ[21] και το καρβοξυ-τελικό της κατάλοιπο είναι μία προλίνη[22].



Παρόλο που τα δύο ένζυμα διαθέτουν μεγάλο ποσοστό ομοιότητας, η ριβονουκλεολυτική δραστηριότητα της αγγειογενίνης είναι αρκετές τάξεις (10^5 - 10^6) μεγέθους μικρότερη[23, 24] από αυτή της ριβονουκλεάσης A[25]. Τα ένζυμα αυτά διαθέτουν δύο βασικές δομικές διαφορές οι οποίες εξηγούν γιατί η αγγειογενίνη αποτελεί, σε αντίθεση με τη ριβονουκλεάση A, έναν ισχυρό αγγειογενετικό παράγοντα [26]. Συγκεκριμένα:

➤ Πρόσδεση σε υποδοχέα και αποικοδόμηση βασικής μεμβράνης.

Η hAng έχει τη δυνατότητα πρόσδεσης σε έναν υποδοχέα με τη συμμετοχή των καταλοίπων 59-68 και Asn109 μέσω του οποίου μπορεί να προσδεθεί στα κύτταρα στόχους.

Αυτό διαφέρει στη ριβονουκλεάση A, η οποία διαθέτει διαφορετική διαμόρφωση και αυτή η θέση πρόσδεσης αποτελεί μέρος της θέσης πρόσδεσης των πουρινών του υποστρώματος RNA [27-29]. Αξίζει να σημειωθεί ότι, σε περίπτωση που η θέση πρόσδεσης της αγγειογενίνης υποστεί κάποια μετάλλαξη, η αγγειογενετική της δυνατότητα χάνεται αλλά η ενζυμική δραστηριότητα παραμένει αμετάβλητη.

Μελέτες για να ταυτοποιηθεί ο υποδοχέας της hAng, αποκάλυψαν μία πρωτεΐνη της κυτταρικής επιφάνειας μοριακού βάρους περίπου 40kDa, η οποία φαινόταν να είναι ο υποδοχέας στον οποίο προσδενόταν η αγγειογενίνη [30]. Αργότερα, δείχθηκε ότι το μόριο αυτό ήταν η α -ακτίνη των λείων μυϊκών κυττάρων [31]. Η πρόσδεση της αγγειογενίνης στην ακτίνη- α (hAng- α -actin complexes) εμπλέκεται στην αποικοδόμηση της βασικής μεμβράνης. Κατά τη σύνδεση της αγγειογενίνης στην α -ακτίνη, μερικά σύμπλοκα hAng- α -actin αποκόπτονται από τη μεμβράνη οδηγώντας έτσι στη σταδιακή αποικοδόμησή της [32]. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα η εξωκυττάρια μήτρα να υφίσταται διατρήσεις και να ανοίγει ο δρόμος στα ενδοθηλιακά κύτταρα να εισέλθουν και να μεταναστεύσουν μέσα στον περιαγγειακό ιστό, το οποίο είναι ένα καθοριστικό γεγονός για την αγγειογένεση.

Ωστόσο, όπως είναι γνωστό, το γονίδιο της α -ακτίνης είναι ένα ιδιόσυστατα εκφραζόμενο γονίδιο, συνεπώς δε μπορεί να χαρακτηριστεί ως ένα εξειδικευμένο μόριο πρόσδεσης για την αγγειογενίνη. Αργότερα, ταυτοποιήθηκε ένα μόριο μοριακού βάρους 170kDa το οποίο βρίσκεται στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων και εκφράζεται μόνο σε απόκριση στην αγγειογενίνη σε κύτταρα που είχαν καλλιεργηθεί αρκετά αραιά ($<2 \times 10^4$ cells/cm²)[33]. Το μόριο αυτό φαίνεται ότι συνεκφράζεται με την α -ακτίνη[34]. Συγκεκριμένα, όταν η αγγειογενίνη συνδέεται με την α -ακτίνη στην κυτταρική επιφάνεια επέρχεται η ενεργοποίηση ενός συστήματος πρωτεόλυσης το οποίο αποικοδομεί τη βασική μεμβράνη και επάγει την είσοδο των ενδοθηλιακών κυττάρων στον περιαγγειακό ιστό[35]. Μετά από αυτό το γεγονός, ενεργοποιείται η έκφραση του εν λόγω μορίου (πιθανού υποδοχέα της αγγειογενίνης) εξαιτίας της μείωσης της πυκνότητας των κυττάρων στο σημείο διάτρησης της βασικής μεμβράνης, με αποτέλεσμα τα παρακείμενα κύτταρα να «ειδοποιούνται» και να επάγουν την έκφραση αυτού του πιθανού υποδοχέα. Αυτό θα βοηθήσει ώστε τα κενά που έχουν δημιουργηθεί λόγω της μειωμένης πυκνότητας να συμπληρωθούν από κύτταρα που θα διαιρεθούν ύστερα από την απόκριση στην αγγειογενίνη. Το γεγονός αυτό αποτελεί ρυθμιστή της επαγόμενης από την hAng δημιουργίας νέων δικτύων τριχοειδών αγγείων. Συνεπώς, όταν μειώνεται η πυκνότητα των κυττάρων αυξάνεται η έκφραση του πιθανού υποδοχέα, ενώ όταν αυξάνεται η πυκνότητα η έκφραση του υποδοχέα αναστέλλεται[34].

📌 Σήμα πυρηνικού εντοπισμού.

Για την πραγματοποίηση της αγγειογένεσης που επάγεται από την hAng είναι απαραίτητο η αγγειογενίνη να εισέλθει στον πυρήνα. Αυτό γίνεται μέσω ενός σήματος πυρηνικού εντοπισμού (NLS, Nuclear Localisation Signal). Η hAng διαθέτει μία αλληλουχία πυρηνικού εντοπισμού (NLS) που αποτελείται από τα αμινοξέα 30MRRRGL35 με το κατάλοιπο R33 να είναι το πλέον σημαντικό στη λειτουργία αυτή [36]. Σε αντίθεση με την RNase A από την οποία απουσιάζει το σήμα NLS, η hAng υφίσταται πυρηνική μετατόπιση σε ενδοθηλιακά κύτταρα, σε λεία μυϊκά κύτταρα, σε καρκινικά κύτταρα και σε κινητικούς νευρώνες[26]. Η αναστολή της πυρηνικής μετατόπισης της hAng[37], ή η μεταλλαξιγένεση

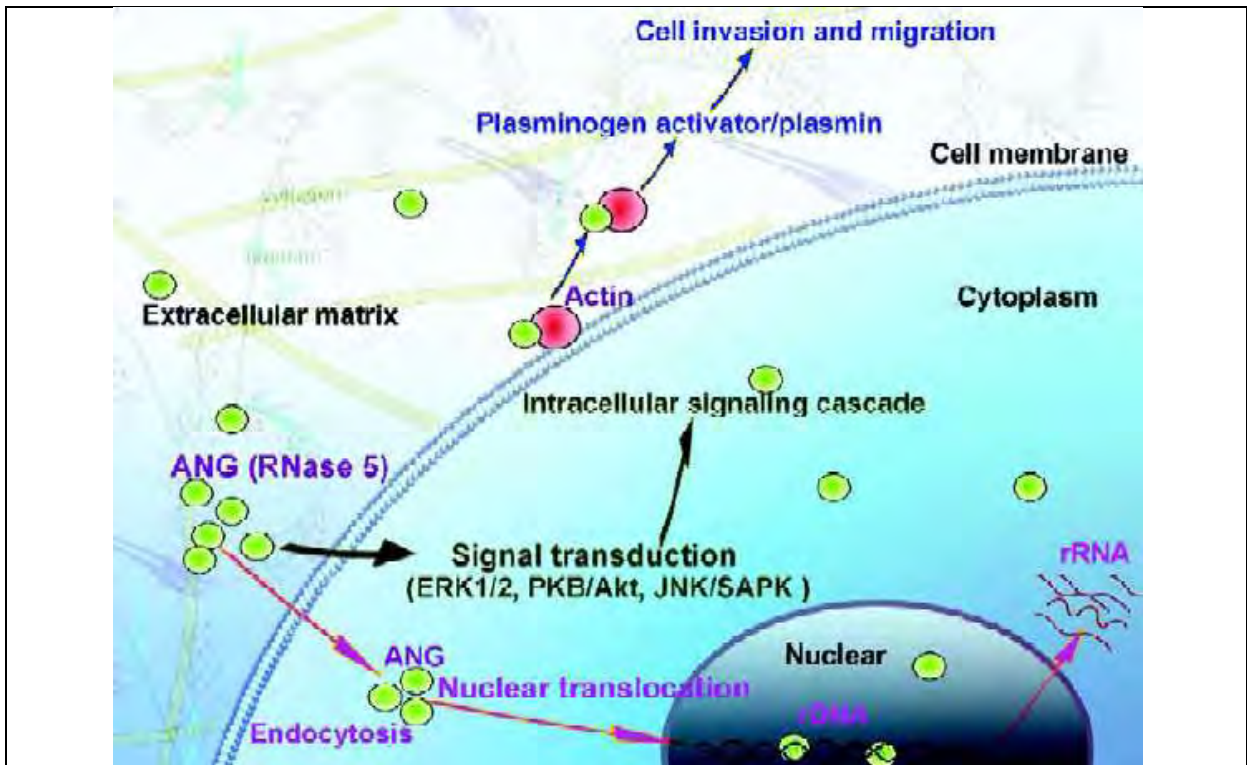
της αλληλουχίας πυρηνικού εντοπισμού [38] έχουν ως αποτέλεσμα την εξάλειψη της αγγειογενετικής δραστηριότητας. Η πυρηνική μετατόπιση της αγγειογενίνης στα ενδοθηλιακά κύτταρα είναι γρήγορη αλλά εξαρτάται αυστηρά από την κυτταρική πυκνότητα[39]. Να σημειώσουμε, ότι η είσοδος της αγγειογενίνης στο κύτταρο είναι ανεξάρτητη από λυσοσώματα και μικροσωληνίσκους [40], καθώς επίσης και από ιμπορτίνες [41]. Αυτό που φαίνεται να εμπλέκεται είναι ο πιθανός υποδοχέας που αναφέρθηκε παραπάνω.

Για την είσοδο της hAng στον πυρήνα αλλά όχι και για την εσωτερίκευσή της, έχει βρεθεί πως απαιτείται η ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης C (PLC), καθώς αναστολή της PLC οδηγεί σε συσσώρευση της πρωτεΐνης στο κυτταρόπλασμα και μείωση των επιπέδων της στον πυρήνα. Αυτό υποδεικνύει πως η είσοδος της hAng από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα ρυθμίζεται από την ίδια, καθώς η hAng ενεργοποιεί την PLC μέσω πρόσδεσής της στους υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας[42]. Δεδομένου του μικρού μοριακού βάρους της αγγειογενίνης, το οποίο είναι μικρότερο από το μέγεθος των πυρηνικών πόρων (<50kDa), ο πιο πιθανός τρόπος εισόδου της στον πυρήνα είναι η παθητική διάχυση διαμέσου των πυρηνικών πόρων[41].

Μελέτες έχουν δείξει πως η δράση της αγγειογενίνης στον πυρήνα έχει ως στόχο την ενίσχυση της μεταγραφής του ριβοσωμικού RNA (rRNA) [43]. Η αγγειογενίνη εισέρχεται στον πυρηνίσκο όπου συσσωρεύεται και προσδένεται στον υποκινητή του γονιδίου του ριβοσωμικού RNA και επάγει τη μεταγραφή του [38]. Η εξάρτωμενη από την αγγειογενίνη μεταγραφή του εν λόγω γονιδίου επιβεβαιώθηκε με τη δοκιμασία της λουσιφεράσης [44]. Συγκεκριμένα, έχει ταυτοποιηθεί ένα στοιχείο ABE (ANG-binding element) στο οποίο πρόσδεεται η αγγειογενίνη, που αποτελείται από επαναλήψεις 5'-CTCT-3' και βρίσκεται στη μη μεταγραφόμενη περιοχή του ριβοσωμικού DNA [44].

Επιπλέον, έχει ταυτοποιηθεί ένας παράγοντας πρόσδεσης στον υποδοχέα του αυξητικού παράγοντα των ινοβλαστών (FGF), ο παράγοντας FRL2, ο οποίος δεν παρουσιάζει καμία ομολογία με τα μέλη της οικογένειας του FGF αλλά σχετίζεται ξεκάθαρα με την υπεροικογένεια αγγειογενίνης/ ριβονουκλεασών (ομολογία 21-26%). Αυτό υποδηλώνει πως είναι πιθανό η αγγειογενίνη να προσδένεται και να ενεργοποιεί ένα μέλος της οικογένειας των υποδοχέων FGF στα ενδοθηλιακά κύτταρα [45]. Συνοψίζοντας, η μεταγραφή των ριβοσωμικών RNA που επάγεται από την αγγειογενίνη στα ενδοθηλιακά κύτταρα, φαίνεται να κατέχει σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της αγγειογένεσης, η οποία επάγεται και από άλλους αγγειογενετικούς παράγοντες.

Τα παραπάνω στοιχεία παρουσιάζονται συνοπτικά στην *Εικόνα 7*.



Εικόνα 7: Μηχανισμοί δράσης της αγγειογενίνης κατά τη διαδικασία της αγγειογένεσης[34].

Το γονίδιο που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη βρίσκεται στο χρωμόσωμα 14 στη θέση q11 και υπάρχει ένα αντίγραφο για κάθε απλοειδές γονιδίωμα [21]. Ύστερα από αλληλούχηση, βρέθηκε πως το γονίδιο της αγγειογενίνης δεν περιέχει ιντρόνια και διαθέτει:

