



ΤΜΗΜΑ

**Βιοχημείας &  
Βιοτεχνολογίας**

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



# ΟΛΓΑ ΠΑΠΑΪΩΑΝΝΟΥ

## Η ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΗΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗΣ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΙΝΗΣ ΣΤΗΝ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ



ΛΑΡΙΣΑ 2022

Το έργο συγχρηματοδοτείται από την Ελλάδα και την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση», στο πλαίσιο της Πράξης «Ενίσχυση του ανθρώπινου ερευνητικού δυναμικού μέσω της υλοποίησης διδακτορικής έρευνας – 2<sup>ος</sup> Κύκλος» (MIS-5000432), που υλοποιεί το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ).



**Επιχειρησιακό Πρόγραμμα  
Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού,  
Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση**

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



Η ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΗΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗΣ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΙΝΗΣ ΣΤΗΝ  
ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ

### Τριμελής συμβουλευτική επιτροπή

**Δημήτριος Λεωνίδας (Επιβλέπων)**

*Καθηγητής, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας*

**Γεώργιος Παπαδόπουλος**

*Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας*

**Νικόλαος Μπαλατσός**

*Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας*

### Επταμελής εξεταστική επιτροπή

**Δημήτριος Λεωνίδας (Επιβλέπων)**

*Καθηγητής, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας*

**Γεώργιος Παπαδόπουλος**

*Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας*

**Νικόλαος Μπαλατσός**

*Επίκουρος Καθηγητής, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας*

**Άννα Μαρία Ψαρρά**

*Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας*

**Μαρία Κοντού**

*Επίκουρη Καθηγήτρια, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας*

**Γεώργιος Κοντοπίδης**

*Καθηγητής, Τμήμα Κτηνιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας*

**Γεώργιος Σπυρούλιας**

*Καθηγητής, Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστήμιο Πατρών*

ΟΛΓΑ ΠΑΠΑΪΩΑΝΝΟΥ

Η ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΗΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗΣ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΙΝΗΣ ΣΤΗΝ  
ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ

ΟΛΓΑ ΠΑΠΑΪΩΑΝΝΟΥ

2022

Η ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΗΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗΣ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΙΝΗΣ ΣΤΗΝ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Αριθμός προκαταρκτικών σελίδων: 10

Συνολικός αριθμός σελίδων: 210

Αριθμός πινάκων: 19

Αριθμός εικόνων: 76

Αριθμός βιβλιογραφικών παραπομπών: 261

**Μέρος της διδακτορικής διατριβής έχει παρουσιαστεί στην παρακάτω δημοσίευση**

**Papaioannou, O.S.E.**, Tsika, A.C., Rovoli, M., Kontopidis, G., Spyroulias, G.A., Leonidas, D.D. Biochemical and biophysical characterization of the human angiogenin – proliferating cell nuclear antigen (PCNA) interaction. Submitted.

**Δημοσιεύσεις σε συναφές αντικείμενο**

Kyriakis, E., Karra, A.G., **Papaioannou, O.**, Solovou, T., Skamnaki, V.T., Liggri, P.G.V., Zographos, S.E., Szennyes, E., Bokor, É., Kun, S., Psarra, A.-M.G., Somsák, L., Leonidas, D.D. The architecture of hydrogen and sulfur  $\sigma$ -hole interactions explain differences in the inhibitory potency of C- $\beta$ -d-glucopyranosyl thiazoles, imidazoles and an N- $\beta$ -d glucopyranosyl tetrazole for human liver glycogen phosphorylase and offer new insights to structure-based design. *Bioorg Med Chem.* 2020, 28(1):115196. doi: 10.1016/j.bmc.2019.115196. Epub 2019 Nov 14.

## Ευχαριστίες

Η εκπόνηση της διδακτορικής διατριβής δεν είναι μια εύκολη διαδικασία. Η καθημερινή τριβή με την επιστημονική έρευνα κρύβει δυσκολίες, πολλές αποτυχίες και κυρίως πάρα πολλές στιγμές αμφισβήτησης του ίδιου σου του εαυτού. Όμως, όλα αυτά στο τέλος του ταξιδιού εξανεμίζονται κι αυτό που μένει είναι η κατάκτηση σημαντικών εφόδων για τη ζωή σου, όπως η επιμονή, η υπομονή, η προσήλωση στο στόχο, η αποφασιστικότητα και η ταπεινοφροσύνη. Ίσως το πιο δύσκολο κομμάτι της συγγραφής της διατριβής να είναι αυτό των Ευχαριστιών. Πώς άραγε να αποτυπώσεις με λέξεις όλα τα συναισθήματα που σε κατακλύζουν, λέγοντας «ευχαριστώ» στους ανθρώπους που σε στήριξαν όλα αυτά τα χρόνια για να πετύχεις το στόχο σου; Νομίζω πως είναι σχεδόν αδύνατον...

Θα ξεκινήσω παρόλα αυτά, με ένα μεγάλο ευχαριστώ στον επιβλέποντα καθηγητή της διατριβής, Καθηγητή Δημήτρη Λεωνίδα. Ήταν πάντα παρών όταν τον χρειαζόμουν, καθοδηγώντας και ενθαρρύνοντας με, σε κάθε στάδιο της διαδικασίας, ακόμα και όταν ο δρόμος ήταν δύσκολος. Μέσα από τις συζητήσεις μας όλα αυτά τα χρόνια, ακόμη και μέσα από τις διαφωνίες μας, μου έμαθε με τον τρόπο του τι σημαίνει να είσαι επιστήμονας. Η εμπιστοσύνη του στο πρόσωπό μου, παρόλο που όταν ξεκίνησα το διδακτορικό μου δεν είχα καμία συνάφεια με το αντικείμενο της Δομικής Βιολογίας, με βοήθησε να ωριμάσω επιστημονικά, να πιστέψω στον εαυτό μου και να εξελιχθώ ως ερευνητρια. Θυμάμαι σε κάποια από τις συζητήσεις μας, μου είχε πει πως για το διδακτορικό σου πρέπει να δώσεις την ψυχή σου... Τότε μου είχε φανεί λίγο υπερβολικό, τώρα όμως συνειδητοποιώ πόσο δίκιο είχε... Το αποτέλεσμα της όμορφης συνεργασίας μας, παρουσιάζεται στις επόμενες σελίδες αυτής της διατριβής!

Επίσης, σημαντικό ρόλο στην περάτωση της διατριβής έπαιξε και ο Αναπληρωτής Καθηγητής Γεώργιος Παπαδόπουλος, μέλος της τριμελούς επιτροπής του διδακτορικού μου. Τον ευχαριστώ για την υπέροχη συνεργασία μας στα πειράματα Docking και τα πειράματα προσομοιώσεων Μοριακής Δυναμικής, που πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριό του. Οι πολύωρες συζητήσεις μας στο γραφείο του, οι συμβουλές του, οι ιδέες του καθώς και οι παρατηρήσεις του ήταν ανεκτίμητες! Ακόμη, θα ήθελα να τον ευχαριστήσω ειλικρινά για την ηθική στήριξη που μου πρόσφερε, κυρίως στο τελευταίο έτος του διδακτορικού. Ήταν εκεί για να μου δείξει πως η παραίτηση δεν υφίσταται καν σαν επιλογή κι ότι όλα τα προβλήματα θα λυθούν, αρκεί να το θελήσω.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω και στο τρίτο μέλος της τριμελούς μου επιτροπής, τον Επίκουρο Καθηγητή Νικόλαο Μπαλατσό, για την άψογη συνεργασία μας όλα αυτά τα χρόνια. Η πόρτα του γραφείου του ήταν πάντα ανοιχτή για μένα, ενώ οι συμβουλές και οι παρατηρήσεις του ήταν πάντα εύστοχες και ουσιαστικές.

Ένα ειλικρινές ευχαριστώ οφείλω στην Επίκουρο Καθηγήτρια Μαρία Κοντού, για την υπέροχη συνεργασία μας, τις όμορφες συζητήσεις μας τόσο για επιστημονικά, όσο και προσωπικά ζητήματα, αλλά και την ηθική της υποστήριξη. Η κ. Κοντού είναι ένας υπέροχος άνθρωπος κι ένας καταρτισμένος επιστήμονας και νιώθω πολύ τυχερή που τη γνώρισα.

Ακόμη, ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στην Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Άννα Μαρία Ψαρρά, για την άριστη συνεργασία μας. Η πόρτα του γραφείου της ήταν πάντα ανοιχτή για να συζητήσουμε και να σχεδιάσουμε πειράματα, ενώ οι στοχευμένες παρατηρήσεις της και οι συμβουλές της με βοήθησαν πολύ.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά και τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής Καθηγητή Γεώργιο Κοντοπίδη, Καθηγητή Γεώργιο Σπυρούλια, τόσο για την τιμή που μου έκαναν να αποτελούν μέλη της εξεταστικής μου επιτροπής, όσο και για το χρόνο που διέθεσαν για να μελετήσουν και να κρίνουν τη διατριβή.

Όσον αφορά στον καθηγητή Γεώργιο Κοντοπίδη, του οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ για την όμορφη συνεργασία μας στα πειράματα Θερμιδομετρίας Ισοθερμικής Τιτλοδότησης (ITC) που πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριό του, στο τμήμα Κτηνιατρικής Καρδίτσας. Επίσης, ευχαριστώ και την Δρ. Μάγδα Ροβόλη, μέλος του εργαστηρίου του, για τη βοήθεια της σε αυτά τα πειράματα. Επιπροσθέτως, ευχαριστώ ιδιαίτερα τον καθηγητή Γεώργιο Σπυρούλια, για την εξαιρετική συνεργασία μας στα πειράματα φασματοσκοπίας NMR, που πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριό του, στο τμήμα Φαρμακευτικής Πατρών. Ευχαριστώ επίσης και την υποψήφια διδάκτορα του Εργαστηρίου του, Κατερίνα Τσίκα, που μοιράστηκε μαζί μου τις γνώσεις της για το NMR.

Επιπλέον θέλω να ευχαριστήσω και τα υπόλοιπα μέλη ΔΕΠ του εργαστηρίου Επίκουρη Καθηγήτρια Βασιλική Σκαμνάκη και Επίκουρη Καθηγήτρια Περσεφόνη Γιαννούλη για τη συνεργασία τους.

Από αυτές τις ευχαριστίες δε θα μπορούσαν να λείπουν και οι συνάδελφοι μου από το εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας. Ιδιαίτερα θα ήθελα να πω ένα τεράστιο ευχαριστώ στον Δρ. Γιώργο Στραβοδήμο για την άψογη συνεργασία που είχαμε όλα αυτά τα χρόνια στο εργαστήριο, αλλά και τη φιλία που αναπτύξαμε. Μέσα από την καρδιά μου θέλω να πω επίσης ένα μεγάλο ευχαριστώ στους συναδέλφους και φίλους: Χριστίνα Δράκου, Αναστασία Τσαγκαράκου, Συμεών Κούλα, Ραφαηλία Μπέτα και Ευθύμιο Κυριάκη. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου με τα οποία μοιραστήκαμε πολλές στιγμές της καθημερινότητάς μας στο εργαστήριο: Φωτεινή Καλούση, Αχιλλέα Γεωργαντόπουλο, Ιωάννη Τσιάλτα, Ζωή Αρσενοπούλου, Σέφη Αλεξόπουλο, Θεοδώρα Σολοβού και Διονύση Αντωνόπουλο.

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω ξεχωριστά την υποψήφια πλέον διδάκτορα Μαριαλένα Γεωργοπούλου, για την όμορφη συνεργασία μας κατά την



*εκπόνηση της μεταπτυχιακής της διατριβής. Η καθημερινότητα στο εργαστήριο γινόταν πιο όμορφη χάρη στην παρέα της και την υποστήριξη της. Είμαι πολύ τυχερή που μέσα από αυτή τη συνεργασία κέρδισα μία τόσο καλή φίλη!*

*Ευχαριστώ επίσης θερμά το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ) για τη χορήγηση υποτροφίας κατά την εκπόνηση της διδακτορικής μου διατριβής.*

*Κλείνοντας, θα ήθελα να εκφράσω το μεγαλύτερο ευχαριστώ στην υπέροχη οικογένεια μου. Τους γονείς μου Στέργιο Παπαϊωάννου και Ευαγγελία Ευαγγέλου, την αδερφή μου Γεωργία Παπαϊωάννου, τη θεία μου Μαρία Ευαγγέλου, την ξαδέρφη μου Αντωνία Χαπίτα, αλλά και τους παππούδες μου Δημήτρη Ευαγγέλου, Γεωργία Παπατριανταφύλλου και Όλγα Παπαϊωάννου. Ήταν πάντα εκεί, τόσο στις εύκολες, όσο και στις δύσκολες στιγμές, για να χαρούν με τη χαρά μου και να με στηρίξουν στη λύπη μου. Χωρίς την στήριξή τους (ηθική και οικονομική) δε θα είχα καταφέρει να πετύχω ποτέ το στόχο μου! Δε θα σταματήσω ποτέ να τους είμαι ευγνώμων και να τους ευχαριστώ από τα βάθη της καρδιάς μου! Στο τέλος άφησα το πιο μεγάλο ευχαριστώ από όλα για το σύντροφο και μέλλοντα σύζυγο μου, Χρήστο Μπάτσικα. Ήταν πάντα δίπλα μου, συνοδοιπόρος και πρόθυμος να θυσιάσει και να υποστεί τα πάντα, φτάνει μόνο να με βλέπει να χαμογελάω... Πόσα ξενύχτια περάσαμε παρέα στο εργαστήριο; Πόσα κλάματα και πόσα γέλια να απαριθμήσω; Η εμπιστοσύνη του στο πρόσωπο μου και η σιγουριά του πως μπορώ να καταφέρω τα πάντα αρκεί να μη σταματήσω να προσπαθώ, ήταν πηγή δύναμης για να πετύχω το στόχο μου. Άλλωστε, όπως συνηθίζει να μου λέει «Το πιο βαθύ σκοτάδι είναι λίγο πριν την αυγή».*

*Στους γονείς μου, Στέργιο Παπαϊωάννου και  
Ευαγγελία Ευαγγέλου και στον αγαπημένο  
μου Χρήστο Μπάτσικα.*

**«Το πιο βαθύ σκοτάδι είναι λίγο πριν την αυγή»**

## Πίνακας περιεχομένων

Πίνακας περιεχομένων .....	1
<b>Περίληψη .....</b>	<b>6</b>
<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....</b>	<b>7</b>
1.1. Ριβονουκλεάσες.....	7
1.2. Ανθρώπινη αγγειογενίνη (hAng) .....	9
1.2.1. Η δομή της ανθρώπινης αγγειογενίνης .....	11
1.2.1.1. Γενικά χαρακτηριστικά.....	11
1.2.1.2. Δομή και ριβονουκλεολυτική δράση της hAng.....	13
1.2.2. Μηχανισμοί δράσης της hAng.....	17
1.2.3. Βασικές λειτουργίες της hAng .....	26
1.2.4. Ρύθμιση της hAng .....	31
1.2.5. Αγγειογενίνη και ασθένειες .....	34
1.2.6. Αναστολείς της δράσης της hAng .....	38
1.2.7. Αλληλεπιδράσεις της hAng με άλλες πρωτεΐνες.....	45
1.3. Πυρηνικό αντιγόνο πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων (PCNA) .....	46
1.3.1. Δομή του PCNA .....	46
1.3.2. Μηχανισμοί λειτουργίας του PCNA .....	50
1.3.2.1. Ο ρόλος του PCNA στην αντιγραφή και στην επιδιόρθωση βλαβών του DNA .....	50
1.3.2.2. Οι ρόλοι του PCNA στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου, στο μεταβολισμό της χρωματίνης και στη συνοχή των αδελφών χρωματίδων .....	56
1.3.3. Ο ρόλος του PCNA στο κυτταρόπλασμα .....	60
1.3.4. Αλληλεπιδράσεις του PCNA με άλλες πρωτεΐνες .....	66
1.3.4.1. Δομικές μελέτες συμπλόκων του PCNA με άλλες πρωτεΐνες .....	66
1.4. Κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ .....	71
1.4.1. Κρυσταλλογραφία πρωτεϊνών .....	71
1.4.1.1. Κρύσταλλοι πρωτεΐνης.....	71

1.4.1.2. Ανάπτυξη κρυστάλλων πρωτεΐνης .....	72
1.4.1.3. Παράγοντες που επηρεάζουν την κρυστάλλωση.....	74
1.4.1.4. Μέθοδοι κρυστάλλωσης .....	75
1.4.2. Περίθλαση ακτίνων Χ από πρωτεϊνικούς κρυστάλλους.....	75
1.4.3. Συλλογή και ανάλυση κρυσταλλογραφικών δεδομένων .....	76
1.4.4. Το πρόβλημα της φάσης .....	77
1.4.5. Δείκτες Miller h, k, l.....	78
1.4.6. Νόμος του Bragg.....	78
1.4.7. Χάρτες ηλεκτρονιακής πυκνότητας .....	79
1.4.8. Παράγοντες κρυσταλλογραφικών δεδομένων .....	80
1.5. Θερμιδομετρία Ισοθερμικής Τιτλοδότησης (Isothermal titration calorimetry, ITC).....	82
1.6. Μελέτες Πρόσδεσης (Docking).....	86
1.7. Προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής (Molecular Dynamic, MD) .....	89
<b>2. ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΜΕΛΕΤΗΣ .....</b>	<b>92</b>
<b>3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....</b>	<b>93</b>
3.1 Υλικά.....	93
3.2 Μέθοδοι .....	100
3.2.1 Δημιουργία μεταλλαγμάτων της hAng με τη μέθοδο της κατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης (Site Direct Mutagenesis, SDM).....	100
3.2.2 Ετερόλογη έκφραση και καθαρισμός των μεταλλαγμάτων της ανθρώπινης αγγειογενίνης, hAng S28AT36AS37A και hAng S28AT36AS37AS87A.....	103
3.2.2.1. Υπερέκφραση των μεταλλαγμάτων hAng S28AT36AS37A και hAng S28AT36AS37AS87A .....	103
3.2.2.2. Απομόνωση και καθαρισμός των μεταλλαγμάτων hAng S28AT36AS37A και hAng S28AT36AS37AS87A.....	105
3.2.3. Κρυστάλλωση των μεταλλαγμάτων hAng S28AT36AS37A και hAng S28AT36AS37AS87A.....	109
3.2.4. Συλλογή κρυσταλλογραφικών δεδομένων των μεταλλαγμάτων hAng S28AT36AS37A και hAng S28AT36AS37AS87A .....	110

3.2.5. Υπερέκφραση του πυρηνικού αντιγόνου πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων (Proliferating Cell Nuclear Antigen, PCNA) .....	110
3.2.6. Απομόνωση και καθαρισμός του PCNA .....	112
3.2.7. Ανοσοκατακρήμνιση πρωτεϊνών (Immunoprecipitation, IP) .....	118
3.2.7.1 Ανοσοκατακρήμνιση της hAng και του PCNA <i>in vitro</i> .....	119
3.2.8. Ανοσοαποτύπωση κατά Western, Western Blot (Kurien & Hal Scofield, 2015) .....	120
3.2.9. Βιοφυσικός χαρακτηρισμός της αλληλεπίδρασης της hAng με το PCNA, μέσω θερμιδομετρίας ισοθερμικής τιτλοδότησης (Isothermal Titration Calorimetry, ITC).....	123
3.2.10. Κρυστάλλωση του συμπλόκου hAng-PCNA.....	124
3.2.10.1 Βελτίωση των κρυστάλλων του συμπλόκου hAng-PCNA με χρήση της τεχνικής της μικροσποράς (microseeding).....	124
3.2.10.2 Συλλογή κρυσταλλογραφικών δεδομένων του συμπλόκου hAng-PCNA.....	125
3.2.11. Υπερέκφραση και καθαρισμός της επισημασμένης 15N Met(-1)-hAng για μετρήσεις φασματοσκοπίας NMR.....	126
3.2.11.1 Υπερέκφραση της επισημασμένης 15N Met(-1)-hAng.....	126
3.2.11.2. Απομόνωση και καθαρισμός της επισημασμένης 15N Met(-1)-hAng.....	126
3.2.12. Πρόβλεψη του Τρόπου Πρόσδεσης (Docking) της hAng με τον PCNA με τη βοήθεια αλγορίθμων docking και Προσομοιώσεων Μοριακής Δυναμικής (Molecular dynamics simulations, MD).....	127
3.2.12.1 Μελέτες πρόσδεσης (Docking).....	127
3.2.12.2. Προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής (Molecular dynamics simulations, MD) .....	129
3.2.12.3. Υπολογισμός RMSD (Root Mean Square Deviation).....	131
3.2.13. Δημιουργία μεταλλάξεων στο μοντέλο hAng-PCNA <i>in silico</i> .....	131
3.2.14. Προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής για το σύμπλοκο hAng R5ER101E-PCNA.....	132
3.2.15. Δημιουργία των μεταλλαγμάτων της hAng, R5E και R5ER101E, με τη μέθοδο της κατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης (Site Direct Mutagenesis, SDM).....	132

3.2.16. Ετερόλογη έκφραση και καθαρισμός των μεταλλαγμάτων hAng R5E και hAng R5ER101E.....	133
3.2.17. Βιοφυσικός χαρακτηρισμός της αλληλεπίδρασης των μεταλλαγμάτων της hAng S28AT36AS37AS87A, R5E και R5ER101E με το PCNA, μέσω θερμιδομετρίας ισοθερμικής τιτλοδότησης (Isothermal Titration Calorimetry, ITC) .....	133
<b>4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>	<b>135</b>
4.1. Απομόνωση και καθαρισμός των μεταλλαγμάτων hAng S28AT36AS37A και hAng S28AT36AS37AS87A.....	135
4.2. Κρυσταλλογραφικές μελέτες των μεταλλαγμάτων hAng S28AT36AS37A και hAng S28AT36AS37AS87A.....	138
4.2.1. Ανάπτυξη κρυστάλλων των μεταλλαγμάτων hAng S28AT36AS37A και hAng S28AT36AS37AS87A.....	138
4.2.2. Συλλογή και ανάλυση κρυσταλλογραφικών δεδομένων .....	139
4.3. Υπερέκφραση του πυρηνικού αντιγόνου πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων (Proliferating Cell Nuclear Antigen, PCNA).....	143
4.4. Απομόνωση και καθαρισμός του PCNA.....	143
4.5. Ανοσοκατακρήμνιση της hAng και του PCNA <i>in vitro</i> .....	149
4.6. Βιοφυσικός χαρακτηρισμός της αλληλεπίδρασης της hAng με το PCNA, μέσω θερμιδομετρίας ισοθερμικής τιτλοδότησης (Isothermal Titration Calorimetry, ITC) .....	150
4.7. Ανάπτυξη κρυστάλλων του συμπλόκου hAng-PCNA .....	151
4.8. Απομόνωση και καθαρισμός της επισημασμένης <sup>15</sup> N hAng .....	152
4.9. Προσδιορισμός της επιφάνειας αλληλεπίδρασης της hAng και του PCNA μέσω φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR)..	152
4.10. Πρόβλεψη του Τρόπου Πρόσδεσης (Docking) της hAng με το PCNA με τη βοήθεια αλγορίθμων docking και Προσομοιώσεων Μοριακής Δυναμικής (Molecular dynamics simulations, MD) .....	156
4.10.1. Απεικόνιση του επικρατέστερου μοντέλου του συμπλόκου hAng-PCNA μετά από τις προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής .....	156
4.11. Απομόνωση και καθαρισμός των μεταλλαγμάτων hAng R5E και hAng R5ER101E.....	164
4.12. Βιοφυσικός χαρακτηρισμός της αλληλεπίδρασης των μεταλλαγμάτων της hAng S28AT36AS37AS87A, R5E και R5ER101E με το PCNA, μέσω	

θερμιδομετρίας ισοθερμικής τιτλοδότησης (ITC) .....	167
4.13. Συμπεράσματα .....	170
<b>SUMMARY .....</b>	<b>173</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....</b>	<b>175</b>

## Περίληψη

Η ανθρώπινη αγγειογενίνη (hAng), ένα ασυνήθιστο μέλος της οικογένειας των εκκρινόμενων ριβονουκλεασών, αποτελεί έναν ισχυρό αγγειογενετικό παράγοντα με ρόλο σε μια πληθώρα τόσο φυσιολογικών, όσο και παθολογικών καταστάσεων. Η hAng εμφανίζεται σε φυσιολογικούς ανθρώπινους ιστούς και υγρά, όπως το πλάσμα, το αμνιακό υγρό και το εγκεφαλονωτιαίο υγρό, ενώ παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και εγκαθίδρυση ανθρώπινων όγκων, καθώς διεγείρει την ανάπτυξη νέων αιμοφόρων αγγείων μέσω της διαδικασίας της αγγειογένεσης. Επίσης, εμπλέκεται σε κάθε στάδιο της ογκογένεσης, αποτελώντας ένα διαγνωστικό και προγνωστικό καρκινικό δείκτη και επικυρωμένο φαρμακευτικό στόχο για την ανάπτυξη φαρμάκων στην αντιμετώπιση νεοπλασιών.

Η διδακτορική διατριβή εστιάζεται κυρίως στις αλληλεπιδράσεις της hAng με το πυρηνικό αντιγόνο πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων (PCNA). Το PCNA ανήκει στην οικογένεια των πρωτεϊνών του ολισθαίνοντος σφιγκτήρα του DNA (DNA sliding clamp) και λειτουργεί ως βοηθητική πρωτεΐνη της πολυμεράσης- $\delta$ , ώστε αυτή να προσδεθεί στο DNA και να πραγματοποιηθεί η αντιγραφή του. Ακόμη, παίζει σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό των νουκλεϊκών οξέων, είναι απαραίτητο για την αντιγραφή και την επιδιόρθωση βλαβών του DNA, συμμετέχει στη συγκρότηση της χρωματίνης, στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου, στην απόπτωση και εμπλέκεται στη μεταγραφή του RNA.

Οι μοριακές λεπτομέρειες της αλληλεπίδρασης της hAng με το PCNA προσδιορίστηκαν με συνδυασμό διάφορων μεθόδων βιοφυσικής. Μέσω μελετών ανοσοκατακρήμνισης (IP) της hAng με το PCNA *in vitro*, αποδείχθηκε πως οι δύο πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν άμεσα, ενώ η αλληλεπίδραση ποσοτικοποιήθηκε με θερμιδομετρία ισοθερμικής τιτλοδότησης (ITC), λαμβάνοντας πληροφορίες σχετικά με τη στοιχειομετρία, την ενθαλπία, την εντροπία και την κινητική σχηματισμού του συμπλόκου των δύο πρωτεϊνών, αποκαλύπτοντας πως πρόκειται για μία ισχυρή αλληλεπίδραση με σταθερά διάστασης  $K_d = 130$  nM. Ακόμη, πραγματοποιήθηκε χαρτογράφηση της επιφάνειας αλληλεπίδρασης τους με φασματοσκοπία NMR, ενώ βάσει των παραπάνω πληροφοριών δημιουργήθηκε ένα μοντέλο της τρισδιάστατης δομής του συμπλόκου hAng-PCNA, με τη βοήθεια αλγορίθμων ελλιμενισμού (docking) και προσομοιώσεων μοριακής δυναμικής. Η σταθερότητα της αλληλεπίδρασης ελέγχθηκε με τη δημιουργία μεταλλάξεων των καταλοίπων της hAng, Arg5 και Arg101 που βρίσκονται, σύμφωνα με το μοντέλο, στην επιφάνεια διεπαφής των δύο πρωτεϊνών και αλληλεπιδρούν με τα κατάλοιπα του PCNA, Glu55 και Glu130 αντίστοιχα. Παράχθηκαν έτσι, δύο μεταλλάγματα (R5E και R5ER101E), όπου οι δύο αργινίνες αντικαταστάθηκαν από γλουταμικό οξύ. Εν συνεχεία, πραγματοποιήθηκε βιοφυσικός χαρακτηρισμός της αλληλεπίδρασης των μεταλλαγμάτων της hAng με το PCNA, με ITC. Τα αποτελέσματα επιβεβαίωσαν την



ορθότητα του μοντέλο, καθώς η αλληλεπίδραση του συμπλόκου hAng-PCNA, μετά την αλλαγή των συγκεκριμένων αμινοξέων, μετατράπηκε από μια ισχυρή σε μία μεσαία αλληλεπίδραση με σταθερές διάστασης,  $K_d= 218$  nM και  $K_d= 1160$  nM, για τα μεταλλάγματα R5E και R5ER101E, αντίστοιχα.

Πρόσφατες μελέτες έδειξαν πως η φωσφορυλίωση καταλοίπων σερίνης-θρεονίνης δίνει στην hAng τη δυνατότητα να αποφεύγει τον κυτοσολικό αναστολέα ριβονουκλεασών (RI) και να εισέρχεται στον πυρήνα. Μεταξύ των καταλοίπων σερίνης-θρεονίνης της hAng παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον, η σερίνη 87, που βρίσκεται στη μοριακή επιφάνεια του συμπλόκου RI-hAng και τρία κατάλοιπα κοντά στην αλληλουχία πυρηνικού εντοπισμού (NLS), οι σερίνες 28 και 37 και η θρεονίνη 36. Με στόχο τη διερεύνηση της συμβολής των καταλοίπων αυτών στη δομή της hAng διεξήχθησαν κρυσταλλογραφικές μελέτες των μεταλλαγμάτων hAng S28AT36AS37A και hAng S28AT36AS37AS87A, όπου τα παραπάνω κατάλοιπα αντικαταστάθηκαν από αλανίνη, οι οποίες αποκάλυψαν πως οι συγκεκριμένες μεταλλάξεις δεν αλλάζουν σημαντικά τη δομή της πρωτεΐνης.

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1. Ριβονουκλεάσες

Οι ανθρώπινες ριβονουκλεάσες (RNases), μαζί με τις RNases των άλλων θηλαστικών και σπονδυλωτών, αποτελούν μια εκτεταμένη υπεροικογένεια ομόλογων ενζυμικών πρωτεϊνών που αποτέλεσαν θέμα έντονων βιοχημικών, δομικών και εξελικτικών μελετών για πάνω από μισό αιώνα (Sorrentino, 2010). Οι RNases ανήκουν στην κατηγορία των νουκλεασών και καταλύουν την αποικοδόμηση μορίων RNA, ελέγχοντας μετα-μεταγραφικά τον πληθυσμό τους στα κύτταρα, ενώ διαιρούνται σε ενδοριβονουκλεάσες και εξωριβονουκλεάσες (Dyer & Rosenberg, 2006).

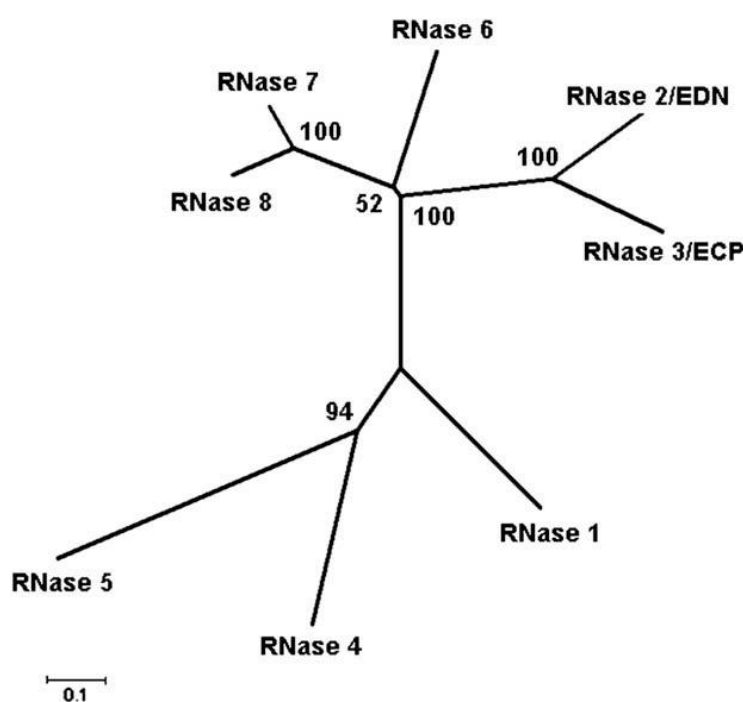
Το πρωτότυπο αυτής της υπεροικογένειας, η βόεια παγκρεατική ριβονουκλεάση A, μια ενδοριβονουκλεάση μοριακού βάρους 13,7 kDa, επίσης γνωστή κι ως RNase A, αποτελεί ίσως την καλύτερα χαρακτηρισμένη πρωτεΐνη από όλες τις γνωστές ενζυμικές πρωτεΐνες θηλαστικών (Sorrentino, 2010). Ακόμη, αποτελεί το καλύτερα χαρακτηρισμένο μέλος μιας ιδιαίτερης ομάδας ριβονουκλεασών με ξεχωριστά χαρακτηριστικά και βιολογικές δράσεις, τις RISBASES (Ribonucleases with Special, i.e. non catalytic, Biological Actions) (D'Alessio et al., 1991). Αυτή η οικογένεια ενζύμων περιλαμβάνει: α) την RNase 1 ή παγκρεατική RNase, που εκφράζεται στο πάγκρεας, καθώς και σε άλλα όργανα και ιστούς, β) την RNase 2, ή μη εκκριτική RNase, επίσης γνωστή ως ηωσινόφιλη νευροτοξίνη (EDN), γ) την RNase 3, που ονομάζεται επίσης ηωσινόφιλη κατιονική πρωτεΐνη (ECP), δ) την RNase 4, που ανιχνεύεται σε αρκετούς σωματικούς ιστούς, ε) την RNase 5, ή αγγειογενίνη (hAng), στ) την RNase 6 ή RNase K6, ζ) την RNase 7, μια επιθηλιακή αντιμικροβιακή πρωτεΐνη και η) την RNase 8, την τελευταία ανακαλυφθείσα ενεργή ανθρώπινη RNase που εκφράζεται μόνο στον πλακούντα (Sorrentino, 2010). Όπως φαίνεται από το φυλογενετικό δέντρο στην *Εικόνα 1*, οι RNases 2, 3, 6, 7 και 8 σχετίζονται στενά μεταξύ τους, σχηματίζοντας ξεχωριστή ομάδα από τις RNase 1, RNase 4 και RNase 5 (Sorrentino, 2010).

Τα μέλη της υπεροικογένειας της RNase A είναι εξωκυτταρικές πρωτεΐνες (Sorrentino, 2010), μοιράζονται σημαντική ομολογία με την παγκρεατική ριβονουκλεάση A, ενώ κωδικοποιούνται από μοναδικά γονίδια που βρίσκονται όλα στο ανθρώπινο χρωμόσωμα 14 (Dyer & Rosenberg, 2006). Και τα οκτώ γνωστά λειτουργικά γονίδια των ριβονουκλεασών στον άνθρωπο, κωδικοποιούν σχετικά μικρά πολυπεπίδια, περίπου 15 kDa. Επτά, από τα οκτώ, γονίδια κωδικοποιούν πρωτεΐνες που έχουν οκτώ κυστεΐνες που σχηματίζουν τέσσερις δισουλφιδικούς δεσμούς στην εκκρινόμενη και κατάλληλα αναδιπλωμένη μορφή των πρωτεϊνών. Εξαιρεση αποτελεί το γονίδιο που κωδικοποιεί την RNase 5, γνωστή κι ως αγγειογενίνη (hAng), το οποίο κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη με έξι κυστεΐνες με αποτέλεσμα η αγγειογενίνη να έχει τρεις δισουλφιδικούς δεσμούς, αντί για 4 που έχουν τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας (Dyer & Rosenberg, 2006).

Επιπλέον, και στα οκτώ μέλη της υπερικογένειας εμφανίζεται μια συντηρημένη καταλυτική τριάδα, που αποτελείται από δύο ιστιδίνες και μία λυσίνη, που βρίσκεται εντός του συντηρημένου μοτίβου CKxxNTF (Dyer & Rosenberg, 2006; Rosenberg, 2008). Τέλος, κάθε ριβονουκλεάση εμφανίζει κάποιο βαθμό προτίμησης νουκλεοτιδίων στα RNA υποστρώματα, αλλά δεν έχουν αυστηρή εκλεκτικότητα για θέσεις διάσπασης και περιοχές αναγνώρισης (Rosenberg, 2008).

Οι ριβονουκλεάσες μπορούν να θεωρηθούν ως τοξίνες, καθώς έχουν την ικανότητα να αποικοδομούν το RNA επάγοντας κυτταρικό θάνατο. Ακόμη, παρουσιάζουν σημαντικές βιολογικές δράσεις όπως αγγειογενετική δράση, νευροτοξικότητα και αντικαρκινική δράση (Sorrentino et al., 1992).

Τέλος, μελέτες έχουν δείξει ότι τα μέλη της οικογένειας των ριβονουκλεασών δεσμεύονται με πολύ υψηλή συγγένεια, αυτής της τάξης των femtomolar (fM), από τον κυτταροπλασματικό αναστολέα ριβονουκλεασών (ribonuclease inhibitor, RI) (Beintema & Kleineidam, 1998). Ο RI, ο οποίος βρίσκεται σε όλα τα κύτταρα των θηλαστικών, ελέγχει τη δραστηριότητα όλων των ριβονουκλεασών αναστέλλοντας ή εξασθενώντας τις βιολογικές τους δράσεις, μέσω της δημιουργίας συμπλόκου RNase-RI (Rutkoski & Raines, 2008).



Εικόνα 1: Φυλογενετικό δέντρο, χωρίς ρίζα, των οκτώ ανθρώπινων ριβονουκλεασών (Sorrentino, 2010).

## 1.2. Ανθρώπινη αγγειογενίνη (hAng)

Η ανθρώπινη αγγειογενίνη (hAng), μέλος της οικογένειας της παγκρεατικής ριβονουκλεάσης (RNase A), είναι μια βασική πρωτεΐνη 123 αμινοξέων και μοριακού βάρους 14,4 kDa, ενώ αποτελεί έναν ισχυρό αγγειογενετικό παράγοντα *in vivo* (Sheng

& Xu, 2016; Fett et al., 1985). Το ανθρώπινο γονίδιο της hAng υπάρχει σε ένα αντίγραφο για κάθε απλοειδές γονιδίωμα και βρίσκεται στο χρωμόσωμα 14, στη θέση q11 (14q11) (Weremowicz et al., 1990).

Η hAng χαρακτηρίστηκε για πρώτη φορά από τον B. Vallee και τους συνεργάτες του, στο Πανεπιστήμιο του Χάρβαρντ, το 1985 (Fett et al., 1985). Αρχικά, απομονώθηκε από το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας ανθρώπινων κυττάρων αδενοκαρκινώματος του παχέος εντέρου, HT-29, βάσει αποκλειστικά και μόνο της αγγειογενετικής δράσης της, στην *in vivo* δοκιμασία αγγειογένεσης, στη χοριοαλλαντοϊκή μεμβράνη εμβρύου όρνιθας (CAM assay). Αποτελεί την πρώτη ανθρώπινη πρωτεΐνη που απομονώθηκε από όγκο και βρέθηκε ότι διεγείρει την ανάπτυξη των αιμοφόρων αγγείων, παρέχοντας έτσι την πρώτη άμεση υποστήριξη για την υπόθεση του J. Folkman, ότι η ανάπτυξη του όγκου εξαρτάται από την αγγειογένεση (Sheng & Xu, 2016). Εμφανίζει ισχυρή αγγειογενετική δράση σε σύγκριση με τους περισσότερους αγγειογενετικούς παράγοντες, καθώς μπορεί να προάγει το σχηματισμό νέων αιμοφόρων αγγείων στη χοριοαλλαντοϊκή μεμβράνη όρνιθας, στους κερατοειδείς και μηνίσκους κονίκλων σε δόσεις fM (Fett et al., 1985; King & Vallee, 1991).

Η ριβονουκλεολυτική της δραστηριότητα είναι από  $10^5$  έως και  $10^6$  φορές χαμηλότερη από εκείνη της RNase A, αλλά παρ' όλα αυτά, είναι απαραίτητη για τη βιολογική της δραστηριότητα (Leland et al., 2002). Η hAng κατανέμεται ευρέως στους ιστούς με το ήπαρ να αποτελεί την κύρια πηγή της κυκλοφορίας της στο πλάσμα του ανθρώπινου ορού, σε συγκέντρωση 250-360 ng/mL, ενώ το mRNA της εκφράζεται σε πολλούς τύπους κυττάρων συμπεριλαμβανομένων τόσο των νεοπλασματικών, όσο και των φυσιολογικών επιθηλιακών, των ινοβλαστών, των περιφερικών αιμοκυττάρων και των αγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων (Shimoyama et al., 1996; Blaser et al., 1993; Weiner et al., 1987).

Η hAng αποτελεί έναν εκκρινόμενο αυξητικό παράγοντα που υπάρχει σε φυσιολογικούς ιστούς και υγρά, όπως στο πλάσμα (Shapiro et al., 1987), στο αμνιακό υγρό (Spong et al., 1997) και στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό (Hzecka, 2008), ενώ εντοπίζεται επίσης και στο μικροπεριβάλλον του όγκου (Skog et al., 2008). Επιπλέον, οι φυσιολογικές και παθολογικές λειτουργίες της hAng δεν περιορίζονται μόνο στην αγγειογένεση, καθώς έχει αποδειχθεί ότι η αυτή εμπλέκεται σε πολλές παθολογικές διεργασίες, όπως η ογκογένεση (Tsuji et al., 2005), η νευροπροστασία (Kieran et al., 2008), η φλεγμονή (Koutroubakis et al., 2004), η έμφυτη ανοσία (Hooper et al., 2003), η αναπαραγωγή (H. S. Lee et al., 1999) και η αναγέννηση των ιστών ύστερα από βλάβη (King & Vallee, 1991).

## 1.2.1. Η δομή της ανθρώπινης αγγειογενίνης

### 1.2.1.1. Γενικά χαρακτηριστικά

Η hAng «αγρίου τύπου» έχει παραχθεί σε δύο μορφές, που διαφέρουν μόνο σε σχέση με το αμινοτελικό τους άκρο. Στη φυσιολογική  $\gamma$ rgoGlu-hAng μορφή, υπάρχει ένα κατάλοιπο πυρογλουταμινικού οξέος στη θέση 1, ενώ στην ανασυνδυασμένη Met(-1)-hAng μορφή, στη θέση 1 υπάρχει γλουταμίνη, καθώς κι ένα επιπλέον κατάλοιπο μεθειονίνης, στη θέση -1. Οι ενζυμικές και αγγειογενετικές λειτουργίες των δύο πρωτεϊνών είναι πανομοιότυπες (Shapiro et al., 1988). Η αρχική τριδιάστατη δομή της hAng (Acharya et al., 1994) προσδιορίστηκε στη μορφή Met(-1)-hAng σε ευκρίνεια 2,4 Å κι ακολούθησε ο προσδιορισμός της δομής της φυσιολογικής μορφής  $\gamma$ rgoGlu-hAng σε ευκρίνεια 1.9 Å (Leonidas et al., 1999).

Η hAng έχει τριτοταγή δομή σε σχήμα νεφρού (kidney shaped), η οποία απαρτίζεται από δύο λοβούς (Εικόνα 2) (Leonidas et al., 1999). Ο λοβός I αποτελείται από τέσσερα αντιπαράλληλα β-ελάσματα, τα B2, B3, B6 και B7, που σχηματίζονται από τα αμινοξικά κατάλοιπα 62-65, 69-72, 104-108 και 111-115 αντίστοιχα. Εκατέρωθεν αυτής της δευτεροταγούς διαμόρφωσης βρίσκονται οι έλικες H1 και H3, που σχηματίζονται από τα αμινοξικά κατάλοιπα 3-13 και 50-57, αντίστοιχα. Ο λοβός II αποτελείται από μια β-πτυχωτή επιφάνεια που σχηματίζεται από τρία αντιπαράλληλα β-ελάσματα, τα B1, B4 και B5, που σχηματίζονται από τα αμινοξικά κατάλοιπα 42-46, 76-84 και 93-101, αντίστοιχα. Τα τρία αυτά αντιπαράλληλα β-ελάσματα βρίσκονται ενδιάμεσα από τις έλικες H2 (κατάλοιπα 23-32) και  $3_{10}$  (κατάλοιπα 117-121) Επίσης, διαθέτει τρεις δισουλφιδικούς δεσμούς. Ο ένας βρίσκεται στον λοβό I και συνδέει την έλικα H3 με το έλασμα B6 (Cys57-Cys107), ενώ οι άλλοι δύο βρίσκονται στο λοβό II, όπου ο ένας συνδέει την έλικα H2 με το έλασμα B4 (Cys26-Cys81) κι ο άλλος το έλασμα B1 με το B5 (Cys39-Cys92) (Leonidas et al., 1999).



Εικόνα 2: Η δομή της hAng (Leonidas et al., 2002).

Οι πρωτοταγείς δομές των hAng και RNase A είναι 33% ταυτόσημες, ενώ διαθέτουν συνολικά 65% ομολογία (Shapiro et al., 1986). Το ενεργό κέντρο της hAng είναι συντηρημένο και απαρτίζεται, όπως και της RNase A, από διάφορα κέντρα πρόσδεσης του υποστρώματος, γνωστά ως P<sub>0</sub>-P<sub>n</sub>, B<sub>0</sub>-B<sub>n</sub>, R<sub>0</sub>-R<sub>n</sub>, τα οποία προσδένουν τις φωσφορικές ομάδες, τις αζωτούχες βάσεις και τις ριβόζες του υποστρώματος RNA, αντίστοιχα (Raines, 1998). Οι κύριες περιοχές είναι: α) το κέντρο P<sub>1</sub>, στο οποίο επιτελείται η διάσπαση του φωσφοδιεστερικού δεσμού (P-O5') και απαρτίζεται από τα καταλυτικά αμινοξέα His13, Lys40, His114, β) το κέντρο B<sub>1</sub>, όπου δεσμεύονται οι 3' πυριμιδίνες και απαρτίζεται από τα αμινοξικά κατάλοιπα Thr44, Ile42, Asn43, Leu115 και Ser118 και γ) το κέντρο B<sub>2</sub>, που αλληλεπιδρά με τις 5' πουρίνες και απαρτίζεται από τα κατάλοιπα Asn68 και Glu108 (Russo et al., 1996; Leonidas et al., 1999).

Επιπλέον, η hAng διαθέτει μία θέση πρόσδεσης σε υποδοχέα, που αποτελείται από τα κατάλοιπα 59-68 και το κατάλοιπο Asn109, μέσω της οποίας προσδένεται στα κύτταρα-στόχους (Leonidas et al., 1999). Εκτός από το ενεργό κέντρο και τη θέση πρόσδεσης σε υποδοχέα, η hAng διαθέτει και μια αλληλουχία πυρηνικού εντοπισμού (Nuclear Localization Signal, NLS), η οποία αποτελείται από τα παρακάτω αμινοξικά κατάλοιπα <sub>30</sub>Met-Arg-Arg-Arg-Gly<sub>35</sub> (Εικόνες 3 και 4) που της επιτρέπει να μετατοπίζεται στον πυρήνα των κυττάρων στόχων (Sheng & Xu, 2016).

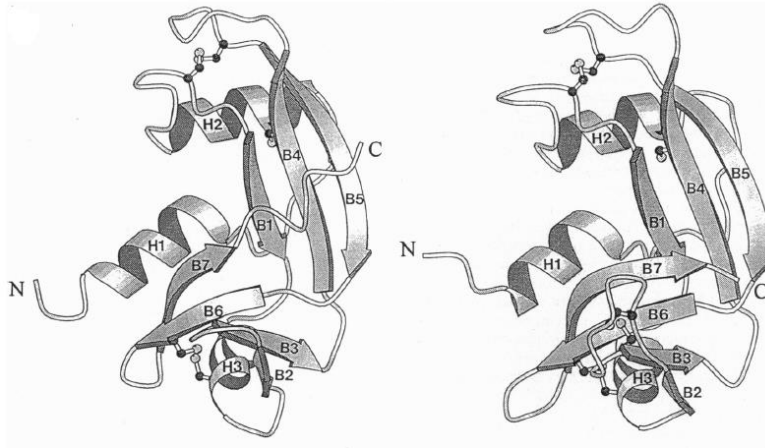


ακολουθείται από αδερίνη, αλλά αυτό δεν ακολουθείται αυστηρά για όλες τις θέσεις διάσπασης. Η hAng στοχεύει τις αλληλουχίες RNA με την ακόλουθη σειρά προτίμησης: CPA> CPG> UPA> UPG. Όπως και η RNase A, η hAng προτιμά ως υπόστρωμα μονόκλωνο RNA, ενώ δε διασπά DNA, παρόλο που έχει αποδειχθεί ότι δεσμεύει DNA *in vivo* (Sheng & Xu, 2016).

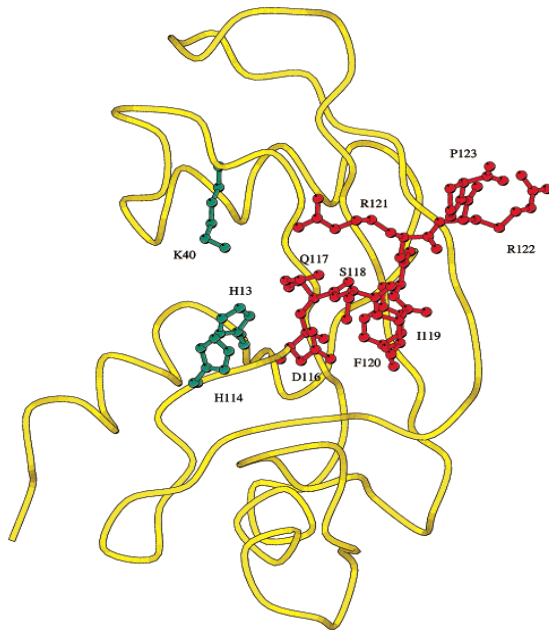
Η κρυσταλλική δομή της hAng δείχνει ότι η αναδίπλωση της, συνολικά, είναι παρόμοια με αυτήν της RNase A (Εικόνα 5). Μελέτες μεταλλαξιγέννησης, καθώς και κρυσταλλογραφικές μελέτες αποκάλυψαν τα μοναδικά χαρακτηριστικά της δομής της hAng, που συμβάλλουν στη χαμηλή ριβονουκλεολυτική της δράση (Leonidas et al., 2002). Κυρίαρχο χαρακτηριστικό μεταξύ αυτών, αποτελεί η παρεμπόδιση της θέσης πρόσδεσης των πυριμιδινών, στο κέντρο B<sub>1</sub>, από το αμινοξικό κατάλοιπο Gln117. Πράγματι, αυτή η παρεμποδιστική διαμόρφωση του καταλοίπου Gln117 είναι το δομικό "σήμα κατατεθέν" της hAng (Leonidas et al., 2002). Η «κλειστή» αυτή διαμόρφωση της πρωτεΐνης, φαίνεται να σταθεροποιείται από διάφορες αλληλεπιδράσεις εντός του C τελικού της άκρου, το οποίο περιέχει το κατάλοιπο Gln117, καθώς κι από άλλες που συνδέουν αυτό το τμήμα με παρακείμενα στοιχεία. Πιο συγκεκριμένα, η ύπαρξη δύο δεσμών υδρογόνου μεταξύ των Gln117 και Thr44, καθώς και μεταξύ των Asp116 και Ser118, σταθεροποιεί περαιτέρω την παρεμπόδιση της θέσης πρόσδεσης πυριμιδινών. Ο προσανατολισμός του Gln117 φαίνεται να ενισχύεται περαιτέρω από τη δευτεροταγή δομή του τμήματος 117-121. Αυτό, σχηματίζει μια έλικα 3<sub>10</sub>, στην οποία οι δεσμοί υδρογόνου της κύριας αλυσίδας συνδέουν το κατάλοιπο Gln117 με το Phe120 και το κατάλοιπο Ser118 με το Arg121. Επίσης, τα κατάλοιπα Ile119 και Phe120, συμμετέχουν σε υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις με κατάλοιπα της υπόλοιπης πρωτεΐνης, σταθεροποιώντας το Gln117 στη θέση παρεμπόδισης (Εικόνα 6) (Leonidas et al., 2002). Ακόμη, ο δεσμός υδρογόνου μεταξύ των καταλοίπων Thr44 και Thr80 καταστέλλει περισσότερο την αποτελεσματικότητα της θέσης πρόσδεσης πυριμιδινών, καθώς η Thr44 παίζει σημαντικό ρόλο στην αναγνώριση της κυτοσίνης από την hAng. Τέλος, η απουσία του βρόχου 65-72 στην hAng, ο οποίος σχηματίζει το μεγαλύτερο μέρος της θέσης δέσμευσης των πουρινών στην RNase A, συμβάλει αποτελεσματικά στην εξασθενημένη ενζυμική της δράση (Shapiro, 1998; Russo et al., 1994).

Σε αντίθεση με τα αμινοξικά κατάλοιπα του καρβοξυτελικού άκρου της hAng που αναφέρθηκαν παραπάνω, η αποκοπή των καταλοίπων 121-123 από τη δομή της μειώνει σημαντικά τη δραστηριότητα του ενζύμου ως προς τα υποστρώματα πολυνουκλεοτιδίων. Έτσι, τα κατάλοιπα Arg121, Arg122 και Pro123 δε συμμετέχουν σε αλληλεπιδράσεις, σε αντίθεση με τα κατάλοιπα 116-120, ενώ φαίνεται να διαδραματίζουν σε μεγάλο βαθμό, θετικό ρόλο στην ενζυμική δραστηριότητα, αποτελώντας πιθανόν μία περιφερειακή περιοχή πρόσδεσης πολυμερών υποστρωμάτων (Leonidas et al., 2002).





Εικόνα 5: Σύγκριση των δομών της hAng (αριστερά) και της RNase A (δεξιά). Στην εικόνα εμφανίζονται οι διαφορετικές αρχιτεκτονικές των καρβοξυτελικών τους περιοχών (Russo, Nobile, et al., 1996).



Εικόνα 6: Σχηματική αναπαράσταση της δομής της hAng, όπου τα αμινοξικά κατάλοιπα του καρβοξυτελικού άκρου (116-123) απεικονίζονται με κόκκινο χρώμα, ενώ οι πλευρικές αλυσίδες των καταλυτικών αμινοξέων (His13, Lys40 και His114) με κυανό (Leonidas et al., 2002).

Σύμφωνα με τα παραπάνω ευρήματα, η δομική αναδιάταξη στην οποία θα πρέπει να υποβληθεί η hAng για να μπορέσει να προσδέσει το υπόστρωμα της και να καταλύσει τη διάσπασή του, περιλαμβάνει τις εξής αλλαγές: α) Τα κατάλοιπα Thr44 και His114 πρέπει να παραμείνουν ως έχουν, καθώς είναι ήδη τοποθετημένα όπως τα αντίστοιχα κατάλοιπα της RNase A, β) να αποσταθεροποιηθούν οι δεσμοί που

συγκροτούν την έλικα 3<sub>10</sub> και κατά συνέπεια το κατάλοιπο Gln117 να μετακινηθεί από το B<sub>1</sub> κέντρο πρόσδεσης των πυριμιδινών, διαταράσσοντας με αυτό τον τρόπο τις αλληλεπιδράσεις που σχηματίζουν τα κατάλοιπα Ile119 και Phe120 με την υπόλοιπη πρωτεΐνη και γ) το τμήμα Arg121-Pro123 να επανατοποθετηθεί, με τέτοιο τρόπο ώστε να είναι δυνατή η δέσμευση του υποστρώματος (Russo, Nobile, et al., 1996; Leonidas et al., 2002).

Αυτό το πολύπλοκο και ιδιαίτερο δίκτυο αλληλεπιδράσεων στο καρβοξυτελικό άκρο της hAng πιθανότατα να εξελίχθηκε με στόχο να καταστήσει λανθάνουσα τη ριβονουκλεολυτική δράση του ενζύμου κι όχι να την καταργήσει τελείως (Russo, Nobile, et al., 1996). Ο διττός ρόλος της καρβοξυτελικής αλυσίδας που συμβάλει και αρνητικά (Asp116-Phe120), αλλά και θετικά (Arg121-Pro123) στη ριβονουκλεολυτική δραστηριότητα του ενζύμου, υποδηλώνει ότι η καρβοξυτελική περιοχή κατέχει μείζονα ρόλο τόσο στη βιολογική της δράση, όσο και στη ρύθμιση της λειτουργίας της hAng (Russo, Nobile, et al., 1996).

Συνοψίζοντας, η βάση της αναποτελεσματικότητας της hAng ως ριβονουκλεάση, πιθανόν να έγκειται στο γεγονός ότι το φυσιολογικό της υπόστρωμα εξακολουθεί να παραμένει άγνωστο. Το ενδεχόμενο η πρωτεΐνη αυτή να έχει μια συγκεκριμένη αλληλουχία αναγνώρισης για κατάλυση, φαντάζει απίθανο. Πιθανόν όμως, τα μόρια-στόχος της hAng να έχουν μια συγκεκριμένη δευτεροταγή δομή, όπως μια φουρκέτα ή έναν ψευδοβρόχο, ή να είναι τμήματα συμπλόκου πρωτεΐνης με νουκλεϊκό οξύ (Leland et al., 2002).

Νέα μελέτη αποκάλυψε την κρυσταλλική δομή της hAng σε σύμπλοκο με ένα δίκλωνο μόριο RNA. Σε αυτή τη δομή, το μόριο RNA δε φθάνει στο ενεργό κέντρο της hAng, ενώ δεν παρατηρείται καμία δομική αναδιάταξη του καρβοξυτελικού της άκρου. Ωστόσο, η hAng σχηματίζει ένα κρυσταλλογραφικό διμερές που δεν είχε παρατηρηθεί μέχρι σήμερα, ενώ δημιουργεί αρκετές αλληλεπιδράσεις με τις κύριες και τις μικρότερες αυλακώσεις της διπλής έλικας του μορίου RNA. Οι αλληλεπιδράσεις της hAng είναι πολλαπλές και κρίσιμες για την *in vivo* λειτουργία της, ενώ μόλις που αρχίζουν να γίνονται κατανοητές. Παρόλο που αυτό το σύμπλοκο hAng-RNA δε συμβαίνει *in vivo*, οι παρατηρούμενες αλληλεπιδράσεις της hAng με το RNA, μπορούν να βοηθήσουν να εξαχθούν τα πρώτα δομικά μοντέλα, πιο σχετικών αλληλεπιδράσεων της hAng, με γνωστούς *in vivo* στόχους (Sievers & Ficner, 2022).

Η ασθενής ριβονουκλεολυτική δραστηριότητα της hAng μπορεί, επίσης, να έχει εξελιχθεί για να μεγιστοποιήσει την εξειδίκευση της ως προς το υπόστρωμα-στόχο της (Leland et al., 2002). Εν κατακλείδι, φαίνεται πως η δομή της hAng έχει προκύψει εξελικτικά, για να μπορεί να υδρολύει ένα συγκεκριμένο κυτταρικό RNA, η ταυτότητα του οποίου είναι ακόμη άγνωστη. Η ταυτοποίηση του φυσιολογικού της υποστρώματος καθίσταται απαραίτητη για την πλήρη περιγραφή του μηχανισμού με τον οποίο αυτή προάγει την αγγειογένεση (Leland et al., 2002).

### 1.2.2. Μηχανισμοί δράσης της hAng

Η hAng, όπως έχει αναφερθεί νωρίτερα, αποτελεί έναν ισχυρό αγγειογενετικό παράγοντα, ενώ είναι η μόνη RNase με αγγειογενετική δράση, καθώς κι ο μόνος αγγειογενετικός παράγοντας με ριβονουκλεολυτική δράση (Riordan, 2001). Δύο σημαντικές δομικές διαφορές μεταξύ της hAng και της RNase A είναι υπεύθυνες για την αγγειογενετική δράση της πρώτης. Η πρώτη είναι ότι η hAng διαθέτει μία θέση πρόσδεσης σε υποδοχέα, που αποτελείται από τα αμινοξικά κατάλοιπα 59-68, ενώ στην RNase A η αντίστοιχη αλληλουχία αμινοξέων αυτής της περιοχής είναι πολύ διαφορετική. Επομένως, η hAng έχει τη δυνατότητα να συνδέεται με τα κύτταρα-στόχους της (συμπεριλαμβανομένων των ενδοθηλιακών κυττάρων, των καρκινικών κυττάρων και των κινητικών νευρώνων), ενώ η RNase A όχι. Η δεύτερη δομική διαφορά είναι ότι σε αντίθεση με την RNase A, η hAng διαθέτει μια αλληλουχία πυρηνικού εντοπισμού (NLS) και μπορεί να υφίσταται πυρηνική μετατόπιση στα κύτταρα-στόχους της (S. Li & Hu, 2010).

#### Η hAng διεγείρει την αποικοδόμηση της βασικής μεμβράνης

Η hAng επάγει την κυτταρική προσκόλληση, μετανάστευση, εισβολή, πολλαπλασιασμό και σχηματισμό σωληνοειδών δομών, ενώ αλληλεπιδρά με κύτταρα ενδοθηλίου και λείου μυός (Sheng & Xu, 2016). Μελέτες για την ταυτοποίηση του υποδοχέα της hAng σε ενδοθηλιακά κύτταρα, αποκάλυψαν αρχικά ως μόριο δέσμευσης της hAng, μια πρωτεΐνη κυτταρικής επιφάνειας, μοριακού βάρους 42 kDa (Hu et al., 1991), η οποία αργότερα αποδείχθηκε ότι ήταν η  $\alpha$ -ακτίνη του λείου μυός (Hu et al., 1993). Η  $\alpha$ -ακτίνη της κυτταρικής επιφάνειας φαίνεται να εμπλέκεται στην αποικοδόμηση της βασικής μεμβράνης. Στο μικροπεριβάλλον του όγκου, η εξωκυττάρια hAng μπορεί να φτάσει στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων, όπου δεσμεύεται με την  $\alpha$ -ακτίνη και δημιουργείται ένα σύμπλεγμα γνωστό ως AngBP (Hu et al., 1991; Hu et al., 1993). Αυτό το σύμπλεγμα διεγείρει τον ιστικό ενεργοποιητή πλασμινογόνου (tPA) προς τον σχηματισμό πλασμίνης από το πλασμινογόνο (Hu et al., 1994). Παρουσία του συμπλόκου αγγειογενίνης-ακτίνης, αυξάνεται σημαντικά η καταλυτική δραστηριότητα της πλασμίνης, διασπώντας τη λαμινίνη και τη φιμπρονεκτίνη της βασικής ενδοθηλιακής μεμβράνης (Tello-Montoliu et al., 2006). Με αυτόν τον τρόπο, η hAng προάγει την αποικοδόμηση της βασικής μεμβράνης και του εξωκυττάριου ιστού, επιτρέποντας στα ενδοθηλιακά κύτταρα να διεισδύουν και να μεταναστεύουν εντός του περιαγγειακού ιστού (Soncin, 1992; Hu et al., 1994).

Επίσης, η αλληλεπίδραση της hAng με την ακτίνη, προκαλεί αλλαγές στον κυτταροσκελετό των κυττάρων, αναστέλλοντας τον πολυμερισμό της G-ακτίνης και μεταβάλλοντας τις φυσικές ιδιότητες της F-ακτίνης (Pyatibratov et al., 2010). Ακόμη, η αλληλεπίδραση αυτή οδηγεί στην ενεργοποίηση αρκετών πρωτεασών,

συμπεριλαμβανομένου του συστήματος της πρωτεολυτικής διάσπασης του πλασμινογόνου, από πρωτεάσες σερίνης, για το σχηματισμό πλασμίνης, καθώς και την ενεργοποίηση μεταλλοπρωτεϊνών, που επάγουν την κυτταρική μετανάστευση και την εισβολή (Hu et al., 1994; Sheng & Xu, 2016). Επιπλέον, μελέτες έδειξαν ότι η hAng αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα uPAR και το σύμπλοκο ανεξίνη A2-καλπακτίνη (S100-A10), στη διασταύρωση των περιοχών λιπιδικής και μη λιπιδικής σχεδίας της κυτταρικής μεμβράνης. Εκεί, η hAng δρα ως μόριο-γέφυρα για να διευκολύνει τις έμμεσες αλληλεπιδράσεις μεταξύ του uPAR και του συμπλόκου S100-A10, που είναι απαραίτητες για το σχηματισμό της πλασμίνης και τη μετανάστευση των κυττάρων (Sheng & Xu, 2016).

Συνοψίζοντας, σύμφωνα με τα παραπάνω η hAng έχει τη δυνατότητα να προάγει την αποικοδόμηση της βασικής μεμβράνης και της εξωκυτταρικής μήτρας, επιτρέποντας με αυτό τον τρόπο στα ενδοθηλιακά κύτταρα να διεισδύσουν και να μεταναστεύσουν στον περιαγγειακό ιστό, γεγονός που αποτελεί βασικό χαρακτηριστικό της αγγειογένεσης (Gao & Xu, 2008). Αυτά τα γεγονότα μεταβάλλουν σοβαρά τις μηχανικές ιδιότητες των κυττάρων, προκαλώντας έτσι ισχυρές επιδράσεις στην κυτταρική δομή, τη λειτουργία και τη μορφογένεση των ιστών, όπως και σε ολόκληρη την αγγειογενετική διαδικασία (Cucci et al., 2021).

#### Η εξωκυτταρική hAng ενεργοποιεί μονοπάτια μεταγωγής σήματος

Εκτός από τη ριβονουκλεολυτική της δράση, η δέσμευση της hAng με την κυτταρική επιφάνεια ενδοθηλιακών κυττάρων είναι επίσης απαραίτητη για τη βιολογική της λειτουργία (Gao & Xu, 2008). Στο εξωκυττάριο περιβάλλον, η εκκρινόμενη hAng εισέρχεται στο κύτταρο με τη μεσολάβηση ενός υποδοχέα μέσω ενδοκυττάρωσης και τελικά συσσωρεύεται στον πυρήνα. Εκεί, η hAng κατευθύνει την αγγειογενετική της δραστηριότητα προς τα ενδοθηλιακά κύτταρα και ασκεί μιτογόνες δράσεις σε διαφορετικούς τύπους κυττάρων (Hoang & Raines, 2017).

