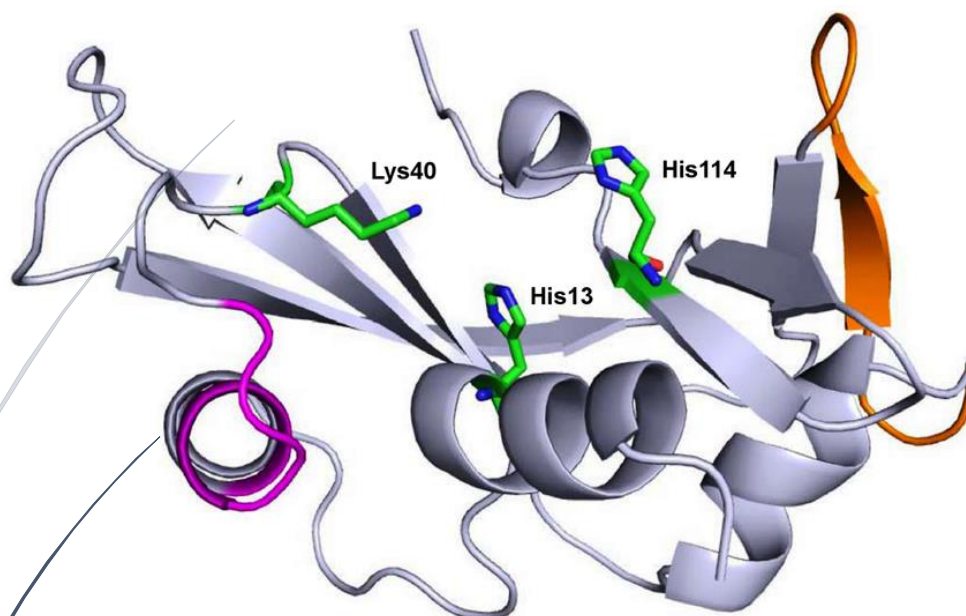


Λάρισα 2021

Πρωτεομική ανάλυση των πυρηνικών
πρωτεϊνών κυττάρων HEK293T στα
οποία έχει γίνει διαμόλυνση με γονίδιο
αγγειογενίνης

Διπλωματική Εργασία



Χριστίνα-Θεοδώρα Αλεξοπούλου

Θέμα διπλωματικής εργασίας

«Πρωτεομική ανάλυση των πυρηνικών πρωτεϊνών κυττάρων HEK293T στα οποία έχει γίνει διαμόλυνση με γονίδιο αγγειογενίνης»

«Proteomic analysis of nuclear proteins from HEK293T cells in which angiogenin gene has been transfected»

Χριστίνα-Θεοδώρα Αλεξοπούλου
Λάρισα 2021

Christina-Theodora Alexopoulou
Larissa 2021

Η συγκεκριμένη διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας την ακαδημαϊκή χρονιά 2020-2021 υπό την επίβλεψη και καθοδήγηση της καθηγήτριας Κοντού Μαρίας και της υποψήφιας διδάκτορα Παπαϊωάννου Όλγας.

Τριμελής Επιτροπή

Κοντού Μαρία (Επιβλέπουσα) : Επίκουρος Καθηγήτρια Πρωτεϊνικής Χημείας, Τμήμα Βιοχημείας Και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Σχολή Επιστήμων Υγείας, Λάρισα, Ελλάδα

Δημήτριος Δ. Λεωνίδας : Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας Και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Σχολή Επιστήμων Υγείας, Λάρισα, Ελλάδα

Νικόλαος Μπαλατσός: Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας Και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Σχολή Επιστήμων Υγείας, Λάρισα, Ελλάδα

Περιεχόμενα

I. Περίληψη	4
II. Abstract	5
1. Εισαγωγή	5
1.1 Ριβονουκλεάσες.....	5
1.2 Αγγειακό Σύστημα/Αγγειογένεση	8
Αγγειακό Σύστημα	8
Αγγειογένεση	9
1.3 Ανθρώπινη Αγγειογενίνη (hAng)	12
Γενικά χαρακτηριστικά	12
Πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με ANG	13
Σχέση δομής & λειτουργίας (Μηχανισμοί δράσης)	15
Ριβονουκλεολυτική δράση της αγγειογενίνης	19
Λειτουργίες της hAng.....	22
Αγγειογενίνη και ασθένειες	24
1.4 Πρωτεομική (Proteomics).....	27
Εισαγωγή	27
ESI – MS/MS(Electrospray ionization- Tandem mass spectrometry).....	28
2. Σκοπός	29
3. Υλικά και Μεθοδολογία	30
3.1 Υλικά.....	30
3.2 Μεθοδολογία	33
ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ	33
ΑΠΟΨΥΞΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ HEK-293T	34
ΑΝΑΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΜΟΝΟΣΤΟΙΒΗΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ-ΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΜΕ ΤΡΙΨΙΝΗ	34
ΚΑΤΑΨΥΞΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΓΙΑ ΕΠΑΚΟΛΟΥΘΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ	35
ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΓΙΑ ΠΕΡΕΤΑΙΡΩ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ	35
ΜΕΤΡΗΣΗ ΣΕ ΑΙΜΟΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΟ ΝΕΥΒΑΥΕΡ	36
ΠΑΡΟΔΙΚΗ ΔΙΑΜΟΛΥΝΣΗ HEK-293T ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΚΑΤΙΟΝΙΚΟΥ ΠΟΛΥΜΕΡΟΥΣ ΡΕΙ	36
ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΕΠΙΔΕΚΤΙΚΩΝ ΓΙΑ ΧΗΜΙΚΟ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ ΚΥΤΤΑΡΩΝ XL1- BLUE (E.coli) ΜΕ ΤΟΝ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΟ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟ ΦΟΡΕΑ pcDNA4-TO (amp ^r) ΓΙΑ ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ ΤΗΣ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΙΝΗΣ ΚΑΘΩΣ ΚΑΙ ΜΕ ΕΝΑΝ ΜΗ- ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΟ.....	37
ΑΝΑΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΑΠΟΙΚΙΩΝ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΕΝΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ XL1-BLUE ΣΕ ΥΓΡΟ ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ	38

ΣΠΑΣΙΜΟ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ LYSIS BUFFER ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΚΑΤΑΜΕΤΡΗΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ	38
ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟΥ ΥΠΟ ΑΠΟΔΙΑΤΑΚΤΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ (SDS-PAGE) ΚΑΙ ΧΡΩΣΗ ΤΗΣ ΠΗΚΤΗΣ.....	40
ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ ΚΑΤΑ WESTERN (WESTERN BLOT).....	42
ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ WHOLE-CELL LYSATE	45
ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ RNA ΜΕ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΤΟΥ TRI REAGENT (SIGMA).....	45
ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟΥ ΧΡΟΝΟΥ ΣΕ ΔΥΟ ΣΤΑΔΙΑ (qRT-PCR)	46
4. Αποτελέσματα και Συζήτηση.....	47
4.1 Έλεγχος παραγωγής της αγγειογενίνης με ανοσοαποτύπωση κατά Western ...	47
4.2 Έλεγχος των επιπέδων mRNA της αγγειογενίνης σε κύτταρα Empty και Transfected με Real-Time PCR	50
4.3 Πρωτεομική ανάλυση και επεξεργασία των δεδομένων	50
4.4 Πιθανές πυρηνικές πρωτεΐνες των οποίων η έκφραση επηρεάζεται θετικά ή αρνητικά σε κύτταρα υπερεκφρασμένα με hAng	55
4.5 Συζήτηση	57
5. Βιβλιογραφία.....	58

I. Περίληψη

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 δραστηριότητα, 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 και αναστέλλοντας έτσι την έναρξη της μετάφρασης.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, πραγματοποιήθηκε υπερέκφραση της αγγειογενίνης στην κυτταρική σειρά HEK-293T με σκοπό την εύρεση και μελέτη των πρωτεϊνικών της αλληλεπιδράσεων. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε καλλιέργεια και διαμόλυνση κυττάρων HEK-293T με τη χρήση του κατιονικού πολυμερούς (PEI). Επιβεβαιώθηκε με Real-Time PCR ότι τα επίπεδα mRNA της hAng είναι υψηλότερα σε κύτταρα διαμολυσμένα με πλασμιδιακό φορέα για την κωδικοποίηση της hAng σε σχέση με κύτταρα διαμολυσμένα με τον ίδιο πλασμιδιακό φορέα που δεν περιείχε γονίδιο για την κωδικοποίηση της hAng. Για τον έλεγχο της παραγωγής της πρωτεΐνης πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση υπό αποδιατακτικές συνθήκες και

ανοσοαποτύπωση κατά Western, η οποία δεν υπέδειξε υπερέκφραση της hAng. Η φασματομετρία μάζας και η ανάλυση με ειδικά προγράμματα οδήγησε στην ταυτοποίηση διαφορετικών επιπέδων πρωτεϊνών που συμμετέχουν σε διάφορες διεργασίες, οι οποίες είναι πιθανόν να σχετίζονται με την έκφραση της hAng στα κύτταρα. Στην παρούσα εργασία αναφέρονται οι πυρηνικές πρωτεΐνες. Είναι κατανοητό ότι το πείραμα χρήζει περαιτέρω διερεύνησης και βελτιστοποίησης προκειμένου να προκύψουν αξιόπιστα αποτελέσματα.

II. Abstract

Human angiogenin (hAng) is a potent angiogenic factor with an important role in a variety of physiological and pathological conditions such as cell growth and development, wound healing, but also the establishment and metastasis of cancerous tumors. It has ribonucleolytic activity, which, is lower than that of RNase A, but is essential for its angiogenic activity. Extracellular hAng has the ability to activate various signal transduction pathways and it is also implicated in the extracellular matrix degradation by inducing cell migration and invasion. Normally, it accumulates in the nucleus / nucleus promoting mRNA transcription and rRNA transcription/procession. Under stress conditions it accumulates in the cytoplasm, promoting the formation of tiRNAs and thus inhibiting the initiation of translation.

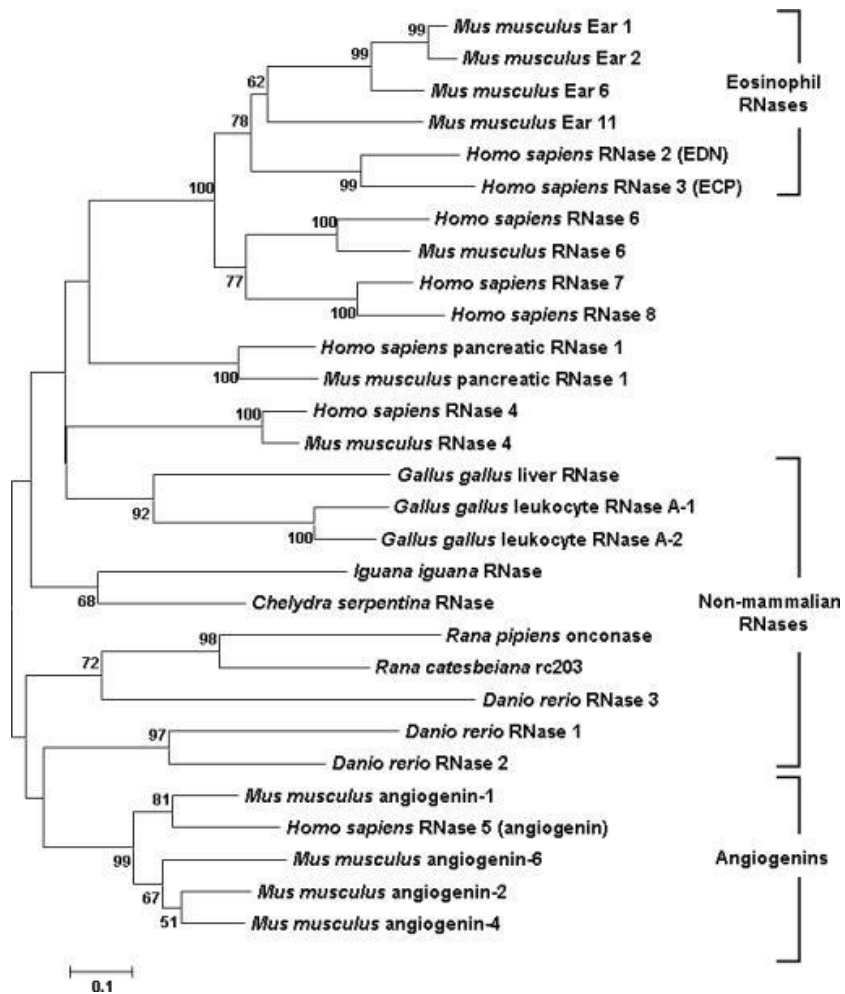
In the present diploma thesis, angiogenin was overexpressed in the HEK-293T cell line in order to find and study its protein interactions. Initially, HEK-293T cells were cultured and transfected using the cationic polymer (PEI). Real-Time PCR confirmed that hAng mRNA levels were higher in cells transfected with a plasmid vector encoding hAng than in cells transfected with the same plasmid vector that did not contain a gene encoding hAng. SDS-PAGE and Western Blot was performed to evaluate the production of the protein in the cells., which did not indicate overexpression of hAng. Mass spectrometry and analysis have led to the identification of different levels of proteins involved in various processes, that are possibly related to the expression of hAng in cells. Nuclear proteins are reported in the present work. Clearly, the experiment needs further and better investigation and optimization in order to obtain reliable results.

1. Εισαγωγή

1.1 Ριβονουκλεάσες

Οι ριβονουκλεάσες (RNases) αποτελούν μια υπεροικογένεια νουκλεασών που καταλύουν την υδρόλυση των 3', 5'-φωσφοδιεστερικών δεσμών στο RNA. Ουσιαστικά αποικοδομούν το RNA σε μικρότερα συστατικά, ώστε να ελέγχουν μετα-μεταγραφικά τον πληθυσμό τους στα κύτταρα. Οι RNases υπάρχουν σε όλους τους οργανισμούς, συμπεριλαμβανομένων των βακτηρίων, της μαγιάς, των φυτών και των ζώων, και σε όλους σχεδόν τους ιστούς και τα σωματικά υγρά των θηλαστικών. Μπορούν να χωριστούν σε δύο κατηγορίες: τις εξωκυτταρικές και τις κυτταροπλασματικές ή ενδοκυτταρικές.(Eun, 1996). Εκτός από τη λειτουργία τους στην αποικοδόμηση του RNA τα μέλη των RNases λειτουργούν επίσης στον έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης, στην ανάπτυξη και διαφοροποίηση των κυττάρων, στην προστασία των κυττάρων από παθογόνα και στην απόπτωση (MikawIrawng, 2016).

Έχει διαπιστωθεί ότι εμφανίζουν ποικίλες δραστηριότητες συμπεριλαμβανομένων αντιικών, ανοσορρυθμιστικών, αντικαρκινικών, αγγειογενετικών και αντιμυκητιασικών δραστηριοτήτων.(Ng, 2006). Θεωρούνται εναλλακτικά χημειοθεραπευτικά φάρμακα λόγω της κυτταροτοξικότητάς τους επειδή σε ορισμένες περιπτώσεις, επιτίθενται επιλεκτικά σε κακοήθη κύτταρα, προκαλώντας απόπτωση.(Makarova & Ilinskaya, 2003). Η ιστορία των RNases ξεκίνησε τη δεκαετία του 1960 με τη μελέτη της RNase του παγκρέατος των βοοειδών (RNase A). Είναι ίσως η πιο χαρακτηρισμένη από όλες τις γνωστές πρωτεΐνες θηλαστικών και πολλά από αυτά που έχουμε μάθει για τη χημεία και τον καταλυτικό μηχανισμό της είχαν άμεσο αντίκτυπο στην κατανόηση της φύσης και της εξέλιξης της υπεροικογένειας ριβονουκλεασών RNase A που φέρει το όνομά της.(Rosenberg 2008). Κατά τα τέλη της δεκαετίας του 1980, απομονώθηκαν αρκετές φαινομενικά «άσχετες» πρωτεΐνες από διαφορετικούς ιστούς, τα γονίδια τους κλωνοποιήθηκαν και αλληλουχήθηκαν, και αυτές οι πρωτεΐνες βρέθηκαν τελικά να έχουν σημαντική ομολογία αλληλουχίας με την RNase A. Στους ανθρώπους, η υπεροικογένεια RNase A περιέχει οκτώ διαφορετικά μέλη που έχουν δραστηριότητα ριβονουκλεάσης και όλα αυτά τα μέλη κωδικοποιούνται στο χρωμόσωμα 14. Δείχνουν μια τριτοταγή δομή που σταθεροποιείται από οκτώ κατάλληλα τοποθετημένες κυστεΐνες που σχηματίζουν διακριτούς δεσμούς δισουλφιδίου, με εξαίρεση την RNase 5, η οποία έχει έξι υπολείμματα κυστεϊνών. Η καταλυτική δραστηριότητα αυτών καθορίζεται από δύο υπολείμματα ιστιδίνης (H) και ένα κατάλοιπο λυσίνης (K), το οποίο βρίσκεται εντός ενός κοινού συντηρημένου μοτίβου αλληλουχίας CKxxNTF. Ποικίλουν στη δραστηριότητα ριβονουκλεάσης και στην προτίμηση νουκλεοτιδίων για διάσπαση υποστρώματος, ανεξάρτητα των θέσεων διάσπασης και αναγνώρισης του RNA.(Koczera et al., 2016; Rosenberg, 2008). Τα ιδρυτικά μέλη της υπεροικογένειας RNase A περιλαμβάνουν: α) την αγγειογενίνη (RNase 5), β) την ηωσινόφιλη κατιονική πρωτεΐνη (ECP / RNase 3), γ) την ηωσινόφιλη νευροτοξίνη (EDN / RNase 2) και δ) αρκετές από τις κυτταροτοξίνες ωκοκυττάρων βουβαλοβατράχου. Ένα φυλογενετικό δέντρο των ριβονουκλεασών αυτής της υπεροικογένειας φαίνεται παρακάτω στην *Εικόνα 1*. Η ηωσινόφιλη νευροτοξίνη (EDN) και η ηωσινόφιλη κατιονική πρωτεΐνη (ECP), είναι δύο από τις τέσσερις κύριες εκκριτικές πρωτεΐνες που απελευθερώνονται μετά την ενεργοποίηση των ηωσινόφιλων. Εμφανίζουν αντιικές και νευροτοξικές δραστηριότητες και έχουν επίσης περιγραφεί βακτηριοκτόνες και κυτταροτοξικές επιδράσεις από την ECP. Από την άλλη η αγγειογενίνη (RNase 5), η οποία όπως υποδηλώνει και το όνομά της επάγει την αγγειογένεση, μπορεί να ανιχνευθεί σε διαφορετικούς ιστούς και όργανα και σχετίζεται με μια σειρά (παθο) φυσιολογικών διεργασιών, συμπεριλαμβανομένης της νεοπλασίας, της αναπαραγωγής και της αναγέννησης κατεστραμμένου ιστού. Έχουν αποδειχθεί οι αντιμικροβιακές και αντιικές δράσεις της, καθώς και ο σημαντικός της ρόλος στις φλεγμονώδεις διαδικασίες και την άμυνα του ξενιστή.(Koczera et al., 2016). Η ιδιότητά τους να υδρολύουν το RNA είναι αυτή που τους προσδίδει τις βιολογικές τους δράσεις και γι'αυτό τα μέλη της υπεροικογένειας της RNase A έχουν προσελκύσει μεγάλο βιολογικό ενδιαφέρον.

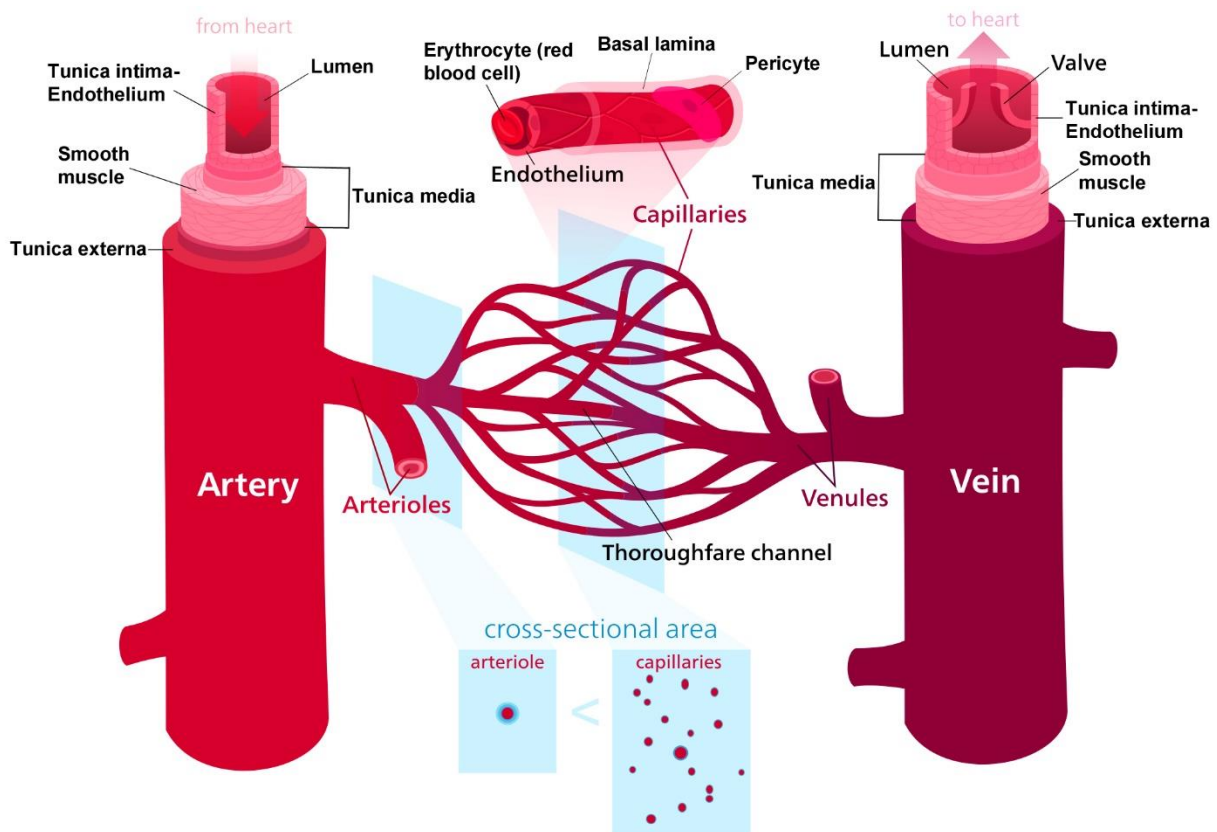


Εικόνα 1. Φυλογενετικό δέντρο της υπερικογένειας της RNase A (Rosenberg, 2008)

1.2 Αγγειακό Σύστημα/Αγγειογένεση

Αγγειακό Σύστημα

Το αγγειακό σύστημα, που ονομάζεται επίσης κυκλοφορικό σύστημα, αποτελείται από τρία είδη αιμοφόρων αγγείων με ρόλο τη μεταφορά του αίματος και ταυτόχρονα άλλων ουσιών σε μεγάλες αποστάσεις μέσα στον οργανισμό. Προμηθεύουν τα κύτταρα των θηλαστικών με οξυγόνο και θρεπτικά στοιχεία για την επιβίωσή τους και απομακρύνουν τα άχρηστα παραπροϊόντα του μεταβολισμού τους. Τα αγγεία του κυκλοφορικού συστήματος, τα οποία διεισδύουν σε όλους τους ιστούς του οργανισμού, είναι: α) Οι αρτηρίες (και τα αρτηρίδια), που μεταφέρουν οξυγονωμένο αίμα από την καρδιά προς το υπόλοιπο σώμα, β) οι φλέβες (και τα φλεβίδια), που επαναφέρουν το αίμα από το σώμα πίσω στην καρδιά, και γ) τα τριχοειδή παρεμβάλλονται μεταξύ αρτηριών και φλεβών και είναι αυτά που επιτρέπουν την ανταλλαγή ουσιών μεταξύ του αίματος και των κυττάρων των ιστών του σώματος. Οι αρτηρίες διασπώνται σε μικρότερα και μικρότερα κλαδιά (αρτηρίδια) για να φέρουν οξυγόνο και άλλα θρεπτικά συστατικά στα κύτταρα των ιστών και των οργάνων του σώματος. Τα αρτηρίδια διακλαδίζονται περαιτέρω στο εσωτερικό του οργάνου σε τριχοειδή. Καθώς το αίμα κινείται μέσω των τριχοειδών αγγείων, το οξυγόνο και άλλα θρεπτικά συστατικά μετακινούνται προς τα κύτταρα και η απόβλητη ύλη από τα κύτταρα μετακινείται στα τριχοειδή αγγεία. Καθώς το αίμα φεύγει από τα τριχοειδή αγγεία, σχηματίζονται μικρά φλεβίδια τα οποία γίνονται όλο και μεγαλύτερα (φλέβες) για να μεταφέρουν το αίμα πίσω στην καρδιά (Εικόνα 2). (Sherwood, 2013).

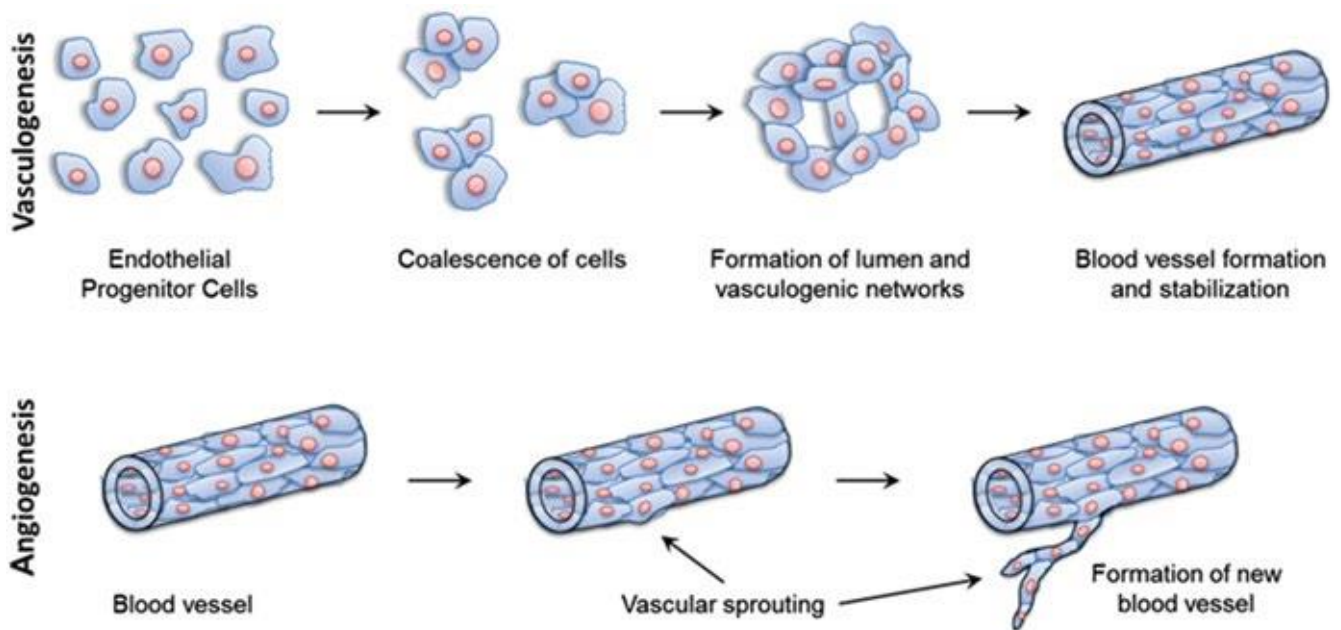


Εικόνα 2. Δομή και χαρακτηριστικά αιμοφόρων αγγείων (Betts et al., 2013)

Οι διαφορετικοί τύποι αιμοφόρων αγγείων διαφέρουν ελαφρώς στις δομές τους, αλλά έχουν τα ίδια γενικά χαρακτηριστικά. Κάθε τύπος αγγείου έχει έναν αυλό (lumen) μέσω του οποίου ρέει το αίμα. Οι αρτηρίες έχουν μικρότερους αυλούς από τις φλέβες. Και οι αρτηρίες και οι φλέβες έχουν τα ίδια τρία διαφορετικά στρώματα ιστών, που ονομάζονται χιτώνες (από τη λατινική ονομασία tunica). Από το πιο εσωτερικό στρώμα προς τα έξω, αυτοί οι χιτώνες είναι το tunica intima, το tunica media και το tunica externa. Το tunica intima αλληλεπιδρά με το περιεχόμενο του αυλού και αποτελείται από ένα μόνο στρώμα ενδοθηλιακών κυττάρων, τα οποία περιβάλλονται από τη βασική μεμβράνη. Η tunica media αποτελείται από λεία μυϊκά κύτταρα, τα οποία συμμετέχουν στην αλλαγή της διαμέτρου του αγγείου ρυθμίζοντας τη ροή και την πίεση του αίματος. Η tunica externa συγκροτεί το συνδετικό ιστό, ο οποίος αποτελείται από ίνες ελαστίνης και κολλαγόνου, καθώς είναι αυτή που στηρίζει και διατηρεί την ελαστικότητα των αγγείων. Τα τριχοειδή αγγεία αποτελούνται μόνο από ενδοθηλιακά κύτταρα, περικύτταρα και βασική μεμβράνη. Τα περικύτταρα και η βασική μεμβράνη περιβάλλουν τα ενδοθηλιακά κύτταρα είναι κρίσιμα για τη σταθερότητα των αγγείων. Αυτά τα δύο είδη κυττάρων μεταφέρουν όλες τις γενετικές πληροφορίες για το σχηματισμό του αυλού των αγγείων. Οι φλέβες έχουν λιγότερα λεία μυϊκά κύτταρα και συνδετικό ιστό σε σχέση με τις αρτηρίες. (Εικόνα 2). (Betts et al., 2013).