- ☐ 12 G στο άκρο 5'
- ☐ μικρή μη κωδικοποιούσα αλληλουχία
- ☐ πεπτίδιο-σινιάλο 24 (ή 22) αμινοξέων
- ☐ 369 νουκλεοτίδια που κωδικοποιούν για την ώριμη πρωτεΐνη 123 αμινοξέων
- ☐ αλληλουχία τερματισμού
- ☐ 175 νουκλεοτίδια στην αμετάφραστη περιοχή 3'
- ☐ πολύ(A) ουρά με 36 νουκλεοτίδια και τέλος,
- ☐ 23 C στο άκρο 3' [21].

```

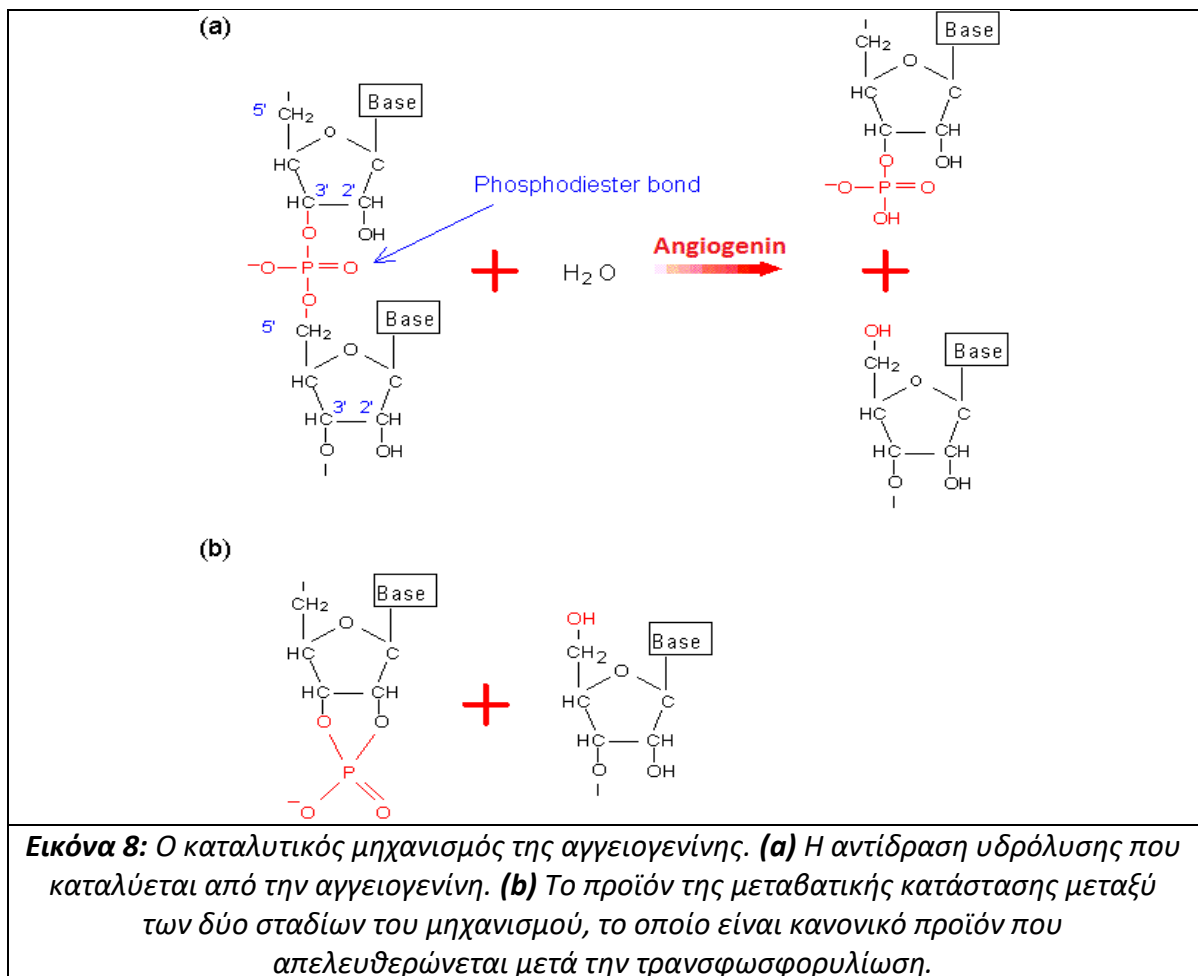
-200  AGTGAGAGTG  GATTTTGTAA  TGTTACGACT  GATACAGAAA  TACTCAGTGA  TTCTAAGGGA  TGGGAAGAA  CGGTTGGAGC  TAGAGGTTGT  GCTCAGGAAA
-100  CTATTAATA  GACGTTCGCG  AGGAAGGGAT  TGACGAAGTC  TGAGCTTAAT  GACGAAGGCA  AAATAGAATA  TAAATTTGG  TGCTGGAAAA  GATCTGATTC
  1  ATGATGCCCT  GTCAGAGAGC  AAAGCTCCTG  TCCTTTTGGC  CTAATTTGGT  GAIGCTGTTC  TTGGGTCTAC  CACACCTCCT  TTTGCCCTCC  GCAGGAGCCT
      -24      -20      -10      -1
      Met Val Met Gly Leu Gly Val Leu Leu Leu Val Phe Val Leu Gly Leu Thr Pro Pro Thr Leu Ala
101  GTGTTGGAAG  AG  ATG  GTG  ATG  GGC  CTG  GGC  GTT  TTG  TTG  GTC  TTC  GTG  CTG  GGT  CTG  GGT  CTG  ACC  CCA  CCG  ACC  CTG  GCT
      +1
      10      20
185  Gln Asp Asn Ser Arg Tyr Thr His Phe Leu Thr Gln His Tyr Asp Ala Lys Pro Gln Gly Arg Asp Asp Arg Tyr Cys Glu
      CAG  GAT  AAC  TCC  AGG  TAC  ACA  CAC  TTC  CTG  ACC  CAG  CAC  TAT  GAT  GCC  AAA  CCA  CAG  GGC  CGG  GAT  GAC  AGA  TAC  TGT  GAA
      30      40      50
266  Ser Ile Met Arg Arg Arg Gly Leu Thr Ser Pro Cys Lys Asp Ile Asn Thr Phe Ile His Gly Asn Lys Arg Ser Ile Lys
      AXC  ATC  ATG  AGG  AGA  CGG  GGC  CTG  ACC  TCA  CCC  TGC  AAA  GAC  ATC  AAC  ACA  TTT  ATT  CAT  GGC  AAC  AAG  CGC  AGC  ATC  AAG
      60      70      80
347  Ala Ile Cys Glu Asn Lys Asn Gly Asn Pro His Arg Glu Asn Leu Arg Ile Ser Lys Ser Ser Phe Gln Val Thr Thr Cys
      GCC  ATC  TGT  GAA  AAC  AAT  GGA  AAC  CCT  CAC  AGA  GAA  AAC  CTA  AGA  ATA  ACC  AAG  TCT  TCT  TTC  CAG  GTC  ACC  ACT  TGC
      90      100
428  Lys Leu His Gly Gly Ser Pro Trp Pro Pro Cys Gln Tyr Arg Ala Thr Ala Gly Phe Arg Asn Val Val Val Ala Cys Glu
      AAG  CTA  CAT  GGA  GGT  TCC  CCC  TGG  CCT  CCA  TGC  CAG  TAC  CGA  GCC  ACA  GCG  GGG  TTC  AGA  AAC  GTT  GTT  GTT  GCT  TGT  GAA
      110      120      123
509  Asn Gly Leu Pro Val His Leu Asp Gln Ser Ile Phe Arg Arg Pro STOP
      AAT  GGC  TTA  CCT  CTC  CAC  TGC  GAT  CAG  TCA  ATT  TTC  CGT  CGT  CCG  TAA  CCAGCGGGCC  CCTGGTCAAG  TGCTGGCTCT  GCTGCTCCTG
  
```

Εικόνα 7: Η αλληλουχία του γονιδίου της αγγειογενίνης. Στην εικόνα είναι επισημασμένα το TATA box στο νουκλεοτίδιο -32 και η θέση έναρξης της μεταγραφής στο νουκλεοτίδιο +1 [21].

1.4.2. Ο ΚΑΤΑΛΥΤΙΚΟΣ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΤΗΣ hAng.

Η ενζυμική δραστηριότητα της αγγειογενίνης είναι αρκετές τάξεις μεγέθους μικρότερη από αυτή της παγκρεατικής ριβονουκλεάσης Α. Ωστόσο, αυτή η ενζυμική δραστηριότητα που διαθέτει φαίνεται να είναι καθοριστική για την σωστή λειτουργία της και για το ρόλο της στις διεργασίες στις οποίες συμμετέχει [25]. Στον καταλυτικό μηχανισμό του ενζύμου πρωταρχικό ρόλο διακατέχουν 3 αμινοξικά κατάλοιπα, His13, Lys40 και His114, τα οποία είναι συντηρημένα από το ψάρι μέχρι τον άνθρωπο [46].

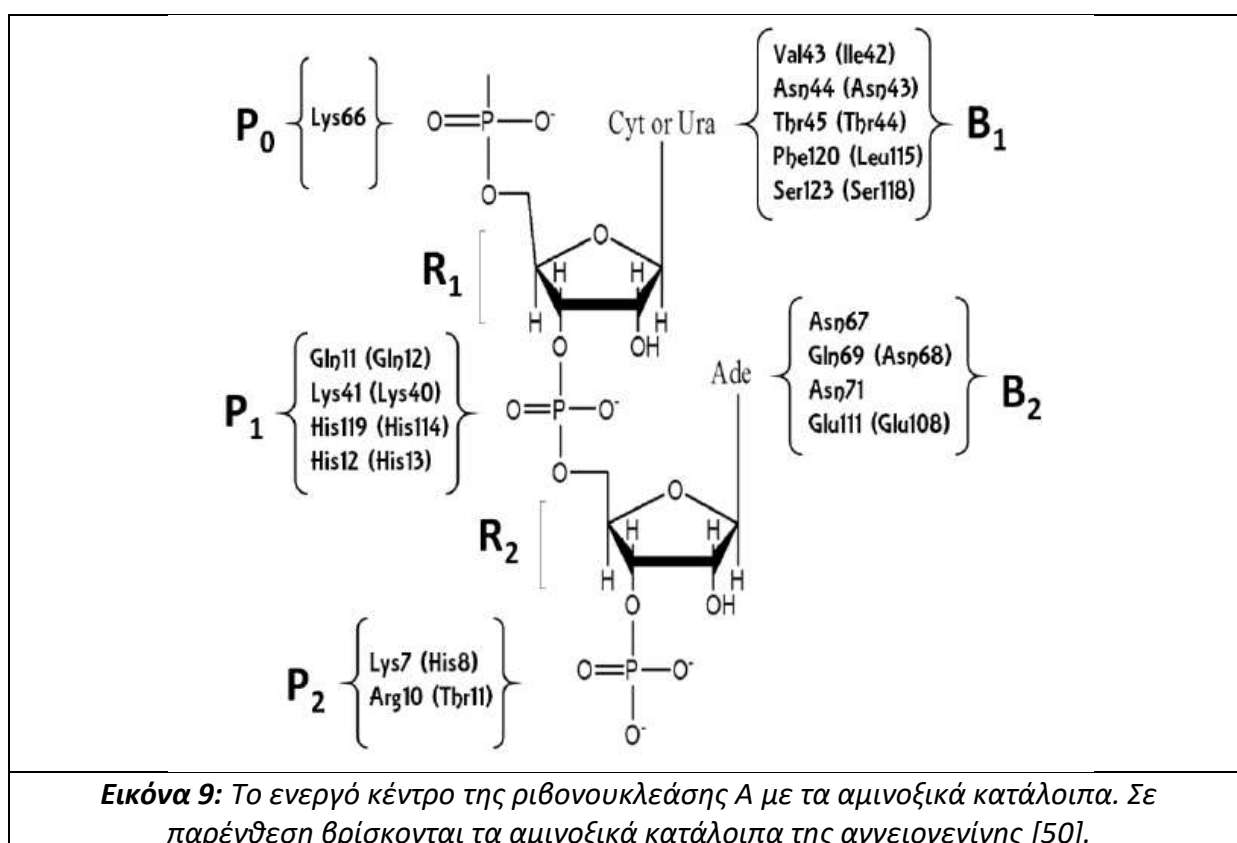
Ως ριβονουκλεάση, η hAng καταλύει την ενδονουκλεολυτική διάσπαση μορίων RNA και ολιγοριβονουκλεοτιδίων στην 3' θέση των πυριμιδινών (κυτοσίνης, ουρακίλης), και πιο συχνά όταν το επόμενο νουκλεοτίδιο φέρει ως βάση την αδενίνη [47]. Ο μηχανισμός της κατάλυσης πραγματοποιείται σε δύο στάδια και απεικονίζεται παρακάτω στην *Εικόνα 8*. Συγκεκριμένα, στο πρώτο στάδιο, γίνεται η τρανσφωσφορυλίωση του 3',5'-φωσφοδιεστερικού δεσμού από την 5' θέση του ενός νουκλεοτιδίου στην 2' θέση του γειτονικού. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη διάσπαση του δεσμού του υποστρώματος, το σχηματισμό ενός 2',3'-κυκλικού-φωσφοδιεστέρα με ελεύθερο το 3'-φωσφορικό άκρο και την απελευθέρωση μιας 5'-OH ομάδας. Στο δεύτερο στάδιο, γίνεται η υδρόλυση του 2',3'-κυκλικού-φωσφοδιεστέρα αποδίδοντας μια 3'-μονοφωσφορική ομάδα. Η αντίδραση του πρώτου σταδίου είναι ταχύτερη και αντιστρεπτή σε σύγκριση με αυτή του δεύτερου σταδίου που είναι πρακτικά μη αντιστρεπτή [48, 49].



Το ριβονουκλεολυτικό κέντρο της hAng διαθέτει συγκεκριμένες θέσεις οι οποίες διατρέχουν σημαντικό ρόλο στην κατάλυση της αντίδρασης. Αυτές είναι:

- ♥ η περιοχή διάσπασης του φωσφοδιεστερικού δεσμού (περιοχή P1) η οποία αποτελείται από τα κατάλοιπα His13, Lys40, His114 και Gln12
- ♥ η περιοχή πρόσδεσης του δακτυλίου πυριμιδίνης (περιοχή B1) του νουκλεοτιδίου που φέρει το 3'-O κατά τη διάσπαση, με τα κατάλοιπα Thr44, Ile42, Asn43, Leu115 και Ser118 και
- ♥ η περιοχή αλληλεπίδρασης με τη βάση του νουκλεοτιδίου (περιοχή B2) που φέρει το 5'-O κατά τη διάσπαση, με τα κατάλοιπα Asn68 και Glu108 [50].

Τα κατάλοιπα που υπάρχουν στις παραπάνω περιοχές και είναι καθοριστικά για την πραγματοποίηση της αντίδρασης είναι αρκετά συντηρημένα και στη ριβονουκλεάση A. Στην *Εικόνα 9*, φαίνονται τόσο τα κατάλοιπα του ενεργού κέντρου της ριβονουκλεάσης A όσο και της αγγειογενίνης εντός των παρενθέσεων.



Έχει διαπιστωθεί από αρκετές μελέτες, πως η ριβονουκλεάση A και η αγγειογενίνη, παρουσιάζουν διαφορές σε ό,τι αφορά τα υποστρώματά τους. Συγκεκριμένα, η αγγειογενίνη παρουσιάζει ασθενή ενδονουκλεολυτική διάσπαση των μορίων 28S και 18S rRNA, παράγοντας προϊόντα πολύ μεγαλύτερα (μήκους 100-500 νουκλεοτιδίων) από αυτά που προκύπτουν από την RNase A [25], καθώς και την υδρόλυση φωσφορικών δινουκλεοσιδίων και μορίων tRNA, σε μία περισσότερο ποσοτική ενζυμική διαδικασία, με τη δραστηριότητα της αγγειογενίνης να είναι εξαιρετικά χαμηλή σε σχέση με αυτή της RNase A [51]. Επιπλέον, διαφορά υπάρχει και στη σταθερά K_m η οποία ισούται με 62 mM στην αγγειογενίνη σε τιμή pH 5.9, ενώ στην RNase A με 0.5 mM [52]. Οι τιμές της σταθεράς pK_a των καταλοίπων ιστιδίνης του καταλυτικού κέντρου της hAng παρουσιάζουν διαφορά δύο μονάδων pH, με την $pK_1 = 5.0$ και την $pK_2 = 7.0$. Οι σταθερές διάστασης οξέων που υπολογίστηκαν κατά τον ίδιο τρόπο και για την RNase A διαφέρουν μεταξύ τους κατά 0.4 μονάδες pH, με την $pK_1 = 6.0$ και την $pK_2 = 6.4$ [53]. Ακόμη, η ριβονουκλεολυτική

δραστηριότητα της hAng εξαρτάται σημαντικά από τη συγκέντρωση ιόντων νατρίου [Na⁺], κάτι το οποίο έρχεται σε συμφωνία με τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις που είναι απαραίτητες για την πρόσδεση μεταξύ των κατιονικών περιοχών της hAng και του ανιονικού υποστρώματος, [53]. Επιπλέον, η καταλυτική δράση της hAng εξαρτάται ισχυρά από το μήκος του υποστρώματος, υποστηρίζοντας τη σημασία των περιφερειακών περιοχών της hAng στην κατάλυση. Έτσι, όσο περισσότερη ενέργεια καταναλώνεται για την πρόσδεση μεγαλύτερων υποστρωμάτων τόσο μεγαλύτερη η καταλυτική δραστηριότητα [53]. Τέλος, το φυσιολογικό υπόστρωμα της hAng παραμένει άγνωστο και είναι πιθανό, πως η διαμόρφωση των καταλυτικών καταλοίπων (His13, Lys40 και His114) δεν είναι η κατάλληλη για τη διάσπαση των υποστρωμάτων που χρησιμοποιούνται συνήθως κατά τη μέτρηση της ριβονουκλεολυτικής δραστηριότητας.