Επειδή η α-ακτίνη δεν είναι ο υποδοχέας της hAng για τη μεταγωγή σημάτων (Gao & Xu, 2008) έχουν εντοπιστεί μέχρι στιγμής τρεις υποδοχείς της hAng: μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη 170 kDa (Hu et al., 1997), η συνδεκάνη-4 (Skorupa et al., 2012) και η πλεξίνη-B2 (PLXNB2) (W. Yu et al., 2017). Ο πρώτος δυνητικός υποδοχέας (πρωτεΐνη 170 kDa) βρίσκεται στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων κι εκφράζεται μόνο ανταποκρινόμενος στην παρουσία αγγειογενίνης, σε αραιά καλλιεργημένα ενδοθηλιακά κύτταρα ( $<2 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>) (Hu et al., 1997). Απομονώθηκε με χρήση χρωματογραφίας συγγένειας ως προς την hAng, αλλά η ταυτότητά του παραμένει ακόμη ασαφής (Hoang & Raines, 2017). Μια πιο πρόσφατη μελέτη ανέφερε ότι η συνδεκάνη-4, που είναι αγκυροβολημένη στην επιφάνεια των αστροκυττάρων, είναι ένας υποδοχέας της hAng (Skorupa et al., 2012). Η πρωτεΐνη αυτή είναι μια πρωτεογλυκάνη θεικής ηπαράνης της κυτταρικής επιφάνειας κι

εκφράζεται τόσο από καρκινικά όσο κι από ενδοθηλιακά κύτταρα (Simons & Horowitz, 2001; Couchman, 2003). Είναι γνωστό ότι η hAng αλληλεπιδρά με τον δυνητικό υποδοχέα, συνδεκάνη-4, μέσω δέσμησης της στη θειική ηπαράνη, ενώ η κατεργασία κυττάρων με ηπαρινάση, για την απομάκρυνση της θειικής ηπαράνης από τη συνδεκάνη-4, αποτρέπει την είσοδο της hAng στο κύτταρο (Joo Yeon et al., 2014). Ακόμη, σύμφωνα με μία πρόσφατη μελέτη του Yu και των συνεργατών του, η πλεξίνη-B2 (PLXNB2) αποτελεί τον λειτουργικό υποδοχέα της hAng σε μια πληθώρα κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των ενδοθηλιακών, των καρκινικών, των νευρωνικών, των φυσιολογικών αιμοποιητικών κυττάρων και των λευχαιμικών βλαστοκυττάρων (W. Yu et al., 2017). Η PLXNB2 μεσολαβεί στην ενδοκυτταρική επεξεργασία του RNA, που συμβάλλει στην κυτταρική ανάπτυξη, την επιβίωση και τις αγγειογενετικές ιδιότητες της hAng. Αντισώματα που δημιουργήθηκαν έναντι της θέσης δέσμησης της hAng στην PLXNB2, περιόρισαν τη βιολογική δραστηριότητα της hAng *in vitro* και *in vivo*, με αποτέλεσμα την καταστολή τόσο εγκατεστημένων όγκων ξеноμοσχεύματος όσο και της επαγόμενης από την hAng νευρογένεση και νευροπροστασία, σε επίπεδα μεταγράφων, σε αιμοποιητικά και σε λευχαιμικά βλαστοκύτταρα, καθώς επίσης και μειωμένη εξέλιξη της λευχαιμίας *in vivo*. Επιπλέον, πρόσφατα αποδείχθηκε ότι το σύμπλοκο hAng-PLXNB2, αποτελεί ένα ζεύγος νέων ρυθμιστών που συμμετέχουν στην εισβολή, στην αγγειακή σύνδεση και στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του γλοιοβλαστώματος, ενώ οι αναστολές του έχουν θεραπευτική δράση έναντι του γλοιοβλαστώματος (Yang et al., 2022).

Στο εξωκυττάριο περιβάλλον, η hAng μπορεί να διεγείρει μια σειρά από μονοπάτια μεταγωγής σήματος, μέσω της πρόσδεσής της σε υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας (Sheng & Xu, 2016). Ως αποτέλεσμα της κυτταρικής αναγνώρισης πρωτεϊνών, η hAng διεγείρει τα μονοπάτια της σηματοδότησης της εξωκυτταρικής σηματοεξαρτώμενης κινάσης (ERK1/2), των πρωτεϊνικών κινασών σερίνης/θρεονίνης(B/Akt) και της πρωτεϊνικής κινάσης που σχετίζεται με το στρες, κινάση c-Jun (SAPK/JNK), αυξάνοντας την παραγωγή των ενδοκυτταρικών ριβοσωμικών πρωτεϊνών και ενισχύοντας έτσι την κυτταρική ανάπτυξη και πολλαπλασιασμό (Cucci et al., 2021).

Αναλυτικότερα, ως απόκριση στην κατεργασία των κυττάρων με hAng, η εξωκυτταρική σηματοεξαρτώμενη κινάση 1/2 (ERK1/2), καθώς και η πρωτεϊνική κινάση B/Akt, ενεργοποιούνται στην ανθρώπινη ενδοθηλιακή κυτταρική σειρά της ομφαλικής φλέβας (HUVE) (Gao & Xu, 2008). Ακόμη, έχει αποδειχτεί πως η hAng συμμετέχει στον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων της ανθρώπινης ομφαλικής αρτηρίας (HuASM), μέσω της δέσμησης της στην κυτοσολική πρωτεΐνη α-ακτινίνη-2. Η πρόσδεση της hAng στην α-ακτινίνη-2, οδηγεί στη φωσφορυλίωση των σχετιζόμενων με το στρες πρωτεϊνικών κινασών (SAPK/JNK) (Xu et al., 2001). Είναι ενδιαφέρον ότι το μονοπάτι SAP/JNK δεν επηρεάζεται από τη σύνδεση της hAng με τον δυνητικό ενδοθηλιακό κυτταρικό υποδοχέα, υποδηλώνοντας ότι ο

πολλαπλασιασμός των κυττάρων του ενδοθηλίου και του λείου μυός δε διεγείρεται από μια κοινή κυτταρική οδό (Tello-Montoliu et al., 2006). Η πυκνότητα της κυτταρικής σειράς HuASM βρέθηκε ότι ρυθμίζει την απόκριση των κυττάρων αυτών ως προς την hAng, αν και αυτό δεν ήταν τόσο κρίσιμο γεγονός, όπως στον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων (Tello-Montoliu et al., 2006).

Επίσης, έχει αποδειχθεί ότι η hAng ενεργοποιεί το σηματοδοτικό μονοπάτι Akt, το οποίο με τη σειρά του, διεγείρει την πυρηνική της μετατόπιση. Αυτή η συντονισμένη δράση του Akt και της hAng, επιτρέπει τη ρύθμιση της βιογένεσης των ριβοσωμάτων, καθώς η διαδικασία αυτή απαιτεί τόσο πρωτεΐνες του ριβοσώματος όσο και rRNA. Η παραγωγή των ριβοσωμικών πρωτεϊνών, διαμεσολαβείται από το μονοπάτι Akt /mTOR, ενώ η παραγωγή των rRNAs από την hAng (S. Li & Hu, 2012). Συνεπώς, η ενεργοποίηση αυτών των βασικών οδών σηματοδότησης από την hAng, πιστεύεται ότι είναι ένας σημαντικός μηχανισμός που οδηγεί στην παραγωγή περισσότερων ριβοσωμικών πρωτεϊνών για την ενίσχυση της κυτταρικής ανάπτυξης και του πολλαπλασιασμού των κυττάρων και κατά συνέπεια στην περαιτέρω αγγειογένεση (Sheng & Xu, 2016).

Επιπλέον, η hAng μπορεί να επάγει, μέσω του μονοπατιού σηματοδότησης κινάσης PI3K/Akt, τη σύνθεση του μονοξειδίου του αζώτου (Sheng & Xu, 2016). Το μονοξείδιο του αζώτου (NO), είναι ένα μικρό μόριο, που παράγεται από τη συνθάση νιτρικού οξειδίου (NOS) και αποτελεί έναν ιδιαίτερα σημαντικό ρυθμιστή της αγγειακής φυσιολογίας, στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Ακόμη, έχει αποδειχθεί ότι παίζει κεντρικό ρόλο στην αγγειογένεση, πυροδοτώντας τη σύνθεση αγγειογενετικών παραγόντων και τη διαφοροποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων, σε κύτταρα αγγειακού σωλήνα (Trouillon et al., 2010). Μελέτες έδειξαν, πως η hAng ενεργοποιεί τη συνθάση NO, αλληλοεπιδρώντας με τον πυρήνα των κυττάρων, ενώ η δραστηριότητα της συνθάσης σταμάτησε όταν παρεμποδίστηκε το σηματοδοτικό μονοπάτι κινάσων PI-3/Akt, δείχνοντας τη σημασία αυτής της οδού για τη σύνθεση του μονοξειδίου του αζώτου. Συνεπώς, η μεταγωγή σήματος μέσω των κινάσων PI-3, Akt και η πυρηνική μετατόπιση της hAng, φαίνεται να είναι κρίσιμες για τη σύνθεση του NO (Trouillon et al., 2010).

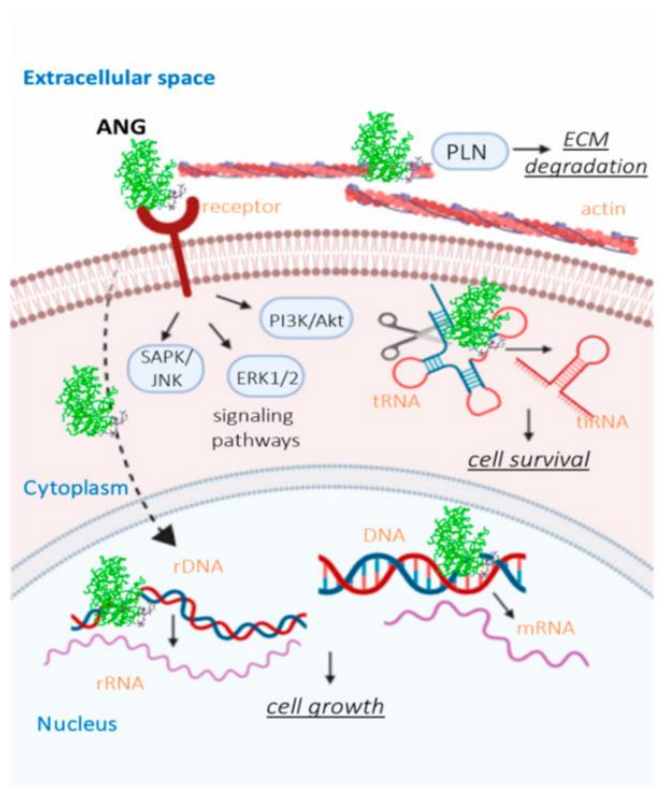
Ακόμη, η hAng εμπλέκεται στη ρύθμιση των βιολογικών λειτουργιών (αύξηση και μετάσταση) των καρκινικών κυττάρων της ουροδόχου κύστεως, μέσω της ρύθμισης του μονοπατιού PI3K/AKT/mTOR. Μελέτες μείωσης των επιπέδων έκφρασης της hAng στα κύτταρα αυτά, έδειξαν ότι η μείωση της αγγειογενίνης αναστέλλει την ανάπτυξη τους και τους προκαλεί απόπτωση, καθώς η φωσφορυλίωση των σηματοδοτικών στόχων AKT, GSK-3β και mTOR μειώνεται (Peng et al., 2014; Shu et al., 2015).

Τέλος, η hAng φαίνεται ότι μπορεί να ενεργοποιεί το μονοπάτι κυτταρικής επιβίωσης NF-κB, μέσω ρύθμισης της έκφραση της πρωτεΐνης FHL3, σε ανθρώπινα

κύτταρα γλοιοβλαστώματος (U87MG), προωθώντας με αυτό τον τρόπο τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Xia et al., 2015). Στα κύτταρα αυτά, η hAng ενεργοποιεί το μονοπάτι NF-κΒ και εισέρχεται στον πυρήνα τους, προκαλώντας κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Ο αποκλεισμός του μονοπατιού NF-κΒ ή η αναστολή της πυρηνικής μετατόπισης της hAng καταστέλλει εν μέρει τον επαγόμενο από την hAng κυτταρικό πολλαπλασιασμό (Xia et al., 2015). Μελέτες έδειξαν επίσης, ότι η hAng αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη p53 κυρίως στον πυρήνα. Η έκφραση της hAng έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της φωσφορυλίωσης της p53 και την ενίσχυση της αλληλεπίδρασης της p53 με την πρωτεΐνη MDM2, με συνέπεια την ουβικιτιλίωση της. Συνεπώς, η hAng προάγει την αναστολή της δράσης της p53, μεσολαβώντας κατά της απόπτωσης και υπέρ της κυτταρικής επιβίωσης (Sadagoran et al., 2012). Ωστόσο, αυτή η αντι-αποπτωτική δράση της hAng στοχεύοντας την p53, οδηγεί στην ευνοϊκή εξέλιξη του καρκίνου (Shibata et al., 2016).

Παρόλα αυτά, το πόσο εκτενώς συμμετέχει η hAng στη ρύθμιση των ενδοκυτταρικών οδών σηματοδότησης είναι ακόμη άγνωστο, λόγω του ότι ο υποδοχέας της δεν έχει ακόμη ταυτοποιηθεί οριστικά. Ο πιο πιθανός μηχανισμός δράσης της είναι ο εξής:

α) Η δέσμευση της hAng από την α-ακτίνη της κυτταρικής επιφάνειας του λείου μυός, προωθεί την επαγόμενη από την hAng αγγειογένεση, διεγείροντας σχετιζόμενες με τα κύτταρα πρωτεολυτικές δραστηριότητες και την εισβολή των ενδοθηλιακών κυττάρων. β) Όταν ενδοθηλιακά κύτταρα καλλιεργούνται σε αραιή πυκνότητα, εκφράζουν έναν δυνητικό υποδοχέα κυτταρικής επιφάνειας, μοριακού βάρους 170 kDa που είναι εξίσου απαραίτητος ως πρωτεΐνη δέσμευσης. γ) Η εξωκυτταρική hAng, μέσω αλληλεπίδρασης με τον ενδοθηλιακό υποδοχέα της επιφάνειας των κυττάρων, ενεργοποιεί διάφορες οδούς μεταγωγής σήματος, συμπεριλαμβανομένων των ERK1/2, SAPK/JNK και PI3K/Akt, προάγοντας έτσι την κυτταρική ανάπτυξη και διαφοροποίηση. δ) Επιπλέον, η εξωκυτταρική hAng υφίσταται μεσολαβούμενη από τον υποδοχέα ενδοκυττάρωση και συσσωρεύεται στο κυτταρόπλασμα υπό συνθήκες στρες ή μετατοπίζεται στον πυρήνα υπό συνθήκες ανάπτυξης, όπου συσσωρεύεται τελικά στον πυρηνίσκο (Εικόνα 7). Η πυρηνική μετατόπιση της hAng αποτελεί ένα κρίσιμο βήμα στη διαδικασία της αγγειογένεσης και του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων (Xia et al., 2015).



Εικόνα 7: Πιθανός μηχανισμός δράσης της hAng (Cucci et al., 2021).

### Η κυτταρική hAng υφίσταται πυρηνική μετατόπιση και ρυθμίζει το μεταβολισμό των νουκλεϊκών οξέων

Το πρώτο βήμα που απαιτείται για την πυρηνική μετατόπιση της εξωκυτταρικής hAng είναι η είσοδος της πρωτεΐνης στο κύτταρο μέσω της διαμεσολαβούμενης από υποδοχέα, ενδοκυττάρωσης (Moroianu & Riordan, 1994a). Η αλληλουχία πυρηνικού εντοπισμού NLS της πρωτεΐνης είναι υπεύθυνη για τη μεταφορά της hAng στον πυρήνα, τον τελικό της προορισμό. Αυτό το συγκεκριμένο πεπτίδιο NLS, έχει χαρακτηριστεί ως ένα εξειδικευμένο σηματοδοτικό πεπτίδιο για το πυρηνικό διαμέρισμα, ενώ η προσθήκη αυτού σε πρωτεΐνες, που δεν υφίστανται φυσιολογικά πυρηνική μετατόπιση, επιτρέπει τη μετανάστευσή τους στον πυρήνα (Moroianu & Riordan, 1994b). Η πυρηνική μετατόπιση της hAng στα ενδοθηλιακά κύτταρα είναι γρήγορη και ανεξάρτητη από μικροσωληνίσκους και λυσοσωμάτια (Moroianu & Riordan, 1994a). Εξαρτάται όμως αυστηρά από την κυτταρική πυκνότητα, καθώς μειώνεται, όσο η κυτταρική πυκνότητα αυξάνεται και σταματά όταν τα κύτταρα είναι πλήρη (Hu et al., 2000). Ο πιθανότερος μηχανισμός εισόδου της hAng στον πυρήνα, δεδομένου ότι το μοριακό της βάρος (14,4 kDa) είναι μικρότερο από αυτό του πυρηνικού πόρου (50 kDa), είναι η παθητική διάχυση και η διαμεσολαβούμενη από την αλληλουχία NLS κράτηση της hAng στο πυρηνικό διαμέρισμα (Moroianu & Riordan, 1994a). Μελέτες έδειξαν ότι η hAng υφίσταται πυρηνική μετατόπιση στα ενδοθηλιακά κύτταρα, στα καρκινικά κύτταρα και στους



κινητικούς νευρώνες (S. Li & Hu, 2010). Η πυρηνική μετατόπιση της hAng είναι ένα κρίσιμο βήμα στη διαδικασία της αγγειογένεσης (Moroianu & Riordan, 1994a), καθώς αναστολή της πυρηνικής μετατόπισης ή μεταλλαξιγένεση της αλληλουχίας NLS καταργούν την αγγειογενετική δράση της πρωτεΐνης (Moroianu & Riordan, 1994; Hu, 1998).

Μετά την είσοδό της στον πυρήνα, η hAng συσσωρεύεται στον πυρηνίσκο όπου λαμβάνει χώρα η βιογένεση των ριβοσωμάτων (S. Li & Hu, 2010). Ένα στοιχείο δέσμησης της hAng (Angiogenin Binding Element, ABE), κοντά στον υποκινητή του ριβοσωματικού DNA (rDNA), έχει προταθεί ότι είναι υπεύθυνο για την προώθηση της έκφρασης των γονιδίων που κωδικοποιούν rRNA ως απόκριση σε ερέθισμα της hAng (Xu et al., 2003). Μέσα στον πυρήνα, η hAng καταλύει τη διάσπαση ενός συγκεκριμένου φωσφοδιεστερικού δεσμού σε ένα πυρηνικό υπόστρωμα, το σχετιζόμενο με τον υποκινητή RNA (pRNA). Το pRNA συνήθως σχηματίζει μια τριπλή έλικα με τον υποκινητή του rDNA, αναστέλλοντας τη μεταγραφή του rDNA. Αυτή η διάσπαση αποτρέπει τη σίγαση της μεταγραφής του rDNA από το σύμπλεγμα πυρηνικής αναδιαμόρφωσης (NoRC) και ενεργοποιεί την παραγωγή rRNA στον πυρήνα (Hoang & Raines, 2017). Η συγγένεια της hAng για το pRNA είναι 3 φορές υψηλότερη από αυτή για το στοιχείο δέσμησης ABE και καθώς η ριβονουκλεολυτική δραστηριότητα της hAng είναι απαραίτητη για τη δράση της, η διάσπαση του pRNA πιθανόν να διαδραματίζει μεγαλύτερο ρόλο στην πυρηνική της δράση, από ό,τι η δέσμηση της στο ABE (Hoang & Raines, 2017). Ακόμη, η hAng προωθεί τη συναρμολόγηση του συμπλόκου έναρξης της μεταγραφής με επιγενετική ενεργοποίηση, μέσω μεθυλίωσης του υποκινητή και τροποποιήσεις ιστονών (Cucci et al., 2021). Επιπλέον, υπό συνθήκες ανάπτυξης η hAng ενισχύει την επεξεργασία του rRNA, δρώντας ως ενδονουκλεάση και διασπά την πρώτη θέση διάσπασης (A<sub>0</sub>) του 47S pre-rRNA (Monti et al., 2009). Η ενισχυμένη παραγωγή rRNA είναι μια κοινή κυτταρική απόκριση κατά τη διάρκεια του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, καθώς επάγει περαιτέρω τη ριβοσωματική βιογένεση και την πρωτεϊνοσύνθεση για να διεγείρει στη συνέχεια την κυτταρική ανάπτυξη. Στην πραγματικότητα, η μεταγραφική δραστηριότητα του rDNA που ενεργοποιείται από την hAng είναι απαραίτητη για την εκδήλωση της πολλαπλασιαστικής και της αγγειογενετικής της δράσης (Kishimoto et al., 2005).

Η hAng ενισχύει, επίσης, τη μεταγραφή του mRNA πολλών γονιδίων, αφού αυτή λειτουργεί ως ενεργοποιητής της αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης. Μελέτες ανοσοκατακρήμνισης της χρωματίνης έδειξαν πως 699 γονίδια θα μπορούσαν να ρυθμίζονται από την πυρηνική hAng, ενώ τα περισσότερα από αυτά εκφράζονται σε μεγάλα ποσοστά στην ογκογένεση (Sheng & Xu, 2016).

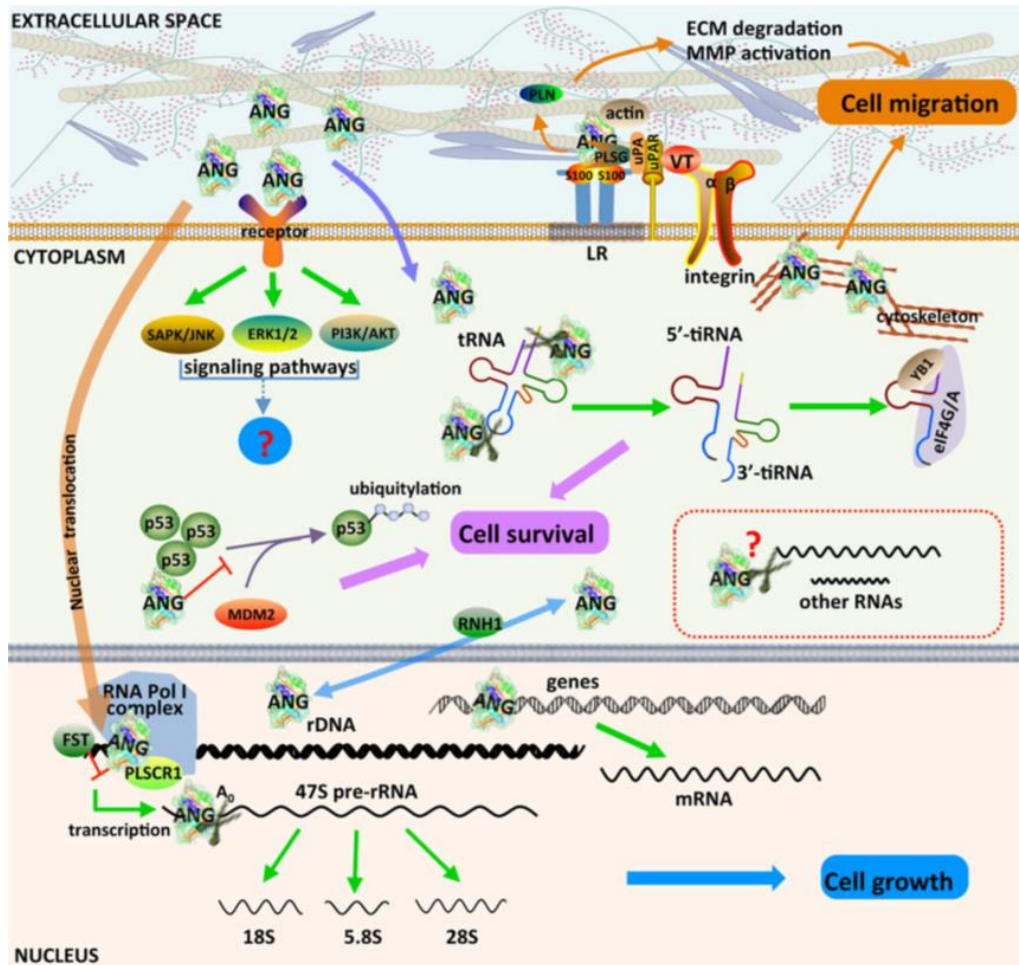
Πρόσφατη μελέτη από την Weng και τους συνεργάτες της, έδειξε ότι η hAng ρυθμίζει αποκλειστικά το ώριμο miR-141, σε ανθρώπινα ομφαλικά ενδοθηλιακά

κύτταρα (HUVECs), μέσω της ριβονουκλεολυτικής της δράσης, διασπώντας κατά προτίμηση το μονόκλωνο miR-141 στις θέσεις A<sup>5</sup>/C<sup>6</sup>, U<sup>7</sup>/G<sup>8</sup> και U<sup>14</sup>/A<sup>15</sup>. Με τη μείωση της ρύθμισης του miR-141, η hAng προάγει τον πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση, το σχηματισμό σωλήνων και την αγγειογένεση των κυττάρων HUVEC, *in vitro* και *in vivo*. Αντίθετα, η μειорύθμιση της hAng, αναστέλλει τη διάσπαση του miR-14, μειώνοντας έτσι την αγγειογένεση των HUVEC (Weng et al., 2022). Επιπλέον, στην ίδια μελέτη, εντοπίζεται μια αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης της hAng και του miR-141 σε ιστούς ορθοκολικού καρκίνου (CRC). Συγκεκριμένα, η hAng ρυθμίζει την εξέλιξη του CRC, διαταράσσοντας το miR-141 και τη ρύθμισή του στα γονίδια-στόχους που σχετίζονται με την αγγειογένεση, αποκαλύπτοντας ένα νέο μηχανισμό δράσης της hAng και καθιερώνοντας το miR-141 ως υπόστρωμα της (Weng et al., 2022).

Η μεταγραφή του rRNA που διεγείρεται από την hAng, στα ενδοθηλιακά κύτταρα, φαίνεται να αποτελεί ένα «σταυροδρόμι» στη διαδικασία της αγγειογένεσης που επάγεται από άλλους αγγειογενετικούς παράγοντες (Gao & Xu, 2008). Πιο συγκεκριμένα, η μεταγραφή του rDNA που ρυθμίζεται από αυτή, είναι απαραίτητη για την αγγειογένεση που επάγεται από άλλους αγγειογενετικούς παράγοντες, όπως ο όξινος αυξητικός παράγοντας ινοβλαστών (αFGF), ο βασικός αυξητικός παράγοντας ινοβλαστών (bFGF) κι ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF) (Kishimoto et al., 2005). Ενώ οι παράγοντες VEGF και FGF-2 σηματοδοτούν, μέσω υποδοχέων κινάσης-τυροσίνης, την ενεργοποίηση της σύνθεσης των πρωτεϊνών (μέσω διέγερσης των σηματοδοτικών μονοπατιών mTOR και S6), η hAng αυξάνει τη μεταγραφή του ριβοσωματικού RNA (rRNA) στον πυρήνα, δρώντας συνεργατικά με τους παραπάνω αυξητικούς παράγοντες, για την αύξηση της πρωτεϊνικής σύνθεσης, που απαιτείται για τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων (Prehn & Jirstrom, 2020). Ο παράγοντας VEGF κι άλλες αγγειογενετικές πρωτεΐνες διεγείρουν την πυρηνική μετατόπιση της hAng, ενώ αναστολείς της δράσης της αναστέλλουν την επαγόμενη από αυτούς τους αγγειογενετικούς παράγοντες αγγειογένεση (S. Li & Hu, 2010). Τέλος, στα καρκινικά κύτταρα η hAng, μέσω της μεταγραφής του rDNA προάγει την πλεονάζουσα παραγωγή rRNA, συμβάλλοντας στην ανεξέλεγκτη ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό τους, ενώ στους κινητικούς νευρώνες η μεσολαβούμενη από την hAng σύνθεση του rRNA είναι κρίσιμη για τη διατήρηση της φυσιολογικής τους λειτουργίας (S. Li & Hu, 2010).

Η hAng παίζει επίσης σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό του tRNA, στο κυτταρόπλασμα (Sheng & Xu, 2016). Σε κύτταρα θηλαστικών κάτω υπό συνθήκες στρες πραγματοποιείται φωσφορυλίωση του παράγοντα eIF2α, προκαλώντας αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης, με στόχο τη διατήρηση αναβολικής ενέργειας για την αποκατάσταση των βλαβών που προκαλούνται από το στρες (S. Li & Hu, 2010). Ωστόσο, η αναστολή της μετάφρασης που προκαλείται από το στρες παρατηρείται επίσης και σε κύτταρα που εκφράζουν ένα μη φωσφορυλιώσιμο μετάλλαγμα του

eIF2 $\alpha$  (S. Li & Hu, 2012). Επιπλέον, η διάσπαση του tRNA, ως απόκριση στο στρες, αποτελεί ένα φαινόμενο που λαμβάνει χώρα σε πολλούς οργανισμούς, ενώ έχει αποδειχθεί ότι η hAng διασπά το tRNA, προάγοντας την επαγόμενη από το στρες μεταφραστική καταστολή (Yamasaki et al., 2009). Συγκεκριμένα, η hAng ως απόκριση στο στρες (π.χ. οξειδωτικό στρες, συνθήκες υποξίας και συνθήκες ασιτίας), διασπά τα διατηρημένα μονόκλωνα άκρα 3'-CCA του tRNA ή το βρόχο της αντικωδικής αλυσίδας του tRNA, σχηματίζοντας tiRNAs (μικρά RNAs προερχόμενα από tRNA επαγόμενα από το στρες)(Fu et al., 2009; Czech et al., 2013). Τα tiRNAs που παράγονται από την hAng προάγουν έναν ανεξάρτητο από τη φωσφορυλίωση του eIF2 $\alpha$  μηχανισμό διακοπής της μετάφρασης, ως απόκριση σε στρεσογόνες συνθήκες (Yamasaki et al., 2009). Η ενδονουκλεολυτική διάσπαση των tRNAs είναι ένα συντηρημένο χαρακτηριστικό σε ανώτερους ευκαρυώτες, με την αγγειογενίνη να δημιουργεί δύο «μισά» τμήματα tRNA, τα 5'- και 3'-tiRNAs (Czech et al., 2013). Από τα δύο «μισά» tiRNA που σχηματίζονται, μόνο τα 5' tiRNAs αναστέλλουν τη μετάφραση (Yamasaki et al., 2009). Τα 5'-tiRNAs αλληλεπιδρούν με τον παράγοντα YB-1, αναστέλλοντας την έναρξη της μετάφρασης μέσω στρατολόγησης του παράγοντα eIF4G/A από τα μόρια mRNA που δε φέρουν καλύπτρα (Saikia et al., 2012). Επιπλέον, τα tiRNAs μπορούν να διεγείρουν το σχηματισμό των κοκκίων του στρες (SGs), δηλαδή κυτταροπλασματικά διαμερίσματα όπου τα μη μεταφραζόμενα mRNPs (mRNA/Protein) αποθηκεύονται παροδικά. Ο σχηματισμός των SGs αποτελεί ένα σημαντικό μηχανισμό, με τον οποίο τα κύτταρα επαναπρογραμματίζουν τη μετάφραση πρωτεϊνών, για να επιβιώσουν σε αντίξοες συνθήκες (Pizzo et al., 2013). Συνοψίζοντας, τα tiRNAs που επάγονται από την hAng επαναπρογραμματίζουν τη μετάφραση, προάγοντας έτσι την επισκευή των βλαβών και κατά συνέπεια την κυτταρική επιβίωση (Ivanov et al., 2011). Ένας γενικός μηχανισμός δράσης της hAng παρουσιάζεται στην *Εικόνα 8*.



Εικόνα 8: Σχηματική αναπαράσταση του γενικού μηχανισμού δράσης της hAng. Η εκκρινόμενη hAng προσδέεται στο δυνητικό της υποδοχέα στην κυτταρική μεμβράνη και με ενδοκυττάρωση εισέρχεται στο εσωτερικό του κυττάρου, όπου α) υπό συνθήκες ανάπτυξης μετατοπίζεται στον πυρήνα, όπου επάγει την παραγωγή rRNA, προάγοντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και β) υπό συνθήκες στρες, συσσωρεύεται στα κυτταροπλασματικά σωμάτια στρες (SG), όπου ενισχύει την παραγωγή tiRNA, επαναπρογραμματίζοντας τη μετάφραση και προάγοντας την κυτταρική επιβίωση (Li & Hu, 2012). Η εξωκυττάρια hAng ενεργοποιεί τα μονοπάτια μεταγωγής σήματος SAPK/JNK, ERK1/2 και PI3K/AKT σε διαφορετικά κύτταρα και σε διαφορετικές κυτταρικές συνθήκες. Η αλληλεπίδραση της hAng με την ακτίνη της κυτταρικής επιφάνειας οδηγεί στην αποικοδόμηση της βασικής μεμβράνης και την ενεργοποίηση των μεταλλοπρωτεϊνών, οδηγώντας στην κυτταρική μετανάστευση και κυτταρική εισβολή. Επιπροσθέτως, η hAng αναστέλλει τη φωσφορυλίωση της p53, επάγοντας την πρόσδεση της στην πρωτεΐνη MDM2, οδηγώντας στην ουβικουιτινίωση της p53 (Sheng & Xu, 2016).

### 1.2.3. Βασικές λειτουργίες της hAng

Σε κυτταρικό επίπεδο, η hAng επάγει την κυτταρική προσκόλληση, μετανάστευση, εισβολή, πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση, σε πολλά πειραματικά μοντέλα κυττάρων (Sheng & Xu, 2016). Παρόλο που έχουν γίνει πολλές

μελέτες για τις βιολογικές λειτουργίες της hAng, υπάρχει έλλειψη *in vivo* δεδομένων για τον πλήρη προσδιορισμό των ρόλων της πρωτεΐνης αυτής σε φυσιολογικές και παθολογικές διεργασίες. Συνολικά, η hAng θεωρείται ότι παίζει ρόλο στην εγκυμοσύνη, στην έμφυτη ανοσία, στην ογκογένεση, το νευροεκφυλισμό κι άλλες παθολογικές καταστάσεις (Sheng & Xu, 2016).

### Ο ρόλος της hAng στην αγγειογένεση

Ως αγγειογένεση αναφέρεται η βιολογική διαδικασία κατά την οποία δημιουργούνται νέα αιμοφόρα αγγεία από ένα προϋπάρχον σύστημα αγγείων. Η αγγειογένεση παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη, την αναπαραγωγή και την επιδιόρθωση βλαβών (Folkman, 2007). Η μη φυσιολογική αγγειογένεση (παθολογική αγγειογένεση), μπορεί να έχει καταστροφικές συνέπειες, όπως σε πολλές παθολογικές καταστάσεις, συμπεριλαμβανομένων της αρθρίτιδας, της διαβητικής αμφιβληστροειδοπάθειας και της ανάπτυξης όγκων (Tello-Montoliu et al., 2006). Η αγγειογένεση είναι μια πολύπλοκη βιολογική διαδικασία, που περιλαμβάνει: α) την ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων από τη δράση ενός αγγειογενετικού ερεθίσματος, β) την εισβολή των ενεργοποιημένων ενδοθηλιακών κυττάρων στους περιαγγειακούς ιστούς και τη μετανάστευση τους προς την πηγή του αγγειογόνου ερεθίσματος και γ), τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων για το σχηματισμό ενός νέου μικροαγγειακού συστήματος (Hu et al., 1997). Η hAng είναι ένας ισχυρός επαγωγέας της αγγειογένεσης, καθώς έχει αποδειχθεί ότι προκαλεί τα περισσότερα από τα συμβάντα στη διαδικασία αυτή, συμπεριλαμβανομένων τη σύνδεση με τα ενδοθηλιακά κύτταρα, προκαλώντας κυτταρική προσκόλληση, ενεργοποιώντας πρωτεάσες, επάγοντας την κυτταρική εισβολή και οργανώνοντας το σχηματισμό σωληνοειδών δομών από καλλιεργημένα ενδοθηλιακά κύτταρα (Hu et al., 1997).

Μια υπόθεση για το ξεκίνημα της αγγειογένεσης και της σειράς των γεγονότων που διαδραματίζονται είναι η εξής :

- α. Η ιστική βλάβη έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση α-ακτίνης και RNA, επάγοντας την έκφραση της hAng.
- β. Η hAng με τη σειρά της προσδένεται στην ακτίνη της επιφάνειας των ενδοθηλιακών κυττάρων, ενεργοποιώντας πρωτεάσες για την αποικοδόμηση της βασικής μεμβράνης.
- γ. Γίνεται έκφραση του υποδοχέα της κυτταρικής μεμβράνης των ενδοθηλιακών κυττάρων, στον οποίο προσδένεται η hAng, με αποτέλεσμα να εισέρχεται με ενδοκυττάρωση στο εσωτερικό του κυττάρου και να μετακινείται στον πυρήνα.
- δ. Εισχώρηση των ενδοθηλιακών κυττάρων διαμέσου της αποδομημένης βασικής μεμβράνης.

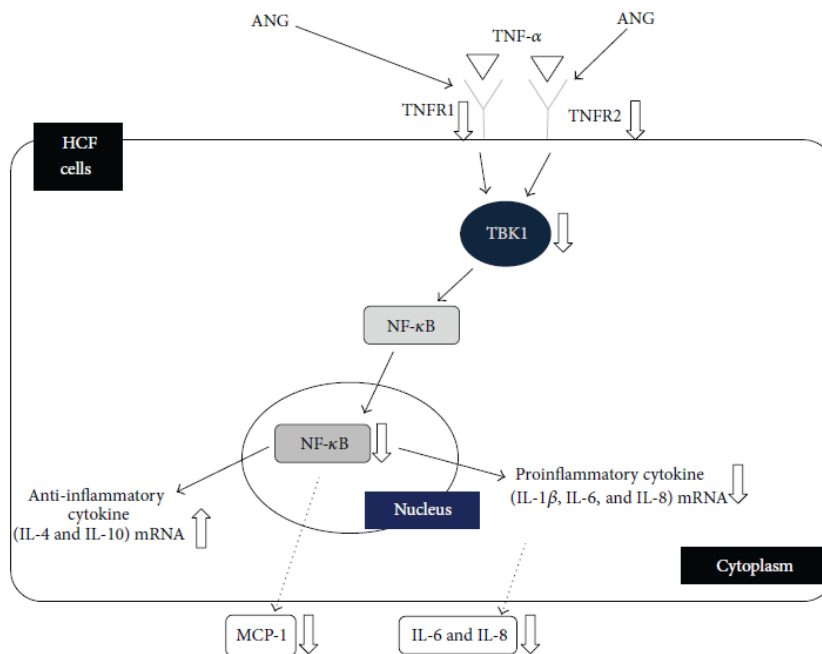
- ε. Ωρίμανση των τοιχωμάτων των αγγείων μέσω της μετανάστευσης και του πολλαπλασιασμού των λείων μυϊκών κυττάρων (Tello-Montoliu et al., 2006).

Συνοψίζοντας, το σύνολο των μηχανισμών δράσης της hAng υποδεικνύει το ρόλο της στην αγγειογένεση, όπου τα ενδοθηλιακά κύτταρα μεταναστεύουν προς την πηγή του αγγειογόνου ερεθίσματος, πολλαπλασιάζονται και τελικά διαφοροποιούνται και ωριμάζουν από εύθραυστα τριχοειδή αγγεία σε πολυστρωματικά αγγεία (Tello-Montoliu et al., 2006).

#### Ο ρόλος της hAng στην έμφυτη ανοσία και στην ανοσοαπόκριση

Μια σημαντική πτυχή της δράσης της hAng είναι η συμμετοχή της στην έμφυτη ανοσία. Η hAng αποτελεί συστατικό των δακρύων (S. H. Lee et al., 2016) και προστατεύει την οφθαλμική επιφάνεια δρώντας ως αντιμικροβιακό πεπτίδιο (Sack et al., 2005), ενώ επάγεται σε αφθονία στα ενδοθηλιακά κύτταρα του εντέρου, όπου κι έχει αποδειχθεί ότι δρα επίσης ως αντιμικροβιακός παράγοντας (Hooper et al., 2003). Η hAng δρα επίσης κι ως αντι-ϊικός παράγοντας, καθώς αποτελεί τη μία από τις δύο RNases που παράγονται από τα T-λεμφοκύτταρα και μπορεί να καταστείλει τον πολλαπλασιασμό του στελέχους X4 του ιού HIV (Sheng & Xu, 2016). Ακόμη, τα επαγόμενα από την hAng tiRNA είναι αυξημένα και πιο άφθονα από τα microRNA, στις χρόνιες λοιμώξεις από ηπατίτιδα Β και C, γεγονός που υποδηλώνει ότι η hAng μπορεί να παίζει κάποιο ρόλο στην ιογενή λοίμωξη (Selitsky et al., 2015).

Εκτός από την κύρια λειτουργία της, ως ενεργοποιητή της αγγειογένεσης, η hAng εμπλέκεται και στη διαδικασία της φλεγμονής. Η συγκέντρωσή της στον ορό αυξάνεται σημαντικά κατά τη διάρκεια αντιφλεγμονώδους απόκρισης, ενώ οι αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες της έχουν αποδειχθεί στα επαγόμενα από ιντερλευκίνη, IL-1β ή TNF-α, μοντέλα φλεγμονής (Yurina et al., 2021). Επιπλέον, είναι γνωστό ότι η hAng καταστέλλει την αποκοκκίωση των πολυμορφοπύρηνων λευκοκυττάρων, συμμετέχοντας, έτσι στην ενδογενή αναστολή της ανάδρασης κατά την ανάπτυξη φλεγμονωδών αντιδράσεων (Tello-Montoliu et al., 2006). Ο μηχανισμός με τον οποίο η hAng καταστέλλει τη φλεγμονώδη αντίδραση απεικονίζεται στην *Εικόνα 9* (S. H. Lee et al., 2014).



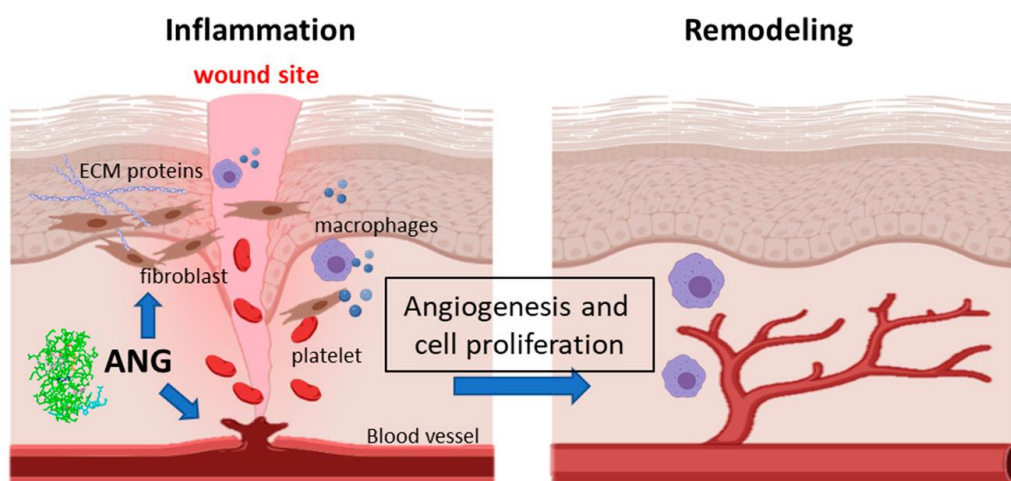
Εικόνα 9: Σχηματικό μοντέλο που απεικονίζει το σηματοδοτικό μονοπάτι που η hAng καταστέλλει τη φλεγμονώδη απόκριση, το οποίο περιλαμβάνει τη διαμεσολαβούμενη από τον TBK-1 πυρηνική μετατόπιση του NF-κB σε ινοβλάστες του κερατοειδούς χιτώνα (HCF). Η επαγωγή της φλεγμονής έγινε από τον παράγοντα TNF-α. Η hAng μειώνει την έκφραση των mRNA των προφλεγμονωδών κυτοκινών (IL-1β, -6, και -8) και ενισχύει την έκφραση του mRNA των αντιφλεγμονωδών κυτοκινών (IL-4 και -10). Αναστέλλει επίσης την πυρηνική μετατόπιση του NF-κβ μέσω μείωσης της έκφρασης του mRNA των TNFR1 και 2 και της παραγωγής TBK1. Τα γεγονότα αυτά οδηγούν στη μείωση των φλεγμονωδών κυτοκινών και χημειοκινών όπως η MCP-1, η IL-6 και -8, στην κυτταρική σειρά HCF (S. H. Lee et al., 2014).

### Ο ρόλος της hAng στην επούλωση τραυμάτων

Η hAng συμμετέχει στη διαδικασία επούλωσης τραυμάτων και αναγέννησης των ιστών που σχετίζεται με την απόκριση του ξενιστή στον τραυματισμό. Όταν οι τραυματισμένοι θρόμβοι διαταράσσουν τη συρροή των ενδοθηλιακών κυττάρων, η υψηλή συγκέντρωση της hAng στα αιμοφόρα αγγεία διευκολύνει την ταχεία ανάπτυξη τους και την επιδιόρθωση των ιστών, υποδηλώνοντας ότι η πρωτεΐνη αυτή μπορεί να προάγει την επούλωση των τραυμάτων (Sheng & Xu, 2016). Πιο συγκεκριμένα, η hAng συνδέεται με την ακτίνη, με το σύμπλοκο αυτό να είναι πιο αποτελεσματικό από την ακτίνη μόνη της, για τη διέγερση του t-PA προς παραγωγή πλασμίνης, η οποία παίζει σημαντικό ρόλο σε διαδικασίες όπως η επούλωση πληγών, η φλεγμονή και η μετάσταση των καρκινικών κυττάρων (Tello-Montoliu et al., 2006). Επιπλέον, η hAng ενεργοποιεί τους ινοβλάστες και τους παράγοντες που αυτοί παράγουν, επηρεάζοντας έτσι και έμμεσα την πορεία της επούλωσης των τραυμάτων (Εικόνα 10) (Cucci et al., 2021). Η λειτουργική δραστηριότητα της hAng καθορίζει



ουσιαστικά την πορεία και το αποτέλεσμα της διαδικασίας της επούλωσης των τραυμάτων, τόσο άμεσα, διεγείροντας τη νεοαγγείωση, όσο κι έμμεσα, ενεργοποιώντας τους ινοβλάστες και τους παράγοντες που παράγουν (Yurina et al., 2021).



Εικόνα 10: Η hAng προάγει την επούλωση των τραυμάτων προκαλώντας αγγειογένεση και κυτταρική μετανάστευση και ενεργοποιώντας τα κύτταρα ινοβλαστών για την παραγωγή πρωτεϊνών της εξωκυττάριας μήτρας (κολλαγόνο, φιβρίνη, φιβρονεκτίνη) (Cucci et al., 2021).

Μελέτες έδειξαν, πως ενδοδερμικές ενέσεις ανασυνδυασμένης hAng σε αρουραίους Wistar επάγουν ιστο-ειδικές παθολογολογικές αλλαγές στο δέρμα, παίζοντας σημαντικό ρόλο στις αγγειογενετικές διεργασίες (Yurina et al., 2021). Ακόμη, στην ίδια μελέτη δείχθηκε πως η προσθήκη ανασυνδυασμένης hAng διεγείρει τα αιμοσφαίρια να παράγουν και να απελευθερώνουν τόσο προ- όσο και αντι-φλεγμονώδεις κυτοκίνες (Yurina et al., 2021), υποδηλώνοντας ότι η hAng μπορεί να λειτουργεί ως προστατευτικός ομοιοστατικός παράγοντας, είτε μέσω της αγγειογένεσης, είτε μέσω της ενεργοποίησης των λεμφοκυττάρων, των ουδετερόφιλων και των ενδοθηλιακών κυττάρων, στα αιμοφόρα αγγεία (Cucci et al., 2021).

Υψηλά επίπεδα της hAng έχουν βρεθεί στα υγρά του τραύματος που συλλέχθηκαν μετά από τραυματισμό. Έχει αποδειχθεί ότι τα υψηλά αυτά επίπεδα προκαλούν πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων και διαφοροποίηση των κυκλοφορικών αγγειογενετικών κυττάρων (CAC), ενώ η εξουδετέρωση της hAng από αντίσωμα της σε ισοδύναμα υγρά τραυμάτων οδηγεί σε μείωση των αγγειογενετικών τους ικανοτήτων. Τέτοια ευρήματα υποστηρίζονται επίσης κι από περαιτέρω κλινικά δεδομένα, αποδεικνύοντας τη θετική συσχέτιση μεταξύ της hAng και της διαδικασίας επούλωσης των τραυμάτων (Cucci et al., 2021).



#### 1.2.4. Ρύθμιση της hAng

Αν και η έκφραση της hAng είναι αυξημένη σε διάφορους τύπους καρκίνων, ο μηχανισμός ρύθμισής της παραμένει ασαφής. Έχει αποδειχτεί ότι η υπερέκφραση του miRNA, miR-409-3p, έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση των επιπέδων του mRNA και της πρωτεΐνης της hAng, μέσω της άμεσης πρόσδεσης του μορίου αυτού στην 3'-UTR περιοχή του γονιδίου της. Το miR-409-3p αναστέλλει την ανάπτυξη, την αγγείωση και τη μετάσταση των όγκων, μέσω της μείωσης της έκφρασης της hAng, τόσο σε κύτταρα ινοσαρκώματος HT1080, όσο και ενδοθηλιακά κύτταρα HUVEC (Weng et al., 2012). Ακόμη, μελέτες έχουν αναδείξει το ρυθμιστικό ρόλο της εξωκυττάριας μήτρας (ECM) και των ιντεγκρινών στην έκφραση του mRNA και στην έκκριση της πρωτεΐνης της hAng στον ανθρώπινο πλακούντα. Η εξωκυττάρια μήτρα φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην ενίσχυση της έκκρισης της hAng, στον ανθρώπινο πλακούντα, γεγονός απαραίτητο για την αγγειογένεση του (Rajashekhar et al., 2005).

Επιπλέον, η μεταγραφή του γονιδίου της hAng ρυθμίζεται από το μεταγραφικό παράγοντα που επάγεται από υποξία, τον HIF-1α. Η αυξημένη έκφραση της hAng διεγείρει την αγγειογένεση σε ιστούς που έχουν ανεπαρκή παροχή οξυγόνου (Lai et al., 2016). Το γενετικό σημείο απόκρισης στην υποξία, εντός του γονιδίου της hAng, έχει χαρτογραφηθεί στην ομόλογη θέση δέσμευσης του HIF-1α, 5'-RCGTG-3'. Είναι γνωστό, ότι ο HIF-1α απαιτείται για την έκφραση της hAng σε νευρικά κύτταρα, ως απόκριση στην υποξία (Lai et al., 2016). Ακόμη, σε ορισμένους συμπαγείς όγκους συμπεριλαμβανομένου του κακοήθους μελανώματος, του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας και του καρκίνου του μαστού, η hAng πιστεύεται πως ρυθμίζεται θετικά σε υποξικό περιβάλλον, πιθανώς μέσω ενός μηχανισμού που διαμεσολαβείται από το HIF-1α (Kishimoto et al., 2012). Σημαντική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης hAng και του HIF-1α υπάρχει και σε δείγματα πλακώδους στοματικού καρκίνου (OSCC). Τόσο *in vitro*, όσο και *in vivo* πειράματα, έδειξαν ότι η hAng ρυθμίζεται σε υψηλό βαθμό σε συνθήκες υποξίας και σχετίζεται αποτελεσματικά με την ογκογένεση και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό του καρκίνου του στόματος (Kishimoto et al., 2012). Η έκφραση της hAng ρυθμίζεται επίσης θετικά κι από τον ηπατικό πυρηνικό παράγοντα-1α, (HNF-1α). Αυτός ο μεταγραφικός παράγοντας εμπλέκεται στο μεταβολισμό της γλυκόζης και των λιπιδίων στα β-κύτταρα του ήπατος και του παγκρέατος (Prehn & Jirström, 2020).

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η ριβονουκλεολυτική δραστηριότητα της hAng είναι απαραίτητη για την αγγειογενετική της δράση (Shapiro & Vallee, 1989). Ωστόσο, άμεση έγχυση της hAng στο κυτταρόπλασμα, είχε ως αποτέλεσμα την αποικοδόμηση του κυτταρικού RNA και κατά συνέπεια τον κυτταρικό θάνατο. Αυτά τα αποτελέσματα «γέννησαν» ένα σημαντικό ερώτημα: με ποιον τρόπο, δηλαδή, ελέγχεται η ριβονουκλεολυτική δράση της hAng υποκυτταρικά, ώστε να αποφεύγεται η τυχαία και ανεξέλεγκτη αποικοδόμηση των μορίων RNA, που οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο (Pizzo et al., 2013).

Η διαφορετική υποκυτταρική διαμερισματοποίηση της hAng κάτω από διαφορετικές συνθήκες, ουσιαστικά αποτελεί έναν ρυθμιστή της δράσης της. Σε συνθήκες ανάπτυξης, η hAng μετατοπίζεται στον πυρήνα όπου και συσσωρεύεται στον πυρηνίσκο διεγείροντας τη μεταγραφή του rRNA, ενώ σε στρεσογόνες συνθήκες, αυτή απαντάται στο κυτταρόπλασμα και συσσωρεύεται στα κοκκία του στρες, SGs, προωθώντας την κυτταρική επιβίωση (Pizzo et al., 2013).

Κατά την είσοδό της στα κύτταρα, η hAng συναντά τον ανθρώπινο πλακουντιακό αναστολέα ριβονουκλεασών (RI). Ο RI είναι μια άφθονη κυτταροπλασματική πρωτεΐνη, μοριακού βάρους 50 kDa (L. Li et al., 2014). Έχει χαρακτηριστική τρισδιάστατη δομή, σε σχήμα πετάλου, που αποτελείται από πολλαπλές επαναλήψεις πλούσιες σε λευκίνη (LRRs), οι οποίες του επιτρέπουν το σχηματισμό μεγάλων επιφανειών, καθιστώντας τον έτσι έναν κόμβο αλληλεπιδράσεων πρωτεϊνών. Ακόμη, λόγω των 32 καταλοίπων κυστεΐνης που αυτός διαθέτει, έχει προταθεί ότι μπορεί να παίζει ρόλο «αισθητήρα» της οξειδωσης του κυττάρου (Sarangdhar & Allam, 2021).

Ο RI μπορεί να καταστείλει αποτελεσματικά και εξειδικευμένα, τόσο την αγγειογενετική, όσο και τη ριβονουκλεολυτική δράση της hAng (Shapiro & Vallee, 1987). Κρυσταλλογραφικές μελέτες ακτίνων Χ του συμπλέγματος hAng-RI, αποκάλυψαν ότι η επιφάνεια αλληλεπίδρασης της hAng και του RI είναι αρκετά μεγάλη και στις δύο πρωτεΐνες. Ωστόσο, οι σημαντικές αλληλεπιδράσεις περιλαμβάνουν μόνο το καρβοξυτελικό τμήμα 434-460 του RI και το καταλυτικό κατάλοιπο Lys-40 της hAng (Parageorgiou et al., 1997). Συγκεκριμένα, το κατάλοιπο Asp435 του RI δημιουργεί γέφυρες άλατος με το κατάλοιπο Lys40 του καταλυτικού κέντρου της hAng (Sarangdhar & Allam, 2021), εμποδίζοντας έτσι το ενεργό της κέντρο και καταργώντας τη ριβονουκλεολυτική της δράση (Dickson et al., 2009). Ο RI δεσμεύει την hAng, με μία σταθερά διάστασης ( $K_d$ ) ίση με 0.71 fM, σχηματίζοντας μία από τις πιο ισχυρές, μη ομοιοπολικές, αλληλεπιδράσεις στη φύση (F. S. Lee et al., 1989), ενώ ρυθμίζει τόσο τη ριβονουκλεολυτική της δράση, όσο και τον εντοπισμό της στα διαφορετικά υποκυτταρικά διαμερίσματα, κάτω από διαφορετικές συνθήκες (Pizzo et al., 2013).

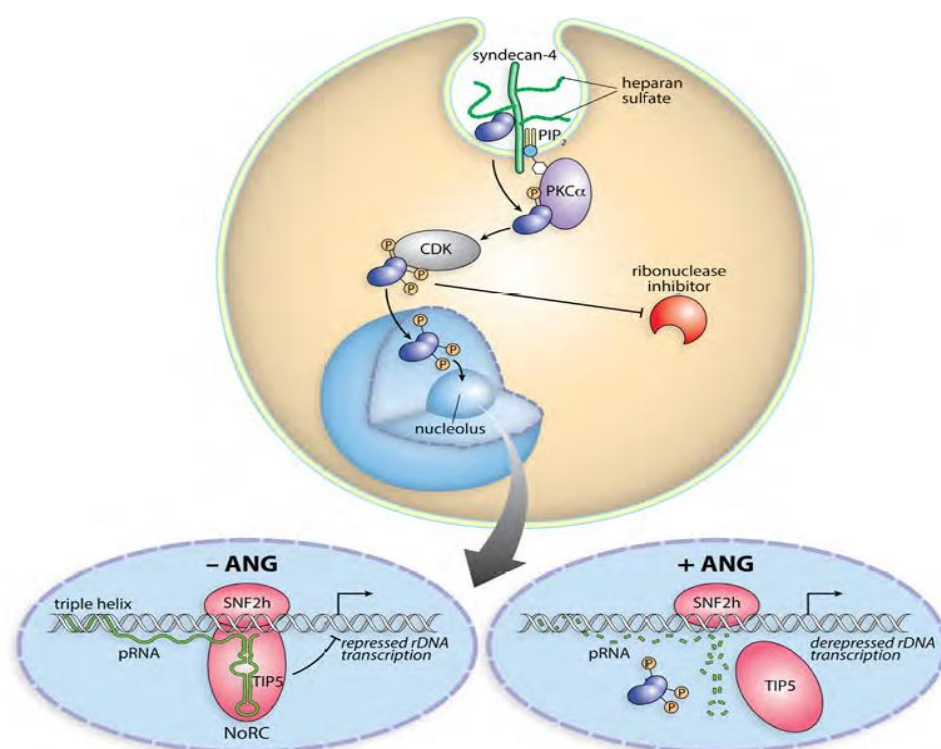
Υπό συνθήκες ανάπτυξης, ο RI προσδένεται με την κυτταροπλασματική hAng, αλλά όχι με την πυρηνική, έτσι ώστε η δεύτερη να είναι ενζυμικά ενεργή, αλλά η πρώτη να αναστέλλεται. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, τη διατήρηση της ριβονουκλεολυτικής δράσης της πυρηνικής hAng, ώστε να διασφαλίζεται η μεταγραφή του rRNA, ενώ ταυτόχρονα αποτρέπεται η τυχαία διάσπαση του κυτταρικού RNA από την κυτταροπλασματική hAng. Αντίθετα, υπό συνθήκες στρες, αυτός συνδέεται με την πυρηνική hAng κι όχι με την κυτταροπλασματική, έτσι ώστε η δράση της πυρηνικής hAng να αναστέλλεται, ενώ η δράση της κυτταροπλασματικής να παραμένει ενεργή. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, τη διατήρηση της

ριβονουκλεολυτικής δράσης της κυτταροπλασματικής hAng, η οποία συγκεντρώνεται στα κοκκία του στρες, SG, επάγοντας την παραγωγή tiRNAs και προάγοντας την κυτταρική επιβίωση. Ταυτόχρονα, αποτρέπεται η παραγωγή περιττού rRNA από την πυρηνική hAng, καθώς αυτή δε μπορεί να διασπάσει το pRNA, το οποίο μπορεί πλέον να συνδεθεί με τον υποκινητή του rDNA, καταστέλλοντας τη σύνθεση rRNA. Έτσι, σταματά ή μειώνεται η παραγωγή πρωτεϊνών προς εξοικονόμηση αναβολικής ενέργειας (Pizzo et al., 2013; Sarangdhar & Allam, 2021). Τέλος, η καταστολή του RI μεταβάλλει τον κυτταρικό εντοπισμό της hAng και καταργεί τη δραστηριότητά της υπέρ της κυτταρικής επιβίωσης (Pizzo et al., 2013). Απουσία του RI, η hAng είναι μια ισχυρή κυτταροτοξίνη, παρά τη χαμηλή ριβονουκλεολυτική της δραστηριότητα, επάγοντας τον κυτταρικό θάνατο μέσω ενός μοναδικού μηχανισμού-ισχυρής προς τα πάνω ρύθμισης- των κυτταροτοξικών tiRNAs. Κάτω από διαφορετικές συνθήκες, τα tiRNAs που παράγονται από την hAng μπορούν να οδηγήσουν είτε σε κυτταρική επιβίωση, είτε σε κυτταρικό θάνατο (Thomas et al., 2018).

Είναι γνωστό, πως η ανοδική ρύθμιση του RI καταστέλλει την ανάπτυξη των όγκων, καθώς και την πυκνότητα των μικροαγγείων τους, μέσω της καταστολής της λειτουργίας της hAng (L. Li et al., 2014). Αντίθετα, οι μεταλλάξεις της hAng που οδηγούν στην αποφυγή της δέσμευσης της με τον RI, εμφανίζουν ενισχυμένη αγγειογενετική δραστηριότητα (Dickson et al., 2009).

Πώς όμως η hAng αποφεύγει τον κυτταροπλασματικό RI κατά τη διαδρομή της προς τον πυρήνα; Η hAng υφίσταται μια μετα-μεταφραστική τροποποίηση για να αποφύγει τον RI (Hoang & Raines, 2017). Πρόσφατη μελέτη έδειξε πως η φωσφορυλίωση συγκεκριμένων καταλοίπων σερίνης, από την πρωτεϊνική κινάση C (PKC) και την κυκλινο-εξαρτώμενη κινάση (CDK), δίνει στην hAng τη δυνατότητα να αποφεύγει τον κυτταροπλασματικό RI και να εισέρχεται στον πυρήνα, αποτελώντας ενδεχομένως έναν μηχανισμό που χρησιμοποιείται από τα ενδοθηλιακά και τα καρκινικά κύτταρα, για την ενίσχυση του πολλαπλασιασμού τους (*Εικόνα11*) (Hoang & Raines, 2017). Η εξαιρετικά στενή δέσμευση μεταξύ του RI και της hAng οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στις αλληλεπιδράσεις Κουλόμπ, καθώς ο RI εμφανίζει σημαντικό αρνητικό φορτίο και η hAng σημαντικά θετικό (Dickson et al., 2005). Προσάρτηση φωσφορικών ομάδων στα αμινοξικά κατάλοιπα της hAng, αλλάζουν το φορτίο της, απαλείφοντας σημαντικές ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις της με τον RI, οδηγώντας σε μείωση της συγγένειας της γι' αυτόν. Ανάμεσα στα δεκαέξι κατάλοιπα σερίνης και θρεονίνης της hAng, τέσσερα έχουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον: η Ser87, η οποία βρίσκεται στην επιφάνεια αλληλεπίδρασης hAng-RI και είναι γνωστή ως «Hotspot» για αντικαταστάσεις αμινοξέων που οδηγούν σε μείωση της αλληλεπίδρασης hAng και RI κι ένα σύμπλεγμα τριών καταλοίπων κοντά στο NLS: Ser28, Thr36 και Ser37 (Hoang & Raines, 2017). Στην ίδια μελέτη δείχθηκε ότι τα κατάλοιπα 28, 36/37 και 87 της hAng επηρεάζουν την πυρηνική της μετατόπιση και κατά συνέπεια την αποικοδόμηση του pRNA. Συγκεκριμένα, πειράματα

ανοσοφθορισμού, έδειξαν ότι η αντικατάσταση των καταλοίπων 28, 36/37 ή 87 με αλανίνη, που δημιουργεί μη φωσφορυλιώσιμα μεταλλάγματα της hAng, οδηγεί σε συσσώρευση της πρωτεΐνης στο κυτταρόπλασμα, ενώ αντίθετα, η αντικατάσταση με ασπαρτικό (φωσφομιμητικό), οδηγεί τη συσσώρευση αυτής στον πυρήνα και κατά συνέπεια, τη διάσπαση του pRNA (Hoang & Raines, 2017). Αυτά τα δεδομένα αποδεικνύουν ότι η φωσφορυλίωση των καταλοίπων Ser28, Ser37 και Ser87, είναι απαραίτητη για την είσοδο της hAng στον πυρήνα του κυττάρου και την αποικοδόμηση του pRNA (Hoang & Raines, 2017).



Εικόνα 11: Κυτταρική δράση της hAng. Κατά την είσοδο στα κύτταρα, η hAng φωσφορυλιώνεται από την πρωτεϊνική κινάση C και την κυκλινο-εξαρτώμενη κινάση, στα κατάλοιπα Ser28, Ser37 και Ser87, επιτρέποντας της να αποφύγει τον RI και να εισέλθει στον πυρήνα. Εκεί, η hAng διασπά το pRNA, οδηγώντας στην απομάκρυνση του TIP5 από τον υποκινητή του rDNA. Η επακόλουθη μεταγραφή του rDNA προωθεί τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων (νεοαγγείωση) και των καρκινικών κυττάρων (μετάσταση) (Hoang & Raines, 2017).