Αγγειογένεση

Δύο μηχανισμοί έχουν περιγραφεί για το σχηματισμό αιμοφόρων αγγείων κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, καθώς και μετά τον τοκετό. Ο ένας είναι η νεοαγγειογένεση (vasculogenesis) και ο άλλος είναι η αγγειογένεση (angiogenesis). Η νεοαγγειογένεση αποτελεί τον de novo σχηματισμό των αγγείων, ενώ κατά την αγγειογένεση δημιουργούνται νέα τριχοειδή από προϋπάρχοντα αγγεία. Η διαδικασία της νεοαγγειογένεσης λαμβάνει χώρα κατά την εμβρυική ανάπτυξη. Τα μεσοδερμικά κύτταρα στο πρώιμο έμβρυο διαφοροποιούνται σε ενδοθηλιακά προγονικά κύτταρα ή αγγειοβλάστες. Οι αγγειοβλάστες διαφοροποιούνται, πολλαπλασιάζονται και μεταναστεύουν, στην ακριβή τοποθεσία των μελλοντικών αγγείων, σχηματίζοντας αυλό και αγγειακά δίκτυα. Στη συνέχεια, το ενδοθύλιο περιβάλλεται από βασική μεμβράνη, λεία μυϊκά κύτταρα και περικύτταρα και έτσι οδηγούμαστε στο σχηματισμό νέων αιμοφόρων αγγείων. (Εικόνα 3). Η αγγειογένεση μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε με βλάστηση και επιμήκυνση νέων αγγείων από τα ήδη υπάρχοντα (sprouting angiogenesis) (Εικόνα 3), είτε με αναδιαμόρφωση υφιστάμενων αγγείων και εσωτερικής τους διαίρεσης (intussusceptive angiogenesis). (Στην εικόνα 3 δεν απεικονίζεται αυτός ο τρόπος). (Swift & Weinstein, 2009).



Εικόνα 3. Ο σχηματισμός νέων αιμοφόρων αγγείων μέσω νεοαγγειογένεσης και (sprouting) αγγειογένεσης (Peak et al., 2016)

Η αγγειογένεση είναι μία σύνθετη διαδικασία που απαιτεί την συνεργασία πολλών παραγόντων και περιλαμβάνει ορισμένα χρονικά και χωρικά ελεγχόμενα βήματα:

1) Αγγειοδιαστολή του υπάρχοντος αγγείου (συνήθως ένα μικρό φλεβίδιο ή ένα ολοκληρωμένο τριχοειδές) και διέγερση των ενδοθηλιακών κυττάρων με μια ποικιλία αγγειογενετικών παραγόντων, με τους καλύτερα χαρακτηρισμένους να είναι οι αυξητικοί παράγοντες VEGF's και FGF's, που προκαλούν τα ενδοθηλιακά κύτταρα να παράγουν και να εξάγουν πληθώρα πρωτεασών.

2) Αποικοδόμηση της βασικής μεμβράνης του υπάρχοντος αγγείου από τις πρωτεάσες (πλασμίνη, κολλαγενάση), επιτρέποντας στα διεγερμένα ενδοθηλιακά κύτταρα να περάσουν (με τη δημιουργία ψευδοποδιών) από τις οπές στη βασική μεμβράνη. Στη συνέχεια, εκτίθενται σε παράγοντες που σχετίζονται με τη μετανάστευση (κολλαγόνα I & II) και τον πολλαπλασιασμό τους, έτσι ώστε να σχηματιστεί ένα αγγειακό βλαστάρι.

3) Το βλαστάρι επιμηκύνεται και τα ενδοθηλιακά κύτταρα διαφοροποιούνται σχηματίζοντας τον αυλό. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα στα νέα αγγεία παράγουν τη νέα βασική μεμβράνη και ελκύουν τα περικύτταρα και τα λεία μυϊκά κύτταρα μέσω της παραγωγής αυξητικών παραγόντων.

4) Οι άκρες παράλληλα αυξανόμενων βλασταριών σχηματίζουν κυκλικά τριχοειδή, τα οποία επιμηκύνονται προς το αγγειακό ερέθισμα και είναι δυνατόν να αποτελέσουν την αρχή νέας αγγειογένεσης. Μέσα από τα κυκλικά τριχοειδή θα ξεκινήσει να ρέει το αίμα και έτσι ολοκληρώνεται η ωρίμανση των καινούργιων αγγείων και παράλληλα η αγγειογένεση. (Gerwins et al., 2000).

Όπως είδαμε, η αγγειογένεση σε φυσιολογικές συνθήκες χαρακτηρίζεται από αυστηρή ρύθμιση. Τα αγγεία αναπτύσσονται με οργανωμένο τρόπο και μόλις ικανοποιηθεί η ανάγκη για τροφοδοσία του ιστού με θρεπτικά συστατικά και

οξυγόνο, η παραγωγή του διεγερτικού παράγοντα σταματά και τα ενδοθηλιακά κύτταρα επέρχονται σε ηρεμία. Αγγειογένεση συμβαίνει και κατά την ενήλικη φάση της ζωής των ατόμων, σε φυσιολογικές καταστάσεις, όπως στην περίπτωση επούλωσης τραύματος ή κατά τη διάρκεια του έμμηνου κύκλου στις γυναίκες. Η διαταραχή των μηχανισμών της φυσιολογικής αγγειογένεσης έχει ρόλο στην παθογένεση ορισμένων ασθενειών με τη μορφή υπερπολλαπλασιασμού αιμοφόρων αγγείων όπως διάφοροι τύποι καρκίνων, ψωρίαση, αρθρίτιδα, αμφιβληστροειδοπάθειες, παχυσαρκία, άσθμα και αθηροσκλήρωση ή με τη μορφή μειωμένης αγγειογένεσης η οποία συμμετέχει σε ασθένειες όπως η καρδιακή και εγκεφαλική ισχαιμία, ο νευροεκφυλισμός, η υπέρταση, η οστεοπόρωση, η αναπνευστική δυσχέρεια, η προεκλαμψία, η ενδομητρίωση, η καρδιομυοπάθεια μετά τον τοκετό, καθώς και το σύνδρομο υπερδιέγερσης των ωοθηκών. Επομένως, είναι πολύ σημαντική η έρευνα και η μελέτη της αγγειογένεσης, διότι μπορεί να καλύψει τη δυνατότητα θεραπείας ενός φάσματος ασθενειών.(Taherigorabi & Khazaei, 2012).

Τα μονοπάτια σηματοδότησης που επάγονται και αξιοποιούνται σε φυσιολογικές αλλά και σε παθολογικές καταστάσεις από τις οποίες προκύπτει αγγειογένεση είναι τα ίδια. Στη σηματοδότηση αυτή σημαντικό ρόλο παίζουν ποικίλες πρωτεΐνες, γνωστές ως αγγειογενετικοί παράγοντες, και οι υποδοχείς τους. Με σημαντικότερους εκπροσώπους την οικεγένεια αυξητικών παραγόντων VEGF (vascular endothelial growth factor) που επιδρά άμεσα και των αυξητικών παραγόντων TNF (tumor necrosis factor) που επιδρά έμμεσα. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα εκφράζουν ένα ευρύ φάσμα αυξητικών παραγόντων και των αντίστοιχων υποδοχέων τους, οι οποίοι επάγουν την αγγειογένεση in vivo. Ανάλογα λοιπόν με συγκεκριμένα περιβαλλοντικά ή γενετικά γεγονότα, καθώς και με το άθροισμα αγγειογενετικών επαγωγέων και αναστολέων που είναι παρόντες, οδηγούμαστε σε μία φυσιολογική ή σε μία παθολογική αγγειογένεση. Στον πίνακα 1 παρουσιάζονται οι κύριοι θετικοί (αγγειογενετικοί παράγοντες) και αρνητικοί (αντι-αγγειογενετικοί παράγοντες) ρυθμιστές της αγγειογένεσης.(Weis & Cheresh, 2011).

Αγγειογενετικοί Παράγοντες	Αντι-αγγειογενετικοί Παράγοντες
Αυξητικός παράγοντας του αγγειακού ενδοθηλίου (VEGF)	Αγγειοστατίνη
Αυξητικός παράγοντας των αιμοπεταλίων (PDGF)	Ενδοστατίνη
Αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού α και β (TGF -α και -β)	Προλακτίνη
Επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (EGF)	Θρομβοσπονδίνη (TSP-1 και -2)
Παράγοντας νέκρωσης των όγκων (TNF-α)	Ιντερφερόνη (IFN) -α, -β, -γ
Αγγειογενίνη (ANG)	Ιντερλευκίνη-4, -12 (IL-4 ,IL-12)
Αγγειοποιητίνη-1 (Ang-1) / Ang-2 και υποδοχέας Tie2	Αγγειοαρρεστίνη

1.3 Ανθρώπινη Αγγειογενίνη (hAng)

Γενικά χαρακτηριστικά

Το γονίδιο που κωδικοποιεί Ang έχει αναγνωριστεί σε σχεδόν όλα τα σπονδυλωτά, συμπεριλαμβανομένων ψαριών, ερπετών, πτηνών και θηλαστικών, αλλά όχι στα ασπόνδυλα. Αναλύσεις πλήρους ή σχεδόν πλήρους γονιδιώματος θηλαστικών έδειξαν την απουσία Ang σε έξι είδη θηλαστικών (γίββωνας, γυμνός αρουραίος, ινδικό χοιρίδιο, σκύλος, γιγαντιαίο πάντα και αφρικανικός ελέφαντας). (Goo & Cho, 2013). Οι εξελικτικές και δομικές αναλύσεις έδειξαν ότι η οικογένεια Ang εξελίσσεται και αναπαράγεται από πρώιμα Ang-like γονίδια στα ψάρια. Μέχρι σήμερα, το ποντίκι έχει αποδειχθεί ότι διαθέτει τη μεγαλύτερη οικογένεια Ang, συμπεριλαμβανομένων πέντε γονιδίων Ang ποντικού (Ang1, Ang2, Ang4, Ang5 και Ang6) και τριών ψευδογονιδίων Ang (Ang-ps1-3). Ωστόσο, μόνο το Ang1 εμφανίζει αγγειογενετική δραστηριότητα και έχει την ίδια δομή με το ανθρώπινο γονίδιο Ang. (Jinghao & Zhengping, 2016). Συγκεκριμένα, οι θέσεις Ang ανθρώπου και ποντικού έχουν μια μοναδική γονιδιακή διάταξη, που χαρακτηρίζεται από κοινόχρηστους υποκινητές και 5'-αμετάφραστες περιοχές (5'-UTRs) που κατευθύνουν δύο ξεχωριστά εξόνια που κωδικοποιούν Ang και ριβονουκλεάση 4 (RNASE4, το τέταρτο μέλος της υπεροικογένειας RNase A), αντίστοιχα. Σε αυτή τη μοναδική γονιδιακή διάταξη, η μεταγραφή των Ang και RNASE4 ελέγχεται από έναν καθολικό ή έναν ειδικό για το ήπαρ υποκινητή. Καθώς ο υποκινητής εμπλέκεται γενικά στη ρύθμιση της μεταγραφής mRNA και η 5'-UTR επηρεάζει την απόδοση της μετάφρασης, τα επίπεδα έκφρασης των Ang και RNASE4 είναι παρόμοια. (Jinghao & Zhengping, 2016). Το γονίδιο που κωδικοποιεί ANG υπάρχει ως ένα αντίγραφο σε κάθε απλοειδές γονιδίωμα και εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 14 και πιο συγκεκριμένα στην περιοχή q11. Περιλαμβάνει ένα μόνο εξόνιο που πλαισιώνεται από μικρά UTRs. Η ανθρώπινη αγγειογενίνη (hAng) είναι μια βασική πρωτεΐνη μονής αλυσίδας που περιέχει 123 αμινοξέα, καθώς και ένα σηματοδοτικό πεπτίδιο 24 αμινοξέων πριν από αυτή, με μοριακό βάρος περίπου 14, 400 Da. (Εικόνα 4). Η αγγειογενίνη (ANG) απομονώθηκε πρώτη φορά από το ρυθμισμένο μέσο καλλιεργημένων κυττάρων HT-29 αδενοκαρκινώματος ανθρώπινου παχέος εντέρου, βάσει αποκλειστικά της αγγειογενετικής της δράσης. (Gao & Xu, 2008). Η ANG κατανέμεται σε φυσιολογικούς ανθρώπινους ιστούς και υγρά, όπως πλάσμα (σε συγκέντρωση 250 έως 360 ng/ml) (Hu et al., 1997), αμνιακό υγρό, μικροπεριβάλλον όγκου και εγκεφαλονωτιαίο υγρό (CSF). Το διαδεδομένο πρότυπο έκφρασης της ANG υποδηλώνει ότι οι φυσιολογικές και παθολογικές της λειτουργίες δεν περιορίζονται στη αγγειογένεση. Έχει αποδειχθεί ότι εμπλέκεται σε πολλές άλλες παθοφυσιολογικές διεργασίες, όπως ογκογένεση, νευροπροστασία, φλεγμονή, έμφυτη ανοσία, αναπαραγωγή και

MVMGLGVLLL VFVLGLGLTP PTLA	24
QDNSRYTHFL TQHYDAKPQG RDDRYSCEIM RRRGLTSPCK DINTFIHGK	50
RSIKAICENK NGNPHRENLR ISKSSFQVTT CKLHGGSPWP PCQYRATAGF	100
RNVVACENG LPVHLDQIF RRP	123

Εικόνα 4. Αμινοξική αλληλουχία της hAng. Τα αμινοξέα του σηματοδοτικού πεπτιδίου (1-24) περικλείονται με κουτί. Τα βασικά αμινοξέα για τη ριβονουκλεολυτική δράση (His13, Lys40 και His114) υποδεικνύονται με (+) και τα κατάλοιπα που είναι απαραίτητα για την αγγειογένεση υπογραμμίζονται (60-68 και 109). (Huret et al., 2013)

αναγέννηση κατεστραμμένων ιστών. (Jinghao & Zhengping, 2016). Η ANG ή RNase 5, όπως έχει προαναφερθεί, είναι το πέμπτο μέλος της υπερικογένειας RNase A και είναι 35% ταυτόσημη και 68% ομόλογη με την αλληλουχία της RNase A. Μία καθοριστική δομική διαφορά μεταξύ αγγειογενίνης και άλλων μελών της υπερικογένειας RNase είναι η απουσία τέταρτου δισουλφιδικού δεσμού σε αυτήν, με αποτέλεσμα δύο καταλοίπων κυστεΐνης που έχουν αντικατασταθεί. Ο ελλειπόμενος δισουλφιδικός δεσμός στην αγγειογενίνη έχει συνέπεια στη λειτουργία της στη διαδικασία της αγγειογένεσης και στη διέγερση των ενδοθηλιακών κυττάρων για το σχηματισμό νέων αγγείων. (Tello-Montoliu et al., 2006). Οι κρυσταλλικές δομές της hANG και της RNase A έχουν υψηλή ομοιότητα, αλλά υπάρχει αξιοσημείωτη διαφορά στο ριβονουκλεολυτικό ενεργό κέντρο. Στο καταλυτικό κέντρο (P1), πρωταρχικό ρόλο για τη ριβονουκλεολυτική δράση της hAng διακατέχουν 3 αμινοξικά κατάλοιπα: His13, Lys40 και His114, τα οποία είναι συντηρημένα από το ψάρι μέχρι τον άνθρωπο. (Riordan, 2001). Το κέντρο σύνδεσης βάσης πυριμιδίνης (B1) και το κέντρο δέσμευσης βάσης πουρίνης (B2) είναι επίσης παρόντα. Ωστόσο, το κέντρο B1 στην Ang φράσσεται από την πλευρική αλυσίδα του Gln-117 λόγω του σχηματισμού δύο δεσμών υδρογόνου με Thr-44, σε σύγκριση με τη δομή της RNase A. Η Ile1-19 και η Phe-120 σχηματίζουν ενδομοριακές υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, βοηθώντας έτσι να παραμείνει το Gln-117 στην αποφρακτική του θέση. Αυτό το μπλοκάρισμα του κέντρου B1 είναι ένας από τους λόγους της πολύ ασθενούς ριβονουκλεολυτικής δράσης της Ang, περίπου 10^5 - 10^6 χαμηλότερη από εκείνη της RNase A. Αν και χαμηλή, η δραστηριότητα ριβονουκλεάσης είναι απαραίτητη για τις λειτουργίες της Ang. (Gao & Xu, 2008), (Russo et al., 1996). Η hAng σε αντίθεση με την RNase A, έχει αγγειογενετική δράση η οποία οφείλεται σε τρεις σημαντικές δομικές διαφορές μεταξύ των δύο πρωτεϊνών.

Πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με ANG

Οι αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης εμπλέκονται σε ένα ευρύ φάσμα βιολογικών διεργασιών και έχουν γίνει ένα από τα κύρια θέματα της έρευνας πρωτεϊνών. Η πρώτη αναγνωρισμένη πρωτεΐνη που δεσμεύει ANG είναι ο ανθρώπινος αναστολέας ριβονουκλεάσης πλακούντα (RNH1), μια πρωτεΐνη 50-kDa πλούσια σε επαναλήψεις λευκίνης. Η ANG δεσμεύει τον RNH1 με εξαιρετικά χαμηλή

τιμή K_i 0,7 fM, η οποία είναι η πιο στενή δέσμευση πρωτεΐνης-πρωτεΐνης που έχει καταγραφεί μέχρι σήμερα. Η διεπαφή σύνδεσης ANG- και RNH1 καλύπτει μια μεγάλη επιφάνεια αλληλεπίδρασης και από τις δύο πρωτεΐνες. Ωστόσο, οι σημαντικές επαφές αφορούν μόνο το C-τερματικό τμήμα 434–460 του RNH1 και το αξιοσημείωτο καταλυτικό κατάλοιπο Lys-40 της ANG. Η δέσμευση του RNH1 αναστέλλει τόσο την ενζυμική όσο και την αγγειογενετική δράση της ANG. Η κυτταρική ANG συνδέεται με τον RNH1, και με αυτό τον τρόπο αποτρέπει την τυχαία διάσπαση του κυτταρικού RNA. Έχει επίσης αναφερθεί ότι ο RNH1 ρυθμίζει τον υποκυτταρικό εντοπισμό της ANG για τον έλεγχο της ανάπτυξης και της επιβίωσης. Στον παρακάτω πίνακα, αναγράφονται οι πρωτεΐνες (με τις ονομασίες των γονιδίων τους) που αλληλεπιδρούν με ANG με πειραματικά στοιχεία (Πίνακας 2).

Γονίδια πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με hAng	Τρόπος πειραματικής απόδειξης	Πηγή
RNH1	Co-crystal structure	Papageorgiou et al., 1997
TP53	Co-IP	Sadagopan et al., 2009
TDGF1	Two-hybrid	Stelzl et al., 2005
PTEN	Two-hybrid	Stelzl et al., 2005
ATP6AP1	Two-hybrid	Stelzl et al., 2005
MDM2	Co-IP	Sadagopan et al., 2009
ACTN2	Two-hybrid, GTS pull-down, FRET	Hu et al., 2005
FST	Two-hybrid, GTS pull-down, FRET	Gao et al., 2007
MYH9	Co-IP	Zhai et al., 2015
ACTN4	Co-IP	Zhai et al., 2015
ACTB	Co-IP	Zhai et al., 2015
FHL3	Two-hybrid, GTS pull-down, Co-IP	Xia et al., 2012
ANXA2	Co-IP	Gho et al., 1997
FBLN1	Pull-down, FRET	Zhang et al., 2008
ACTA1	Affinity Capture Western	Hu et al., 1993
HIST3H3	Affinity Capture Western	Sheng et al., 2014
PLSCR1	Two-hybrid, GTS pull-down, FRET	Zhu et al., 2013
HSF1	Pull-down	Bultman et al., 2015
SDC4	In situ proximity ligation assay	Skorupa et al., 2012
PCNA	Co-IP	Chatzileontiadou et al., 2017

Πίνακας 2. Γονίδια των οποίων οι πρωτεΐνες έχει αποδειχθεί πειραματικά ότι αλληλεπιδρούν με την hAng

Αυτές οι αλληλεπιδράσεις μπορούν να ταξινομηθούν σε διάφορες ομάδες λειτουργιών όπως: (i) κυτταρική μετανάστευση, προσκόλληση και εισβολή, (ii) κυτταρικός πολλαπλασιασμός (iii) κυτταρική απόπτωση.

Σχέση δομής & λειτουργίας (Μηχανισμοί δράσης)

Αυτές οι ειδικές δομές της Ang όχι μόνο εξηγούν τη μοναδική ριβονουκλεολυτική και αγγειογενετική δράση της, αλλά επίσης της παρέχουν διαφορετικές βιολογικές λειτουργίες. Οι δομές είναι οι εξής, και κάθε μία από αυτές συνδέεται άμεσα με ένα μηχανισμό δράσης της Ang, :1) Θέση πρόσδεσης σε υποδοχέα και πρόκληση αποικοδόμησης της βασικής μεμβράνης, 2) Θέση σύνδεσης με θεωρούμενη πρωτεΐνη 170kDa και στη συνέχεια μεταγωγή σήματος σε κυτόπλασμα, 3) Ακολουθία NLS μετατόπισης απευθείας στον πυρήνα των κυττάρων στόχων και στη συνέχεια ενίσχυση της μεταγραφής ριβοσωμικού RNA.

- 1) Η hAng διαθέτει μία περιοχή διαφορετική από την καταλυτική, η οποία ορίζεται ως θέση δέσμευσης κυττάρων και περιλαμβάνει τα κατάλοιπα αμινοξέων 60-68 και Asn-109. Η αγγειογενίνη αλληλεπιδρά με τα ενδοθηλιακά κύτταρα μέσω ειδικών υποδοχέων για να ενεργοποιήσει τις οδούς φωσφολιπάσης τους και συνδέεται ειδικά στην επιφάνειά τους. Αποδείχθηκε ότι συνδέεται με ένα συστατικό κυτταρικής επιφάνειας 42-kDa κυττάρων CPAE και GM7373, από όπου μπορεί και να αποσπαστεί. Μετά από χαρτογράφηση τρυπτικών πεπτιδίων και ανάλυση αλληλουχίας αμινοξέων, ταυτοποιήθηκε το συστατικό αυτό ως μέλος της οικογένειας ακτίνης μυϊκού τύπου. Μέσω ανοσοφθορισμού αποδείχθηκε ότι η α-ακτίνη των λείων μυών είναι το επιφανειακό συστατικό των καλλιεργημένων κυττάρων CPAE και μπορεί να αλληλεπιδράσει με την αγγειογενίνη. (Moroiianu & Riordan, 1994). Να σημειωθεί ότι, μεταλλαξιγόνες και χημικές μεταβολές στην θέση πρόσδεσης υποδοχέα συνοδεύονται από απώλεια αγγειογενετικής δραστηριότητας αλλά διατήρηση της ριβονουκλεολυτικής δράσης. Αντιθέτως, αν γίνει τροποποίηση σε οποιοδήποτε από τα κατάλοιπα ιστιδίνης του καταλυτικού κέντρου της hAng, έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια της ριβονουκλεολυτικής δράσης. Απαιτείται λειτουργική καταλυτική θέση καθώς και άθικτη θέση πρόσδεσης υποδοχέα για την ολοκληρωμένη/διπλή δράση της αγγειογενίνης. (Hu et al., 1991). Η κυτταρική επιφανειακή ακτίνη φαίνεται να εμπλέκεται στην υποβάθμιση της βασικής μεμβράνης. Κατά τη σύνδεση της αγγειογενίνης στην ακτίνη, μερικά από τα σύμπλοκα ANG-ακτίνης διαχωρίζονται από την κυτταρική επιφάνεια. Στη συνέχεια, αυτό το σύμπλοκο επιταχύνει τον ιστικό ενεργοποιητή πλασμινογόνου (tPA) που καταλύει την παραγωγή πλασμίνης από πλασμινογόνο. Η καταλυτική δραστηριότητα της πλασμίνης αυξάνει σημαντικά, αποικοδομώντας τη λαμινίνη, τη φιβρονεκτίνη και τη βασική μεμβράνη. Επομένως, μέσω του σχηματισμού του συμπλόκου ακτίνης, η ANG προάγει την αποικοδόμηση της βασικής μεμβράνης και της εξωκυτταρικής μήτρας και έτσι επιτρέπει στα ενδοθηλιακά κύτταρα να διεισδύσουν και να μεταναστεύσουν στον περιαγγειακό ιστό, βασικό στάδιο της αγγειογένεσης. (Gao & Xu, 2008).
- 2) Το γονίδιο της α-ακτίνης είναι ιδιосуστατικά εκφραζόμενο και η πρωτεΐνη του δεν μπορεί να θεωρηθεί ως ένας εξειδικευμένος υποδοχέας της hAng. Έπειτα από μελλοντικές μελέτες, βρέθηκε μία πρωτεΐνη μοριακού βάρους 170-kDa