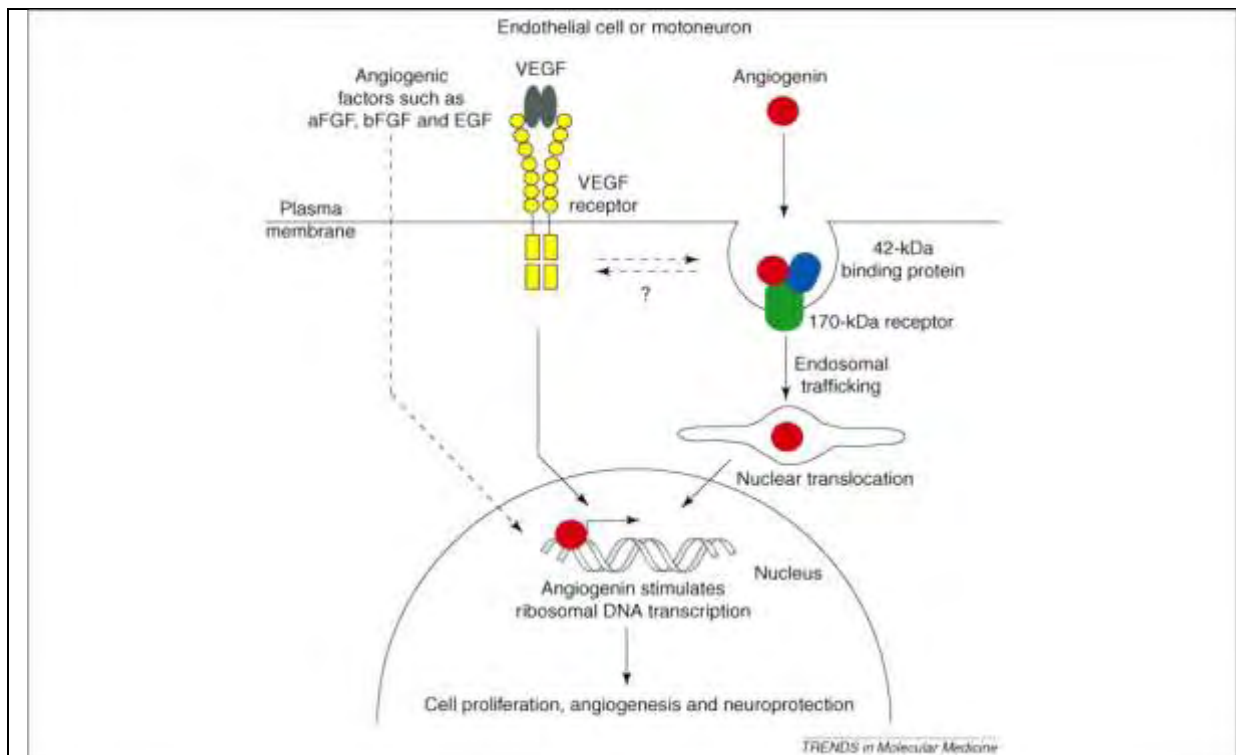
1.4.3. ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΙΝΗ ΚΑΙ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ

Φυσιολογικά, η έκφραση του γονιδίου της αγγειογενίνης επάγεται σε περιπτώσεις φλεγμονής, προάγοντας την επούλωση τραυμάτων, παρουσιάζοντας μικροβιοκτόνο δράση έναντι παθογόνων βακτηρίων και μυκήτων και προσδίδοντας ανοσία στον ξενιστή [54].

Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του ανθρώπου, ανιχνεύεται σε όργανα όπως η καρδιά, ο σπλήνας, ο πνεύμονας, το ήπαρ, ο προστάτης, ο μαστός, ο εγκέφαλος, το παχύ έντερο, ο αμφιβληστροειδής χιτώνας και άλλα[55]. Παράγεται σε σημαντικά επίπεδα στο νωτιαίο μυελό τόσο κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη όσο και κατά την ενηλικίωση [56]. Παρ' όλα αυτά, η αγγειογένεση δεν λαμβάνει χώρα διαρκώς σε όλους του ιστούς και όλα τα στάδια [55].

Σύμφωνα με πολλές μελέτες, η αγγειογενίνη συμμετέχει στην ανάπτυξη του καρκίνου διεγείροντας τόσο την αγγειογένεση όσο και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Συγκεκριμένα, έχει καταγραφεί αύξηση των επιπέδων της σε πολλούς τύπους καρκίνου συμπεριλαμβανομένου του προστάτη [57], του μαστού[58], του παχέος εντέρου[59], του ενδομητρίου[60], των ωοθηκών[61], των νεφρών[62], του παγκρέατος, του ουροθελίου[63], του τραχήλου της μήτρας[23], του γαστρικού[24] καθώς και στη λευχαιμία[64], στο γλοίωμα χαμηλής κακοήθειας (αστροκύτωμα)[65], στο λεμφαγγίωμα[66], στο μελάνωμα[67] και στο νεφροβλάστωμα (όγκος Wilms)[68]. Υψηλά επίπεδα της hAng παρατηρούνται ακόμη σε ασθενείς με οξεία μυελοειδή λευχαιμία (AML), μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο (MDS)[34], χρόνιες μυελοπολλαπλασιαστικές διαταραχές (CMD)[69] και πολλαπλό μυέλωμα[70].

Επιπλέον, έχει δειχθεί ότι η αγγειογενίνη μπορεί να σχετίζεται με την πλάγια αμυοτροφική σκλήρυνση (ALS, Amyotrophic Lateral Sclerosis). Η συγκεκριμένη ασθένεια είναι μία διαταραχή του νευρικού συστήματος η οποία επηρεάζει τόσο τους άνω όσο και τους κάτω κινητικούς νευρώνες (MNs). Ο πρώτος αγγειογενετικός παράγοντας που βρέθηκε να συμβάλλει στην παθογένεια της ALS ήταν ο VEGF, ένας σημαντικός παράγοντας για την αγγειογένεση[71]. Η αγγειογενίνη ταυτοποιήθηκε πρόσφατα ως ο δεύτερος αγγειογενετικός παράγοντας που σχετίζεται με την ALS[72]. Σε μία μεγάλη συνεργατική προσπάθεια μεταξύ Ευρωπαϊκών και Αμερικανικών επιστημονικών ομάδων, βρέθηκαν επτά σημειακές μεταλλάξεις στη γονιδιακή αλληλουχία της αγγειογενίνης, από τις οποίες οι πέντε βρισκότουσαν σε θέσεις που κωδικοποιούν αμινοξέα του καταλυτικού κέντρου του ενζύμου[73]. Ωστόσο, δεν μελετήθηκαν περαιτέρω οι λειτουργικές συνέπειες των μεταλλάξεων αυτών[73], γι' αυτό ο τρόπος με τον οποίο επηρεάζουν την αγγειογενετική και τη νευροπροστατευτική δραστηριότητα της αγγειογενίνης δεν έχει αποκαλυφθεί.



Εικόνα 10: Η hAng προσδέεται στην επιφάνεια του ενδοθηλιακού ή του νευροκινητικού κυττάρου και αλληλεπιδρά με πιθανό υποδοχέα 170kDa και/ή με πρωτεΐνη 42kDa, ενδοκυτταρώνεται και κατευθύνεται προς τον πυρήνα. Εκεί διεγείρει τη μεταγραφή του rRNA και συνεισφέρει στην αγγειογένεση, στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και στη νευροπροστασία[73].

Ύστερα από διάφορες μελέτες, διατυπώθηκε μία ξεχωριστή υπόθεση για τη δράση και τη λειτουργία της αγγειογενίνης, σύμφωνα με την οποία το ένζυμο μπορεί να διακατέχει νευροπροστατευτικό ρόλο μέσω αλληλεπικαλυπτόμενων μονοπατιών με τον αυξητικό παράγοντα VEGF (Εικόνα 10). Πρόσφατα στοιχεία, υποδεικνύουν ότι η αγγειογενίνη εκφράζεται από κινητικούς νευρώνες και γλοιοκύτταρα, ειδικά όταν υπόκεινται σε συνθήκες έλλειψης οξυγόνου (υποξία). Η αγγειογενίνη προσφέρει νευροπροστασία προάγοντας την επιβίωση των νευρώνων που έχουν βρεθεί σε συνθήκες υποξίας σε μία καλλιέργεια[73]. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα της σπονδυλικής στήλης μπορούν επίσης να χαρακτηριστούν ως μια πιθανή πηγή αγγειογενίνης για τους κινητικούς νευρώνες, αλλά παραμένει άγνωστο εάν η αγγειογενίνη μπορεί να διαπεράσει τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό ή αν είναι παρούσα στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό[73]. Η πιθανότητα να έχει η αγγειογενίνη έναν ανεξάρτητο ρόλο από τον VEGF δεν έχει μελετηθεί περαιτέρω.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο

2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο σκοπός της εργασίας είναι η υπερέκφραση του γονιδίου (ANG) της ανθρώπινης αγγειογενίνης (hAng) στην επιθηλιακή κυτταρική σειρά HEK-293T, ώστε να μελετηθούν οι αλληλεπιδράσεις με πρωτεΐνες και ο ρόλος στη γονιδιακή έκφραση.

Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκε η σειρά HEK-293T και εξετάστηκαν διαφορετικές μέθοδοι υπερέκφρασής της στα κύτταρα αυτά.

Εφόσον επιλέχθηκε η καταλληλότερη μέθοδος υπερέκφρασης, τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα των κυττάρων θα αναλυθούν με φασματομετρία μάζας.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

3.1. ΥΛΙΚΑ

3.1.1. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Αντιδραστήριο	Εταιρεία παροχής
Acetic Acid (CH ₃ COOH)	Scharlau
Acrylamide	SERVA
Agarose	NIPPON GENETICS
Ammonium Persulfate (APS)	SERVA
Ampicillin	SIGMA
N',N'-methylene-Bisacrylamide	SERVA
Calcium Chloride (CaCl ₂)	MERCK
Coomassie Brillinat Blue R-250	Panreac
disodium Hydrogen Phosphate (Na ₂ HPO ₄)	MERCK
Dithiothreitol (DTT)	SERVA
Ethanol Absolute	SIGMA
Glycine	SERVA
Hydrogen peroxide	Applichem
Hydrochloric Acid (HCl)	MERCK
LB Agar	SERVA
LB Broth	SIGMA-Aldrich
Luminol	SIGMA
Nucleospin Plasmid Kit	Macherey-Nagel
p-cumaric acid	SIGMA
Potassium Chloride (KCl)	MERCK
Skimmed powdered milk	Applichem
PrimeScript 1st Strand cDNA synthesis Kit	TaKaRa

Sodium dodecyl Sulfate (SDS)	SERVA-Panreac
Sodium Chloride (NaCl)	ChemLab
Sodium Hydroxide (NaOH)	MERCK
Tetramethylethylenediamine (TEMED)	Research Organics
Tris Base	MERCK
Tween-20	Euroclone
2-propanol	Sharlau

ΥΛΙΚΑ

Disposable Serological Pipettes Sterile (25ml, 10ml, 5ml, 2ml)	Costar, Corning
Φυγοκεντρικοί σωλήνες τύπου Falcon (50ml, 15ml)	SPL
Φυγοκεντρικοί σωλήνες τύπου eppendorf(1,5ml)	Eppendorf
Minisart filters 0,2µm	Sartorius stedim
PVDF membrane 0.2µm	Macherey-Nagel
Whatmann 3MM paper	Whatmann

ΟΡΓΑΝΑ

Mini-Opticon Real Time PCR	BIORAD
Yrdimes SemiDry Blotter	Wealtec
Shaking incubator	Labtech
Ultrasonic processor UP 400S (400W, 24kHz)	Hielscher
Αναλυτικός ζυγός	Kern & Sohn GmbH
Απαγωγός κατακόρυφης νηματικής ροής (AV-30/70, κυτταροκαλλιέργειες)	TELSTAR
Αυτόματες πιπέτες	Gilson, Eppendorf
Επωαστήρες 37°C	Binder
Κάθετη συσκευή ηλεκτροφόρησης Mini-Protean Tetra Cell	BIORAD
Μετρητής pH	Metrohm
Φυγόκεντροι	Eppendorf

ENZYMA

KAPA Taq PCR Kit	Kapa Biosystems
KAPA SYBR FAST qPCR	Kapa Biosystems
RTase (200 U/μl)	Clontech

3.1.2. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ

Αντιδραστήριο	Εταιρεία Παροχής
Antibiotic-Antimycotic (penicillin-streptomycin)	Biosera
Dimethyl Sulfoxide (DMSO)	Panreac Applichem
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), (High Glucose) with L-Glutamine, 4500 mg/L D-Glucose, Sodium Pyruvate	Biosera
Fetal Bovine Serum (FBS)	Gipco
Polyethylenimine (PEI)	SIGMA
Trypsin-PBS 0,25% w/o Mg ²⁺ , Ca ²⁺	Gipco

ΥΛΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ

Cell Scrappers	Orange scientific
Disposable Serological Pipettes Sterile (25ml, 10ml, 5ml, 2ml)	Costar, Corning
Φυγοκεντρικοί σωλήνες τύπου Falcon (50ml, 15ml)	SPL
Flasks (75cm ² , 25cm ²) cap filtered	Orange scientific
Φυγοκεντρικοί σωλήνες τύπου eppendorf(1,5ml)	Eppendorf
Minisart filters 0,2μm	Sartorius stedim
6-well plates, cell culture	NEST
Plates 20cm diameter	SPL

ΟΡΓΑΝΑ ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ

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

ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΣΕΙΡΑ

HEK-293T (Human Embryonic Kidney, ανθρωπινή κυτταρική σειρά επιθηλίου).

ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΣ ΦΟΡΕΑΣ

pcDNA4-TO (πλασμιδιακός φορέας για διαμόλυνση σε ευκαρυωτικά κύτταρα θηλαστικών)

ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΟ ΣΤΕΛΕΧΟΣ

XL1 Blue

ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ

1^ο : μονοκλωνικό έναντι hAng (C-1) , Αραίωση 1:100

μονοκλωνικό έναντι β-ακτίνης , Αραίωση 1:5.000

2^ο : δευτερογενές αντίσωμα αίγας έναντι IgG ποντικού συζευγμένο με HRP , Αραίωση 1:25.000

3.2. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

Παρασκευή υλικών:

- Πλήρες Θρεπτικό υλικό

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium , περιέχει L-γλουταμίνη, 4.500 mg/ L D-γλυκόζη, πυροσταφυλικό νάτριο)

10% (v/v) FBS (ορός εμβρύου μόσχου)

1% αντιβιοτικό/αντιμυκητιακό (πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη)

- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών PBS, pH 7.4, αποστειρωμένο

Το διάλυμα αποστειρώνεται πριν τη χρήση του και για την παρασκευή του με pH 7,4, χρειάστηκαν τα εξής αντιδραστήρια με τις συγκεκριμένες συγκεντρώσεις:

NaCl 130mM

KCl 2mM

Na₂HPO₄ 8mM

KH₂PO₄ 1,5mM

απεσταγμένο νερό (έως τελικό όγκο)

- Κρυοπροστατευτικό μέσο

DMEM

10% (v/v) DMSO (για την προστασία των κυττάρων από τη χαμηλή θερμοκρασία κατάψυξης και για την αποφυγή δημιουργίας κρυστάλλων)

10% (v/v) FBS

- Τριψίνη 0,25% 1x σε PBS, χωρίς Mg²⁺, Ca²⁺

Μεθοδολογία:

Στα πειράματα των κυτταροκαλλιιεργειών χρησιμοποιήθηκε η ανθρώπινη κυτταρική σειρά HEK-293T (εμβρυϊκά κύτταρα νεφρού). Η συγκεκριμένη κυτταρική σειρά προέρχεται από την επιθηλιακή κυτταρική σειρά HEK-293 και εκφράζει ένα μετάλλαγμα του μεγάλου T-αντιγόνου του SV40 (Simian Vacuolating Virus 40). Η κυτταρική σειρά HEK-293T αναπτύσσεται ως μονόστιβη καλλιέργεια και διατηρείται σε υγρό μέσο καλλιέργειας σε θερμοκρασία 37°C , παρουσία 5% CO₂ (επωαστήρας) και παρουσία θρεπτικού υλικού DMEM εμπλουτισμένου με 10% (v/v) FBS και 1% αντιβακτηριακό/αντιμυκητιακό (πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη) (Ab/Am).

Οι διαδικασίες του χειρισμού των κυττάρων πραγματοποιούνται σε ασηπτικές συνθήκες με αποστειρωμένα υλικά και σε απαγωγό καθέτου νηματικής ροής. Η εσωτερική επιφάνεια εργασίας του απαγωγού, καθώς και ό, τι εισέρχεται σε αυτόν, απολυμαίνονται εξωτερικά με αιθανόλη 70% (v/v).

ΑΠΟΨΥΞΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ HEK-293T

1. Τα φιαλίδια (cryovials 2mL) που περιέχουν τα κύτταρα, εμβαπτίζονται στο υδατόλουτρο 37°C και πραγματοποιείται ήπια ανάδευση.
2. Αμέσως μόλις ξεπαγώσουν, το εναιώρημα των κυττάρων (1.8mL) μεταφέρεται σε φλάσκα (T₇₅) και προστίθενται 9mL πλήρους θρεπτικού υλικού. Πραγματοποιείται έντονη ανάδευση του εναιωρήματος με τη χρήση σιφωνίου κατάλληλου όγκου ώστε να διαλυθούν όλα τα συσσωματώματα που πιθανώς δημιουργήθηκαν.
3. Τα κύτταρα τοποθετούνται στον επωαστήρα για 16ώρες.
4. Έπειτα, απομακρύνεται το υπερκείμενο με το θρεπτικό ώστε να αφαιρεθεί το DMSO το οποίο περιέχεται σε αυτό διότι δρα κυτταροτοξικά και αναστέλλει την ανάπτυξη των κυττάρων.
5. Προστίθενται 3-4 mL PBS και με ήπιες σταυρωτές κινήσεις, ώστε να μην διαταραχθούν τα κύτταρα, πραγματοποιείται πλύση των κυττάρων για να απομακρυνθεί οποιοδήποτε υπόλειμμα θρεπτικού υλικού υπάρχει.
6. Τέλος, προστίθεται νέο θρεπτικό 10mL και η φλάσκα επανατοποθετείται στον επωαστήρα.

ΑΝΑΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΜΟΝΟΣΤΟΙΒΗΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ-ΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΜΕ ΤΡΙΨΙΝΗ

Όταν η επιφάνεια της φλάσκας καλυφθεί στο μεγαλύτερο μέρος της με κύτταρα και δεν υπάρχει χώρος για περεταίρω ανάπτυξη πραγματοποιείται ανακαλλιέργεια. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται όταν η πληρότητα των κυττάρων φτάσει περίπου το 90-100% και είναι η εξής:

1. Απομακρύνεται με αναρρόφηση το υλικό της καλλιέργειας.
2. Τα κύτταρα πλένονται με διάλυμα PBS και το διάλυμα αναρροφάται.
3. Προστίθεται κατάλληλος όγκος τριψίνης αναλόγως του μεγέθους της φλάσκας (25 cm² ή 75 cm²).
4. Ανακινούμε τη φλάσκα με σταυρωτές κινήσεις έτσι ώστε η τριψίνη να καλύψει όλη την επιφάνειά της και την τοποθετούμε για 2-3 λεπτά στον επωαστήρα.

5. Η φλάσκα αφαιρείται από τον επωαστήρα όταν τα κύτταρα αρχίσουν να αποκολλώνται από την επιφάνεια, δηλαδή όταν μεταβληθεί η μορφολογία τους και το σχήμα τους γίνει σφαιρικό. Παρατηρείται η μορφή των κυττάρων στο μικροσκόπιο και έπειτα προστίθεται θρεπτικό υλικό σε όγκο τέσσερις φορές του όγκου της τριψίνης που χρησιμοποιήθηκε.
6. Τα κύτταρα επαναιωρούνται και διασπείρονται ομοιόμορφα με σιφώνιο κατάλληλου όγκου.
7. Σε αυτό το στάδιο επιλέγεται η κατάλληλη/επιθυμητή αραιώση (1:4, 1:10, 1:20 κλπ.).
8. Η καλλιέργεια συμπληρώνεται με πλήρες θρεπτικό υλικό μέχρι τελικό όγκο και επιστρέφεται η φλάσκα στον επωαστήρα.

ΚΑΤΑΨΥΞΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΓΙΑ ΕΠΑΚΟΛΟΥΘΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

Όταν η πληρότητα της φλάσκας φτάσει περίπου στο 80% πραγματοποιούμε κατεργασία με τριψίνη για να συλλέξουμε και να καταψύξουμε τα κύτταρα για επακόλουθη καλλιέργεια.

Είναι επιθυμητό, η πληρότητα να είναι στο 80% και όχι περισσότερο διότι τότε βρίσκονται στην εκθετική φάση ανάπτυξης.

Η διαδικασία είναι η εξής:

1. Πραγματοποιούνται τα βήματα της παραπάνω διαδικασίας από το 1 έως το 5.
2. Τα κύτταρα φυγοκεντρώνονται στις 1.000 rpm για 5λεπτά.
3. Αναρροφάται το υπερκείμενο και επαναδιαλυτοποιείται το ίζημα των κυττάρων σε κατάλληλη ποσότητα κρυοπροστατευτικού θρεπτικού υλικού DMEM (.
4. Το εναιώρημα μοιράζεται σε cryovials των 2mL και τα τοποθετούνται σε θερμοκρασία -80°C σε κατάλληλο δοχείο κατάψυξης το οποίο διαβρέχεται από ισοπροπανόλη ώστε να επιτευχθεί σταδιακή μείωση της θερμοκρασίας κατά 1°C/min.
5. Αποθήκευση των cryovials στους -80°C για μικρό χρονικό διάστημα (έως πέντε μήνες) ή στο υγρό άζωτο μακροπρόθεσμα.

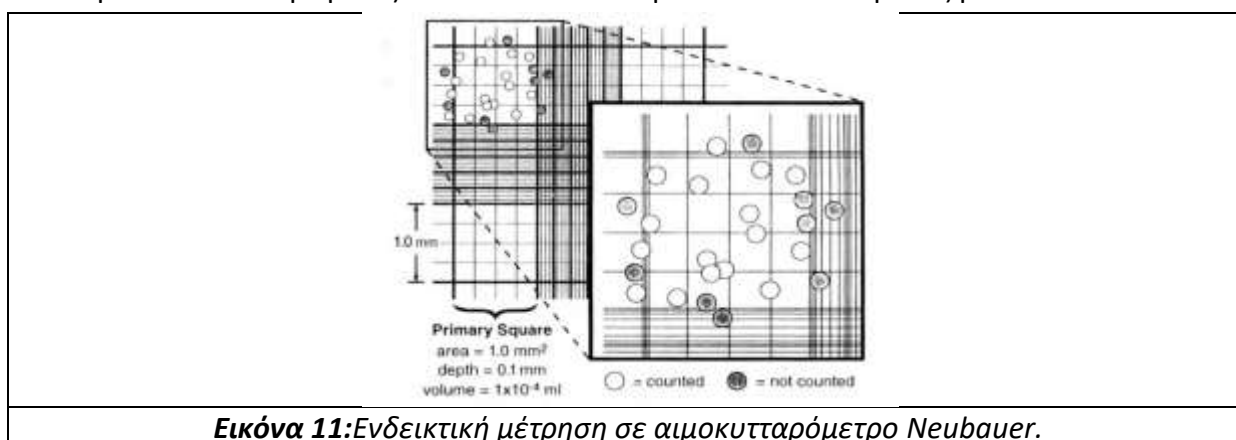
ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΓΙΑ ΠΕΡΕΤΑΙΡΩ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ

Για τη συλλογή των κυττάρων πραγματοποιούνται τα παρακάτω βήματα:

1. Απομάκρυνση του θρεπτικού με αναρρόφηση και πλύση των κυττάρων με ρυθμιστικό διάλυμα PBS.
2. Ακολουθεί κατεργασία με τριψίνη όπως αναφέρθηκε προηγουμένως για να αποκολληθούν τα κύτταρα από το ταπήτιο της φλάσκας.
3. Με τη χρήση πλαστικού scraper αποκολλούμε τα κύτταρα στο σύνολό τους και με τη βοήθεια ρυθμιστικού διαλύματος PBS ξεπλένουμε τη φλάσκα.
4. Επαναιωρούμε τα κύτταρα και λαμβάνουμε 10μL για μέτρηση σε αιμοκυτταρόμετρο Neubauer.
5. Τα κύτταρα φυγοκεντρώνονται σε 1.000 rcf για 5 λεπτά.
6. Αναρροφάται το υπερκείμενο και το pellet φυλάσσεται για περεταίρω χρήση.
Τα βήματα 1 έως 3 πραγματοποιούνται σε απαγωγό καθέτου νηματικής ροής.

ΜΕΤΡΗΣΗ ΣΕ ΑΙΜΟΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΟ NEUBAUER

Το αιμοκυτταρόμετρο είναι μια ιδιαίτερα κατασκευασμένη αντικειμενοφόρος πλάκα η οποία διαθέτει δύο κατάλληλα επεξεργασμένες λείες επιφάνειες. Κάθε μια από αυτές έχει ένα τετράγωνο πλέγμα, το οποίο αποτελείται από εννέα κύρια τετράγωνα, με μήκος πλευράς 1 mm. Το κάθε ένα από αυτά τα τετράγωνα ορίζεται από τρεις παράλληλες γραμμές που απέχουν μεταξύ τους 2,5 μm και καθορίζουν εάν τα κύτταρα θεωρείται ότι βρίσκονται εντός ή εκτός του πλέγματος. Υπάρχει μια κοίλη επιφάνεια μεταξύ της εξωτερικής πλευράς κάθε τετραγωνισμένης λείας επιφάνειας και των σημείων που στηρίζεται η καλυπτρίδα. Στην κοίλη αυτή επιφάνεια μεταφέρεται το κυτταρικό ελαιώρημα, το οποίο με τριχοειδικά φαινόμενα απλώνεται στην τετραγωνισμένη επιφάνεια. Η συγκέντρωση των κυττάρων στο αρχικό ελαιώρημα (σε κύτταρα/mL) γίνεται με καταμέτρηση στα τέσσερα κύρια τετράγωνα, διαίρεση του αριθμού με το 4 (μέσος όρος κυττάρων σε ένα τετράγωνο) και πολλαπλασιασμό του αποτελέσματος με 10^4 .



Εικόνα 11: Ενδεικτική μέτρηση σε αιμοκυτταρόμετρο Neubauer.

ΠΑΡΟΔΙΚΗ ΔΙΑΜΟΛΥΝΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ HEK-293T

Για την υπερέκφραση της ανθρώπινης αγγειογενίνης πραγματοποιήθηκε παροδική διαμόλυνση των κυττάρων HEK-293T με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pcDNA4-hAng. Αρχικά, πραγματοποιείται κατεργασία με τριψίνη και τα κύτταρα μεταφέρονται σε πιάτο 6 βοθρίων ή/ και σε τριβλίο διαμέτρου 10cm.

Μεταφέρεται κατάλληλος αριθμός κυττάρων ώστε μετά από 24 ώρες, που θα λάβει χώρα η διαδικασία της διαμόλυνσης, η πληρότητά τους να είναι ~70 %.

Η παροδική διαμόλυνση έγινε με δύο τρόπους:

α) Διαμόλυνση με χρήση κατιονικού πολυμερούς.

Το αντιδραστήριο που χρησιμοποιήθηκε ήταν το PEI (PolyEthylImine). Το συγκεκριμένο πολυμερές συμπυκνώνει το DNA σε μικρά θετικά φορτισμένα σωματίδια τα οποία προσδένονται σε ανιονικές κυτταρικές επιφάνειες. Τα σύμπλοκα PEI:DNA ενδοκυτταρώνονται και το DNA απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα.

Στη συγκεκριμένη περίπτωση οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι εξής:

Πίνακας 1. Για το πιάτο 6 βοθρίων:

Αντιδραστήρια	Ποσότητα ανά βοθρίο (~2ml)
DMEM -/-, μl	330
Πλασμιδιακό DNA, μg	3,3
Αντιδραστήριο PEI, μl	6,6
DMEM-5% FBS, ml	1,7

Πίνακας 2. Για το τριβλίο 20cm:

Αντιδραστήρια	Ποσότητα ανά τριβλίο (~10ml)
DMEM -/-, ml	2,9
Πλασμιδιακό DNA, µg	30
Αντιδραστήριο PEI, µl	60
DMEM-5% FBS, ml	7

Μεθοδολογία:

1. Σε ένα φυγοκεντρικό σωλήνα τύπου erpendorf (ή falcon) προετοιμάζεται το διάλυμα της αντίδρασης. Προστίθενται κατά σειρά το DMEM -/- και σε αυτό το πλασμιδιακό DNA και πραγματοποιείται έντονη κυκλική μίξη (vortex).
2. Προστίθεται το αντιδραστήριο PEI και αναδεύεται ήπια. Το διάλυμα παραμένει σε θερμοκρασία δωματίου 25°C για 20 λεπτά.
3. Προστίθεται κατάλληλη ποσότητα θρεπτικού υλικού DMEM-5% FBS.
4. Το διάλυμα της αντίδρασης απλώνεται στα κύτταρα κυκλικά.
5. Τα κύτταρα τοποθετούνται στον επωαστήρα στους 37°C , 5% CO₂ για 4 ώρες.
6. Ύστερα από 4 ώρες πραγματοποιείται αλλαγή θρεπτικού χωρίς πλύση των κυττάρων με ρυθμιστικό διάλυμα PBS, ώστε να μην διαταραχθούν, με πλήρες θρεπτικό υλικό.
7. Συλλογή των κυττάρων 36 ώρες μετά από τη διαμόλυνση.

β) Διαμόλυνση με χλωριούχο ασβέστιο

Παρασκευή υλικών:

➤ 2x HBS (Hepes Buffered Saline)

50 mM HEPES, pH 7,05

280 mM NaCl

1,5 mM Na₂HPO₄

Ρύθμιση της τιμής pH στο 7,05 με 1 N HCl. Αποστείρωση με φίλτρο διαμέτρου πόρων 0,22 µm. Αποθήκευση σε θερμοκρασία -20°C.

➤ 2M CaCl₂

Αποστείρωση με φίλτρο πόρων διαμέτρου 0,22 µm. Αποθήκευση σε θερμοκρασία -20°C.

Πίνακας 3.

Αντιδραστήρια	Ποσότητα ανά βοθρίο (~1ml)
CaCl ₂ , µl	16,5
Water For Injection, µl	Έως τελικού όγκου 100µl*
Πλασμιδιακό DNA, µg	3,3
HBS × 2, µl	50
DMEM-10% FBS, 1% Ab/Am, µl	900

*Διάλυμα διαμόλυνσης:100µl ανά βοθρίο

Μεθοδολογία:

1. Πραγματοποιείται αλλαγή θρεπτικού υλικού στα κύτταρα 4 ώρες πριν τη διαμόλυνση προσθέτοντας 900µl πλήρες θρεπτικό μέσο.
2. Παρασκευάζεται το διάλυμα διαμόλυνσης σε φυγοκεντρικό σωλήνα τύπου erpendorf διαλύοντας πρώτα το πλασμιδιακό DNA σε αποστειρωμένο νερό.
3. Προστίθεται σε αυτό το CaCl₂.

4. Προστίθεται έπειτα το HBS σταγόνα-σταγόνα (σε 4 δόσεις- 4 × 25μl) και αναδεύεται έντονα κάθε μία από τις 4 φορές με έντονη κυκλική κίνηση (vortex) ώστε να μην κατακρημνιστεί το CaCl₂ από το HBS.
5. Το διάλυμα της αντίδρασης παραμένει για 20λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και προστίθεται στα κύτταρα κυκλικά.
6. Μετά από 12ώρες επώασης στους 37°C, πραγματοποιείται αφαίρεση του θρεπτικού υλικού με το διάλυμα διαμόλυνσης και προστίθεται 1ml πλήρους θρεπτικού υλικού.
7. Τα κύτταρα συλλέγονται 36 ώρες μετά από τη διαμόλυνση.