### 1.2.5. Αγγειογένιση και ασθένειες

Η hAng κυκλοφορεί ελεύθερη στο πλάσμα του αίματος, σε συγκέντρωση περίπου 250–360 μg/L, σε υγιή άτομα. Κατά τη διάρκεια της ανθρώπινης ανάπτυξης, ανιχνεύεται σε διάφορα όργανα, όπως η καρδιά, ο σπλήνας, ο πνεύμονας, το ήπαρ, το παχύ έντερο, ο προστάτης, ο μαστός, ο εγκέφαλος, ο αμφιβληστροειδής χιτώνας κ.α. Ωστόσο, η διαδικασία της αγγειογένεσης δε λαμβάνει χώρα συνεχώς σε όλους

τους ιστούς και σε όλα τα στάδια ανάπτυξης (Tello-Montoliu et al., 2006).

### hAng και καρκίνος

Η hAng είναι μια ισχυρή αγγειογόνος πρωτεΐνη που υπερεκφράζεται σε πολλούς τύπους καρκίνου, σε τιμές συγκέντρωσης που σχετίζονται με την επιθετικότητα του όγκου (Marzo et al., 2022). Διάφοροι τύποι καρκίνου έχουν διερευνηθεί σε σχέση με την έκφραση της hAng κατά την ανάπτυξη του όγκου, υποδηλώνοντας ότι η πρωτεΐνη αυτή σχετίζεται στενά τόσο με την ανάπτυξη, όσο και με την εξέλιξη του (Tello-Montoliu et al., 2006). Πλέον, είναι γνωστό ότι η hAng επηρεάζει σχεδόν όλα τα στάδια της ογκογένεσης, συμπεριλαμβανομένης της προστασίας των καρκινικών κυττάρων από αντίξοες συνθήκες, της προώθησης του πολλαπλασιασμού τους, της ενίσχυσης της μετανάστευσης και της εισβολής τους, καθώς και της επαγωγής της αγγειογένεσης (Sheng & Xu, 2016). Αύξηση των επιπέδων έκφρασης της hAng παρατηρείται σε διάφορους τύπους καρκίνων, συμπεριλαμβανομένου του προστάτη, του μαστού, του παχέος εντέρου, του παγκρέατος, του ουροθηλίου, του γαστρικού, του νεφρού, του τραχήλου της μήτρας, του ενδομήτριου, των ωοθηκών, της οξείας μυελογενούς λευχαιμίας (AML), του μυελοδυσπλαστικού συνδρόμου (MS), των χρόνιων μυελοϋπερπλαστικών διαταραχών (CMD), του πολλαπλού μυελώματος κ.α. (Gao & Xu, 2008).

Το επίπεδο συγκέντρωσης της hAng στον ορό του αίματος αποτελεί ένα χρήσιμο εργαλείο για την αξιολόγηση της ανάπτυξης και της προόδου του όγκου. Αυξημένα επίπεδα της hAng στον ορό βρέθηκαν σε συμπαγείς όγκους, ενώ ασθενείς με υψηλότερα επίπεδα hAng στον ορό, βρέθηκε να έχουν κακή πρόγνωση. Ωστόσο, τα επίπεδα της hAng στον ορό ποικίλλουν μεταξύ των διαφορετικών τύπων καρκίνου και σύμφωνα με μελέτες κούρτης (D. Yu et al., 2018).

Σήμερα, η hAng αποτελεί δείκτη διάγνωσης, πρόγνωσης και παρακολούθησης της θεραπείας στον καρκίνο (Tello-Montoliu et al., 2006; Sheng & Xu, 2016), ενώ παράλληλα έχει αναδειχθεί ως φαρμακευτικός στόχος για την ανάπτυξη νέων αντικαρκινικών παραγόντων (S. Li & Hu, 2010).

### hAng, νευροπροστασία και νευροεκφυλιστικές ασθένειες

Γενετικές μελέτες έχουν δείξει ότι μεταλλάξεις του γονιδίου της hAng, που οδηγούν σε απώλεια της λειτουργίας της, σχετίζονται με νευροεκφυλιστικές ασθένειες, όπως η αμυοτροφική πλευρική σκλήρυνση (ALS) και η νόσος του Parkinson (PD) (van Es et al., 2011; Greenway et al., 2004). Οι περισσότερες από αυτές, δε μεταβάλλουν σημαντικά την τριτοταγή δομή (Thiyagarajan et al., 2012) ή τη σταθερότητα της, αλλά αναστέλλουν τη ριβονουκλεολυτική της δραστηριότητα ή την πυρηνική της μετατόπιση (Crabtree et al., 2007; Bradshaw et al., 2017; Fasoli et al., 2021), υποδηλώνοντας ότι η hAng αποτελεί έναν ισχυρό νευροπροστατευτικό

παράγοντα (D. Yu et al., 2018).

Η ALS είναι μια όψιμης έναρξης, προοδευτική νευροεκφυλιστική διαταραχή που οδηγεί σε απώλεια των κινητικών νευρώνων στο νωτιαίο μυελό και στον κινητικό φλοιό (van Es et al., 2011). Ο VEGF ήταν ο πρώτος αγγειογενετικός παράγοντας που δείχθηκε ότι συμβάλλει στην παθογένεση της ALS (Gao & Xu, 2008). Ένας πιθανός ρόλος της hAng στην ALS ίσως να σχετίζεται με τη συμμετοχή της στην επαγόμενη από τον VEGF αγγειογένεση. Η hAng πρόσφατα αναγνωρίστηκε ως ο δεύτερος αγγειογενετικός παράγοντας που σχετίζονται με αυτή την ασθένεια, ενώ το γονίδιο της είναι το πρώτο γονίδιο «απώλειας λειτουργίας» που εντοπίστηκε σε ασθενείς με ALS και PD μέχρι σήμερα (Wu et al., 2007).

Πίνακας 1: Μεταλλάξεις hAng που σχετίζονται με ALS (Prehn & Jirström, 2020).

Variant	Ethnic origin
M(-24)I	Italian, Hungarian
F(-13)L	German
F(-13)S	Italian
G(-10)D	Dutch
P(-4)S	Italian, Northern American
P(-4)Q	Belgian
Q12L	Irish, Scottish
R31K	Irish, English
K17E	Irish, Swedish
K40I	Irish, Scottish
K17I	Irish, Scottish, North American, French, Dutch, Belgian, German
I46V	Scottish, Italian, German, French, Swedish
K54E	German
S28N	North American
P112L	North American
R121H	French
G20G	Italian
V113I	Italian
H114R	Italian
T80S	Dutch
F100I	Dutch
R33W	Hungarian
V103I	Hungarian, Chinese
R145C	Italian
R21G	Indian
C39W	European
g.446C → T	Italian

Η hAng μπορεί να ασκήσει νευροπροστατευτικές δραστηριότητες στους κινητικούς νευρώνες (ΚΝ), στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ). Ως αγγειογενετικός παράγοντας, αυτή προστατεύει τους ΚΝ αυξάνοντας τη νευροαγγειακή αιμάτωση. Μελέτες μεταλλαξιγένεσης της hAng που οδηγούσαν σε απώλεια των παραπάνω λειτουργιών, έδειξαν ότι τα μεταλλάγματα αυτά, μείωσαν τη ριβονουκλεολυτική δραστηριότητα της hAng ή την πυρηνική της μετατόπιση ή και τα δύο (S. Li & Hu, 2010). Στον Πίνακα1 παρουσιάζεται μια λίστα των μεταλλάξεων της hAng που σχετίζονται με την ALS (Prehn & Jirström, 2020). Η hAng προάγει την επιβίωση των κινητικών νευρώνων *in vitro* και *in vivo* (Kieran et al., 2008). Μελέτες έχουν δείξει πως η hAng παρουσιάζει νευροπροστατευτική δράση σε καλλιέργειες κινητικών νευρώνων έναντι τοξικής βλάβης, με τρόπο που εξαρτάται από το μονοπάτι PI-3/Akt. Αντίθετα, η αποσιώπηση της ενισχύει τον κυτταρικό θάνατο των κινητικών νευρώνων (Kieran et al., 2008). Πιο συγκεκριμένα, μελέτες σε κινητικούς νευρώνες αποκάλυψαν πως η νευροπροστατευτική δράση της hAng οφείλεται στην αναστολή της απόπτωσης,

μέσω της ενεργοποίησης της οδού σηματοδότησης PI-3/Akt. Μεταλλάγματα της hAng που δε μπορούν να ενεργοποιήσουν το μονοπάτι PI-3/Akt, καθιστούν τους νευρώνες πιο επιρρεπείς στην απόπτωση, μέσω της ενεργοποίησης της κασπάσης-3 (van Es et al., 2011). Επιπλέον, η χορήγηση της σε ποντίκια SOD1<sup>G93A</sup>, ένα τυπικό

εργαστηριακό μοντέλο ALS, προάγει σημαντικά τόσο τη διάρκεια ζωής τους, όσο και την κινητική τους λειτουργία (Kieran et al., 2008). Πιθανόν, η λειτουργία της hAng στους κινητικούς νευρώνες να σχετίζεται με τη ριβοσωμική βιογένεση και τη μετάφραση πρωτεϊνών. Ένα λάθος σε αυτό το μονοπάτι, ως συνέπεια μιας μετάλλαξης της hAng στην ALS, μπορεί να οδηγήσει σε ανεπαρκή σύνθεση ριβοσωμάτων, επηρεάζοντας έτσι την βιωσιμότητα των κινητικών νευρώνων (Wu et al., 2007). Από πλευράς μηχανισμού δράσης, ίσως ο επαγόμενος από την hAng σχηματισμός tiRNA, μπορεί να συμβάλει στην επιβίωση των κινητικών νευρώνων μέσω της αναστολής της κυτταρικής απόπτωσης ή του σχηματισμού κοκκίων στρες (Sheng & Xu, 2016).

Πίνακας 2: Μεταλλάξεις hAng που σχετίζονται με PD (Prehn & Jirström, 2020).

Variant	Ethnic origin
M(-24)I	German
V(-12)A	Italian
G(-8)D	Italian
P(-4)S	Italian, North American, German
H13R	German
K17I	North American, Dutch, Italian
D22V	Dutch
I46V	Italian, North American, Dutch, German
K54R	Dutch
R95Q	Dutch
R121C	Italian
K60E	North American
Q77P	North American
A(-1)P	North American

Μελέτες έχουν δείξει ότι αρκετοί ασθενείς με ALS, που φέρουν μεταλλάξεις στο γονίδιο της hAng, εμφάνισαν επίσης σημάδια της νόσου του Πάρκινσον (PD). Επιδημιολογικές μελέτες αποκάλυψαν ότι οι ασθενείς με ALS διατρέχουν αυξημένο κίνδυνο να αναπτύξουν PD, υποδηλώνοντας ότι υπάρχει γενετική σχέση μεταξύ των δύο ασθενειών (Chen et al., 2014). Στον Πίνακα 2 παρουσιάζεται μια λίστα των μεταλλάξεων της hAng που σχετίζονται με PD (Prehn & Jirström, 2020).

Η hAng μπορεί επίσης να έχει νευροπροστατευτική δράση και στο PD. Μελέτες αποκάλυψαν σημαντική μείωση

των επιπέδων της ενδογενούς hAng σε μοντέλα διαγονιδιακών ποντικών με PD. Ακόμη, η εξωγενής προσθήκη ανασυνδυασμένης hAng παρείχε προστασία έναντι του ντοπαμινεργικού νευρωνικού κυτταρικού θανάτου, ενώ ανέστειλε την ενεργοποίηση της κασπάσης-3, προάγοντας την κυτταρική επιβίωση, σε μοντέλα PD που προκαλούνται από νευροτοξίνες *in vitro* (Steidinger et al., 2011). Ακόμη, έχει δειχθεί πως τα επίπεδα της hAng στον ορό είναι αυξημένα στη νόσο ALS, αλλά όχι στη νόσο του Πάρκινσον (Van Es et al., 2014). Ωστόσο, τα σταθερά αυξημένα επίπεδα της hAng στον ορό ασθενών με ALS, ίσως να αντανakλούν έναν αντισταθμιστικό μηχανισμό των κινητικών νευρώνων ως απόκριση στο νευροεκφυλισμό, αναδεικνύοντας την hAng ως έναν ενδιαφέροντα θεραπευτικό στόχο (Van Es et al., 2014). Εν κατακλείδι, μια πρόσφατη μελέτη έδειξε πως οικογενείς περιπτώσεις της νόσου του Alzheimer (AD) φέρουν μεταλλάξεις της hAng. Συλλογικά, αυτά τα δεδομένα υποδεικνύουν ένα γενικό ρόλο της πρωτεΐνης αυτής ως προστατευτικό παράγοντα για τους νευρώνες του κεντρικού νευρικού συστήματος (Prehn & Jirström, 2020).

## hAng και άλλες ασθένειες

Η διαδικασία της αγγειογένεσης είναι πολύ συχνή στην καρδιαγγειακή νόσο (CVD), η οποία περιλαμβάνει τη στεφανιαία νόσο (CAD), το οξύ στεφανιαίο σύνδρομο (ACS), την καρδιακή ανεπάρκεια και άλλες ασθένειες. Καθώς η hAng είναι ένας ισχυρός επαγωγέας της αγγειογένεσης, τα επίπεδα της συγκέντρωσης της στην κυκλοφορία του αίματος, αντανakλούν το βαθμό στον οποίο συμβαίνουν διάφορες αγγειογενετικές διεργασίες, όπως η αύξηση της διαπερατότητας των αγγείων, ο πολλαπλασιασμός του ενδοθηλίου και η ωρίμανση των αγγείων. Συνεπώς, η hAng μπορεί να αποτελέσει έναν δείκτη εξέλιξης της αγγειακής νόσου (D. Yu et al., 2018).

Η hAng εμπλέκεται, επίσης σε διάφορες μη κακοήθεις παθολογικές καταστάσεις που εξαρτώνται από την αγγειογένεση, συμπεριλαμβανομένης της ενδομητρίωσης, της φλεγμονώδους νόσου του εντέρου (IBD), της ρευματοειδούς αρθρίτιδας, του διαβήτη κ.α. Σε αυτές τις διαταραχές, παρατηρείται επίσης αύξηση των επιπέδων έκφρασης της, ενώ μπορεί να συνεισφέρει σε τοπικές καταστάσεις παθολογικής αγγειογένεσης (Gao & Xu, 2008). Ωστόσο, η πλειοψηφία των σχετικών μελετών στις παραπάνω παθολογικές καταστάσεις επικεντρώθηκαν στη συγκέντρωση της hAng στον ορό, υποδηλώνοντας ότι η αλλαγή στα επίπεδα συγκέντρωσης της πρωτεΐνης αυτής στον ορό μπορεί να αποτελέσει δείκτη παρακολούθησης της εξέλιξης τους (Sheng & Xu, 2016).

### **1.2.6. Αναστολείς της δράσης της hAng**

Η hAng αποτελεί επικυρωμένο φαρμακευτικό στόχο για τον έλεγχο της αγγειογένεσης στον καρκίνο και άλλες ασθένειες (S. Li & Hu, 2010; Garnett & Raines, 2022). Μέχρι σήμερα έχουν διεξαχθεί πολλές μελέτες για την εύρεση κατάλληλων μορίων που μπορούν να δράσουν ως αναστολείς της βιολογικής δράσης της, ωστόσο κανένας από αυτούς δεν έχει χορηγηθεί στον άνθρωπο, για τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας του. Παλαιότερες μελέτες έχουν δείξει πως τα μονοκλωνικά αντισώματα έναντι της hAng, mAb 26-2F και mAb 36u παρουσιάζουν σημαντική αναστολή τόσο της ριβονουκλεολυτικής, όσο και της αγγειογενετικής δράσης της. Πιο συγκεκριμένα, τα δύο αντισώματα αναγνωρίζουν διαφορετικούς επίτοπους της hAng, με το πρώτο να προσδένεται στα αμινοξικά κατάλοιπα 38-41 και 89 (Chavali et al., 2003), ενώ το δεύτερο στα 58-73, αυξάνοντας σημαντικά το ποσοστό των ποντικών που δεν εμφανίζουν όγκο μετά τη χορήγηση τους (Fett et al., 1994; Olson et al., 1995). Παρόλα αυτά, τα mAbs παρουσιάζουν μειονεκτήματα ως εν δυνάμει φάρμακα, καθώς λόγω της αυξημένης συγκέντρωσης της hAng στο αγγειακό σύστημα ασθενών με καρκίνο, θα πρέπει να χορηγούνται μεγάλες δόσεις τους για την εξουδετέρωση της, γεγονός που μπορεί να εμφανίσει παρενέργειες. Η μείωση της ανοσογονικότητας των mAbs μπορεί πιθανόν να αντιμετωπιστεί με τη χρήση χμιαϊρικών ή ανθρωποποιημένων αντισωμάτων, όπως το ανασυνδυασμένο χμιαϊρικό



αντίσωμα ανθρώπου/ ποντικού έναντι της hAng, cAb 26–2F (Piccoli et al., 1998).

Επιπλέον, η ακτίνη, συνδέεται με την hAng και αναστέλλει τη δραστηριότητα της στην *in vivo* δοκιμασία αγγειογένεσης, στη χοριοαλλαντοϊκή μεμβράνη εμβρύου όρνιθας (CAM assay), ενώ αποτρέπει την ανάπτυξη όγκων σε περισσότερα από 60% των ζώων που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με αυτή. Πρέπει να σημειωθεί ότι η ακτίνη, σε αντίθεση με το mAb 26-2F, αλληλεπιδρά έντονα και με την hAng ποντικού *in vitro*, χωρίς να προκαλεί τοξικές παρενέργειες, όταν χορηγείται καθημερινά σε δόσεις > 50 φορές της μοριακής ποσότητας της hAng που βρίσκεται στην κυκλοφορία, σε ποντίκια (Vallee & Riordan, 1997).

Διάφορες μελέτες έχουν αναδείξει ως αναστολείς της hAng δύο πεπτίδια, τα οποία σχεδιάστηκαν με βάση το αντινοσηματικό μόριο RNA που αντιστοιχεί στα κατάλοιπα 58-70 της hAng, τα οποία αποτελούν τη θέση πρόσδεσης στον υποδοχέα της, είτε με κατεύθυνση 5'-3' (πεπτίδιο chANG), είτε με κατεύθυνση 3' -5' (πεπτίδιο chGNA). Τα πεπτίδια αυτά συνδέονται στην hAng με υψηλή συγγένεια ( $K_d=44$  nM) και αναστέλλουν την αλληλεπίδραση της με την ακτίνη. Ακόμη, αναστέλλουν την επαγόμενη, από την hAng, αγγειογένεση στην *in vivo* δοκιμασία αγγειογένεσης, στη χοριοαλλαντοϊκή μεμβράνη εμβρύου όρνιθας (CAM assay). Η αντι-αγγειογενετική δράση των πεπτιδίων είναι ειδική για την hAng, χωρίς να υπάρχει οποιαδήποτε επίδραση στην εμβρυϊκή αγγειογένεση ή στα προϋπάρχοντα αιμοφόρα αγγεία. Αναστέλλουν επίσης την αγγειογένεση που προκαλείται από την έκκριση της hAng από τα ανθρώπινα κύτταρα αδενοκαρκινώματος του προστάτη PC3 (Gho & Chae, 1997).

Κατά τη διάρκεια μελέτης για την αποσαφήνιση του μηχανισμού της πυρηνικής μετατόπισης της hAng, η νεομυκίνη, ένα εγκεκριμένο αμινογλυκοσιδικό αντιβιοτικό, βρέθηκε ότι εμποδίζει την πυρηνική μετατόπιση της hAng, αναστέλλοντας έτσι τον επαγόμενο από την hAng κυτταρικό πολλαπλασιασμό και αγγειογένεση. Ωστόσο, ο μηχανισμός με τον οποίο η νεομυκίνη εμποδίζει την πυρηνική μετατόπιση της hAng παραμένει άγνωστος. Η νεομυκίνη έχει αποδειχθεί ότι αναστέλλει την ανάπτυξη ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων του προστάτη σε ξενομοσχεύματα αθυμικών ποντικών (Hu, 1998). Παρόλα αυτά, δε μπορεί να εφαρμοστεί άμεσα ως θεραπευτικός παράγοντας του καρκίνου, λόγω της νεφροτοξικότητας και της ωτοτοξικότητας της. Το γεγονός αυτό δημιούργησε την ανάγκη για την εύρεση λιγότερο τοξικών αναλόγων και παραγώγων της. Ένα μη τοξικό παράγωγο της νεομυκίνης αποτελεί η νεαμίνη. Τόσο η νεαμίνη όσο και η νεομυκίνη εμποδίζουν αποτελεσματικά την πυρηνική μετατόπιση της hAng και αναστέλλουν την ανάπτυξη ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων του προστάτη σε ετερομοσχεύματα αθυμικών ποντικών, αναστέλλοντας τόσο τον πολλαπλασιασμό όσο και την αγγειογένεση τους (Kishimoto et al., 2014).

Επιπροσθέτως, η θεραπεία με νεαμίνη ανέστειλε αποτελεσματικά την

ανάπτυξη ετερομοσχευμάτων ανθρώπινων όγκων και των δυο κυτταρικών σειρών πλακώδους στοματικού καρκίνου HSC-2 και SAS σε αθυμικά ποντίκια, ενώ οδήγησε σε σημαντική μείωση της αγγειογένεσης του όγκου, συνοδευόμενη από μείωση της hAng και του πυρηνικού αντιγόνου πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων (PCNA), ειδικά στους όγκους HSC-2. Συνεπώς, η νεαμίνη αναστέλλει αποτελεσματικά, τόσο την εξέλιξη του καρκίνου του στόματος, μέσω της αναστολής της αγγειογένεσης του όγκου, όσο και τον πολλαπλασιασμό ορισμένων τύπων καρκινικών κυττάρων του στόματος (Kishimoto et al., 2014).

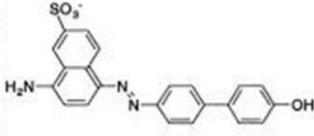
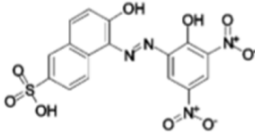
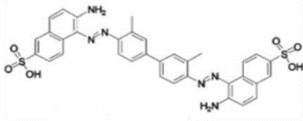
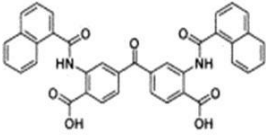
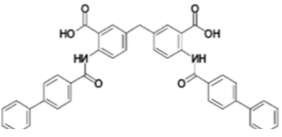
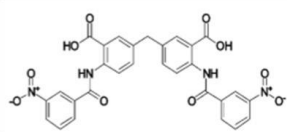
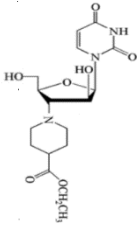
Όπως έχει ήδη αναφερθεί η ριβονουκλεολυτική δράση της hAng είναι απαραίτητη για την αγγειογενετική της δράση, γεγονός που έχει οδηγήσει τους ερευνητές στην αναζήτηση αναστολέων της ενζυμικής δράσης της πρωτεΐνης (Curran et al., 1993). Επιπλέον, το γεγονός ότι η αλληλουχία της hAng είναι 33% ταυτόσημη με της RNase A και το καταλυτικό κέντρο των δυο πρωτεϊνών είναι συντηρημένο (Shapiro et al., 1986), διευκολύνει το σχεδιασμό αναστολέων χρησιμοποιώντας ενώσεις που παρουσιάζουν ισχυρή αναστολή στην RNase A. Η στόχευση της ριβονουκλεολυτικής δράσης της hAng, και κατά συνέπεια της αγγειογενετικής, έχει πολλά πλεονεκτήματα ως στρατηγική αντικαρκινικής θεραπείας, καθώς οι δράσεις αυτές παρατηρούνται μόνο στα καρκινικά και στα πολλαπλασιαζόμενα ενδοθηλιακά κύτταρα, ενώ δεν απαιτούνται για την αύξηση και επιβίωση των φυσιολογικών κυττάρων του οργανισμού. Το γεγονός αυτό βοηθά στην επιλεκτική αναστολή του πολλαπλασιασμού και της ανάπτυξης των καρκινικών και των πολλαπλασιαζόμενων ενδοθηλιακών κυττάρων, με τις παρενέργειες τέτοιων αναστολέων να είναι μειωμένες (S. Li & Hu, 2010). Ακόμη, στοχεύοντας τη ριβονουκλεολυτική δράση της hAng, δε χρειάζεται να εξουδετερωθεί όλη η ποσότητα της πρωτεΐνης στο πλάσμα. Αυτό βοηθά στην παράκαμψη του εμποδίου που αποτελούν τα αυξημένα επίπεδα της hAng στο πλάσμα και καθιστούσαν απαγορευτική την ποσότητα των αναστολέων που χρειαζότανε για την εξουδετέρωση της. Παλαιότερες προσπάθειες για τον εντοπισμό μικρών αναστολέων που στοχεύουν στο καταλυτικό κέντρο της hAng επικεντρώθηκαν σε νουκλεοτίδια (Πίνακας 3) (Russo et al., 1999; Kumar et al., 2003; Tonan et al., 2003). Ωστόσο, οι σχετικά υψηλές τιμές της σταθεράς αναστολής,  $K_i$ , των νουκλεοτιδίων και τα εμπόδια στην κρυσταλλογραφική μελέτη των συμπλόκων των μορίων αυτών με την hAng, ενισχύουν την ανάγκη εύρεσης άλλων μικρομοριακών αναστολέων της ενζυμικής δράσης της (Kao et al., 2002).

Πίνακας 3: Αναστολή της ριβονουκλεολυτικής δράσης της hAng από νουκλεοτίδια (Russo et al., 1999; Kumar et al., 2003; Tonan et al., 2003).

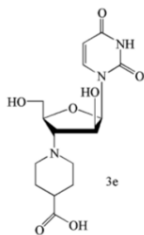
Νουκλεοτίδιο	$K_i$ , mM	Νουκλεοτίδιο	$K_i$ , mM	Νουκλεοτίδιο	$K_i$ , mM
2'-CMP	8.7 ± 1.1	3', 5'-ADP	1.3 ± 0.2	5'-ADP	1.2 ± 0.2
2'-UMP	13.1 ± 0.9	3'-AMP	13.8 ± 0.4	5'-ATP	0.8 ± 0.3
3'-CMP	13.0 ± 1.0	2'-AMP	2.7 ± 0.2	ppA <sup>p</sup>	0.15 ± 0.01
5'-AMP	7.2 ± 0.4	2', 5'-ADP	0.40 ± 0.05	Ap <sub>4</sub> A	0.186 ± 0.012
NADP <sup>+</sup>	0.387 ± 0.036	ATP	0.8	Ap <sub>5</sub> A	0.105 ± 0.006
NADPH	0.16 ± 0.014	Ap <sub>3</sub> A	1.02 ± 0.14	dUppA-2'-p	0.15

Πειράματα ταχείας σάρωσης υψηλής απόδοσης (high throughput screening) από το Εθνικό Ινστιτούτο Καρκίνου των Η.Π.Α. (NCI), ανέδειξαν τις ενώσεις: 8-amino-5-(4'-hydroxybiphenyl-4-ylazo) naphthalene-2-sulfonate (N-65828, NCI), με  $K_i$  81  $\mu$ M και την 4,4'-dicarboxy-3,3'-bis(naphthylamido)-diphenylmethanone (C-181431, NCI), με  $K_i$  41  $\mu$ M, ως δύο πολύ ισχυρούς αναστολείς *in vitro* που στοχεύουν το καταλυτικό κέντρο της hAng, ανάμεσα σε 18.310 ενώσεις. Τοπική θεραπεία με χαμηλές δόσεις της ένωσης N-65828, καθυστέρησε σημαντικά ή απέτρεψε το σχηματισμό όγκων σε δύο ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές (PC3 και HT29), σε αθυμικά ποντίκια (Kao et al., 2002). Με την εύρεση των παραπάνω μικρομοριακών αναστολέων πραγματοποιήθηκαν περεταίρω υπολογιστικές μελέτες πρόσδεσης (docking), στοχεύοντας στην εύρεση ενώσεων ανάλογων των παραπάνω, που θα συνδέονται ισχυρότερα στην hAng. Τα ανάλογα της ένωσης N-65828, NCS-65820, και benzorurpurin B, έχουν  $K_i$  25  $\mu$ M και 5  $\mu$ M, αντίστοιχα. Επίσης, τα ανάλογα της ένωσης C-181431, C-473872 και C-467929, έχουν τιμές  $K_i$  20  $\mu$ M και 24  $\mu$ M, αντίστοιχα. Οι ενώσεις C-473872 και C-467929 συνδέονται ισχυρότερα στην hAng από ότι στην RNase A, αποτελώντας τους πρώτους μικρομοριακούς αναστολείς που παρουσιάζουν τέτοια εκλεκτικότητα (Jenkins & Shapiro, 2003). Ακόμη, μελέτη ανέδειξε τα αμινο-νουκλεοτίδια ως υποψήφιους αναστολείς τόσο της RNase A, όσο και της hAng. Ιδιαίτερα τα μόρια 3'-N-αλκυλάμινο-3'-δεοξυ-*ara*-ουριδίνες, αναστέλλουν την αγγειογενετική δραστηριότητα της hAng στην *in vivo* δοκιμασία αγγειογένεσης, στη χοριοαλλαντοϊκή μεμβράνη εμβρύου όρνιθας (CAM assay) (Maiti et al., 2006). Στον Πίνακα 4 παρουσιάζονται οι χημικές δομές των αναστολέων μικρού μοριακού βάρους της hAng από διάφορες μελέτες.

Πίνακας 4: Χημικές δομές αναστολέων μικρού μοριακού βάρους της hAng.

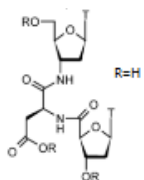
Χημική Ένωση	Χημική Δομή	Ki [μM]
N-65828		81 (Kao et al., 2002)
NCS-65820		25 (Kao et al., 2002)
Benzopurpurin B		5 (Jenkins & Shapiro, 2003)
C-181431		41 (Jenkins & Shapiro, 2003)
C-473872		20 (Jenkins & Shapiro, 2003)
C-467929		24 (Jenkins & Shapiro, 2003).
3d		(Maiti et al., 2006)

3e



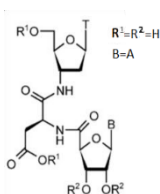
(Maiti et al.,  
2006)

21



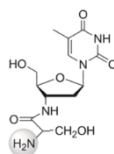
729± 2 (Debnath  
et al., 2012)

23



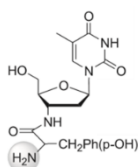
670± 2 (Debnath  
et al., 2012)

2



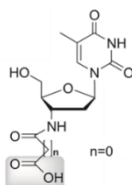
427 ± 7 (Debnath et  
al., 2014)

3



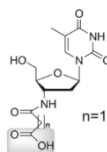
1251 ± 4 (Debnath  
et al., 2014)

5



775 ± 6 (Debnath et  
al., 2014)

6



1114 ± 3 (Debnath et  
al., 2014)

Μία πρόσφατη μελέτη ανέδειξε την αναστολή της hAng από το θειικό αμμώνιο. Η ανασταλτική ισχύς του θειικού αμμωνίου για την πρωτεΐνη αυτή ( $IC_{50} = 123,5 \pm 14,9$  mM) δε διέφερε πολύ από τις αντίστοιχες τιμές για την RNase A ( $119,0 \pm 6,5$  mM) και την RNase 2 ( $95,7 \pm 9,3$  mM). Παρόλα αυτά, η ανάλυση της κρυσταλλικής δομής με ακτίνες Χ της hAng σε σύμπλοκο με το θειικό αμμώνιο δείχνει έναν πολύ διαφορετικό μηχανισμό αναστολής. Ενώ το θειικό αμμώνιο αναστέλλει τη ριβονουκλεολυτική δράση της RNase A και της RNase 2, μέσω της πρόσδεσής του στο καταλυτικό κέντρο αυτών των ενζύμων, τα θειικά ανιόντα προσδένονται μόνο στα περιφερειακά κέντρα σύνδεσης φωσφορικών ομάδων του υποστρώματος RNA της hAng κι όχι στο ενεργό της κέντρο, υποδηλώνοντας ένα διαφορετικό μηχανισμό ενεργοποίησης της hAng, ο οποίος μπορεί να ενεργοποιηθεί από τη σύνδεση της με το RNA υπόστρωμα της (Chatzileontiadiou et al., 2016).

Πρόσφατα ανακαλύφθηκε μία ένωση με διπλή δράση έναντι της hAng, που μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ένωση οδηγός. Πιο συγκεκριμένα, μελέτες NMR σε συνδυασμό με μελέτες πρόσδεσης (Docking) και Μοριακής Δυναμικής (Molecular Dynamics, MD), αποκάλυψαν ένα διπλό τρόπο πρόσδεσης της ένωσης 4a, στην hAng. Η ένωση αυτή ανήκει σε μια σειρά τριαζολο-νουκλεοζιτών πυριμιδίνης, που αναστέλλουν ισχυρά την αγγειογενετική δράση της hAng *in vivo*. Αυτή είναι η πρώτη φορά που ένας νουκλεοζιτικός αναστολέας αναφέρεται ότι αναστέλλει πλήρως την αγγειογενετική δραστηριότητα της hAng *in vivo*, ασκώντας διπλή ανασταλτική δράση σε αυτή, τόσο με τον αποκλεισμό της εισόδου της hAng στο κύτταρο (πρόσδεση αναστολέα 4a στη θέση πρόσδεσης του υποδοχέα της), όσο και της ριβονουκλεολυτικής δράσης (πρόσδεση αναστολέα 4a στο ενεργό της κέντρο) (Chatzileontiadiou et al., 2018).

Αναστολείς της hAng, όπως ο 4a, που παρουσιάζουν διπλή δράση παρεμποδίζοντας την ενζυμική της δράση, αλλά κυρίως τη πρόσδεση της στον κυτταρικό υποδοχέα, έχουν το πλεονέκτημα του αποκλεισμού της βιολογικής δράσης της hAng, ανεξάρτητα της αιτίας, καθώς αποτρέπουν οποιαδήποτε αλληλεπίδραση αυτής με τα κύτταρα-στόχους της. Ακόμη, όπως έχει ήδη αναφερθεί, δεδομένου ότι τα φυσιολογικά κύτταρα δεν απαιτούν την hAng για την ανάπτυξη και την επιβίωσή τους, η είσοδος της hAng στο εσωτερικό των κυττάρων και η επακόλουθη πυρηνική της μετατόπιση, συμβαίνει μόνο σε καρκινικά κύτταρα και πολλαπλασιαζόμενα ενδοθηλιακά κύτταρα. Αποκλείοντας τη θέση πρόσδεσης της hAng στον υποδοχέα των κυττάρων, θα ανασταλεί επιλεκτικά μόνο η ανάπτυξη και ο πολλαπλασιασμός των καρκινικών και των πολλαπλασιαζόμενων ενδοθηλιακών κυττάρων, παρουσιάζοντας με αυτό τον τρόπο λιγότερες παρενέργειες και μικρότερη τοξικότητα (Chatzileontiadiou et al., 2018).

Νέες μελέτες υποστηρίζουν την ενίσχυση της αναστολής της ριβονουκλεολυτικής δράσης hAng από νανοσωματίδια χρυσού καλυμμένα με

πολυφαινόλη (ECG-AuNPs και EGCG-AuNPs), γεγονός που θα μπορούσε να βρει εφαρμογές στην ανάπτυξη αντι-αγγειογενετικών ενώσεων (Panda et al., 2021). Ακόμη, κυτταρικές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε καρκινικά κύτταρα προστάτη (PC-3), έδειξαν ότι η οξαλιπλατίνη, μια αντινεοπλασματική δραστική ουσία που ανήκει σε μια νέα κατηγορία παραγώγων πλατίνης, αναστέλλει την επίδραση της hAng στον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση αυτών των κυττάρων, αναδεικνύοντας την, ως πιθανό στόχο της οξαλιπλατίνης. Το γεγονός αυτό οδηγεί σε νέες προσεγγίσεις στη συνδυασμένη αντικαρκινική και αντι-αγγειογενετική θεραπεία (Marzo et al., 2022).

### 1.2.7. Αλληλεπιδράσεις της hAng με άλλες πρωτεΐνες

Οι ακριβείς μηχανισμοί των λειτουργιών της hAng παραμένουν ασαφείς. Μέχρι σήμερα έχουν αναφερθεί αρκετές πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με την hAng (Πίνακας 5), αλλά η διαδικασία και η ρύθμιση της υποκυτταρικής της μετατόπισης

*Πίνακας 5: Αλληλεπιδράσεις της hAng με άλλες πρωτεΐνες (Sheng & Xu, 2016).*

No.	Interactor (gene symbol)	Experimental evidence
1	RNH1	Co-crystal structure
2	TP53	Co-IP
3	TDGF1	Two-hybrid
4	PTEN	Two-hybrid
5	ATP6AP1	Two-hybrid
6	MDM2	Co-IP
7	ACTN2	Two-hybrid, GTS pull-down, FRET
8	FST	Two-hybrid, GTS pull-down, FRET
9	MYH9	Co-IP
10	ACTN4	Co-IP
11	ACTB	Co-IP
12	FHL3	Two-hybrid, GTS pull-down, Co-IP
13	ANXA2	Co-IP
14	FBLN1	Pull-down, FRET
15	ACTA1	Affinity Capture Western
16	HIST3H3	Affinity Capture Western
17	PLSCR1	Two-hybrid, GTS pull-down, FRET
18	HSF1	Pull-down
19	SDC4	<i>In situ</i> proximity ligation assay

παραμένουν άγνωστες. Με βάση τη διαθέσιμη βιβλιογραφία, οι αλληλεπιδράσεις της hAng με άλλες πρωτεΐνες μπορούν να ταξινομηθούν σε διαφορετικές ομάδες ανάλογα με τη βιολογική λειτουργία που συμμετέχουν. Στην κυτταρική μετανάστευση, προσκόλληση και εισβολή, η hAng αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες του συστήματος ενεργοποίησης του πλασμινογόνου και πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού, ενώ στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό με τη φολλιστατίνη, τη φωσφολιπιδική σκραμπλάση (PLSCR1), την ιστόνη H3, τον RI και τους δυνητικούς υποδοχείς της hAng (την πρωτεΐνη 170 kDa στα ενδοθηλιακά κύτταρα, τη συνδεκάνη 4 στα αστροκύτταρα και την πλεξίνη β). Στην κυτταρική απόπτωση, η hAng αλληλεπιδρά με την p53, την πρωτεΐνη MDM2, το συντελεστή θερμικού σοκ 1 (HSF1), και τον RI (Sheng & Xu, 2016).

Η αναγνώριση και η ταυτοποίηση των πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με την hAng μπορεί να βοηθήσει στην καλύτερη κατανόηση των βιολογικών της ρόλων, καθώς και των μηχανισμών δράσης της. Τέλος, πρόσφατη μελέτη του εργαστηρίου μας,

ανέδειξε το πυρηνικό αντιγόνο πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων ή αλλιώς PCNA, ως μια αλληλοεπιδρώσα πρωτεΐνη της hAng στο κυτταρόπλασμα της ανθρώπινης υβριδικής κυτταρικής σειράς ενδοθηλιακών και καρκινικών κυττάρων πνεύμονα (Chatzileontiadiou et al., 2017).

### **1.3. Πυρηνικό αντιγόνο πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων (PCNA)**

Το PCNA είναι μια εξελικτικά καλά συντηρημένη πρωτεΐνη που βρίσκεται σε όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς από τη ζύμη έως τον άνθρωπο, καθώς και στα Αρχαία (Stoimenon & Helleday, 2009). Υπάρχει μόνο ένα αντίγραφο του γονιδίου του PCNA στο ανθρώπινο γονιδίωμα, το οποίο αποτελείται από έξι εξόνια (Travali et al., 1989). Πρόκειται για μία όξινη πρωτεΐνη, με την τιμή του ισοηλεκτρικού της σημείου, pI, να ισούται με 4.57, ενώ αποτελείται από 261 αμινοξέα με θεωρητική μοριακή μάζα 29,26 kDa. Ανήκει στην οικογένεια των πρωτεϊνών του ολισθαίνοντος σφιγκτήρα του DNA (DNA sliding clamp) και αποτελεί έναν ρυθμιστή του κυτταρικού κύκλου (Zhu et al., 2014).

Οι ολισθαίνοντες σφιγκτήρες είναι πρωτεΐνες που περικλείουν το δίκλωνο DNA και βρίσκονται σε όλους τους τομείς της ζωής. Λειτουργούν ως πλατφόρμες για τη στρατολόγηση και τη ρύθμιση διαφόρων ενζύμων που συμμετέχουν στην αντιγραφή και επιδιόρθωση του DNA, όπως οι πολυμεράσες, οι νουκλεάσες και οι λιγάσες (Moldovan et al., 2007).

Το PCNA λειτουργεί ως βοηθητική πρωτεΐνη της πολυμεράσης- $\delta$  του DNA, ώστε αυτή να προσδεθεί στο DNA και να πραγματοποιηθεί η αντιγραφή του (Zhu et al., 2014). Ακόμη, παίζει σημαντικό ρόλο στον μεταβολισμό των νουκλεϊκών οξέων, είναι απαραίτητο για την αντιγραφή και την επιδιόρθωση βλαβών του DNA, συμμετέχει στη συγκρότηση της χρωματίνης, στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου, στην απόπτωση και εμπλέκεται στη μεταγραφή του RNA (Kelman, 1997). Το PCNA εμφανίζει μια τριπλή λειτουργία στη ζωή και τον θάνατο των κυττάρων. Όταν δεν «ασχολείται» με την αντιγραφή του DNA, «συλλαμβάνει», συχνότερα υπό τον έλεγχο του μορίου P53, τα κύτταρα κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου και επιδιορθώνει τυχόν βλάβες του DNA. Ενώ, όταν η επιδιόρθωση δεν είναι δυνατή, λόγω απουσίας ή χαμηλών επιπέδων λειτουργικού PCNA, μπορεί να οδηγήσει τα κύτταρα σε απόπτωση (Paunesku et al., 2001).

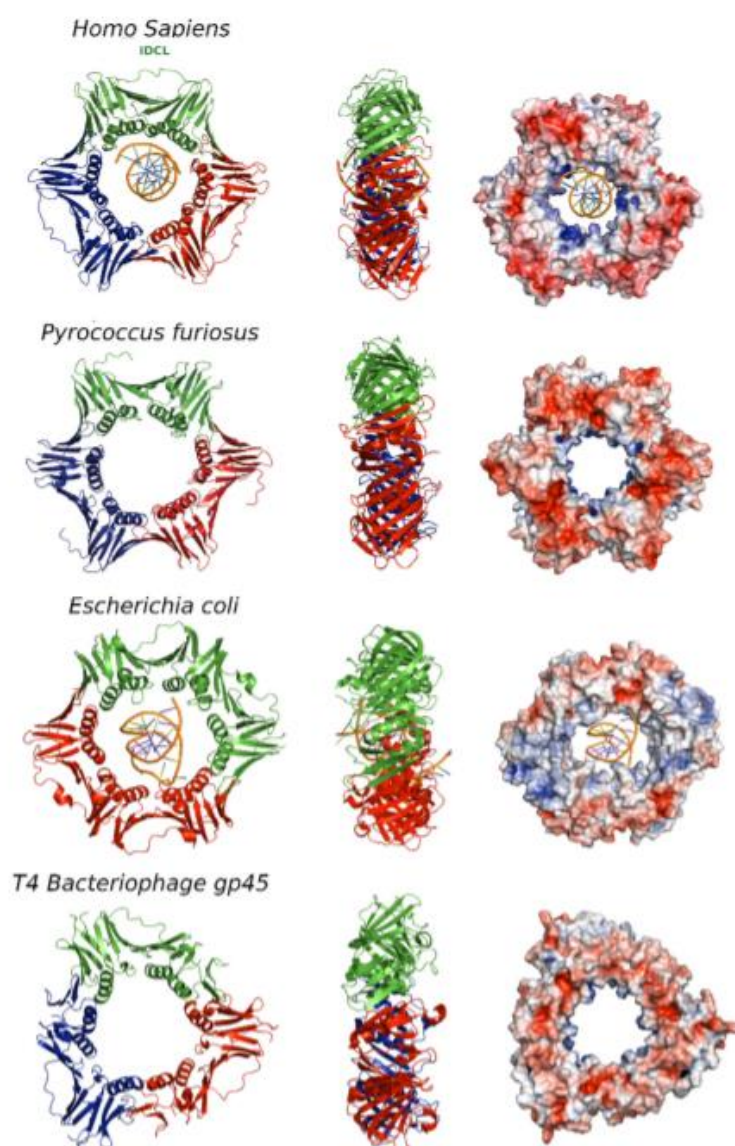
#### **1.3.1. Δομή του PCNA**

Η στοιχίση των αμινοξικών αλληλουχιών του PCNA από διαφορετικά είδη δείχνει ότι παρουσιάζουν σημαντική ομολογία και εξελικτική συντήρηση. Ακόμη πιο εντυπωσιακή είναι η ομοιότητα στη μοριακή δομή τους (Stoimenon & Helleday, 2009). Οι ολισθαίνοντες σφιγκτήρες είναι λειτουργικά και δομικά παρόμοιοι σε όλους



τους ζωντανούς οργανισμούς, συμπεριλαμβανομένων και ορισμένων ιών, και μπορούν να συναρμολογηθούν σε ομοδιμερείς, ομοτριμερείς ή ετεροτριμερείς δακτυλίους (Krishna et al., 1994; González-Magaña & Blanco, 2020).

Όλοι οι ολισθαίνοντες σφιγκτήρες των βακτηρίων, των αρχαίων και των ευκαρυωτών, παρά τη χαμηλή ομοιότητα στην αλληλουχία τους, υιοθετούν μια τρισδιάστατη δομή ψευδο-εξαγωνικής συμμετρίας που αποτελείται από ένα εξωτερικό στρώμα έξι β-πτυχωτών φύλλων και ένα εσωτερικό στρώμα δώδεκα α-ελίκων (Mailand et al., 2013 ; González-Magaña & Blanco, 2020) (Εικόνα 12). Ωστόσο, υπάρχουν διαφορές στον αριθμό των επικρατειών που περιλαμβάνουν κάθε υπομονάδα, καθώς και του τρόπου με τον οποίο συγκρατούνται οι υπομονάδες για να σχηματίσουν το δακτύλιο (Dieckman et al., 2012b).



Εικόνα 12: DNA ολισθαίνοντες σφιγκτήρες από διαφορετικούς οργανισμούς. Παρουσιάζονται

οι κρυσταλλικές δομές: του ανθρώπινου PCNA συνδεδεμένου με DNA (PDB: 6GIS), του PCNA του *Pyrococcus furiosus* (PDB:1GE8), του PCNA του *Escherichia coli* συνδεδεμένου με DNA (PDB: 3BEP) και του βακτηριοφάγου T4 (PDB: 1CZD) (González-Magaña & Blanco, 2020).

Η κρυσταλλική δομή του ευκαρυωτικού PCNA προσδιορίστηκε για πρώτη φορά το 1994, από τον Krishna και τους συνεργάτες του. Το PCNA αποτελείται από τρία πανομοιότυπα μονομερή, τα οποία σχηματίζουν ένα ομοτριμερές με σπειροειδές σχήμα και εξαγωνική συμμετρία (Εικόνα 13). Η κρυσταλλική δομή του ευκαρυωτικού PCNA δείχνει ότι κάθε υπομονάδα του αποτελείται από δύο ανεξάρτητες και παρόμοια αναδιπλωμένες επικράτειες (Krishna et al., 1994).

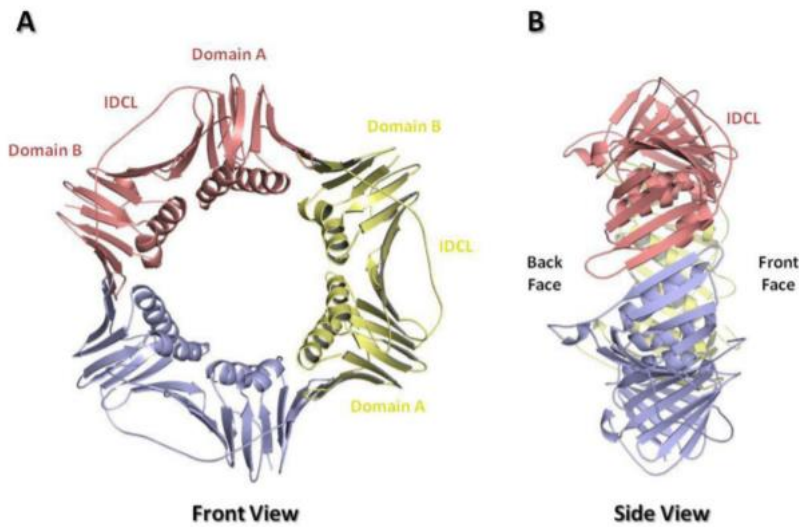
Η αμινοτελική περιοχή (αμινοξικά κατάλοιπα 1-117) αναφέρεται ως επικράτεια A και η καρβοξυτελική περιοχή (αμινοξικά κατάλοιπα 135-258) αναφέρεται ως επικράτεια B. Αυτές οι δύο ανεξάρτητες επικράτειες συγκρατούνται μαζί με ένα εκτεταμένο β-πτυχωτό φύλλο κατά μήκος του διαστήματος μεταξύ των ορίων των επικρατειών, σε κάθε υπομονάδα. Επιπλέον, οι δύο επικράτειες συνδέονται μέσω ενός μακριού, εύκαμπτου βρόχου (αμινοξικά κατάλοιπα 118-134) που ονομάζεται διεπικρατειακός βρόχος σύνδεσης (Interdomain Connector Loop, IDCL) (Boehm et al., 2016).

Ο βρόχος IDCL συμβάλλει σημαντικά στη βιολογική δραστηριότητα του PCNA, ενώ είναι απαραίτητος για τη σύνδεση της αμινοτελικής και της καρβοξυτελικής περιοχής κάθε μονομερούς, αν και αυτό δεν είναι η μοναδική του λειτουργία. Μελέτες έδειξαν ότι ο βρόχος IDCL είναι μια σημαντική θέση πρόσδεσης για διαφορετικές αλληλεπιδρώσες πρωτεΐνες του PCNA, όπως η DNA pol δ, η p21, η DNA λιγάση 1 (DNA lig1), η ενδονουκλεάση Fen1 κ.α. (Strzalka & Ziemienowicz, 2011). Το PCNA περιέχει και μια αλληλουχία πυρηνικού εντοπισμού, NLS, εντός του αμινοξικού τμήματος 101-120, ενώ η πυρηνική του εισαγωγή φαίνεται να πραγματοποιείται με τη μεσολάβηση της ιμπορτίνης β, καθώς το PCNA συνδέεται με την ιμπορτίνη β, αλλά όχι με την ιμπορτίνη α (Naryzhny & Lee, 2010).

Οι τρεις υπομονάδες του PCNA συναρμολογούνται με διάταξη/προσανατολισμό από την κορυφή προς την ουρά (head-to-tail manner), με την επικράτεια A, μιας υπομονάδας, να αλληλεπιδρά με την επικράτεια B μιας γειτονικής υπομονάδας. Αυτή η αλληλεπίδραση σταθεροποιείται μέσω ενός εκτεταμένου β-πτυχωτού φύλλου που αποτελείται από β-ελάσματα της επικράτειας A, μιας υπομονάδας και β-ελάσματα της επικράτειας B και μιας γειτονικής υπομονάδας (Dieckman et al., 2012b).

Ο δακτύλιος του PCNA έχει διάμετρο περίπου 80 Å, ενώ η κεντρική κοιλότητα/οπή στο δακτύλιο έχει διάμετρο περίπου 34 Å. Η εξωτερική επιφάνεια του δακτυλίου του PCNA είναι ένα κυκλικό «κολάρο» των προαναφερθέντων έξι β-φύλλων. Η εσωτερική επιφάνεια του δακτυλίου του PCNA είναι ένα σύνολο από

δώδεκα  $\alpha$ -έλικες, δύο από κάθε επικράτεια (Kelman, 1997).



Εικόνα 13. Διάγραμμα του τριμερούς PCNA (PDB ID: 1PLQ) που φαίνεται από το μπροστινό μέρος (A) και το πλάι (B), με τις επιμέρους υπομονάδες του PCNA χρωματισμένες με κόκκινο, κίτρινο και μπλε. Υποδεικνύεται ο βρόχος IDCL (Dieckman et al., 2012b).

Σε όλα τα είδη που μελετήθηκαν, το PCNA είναι μια όξινη πρωτεΐνη με χαμηλό pI. Η κατανομή του ηλεκτρικού φορτίου στο PCNA είναι ασύμμετρη. Υπάρχει ένα ισχυρό αρνητικό ηλεκτροστατικό δυναμικό στην εξωτερική του επιφάνεια και ένα καθαρό θετικό ηλεκτροστατικό δυναμικό στην κεντρική του κοιλότητα. Το συνολικό ηλεκτροστατικό δυναμικό του PCNA, όμως, είναι αρνητικό. Η εσωτερική κοιλότητα είναι θετικά φορτισμένη λόγω της παρουσίας αμινοξικών καταλοίπων λυσίνης και αργινίνης σε αυτές τις έλικες. Αυτά τα θετικά φορτία σταθεροποιούν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ του PCNA και του DNA και διευκολύνουν την ολίσθηση του PCNA στο αρνητικά φορτισμένο DNA (Kelman, 1997). Η μοναδική αυτή δομή του ομοτριμερούς επιτρέπει στο PCNA να περικυκλώνει το δίκλωνο DNA και να ολισθαίνει ελεύθερα κατά μήκος του, λόγω των  $\alpha$ -ελίκων του που είναι πλούσιες σε βασικά αμινοξικά κατάλοιπα και επενδύουν την εσωτερική του κοιλότητα (Witko-Sarsat & Ohayon, 2016). Ακόμη, η αρνητικά φορτισμένη επιφάνεια μπορεί να αποτρέπει τη μη ειδική αλληλεπίδραση με το DNA (Kelman, 1997).

Το PCNA έχει δύο ευδιάκριτες όψεις, οι οποίες αναφέρονται ως η μπροστινή και η πίσω όψη. Η μπροστινή όψη δείχνει προς την κατεύθυνση της σύνθεσης του DNA και περιέχει το καρβοξυτελικό άκρο κάθε μονομερούς καθώς και το βρόχο σύνδεσης επικρατειών IDCL, ενώ εμπλέκεται σε πολλές πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις. Η πλειοψηφία των πρωτεϊνών αλληλεπιδρούν με το PCNA μέσα σε μια υδρόφοβη κοιλότητα στη μπροστινή όψη του PCNA, κοντά στο βρόχο IDCL (Hishiki

et al., 2009, Boehm et al., 2016). Η δέσμευση στην μπροστινή όψη επιτρέπει σε αυτές τις αλληλεπιδρώσες πρωτεΐνες να έχουν πρόσβαση στο άκρο του εκκινητή του αντιγραφόμενου DNA. Η πίσω όψη του PCNA, αντίθετα, δείχνει μακριά από την κατεύθυνση της σύνθεσης του DNA, ενώ περιέχει αρκετούς εκτεταμένους βρόχους και μια λυσίνη-164, που αποτελεί θέση ουβικιτινυλίωσης και σουμοϋλίωσης (Hoege et al., 2002).

Ο ρόλος της πίσω όψης του PCNA είναι προς το παρόν λιγότερο σαφής και θεωρείται ότι ίσως αποτελεί τοποθεσία μετα-μεταφραστικής τροποποίησης του PCNA. Έχει προταθεί ότι αυτές οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις δεσμεύουν συγκεκριμένες πρωτεΐνες και τις κρατούν στην πίσω όψη του PCNA μέχρι να χρειαστούν (Dieckman et al., 2012; Boehm et al., 2016). Το PCNA υπόκειται σε μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις που επηρεάζουν τη λειτουργία του, όπως σε ακετυλίωση, μεθυλίωση, ουβικιτινυλίωση, σουμοϋλίωση, σιαλυλίωση και φωσφορυλίωση (Zhu et al., 2014).

### **1.3.2. Μηχανισμοί λειτουργίας του PCNA**

#### **1.3.2.1. Ο ρόλος του PCNA στην αντιγραφή και στην επιδιόρθωση βλαβών του DNA**

Η αντιγραφή του DNA είναι μια βασική κυτταρική διαδικασία που επιτρέπει το διπλασιασμό του γονιδιωματικού υλικού, γεγονός απαραίτητο για την κυτταρική διαίρεση. Εξίσου απαραίτητη είναι η επιδιόρθωση του DNA, η οποία διατηρεί τη γονιδιωματική ακεραιότητα με την επιδιόρθωση του κατεστραμμένου DNA. Αυτές οι διαδικασίες συνεπάγονται τη δυναμική δέσμευση τόσο των παραγόντων αντιγραφής του DNA για την εξασφάλιση της γρήγορης και πιστής αντιγραφής του, όσο και των παραγόντων επιδιόρθωσης του DNA για την επιδιόρθωση με ακρίβεια και αποτελεσματικότητα του κατεστραμμένου DNA. Οι δυναμικές αλληλεπιδράσεις των πρωτεϊνών που επιτελούν τις παραπάνω διεργασίες απαιτούν συχνά έναν κύριο συντονιστή, υπεύθυνο για την έγκαιρη αλληλεπίδραση και την ακριβή πρόσληψη τους στο μόριο DNA. Το πυρηνικό αντιγόνο πολλαπλασιαζόμενου κυττάρου (PCNA) παίζει ακριβώς αυτόν τον ρόλο τόσο στην αντιγραφή του DNA, όσο και σε ένα υποσύνολο μονοπατιών επιδιόρθωσης του DNA (Slade, 2018).

#### Ο ρόλος του PCNA στην αντιγραφή του DNA

Η καλύτερα μελετημένη και πιο κατανοητή λειτουργία του PCNA, μέχρι σήμερα, είναι αυτή του ρόλου του στην αντιγραφή του DNA. Εκτεταμένες μελέτες δείχνουν ότι το PCNA είναι ένας βοηθητικός παράγοντας για τις DNA πολυμεράσες  $\delta$  και  $\epsilon$  (Pol  $\delta$  και Pol  $\epsilon$ ), αυξάνοντας την ικανότητα τους να καταλύουν διαδοχικές αντιδράσεις χωρίς να απελευθερώνουν το υπόστρωμα τους (processivity), μέσω της πρόσδεσης και της ολίσθησης τους κατά μήκος της διπλής έλικας του DNA. Ιδιαίτερα

σημαντικός είναι ο ρόλος του PCNA στη σύνθεση του ασυνεχούς κλώνου, ενεργώντας ως πλατφόρμα, όπου η Pol δ, η ενδονουκλεάση κρημονού 1 (FEN1) και η DNA λιγάση I (LIG1) προσδένονται για να συνθέσουν, να επεξεργαστούν και να ενώσουν τα τμήματα Okazaki (Slade, 2018).

Πιο αναλυτικά, η αντιγραφή του DNA ξεκινά τόσο στο συνεχή όσο και στον ασυνεχή κλώνο από το σύμπλοκο DNA πολυμεράσης α (pol α)/πριμάσης που συνθέτει μικρούς εκκινητές RNA. Αυτοί οι εκκινητές στη συνέχεια επιμηκύνονται από την DNA pol α. Στο επόμενο βήμα, ο αρχικός εκκινητής RNA-DNA αναγνωρίζεται από το συντηρημένο σύμπλοκο RFC (Furukawa et al., 2003) που δεσμεύεται στο 3' άκρο, οδηγώντας έτσι στην αποδέσμευση του συμπλόκου της DNA pol α/ πριμάσης. Το σύμπλοκο RFC δρα ως, εξαρτώμενη από το DNA, ATPάση και παίζει ρόλο στην αντιγραφή του DNA, φορτώνοντας το τριμερές μόριο PCNA στο DNA, στο τέλος του εκκινητή RNA-DNA (Strzalka & Ziemienowicz, 2011).

Το RFC είναι ένα ετεροπενταμερές σύμπλεγμα πέντε βασικών πρωτεϊνών παρόμοιας δομής (ATPάσες τύπου AAA+), σε σχήμα τόξου και συνδέεται με το PCNA, όπως ένα βιδωτό καπάκι με ένα μπουκάλι. Το σύμπλοκο RFC μοιάζει με μοριακό συνοδό και αποτελείται από τις υπομονάδες Rfc1, Rfc2, Rfc3, Rfc4 και Rfc5 (Majka and Burgers, 2004; Moldovan et al., 2007), ενώ αναγνωρίζει το 3' άκρο του εκκινητή του DNA εκμαγείου και φορτώνει το PCNA σε αυτή τη θέση. Για το σχηματισμό ενός σταθερού συμπλόκου PCNA-RFC και για τη φόρτωσή του πρώτου στο DNA απαιτείται δέσμευση ATP (Moldovan et al., 2007). Η δέσμευση του DNA, με τη σειρά της, ενεργοποιεί την υδρόλυση ATP, η οποία κατ' επέκταση οδηγεί στην αποσύνδεσή του δεσμευμένου στο DNA παράγοντα RFC (Gomes & Burgers, 2001).

Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι μόνο η παρουσία του PCNA στη διχάλα αντιγραφής επιτρέπει την ανταλλαγή της DNA Pol α με τις άλλες πολυμεράσες που συνεχίζουν τη σύνθεση DNA (Εικόνα 14). Η σύνδεση του PCNA στο 3' άκρο του εκκινητή αποτρέπει την επαναφόρτωση της DNA Pol α και λειτουργεί ως σήμα στρατολόγησης για τις πολυμεράσες DNA Pol δ/ε (Maga & Hübscher, 2003).

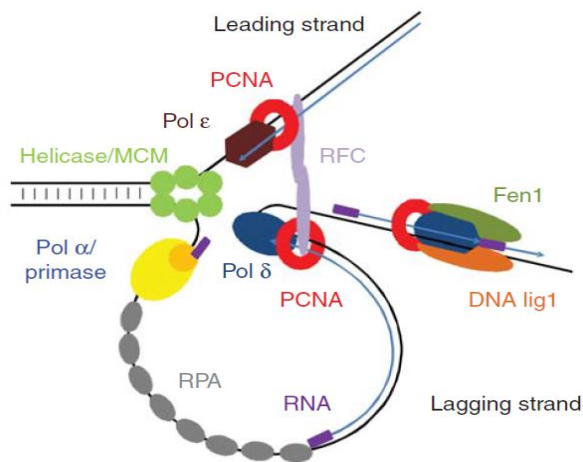
Ο δακτύλιος του PCNA, ο οποίος περιβάλλει το DNA, συνδέει τις πολυμεράσες σταθερά στο DNA, καθιστώντας τον με αυτόν τον τρόπο ως απαραίτητο συμπαράγοντα για τη σύνθεση του DNA. Πρώιμες μελέτες *in vitro* έδειξαν ότι η παρουσία του PCNA αυξάνει την ικανότητα των πολυμερασών DNA να προσθέτουν νουκλεοτίδια από δεκάδες σε χιλιάδες (Moldovan et al., 2007). Μετά τη φόρτωση πολυμερασών στο DNA, το σύμπλοκο DNA Pol δ/ε-PCNA κινείται κατά μήκος του κλώνου του εκμαγείου με τη σύνθεση του DNA να λαμβάνει χώρα ταυτόχρονα τόσο στο συνεχή όσο και στον ασυνεχή κλώνο, με συνεχή και ασυνεχή τρόπο, αντίστοιχα. Στο συνεχή κλώνο, ο εκκινητής επεκτείνεται από την DNA Pol ε, ενώ η DNA Pol δ συνθέτει κάθε τμήμα Okazaki στον ασυνεχή κλώνο του DNA (Burgers, 2009).

Επίσης, επειδή το PCNA στερείται ενζυμικής δράσης, είναι ιδανικό για να λειτουργεί επιπλέον ως μια κινούμενη πλατφόρμα για πρωτεϊνικούς παράγοντες που δρουν ταυτόχρονα με την αντιγραφή του DNA (Moldovan et al., 2007). Το PCNA στρατολογεί κι άλλους παράγοντες στην αντιγραφική διχάλα, που συμμετέχουν στην επιδιόρθωση του DNA, στην αναδιαμόρφωση της χρωματίνης και στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου (Slade, 2018). Δεν προσδένονται όλες οι πρωτεΐνες ταυτόχρονα στο PCNA και η εναλλαγή πρόσδεσης των πρωτεϊνών σε αυτόν μπορεί να ενεργοποιηθεί μέσω διαφορετικών μηχανισμών, όπως ο ανταγωνισμός συγγένειας, η πρωτεόλυση ή οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις (Moldovan et al., 2007).

Ένα συντηρημένο μοτίβο που ονομάζεται PIP-box βρέθηκε στο Rfc1, στο Rfc3 και στις περισσότερες πρωτεΐνες που προσδένονται στο PCNA. Στην πραγματικότητα, οι πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με την υδρόφοβη κοιλότητα στη μπροστινή όψη του PCNA περιέχουν γενικά ένα ή περισσότερα συντηρημένα μοτίβα πρόσδεσης στο PCNA, γνωστά ως μοτίβα PIP-box (PCNA-interacting protein motif) (Bruning & Shamo, 2004). Η δέσμευση του PCNA στην καταλυτική υπομονάδα της Pol δ γίνεται μόνο όταν αυτός φορτωθεί στο DNA και μπορεί να μην περιλαμβάνει τα μοτίβα PIP-box (Garg & Burgers, 2005). Ωστόσο, τα μοτίβα αυτά βρίσκονται στις μικρές υπομονάδες της Pol δ (p12 και p66 στους ανθρώπους και Pol 32 στον *S. cerevisiae*), στην ανθρώπινη καταλυτική υπομονάδα p125 και στις δύο από τις τέσσερις υπομονάδες της Pol ε, συμπεριλαμβανομένης της καταλυτικής υπομονάδας Pol 2 (Moldovan et al., 2007).