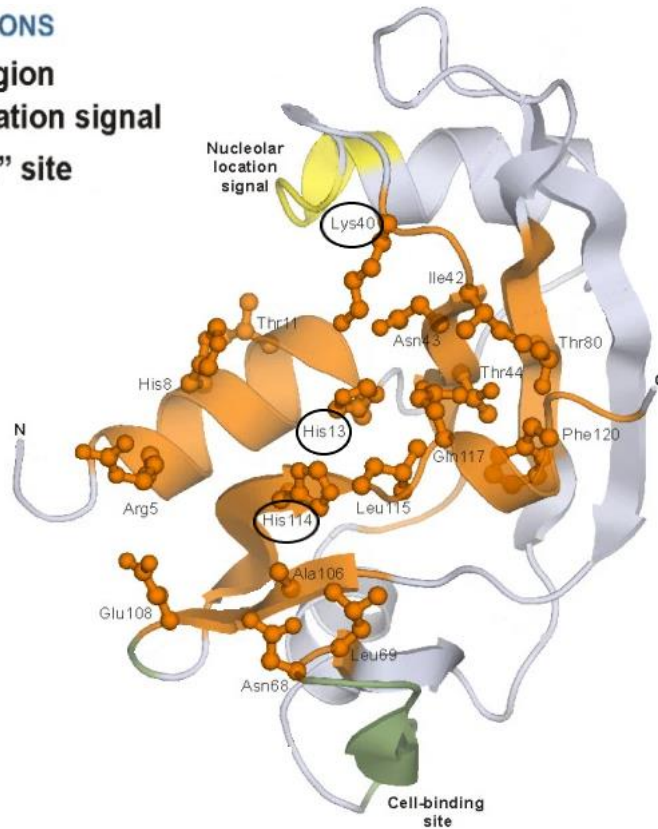
ως πιθανός υποδοχέας της ANG για μεταγωγή σήματος. Η πρωτεΐνη αυτή, βρίσκεται στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων και εκφράζεται μόνο σε ενδοθηλιακά κύτταρα που ανταποκρίνονται σε ANG αλλά είναι αραιά καλλιεργημένα ($<2 \times 10^4$ κύτταρα / cm^2). Η εκκρινόμενη ANG στο εξωκυτταρικό περιβάλλον όταν δεσμευτεί με τον υποδοχέα 170-kDa, ο οποίος δεν έχει ακόμη πλήρως χαρακτηριστεί, είναι δυνατόν να προκαλέσει μια σειρά αποκρίσεων σηματοδότησης στο κυτόπλασμα. Έχει αναφερθεί ότι η ANG μπορεί να ενεργοποιήσει την σχετιζόμενη με το σήμα εξωκυτταρική κινάση1/2 (ERK1/2), την πρωτεϊνική κινάση B/Akt σε κύτταρα ενδοθηλιακής ανθρώπινης ομφαλικής φλέβας (HUVE) και/ή να φωσφορυλιώσει τη σχετιζόμενη με το στρες πρωτεϊνική κινάση/c-Jun N-τερματική κινάση (SAPK / JNK) σε διαφορετικά κύτταρα στόχους. Η ενεργοποίηση αυτών των βασικών οδών σηματοδότησης από την ANG θεωρείται ότι παράγει περισσότερες ριβοσωμικές πρωτεΐνες, ενισχύει την κυτταρική ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό και με τον τρόπο αυτό οδηγούμαστε και στην περεταίρω αγγειογένεση.(Sheng & Xu, 2016),(Gao & Xu, 2008). Φαίνεται ότι ο υποθετικός υποδοχέας και η ακτίνη δεν εκφράζονται ποτέ ταυτόχρονα στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων. Τα δεδομένα υποδηλώνουν ότι συμμετέχουν σε συγκεκριμένες κυτταρικές λειτουργίες σε διαφορετικά στάδια της επαγόμενης από ANG αγγειογένεσης. Με το που δεσμευτεί η ANG στην ακτίνη της κυτταρικής επιφάνειας, ενεργοποιείται ένα σχετιζόμενο με κύτταρα σύστημα πρωτεάσης το οποίο προάγει την εισβολή των κυττάρων. Αφού τα κύτταρα αρχίσουν να μεταναστεύουν και να εισβάλουν στη βασική μεμβράνη, η τοπική πυκνότητα των κυττάρων κοντά στα μεταναστευτικά κύτταρα μειώνεται, προκαλώντας έτσι την έκφραση του υποτιθέμενου υποδοχέα ANG 170-kDa στα υπόλοιπα γειτονικά κύτταρα. Τα γειτονικά κύτταρα αποκρίνονται στη διέγερση της ANG και ως εκ τούτου χωρίζονται για να γεμίσουν το χώρο που δημιουργείται από τα κύτταρα που μετακινούνται. Όταν η κυτταρική πυκνότητα αυξηθεί, η έκφραση του υποδοχέα μπορεί να απενεργοποιηθεί. Με τον τρόπο αυτό είναι δυνατόν, τέτοιες εξαρτώμενες από την πυκνότητα εκφράσεις υποδοχέων να ρυθμίζουν την επαγόμενη από ANG ανάπτυξη του νέου τριχοειδούς δικτύου.(Gao & Xu, 2008), (Shestenko et al., 2001).

- 3) Η hAng έχει επίσης μια ακολουθία πυρηνικού εντοπισμού (NLS), η οποία αποτελείται από τα αμινοξέα: 30Met-Arg-Arg-Arg-Gly35 με το κατάλοιπο R33 να παίζει καθοριστικό ρόλο στη λειτουργία αυτή.(Sheng & Xu, 2016). Έχει αποδειχθεί ότι η αγγειογενίνη υφίσταται πυρηνική μετατόπιση στα ενδοθηλιακά και καρκινικά κύτταρα, σε κινητικούς νευρώνες, καθώς και σε κύτταρα λείου μυός. Η πυρηνική αυτή μετατόπιση είναι απαραίτητη για την αγγειογένεση που προκαλείται από την hAng, καθώς η αναστολή της πυρηνικής μετατόπισης της hAng ή η μεταλλαξιγένεση της αλληλουχίας του πυρηνικού εντοπισμού καταργεί την αγγειογενετική δράση της.(Gao & Xu, 2008). Η πυρηνική μετατόπιση της εξωγενούς αγγειογενίνης συμβαίνει πολύ γρήγορα μέσω ενδοκυττάρωσης διαμεσολαβούμενης από υποδοχέα. Είναι

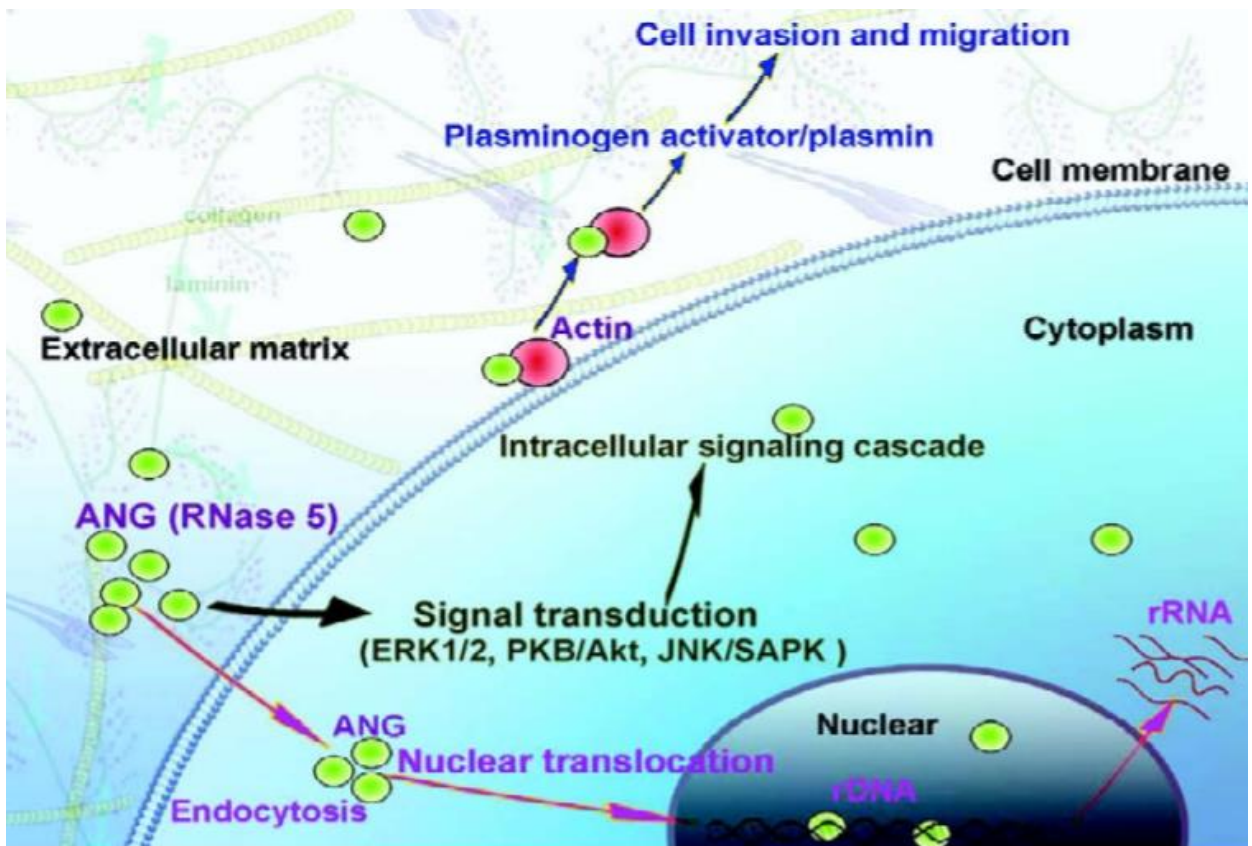
ανεξάρτητη από μικροσωληνίσκους και λυσοσώματα, όπως επίσης δεν είναι υποχρεωτική η ύπαρξη ιμπορτινών και πρωτεϊνών RAN (RAS-related Nuclear protein), οι οποίες χρησιμοποιούνται από συμβατικές NLSs. (Lixin et al., 2001). Αντιθέτως, έχει αποδειχθεί σε ενδοθηλιακά κύτταρα ότι εξαρτάται αυστηρά από την πυκνότητα των κυττάρων. Μειώνεται καθώς η πυκνότητα των κυττάρων αυξάνεται και σταματά όταν τα κύτταρα είναι πλήρη (confluent). Έχει βρεθεί, πως για να εισέλθει hAng στον πυρήνα αλλά όχι και για να εσωτερικευθεί, είναι απαραίτητη η ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης C (PLC). Αντίθετα, η νεομυκίνη που κατατάσσεται στα αμινογλυκοσιδικά αντιβιοτικά και αποτελεί γνωστό αναστολέα της PLC, αναστέλλει ισχυρά τόσο την πυρηνική μετατόπιση της αγγειογενίνης όσο και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων που προκαλείται από την αγγειογενίνη και την αγγειογένεση. Με κάθε αναστολή της PLC να οδηγεί σε συσσώρευση της hAng στο κυτταρόπλασμα και να προκαλεί μείωση των επιπέδων της στον πυρήνα. (Hu, 1998), (Bicknell & Vallee, 1988). Η αγγειογενίνη δεδομένου ότι το μοριακό βάρος της είναι μικρότερο από το όριο του μεγέθους των πυρηνικών πόρων (50-kDa), φαίνεται να εισέρχεται στον πυρήνα μέσω παθητικής διάχυσης και διατήρησής της εκεί χάρη στην περιοχή NLS. Η hAng με το που φτάσει στον πυρήνα, συσσωρεύεται εκεί όπου λαμβάνει χώρα η βιογένεση των ριβοσωμάτων. Έχει αποδειχθεί, ότι η πυρηνική hAng συνδέεται στην περιοχή υποκινητή του ριβοσωμικού DNA (rDNA) και διεγείρει τη μεταγραφή του rRNA. Επιπροσθέτως, έχει ταυτοποιηθεί το στοιχείο ABE, γνωστό για τις επαναλήψεις CTCT, το οποίο προσδένει την hAng. Έχει ταυτοποιηθεί από τη μη μεταγραφόμενη περιοχή του rDNA και έχει αποδειχθεί ότι λειτουργεί ως υποκινητής εξαρτώμενος από αγγειογενίνη σε μια δοκιμασία αναφοράς λουσιφεράσης. Η διεγερμένη από την hAng μεταγραφή rRNA σε ενδοθηλιακά κύτταρα έχει αποδειχθεί ότι χρησιμεύει ως σταυροδρόμι στη διαδικασία της αγγειογένεσης που προκαλείται από άλλους αγγειογενετικούς παράγοντες. Όπως ο όξινος και αυξητικός παράγοντας ινοβλαστών (aFGF), ο βασικός παράγοντας ανάπτυξης ινοβλαστών (bFGF) και ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF). Συνοψίζοντας, η μεταγραφή των rRNA που επάγεται από την αγγειογενίνη στα ενδοθηλιακά κύτταρα, διακατέχει σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της αγγειογένεσης και χρειάζεται την πυρηνική μετατόπιση. (Gao & Xu, 2008), (Li & Hu, 2010). Η κρυσταλλική δομή της hAng και οι λειτουργικές περιοχές της παρουσιάζονται στην εικόνα 5 και οι λειτουργίες που προκύπτουν από τα τρία δομικά χαρακτηριστικά της hAng φαίνονται συνοπτικά στην εικόνα 6.

FUNCTIONAL REGIONS

- Active site region
- Nucleolar location signal
- “Cell-Binding” site



Εικόνα 5. Η κρυσταλλική δομή της hAng και οι λειτουργικές περιοχές της (Osorio et al., 2007)



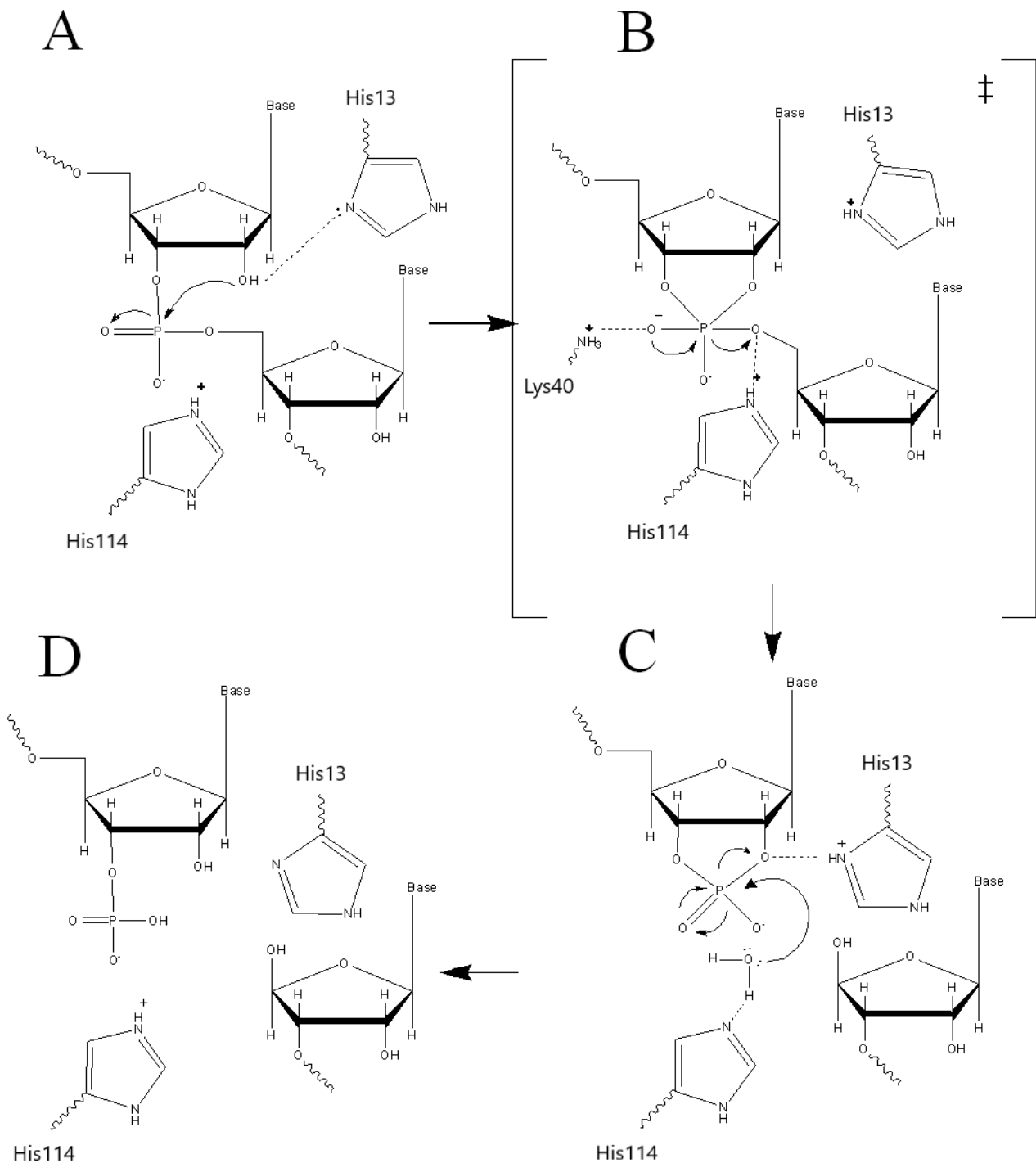
Εικόνα 6. Μηχανισμοί λειτουργίας/δράσης της αγγειογενίνης κατά τη διαδικασία της αγγειογένεσης (Gao & Xu, 2008)

Ριβονουκλεολυτική δράση της αγγειογενίνης

Όπως η RNase A, έτσι και η αγγειογενίνη καταλύει την ενδονουκλεολυτική διάσπαση μορίων RNA και ολιγοριβονουκλεοτιδίων, συγκεκριμένα τη διάσπαση του δεσμού P-O5' στην 3' θέση των πυριμιδινών (κυτοσίνης, ουρακίλης), και συχνότερα όταν το επόμενο νουκλεοτίδιο φέρει ως βάση την αδενίνη. Παρ' όλα αυτά, σε πειράματα όπου το υπόστρωμα είναι το 5S RNA, παρατηρούνται διαφορετικά πρότυπα διάσπασης για τα δύο ένζυμα, με την αγγειογενίνη να υδρολύει συγκεκριμένους δεσμούς, διαφορετικούς από αυτούς της RNase A και αντίστροφα. (Rybak & Vallee, 1988). Η ριβονουκλεολυτική δραστηριότητα της Ang έχει αναφερθεί παραπάνω ότι είναι 10^4 - 10^6 φορές χαμηλότερη από εκείνη της RNase A, αλλά παρ' όλα αυτά είναι απαραίτητη για την αγγειογενετική της δράση. Ο καταλυτικός μηχανισμός παραμένει κοινός και αποτελείται από δύο στάδια: στο πρώτο στάδιο δημιουργείται ένα 2',3'-κυκλοφωσφορικό ενδιάμεσο και στο δεύτερο στάδιο υδρολύεται έτσι ώστε να παραχθεί το τελικό προϊόν. . Πιο αναλυτικά στο στάδιο 1: το κατάλοιπο His13 αποπρωτονιώνει την ομάδα 2'OH του ριβονουκλεοτιδίου που θα παραμένει με τον φωσφοδιεστερικό δεσμό, προάγοντας έτσι στην πυρηνόφιλη προσβολή στο 2'οξυγόνο του ηλεκτρονιόφιλου φωσφόρου. Στη συνέχεια σχηματίζεται μια μεταβατική κατάσταση, που έχει ένα πεντασθενές φωσφορικό άλας, το οποίο σταθεροποιείται από την θετικά φορτισμένη αμινομάδα του καταλοίπου Lys40 καθώς και από την κύρια αλυσίδα αζώτου αμιδίου του Phe120. Έπειτα, το His114 δρα ως οξύ και πρωτονιώνει το 5' οξυγόνο του ριβονουκλεοτιδικού δακτυλίου που θα αποκοπεί από τον φωσφοδιεστερικό δεσμό (αντίδραση SN2). Με αυτό τον τρόπο, η κατάσταση μετάβασης τελειώνει και σχηματίζεται ένα 2'3' κυκλικό φωσφορικό ενδιάμεσο. Στο 2^ο στάδιο: σε μια δευτερεύουσα και ξεχωριστή αντίδραση, το 2',3' κυκλικό φωσφορικό ενδιάμεσο υπόκειται σε υδρόλυση με αποτέλεσμα ένα μείγμα 2' φωσφορικού και 3' υδροξυλίου. Το His13 θα δωρίσει ένα πρωτόνιο στην αποχωρούσα ομάδα αυτής της αντίδρασης, δηλαδή στο 3' οξυγόνο του κυκλικού ενδιάμεσου. Ταυτόχρονα, το His-114 ενεργεί τώρα ως βάση, αφαιρώντας το πρωτόνιο από ένα μόριο νερού, επιτρέποντάς του να εκτελέσει μια πυρηνόφιλη επίθεση. Το ενεργοποιημένο μόριο νερού προσβάλλει το κυκλικό φωσφορικό προκαλώντας τη διάσπαση του ενδιάμεσου κυκλικού φωσφορικού 2'3'. Το κομμένο νουκλεοτίδιο στη συνέχεια απελευθερώνεται με 3' φωσφορική ομάδα. (Raines, 1998). Όλα αυτά φαίνονται παρακάτω στην εικόνα 7.

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
- 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

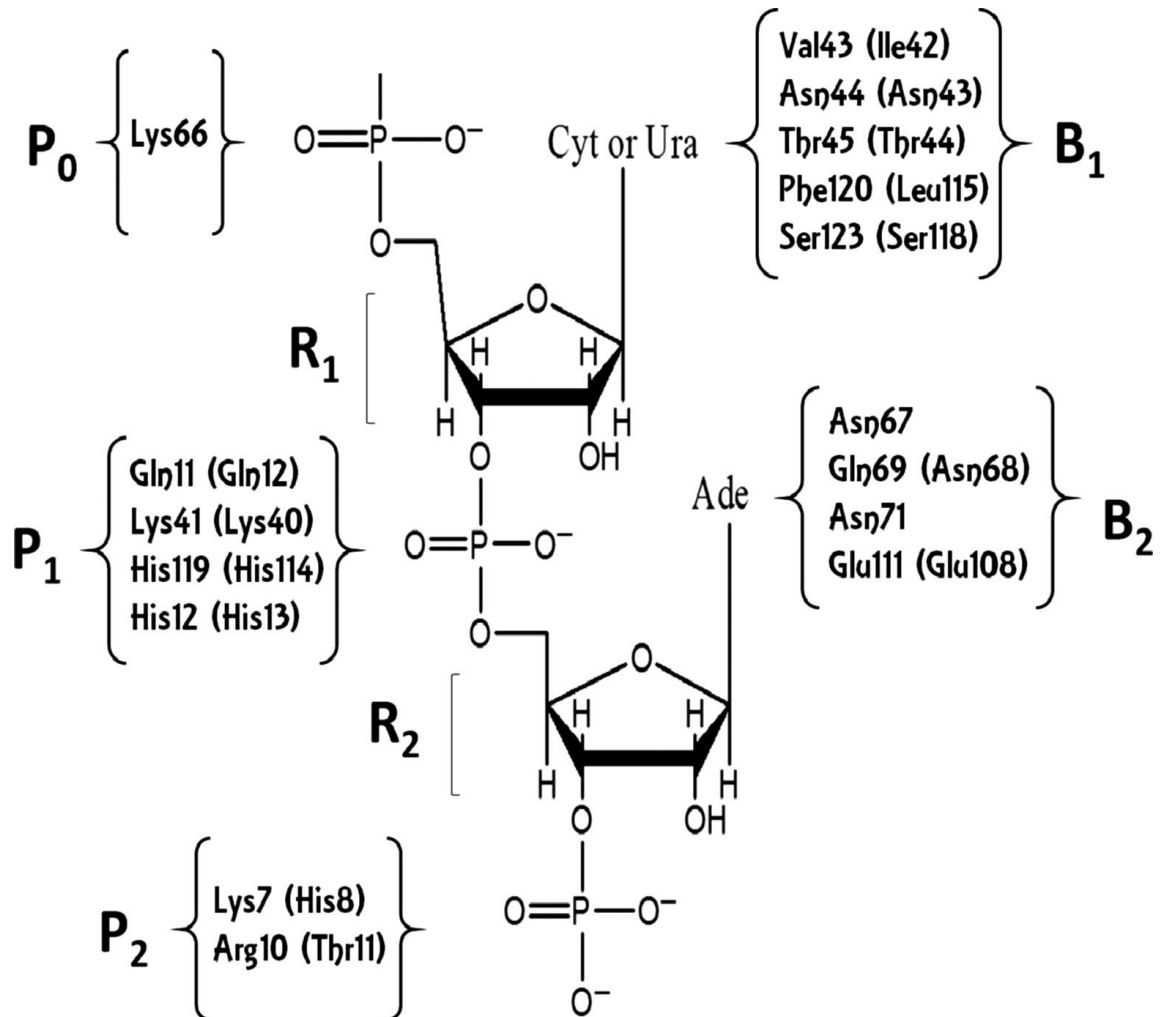


Εικόνα 7. Ο καταλυτικός μηχανισμός της αγγειογενίνης. A,B: Στάδιο 1. C,D: Στάδιο 2 (Raines, 1998)

- η περιοχή αλληλεπίδρασης με τη βάση του νουκλεοτιδίου (περιοχή B2) που φέρει το 5'-O κατά τη διάσπαση, με τα κατάλοιπα Asn68 και Glu108.(Chatzileontiadiou et al., 2016).

Τα κατάλοιπα που υπάρχουν στις παραπάνω περιοχές και είναι καθοριστικά για την πραγματοποίηση της αντίδρασης είναι αρκετά συντηρημένα και στην RNase A. Η hAng παρουσιάζει 10-30 φορές μεγαλύτερη προτίμηση (σε όρους kcat/Km) για υποστρώματα που στη θέση B1 φέρουν κυτιδίνη παρά ουριδίνη.(Russo et al., 1996). Στην RNase A, δύο περιοχές, η P0 και P2, προσδένουν τις φωσφορικές ομάδες της 5' και 3' θέσης του υπό διάσπαση φωσφοδιεστερικού δεσμού αντίστοιχα. Κινητικές

μελέτες υποστηρίζουν την ύπαρξη της περιοχής P2 και στην hAng, με τα αμινοξικά κατάλοιπα που απαρτίζουν την περιοχή αυτή να διαφέρουν από τα αντίστοιχα στην RNase A (His8 και Thr11 για την hAng, Lys7 και Arg10 αντίστοιχα για την RNase A), ενώ η περιοχή P0 φαίνεται να απουσιάζει από την αγγειογενίνη. (Leland et al., 2002). Στην εικόνα 8, φαίνονται τόσο τα κατάλοιπα του ενεργού κέντρου της RNase A όσο και της αγγειογενίνης εντός των παρενθέσεων. Έχει διαπιστωθεί από αρκετές



Εικόνα 8. Το ενεργό κέντρο της RNase A με τα αμινοξικά κατάλοιπα. Σε παρένθεση βρίσκονται τα αμινοξικά κατάλοιπα της αγγειογενίνης (Chatzileontiadiou et al., 2016)

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, 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. (Shapiro et al., 1986), (Shapiro et al., 1987). Επιπλέον, διαφορά υπάρχει και στη σταθερά Km η οποία ισούται με 62 mM στην αγγειογενίνη σε τιμή pH 5.9, ενώ στην RNase A με 0.5 mM. (Russo et al., 1996). 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. 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.(Leland et al., 2002).

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.