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ RNA ΜΕ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΤΟΥ TRI REAGENT (Sigma)

1. Τα κύτταρα φυγοκεντρώνονται στις 3.000 rcf για 3λεπτά στους 4°C (το βήμα αυτό μπορεί να παραλειφθεί αν τα κύτταρα βρίσκονται ήδη υπό τη μορφή ιζήματος).
2. Προστίθενται 500μl από το TRI Reagent ώστε να πραγματοποιηθεί λύση των κυττάρων. Πραγματοποιείται επαναλαμβανόμενα έντονη ανάδευση με τη βοήθεια της πιπέτας και τα δείγματα παραμένουν σε θερμοκρασία δωματίου (RT, Room Temperature) έως 5λεπτά.
3. Προστίθενται 50μl 1-βρωμο-3-χλωροπροπάνιο και πραγματοποιείται έντονη κυκλική ανάδευση (vortex) για 15 δευτερόλεπτα ώστε να γίνει διαχωρισμός των φάσεων. Ακολουθεί επώαση σε RT για 15 λεπτά.
4. Τα δείγματα φυγοκεντρώνονται στις 12.000rcf για 15 λεπτά στους 4°C.
Εάν τα δείγματα δεν έχουν φυγοκεντρηθεί καλά πραγματοποιείται επιπλέον φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις ίδιες στροφές και θερμοκρασία.
5. Μεταφέρουμε σε φυγοκεντρικούς σωλήνες τύπου erpendorfs την υδατική φάση και προσθέτουμε 250μl 2-προπανόλη.
6. Φυγοκεντρούμε για 10 λεπτά στους 4°C στις 12.000rcf.
7. Αφαιρείται το υπερκείμενο και το ίζημα πλένεται με 1ml παγωμένης αιθανόλης 75% με τη χρήση έντονης κυκλικής ανάδευσης (vortex).
8. Τα δείγματα επωάζονται με την αιθανόλη 75% για 30 λεπτά στους -20°C έτσι ώστε να βελτιστοποιηθεί η κατακρήμνιση του ολικού RNA.
9. Τα δείγματα φυγοκεντρώνονται για 5 λεπτά στις 12.000rcf στους 4°C.
10. Αφαιρείται το υπερκείμενο και το ίζημα παραμένει σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να εξατμιστεί όλη η αιθανόλη 75% (ελέγχουμε τα δείγματα ανά τακτά χρονικά διαστήματα).
11. Το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται με 40μl ddH₂O με έντονη ανάδευση με τη βοήθεια πιπέτας.
12. Τοποθέτηση των δειγμάτων στους 55°C για 10 λεπτά.
13. Αποθήκευση στους -80°C.

ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΕΠΙΔΕΚΤΙΚΩΝ ΓΙΑ ΧΗΜΙΚΟ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ ΚΥΤΤΑΡΩΝ XL1-BLUE ΜΕ ΤΟΝ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΟ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟ ΦΟΡΕΑ pcDNA4-TO (amp^r) ΓΙΑ ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ ΤΗΣ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΙΝΗΣ

Το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο προήλθε από ανασυνδυασμό που πραγματοποίησε κατά την εκπόνηση της διδακτορικής διατριβής της η κ. Δήμητρας Σ.Μ. Χατζηλεοντιάδου.

1. 100μl κυττάρων XL1-blue από -80°C τοποθετούνται στον πάγο να ξεπαγώσουν ελαφρά.

2. 1μl πλασμιδίου pcDNA4-TO αναμιγνύονται με τα κύτταρα και αναδεύονται απαλά.
3. 30 λεπτά στον πάγο.
4. 45 δευτερόλεπτα στους 42 °C ΑΚΡΙΒΩΣ στο Thermo Blocker.
5. 2 λεπτά στον πάγο.
6. Προσθήκη 900μl αποστειρωμένου LB Broth άνευ αντιβιοτικού και επώαση 1h στους 37 °C στα 210 rpm.
7. Επίστρωση τριβλίων με LB Agar/ 50μg/ml Amp^r με 50 -150 μl καλλιέργειας μετασχηματισμένων βακτηρίων.
8. Επώαση O/N για 12-16h στους 37 °C.

ΑΝΑΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΑΠΟΙΚΙΩΝ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΕΝΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΧΛ1-BLUE ΣΕ ΥΓΡΟ ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

1. Από κάθε τριβλίο που έχει επωαστεί επιλέγεται μία απομονωμένη και ευδιάκριτη αποικία.
2. Σε ένα φυγοκεντρικό σωλήνα τύπου falcon 50ml τοποθετούνται 5ml αποστειρωμένου θρεπτικού υλικού LB με αντιβιοτικό 50μg/ml Amp^r.
3. Με ένα αποστειρωμένο tip επιλέγεται μια αποικία από το τριβλίο και εμβολιάζεται η υγρή καλλιέργεια.
4. Οι εμβολιασμένες καλλιέργειες τοποθετούνται στον επωαστήρα υπό ανάδευση στις 210 rpm για 12-16 ώρες στους 37°C.

ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ DNA & RNA

Παρασκευή υλικών:

- Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (TAE) 50× pH 8.6
24,2 % (w/v) Tris base
5,71 % (w/w) οξικό οξύ
0,05 M EDTA

Μεθοδολογία:

Η ηλεκτροφόρηση των μορίων DNA και RNA πραγματοποιείται σε πηκτή ακρυλαμιδίου με πυκνότητα ανάλογη του μεγέθους του μορίου. Τα μόρια φορτώνονται με τη χρήση ενός κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος σε κατάλληλη ποσότητα έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση του διαλύματος που θα φορτωθεί να είναι 1×. Έπειτα, εφαρμόζεται ρεύμα έντασης από 70-100 Volt.

Τα μόρια ανιχνεύονται στην πηκτή με τη χρήση μιας φθορίζουσας ουσίας Midori Green, η οποία προστίθεται στην πηκτή προτού πολυμεριστεί. Η ουσία αυτή προσδένεται τόσο στο DNA όσο και στο RNA και εκπέμπει φθορισμό σε μήκος κύματος ~540nm.

Πίνακας 4.

Αγαρόζη (%)	Νουκλεϊκό οξύ (Kb)
0,3	5-60
0,6	1-20
0,7	0.8-10
0,9	0.5-7
1,2	0.4-6
1,5	0.2-3
2,0	0.1-2

ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟΥ ΧΡΟΝΟΥ ΣΕ ΔΥΟ ΣΤΑΔΙΑ- qRT PCR

Η Real Time PCR είναι μία μέθοδος προσδιορισμού της γονιδιακής έκφρασης. Είναι μία πολύ ευαίσθητη μέθοδος και μπορεί να ανιχνεύσει ακόμη και ένα αντίγραφο ενός μεταγράφου ή να ανιχνεύσει την διαφορετική ένταση έκφρασης μεταξύ δύο μεταγράφων σε ποσοστό έως και 23%. Η διαδικασία μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε σε ένα στάδιο (one step reaction) όπου η σύνθεση του συμπληρωματικού DNA (αντίστροφη μεταγραφή) και η ενίσχυση του προϊόντος (cDNA, complementary DNA) γίνονται στο ίδιο σωληνάκι, είτε σε δύο στάδια (two step reaction) όπου οι δύο προαναφερθείσες διαδικασίες λαμβάνουν χώρα ξεχωριστά. Η one step Real Time PCR θεωρείται ότι μειώνει την πειραματική απόκλιση, ωστόσο, η μέθοδος χρησιμοποιεί ως μήτρα το RNA το οποίο είναι εξαιρετικά ασταθές και επιρρεπές στην αποικοδόμηση. Για το λόγο αυτό επιλέχθηκε η two step reaction Real Time PCR. Τα δύο βήματα έχουν ως εξής:

1^ο Βήμα: Σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA κλώνου)

Η σύνθεση του 1^{ου} κλώνου γίνεται σύμφωνα με το πρωτόκολλο της TaKaRa Bio, PrimeScript™ 1st strand cDNA synthesis.

Σύμφωνα με αυτό, η αντίστροφη μεταγραφή συνθέτει τον πρώτο συμπληρωματικό κλώνο με μήτρα ολικό RNA ή πολυ(A)+ RNA. Το RNA που χρησιμοποιήθηκε απομονώθηκε με το πρωτόκολλο του TRI Reagent.

Σε ένα φυγοκετρικό σωλήνα τύπου eppendorf ετοιμάζουμε τα εξής:

Πίνακας 5. 1^η αντίδραση για τη σύνθεση του cDNA.

Αντιδραστήριο	Ποσότητα ανά αντίδραση (10μl*)
dNTPs,μl	1
oligodT,μl	1
RNA,ng	500
Water For Injection, μl	Έως 10*

Αρχικά, τα δείγματα επωάζονται για 5 λεπτά στους 65°C έτσι ώστε να αποδιαταχθούν οι δευτεροταγείς δομές του RNA και να προσδεθούν οι εκκινητές στο στόχο. Τοποθετούμε τα δείγματα αμέσως στον πάγο και προσθέτουμε ποσότητα από τα παρακάτω αντιδραστήρια έτσι ώστε ο τελικός όγκος της αντίδρασης να είναι 20μl.

Πίνακας 6. 2^η αντίδραση για τη σύνθεση του cDNA.

Αντιδραστήριο	Ποσότητα ανά αντίδραση (10μl)
5x Primescript Buffer	4μl
RTase (200 U/μl)	1μl
RNasin Αναστολέας (400 U/μl)	0,5μl
Water For Injection	4,5μl

Έπειτα, τα δείγματα επωάζονται για 60 λεπτά στους 42°C η οποία είναι η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης του ενζύμου. Τέλος, επωάζονται για 15 λεπτά στους 70°C ώστε να αδρανοποιηθεί το ένζυμο.

2^ο Βήμα: Real Time PCR

Με τη Real Time PCR μπορεί να γίνει μέτρηση της ποσότητας των προϊόντων και να παρακολουθείται ο ρυθμός πολλαπλασιασμού ενός μορίου-στόχου. Στο αρχικό στάδιο της διαδικασίας, το προϊόν δεν είναι ανιχνεύσιμο καθώς βρίσκεται σε πολύ μικρή ποσότητα. Σε επόμενο στάδιο, ο αριθμός των προϊόντων αυξάνεται (εκθετική φάση) και το προϊόν καθίσταται ανιχνεύσιμο. Όσο περισσότερα μόρια-στόχοι υπάρχουν αρχικά στο δείγμα, τόσο λιγότεροι κύκλοι θα χρειαστούν ώστε να επέλθει η εκθετική φάση και να γίνει το προϊόν ανιχνεύσιμο. Συγκρίνοντας τον αριθμό των κύκλων στον οποίο έχει επέλθει η εκθετική φάση για διάφορα προϊόντα, μπορούμε να προσδιορίσουμε την αρχική ποσότητα των μορίων που χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα.

Για την ανίχνευση των μορίων χρησιμοποιείται συνήθως μια φθορίζουσα ετικέτα (tag) η οποία προσδένεται σε κάθε μόριο που συντίθεται εισχωρώντας στις αύλακες του DNA. Στις παρούσες πειραματικές διαδικασίες χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο της Kapa Biosystems, KAPA™ SYBR® FAST qPCR Kit. Με βάση το πρωτόκολλο αυτό ελέγχθηκαν τα ενδογενή επίπεδα έκφρασης της αγγειογενίνης στην κυτταρική σειρά HEK-293T. Για να διαπιστωθεί αν το mRNA του γονιδίου της hAng εκφράζεται στα κύτταρα καθώς και τα επίπεδα έκφρασής του, πραγματοποιήθηκε σύγκριση με τα επίπεδα του ιδιοσυστάτα εκφραζόμενου γονιδίου της β-ακτίνης. Ως υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε cDNA από ολικό RNA που απομονώθηκε από τα κύτταρα HEK-293T. Τα αντιδραστήρια και οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν όπως και οι εκκινητές για τα δύο γονίδια παρουσιάζονται παρακάτω.

Πίνακας 7. Αλληλουχίες εκκινητών των γονιδίων της hAng και β-ακτίνης για τη Real Time PCR.

Γονίδιο	Αλληλουχία Εκκινητή (5' → 3')	Αναμενόμενο Μέγεθος προϊόντος PCR (bp)
hAng	Εμπρόσθιος GGCGGTTTGTGTTGGTCTT	184 bp
	Ανάστροφος TGATGTCTTTCAGGGTGAG	
β-ακτίνη	Εμπρόσθιος GGACTTCGAGCAAGAGATGG	234bp
	Ανάστροφος AGCACTGTGTTGGCGTACAG	

Πίνακας 8. Αντιδραστήρια και ποσότητες για την αντίδραση της Real Time PCR.

Αντιδραστήρια	Τελικές ποσότητες (ανά αντίδραση)
KAPA SYBR™ FAST qPCR Master Mix (2x) Universal	10
Εμπρόσθιος εκκινητής	0,1
Ανάστροφος εκκινητής	0,1
cDNA	2
Water For Injection	7,5

Πίνακας 9. Πρωτόκολλο θερμοκρασίας για την πραγματοποίηση της Real Time PCR.

Βήματα	Θερμοκρασία/χρόνος	Αριθμός κύκλων
Αποδιάταξη	95°C/3min	1
Ενίσχυση	95°C/3sec	40
	60°C/30sec *Μέτρηση	
	72°C/11sec *Μέτρηση	
Διάσπαση	95°C/1min } Καμπύλη	1
	55°C/30sec } Αποδιάταξη	
	25°C/3min	1

ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΥΠΟ ΑΠΟΔΙΑΤΑΚΤΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ (SDS-PAGE) ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟΥ ΚΑΙ ΧΡΩΣΗ ΤΗΣ ΠΗΚΤΗΣ

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου είναι μία αναλυτική μέθοδος η οποία χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών ανάλογα με το μοριακό τους βάρος. Πραγματοποιείται σε αποδιατακτικές συνθήκες με τη βοήθεια του αποδιατακτικού παράγοντα SDS ο οποίος καταργεί τις ενδομοριακές δυνάμεις μεταξύ των πρωτεϊνών και προσδίδει στις πρωτεΐνες αρνητικό ηλεκτρικό φορτίο. Με αυτόν τον τρόπο εξασφαλίζεται η κοινή τους πορεία από την άνοδο προς την κάθοδο και εξασφαλίζεται ότι ο διαχωρισμός γίνεται με βάση το μοριακό βάρος και όχι το ηλεκτρικό φορτίο. 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[74].

Το σύστημα ηλεκτροφόρησης είναι δυο φάσεων, που σημαίνει πως υπάρχουν 2 ειδών πηκτές για την πραγματοποίηση της ηλεκτροφόρησης, η πηκτή επιστοίβαξης (stacking gel) και η πηκτή διαχωρισμού (resolving gel). Η πηκτή επιστοίβαξης και σκοπός αυτής είναι να «συμπυκνώσει» τις πρωτεΐνες και να διασφαλίσει ότι όλες οι πρωτεΐνες θα εισέλθουν ταυτόχρονα στην πηκτή διαχωρισμού.

Η ηλεκτροφόρηση μέσα στη συσκευή πραγματοποιείται με τη συμβολή του ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης το οποίο βρίσκεται σε άμεση επαφή με την πηκτή, τόσο στο πάνω όσο και στο κάτω μέρος της καθώς και μέσα στα πηγάδια. Έπειτα, εφαρμόζεται ηλεκτρικό ρεύμα σταθερής έντασης με τη βοήθεια τροφοδοτικού έτσι ώστε να δημιουργηθεί πολικότητα και τα δείγματα να εισέλθουν στην πηκτή.

Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης, γίνεται ανίχνευση των διαχωρισμένων πρωτεϊνών με χρώση της είτε με χρωστική Coomassie (Coomassie Brilliant Blue R-250), είτε με νιτρικό άργυρο (AgNO₃). Στην πρώτη χρειάζεται ελαφρώς όξινο περιβάλλον το οποίο ευνοεί τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις της χρωστικής με τις αμινομάδες των πρωτεϊνών. Με τη μέθοδο αυτή ανιχνεύονται $\geq 0,1$ μg πρωτεΐνης.

Μεθοδολογία:

Αρχικά, πραγματοποιείται λύση των κυττάρων έτσι να απομονωθούν οι πρωτεΐνες. Αυτό πραγματοποιείται με τη βοήθεια ρυθμιστικού διαλύματος λύσης των κυττάρων.