Η πρόσδεση της ενδονουκλεάσης κρημού FEN-1, μιας πρωτεΐνης που εμπλέκεται στην ωρίμανση των τμημάτων Okazaki, στο PCNA, διεγείρει την 5' προς 3' δραστηριότητα εξωνουκλεάσης της FEN-1, διαδικασία που είναι σημαντική για το σχηματισμό του ασυνεχούς κλώνου του DNA (Kelman, 1997). Τόσο η ενδονουκλεάση FEN-1 όσο και η DNA λιγάση 1- που αποτελούν μέρος του συμπλόκου αντιγραφής στον ασυνεχή κλώνο- διαθέτουν μοτίβα PIP-box που απαιτούνται για την πρόσδεση τους στο PCNA και συνεργάζονται μαζί του κατά τη διάρκεια της αντιγραφής στα θηλαστικά (Moldovan et al., 2007).

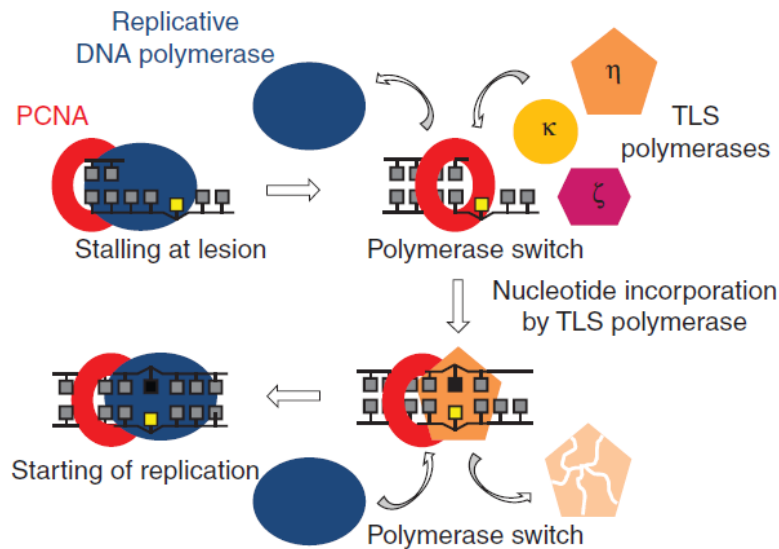
Ως εκ τούτου, φαίνεται ότι κατά τη διάρκεια της αντιγραφής, ο ρόλος του PCNA δεν περιορίζεται μόνο στη σύνθεση του DNA ως μέρος του ολοένζυμου της πολυμεράσης, διεγείροντας τις πολυμεράσες DNA, αλλά επίσης συντονίζει καθοριστικά την επεξεργασία και τη σύνδεση των τμημάτων Okazaki, διαδικασίες που οδηγούν τελικά στο σχηματισμό ενός πλήρους δίκλωνου μορίου DNA (Kelman, 1997; Moldovan et al., 2007). Όλα τα παραπάνω καθιστούν το PCNA βασικό συντονιστή της διαδικασίας της αντιγραφής του DNA.



Εικόνα 14: Μοντέλο αντιγραφής του ευκαρυωτικού DNA. Η λειτουργία του PCNA στη σύνθεση DNA και στην ωρίμανση των τμημάτων Okazaki (Strzalka & Ziemienowicz, 2011).

Τέλος, κατά την αντιγραφή του ευκαρυωτικού DNA, η κατά μήκος σύνθεση των κατεστραμμένων DNA εκμαγείων (π.χ. μη επιδιορθωμένες βλάβες στο DNA ή δευτεροταγείς δομές του DNA) επιτυγχάνεται με εξειδικευμένες πολυμεράσες DNA με μια διαδικασία που ονομάζεται TLS (translesion synthesis). Η σύνθεση του DNA από ένα κατεστραμμένο πρότυπο επιτρέπει την ολοκλήρωση της αντιγραφής του DNA ξεπερνώντας την αντιγραφική διχάλα στο σημείο της ζημιάς. Σε μια τέτοια κατάσταση, οι πολυμεράσες DNA Pol δ/ε, οι οποίες δε μπορούν να αντιγράψουν το κατεστραμμένο DNA, αντικαθίστανται προσωρινά από τις πολυμεράσες TLS η, κ και ι. Αυτές οι χαμηλής πιστότητας πολυμεράσες παρακάμπτουν τα εμπόδια της αντιγραφής και διασφαλίζουν την αποτελεσματική αντιγραφή του DNA, ενσωματώνοντας ένα σωστό ή ένα λάθος νουκλεοτίδιο (Εικόνα 15) (Strzalka & Ziemienowicz, 2011). Ως απόκριση στη βλάβη του DNA, το PCNA μονοουβικιτινυλιώνεται από τη λιγάση ουβικιτίνης, RAD18 στη συντηρημένη λυσίνη 164. Αυτή η τροποποίηση προωθεί την αλλαγή των αντιγραφικών πολυμερασών δ/ε από τις εξειδικευμένες πολυμεράσες χαμηλής πιστότητας TLS, οι οποίες κατά προτίμηση συνδέονται με το ουβικιτινυλιομένο-PCNA (UbiPCNA). Η παρουσία του PCNA διεγείρει τη δραστηριότητα των πολυμερασών TLS με αποτέλεσμα την αυξημένη απόδοση της ενσωμάτωσης νουκλεοτιδίων σε θέσεις απέναντι από το κατεστραμμένο DNA (Gottifredi & Gastón, 2010; Sebesta et al., 2013; Thakar et al., 2020).





Εικόνα 15: Διαδικασία TLS, κατά την οποία η εναλλαγή των DNA πολυμερασών διαμεσολαβείται από το PCNA (Strzalka & Ziemienowicz, 2011).

### Ο ρόλος του PCNA στην επιδιόρθωση βλαβών του DNA

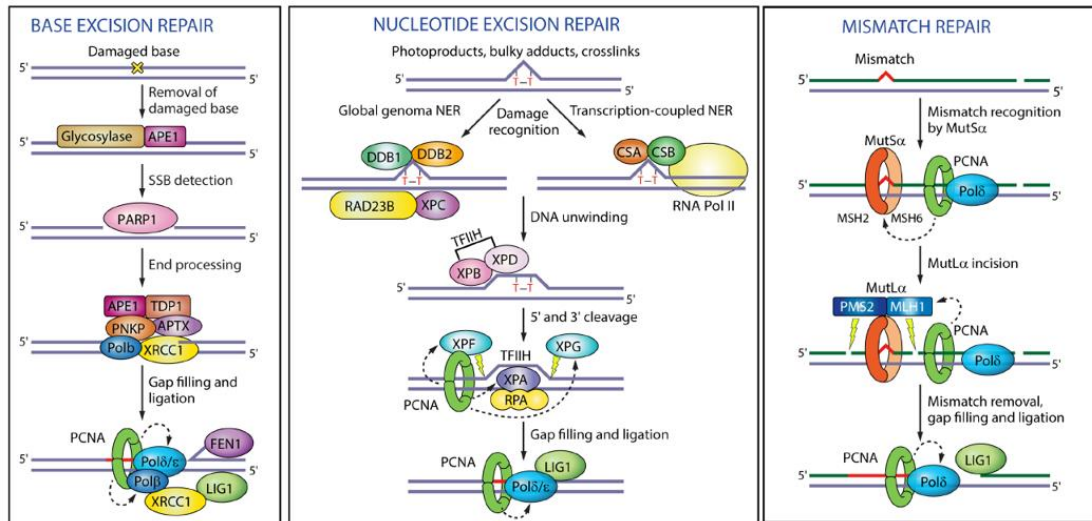
Μελέτες ανοσοϊστοχημείας, με χρήση αντισωμάτων έναντι του PCNA, για τη μελέτη της κατανομής της πρωτεΐνης αυτής εντός του κυττάρου πρότειναν έναν ρόλο του PCNA στην επιδιόρθωση του DNA. Ο πυρήνας των κυττάρων χρωματίστηκε έντονα με αντισώματα αντι-PCNA μετά από βλάβη του DNA από υπερύδνη ακτινοβολία, παρόλο που τα κύτταρα δεν ήταν στη φάση S του κυτταρικού κύκλου. Αυτή η παρατήρηση, πρότεινε τη συμμετοχή του PCNA στις διαδικασίες επιδιόρθωσης του DNA (Toschi & Bravo, 1988).

Υπάρχουν αρκετά εξειδικευμένα μονοπάτια για την επιδιόρθωση των βλαβών του DNA, συμπεριλαμβανομένης της επιδιόρθωσης με νουκλεοτιδική εκτομή (Nucleotide Excision Repair, NER), της επιδιόρθωσης με εκτομή βάσης (Base Excision Repair, BER) και της επιδιόρθωσης αναντιστοιχίας (Mismatch Repair, MMR). Όλα αυτά περιλαμβάνουν ένα στάδιο σύνθεσης DNA που απαιτεί τη χρήση είτε της Pol δ είτε της Pol ε, υποδηλώνοντας με αυτό τον τρόπο ότι το PCNA είναι ένας απαραίτητος παράγοντας για την επιδιόρθωση του DNA (Maga & Hübscher, 2003).

Το μονοπάτι για την επιδιόρθωση μικρών χημικών παραλλαγών των νουκλεοτιδίων μετά από έκθεση σε οξειδωτικούς, αναγωγικούς ή αλκυλιωτικούς παράγοντες καθώς και της κακώς ενσωματωμένης ουρακίλης ονομάζεται επιδιόρθωση με εκτομή βάσης, BER (Stoimenov & Helleday, 2009). Σε αυτό το επιδιορθωτικό μονοπάτι το PCNA στρατολογεί τις πολυμεράσες Pol β, δ ή ε, για να αντικαταστήσουν την κατεστραμμένη βάση (Sebesta et al., 2013). Υπάρχουν δύο τρόποι λειτουργίας του μονοπατιού BER: το «μικρό μονοπάτι επιδιόρθωσης» και το «μεγάλο μονοπάτι επιδιόρθωσης». Ο ρόλος του PCNA συνδέεται με την



επιδιορθωτική σύνθεση του DNA στο μεγάλο μονοπάτι. Πιο συγκεκριμένα, στο «μεγάλο μονοπάτι επιδιόρθωσης», το σύμπλοκο RFC-PCNA-Pol $\delta$ /Pol $\epsilon$  επιστρατεύεται για να επιδιορθώσει την κατεστραμμένη βάση του DNA, ενώ η διαδικασία ολοκληρώνεται με τρόπο ανάλογο με τη σύνθεση των ασυνεχών κλώνων στην αντιγραφή του DNA, που περιλαμβάνει και τη στρατολόγηση των πρωτεϊνών FEN-1 και DNA λιγάση 1 (Moldovan et al., 2007). Το PCNA αλληλεπιδρά με όλες τις εμπλεκόμενες πρωτεΐνες σε όλα τα βήματα του μονοπατιού BER και είναι πιθανό ότι λειτουργεί ως γέφυρα μεταξύ των διαφορετικών πρωτεϊνών που συμμετέχουν στο μονοπάτι BER, διεγείροντας τη δραστικότητα τους και συντονίζοντας το σύνολο της διαδικασίας (Stoimenov & Helleday, 2009). Επίσης, το PCNA παίζει σημαντικό ρόλο και στην επιδιόρθωση του DNA με εκτομή νουκλεοτιδίου (NER), μονοπάτι που ασχολείται με βλάβες του DNA που δημιουργούνται μετά από αλληλεπίδραση αυτού με ορισμένες χημικές ουσίες και υπεριώδη ακτινοβολία. Ο κύριος ρόλος του PCNA στο μονοπάτι επιδιόρθωσης NER σχετίζεται με την επιδιορθωτική σύνθεση (Stoimenov & Helleday, 2009). Πιο συγκεκριμένα, το PCNA α) αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη ικρίωματος XPA, β) ενεργοποιεί την ενδονουκλεάση XPF, γ) στοχεύει την πρωτεΐνη XPG προς αποδόμηση και δ) στρατολογεί την Pol  $\delta$  για να συμπληρώσει τα κενά (Sebesta et al., 2013). Τέλος, κατά την επιδιόρθωση αναντιστοιχίας βάσεων (MMR), η οποία αποτελεί ένα μηχανισμό είτε για την επιδιόρθωση εσφαλμένης ενσωμάτωσης βάσεων (αναντιστοιχίες), είτε για την επιδιόρθωση εισαγωγής ή διαγραφής βρόχων, που δημιουργούνται μετά από μη ακριβή αντιγραφή του DNA, το PCNA απαιτείται όχι μόνο για τη σύνθεση του επιδιορθωμένου τμήματος DNA, αλλά και στο αρχικό βήμα της αναγνώρισης των βλαβών (Stoimenov & Helleday, 2009). Το PCNA αλληλεπιδρά με το σύμπλοκο MutS $\alpha$ , για να αναγνωρίσει την «αναντιστοιχία» που χρήζει επιδιόρθωσης, ενεργοποιεί την ενδονουκλεολυτική δραστικότητα της πρωτεΐνης MutL $\alpha$ , για να αφαιρέσει αυτή την αναντιστοιχία και στρατολογεί την Pol  $\delta$  για να συνθέσει το επιδιορθωμένο τμήμα DNA (Εικόνα 16) (Boehm et al., 2016).



Εικόνα 16: Λειτουργίες του PCNA στα διαφορετικά μονοπάτια επιδιόρθωσης του DNA (Sebesta et al., 2013).

### 1.3.2.2. Οι ρόλοι του PCNA στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου, στο μεταβολισμό της χρωματίνης και στη συνοχή των αδελφών χρωματίδων

#### Ο ρόλος του PCNA στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου

Η σωστή ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου είναι ένα βασικό στοιχείο ελέγχου της κυτταρικής διαίρεσης. Πολλές πρωτεΐνες εμπλέκονται σε αυτή τη διαδικασία, συμπεριλαμβανομένων των κυκλινών και των κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών που ρυθμίζουν τη μετάβαση του κυττάρου στις επόμενες φάσεις του κυτταρικού κύκλου. Το PCNA αλληλεπιδρά με πολλές πρωτεΐνες του ευκαρυωτικού κυτταρικού κύκλου (Strzalka & Ziemienowicz, 2011), ενώ στους ανώτερους ευκαρυώτες, οι λειτουργίες του ρυθμίζονται από την αλληλεπίδραση του με έναν από τους αναστολείς του κυτταρικού κύκλου, την πρωτεΐνη p21 (Stoimenov & Helleday, 2009).

Το PCNA προσδέεται τόσο σε σύμπλοκα κυκλινών–CDK, όσο και στον αναστολέα τους, p21, ενώ έχει αναφερθεί επίσης, η ύπαρξη τετραμερών συμπλόκων PCNA-p21/CDK-κυκλίνης (Maga & Hübscher, 2003). Βιοχημικές μελέτες του PCNA έδειξαν ότι αλληλεπιδρά με το σύμπλοκο κυκλίνης A–CDK2, υποδηλώνοντας ότι λειτουργεί ως συνδέτης μεταξύ της CDK2 και των υποστρωμάτων της (RFC και DNA λιγάση 1), διεγείροντας τη φωσφορυλίωση τους (Strzalka & Ziemienowicz, 2011).

Υπό κανονικές συνθήκες η εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου δεν διαταράσσεται. Ωστόσο, οι τυχόν βλάβες στο DNA και η γήρανση των κυττάρων οδηγούν στην παραγωγή της πρωτεΐνης p21, η οποία εμποδίζει τη μετάβαση του κυττάρου από τη φάση G1 στη φάση S του κυτταρικού κύκλου. Η πρωτεΐνη p21 επιτυγχάνει αυτή τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου, στις φάσεις G1 και G2, αναστέλλοντας τη

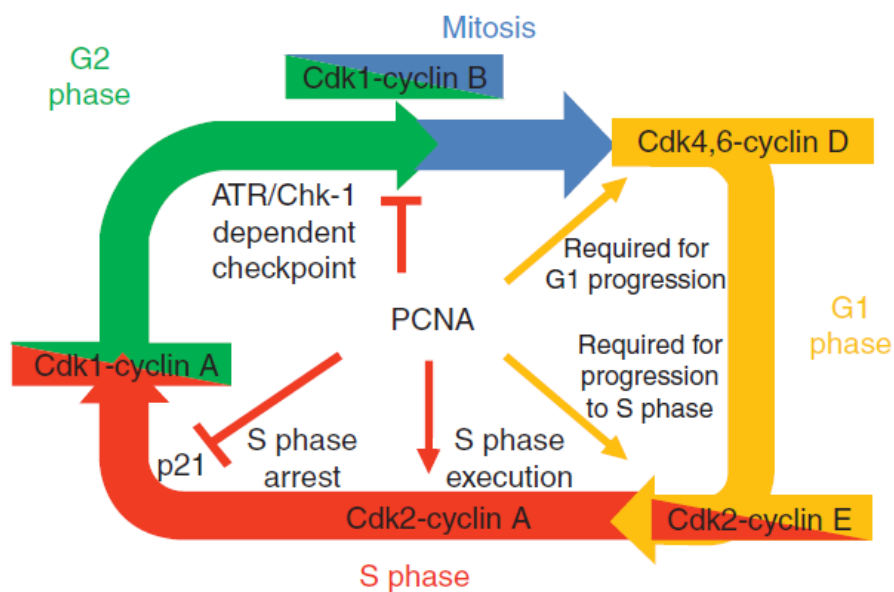
δραστηριότητα των κυκλινοεξαρτώμενων κινασών CDKs, ενώ έχει βρεθεί σε σύμπλοκο που σχηματίζεται από PCNA, κυκλίνες και CDKs (Strzalka & Ziemienowicz, 2011).

Ελλείπει εξωγενών παραγόντων που προκαλούν αντιγραφικό στρες, τα επίπεδα της p21 στη φάση S είναι εξαιρετικά χαμηλά και δεν επαρκούν για την αναστολή των CDKs. Ωστόσο, μελέτες έχουν δείξει ότι αυτά τα χαμηλά επίπεδα της p21 στη φάση S, ελέγχουν την ταχύτητα αντιγραφής του DNA και την αρχική πυροδότηση για τη διατήρηση της γονιδιωματικής σταθερότητας. Οι παραπάνω λειτουργίες της p21 στη φάση S, εξαρτώνται πλήρως από την ικανότητα αυτής να εκτοπίζει τις πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με το δεσμευμένο στη χρωματίνη PCNA. Αντίστροφα, το PCNA ρυθμίζει επίσης την p21 αποτρέποντας την ανοδική έκφραση της στη φάση S, ακόμη και κατά τη διάρκεια ισχυρής επαγωγής της από ακτινοβολία (Mansilla et al., 2020).

Η p21 αλληλεπιδρά με το βρόχο IDCL του PCNA, περιοχή που προσδένονται οι πολυμεράσες DNA, καθώς και μια πληθώρα άλλων πρωτεϊνών. Αξιοσημείωτο γεγονός αποτελεί το ότι η p21 προσδέεται στο βρόχο IDCL με πολύ υψηλότερη συγγένεια από οποιαδήποτε άλλη γνωστή πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά με το PCNA (Bruning & Shamo, 2004). Περαιτέρω, πειράματα *in vitro* καταδεικνύουν ότι η p21 είναι δυναμικά ικανή να αποκλείει την αλληλεπίδραση του PCNA με πολλούς παράγοντες συμπεριλαμβανομένης και της pol δ. Επίσης, οι πολυμεράσες TLS αλληλεπιδρούν με το βρόχο IDCL του PCNA, με παρόμοιο τρόπο με τις πολυμεράσες αντιγραφής, με αποτέλεσμα η p21 να μπορεί να μπλοκάρει και την αλληλεπίδραση του PCNA με αυτές (Prives & Gottifredi, 2008).

Η *in vitro* πρόσδεση της p21 στο PCNA έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της αντιγραφής του DNA, αλλά όχι του εξαρτώμενου από το PCNA μονοπατιού επιδιόρθωσης NER. Βιοχημικές μελέτες έδειξαν ότι η p21 αναστέλλει αποτελεσματικά την επιμήκυνση του DNA κατά τη διάρκεια της διαδικασίας σύνθεσης από τις πολυμεράσες δ ή ε, αλλά όχι τη διαδικασία συμπλήρωσης των κενών που απαιτείται στο επιδιορθωτικό μονοπάτι NER. Αυτά τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι το PCNA είναι απαραίτητο για τη ρυθμιστική δράση της p21 (Waga et al., 1994). Επιπλέον, μελέτες έδειξαν ότι σε τελικά διαφοροποιημένα καρδιομυοκύτταρα, η διακοπή του κυτταρικού κύκλου εξαρτάται από τη διατήρηση υψηλών επιπέδων της πρωτεΐνης p21, τα οποία με τη σειρά τους απαιτούνται για την καταστολή της έκφρασης του PCNA (Maga & Hübscher, 2003). Αυτό μπορεί να συμβαίνει, διότι η p21 εμποδίζει το PCNA να συνδεθεί είτε με πρωτεΐνες που συμμετέχουν στον κυτταρικό κύκλο, είτε με το μηχανισμό αντιγραφής του DNA, στοχεύοντας έτσι την καταστολή της πρωτεΐνης. Πράγματι, η p21 μπορεί να σχηματίσει ένα σταθερό σύμπλοκο με το PCNA στο μόριο DNA, αποτρέποντας την περαιτέρω αλληλεπίδραση του με τις πρωτεΐνες αντιγραφής RF-C και pol δ (Waga et al., 1994).

Οι ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου όπως οι CDK και οι κυκλίνες, αλλά και οι αναστολείς του, όπως οι πρωτεΐνες p21 και p27, είναι μόρια ζωτικής σημασίας του συστήματος ελέγχου του κυτταρικού κύκλου, ένας φραγμός που πολύ συχνά υπερνικάται κατά την εξέλιξη του καρκίνου. Σύμφωνα με τα παραπάνω, υπάρχει ένα σημείο τομής, μέσω της μεσολάβησης του PCNA, μεταξύ της ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου και της αντιγραφής και επιδιόρθωσης του DNA (Stoimenov & Helleday, 2009). Το PCNA είναι ταυτόχρονα μετατροπέας και στόχος τόσο θετικών, όσο και αρνητικών σημάτων κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, καθώς η πρόσδεση του στα σύμπλοκα κυκλινών-CDK, βοηθάει να βρουν αυτές οι ρυθμιστικές πρωτεΐνες τους στόχους τους, ενώ η διακοπή αυτών των αλληλεπιδράσεων από την ανταγωνιστική πρόσδεση της p21, είναι ένα σήμα για να ανασταλεί η αντιγραφή του DNA (Εικόνα 17) (Maga & Hübscher, 2003).



Εικόνα 17: Αλληλεπιδράσεις του PCNA με πρωτεΐνες που ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο (Strzalka & Ziemienowicz, 2011).

Επίσης, το PCNA διαδραματίζει πολύ σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της ισορροπίας μεταξύ της κυτταρικής επιβίωσης και του κυτταρικού θανάτου. Έχει αποδειχθεί ότι αυτό συμμετέχει ενεργά στη ρύθμιση της απόπτωσης που προκαλείται από βλάβη, είτε μέσω της πρόκλησης προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, είτε με διέγερση συγκεκριμένων πρωτεϊνών, όπως η ING1 (αναστολέας ανάπτυξης), ή με καταστολή ορισμένων αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών (Stoimenov & Helleday, 2009). Η πρωτεΐνη ING1 είναι ένας πιθανός ογκοκαταστολέας που συνδέει το PCNA με την αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης και/ή απόπτωσης, ενώ η ισομορφή της p33<sup>ING1</sup> περιέχει ένα μοτίβο PIP-box και αλληλεπιδρά φυσικά με το

PCNA (Maga & Hübscher, 2003). Πιο συγκεκριμένα, ως απόκριση στην υπεριώδη ακτινοβολία, η πρόσδεση της πρωτεΐνης ING1 στο PCNA δεκαπλασιάστηκε, προκαλώντας έτσι κυτταρική απόπτωση (Moldovan et al., 2007). Κύτταρα που εκφράζουν μεταλλάγματα της ING1, τα οποία δε μπορούν να προσδεθούν στο PCNA προστατεύονται από την απόπτωση που προκαλείται από την υπεριώδη ακτινοβολία (Maga & Hübscher, 2003). Το PCNA εμφανίζει επίσης μια αντι-αποπτωτική δράση, μέσω της αλληλεπίδρασης του με πρωτεΐνες της οικογένειας Gadd45 (Gadd45, MyD118 και CR6), οι οποίες εμπλέκονται στον έλεγχο της ανάπτυξης, στην απόπτωση και στην επιδιόρθωση του DNA. Και τα τρία μέλη αυτής της οικογένειας έχουν μοτίβα PIP-box στις καρβοξυτελικές περιοχές τους. Ωστόσο, σε αυτές τις περιπτώσεις, η αλληλεπίδραση με το PCNA αναστέλλει τις δραστηριότητές τους (Moldovan et al., 2007). Τέλος, μελέτες έδειξαν ότι το PCNA αλληλεπιδρά τόσο με την πρωτεΐνη p53, επάγοντας την πολυουβικτινυλίωση της, όσο και με τον αρνητικό ρυθμιστή της, MDM2. Και οι δύο αυτές πρωτεΐνες περιέχουν μοτίβα PIP-box (Banks et al., 2006). Παρόλο που η σημασία της αλληλεπίδρασης αυτής δεν είναι ακόμη ξεκάθαρη, η ελάττωση της συγκέντρωσης PCNA στο κύτταρο, οδηγεί σε συσσώρευση της p53, υποδηλώνοντας ότι το PCNA μπορεί να συμβάλλει άμεσα στη σταθερότητα της p53 (Moldovan et al., 2007).

#### Ο ρόλος του PCNA στο μεταβολισμό της χρωματίνης και στη συνοχή των αδελφών χρωματίδων

Αμέσως μετά την αντιγραφή του DNA, τα νουκλεοσώματα πρέπει να συναρμολογηθούν στις νεοσυντιθέμενες αδερφές χρωματίδες πίσω από τη διχάλα αντιγραφής. Στις ετεροχρωματικές περιοχές του γονιδιώματος συμπεριλαμβανομένων των κεντρομερών και των τελομερών περιοχών των χρωμοσωμάτων, αυτό πραγματοποιείται εν μέρει από τον παράγοντα σύνδεσης της χρωματίνης-1, CAF-1 (chromatin association factor-1). Ο παράγοντας CAF-1 είναι ένα ετεροτριμερές που αποτελείται από τις υπομονάδες Cac1, Cac2 και Cac3. Λειτουργεί ως μοριακός συνοδός των ιστονών H3 και H4, παραδίδοντας αυτές στο αναδιπλασιαζόμενο DNA κατά τη φάση S του κυτταρικού κύκλου, αλλά και στην ανεξάρτητη της αντιγραφής, συναρμολόγηση της χρωματίνης. Η στόχευση του CAF-1 στις θέσεις σύνθεσης του DNA απαιτεί την άμεση αλληλεπίδραση με το PCNA, καθώς ο ρόλος του είναι να σημαδεύει τοπολογικά το νέο αναδιπλασιασμένο DNA, για τη συναρμολόγηση της χρωματίνης από τον CAF-1. Η υπομονάδα Cac1 του CAF-1 περιέχει ένα μοτίβο PIP που μεσολαβεί στην αλληλεπίδρασή του με το PCNA, συνδέοντας έτσι φυσικά τη διαδικασία εναπόθεσης της ιστόνης στη διχάλα της αντιγραφής (Moldovan et al., 2007; Boehm et al., 2016).

Τα ευκαρυωτικά κύτταρα έχουν εξελίξει περίπλοκους μηχανισμούς για να οργανώσουν το καινούργιο αντίγραφο του γονιδιώματος που συντίθεται κατά τη

φάση S. Η συνοχή των αδελφών χρωματίδων είναι ένα τέτοιο φαινόμενο όπου οι νεοσυντιθέμενες αδελφές χρωματίδες συγκρατούνται μαζί από το σύμπλοκο κοχεσίνης μέχρι την ανάφαση, όπου τελικά διαχωρίζονται στους αντίθετους πόλους (Arbel et al., 2021). Αναλυτικότερα, η πρωτεΐνη Eco1/Ctf7 είναι μια ακετυλοτρανσφεράση που μετατρέπει τις δεσμευμένες στη χρωματίνη κοχεσίνες, μέσω ακετυλίωσης της υπομονάδας κοχεσίνης Smc3, σε μια κατάλληλη κατάσταση πρόσδεσης. Πρώιμες μελέτες συνέδεσαν αυτή τη διαδικασία δημιουργίας συνοχής, με το PCNA. Το PCNA δεσμεύει άμεσα την ακετυλοτρανσφεράση Eco1/Ctf7 και την στρατολογεί στην αντιγραφική διχάλα, υποδηλώνοντας ότι η τοποθέτηση αυτή συντονίζεται με τις πολυάριθμες διαδικασίες που διευθύνονται από το PCNA, όπως η εναπόθεση ιστόνης, η αναδιαμόρφωση χρωματίνης, η επιδιόρθωση του DNA κ.α. και ρυθμίζονται μέσω μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων του PCNA. Γενικά, το PCNA δεσμεύει παράγοντες μέσω των οποίων η εναπόθεση ιστόνης, η αναδιαμόρφωση της χρωματίνης και η επιδιόρθωση του DNA συνδέονται με την αντιγραφή του DNA. Εν συνεχεία, η Eco1/Ctf7 με τη σειρά της ενεργοποιεί τις κοχεσίνες και δημιουργεί συνοχή μεταξύ των νεοσυντιθέμενων αδελφών χρωματίδων, ενώ σύμφωνα με τα αποτελέσματα των Zuilkoski & Skibbens, το PCNA αυξάνει τα επίπεδα, τόσο της δεσμευμένης στη χρωματίνη κοχεσίνης όσο και της ακετυλίωσης της κοχεσίνης (Zuilkoski & Skibbens, 2020).

### 1.3.3. Ο ρόλος του PCNA στο κυτταρόπλασμα

Όπως έχει περιγραφεί αναλυτικά παραπάνω, το PCNA είναι μια μείζονος σημασίας πρωτεΐνη που συμμετέχει σε απαραίτητες κυτταρικές λειτουργίες όπως η αντιγραφή και η επισκευή βλαβών του DNA, η συνοχή των αδελφών χρωματίδων, η εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου κ.α. Όλες αυτές οι λειτουργίες συνδέονται με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τον εντοπισμό του PCNA στον πυρήνα των κυττάρων (Naryzhny & Lee, 2010).

Παρόλο που έχει βρεθεί σημαντική ποσότητα του PCNA στο κυτταρόπλασμα, οι λειτουργίες του σε αυτό το κυτταρικό διαμέρισμα δεν έχουν μελετηθεί τόσο εκτενώς όσο αυτές του πυρήνα. Ενδιαφέρον είναι το γεγονός, ότι κύτταρα όπως τα ώριμα ουδετερόφιλα, τα οποία είναι εξαιρετικά διαφοροποιημένα και μη πολλαπλασιαζόμενα, περιέχουν αρκετά μεγάλη ποσότητα PCNA, η οποία εντοπίζεται μόνο στο κυτταρόπλασμα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τα κύτταρα αυτά να αποτελούν ιδανικό μοντέλο για τη μελέτη του κυτταροπλασματικού PCNA (Belyakova et al., 2017). Επίσης, έχει ταυτοποιηθεί μια λειτουργική αλληλουχία πυρηνικής εξόδου (Nuclear Export Sequence, NES) στο PCNA, η οποία επιβεβαίωσε το γεγονός, ότι η πρωτεΐνη αυτή ασκεί επίσης σημαντική λειτουργία εκτός του πυρήνα (Witko-Sarsat & Ohayon, 2016). Είναι ενδιαφέρον, ότι η μεταφορά του PCNA από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα συμβαίνει στο τέλος της διαφοροποίησης των κοκκιοκυττάρων και

περιλαμβάνει την ενεργή εξαγωγή του από τον πυρήνα μέσω της εξπορτίνης CRM1 (De Chiara et al., 2013). Ωστόσο, επειδή η αλληλουχία NES βρίσκεται στην εσωτερική όψη του τριμερούς PCNA δεν είναι λειτουργική μέσα στο τριμερές PCNA. Αντίθετα, όταν το PCNA είναι μονομερές, τα ίδια αμινοξικά κατάλοιπα είναι εκτεθειμένα και έχουν πρόσβαση στην εξπορτίνη CRM1. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι για την πυρηνική εξαγωγή του PCNA απαιτείται η μονομερής του μορφή (Witko-Sarsat & Ohayon, 2016; De Chiara et al., 2013). Συμπερασματικά, η πυρηνική εξαγωγή του PCNA διαμεσολαβείται από μια εξαρτώμενη από την εξπορτίνη CRM1 αλληλουχία πυρηνικής εξαγωγής (NES) και είναι ζωτικής σημασίας για την αντιαποπτωτική του δράση στα ώριμα ουδετερόφιλα (Bouayad et al., 2012).

Η απόδειξη ότι η πυρηνική εξαγωγή του PCNA απαιτεί τη μονομερή του μορφή έθεσε το ερώτημα για το αν η δυναμική του τριμερούς στο κυτταρόπλασμα είναι παρόμοια με αυτή που παρατηρείται στον πυρήνα. Χρησιμοποιώντας πειράματα χρωματογραφίας μοριακής διήθησης η V. Witko-Sarsat και οι συνεργάτες της έδειξαν ότι και οι δύο μορφές του PCNA, τριμερής και μονομερής, μπορούν να ανιχνεύονται στο κυτταρόπλασμα των ουδετερόφιλων, υποδηλώνοντας ότι υπάρχουν ορισμένοι μοριακοί μηχανισμοί που παρεμποδίζουν το σχηματισμό του τριμερούς PCNA στο διαμέρισμα αυτό (Witko-Sarsat & Ohayon, 2016). Έχει αναφερθεί πως, τόσο τα τριμερή όσο και τα μονομερή μόρια του PCNA στο κυτταρόπλασμα των ουδετερόφιλων κυττάρων συμμετέχουν στη ρύθμιση της ισορροπίας μεταξύ επιβίωσης/ απόπτωσης (Bouayad et al., 2012).

Το PCNA εμφανίζει όλα τα χαρακτηριστικά ενός κύριου ρυθμιστή της επιβίωσης των ουδετερόφιλων. Πιο συγκεκριμένα, στα πρωτογενή ουδετερόφιλα το PCNA συνδέεται με τις προκασπάσες 3, 8, 9 και 10, πιθανόν για να τις απομονώσει μέσα στο κυτταρόπλασμα, αποτρέποντας την ενεργοποίησή τους και ρυθμίζοντας κατά συνέπεια θετικά την επιβίωση των ουδετερόφιλων. Ιδιαίτερα, η δέσμευση της προκασπάσης 9 από το PCNA φαίνεται να αποτελεί έναν πολύ αποτελεσματικό τρόπο για την αναστολή της απόπτωσης (Witko-Sarsat et al., 2010).

Ακόμη, μελέτες έδειξαν ότι η αφθονία του κυτταροπλασματικού PCNA μειώθηκε κατά τη διάρκεια της απόπτωσης των ουδετερόφιλων, ενώ αυξήθηκε κατά την *in vitro* και *in vivo* έκθεση των κυττάρων αυτών στον παράγοντα διέγερσης αποικιών των κοκκιοκυττάρων, G-CSF, ο οποίος αποτελεί έναν παράγοντα επιβίωσης (Witko-Sarsat et al., 2010).

Κατά τη φλεγμονή, πρωτεΐνες όπως ο κυκλινο-εξαρτώμενος αναστολέας κινασών p21/waf1, που συνδέεται με το βρόχο IDCL του PCNA, μπορεί να πυροδοτήσει την απόπτωση των κυττάρων διαταράσσοντας το ικρίωμα του κυτταροπλασματικού PCNA (Ohayon et al., 2016). Το γεγονός αυτό αποδεικνύει ότι είναι δυνατό να ρυθμιστεί ο θάνατος των ουδετερόφιλων αντικαθιστώντας τις αλληλεπιδράσεις του PCNA με τους συνεργάτες του, με ανταγωνιστικά πεπτίδια που

προέρχονται από την πρωτεΐνη p21 (De Chiara et al., 2013). Το PCNA θα μπορούσε επίσης να ρυθμίσει την επιβίωση των ουδετερόφιλων κατά τη διάρκεια λοιμώξεων, όπως έχει προταθεί κατά τη διάρκεια της λοίμωξης από *Staphylococcus aureus* (Greenlee-Wacker et al., 2014). Αυτές οι μελέτες συμφωνούν με την ιδέα ότι το κυτταροπλασματικό κριώμα του PCNA είναι αυστηρά προσαρμοσμένο στη φυσιολογία των ουδετερόφιλων για την προώθηση της επιβίωσής τους (Greenlee-Wacker et al., 2014).

Μελέτες μείωσης της έκφρασης του PCNA με αποσιώπηση του με siRNA, έδειξαν ότι υπήρξε ευαισθητοποίηση των κυττάρων ως προς την απόπτωση, ενώ συγκεκριμένες μεταλλάξεις στο βρόχο IDCL του PCNA, που αποτελεί τόπο πρόσδεσης πολλών πρωτεϊνών, μείωσαν σημαντικά την αντιαποπτωτική του δράση (Witko-Sarsat et al., 2010).

Το κυτταροπλασματικό PCNA δρα ως βασικός ρυθμιστής της ζωής των ουδετερόφιλων, με τρόπο ανεξάρτητο του κυτταρικού κύκλου, παρουσιάζοντας αντιαποπτωτική δράση, καθώς συνδέεται με τις προκασπάσες αποτρέποντας την ενεργοποίησή τους. Αντίθετα, αυτός αλληλεπιδρά με τον κυκλινο-εξαρτώμενο αναστολέα κινάσων, p21<sup>WAF1/Cip1</sup> οδηγώντας τα κύτταρα σε απόπτωση (De Chiara et al., 2013).

Επιπλέον, μελέτες έδειξαν ότι το κυτταροπλασματικό PCNA σχετίζεται με έξι γλυκολυτικά ένζυμα που εμπλέκονται στη ρύθμιση των σταδίων 4-9 στο μονοπάτι της γλυκόλυσης, υποδηλώνοντας ότι αυτός μπορεί να συντονίζει τουλάχιστον ένα μέρος αυτού του μονοπατιού στο κυτταρόπλασμα. Έχει βρεθεί επίσης ότι το PCNA σχετίζεται με τρεις γνωστές ογκοπρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένων της μηλικής αφυδρογονάσης, η οποία εμπλέκεται στον κύκλο του Krebs (TCA). Δεδομένου ότι η γλυκόλυση λαμβάνει χώρα στο κυτταρόπλασμα, τα δεδομένα αυτά υποδηλώνουν ότι το PCNA έχει σημαντικές βιολογικές λειτουργίες στο διαμέρισμα αυτό. Εκτός από τη γλυκόλυση, το PCNA μπορεί επίσης να εμπλέκεται στη ρύθμιση του συστήματος παραγωγής ενέργειας στα μιτοχόνδρια, καθώς δεσμεύεται στη μηλική αφυδρογονάση. Τα δεδομένα αυτά υποστηρίζουν επίσης την ιδέα ότι το κυτταροπλασματικό PCNA εμπλέκεται στη ρύθμιση της ακεραιότητας του κυτταροσκελετού και άλλων μονοπατιών κυτταρικής σηματοδότησης μέσω της δέσμευσης του σε κυτταροπλασματικές και μεμβρανικές πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένων της αννεξίνης A2, της σαρκολεκτίνης, του παράγοντα επιμήκυνσης EF1A και των ριβοσωμικών πρωτεϊνών 40S (Naryzhny & Lee, 2010). Συνοψίζοντας, λοιπόν, το κυτταροπλασματικό PCNA μπορεί να εμπλέκεται στη ρύθμιση της ογκογένεσης, του γλυκολυτικού μονοπατιού και της ακεραιότητας του κυτταροσκελετού (Naryzhny & Lee, 2010).

Η θεωρία που περιεγράφηκε προηγουμένως στα ώριμα ουδετερόφιλα, ότι το κυτταροπλασματικό PCNA προάγει την κυτταρική επιβίωση, έχει επιβεβαιωθεί και σε



κύτταρα HL-60 που είναι ανθεκτικά στη χημειοθεραπεία. Σύμφωνα με ευρήματα της Ohayon και των συνεργατών της, προτείνεται μια θεωρία κατά την οποία μια αύξηση της εξαγωγής του πυρηνικού PCNA έχει ως αποτέλεσμα έναν προεξέχοντα εντοπισμό του PCNA στο κυτταρόπλασμα, ο οποίος με τη σειρά του χτίζει ένα πρωτεϊνικό κρίωμα που υπαγορεύει την επιβίωση των κυττάρων, ενισχύοντας τον γλυκολυτικό μεταβολισμό τους προσδίδοντας τους αντίσταση-αντοχή στη χημειοθεραπεία (Ohayon et al., 2016). Συγκεκριμένα, το PCNA με την αλληλεπίδραση με τη νικοτιναμίδική φωσφοριβοσυλο-τρανσφεράση (NAMPT), μια πρωτεΐνη που εμπλέκεται στη βιοσύνθεση του NAD, συντονίζει τη γλυκόλυση και την επιβίωση, ειδικά στα κύτταρα HL-60R (κύτταρα ανθεκτικά στη δαουνορουβικίνη). Αυτά τα κύτταρα παρουσίασαν δραματική αύξηση της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης NAD<sup>+</sup>, καθώς και στη γλυκόλυση, συμπεριλαμβανομένης της αυξημένης έκφρασης και δραστηριότητας της εξοκινάσης 1 και της αυξημένης παραγωγής γαλακτικού οξέος. Επιπλέον, αυτή η λειτουργία του κυτταροπλασματικού PCNA δείχθηκε επίσης σε ασθενείς με οξεία μυελογενή λευχαιμία (AML), αποκαλύπτοντας μια νέα οδό πυρηνικής εξαγωγής του PCNA που οδηγεί στην κυτταρική επιβίωση αυξάνοντας τη ροή του μεταβολισμού. Πειραματικά ευρήματα της Ohayon και των συνεργατών της υποδηλώνουν ότι το κυτταροπλασματικό PCNA είναι ένας βασικός παράγοντας στη διαμόρφωση του ενεργειακού μεταβολισμού που μεσολαβεί στο φαινόμενο Warburg στην οξεία μυελογενή λευχαιμία (AML). Ακόμη, έχουν αποκαλύψει ένα νέο ρυθμιστικό βρόχο του κυτοσολικού PCNA, που συνδέει την εξαρτώμενη από την εξορτίνη CRM1 πυρηνική εξαγωγή και κυτταρική επιβίωση με τη γλυκόλυση, στην οξεία μυελογενή λευχαιμία (AML) (Ohayon et al., 2016). Το γεγονός αυτό υπογραμμίζει τη σημασία της αλληλεπίδρασης του κυτταροπλασματικού PCNA με στοιχεία της γλυκόλυσης και του καρκίνου (Tang et al., 2020).

Στο πολλαπλό μύελωμα, κατά το οποίο τα πλασματοκύτταρα εμφανίζουν υψηλά επίπεδα κυτοσολικού PCNA, έχει αναφερθεί ότι θα μπορούσε να προκληθεί από κασπάσες, αποπτωτική απόκριση στοχεύοντας απευθείας το PCNA, με ανταγωνιστικά πεπτίδια (Müller et al., 2013). Επιπλέον στοιχεία για τον κυτταροπλασματικό PCNA προέρχονται από μια μελέτη που δείχνει τα αποτελέσματα της S-νιτροζυλίωσης του PCNA στην αποπτωτική οδό σε ένα κυτταρικό μοντέλο της νόσου του Πάρκινσον. Αναλυτικότερα, στα ανθρώπινα κύτταρα νευροβλαστώματος, η αλληλεπίδραση μεταξύ της προκασπάσης-9 και του κυτοσολικού PCNA θα μπορούσε να διαταραχθεί μετά από S-νιτροζυλίωση του PCNA, προκαλώντας με τη σειρά της απόπτωση. Αυτό υποδεικνύει ότι η S-νιτροζυλίωση του κυτοσολικού PCNA μπορεί να είναι μεσολαβητής της αποπτωτικής οδού (Yin et al., 2015).

Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι το PCNA παρουσιάζει αυξημένα επίπεδα έκφρασης σε καρκινικά κύτταρα, ενώ προσελκύεται στην ανοσολογική σύναψη με τα φυσικά κύτταρα φονείς (NK cells). Τα φυσικά κύτταρα-φονείς (NK cells) είναι βασικά κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος που καταπολεμούν τάχιστα τα κακοήθη,

καθώς και τα μολυσμένα κύτταρα. Έχει βρεθεί ότι το κυτοσολικό PCNA αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα NKp44, αναστέλλοντας τη δράση του. Ο υποδοχέας NKp44 ανήκει στους υποδοχείς NCRs και επάγει την κυτταροτοξικότητα των κυττάρων NK. Πιο αναλυτικά, το PCNA προσελκύεται στη μεμβράνη των καρκινικών κυττάρων, απελευθερώνεται από αυτά και αλληλεπιδρά με τα κύτταρα-φονείς μέσω της πρόσδεσής του στην κυτταροπλασματική ουρά του υποδοχέα NKp44, αναστέλλοντας τη δράση του. Με αυτό τον τρόπο το PCNA συμβάλει στην επιβίωση των καρκινικών κυττάρων, καθώς αναστέλλει την «προσβολή» αυτών από τα κύτταρα-φονείς, που επάγεται από τον υποδοχέα NKp44 (Rosental et al., 2011).

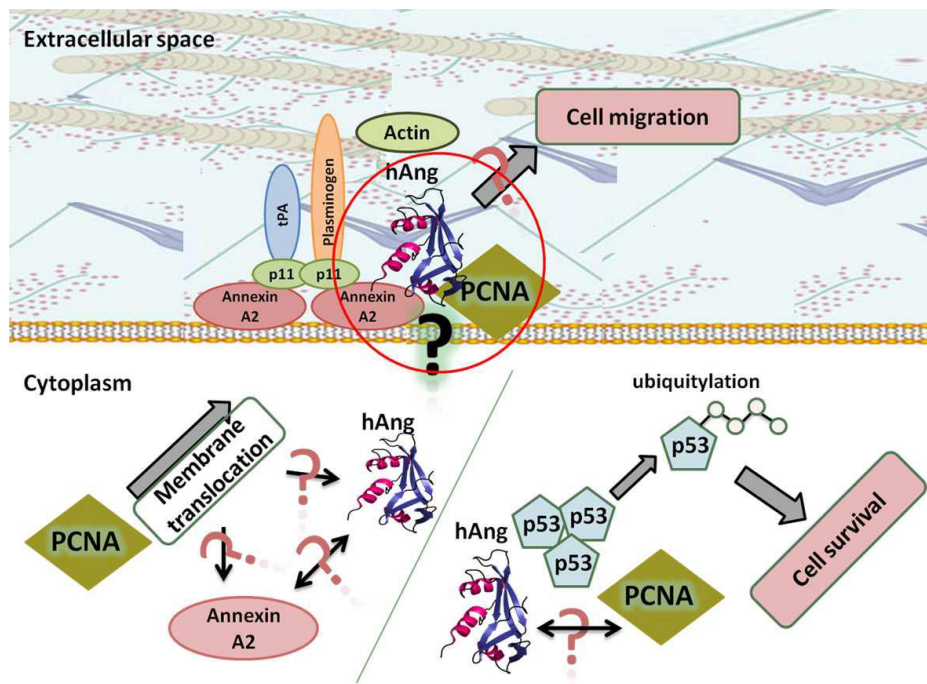
Μια πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι το PCNA μετατοπίζεται από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης των οστεοκλαστών που προκαλείται από την κυτοκίνη RANKL και εντοπίζεται στη ζώνη ακτίνης του ώριμου οστεοκλάστη. Μείωση των επιπέδων έκφρασης του PCNA επηρέασε σημαντικά την ακεραιότητα της ζώνης της ακτίνης, το σχηματισμό των πολυπύρηνων οστεοκλαστών, την έκφραση των ειδικών γονιδίων οστεοκλαστών και την *in vitro* οστική απορρόφηση. Ακόμη, αποκαλύφθηκε ότι η β-ακτίνη αποτελεί μια σημαντική πρωτεΐνη αλληλεπίδρασης του κυτταροπλασματικού PCNA, υποδηλώνοντας ότι ο δεύτερος μπορεί να διαδραματίσει κρίσιμο ρόλο στη διαφοροποίηση των οστεοκλαστών, μέσω της ρύθμισης της αναδιαμόρφωσης ακτίνης-κυτταροσκελετού. Συνεπώς, το κυτταροπλασματικό PCNA διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο κατά τη διαδικασία της διαφοροποίησης των οστεοκλαστών, ενώ μπορεί να αποτελέσει έναν πιθανό θεραπευτικό στόχο για τη θεραπεία ασθενειών των οστών που σχετίζονται με τους οστεοκλάστες (Tang et al., 2020).

Τέλος, όπως αναφέρθηκε παραπάνω μια σχετικά πρόσφατη μελέτη ανέδειξε το PCNA ως αλληλεπιδρώσα πρωτεΐνη της ανθρώπινης αγγειογενίνης (hAng) στο κυτταρόπλασμα της ανθρώπινης υβριδικής κυτταρικής σειράς ενδοθηλιακών και καρκινικών κυττάρων πνεύμονα (EA.hy926). Η αλληλεπίδραση hAng-PCNA και ο συνεντοπισμός τους στο συγκεκριμένο κυτταρικό διαμέρισμα επικυρώθηκε με ανοσοκατακρήμνιση, ανοσοαποτύπωση και ανοσοκυτταροχημεία. Τα αποτελέσματα αποκάλυψαν ότι το PCNA, παραδόξως, εντοπίζεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα στα κύτταρα αυτά, ενώ η hAng κατανέμεται τόσο στον πυρήνα όσο και στο κυτταρόπλασμα. Ο συνεντοπισμός των δυο πρωτεϊνών στο συγκεκριμένο κυτταρικό διαμέρισμα υποδηλώνει την ύπαρξη αλληλεπίδρασης μεταξύ τους στο διαμέρισμα αυτό (Chatzileontiadiou et al., 2017). Είναι πολύ ενδιαφέρον ότι στην ενδοθηλιακή κυτταρική σειρά E.A.hy926, το PCNA, ένας κρίσιμος πυρηνικός παράγοντας, εντοπίζεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα, όπου πολύ λίγα είναι γνωστά για τη βιολογική του λειτουργία (Chatzileontiadiou et al., 2017).

## Πιθανός βιολογικός ρόλος της αλληλεπίδρασης της hAng-PCNA

Μελέτες έχουν δείξει πως το PCNA εντοπίζεται και στη μεμβράνη των κυττάρων, όπου εικάζεται πως η στρατολόγηση του εκεί διευκολύνεται από την αννεξίνη A2, μια πρωτεΐνη που εμπλέκεται στη διακίνηση των μεμβρανών και στη στρατολόγηση πρωτεϊνών σε λιπιδιακές σχεδίες (Rosental et al., 2011). Το PCNA αλληλεπιδρά με την αννεξίνη A2 και με την πρωτεΐνη S100A6. Τόσο η αννεξίνη A2, όσο και η S100A6 εκφράζονται ως απόκριση σε σωληναριακή βλάβη και εμπλέκονται στην ανάκαμψη των κυττάρων των νεφρικών σωληναριακών σε οξεία νεφρική ανεπάρκεια (Cheng et al., 2005). Επιπλέον, άλλες μελέτες σε καρκινικά κύτταρα έδειξαν ότι η αλληλεπίδραση μεταξύ S100A6 και αννεξίνης A2 προάγει ή διευκολύνει τη μετατόπιση της αννεξίνης A2 στην κυτταρική μεμβράνη και μπορεί να ενισχύσει την κινητικότητα των κυττάρων πιθανόν, λόγω της αυξημένης δραστηριότητας του ενεργοποιητή πλασμινογόνου (tPA) (Cheng et al., 2005). Όπως αναφέρθηκε νωρίτερα στη διατριβή, η hAng αλληλεπιδρά με το σύστημα ενεργοποίησης πλασμινογόνου (uPAR, uPA, Αννεξίνη A2 και S100-A10) στις μεμβράνες των κυττάρων, επάγοντας την πρωτεολυτική διάσπαση του πλασμινογόνου προς παραγωγή πλασμίνης, προάγοντας με αυτόν τον τρόπο την κυτταρική μετανάστευση. Το γεγονός ότι η αννεξίνη A2 αλληλεπιδρά τόσο με το PCNA, όσο και με την hAng υποδηλώνει ότι είναι πολύ πιθανό η αλληλεπίδραση της hAng με το PCNA να σχετίζεται με την κυτταρική μετανάστευση (*Εικόνα 18*) (Chatzileontiadiou et al., 2017).

Επιπλέον, το PCNA αλληλεπιδρά τόσο με την p53, επάγοντας την πολυουβικουτινιλίωση της, όσο και με την πρωτεΐνη MDM2, η οποία αποτελεί έναν ρυθμιστή της p53, διαδραματίζοντας μείζονα ρόλο στη σταθερότητα τους (Banks et al., 2006). Η hAng επίσης, όπως έχει αναφερθεί νωρίτερα, επάγει την ουβικουτινιλίωση της p53, μέσω της προώθησης της αλληλεπίδρασης της p53 με την πρωτεΐνη MDM2. Συνεπώς, η αλληλεπίδραση της hAng με το PCNA πιθανόν να σχετίζεται με την αναστολή της δράσης της p53, αναστέλλοντας έτσι την κυτταρική απόπτωση και επάγοντας την κυτταρική επιβίωση (*Εικόνα 18*) (Chatzileontiadiou et al., 2017).



Εικόνα 18: Σχηματική αναπαράσταση του δυνητικού βιολογικού ρόλου της αλληλεπίδρασης hAng-PCNA (Chatzileontiadiou et al., 2017).

### 1.3.4. Αλληλεπιδράσεις του PCNA με άλλες πρωτεΐνες

#### 1.3.4.1. Δομικές μελέτες συμπλόκων του PCNA με άλλες πρωτεΐνες

Μέχρι σήμερα, το PCNA αναφέρεται ότι συνδέεται άμεσα με περισσότερες από 200 πρωτεΐνες (Bhardwaj & Purohit, 2020). Μεταξύ των πολλών πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με το PCNA είναι οι DNA πολυμεράσες, οι ελικάσες, οι εξωνουκλεάσες, οι λιγάσες, ρυθμιστές κυτταρικού κύκλου, οι ακετυλοτρανσφεράσες, οι αναδιαμορφωτές χρωματίνης και οι συνοδοί ιστονών (Slade, 2018).

Καθώς το PCNA είναι ένα συμμετρικό ομοτριμερές μόριο, διαθέτει τρεις πανομοιότυπες υδρόφοβες τσέπες, για να μπορεί να δεσμεύει ταυτόχρονα διαφορετικούς «συνεργάτες» και να συντονίζει μια ποικιλία λειτουργιών στο χώρο και το χρόνο (González-Magaña & Blanco, 2020). Οι περισσότερες από τις πρωτεΐνες που δεσμεύουν το PCNA, είτε είναι εγγενώς αποδιατεταγμένες πρωτεΐνες, (intrinsically disordered proteins, IDPs), είτε έχουν εγγενώς αποδιατεταγμένες περιοχές, (intrinsically disordered regions, IDRs) (González-Magaña & Blanco, 2020). Οι IDPs είναι μια πρόσφατα αναγνωρισμένη κατηγορία λειτουργικών πρωτεϊνών που βασίζονται στην έλλειψη σταθερής δομής για τη λειτουργία τους. Δεν έχουν καθορισμένες δευτερογενείς και τριτογενείς δομές κάτω από φυσιολογικές συνθήκες και είναι ιδιαίτερα διαδεδομένες στη βιολογία, καθώς παίζουν θεμελιώδεις ρόλους σε όλους τους τομείς της ζωής κι εμπλέκονται εκτενώς σε ανθρώπινες ασθένειες (Click et al., 2010).

Όπως έχει αναφερθεί και νωρίτερα πληθώρα πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με το PCNA εμφανίζουν ένα χαρακτηριστικό συντηρημένο μοτίβο γνωστό ως PIP-box (PCNA Interacting Protein-box) ή μια εκτεταμένη έκδοση του που ονομάζεται PIP DeGron (De Biasio & Blanco, 2013). Δομικές μελέτες έχουν δείξει ότι η αμινοξική ακολουθία του πεπτιδίου PIP-box αναδιπλώνεται σε μια έλικα  $3_{10}$  που λειτουργεί ως ένα υδρόφοβο «βύσμα», που προσδέεται στην υδρόφοβη κοιλότητα του PCNA, κάτω από τον βρόχο IDCL (Bruning & Shamo, 2004). Αναλυτικότερα, τα PIP-box είναι αλληλουχίες οκτώ αμινοξέων, (Qxhxhxaa), με μια συντηρημένη γλουταμίνη στη θέση 1, ένα συντηρημένο αλειφατικό αμινοξικό κατάλοιπο (λευκίνη, ισολευκίνη ή μεθειονίνη) στη θέση 4 και δύο γειτονικά, συντηρημένα αρωματικά αμινοξικά κατάλοιπα (φαινυλαλανίνη ή τυροσίνη) στη θέση 8. Οι συντηρημένες αρωματικές πλευρικές αλυσίδες προσδέονται εντός της υδρόφοβης κοιλότητας του PCNA που αποτελείται από την ισολευκίνη-128 στο βρόχο IDCL και τις προλίνες-234 και 253 στην επικράτεια B (Boehm et al., 2016). Τέλος, ένα ακόμη γνωστό μοτίβο πρόσδεσης πρωτεϊνών στο PCNA το οποίο σχετίζεται με το μοτίβο PIP-box, είναι το μοτίβο KA, που αποτελείται από τα κατάλοιπα K-A-A-(A/L/I)-(A/L/Q) -X-X- (L/V). Σε αυτό, οι πρωτεΐνες προσδέονται στην καρβοξυτελική ουρά του PCNA (Stoimenov & Helleday, 2009). Παρόλα αυτά, η πρόσφατη επιστημονική βιβλιογραφία αναφέρει ότι πολλές πρωτεΐνες που δε φέρουν στην αλληλουχία τους το μοτίβο PIP-box, μπορούν και αλληλεπιδρούν με το PCNA (De Biasio & Blanco, 2013).

Τα μοτίβα PIP βρίσκονται συχνά στο C-τελικό άκρο των πρωτεϊνών που δεσμεύονται στο PCNA, όπως η DNA πολυμεράση  $\delta$  (υπομονάδα p66), η DNA πολυμεράση  $\epsilon$  κι ο αναστολέας κυκλινοεξαρτώμενων κινασών p21<sup>WAF1/CIP1</sup>, όπου και θα αναφέρεται ως p21. Τα μοτίβα PIP, ωστόσο, μπορούν να εμφανιστούν και αλλού στη δομή των πρωτεϊνών που δεσμεύουν PCNA, συμπεριλαμβανομένων των N-τελικών άκρων (όπως η Λιγάση I) και στο εσωτερικό των πρωτεϊνών (όπως η DNA πολυμεράση  $\iota$ ). Η απαλοιφή του μοτίβου PIP ή μεταλλάξεις στα συντηρημένα αμινοξικά του κατάλοιπα, μπορεί να αποδυναμώσει σημαντικά ή να καταργήσει τις αλληλεπιδράσεις με το PCNA *in vivo* και *in vitro* (Dieckman et al., 2012a).

Δομικές μελέτες πρωτεϊνών που περιέχουν το μοτίβο PIP-box ή παραγόμενα πεπτίδια, σε σύμπλοκο με τον ανθρώπινο PCNA, έχουν αποκαλύψει τις μοριακές λεπτομέρειες της διεπαφής του PIP μοτίβου με το PCNA (González-Magaña & Blanco, 2020). Η κρυσταλλική δομή ενός τμήματος της p21, σε σύμπλοκο με το PCNA αποκάλυψε για πρώτη φορά τη δομή αυτής της διεπαφής (PDB: 1AXC) (Gulbis et al., 1996). Γενικά, όλες οι αλληλεπιδρώσεις πρωτεϊνών του PCNA υιοθετούν μια παρόμοια διαμόρφωση, η οποία αποτελείται από μία εκτεταμένη N-τερματική περιοχή, μια έλικα  $3_{10}$  τεσσάρων αμινοξικών καταλοίπων που περικλείονται από τα υδρόφοβα κατάλοιπα του PIP-box και μια C-τερματική περιοχή μεταβλητού μήκους που μερικές φορές υιοθετεί μια δευτεροταγή δομή β πτυχωτού φύλλου και αλληλεπιδρά με το βρόχο IDCL (Gulbis et al., 1996 ; González-Magaña & Blanco, 2020). Η συντηρημένη

έλικα εισέρχεται στην υδρόφοβη τσέπη του PCNA, ενώ η γλουταμίνη «κολλάει» στην αποκαλούμενη Q-rocket του, δημιουργώντας δεσμούς υδρογόνου με την κύρια αλυσίδα του PCNA (Gulbis et al., 1996). Γενικά, η δομή του PCNA δε μεταβάλλεται κατά τη δέσμευση των πεπτιδίων PIP, ενώ παρατηρούνται μόνο μικρές μεταβολές στη δομή του βρόχου IDCL (Dieckman et al., 2012a).

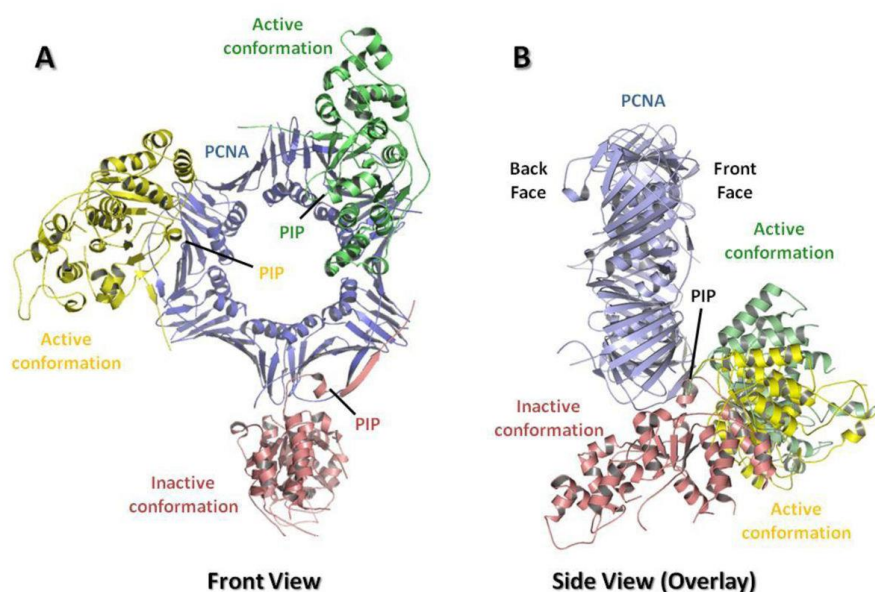
Τα τελευταία χρόνια έχουν προσδιοριστεί, διάφορες κρυσταλλικές δομές του PCNA συνδεδεμένου με πεπτίδια. Τα πεπτίδια αυτά προέρχονται από πρωτεΐνες που δεσμεύονται στο PCNA. Πιο πρόσφατα, κρυσταλλικές δομές με άλλες πρωτεΐνες πλήρους μήκους έχουν προσδιοριστεί. Αυτές οι δομές παρέχουν πολύτιμες πληροφορίες για τον τρόπο με τον οποίο το PCNA αναγνωρίζει πρωτεΐνες που δεσμεύονται σε αυτόν και τις στρατολογεί στην αντιγραφική διχάλα (Dieckman et al., 2012b). Υπάρχουν κρυσταλλικές δομές του PCNA που συνδέονται με πεπτίδια PIP-box από έξι διαφορετικές πρωτεΐνες: του ρυθμιστή του κυτταρικού κύκλου p21, της πρωτεΐνης FEN1, της υπομονάδας 3 της DNA πολυμεράσης- $\delta$  (pol  $\delta$ 3), της B υπομονάδας της RNaseH2 (RNaseH2B) και των πεπτιδίων PIP-box των TLS πολυμερασών pol  $\eta$  και pol  $\iota$  (De Biasio & Blanco, 2013). Στις κρυσταλλικές δομές αυτών των συμπλόκων, η στοιχειομετρία είναι τρία πεπτιδικά μόρια ανά τριμερές PCNA. Σε κάθε σύμπλοκο, οι τρεις θέσεις δέσμευσης και η διαμόρφωση των τριών δεσμευμένων πεπτιδίων είναι κρυσταλλογραφικά ταυτόσημη ή ουσιαστικά η ίδια. Ωστόσο, υπάρχουν ορισμένες διαφορές μεταξύ των διαφόρων συμπλόκων σχετικά με το μήκος της ορατής πεπτιδικής αλυσίδας και τις λεπτομέρειες της διαμόρφωσης στα άκρα της αλυσίδας τους (De Biasio & Blanco, 2013).

Η εγγενώς αποδιατεταγμένη πρωτεΐνη p21 είναι μία από τις αλληλεπιδρώσες πρωτεΐνες του PCNA με την υψηλότερη συγγένεια. Διαθέτει N-τερματική αλληλουχία παρόμοια με άλλες πρωτεΐνες αναστολής CDK και μια C-τερματική περιοχή που περιέχει ένα PIP-box. Τα τμήματα p21 139-160 και 141-160 που περιέχουν αυτή την αλληλουχία δεσμεύονται στο PCNA με τιμές  $K_d$  54-88 nM, σε θερμοκρασία 30°C (Bruning & Shamo, 2004; De Biasio et al., 2012; Zheleva et al., 2000). Αυτή η υψηλή συγγένεια με το PCNA πιθανώς οφείλεται στο γεγονός ότι μετατοπίζει τις άλλες πρωτεΐνες για να παρεμποδιστεί η αντιγραφή, ως απόκριση σε βλάβη του DNA (González-Magaña & Blanco, 2020; Horsfall et al., 2021). Δομικές μελέτες έδειξαν πως η μεγάλη αυτή συγγένεια βασίζεται στην αποτελεσματική υδρόφοβη τσέπη, καθώς και στις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις με την C-τερματική περιοχή του PCNA. Ακόμη, μελέτες με πεπτίδια μεταβλητού μήκους της p21 υποδηλώνουν ότι τα βασικά αμινοξικά κατάλοιπα στην N και C περιοχή περικλείουν την πρωτεΐνη που φέρει PIP-box μοτίβο, συμβάλλοντας επίσης στην αύξηση της συγγένειας δέσμευσης (González-Magaña & Blanco, 2020).