Λειτουργίες της hAng

Η αγγειογενίνη πέρα από τις βασικές δράσεις της, ριβονουκλεολυτική και αγγειογενετική, επιτελεί και κάποιες άλλες λειτουργίες. Εντοπίζεται σε διάφορες υποκυτταρικές περιοχές όπως στην κυτταρική μεμβράνη, το κυτταρόπλασμα, τον πυρήνα και τον πυρηνίσκο, έχοντας διακριτές λειτουργίες και επιπρόσθετα, εκκρίνεται από πολλούς κυτταρικούς τύπους, αλλά ο μηχανισμός παραμένει άγνωστος.(Li & Hu, 2012). Δρα λοιπόν όχι μόνο ενδοκυτταρικά, αλλά και εξωκυτταρικά, παρουσιάζοντας τόσο αυτοκρινή όσο και παρακρινή δράση.(Sadagoran et al., 2009). Αλληλεπιδρά με ενδοθηλιακά, λεία μυϊκά και καρκινικά κύτταρα στα οποία επάγει και ρυθμίζει ένα ευρύ φάσμα κυτταρικών αποκρίσεων συμπεριλαμβανομένου τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, τη μετανάστευση, την εισβολή, την προσκόλληση ή/και τη διαφοροποίηση σε αυτά. Παρόλο που υπάρχουν πολλές αναφορές που έχουν επικεντρωθεί στις λειτουργίες της ANG, η οποία έχει εντοπιστεί σε ανθρώπινα όργανα, όπως η καρδιά, ο σπλήνας, ο πνεύμονας, το συκώτι, το κόλον, ο προστάτης, το στήθος, ο εγκέφαλος, ο αμφιβληστροειδής, τα μελανοκύτταρα και η ακροποσθία, υπάρχει έλλειψη απευθείας in vivo δεδομένων για τον πλήρη προσδιορισμό των ρόλων της ANG σε φυσιολογικές και παθοφυσιολογικές διαδικασίες. Συνολικά, η ANG θεωρείται ότι παίζει ρόλους στην εγκυμοσύνη, την έμφυτη ανοσία, την ογκογένεση, τον νευροεκφυλισμό και άλλες παθολογικές καταστάσεις.(Sheng & Xu, 2016).

Τόσο ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων όσο και η αγγειογένεση που επάγεται από τους, αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF), βασικός αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών (bFGF), όξινο αυξητικό παράγοντας των ινοβλαστών (aFGF) και επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (EGF), εξαρτώνται άμεσα από την hAng, καθώς η μείωση των επιπέδων της, οδηγεί σε μείωση της μεταγραφής του rRNA, της βιογένεσης των ριβοσωμάτων και του κυτταρικού πολλαπλασιασμού που επάγεται από αυτούς τους αγγειογενετικούς παράγοντες. Επιπλέον, ενώσεις που αναστέλλουν την πυρηνική μετατόπιση της hAng, όπως η νεαμίνη (νεομυκίνη A) και η ακτίνη, εξαλείφουν την αγγειογενετική δραστηριότητα αυτών των παραγόντων.(Moroiianu & Riordan, 1994),(Kishimoto et al., 2005).

Η αγγειογενίνη είναι επίσης πιθανό να συμμετάσχει στη διαδικασία επούλωσης τραυμάτων και αναγέννησης ιστών που σχετίζονται με την απόκριση του ξενιστή στον τραυματισμό. Η αγγειογενίνη συνδέεται με την ακτίνη και αυτό το σύμπλοκο είναι πιο αποτελεσματικό από την ακτίνη μόνη της, στη διέγερση του t-PA για την παραγωγή πλασμίνης, το οποίο παίζει ουσιαστικό ρόλο σε διαδικασίες όπως

επούλωση τραυμάτων, φλεγμονή, ακόμη και μετάσταση καρκινικών κυττάρων. (Hu & Riordan, 1993).

Η ANG εμπλέκεται στην αγγείωση του εμβρύου και στην ανοσολογική ανοχή. Η εγκυμοσύνη είναι μια φυσιολογική κατάσταση που προκαλεί αγγειογένεση και αγγειακή αναδιαμόρφωση σε φυσιολογικούς ιστούς. Το επίπεδο ANG στον ορό αυξάνεται σε απλές κυήσεις, υποδηλώνοντας ότι η ANG μπορεί να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στην φυσιολογική αγγειακή ανάπτυξη κατά την προγεννητική περίοδο. Πράγματι, η ANG εκφράζεται κατά την πρώιμη ανάπτυξη του πλακούντα στον άνθρωπο. Έχει αναφερθεί ότι η κυτταροτροφοβλάστη μπορεί να απελευθερώσει ANG μέσω παρακρινής σηματοδότησης για να διεγείρει τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων. Το ANG εκφράζεται επίσης σε κύτταρα φθαρτού υμένα από πλακούντα πρώτου τριμήνου και υπάρχει σε στρωματικά και επιθηλιακά κύτταρα του πλακούντα, με αυξημένη έκφραση στο ενδομήτριο στις φάσεις της μέσης και αργότερης έκκρισης, καθώς και στην πρώιμη κύηση. Το περιβάλλον κυτταροτροφοβλάστης είναι γνωστό ότι είναι ανοσοκατασταλτικό. Είναι πιθανό ότι η ANG, ένας ανοσοδιαμορφωτής, θα μπορούσε να συμμετάσχει στη μητρική ανοσολογική ανοχή έναντι του ημι-αλλογενούς εμβρύου. (Sheng & Xu, 2016).

Η ANG εμπλέκεται στην έμφυτη ανοσία και σχετίζεται με ποικίλη φλεγμονώδη ενεργοποίηση. Στην έμφυτη άμυνα του ξενιστή, η ANG είναι ένα συστατικό των δακρύων και προστατεύει την οφθαλμική επιφάνεια ως αντιμικροβιακό πεπτίδιο. Επίσης η ANG παράγεται άφθονα στα κύτταρα Paneth και έχει αποδειχθεί ότι δρα ως παράγοντας για την έμφυτη αντιμικροβιακή άμυνα του εντέρου. Εκτός από τις αντιβακτηριακές δραστηριότητες, το ANG έχει επίσης αντιϊκές ιδιότητες. Ως μία από τις δύο RNases που παράγονται από πρωτογενή T κύτταρα, η ANG μπορεί να καταστείλει την αντιγραφή των στελεχών του X4 HIV. Τα μεσολαβούμενα από ANG TiRNAs είναι επίσης αυξημένα και άφθονα σε χρόνια λοίμωξη από ηπατίτιδα B και C, υποδηλώνοντας ότι η ANG μπορεί να παίζει ρόλο σε ιογενείς λοιμώξεις. Επιπλέον, η ANG μπορεί να έχει αντιφλεγμονώδη δράση επειδή οι συγκεντρώσεις πρωτεΐνης στον ορό είναι αυξημένες κατά τη διάρκεια της φλεγμονώδους απόκρισης ή της θεραπείας από τον παράγοντα νέκρωσης όγκου άλφα και ιντερλευκίνης-1β. Οι μηχανισμοί με τους οποίους η ANG καταστέλλει τη φλεγμονώδη απόκριση μπορεί να περιλαμβάνει την αναστολή της μεσολαβούμενης από TBK1 πυρηνικής μετατόπισης NF-κB. Απαιτούνται επιπλέον δεδομένα για την υποστήριξη αυτής της πρότασης. Επιπλέον, το ANG μπορεί να αναστέλλει την αποκοκκίωση των πολυμορφοπύρηνων λευκοκυττάρων, υποδηλώνοντας ότι η ANG μπορεί να συμμετέχει σε ενδογενείς ανασταλτικούς μηχανισμούς για την εξισορρόπηση των προερχόμενων από πλάσμα μορίων που απελευθερώνονται κατά τη διάρκεια φλεγμονωδών αποκρίσεων. (Sheng & Xu, 2016).

Ακόμη, η hAng ρυθμίζει αρνητικά την απόπτωση και επάγει την κυτταρική επιβίωση, αναστέλλοντας την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53. Έχει αποδειχθεί πως αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη αυτή αναστέλλοντας τη φωσφορυλίωσή της,

προωθώντας την αλληλεπίδραση p53-Mdm2 και αυξάνοντας την ουβικουϊτινίωση της p53.(Sadagoran et al., 2012). Τέλος, στον πυρήνα, έχει βρεθεί ότι προσδέεται σε μία αλληλουχία DNA του γονιδίου του οιστρογονικού υποδοχέα ERR γ , αναστέλλοντας τη μεταγραφή του και προωθώντας τον πολλαπλασιασμό καρκινικών κυττάρων.(Ang et al., 2013).

Όλες αυτές και πολλές άλλες πιθανές λειτουργίες της αγγειογενίνης μπορούν να χρησιμοποιηθούν με ποικίλους τρόπους σε διαφορετικές περιπτώσεις(πχ ως διαγνωστικά εργαλεία). Ωστόσο, απαιτούνται περισσότερες μελέτες για την αποσαφήνιση όλων των πιθανών χρήσεων στο μέλλον.

Αγγειογενίνη και ασθένειες

Η αγγειογενίνη είναι ένας ισχυρός επαγωγέας του σχηματισμού αιμοφόρων αγγείων, ο οποίος παίζει ρόλους σε διάφορες φυσιολογικές διεργασίες όπως, αναπαραγωγή, φλεγμονή, επούλωση πληγών, άμυνα ξενιστή αλλά και σε παθολογικές καταστάσεις, όπως ογκογένεση, νευροεκφυλιστικές παθήσεις, καρδιαγγειακές παθήσεις και άλλες μη κακοήθης παθολογικές διεργασίες. Οι περισσότερες σχετικές μελέτες έχουν επικεντρωθεί στη σύγκριση μεταξύ φυσιολογικών και παθολογικών επιπέδων της ANG στον ορό.(Yu et al., 2018). Για να προκληθεί αγγειογένεση, η εκκρινόμενη ANG πρέπει να συνδεθεί με την ακτίνη επιφανειακής μεμβράνης των ενδοθηλιακών κυττάρων του αγγείου για να ενεργοποιήσει τους καταρράκτες πρωτεάσης, υποβαθμίζοντας έτσι τη βασική μεμβράνη και την εξωκυτταρική μήτρα για να επιτρέψει στο ενδοθηλιακό κύτταρο να διεισδύσει και να μεταναστεύσει. Τα αραιά ενδοθηλιακά κύτταρα στη συνέχεια εκφράζουν υποδοχείς ANG οι οποίοι μεσολαβούν στην πυρηνική μετατόπισή της για την ενίσχυση της βιογένεσης ριβοσωμάτων, με αποτέλεσμα τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων. Τα πολλαπλασιασμένα ενδοθηλιακά κύτταρα τελικά σχηματίζουν νέο σωλήνα αίματος και εναποτίθενται από κύτταρα λείου μυός, τα οποία επίσης διεγείρονται από ANG, για ωρίμανση ως νέο αιμοφόρο αγγείο. Δεδομένου ότι η ANG παίζει βασικούς ρόλους στην ανάπτυξη και την επιβίωση των κυττάρων, τα ανώμαλα επίπεδα ή μεταλλάξεις αγγειογενίνης παρατηρούνται συνήθως σε μια ποικιλία ασθενειών, υποδηλώνοντας ότι η ANG μπορεί να αποδειχθεί ένας πολύτιμος διαγνωστικός ή προγνωστικός δείκτης για ορισμένες ασθένειες. Μελέτες έχουν δείξει ότι η συγκέντρωση αγγειογενίνης στον ορό σε υγιείς πληθυσμούς είναι $336,14 \pm 142,83$ ng/ml και παραμένει σχετικά σταθερή σε διαφορετικούς πληθυσμούς και περιοχές.(Yu et al., 2018).

Η ογκογένεση είναι μια διαδικασία πολλαπλών σταδίων που περιλαμβάνει όχι μόνο γενετικές και επιγενετικές αλλαγές στα καρκινικά κύτταρα αλλά και επιλεκτικές υποστηρικτικές συνθήκες του μικροπεριβάλλοντος του όγκου. Η προοδευτική ανάπτυξη πρωτογενών νεοπλασμάτων και μεταστάσεων εξαρτάται από την επαρκή παροχή αίματος. Είναι επόμενο ότι, η αγγειογένεση, απαιτείται για την επέκταση των όγκων πέρα από τα 1-2 mm.(Miyake et al., 2015). Μελέτη έχει δείξει ότι η ANG υπερεκφράζεται σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα σε σύγκριση με τα ανθρώπινα καλοήθη κύτταρα. Ο χειρισμός της έκφρασης ANG σε μια ομάδα μετασχηματισμένων

ανθρώπινων κυτταρικών σειρών έδειξε ότι τα επίπεδα ANG συσχετίζονται όχι μόνο με το σχηματισμό ενδοθηλιακού σωλήνα, αλλά και με την προστασία των καρκινικών κυττάρων από κακές συνθήκες επιβίωσης, την προώθηση του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων, την ενίσχυση της μετανάστευσης και της εισβολής των καρκινικών κυττάρων και την επαγωγή της αγγειογένεσης.(Sheng & Xu, 2016). Η ANG απομονώθηκε αρχικά από καλλιιεργημένα καρκινικά κύτταρα και βρέθηκε να έχει την ικανότητα να ενισχύει την πρωτογενή και τη μεταστατική ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων. Η μηχανική έρευνα αποκάλυψε ότι η ANG δρα μέσω της σηματοδότησης ERK1/2, η οποία με τη σειρά της, ρυθμίζει την έκφραση του ενζύμου MMP2 που αναδιαμορφώνει τον ιστό. Διαταραχές στην οδό σηματοδότησης ERK1/2 έχουν παρατηρηθεί στο ~ 30% όλων των κακοηθειών και θεωρείται ότι εμπλέκονται στην έναρξη της ογκογένεσης.(Miyake et al., 2015). Η έκκριση ANG αυξάνεται σημαντικά στα κακοήθη μελανώματα του ανθρώπου και στις κυτταρικές σειρές καρκίνου του τραχήλου της μήτρας σε υποξικά περιβάλλοντα. Ο επαγόμενος από υποξία παράγοντας-1, ένας παράγοντας μεταγραφής που ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων που ανταποκρίνονται στην υποξία, είναι απαραίτητος για την ενεργοποίηση της έκφρασης ANG σε κύτταρα που εκτίθενται σε υποξία. Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι η ANG απενεργοποιεί το p53, συμπεριλαμβανομένης της αναστολής της φωσφορυλίωσης της σερίνης-15 της και της επακόλουθης σύνδεσης του Mdm2, με αποτέλεσμα την ουβικουιτίνωση του p53. Η πρωτεΐνη p53 είναι τόσο ισχυρός καταστολέας των όγκων που αδρανοποιείται σχεδόν σε κάθε περίπτωση δημιουργίας όγκου. Ωστόσο, ο μηχανισμός που διέπει τη ρύθμιση της κυτταρικής επιβίωσης και της απόπτωσης από την ANG είναι ακόμη σε μεγάλο βαθμό άγνωστος.(Sheng & Xu, 2016). Έχει καταγραφεί υπερέκφραση της αγγειογενίνης σε αρκετές μορφές καρκίνου συμπεριλαμβανομένου: του παχέος εντέρου, της οξείας μυελογενής λευχαιμίας (AML), του πολλαπλού μυελώματος (MM), των μυελοδυσπλαστικών συνδρόμων (MDSs),(Yu et al., 2018), του γαστρικού, του παγκρέατος, του μαστού, του ουροθηλίου,(Tello-Montoliu et al., 2006),του προστάτη (Majumder et al., 2003), του ενδομητρίου (Chopra et al., 1997), των ωοθηκών (Barton et al., 1997), του τραχήλου της μήτρας (Chopra et al., 1998), του γλοιώματος χαμηλής κακοήθειας (αστροκύτωμα) (Eberle et al., 2000), του νεφροβλαστώματος (όγκος του Wilms) (Sköldenberg et al., 2001). Οι συγκεντρωτικές εκτιμήσεις μας έδειξαν ότι τα επίπεδα ANG στον ορό σε ασθενείς με καρκίνο ήταν σημαντικά υψηλότερα από αυτά σε υγιείς μάρτυρες. Συγκεκριμένα, τα επίπεδα ANG στον ορό σε ασθενείς με καρκίνο ήταν 96,21 ng/ml υψηλότερα από αυτά των αντίστοιχων υγιών μαρτύρων.(Yu et al., 2018). Τέλος, έχει παρατηρηθεί μείωση των επιπέδων της αγγειογενίνης στους όγκους μετά τη θεραπεία και, σε ορισμένες περιπτώσεις, αύξηση με την υποτροπή του όγκου. Ενόψει του τελευταίου, έχει προταθεί ότι η αγγειογενίνη μπορεί να είναι κλινικά χρήσιμη στην παρακολούθηση κάποιας θεραπείας για καρκίνο και στην ανίχνευση υποτροπής του όγκου.(Tello-Montoliu et al., 2006).

Το 2004 δημοσιεύθηκε η πρώτη μελέτη που υποδηλώνει τη σχέση μεταξύ της ANG με μία από τις πιο κοινές νευροεκφυλιστικές παθήσεις παγκοσμίως την

αμυοτροφική πλευρική σκλήρυνση – ALS (amyotrophic lateral sclerosis). Μέχρι σήμερα, έχουν εντοπιστεί συνολικά 29 μοναδικές, μη συνώνυμες παραλλαγές του γονιδίου ANG σε 6471 ασθενείς με ALS και 3146 ασθενείς με PD (Parkinson Disease), επίσης μία από τις πιο κοινές νευροεκφυλιστικές ασθένειες, σε σύγκριση με 7668 άτομα ελέγχου. Έχουν αποδειχθεί αρκετές μεταλλάξεις ότι επηρεάζουν την ριβονουκλεολυτική δραστηριότητα, την ικανότητα πυρηνικής μετατόπισης και την αγγειογενετική δράση της Ang. Στην πραγματικότητα, το ANG είναι το πρώτο γονίδιο «απώλειας λειτουργίας» που έχει εντοπιστεί σε ασθενείς με ALS και PD μέχρι σήμερα. Η Ang είναι ο δεύτερος αγγειογενετικός παράγοντας που σχετίζεται με την παθογένεση του ALS. Ποντικοί με ομόζυγη διαγραφή στο στοιχείο που ανταποκρίνεται στην υποξία του γονιδίου VEGF έδειξαν έναν φαινότυπο τύπου ALS. Περαιτέρω μελέτες έδειξαν ότι ο VEGF έχει νευροπροστατευτικές λειτουργίες στους κινητικούς νευρώνες όχι μόνο με την αύξηση της νευροαγγειακής αιμάτωσης αλλά και μέσω άμεσων επιδράσεων στα ίδια τα νευρωνικά κύτταρα. Καθώς η μεταγραφή του rRNA με τη μεσολάβηση της ANG είναι απαραίτητη για την διέγερση της αγγειογένεσης μέσω του VGF, είναι πιθανό ότι μια ανεπάρκεια στη λειτουργία της ANG μπορεί επίσης να επηρεάσει τις φυσιολογικές δράσεις του VEGF έναντι των κινητικών νευρώνων.(Sheng & Xu, 2016). Από την άλλη πλευρά, παραμένει ασαφές εάν τα επίπεδα ANG στον ορό σχετίζονται με νευροεκφυλιστικές ασθένειες. Το συμπέρασμα 5 συσχετιζόμενων μελετών, είναι ότι τα επίπεδα ANG στον ορό δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ ασθενών με νευροεκφυλιστικές ασθένειες και υγιών μαρτύρων. Με βάση, θεωρούμε ότι ίσως η λειτουργική και δομική ακεραιότητα της ANG να είναι πιο σημαντική από τα επίπεδα της στον ορό όσον αφορά τις νευροεκφυλιστικές νόσους.(Yu et al., 2018).

Η αγγειογένεση είναι συχνή σε καρδιαγγειακές παθήσεις (CVD), στις οποίες περιλαμβάνονται: η στεφανιαία νόσος (CAD), το οξύ στεφανιαίο σύνδρομο (ACS), η καρδιακή ανεπάρκεια και άλλες ασθένειες. Μία μετα-ανάλυση 8 μελετών που διερευνούν τις σχέσεις μεταξύ των επιπέδων ANG και των καρδιαγγειακών παθήσεων, έδειξαν ότι τα επίπεδα ANG στον ορό σε ασθενείς με CVD ήταν σημαντικά υψηλότερα από εκείνα σε υγιή άτομα ελέγχου. Τα επίπεδα ANG στον ορό ήταν 116,22 ng/ml υψηλότερα σε ασθενείς με CVD από εκείνους στους αντίστοιχους υγιείς μάρτυρες. Όσον αφορά τα επίπεδα ANG σε συγκεκριμένους υποτύπους καρδιαγγειακών παθήσεων, τα επίπεδα ANG στον ορό ήταν αυξημένα σε ασθενείς με CAD σε σύγκριση με υγιείς μάρτυρες, σε αντίθεση με τα επίπεδα Ang στον ορό ασθενών με ACS, τα οποία δεν παρουσίασαν σημαντική διαφορά με εκείνα των υγιών μαρτύρων. Επιπλέον, ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια, το τυπικά τελικό στάδιο των περισσότερων CVD, παρουσίασαν αυξημένα επίπεδα ANG στον ορό σε σύγκριση με υγιείς μάρτυρες. Συνολικά, τα αποτελέσματα, μας δείχνουν ότι τα αυξημένα επίπεδα ANG στον ορό σχετίζονται με την επιδείνωση της καρδιακής λειτουργίας.(Yu et al., 2018).

Η αγγειογενίνη παίζει επίσης ρόλο σε μια ποικιλία μη κακοηθών παθολογικών καταστάσεων, όπως η ενδομητρίωση, η περιφερική αγγειακή νόσος, η φλεγμονώδης νόσος του εντέρου (IBD), η ρευματοειδής αρθρίτιδα, ο διαβήτης και η παχυσαρκία. Η

πλειονότητα των σχετικών μελετών επικεντρώθηκε στο επίπεδο ANG στον ορό. Για παράδειγμα, οι ασθενείς με περιφερική αποφρακτική αρτηριακή νόσο, τη σοβαρότερη μορφή της, βρέθηκε να έχουν υψηλότερα επίπεδα ANG σε σύγκριση με εκείνους με ήπια ή μέτρια σοβαρότητα της νόσου. Η υπέρταση, ένας σημαντικός παράγοντας κινδύνου για θρομβωτικά επεισόδια, έχει χαρακτηριστεί από χαμηλά επίπεδα ANG στον ορό, που προάγει την εμφάνιση της νόσου. Τα επίπεδα ANG είναι σημαντικά υψηλότερα σε ασθενείς με IBD από ό, τι σε υγιείς μάρτυρες. Επιπλέον, τα επίπεδα ANG αυξάνονται επίσης σε παιδιά και εφήβους ασθενείς με διαβήτη τύπου 1. Επομένως, η αλλαγή στο επίπεδο ANG στον ορό μπορεί ενδεχομένως να είναι ένας δείκτης αυτών των ασθενειών. (Sheng & Xu, 2016).

1.4 Πρωτεομική (Proteomics)

Εισαγωγή

Η Πρωτεομική είναι η μεγάλης κλίμακας μελέτη των πρωτεωμάτων. Ένα πρωτέωμα είναι το σύνολο των πρωτεϊνών που παράγονται σε έναν οργανισμό, σύστημα ή βιολογικό πλαίσιο. Proteomics είναι ο χαρακτηρισμός του πρωτεώματος, συμπεριλαμβανομένης της έκφρασης, της δομής, των λειτουργιών, των αλληλεπιδράσεων και των τροποποιήσεων των πρωτεϊνών σε οποιοδήποτε στάδιο. Μπορούμε να αναφέρουμε, για παράδειγμα, το πρωτέωμα ενός είδους (για παράδειγμα, Homo sapiens) ή ενός οργάνου (για παράδειγμα, του ήπατος). Το πρωτέωμα δεν είναι σταθερό, διαφέρει από κύτταρο σε κύτταρο και αλλάζει με την πάροδο του χρόνου καθώς και σε απόκριση σε εξωτερικά ερεθίσματα. Σε κάποιο βαθμό, το πρωτέωμα αντανακλά το αντίστοιχο μεταγράφημα (Το μεταγράφημα είναι το σύνολο όλων των μορίων RNA, συμπεριλαμβανομένων mRNA, rRNA, tRNA και μη κωδικοποιητικού RNA που παράγεται σε ένα κύτταρο ή σε έναν πληθυσμό κυττάρων). Ωστόσο, η δραστηριότητα κάθε πρωτεΐνης (συχνά εκτιμάται από τον ρυθμό αντίδρασης των διεργασιών στις οποίες εμπλέκεται η πρωτεΐνη) διαμορφώνεται επίσης από πολλούς παράγοντες, πέρα από το επίπεδο έκφρασης του σχετικού γονιδίου. Η Πρωτεομική χρησιμοποιείται για τη διερεύνηση:

- του πότε και του πού εκφράζονται οι πρωτεΐνες
- του ρυθμού παραγωγής πρωτεϊνών, της αποδόμησης και της σταθερής κατάστασης αφθονίας
- της τροποποίησης των πρωτεϊνών (για παράδειγμα, μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων (PTM) όπως φωσφορυλίωση)
- της κίνησης των πρωτεϊνών μεταξύ των υποκυτταρικών διαμερισμάτων
- της συμμετοχής των πρωτεϊνών στις μεταβολικές οδούς
- της αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών μεταξύ τους

Η Πρωτεομική επίσης, μπορεί να παρέχει σημαντικές βιολογικές πληροφορίες για πολλά βιολογικά προβλήματα, όπως: ποιες πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν με μια συγκεκριμένη πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει (για παράδειγμα, την πρωτεΐνη καταστολής όγκου p53), ποιες πρωτεΐνες εντοπίζονται σε ένα υποκυτταρικό διαμέρισμα (για παράδειγμα, το μιτοχόνδριο), ποιες πρωτεΐνες εμπλέκονται σε μια βιολογική διαδικασία (για παράδειγμα, στον κερκάδιο ρυθμό). Είναι ζωτικής

σημασίας για την έγκαιρη διάγνωση νόσου, την πρόγνωση και την παρακολούθηση της ανάπτυξης της νόσου. Επιπλέον, έχει ζωτικό ρόλο στην ανάπτυξη φαρμάκων ως μόρια στόχους.(Magrane & UniProt Consortium, 2011), (Aslam et al., 2017).