Συγκεκριμένα:

ο Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης κυττάρων

100mM Tris pH 7,6

100mM DTT

4% SDS

Σε κάθε δείγμα, προστίθενται 100μl ρυθμιστικού διαλύματος λύσης και έπειτα πραγματοποιείται θέρμανση στους 95°C για 5 λεπτά. Ακολουθεί ομογενοποίηση του διαλύματος των κυττάρων με χρήση υπερήχων για 2 κύκλους των 10 δευτερολέπτων σε ένταση 20%. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση των δειγμάτων στις 15.000 rpm για 20 λεπτά. Συλλέγεται το υπερκείμενο και προστίθεται σε αυτό ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών 4X. Έπειτα, τα δείγματα θερμαίνονται στους 95°C για 15 λεπτά.

Για την προετοιμασία των πηκτών ακολουθείται η παρακάτω διαδικασία:

Η πυκνότητα των πηκτών ποικίλλει ανάλογα με το μέγεθος των πρωτεϊνών που θέλουμε να διαχωρίσουμε.

Στη συγκεκριμένη περίπτωση, χρησιμοποιήθηκε πηκτή διαχωρισμού 12% ενώ η πηκτή επιστοιβάξης είναι πάντοτε 5%. Επιπλέον, ανάλογα με τη χωρητικότητα της συσκευής προετοιμασίας των πηκτών, παρασκευάζονται διαφορετικές ποσότητες. Παρακάτω, αναφέρονται ενδεικτικά οι ποσότητες των 10ml για την πηκτή διαχωρισμού και 6ml για την πηκτή επιστοιβάξης οι οποίες εξυπηρετούσαν τη χωρητικότητα της συσκευής που χρησιμοποιήθηκε.

Πίνακας 10. Διαλύματα προετοιμασίας πηκτών επιστοιβάξης και διαχωρισμού.

<i>Resolving Gel 10%</i>	
Solutions Components	10ml
dH ₂ O	4.6ml
30% acrylamide mix (ακρυλαμίδιο/bis-ακρυλαμίδιο)	2.7ml
1.5 M Tris pH 8.8	2.5ml
10% SDS	0.1ml
10% ammonium persulfate (APS)	0.1ml
TEMED	0.006ml
<i>Stacking Gel 5%</i>	
Solutions Components	6ml
dH ₂ O	4.1ml
30% acrylamide mix (ακρυλαμίδιο/bis-ακρυλαμίδιο)	1.0ml
1.5 M Tris pH 6.8	0.75ml
10% SDS	0.06ml
10% ammonium persulfate	0.06ml
TEMED	0.006ml

Η πηκτή διαχωρισμού παρασκευάζεται πρώτη και όταν πήξει παρασκευάζουμε την πηκτή επιστοιβάξης.

Μεταξύ των 2 πηκτών και προτού πολυμεριστεί, τοποθετείται ισοπροπανόλη έτσι ώστε να στεγανοποιηθεί η πηκτή και να πολυμεριστεί. Λόγω της αύξησης της επιφανειακής τάσης στην επιφάνεια αυτή σπάνε οι φυσαλίδες που έχουν δημιουργηθεί κατά την παρασκευή της πηκτής. Η ισοπροπανόλη αφαιρείται αφού η πρώτη πηκτή πολυμεριστεί πλήρως και η

επιφάνεια της εκπλένεται με dH₂O. Στη δεύτερη πηκτή, προτού πολυμεριστεί τοποθετούμε και τη χτένα που θα δημιουργήσει τα βοθρία φόρτωσης του δείγματος.

○ 10× Ρυθμιστικό Διάλυμα Ηλεκτροφόρησης (Running Buffer)

25mM Tris

192mM Glycine

0.1% SDS

Το Running Buffer το χρησιμοποιούμε σε συγκέντρωση 1x. Συνεπώς, αραιώνουμε με dH₂O από το αρχικό 10× Running Buffer σε κατάλληλο όγκο.

Μόλις πολυμεριστεί και η δεύτερη πηκτή, τη μεταφέρουμε στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και γεμίζουμε τη συσκευή με Running Buffer. Προσεκτικά, φορτώνουμε τα δείγματά μας τα οποία προηγουμένως, έχουμε αναμίξει με ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης και τα έχουμε θερμάνει στους 95°C για 5min. Ρυθμίζουμε το τροφοδοτικό στα 140 Volt.

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, η πηκτή αφαιρείται από τη συσκευή ηλεκτροφόρησης και βάφεται με τη χρωστική Coomassie Brilliant Blue R-250 .

Η σύσταση της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue R-250 είναι η εξής:

○ Διάλυμα χρωστικής Coomassie

40 % (v/v) μεθανόλη

10 % (v/v) οξικό οξύ

50 % (v/v) ddH₂O

0,1 % (w/v) Coomassie R-250

ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ ΚΑΤΑ WESTERN (Western blot)

Η τεχνική της αποτύπωσης (blot) βασίζεται στο ότι οι πρωτεΐνες που υπάρχουν στην πηκτή μετακινούνται με την εφαρμογή του ηλεκτρικού πεδίου προς την κάθοδο, εξαιτίας του αρνητικού ηλεκτρικού φορτίου που έχουν αποκτήσει μετά τη συμπλοκοποίησή τους με το SDS. Οι πρωτεΐνες καθλώνονται σε ειδική μεμβράνη λόγω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων η οποία τις διευκολύνει να αλληλεπιδράσουν με το αντίσωμα που προστίθεται αργότερα και είναι ειδικό για την πρωτεΐνη που εξετάζεται. Το σύμπλοκο πρωτεΐνης-αντισώματος που έχει δημιουργηθεί, ανιχνεύεται με την προσθήκη ενός δεύτερου αντισώματος το οποίο είναι ειδικό για το πρώτο. Η οπτικοποίηση του αποτελέσματος γίνεται με τη μέθοδο της χημειοφωταύγειας.

Ως χημειοφωταύγεια ορίζουμε την εκπομπή φωτός που προέρχεται από χημική αντίδραση ύστερα από απελευθέρωση ενέργειας των συμμετεχόντων μορίων τα οποία βρίσκονται σε διεγερμένη ενεργειακή κατάσταση. Στη χημειοφωταύγεια, η επομπή καθορίζεται από μία χημική αντίδραση. Ένα τέτοιο σύστημα αποτελεί το ένζυμο της υπεροξειδάσης του χρένου (HRP), το οποίο παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂) σε αλκαλικό περιβάλλον, καταλύει την οξειδωση της λουμινόλης. Η λουμινόλη όταν βρίσκεται σε οξειδωμένη κατάσταση, έχει την ιδιότητα να μεταπίπτει σταδιακά σε πιο σταθερή ενεργειακά κατάσταση με ταυτόχρονη εκπομπή φωτονίων. Η μέγιστη εκπομπή φωτονίων λαμβάνει χώρα σε μήκος κύματος 428 nm και παρουσιάζει ένα μέγιστο 5-20 λεπτά μετά την προσθήκη των

αντιδραστηρίων. Η ανίχνευση επιτυγχάνεται είτε με έκθεση σε ακτινογραφικό φιλμ, είτε σε μηχανήμα ανίχνευσης χημειοφωτάυγεια [74].

Παρασκευή υλικών:

- Διάλυμα μεταφοράς 10× (Transfer Buffer)

25mM Tris

192mM Γλυκίνη

0,1% SDS

10 % (v/v) μεθανόλη (προστίθεται στο αραιό διάλυμα 1× πριν τη χρήση)

- Ρυθμιστικό διάλυμα αλάτων, PBS, pH 7,4

NaCl 130mM

KCl 2mM

Na₂HPO₄ 8mM

KH₂PO₄ 1,5mM

απεσταγμένο νερό (έως όγκο 1L)

- Διάλυμα κορεσμού (σε διάλυμα PBS)

5 % γάλα σε σκόνη

0,1 % (v/v) Tween 20

- Διάλυμα έκπλυσης

0,1 % (v/v) Tween 20 σε διάλυμα PBS

Μεθοδολογία:

Η μεμβράνη που χρησιμοποιήθηκε είναι PVDF (φθοριούχο πολυβινιδυλένιο). Αφού αφαιρεθεί η πηκτή από τη συσκευή ηλεκτροφόρησης τοποθετείται σε διάλυμα μεταφοράς μέχρι να ετοιμαστεί η συσκευή για την ηλεκτρομεταφορά. Για την ηλεκτρομεταφορά θα χρειαστούν 6 φύλλα Whatmann 3mm ανάμεσα στα οποία θα τοποθετηθεί η μεμβράνη PVDF και η πηκτή. Πριν την ηλεκτρομεταφορά, η μεμβράνη PVDF κόβεται στις διαστάσεις της πηκτής που ηλεκτροφορήθηκε και εμβαπτίζεται για λίγα δευτερόλεπτα σε μεθανόλη. Έπειτα, μεταφέρεται σε διάλυμα μεταφοράς 1x μαζί με τα 6 φύλλα Whatman που διαθέτουν επίσης τις ίδιες διαστάσεις με την πηκτή ηλεκτροφόρησης. Για την ηλεκτρομεταφορά χρησιμοποιήθηκε η συσκευή Yrdimes Semi-dry Blotter (Wealtec). Η συσκευή αυτή φέρει δύο ηλεκτρόδια σε μορφή επιπέδων οριζόντιων πλακών, ενώ για την μεταφορά απαιτούνται μικρές ποσότητες διαλύματος μεταφοράς. Τοποθετούμε από τον θετικό (+) προς τον αρνητικό (-) πόλο διαδοχικά τα εξής:

3 φύλλα Whatman → μεμβράνη PVDF → πηκτή ηλεκτροφόρησης → 3 φύλλα Whatman

Η πηκτή πρέπει να βρίσκεται σε άμεση επαφή με τη μεμβράνη ώστε να μη δημιουργούνται φυσαλίδες που θα παρεμποδίσουν την ομοιόμορφη διέλευση του ηλεκτρικού ρεύματος. Η κατασκευή που δημιουργείται διαβρέχεται από διάλυμα μεταφοράς και η μεταφορά πραγματοποιείται σε ένταση 270mA για 50 λεπτά.

Μετά τη λήξη της ηλεκτρομεταφοράς, η μεμβράνη PVDF επώζεται σε διάλυμα κορεσμού για 50 λεπτά έτσι ώστε να κορεστεί η μεμβράνη από την καζεΐνη του γάλακτος και να αποφευχθούν οι μη ειδικές αλληλεπιδράσεις της μεμβράνης με το αντίσωμα. Έπειτα,

η μεμβράνη επωάζεται με το 1^ο αντίσωμα για 12-16 ώρες στους 4°C υπό ανάδευση. Στη συνέχεια, πραγματοποιούνται 3 πλύσεις των 5 λεπτών με διάλυμα έκπλυσης και μετά από αυτές πραγματοποιείται επώαση για 1 ώρα με το δευτερογενές αντίσωμα. Ακολουθούν 3 πλύσεις των 5 λεπτών με διάλυμα έκπλυσης και πραγματοποιείται ανίχνευση του σήματος. Η ανίχνευση του σήματος λαμβάνει χώρα σε σκοτεινό θάλαμο όπου η μεμβράνη επωάζεται για 3 λεπτά με τα αντιδραστήρια ανίχνευσης ενισχυμένης χημειοφωταύγειας. Η διαδικασία συνεχίζεται με την τοποθέτηση της μεμβράνης σε κασέτα εμφάνισης ύστερα από την προσεκτική τοποθέτηση ενός φιλμ με διαστάσεις ίδιες με αυτές της μεμβράνης. Μετά το πέρας του χρόνου έκθεσης, το φιλμ εμβαπτίζεται διαδοχικά σε φωτογραφικό διάλυμα εμφάνισης (Developer), νερό και σε φωτογραφικό διάλυμα σταθεροποίησης (Fixer) έτσι ώστε να γίνει εμφανιστεί και να σταθεροποιηθεί το σήμα στο φιλμ.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΝΔΟΓΕΝΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΙΝΗΣ ΣΤΑ HEK-293T

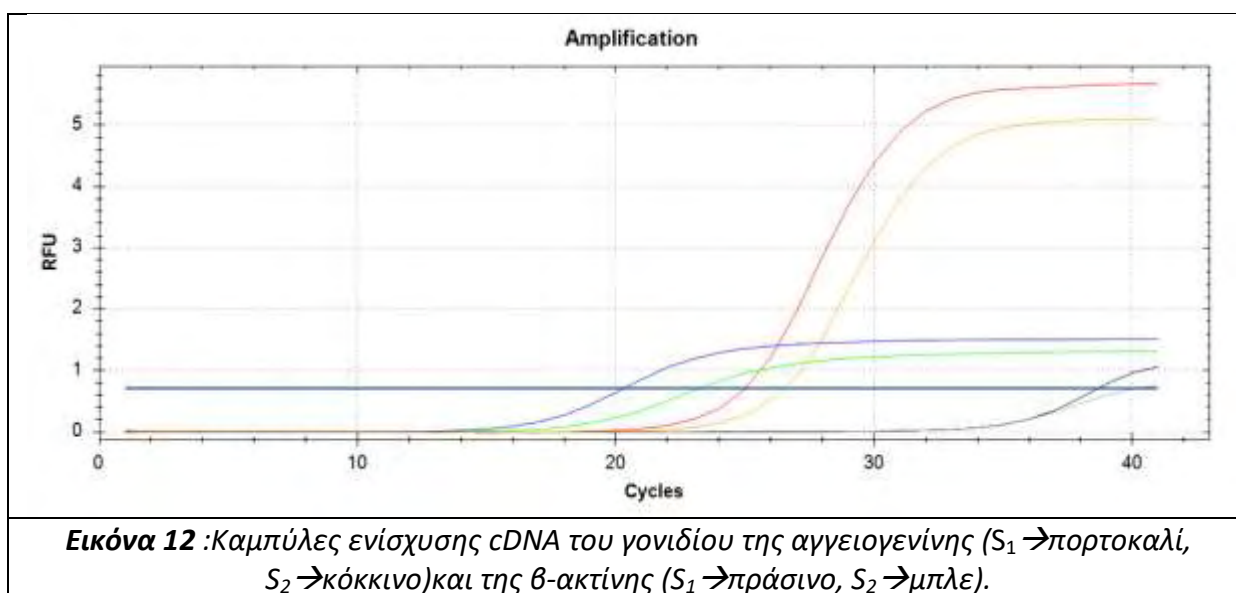
Προτού προχωρήσουμε στην παροδική διαμόλυνση της κυτταρικής σειράς HEK-293T με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο της αγγειογενίνης, πραγματοποιήθηκε Real Time PCR για να ελεγχθούν τα ενδογενή επίπεδα έκφρασης του γονιδίου στη συγκεκριμένη κυτταρική σειρά. Για το λόγο αυτό, απομονώθηκε ολικό RNA από δύο δείγματα (S_1 και S_2) κυττάρων HEK-293T που προέρχονται από καλλιέργεια της συγκεκριμένης κυτταρικής σειράς.

Για να διαπιστώσουμε εάν το mRNA του γονιδίου εκφράζεται, το συγκρίναμε με τα επίπεδα έκφρασης ενός ιδιόσυστατα εκφραζόμενου γονιδίου, της β-ακτίνης. Στο διάγραμμα της παρακάτω εικόνας (Εικόνα 12), φαίνονται οι καμπύλες διακύμανσης των επιπέδων έκφρασης, μετά την πραγματοποίηση 41 κύκλων. Οι κύκλοι έναρξης της ενίσχυσης του κάθε γονιδίου (Cycle threshold, Ct) είναι οι εξής:

hAng: $S_1 \rightarrow 26.5$ (πορτοκαλί), $S_2 \rightarrow 25.02$ (κόκκινο)

β-actin: $S_1 \rightarrow 23.25$ (πράσινο), $S_2 \rightarrow 20.31$ (μπλε)

Με μαύρο και γκρι χρώμα φαίνονται οι αρνητικοί μάρτυρες (NTC, Non Template Control) της β-ακτίνης και της αγγειογενίνης, αντίστοιχα.