Αντίθετα, οι TLS πολυμεράσες pol  $\lambda$ , pol  $\kappa$  και pol  $\iota$  δεσμεύουν το PCNA με συγγένεια της τάξης των  $\mu$ M, ενώ ένα πεπτίδιο που προέρχεται από τη κύρια

πολυμεράση Pol δ, το Pol δ<sub>p66 452-466</sub> έχει συγγένεια για το PCNA 15,6 μM (Horsfall et al., 2021). Επιπλέον, η ενδονουκλεάση FEN1 και η pol δ3, παρουσιάζουν λιγότερα βασικά αμινοξικά κατάλοιπα από την p21 και κατά συνέπεια παρουσιάζουν χαμηλότερη συγγένεια (González-Magaña & Blanco, 2020).

Ενώ οι περισσότερες δομές συμπλόκων του PCNA με πεπτίδια PIP έχουν προσδιοριστεί, λίγες είναι οι υπάρχουσες δομές από σύμπλοκα PCNA με πρωτεΐνες πλήρους μήκους. Αυτές έδωσαν πληροφορίες για τις δευτερεύουσες επαφές μεταξύ αυτών των πρωτεϊνών και του PCNA εκτός αυτών του PIP-box. Για παράδειγμα, η ενδονουκλεάση FEN1 αποτελείται από μια επικράτεια πυρήνα νουκλεάσης (κατάλοιπα 1-332) και μια περιοχή C-τελικού άκρου (κατάλοιπα 333-380). Αν και η κύρια επαφή που γίνεται μεταξύ της FEN1 και του PCNA διαμεσολαβείται από το μοτίβο PIP, υπάρχουν δευτερεύουσες επαφές μεταξύ του PCNA και των περιοχών που πλαισιώνουν το μοτίβο PIP, καθώς και μεταξύ του PCNA και του πυρήνα της FEN1. Η δομή του συμπλόκου FEN1-PCNA περιλαμβάνει τρία μόρια FEN1 που συνδέονται με το PCNA, ενώ κάθε μόριο FEN1 ήταν σε διαφορετική θέση σε σχέση με την υπομονάδα του PCNA στην οποία ήταν δεσμευμένη (Εικόνα 19) (Sakurai et al., 2005; Dieckman et al., 2012a).



Εικόνα 19: Διάγραμμα του συμπλόκου FEN1-PCNA (PDB ID: 1UL1) που φαίνεται από το μπροστινό μέρος (A) και το πλάι (B)(A) Το τριμερές PCNA παρουσιάζεται με μπλε χρώμα, συνδεδεμένο με τρία μόρια FEN1, που παρουσιάζονται με κόκκινο, κίτρινο και πράσινο χρώμα. (B) Απεικόνιση των τριών θέσεων της πρωτεΐνης FEN1 σε σχέση με την υπομονάδα του PCNA στην οποία είναι προσδεμένη. Το PCNA εμφανίζεται με μπλε χρώμα, η ανενεργή διαμόρφωση της πρωτεΐνης FEN1 εμφανίζεται με κόκκινο χρώμα, ενώ οι ενεργές της διαμορφώσεις εμφανίζονται με κίτρινο και πράσινο χρώμα. (Dieckman et al., 2012a).



Τέλος, ο παράγοντας RFC που, όπως έχει περιγραφεί σε προηγούμενο κεφάλαιο, συνδέεται με το PCNA, ανοίγει το δακτύλιο και τον εναποθέτει πάνω στο DNA, αποτελεί ένα ακόμη παράδειγμα δομής συμπλόκου PCNA με πρωτεΐνη πλήρους μήκους. Ο RFC «κάθεται» στην μπροστινή όψη του κλειστού δακτυλίου του PCNA. Οι πέντε υπομονάδες του, σχηματίζουν μια δεξιά σπείρα που κλίνει κατά περίπου 9 ° σε σχέση με τον τριπλάσιο άξονα του PCNA. Μόνο τρεις από τις πέντε υπομονάδες του RFC (RFC-A, RFC-B και RFC-C) κάνουν επαφές με το PCNA. Στην περίπτωση των RFC-A και RFC-C, αυτές προκαλούνται από μοτίβα PIP. Εν αντιθέσει, η υπομονάδα RFC-B, κάνει αρκετές δευτερεύουσες επαφές με το PCNA στις εσωτερικές του υπομονάδες (Εικόνα 20) (Dieckman et al., 2012a). Στον Πίνακα 6 παρουσιάζεται μια περίληψη των αλληλεπιδράσεων πρωτεϊνών με το PCNA που επικυρώθηκαν με δομικές και/ή ποσοτικές μεθόδους (González-Magaña & Blanco, 2020).



Εικόνα 20: Σχηματική απεικόνιση του συμπλόκου RFC-PCNA (PDB ID:1SXJ)(Bowman et al., 2004).



Πίνακας 6: Αλληλεπιδράσεις του PCNA με άλλες πρωτεΐνες. Τα συντηρημένα κατάλοιπα του μοτίβου PIP-box επισημαίνονται με κόκκινο χρώμα (González-Magaña & Blanco, 2020).

Protein	Activity	Sequence	T(°C)	Kd (μM)	Method	PDB Code
CANONICAL						
p21	CDK1 inhibitor	<sup>139</sup> GRKRRQTSMTDFYHSKRRLLIFS <sup>160</sup>	30	0.080	ITC, XR, NMR	1AXC
p68	Polymeraseδ subunit	<sup>451</sup> GKANRQVSITGFFQRK <sup>466</sup>	30	16	ITC, XR, NMR	1U76
FEN1	Endonuclease	<sup>331</sup> SRQGSTQGRLLDDFFKVTG <sup>350</sup>	30	59.9	ITC, NMR	1U7B
p15 <sup>PAF</sup>	Replication/repair	<sup>50</sup> GNPVCVRPTPKWQKIGEFFRLSPKDSE <sup>77</sup>	25	5.56	ITC, XR, NMR	4D2G 6GWS
ZRANB3	Helicase/Endonuclease	<sup>511</sup> FTHFEKEKQHDIRSFFVPOPKK <sup>532</sup>	25	4.8	ITC, XR	5MLO
DVC1	Adaptor protein	<sup>321</sup> SNSHQNVLSNYFPRV <sup>336</sup>	25	15.55	ITC, XR	5IY4
DNMT1	Methyltransferase	<sup>161</sup> STRQTTITSHFAKGPAAKRP <sup>180</sup>	25	1	ITC, XR	6K3A
UHRF2	E3 ubiquitin ligase	<sup>784</sup> NEILQTLDDLFFPGYSK <sup>800</sup>	20	25.7	ITC, XR	5ICO
Cdt1	Replication factor	<sup>1</sup> MEQRRVTDFFARRR <sup>14</sup>	ND	7.2	FP, XR	6QCG
RecQ5	Helicase	<sup>952</sup> KTSPGRSVKKEAQNLIRHFFHGRARCESE <sup>980</sup>	35	210	NMR	-
NON-CANONICAL						
pol 1	TLS polymerase	<sup>419</sup> CAKKGLIDYYLMPSLST <sup>435</sup>	25	0.39	SPR, XR	2ZVM
polη	TLS polymerase	<sup>694</sup> CKRPRREGMQTLESFFKPLTH <sup>713</sup>	25	0.4	SPR, XR	2ZVK
Pol k	TLS polymerase	<sup>856</sup> CIKPNPKHTLIDIFFK <sup>870</sup>	25	ND	SPR, XR	2ZVL
ZRANB3	Helicase/endonuclease	<sup>1058</sup> QVRRQSLASKHGSDITRFLVKK <sup>1079</sup>	25	9.24	ITC, XR	5MLW 5YD8
PARG	Glycosylase	<sup>402</sup> QHGKKDSKITDHFMRPKA <sup>420</sup>	25	3.3	ITC, XR	5MAV
p12	Polymeraseδ subunit	<sup>1</sup> MGRKRLITDSYPVVKRREG <sup>19</sup>	25	38	ITC, XR, NMR	6HVO
Cdt2	E3 ubiquitin ligase	<sup>704</sup> SSMRKICTYFHRKS <sup>717</sup>	ND	0.057	FP, XR	6QC0
TRAI1	E3 ubiquitin ligase	<sup>447</sup> KQVRVKTVPSTLQAKLDTFLWS <sup>469</sup>	25	30.7	ITC, XR	4ZTD
RNH2B	RNase	<sup>290</sup> DKSGMKSIDTFFGVNKKKIGKV <sup>312</sup>	-	-	XR	3P87

## 1.4. Κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ

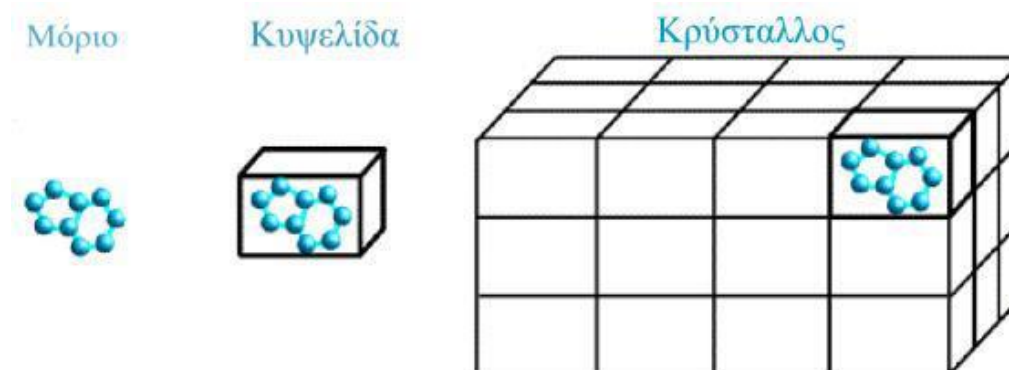
### 1.4.1. Κρυσταλλογραφία πρωτεϊνών

Η κρυσταλλογραφία πρωτεϊνών είναι ένας εξειδικευμένος κλάδος της κρυσταλλογραφίας ακτίνων Χ, που στοχεύει μέσω της περίθλασης των ακτίνων Χ από πρωτεϊνικούς κρυστάλλους, στον προσδιορισμό των τρισδιάστατων δομών της. Γνωρίζοντας το μήκος κύματος και τη γωνία περίθλασης των ακτίνων Χ από ένα πρωτεϊνικό κρύσταλλο, είναι δυνατό να προσδιοριστεί η δομή μιας πρωτεΐνης (Feiten et al., 2017).

#### 1.4.1.1. Κρύσταλλοι πρωτεΐνης

Ο κρύσταλλος είναι ένα στερεό σώμα που χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη μιας περιοδικής διευσθέτησης των ατόμων και των μορίων του στις τρεις διαστάσεις. Ο κρύσταλλος χαρακτηρίζεται από συμμετρία και περιοδικότητα, ενώ δημιουργείται από την επανάληψη με απλή μετάθεση ενός σταθερού μοτίβου σε σχήμα παραλληλεπίπεδου με έξι έδρες και οκτώ ακμές, που ονομάζεται μοναδιαία ή στοιχειώδης κυψελίδα (unit cell). Στον τρισδιάστατο χώρο, οι στοιχειώδεις κυψελίδες που αποτελούν τον κρύσταλλο, είναι πανομοιότυπες μεταξύ τους σε διαστάσεις και περιεχόμενο (Εικόνα 21) (Γλυκός, 2015). Οι αλληλεπιδράσεις που συγκροτούν τις πρωτεΐνες στο κρυσταλλικό πλέγμα ονομάζονται κρυσταλλικές επαφές και είναι ίδιες σε κάθε οργανωμένη βασική μονάδα μορίων που περιέχεται στη στοιχειώδη κυψελίδα του κρυσταλλικού πλέγματος (Blundell & Johnson, 1976). Συνεπώς, η στοιχειώδης κυψελίδα αποτελεί τη μικρότερη στοιχειώδη ομάδα που απαιτείται για τη δημιουργία ολόκληρου κρυστάλλου με επαναλαμβανόμενη συμμετρία. Συνήθως,

οι στοιχειώδεις κυψελίδες περιέχουν περισσότερα από ένα μόρια πρωτεΐνης, που σχετίζονται μεταξύ τους μέσω της ύπαρξης επιπλέον στοιχείων συμμετρίας (Γλυκός, 2015).



Εικόνα 21: Σχηματική αναπαράσταση της στοιχειώδους κυψελίδας.

#### 1.4.1.2. Ανάπτυξη κρυστάλλων πρωτεΐνης

Η κρυστάλλωση πρωτεϊνών είναι κυρίως μια διαδικασία «δοκιμής και σφάλματος» (trial and error method), κατά την οποία η πρωτεΐνη καταβυθίζεται αργά από ένα υδατικό διάλυμα. Κατά κανόνα, όσο πιο καθαρή είναι μια πρωτεΐνη, τόσο περισσότερες είναι οι πιθανότητες να αναπτυχθούν κρύσταλλοι (Ilari & Savino, 2008). Ο κρύσταλλος αποτελείται από τη στερεή φάση, δηλαδή τα σημεία επαφής των μακρομορίων που δημιουργεί το κρυσταλλικό πλέγμα και από την υγρή, η οποία συμπληρώνει τα κενά μεταξύ του κρυσταλλικού πλέγματος (Blundell & Johnson, 1976). Για να επιτευχθεί η κρυστάλλωση μιας πρωτεΐνης, απαραίτητη προϋπόθεση είναι η δημιουργία μιας κατάστασης υπερκορεσμού των πρωτεϊνικών μορίων, έτσι ώστε αυτά να μπορούν να αλληλεπιδρούν μεταξύ τους (McPherson, 2007). Ο υπερκορεσμός μπορεί να επιτευχθεί με την προσθήκη ήπιων καταβυθιστικών παραγόντων, όπως ουδέτερα άλατα, οργανικοί διαλύτες και πολυμερή πολυαιθυλενογλυκόλης και/ή με τροποποίηση ορισμένων από τις εσωτερικές παραμέτρους του διαλύματος, όπως το pH, η θερμοκρασία και η συγκέντρωση της πρωτεΐνης (Ilari & Savino, 2008). Η ανάπτυξη των κρυστάλλων ξεκινά από ένα υπερκορεσμένο διάλυμα του μακρομορίου και εξελίσσεται προς μια θερμοδυναμικά σταθερή κατάσταση, στην οποία η πρωτεΐνη κατανέμεται μεταξύ μιας στερεάς φάσης και του διαλύματος. Ο απαιτούμενος χρόνος πριν επιτευχθεί η ισορροπία παίζει σημαντικό ρόλο στην κρυστάλλωση, καθώς υπάρχει μεγάλη πιθανότητα να σχηματιστεί ένα άμορφο ή μικροκρυσταλλικό ίζημα, αντί μιας κρυσταλλικής δομής. Αυτό, κατά κύριο λόγο, συμβαίνει όταν η κατάσταση υπερκορεσμού προσεγγίζεται πολύ γρήγορα, με αποτέλεσμα τα μόρια της πρωτεΐνης να μην έχουν το χρόνο που

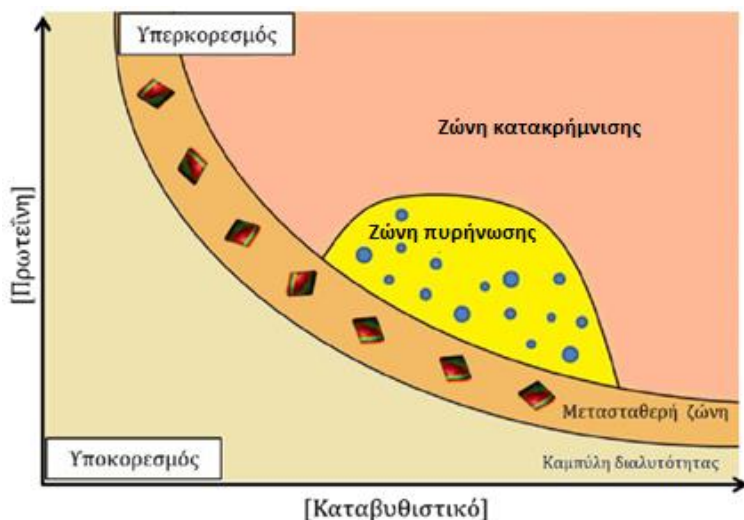
χρειάζονται, για να αλληλεπιδράσουν με τα γειτονικά τους και να διευθετηθούν στο χώρο κατάλληλα (Ilari & Savino, 2008).

Οι καταστάσεις υποκορεσμού και υπερκορεσμού καθορίζονται από τη διαλυτότητα των μακρομορίων στα διαγράμματα διαλυτότητας. Εκεί, παράμετροι όπως η ιοντική ισχύς, το pH, η θερμοκρασία και η φύση των διαλυτών παραμένουν σταθερές. Η καμπύλη διαλυτότητας (S) ορίζει τις ζώνες υποκορεσμού και υπερκορεσμού και καθορίζει την κατάσταση εξισορρόπησης μεταξύ κορεσμένης και κρυσταλλωμένης πρωτεΐνης στο διάλυμα. Κάτω από την καμπύλη διαλυτότητας, η πρωτεΐνη δε θα κρυσταλλωθεί ποτέ (υποκορεσμός), ενώ πάνω από την καμπύλη διαλυτότητας, η συγκέντρωση της πρωτεΐνης είναι υψηλότερη από την συγκέντρωση εξισορρόπησης για δεδομένη συγκέντρωση ηλεκτρολύτη (υπερκορεσμός) και υποδιαιρείται σε τρεις ακόμη ζώνες:

Ζώνη κατακρήμνισης: η πρωτεΐνη μετατρέπεται σε άμορφο ίζημα, συνήθως λόγω της μεγάλης ταχύτητας προσέγγισης στην κατάσταση υπερκορεσμού.

Ζώνη πυρήνωσης: Σχηματισμός πυρήνων κρυστάλλωσης. Ως πυρήνες κρυστάλλωσης ονομάζονται οι μικρότερες οργανωμένες μορφές πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων που σχηματίζονται στην περιοχή, όπου η περίσσεια της πρωτεΐνης αποκτά κρυσταλλική μορφή. Κοντά στην ζώνη κατακρήμνισης βρίσκεται πλήθος μικροκρυστάλλων, οι οποίοι μπορούν να μπερδευτούν με το άμορφο ίζημα πρωτεΐνης. Η εύρεση της ζώνης πυρήνωσης αποτελεί πρωταρχικό σκοπό των πειραμάτων κρυστάλλωσης.

Μετασταθερή ζώνη: ένα υπέρκορο διάλυμα πρωτεΐνης μπορεί, για μεγάλο χρονικό διάστημα, να μη δημιουργεί πυρήνες κρυστάλλωσης, εκτός αν βοηθηθεί μηχανικά. Στη ζώνη αυτή οι πυρήνες μετασχηματίζονται σε κρυστάλλους. Η μετασταθερή ζώνη αντιστοιχεί ιδανικά στην αύξηση των κρυστάλλων από πυρήνες κρυστάλλωσης που προϋπάρχουν, χωρίς τη δημιουργία νέων. Η συγκέντρωση της διαλυμένης πρωτεΐνης μειώνεται, καθώς το μέγεθος των κρυστάλλων αυξάνεται και αυτό έχει ως συνέπεια τη μετατόπιση της μετασταθερής ζώνης (Durbin & Feher, 1996; Saridakis & Chayen, 2003). Στην *Εικόνα 22* παρουσιάζεται το διάγραμμα φάσεων κατά τη διαδικασία κρυστάλλωσης μίας πρωτεΐνης.



Εικόνα 22: Διάγραμμα φάσης κρυστάλλωσης πρωτεϊνών.

#### 1.4.1.3. Παράγοντες που επηρεάζουν την κρυστάλλωση

Σημαντικό μειονέκτημα της κρυσταλλογραφίας αποτελεί ο μεγάλος αριθμός των παραγόντων που επηρεάζουν την κρυστάλλωση των πρωτεϊνών (Πίνακας 7). Οι κυριότεροι από αυτούς τους παράγοντες είναι η συγκέντρωση της πρωτεΐνης και η καθαρότητά της ( $> 95\%$ ), η θερμοκρασία, το pH, η ιοντική ισχύς, καθώς και η συγκέντρωση και η φύση του καταβυθιστικού μέσου (McPherson & Gavnira, 2014).

Πίνακας 7: Παράγοντες που επηρεάζουν την κρυστάλλωση μακρομορίων (McPherson & Gavnira, 2014).

Φυσικοί παράγοντες	Χημικοί παράγοντες	Βιοχημικοί παράγοντες
1. Θερμοκρασία	1. pH	1. Καθαρότητα
2. Προσέγγιση της ισορροπίας	2. Παράγοντας καταβύθισης	2. Επίδραση προσδέτη
3. Βαρύτητα	3. Ιοντική ισχύς	3. Στάδιο σχηματισμού συσσωματωμάτων
4. Πίεση	4. Βαθμός υπερκορεσμού	4. Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις
5. Χρόνος	5. Αναγωγικό/οξειδωτικό περιβάλλον	5. Πρωτεόλυση /υδρόλυση
6. Μηχανική διαταραχή	6. Συγκέντρωση πρωτεΐνης	6. Ιδιότητες πρωτεϊνών (υδροφοβικότητα,
7. Ηλεκτρικό/μαγνητικό πεδίο	7. Συμπαράγοντες, ιόντα, μεταλλικά ιόντα, υποστρώματα	
8. Διηλεκτρικές ιδιότητες του μέσου		

9. Ιξώδες	8. Επιφανειοδραστικές ουσίες/αμφολύτες	οξείδωση, υδροφιλικότητα)
10. Ομοιογένεια/ετερογένεια πυρήνων κρυστάλλωσης	9. Προσμίξεις	7. Συμμετρία 8. Σταθερότητα 9. Ισοηλεκτρικό σημείο

#### 1.4.1.4. Μέθοδοι κρυστάλλωσης

Η κρυστάλλωση των πρωτεϊνών βασίζεται σε ένα διαφορετικό σύνολο αρχών, εμπειριών και εξελισσόμενων ιδεών. Δεν υπάρχει κάποια ολοκληρωμένη θεωρία, ή μια οργανωμένη βάση δεδομένων για την καθοδήγηση του ερευνητή, με συνέπεια η ανάπτυξη πρωτεϊνικών κρυστάλλων να στηρίζεται σε μεγάλο βαθμό στην εμπειρία, την υπομονή και την επιμονή του ερευνητή καθώς και τη διαίσθηση του (McPherson, 2007). Η μέθοδος που εφαρμόζεται συνήθως είναι αυτή της «δοκιμής και σφάλματος», δοκιμάζοντας γνωστές συνθήκες κρυστάλλωσης πρωτεϊνών. Μέχρι σήμερα, έχει αναπτυχθεί μια πληθώρα προσεγγίσεων που συνδυάζουν το φάσμα των παραγόντων που επηρεάζουν και προάγουν την κρυστάλλωση και μεταξύ των πιο ευρέως χρησιμοποιούμενων είναι: η διάχυση ατμών (vapor diffusion), στην οποία περιλαμβάνονται οι τεχνικές της κρεμάμενης και καθήμενης σταγόνας (hanging and sitting drop), η στατική μέθοδος batch και η διαπίδυση (dialysis) (Dessau & Modis, 2010). Η διάχυση ατμών, αποτελεί την πλέον δημοφιλή μέθοδο κρυστάλλωσης, η οποία στηρίζεται στην αργή εξάτμιση του νερού από ένα διάλυμα χαμηλής συγκέντρωσης, που οδηγεί σε ένα διάλυμα υψηλότερης συγκέντρωσης (υπέρκορο) (Feiten et al., 2017). Παρόλο που όπως έχει αναφερθεί παραπάνω η κρυστάλλωση των πρωτεϊνών είναι μια ιδιαίτερα απαιτητική διαδικασία και αρκετές φορές, μη επιτυχής, τα τελευταία χρόνια, λόγω της εμφάνισης πρακτικών κι εύχρηστων κιτ συνθηκών κρυστάλλωσης, καθώς και της εφαρμογής εργαστηριακών ρομποτικών συστημάτων, οι επιτυχίες στην κρυστάλλωση πρωτεϊνών έχουν πολλαπλασιαστεί (McPherson & Gavira, 2014).

#### 1.4.2. Περίθλαση ακτίνων Χ από πρωτεϊνικούς κρυστάλλους

Η περίθλαση ακτίνων-Χ από κρυστάλλους ή αλλιώς κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ, είναι μια αναλυτική τεχνική, όπου χρησιμοποιούνται ακτίνες-Χ για τον προσδιορισμό της ακριβούς θέσης των ατόμων σε έναν κρύσταλλο (ατομική δομή). Η κρυσταλλογραφία βασίζεται σχεδόν αποκλειστικά στη σκέδαση των ακτίνων Χ από τα ηλεκτρόνια στα μόρια του υπό μελέτη δείγματος (Wlodawer et al., 2008). Οι ακτίνες Χ ή ακτίνες Röntgen αποτελούν ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία μικρού μήκους κύματος, στην περιοχή από 0.01 έως 10nm ή 0,1 - 10 Å κι ανακαλύφθηκαν από τον Wilhelm Conrad Röntgen, το 1895. Η μέση απόσταση μεταξύ ομοιοπολικά

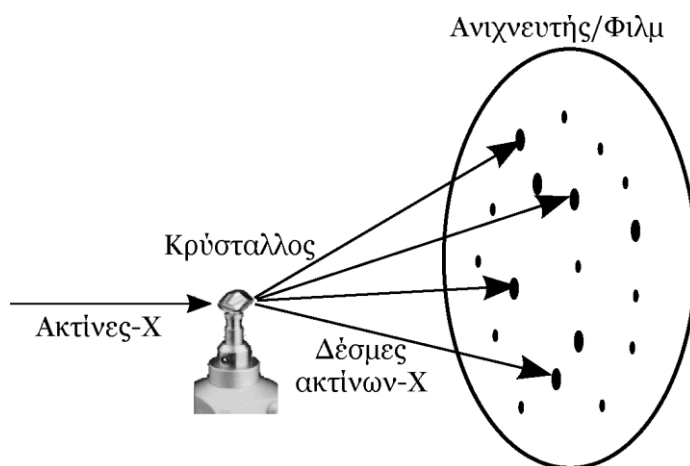
συνδεδεμένων ατόμων στα μόρια πρωτεΐνης είναι περίπου 1.4 Å, συνεπώς για να μπορέσουμε να διακρίνουμε άτομα (ατομική ευκρίνεια), είναι απαραίτητη η χρήση ακτινοβολίας ακτίνων Χ, λόγω του μικρού μήκους κύματος της, που είναι ανάλογο με τις αποστάσεις των ατόμων στα πρωτεϊνικά μόρια (Feiten et al., 2017). Όταν οι ακτίνες Χ περνούν μέσα από τον κρύσταλλο, αλληλεπιδρούν με τα ηλεκτρόνια των ατόμων που συνθέτουν τον κρύσταλλο. Οι ακτίνες Χ, όπως και κάθε ηλεκτρομαγνητικό κύμα, προκαλούν στα ηλεκτρικά φορτία δύναμη ανάλογη του ηλεκτρικού πεδίου της ακτινοβολίας. Αυτή η δύναμη επιταχύνει τα ηλεκτρόνια τα οποία, με τη σειρά τους, εκπέμπουν ακτινοβολία ίδιου μήκους κύματος προς όλες τις κατευθύνσεις. Το φαινόμενο αυτό είναι γνωστό ως "σκέδαση" (Rhodes, 1993). Οι δέσμες ακτίνων Χ (κύματα) που σκεδάζονται από τον πρωτεϊνικό κρύσταλλο προς κάποια συγκεκριμένη κατεύθυνση, γνωστές ως περιθλάσεις, είναι η υπέρθεση όλων των κυμάτων που εκπέμπονται από κάθε ηλεκτρόνιο του κρυστάλλου. Συνεπώς, το πειραματικό προϊόν της κρυσταλλογραφίας πρωτεϊνών είναι η κατανομή ηλεκτρονίων στη στοιχειώδη κυψελίδα (Γλυκος, 2015). Ένα πείραμα περίθλασης ακτίνων Χ μπορεί να συνοψιστεί στην υποβολή ενός κρυσταλλωμένου μακρομορίου σε ακτινοβολία γνωστού μήκους κύματος (Feiten et al., 2017).

Υπάρχουν δύο είδη πηγών ακτινοβολίας Χ, οι συμβατικές πηγές και οι συγχροτρονικές. Οι συμβατικές πηγές (γεννήτριες ακτίνων Χ) εκπέμπουν ακτίνες Χ τόσο λόγω της επιβράδυνσης (ακτινοβολία πέδησης) ηλεκτρονίων που προσπίπτουν με μεγάλη ταχύτητα σε μεταλικό στόχο, όσο και λόγω της αναδιάταξης των ηλεκτρονίων στις στοιβάδες των ατόμων του στόχου μετά από εκδίωξη ενός ηλεκτρονίου τους από το προσπίπτον ηλεκτρόνιο. Η ακτινοβολία πέδησης είναι συνεχούς φάσματος, ενώ εκείνη μετά από εκδίωξη και αναδιάταξη εμφανίζει έντονες χαρακτηριστικές κορυφές, και είναι εκείνη που αξιοποιείται σε πειράματα περίθλασης ακτίνων Χ. Από την άλλη, οι συγχροτρονικές πηγές, στις οποίες ηλεκτρικά φορτισμένα σωματάρια (ηλεκτρόνια, ποζιτρόνια) επιταχύνονται σε κυκλική τροχιά,, ώστε να αποκτήσουν ταχύτητες ανάλογες της ταχύτητας του φωτός, παράγουν ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία λόγω της συνεχούς μεταβολής της διεύθυνσης του διανύσματος της ταχύτητας των σωματιδίων ή και λόγω υποβολής τους σε κυματοειδή κίνηση (undulation) (Rhodes, 1993).

### **1.4.3. Συλλογή και ανάλυση κρυσταλλογραφικών δεδομένων**

Η κρυσταλλική δομή της πρωτεΐνης μπορεί να ληφθεί με την ανάλυση του μοτίβου περίθλασης που παράγεται από τον κρύσταλλό της. Αυτή η ανάλυση αποτελείται από τρία βασικά βήματα: α) συλλογή και επεξεργασία κρυσταλλογραφικών δεδομένων, β) προσδιορισμός της δομής μέσω μαθηματικών εξισώσεων (μετασχηματισμός Fourier) και γ) βελτιστοποίηση δομής (Refinement) (Feiten et al., 2017). Μια πηγή ακτίνων Χ, εκπέμπει ακτινοβολία που περνάει μέσα

από ένα πρωτεϊνικό κρύσταλλο και περιθλάται. Ένας ανιχνευτής ακτίνων Χ τοποθετημένος πίσω από τον κρύσταλλο, «συλλαμβάνει» τις ακτίνες που περιθλώνται. Να αναφερθεί σε αυτό το σημείο πως οι πρωτεϊνικοί κρύσταλλοι είναι αρκετά ευαίσθητοι στις ακτίνες Χ. Για την ελαχιστοποίηση της καταστροφής από την ακτινοβολία και την αύξηση της διάρκειας ζωής των κρυστάλλων, η συλλογή δεδομένων πραγματοποιείται κυρίως με κρυστάλλους που ψύχονται σε ρεύμα αζώτου, σε θερμοκρασία 100 K (κρυοκρυσταλλογραφία) (Feiten et al., 2017). Για την ανάκτηση της πληροφορίας σε τρεις διαστάσεις απαιτείται, η περιστροφή του πρωτεϊνικού κρυστάλλου γύρω από τον κάθετο, στις ακτίνες Χ, άξονα και η καταγραφή των δεδομένων περίθλασης από τον ανιχνευτή, για τη συλλογή ενός πλήρους συνόλου δεδομένων (data set). Ο κρύσταλλος τοποθετείται σε ένα γωνιόμετρο που βρίσκεται ανάμεσα στην πηγή ακτίνων Χ και στον ανιχνευτή. Η απόσταση μεταξύ του ανιχνευτή ακτίνων Χ και του κρυστάλλου πρέπει να ρυθμιστεί για να πλησιάσει όσο πιο κοντά στη δυνατή μέγιστη ευκρίνεια (resolution), η οποία εξαρτάται από την ποιότητα του κρυστάλλου και την ισχύ των ακτίνων Χ, αλλά και να μην πλησιάζει περισσότερο από όσο χρειάζεται για να μην συμπιέζεται το καταγεγραμμένο μοτίβο περίθλασης (Feiten et al., 2017). Το πειραματικό αποτέλεσμα, γνωστό ως περιθλασίγραμμα, παρέχει πληροφορίες για το πλάτος, το μήκος της διαδρομής και τη διεύθυνση διάδοσης των κυμάτων ακτίνων Χ που περιθλώνται. Όσο πιο έντονη είναι μια αμαύρωση σε ένα περιθλασίγραμμα, τόσο μεγαλύτερη η ένταση (και το πλάτος) των περιθλωμένων κυμάτων ακτίνων Χ (Εικόνα 23) (Γλυκος, 2015).



Εικόνα 23: Σχηματική αναπαράσταση πειράματος κρυσταλλογραφίας ακτίνων Χ (Γλυκος, 2015).

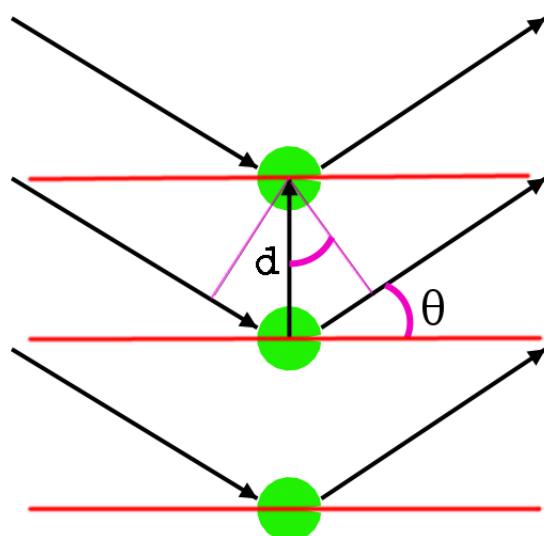
#### 1.4.4. Το πρόβλημα της φάσης

Η μεγάλη συχνότητα των ακτίνων Χ, καθώς και η έλλειψη φακών που να μπορούν να αλλάξουν σημαντικά τη διεύθυνση διάδοσης τους, καθιστούν πειραματικά αδύνατη την καταγραφή και τον προσδιορισμό της φάσης των κυμάτων που περιθλώνται. Για την ανάκτηση όμως του ειδώλου της πρωτεΐνης είναι απαραίτητος ο υπολογισμός των ιδιοτήτων του κύματος, δηλαδή το πλάτος, το μήκος, η διεύθυνση διάδοσης και η φάση του κύματος (Γλυκος, 2015). Το γεγονός αυτό αποτελεί τροχοπέδη στον προσδιορισμό της κρυσταλλικής δομής μέσω της κρυσταλλογραφίας ακτίνων Χ, ενώ αναφέρεται κι ως «πρόβλημα φάσης». Μπορούν να χρησιμοποιηθούν διαφορετικές πειραματικές τεχνικές για να λύσουν το «πρόβλημα της φάσης», επιτρέποντας τη δημιουργία της τρισδιάστατης πρωτεϊνικής δομής, όπως η πολλαπλή ισόμορφη αντικατάσταση (MIR), η ανώμαλη περίθλαση (MAD, SAD) και η μοριακή αντικατάσταση (MR) (Dauter & Wlodawer, 2016).

#### 1.4.5. Δείκτες Miller $h, k, \ell$

Η διεύθυνση του κάθε περιθλώμενου κύματος μπορεί να χαρακτηριστεί με τρεις ακέραιους αριθμούς, τους δείκτες  $h k \ell$ , ή δείκτες Miller. Οι δείκτες αυτοί χρησιμοποιούνται για την περιγραφή των κρυσταλλικών επιπέδων και διευθύνσεων ενός κρυσταλλικού πλέγματος. Η σταθερά  $h$  δίνει τον αριθμό των επιπέδων στον άξονα  $x$ , ή με άλλα λόγια σε πόσα τμήματα τέμνεται η πλευρά  $a$  της στοιχειώδους κυψελίδας από μια οικογένεια επιπέδων. Οι σταθερές  $k$  και  $\ell$ , δίνουν τον αριθμό των επιπέδων στους άξονες  $y$  και  $z$ , αντίστοιχα (Γλυκος, 2015).

#### 1.4.6. Νόμος του Bragg



Ο William L. Bragg έδειξε ότι οι ακτίνες Χ συμπεριφέρονται σαν «δημιουργοί» της απεικόνισης της κρυσταλλικής δομής, όταν αυτές περιθλώνται σε έναν κρύσταλλο. Οι προσπίπτουσες ακτίνες Χ σκεδάζονται από τα κρυσταλλικά επίπεδα, που προσδιορίζονται από τους δείκτες Miller  $h k \ell$ , με γωνία πρόσπτωσης  $\theta$ . Ενισχυτική συμβολή, εμφανίζεται μόνο όταν η διαφορά του μήκους της διαδρομής μεταξύ των περιθλώμενων ακτίνων, από παράλληλα κρυσταλλικά

επίπεδα, είναι μηδέν ή ίση με ακέραιο πολλαπλάσιο του μήκους κύματος  $\lambda$ . Όταν τα



κρυσταλλικά επίπεδα χωρίζονται με απόσταση  $d$ , η διαφορά μήκους διαδρομής είναι:  $2d \cdot \sin\theta$ . Έτσι, για να συμβεί ενισχυτική συμβολή θα πρέπει να ισχύει η σχέση:  $n\lambda = 2d \cdot \sin\theta$ , όπου  $\lambda$  το μήκος κύματος,  $n$  ακέραιος αριθμός,  $d$  η απόσταση των παράλληλων επιπέδων και  $\theta$  η γωνία πρόσπτωσης ή γωνία Bragg (Εικόνα 24). Ως συνέπεια του νόμου του Bragg, για να μπορέσουμε να «δούμε» τα μεμονωμένα άτομα σε μια κρυσταλλική δομή, το μήκος κύματος της ακτινοβολίας θα πρέπει να είναι παρόμοιο με τις δι-ατομικές αποστάσεις (συνήθως 1,5 Å) (Ilari & Savino, 2008).

#### 1.4.7. Χάρτες ηλεκτρονιακής πυκνότητας

Οι εικόνες που ανακτώνται από την περίθλαση ακτίνων-Χ, παρέχουν πληροφορίες για την κατανομή των ηλεκτρονίων στη στοιχειώδη κυψελίδα του *Εικόνα 24: Σχηματική απεικόνιση του νόμου του κρυστάλλου, κωδικοποιημένες σε Bragg (Γλυκος, 2015).* κατανομές έντασης των περιθλάσεων.

Με τη βοήθεια των μετασχηματισμών Fourier, οι πληροφορίες αυτές μπορούν να αποκωδικοποιηθούν, αποκαλύπτοντας τη δομή της κρυσταλλωμένης πρωτεΐνης. Ολόκληρο το κρυσταλλογραφικό πείραμα αποτελεί μία ανάλυση Fourier. Οι μετασχηματισμοί Fourier στηρίζονται στο γεγονός πως κάθε περιοδική συνάρτηση, όσο πολύπλοκη και να είναι, μπορεί να γραφεί σαν ένα άθροισμα απλών κυμάτων (Γλυκος, 2015). Πιο συγκεκριμένα, οι μετασχηματισμοί Fourier αποτελούν μια μαθηματική σχέση που συνδέει την ηλεκτρονιακή πυκνότητα με α) τα πλάτη των παραγόντων δομής (structure factors), που λαμβάνονται από την ένταση των κηλίδων (spots) στο περιθλασίγραμμα, και β) τη σχετική γωνία φάσης της κάθε αμαύρωσης. Καθώς οι ακτίνες Χ αλληλεπιδρούν με τα ηλεκτρόνια των ατόμων, η κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ δημιουργεί ένα χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας, ο οποίος εντοπίζει τα ηλεκτρόνια στην ασύμμετρη μονάδα του κρυστάλλου. Οι χάρτες ηλεκτρονιακής πυκνότητας είναι το πρώτο αποτέλεσμα των κρυσταλλογραφικών πειραμάτων, ενώ αποτελούν το μέσο όρο του χρόνου και του χώρου της ηλεκτρονιακής πυκνότητας των μορίων που υπάρχουν στον κρύσταλλο (Maveyraud & Mourey, 2020).

Ο βασικός χάρτης ηλεκτρονιακής πυκνότητας υπολογίζεται μέσω των μετασχηματισμών Fourier, με χρήση του συνόλου των πειραματικών πλατών των ανακλάσεων ( $F_{obs}$ ) και των φάσεων τους. Ωστόσο, επειδή οι φάσεις,  $\phi_{calc}$ , δεν είναι διαθέσιμες πειραματικά, υπολογίζονται από το τρέχον πρωτεϊνικό μοντέλο. Ένας τέτοιος χάρτης αντιπροσωπεύει μια προσέγγιση της πραγματικής δομής, ανάλογα με την ακρίβεια των υπολογιζόμενων φάσεων (Wlodawer et al., 2008).

Ένας άλλος τύπος χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας, ο χάρτης διαφοράς ηλεκτρονιακής πυκνότητας, υπολογίζεται χρησιμοποιώντας τις διαφορές μεταξύ των πειραματικών και των υπολογισμένων πλατών και φάσεων, ( $F_{obs} - F_{calc}$ ,  $\phi_{calc}$ ). Ο χάρτης αυτός, απεικονίζει τις διαφορές μεταξύ της πραγματικής δομής και της δομής-

μοντέλου. Σε έναν τέτοιο χάρτη, τα τμήματα που υπάρχουν στην πραγματική δομή, αλλά δεν περιλαμβάνονται στη δομή-μοντέλο, εμφανίζουν θετική ηλεκτρονιακή πυκνότητα, ενώ τα τμήματα που απουσιάζουν από την πραγματική δομή και εισάγονται λανθασμένα στη δομή-μοντέλο, εμφανίζουν αρνητική πυκνότητα (Wlodawer et al., 2008).

Παρόλα αυτά, συνήθως χρησιμοποιούνται οι χάρτες ( $2F_{obs} - F_{calc}$ ,  $\phi_{calc}$ ), που αντιστοιχούν σε μια υπέρθεση των δύο προηγούμενων χαρτών. Οι χάρτες αυτοί δείχνουν το χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας της δομής- μοντέλου καθώς και των χαρακτηριστικών αυτής, που απαιτούν διορθώσεις. Σε όλες τις περιπτώσεις, η ποιότητα των χαρτών ηλεκτρονιακής πυκνότητας εξαρτάται άμεσα από την ευκρίνεια των δεδομένων περίθλασης (Wlodawer et al., 2008).

#### 1.4.8. Παράγοντες κρυσταλλογραφικών δεδομένων

Η ποιότητα των πρωτεϊνικών κρυσταλλικών δομών εξαρτάται από την ποιότητα των δεδομένων περίθλασης που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό τους. Οι πιο σημαντικοί δείκτες ποιότητας των δεδομένων περίθλασης είναι η **ευκρίνεια (resolution)**, η **πληρότητα των δεδομένων (completeness)**, ο **λόγος  $I/\sigma(I)$**  και ο **δείκτης συμφωνίας  $R_{merge}$**  (Wlodawer et al., 2008).

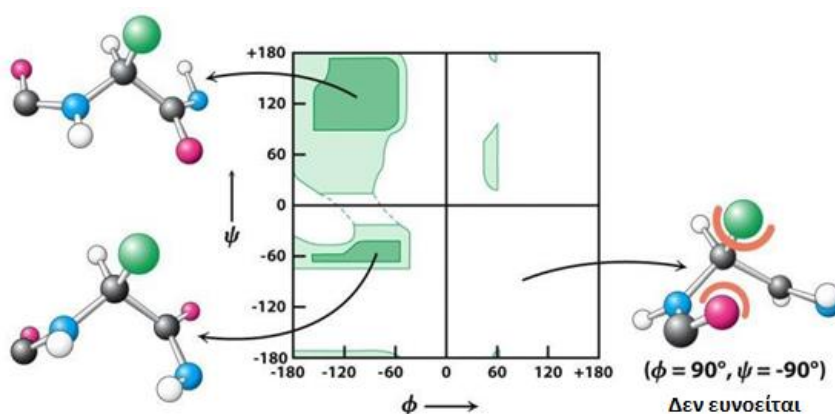
- **Ευκρίνεια (resolution):** Η ευκρίνεια είναι η ελάχιστη απόσταση ( $d$ ) των επιπέδων του κρυσταλλικού πλέγματος που εξακολουθούν να παρέχουν μετρήσιμη περίθλαση ακτίνων Χ. Η ευκρίνεια μετριέται σε Angstrom ( $\text{\AA}$ ) και καθορίζει τη μικρότερη δυνατή απόσταση μεταξύ των δομικών χαρακτηριστικών που μπορούν να διακριθούν, σε χάρτες ηλεκτρονιακής πυκνότητας. Όσο μεγαλύτερη είναι η ευκρίνεια, δηλαδή όσο μικρότερη είναι η απόσταση  $d$ , τόσο περισσότερες ανεξάρτητες περιθλάσεις είναι διαθέσιμες για τον προσδιορισμό της δομής και συνεπώς τόσο περισσότερες οι λεπτομέρειες της δομής που μπορούν να διακριθούν. Οι όροι που χρησιμοποιούνται συνήθως για το βαθμό της ευκρίνειας είναι «χαμηλή», «μέτρια», «υψηλή» και «ατομική». Οι πληροφορίες που παρέχονται από κρυσταλλικές δομές χαμηλής ευκρίνειας είναι ελάχιστες κι αφορούν κυρίως το σχήμα του μακρομορίου (Wlodawer et al., 2008).
- **Πληρότητα των δεδομένων (completeness):** Εάν η συλλογή κρυσταλλογραφικών δεδομένων δεν διεξαχθεί σωστά, ορισμένες περιθλάσεις ενδέχεται να μην μετρηθούν και τα δεδομένα δε θα είναι 100% πλήρη. Λόγω των ιδιοτήτων των μετασχηματισμών Fourier, κάθε τιμή του χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας υπολογίζεται σωστά, μόνο με τη συμβολή όλων των περιθλάσεων, επομένως η έλλειψη πληρότητας

επηρεάζει αρνητικά τόσο την ποιότητα, όσο και την ερμηνεία των χαρτών που υπολογίζονται από τέτοια ελλιπή δεδομένα. Για το λόγο αυτό, η πληρότητα των δεδομένων, δηλαδή η μέτρηση όλων των θεωρητικά πιθανών μοναδικών περιθλάσεων σε συγκεκριμένη ευκρίνεια, αποτελεί μια σημαντική παράμετρο της ποιότητας των δεδομένων (Wlodawer et al., 2008).

- Λόγος  $I/\sigma(I)$ : Η τιμή του δείκτη  $I/\sigma(I)$ , ορίζεται ως ο λόγος της έντασης της περιθλάσης προς την τυπική απόκλιση της. Το μέτρο αυτό δεν είναι πάντα απόλυτα έγκυρο. Το όριο περιθλάσης του κρυστάλλου ορίζεται κατά κανόνα σε εκείνη την ευκρίνεια, που ο παράγοντας  $I/\sigma(I)$  έχει τιμή ίση με 2. Τιμές του λόγου  $> 2$ , δηλώνουν ότι ο κρύσταλλος έχει δυνατότητα για περιθλάσεις υψηλότερη ευκρίνειας, αλλά αυτή περιορίζεται, λόγω των συνθηκών συλλογής, ενώ τιμές  $< 2$ , υποδεικνύουν την παρουσία σφάλματος (Wlodawer et al., 2008).
- Δείκτης συμφωνίας  $R_{merge}$ : Οι περισσότερες περιθλάσεις (με τις συμμετρικά τους ισοδύναμες) καταμετρώνται πολλές φορές και μετά από εφαρμογή όλων των απαιτούμενων διορθώσεων, οι εντάσεις τους συγχωνεύονται. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται «scaling & merging» και οδηγεί στη δημιουργία ενός συνόλου μοναδικών εντάσεων των περιθλάσεων, στο οποίο εμπεριέχεται και το ποσοστό σφάλματος τους. Πολλαπλές παρατηρήσεις μιας συγκεκριμένης περιθλάσης βοηθούν στον εντοπισμό και ενδεχομένως στην απόρριψη ακραίων τιμών, ωστόσο ο αριθμός των περιθλάσεων που απορρίπτονται πρέπει να είναι  $\leq 1\%$ . Ο παράγοντας  $R_{merge}$  εκτιμά το εύρος των εντάσεων των συμμετρικά ισοδύναμων περιθλάσεων, που συμβάλουν στη δημιουργία μιας μοναδικής περιθλάσης. Ένα σύνολο δεδομένων περιθλάσης για να είναι αποδεκτό, πρέπει η τιμή του  $R_{merge}$  να είναι  $< 4-5\%$ , για βελτιστοποιημένα συστήματα. Τέλος, ο δείκτης αυτός δεν αποτελεί τον πιο σημαντικό δείκτη, καθώς δε λαμβάνει υπόψη του την πολλαπλότητα των μετρήσεων (Wlodawer et al., 2008).

Ωστόσο, δείκτες της ποιότητας της κρυσταλλικής δομής (γωνίες, μήκη δεσμών, στερεοχημικά χαρακτηριστικά) κι έμμεσα της εγκυρότητας της ερμηνείας της (από το χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας), αποτελούν οι παράγοντες **R-factor** και  **$R_{free}$**  (Wlodawer et al., 2008). Μόλις καθοριστούν οι φάσεις, υπολογίζεται ο χάρτης ηλεκτρονιακής πυκνότητας και εν συνεχεία οπτικοποιείται χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα COOT, το οποίο επιτρέπει την ερμηνεία της πυκνότητας που επιτυγχάνεται με την κατασκευή ενός ατομικού μοντέλου που ταιριάζει στην ηλεκτρονιακή πυκνότητα (Emsley & Cowtan, 2004). Η διαδικασία βελτιστοποίησης της δομής (Refinement), στοχεύει στην εύρεση της καλύτερης «συμφωνίας» μεταξύ

του προτεινόμενου μοντέλου για τη δομή του μορίου πρωτεΐνης και της ηλεκτρονιακής του πυκνότητας. Αυτή η συμφωνία θα πρέπει να αντικατοπτρίζει την ισότητα μεταξύ των υπολογισμένων από το μοντέλο συντελεστών δομής ( $F_{calc}$ ) και των πειραματικών παραγόντων δομής ( $F_{obs}$ ). Ο ποιοτικός έλεγχος της διαδικασίας του Refinement γίνεται με τον υπολογισμό του δείκτη αξιοπιστίας, **R-factor**. Ο R-factor αποτελεί μέτρο της ομοιότητας, μεταξύ του χρησιμοποιούμενου κρυσταλλογραφικού μοντέλου και των πειραματικών δεδομένων περίθλασης ακτίνων Χ. Με άλλα λόγια, είναι ένα μέτρο του πόσο καλά η βελτιστοποιημένη δομή προβλέπει τα δεδομένα που παρατηρήθηκαν στο πείραμα περίθλασης ακτίνων Χ (Feiten et al., 2017). Για πρωτεϊνικές δομές που έχουν λυθεί σε ευκρίνεια περίπου 2 Å, αναμένεται ότι ο R-factor έχει τιμή περίπου 20%. Καθώς ο R-factor μπορεί να ελαχιστοποιηθεί τεχνητά με υπερβολική προσαρμογή (overfitting), ένα μικρό ποσοστό των περιθλάσεων εξαιρούνται από τη βελτιστοποίηση και χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό ενός νέου παράγοντα, που ονομάζεται δείκτης αξιοπιστίας,  $R_{free}$ . Συνήθως, οι τιμές του παράγοντα  $R_{free}$  είναι ελαφρώς υψηλότερες από αυτές του R-factor. Κατά κανόνα, η διαφορά μεταξύ τους δεν υπερβαίνει το 10% για βελτιστοποιημένες δομές υψηλής ευκρίνειας. Τα προγράμματα κατασκευής και βελτιστοποίησης δομών-μοντέλων προσφέρουν στατιστικά στοιχεία σχετικά με τη γεωμετρία της δομής συνήθως από το διάγραμμα Ramachandran (Εικόνα 25), το οποίο υποδεικνύει τις ευνοϊκές γωνίες  $\phi$  και  $\psi$  για την κύρια αλυσίδα της πρωτεΐνης. Καθώς οι δυσμενείς γωνίες  $\phi/\psi$  είναι σχεδόν απίθανες στις πρωτεϊνικές δομές, η διαδικασία κατασκευής και βελτίωσης του μοντέλου πρέπει να προσανατολιστεί προς την αποφυγή αυτών των διαμορφώσεων (Feiten et al., 2017).



Εικόνα 25: Σχηματική αναπαράσταση του Διαγράμματος Ramachandran (Berg et al., 2009).

### 1.5. Θερμιδομετρία Ισοθερμικής Τιτλοδότησης (Isothermal titration calorimetry, ITC)

Η θερμιδομετρία ισοθερμικής τιτλοδότησης, ή εν συντομία ITC, είναι μια ποσοτική μέθοδος μελέτης μοριακών αλληλεπιδράσεων (Pierce et al., 1999) και μπορεί να εφαρμοστεί στη μελέτη οποιασδήποτε διαμοριακής αλληλεπίδρασης με την προϋπόθεση ότι εκλύεται (εξώθερμη) ή προσλαμβάνεται (ενθόθερμη) θερμότητα κατά τη δέσμευση. Κατά τη διαδικασία του ITC, τα αλληλεπιδρώντα μόρια δεν καταστρέφονται και δε χρειάζεται να φέρουν ετικέτα σήμανσης, ενώ η τεχνική εκτελείται εξ ολοκλήρου σε διάλυμα (Conn, 2019). Το ITC αποτελεί τη μόνη τεχνική που μπορεί να μετρήσει απευθείας την ενέργεια δέσμευσης βιολογικών διεργασιών, συμπεριλαμβανομένων των αλληλεπιδράσεων: πρωτεΐνης-προσδέτη, πρωτεΐνης-πρωτεΐνης, DNA-πρωτεΐνης, πρωτεΐνης-υδατανθράκων, πρωτεΐνης-λιπιδίων και αντιγόνου-αντισώματος (Hawkes & Janata, 1973). Η τεχνική αυτή, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μέτρηση των θερμοδυναμικών παραμέτρων των βιομοριακών αλληλεπιδράσεων, συμπεριλαμβανομένης της σταθεράς σχηματισμού του μοριακού συμπλόκου ( $K_a$ ), της ενθαλπίας ( $\Delta H$ ), της στοιχειομετρίας της αντίδρασης ( $N$ ), της εντροπίας ( $\Delta S$ ) και της ελεύθερης ενέργειας της αλληλεπίδρασης ( $\Delta G$ ) και είναι η μόνη τεχνική που μπορεί να προσδιορίσει με ακρίβεια τόσες πολλές θερμοδυναμικές παραμέτρους από ένα και μόνο πείραμα (Leavitt & Freire, 2001; Dutta et al., 2015).

Όταν δύο πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν, προκαλούνται αλλαγές στις θερμοδυναμικές παραμέτρους του συστήματος, οι οποίες μπορούν να μετρηθούν απευθείας με τη μέθοδο ITC (Velazquez-Campoy et al., 2004). Αναλυτικότερα, όταν δύο πρωτεΐνες, A και B, αλληλεπιδρούν, σχηματίζουν ένα πρωτεϊνικό σύμπλοκο, το AB. Η αντίδραση αυτή, ορίζεται ως:  $A + B \leftrightarrow AB$ . Η σταθερά σχηματισμού του πρωτεϊνικού συμπλόκου  $K_a$ , ορίζεται ως:  $K_a = \frac{[AB]}{\{ [A] [B] \}}$  (1), ενώ η σταθερά διάστασης  $K_d$ , ορίζεται ως  $K_d = 1 / K_a$  (2). Σύμφωνα με τη θερμοδυναμική, η αλλαγή στην ελεύθερη ενέργεια  $\Delta G$ , κατά την αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών A και B ορίζεται ως:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (3), \text{ όπου:}$$

$\Delta H$ = μεταβολή της ενθαλπίας

T= απόλυτη θερμοκρασία, σε Kelvin

$\Delta S$ = μεταβολή της εντροπίας

Ακόμη, η σχέση μεταξύ της μεταβολής της ελεύθερης ενέργειας,  $\Delta G$  και της σταθεράς σχηματισμού του πρωτεϊνικού συμπλόκου  $K_a$ , μπορεί να περιγραφεί ως:

$$\Delta G = - RT \ln K_a \quad (4), \text{ όπου:}$$

R= σταθερά των αερίων

T=απόλυτη θερμοκρασία, σε K

**Ln**=φυσικός λογάριθμος

Συνδυάζοντας τις εξισώσεις (3) και (4), λαμβάνουμε την ακόλουθη εξίσωση για την αντίδραση αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών A και B:

$$\Delta H - T\Delta S = - RT \ln K_a \quad (5)$$

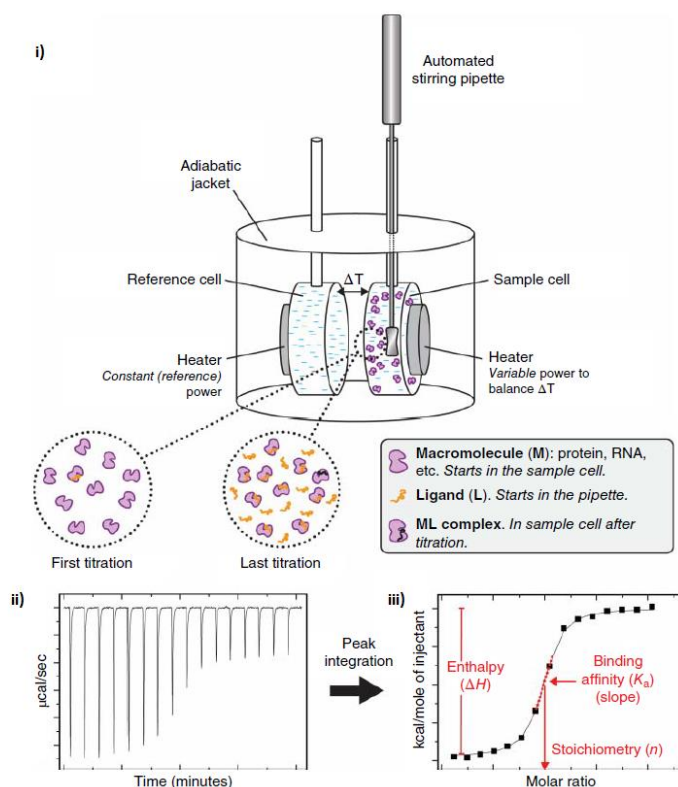
Σε ένα πείραμα ITC, το  $\Delta H$  της αλληλεπίδρασης μετράται απευθείας, από τη θερμότητα που απελευθερώνεται ή απορροφάται κατά την αλληλεπίδραση μεταξύ των πρωτεϊνών A και B. Επιπλέον, μπορούμε να υπολογίσουμε τη σταθερά  $K_a$ , μέσω προσαρμογής των πειραματικών δεδομένων του ITC. Επομένως, μπορούμε να υπολογίσουμε το  $\Delta S$  από την εξίσωση (5), καθώς και τη σταθερά διάστασης  $K_d$  από την εξίσωση (2), η οποία χρησιμοποιείται πιο συχνά από τη σταθερά  $K_a$ . Κατά κανόνα, αν η σταθερά διάστασης  $K_d$  έχει τιμές της τάξης των nM ( $10^{-9}$  M), τότε περιγράφει μια ισχυρή πρωτεϊνική αλληλεπίδραση, εάν όμως οι τιμές της είναι της τάξης των  $\mu$ M ( $10^{-6}$  M) ή της τάξης των mM ( $10^{-3}$  M), τότε αυτή περιγράφει μια μεσαία ή μια ασθενή αλληλεπίδραση, αντίστοιχα (Lin & Wu, 2019).

Η ενθαλπία της αλληλεπίδρασης αντικατοπτρίζει την ισχύ των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων (πχ υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις, δεσμοί υδρογόνου και ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις) σε σχέση με αυτών του διαλύτη ( $H_2O$ ), ενώ η εντροπία προκύπτει λόγω των αλλαγών στον περιορισμό/ελευθερία των ατόμων της κύριας και της πλευρικής αλυσίδας των πρωτεϊνών, καθώς και της αναδιάταξης ή απελευθέρωσης μορίων νερού και ιόντων (Dutta et al., 2015). Οι ενεργειακά ευνοϊκές αντιδράσεις αλληλεπίδρασης έχουν αρνητικές τιμές ελεύθερης ενέργειας,  $\Delta G = RT \ln K_d$ . (Pierce et al., 1999). Τέτοιες πληροφορίες είναι πολύ βασικές για την κατανόηση της σχέσης μεταξύ δομής, δυναμικής, θερμοδυναμικής και λειτουργίας των πρωτεϊνών, ενώ δε μπορούν να εντοπιστούν από την απλή μελέτη των πρωτεϊνικών δομών και μόνο, καθώς κι από συμβατικές μελέτες μεταλλαξιγένεσης (Dutta et al., 2015).

### *Αρχή της μεθόδου*

Το ITC αποτελεί μια σημαντική τεχνική για το χαρακτηρισμό των μοριακών αλληλεπιδράσεων και την κατανόηση της θερμοδυναμικής δέσμευσης βιολογικών μορίων και βιολογικών συστημάτων. Η θερμική ενέργεια που μετρείται, προέρχεται από τα συμβάντα αλληλεπίδρασης που προκύπτουν από μία ή πολλαπλές τιτλοδοτήσεις ενός μορίου αλληλεπίδρασης σε ένα άλλο (Prozeller et al., 2019). Συνοπτικά, η βασική αρχή της θερμοδομετρίας ισοθερμικής τιτλοδότησης περιγράφεται παρακάτω. Στο εσωτερικό ενός μικροθερμιδόμετρου ITC βρίσκονται δύο πανομοιότυποι θάλαμοι που περικλείονται σε ένα αδιαβατικό κέλυφος. Ο ένας περιέχει το διαλύτη των πρωτεϊνών και ονομάζεται θάλαμος αναφοράς (reference

cell) κι ο δεύτερος περιέχει το δείγμα κι ονομάζεται θάλαμος του δείγματος (sample cell), όπου και λαμβάνει χώρα το κυρίως πείραμα της θερμιδομετρίας (Εικόνα 26). Η διαφορά θερμοκρασίας μεταξύ του θαλάμου αναφοράς και του αδιαβατικού κελύφους παρακολουθείται συνεχώς για να διατηρείται σταθερή η θερμοκρασία. Ένα σύστημα ελέγχου ανάδρασης παρακολουθεί τη διαφορά θερμοκρασίας μεταξύ των δύο θαλάμων αναφοράς με έναν αισθητήρα ανίχνευσης που βρίσκεται ανάμεσα τους. Αυτή η διαφορά θερμοκρασίας διατηρείται σταθερή και όσο το δυνατόν πιο κοντά στο μηδέν. Οι αισθητήρες ανίχνευσης θερμότητας ανιχνεύουν τη διαφορά θερμοκρασίας μεταξύ των κυψελίδων όταν συμβαίνει αλληλεπίδραση μεταξύ των πρωτεϊνικών δειγμάτων στο θάλαμο του δείγματος και δίνουν σήμα στους θερμαντήρες, οι οποίοι αντισταθμίζουν αυτή τη διαφορά και επαναφέρουν τους θαλάμους σε ίση θερμοκρασία. Το σήμα ανάδρασης είναι το μετρούμενο σήμα. Μία εκ των δύο πρωτεϊνών της αλληλεπίδρασης, τοποθετείται στο θάλαμο του δείγματος, ενώ η δεύτερη στη σύριγγα έγχυσης. Κατά τη διάρκεια του πειράματος, πραγματοποιείται σταδιακή προσθήκη του δείγματος της σύριγγας (~10  $\mu$ L ανά έγχυση), στο θάλαμο του δείγματος (~1 mL), παράλληλα υπό συνεχή ανάδευση για ομοιόμορφη κατανομή των πρωτεϊνών στο διάλυμα. Ο θάλαμος αναφοράς χρησιμεύει μόνο ως αναφορά θερμοκρασίας. Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης που βρίσκεται στη σύριγγα πρέπει να είναι τουλάχιστον 10 φορές μεγαλύτερη από εκείνη που τοποθετείται στο θάλαμο του δείγματος, ώστε να επιτευχθεί κορεσμός στην αντίδραση αλληλεπίδρασης και να υπολογιστούν οι θερμιδομετρικές παράμετροι (Freyer & Lewis, 2008).