ESI – MS/MS(Electrospray ionization- Tandem mass spectrometry)

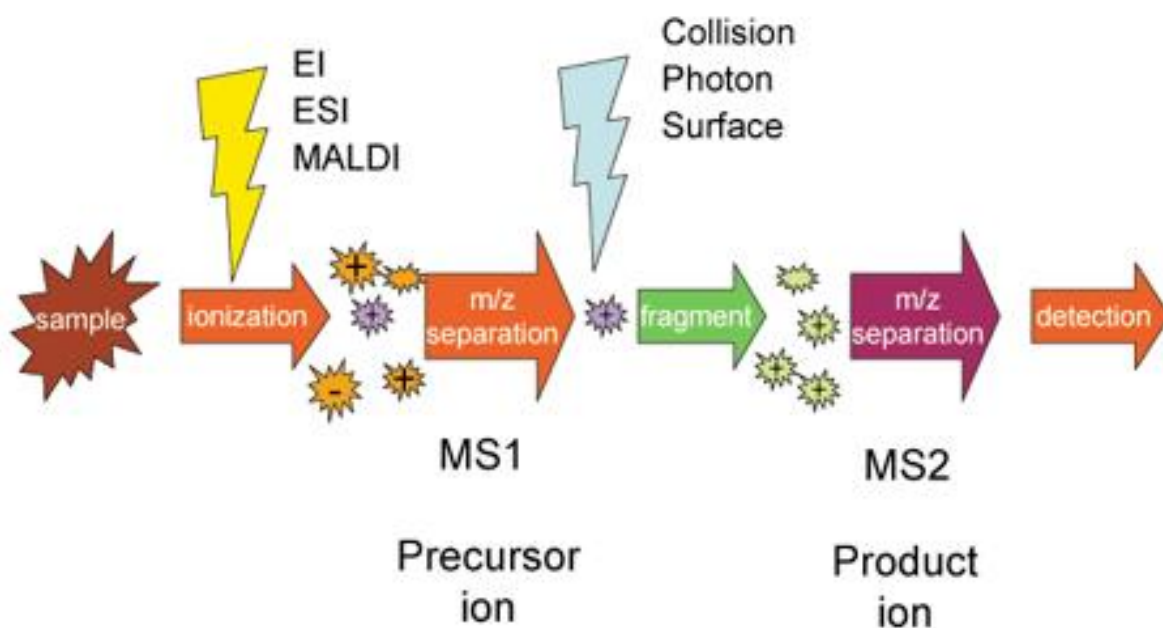
Η φασματομετρία μάζας (MS) έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για την ανάλυση βιολογικών δειγμάτων και έχει εξελιχθεί σε ένα απαραίτητο εργαλείο για την πρωτεϊμική έρευνα. Μεταξύ των αρκετών τεχνικών με τις οποίες οι πρωτεΐνες μπορούν να διερευνηθούν σε μεγάλη κλίμακα, η φασματομετρία μάζας (MS) έχει κερδίσει δημοτικότητα λόγω της ικανότητάς της να χειρίζεται τις πολυπλοκότητες που σχετίζονται με το πρωτεώμα. Η χρήση της MS για την πρωτεομική δεν είναι η εφαρμογή μίας μεμονωμένης τεχνικής για όλους τους σκοπούς, αλλά μάλλον μια συλλογή μεθοδολογιών, καθεμία με κατάλληλες δυνατότητες για συγκεκριμένες έρευνες. Για οποιοδήποτε πείραμα MS, πρέπει να εξεταστεί ο τύπος οργάνων, η μέθοδος κατακερματισμού και η στρατηγική ανάλυσης που ταιριάζει καλύτερα σε ένα μεμονωμένο δείγμα.(Han et al., 2008). Η MS είναι μια αναλυτική τεχνική που μπορεί να παρέχει τόσο ποιοτικές (δομή) όσο και ποσοτικές (μοριακή μάζα ή συγκέντρωση) πληροφορίες για τα μόρια του αναλύτη μετά τη μετατροπή τους σε ιόντα. Τα μόρια ενδιαφέροντος εισάγονται αρχικά στην πηγή ιονισμού του φασματομέτρου μάζας, όπου ιονίζονται πρώτα για να αποκτήσουν θετικά ή αρνητικά φορτία. Τα ιόντα στη συνέχεια ταξιδεύουν μέσω του αναλύτη μάζας και φτάνουν σε διαφορετικά μέρη του ανιχνευτή σύμφωνα με την αναλογία μάζας / φορτίου (m/z). Αφού τα ιόντα έρθουν σε επαφή με τον ανιχνευτή, δημιουργούνται και καταγράφονται χρήσιμα σήματα από ένα σύστημα υπολογιστή. Ο υπολογιστής εμφανίζει τα σήματα γραφικά ως φάσμα μάζας που δείχνει τη σχετική αφθονία των σημάτων σύμφωνα με την αναλογία m/z τους.(Ho et al., 2003).

Για να αναλυθούν βιολογικά δείγματα με MS, τα μόρια πρέπει να φορτωθούν και να στεγνώσουν. Αυτό επιτυγχάνεται μετατρέποντάς τα σε απομονωμένα ιόντα. Οι δύο πιο κοινές μέθοδοι για αυτό είναι η ESI(Electrospray ionization) και η MALDI(matrix-assisted laser desorption/ionization). Και στις δύο μεθόδους, τα πεπτίδια μετατρέπονται σε ιόντα με την προσθήκη ή απώλεια ενός ή περισσοτέρων πρωτονίων. Οι ESI και MALDI είναι «μαλακές» μέθοδοι ιονισμού που επιτρέπουν το σχηματισμό ιόντων χωρίς σημαντική απώλεια της ακεραιότητας του δείγματος. Αυτό είναι σημαντικό επειδή επιτρέπει να ληφθεί ακριβής πληροφορία της μάζας των πρωτεϊνών και των πεπτιδίων στις φυσικές τους καταστάσεις.

Η ESI χρησιμοποιεί ηλεκτρική ενέργεια για να βοηθήσει τη μεταφορά ιόντων από το διάλυμα στην αέρια φάση προτού υποβληθούν σε φασματομετρική ανάλυση μάζας. Η μεταφορά ιόντων από διάλυμα στην αέρια φάση με ESI περιλαμβάνει τρία στάδια: (1) διασπορά ενός ψεκασμού φορτισμένων σταγονιδίων, ακολουθούμενη από (2) εξάτμιση του διαλύτη και (3) εξώθηση ιόντων από τον πολύ φορτισμένο σωλήνα σταγονιδίων, ο οποίος διατηρείται σε υψηλή τάση (π.χ. 2,5 - 6,0 kV) σε σχέση με το τοίχωμα του περιβάλλοντος θαλάμου. Είναι ιδιαίτερα χρήσιμο στην παραγωγή ιόντων από μακρομόρια επειδή υπερνικά την τάση αυτών των μορίων να

μετατρέπονται σε θραύσματα όταν ιονίζονται. Το ESI διαφέρει από άλλες διεργασίες ιονισμού, καθώς μπορεί να παράγει πολλαπλά φορτισμένα ιόντα, επεκτείνοντας αποτελεσματικά το εύρος μάζας του αναλυτή για να καλύψει τις τάξεις μεγέθους kDa-MDa που παρατηρούνται σε πρωτεΐνες και στα ανάλογα πολυπεπτιδικά τους θραύσματά.(Ho et al., 2003).

Tandem mass spectrometry, επίσης γνωστή ως MS/MS ή MS², είναι μια τεχνική όπου δύο ή περισσότεροι αναλυτές μάζας συνδέονται μαζί χρησιμοποιώντας ένα πρόσθετο βήμα αντίδρασης για να αυξήσουν τις ικανότητές τους να αναλύουν χημικά δείγματα. Μια κοινή χρήση του MS/MS είναι η ανάλυση βιομορίων, όπως πρωτεϊνών και πεπτιδίων. Τα μόρια ενός δεδομένου δείγματος ιονίζονται, π.χ. από ιονισμό ηλεκτρονίων(EI), ESI ή MALDI, και το πρώτο φασματόμετρο (ορίζεται MS¹) διαχωρίζει αυτά τα ιόντα με την αναλογία μάζας προς φορτίο. Τα ιόντα ενός συγκεκριμένου λόγου m/z που προέρχονται από το MS¹ επιλέγονται και στη συνέχεια κατασκευάζονται για να χωριστούν σε μικρότερα θραύσματα ιόντων, π.χ. με διαχωρισμό που προκαλείται από σύγκρουση(CID), με αντίδραση ιόντος-μορίου ή με φωτοδιάσπαση. Αυτά τα θραύσματα στη συνέχεια εισάγονται στο δεύτερο φασματόμετρο μάζας (MS²), το οποίο με τη σειρά του διαχωρίζει τα θραύσματα με την αναλογία m/z και τα ανιχνεύει. Το στάδιο κατακερματισμού καθιστά δυνατή την αναγνώριση και τον διαχωρισμό ιόντων που έχουν πολύ παρόμοιες αναλογίες m/z σε φασματόμετρα κανονικής μάζας.(Bythell et al., 2012).



Εικόνα 9. Απεικόνιση της Tandem mass spectrometry (K. Murray)

2. Σκοπός

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

γονιδιακή έκφραση. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκε η σειρά HEK-293T και χρησιμοποιήθηκε η καταλληλότερη και αποτελεσματικότερη μέθοδος διαμόλυνσης για την κυτταρική σειρά HEK-293T με τη χρήση του κατιονικού πολυμερούς PEI. Κατά τη διαμόλυνση με το κατιονικό πολυμερές PEI έχει παρατηρηθεί έντονη αύξηση των επιπέδων έκφρασης της αγγειογενίνης τόσο σε σχέση με μη διαμολυσμένα κύτταρα μάρτυρες όσο και με κύτταρα που είχαν διαμολυνθεί με CaCl₂, μία άλλη μέθοδο διαμόλυνσης. Στη συνέχεια, τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα των κυττάρων θα αναλυθούν με φασματομετρία μάζας, ESI-MS/MS, με τελικό στόχο την εύρεση πρωτεϊνών που τα επίπεδα έκφρασής τους αυξάνονται ή μειώνονται με την υπερέκφραση της αγγειογενίνης, καθώς και τη συσχέτιση των λειτουργιών που επιτελούν.

3. Υλικά και Μεθοδολογία

3.1 Υλικά

Αντιδραστήρια

Αντιδραστήριο	Εταιρία Παροχής
2-propanol	Sharlau
Acetic Acid (CH ₃ COOH)	Scharlau
Acrylamide	SERVA
Agarose	NIPPON GENETICS
Ammonium Persulfate (APS)	SERVA
Ampicillin	SIGMA
Bradford Protein Assay	Bio-rad
Coomassie Brillinat Blue R-250	Panreac
Deoxycholic acid Na-salt	SERVA
disodium Hydrogen Phosphate (Na ₂ HPO ₄)	MERCK
Dithiothreitol (DTT)	SERVA
EDTA	Panreac
Ethanol Absolute	SIGMA
FastGene Scriptase II cDNA Synthesis Kit	NIPPON Genetics
Glycerol	Panreac
Glycine	SERVA
Hepes	SIGMA
Hydrochloric Acid (HCl)	MERCK
Ifosol 3 (Film Developer)	Iford
LB Agar	SERVA
LB Broth	SIGMA-Aldrich
Loading Buffer	
Methanol	Sigma
NP40	Sigma
Nucleospin Plasmid Kit	Macherey-Nagel
PMSF	Applichem

Ponceau S	
Potassium Chloride (KCl)	MERCK
potassium dihydrogen phosphate KH ₂ PO ₄	MERCK
Protease Inhibitors Set X	MERCK
Protein Marker	Nippon Genetics
Protein Quantification Assay	Macherey-Nagel
Rapid Fixer	Ilford
Skimmed powdered milk	Regilait
Sodium Chloride (NaCl)	ChemLab
Sodium dodecyl Sulfate (SDS)	SERVA-Panreac
Sodium Hydroxide (NaOH)	MERCK
Tetramethylethylenediamine (TEMED)	Research Organics
Tris Base	MERCK
Triton X-100	MERCK
Tween-20	Euroclone
Water For Injection	Vioser
N',N'-methylene-Bisacrylamide	SERVA

Αναλώσιμα-Υλικά

Αναλώσιμα-Υλικά	Εταιρία Παροχής
Medical X-Ray Film	Fugifilm
Pasteur Pipettes	Corning
PVDF membrane 0.2μm	Macherey-Nagel
Whatmann 3MM paper	Whatmann
Φυγοκεντρικοί σωλήνες τύπου eppendorf(1,5ml)	Eppendorf
Φυγοκεντρικοί σωλήνες τύπου Falcon (50ml, 15ml)	SPL

Όργανα

Όργανα	Εταιρία Παροχής
FastGene Mini Dry Bath	Nippon Genetics
Hypercassette RPN 11649	Amersham Biosciences
Magnetic stirrer	
mini centrifuge	Nippon Genetics
Shaking incubator	Labtech
StepOne Real-Time PCR System	Applied Biosystems
Ultrasonic processor UP 400S (400W, 24kHz)	Hielscher
Yrdimes SemiDry Blotter	Wealtec
Αναλυτικός ζυγός	Kern & Sohn GmbH

Αυτόματες πιπέτες	Gilson, Eppendorf
Επωαστήρες	Binder
Κάθετη συσκευή ηλεκτροφόρησης Mini-Protean Tetra Cell	BIORAD
Μετρητής pH	Metrohm
Φυγόκεντροι	Eppendorf

Αντιδραστήρια Κυτταροκαλλιέργειων

Αντιδραστήριο	Εταιρία 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)	Gibco
Polyethylenimine (PEI)	SIGMA
Trypsin-PBS 0,25% w/v Mg ²⁺ , Ca ²⁺	Gibco

Υλικά Κυτταροκαλλιέργειων

Υλικά	Εταιρία Παροχής
Cell Scrapers	Orange scientific
Disposable Serological Pipettes Sterile (25ml, 10ml, 5ml, 2ml)	Costar, Corning
Flasks (75cm ² , 25cm ²) cap filtered	Orange scientific
Glass Pasteur Pipettes	Corning
Minisart syringe filters 0,2μm	Sartorius stedim
Plates 20cm diameter	SPL
Φυγοκεντρικοί σωλήνες τύπου eppendorf(1,5ml)	Eppendorf
Φυγοκεντρικοί σωλήνες τύπου Falcon (50ml, 15ml)	SPL

Όργανα Κυτταροκαλλιέργειων

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

Κυτταρικές Σειρές

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

HeLa (immortal cervical cancer line, αθάνατη κυτταρική σειρά καρκίνου τραχήλου της μήτρας)

Πλασμιδιακός φορέας

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

Βακτηριακό Στέλεχος

XL1 Blue

Αντισώματα

1^ο : μονοκλωνικό έναντι hAng (mouse)

1^ο : μονοκλωνικό έναντι β-ακτίνης

1^ο : πολυκλωνικό έναντι hAng (rabbit)

2^ο : δευτερογενές συζευγμένο με HRP (anti-mouse raised in goat)

3.2 Μεθοδολογία

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 1L με pH 7,4, η σύσταση είναι η εξής:

- 8gr NaCl
- 0,2gr KCl
- 1,78gr Na₂HPO₄
- 0,2gr KH₂PO₄
- 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

Τρουψίνη 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 μονόστοιβη 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, τα οποία πριν προστεθούν στα κύτταρα ζεσταίνονται στους 37°C στο υδατόλουτρο, 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. Η φλάσκα τοποθετείται στον επωαστήρα για 16ώρες.
4. Μετά το πέρας των 16 ωρών, απομακρύνεται το υπερκείμενο με το θρεπτικό ώστε να αφαιρεθεί το DMSO, επειδή από ένα σημείο και μετά 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 αφού αναρροφηθεί το PBS, 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 γίνεται ως εξής:

1. Απομακρύνεται με αναρρόφηση το υλικό της καλλιέργειας.
2. Τα κύτταρα πλένονται με διάλυμα PBS και το διάλυμα αναρροφάται.(x2)
(Προσοχή να μη μπει PBS στο φίλτρο του πώματος του σιφωνίου)

3. Προστίθεται κατάλληλος όγκος τρυψίνης (πάνω στα κύτταρα και όχι στην άκρη) αναλόγως του μεγέθους της φλάσκας.
4. Ανακινούμε τη φλάσκα με σταυρωτές κινήσεις έτσι ώστε η τρυψίνη να καλύψει όλη την επιφάνειά της και την τοποθετούμε για 3 λεπτά στην επιφάνεια του hood.(Τα HEK-293T ξεκολλάνε πολύ εύκολα, άλλα κύτταρα θέλουν επωαστήρα).
5. Είναι έτοιμα 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 τουλάχιστον 5 φορές του όγκου της τρυψίνης που χρησιμοποιήθηκε.(Το FBS σταματά τη τρυψινοποίηση).
6. Παράλληλα, τοποθετείται θρεπτικό υλικό στις νέες φλάσκες που θα μπουν τα κύτταρα.
7. Τα κύτταρα επαναιωρούνται και διασπείρονται ομοιόμορφα με σιφώνιο κατάλληλου όγκου.(up and down για να σπάσουν τυχόν συσσωματώματα και προσοχή να μη μπει όλη η ποσότητα μέσα στο σιφώνιο αλλά και να γίνει όσο το δυνατόν λιγότερος αφρός).
8. Σε αυτό το στάδιο επιλέγεται η κατάλληλη/επιθυμητή αραιώση, δηλαδή πόση ποσότητα κυττάρων θα βάλουμε σε κάθε φλάσκα που περιέχει συγκεκριμένη ποσότητα θρεπτικού.
9. Τέλος, οι φλάσκες επιστρέφονται στον επωαστήρα.

ΚΑΤΑΨΥΞΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΓΙΑ ΕΠΑΚΟΛΟΥΘΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

Όταν η πληρότητα της φλάσκας φτάσει περίπου στο 80% πραγματοποιείται κατεργασία με τρυψίνη για να συλλεχθούν και να καταψυχθούν 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. Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση 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:
(Τα βήματα 1 έως 4 εκτελούνται σε απαγωγό καθέτου νηματικής ροής)

1. Από μία φλάσκα με επιθυμητό αριθμό κυττάρων, απομάκρυνση του θρεπτικού με αναρρόφηση και αμέσως μετά ακολουθεί πλύση των κυττάρων με ρυθμιστικό διάλυμα PBS.

2. Ακολουθεί κατεργασία με τρυψίνη όπως αναφέρθηκε προηγουμένως για να αποκολληθούν τα κύτταρα από τον πάτο της φλάσκας.
3. Με τη χρήση πλαστικού scraper αποκολλούμε τα κύτταρα στο σύνολό τους και με προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος PBS ξεπλένουμε τη φλάσκα.
4. Επαναιωρούμε τα κύτταρα σε θρεπτικό και λαμβάνουμε 10μL για μέτρηση σε αιμοκυτταρόμετρο Neubauer.
5. Φυγοκέντρηση των κυττάρων σε 250g για 5 λεπτά στους 4 °C. Αναρροφάται το υπερκείμενο και το κυτταρικό ίζημα (pellet) φυλάσσεται για μελλοντική χρήση.

ΜΕΤΡΗΣΗ ΣΕ ΑΙΜΟΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΟ NEUBAUER

Το αιμοκυτταρόμετρο είναι μια τροποποιημένη αντικειμενοφόρος πλάκα που 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. Στην κοίλη επιφάνεια μεταφέρεται το κυτταρικό εναιώρημα, το οποίο με τριχοειδικά φαινόμενα απλώνεται στην τετραγωνισμένη επιφάνεια. Ο αριθμός των κυττάρων που μετράμε σε ένα από αυτά τα τετράγωνα αντιστοιχεί σε $0,1\text{mm}^3$ ή $1 \times 10^{-4}\text{mL}$. Η συγκέντρωση των κυττάρων στο αρχικό εναιώρημα (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 .

ΠΑΡΟΔΙΚΗ ΔΙΑΜΟΛΥΝΣΗ HEK-293T ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΚΑΤΙΟΝΙΚΟΥ

ΠΟΛΥΜΕΡΟΥΣ PEI

Για την υπερέκφραση της hAng πραγματοποιήθηκε παροδική διαμόλυνση των κυττάρων HEK-293T με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pcDNA-TO(ampr^r). Μετά τη μέτρηση στο αιμοκυτταρόμετρο, υπολογίζεται η κατάλληλη ποσότητα κυττάρων που θα στρωθεί τρυβλίο και προστίθεται μαζί με συγκεκριμένη ποσότητα θρεπτικού DMEM-10% FBS. 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 τη χρήση κατιονικού πολυμερούς PEI, διότι σύμφωνα με προηγούμενη διπλωματική του εργαστηρίου (Βασιλική Ε. Κουκουλιάτρα) βρέθηκε πως η καταλληλότερη και αποτελεσματικότερη μέθοδος διαμόλυνσης για την κυτταρική σειρά HEK-293T είναι με τη χρήση του κατιονικού πολυμερούς PEI. Το συγκεκριμένο πολυμερές συμπυκνώνει το DNA σε μικρά θετικά φορτισμένα σωματίδια τα οποία προσδένονται σε ανιονικές κυτταρικές επιφάνειες. Τα σύμπλοκα PEI:DNA ενδοκυττάρωνονται και το DNA απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα (βοηθάει το πλασμίδιο να εισέλθει στα κύτταρα).

Οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι εξής:

Για τα κύτταρα που διαμολύνθηκαν με μη ανασυνδυασμένο πλασμίδιο (Empty):

Αντιδραστήρια	Ποσότητα ανά τρυβλίο
DMEM -/-	2,869μL

Vector plasmid Empty	71μL
PEI	60μL
DMEM-5% FBS	17mL
DMEM-10% FBS	20mL

Για τα κύτταρα που διαμολύνθηκαν με ανασυνδυασμένο για hAng πλασμίδιο (Ang):

Αντιδραστήρια	Ποσότητα ανά τρυβλίο
DMEM -/-	2,887μL
Vector plasmid Ang	53μL
PEI	60μL
DMEM-5% FBS	17mL
DMEM-10% FBS	20mL

Μεθοδολογία:

1. 24 ώρες μετά το στρώσιμο των κυττάρων στα τρυβλία, πραγματοποιείται προσεκτική αναρρόφηση του υπάρχοντος θρεπτικού και προσθήκη νέου θρεπτικού DMEM-5% FBS.
2. Επώαση των τρυβλίων στον επωαστήρα, και προετοιμασία σε ένα φυγοκεντρικό σωλήνα τύπου erpendorf του διαλύματος της αντίδρασης. Προστίθενται κατά σειρά το DMEM -/- και σε αυτό το αντίστοιχο vector plasmid και πραγματοποιείται έντονη κυκλική μίξη (vortex).
3. Έπειτα, προστίθεται το αντιδραστήριο PEI, αναδεύεται ήπια, και το διάλυμα παραμένει σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά.
4. Μετά το πέρας των 20 λεπτών, προστίθεται το κάθε διάλυμα αντίδρασης στο αντίστοιχο τρυβλίο σταγόνα-σταγόνα και αναδεύεται ήπια για να απλωθεί παντού.
5. Παρατηρείται η μορφή των κυττάρων στο μικροσκόπιο και ακολουθεί επώαση 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 DMEM-10% FBS.
7. Τοποθέτηση στον επωαστήρα και συλλογή των κυττάρων 36 ώρες μετά από τη διαμόλυση.

ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΕΠΙΔΕΚΤΙΚΩΝ ΓΙΑ ΧΗΜΙΚΟ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ ΚΥΤΤΑΡΩΝ XL1- BLUE (E.coli) ΜΕ ΤΟΝ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΟ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟ ΦΟΡΕΑ pcDNA4-TO (amp^r) ΓΙΑ ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ ΤΗΣ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΙΝΗΣ ΚΑΘΩΣ ΚΑΙ ΜΕ ΕΝΑΝ ΜΗ-ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΟ

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

1. 2 erpendrof από 100μl, το καθένα, κυττάρων XL1-blue από τους -80 °C τοποθετούνται στον πάγο ώστε να ξεπαγώσουν ελαφρά.
2. Προσθήκη 1μl πλασμιδίου pcDNA4-TO, Empty(μη ανασυνδυασμένο) και Ang(ανασυνδυασμένο) αντίστοιχα, στα κύτταρα και απαλή ανάδευση.

3. Επώαση για 30 λεπτά στον πάγο.
4. 45 δευτερόλεπτα στους 42 °C ΑΚΡΙΒΩΣ στο Thermo Blocker.
5. Επώαση 2 λεπτά στον πάγο.
6. Προσθήκη 900μl αποστειρωμένου LB Broth άνευ αντιβιοτικού στο καθένα και επώαση 1h στους 37 °C στα 210 rpm σε shaking incubator.
7. Επίστρωση 4 τριβλίων με LB Agar/ 50μg/ml Amp^r με:
 - 50μl καλλιέργειας μετασχηματισμένων με Empty βακτηρίων
 - 100μl καλλιέργειας μετασχηματισμένων με Empty βακτηρίων
 - 50μl καλλιέργειας μετασχηματισμένων με Ang βακτηρίων
 - 100μl καλλιέργειας μετασχηματισμένων με Ang βακτηρίων
8. Επώαση O/N για 16h στους 37°C.

ΑΝΑΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΑΠΟΙΚΙΩΝ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΕΝΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ XL1-BLUE ΣΕ ΥΓΡΟ ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

1. Από κάθε τρυβλίο που έχει επωαστεί επιλέγεται μία απομονωμένη και ευδιάκριτη αποικία.
2. Σε 4 falcon 50ml, τοποθετούνται 5ml αποστειρωμένου θρεπτικού υλικού LB με αντιβιοτικό 50μg/ml Amp^r αντίστοιχα.
3. Με ένα νέο αποστειρωμένο tip κάθε φορά, επιλέγεται μια αποικία από κάθε τρυβλίο και τοποθετείται σε κάθε falcon(εμβολιάζεται η υγρή καλλιέργεια).
4. Οι εμβολιασμένες καλλιέργειες τοποθετούνται στον επωαστήρα O/N υπό ανάδευση στις 210rpm για 16 ώρες στους 37°C.

ΣΠΑΣΙΜΟ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΜΕ LYSIS BUFFER ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΚΑΤΑΜΕΤΡΗΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Διάλυμα RIPA και καταμέτρηση πρωτεϊνών με protein quantification assay kit

Η λύση των κυττάρων πραγματοποιείται με τη βοήθεια ρυθμιστικού διαλύματος λύσης των κυττάρων.

Ρυθμιστικό διάλυμα λύσης κυττάρων RIPA(10mL):

- 5M NaCl 300 μL
- 1M TRIS-HCl 7,5 pH 250μL
- NP40 100μL
- Deoxycholic acid-Na-salt 0,05gr
- SDS 10% 100M (100μL)
- 9mL και 250μL dH₂O

Μαζί με το διάλυμα RIPA προσθήκη και protease inhibitors(1X).Για διάλυμα RIPA 100μL και stock protein inhibitors(100X), προσθήκη 1μl από τους protease inhibitors 100X (stock) και 99μl RIPA σε ένα 38ppendorf. Σε κάθε δείγμα, προσθήκη ανάλογου όγκου RIPA-protein inhibitors και έπειτα:

1. Πιυετάρισμα των διαλυμάτων(up/down), vortex και spin
2. Δείγματα στον πάγο για 20 λεπτά
3. Ομογενοποίηση του διαλύματος των κυττάρων με χρήση υπερήχων για 3 κύκλους /20% amplitude/10sec χτύπημα -10sec ξεκούραση
4. Φυγοκέντρηση των δειγμάτων στους 15.000rpm, στους 4°C για 20 λεπτά

5. Συλλογή του υπερκειμένου(πρωτεΐνες) και αποθήκευση στους -80°C για μελλοντική χρήση αν χρειάζεται

Μέτρηση πρωτεϊνών με protein quantification assay kit

Το πρωτόκολλο περιλαμβάνει τα εξής βήματα:

1. Προσθήκη 10μl δείγματος και 10μl RIPA ανά πηγαδάκι του kit. Προσθήκη 20μl RIPA σε δύο πηγαδάκια ως τυφλά
2. Προσθήκη σε κάθε πηγαδάκι 40μl διαλύματος PSB
3. Προσθήκη 40μl διαλύματος QR και κουνάμε ελαφρά τη μικροπλάκα έως ότου το χρώμα στα πηγαδάκια από μπλε να γίνει κίτρινο
4. Επώαση μικροπλάκας 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
5. Φωτομέτρηση σε plate reader(μέσω προγράμματος στον υπολογιστή) στα 570nm
6. Τέλος, με χρήση κατάλληλης εξίσωσης υπολογίζεται η ποσότητα πρωτεϊνών σε κάθε δείγμα και έπειτα η ποσότητα του δείγματος που θα προστεθεί στην πηκτή ηλεκτροφόρησης

Τα 10 μl δείγμα/10μl RIPA πρώτα τα αναμιγνύουμε μαζί σε ένα tube και μετά τα προσθέτουμε σε πηγαδάκια. Για σωστή μέτρηση δεν πρέπει να υπάρχουν φυσαλίδες μέσα στα πηγαδάκια. Αν υπάρχουν τις αφαιρούμε με την πιπέτα.

Διάλυμα Lysis και καταμέτρηση πρωτεϊνών με μέθοδο Bradford

Διαφορετικός τρόπος για σπάσιμο και καταμέτρηση των κυττάρων.