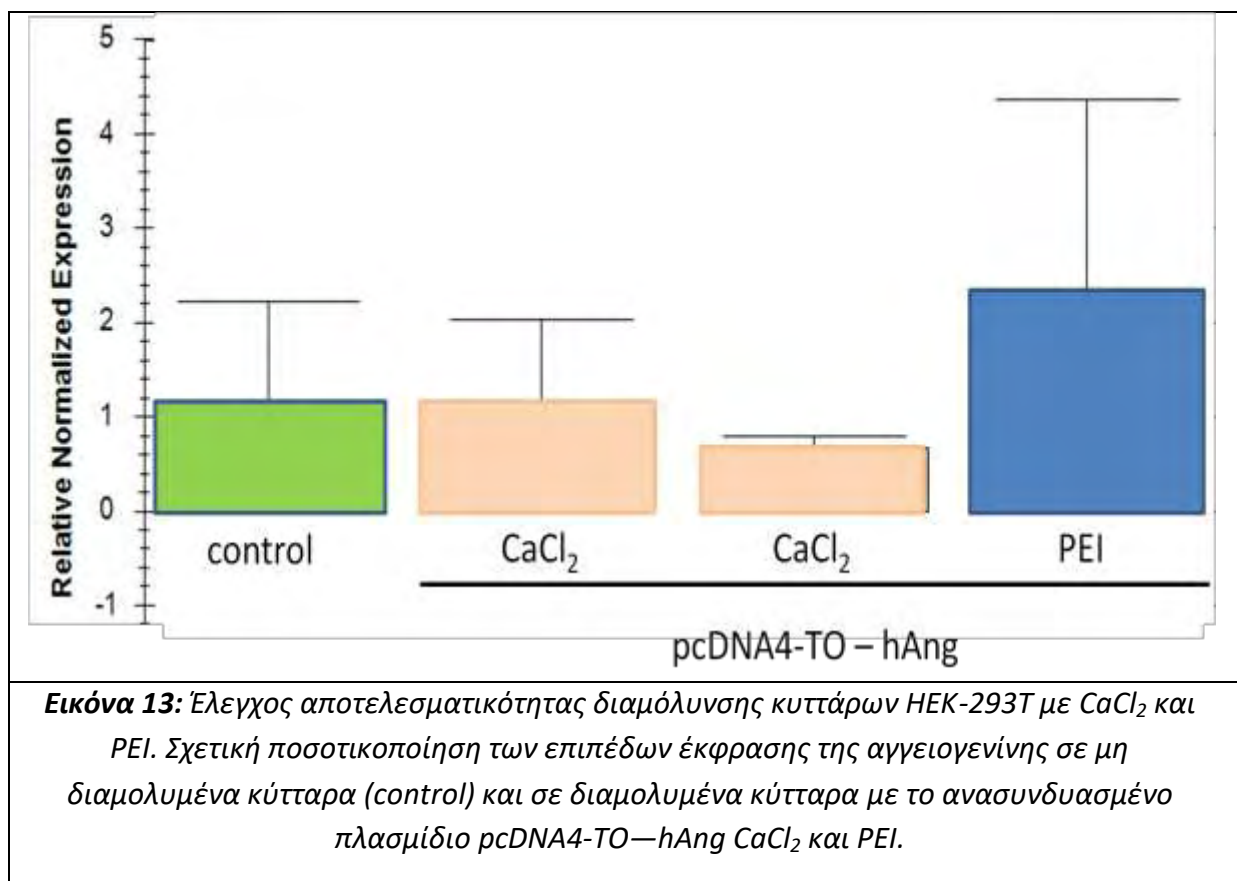


Παρατηρούμε, πως τα μεταγράφα του γονιδίου της hAng παράγονται σε φυσιολογικά επίπεδα σε αυτήν την κυτταρική σειρά, συγκριτικά με αυτά της β-ακτίνης τα οποία είναι άφθονα μέσα στο κύτταρο.

4.2. ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΚΑΤΑΛΛΗΛΟΤΕΡΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΠΑΡΟΔΙΚΗΣ ΔΙΑΜΟΛΥΝΣΗΣ ΓΙΑ ΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ HEK-293T

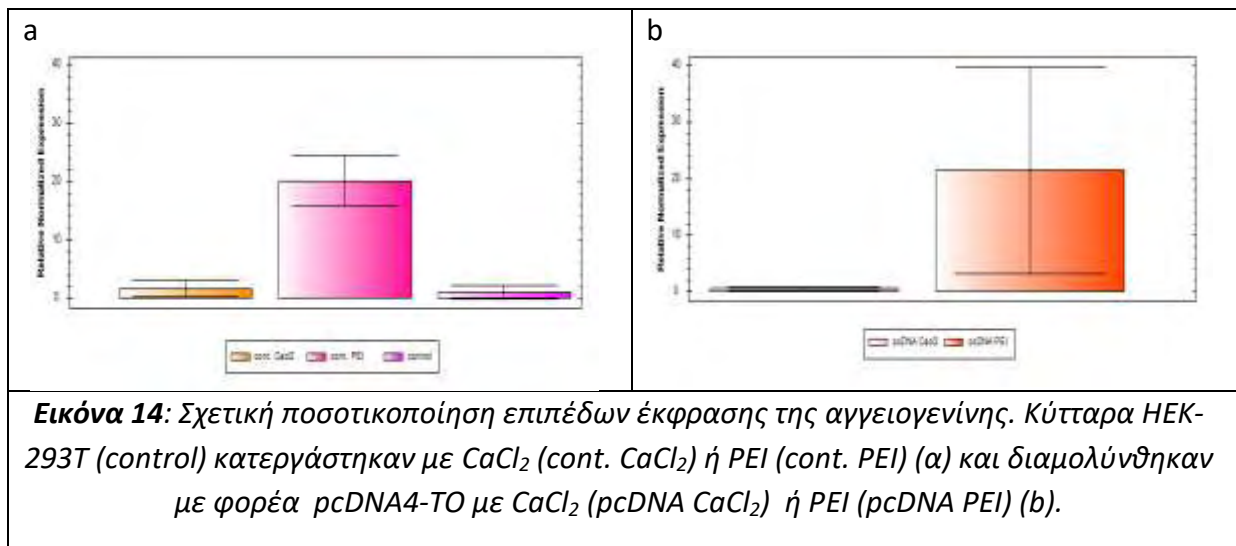
Για να ταυτοποιηθεί η αποδοτικότερη μέθοδος παροδικής διαμόλυνσης για τα κύτταρα HEK-293T πραγματοποιήθηκε διαμόλυνση τόσο με τη χρήση χλωριούχου ασβεστίου όσο και με τη χρήση κατιονικού πολυμερούς (PEI). Χρησιμοποιήθηκαν 2 πιάτα των 6 βοθρίων στα οποία προστέθηκε ίσος αριθμός κυττάρων (250.000 κύτταρα σε κάθε βοθρίο). Πραγματοποιήθηκε παροδική μόλυνση με ανασυνδυασμένο πλασμίδιο που φέρει το γονίδιο της αγγειογενίνης pcDNA4-TO—hAng και με τον πλασμιδιακό φορέα

pcDNA4-TO, ενώ υπήρχαν και βοθρία που δεν διαμολύνθηκαν, ως μάρτυρες. Τόσο τα βοθρία με τον πλασμιδιακό φορέα, όσο και αυτά με τα μη διαμολυμένα κύτταρα λειτουργούν ως αρνητικοί ή θετικοί μάρτυρες για το πείραμα, αντίστοιχα. Μετά το πέρας της διαμόλυνσης, συλλέχθηκαν τα κύτταρα και πραγματοποιήθηκε Real Time PCR με cDNA από το ολικό RNA που απομονώθηκε από τα κύτταρα. Τα αποτελέσματα υπέστησαν σχετική ποσοτικοποίηση $\Delta\Delta C_T$ και παρουσιάζονται στο διάγραμμα της παρακάτω εικόνας (Εικόνα 13).



Τα επίπεδα έκφρασης της αγγειογενίνης στα κύτταρα που διαμολύνθηκαν με το κατιονικό πολυμερές PEI φαίνεται να είναι περίπου 0.7 φορές υψηλότερα από τα επίπεδα έκφρασης των μη διαμολυμένων κυττάρων (control). Σε αντίθεση με το αντιδραστήριο PEI, τα κύτταρα που διαμολύνθηκαν με χλωριούχο ασβέστιο δεν παρουσίασαν υψηλότερα επίπεδα έκφρασης από τα μη διαμολυμένα κύτταρα. Τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου ήταν 0.1 φορές υψηλότερα στο ένα δείγμα και περίπου 0.4 φορές μικρότερη στο άλλο. Από τα παραπάνω αποτελέσματα, φαίνεται πως η καταλληλότερη και αποτελεσματικότερη μέθοδος διαμόλυνσης για την κυτταρική σειρά HEK-293T είναι με τη χρήση του κατιονικού πολυμερούς PEI.

Επιπρόσθετα, αξίζει να σημειωθεί ότι κατά τη διαμόλυνση με το κατιονικό πολυμερές PEI παρατηρήθηκε έντονη αύξηση των επιπέδων έκφρασης της αγγειογενίνης τόσο σε σχέση με τα μη διαμολυμένα κύτταρα μάρτυρες όσο και με τα κύτταρα που είχαν διαμολυνθεί με το CaCl₂.

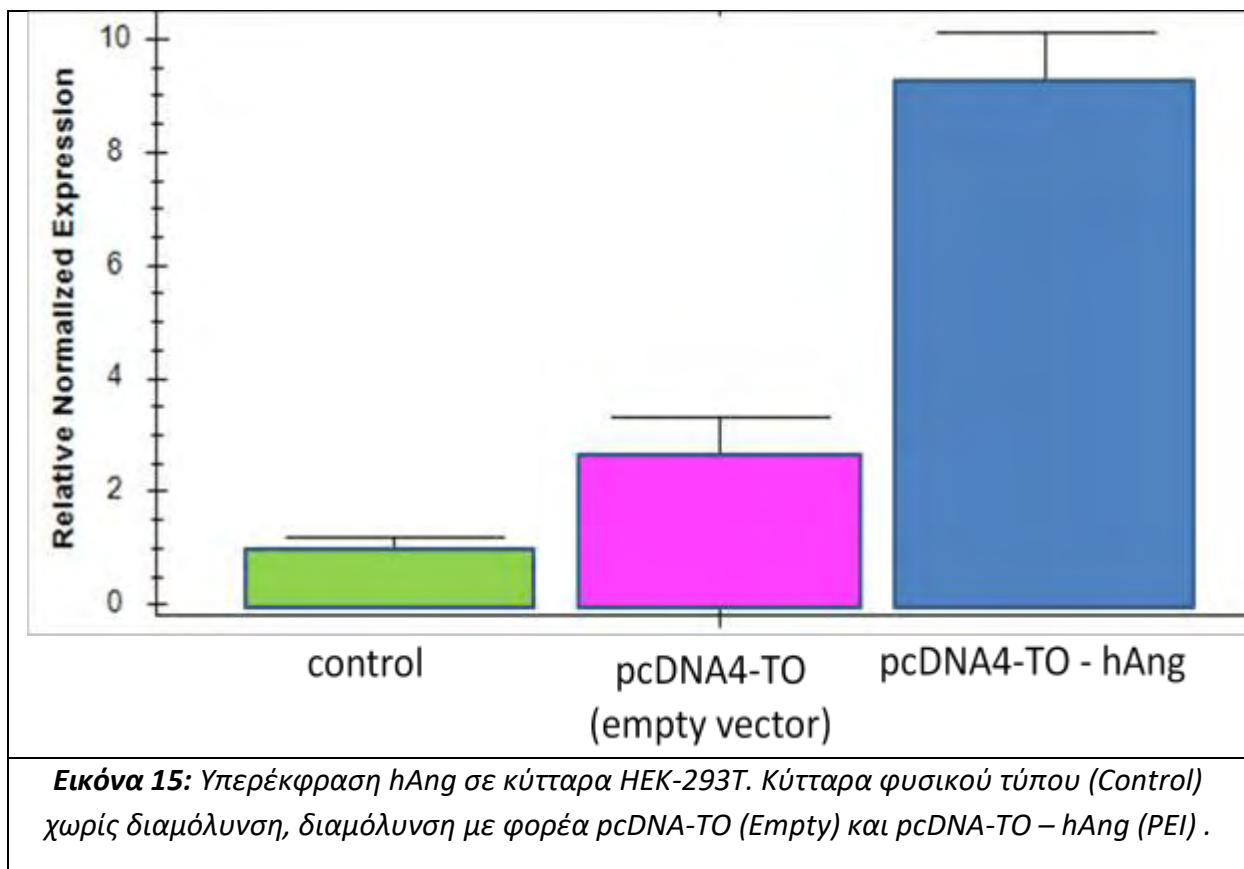


Εικόνα 14: Σχετική ποσοτικοποίηση επιπέδων έκφρασης της αγγειογενίνης. Κύτταρα HEK-293T (control) κατεργάστηκαν με $CaCl_2$ (cont. $CaCl_2$) ή PEI (cont. PEI) (α) και διαμολύνθηκαν με φορέα pcDNA4-TO με $CaCl_2$ (pcDNA $CaCl_2$) ή PEI (pcDNA PEI) (b).

Συγκεκριμένα, όπως φαίνεται στην Εικόνα 14 α, τα επίπεδα έκφρασης της αγγειογενίνης στα κύτταρα control τα οποία υπέστησαν την επίδραση του PEI βρίσκονται περίπου 20 φορές υψηλότερα από αυτά των κυττάρων control τα οποία δε δέχθηκαν την επίδραση κάποιου αντιδραστήριου. Σε αντίθεση με τα κύτταρα που δέχθηκαν την επίδραση του PEI, τα κύτταρα που δέχθηκαν την επίδραση του χλωριούχου ασβεστίου δεν παρουσίασαν αύξηση των επιπέδων έκφρασης της αγγειογενίνης. Επιπρόσθετα, το αντιδραστήριο PEI φαίνεται να επηρέασε και τα επίπεδα έκφρασης της αγγειογενίνης στα διαμολυμένα κύτταρα με τον πλασμιδιακό φορέα pcDNA4-TO, όπως παρουσιάζεται στο διάγραμμα (b). Τα επίπεδα ήταν και σε αυτή την περίπτωση περίπου 20 φορές υψηλότερα σε σχέση με αυτά των μη διαμολυμένων κυττάρων (control) αλλά και σε σχέση με τα κύτταρα που είχαν διαμολυνθεί με τον πλασμιδιακό φορέα.

4.3. ΠΑΡΟΔΙΚΗ ΔΙΑΜΟΛΥΝΣΗ HEK-293T ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΚΑΤΙΟΝΙΚΟΥ ΠΟΛΥΜΕΡΟΥΣ PEI

Ύστερα από τη διερεύνηση της καταλληλότερης μεθόδου διαμόλυνσης, επιλέχθηκε η χρήση του κατιονικού πολυμερούς PEI. Για τη διαμόλυνση χρησιμοποιήθηκαν 3 τριβλία ανάπτυξης κυττάρων διαμέτρου 20εκατοστών στα οποία τοποθετήθηκε ίσος αριθμός κυττάρων προς ανάπτυξη (7×10^6 κύτταρα σε κάθε τρυβλίο). Στη συνέχεια, κύτταρα HEK-293T διαμολύνθηκαν α) με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο που φέρει ως ένθεμα το γονίδιο της αγγειογενίνης pcDNA4-TO-hAng, β) με τον πλασμιδιακό φορέα pcDNA4-TO χωρίς ένθεμα, ενώ χρησιμοποιήθηκαν γ) κύτταρα ως μάρτυρες χωρίς διαμόλυνση. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο διάγραμμα της επόμενης εικόνας (Εικόνα 15) ύστερα από κανονικοποίηση και σχετική ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων.



Διαπιστώθηκε ότι τα κύτταρα που είχαν διαμολυνθεί με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο παρουσίασαν επίπεδα έκφρασης της αγγειογενίνης περίπου 7 φορές πάνω από τα επίπεδα έκφρασης των μη διαμολυμένων κυττάρων (control). Επιπλέον, παρατηρήθηκε πως τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου στα κύτταρα που είχαν διαμολυνθεί με τον μη ανασυνδυασμένο πλασμιδιακό φορέα ήταν περίπου 3 φορές υψηλότερα από αυτά των κυττάρων control και 4 φορές χαμηλότερα από τα κύτταρα που διέθεταν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο της αγγειογενίνης.