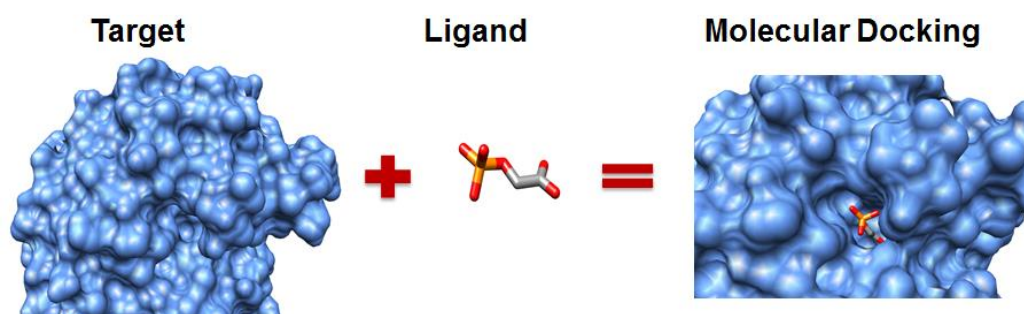
Εικόνα 26: Βασική αρχή λειτουργίας του μηχανήματος ITC. i) Στην εικόνα φαίνονται τα κύρια χαρακτηριστικά του μηχανήματος, όπως οι θάλαμοι αναφοράς (reference cell) και δείγματος (sample cell), η σύριγγα έγχυσης και το αδιαβατικό κέλυφος (adiabatic shield) που περικλείει τους δυο θαλάμους αναφοράς. ii) Τυπικό πείραμα ITC εξώθερμης αντίδρασης, όπου η θερμότητα εκλύεται, με αποτέλεσμα η ισχύς στο θερμαντήρα του θαλάμου του δείγματος να μειώνεται, για να επιτευχθεί εξισορρόπηση. iii) Τυπικό διάγραμμα ITC (Conn, 2019).

## 1.6. Μελέτες Πρόσδεσης (Docking)

Ο ελλιμενισμός (docking) αποτελεί μια υπολογιστική μέθοδο προσομοίωσης για την πρόβλεψη της τρισδιάστατης διαμόρφωσης ενός συμπλόκου μορίων. Το ένα μόριο ονομάζεται υποδοχέας και αποτελεί συνήθως μια πρωτεΐνη, ενώ το άλλο ονομάζεται προσδέτης και αποτελεί συνήθως ένα μικρό μόριο ή μια άλλη πρωτεΐνη (Hernandez-Santoyo et al., 2013). Οι τρισδιάστατες δομές των πρωτεϊνών (συντεταγμένες ατόμων) λαμβάνονται από την Τράπεζα Δεδομένων Πρωτεϊνών (PDB) σε αρχεία τύπου ".pdb" στην «αδέσμευτη» μορφή τους. Η μέθοδος αυτή, έχει ως στόχο να προβλέψει την «καλύτερη» δυνατή αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο μορίων (Εικόνα 27). Με άλλα λόγια, οι αλγόριθμοι του docking, για μια αλληλεπίδραση δυο μορίων, ελέγχουν αν τα μόρια αυτά μπορούν να αλληλεπιδράσουν μεταξύ τους, ενώ ταυτόχρονα προσπαθούν να βρουν τον προσανατολισμό εκείνο, όπου η ενέργεια του συμπλόκου είναι ελάχιστη. Για την πρόβλεψη της «σωστής» πρόσδεσης, ως βασικές πληροφορίες λαμβάνονται οι συντεταγμένες των ατόμων των μορίων που αλληλεπιδρούν, ενώ μπορούν να δοθούν και επιπλέον πληροφορίες, είτε βιοχημικές,



είτε φυσικοχημικές, όπως για παράδειγμα οι θέσεις πρόσδεσης (εάν είναι γνωστές), η θερμοκρασία, η ιοντική ισχύς κ.α. (Bonvin, 2006; Gray, 2006). Με την πάροδο των χρόνων το docking έχει εξελιχθεί σε μια ξεχωριστή υπολογιστική διαδικασία που συνδυάζει μια πληθώρα πληροφοριών και τεχνικών, από ένα μεγάλο φάσμα επιστημών, όπως των μαθηματικών, της πληροφορικής, της φυσικής, της χημείας και της βιολογίας, με απώτερο σκοπό την *in silico* μοντελοποίηση της συμπεριφοράς των μακρομορίων (Ritchie, 2008).



Εικόνα 27: Σχηματική απεικόνιση μιας μελέτης πρόσδεσης πρωτεΐνης-προσδέτη (Hernndez-Santoyo et al., 2013).

Η πρόβλεψη της δομής των συμπλόκων πρωτεΐνης-προσδέτη, χρησιμοποιώντας μελέτες πρόσδεσης είναι μια δύσκολη διαδικασία, κύριες προκλήσεις της οποίας αποτελούν η εύρεση των σωστών προβλέψεων της δομής και η σωστή διαχείριση της μοριακής ευλυγισίας και των αλλαγών στη διαμόρφωση των μορίων (Bonvin, 2006).

Διακρίνονται δύο είδη πρόβλεψης της διαμόρφωσης ενός συμπλόκου, το docking άκαμπτου σώματος (rigid docking) και το docking εύκαμπτου σώματος (flexible docking).

1. **Rigid docking:** Αυτή η προσέγγιση αντιμετωπίζει τόσο τον προσδέτη, όσο και τον υποδοχέα ως άκαμπτα/σταθερά μόρια και διερευνά μόνο έξι βαθμούς ελευθερίας μετατόπισης και περιστροφής, αποκλείοντας έτσι κάθε είδους ευλυγισία.
2. **Flexible docking:** Μια πιο κοινή προσέγγιση είναι να μοντελοποιήσουμε την ευλυγισία του προσδέτη, εικάζοντας ότι ο υποδοχέας μας (πρωτεΐνη) είναι σταθερός/άκαμπτος και λαμβάνοντας υπόψη μόνο το διαμορφωτικό χώρο του προσδέτη. Ιδανικά, ωστόσο, θα πρέπει επίσης να λαμβάνεται υπόψη και η ευλυγισία των πρωτεϊνών. Στο flexible docking με μικρούς προσδέτες μπορεί να επιτραπεί και η μεταβολή της δομής των πλευρικών αλυσίδων των αμινοξέων που συνιστούν τον θύλακα πρόσδεσης. (Hernndez-Santoyo et al., 2013).

Τα πρωτόκολλα docking μπορούν να περιγραφούν ως ένας συνδυασμός ενός αλγορίθμου αναζήτησης (search algorithm) και ενός αλγορίθμου βαθμολόγησης (scoring function). Ο αλγόριθμος αναζήτησης θα πρέπει να δημιουργήσει ένα βέλτιστο αριθμό διαμορφώσεων που να περιλαμβάνει όλους τους πειραματικά προσδιορισμένους τρόπους πρόσδεσης των μορίων. Αν κι ένας αυστηρός αλγόριθμος αναζήτησης θα έψαχνε όλους τους πιθανούς τρόπους πρόσδεσης των δύο μορίων, αυτή η αναζήτηση δε θα ήταν πρακτική λόγω του μεγέθους του χώρου αναζήτησης και του χρόνου που χρειάζεται για την ολοκλήρωσή της. Κατά συνέπεια, πραγματοποιείται δειγματοληψία μόνο ενός μικρού όγκου του συνολικού διαμορφωτικού χώρου κι επομένως πρέπει να εξισορροπηθεί το υπολογιστικό κόστος με τον όγκο του εξεταζόμενου χώρου αναζήτησης. Από την άλλη πλευρά, ο αλγόριθμος βαθμολόγησης αποτελείται από έναν αριθμό μαθηματικών μεθόδων που χρησιμοποιούνται για την πρόβλεψη της ισχύος της μη ομοιοπολικής αλληλεπίδρασης, που ονομάζεται συγγένεια δέσμευσης. Σε όλες τις υπολογιστικές μεθοδολογίες, σημαντικό πρόβλημα αποτελεί η ανάπτυξη μιας συνάρτησης βαθμολόγησης που να μπορεί να αξιολογήσει γρήγορα και με ακρίβεια τα υποψίφια μοντέλα συμπλόκων μεταξύ του υποδοχέα και του προσδέτη (Hernandez-Santoyo et al., 2013). Για τους λόγους αυτούς, απαιτείται πάντα ο συνδυασμός των καλύτερων αλγορίθμων αναζήτησης, με τους καλύτερους αλγόριθμους βαθμολόγησης, ώστε να επιτυγχάνεται η πιο «σωστή» πρόσδεση (Halperin et al., 2002).

Οι διάφοροι αλγόριθμοι docking κατατάσσουν τα μοντέλα που προκύπτουν χρησιμοποιώντας τους δικούς τους αλγόριθμους βαθμολόγησης. Ωστόσο, παρά τη χρήση βελτιστοποιημένων αλγορίθμων, εξακολουθεί να υπάρχει δυσκολία στον προσδιορισμό της βέλτιστης λύσης μέσα από έναν κατάλογο ψευδώς θετικών λύσεων. Γι' αυτό το λόγο, οι αλγόριθμοι docking χρησιμοποιούν πλέον μια διαδικασία δυο σταδίων αναζήτησης και βαθμολόγησης, όπου οι τεχνικές χρησιμοποιούνται *ab initio* για τη δημιουργία ενός αρχικού καταλόγου πιθανών τρόπων πρόσδεσης που κατόπιν βαθμολογούνται εκ νέου, με χρήση των διαθέσιμων βιοφυσικών πληροφοριών (data-driven docking) και πληροφοριών από μελέτες των υφιστάμενων διεπιφανειών επαφής των πρωτεϊνών (Ritchie, 2008).

### Η $pK_a$ , ως δείκτης αξιολόγησης των μοντέλων που προκύπτουν από τους αλγόριθμους docking

Η σύνδεση υποδοχέα-προσδέτη είναι υπεύθυνη για την αλλαγή του τοπικού περιβάλλοντος κάθε αμινοξικού κατάλοιπου, ειδικά εκείνων που βρίσκονται στην επιφάνεια διεπαφής. Ως «περιβάλλον» αναφέρεται η δομή και η ταυτότητα των υπολοίπων αμινοξέων που περιβάλλουν το υπό διερεύνηση κατάλοιπο, καθώς και τα επιμέρους φορτία τους. Οι αλλαγές αυτές, μπορεί να επηρεάσουν τις καταστάσεις πρωτονίωσης, επομένως και τα φορτία των αμινοξέων, που μπορούν να εκφραστούν

σε μετατοπίσεις των τιμών της  $pK_a$  τους. Ως « $pK_a$ » ορίζεται ο αρνητικός δεκαδικός λογάριθμος, της σταθεράς διάστασης οξέων ( $K_a$ ). Όσο χαμηλότερη είναι η τιμή της  $pK_a$ , τόσο πιο όξινο είναι το αμινοξικό κατάλοιπο (Alongi & Shields, 2010).

Οι τιμές της  $pK_a$  εξαρτώνται από το περιβάλλον των καταλοίπων. Όταν η πρωτεΐνη αναδιπλώνεται στο χώρο, αποκτώντας την τρισδιάστατη μορφή της, ορισμένα κατάλοιπα «θάβονται» μέσα της, ενώ άλλα βρίσκονται πιο κοντά στην επιφάνεια και έχουν πρόσβαση στο διαλύτη. Κάθε κατάλοιπο αλληλεπιδρά επίσης με άλλα κατάλοιπα, τα οποία μπορεί να είναι πιο αρνητικά ή πιο θετικά φορτισμένα. Κατά τη διάρκεια της αλληλεπίδρασης δύο πρωτεϊνών, η συνολική δομή τους αλλάζει, με αποτέλεσμα μια πιθανή αλλαγή στο περιβάλλον ορισμένων καταλοίπων. Διαφορετικά αμινοξέα μπορούν πλέον να είναι «θαμμένα» περισσότερο ή λιγότερο μέσα στις πρωτεΐνες. Ορισμένα δε, μπορεί να βρεθούν πιο κοντά σε διαφορετικά κατάλοιπα και να αλληλεπιδράσουν μαζί τους, αντί με αυτά που αλληλεπιδρούσαν όταν η πρωτεΐνη ήταν ακόμη ελεύθερη. Αυτές οι αλλαγές μπορεί να έχουν ως αποτέλεσμα τη μετατόπιση της  $pK_a$  ορισμένων αμινοξικών καταλοίπων. Κατά τη διάρκεια των τελευταίων ετών, έχουν διεξαχθεί πολλές μελέτες για το εάν η κατάσταση πρωτονίωσης, επομένως και οι τιμές  $pK_a$  των αμινοξέων, θα πρέπει να αλλάζουν κατά την αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών. Ορισμένες μελέτες υποστηρίζουν ότι λόγω των δομικών αλλαγών στις οποίες υποβάλλονται τα στοιχεία της πρωτεΐνης, οι τιμές  $pK_a$  των αμινοξέων τους θα πρέπει να αλλάζουν, όπως και το περιβάλλον τους. Ωστόσο, υπάρχουν αρκετοί ερευνητές, που μετά από πολλά πειράματα, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι οι αλληλεπιδράσεις, όπου η  $pK_a$  δεν αλλάζει, είναι πιο ευνοϊκές (Castaño & Maurer, 2015). Σε αντίθεση με τις αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-νουκλεϊκού οξέος ή πρωτεΐνης-μικρομορίου, η αλληλεπίδραση πρωτεΐνης-πρωτεΐνης δεν παρουσιάζει μεγάλες αλλαγές στη συνολική τιμή  $pK_a$ , σε σύγκριση με την αδέσμευτη κατάσταση του συμπλόκου. Η διαφορά στις δύο τιμές  $pK_a$  δε μπορεί ποτέ να είναι μηδέν, αλλά οι μικρές διαφορές είναι πιο ευνοϊκές από τις μεγάλες. Οι μετατοπίσεις  $pK_a$  των αμινοξέων κατά τις αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης, έχουν ως αποτέλεσμα μια αλλαγή της κατανομής του φορτίου των πρωτεϊνών κι επομένως και της συνολικής διπολικής ροπής (Castaño & Maurer, 2015). Στην παρούσα διατριβή, χρησιμοποιήσαμε αυτήν την παρατήρηση για να επιλέξουμε το καλύτερο μοντέλο ανάμεσα σε αυτά που προέκυψαν από τη χρήση διαφορετικών αλγόριθμων docking.

## 1.7. Προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής (Molecular Dynamic, MD)

### *Αρχή της μεθόδου*

Η Μοριακή Δυναμική (Molecular dynamics, MD) είναι μια υπολογιστική μέθοδος προσομοίωσης που μελετά τις φυσικές κινήσεις των ατόμων και των μορίων που συμβαίνουν σε μοριακά συστήματα, συναρτήσει του χρόνου, μέσω επίλυσης των

κινητικών εξισώσεων του Νεύτωνα (Hildebrand et al., 2019). Κάθε δυναμική διεργασία, για παράδειγμα η κίνηση, έχει μία χρονική κλίμακα, ένα πλάτος, καθώς κι ένα ενεργειακό εύρος. Οι πρωτεΐνες εμφανίζουν μεγάλο εύρος χαρακτηριστικών κινήσεων από τις ταλαντώσεις των ατόμων. Οι κινήσεις μπορεί να είναι πολύ γρήγορες (fs) και πολύ εντοπισμένες, έως και αργές που γίνονται στην κλίμακα ολόκληρου του μορίου ( $\mu\text{s}$ -ms). Πολλές από αυτές τις κινήσεις, διαδραματίζουν μείζονα ρόλο στη βιοχημική λειτουργία των πρωτεϊνών. Υπάρχουν δύο βασικές κατηγορίες ανάλυσης μοριακής δυναμικής, ανάλογα με το μοντέλο που έχει επιλεγεί για την αναπαράσταση ενός φυσικού συστήματος: α) οι αναλύσεις που κάνουν χρήση των νόμων της κλασικής μηχανικής και β) οι αναλύσεις που λαμβάνουν υπ' όψη τους την κβαντομηχανική φύση του χημικού δεσμού. Μέχρι σήμερα, πρακτικά εφαρμόσιμη σε προσομοιώσεις βιομοριακών συστημάτων είναι η κλασική μοριακή δυναμική. Σε αυτήν, η δυναμική κίνηση ενός μοριακού συστήματος αξιολογείται από τη συνολική του ενέργεια (Meller, 2001).

Η μοριακή δυναμική με λίγα λόγια, αναφέρεται στην αριθμητική επίλυση κλασικών εξισώσεων κίνησης για μια ομάδα ατόμων. Για να συμβεί αυτό, χρειαζόμαστε ένα νόμο που να αποκαλύπτει το πώς αλληλεπιδρούν τα άτομα μεταξύ τους στο σύστημα. Αυτό σε συνδυασμό με τις ατομικές θέσεις μπορεί να μας δώσει τη σχετική δυναμική ενέργεια, τις δυνάμεις στα άτομα και την πίεση στα τοιχώματα του δοχείου. Ακόμη, είναι απαραίτητη η ύπαρξη ενός αλγορίθμου, ο οποίος ενσωματώνει τις εξισώσεις κίνησης των ατόμων του συστήματος (Vlachakis et al., 2014). Για την επίλυση των εξισώσεων αυτών, απαραίτητη προϋπόθεση είναι η παροχή των αρχικών τιμών, όπως αρχικές θέσεις και ταχύτητες του κάθε ατόμου στο μοριακό σύστημα. Λαμβάνοντας υπόψη τις θέσεις όλων των ατόμων σε ένα βιομοριακό σύστημα (π.χ. μια πρωτεΐνη που περιβάλλεται από νερό), μπορεί να υπολογιστεί η δύναμη που ασκείται σε κάθε άτομο από τα υπόλοιπα άτομα του συστήματος. Έτσι, κάνοντας χρήση των νόμων κίνησης του Νεύτωνα μπορεί να προβλεφθεί η θέση κάθε ατόμου στο χώρο, συναρτήσει του χρόνου. Συγκεκριμένα, υπολογίζοντας επανειλημμένα τις δυνάμεις που ασκούνται σε κάθε άτομο και κατόπιν χρησιμοποιώντας αυτές τις δυνάμεις για την ενημέρωση της θέσης και της ταχύτητας κάθε ατόμου, η τροχιά που προκύπτει είναι μια τρισδιάστατη «ταινία» που περιγράφει τη διάταξη των ατόμων του συστήματος, σε κάθε σημείο, κατά τη διάρκεια του προσομοιωμένου χρονικού διαστήματος (Scott A. Hollingsworth & Ron O. Dror, 2018). Στις προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής, η κινητική ενέργεια του συστήματος εξαρτάται από τη θερμοκρασία του συστήματος, ενώ η ενέργεια αποτελεί το άθροισμα της κινητικής και δυναμικής ενέργειας των συνιστωσών του συστήματος. Η επιτάχυνση του κάθε ατόμου υπολογίζεται από το άθροισμα των δυνάμεων που δέχεται, σε συγκεκριμένο δυναμικό πεδίο (Vlachakis et al., 2014).

Εν κατακλείδι, ένα πρόγραμμα προσομοιώσεων Μοριακής Δυναμικής, χρησιμοποιεί μια συνάρτηση δυναμικού και υπολογίζει από τις τρέχουσες

συντεταγμένες των ατόμων σε κάθε στάδιο της προσομοίωσης και για κάθε άτομο, τη συνισταμένη δύναμη που ασκείται σε αυτό. Από τις δυνάμεις υπολογίζονται οι επιταχύνσεις και εν συνεχεία οι καινούργιες θέσεις και ταχύτητες για ένα χρονικό βήμα  $\Delta t$  (συνήθως 2 fs). Η διαδικασία αυτή συνεχίζεται για χιλιάδες ή εκατομμύρια βήματα. Αυτές οι προσομοιώσεις αποτελούν ένα πολύ ισχυρό εργαλείο, καθώς:

- α. Καταγράφουν τη θέση και την κίνηση κάθε ατόμου κάθε χρονική στιγμή, το οποίο είναι πολύ δύσκολο να πραγματοποιηθεί με οποιαδήποτε πειραματική τεχνική.
- β. Οι συνθήκες προσομοίωσης είναι γνωστές και μπορούν να ελεγχθούν, όπως για παράδειγμα η αρχική διαμόρφωση μιας πρωτεΐνης, ποιοι προσδέτες είναι συνδεδεμένοι σε αυτήν, αν έχει είτε μεταλλάξεις, είτε μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, ποια άλλα μόρια υπάρχουν στο περιβάλλον της, η κατάσταση πρωτονίωσης της, η θερμοκρασία κ.α. (Scott A. Hollingsworth & Ron O. Dror, 2018).

Ίσως η πιο βασική εφαρμογή της μοριακής δυναμικής είναι η αξιολόγηση της κινητικότητας ή της ευελιξίας διαφόρων περιοχών ενός βιομορίου. Οι πειραματικές μέθοδοι προσδιορισμού της δομής όπως η κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ και η κρυο-ηλεκτρονική μικροσκοπία αποδίδουν γενικά μια μέση δομή. Με τη μελέτη μιας προσομοίωσης τέτοιας δομής, μπορούν να βρεθούν οι περιοχές του μορίου που κινούνται σε ισορροπία και να ταυτοποιηθούν τα είδη δομικών μεταβολών που υφίστανται. Τέτοιες προσομοιώσεις αποκαλύπτουν επίσης τη δυναμική συμπεριφορά των μορίων του νερού και των ιόντων άλατος, τα οποία είναι συχνά κρίσιμα για τη λειτουργία των πρωτεϊνών και τη δέσμευση προσδετών. Ακόμη, οι προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής, χρησιμοποιούνται ευρέως για την κατασκευή ή τη βελτιστοποίηση δομικών μοντέλων, με βάση πειραματικά δεδομένα της δομικής βιολογίας. Οι κρυσταλλικές δομές ακτίνων Χ, για παράδειγμα, συχνά βελτιώνονται με ένα πρωτόκολλο προσομοίωσης που προσαρμόζει το μοντέλο στα πειραματικά δεδομένα διατηρώντας παράλληλα τη φυσική του δομή (Scott A. Hollingsworth & Ron O. Dror, 2018). Επιπλέον, οι προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη βελτιστοποίηση των μοντέλων που προκύπτουν από μελέτες πρόσδεσης, όπου οι αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-προσδέτη αναλύονται ως προς τη σταθερότητά τους (Vlachakis et al., 2014). Τέλος, μια ιδιαίτερα σημαντική εφαρμογή των προσομοιώσεων αυτών είναι να προσδιορίσει το πώς ένα βιομοριακό σύστημα θα ανταποκριθεί σε κάποια διαταραχή, όπως:

- α. Αφαίρεση ενός προσδέτη από μια πειραματικά καθορισμένη πρωτεϊνική δομή και κατόπιν προσομοίωση, για να δειχθεί πώς η απομάκρυνση του προσδέτη επηρεάζει τη διαμόρφωση της πρωτεΐνης.
- β. Αντικατάσταση ενός δεσμευμένου προσδέτη με έναν άλλο, ή προσθήκη ενός προσδέτη σε σημείο της δομής όπου δεν υπάρχει κάτι δεσμευμένο.

- γ. Μετάλλαξη ενός ή περισσότερων αμινοξέων στην πρωτεΐνη - για παράδειγμα, για να εξηγήσει ή να προβλέψει το λειτουργικό αποτέλεσμα μιας μετάλλαξης.
- δ. Φωσφορυλίωση ή αλλαγή της πρωτονίωσης αμινοξικών καταλοίπων κ.α.

Συγκρίνοντας προσομοιώσεις που εκτελούνται υπό διαφορετικές συνθήκες, μπορούμε να ταυτοποιήσουμε τα αποτελέσματα/συνέπειες μιας πληθώρας μοριακών διαταραχών. Σε κάθε μία από αυτές τις περιπτώσεις, θα πρέπει κατά κανόνα να εκτελούνται πολλές προσομοιώσεις τόσο των διαταραγμένων όσο και των μη διαταραγμένων συστημάτων προκειμένου να εντοπιστούν σταθερές διαφορές στα αποτελέσματα (Scott A. Hollingsworth & Ron O. Dror, 2018).

## **2. ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΜΕΛΕΤΗΣ**

Ο πρωταρχικός στόχος της διδακτορικής διατριβής είναι η αποκάλυψη των κυτταρικών λειτουργιών της hAng και η αξιοποίηση των πληροφοριών που θα προκύψουν στην ανακάλυψη νέων αντικαρκινικών παραγόντων. Πιο συγκεκριμένα, η διδακτορική διατριβή εστιάζεται κυρίως στην αποκάλυψη των μοριακών στοιχείων που διέπουν την αλληλεπίδραση της hAng με το PCNA. Η αναγνώριση και η ταυτοποίηση των πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με την hAng μπορεί να βοηθήσει στην καλύτερη κατανόηση των βιολογικών της ρόλων, καθώς και των μηχανισμών δράσης της. Για το σκοπό αυτό, στο πλαίσιο της διατριβής, οι μοριακές λεπτομέρειες της αλληλεπίδρασης της hAng με το PCNA προσδιορίστηκαν με το συνδυασμό διάφορων τεχνικών βιοφυσικής.

Επιπροσθέτως, έχειδειχθεί πως η φωσφορυλίωση των καταλοίπων Ser28, Thr36, Ser37 και Ser87 παρέχει στην hAng τη δυνατότητα να αποφεύγει τον κυτοσολικό αναστολέα ριβονουκλεασών (RI) και να εισέρχεται στον πυρήνα. Στο πλαίσιο της διατριβής διερευνάται η συμβολή των καταλοίπων αυτών στη δομή της hAng με στόχο την αποκάλυψη δομικών μεταβολών που ενδεχομένως να σχετίζονται με την παρεμπόδιση της αλληλεπίδρασης hAng και RI.

### 3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 3.1 Υλικά

##### *Αντιδραστήρια*

a-D-Glucose 1-phosphate dipotassium salt hydrate	SIGMA
Acetic Acid	Merck
Acetonitrile	CARLO ERBA Reagents-SDS
Acrylamide	SERVA
Adenosine 5'-monophosphate monohydrate	SIGMA
Adenosine 5'-triphosphate disodium salt hydrate	SIGMA
Agarose	SIGMA
Ammonium di-Hydrogen phosphate	SIGMA
Ammonium Persulfate (APS)	SIGMA
Ammonium sulfate	CHEM-LAB
Ampicillin	SERVA
$\beta$ -Mercaptoethanol	SIGMA
Bis Acrylamide	SERVA
Bovine Serum Albumin (BSA)	New England Biolabs
Bradford protein assay	Bio-rad
Bromophenol Blue	Research organics
Calcium Chloride dehydrate	Merck
Cloning primers for hAng gene (Forward, Reverse)	VBC Biotech
Coomassie Brilliant Blue R-250	Fluka
Deoxycholic acid Na-salt	SERVA
Dimethyl Sulfoxide (DMSO)	Merck
diPotassium Hydrogen Phosphate	Panreac
diSodium Hydrogen Phosphate	Merck
ECL	GenScript
EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid)	Panreac
Ethanol Absolute	SIGMA
Formaldehyde	Applichem
Glycerol	Panreac
Glycine	Biochemica



Guanidine Hydrochloride	SIGMA
Hepes	SIGMA
Hexylene Glycol (MPD)	SIGMA
Hydrochloric Acid (HCl)	Merck
In-Fusion <sup>®</sup> HD cloning kit	Clontech
Iron (III) Chloride	SIGMA
Isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside(IPTG)	Serva
Kanamycin monosulphate	Applichem
L-Arginine Hydrochloride	Serva
L- Glutathione reduced (GSH) Biochemica	Applichem
L- Glutathione oxidized (GSSG) Biochemica	Applichem
Lanthanum Nitrate	SIGMA
LB Agar	SIGMA
LB Broth	Merck
Lithium sulfate	SIGMA
M9 salts 5x	SIGMA
Magnesium chloride Hexahydrate (MgCl <sub>2</sub> •6H <sub>2</sub> O)	Panreac
Magnesium sulphate Heptahydrate	Applichem
Malic acid	SIGMA
Methanol	Applichem
Molecular Dimensions kits	Molecular Dimensions
Nonidet™ P 40	SIGMA
NucleoSpin <sup>®</sup> Gel and PCR Clean-up	MACHEREY-NAGEL
NucleoSpin <sup>®</sup> Plasmid kit	MACHEREY-NAGEL
NucleoSpin <sup>®</sup> TriPrep DNA, RNA, and protein purification	MACHEREY-NAGEL
Paraformaldehyde	SIGMA
Perchloric acid	FLUKA
Pink prestained protein marker	Nippon Genetics
PMSF (phenylmethanesulfonylfluoride)	Applichem
Polyethylene Glycol (PEG) 3350	SIGMA
Polyethylene Glycol (PEG) 4000	FLUKA
Polyethylene Glycol (PEG) 400	SIGMA
Potassium Chloride (KCl)	Merck

Potassium diHydrogen Phosphate	Merck
Powdered milk low fat	-
Protein A/G Plus-Agarose, Immunoprecipitation reagent	Santa Cruz
Protein G Plus-Agarose, Immunoprecipitation reagent	Santa Cruz
Protease inhibitor cocktail tablets, EDTA-free	Roche
Protein marker	Nippon Genetics
Ribonucleic acid, transfer from baker's yeast ( <i>S. cerevisiae</i> )	SIGMA
SDS (Sodium dodecyl Sulfate)	SERVA
Silver Nitrate (AgNO <sub>3</sub> )	Panreac
Sodium Acetate	Merck
Sodium Azide	Riedel de Haën
Sodium Bicarbonate (NaHCO <sub>3</sub> )	Merck
Sodium Cacodylate	SIGMA
Sodium Carbonate Anhydrous (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	Panreac
Sodium Chloride (NaCl)	Applichem
Sodium Citrate	Applichem
Sodium diHydrogen Phosphate	Merck
Sodium Hydroxide (NaOH)	Merck
Sodium Potassium Tartrate	SIGMA
Sodium Thiosulfate pentahydrate (Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )	ChemLab
Sucrose	Duchefa Biochemie
TEMED (N,N,N',N' -tetramethylethylenediamine)	Research organics
Tetracycline	SIGMA
Thiamine hydrochloride	SIGMA
Trifluoroacetic acid (TFA)	SIGMA
Tris Base	Merck
Triton X-100	Merck
Tryptone	Fluka
Tween- 20	Biochemica
Water for Injection	Bioser
Xylene Cyanol	Merck
Yeast extract	SERVA
2-propanol	SIGMA

<sup>15</sup> NH <sub>4</sub> Cl	SIGMA
<sup>15</sup> N Bioexpress	SIGMA

## Υλικά

Amicon® Ultra-15 Centrifugal Filter Unit. 10 kDa MWCO	Millipore
Cell Scrapers	Orange Scientific
Cover Glass 13 mm	VWR
CrystalClear Sealing Tape (2 Inch wide)	Hampton Research
Disposable Serological Pipette sterile 10 mL, 5 mL, 2 mL	CORNING
Falcons (50 mL, 15 mL)	CORNING
Flasks (75 cm <sup>2</sup> -25 cm <sup>2</sup> ) cap filtered	Orange Scientific
GE Bayer Silicone Grease	Jena Bioscience
Membrane dialysis tubing 7000 cutoff	SERVA
Micro Tubes (1.5 mL)	AHN Biotechnologie GmbH
Microscope slides SuperFrost® BLAU	Carl Roth GmbH
Minisart filters 0.45 µm	Sartorius
Minisart filters 0.2 µm	Sartorius
Mounted LithoLoops	Molecular Dimensions
PELLICON XL FILTER	Millipore
PVDF membrane	MACHEREY-NAGEL
Siliconized Glass Circle Cover Slides, 22 mm	Hampton Research
Tips (0.1-10 µL, 10-200 µL, 200-1000 µL)	Gilson
Whatman 3MM paper	Whatman International Ltd Kent, England
24 well crystallization plates, sitting - hanging	Hampton Research
96 well crystallization plates, sitting x 2 drops	Douglas Instruments
Κυψελίδα χαλαζία	Hellma Analytics
Κυψελίδες πλαστικές	Eppendorf

## Ένζυμα

Benzonase	SIGMA
Bovine pancreatic RNase A (type XII-A)	SIGMA
DNase I (RNase-free)	NEW ENGLAND BioLabs
KAPA HiFi HotStart ReadyMix PCR Kit	Kapa Biosystems
KAPA Taq PCR kit	Kapa Biosystems
KAPA™ SYBR® FAST qPCR Kit	Kapa Biosystems
Phusion HiFi DNA polymerase	Thermo
Lysozyme	Applichem
T4 DNA ligase kit	Takara Bio

## Αντισώματα

Αντίσωμα ελέγχου ποντικού IgG (normal mouse IgG)	Santa Cruz
Δεύτερο αντίσωμα goat anti-mouse IgG-HRP	Santa Cruz
Δεύτερο αντίσωμα goat anti-rabbit IgG-HRP	Santa Cruz
Δεύτερο αντίσωμα donkey anti-mouse IgG, Alexa Fluor® 546 (κόκκινο)	Life Technologies
Δεύτερο αντίσωμα donkey anti-rabbit (H+L) IgG, Alexa Fluor® 488 (πράσινο)	Life Technologies
Μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι ανθρώπινης αγγειογενίνης (hAng) (ANG I (C-1))	Santa Cruz
Μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι πυρηνικού αντιγόνου πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων (PCNA - PC10)	Santa Cruz
Πολυκλωνικό αντίσωμα κονίκλου έναντι ανθρώπινης αγγειογενίνης (hAng) (ANG I (H-123))	Santa Cruz

## Ένζυμα περιορισμού και διαλύματα πέψης

BsaI	NEW ENGLAND BioLabs
EcoRI	Takara Bio
EcoRI-HF	NEW ENG LAND BioLabs

NcoI-HF	NEW ENGLAND BioLabs
NEBuffer 4	NEW ENGLAND BioLabs
CutSmart Buffer	NEW ENGLAND BioLabs

### **Πλασμιδιακοί φορείς**

pET-28a	Novagen
pFLAG-CMV-2	SIGMA
pcDNA4-TO	Invitrogen

### **Βακτηριακά στελέχη *E.coli***

BL21- Gold (DE3)	Agilent Technologies
<i>Rosetta 2</i>	Novagen
<i>XL1 Blue</i>	Agilent Technologies

### **Στήλες υγρής χρωματογραφίας**

HiPrep SP FF 16/10	GE Healthcare
Resource RPC 18	GE Healthcare
HiTrap TALON Crude	GE Healthcare
Protino GST 4B	Macherey-Nagel
HiTrap Heparin HP	GE Healthcare
Superdex S200	GE Healthcare

### **Όργανα**

ÄKTA purifier (FPLC system)	GE Healthcare Life Sciences
BioPhotometer	Eppendorf
Mastercycler gradient (for PCR)	Eppendorf
Robot OryxNano	Douglas Instruments Ltd
SemiDry Blotter	Wealtec Corp.
Shaking Incubator	LabTech

Nano ITC	TA Instruments
SpeedVac concentrator-Savant SPD1010	Thermo
Ultrasonic processor UP400S (400 W, 24kHz)	Hielscher
UV-1600 PC Spectrophotometer	VWR
WiseStir HS-30E homogenizing stirrer	VWR
Αναλυτικός ζυγός	Kern & Sohn GmbH
Απαγωγός κατακόρυφης νηματικής ροής (AV-30/70, κυτταροκαλλιέργειες)	TELSTAR
Αυτόματες πιπέτες	Gilson, Eppendorf
Επωαστήρες 37 °C	Binder
Επωαστήρας CO <sub>2</sub> (Galaxy 170S)	New Brunswick
Κάθετη συσκευή ηλεκτροφόρησης	BioRad
Μετρητής pH	Metrohm
Μικροσκόπιο	A. Krüss Optronik GmbH
Μικροσκόπιο φθορισμού	Zeiss AxioVert 200
Στερεοσκόπια	Olympus TL2, LEICA (MZ6)
Σύστημα απεικόνισης (FluorChem <sup>TM</sup> E)	Protein Simple
Υδατόλουτρο	Wisebath
Φυγόκεντροι	Eppendorf Centrifuge 5810R, HermLe Z36HK Hitachi

## 3.2 Μέθοδοι

### 3.2.1 Δημιουργία μεταλλαγμάτων της hAng με τη μέθοδο της κατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης (Site Direct Mutagenesis, SDM)

#### Αρχή της μεθόδου

Η νουκλεοτιδική αλληλουχία ενός κλωνοποιημένου τμήματος DNA μπορεί να αλλάξει κατά βούληση μέσω της στοχευμένης μεταλλαξιγένεσης χρησιμοποιώντας συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια. Η πιο κοινή προσέγγιση είναι να γίνει χρήση ενός ολιγονουκλεοτιδίου συμπληρωματικού προς ένα τμήμα του DNA μήτρα, αλλά να εμπεριέχει μια εσωτερική αναντιστοιχία στο σημείο όπου θα δημιουργηθεί η μετάλλαξη. Εκτός της δημιουργίας μεταλλάξεων ενός νουκλεοτιδίου, αυτή η προσέγγιση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη δημιουργία πολλαπλών μεταλλάξεων, ενθέσεων και απαλείψεων (Carter, 1986).

Η κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση είναι η πλέον ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος για την *in vitro* εισαγωγή σημειακών μεταλλάξεων σε επιθυμητά γονίδια. Η SDM χρησιμοποιεί ολιγονουκλεοτιδικούς εκκινητές σχεδιασμένους ειδικά ώστε να περιέχουν την επιθυμητή μετάλλαξη και με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR), εισάγει τη μετάλλαξη στο γονίδιο-στόχο. Πιο συγκεκριμένα, σημειακές μεταλλάξεις μπορούν να εισαχθούν σε γονίδια εντός πλασμιδίων με χρήση 2 εκκινητών που φέρουν την επιθυμητή μετάλλαξη και συνήθως είναι συμπληρωματικοί, δηλαδή υβριδίζονται στην ίδια ακριβώς αλληλουχία, ο ένας στην κωδική και ο άλλος στη μη κωδική αλυσίδα. Η αντίδραση ενίσχυσης γίνεται σε δυο ξεχωριστές αντιδράσεις PCR, ενώ και στις δυο αντιδράσεις το εκμαγείο είναι το πλασμίδιο που περιέχει το γονίδιο-στόχο. Στη μια αντίδραση χρησιμοποιείται ο εκκινητής που υβριδίζεται στην κωδική αλυσίδα και στη δεύτερη ο εκκινητής που υβριδίζεται στη μη κωδική αλυσίδα. Στη συνέχεια, γίνεται μια τρίτη αντίδραση υβριδοποίησης των ενισχυμένων προϊόντων που προέκυψαν από τις δυο πρώτες αντιδράσεις PCR (δηλαδή τις δυο αλυσίδες του πλασμιδίου) και τέλος γίνεται πέψη με το περιοριστικό ένζυμο DpnI, το οποίο αναγνωρίζει και «κόβει» μεθυλιωμένες βάσεις, απομακρύνοντας έτσι το DNA εκμαγείο κι αφήνοντας ολόκληρο, μόνο το πλασμίδιο που προέκυψε από τη διαδικασία της SDM (Mutagenesis, 2008; Wan et al., 2012).

Δημιουργήθηκαν τέσσερα μονά μεταλλάγματα της hAng με τη μέθοδο της στοχευμένης μεταλλαξιγένεσης. Στον Πίνακα 8, φαίνονται οι ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για να γίνουν οι στοχευμένες μεταλλάξεις, οι οποίοι σχεδιάστηκαν κάνοντας χρήση του διαδικτυακού προγράμματος Primer X (Lapid & Gao, 2003). Ο πλασμιδιακός φορέας που χρησιμοποιήθηκε στην προκειμένη περίπτωση ως εκμαγείο είναι ο pET-28a στον οποίο βρίσκεται και το cDNA του

γονιδίου της hAng (pET-28a-hAng). Πιο συγκεκριμένα, μεταλλάχθηκαν 3 κατάλοιπα σερίνης (Ser, S) που βρίσκονται στις θέσεις 28, 37 και 87 αντίστοιχα προς το αμινοξύ αλανίνη (Ala, A). Επιπρόσθετα, μεταλλάχθηκε και ένα κατάλοιπο θρεονίνης (Thr, T) στη θέση 36 προς αλανίνη, ενώ σχεδιάστηκαν και κατασκευάστηκαν επίσης, πλασμίδια για την ετερόλογη έκφραση δύο ακόμη μεταλλαγμένων μορφών της hAng, μία με τριπλή μετάλλαξη (hAng S28AT36AS37A) και μια με τετραπλή (hAng S28AT36AS37AS87A), όπου τα παραπάνω κατάλοιπα αντικαταστάθηκαν εξίσου από αλανίνη.

Πίνακας 8: Εκκινητές για την εισαγωγή μεταλλάξεων στην αλληλουχία της hAng.

Μετάλλαξη	Κατεύθυνση	Αλληλουχία εκκινητή	Tm (°C)	GC %
S28A	FW	GATCGT TACTGCGAA <b>GCG</b> ATTATGAGACGC	76,5	50
	REV	GCGTCTCATAATCGCTTCGCAGTAACGATC		
T36A	FW	GACGCCGTGGGTTA <b>GCG</b> AGTCCGTGCAAAG	74,8	63,3
	REV	CTTTGCACGGACTCGCTAACCCACGGCGTC		
S37A	FW	CGCCGTGGGTTAACT <b>GCG</b> CCGTGCAAAGATATC	75,8	57,6
	REV	GATATCTTTGCACGGCGCAGTTAACCCACGGCGG		
S87A	FW	CTTCATGGGGGA <b>GCG</b> CCGTGGCCGCC	75,1	76,8
	REV	GGCGGCCACGGCGCTCCCCATGAAG		

Η αντίδραση της PCR γίνεται σε συνθήκες ευνοϊκότερες από ότι συμβαίνει συνήθως (αυξημένος χρόνος υβριδοποίησης και επέκτασης, χαμηλή θερμοκρασία υβριδοποίησης), καθώς οι εκκινητές έχουν ανόμοια νουκλεοτίδια σε σχέση με το DNA μήτρα. Στους Πίνακες 9 και 10, παρατίθεται η αντίδραση PCR της στοχευμένης μεταλλαξιγένεσης στην hAng, καθώς και το θερμικό πρότυπο αυτής.

Πίνακας 9: Αντίδραση PCR στοχευμένης μεταλλαξιγένεσης στην hAng.

Αντιδραστήρια	Όγκος, μL
2× KAPA HiFi HotStart Ready Mix	22
Εκκινητής (10μM) <sup>1</sup>	1,3
Πλασμιδιακό DNA	1,5
ddH <sub>2</sub> O	22,2
Τελικός όγκος αντίδρασης, V <sub>τελ</sub>	50



Πίνακας 10: Θερμικό πρότυπο της αντίδρασης PCR.

Στάδιο	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος	Συνθήκες αντίδρασης
Αρχική αποδιάταξη	95	3 min	10 κύκλοι αντίδρασης
Αποδιάταξη	98	20 s	
Υβριδοποίηση	68	1 min	
Επέκταση	72	8 min	

Κατόπιν, οι αντιδράσεις των PCR, για τους επιμέρους εκκινητές, ενώνονται σε μια αντίδραση, η οποία λαμβάνει χώρα σε ακόμη πιο ευνοϊκές συνθήκες (Πίνακας 11), ενώ προστίθεται κι ένα ακόμη βήμα τελικής επέκτασης.

Πίνακας 11: Θερμικό πρότυπο της αντίδρασης PCR.

Στάδιο	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος	Συνθήκες αντίδρασης
Αρχική αποδιάταξη	95	3 min	15 κύκλοι αντίδρασης
Αποδιάταξη	98	20 s	
Υβριδοποίηση	65	1 min	
Επέκταση	72	8 min	
Τελική επέκταση	72	20 min	

Τέλος, για να διαχωρίσουμε στο δείγμα τους κλώνους που περιέχουν τη νέα αλληλουχία που προστέθηκε μέσω των εκκινητών, γίνεται πέψη με το ένζυμο Dpn1 (Πίνακας 12).

Πίνακας 12: Τα επιμέρους συστατικά της αντίδρασης πέψης με το ένζυμο Dpn1.

Αντιδραστήρια	Όγκος, $\mu\text{L}$	Συνθήκες
Dpn1	1	37°C/ 5h
rCutSmart™ Buffer	5	
Αντίδραση μεταλλαξιγένεσης	44	

Ντελ	50	
------	----	--

Εν συνεχεία, το DNA κατακρημνίζεται με αιθανόλη. Πιο συγκεκριμένα, στο διάλυμα της αντίδρασης προστίθενται σε τελική συγκέντρωση 0.25 M NaCl και κατόπιν τρεις όγκοι παγωμένης αιθανόλης. Το δείγμα αναδεύεται έντονα και καταψύχεται (-80° C) για 30 min. Ακολουθεί φυγοκέντρηση (15000 rpm/4° C/30 min) και το υπερκείμενο απορρίπτεται προσεκτικά. Ακολούθως, προστίθεται παγωμένη αιθανόλη 70% (v/v) και το δείγμα υποβάλλεται σε φυγοκέντρηση (15000 rpm/4° C/5 min). Το υπερκείμενο απορρίπτεται και πάλι, ενώ το δείγμα αφήνεται να στεγνώσει μέχρι να εξατμιστεί η αιθανόλη. Το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται σε 10 µL υπερκαθαρού ύδατος. Τέλος, γίνεται εισαγωγή του ανασυνδυασμένου φορέα σε επιδεκτικά βακτηριακά στελέχη *E. coli X11-Blue* και ακολούθως απομόνωση του πλασμιδίου με το kit Nucleo-sprin plasmid (Macherey- Nagel). Τα πλασμίδια που συλλέγονται στέλνονται για αλληλούχιση, ώστε να επιβεβαιωθεί η επιτυχία της SDM.

### 3.2.2 Ετερόλογη έκφραση και καθαρισμός των μεταλλαγμάτων της ανθρώπινης αγγειογενίνης, hAng S28AT36AS37A και hAng S28AT36AS37AS87A

#### 3.2.2.1. Υπερέκφραση των μεταλλαγμάτων hAng S28AT36AS37A και hAng S28AT36AS37AS87A

##### Μετασηματισμός κυττάρων υπερέκφρασης *E. coli BL21-Gold (DE3)*

Τα πλασμίδια τόσο του τριπλού όσο και του τετραπλού μεταλλάγματος της ανθρώπινης αγγειογενίνης (pET-hAng S28AT36AS37A και pET-hAng S28AT36AS37AS87A αντίστοιχα), των οποίων η αλληλουχία επιβεβαιώθηκε μέσω αλληλούχισης, εισάγονται σε δεκτικά κύτταρα *E. coli BL21-Gold (DE3)* για την υπερέκφραση των μεταλλαγμένων πρωτεϊνών. Πιο αναλυτικά:

- ✓ Το εναίωρημα (100 µL) των επιδεκτικών βακτηριακών κυττάρων τοποθετείται στον πάγο, για 1-2 λεπτά, μέχρι να ξεπαγώσει.
- ✓ Αμέσως μόλις ξεπαγώσει, προστίθενται σε αυτό 1-100 ng πλασμιδιακού φορέα που φέρει το επιθυμητό γονίδιο.
- ✓ Εν συνεχεία, πραγματοποιείται ήπια ανάδευση και επώαση για 30 λεπτά στον πάγο. Κατόπιν, τα βακτηριακά κύτταρα υποβάλλονται σε σύντομο θερμικό σοκ, για 45 δευτερόλεπτα, σε θερμοκρασία 42° C. Η απότομη αλλαγή στη θερμοκρασία αυξάνει τη ρευστότητα της κυτταρικής μεμβράνης των βακτηρίων επιτρέποντας στο μόριο του DNA να εισέλθει μέσα στο κύτταρο.
- ✓ Το δείγμα τοποθετείται άμεσα στον πάγο και επώαζεται για ακόμη 2 λεπτά. Προστίθενται 0,9 mL αποστειρωμένου και προθερμασμένου σε θερμοκρασία 37 °C, θρεπτικού μέσου (LB, 2YT, SOB).

- ✓ Ακολουθεί επώαση των μετασχηματισμένων κυττάρων σε θερμοκρασία 37 °C για 1 ώρα, υπό ανάδευση (210 rpm).
- ✓ Τέλος, 50-100 μL των κυττάρων επιστρώνονται σε τρυβλία *Petri* με θρεπτικό μέσο LB άγαρ, στο οποίο έχει προστεθεί κατάλληλη συγκέντρωση του αντιβιοτικού επιλογής των μετασχηματισμένων κυττάρων. Τα τρυβλία επωάζονται σε θερμοκρασία 37 °C, για 16-20 ώρες.

Να σημειωθεί πως όλοι οι χειρισμοί βακτηρίων και αποστειρωμένων θρεπτικών μέσων πραγματοποιήθηκαν υπό στείρες συνθήκες.

#### Υπερέκφραση των μεταλλαγμάτων hAng S28AT36AS37A και hAng S28AT36AS37AS87A

Η παραγωγή της πρωτεΐνης σύντηξης με τη χρήση του συστήματος pET βασίζεται τόσο στην παραγωγή όσο και στη δράση της T7 RNA πολυμεράσης (Studier & Moffatt, 1986). Για την παραγωγή της T7 RNA πολυμεράσης είναι απαραίτητη η προσθήκη IPTG (Isopropylβ-D-1-thiogalactopyranoside ή ισοπροπυλοθειογαλακτοζίτης), που αποτελεί ανάλογο της λακτόζης και παρουσιάζει δομικές ομοιότητες με την αλλολακτόζη. Η αλλολακτόζη είναι ένας μεταβολίτης της λακτόζης που ενεργοποιεί τη μεταγραφή του οπερονίου *lac*, με σκοπό την άρση καταστολής της μεταγραφής από τον καταστολέα *lacI*, ο οποίος προσδένεται στη θέση χειριστή του υποκινητή. Παράλληλα, πραγματοποιείται και άρση της καταστολής έκφρασης του επιθυμητού γονιδίου που βρίσκεται στο πλασμίδιο pET, με την αποσύνδεση του *lacI* από τον χειριστή *lacO* που βρίσκεται μπροστά από τον υποκινητή της T7 RNA πολυμεράσης. Το IPTG αποτελεί ένα μόριο ρυθμιστή της έκφρασης των γονιδίων, λειτουργώντας μέσω της πρόσδεσης του σε καταστολείς ή ενεργοποιητές (Studier & Moffatt, 1986).

#### Παρασκευή θρεπτικών υλικών:

##### ➤ Θρεπτικό υλικό Terrific Broth (1 L)

- ✓ Διαλύουμε 12 gr τρυπτόνης και 24 gr εκχυλίσματος ζύμης σε 800 mL dH<sub>2</sub>O
- ✓ Προσθέτουμε 4 mL γλυκερόλης και συμπληρώνουμε μέχρι ο τελικός όγκος να είναι 900 mL
- ✓ Διαλύουμε 12,54 gr K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> και 2,31 gr KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> σε 100 mL dH<sub>2</sub>O
- ✓ Αναμιγνύουμε τα δύο διαλύματα

Η υπερέκφραση των μεταλλαγμάτων είναι πανομοιότυπη με αυτήν της hAng άγριου τύπου, η οποία πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο του Holloway D.E. και των συνεργατών του (Holloway et al., 2001) με ορισμένες τροποποιήσεις.

Πιο αναλυτικά, τα κύτταρα αναπτύσσονται σε υγρές καλλιέργειες εφόσον έχει προηγηθεί ο αντίστοιχος μετασχηματισμός των βακτηριακών στελεχών με τα πλασμίδια pET-hAng S28AT36AS37A και pET-hAng S28AT36AS37AS87A. Για κάθε υγρή καλλιέργεια γίνεται επιλογή μίας μοναδιαίας στικτής αποικίας από το τρυβλίο *Petri*, η οποία και εισάγεται σε σωληνάριο τύπου falcon, με θρεπτικό μέσο 5-15 mL, στο οποίο έχει προστεθεί αντιβιοτικό καναμυκίνη, σε τελική συγκέντρωση 50 µg/mL και κατόπιν επωάζεται για 16 h, σε θερμοκρασία 37° C, υπό ανάδευση (210 rpm). Εν συνεχεία, 2 L αποστειρωμένου θρεπτικού μέσου TB Broth (1L για κάθε μετάλλαγμα), στο οποίο επίσης προστέθηκε αντιβιοτικό καναμυκίνη με τελική συγκέντρωση 50 µg/mL, εμβολιάζεται με αναλογία 1/100, από μία υγρή καλλιέργεια (μία για κάθε μετάλλαγμα) και επωάζεται σε θερμοκρασία 37° C, υπό ανάδευση (210 rpm), ώσπου η οπτική απορρόφηση (OD<sub>600nm</sub>) να έχει τιμή μεταξύ 0,6 και 0,8, όπου και θεωρείται ότι η καλλιέργεια βρίσκεται στην εκθετική φάση ανάπτυξης. Ακολουθεί η προσθήκη IPTG σε τελική συγκέντρωση 1 mM και η επώαση των βακτηριακών καλλιιεργειών σε θερμοκρασία 37° C, υπό ανάδευση (210 rpm), για δύο επιπλέον ώρες. Τέλος, γίνεται η συλλογή των κυττάρων έπειτα από φυγοκέντρηση (5000 g/ 4 ° C/ 30 min). Όλες οι παραπάνω διαδικασίες πραγματοποιούνται με αποστειρωμένα μέσα και υλικά και κάτω από ασηπτικές συνθήκες μέχρι το στάδιο της φυγοκέντρησης.

### **3.2.2.2 Απομόνωση και καθαρισμός των μεταλλαγμάτων hAng S28AT36AS37A και hAng S28AT36AS37AS87A**

#### Παρασκευή υλικών

- Διάλυμα λύσης κυττάρων, pH 8,0
  - ✓ 50 mM Tris-HCl
  - ✓ 2 mM EDTA
  
- Διάλυμα αποδιάταξης, pH 8,0
  - ✓ 7 M υδροχλωρική γουανιδίνη
  - ✓ 0,15 M ανηγμένη γλουταθειόνη
  - ✓ 0,1 M Tris
  - ✓ 2 mM EDTA

- Διάλυμα αναδίπλωσης, pH 8,0
  - ✓ 0,5 M L-αργινίνη-HCl
  - ✓ 0,6 mM οξειδωμένη γλουταθειόνη
- Διαλύματα κατιονανταλλακτικής στήλης *SP-Sepharose Fast Flow*
  - ✓ Διάλυμα εξισορρόπησης: 25 mM Tris-HCl, 0,2 M NaCl, pH 8,0
  - ✓ Διάλυμα έκλουσης: 25 mM Tris-HCl, 0,8 M NaCl, pH 8,0
- Διαλύματα στήλης αντίστροφης φάσης *Resource RPC*
  - ✓ Διάλυμα εξισορρόπησης: 0,1 % (v/v) TFA
  - ✓ Διάλυμα έκλουσης: 0,08% (v/v) TFA σε ισοπροπανόλη: ακετονιτρίλιο: νερό σε αναλογία 3:2:2

Η μέθοδος που ακολουθήθηκε για την απομόνωση και τον καθαρισμό των μεταλλαγμένων μορφών της ανθρώπινης αγγειογενίνης βασίστηκε στο πρωτόκολλο του Holloway D.E και των συνεργατών του (Holloway et al., 2001). Η διαδικασία έγινε ως εξής:

Λύση του ιζήματος από 0,5 L βακτηριακής καλλιέργειας:

- ✓ Επαναδιάλυση βακτηριακού ιζήματος σε 25 mL διαλύματος λύσης.
- ✓ Λύση των βακτηριακών κυττάρων με δράση υπερήχων εύρους 70%, διάρκειας 40 sec, για 5 κύκλους. Κατά τη διάρκεια της λύσης με υπερήχους αυξάνεται η θερμοκρασία του διαλύματος, έτσι η λύση γίνεται με παύσεις, ενώ ο σωλήνας, στον οποίο εμπεριέχεται το διάλυμα προς λύση, βρίσκεται σε πάγο, ώστε να αποφευχθεί η ανεπιθύμητη αύξηση της θερμοκρασίας.
- ✓ Φυγοκέντρηση για 20 λεπτά σε 20.000 g και θερμοκρασία 4°C και απόρριψη του υπερκειμένου.
- ✓ Επανάληψη της παραπάνω διαδικασίας για δύο επιπλέον φορές, με τη διαφορά ότι τη δεύτερη φορά το διάλυμα λύσης περιέχει και 0,1 % (v/v) Triton X-100.

Οι παραπάνω διεργασίες εκτελούνται σε πάγο.

Διάσπαση σωματίων εγκλεισμού:

- ✓ Το ίζημα, το οποίο περιέχει τα σωματία εγκλεισμού (inclusion bodies), επαναδιαλύεται σε 15 mL διαλύματος αποδιάταξης και με τη χρήση

ομογενοποιητή υφίσταται μηχανική διάτμηση. Τα σωματίδια εγκλεισμού αποτελούν δομές που σχηματίζουν οι μη διαλυτές πρωτεΐνες στο κυτταρόπλασμα των βακτηριακών κυττάρων. Ο σχηματισμός των σωματίων εγκλεισμού μπορεί να συμβαίνει λόγω της υπερπαραγωγής μιας πρωτεΐνης σε ένα βακτηριακό σύστημα υπερέκφρασης (Singh & Panda, 2005).

- ✓ Μετά τη διαδικασία ομογενοποίησης, το διάλυμα αφήνεται για ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 2 ώρες.

#### Αναδίπλωση της αποδιατεταγμένης πρωτεΐνης.

- ✓ Το δείγμα εν συνεχεία, προστίθεται πολύ αργά, σταγόνα-σταγόνα, σε 0,5 L διαλύματος αναδίπλωσης και επώαζεται υπό ήπια ανάδευση για 24 ώρες, σε θερμοκρασία δωματίου.
- ✓ Με το πέρας των 24 ωρών, φυγοκεντρείται σε 10.000 g, για 30 λεπτά, σε θερμοκρασία 25° C και το υπερκείμενο αραιώνεται τρεις φορές σε απαερωμένο υπερκάθαρο νερό (1 L).

#### Χρωματογραφικός καθαρισμός των μεταλλαγμάτων της hAng με χρήση του συστήματος FPLC.

##### *Αρχή της μεθόδου*

Η χρωματογραφία είναι μια μέθοδος διαχωρισμού χημικών ουσιών, που στηρίζεται στη διαφορετική κατανομή των συστατικών ενός μίγματος μεταξύ μιας κινούμενης και μια στατικής φάσης και χαρακτηρίζεται ως αέριος ή υγρή, ανάλογα με τη φύση των δύο αυτών φάσεων. Η ταχεία υγρή χρωματογραφία πρωτεϊνών (FPLC) είναι ένας τύπος υγρής χρωματογραφίας που παρέχει υψηλή ανάλυση μέσω στατικών φάσεων μικρής διαμέτρου για το χαρακτηρισμό και το διαχωρισμό πρωτεϊνών μέσα από ένα μίγμα (Walls & Walker, 2017)

Στην ταχεία υγρή χρωματογραφία πρωτεϊνών, η κινητή φάση είναι ένα υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα και ο ρυθμός ροής διατηρείται σταθερός από μια αντλία θετικής μετατόπισης, ενώ η σύνθεση του ρυθμιστικού διαλύματος μπορεί να μεταβάλλεται με την άντληση υγρών από εξωτερικές δεξαμενές. Η στατική φάση αποτελείται από σφαιρίδια, συνήθως από συνδεδεμένη αγαρόζη, συσκευασμένα σε κυλινδρική στήλη. Οι στήλες του συστήματος μπορεί να είναι φτιαγμένες από γυαλί ή πλαστικό. Το σύστημα FPLC επιτρέπει στους χρήστες να παρακολουθούν πολλές παραμέτρους ταυτόχρονα, όπως το επίπεδο υπεριώδους ακτινοβολίας, το pH και την αγωγιμότητα κι επιτρέπει τη διαδοχική εκτέλεση πολλαπλών στηλών χρωματογραφίας, ελαχιστοποιώντας το χρόνο που απαιτείται για την απομόνωση και τον καθαρισμό της πρωτεΐνης (Walls & Walker, 2017).

Ο χρωματογραφικός καθαρισμός των μεταλλαγμάτων της hAng γίνεται με χρήση του αυτοματοποιημένου συστήματος ÄKTA-FPLC, σε ψυκτικό θάλαμο σε θερμοκρασία 4° C. Το σύστημα αποτελείται από έναν ρυθμιστή της ταχύτητας ροής των διαλυμάτων στη στήλη, έναν συλλέκτη κλασμάτων κι ένα φωτόμετρο υπεριώδους ακτινοβολίας που καταγράφει τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης, απορροφώντας το υπεριώδες φως σε μήκος κύματος 280 nm, ενώ τα διαλύματα εξισορρόπησης και έκλουσης τοποθετούνται στις αντίστοιχες αντλίες A και B, του μηχανήματος ÄKTApurifier (GE Healthcare) (Äkta, n.d.).

### *Πειραματική διαδικασία*

Ο καθαρισμός των μεταλλαγμάτων της hAng γίνεται με δυο διαδοχικές χρωματογραφικές στήλες, μία κατιοανταλλακτική και μία αντίστροφης φάσης.

Η πρώτη στήλη που χρησιμοποιείται για τον καθαρισμό είναι η στήλη SP-Sepharose Fast Flow, μία κατιοανταλλακτική ρητίνη, όγκου 20 mL. Η εξισορρόπηση της στήλης γίνεται με, τουλάχιστον, πέντε όγκους στήλης διαλύματος έκλουσης, ακολουθώντας ακόμη πέντε, τουλάχιστον, όγκους στήλης διαλύματος εξισορρόπησης, με ταχύτητα ροής 1 mL/min. Ακολουθεί η διέλευση του πρωτεϊνικού δείγματος με τις θετικά φορτισμένες πρωτεΐνες να δεσμεύονται στη ρητίνη, συμπεριλαμβανομένων της hAng και των μεταλλαγμάτων της, ενώ στη συνέχεια γίνεται έκπλυση με πέντε όγκους στήλης διαλύματος εξισορρόπησης, ώστε να απομακρυνθούν οι μη ειδικά προσδεμένες πρωτεΐνες από τη στήλη. Η έκλυση των δεσμευμένων πρωτεϊνών γίνεται με χρήση του διαλύματος έκλουσης (100 %) και συλλέγονται κλάσματα όγκου 4 mL. Σύμφωνα με την τιμή απορρόφησης σε μήκος κύματος 280 nm συλλέγονται κι ενώνονται τα κλάσματα που περιέχουν την πρωτεΐνη προκειμένου να διέλθουν στη δεύτερη στήλη καθαρισμού.

Η δεύτερη χρωματογραφική στήλη είναι η στήλη RPC 18. Είναι μια στήλη αντίστροφης φάσης και όγκου 3 mL, στην οποία ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών βασίζεται στην αντιστρεπτή προσρόφηση των βιομορίων σύμφωνα με την υδροφοβικότητα τους. Η στατική φάση είναι πιο υδρόφοβη από την κινητή φάση, δεσμεύοντας με μεγαλύτερη συγγένεια υδροφοβικά και λιγότερο πολικά μόρια. Τα προσδεμένα στη στήλη μόρια εκκλύονται μέσω αύξησης της συγκέντρωσης ενός οργανικού διαλύτη, με τις πολικές ενώσεις να εκκλύονται πρώτες από τη στήλη, καθώς οι μη πολικές επιβραδύνονται, λόγω της πρόσδεσής τους στη στατική φάση. Η στήλη εξισορροπείται με τουλάχιστον 10 όγκους στήλης διαλύματος εξισορρόπησης και στη συνέχεια με 5 όγκους στήλης 5% διαλύματος έκλουσης, με ταχύτητα ροής 1 mL/min. Μετά τη διέλευση του πρωτεϊνικού δείγματος από τη στήλη γίνεται έκπλυση της στήλης με 25% διαλύματος έκλουσης για 5 όγκους στήλης, προκειμένου να απομακρυνθούν οι μη ειδικά συνδεδεμένες πρωτεΐνες. Τέλος, γίνεται έκλυση της πρωτεΐνης μας με διαβάθμιση συγκέντρωσης του διαλύματος

έκλουσης, από 25% έως 45% για 16 λεπτά, με ταχύτητα ροής 1 mL/ min και συλλέγονται κλάσματα του 1 mL.

#### Διαπίδυση και συμπύκνωση της αγγειογενίνης

Τα κλάσματα που περιέχουν την πρωτεΐνη μας συλλέγονται σύμφωνα με την τιμή της απορρόφησης τους σε μήκος κύματος 280 nm και μεταφέρονται σε μεμβράνη διαπίδυσης με κατώφλι 7.000 Da σε υπερκάθαρο νερό, με σκοπό την απομάκρυνση του διαλύματος έκλουσης, στο οποίο βρίσκεται η πρωτεΐνη και την αντικατάστασή του με υπερκάθαρο νερό. Κατόπιν, γίνεται μεταφορά της μεμβράνης διαπίδυσης σε ογκομετρικό σωλήνα που περιέχει 1L υπερκαθαρού νερού και ακολουθεί επώαση για 16 ώρες σε θερμοκρασία 4°C, υπό ανάδευση. Μετά το πέρας των 16 ωρών γίνεται αλλαγή στο υπερκάθαρο νερό και η μεμβράνη επωάζεται στις ίδιες συνθήκες για άλλες 2 ώρες. Τέλος, η πρωτεΐνη συμπυκνώνεται σε τελική συγκέντρωση 20 mg/mL με τη χρήση του συστήματος φυγοκεντρικής εξάτμισης υπό κενό, χωρίζεται σε κλάσματα των 20 mL και αποθηκεύεται σε θερμοκρασία -80°C, για μελλοντική χρήση.