Lysis Buffer:

- 20mM Tris-HCl pH 7.5
- 0,5% v/v Triton X-100
- 250mM NaCl
- 3mM EDTA

Τελικό Lysis με προσθήκη protein inhibitors: 99μl Lysis + 1μl protein inhibitors

Σε κάθε δείγμα, προσθήκη ανάλογου όγκου Lysis-protein inhibitors και έπειτα:

1. Πιπετάρισμα των διαλυμάτων(up/down), vortex και spin
2. Δείγματα στον πάγο για 20 λεπτά
3. Ομογενοποίηση του διαλύματος των κυττάρων με χρήση υπερήχων για 4 κύκλους /40% amplitude/10sec χτύπημα -10sec ξεκούραση
4. Φυγοκέντρηση των δειγμάτων στους 15.000rpm, στους 4°C για 20 λεπτά
5. Συλλογή του υπερκειμένου(πρωτεΐνες) και αποθήκευση στους -80°C για μελλοντική χρήση αν χρειάζεται

Μέτρηση πρωτεϊνών με μέθοδο Bradford

Παρασκευή κατάλληλων διαλυμάτων σε Eppendorf που περιέχουν τα εξής:

Τυφλό

- 780μl dH₂O
- 200μl αντιδραστήριο Bradford
- 20μl Lysis

Δείγμα

- 780μl dH₂O
- 200μl αντιδραστήριο Bradford
- 2μl υπερκειμένου + 18μl Lysis

Ανακινούμε τα Eppendorf, προσθέτουμε το περιεχόμενό τους σε κυψελίδες και πραγματοποιείται φωτομέτρηση στα 595nm στο φωτόμετρο. Τέλος, με χρήση κατάλληλης εξίσωσης υπολογίζεται η ποσότητα πρωτεϊνών σε κάθε δείγμα και έπειτα η ποσότητα του δείγματος που θα προστεθεί στην πηκτή ηλεκτροφόρησης.

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

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου 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. 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. Στη μέθοδο αυτή, χρησιμοποιούνται 2 ειδών πηκτές για την πραγματοποίηση της ηλεκτροφόρησης, μία πηκτή επιστοίβαξης (stacking gel) στην οποία τοποθετούνται τα δείγματα και μία πηκτή διαχωρισμού (separating gel) η οποία ακολουθεί ακριβώς κάτω από την πηκτή επιστοίβαξης. Η πηκτή επιστοίβαξης και σκοπός αυτής είναι να «συμπυκνώσει» τις πρωτεΐνες και να διασφαλίσει ότι όλες οι πρωτεΐνες θα εισέλθουν ταυτόχρονα στην πηκτή διαχωρισμού. Μετά την ολοκλήρωση του πολυμερισμού, η πηκτή τοποθετείται κατακόρυφα και σταθερά στην ειδική συσκευή ηλεκτροφόρησης και προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης (running buffer) τόσο στο μέσα όσο και στο έξω μέρος της πηκτής, γεμίζοντας όλη τη συσκευή. 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 με χρωστική Coomassie (Coomassie Brilliant Blue R-250), η οποία χρειάζεται ελαφρώς όξινο περιβάλλον και αυτό το προσδίδει το οξικό οξύ. Με τη μέθοδο αυτή ανιχνεύονται $\geq 0,1$ μg πρωτεΐνης.

Παρασκευή Υλικών

Ρυθμιστικό Διάλυμα Ηλεκτροφόρησης 10X (500mL)

- 72gr γλυκίνη(1,92M)
- 15gr Tris-HCl(0,25M)
- 5gr SDS(0,035M)

Αλλά το γέμισμα της συσκευής γίνεται με χρήση Running Buffer 1X(Για 850mL):
85ml Running Buffer 10X +765mL dH₂O

Stacking gel 5% (3mL)

- 2,1mL dH₂O
- 0,5mL 30% acrylamide
- 0,38mL Tris pH 6.8
- 0,03mL 10% SDS
- 0,03mL 10% APS

- 0,003mL TEMED

Separating gel 12% (10mL)

- 3,3mL dH₂O
- 4,0mL 30% acrylamide
- 2,5mL Tris pH 8.8
- 0,1mL 10% SDS
- 0,1mL 10% APS
- 0,004mL TEMED

* Η πυκνότητα των πηκτών ποικίλλει ανάλογα με το μέγεθος των πρωτεϊνών που θέλουμε να διαχωρίσουμε. Επιπλέον, ανάλογα με τη χωρητικότητα της συσκευής προετοιμασίας των πηκτών, παρασκευάζονται διαφορετικές ποσότητες.

Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών (Laemmli Buffer) 6X

- 1,2gr SDS
- 6mg κυανό της βρωμοφαινόλης
- 1,2mL 0,5 M Tris pH 6.8
- 4,7mL γλυκερόλη
- 0,93gr DTT
- 2,1mL dH₂O

Διάλυμα χρωστικής Coomassie (φωτοευαίσθητη)

- 40 % (v/v) μεθανόλη
- 10 % (v/v) οξικό οξύ
- 50 % (v/v) dH₂O
- 0,1 % (w/v) Coomassie R-250

Μέθοδος:

Παρασκευή πηκτής πολυακρυλαμιδίου

Και στις δύο παρασκευές πηκτών προστίθενται όλα τα συστατικά που αναγράφονται στην παραπάνω συνταγή και τέλος αφού έχει προστεθεί και το SDS 10%, γίνεται ταυτόχρονη προσθήκη, με δύο διαφορετικές πιπέτες, APS 10% ΚΑΙ TEMED για να πήξει. Up and down πιπετάρισμα και ανάδευση. Αρχικά συναρμολογείται η ειδική συσκευή ηλεκτροφόρησης, όπου τοποθετούνται το δύο τζαμάκια (λεπτό και παχύ) το ένα πάνω στο άλλο στη βάση της συσκευής. Έπειτα γίνεται έλεγχος αν στο εκμαγείο που θα μπει η πηκτή υπάρχει διαρροή, με την προσθήκη dH₂O. Αν υπάρχει, υπολογίζεται να προστεθεί λίγο περισσότερο Separating gel. Άρα προσθήκη Separating gel στο εκμαγείο, γέμισμα με dH₂O μέχρι πάνω και αναμονή για τον πολυμερισμό του ακρυλαμιδίου. Μόλις πήξει το Separating gel, αφαίρεση του dH₂O και προσθήκη του Stacking gel. Αμέσως τοποθέτηση της χτένα και τέλος όταν πήξει και το Stacking αφαίρεση της χτένα και καλό ξέπλυμα με dH₂O. Μεταφορά στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και γέμισμα της συσκευής με Running Buffer 1X. Φόρτωση των δειγμάτων μας αφού προηγουμένως, έχουν κατάλληλα αναμιχθεί με ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών 4X και έχουν θερμάνει στους 95°C για 5 λεπτά. Απαραίτητο είναι και το φόρτωμα

πρωτεϊνικού μάρτυρα στο αρχικό πηγαδάκι. Ο μάρτυρας διαχωρίζεται σε ζώνες με διαφορετικά γνωστά μοριακά βάρη, έτσι ώστε να είναι δυνατή η ταυτοποίηση των πρωτεϊνών σε μεταγενέστερο στάδιο. Εφαρμογή σταθερής διαφοράς δυναμικού 130Volt. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, η πηκτή αφαιρείται από τη συσκευή ηλεκτροφόρησης και βάφεται με τη χρωστική Coomassie Brilliant Blue R-250.

ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ ΚΑΤΑ WESTERN (WESTERN BLOT)

Το Western είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη αναλυτική τεχνική για την ανίχνευση συγκεκριμένων πρωτεϊνών σε ένα δείγμα ομογενοποιημένου ιστού ή εκχυλίσματος. Μετά το σπάσιμο των κυττάρων και τη μετουσίωση των πρωτεϊνών από τα δείγματα, ακολουθεί η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης όπως προαναφέρθηκε. 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 καθιλώνονται 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(γνωστό ως το πρωτεύον αντίσωμα). Το σύμπλοκο πρωτεΐνης-αντισώματος που έχει δημιουργηθεί, ανιχνεύεται με την προσθήκη ενός δεύτερου αντισώματος το οποίο είναι ειδικό για το πρώτο. Πραγματοποιείται οπτικοποίηση-εμφάνιση του δευτερεύοντος αντισώματος με τη μέθοδο της χημειοφωταύγειας. Στη χημειοφωταύγεια, η εκπομπή καθορίζεται από μία χημική αντίδραση. Ένα τέτοιο σύστημα αποτελεί το ένζυμο της υπεροξειδάσης(HRP), το οποίο παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) 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 ανίχνευση επιτυγχάνεται είτε με έκθεση σε ακτινογραφικό φιλμ, είτε σε μηχανήμα ανίχνευσης χημειοφωταύγειας.

Παρασκευή Υλικών

Διάλυμα Μεταφοράς(Transfer Buffer) 10X (450mL)

- 15gr Tris
- 72gr γλυκίνη
- 5gr SDS

Διάλυμα Μεταφοράς(Transfer Buffer) 1X (200mL)

- 20mL Transfer Buffer 10X
- 20mL μεθανόλη
- 160mL dH₂O

Διάλυμα PBS 1X, pH 7.4 (1L)

- 8gr NaCl
- 0,2gr KCl
- 1,78gr Na₂HPO₄
- 0,2gr KH₂PO₄
- dH₂O μέχρι τελικό όγκο

Διάλυμα PBST(500mL): 0,1% v/v Tween 20 σε διάλυμα PBS 1X

- 500mL PBS 1X
- 500μL Tween 20

Blocking Buffer 5% w/v (50mL)

- 2,5gr σκόνη γάλακτος
- 50mL PBST

Stripping Buffer, pH 2.2 (50mL)

- 0,75gr γλυκίνη
- 0,2mL SDS 10%
- 0,5mL Tween 20
- dH₂O μέχρι τελικό όγκο

Μεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη:

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, τοποθέτηση της πηκτής σε Transfer Buffer 1X, και εμβάπτιση 6 χαρτιών Whatman (ίδιες διαστάσεις με την πηκτή ηλεκτροφόρησης) σε Transfer Buffer 1X, αφού πρώτα κοπεί τμήμα μεμβράνης PVDF(φθοριούχο πολυβινυλιδένιο) σε ίσες διαστάσεις με ένα από αυτά. Επώαση των Whatman στο Transfer Buffer 1X για 10 λεπτά και ενεργοποίηση της μεμβράνης PVDF με προσθήκη μεθανόλης για 30 δευτερόλεπτα και τοποθέτησή της σε Transfer Buffer 1X. Στη συνέχεια άνοιγμα της συσκευής Semidry και απολύμανσή της με αιθανόλη 70%. Τοποθέτηση Transfer 1X στον θετικό (κάτω) πόλο και επιστοίβαξη τριών χαρτιών Whatman, με ενδιάμεση προσθήκη Transfer 1X και αφαίρεση φυσαλίδων που μπορεί να δημιουργηθούν. Τοποθέτηση κατά τον ίδιο τρόπο πρώτα τη μεμβράνη (ενεργοποιημένη), μετά το gel που έτρεξε και τα υπόλοιπα τρία χαρτιά Whatman. Δηλαδή από τον θετικό/κάτω (+) προς τον αρνητικό/πάνω (-) πόλο, τοποθετούμε διαδοχικά τα εξής:

3 φύλλα Whatman → μεμβράνη PVDF → πηκτή ηλεκτροφόρησης → 3 φύλλα Whatman. Οι πρωτεΐνες είναι αρνητικά φορτισμένες, άρα θα μετακινηθούν προς τη θετική πλευρά. Τέλος κλείσιμο και ενεργοποίηση της συσκευής Semidry στα 270 mA δηλαδή 0,27A για 39 λεπτά. (Όλα τα εργαλεία πρέπει να τα απολυμάνουμε με 70% αιθανόλη πριν χρησιμοποιηθούν).

Μόλις ολοκληρωθεί η μεταφορά, πραγματοποιείται έλεγχος επιτυχούς μεταφοράς πρωτεϊνών με τη χρωστική Ponceau. Είναι μη ειδική, με αποτέλεσμα να εμφανίζονται όλες οι πλεονάζουσες (abundant) πρωτεΐνες. Προστίθεται ορισμένη ποσότητα στη μεμβράνη PVDF για περίπου 1 λεπτό. Μετά ξεπλένεται με dH₂O μέχρι να φύγει το περίσσιο χρώμα. Τέλος, ελέγχεται εάν τα δείγματα είναι ισοφορτωμένα και αν οι μπάντες είναι ευθείες (sharp), δηλαδή αν έχουν υποστεί διάσπαση.

Προσθήκη αντισωμάτων

Μετά το πέρας της μεταφοράς, η μεμβράνη PVDF χρησιμοποιείται για την ανίχνευση αντιγονικών θέσεων. Αρχικά επώαζεται στο Blocking Buffer για 1 ώρα, σε θερμοκρασία δωματίου, υπό ανάδευση, ώστε να κορεστεί η μεμβράνη από την καζεΐνη του γάλακτος και να αποφευχθούν οι μη ειδικές αλληλεπιδράσεις της μεμβράνης με το αντίσωμα. Ακολουθεί επώαση με το πρώτο αντίσωμα σε

θερμοκρασία 4°C για 12-16 ώρες, υπό ανάδευση. Στη συνέχεια, πραγματοποιούνται τρεις διαδοχικές εκπλύσεις της μεμβράνης με διάλυμα PBST, για 5 λεπτά η καθεμία, υπό ανάδευση. Η διαδικασία της έκπλυσης επαναλαμβάνεται τρεις φορές ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια του πρώτου αντισώματος και ακολούθως επωάζεται υπό ανάδευση, με το δεύτερο αντίσωμα για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος, γίνονται και πάλι διαδοχικές εκπλύσεις της μεμβράνης με PBST όπως και προηγουμένως (3x5 λεπτά). Το 2ο αντίσωμα είναι συνδεδεμένο με το ένζυμο υπεροξειδάση-HRP και βασίζεται στο είδος από το οποίο προήρθε το 1ο αντίσωμα, δηλαδή αν το πρώτο αντίσωμα προέρχεται από mouse, το δεύτερο θα είναι anti-mouse. Τα αντισώματα αραιώνονται με βάση τις οδηγίες του παρασκευαστή σε Blocking Buffer και μπορεί να χρησιμοποιηθούν έως και 3 φορές.

Εμφάνιση και ανίχνευση πρωτεΐνης

Η ανίχνευση πρωτεΐνης γίνεται με τη χρήση υποστρώματος ECL που δίνει φθορισμό παρουσία του ενζύμου HRP. Το ECL είναι ένα υπόστρωμα για την HRP, horseradish peroxidase, η οποία υπάρχει στο 2^ο αντίσωμα με το οποίο έχουμε επώσει τη μεμβράνη μας. Το σήμα που θα πάρουμε παράγεται από την αντίδραση που προκαλείται από την HRP με το υπόστρωμα και είναι ανάλογο με την ποσότητα των επισημασμένων με HRP αντισωμάτων. Λαμβάνει χώρα σε σκοτεινό θάλαμο όπου η μεμβράνη καλύπτεται και επωάζεται για 1 λεπτό με το αντιδραστήριο ECL. Μετά το πέρας του ενός λεπτού, τοποθέτηση της μεμβράνης στην Hypercasette (κασέτα εμφάνισης) ανάμεσα από δύο διαφάνειες. Κόβεται φιλμ σε διαστάσεις ίδιες με αυτές της μεμβράνης και καλύπτεται με αυτό ολόκληρη η μεμβράνη πάνω από τις διαφάνειες. Κλείσιμο της Hypercasette και αναμονή για εμφάνιση όσο χρόνο χρειάζεται κάθε φορά. Μετά το πέρας του χρόνου αυτού τοποθέτηση του φιλμ σε διάλυμα Developer (για ενεργοποίηση) 3 λεπτά υπό ανάδευση, έπειτα τοποθέτηση του φιλμ σε νερό και ξέπλυμα υπό ανάδευση για 3 λεπτά και τέλος άλλα 3 λεπτά υπό ανάδευση σε διάλυμα Fixer (για μονιμοποίηση). Τέλος, καλό ξέπλυμα κάτω από τρεχούμενο νερό και παρατήρηση των αποτελεσμάτων.

Απομάκρυνση αντισωμάτων (Stripping)

Εφόσον γίνει ανίχνευση μιας πρωτεΐνης, είναι εφικτός ο καθαρισμός της μεμβράνης από αντισώματα, ώστε να προστεθούν διαφορετικά για ανίχνευση άλλης πρωτεΐνης. Αυτό επιτυγχάνεται με το διάλυμα αφαίρεσης (Stripping Buffer), το οποίο περιέχει απορρυπαντικά και χαμηλό pH (αποδιατακτικά). Ξεκολλάνε τα αντισώματα σταδιακά και αν το Stripping Buffer είναι πολύ δυνατό ξεκολλά ακόμα και η πρωτεΐνη. Επωάζεται στο διάλυμα αφαίρεσης (Stripping Buffer) η μεμβράνη για 2 φορές από 5 λεπτά η καθεμία. Απομακρύνεται το διάλυμα, προστίθεται PBS 1X για 2 δεκάλεπτες πλύσεις. Απορρίπτεται το περιεχόμενο και γίνονται δύο πλύσεις με PBST 2 φορές για 5 λεπτά καθεμία. Έλεγχος αν υπάρχουν πρωτεΐνες στη μεμβράνη με χρωστική ronceau, ενεργοποίηση της μεμβράνης με μεθανόλη για 30 δευτερόλεπτα, επώαση για 1 ώρα σε διάλυμα μη ειδικής δέσμησης (Blocking Buffer) και ύστερα η μεμβράνη είναι έτοιμη να δεχτεί άλλο 1ο αντίσωμα.

ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ WHOLE-CELL LYSATE

Ο σκοπός της παρασκευής whole-cell lysate είναι η απελευθέρωση των πρωτεϊνών που περιέχονται στα κύτταρα και των δειγμάτων των ιστών σε ένα διάλυμα, έτσι ώστε μετά να μπορεί να γίνει ανάλυσή τους με την τεχνική της φασματομετρίας μάζας. Είναι απαραίτητη η παρασκευή lysis buffer(1 mL) που θα περιέχει τα εξής:

- 400μL 10% SDS
- 100μL 1M Tris-HCl pH 7.6
- 100μL DTT
- 400μL Water for injection

Στη συνέχεια, προσθήκη συγκεκριμένης ποσότητας protease inhibitor PMSF (Από stock 100mM → 1mM) σε κατάλληλα υπολογισμένη ποσότητα lysis buffer. Σε κάθε δείγμα προσθήκη 150μL από διάλυμα lysis buffer-PMSF. Δυνατό πιετάρισμα (up/down) και 3 λεπτά στους 95°C στο heat block. Ακολουθεί ομογενοποίηση του διαλύματος των κυττάρων με χρήση υπερήχων για 3-6 κύκλους /35% amplitude/10sec χτύπημα -10sec ξεκούραση. Τέλος, φυγοκέντρηση των δειγμάτων για 5 λεπτά στα 16.000g στους 20°C. Συλλογή των υπερκειμένων και αποθήκευσή τους. *Σε όλη τη διάρκεια πρέπει να αποφεύγονται οι θερμοκρασίες κάτω των 15°C καθώς και τα άλατα καλίου για να αποφευχθεί η καταβύθιση συμπυκνωμένου SDS.

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ RNA ΜΕ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΤΟΥ TRI REAGENT (SIGMA)

1. Φυγοκέντρηση των κυττάρων στις 3.000rcf για 3λεπτά στους 4°C (το βήμα αυτό μπορεί να παραλειφθεί αν τα κύτταρα βρίσκονται ήδη υπό τη μορφή ιζήματος).
2. Προσθήκη 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 5 λεπτά.
3. Προσθήκη 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. Φυγοκέντρηση των δειγμάτων 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. Μεταφορά σε φυγοκεντρικούς σωλήνες τύπου erpendorfs την υδατική φάση και προσθήκη 250μL 2-προπανόλη.
6. Φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στους 4°C στις 12.000rcf.
7. Αφαίρεση του υπερκειμένου και πλύση του ιζήματος με 1mL παγωμένης αιθανόλης 75% με τη χρήση έντονης κυκλικής ανάδευσης (vortex).
8. Επώαση των δειγμάτων με την αιθανόλη 75% για 30 λεπτά στους -20°C έτσι ώστε να βελτιστοποιηθεί η κατακρήμνιση του ολικού RNA.
9. Φυγοκέντρηση δειγμάτων για 5 λεπτά στις 12.000rcf στους 4°C.

10. Αφαίρεση του υπερκειμένου και το ιζήμα παραμένει σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να εξατμιστεί όλη η αιθανόλη 75% (έλεγχος των δειγμάτων ανά τακτά χρονικά διαστήματα).
11. Επαναδιαλυτοποίηση του ιζήματος με 40μL dH₂O με έντονη ανάδευση με τη βοήθεια πιπέτας.
12. Τοποθέτηση των δειγμάτων στους 55°C για 10 λεπτά.
13. Αποθήκευση στους -80°C.

ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟΥ ΧΡΟΝΟΥ ΣΕ ΔΥΟ ΣΤΑΔΙΑ (qRT-PCR)

Η Real Time PCR είναι μία από τις πιο διαδεδομένες μεθόδους προσδιορισμού γονιδιακής έκφρασης. Παρακολουθεί την ενίσχυση ενός στοχευμένου μορίου DNA κατά τη διάρκεια της PCR (δηλαδή, σε πραγματικό χρόνο), όχι στο τέλος του, όπως σε συμβατική PCR. Μπορεί να διεξαχθεί σε ένα βήμα (one step reaction), όπου η όλη διαδικασία από τη σύνθεση του συμπληρωματικού DNA (cDNA) μέχρι την αντίδραση πολυμεράσης συμβαίνει στο ίδιο σωληνάριο, ή σε δύο βήματα (two-steps reaction) όπου η αντίστροφη μεταγραφή και η ενίσχυση του παραγόμενου cDNA πραγματοποιούνται σε διαφορετικά σωληνάρια. Η one step Real time PCR θεωρείται ότι μειώνει την πειραματική απόκλιση γιατί οι ενζυμικές αντιδράσεις συμβαίνουν στο ίδιο σωληνάριο. 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 1ου κλώνου γίνεται σύμφωνα με το πρωτόκολλο της FastGene Scriptase II cDNA synthesis kit. Σύμφωνα με αυτό, η αντίστροφη μεταγραφή συνθέτει τον πρώτο συμπληρωματικό κλώνο με μήτρα ολικό RNA ή πολύ(A)+ RNA. Το RNA που χρησιμοποιήθηκε απομονώθηκε με το πρωτόκολλο του TRI Reagent, όπως αναγράφεται παραπάνω.

Για την αντίδραση σύνθεσης του cDNA σε φυγοκεντρικό σωλήνα τύπου erpendorf ετοιμάζουμε τα εξής (1 φυγοκεντρικός σωλήνας αντιστοιχεί σε 1 δείγμα):

- 2μL dNTPs (2mM each)
- 1 μL Oligo (dT) primer (80μM)
- 1000ng ολικό RNA
- Water for injection RNase-free μέχρι τελικό όγκο

*Ποσότητες ανά αντίδραση 12,5mL

Επώαση δειγμάτων για 5 λεπτά στους 65°C έτσι ώστε να αποδιαταχθούν οι δευτεροταγείς δομές του RNA και να προσδεθούν οι εκκινητές στο στόχο. Τοποθέτηση των δειγμάτων αμέσως στον πάγο και προσθήκη ποσότητας από τα παρακάτω αντιδραστήρια:

- 4μL 5X FastGene Scriptase II Buffer
- 2μL DTT (0,1M)
- 0,5μL Αναστολέας RNase (40U/μL)

Έπειτα, επώαση δειγμάτων για 60 λεπτά στους 42°C η οποία είναι η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης του ενζύμου. Τέλος, επώαση 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 όπως αναφέρθηκε και παραπάνω. 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. Γενικά, 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 FastGene Scriptase II cDNA synthesis 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 GAPDH. Ως υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε cDNA από ολικό RNA που απομονώθηκε από τα κύτταρα HEK-293T. Τα αντιδραστήρια και οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται παρακάτω.

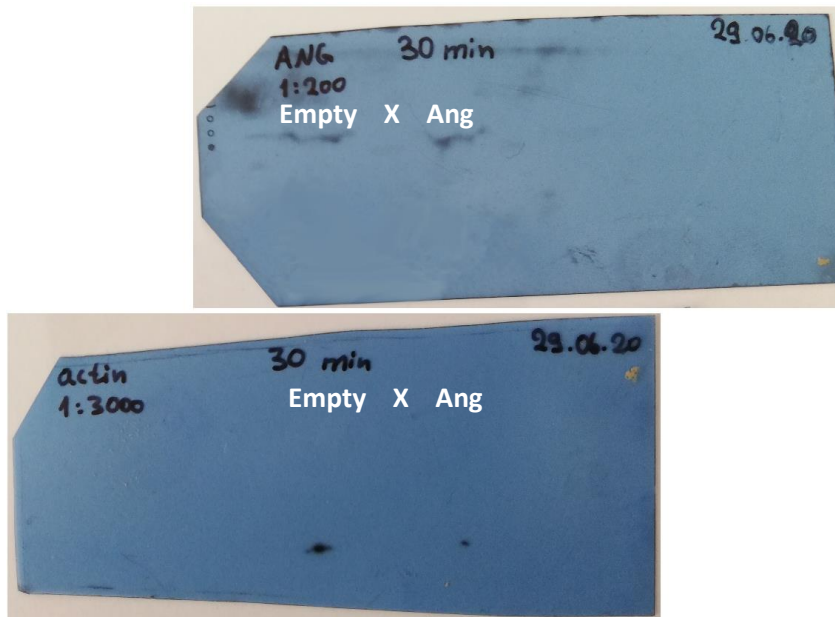
Αντιδραστήριο	Ποσότητα ανά αντίδραση (15μL)
PCR Ready Mix (μL)	7,5
Primer, Forward (μL)	0,075
Primer, Reverse (μL)	0,075
cDNA (μL)	1,5
RNase-free Water (μL)	5,85

4. Αποτελέσματα και Συζήτηση

4.1 Έλεγχος παραγωγής της αγγειογενίνης με ανοσοαποτύπωση κατά Western

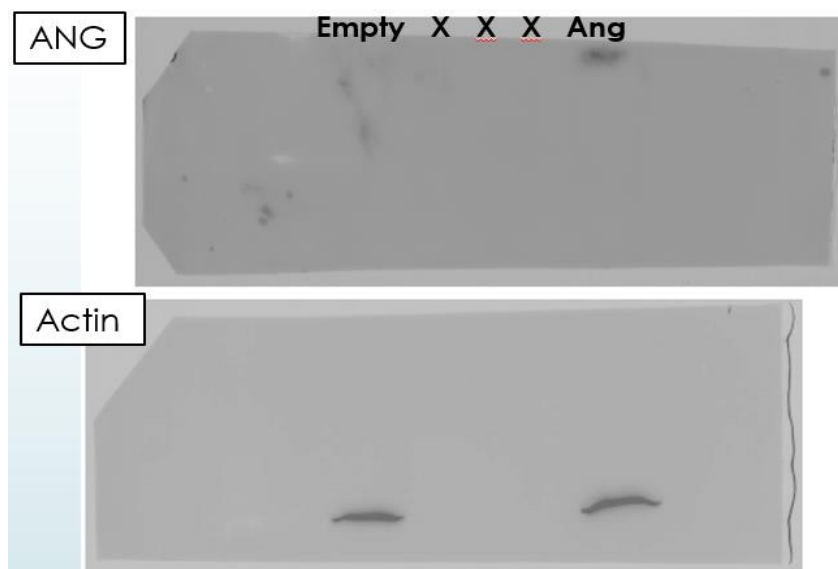
Πραγματοποιήθηκε ανοσοαποτύπωση κατά Western για τον έλεγχο της παραγωγής της αγγειογενίνης σε δύο διαφορετικές κυτταρικές σειρές, στην ανθρώπινη κυτταρική σειρά επιθηλίου (HEK-293T) και στην αθάνατη κυτταρική σειρά καρκίνου του τραχήλου της μήτρας (HeLa). Για την υπερέκφραση της hAng, έγινε παροδική διαμόλυνση (Transfection) των κυττάρων HEK-293T με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pcDNA4-hAng, ενώ στα κύτταρα HeLa η αγγειογενίνη προστέθηκε εξωγενώς, σε ποσότητα 4μg και 2μg αντίστοιχα. Στις παρακάτω Εικόνες απεικονίζονται τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης με τα ειδικά αντισώματα έναντι της hAng για το 1^ο και 2^ο Transfection στα κύτταρα HEK-293T (Εικόνα 10 και Εικόνα 11 αντίστοιχα), καθώς και για τα κύτταρα HeLa (Εικόνα 12), καθώς και έλεγχος

ισοφόρτωσης των δειγμάτων με αντίσωμα έναντι της β-ακτίνης. (Ang-14,4kDa/Actin-42kDa)



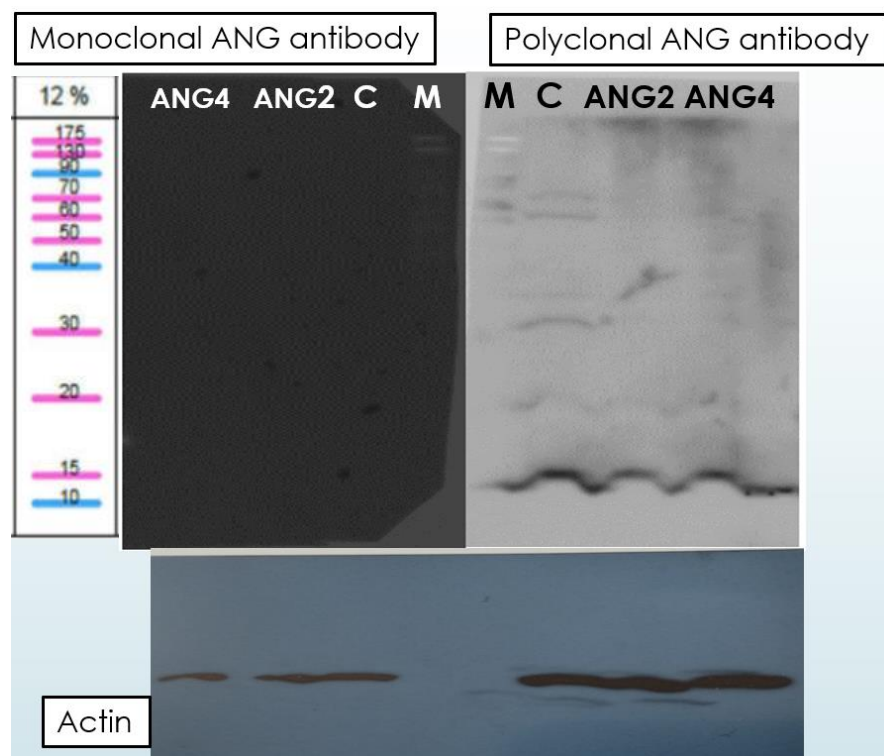
Εικόνα 10. Αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης κατά Western με το ειδικό αντίσωμα έναντι της hAng για το 1^ο Transfection στα κύτταρα HEK-293T. Με Empty απεικονίζεται η διαδρομή που έτρεξε το δείγμα από κύτταρα που διαμολύνθηκαν με το πλασμίδιο pcDNA4/TO και με Ang η διαδρομή που έτρεξε το δείγμα από κύτταρα που διαμολύνθηκαν με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pcDNA4-hAng

Στην Εικόνα 10 παρατηρούνται κάποιες μικρές και αχνές ζώνες τόσο στις διαδρομές με το ειδικό αντίσωμα έναντι της hAng όσο και σε αυτές με το ειδικό αντίσωμα έναντι της β-ακτίνης. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα αυτά δεν πραγματοποιήθηκε υπερέκφραση της hAng κατά την πρώτη παροδική διαμόλυνση των κυττάρων HEK-293T, ενώ σύμφωνα με τα αποτελέσματα για τη β-ακτίνη δεν έγινε ισοφόρτωση ανάμεσα στα δείγματα.