4.4. ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΤΗΣ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΙΝΗΣ ΜΕ ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ ΚΑΤΑ WESTERN

Ύστερα από την επιβεβαίωση της αυξημένης έκφρασης του γονιδίου της αγγειογενίνης στα διαμολυμένα κύτταρα με το κατιονικό πολυμερές, κρίθηκε αναγκαίο να ελεγχθεί η παραγωγή της πρωτεΐνης με ανοσοαποτύπωση κατά Western. Για το λόγο αυτό, απομονώθηκε το σύνολο των πρωτεϊνών των κυττάρων control, των διαμολυμένων κυττάρων με τον πλασμιδιακό φορέα και των διαμολυμένων κυττάρων με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο της αγγειογενίνης. Τα δείγματα ποσοτικοποιήθηκαν και πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση υπό αποδιατακτικές συνθήκες. Οι συγκεντρώσεις που προέκυψαν από την ποσοτικοποίηση των δειγμάτων είναι οι εξής:

pcDNA4-TO—hAng→3,4mg/ml,

pcDNA4-TO→3mg/ml και

μη διαμολυμένα κύτταρα control→ 6,68mg/ml. Στην ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας απομονωμένη αγγειογενίνη σε συγκέντρωση 0.25mg/ml καθώς και εκχύλισμα από τα κύτταρα που προαναφέρθηκαν.

Τα αποτελέσματα χρήζουν περαιτέρω ανάλυσης γι' αυτό και δεν παρουσιάζονται στην παρούσα διπλωματική εργασία και θα αποτελέσουν στόχο διπλωματικής εργασίας στο άμεσο μέλλον.

4.5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η αγγειογενίνη είναι ένας ισχυρός αγγειογενετικός παράγοντας που εμπλέκεται τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε παθολογικές καταστάσεις.

Ύστερα από τη διεξαγωγή των προαναφερθέντων πειραματικών διαδικασιών, διαπιστώθηκε πως η αγγειογενίνη εκφράζεται κανονικά στην κυτταρική σειρά HEK-293T. Επιπλέον, καταλληλότερη μέθοδος διαμόλυνσης για την υπερέκφρασή της είναι η χρήση του κατιονικού πολυμερούς PEI. Τέλος, ως μελλοντικός στόχος έχει τεθεί η ανάλυση πρωτεϊνικών δειγμάτων τόσο από διαμολυμένα κύτταρα που υπερεκφράζουν την αγγειογενίνη όσο και από μη διαμολυμένα κύτταρα με φασματοσκοπία μάζας έτσι ώστε να μελετηθούν οι πρωτεϊνικές της αλληλεπιδράσεις με άλλα μόρια.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. D'Alessio, G., et al., *Seminal RNase: a unique member of the ribonuclease superfamily*. Trends Biochem Sci, 1991. **16**(3): p. 104-6.
2. Rosenberg, H.F., *RNase A ribonucleases and host defense: an evolving story*. J Leukoc Biol, 2008. **83**(5): p. 1079-87.
3. Sorrentino, S., et al., *Eosinophil-derived neurotoxin and human liver ribonuclease. Identity of structure and linkage of neurotoxicity to nuclease activity*. J Biol Chem, 1992. **267**(21): p. 14859-65.
4. Fett, J.W., J.L. Bethune, and B.L. Vallee, *Induction of angiogenesis by mixtures of two angiogenic proteins, angiogenin and acidic fibroblast growth factor, in the chick chorioallantoic membrane*. Biochem Biophys Res Commun, 1987. **146**(3): p. 1122-31.
5. Folkman, J., *Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery?* Nat Rev Drug Discov, 2007. **6**(4): p. 273-86.
6. Augustin, H.G., *Commentary on Folkman: "How Is Blood Vessel Growth Regulated in Normal and Neoplastic Tissue?"*. Cancer Res, 2016. **76**(10): p. 2854-6.
7. Folkman, J., *The role of angiogenesis in tumor growth*. Semin Cancer Biol, 1992. **3**(2): p. 65-71.
8. Pandya, N.M., N.S. Dhalla, and D.D. Santani, *Angiogenesis--a new target for future therapy*. Vascul Pharmacol, 2006. **44**(5): p. 265-74.
9. Bussolino, F., A. Mantovani, and G. Persico, *Molecular mechanisms of blood vessel formation*. Trends Biochem Sci, 1997. **22**(7): p. 251-6.
10. Griffioen, A.W. and G. Molema, *Angiogenesis: potentials for pharmacologic intervention in the treatment of cancer, cardiovascular diseases, and chronic inflammation*. Pharmacol Rev, 2000. **52**(2): p. 237-68.
11. Weis, S.M. and D.A. Cheresh, *Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets*. Nat Med, 2011. **17**(11): p. 1359-70.
12. Chen, L. and G.F. Hu, *Angiogenin-mediated ribosomal RNA transcription as a molecular target for treatment of head and neck squamous cell carcinoma*. Oral Oncol, 2010. **46**(9): p. 648-53.
13. Loizzi, V., et al., *Biological Pathways Involved in Tumor Angiogenesis and Bevacizumab Based Anti-Angiogenic Therapy with Special References to Ovarian Cancer*. Int J Mol Sci, 2017. **18**(9).
14. Folkman, J. and D. Hanahan, *Switch to the angiogenic phenotype during tumorigenesis*. Princess Takamatsu Symp, 1991. **22**: p. 339-47.
15. Weis, S.M. and D.A. Cheresh, *Pathophysiological consequences of VEGF-induced vascular permeability*. Nature, 2005. **437**(7058): p. 497-504.

16. Franco, O.E., et al., *Cancer associated fibroblasts in cancer pathogenesis*. Semin Cell Dev Biol, 2010. **21**(1): p. 33-9.
17. Gonda, T.A., et al., *Molecular biology of cancer-associated fibroblasts: can these cells be targeted in anti-cancer therapy?* Semin Cell Dev Biol, 2010. **21**(1): p. 2-10.
18. Xing, F., J. Saidou, and K. Watabe, *Cancer associated fibroblasts (CAFs) in tumor microenvironment*. Front Biosci (Landmark Ed), 2010. **15**: p. 166-79.
19. Hellberg, C., A. Ostman, and C.H. Heldin, *PDGF and vessel maturation*. Recent Results Cancer Res, 2010. **180**: p. 103-14.
20. Leonidas, D.D., et al., *Refined crystal structures of native human angiogenin and two active site variants: implications for the unique functional properties of an enzyme involved in neovascularisation during tumour growth*. J Mol Biol, 1999. **285**(3): p. 1209-33.
21. Kurachi, K., et al., *Sequence of the cDNA and gene for angiogenin, a human angiogenesis factor*. Biochemistry, 1985. **24**(20): p. 5494-9.
22. Strydom, D.J., et al., *Amino acid sequence of human tumor derived angiogenin*. Biochemistry, 1985. **24**(20): p. 5486-94.
23. Chopra, V., T.V. Dinh, and E.V. Hannigan, *Circulating serum levels of cytokines and angiogenic factors in patients with cervical cancer*. Cancer Invest, 1998. **16**(3): p. 152-9.
24. Shimoyama, S. and M. Kaminishi, *Increased angiogenin expression in gastric cancer correlated with cancer progression*. J Cancer Res Clin Oncol, 2000. **126**(8): p. 468-74.
25. Shapiro, R., J.F. Riordan, and B.L. Vallee, *Characteristic ribonucleolytic activity of human angiogenin*. Biochemistry, 1986. **25**(12): p. 3527-32.
26. Li, S. and G.F. Hu, *Angiogenin-mediated rRNA transcription in cancer and neurodegeneration*. Int J Biochem Mol Biol, 2010. **1**(1): p. 26-35.
27. Acharya, K.R., et al., *Crystal structure of bovine angiogenin at 1.5-Å resolution*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(7): p. 2949-53.
28. Hallahan, T.W., R. Shapiro, and B.L. Vallee, *Dual site model for the organogenic activity of angiogenin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(6): p. 2222-6.
29. Russo, N., et al., *Role of glutamine-117 in the ribonucleolytic activity of human angiogenin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(8): p. 2920-4.
30. Hu, G.F., et al., *An angiogenin-binding protein from endothelial cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(6): p. 2227-31.
31. Hu, G.F., et al., *Actin is a binding protein for angiogenin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(4): p. 1217-21.
32. Soncin, F., *Angiogenin supports endothelial and fibroblast cell adhesion*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(6): p. 2232-6.
33. Hu, G.F., J.F. Riordan, and B.L. Vallee, *A putative angiogenin receptor in angiogenin-responsive human endothelial cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(6): p. 2204-9.
34. Gao, X. and Z. Xu, *Mechanisms of action of angiogenin*. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2008. **40**(7): p. 619-24.
35. Hu, G., J.F. Riordan, and B.L. Vallee, *Angiogenin promotes invasiveness of cultured endothelial cells by stimulation of cell-associated proteolytic activities*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(25): p. 12096-100.
36. Moroianu, J. and J.F. Riordan, *Identification of the nucleolar targeting signal of human angiogenin*. Biochem Biophys Res Commun, 1994. **203**(3): p. 1765-72.
37. Hu, G.F., *Neomycin inhibits angiogenin-induced angiogenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(17): p. 9791-5.
38. Moroianu, J. and J.F. Riordan, *Nuclear translocation of angiogenin in proliferating endothelial cells is essential to its angiogenic activity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(5): p. 1677-81.
39. Hu, G., C. Xu, and J.F. Riordan, *Human angiogenin is rapidly translocated to the nucleus of human umbilical vein endothelial cells and binds to DNA*. J Cell Biochem, 2000. **76**(3): p. 452-62.
40. Li, R., J.F. Riordan, and G. Hu, *Nuclear translocation of human angiogenin in cultured human umbilical artery endothelial cells is microtubule and lysosome independent*. Biochem Biophys Res Commun, 1997. **238**(2): p. 305-12.
41. Lixin, R., et al., *Novel properties of the nucleolar targeting signal of human angiogenin*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **284**(1): p. 185-93.

42. Wiedlocha, A., *Following angiogenin during angiogenesis: a journey from the cell surface to the nucleolus*. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 1999. **47**(5): p. 299-305.
43. Xu, Z.P., et al., *The nuclear function of angiogenin in endothelial cells is related to rRNA production*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. **294**(2): p. 287-92.
44. Xu, Z.P., et al., *Identification and characterization of an angiogenin-binding DNA sequence that stimulates luciferase reporter gene expression*. Biochemistry, 2003. **42**(1): p. 121-8.
45. Adams, S.A. and V. Subramanian, *The angiogenins: an emerging family of ribonuclease related proteins with diverse cellular functions*. Angiogenesis, 1999. **3**(3): p. 189-99.
46. Riordan, J.F., *Angiogenin*. Methods Enzymol, 2001. **341**: p. 263-73.
47. Rybak, S.M. and B.L. Vallee, *Base cleavage specificity of angiogenin with Saccharomyces cerevisiae and Escherichia coli 5S RNAs*. Biochemistry, 1988. **27**(7): p. 2288-94.
48. Moussaoui, M., et al., *The subsites structure of bovine pancreatic ribonuclease A accounts for the abnormal kinetic behavior with cytidine 2',3'-cyclic phosphate*. J Biol Chem, 1998. **273**(40): p. 25565-72.
49. Safarian, S. and A.A. Moosavi-Movahedi, *Binding patterns and kinetics of RNase a interaction with RNA*. J Protein Chem, 2000. **19**(5): p. 335-44.
50. Chatzileontiadou, D.S., et al., *The ammonium sulfate inhibition of human angiogenin*. FEBS Lett, 2016. **590**(17): p. 3005-18.
51. Shapiro, R., et al., *Ribonucleolytic activity of angiogenin: essential histidine, lysine, and arginine residues*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(24): p. 8783-7.
52. Russo, N., et al., *A combined kinetic and modeling study of the catalytic center subsites of human angiogenin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(2): p. 804-8.
53. Leland, P.A., et al., *The ribonucleolytic activity of angiogenin*. Biochemistry, 2002. **41**(4): p. 1343-50.
54. Hooper, L.V., et al., *Angiogenins: a new class of microbicidal proteins involved in innate immunity*. Nat Immunol, 2003. **4**(3): p. 269-73.
55. Tello-Montoliu, A., J.V. Patel, and G.Y. Lip, *Angiogenin: a review of the pathophysiology and potential clinical applications*. J Thromb Haemost, 2006. **4**(9): p. 1864-74.
56. Wu, D., et al., *Angiogenin loss-of-function mutations in amyotrophic lateral sclerosis*. Ann Neurol, 2007. **62**(6): p. 609-17.
57. Majumder, P.K., et al., *Prostate intraepithelial neoplasia induced by prostate restricted Akt activation: the MPAKT model*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(13): p. 7841-6.
58. Montero, S., et al., *Angiogenin expression and prognosis in primary breast carcinoma*. Clin Cancer Res, 1998. **4**(9): p. 2161-8.
59. Li, D., et al., *The observation of angiogenin and basic fibroblast growth factor gene expression in human colonic adenocarcinomas, gastric adenocarcinomas, and hepatocellular carcinomas*. J Pathol, 1994. **172**(2): p. 171-5.
60. Chopra, V., T.V. Dinh, and E.V. Hannigan, *Serum levels of interleukins, growth factors and angiogenin in patients with endometrial cancer*. J Cancer Res Clin Oncol, 1997. **123**(3): p. 167-72.
61. Barton, D.P., et al., *Angiogenic protein expression in advanced epithelial ovarian cancer*. Clin Cancer Res, 1997. **3**(9): p. 1579-86.
62. Wechsel, H.W., et al., *Renal cell carcinoma: relevance of angiogenetic factors*. Anticancer Res, 1999. **19**(2C): p. 1537-40.
63. Miyake, H., et al., *Increased angiogenin expression in the tumor tissue and serum of urothelial carcinoma patients is related to disease progression and recurrence*. Cancer, 1999. **86**(2): p. 316-24.
64. Verstovsek, S., et al., *Significance of angiogenin plasma concentrations in patients with acute myeloid leukaemia and advanced myelodysplastic syndrome*. Br J Haematol, 2001. **114**(2): p. 290-5.
65. Eberle, K., et al., *The expression of angiogenin in tissue samples of different brain tumours and cultured glioma cells*. Anticancer Res, 2000. **20**(3A): p. 1679-84.
66. Park, Y.W., et al., *Lymphangioma involving the mandible: immunohistochemical expressions for the lymphatic proliferation*. J Oral Pathol Med, 2002. **31**(5): p. 280-3.
67. Hartmann, A., et al., *Hypoxia-induced up-regulation of angiogenin in human malignant melanoma*. Cancer Res, 1999. **59**(7): p. 1578-83.

68. Skoldenberg, E.G., et al., *Angiogenesis and angiogenic growth factors in Wilms tumor*. J Urol, 2001. **165**(6 Pt 2): p. 2274-9.
69. Musolino, C., et al., *Levels of soluble angiogenin in chronic myeloid malignancies: clinical implications*. Eur J Haematol, 2004. **72**(6): p. 416-9.
70. Alexandrakis, M.G., et al., *Elevated serum angiogenin in multiple myeloma*. Hematol J, 2003. **4**(6): p. 454-5.
71. Oosthuyse, B., et al., *Deletion of the hypoxia-response element in the vascular endothelial growth factor promoter causes motor neuron degeneration*. Nat Genet, 2001. **28**(2): p. 131-8.
72. Greenway, M.J., et al., *ANG mutations segregate with familial and 'sporadic' amyotrophic lateral sclerosis*. Nat Genet, 2006. **38**(4): p. 411-3.
73. Lambrechts, D., et al., *Another angiogenic gene linked to amyotrophic lateral sclerosis*. Trends Mol Med, 2006. **12**(8): p. 345-7.
74. Berg, J.M., et al., *Biochemistry*. 5th ed. 2002, New York: W.H. Freeman.
75. Padhi, A.K., et al., *Mechanisms of loss of functions of human angiogenin variants implicated in amyotrophic lateral sclerosis*. PLoS One, 2012. **7**(2): p. e32479.

EIKONA ΕΞΩΦΥΛΛΟΥ [75]