### **3.2.3 Κρυστάλλωση των μεταλλαγμάτων hAng S28AT36AS37A και hAng S28AT36AS37AS87A**

#### Κρυστάλλωση του μεταλλάγματος hAng S28AT36AS37A

Η κρυστάλλωση του τριπλού μεταλλάγματος της ανθρώπινης αγγειογενίνης, hAng S28AT36AS37A, επιτεύχθηκε με τη μέθοδο διάχυσης ατμών (καθήμενη σταγόνα). Η συνθήκη κρυστάλλωσης είναι ίδια με αυτήν της hAng αγρίου τύπου και αποτελείται από 0,15 M μαλαϊκό νάτριο pH 7,0 και 20% (w/v) πολυαιθυλενική γλυκόλη (PEG) 3350. Οι κρύσταλλοι αναπτύχθηκαν με ανάμειξη ίσων ποσοτήτων διαλύματος πρωτεΐνης και διαλύματος εξισορρόπησης σε σταγόνα τελικού όγκου 4 mL, η οποία τοποθετήθηκε πάνω από διάλυμα εξισορρόπησης όγκου 700 mL, με τελική συγκέντρωση πρωτεΐνης στη σταγόνα 5 mg/ mL. Το σύστημα κλείνεται αεροστεγώς και αφήνεται να ισορροπήσει σε θερμοκρασία 16°C, με τους κρυστάλλους να εμφανίζονται περίπου 5 μέρες αργότερα.

#### Κρυστάλλωση του μεταλλάγματος hAng S28AT36AS37AS87A

Σε αντίθεση με το τριπλό μετάλλαγμα της αγγειογενίνης, το τετραπλό μετάλλαγμα hAng S28AT36AS37AS87 δεν κρυσταλλώθηκε στη συνθήκη κρυστάλλωσης της hAng αγρίου τύπου. Για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκε σάρωση 96 συνθηκών του κιτ *JBScreen Basic 1,2,3 και 4* της εταιρίας *Jena Biosciences*, με τη χρήση του ρομποτικού συστήματος *OryxNano (Douglas Instruments)*. Το κάθε βοθρίο



του πιάτου 96 θέσεων περιείχε 50  $\mu\text{L}$  από την κάθε συνθήκη του κιτ. Ακολουθεί προσθήκη 0,2  $\mu\text{L}$  πρωτεΐνης με 0,2  $\mu\text{L}$  διαλύματος συνθήκης στη θέση εναπόθεσης της σταγόνας. Επιπλέον, για την εύρεση της βέλτιστης συγκέντρωσης της πρωτεΐνης για τα πειράματα κρυστάλλωσης χρησιμοποιήθηκε το κιτ *pre-crystallization test* της εταιρίας *Hampton Research*. Η βέλτιστη συγκέντρωση εκτιμήθηκε σε 20  $\text{mg}/\text{mL}$ . Το σύστημα κλείνεται αεροστεγώς και αφήνεται να ισορροπήσει σε θερμοκρασία 16° C, με τους κρυστάλλους να εμφανίζονται περίπου 2 μέρες αργότερα, σε συνθήκη κρυστάλλωσης 100 mM κιτρικό νάτριο pH 5,6 και 25% (w/v) PEG 4000.

### **3.2.4 Συλλογή κρυσταλλογραφικών δεδομένων των μεταλλαγμάτων hAng S28AT36AS37A και hAng S28AT36AS37AS87A**

Η συλλογή των κρυσταλλογραφικών δεδομένων πραγματοποιήθηκε υπό κρουονικές συνθήκες (εκροή υγρού αζώτου) σε θερμοκρασία 100 K στο σταθμό πρωτεϊνικής κρυσταλλογραφίας P13 του PETRA III, στις εγκαταστάσεις του EMBL, στο Αμβούργο της Γερμανίας. Πριν τη συλλογή κρυσταλλογραφικών δεδομένων οι κρύσταλλοι εμβαπτίζονται για μερικά δευτερόλεπτα σε κατάλληλο κρυστοπροστατευτικό διάλυμα, το οποίο αποτελείται, στην περίπτωση των μεταλλαγμάτων της hAng, από φρέσκο διάλυμα εξισορρόπησης που περιέχει επιπλέον 25 % (v/v) γλυκερόλη. Η ισοζύγηση και η συγχώνευση των εντάσεων των περιθλάσεων πραγματοποιήθηκαν με το πρόγραμμα AIMLESS (Evans & Murshudon, 2013) του πακέτου προγραμμάτων CCP4 (Collaborative Computational Project, 1994). Οι υπολογισμοί Fourier των χαρτών ηλεκτρονικής πυκνότητας και η βελτιστοποίηση των δομών των συμπλόκων πραγματοποιήθηκαν με το πρόγραμμα REFMAC (Murshudon et al., 1997). Η ανοικοδόμηση και η προσαρμογή του μοντέλου στο χάρτη ηλεκτρονικής πυκνότητας γίνεται με το πρόγραμμα COOT (Emsley & Cowtan, 2004). Τέλος, χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα CCP4 Molecular Graphics (Potterton et al., 2002) πραγματοποιήθηκε η απεικόνιση των μεταλλαγμένων δομών σε σύγκριση με την πρωτεΐνη αγρίου τύπου.

### **3.2.5 Υπερέκφραση του πυρηνικού αντιγόνου πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων (Proliferating Cell Nuclear Antigen, PCNA)**

#### Μελέτες έκφρασης του PCNA

Το πλασμίδιο που φέρει το cDNA του PCNA είναι το pET 28 και είναι ευγενική χορηγία του καθηγητή *Francisco J Blanco*, από το Ισπανικό Εθνικό Συμβούλιο Έρευνας (Spanish National Research Council, CSIC), στη Μαδρίτη.

Με σκοπό την εύρεση της βέλτιστης συνθήκης έκφρασης του PCNA έγινε μια αρχική διερεύνηση των συνθηκών και των αντίστοιχων επιπέδων έκφρασης σε καλλιέργειες μικρής κλίμακας (expression test). Πιο συγκεκριμένα, για την έκφραση

του PCNA πραγματοποιήθηκαν δοκιμές σε διαφορετικές συνθήκες, ώστε να επιτευχθεί η υπερέκφρασή του. Για τις δοκιμές έκφρασης επιλέχθηκε η κυτταρική σειρά βακτηριακών στελεχών *E. coli Rosetta (DE3)*, σύμφωνα με το πρωτόκολλο του *Francisco J. Blanco* και των συνεργατών του (De March et al., 2018). Η επαγωγή της υπερέκφρασης πραγματοποιήθηκε σε διάφορες συγκεντρώσεις επαγωγέα έκφρασης (IPTG), σε θερμοκρασία 18° C.

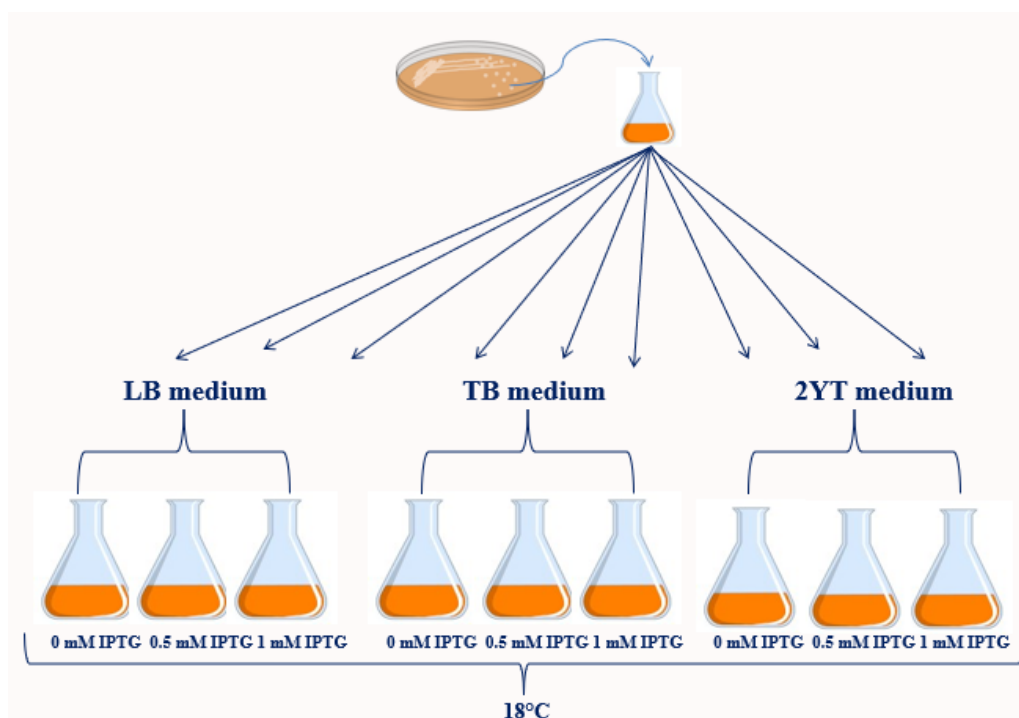
Πραγματοποιήθηκαν, επιπλέον δοκιμές στις συνθήκες ανάπτυξης των κυττάρων (θρεπτικά μέσα) ώστε να προσδιορισθούν οι βέλτιστες συνθήκες για την καλύτερη ανάπτυξη των βακτηρίων και τη μεγαλύτερη απόδοση στην έκφραση της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης. Τα βακτηριακά κύτταρα αναπτύχθηκαν σε θρεπτικά: LB Broth (χειροποίητο με αναλογίες 1/100 Bacto-tryptone, 1/100 NaCl και 0.5/100 Yeast extract και ρύθμιση του pH στο 7,0), 2YT (με αναλογίες 1.6/100 Bacto-tryptone, 0.5/100 NaCl και 1/100 Yeast extract και ρύθμιση του pH στο 7,0) και TB Broth (με αναλογίες 1.2/100 Bacto-tryptone, 2.4/100 Yeast extract, 1.254/100 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.231/100 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> και 400μL/100 γλυκερόλη).

Για κάθε υγρή καλλιέργεια γίνεται επιλογή μίας μοναδιαίας στικτής αποικίας από το ανάλογο τρυβλίο *Petri*, η οποία μεταφέρεται σε σωληνάριο τύπου falcon, το οποίο περιέχει 5-15 ml θρεπτικού μέσου, στο οποίο είχε προστεθεί το αντιβιοτικό καναμυκίνη με τελική συγκέντρωση 50μg/mL και επωάζεται για 16 h, στους 37° C, υπό συνεχή ανάδευση (210 rpm). Τα βακτηριακά στελέχη *E. Coli, Rosetta (DE3)*, αναπτύχθηκαν σε υγρές καλλιέργειες, εφόσον είχε προηγηθεί ο αντίστοιχος μετασχηματισμός τους, με τη μέθοδο του θερμικού σοκ, με το πλασμίδιο του PCNA. Εν συνεχεία, ακολουθεί ανακαλλιέργεια σε μεγαλύτερη κλίμακα. Συγκεκριμένα, τα αποστειρωμένα θρεπτικά μέσα LB Broth, 2YT και TB Broth, στα οποία προστέθηκε καναμυκίνη τελικής συγκέντρωσης 50μg/mL, εμβολιάζονται με αναλογία 1/100 από μία υγρή καλλιέργεια και επωάζονται στους 37° C, υπό συνεχή ανάδευση (210 rpm), ώσπου η οπτική απορρόφηση να είναι OD<sub>600nm</sub>=0.6-0.8.

#### Επαγωγή υπερέκφρασης σε θερμοκρασία 18° C:

Ακολούθως, πραγματοποιούνται δοκιμές της επαγωγής έκφρασης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις IPTG (Εικόνα 28). Η καλλιέργεια διαιρείται σε σωλήνες τύπου falcon χωρητικότητας 50mL (x10mL καλλιέργειας), οι οποίοι ονομάζονται ανάλογα με τη συγκέντρωση του IPTG: «control», «0,5» και «1». Στο σωλήνα «control» δεν προστίθεται IPTG, στο σωλήνα «0,5» προστίθεται IPTG σε τελική συγκέντρωση 0,5 mM και στο σωλήνα «1» προστίθεται IPTG σε τελική συγκέντρωση 1 mM. Οι καλλιέργειες μετά την επαγωγή της υπερέκφρασης αφήνονται να αναπτυχθούν για ακόμη 16-18 h, σε θερμοκρασία 18° C, υπό συνεχή ανάδευση (210 rpm). Μετά το πέρας της επώασης, η καλλιέργεια τοποθετείται σε πάγο και φυγοκεντρείται (11000 g/4° C/ 5 min). Το υπερκείμενο απορρίπτεται και τα κυτταρικά

ιζήματα αποθηκεύονται σε θερμοκρασία  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , για την μετέπειτα ανάλυση τους με ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE).



Εικόνα 28. Μελέτες έκφρασης του PCNA.

### 3.2.6 Απομόνωση και καθαρισμός του PCNA

Η απομόνωση και ο καθαρισμός του PCNA έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο του *Francisco J. Blanco* και των συνεργατών του (De March et al., 2018), με ορισμένες τροποποιήσεις.

#### Λύση του ιζήματος από 2 L βακτηριακής καλλιέργειας

##### *Αρχή της μεθόδου*

Η λύση των βακτηριακών κυττάρων είναι μία μέθοδος κατά την οποία διαρρηγνύεται η κυτταρική μεμβράνη των βακτηρίων και απελευθερώνονται τα ενδοκυτταρικά τους συστατικά. Αποτελεί ένα σημαντικό στάδιο στην απομόνωση των πρωτεϊνών καθώς επηρεάζει τόσο τη βιολογική τους ενεργότητα όσο και τη συνολική τους ποσότητα. Η λύση των κυττάρων πραγματοποιείται με τη χρήση ενός διαλύματος λύσης με μία ή περισσότερες από τις παρακάτω τεχνικές (Benon & Al-Ibraheem, 2002):

- ✓ Ενζυμικά, είτε με τη χρήση κατάλληλου ενζύμου, όπως για παράδειγμα η λυσοζύμη, η οποία μπορεί να διαρρηγνύει την κυτταρική μεμβράνη, είτε με τη

χρήση νουκλεασών, όπως για παράδειγμα η βενζονάση, η οποία αποικοδομεί το DNA και το RNA, μέσω υδρόλυσης των φωσφοδιεστερικών δεσμών των νουκλεοτιδίων (Kar & Singhal, 2015).

- ✓ Μηχανικά, με χρήση υπερήχων στο κυτταρικό διάλυμα λύσης (Brown & Audet, 2008).
- ✓ Με χρήση αποδιατακτικών μέσων, όπως για παράδειγμα ήπια απορρυπαντικά (Brown & Audet, 2008).
- ✓ Με οσμωτική πίεση (Logisz & Hovis, 2005).

### *Πειραματική διαδικασία*

Το βακτηριακό ίζημα που συλλέχθηκε μετά την υπερέκφραση, αποψύχεται ελαφρώς σε πάγο, ώστε να είναι εύκολα διαχειρίσιμο. Το ίζημα επαναδιαλύεται σε διάλυμα λύσης που περιέχει 50 mM Tris-HCl pH 7,6, 150 mM NaCl, 10% (v/v) γλυκερόλη και 1 mM αναστολέα πρωτεασών PMSF. Το PMSF προστίθεται τελευταίο, λόγω του μικρού χρόνου ημιζωής του. Ακολούθως, τα διαλυτοποιημένα κύτταρα παραμένουν για 20 λεπτά σε πάγο παρουσία βενζονάσης. Εν συνεχεία, το διάλυμα υποβάλλεται σε μηχανική λύση με υπερήχους. Η πλήρης λύση των κυττάρων γίνεται σε 5 κύκλους των 30 sec. Δηλαδή, η συσκευή υπερήχων επί 30 sec παράγει υπερήχους εύρους 70%, σε συνεχόμενους κύκλους, οι οποίοι διαπερνούν το κυτταρόλυμα και κατόπιν σταματάει την παραγωγή υπερήχων για ακόμη 30 sec. Στη συνέχεια, το διάλυμα των λυμένων κυττάρων υποβάλλεται σε φυγοκέντρηση (20000 g /4°C / 60 λεπτά). Μετά τη φυγοκέντρηση των βακτηριακών κυττάρων, το υπερκείμενο περνάει από φίλτρο διαμέτρου πόρων 0,45 μm και υποβάλλεται σε χρωματογραφικό καθαρισμό.

### Χρωματογραφικός καθαρισμός του PCNA με χρήση του συστήματος FPLC

Ο χρωματογραφικός καθαρισμός του PCNA πραγματοποιείται σε 4 στάδια με χρήση του αυτοματοποιημένου συστήματος ÄKTA-FPLC. Για την απομόνωση της πρωτεΐνης χρησιμοποιούνται τα διαλύματα εξισορρόπησης και έκλουσης κάθε στήλης που συμμετέχει τον καθαρισμό, τα οποία πριν χρησιμοποιηθούν φιλτράρονται υπό κενό με φίλτρο διαμέτρου πόρων 0,45 μm και απαερώνονται με χρήση υπερήχων. Η διαδικασία του καθαρισμού πραγματοποιείται στους 4°C.

**1<sup>ο</sup> Στάδιο καθαρισμού: Χρωματογραφία συγγένειας HiTrap TALON Crude, 5 mL (IMAC με ακινητοποιημένα ιόντα CO<sup>2+</sup> σε σφαιρίδια σεφαρόζης, GE HealthCare)**

*Αρχή της μεθόδου*

Η χρωματογραφία συγγένειας ακινητοποιημένου μετάλλου (IMAC) στηρίζεται στις αλληλεπιδράσεις που δημιουργούνται μεταξύ των ιόντων των στοιχείων μετάπτωσης ( $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ), τα οποία έχουν ακινητοποιηθεί πάνω σε ρητίνη, καθώς και συγκεκριμένων πλευρικών αλυσίδων των αμινοξέων (Bornhorst & Falke, 2000). Το αμινοξύ που έχει την πιο ισχυρή αλληλεπίδραση με τις ρητίνες, που πάνω στις οποίες βρίσκονται ακινητοποιημένα ιόντα, είναι η ιστιδίνη (His, H) (Schmitt et al., 1993). Οι ομάδες δοτών ηλεκτρονίων στον ιμιδαζολικό δακτύλιο της ιστιδίνης σχηματίζουν ημιπολικούς δεσμούς με το ακινητοποιημένο ιόν μετάλλου μετάπτωσης (Bornhorst & Falke, 2000). Το PCNA διαθέτει ετικέτα 6 ιστιδινών στο αμινοτελικό του άκρο και συνεπώς έχει υψηλή συγγένεια ως προς τα ιόντα  $\text{Co}^{2+}$ , με αποτέλεσμα την ισχυρή πρόσδεση του στη στήλη συγγένειας HiTrap TALON. Ο παράγοντας έκλουσης της πρωτεΐνης από τη στήλη είναι το ιμιδαζόλιο, το οποίο εμφανίζει σημαντική ομοιότητα με τον δακτύλιο της ιστιδίνης.

### *Πειραματική διαδικασία*

#### Παρασκευή υλικών

##### ➤ Διαλύματα στήλης HiTrap TALON Crude

- ✓ Διάλυμα εξισορρόπησης: 50 mM Tris-HCl pH 7,6, 150 mM NaCl, 10% (v/v) γλυκερόλη
- ✓ Διάλυμα έκλουσης: 50 mM Tris-HCl pH 7,6, 150 mM NaCl, 10% (v/v) γλυκερόλη, 500 mM ιμιδαζόλιο

##### ➤ Διάλυμα πέψης πρωτεάσης 3C

- ✓ 50 mM Tris-HCl pH 7,6, 150 mM NaCl, 10% (v/v) γλυκερόλη, 1 mM EDTA, 2 mM DTT

Η εξισορρόπηση του υλικού της στήλης γίνεται με τουλάχιστον 5 όγκους στήλης διαλύματος εξισορρόπησης, με ροή 1 mL/min. Η διέλευση του πρωτεϊνικού δείγματος πραγματοποιείται με ροή 0,5 mL/min, συλλέγοντας κλάσματα των 5 mL (*Flow Through, FT*). Ακολουθεί η έκπλυση της στήλης με τουλάχιστον 5 όγκους διαλύματος εξισορρόπησης, με ροή 1 mL/min (*Wash*) και συλλογή κλασμάτων των 5 mL. Η έκπλυση έχει στόχο την απομάκρυνση των μη ειδικά προσδεμένων πρωτεϊνών στη στήλη. Στη συνέχεια, η έκλυση των προσδεμένων, στη στήλη, πρωτεϊνών γίνεται με χρήση 30% του διαλύματος έκλουσης, με ροή 1 mL/min, ενώ συλλέγονται κλάσματα όγκου 1 mL. Ακολουθεί ανάλυση των κλασμάτων σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου υπό αποδιατακτικές συνθήκες. Τα κλάσματα που περιέχουν την πρωτεΐνη μας συλλέγονται και ενώνονται σύμφωνα με την τιμή της απορρόφησης τους, σε μήκος κύματος 280 nm. Κατόπιν, προστίθεται η πρωτεάση 3C σε αναλογία

1mg πρωτεάσης ανά 20 mg πρωτεΐνης και το πρωτεϊνικό μίγμα υποβάλλεται σε διαπίδυση έναντι του διαλύματος πέψης της πρωτεάσης, σε θερμοκρασία 4° C, για 16 ώρες, υπό ανάδευση. Η πρωτεάση 3C είναι ειδική για την τμήση της σηματοδοτικής ετικέτας των 6 ιστιδινών, ενώ φέρει και η ίδια ετικέτα αγκιστείας GST, ώστε να μπορεί να απομακρύνεται από το διάλυμα πρωτεΐνης μετά από πέψη, με ένα επιπλέον βήμα καθαρισμού.

## **2° Στάδιο καθαρισμού: Χρωματογραφία συγγένειας HiTrap TALON Crude, 1 mL και GST, 1 mL (Protino GST 4B, Macherey-Nagel)**

Το πρωτεϊνικό μίγμα υποβάλλεται σε διαπίδυση έναντι του διαλύματος εξισορρόπησης της στήλης HiTrap TALON, σε θερμοκρασία 4° C, για 6 ώρες, με συνεχείς αλλαγές διαλύματος, ανά 1 ώρα, υπό ανάδευση. Η διαπίδυση γίνεται προκειμένου να απομακρυνθεί το ιμιδαζόλιο, ώστε το δείγμα που δεν έχει κοπεί από την πρωτεάση, να μπορέσει να προσδεθεί εκ νέου στη στήλη HiTrap TALON.

Χρωματογραφία συγγένειας HiTrap TALON, 1 mL, ως αφαιρετική στήλη

### Παρασκευή υλικών

#### ➤ Διαλύματα στήλης HiTrap TALON Crude

- ✓ Διάλυμα εξισορρόπησης: 50 mM Tris-HCl pH 7,6, 150 mM NaCl
- ✓ Διάλυμα έκλουσης: 50 mM Tris-HCl pH 7,6, 150 mM NaCl, 500 mM ιμιδαζόλιο

Ακολουθεί ο έλεγχος της επιτυχίας της πέψης της πρωτεΐνης από την πρωτεάση 3C. Αυτό, επιτυγχάνεται με ένα επιπλέον βήμα καθαρισμού, καθώς η πρωτεάση και η πρωτεΐνη που έχει υποστεί επιτυχή πέψη δεν έχουν αγκιστεία για τη στήλη. Αυτό το στάδιο καθαρισμού γίνεται ακριβώς όπως και το 1° στάδιο, με τη μόνη διαφορά πως σε αυτό το βήμα η πρωτεΐνη μας συλλέγεται στο Flow Through, καθώς πλέον δεν εμφανίζει αγκιστεία με τη στήλη. Πιο συγκεκριμένα, η εξισορρόπηση του υλικού της στήλης γίνεται με τουλάχιστον 10 όγκους στήλης διαλύματος εξισορρόπησης, με ροή 1 mL/min. Η διέλευση του πρωτεϊνικού δείγματος πραγματοποιείται με ροή 0,5 mL/min συλλέγοντας κλάσματα των 5 mL. Ακολουθεί η έκπλυση της στήλης με τουλάχιστον 5 όγκους διαλύματος εξισορρόπησης, με ροή 1 mL/min και συλλογή κλασμάτων των 5 mL. Τέλος, η έκλυση της άκοπης πρωτεΐνης γίνεται με χρήση 100% του διαλύματος έκλουσης, με ροή 1 mL/min, ενώ συλλέγονται κλάσματα όγκου 2 mL. Κατόπιν, η αξιολόγηση της πορείας του καθαρισμού, καθώς κι ο έλεγχος της επιτυχίας του διαχωρισμού κομμένης με άκοπης πρωτεΐνης γίνεται με ανάλυση των κλασμάτων σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου.

## Χρωματογραφία συγγένειας GST, 1 mL, ως αφαιρετική στήλη

### *Αρχή της μεθόδου*

Η προσθήκη της ετικέτας S-τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (GST-Tag, 26 KDa) σε ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες αποτελεί μια πολύ διαδεδομένη μέθοδο χρωματογραφικού καθαρισμού πρωτεϊνών που βασίζεται στη συγγένεια μεταξύ πρωτεΐνης-προσδέτη. Οι πρωτεΐνες δεσμεύονται στη στήλη που έχει ακινητοποιημένα σφαιρίδια γλουταθειόνης, ενώ οι υπόλοιπες πρωτεΐνες που δε φέρουν ετικέτα GST, μη έχοντας συγγένεια με τη στήλη, απομακρύνονται μετά την έκπλυση. Τέλος, η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη εκκλύεται με χρήση ανηγμένης γλουταθειόνης (GSH) (Healthcare & Sciences, 1994).

### *Πειραματική διαδικασία*

#### Παρασκευή υλικών

##### ➤ Διαλύματα στήλης GST

- ✓ Διάλυμα εξισορρόπησης: 50 mM Tris-HCl pH 7,6, 150 mM NaCl
- ✓ Διάλυμα έκλυσης: 50 mM Tris-HCl pH 7,6, 150 mM NaCl, 10 mM GSH

Η στήλη εξισορροπείται με τουλάχιστον 10 όγκους στήλης του διαλύματος εξισορρόπησης, που είναι πανομοιότυπο με το διάλυμα εξισορρόπησης της στήλης HiTrap TALON, ώστε να μπορέσει το δείγμα μας να περάσει αμέσως σε αυτή. Η πρωτεΐνη μας αναμένεται να μην προσδεθεί σε αυτή τη στήλη και να συλλεχθεί στο Flow Through, ενώ η πρωτεάση 3C, η οποία διαθέτει ετικέτα GST, θα πρέπει να συνδεθεί στη στήλη. Στη συνέχεια, γίνεται έκπλυση της στήλης με διάλυμα εξισορρόπησης και ακολουθεί έκλυση της πρωτεάσης 3C και άλλων συνδεδεμένων πρωτεϊνών με 100% του διαλύματος έκλυσης, με ροή 1mL/min, ενώ συλλέγονται κλάσματα όγκου 2 mL. Τέλος, γίνεται ανάλυση των κλασμάτων σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου, για να ελεγχθεί η επιτυχής απομάκρυνση της πρωτεάσης 3C από το πρωτεϊνικό μίγμα που συλλέχθηκε στο Flow Through.

Το δείγμα, μετά την αφαίρεση της ετικέτας των 6 ιστιδινών, καθώς και την απομάκρυνση της πρωτεάσης 3C, υποβάλλεται σε διαπίδυση έναντι του διαλύματος εξισορρόπησης της στήλης ηπαρίνης σε θερμοκρασία 4° C, για 16 ώρες, υπό ανάδευση.

### **3<sup>ο</sup> Στάδιο καθαρισμού: Στήλη ηπαρίνης, HiTrap Heparin HP, 5 mL**

#### *Αρχή της μεθόδου*

Ο προσδέτης στη στήλη ηπαρίνης είναι μια φυσική θειωμένη γλυκοζαμινογλυκάνη. Η ηπαρίνη αποτελείται από εναλλασσόμενες μονάδες ουρονικού οξέος και D-γλυκοζαμίνης, οι περισσότερες από τις οποίες έχουν υποκατασταθεί με μία ή δύο θειικές ομάδες και συνδέεται ομοιοπολικά με σφαιρίδια αгарόζης. Η ακινητοποιημένη ηπαρίνη της στήλης έχει δύο κύριους τρόπους αλληλεπίδρασης με τις πρωτεΐνες. Είτε λειτουργεί ως προσδέτης συγγένειας, όπως για παράδειγμα στην αλληλεπίδρασή της με παράγοντες πήξης, είτε ως ανταλλάκτης κατιόντων, λόγω των ανιονικών θειικών ομάδων της. Η HiTrap™ Heparin HP αποτελεί ένα πολύ ευέλικτο εργαλείο για το διαχωρισμό πολλών πρωτεϊνών, όπως για παράδειγμα πρωτεΐνες που δεσμεύουν DNA, αυξητικούς παράγοντες, παράγοντες σύνθεσης πρωτεϊνών πήξης και υποδοχείς στεροειδών ("HiTrap Affinity Columns," 2012).

#### *Πειραματική διαδικασία*

##### Παρασκευή υλικών

##### ➤ Διαλύματα στήλης HiTrap Heparin HP

- ✓ Διάλυμα εξισορρόπησης: 50 mM CH<sub>3</sub>COONa pH 5,5, 100 mM NaCl
- ✓ Διάλυμα έκλυσης: 50 mM CH<sub>3</sub>COONa pH 5,4, 2 M NaCl

Η εξισορρόπηση του υλικού της στήλης γίνεται με τουλάχιστον 5 όγκους στήλης διαλύματος εξισορρόπησης, με ροή 3 mL/min. Η διέλευση του πρωτεϊνικού δείγματος πραγματοποιείται με ροή 1 mL/min και συλλέγονται κλάσματα των 5 mL. Η έκπλυση της στήλης γίνεται με τουλάχιστον 5 όγκους διαλύματος εξισορρόπησης, με ροή 2 mL/min, ενώ συλλέγονται κλάσματα όγκου 5 mL. Εν συνεχεία, η πρωτεΐνη εκλύεται με αύξηση της διαβάθμισης της συγκέντρωσης, 0-100%, του διαλύματος έκλυσης σε 20 όγκους στήλης (CV) με ροή 2 mL/min, ενώ συλλέγονται κλάσματα όγκου 1 mL. Ακολουθεί η ανάλυση των κλασμάτων σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου υπό αποδιατακτικές συνθήκες.

Τα κλάσματα που περιέχουν την πρωτεΐνη μας συλλέγονται σύμφωνα με την τιμή της απορρόφησης τους σε μήκος κύματος 280 nm και συμπυκνώνονται με φίλτρο συμπύκνωσης (με κατώφλι 10 kDa) σε συγκέντρωση περίπου 15 mg/mL, ώστε



εν συνεχεία η συμπυκνωμένη πλέον πρωτεΐνη να «εισέλθει» σε μία στήλη μοριακής διήθησης.

#### **4<sup>ο</sup> Στάδιο καθαρισμού: Χρωματογραφία μοριακής διήθησης Superdex S200 (SEC, GE HealthCare)**

##### *Αρχή της μεθόδου*

Η χρωματογραφία μοριακής διήθησης (Size Exclusion Chromatography, SEC) διαχωρίζει τις πρωτεΐνες βάσει του διαφορετικού μοριακού τους βάρους. Το υλικό από το οποίο αποτελείται μια στήλη μοριακής διήθησης είναι μια πηκτή πολυμερούς υλικού, με ορισμένο μέγεθος πόρων, το οποίο καθορίζει το μέγεθος των πρωτεϊνών που μπορούν να διαχωριστούν από τη στήλη. Οι πρωτεΐνες μεγάλου μοριακού βάρους δε μπορούν να εισέλθουν στους πόρους της πηκτής και εκλούνται πρώτες, μαζί με τυχόν συσσωματώματα της πρωτεΐνης, στο νεκρό όγκο της στήλης. Αντίθετα, οι μικρότερες μοριακού βάρους πρωτεΐνες εισέρχονται σε διαφορετικά ποσοστά στους πόρους και εκλούνται κατά τάξεις μεγέθους (“Size Exclusion Chromatography: Principles and Methods,” 2018).

##### *Πειραματική διαδικασία*

##### Παρασκευή υλικών

##### ➤ Διάλυμα στήλης Superdex S200

- ✓ Διάλυμα εξισορρόπησης: 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 2 mM DTT

Το συμπυκνωμένο δείγμα υποβάλλεται σε διαύγαση (15000 g, 4° C, 15 λεπτά) κι εφαρμόζεται στη στήλη Superdex S200, η οποία έχει εξισορροπηθεί με 2 όγκους στήλης (~120 mL) με το διάλυμα εξισορρόπησης, με ροή 1 mL/min. Το δείγμα εισάγεται με ροή 0,5 mL/min, ενώ συλλέγονται κλάσματα του 1 mL. Εν συνεχεία, πραγματοποιήθηκε ανάλυση των κλασμάτων σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες. Τα κλάσματα που περιέχουν την πρωτεΐνη μας συλλέγονται σύμφωνα με την τιμή της απορρόφησης τους σε μήκος κύματος 280 nm και συμπυκνώνονται με φίλτρο συμπύκνωσης (με κατώφλι 10 kDa) σε συγκέντρωση περίπου 12 mg/mL.

#### **3.2.7. Ανοσοκατακρήμνιση πρωτεϊνών (Immunoprecipitation, IP)**

##### *Αρχή της μεθόδου*

Η ανοσοκατακρήμνιση αποτελεί μία μορφή χρωματογραφίας συγγένειας, στην οποία σφαιρίδια συνήθως από αγαρόζη ή κάποιο άλλο υλικό, όπως για παράδειγμα μαγνητικά σφαιρίδια, χρησιμοποιούνται ως στερεό υπόστρωμα για τη

σύζευξη του αντισώματος. Πιο συγκεκριμένα, πάνω στα σφαιρίδια είναι ομοιοπολικά δεσμευμένες οι βακτηριακής προέλευσης πρωτεΐνες A ή πρωτεΐνες G, οι οποίες μπορούν και δεσμεύουν με μεγάλη συγγένεια την Fc περιοχή ορισμένων τύπων IgG ανοσοσφαιρινών. Κατά τη μέθοδο αυτή δημιουργούνται σύμπλοκα σφαιριδίων-πρωτεϊνών A/G-αντισωμάτων που κατακρημνίζουν το επιθυμητό αντιγόνο, μέσω επιλεκτικής δέσμησης σε αυτό. Μαζί με το επιθυμητό αντιγόνο κατακρημνίζονται και οι πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν άμεσα ή έμμεσα με αυτό σχηματίζοντας σύμπλοκα στο διάλυμα. Τα σύμπλοκα αυτά μπορούν να κατακρημνιστούν μετά από φυγοκέντρηση και οι πρωτεΐνες από τις οποίες αποτελούνται, να αποδεσμευτούν με χρήση αποδιατακτικών παραγόντων. Η ανοσοκατακρήμνιση (IP) χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό πρωτεϊνών που είναι συνδεδεμένες σε ένα συγκεκριμένο αντίσωμα από το υπόλοιπο δείγμα, ενώ η μέθοδος co-IP χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ της πρωτεΐνης που δεσμεύεται στο αντίσωμα που χρησιμοποιείται στο IP και των πρωτεϊνών που δεσμεύονται σε αυτή και ανιχνεύονται με ανοσοαποτύπωση κατά Western (Corthell, 2014).

### 3.2.7.1 Ανοσοκατακρήμνιση της hAng και του PCNA *in vitro*

*Πειραματική διαδικασία*

Παρασκευή υλικών

➤ Διάλυμα πλύσης πρωτεϊνών

25 mM Tris, pH 7,5, 2 mM DTT, 150 mM NaCl

➤ Διάλυμα έκλουσης πρωτεϊνών

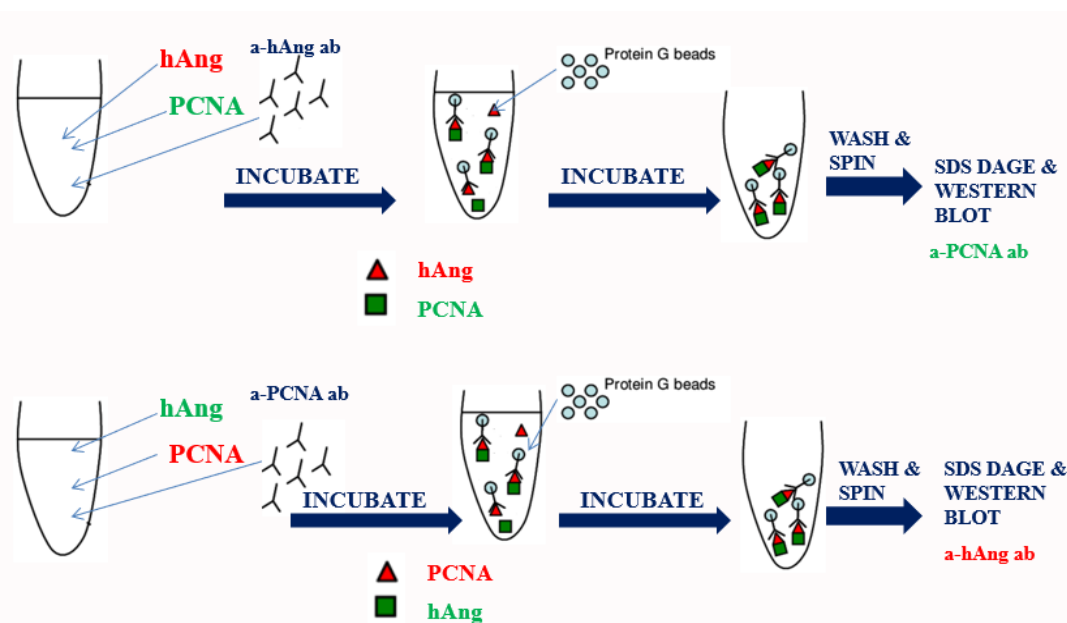
0,1 M Γλυκίνη, pH 2,5

➤ Ανοσοκατακρήμνιση της ανθρώπινης αγγειογενίνης και του PCNA *in vitro*

- ✓ Σε ένα σωλήνα τύπου Eppendorf προστίθενται καθαρές πρωτεΐνες hAng (20 µg) και PCNA (50 µg), ένα ειδικό μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της πρώτης πρωτεΐνης, καθώς και αναστολείς πρωτεασών.
- ✓ Σε ένα δεύτερο σωλήνα τύπου Eppendorf προστίθενται καθαρές πρωτεΐνες hAng (20 µg) και PCNA (50 µg), ένα ειδικό μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της δεύτερης πρωτεΐνης, καθώς και αναστολείς πρωτεασών.
- ✓ Σε έναν τρίτο σωλήνα τύπου Eppendorf προστίθενται καθαρές πρωτεΐνες hAng (20 µg) και PCNA (50 µg), ένα μη ειδικό αντίσωμα IgG (control), καθώς και αναστολείς πρωτεασών.
- ✓ Τα διαλύματα πρωτεϊνών και των τριών σωληνών τύπου Eppendorf επωάζονται για 16 ώρες, στους 4° C, υπό ανάδευση με περιστρεφόμενο τροχό.
- ✓ Μετά το πέρας των 16 ωρών προστίθενται τα σφαιρίδια αγαρόζης, τα οποία

έχουν εξισορροπηθεί προηγουμένως με το διάλυμα πλύσης και τα διαλύματα πρωτεϊνών- αντισωμάτων-σφαιριδίων επωάζονται εκ νέου για άλλες 4 ώρες στους 4° C, υπό ανάδευση με περιστρεφόμενο τροχό.

- ✓ Μετά το πέρας των 4 ωρών, γίνεται έκπλυση των συμπλόκων πρωτεϊνών-αντισωμάτων-σφαιριδίων με το διάλυμα πλύσης και κατακρήμιση τους με φυγοκέντρηση (1000 g/ 4° C/ 1 min), ενώ το υπερκείμενο απορρίπτεται. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται για δύο ακόμη φορές.
- ✓ Προστίθενται 50 μL διαλύματος έκλυσης και ακολουθεί επώαση των συμπλόκων για 10 min, στους 4° C, υπό ανάδευση με περιστρεφόμενο τροχό.
- ✓ Γίνεται έκλυση των συμπλόκων αντισωμάτων-πρωτεϊνών μετά από φυγοκέντρηση (1000 g/ 4° C/ 3 min) και το υπερκείμενο συλλέγεται. Στο υπερκείμενο προστίθεται 4x sample buffer και πραγματοποιείται επώαση για 5 min στους 95° C.
- ✓ Τέλος, πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 12% (w/v), σε αποδιατακτικές συνθήκες με στόχο την ανάλυση και έλεγχο των πειραμάτων ανοσοκατακρήμισης, μέσω ανοσοαποτύπωσης κατά Western (Εικόνα 29).



Εικόνα 29: Πειραματική διαδικασία ανοσοκατακρήμισης της hAng και του PCNA *in vitro*.

### 3.2.8. Ανοσοαποτύπωση κατά Western, Western Blot (Kurien & Hal Scofield, 2015)

Αρχή της μεθόδου

Η ανοσοαποτύπωση κατά Western χρησιμοποιείται συχνά στην έρευνα για το διαχωρισμό και την ταυτοποίηση πρωτεϊνών. Σε αυτή την τεχνική ένα μείγμα πρωτεϊνών διαχωρίζεται με βάση το μοριακό τους βάρος, μέσω SDS-PAGE. Τα σύμπλοκα SDS-πρωτεϊνών, κατευθύνονται με την εφαρμογή ενός ηλεκτρικού πεδίου προς την άνοδο με αποτέλεσμα να εξέρχονται από την πηκτή και τέλος να καθιλώνονται σε μια ειδική μεμβράνη, λόγω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων. Η μεμβράνη στη συνέχεια επώαζεται με αντισώματα ειδικά για την πρωτεΐνη ενδιαφέροντος. Το μη δεσμευμένο αντίσωμα ξεπλένεται αφήνοντας έτσι μόνο το ειδικά δεσμευμένο αντίσωμα στην πρωτεΐνη ενδιαφέροντος. Το σύμπλοκο αντιγόνου-αντισώματος ανιχνεύεται με την προσθήκη ενός δεύτερου αντισώματος ειδικού για το πρώτο. Το δευτερογενές αντίσωμα είναι συνήθως χημικά προσδεδεμένο με ένα ένζυμο όπως η υπεροξειδάση ραπανίδος (horseradish peroxidase-HRP), έτσι ώστε να μπορεί να ανιχνευτεί μετά την προσθήκη κατάλληλου υποστρώματος (Enhanced Chemiluminescence, ECL). Η δράση του ECL βασίζεται στη χημειοφωταύγεια, η ένταση της οποίας είναι ανάλογη με την ποσότητα της πρωτεΐνης που υπάρχει στο εκάστοτε δείγμα. Καθώς τα αντισώματα συνδέονται μόνο με την πρωτεΐνη ενδιαφέροντος, μόνο μία ζώνη πρέπει να είναι ορατή. Το πάχος της ζώνης αντιστοιχεί στην ποσότητα της παρούσας πρωτεΐνης. Το δευτερογενές αντίσωμα ανιχνεύεται από το σήμα που παράγει και που αντιστοιχεί στη θέση της πρωτεΐνης στόχου. Το σήμα καταγράφεται σε φωτογραφικό φιλμ που συνήθως αναπτύσσεται σε σκοτεινό θάλαμο (Berg, J. M et al., 2009).

#### *Πειραματική διαδικασία*

##### Παρασκευή υλικών

##### ➤ Διάλυμα μεταφοράς 10x

25 mM Tris, 192mM γλυκίνη, 0,1% SDS

##### ➤ Διάλυμα μεταφοράς 1x

Αραίωση του διαλύματος μεταφοράς 10x κατά 10 φορές με dH<sub>2</sub>O και προσθήκη 10% (v/v) μεθανόλης

##### ➤ Διάλυμα PBS, pH 7,4 (V= 1 L)

130 mM NaCl, 2mM KCl, 8mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,5mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

##### ➤ Διάλυμα έκπλυσης (PBST)

0,1 % (v/v) Tween 20 σε διάλυμα PBS

➤ Διάλυμα κορεσμού (σε διάλυμα PBST)

5 % αποβουτυρωμένο γάλα σε σκόνη, 0,1 % (v/v) Tween 20

Κατά την ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε μεμβράνη διφθοριούχου πολυβινυλιδενίου (PVDF). Η ενεργοποίηση της μεμβράνης PVDF, η οποία έχει κοπεί στις ίδιες διαστάσεις με την πηκτή, πραγματοποιείται με εμβάπτιση αυτής σε μεθανόλη, για 10 δευτερόλεπτα. Κατόπιν, η μεμβράνη επωάζεται στο διάλυμα μεταφοράς 1x για 10 λεπτά. Ταυτόχρονα με τη μεμβράνη πραγματοποιείται εξισορρόπηση τόσο της πηκτής όσο και των 6 χαρτιών Whatman στο διάλυμα μεταφοράς 1x. Εντός του διαλύματος μεταφοράς, οι πρωτεΐνες φορτίζονται αρνητικά και μετακινούνται προς το θετικό πόλο. Για την ηλεκτρομεταφορά χρησιμοποιήθηκε η ειδική συσκευή Semi-dry της εταιρίας Biorad, η οποία φέρει δύο ηλεκτρόδια σε μορφή επιπέδων οριζόντιων πλακών, ενώ η τοποθέτηση στη συσκευή γίνεται ως εξής: στην πλάκα του θετικού πόλου τοποθετούνται διαδοχικά τα τρία χαρτιά Whatman, η μεμβράνη PVDF, η πηκτή και τέλος τα υπόλοιπα τρία χαρτιά Whatman. Η πηκτή είναι απαραίτητο να βρίσκεται σε άμεση επαφή με τη μεμβράνη PVDF, ώστε να αποφευχθεί η δημιουργία φυσαλίδων που θα παρεμποδίσουν την ομοιόμορφη διέλευση του ηλεκτρικού ρεύματος. Η κατασκευή που δημιουργείται, διαβρέχεται με διάλυμα μεταφοράς 1x. Τέλος, η ηλεκτρομεταφορά πραγματοποιείται σε σταθερή ένταση ρεύματος 270 mA για 40 λεπτά.

Αποκλεισμός μη ειδικών θέσεων των αντισωμάτων (Blocking)

Με το τέλος της ηλεκτρομεταφοράς, η μεμβράνη επωάζεται σε διάλυμα κορεσμού, για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, υπό ανάδευση. Η καζεΐνη του γάλακτος προκαλεί κορεσμό στη μεμβράνη, έτσι ώστε να αποκλείονται οι μη ειδικές θέσεις πρόσδεσης των αντισωμάτων στη μεμβράνη.

Ανίχνευση των επιθυμητών πρωτεϊνών με χρήση ειδικών αντισωμάτων

Μετά το πέρας του blocking, η μεμβράνη PVDF εκπλένεται με PBST και επωάζεται για 16 ώρες, σε θερμοκρασία 4° C, υπό ανάδευση με ειδικό αντίσωμα έναντι της υπό μελέτη πρωτεΐνης, το οποίο είναι επίσης διαλυμένο σε διάλυμα κορεσμού. Εν συνεχεία, πραγματοποιείται έκπλυση της μεμβράνης με διάλυμα PBST, για 10 λεπτά, υπό ανάδευση, σε θερμοκρασία δωματίου. Για την απομάκρυνση της περίσσειας του πρώτου αντισώματος, η διαδικασία της έκπλυσης της μεμβράνης επαναλαμβάνεται τρεις φορές. Κατόπιν, ακολουθεί η επώαση της μεμβράνης με το δευτερογενές αντίσωμα για 1 ώρα, σε θερμοκρασία δωματίου, υπό ανάδευση. Η μεμβράνη εκπλένεται τρεις φορές με διάλυμα PBST, όπως και προηγουμένως κι έπειτα επωάζεται με τα αντιδραστήρια ανίχνευσης ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (ECL kit), για τρία λεπτά, στο σκοτάδι. Η ανίχνευση του σήματος λαμβάνει χώρα σε

σκοτεινό θάλαμο, όπου η μεμβράνη τοποθετείται σε κασέτα εμφάνισης, μετά την τοποθέτηση φωτογραφικού φιλμ, κομμένο σε ίδιες διαστάσεις με αυτές της μεμβράνης. Ο χρόνος εμφάνισης ποικίλλει από 20 δευτερόλεπτα μέχρι και 1 ώρα, ανάλογα με την ένταση του σήματος. Μετά το πέρας του χρόνου έκθεσης, το φιλμ επωάζεται διαδοχικά σε διάλυμα εμφάνισης (Developer), νερό και σε διάλυμα μονιμοποίησης (Fixer), για περίπου ένα λεπτό. Τέλος, το φιλμ ξεπλένεται με νερό και αφήνεται μέχρι να στεγνώσει.

Για το πείραμα ανοσοκατακρήμνισης της hAng γίνεται ανίχνευση με μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του PCNA, σε αναλογία 1:200 σε διάλυμα κορεσμού, ενώ στο πείραμα ανοσοκατακρήμνισης του PCNA γίνεται ανίχνευση με μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της hAng σε αναλογία 1:100 σε διάλυμα κορεσμού αντίστοιχα. Και στα δύο πειράματα ανοσοκατακρήμνισης ως δευτερογενές αντίσωμα χρησιμοποιήθηκε το αντίσωμα αίγας έναντι IgG ποντικού (goat anti-mouse), σε αναλογία 1: 25000, σε διάλυμα κορεσμού.

### **3.2.9. Βιοφυσικός χαρακτηρισμός της αλληλεπίδρασης της hAng με το PCNA, μέσω θερμιδομετρίας ισοθερμικής τιτλοδότησης (Isothermal Titration Calorimetry, ITC)**

#### *Πειραματική διαδικασία*

Η τεχνική της θερμιδομετρίας ισοθερμικής τιτλοδότησης εφαρμόστηκε για τη μελέτη και τον προσδιορισμό των θερμοδυναμικών παραμέτρων της αλληλεπίδρασης της hAng με το PCNA. Οι δύο πρωτεΐνες υποβάλλονται σε διαπίδυση έναντι 1 L κοινού διαλύματος, σύστασης 50 mM HEPES/NaOH, pH 7,5, 300 mM NaCl, 2 mM DTT για 16 ώρες σε θερμοκρασία 4° C, υπό ανάδευση. Μετά το πέρας των 16 ωρών γίνεται αλλαγή του διαλύματος διαπίδυσης με 0,5 L διαλύματος ίδιας σύστασης και η διαδικασία συνεχίζεται στις ίδιες συνθήκες για άλλες 3 ώρες. Μετά το τέλος της διαπίδυσης, οι δύο πρωτεΐνες μεταφέρονται σε σωλήνα τύπου Eppendorf και φυγοκεντρούνται σε 15000 rpm, για 12 λεπτά, σε θερμοκρασία 4° C. Το υπερκείμενο της φυγοκέντρωσης συλλέγεται και υπολογίζονται με ακρίβεια οι συγκεντρώσεις των πρωτεϊνών σύμφωνα με την τιμή της απορρόφησης τους σε μήκος κύματος 280 nm. Κατά τη διάρκεια του πειράματος ITC, η hAng, συγκέντρωσης 140 μM, τοποθετείται στη σύριγγα, ενώ το PCNA, συγκέντρωσης 14 μM, τοποθετείται στο θάλαμο του δείγματος. Οι μετρήσεις θερμιδομετρίας ισοθερμικής τιτλοδότησης γίνονται στο μηχάνημα Nano-ITC (*Εικόνα 30*), που βρίσκεται στο Εργαστήριο του Καθ. Κοντοπίδη Γεώργιου, στο Τμήμα Κτηνιατρικής στην Καρδίτσα, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Στο μηχάνημα αυτό, ο όγκος του θαλάμου του δείγματος είναι 950 μL, αλλά χρειάζεται 1,3 mL διαλύματος πρωτεΐνης για να γεμίσει ο θάλαμος, ενώ για τη σύριγγα χρειάζεται 250 μL δείγματος. Τέλος, πραγματοποιούνται 16 τιτλοδοτήσεις, με τον όγκο κάθε τιτλοδότησης να ισούται με 15 μL, ενώ το πείραμα πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία 30 °C.



Εικόνα 30: Μηχάνημα θερμοδομετρίας ισοθερμικής τιτλοδότησης, Nano-ITC.

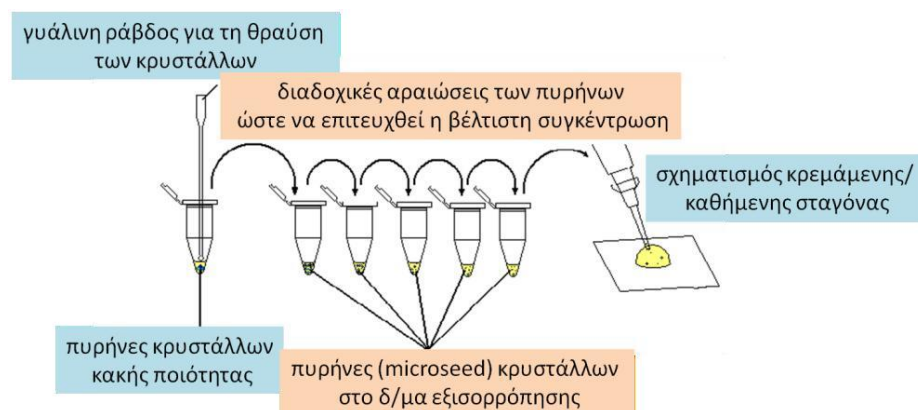
### 3.2.10. Κρυστάλλωση του συμπλόκου hAng-PCNA

Η κρυστάλλωση του συμπλόκου hAng-PCNA, επιτυγχάνεται με τη μέθοδο διάχυσης ατμών (καθήμενη σταγόνα). Πραγματοποιείται σάρωση πολλών συνθηκών διάφορων κιτ με τη χρήση του ρομποτικού συστήματος *OryxNano* (*Douglas Instruments*). Το κάθε βοθρίο του πιάτου 96 θέσεων περιείχε 50  $\mu\text{L}$  από την κάθε συνθήκη του εκάστοτε κιτ. Η αναλογία του μίγματος των δύο πρωτεϊνών είναι η εξής: hAng:PCNA 1:1,2. Το σύστημα κλείνεται αεροστεγώς και αφήνεται να ισορροπήσει σε θερμοκρασία  $16^{\circ}\text{C}$ , με τους κρυστάλλους να εμφανίζονται περίπου 2 μέρες αργότερα, σε συνθήκη κρυστάλλωσης 2 M  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  και 100 mM Tris-HCl pH 8,5, του κιτ *JBScreen Basic*, της εταιρίας *Jena Biosciences*.

#### 3.2.10.1 Βελτίωση των κρυστάλλων του συμπλόκου hAng-PCNA με χρήση της τεχνικής της μικροσποράς (microseeding)

Λόγω του πολύ μικρού μεγέθους των κρυστάλλων του συμπλόκου hAng-PCNA, οι οποίοι σχημάτιζαν συσσωματώματα, προχωρήσαμε σε βελτιστοποίηση της μορφολογίας τους χρησιμοποιώντας την τεχνική της μικροσποράς (microseeding). Στην τεχνική αυτή, ο πυρήνας είναι βάση, όπου συναθροίζονται τα υπόλοιπα μόρια πρωτεϊνών. Η προσθήκη ενός προϋπάρχοντος κρυσταλλικού πλέγματος ευνοείται ενεργειακά σε σχέση με τη δημιουργία ενός νέου πυρήνα. Με αυτή τη μέθοδο καθίσταται δυνατός ο έλεγχος της διαδικασίας της πυρήνωσης, ενώ κάτω υπό συγκεκριμένες συνθήκες τόσο χρόνου, όσο και του περιβάλλοντος, ο πυρήνας αυτός μπορεί να οδηγήσει στο σχηματισμό κρυστάλλου (Bergfors, 2003).

Κατά την τεχνική της μικροσποράς, ως πυρήνες χρησιμοποιούνται κρυσταλλικά θραύσματα. Έτσι λοιπόν τα κρυσταλλικά συσσωματώματα που σχηματίστηκαν θρυμματίζονται με τη βοήθεια ειδικής γυάλινης ράβδου και μεταφέρονται από τη σταγόνα, με την προσθήκη 20  $\mu\text{L}$  διαλύματος εξισορρόπησης, σε ένα σωληνάριο τύπου Eppendorf 1,5 που περιέχει ένα ειδικό σφαιρίδιο και 30  $\mu\text{L}$  διαλύματος εξισορρόπησης. Ακολουθεί έντονη ανάδευση (vortex) διάρκειας 30 sec και κατόπιν τοποθέτηση στον πάγο για 10 sec. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται 5 φορές, έτσι ώστε οι κρύσταλλοι να θρυμματιστούν. Από το πυκνό διάλυμα πυρήνων πραγματοποιείται μία σειρά πέντε διαδοχικών αραιώσεων (1:10 έως 1:10<sup>6</sup>). Κατόπιν, πάνω σε κάθε βοθρίο τοποθετούνται 1,5  $\mu\text{L}$  διαλύματος πρωτεϊνών (αυτό που χρησιμοποιήθηκε για το σχηματισμό των κρυστάλλων που χρησιμοποιούνται στο microseeding), 1  $\mu\text{L}$  διαλύματος εξισορρόπησης (0,1 M Tris/HCl pH 8,5, 2 M  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ) καθώς και 0,5  $\mu\text{L}$  από την εκάστοτε αραιώση των πυρήνων (Εικόνα 31). Το σύστημα κλείνεται αεροστεγώς κι αφήνεται να ισορροπήσει σε θερμοκρασία 16°C. Κρύσταλλοι μεγαλύτερου μεγέθους εμφανίστηκαν 5 ημέρες αργότερα στις σταγόνες με την 2<sup>η</sup> (1:100) και 3<sup>η</sup> (1:1000) κατά σειρά διαδοχική αραιώση των πυρήνων.



Εικόνα 31: Σχηματική απεικόνιση της τεχνικής της μικροσποράς (microseeding).

### 3.2.10.2. Συλλογή κρυσταλλογραφικών δεδομένων του συμπλόκου hAng-PCNA

Αφού βελτιστοποιήσαμε τους κρυστάλλους μας, το επόμενο βήμα ήταν η συλλογή των κρυσταλλογραφικών δεδομένων, η οποία πραγματοποιήθηκε με κροοκρυσταλλογραφικές μεθόδους (εκροή υγρού αζώτου), σε θερμοκρασία 100 K. Προτού ο κρύσταλλος εκτεθεί στην ακτινοβολία, εμβαπτίζεται για μερικά δευτερόλεπτα σε κατάλληλο κροοπροστατευτικό διάλυμα. Στην περίπτωση μας, το διάλυμα αυτό αποτελείται από φρέσκο διάλυμα εξισορρόπησης που περιέχει επιπλέον 25% (v/v) Jeffamine, καθώς οποιοδήποτε άλλο κροοπροστατευτικό, εκτός από Jeffamine, κατακρήμνιζε το δισόξινο φωσφορικό αμμώνιο ( $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ), του διαλύματος εξισορρόπησης. Τα δεδομένα περίθλασης για το σύμπλοκο των δύο



πρωτεϊνών συλλέχθηκαν με συγχροτρονική ακτινοβολία στις εγκαταστάσεις του Diamond στο Harwell Science and Innovation Campus, της Οξφόρδης, στην Αγγλία.

### **3.2.11. Υπερέκφραση και καθαρισμός της επισημασμένης $^{15}\text{N}$ Met(-1)-hAng για μετρήσεις φασματοσκοπίας NMR**

#### **3.2.11.1. Υπερέκφραση της επισημασμένης $^{15}\text{N}$ Met(-1)-hAng**

Παρασκευή θρεπτικών υλικών:

➤ Θρεπτικό υλικό αλάτων M9 5x (1 L)

6,8 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 3 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,5 g  $\text{NaCl}$ , pH 7,4

➤ Θρεπτικό υλικό αλάτων M9 1x (1 L)

Το θρεπτικό υλικό αλάτων, M9 1x, παρασκευάζεται με αραιώση του πυκνού διαλύματος M9 5x σε υπερκάθαρο νερό και ρύθμιση της τιμής του pH στο 7,4. Αυτό περιέχει επιπλέον τα εξής:

- ✓  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$  και  $^{15}\text{N}$  Bioexpress (1ml/L καλλιέργειας)
- ✓ 1 mM  $\text{MgSO}_4$
- ✓ 0,1 mM  $\text{CaCl}_2$
- ✓ 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$   $\text{FeCl}_3$
- ✓ 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  θειαμίνη

Η υπερέκφραση της επισημασμένης αγγειογενίνης πραγματοποιείται σύμφωνα με το πρωτόκολλο του Tonan K. και των συνεργατών του (Tonan et al., 2003) με ορισμένες τροποποιήσεις. Η υγρή καλλιέργεια γίνεται σε 15 mL θρεπτικού υλικού LB broth, όπως έχει περιγραφεί στην υποενότητα 3.2.2.1. Στη συνέχεια, 1 L αποστειρωμένου θρεπτικού υλικού αλάτων M9 1x, στο οποίο προστέθηκε αντιβιοτικό καναμυκίνη με τελική συγκέντρωση 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , εμβολιάστηκε με αναλογία 1/100 από μία υγρή καλλιέργεια και επώαστηκε σε θερμοκρασία 37°C υπό ανάδευση (210 rpm), ώσπου η οπτική απορρόφηση ( $\text{OD}_{600\text{nm}}$ ) να είναι μεταξύ 0,6-0,8. Ακολούθησε προσθήκη IPTG σε τελική συγκέντρωση 1 mM και επώαση σε θερμοκρασία 37°C, υπό ανάδευση 210 rpm, για δύο επιπλέον ώρες. Τέλος, έγινε η συλλογή των κυττάρων έπειτα από φυγοκέντρηση σε 5000 g, σε θερμοκρασία 4°C, για 30 λεπτά.

#### **3.2.11.2. Απομόνωση και καθαρισμός της επισημασμένης $^{15}\text{N}$ Met(-1)-hAng**

Η διαδικασία απομόνωσης και καθαρισμού της επισημασμένης hAng είναι πανομοιότυπη με αυτήν της hAng άγριου τύπου, η οποία πραγματοποιήθηκε

σύμφωνα με το πρωτόκολλο του Holloway D.E. και των συνεργατών του (Holloway et al., 2001) και περιγράφεται αναλυτικά στην ενότητα 3.2.2.2. Η μόνη διαφορά είναι ότι η πρωτεΐνη μετά τη συμπύκνωση με speedvac, επαναδιαλύεται σε διάλυμα 50 mM οξικού νατρίου, 0,2 mM EDTA και 100 mM NaCl, pH 5,5, για να χρησιμοποιηθεί σε πειράματα φασματοσκοπίας NMR.

### **3.2.12. Πρόβλεψη του Τρόπου Πρόσδεσης (Docking) της hAng με το PCNA με τη βοήθεια αλγορίθμων docking και Προσομοιώσεων Μοριακής Δυναμικής (Molecular dynamics simulations, MD)**

#### **3.2.12.1 Μελέτες πρόσδεσης (Docking)**

Τα προγράμματα docking που χρησιμοποιήθηκαν για την πρόβλεψη της δομής του συμπλόκου της αγγειογενίνης με το PCNA είναι το InterEvDock3 (Quignot et al., 2021), το HADDOCK (Dominguez et al., 2003), το HDock (Yan et al., 2017) και το PatchDock (Schneidman-Duhovny et al., 2005).

#### InterEvDock3

Το InterEvDock3 είναι ένα λογισμικό docking που παρέχεται ως διακομιστής στο διαδίκτυο. Είναι σχεδιασμένο έτσι ώστε να χρησιμοποιεί πρώτα τον πιο πρόσφατο αλγόριθμο, FRODOCK (Garzon et al., 2009), για μελέτες άκαμπτης πρόσδεσης (rigid-body docking) και να τις βαθμολογεί, ακολουθώντας επαναβαθμολόγηση με τους αλγόριθμους SOAP-PP και InterEvScore (Andreani et al., 2013), ώστε να βελτιώνονται όσο το δυνατόν περισσότερο οι προβλέψεις πρόσδεσης. Ο χρήστης μπορεί να παρέχει στο πρόγραμμα όχι μόνο τρισδιάστατες δομές των πρωτεϊνών, αλλά και πρωτεϊνικές αλληλουχίες (Quignot et al., 2021).

#### HADDOCK

Σε αυτό το πρόγραμμα, το docking γίνεται αξιοποιώντας τόσο βιοχημικά όσο και βιοφυσικά πειραματικά δεδομένα των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων. Το HADDOCK χρησιμοποιεί συγκεκριμένους περιορισμούς στην αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών, στο πλαίσιο των οποίων οι χρήστες πρέπει να παρέχουν στο πρόγραμμα τα «ενεργά» και «παθητικά» αμινοξικά κατάλοιπα της επιφάνειας αλληλεπίδρασης των δύο πρωτεϊνών. Τα «ενεργά» αμινοξικά κατάλοιπα συμμετέχουν στην πρωτεϊνική αλληλεπίδραση, ενώ τα «παθητικά» την περιβάλλουν. Για τους υπολογισμούς των δομών των μοντέλων χρησιμοποιεί το λογισμικό CNS (Crystallography and NMR System), καθώς και πολλά σκριπτ του προγράμματος python. Οι χρήστες μπορούν να χρησιμοποιήσουν το HADDOCK είτε ως web server,

είτε μπορούν να το εγκαταστήσουν ως πρόγραμμα στον υπολογιστή τους (Dominguez et al., 2003).

### HDock

Το πρόγραμμα HDock είναι ένα λογισμικό docking που παρέχεται ως διακομιστής στο διαδίκτυο. Στο πρόγραμμα αυτό, το docking γίνεται με βάση έναν υβριδικό αλγόριθμο από μοντελισμό βάσει προτύπων (template based modeling) και από την *ab initio* ελεύθερη πρόσδεση των πρωτεϊνών (free docking). Με αυτόν τον τρόπο περιπτώσεις με παραπλανητικά-λανθασμένα πρότυπα, μπορούν να διορθωθούν από το free docking. Ο διακομιστής υποστηρίζει μελέτες πρόσδεσης πρωτεΐνης-πρωτεΐνης και πρωτεΐνης-DNA/RNA και ο χρήστης μπορεί να παρέχει στο πρόγραμμα όχι μόνο τρισδιάστατες δομές των πρωτεϊνών, αλλά και πρωτεϊνικές αλληλουχίες. Η διαδικασία του docking είναι γρήγορη και απαιτεί περίπου 10-20 λεπτά για την ολοκλήρωση της (Yan et al., 2017).