Εικόνα 11. Αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης κατά Western με το ειδικό αντίσωμα έναντι της hAng για το 2^ο Transfection στα κύτταρα HEK-293T. Με Empty απεικονίζεται η διαδρομή που έτρεξε το δείγμα από κύτταρα που διαμολύνθηκαν με το πλασμίδιο pcDNA4/TO και με Ang η διαδρομή που έτρεξε το δείγμα από κύτταρα που διαμολύνθηκαν με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pcDNA4-hAng

Όπως παρατηρείται από τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης κατά Western (Εικόνα 11) και στη δεύτερη προσπάθεια παροδικής διαμόλυνσης των κυττάρων HEK-293T δε φαίνεται να πραγματοποιήθηκε υπερέκφραση της ανθρώπινης αγγειογενίνη, καθώς δεν υπάρχει καμία ειδική ζώνη στις διαδρομές με το ειδικό αντίσωμα έναντι της hAng. Αντίθετα, στις διαδρομές με το ειδικό αντίσωμα έναντι της β-ακτίνης παρατηρούνται δύο παρόμοιου μεγέθους ζώνες, υποδηλώνοντας τόσο την ισοφόρτωση των δειγμάτων, όσο και τη διασφάλιση ότι δεν υπήρχαν προβλήματα κατά τη διαδικασία της western blot.



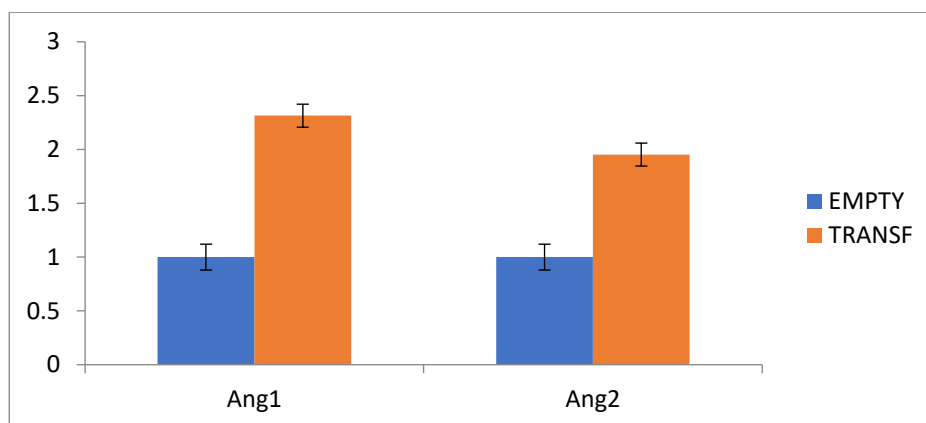
Εικόνα 12. Αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης κατά Western με τα ειδικά αντισώματα έναντι της hAng, κατά την εξωγενή προσθήκη αυτής στα κύτταρα HeLa. Με C (Control) απεικονίζονται οι διαδρομές των δειγμάτων που αποτελούν κύτταρα HeLa χωρίς εξωγενή προσθήκη αγγειογενίνης. Με ANG απεικονίζονται οι διαδρομές με τα κύτταρα HeLa που προστέθηκε εξωγενώς αγγειογενίνη σε ποσότητα 4μg και 2μg αντίστοιχα. Η μεμβράνη κόπηκε στη μέση και η αριστερή πλευρά επώαστηκε με μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της αγγειογενίνης, ενώ η δεξιά με πολυκλωνικό.

Όπως παρατηρείται από τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης κατά Western, για την προσθήκη της αγγειογενίνης εξωγενώς στα κύτταρα HeLa (Εικόνα 12), τόσο η επώαση με μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της αγγειογενίνης, όσο και με πολυκλωνικό, δεν έδωσε σήμα που να υποδηλώνει υπερέκφραση αγγειογενίνης για τα δείγματα των κυττάρων στα οποία είχε γίνει προσθήκη εξωγενώς της πρωτεΐνης. Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα για την ακτίνη, όπου παρατηρήθηκε παρόμοιο σήμα σε όλα τα δείγματα των κυτταρικών εκχυλισμάτων, οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η αγγειογενίνη που προστέθηκε εξωγενώς στα κύτταρα HeLa δεν εισήλθε μέσα σε αυτά. Επειδή, όπως μπορούμε να παρατηρήσουμε από την

εμφάνιση με το πολυκλωνικό αντίσωμα, το σήμα στο Control είναι παρόμοιο με τα σήματα των ANG στα οποία έχει γίνει εξωγενής προσθήκη αγγειογενίνης.

4.2 Έλεγχος των επιπέδων mRNA της αγγειογενίνης σε κύτταρα Empty και Transfected με Real-Time PCR

Για να μελετηθούν τα επίπεδα mRNA της hAng στα κύτταρα HEK-293T, στα οποία έγινε παροδική διαμόλυνση (Transfection) τόσο με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pcDNA4-hAng, όσο και με τον πλασμιδικό φορέα pcDNA4/TO, πραγματοποιήθηκε Real-Time PCR.



Εικόνα 13. Υπερέκφραση της hAng σε κύτταρα HEK-293T. Διαμόλυνση με πλασμιδικό φορέα pcDNA4/TO (EMPTY) και pcDNA-hAng (TRANSF). Ang1: 1^ο πείραμα διαμόλυνσης. Ang2: 2^ο πείραμα διαμόλυνσης.

Για να διαπιστώσουμε εάν το mRNA του γονιδίου της ανθρώπινης αγγειογενίνης εκφράζεται, το συγκρίναμε με τα επίπεδα έκφρασης ενός ιδιόσυστατα εκφραζόμενου γονιδίου, της GAPDH. Τα μετάργραφα του γονιδίου της hAng παράγονται σε φυσιολογικά επίπεδα στη συγκεκριμένη κυτταρική σειρά, συγκριτικά με αυτά της GAPDH. Η RT-PCR έδειξε πως τα επίπεδα mRNA της αγγειογενίνης στα κύτταρα που διαμολύνθηκαν με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο που φέρει ως ένθεμα το γονίδιο της αγγειογενίνης pcDNA4-hAng φαίνεται να είναι διπλάσια από τα επίπεδα έκφρασης των διαμολυμένων κυττάρων από τον πλασμιδικό φορέα pcDNA4/TO (control) και στα δύο Transfections (Ang1, Ang2) που πραγματοποιήθηκαν (Εικόνα 13). Στα αποτελέσματα της Real-Time PCR παρατηρείται μία περαιτέρω υπερέκφραση, σε συνδυασμό όμως με τα αποτελέσματα των Western στα οποία δεν φαίνεται κάποια υπερέκφραση, μία πιθανή υποψία στο γιατί να συμβαίνει αυτό είναι ότι ίσως το αντίσωμα να μη κατάφερε να προσδέσει τόσο καλά μία τόσο μικρή ποσότητα πρωτεΐνης στα κύτταρα.

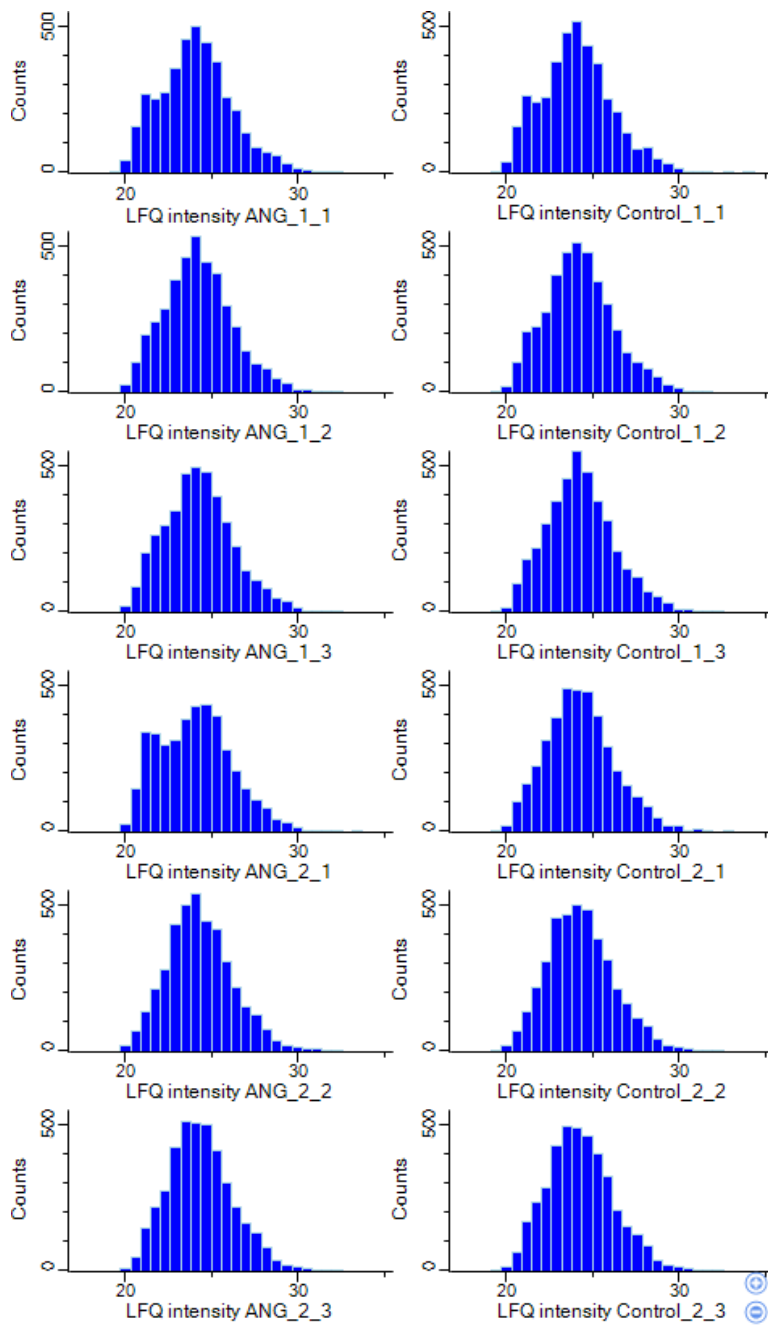
4.3 Πρωτεομική ανάλυση και επεξεργασία των δεδομένων

Τα πρωτεϊνικά δείγματα από δύο βιολογικές επαναλήψεις υποβλήθηκαν σε ανάλυση με φασματογραφία μαζών. (Υπό κανονικές συνθήκες για να μπορέσουμε να βγάλουμε αξιόλογα και συγκρίσιμα αποτελέσματα πρέπει να πραγματοποιηθούν τρεις βιολογικές επαναλήψεις, αλλά αυτό δεν ήταν εφικτό λόγω του ξεσπάσματος της πανδημίας και του κλεισίματος του εργαστηρίου). Τα πρωτογενή δεδομένα με τη μορφή φασμάτων μαζών αναλύονται με το ειδικό πακέτο λογισμικού MaxQuant, που

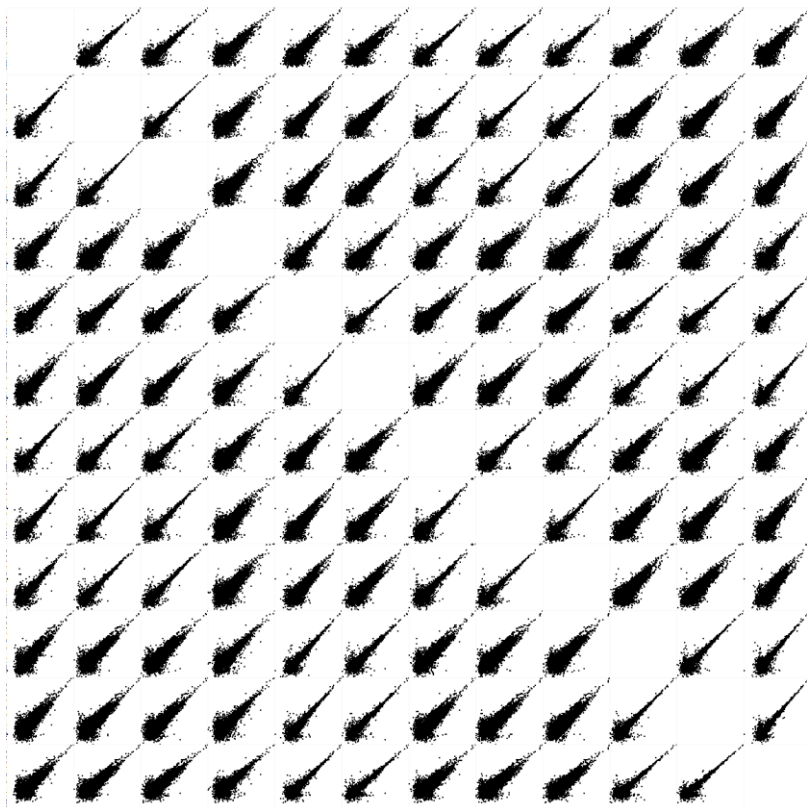
αποτελεί μία σειρά αλγορίθμων. Με τον τρόπο αυτό γίνεται η ταυτοποίηση των πρωτεϊνών του δείγματος από τα επιμέρους πεπτίδια, χρησιμοποιώντας τη βάση δεδομένων του ιστοτόπου της UNIPROT (Universal Protein Resource), με την εφαρμογή φίλτρου ειδικά για τις πρωτεΐνες του ανθρώπου. Το λογισμικό πακέτο MaxQuant παρέχει επιπλέον τη δυνατότητα ποσοτικοποίησης των πρωτεϊνών του δείγματος. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της σχετικής ποσότητας των πρωτεϊνών είναι η διαφορική ανάλυση πρωτεομικής έκφρασης χωρίς σήμανση (Label-Free Quantification, LFQ). Σε αντίθεση με άλλες μεθόδους ποσοτικοποίησης, δεν χρησιμοποιεί κάποιο είδος σήμανσης των πρωτεϊνών (π.χ. με ισότοπα), αλλά τον υπολογισμό της συνολικής έντασης του σήματος του πρόδρομου ιόντος (spectral counts), σαν χρωματογραφική κορυφή. Η ποσοτική τιμή για κάθε πρωτεΐνη δίνεται με τη μορφή LFQ. Τα αποτελέσματα του κάθε δείγματος επεξεργάστηκαν στη συνέχεια με το πρόγραμμα Perseus. Σύμφωνα με την προσέγγιση αυτή, αποκλείονται οι μη ειδικές πρωτεΐνες, αποκλείονται οι πρωτεΐνες που έχουν τιμές έκφρασης ίσες με το μηδέν (δηλαδή δεν ανιχνεύθηκαν από το φασματόμετρο μάζας), ομαδοποιούνται οι προς σύγκριση διαφορετικές ομάδες και ακολουθεί η συγκριτική και στατιστική ανάλυση. Η ανάλυση των δειγμάτων μέσω φασματομετρίας μάζας πραγματοποιήθηκε στο Ινστιτούτο Μοριακής Ογκολογίας του Ερευνητικού Κέντρου Βιοϊατρικών Επιστημών "Αλέξανδρος Φλέμινγκ", από τη Δρ. Μαρίνα Σαμιωτάκη και την Επίκουρο Καθηγήτρια Μαρία Κοντού.

Παρακάτω παρουσιάζονται τα διαγράμματα από το Perseus. Στο Histogram παρατηρούμε ότι τα technical replicates(LFQ intensity ANG_1_1,2,3/ LFQ intensity ANG_2_1,2,3/LFQ intensity Control_1_1,2,3/ LFQ intensity Control_2_1,2,3) δεν έχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ τους και πως όλα παρουσιάζουν γκαουσιανή κατανομή. Αυτό σημαίνει ότι τεχνικά, τα δεδομένα είναι αξιόπιστα.

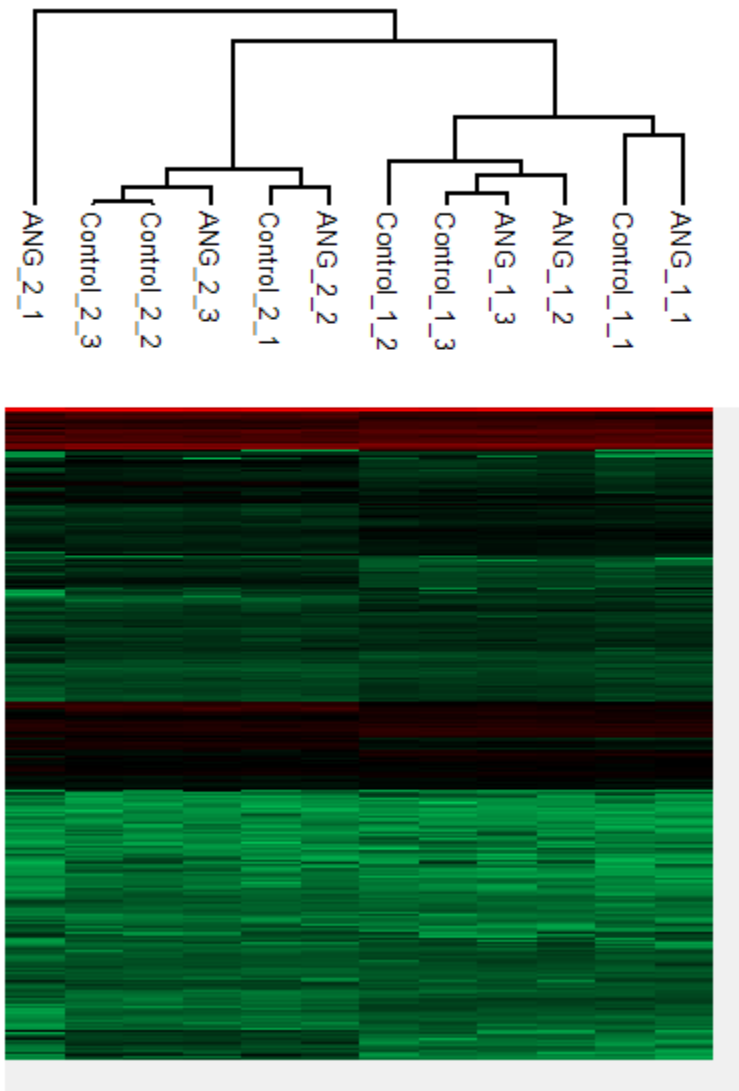
Το διάγραμμα MultiScatter είναι για ποιοτικό έλεγχο όπως και το Histogram.



Εικόνα 14. Διάγραμμα τύπου Histogram, του συνόλου των πρωτεϊνών που προέκυψαν με την επεξεργασία στο Perseus.



Εικόνα 15. Διάγραμμα τύπου *MultiScatter*, του συνόλου των πρωτεϊνών που προέκυψαν με την επεξεργασία στο *Perseus*.

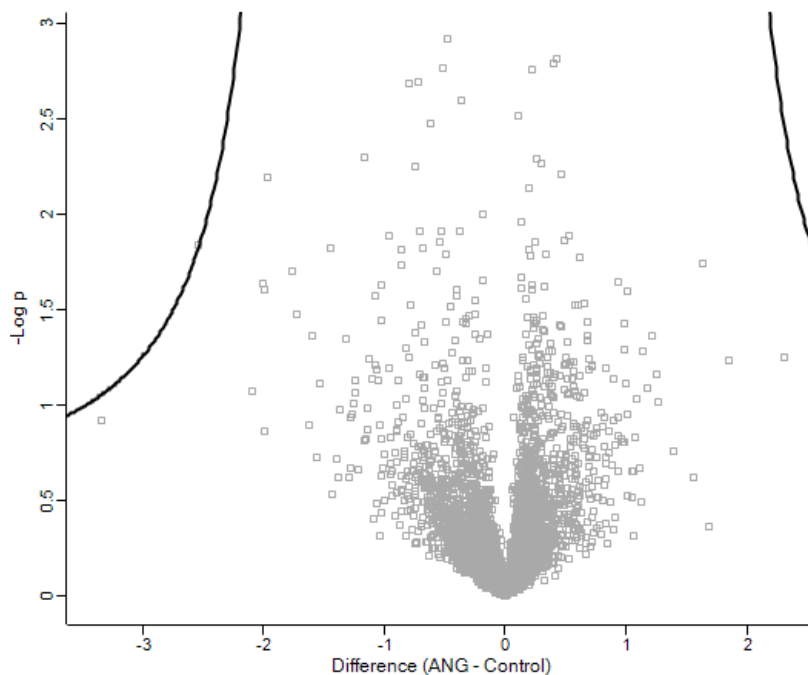


Εικόνα 16. Διάγραμμα τύπου HeatMap του συνόλου των πρωτεϊνών που προέκυψαν με την επεξεργασία στο Perseus

Το HeatMap αποτελεί μια κοινή μέθοδο οπτικοποίησης δεδομένων γονιδιακής έκφρασης. Τα δεδομένα εμφανίζονται σε ένα πλέγμα όπου κάθε σειρά αντιπροσωπεύει ένα γονίδιο και κάθε στήλη αντιπροσωπεύει ένα δείγμα. Το χρώμα και η ένταση των κουτιών χρησιμοποιείται για την αναπαράσταση αλλαγών (όχι απόλυτων τιμών) της έκφρασης γονιδίου. Το συγκεκριμένο HeatMap δεν έχει αξιοποιήσιμα αποτελέσματα καθώς από ότι παρατηρούμε περισσότερη κοινή έκφραση παρουσιάζουν Control και Ang μεταξύ τους από το ίδιο replicate και μεγαλύτερη διαφορά φαίνεται να έχουν δύο Control ή δύο Ang από διαφορετικά replicates. Κάτι το οποίο δεν ήταν αναμενόμενο και δεν βγάζει νόημα.

Στην εικόνα 14, οι καρτεσιανές συντεταγμένες της κάθε πρωτεΐνης στα διαγράμματα, είναι η διαφορά (Difference) μεταξύ των δύο μέσων δείγματος στον άξονα x και ο αρνητικός δεκαδικός λογάριθμος του p -value (-Log p) στον άξονα y . Η εγγενής, αναμενόμενη τάση που έχουν οι ακραίες τιμές Difference να αντιστοιχούν σε μικρές τιμές p -value οδηγεί στο χαρακτηριστικό σχήμα που προσομοιάζει έναν κρατήρα ηφαιστείου. Με αυτόν τον τρόπο, όσο ψηλότερα στον κάθετο άξονα βρίσκεται ένα σημείο (μεγάλη τιμή αρνητικού λογαρίθμου του p -value) τόσο πιο στατιστικά σημαντική είναι η επαναληψιμότητα της ποσότητας της πρωτεΐνης στο κάθε δείγμα, ενώ όσο πιο μακριά από το σημείο 0 στον οριζόντιο άξονα, τόσο πιο στατιστικά

σημαντική είναι η διαφορά στην ποσότητα της πρωτεΐνης μεταξύ των ειδικών δειγμάτων και των δειγμάτων ελέγχου. Οι στατιστικά σημαντικές πρωτεΐνες: που υπερεκφράζονται είναι αυτές που βρίσκονται στο πάνω δεξιό τμήμα του διαγράμματος και αυτές που η έκφρασή τους μειώνεται είναι τοποθετημένες στο πάνω αριστερό τμήμα του διαγράμματος και κάποιες από αυτές ελήφθησαν υπόψη για περαιτέρω ανάλυση.



Εικόνα 17. Διάγραμμα τύπου ScatterPlot (Volcano) του συνόλου των πρωτεϊνών που προέκυψαν με την επεξεργασία στο Perseus

4.4 Πιθανές πυρηνικές πρωτεΐνες των οποίων η έκφραση επηρεάζεται θετικά ή αρνητικά σε κύτταρα υπερεκφρασμένα με hAng

Αν θεωρήσουμε ότι η διαμόλυνση ήταν επιτυχής, τότε οι πρωτεΐνες από την πρωτεομική ανάλυση με τη μεγαλύτερη στατιστική σημαντικότητα σχετίζονται με τα επίπεδα της hAng. Αυτές παρουσιάζονται παρακάτω:

Γονίδιο HMGN1-Upregulation

Κωδικοποιεί την χρωμοσωμική πρωτεΐνη HMG-14 η οποία εντοπίζεται στον πυρήνα των κυττάρων. Η χρωμοσωμική πρωτεΐνη HMG14 δεσμεύεται στην εσωτερική πλευρά του νουκλεοσωμικού DNA, μεταβάλλοντας δυνητικά την αλληλεπίδραση μεταξύ του DNA και του οκταμερούς ιστόνης. Το HMGN1 εκδηλώνει αντικαρκινικές επιδράσεις με τουλάχιστον δύο τρόπους: 1) Με προώθηση της αντικαρκινικής ανοσίας μέσω πόλωσης της ανοσολογικής απόκρισης Th1 και 2) Με αναστολή της ογκογένεσης μέσω της προώθησης της επιδιόρθωσης του DNA και της σταθερότητας του γονιδιώματος.

Γονίδιο CENPF-Upregulation

Κωδικοποιεί την πρωτεΐνη κεντρομερούς F η οποία εντοπίζεται στον πυρήνα των κυττάρων. Η πρωτεΐνη δρα ως πιθανός αναστολέας των κυτταρικών διεργασιών που προκαλούνται από πρωτεΐνες τσέπης(rocket protein) κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, ρυθμίζοντας τη δραστηριότητα των πρωτεϊνών RB κατά τη διαίρεση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Οι RB(πρωτεΐνες ρετινοβλαστώματος-rocket proteins) είναι ογκοκατασταλτικές. Μία επιπλέον ένδειξη ότι μπορεί να σχετίζεται με τα επίπεδα της αγγειογενίνης είναι ότι σε προηγούμενο πείραμα έχει βρεθεί στις στατιστικά σημαντικές πυρηνικές πρωτεΐνες σε πείραμά pulldown με την Ang.

Γονίδιο HMGN2-Upregulation

Κωδικοποιεί την χρωμοσωμική πρωτεΐνη HMG-17 η οποία εντοπίζεται στον πυρήνα των κυττάρων. Συνδέεται με την εσωτερική πλευρά του νουκλεοσωμικού DNA μεταβάλλοντας έτσι την αλληλεπίδραση μεταξύ του DNA και του οκταμερούς ιστόνης. Το HMGN2 μπορεί να αναστέλλει την αγγειογένεση του καρκινικού ιστού και να μειώνει τη διατροφική τροφοδοσία των καρκινικών κυττάρων, προωθώντας έτσι τον θάνατο των καρκινικών κυττάρων και υποδεικνύοντας την πιθανή χρήση του ως αντικαρκινική θεραπεία.

Γονίδιο RYBP-Upregulation

Κωδικοποιεί την πρωτεΐνη που προσδένει RING1 και YY1 η οποία εντοπίζεται στον πυρήνα των κυττάρων. Είναι συστατικό ενός συμπλέγματος πολυπρωτεϊνών PRC1 ομάδας Polycomb (PcG), μια πολύπλοκη κατηγορία που απαιτείται για τη διατήρηση της μεταγραφικά κατασταλτικής κατάστασης πολλών γονιδίων, συμπεριλαμβανομένων των γονιδίων Hox, καθ 'όλη τη διάρκεια της ανάπτυξης. Η υπερέκφραση του μεταγραφικού παράγοντα ETS1 ρυθμίζει προς τα πάνω τη δραστηριότητα υποκινητή του RYBP σε HEK293T και καρκινικά κύτταρα. Το ETS1 ρυθμίζει θετικά την έκφραση RYBP τόσο από το επίπεδο mRNA όσο και από τα επίπεδα πρωτεΐνης. Στα καρκινώματα, το ETS1 δείχνει αυξημένη έκφραση σε μια ποικιλία καρκίνων του ανθρώπου, συμπεριλαμβανομένων των πνευμόνων, του μαστού, του ήπατος, των γαστρικών, του παχέος εντέρου και άλλων, και το αυξημένο ETS1 ρυθμίζει προς τα πάνω τις εκφράσεις ογκογονιδίων.

Γονίδιο TCOF1-Upregulation

Κωδικοποιεί την πρωτεΐνη Treacle η οποία εντοπίζεται στον πυρήνα των κυττάρων. Δρα ως ρυθμιστής της RNA πολυμεράσης I συνδέοντάς την με ένζυμα υπεύθυνα για την επεξεργασία και τροποποίηση RNA από το ριβόσωμα. Επίσης, έχει βρεθεί ότι αλληλοεπιδρά με την πρωτεΐνη PCNA η οποία έχει δειχθεί ότι αλληλοεπιδρά με την αγγειογενίνη. Ο PCNA αλληλοεπιδρά τόσο με την p53 επάγοντας την πολυουβικουϊνωσή της, όσο και με την πρωτεΐνη MDM2, ένα ρυθμιστή της p53, παίζοντας σημαντικό ρόλο στη σταθερότητα των δύο πρωτεϊνών. Η hAng επίσης επάγει την ουβικουϊνωση της p53, προωθώντας την αλληλεπίδραση p53-MDM2. Θα μπορούσε λοιπόν η αλληλεπίδραση της hAng με τον PCNA να σχετίζεται με την αναστολή της δράσης της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης p53,

έχοντας ως αποτέλεσμα την αναστολή της απόπτωσης και την επαγωγή της κυτταρικής επιβίωσης.

Γονίδιο EPAS1-Downregulation

Κωδικοποιεί την Endothelial PAS domain-containing protein 1 η οποία εντοπίζεται στον πυρήνα των κυττάρων. Αποτελεί μεταγραφικό παράγοντα που εμπλέκεται στην ενεργοποίηση γονιδίων ρυθμιζόμενων από τη διαθεσιμότητα οξυγόνου. Σχηματίζει ετεροδιμερές με την ARNT, το οποίο προσδένεται στην αλληλουχία 5'-TACGTG-3' των στοιχείων HRE (Hypoxia Response Element) των υποκινητών των γονιδίων-στόχων. Ρυθμίζει την έκφραση του VEGF και φαίνεται να εμπλέκεται στην ανάπτυξη των αιμοφόρων αγγείων και του πνευμονικού δικτύου. Οι πρωτεΐνες hypoxia-inducible factor-1 alpha (HIF1A) και EPAS1 είναι γνωστό ότι είναι οι βασικοί παράγοντες μεταγραφής που εμπλέκονται στην έκφραση γονιδίων που εξαρτώνται από HIF(επαγώμενους από υποξία μεταγραφικούς παράγοντες) υπό υποξικές συνθήκες. Ένα τέτοιο γονίδιο είναι και η αγγειογενίνη. Το EPAS1 ρυθμίζει όχι μόνο τους VEGF αλλά και τους ειδικούς ενδοθηλιακούς υποδοχείς Flt-1, Flk-1 και Tie2, που είναι όλοι απαραίτητοι στη διαδικασία της αγγειογένεσης. Μπορεί να μειώνεται ο EPAS1 και κατά συνέπεια το mRNA των VEGF, όμως βρέθηκε αρνητικός συσχετισμός μεταξύ του επιπέδου έκφρασης του VEGF και της αγγειογενίνης, άρα δε σημαίνει ότι μειώνεται και η Ang. Μπορεί να ακολουθεί διαφορετική οδό αγγειογένεσης.

Γονίδιο LMNA-Downregulation

Κωδικοποιεί την Prelamin-A/C η οποία εντοπίζεται στον πυρήνα των κυττάρων. Οι λαμίνες είναι συστατικά των πυρηνικών ελασμάτων (lamina), μιας ινώδους στοιβάδας στην πυρηνοπλασματική πλευρά της εσωτερικής πυρηνικής μεμβράνης, παρέχοντας μια μορφή ικρίωματος για τη στήριξη του πυρηνικού φακέλου και ενδεχομένως αλληλεπιδρώντας με τη χρωματίνη. Στα πυρηνικά ελάσματα των κυττάρων θηλαστικών, η λαμίνες A και C είναι παρούσες σε ίσες ποσότητες. Στα όρια των όγκων που διεισδύουν σε υγιή ιστό, τα καρκινικά κύτταρα απελευθερώνουν πρωτεάσες όπως μεταλλοπρωτεϊνάσες και άλλα ένζυμα για να αποικοδομήσουν την εξωκυτταρική μήτρα και να ανοίξουν το δρόμο για επέκταση όγκου. Η αποικοδόμηση της εξωκυτταρικής μήτρας απελευθερώνει παράγοντες ανάπτυξης(growth factors), χημειοκίνες και ρυθμιστές αγγειογένεσης που δεσμεύονται εκεί, οι οποίοι αναδρούν(retroact) στα κύτταρα του όγκου και μεταξύ πολλών άλλων επιδράσεων αυτό θα μπορούσε να αυξήσει τα επίπεδα του Lamina A / C. Μία επιπλέον ένδειξη ότι μπορεί να σχετίζεται με τα επίπεδα της αγγειογενίνης είναι ότι σε προηγούμενο πείραμα έχει βρεθεί στις στατιστικά σημαντικές πυρηνικές πρωτεΐνες σε πείραμα pull-down με την Ang.

4.5 Συζήτηση

Η αγγειογενίνη είναι ένας ισχυρός επαγωγέας της αγγειογένεσης, παίζοντας καταλυτικό ρόλο στο σχηματισμό νέων αιμοφόρων αγγείων. Οι ιδιότητές της ως ριβονουκλεάση και ως αγγειογενετικός παράγοντας είναι απαραίτητες για τη διεκπεραίωση όλων των λειτουργιών της. Πέρα από τις βασικές της δράσεις, τη

ριβονουκλεολυτική και την αγγειογενετική, η hAng επιτελεί ή παίρνει μέρος και σε άλλες σημαντικές λειτουργίες, σε διάφορες υποκυτταρικές περιοχές, σε διαφορετικούς τύπους κυττάρων καθώς και σε ποικίλες φυσιολογικές και παθολογικές διεργασίες. Έχει μεγάλο ενδιαφέρον η μελέτη της, καθώς μέσω της ανακάλυψης των μηχανισμών δράσης της και των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της μπορεί να γίνει δυνατή η χρήση της ως διαγνωστικό εργαλείο στις ασθένειες που εμπλέκεται, όπως επίσης και να χρησιμοποιηθεί στην ανάπτυξη θεραπειών κατά της παθολογικής αγγειογένεσης.

Ύστερα από τη διεξαγωγή των προαναφερθέντων πειραματικών διαδικασιών, διαπιστώθηκε πως η αγγειογενίνη δεν εμφανίστηκε καθόλου πόσο μάλλον με αυξημένα επίπεδα στις ανοσοαποτυπώσεις Western και στις στατιστικές αναλύσεις στα διαμολυσμένα κύτταρα, γεγονός που υποδηλώνει ότι σε κάποιο στάδιο κάτι πήγε στραβά. Η Real-Time PCR φανέρωσε αυξημένα επίπεδα mRNA αγγειογενίνης σε διαμολυσμένα κύτταρα με το πλασμίδιο που φέρει ως ένθεμα το γονίδιο της hAng, αλλά από μόνο του δεν είναι αρκετό. Επίσης, δεν υπήρχε ο απαιτούμενος βαθμός επαναληψιμότητας και για τους λόγους αυτούς τα αποτελέσματα δεν είναι αδιαμφισβήτητα και οριστικά και χρίζονται περαιτέρω μελέτης .

Δυστυχώς, δεν ήταν δυνατή η περαιτέρω μελέτη λόγω του ξαφνικού ξεσπάσματος της πανδημίας COVID-19 παγκοσμίως. Ως μελλοντικοί στόχοι λοιπόν, έχουν τεθεί τα εξής: Η επανάληψη και η βελτιστοποίηση του πρωτοκόλλου διαμόλυνσης των HEK-293T κυττάρων καθώς και της ανοσοαποτύπωσης Western, η διαμόλυνση κυττάρων HEK-293T με διαφορετικό τρόπο με τη χρήση χλωριούχου ασβεστίου $CaCl_2$, η διερεύνηση έκφρασης και/ή υποκυτταρικού εντοπισμού σε διαμολυσμένα για hAng κύτταρα μέσω ανοσοφθορισμού, η χρήση διαφορετικού μοντέλου κυττάρων, καθώς και η ανίχνευση αλληλεπιδράσεων αγγειογενίνης μέσω RNAi σε κύτταρα που την εκφράζουν φυσιολογικά ενδογενώς σε υψηλά επίπεδα.

5. Βιβλιογραφία

Ang, J., Sheng, J., Lai, K., Wei, S., & Gao, X. (2013). Identification of estrogen receptor-related receptor gamma as a direct transcriptional target of angiogenin. *PLoS one*, 8(8), e71487.

Aslam, B., Basit, M., Nisar, M. A., Khurshid, M., & Rasool, M. H. (2017). Proteomics: Technologies and Their Applications. *Journal of chromatographic science*, 55(2), 182–196.

Barton, D. P., Cai, A., Wendt, K., Young, M., Gamero, A., & De Cesare, S. (1997). Angiogenic protein expression in advanced epithelial ovarian cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 3(9), 1579–1586.

Betts, J. G., Young, K. A., DeSaix, P., Womble, M., Johnson, J. E., Korol, O., . . . Wise, J. A. (2013). Structure and Function of Blood Vessels. In *Anatomy & Physiology*. Houston, TX: OpenStax College, Rice University.

Bicknell, R., & Vallee, B. L. (1988). Angiogenin activates endothelial cell phospholipase C. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(16).

Bultman, K.M., Uebersohn, A., & Dickson, K. (2015). Angiogenin Interacts with Heat Shock Factor 1. *The FASEB Journal*, 29.

Bythell, B. J., Hendrickson, C. L., & Marshall, A. G. (2012). Relative stability of peptide sequence ions generated by tandem mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 23(4), 644–654.

Chatzileontiadou, D., Samiotaki, M., Alexopoulou, A. N., Cotsiki, M., Panayotou, G., Stamatiadi, M., Balatsos, N., Leonidas, D. D., & Kontou, M. (2017). Proteomic Analysis of Human Angiogenin Interactions Reveals Cytoplasmic PCNA as a Putative Binding Partner. *Journal of proteome research*, 16(10), 3606–3622.

Chatzileontiadou, D. S., Tsirkone, V. G., Dossi, K., Kassouni, A. G., Liggri, P. G., Kantsadi, A. L., Stravodimos, G. A., Balatsos, N. A., Skamnaki, V. T., & Leonidas, D. D. (2016). The ammonium sulfate inhibition of human angiogenin. *FEBS letters*, 590(17), 3005–3018.

Chopra, V., Dinh, T. V., & Hannigan, E. V. (1997). Serum levels of interleukins, growth factors and angiogenin in patients with endometrial cancer. *Journal of cancer research and clinical oncology*, 123(3), 167–172.

Chopra, V., Dinh, T. V., & Hannigan, E. V. (1998). Circulating serum levels of cytokines and angiogenic factors in patients with cervical cancer. *Cancer investigation*, 16(3), 152–159.

Eberle, K., Oberpichler, A., Trantakis, C., Krupp, W., Knüpfer, M., Tschesche, H., & Seifert, V. (2000). The expression of angiogenin in tissue samples of different brain tumours and cultured glioma cells. *Anticancer research*, 20(3A), 1679–1684.

Eun, H.-M. (1996). Nucleases. In *Enzymology Primer for Recombinant DNA Technology* (pp. 145–232). Elsevier.

Gao, X., Hu, H., Zhu, J., & Xu, Z. (2007). Identification and characterization of follistatin as a novel angiogenin-binding protein. *FEBS letters*, 581(28), 5505–5510.

Gao, X., & Xu, Z. (2008). Mechanisms of action of angiogenin. *Acta biochimica et biophysica Sinica*, 40(7), 619–624.

Gerwins, P., Sköldenberg, E., & Claesson-Welsh, L. (2000). Function of fibroblast growth factors and vascular endothelial growth factors and their receptors in angiogenesis. *Critical reviews in oncology/hematology*, 34(3), 185–194

Gho, Y. S., Lee, J. E., Oh, K. S., Bae, D. G., & Chae, C. B. (1997). Development of antiangiogenin peptide using a phage-displayed peptide library. *Cancer research*, 57(17), 3733–3740.

Goo, S. M., & Cho, S. (2013). The expansion and functional diversification of the mammalian ribonuclease a superfamily epitomizes the efficiency of multigene families at generating biological novelty. *Genome biology and evolution*, 5(11), 2124–2140.

Han, X., Aslanian, A., & Yates, J. R., 3rd (2008). Mass spectrometry for proteomics. *Current opinion in chemical biology*, 12(5), 483–490.

Ho, C. S., Lam, C. W., Chan, M. H., Cheung, R. C., Law, L. K., Lit, L. C., Ng, K. F., Suen, M. W., & Tai, H. L. (2003). Electrospray ionisation mass spectrometry: principles and clinical applications. *The Clinical biochemist. Reviews*, 24(1), 3–12.

Hu G. F. (1998). Neomycin inhibits angiogenin-induced angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(17), 9791–9795.

Hu, G. F., Chang, S. I., Riordan, J. F., & Vallee, B. L. (1991). An angiogenin-binding protein from endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(6), 2227–2231.

Hu, G. F., & Riordan, J. F. (1993). Angiogenin enhances actin acceleration of plasminogen activation. *Biochemical and biophysical research communications*, 197(2), 682–687.

Hu, G. F., Riordan, J. F., & Vallee, B. L. (1997). A putative angiogenin receptor in angiogenin-responsive human endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(6), 2204–2209.

Hu, H., Gao, X., Sun, Y., Zhou, J., Yang, M., & Xu, Z. (2005). Alpha-actinin-2, a cytoskeletal protein, binds to angiogenin. *Biochemical and biophysical research communications*, 329(2), 661–667.

Hu, G. F., Strydom, D. J., Fett, J. W., Riordan, J. F., & Vallee, B. L. (1993). Actin is a binding protein for angiogenin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(4), 1217–1221.

Huang, Z., & Bao, S. D. (2004). Roles of main pro- and anti-angiogenic factors in tumor angiogenesis. *World journal of gastroenterology*, 10(4), 463–470.

Huret, J. L., Ahmad, M., Arsaban, M., Bernheim, A., Cigna, J., Desangles, F., Guignard, J. C., Jacquemot-Perbal, M. C., Labarussias, M., Leberre, V., Malo, A., Morel-Pair, C., Mossafa, H., Potier, J. C., Texier, G., Viguié, F., Yau Chun Wan-Senon, S., Zasadzinski, A., & Dessen, P. (2013). Atlas of genetics and cytogenetics in oncology and haematology in 2013. *Nucleic acids research*, 41(Database issue), D920–D924.

Kishimoto, K., Liu, S., Tsuji, T., Olson, K. A., & Hu, G. F. (2005). Endogenous angiogenin in endothelial cells is a general requirement for cell proliferation and angiogenesis. *Oncogene*, 24(3), 445–456.

Koczera, P., Martin, L., Marx, G., & Schuerholz, T. (2016). The Ribonuclease A Superfamily in Humans: Canonical RNases as the Buttress of Innate Immunity. *International journal of molecular sciences*, *17*(8), 1278.

Leland, P. A., Staniszewski, K. E., Park, C., Kelemen, B. R., & Raines, R. T. (2002). The ribonucleolytic activity of angiogenin. *Biochemistry*, *41*(4), 1343–1350.

Li, S., & Hu, G. F. (2010). Angiogenin-mediated rRNA transcription in cancer and neurodegeneration. *International journal of biochemistry and molecular biology*, *1*(1), 26–35.

Li, S., & Hu, G. F. (2012). Emerging role of angiogenin in stress response and cell survival under adverse conditions. *Journal of cellular physiology*, *227*(7), 2822–2826.

Lixin, R., Efthymiadis, A., Henderson, B., & Jans, D. A. (2001). Novel properties of the nucleolar targeting signal of human angiogenin. *Biochemical and biophysical research communications*, *284*(1), 185–193.

Magrane, M., & UniProt Consortium (2011). UniProt Knowledgebase: a hub of integrated protein data. *Database : the journal of biological databases and curation*, *2011*, bar009.

Majumder, P. K., Yeh, J. J., George, D. J., Febbo, P. G., Kum, J., Xue, Q., Bikoff, R., Ma, H., Kantoff, P. W., Golub, T. R., Loda, M., & Sellers, W. R. (2003). Prostate intraepithelial neoplasia induced by prostate restricted Akt activation: the MPAKT model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(13), 7841–7846.

Makarov, A. A., & Ilinskaya, O. N. (2003). Cytotoxic ribonucleases: molecular weapons and their targets. *FEBS letters*, *540*(1-3), 15–20.

Mikawlawng, K. (2016). Aspergillus in Biomedical Research. In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering* (pp. 229–242). Elsevier.

Miyake, M., Goodison, S., Lawton, A., Gomes-Giacoa, E., & Rosser, C. J. (2015). Angiogenin promotes tumoral growth and angiogenesis by regulating matrix metalloproteinase-2 expression via the ERK1/2 pathway. *Oncogene*, *34*(7), 890–901

Moroianu, J., & Riordan, J. F. (1994). Nuclear translocation of angiogenin in proliferating endothelial cells is essential to its angiogenic activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *91*(5), 1677–1681

Ng, T. B., & Wang, H. X. (2006). Fungal Peptides with Ribonuclease Activity. In *Handbook of Biologically Active Peptides* (pp. 137–143). Elsevier.

Osorio, D. S., Antunes, A., & Ramos, M. J. (2007). Structural and functional implications of positive selection at the primate angiogenin gene. *BMC evolutionary biology*, *7*, 167.

Papageorgiou, A. C., Shapiro, R., & Acharya, K. R. (1997). Molecular recognition of human angiogenin by placental ribonuclease inhibitor--an X-ray crystallographic study at 2.0 Å resolution. *The EMBO journal*, *16*(17), 5162–5177.

Peak C.W., Cross L., Singh A., Gaharwar A.K. (2016) Microscale Technologies for Engineering Complex Tissue Structures. In: Singh A., Gaharwar A. (eds) Microscale Technologies for Cell Engineering. Springer, Cham.

Raines R. T. (1998). Ribonuclease A. *Chemical reviews*, *98*(3), 1045–1066.

Riordan J. F. (2001). Angiogenin. *Methods in enzymology*, *341*, 263–273.

Rosenberg H. F. (2008). RNase A ribonucleases and host defense: an evolving story. *Journal of leukocyte biology*, *83*(5), 1079–1087.

Russo, N., Acharya, K. R., Vallee, B. L., & Shapiro, R. (1996). A combined kinetic and modeling study of the catalytic center subsites of human angiogenin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *93*(2)

Russo, N., Nobile, V., Di Donato, A., Riordan, J. F., & Vallee, B. L. (1996). The C-terminal region of human angiogenin has a dual role in enzymatic activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *93*(8), 3243–3247

Rybak, S. M., & Vallee, B. L. (1988). Base cleavage specificity of angiogenin with *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli* 5S RNAs. *Biochemistry*, *27*(7), 2288–2294.

Sadagopan, S., Sharma-Walia, N., Veetil, M. V., Bottero, V., Levine, R., Vart, R. J., & Chandran, B. (2009). 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. *Journal of virology*, *83*(7), 3342–3364.

Sadagopan, S., Veetil, M. V., Chakraborty, S., Sharma-Walia, N., Paudel, N., Bottero, V., & Chandran, B. (2012). Angiogenin functionally interacts with p53 and regulates p53-mediated apoptosis and cell survival. *Oncogene*, *31*(46), 4835–4847.

Shapiro, R., Riordan, J. F., & Vallee, B. L. (1986). Characteristic ribonucleolytic activity of human angiogenin. *Biochemistry*, *25*(12), 3527–3532.

Shapiro, R., Weremowicz, S., Riordan, J. F., & Vallee, B. L. (1987). Ribonucleolytic activity of angiogenin: essential histidine, lysine, and arginine residues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *84*(24), 8783–8787.

Sheng, J., & Xu, Z. (2016). Three decades of research on angiogenin: a review and perspective. *Acta biochimica et biophysica Sinica*, *48*(5), 399–410.

Sheng, J., Yu, W., Gao, X., Xu, Z., & Hu, G. F. (2014). Angiogenin stimulates ribosomal RNA transcription by epigenetic activation of the ribosomal DNA promoter. *Journal of cellular physiology*, *229*(4), 521–529.

Sherwood, L. (2013). Introduction to human physiology. 8th ed. Pacific Grove, Calif.: Brooks/Cole.

Shestenko, O.P., Nikonov, S.D. & Mertvetsov, N.P. (2001). Angiogenin and Its Functions in Angiogenesis. *Molecular Biology* 35, 294–314.

Sköldenberg, E. G., Christiansson, J., Sandstedt, B., Larsson, A., Läckgren, G., & Christofferson, R. (2001). Angiogenesis and angiogenic growth factors in Wilms tumor. *The Journal of urology*, 165(6 Pt 2), 2274–2279.

Skorupa, A., King, M. A., Aparicio, I. M., Dussmann, H., Coughlan, K., Breen, B., Kieran, D., Concannon, C. G., Marin, P., & Prehn, J. H. (2012). Motoneurons secrete angiogenin to induce RNA cleavage in astroglia. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 32(15), 5024–5038.

Stelzl, U., Worm, U., Lalowski, M., Haenig, C., Brembeck, F. H., Goehler, H., Stroedicke, M., Zenkner, M., Schoenherr, A., Koeppen, S., Timm, J., Mintzlaff, S., Abraham, C., Bock, N., Kietzmann, S., Goedde, A., Toksöz, E., Droege, A., Krobitsch, S., Korn, B., ... Wanker, E. E. (2005). A human protein-protein interaction network: a resource for annotating the proteome. *Cell*, 122(6), 957–968

Swift, M. R., & Weinstein, B. M. (2009). Arterial-venous specification during development. *Circulation research*, 104(5), 576–588.

Tahergorabi, Z., & Khazaei, M. (2012). A review on angiogenesis and its assays. *Iranian journal of basic medical sciences*, 15(6), 1110–1126.

Tello-Montoliu, A., Patel, J. V., & Lip, G. Y. (2006). Angiogenin: a review of the pathophysiology and potential clinical applications. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*, 4(9), 1864–1874.

Voron, T., Marcheteau, E., Pernot, S., Colussi, O., Tartour, E., Taieb, J., & Terme, M. (2014). Control of the immune response by pro-angiogenic factors. *Frontiers in oncology*, 4, 70.

Weis, S. M., & Cheresh, D. A. (2011). Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets. *Nature medicine*, 17(11), 1359–1370.

Xia, W., Fu, W., Cai, L., Kong, H., Cai, X., Liu, J., Wang, Y., Zou, M., & Xu, D. (2012). Identification and characterization of FHL3 as a novel angiogenin-binding partner. *Gene*, 504(2), 233–237.

Yu, D., Cai, Y., Zhou, W., Sheng, J., & Xu, Z. (2018). The Potential of Angiogenin as a Serum Biomarker for Diseases: Systematic Review and Meta-Analysis. *Disease markers*, 2018, 1984718.

Zhai, Y., Zhao, X., Sheng, J., Gao, X., Ou, Z., & Xu, Z. (2015). Ribonuclease like 5 regulates zebrafish yolk extension by suppressing a p53-dependent DNA damage response pathway. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 65, 12–19.

Zhang, H., Gao, X., Weng, C., & Xu, Z. (2008). Interaction between angiogenin and fibulin 1: evidence and implication. *Acta biochimica et biophysica Sinica*, 40(5), 375–380.

Zhu, J., Sheng, J., Dong, H., Kang, L., Ang, J., & Xu, Z. (2013). Phospholipid scramblase 1 functionally interacts with angiogenin and regulates angiogenin-enhanced rRNA transcription. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, 32(6), 1695–1706.