### PatchDock

Το PatchDock είναι ένας αλγόριθμος για μελέτες πρόσδεσης. Το πρόγραμμα αυτό εκτελεί μελέτες πρόσδεσης πρωτεΐνης-πρωτεΐνης και μελέτες πρόσδεσης πρωτεϊνών με μικρά μόρια. Ο χρήστης μπορεί να παρέχει στο πρόγραμμα δύο μόρια οποιουδήποτε τύπου, όπως πρωτεΐνες, DNA, πεπτίδια και φάρμακα. Το PatchDock βασίζεται στη γεωμετρία των μορίων και αποσκοπεί στην εύρεση τρόπων πρόσδεσης των μορίων που αποδίδουν καλή συμπληρωματικότητα μοριακού σχήματος. Τα αποτελέσματα του προγράμματος αυτού είναι μια λίστα δυνητικών μοριακών συμπλόκων, ταξινομημένων με κριτήρια συμπληρωματικότητας σχήματος (Schneidman-Duhovny et al., 2005).

Ο τρόπος με τον οποίο πραγματοποιήθηκε η υποβολή των δεδομένων (αρχεία rdb, διάφοροι περιορισμοί), για την εκτέλεση των διαφορετικών προγραμμάτων docking, είναι σχεδόν πανομοιότυπη για όλα τα προγράμματα docking που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή με μικρές αλλαγές, ανάλογα τον αλγόριθμο. Σε όλους τους παραπάνω αλγόριθμους docking χρησιμοποιήθηκαν τα αρχεία rdb που αφορούν στις κρυσταλλικές δομές της hAng (PDB:1B1I) και του PCNA (PDB:6CBI). Ο μόνος περιορισμός που χρησιμοποιήθηκε είναι η υποχρεωτική συμμετοχή τριών αμινοξικών καταλοίπων της hAng (**Leu 83, Arg 101, Ser 118**) στην επιφάνεια αλληλεπίδρασης των δυο πρωτεϊνών, η οποία βασίζεται σε πειραματικά δεδομένα φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR).

Από την εκτέλεση των παραπάνω προγραμμάτων docking προκύπτουν 1000 διαφορετικά μοντέλα από το docking με το πρόγραμμα HADDOCK, 100 από το πρόγραμμα HDock, κι 100 από το πρόγραμμα PatchDock. Τα αποτελέσματα του προγράμματος InterEvDock3 είναι 50 μοντέλα από την αξιολόγηση του αλγόριθμου

FRODOCK, 50 μοντέλα του SOAP-PP και άλλα 50 του InterEvScore. Εν κατακλείδι, το τελικό σύνολο είναι 1350 διαφορετικά μοντέλα, με τη μορφή αρχείων pdb. Η επιλογή των επικρατέστερων διατάξεων έγινε με βάση τα πειραματικά δεδομένα από πειράματα τιτλοδότησης NMR και πειράματα ITC του συμπλόκου hAng-PCNA, καθώς κι από μερικά άλλα υπολογιστικά κριτήρια που περιγράφονται παρακάτω.

#### Κριτήρια επιλογής επικρατέστερων διατάξεων

- ✓ Ελεύθερη ενέργεια, ΔG (όσο μικρότερη, τόσο πιο σταθερό το σύμπλοκο). Ο υπολογισμός της ΔG για κάθε μοντέλο έγινε μέσω του διαδικτυακού εργαλείου PRODIGY, του προγράμματος docking, HADDOCK.
- ✓ Μεταβολή της συνολικής ρKa (ΔρKa) επί όλων των καταλοίπων του συμπλόκου, προ και μετά από την πρόσδεση. Όσο μικρότερη η ΔρKa, τόσο "σωστότερο" το μοντέλο του συμπλόκου. Ο υπολογισμός της ρKa για κάθε μοντέλο έγινε με χρήση του σκριπτ PROPKA μέσω του λογισμικού PDB2PQR, σε Linux.
- ✓ Έλεγχος της περιοχής πρόσδεσης της hAng με το PCNA με την βοήθεια του προγράμματος SPDBV (πρέπει να συμμετέχουν στην επιφάνεια αλληλεπίδρασης τα τρία αμινοξικά κατάλοιπα της hAng (Leu 83, Arg 101 και Ser 118).
- ✓ Έλεγχος της διατήρησης των τριών δισουλφιδικών δεσμών της hAng με τη βοήθεια του προγράμματος RASMOL (Sayle, 1995).

Από τα 1350 διαφορετικά μοντέλα, αυτό που ικανοποιεί καλύτερα όλα τα παραπάνω κριτήρια είναι το πρώτο μοντέλο του προγράμματος PatchDock. Το μοντέλο αυτό χρησιμοποιήθηκε για τις προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής.

#### **3.2.12.2. Προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής (Molecular dynamics simulations, MD)**

##### *Πειραματική διαδικασία*

##### Προετοιμασία για την προσομοίωση του συμπλόκου hAng-PCNA

##### ➤ Πρόγραμμα psfgen

Απαραίτητη προϋπόθεση, για την πραγματοποίηση της ελαχιστοποίησης ενέργειας καθώς και της προσομοίωσης μοριακής δυναμικής, αποτελούν οι πληροφορίες του τρόπου με τον οποίο συνδέονται όλα τα άτομα των πρωτεϊνών. Ωστόσο, το αρχείο pdb που χρησιμοποιείται για το αρχικό «χτίσιμο» της δομής, περιέχονται μόνο οι συντεταγμένες των ατόμων των πρωτεϊνών, ενώ λείπουν και τα υδρογόνα. Κατά συνέπεια, είναι απαραίτητη η δημιουργία ενός αρχείου psf, το οποίο να περιλαμβάνει όλες τις παραπάνω πληροφορίες. Το αρχείο psf δημιουργείται από το

πρόγραμμα psfgen, βάσει του αρχικού αρχείου pdb κι ενός αρχείου τοπολογίας. Κατόπιν, το πρόγραμμα δημιουργεί δυο καινούργια αρχεία, pdb και psf, τα οποία και χρησιμοποιούνται στις επακόλουθες διαδικασίες (Εικόνα 32).

➤ Ενυδάτωση (solvate)

Πριν την ελαχιστοποίηση ενέργειας πρέπει να δημιουργηθούν οι κατάλληλες συνθήκες γύρω από το πρωτεϊνικό μόριο, ώστε να προσεγγίζουν αυτές της πραγματικότητας. Επειδή το άμεσο περιβάλλον της υπό μελέτη πρωτεΐνης είναι υδατικό, πρέπει να τροποποιηθεί το μοντέλο του συστήματος με την προσθήκη μορίων νερού. Συνήθως δημιουργούμε ένα υδατινό πλέγμα σε μορφή κύβου, που στο εσωτερικό του βρίσκεται η πρωτεΐνη μας, με τη βοήθεια του προγράμματος VMD (Humphrey et al., 1996a). Με την εκτέλεση της παραπάνω διαδικασίας δημιουργούνται τα αρχεία psf και pdb.

➤ Προσθήκη Ιόντων (Neutralization/Add Ions)

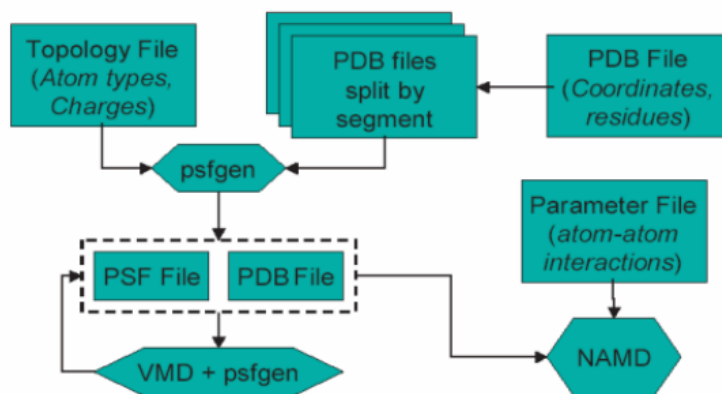
Τα αρχεία psf και pdb που δημιουργήθηκαν κατά τη διαδικασία της ενυδάτωσης περιέχουν το σύμπλεγμα (hAng-PCNA)-H<sub>2</sub>O. Το σύστημα όμως για να χρησιμοποιηθεί για την εξισορρόπηση πρέπει να είναι ηλεκτρικά ουδέτερο. Για αυτό το λόγο προσθέτουμε ιόντα θετικά ή/και αρνητικά. Γίνεται προσθήκη ιόντων Na<sup>+</sup> για την εξουδετέρωση αρνητικού φορτίου και ιόντων Cl<sup>-</sup> για την εξουδετέρωση θετικού φορτίου, ενώ η διαδικασία πραγματοποιείται με χρήση του προγράμματος VMD (Humphrey et al., 1996b). Με την εκτέλεση της παραπάνω διαδικασίας δημιουργούνται νέα αρχεία psf και pdb.

➤ Ελαχιστοποίηση ενέργειας (energy minimization)

Στη φάση αυτή το πρόγραμμα NAMD (Nanomolar Molecular Dynamics) προβαίνει σε τοπικές μεταβολές της δομής (κυρίως στις πλευρικές αλυσίδες) με στόχο την ελαχιστοποίηση της συνολικής δυναμικής ενέργειας του συστήματος.

Πρόγραμμα NAMD

Το πρόγραμμα NAMD εκτελεί τις προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής καθώς και την ελαχιστοποίηση της ενέργειας σε ένα σύστημα βιομορίων (Phillips et al., 2005).



Εικόνα 32 : Διάγραμμα ροής που απεικονίζει τον τρόπο χρήσης των διαφόρων αρχείων από τα προγράμματα VMD (Humphrey et al., 1996b) και NAMD (NAMDTUTORIAL, 2010).

### ➤ Εξισορρόπηση (Equilibration)

Μετά από την ελαχιστοποίηση ενέργειας ακολουθεί σύντομη (25000 βήματα) προσομοίωση του συστήματος υπό σταθερή πίεση 1 Atm και βαθμιαία αύξηση της θερμοκρασίας από 0 K στους 303 K (30 °C). Στη φάση αυτή προσαρμόζεται ο όγκος του συστήματος στις επιβαλλόμενες συνθήκες πίεσης και θερμοκρασίας. Ακολουθεί η φάση της εξισορρόπησης, που στην συγκεκριμένη μελέτη είναι προσομοίωση υπό σταθερό όγκο, θερμοκρασία (303 K) και σταθερό αριθμό σωματιδίων (NVT) για 30 ns (15000000 βήματα).

#### 3.2.12.3. Υπολογισμός RMSD (Root Mean Square Deviation)

Για την ολοκλήρωση της μελέτης μας, υπολογίζεται η παράμετρος RMSD. Η παράμετρος RMSD ορίζεται ως μέτρο της μεταβολής της δομής σε σύγκριση με την αρχική δομή συναρτήσει του χρόνου. Με άλλα λόγια, είναι η απόκλιση σε Å που παρουσιάζει η πρωτεϊνική δομή από την αρχική δομή σε μια δεδομένη χρονική στιγμή. Η μεταβολή της παραμέτρου RMSD για κάθε στιγμιότυπο της προσομοίωσης είναι δυνατόν να αναπαρασταθεί σε ένα διάγραμμα. Για να θεωρηθεί ότι η εξισορρόπηση του μοντέλου μας είναι ικανοποιητική, θα πρέπει η μεταβολή του RMSD να φτάνει σε ένα πλατό, να μένει δηλαδή σταθερή γύρω από μία τιμή.

#### 3.2.13. Δημιουργία μεταλλάξεων στο μοντέλο hAng-PCNA *in silico*

Με την ολοκλήρωση των προσομοιώσεων μοριακής δυναμικής για το μοντέλο της τρισδιάστατης δομής του συμπλόκου hAng-PCNA, που προέκυψε από docking, προχωρήσαμε στην *in silico* δημιουργία μεταλλάξεων ορισμένων αμινοξικών καταλοίπων της hAng, που βρίσκονται, σύμφωνα με το μοντέλο μας, στην επιφάνεια

αλληλεπίδρασης των δύο πρωτεϊνών, για να εξετάσουμε το πόσο σταθερή είναι η συγκεκριμένη αλληλεπίδραση. Τα αμινοξικά κατάλοιπα που επιλέχθηκαν να αλλάξουν, είναι δύο αργινίνες της hAng, η R5 και η R101, που βρίσκονται στην επιφάνεια διεπαφής της hAng με το PCNA. Πέραν του γεγονότος, ότι τα δύο αυτά κατάλοιπα βρίσκονται στην επιφάνεια αλληλεπίδρασης της hAng με το PCNA, βάσει του μοντέλου, επιλέχθηκαν και για έναν ακόμη λόγο. Μέσω του προγράμματος VMD υπολογίστηκε η τιμή της συνολικής ενέργειας (ηλεκτροστατικές δυνάμεις και δεσμοί van der Waals), για όλα τα αμινοξέα της hAng, που βρίσκονται, σύμφωνα με το μοντέλο μας, στην επιφάνεια διεπαφής με το PCNA. Όσο πιο αρνητική είναι η τιμή της ενέργειας ενός αμινοξέος, τόσο πιο σταθεροποιητικό ρόλο παίζει στην αλληλεπίδραση των δύο πρωτεϊνών. Συνεπώς, αυτές οι δύο αργινίνες επιλέχθηκαν, διότι έχουν τη μικρότερη συνολικά ενέργεια, σε σχέση με τα υπόλοιπα κατάλοιπα. Τα δύο κατάλοιπα αργινίνης (Arg, R) που βρίσκονται στις θέσεις 5 και 101 της hAng, μετατράπηκαν σε γλουταμικό οξύ (Glu, E), *in silico*, με χρήση του προγράμματος SPDBV, δημιουργώντας ένα διπλό μετάλλαγμα της hAng, το hAng R5ER101E. Η μετάλλαξη δύο θετικά φορτισμένων αμινοξέων, όπως οι αργινίνες, σε δύο αρνητικά φορτισμένα αμινοξέα, όπως τα κατάλοιπα γλουταμικού, στην επιφάνεια διεπαφής του συμπλόκου hAng-PCNA, έχει ως στόχο την αποσταθεροποίηση της πρόσδεσης των δύο πρωτεϊνών.

### **3.2.14. Προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής για το σύμπλοκο hAng R5ER101E-PCNA**

Το σύμπλοκο της μεταλλαγμένης μορφής της hAng, hAng R5ER101E, με το PCNA, υποβάλλεται σε προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής, έτσι ώστε να διαπιστωθεί εάν οι συγκεκριμένες μεταλλάξεις στα αμινοξικά κατάλοιπα της hAng (R5 και R101), που βρίσκονται στην επιφάνεια διεπαφής με το PCNA, μπορούν να αποσταθεροποιήσουν ή όχι την πρόσδεση των δύο πρωτεϊνών. Η προσομοίωση πραγματοποιήθηκε, ακολουθώντας την ίδια διαδικασία που περιγράφεται στην υποενότητα 3.2.14.2.

### **3.2.15. Δημιουργία των μεταλλαγμάτων της hAng, R5E και R5ER101E, με τη μέθοδο της κατευθυνόμενης μεταλλαξιγένεσης (Site Direct Mutagenesis, SDM)**

Τα μεταλλάγματα της hAng, R5E και R5ER101E, δημιουργήθηκαν με τη μέθοδο της στοχευμένης μεταλλαξιγένεσης, ακολουθώντας την ίδια διαδικασία που περιγράφεται στην υποενότητα 3.2.1. Στον Πίνακα 13, φαίνονται οι ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για να γίνουν οι στοχευμένες μεταλλάξεις, οι οποίοι σχεδιάστηκαν κάνοντας χρήση του διαδικτυακού προγράμματος Primer X. Ο πλασμιδιακός φορέας που χρησιμοποιήθηκε και σε αυτή την περίπτωση ως εκμαγείο είναι ο pET-28a, όπου βρίσκεται το cDNA του γονιδίου

της hAng (pET-28a-hAng). Πιο συγκεκριμένα, μεταλλάχθηκαν 2 κατάλοιπα αργινίνης (Arg, R) που βρίσκονται στις θέσεις 5 και 101, προς γλουταμικό οξύ (Glu, E).

Πίνακας 13: Εκκινητές για την εισαγωγή μεταλλάξεων στην αλληλουχία της hAng.

Μετάλλαξη	Κατεύθυνση	Αλληλουχία εκκινητή	Tm (°C)	GC %
R5E	FW	CAGGACAACCTCGGAATATACACATTTCC	60	43
	REV	GGAAATGTGTATATTCCGAGTTGTCCTG		
R101E	FW	CTACTGCCGGCTTCGAAATGTTGTGGTTG	63	50
	REV	CAACCACAACATTTTCGAAGCCGGCAGTAG		

### 3.2.16. Ετερόλογη έκφραση και καθαρισμός των μεταλλαγμάτων hAng R5E και hAng R5ER101E

Η αλληλουχία των πλασμιδίων των μεταλλαγμάτων της hAng (pET-hAng R5E και pET-hAng R5ER101E) επιβεβαιώθηκε μέσω αλληλούχισης. Η υπερέκφραση και ο καθαρισμός των δύο μεταλλαγμένων μορφών της hAng πραγματοποιήθηκε ακριβώς με την ίδια διαδικασία που περιγράφεται αναλυτικά στην υποενότητα 3.2.2.

### 3.2.17. Βιοφυσικός χαρακτηρισμός της αλληλεπίδρασης των μεταλλαγμάτων της hAng S28AT36AS37AS87A, R5E και R5ER101E με το PCNA, μέσω θερμιδομετρίας ισοθερμικής τιτλοδότησης (Isothermal Titration Calorimetry, ITC)

#### Πειραματική διαδικασία

Η τεχνική της θερμιδομετρίας ισοθερμικής τιτλοδότησης εφαρμόστηκε για τη μελέτη και τον προσδιορισμό των θερμοδυναμικών παραμέτρων της αλληλεπίδρασης των μεταλλαγμάτων της hAng S28AT36AS37AS87A, R5E και R5ER101E με το PCNA, με σκοπό την επιβεβαίωση του μοντέλου του συμπλόκου hAng-PCNA, που προέκυψε με μοντελισμό. Το μετάλλαγμα hAng S28AT36AS37AS87A και το PCNA υποβάλλονται σε διαπίδυση έναντι 1 L κοινού διαλύματος, σύστασης 50 mM HEPES/NaOH, pH 7,5, 300 mM NaCl, 2 mM DTT για 16 ώρες σε θερμοκρασία 4° C, υπό ανάδευση. Μετά το πέρας των 16 ωρών γίνεται αλλαγή του διαλύματος διαπίδυσης με 0,5 L διαλύματος ίδιας σύστασης και η διαδικασία συνεχίζεται στις ίδιες συνθήκες για άλλες 3 ώρες. Μετά το τέλος της διαπίδυσης, οι δύο πρωτεΐνες μεταφέρονται σε σωλήνα τύπου Eppendorf και φυγοκεντρούνται σε 15000 rpm, για 12 λεπτά, σε θερμοκρασία 4° C. Το υπερκείμενο της φυγοκέντρησης συλλέγεται και υπολογίζονται με ακρίβεια οι συγκεντρώσεις των πρωτεϊνών σύμφωνα με την τιμή της απορρόφησης τους σε μήκος κύματος 280 nm. Κατά τη διάρκεια του πειράματος ITC, το μετάλλαγμα hAng S28AT36AS37AS87A, συγκέντρωσης 104 μM, τοποθετείται



στη σύριγγα, ενώ το PCNA, συγκέντρωσης 14  $\mu\text{M}$ , τοποθετείται στο θάλαμο του δείγματος. Εν συνεχεία, με τον ίδιο τρόπο τα μεταλλάγματα hAng R5E και R5ER101E και το PCNA, υποβάλλονται σε διαπίδυση έναντι 1 L κοινού διαλύματος, σύστασης 50 mM οξικού νατρίου, 0,2 mM EDTA και 100 mM NaCl, pH 5,5, για 16 ώρες σε θερμοκρασία 4° C, υπό ανάδευση. Μετά το πέρας των 16 ωρών γίνεται αλλαγή του διαλύματος διαπίδυσης με 0,5 L διαλύματος ίδιας σύστασης και η διαδικασία συνεχίζεται στις ίδιες συνθήκες για ακόμη 3 ώρες. Μετά το τέλος της διαπίδυσης, οι δύο πρωτεΐνες μεταφέρονται σε σωλήνα τύπου Eppendorf και φυγοκεντρούνται σε 15000 rpm, για 12 λεπτά, σε θερμοκρασία 4° C. Το υπερκείμενο της φυγοκέντρωσης συλλέγεται και υπολογίζονται με ακρίβεια οι συγκεντρώσεις των πρωτεϊνών σύμφωνα με την τιμή της απορρόφησης τους σε μήκος κύματος 280 nm. Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων ITC, το PCNA συγκέντρωσης 300  $\mu\text{M}$ , τοποθετείται στη σύριγγα, ενώ τα μεταλλάγματα της hAng R5E και R5ER101E συγκέντρωσης 15 και 20  $\mu\text{M}$  αντίστοιχα, τοποθετούνται στο θάλαμο του δείγματος. Οι μετρήσεις θερμιδομετρίας ισοθερμικής τιτλοδότησης, όπως και στα προηγούμενα πειράματα, γίνονται στο μηχάνημα Nano-ITC (*Εικόνα 30*), που βρίσκεται στο Εργαστήριο του Καθ. Κοντοπίδη Γεώργιου, στο Τμήμα Κτηνιατρικής στην Καρδίτσα, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Πραγματοποιούνται 16 τιτλοδοτήσεις, με τον όγκο κάθε τιτλοδότησης να ισούται με 15  $\mu\text{L}$ , σε κάθε πείραμα, ενώ όλα τα πειράματα διεξάγονται σε θερμοκρασία 30° C.

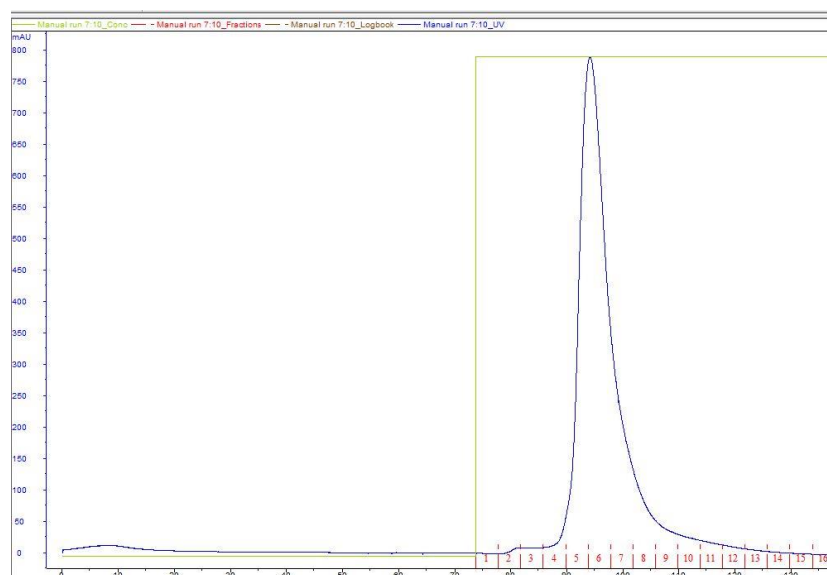
## 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

### **4.1. Απομόνωση και καθαρισμός των μεταλλαγμάτων hAng S28AT36AS37A και hAng S28AT36AS37AS87A**

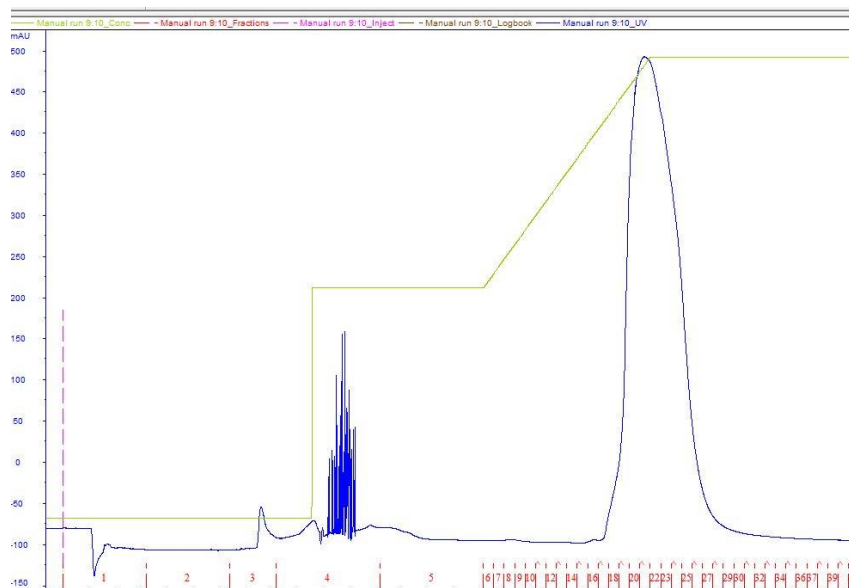
Η απομόνωση και ο καθαρισμός των μεταλλαγμάτων hAng S28AT36AS37A και hAng S28AT36AS37AS87A διεξήχθη σύμφωνα με το πρωτόκολλο του Holloway D.E. και των συνεργατών του (Holloway et al., 2001), με τροποποιήσεις όπως περιεγράφηκε στην ενότητα 3.2.2.2. Παρακάτω παρατίθενται τα αποτελέσματα του χρωματογραφικού καθαρισμού των δύο μεταλλαγμάτων με την απεικόνιση τόσο χρωματογραφημάτων, όσο και των αντίστοιχων πηκτών πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες.

#### Αποτελέσματα χρωματογραφικού καθαρισμού του μεταλλάγματος hAng S28AT36AS37A

Όπως παρουσιάζεται στην *Εικόνα 33*, η έκλυση της πρωτεΐνης από την κατιονανταλλακτική στήλη SPFF γίνεται στα κλάσματα 5-8, σύμφωνα με την τιμή της απορρόφησης σε μήκος κύματος 280 nm, τα οποία εν συνεχεία συλλέγονται και διέρχονται από τη δεύτερη στήλη καθαρισμού, RPC 18 *Εικόνα 34*.

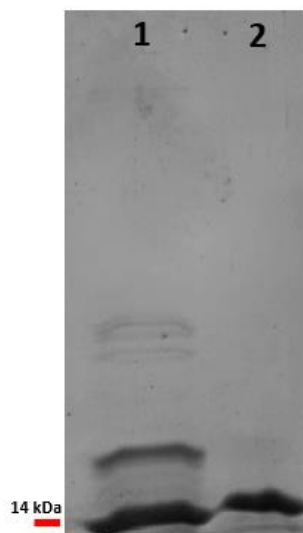


*Εικόνα 33: Χρωματογράφημα της κατιονανταλλακτικής στήλης SPFF. Με πράσινη γραμμή απεικονίζεται η συγκέντρωση του διαλύματος έκλυσης, ενώ με μπλε γραμμή απεικονίζεται η απορρόφηση σε μήκος κύματος 280 nm.*



Εικόνα 34: Χρωματογράφημα της στήλης ανάστροφης φάσης, RPC 18. Με πράσινη γραμμή απεικονίζεται η συγκέντρωση του διαλύματος έκλουσης, ενώ με μπλε γραμμή απεικονίζεται η απορρόφηση σε μήκος κύματος 280 nm.

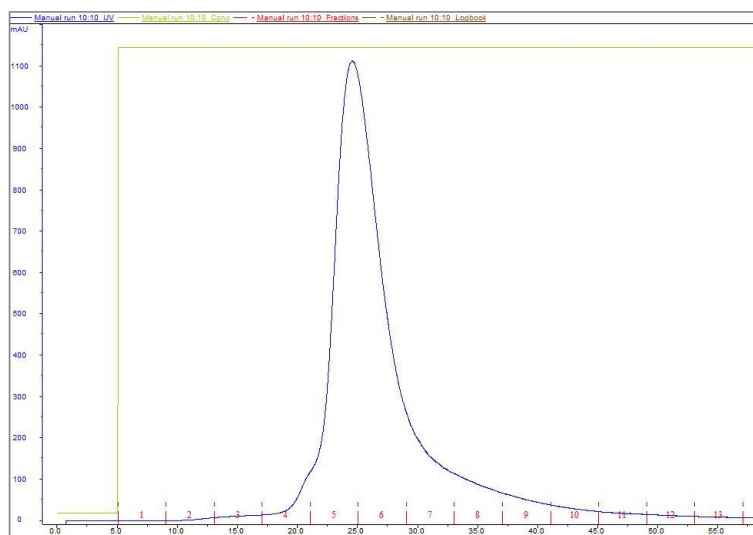
Η πορεία της απομόνωσης του μεταλλάγματος hAng S28AT36AS37A ελέγχεται με ανάλυση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (Εικόνα 35).



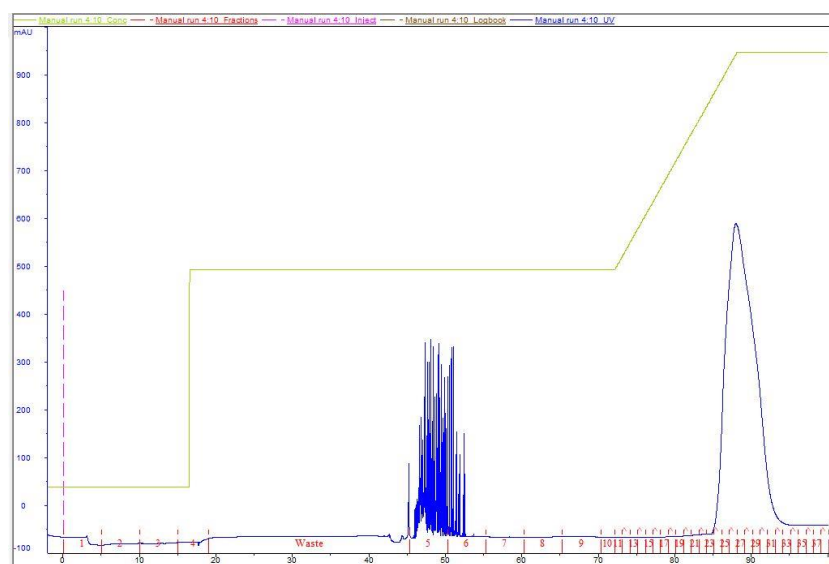
Εικόνα 35: Πηκτή 12 % (w/v) SDS πολυακρυλαμιδίου, με χρώση Coomassie brilliant blue R-250. Στη διαδρομή 1 απεικονίζεται το πρωτεϊνικό κλάσμα, μετά τη στήλη SPFF, ενώ στη διαδρομή 2 απεικονίζεται το πρωτεϊνικό κλάσμα, μετά τη στήλη Resource RPC18.

## Αποτελέσματα χρωματογραφικού καθαρισμού του μεταλλάγματος hAng S28AT36AS37AS87A

Όπως παρουσιάζεται στην *Εικόνα 36*, η έκλυση της πρωτεΐνης από την κατιονανταλλακτική στήλη SPFF γίνεται στα κλάσματα 5-7, σύμφωνα με την τιμή της απορρόφησης σε μήκος κύματος 280 nm, τα οποία εν συνεχεία συλλέγονται και διέρχονται από τη δεύτερη στήλη καθαρισμού, RPC 18 *Εικόνα 37*.



*Εικόνα 36:* Χρωματογράφημα της κατιονανταλλακτικής στήλης SPFF. Με πράσινη γραμμή απεικονίζεται η συγκέντρωση του διαλύματος έκλυσης, ενώ με μπλε γραμμή απεικονίζεται η απορρόφηση σε μήκος κύματος 280 nm.



*Εικόνα 37:* Χρωματογράφημα της στήλης ανάστροφης φάσης, RPC 18. Με πράσινη γραμμή απεικονίζεται η συγκέντρωση του διαλύματος έκλυσης, ενώ με μπλε γραμμή απεικονίζεται η απορρόφηση σε μήκος κύματος 280 nm.

Η πορεία της απομόνωσης του μεταλλάγματος hAng S28AT36AS37AS87A ελέγχεται με ανάλυση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (Εικόνα 38).



Εικόνα 38: Πηκτή 12 % SDS πολυακρυλαμιδίου, με χρώση Coomassie brilliant blue R-250. Στη διαδρομή 1 απεικονίζεται το πρωτεϊνικό κλάσμα, μετά τη στήλη SPFF, ενώ στη διαδρομή 2 απεικονίζεται το πρωτεϊνικό κλάσμα, μετά τη στήλη Resource RPC18.

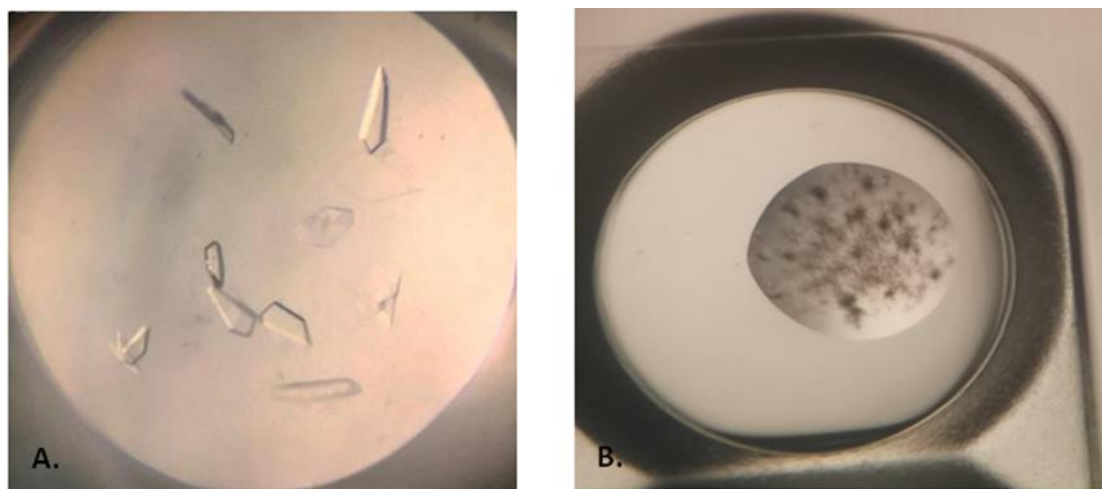
Απόδοση του καθαρισμού: ο καθαρισμός των μεταλλαγμάτων hAng S28AT36AS37A και hAng S28AT36AS37AS87A, είχε ως αποτέλεσμα την παραγωγή 6 mg καθαρής πρωτεΐνης για κάθε μετάλλαγμα ανά λίτρο βακτηριακής καλλιέργειας.

## 4.2. Κρυσταλλογραφικές μελέτες των μεταλλαγμάτων hAng S28AT36AS37A και hAng S28AT36AS37AS87A

### 4.2.1. Ανάπτυξη κρυστάλλων των μεταλλαγμάτων hAng S28AT36AS37A και hAng S28AT36AS37AS87A

Μετά από σάρωση διαφόρων κρυσταλλογραφικών συνθηκών αναπτύχθηκαν κρύσταλλοι των μεταλλαγμάτων με την τεχνική της καθημένης σταγόνας. Οι κρύσταλλοι για τα δύο μεταλλάγματα αναπτύχθηκαν σε διαφορετικές κρυσταλλογραφικές συνθήκες. Η συνθήκη κρυστάλλωσης για το τριπλό μετάλλαγμα, hAng S28AT36AS37A, είναι 0,15 M μαλαϊκό νάτριο pH 7,0, 20% (w/v) PEG 3350, ενώ για το τετραπλό μετάλλαγμα, hAng S28AT36AS37AS87A, 100 mM κιτρικό νάτριο pH 5,6, 25% (w/v) PEG 4000. Οι κρύσταλλοι και των δύο μεταλλαγμάτων αναπτύχθηκαν σε θερμοκρασία 16°C, όπως περιγράφεται αναλυτικά στην ενότητα 3.2.3. Παρατηρείται ότι η μορφολογία των κρυστάλλων των δυο μεταλλαγμάτων είναι

διαφορετική. Στην *Εικόνα 39* παρουσιάζονται οι κρύσταλλοι των δύο μεταλλαγμάτων, όπου είναι εμφανής η διαφορετική τους μορφολογία.



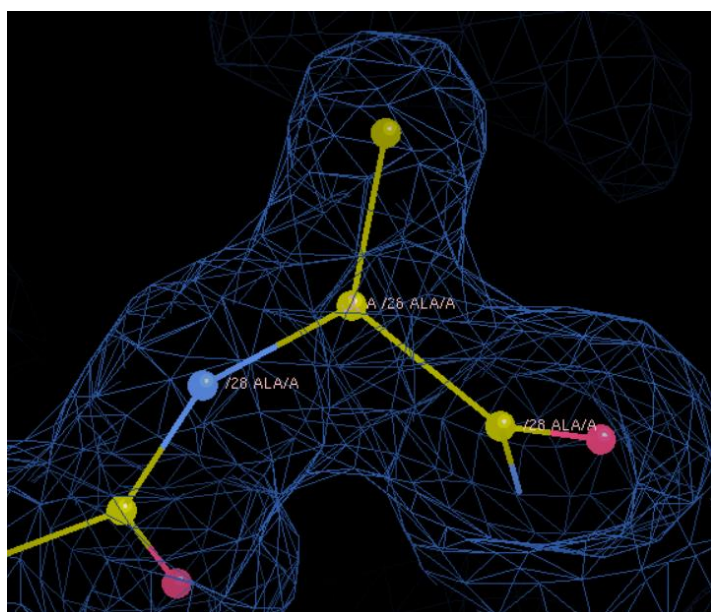
*Εικόνα 39: A. Κρύσταλλοι του μεταλλάγματος hAng S28AT36AS37A. Σύσταση διαλύματος εξισορρόπησης 0,15 M μαλαϊκό νάτριο pH 7,0, 20% (w/v) PEG 3350. B. Κρύσταλλοι του μεταλλάγματος hAng S28AT36AS37AS87A. Σύσταση διαλύματος εξισορρόπησης 100 mM κιτρικό νάτριο pH 5,6, 25% (w/v) PEG 4000. Συγκέντρωση των μεταλλαγμάτων στη σταγόνα: 5mg/ml.*

#### 4.2.2. Συλλογή και ανάλυση κρυσταλλογραφικών δεδομένων

Όπως περιγράφεται αναλυτικά στην ενότητα 3.2.4, η συλλογή των κρυσταλλογραφικών δεδομένων πραγματοποιήθηκε στον σταθμό πρωτεϊνικής κρυσταλλογραφίας P13 στις εγκαταστάσεις συγχροτρονικής ακτινοβολίας του EMBL, στο Αμβούργο της Γερμανίας. Η ανοικοδόμηση και η προσαρμογή του μοντέλου στο χάρτη ηλεκτρονικής πυκνότητας γίνεται με το πρόγραμμα COOT (Emsley & Cowtan, 2004), ενώ χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα CCP4 Molecular Graphics (Pottterton et al., 2002), έγινε η απεικόνιση των μεταλλαγμένων δομών. Η κρυσταλλική δομή της μεταλλαγμένης μορφής hAng S28AT36AS37A επιλύθηκε σε ευκρίνεια 1,6 Å, ενώ της μεταλλαγμένης μορφής hAng S28AT36AS37AS87A σε ευκρίνεια 3,1 Å. Στον Πίνακα 14 παρουσιάζονται τα στατιστικά στοιχεία της συλλογής και της επεξεργασίας των κρυσταλλογραφικών δεδομένων και της βελτιστοποίησης των δομών των δύο μεταλλαγμάτων της hAng, ενώ στις Εικόνες 40, 41 και 43, παρουσιάζονται οι χάρτες ηλεκτρονικής πυκνότητας από τους κρυστάλλους των δύο μεταλλαγμάτων της hAng. Εν κατακλείδι, όπως φαίνεται από τις Εικόνες 42 και 44, οι συγκεκριμένες μεταλλάξεις δεν αλλάζουν σημαντικά τη δομή της hAng, (*hAng S28AT36AS37A-RMSD Ca: 0,695 Å, RMSD main chain: 0,646 Å / hAng S28AT36AS37AS87A-RMSD Ca: 0,730 Å RMSD main chain: 0,767 Å*).

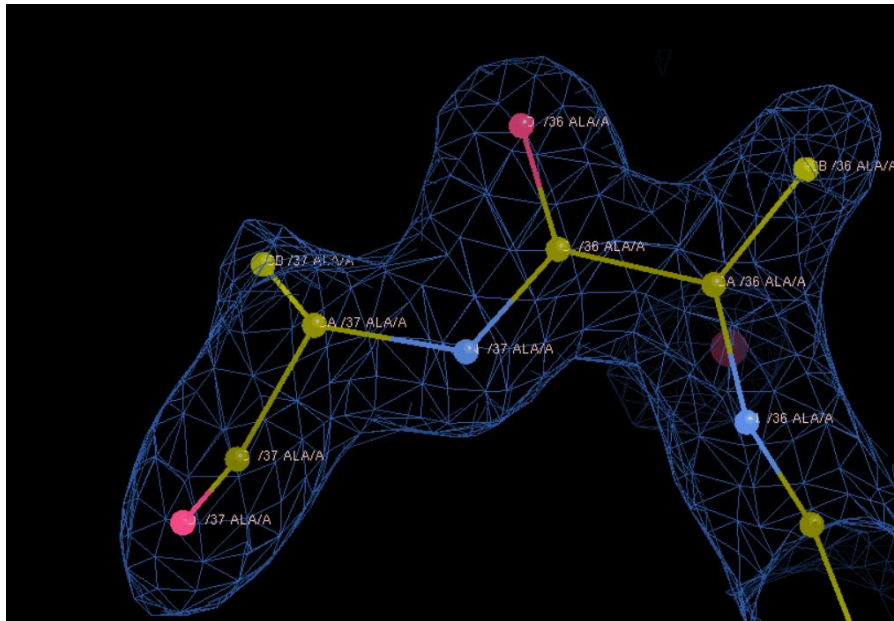
Πίνακας 14: Στατιστικά στοιχεία συλλογής κι επεξεργασίας δεδομένων και βελτιστοποίησης των μεταλλαγμάτων *hAng S28AT36AS37A* και *hAng S28AT36AS37AS87A*. Τα δεδομένα που βρίσκονται σε παρενθέσεις αφορούν στην εξωτερική στοιβάδα.

	<i>hAng S28AT36AS37A</i>	<i>hAng S28AT36AS37AS87A</i>
Ομάδα συμμετρίας	<i>P 21 21 2</i>	<i>P 21 2 21</i>
Διαστάσεις μοναδιαίας		
κυψελίδας	84.63, 37.34, 39.72	34.57, 55.05, 68.66
Ευκρίνεια (Å)	42.32-1.60	42.99-3.10
Συνολικές ανακλάσεις	89270	18483
Μοναδικές ανακλάσεις	17242	2632
<i>R<sub>sym</sub></i>	0.017 (0.290)	0.070 (0.469)
Πληρότητα (%)	99.7 (99.7)	99.5 (100)
<I/σI >	4.57 (at 1.60Å)	4.35 (at 3.12Å)
Πολλαπλότητα	4.1 (5.5)	5.4 (7.8)
CC <sub>1/2</sub>	0.999 (0.971)	0.989 (0.943)
<i>R<sub>rim</sub></i>	0.01 (0.147)	0.034 (0.185)
<i>R, R<sub>free</sub></i>	0.190, 0.201	0.250, 0.276
<b>Μέση τιμή παράγοντα B</b>		
Πρωτεϊνικά άτομα (Å <sup>2</sup> )	28.0	14.0
Κωδικός στην PDB	7PNR	7PNJ

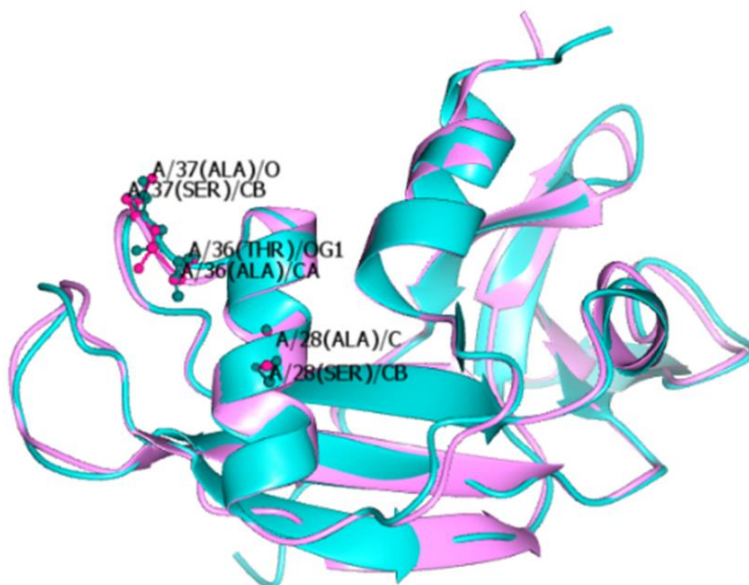


Εικόνα 40: Χάρτης ηλεκτρονιακής πυκνότητας από κρύσταλλο του μεταλλάγματος *hAng S28AT36AS37A*, όπου φαίνεται η αλλαγή της *Ser28* σε *Ala*.



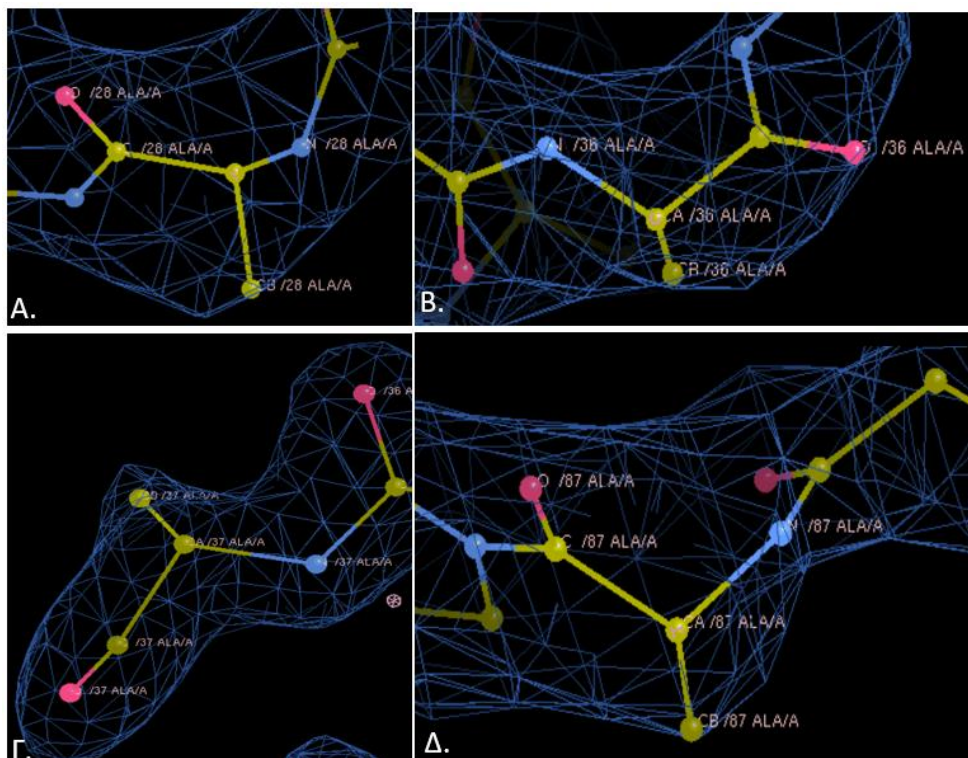


Εικόνα 41: Χάρτης ηλεκτρονιακής πυκνότητας από κρύσταλλο του μεταλλάγματος hAng S28AT36AS37A, όπου φαίνεται η αλλαγή των αμινοξικών καταλοίπων Thr36 και Ser37 σε Ala.

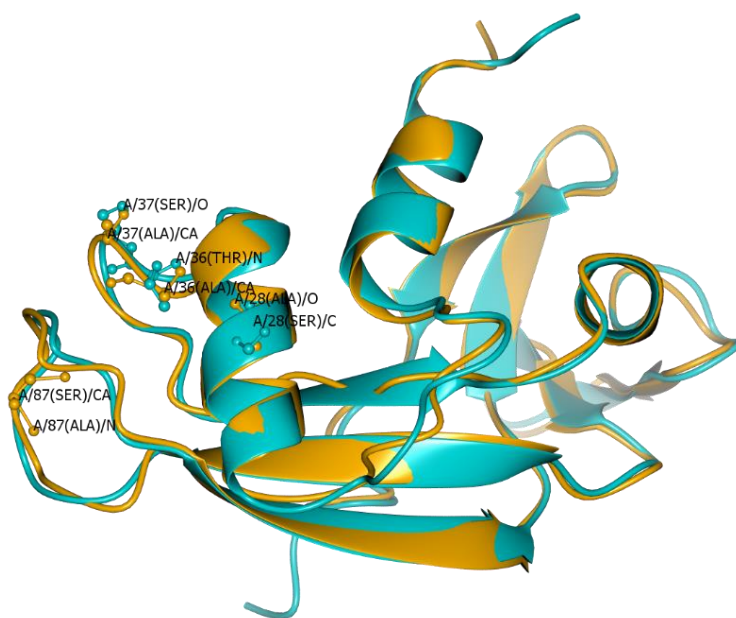


Εικόνα 42: Δομή της μεταλλαγμένης μορφής hAng S28AT36AS37A (ροζ) σε υπέρθεση με τη φυσιολογική δομή της hAng (κυανό). Στην Εικόνα απεικονίζονται και τα κατάλοιπα σερίνης (Ser28), θρεονίνης (Thr36) και σερίνης (Ser37) που μετατράπηκαν σε αλανίνη (Ala).





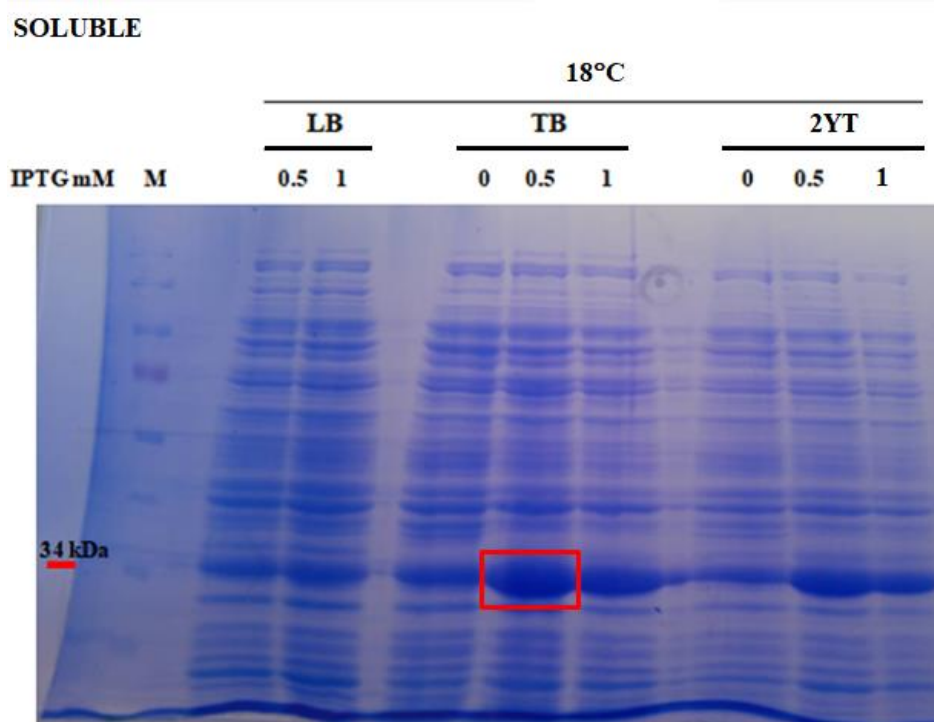
Εικόνα 43: Χάρτης ηλεκτρονιακής πυκνότητας από κρύσταλλο του μεταλλάγματος hAng S28A36A37A87A, όπου φαίνεται η αλλαγή των αμινοξικών καταλοίπων: Α. Ser28, Β. Thr36, Γ. Ser37 και Δ. Ser87 σε Ala.



Εικόνα 44: Δομή της μεταλλαγμένης μορφής hAng S28A36A37A87A (πορτοκαλί) σε υπέρθεση με τη φυσιολογική δομή της hAng (κυανό). Στην Εικόνα απεικονίζονται και τα κατάλοιπα σερίνης (Ser28), θρεονίνης (Thr36) και σερίνης (Ser37) που μετατράπηκαν σε αλανίνη (Ala).

### 4.3. Υπερέκφραση του πυρηνικού αντιγόνου πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων (Proliferating Cell Nuclear Antigen, PCNA)

Με σκοπό την εύρεση της βέλτιστης συνθήκης έκφρασης του PCNA πραγματοποιήθηκε διερεύνηση των συνθηκών και των αντίστοιχων επιπέδων έκφρασης σε καλλιέργειες μικρής κλίμακας (expression test), η οποία περιγράφεται αναλυτικά στην ενότητα 3.2.5. Η υπερέκφραση της πρωτεΐνης στο επιθυμητό διαλυτό κομμάτι παρατηρείται σε θερμοκρασία 18°C, παρουσία συγκέντρωσης 0,5 mM επαγωγικού παράγοντα IPTG σε θρεπτικό μέσο TB Broth, όπως φαίνεται στην *Εικόνα 45*.

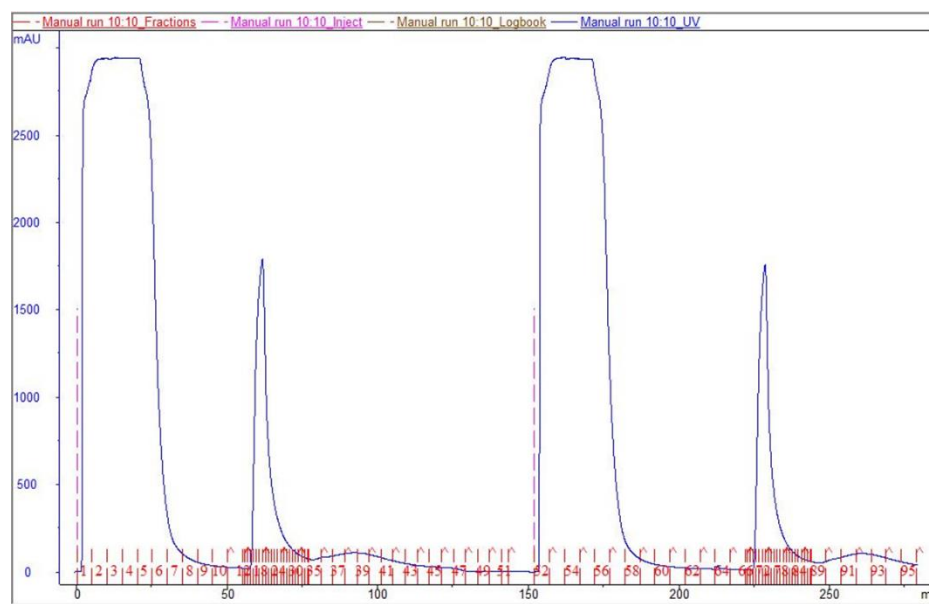


*Εικόνα 45: Μελέτες έκφρασης του PCNA. Ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου (10 %), υπό αποδιατακτικές συνθήκες, με χρώση Coomassie brilliant blue R-250. Με M συμβολίζεται ο μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους. Σε κόκκινο τετράγωνο απεικονίζεται το PCNA στο επιθυμητό διαλυτό κομμάτι (θερμοκρασία 18°C, 0,5 mM συγκέντρωση IPTG, θρεπτικό μέσο TB Broth).*

### 4.4. Απομόνωση και καθαρισμός του PCNA

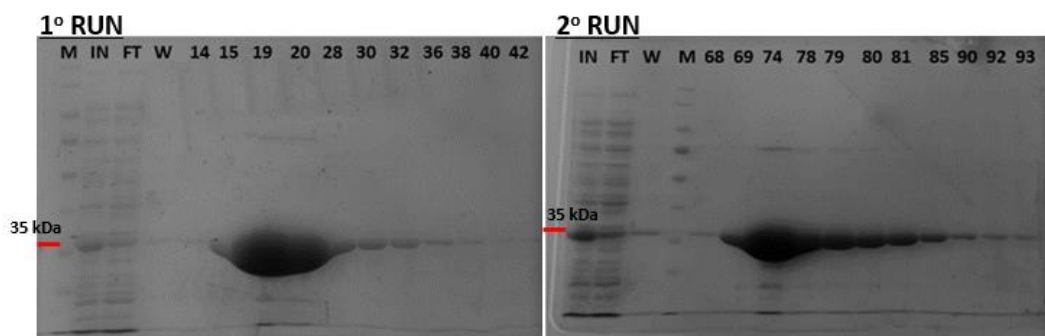
Η απομόνωση και ο καθαρισμός του PCNA έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο του *Francisco J. Blanco* και των συνεργατών του (De March et al., 2018), με ορισμένες τροποποιήσεις και περιγράφεται αναλυτικά στην ενότητα 3.2.6. Παρακάτω παρατίθενται τα αποτελέσματα του χρωματογραφικού καθαρισμού του PCNA με την απεικόνιση τόσο χρωματογραφημάτων, όσο και των αντίστοιχων πηκτών πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες.

**1<sup>ο</sup> Στάδιο καθαρισμού: Χρωματογραφία συγγένειας HiTrap TALON Crude, 5 ml (IMAC με ακινητοποιημένα ιόντα CO<sup>2+</sup> σε σφαιρίδια σεφαρόζης, GE HealthCare)**



Εικόνα 46: Χρωματογράφημα στήλης αχιστείας (HiTrap TALON Crude, 5 ml). Πραγματοποιούνται 2 Run στη στήλη, για τη δέσμευση μεγαλύτερης ποσότητας πρωτεΐνης. Η κόκκινη διακεκομμένη κάθετος αντιπροσωπεύει την εισαγωγή δείγματος πρωτεϊνών στη στήλη.

Η πορεία της απομόνωσης ελέγχεται με ανάλυση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (Εικόνα 47).



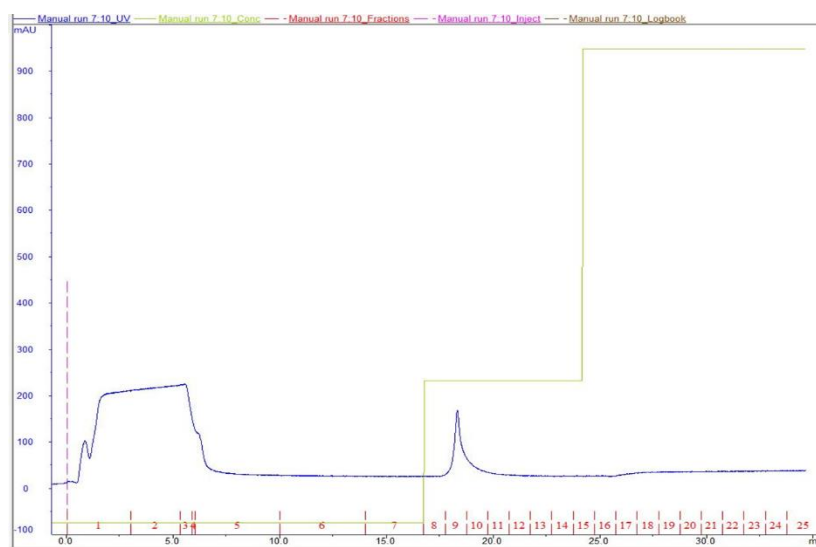
Εικόνα 47: Ανάλυση των εκλουσμένων πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (10%). IN: υπερκείμενο μετά τη λύση των κυττάρων, FT: υπερδιήθημα, M: δείκτης μοριακών μαζών. Οι αριθμοί στις διαδρομές αντιστοιχούν στην αρίθμηση των κλασμάτων έκλουσης.

Όπως παρουσιάζεται στις Εικόνες 46 και 47, κατά τη διάρκεια της απομόνωσης η έκλυση της πρωτεΐνης γίνεται στα κλάσματα 15-32, από το πρώτο Run και στα κλάσματα 69-90, από το δεύτερο Run, σύμφωνα με την τιμή της απορρόφησης σε

μήκος κύματος 280 nm, τα οποία εν συνεχεία συλλέγονται και επωάζονται με την πρωτεάση 3C.

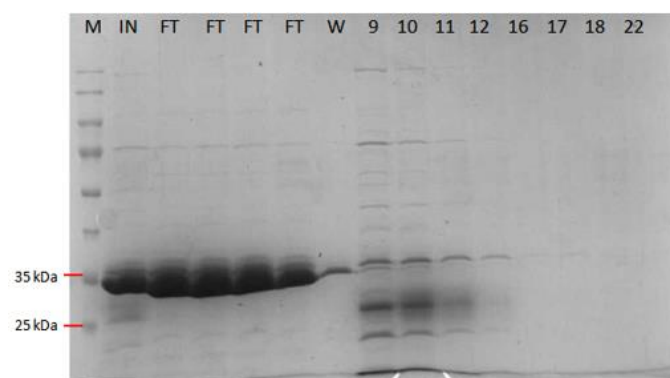
## 2<sup>ο</sup> Στάδιο καθαρισμού: Χρωματογραφία συγγένειας HiTrap TALON Crude, 1 mL και GST, 1 mL (Protino GST 4B, Macherey-Nagel)

Χρωματογραφία συγγένειας HiTrap TALON, 1 mL, ως αφαιρετική στήλη



Εικόνα 48: Χρωματογράφημα στήλης αχιστείας (HiTrap TALON Crude, 1 ml). Η κόκκινη διακεκομμένη κάθετος αντιπροσωπεύει την εισαγωγή δείγματος πρωτεϊνών στη στήλη. Η πράσινη κάθετος καταδεικνύει την αρχή της έκλουσης της πρωτεΐνης.

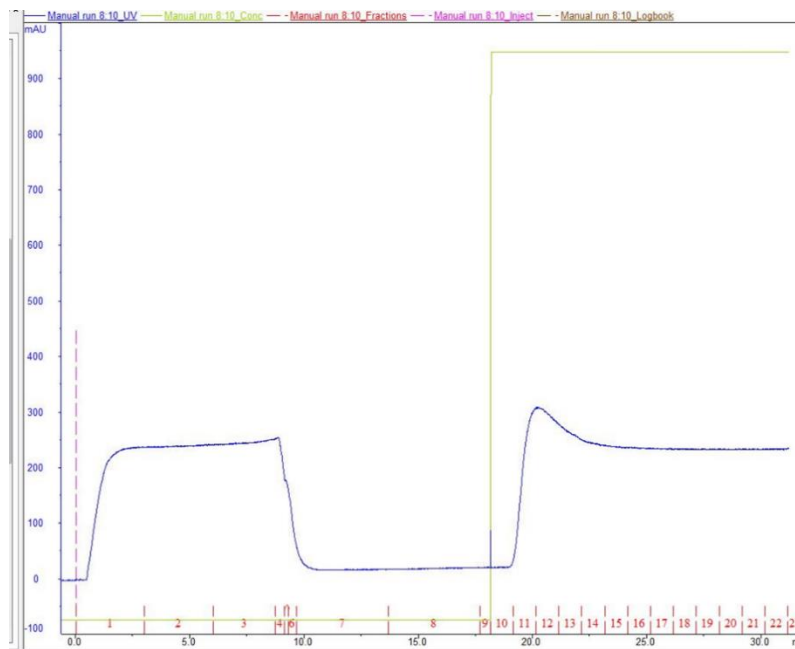
Η πορεία της απομόνωσης ελέγχεται με ανάλυση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (Εικόνα 49).



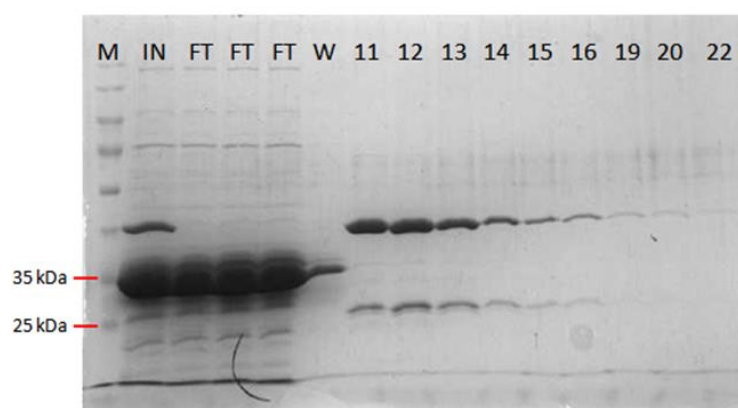
Εικόνα 49: Ανάλυση των εκλουσμένων πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου. IN: διάλυμα πρωτεϊνών που εκλούστηκαν από το προηγούμενο στάδιο καθαρισμού, FT: υπερδιήθημα, M: δείκτης μοριακών μαζών. Οι αριθμοί στις διαδρομές αντιστοιχούν στην αρίθμηση των κλασμάτων έκλουσης.

Σε αυτό το στάδιο καθαρισμού η πρωτεΐνη μας συλλέγεται στο *Flow Through*, καθώς δεν εμφανίζει πλέον αγκιστεία με τη στήλη και εκπλένεται χωρίς να αλληλεπιδρά με αυτή.

#### Χρωματογραφία συγγένειας GST, 1 mL, ως αφαιρετική στήλη



Εικόνα 50: Χρωματογράφημα στήλης αγκιστείας (*Protino GST/4B*, 1 ml). Η κόκκινη διακεκομμένη κάθετος αντιπροσωπεύει την εισαγωγή δείγματος πρωτεϊνών στη στήλη. Η πράσινη κάθετος υποδεικνύει την αρχή της έκλουσης της πρωτεΐνης.

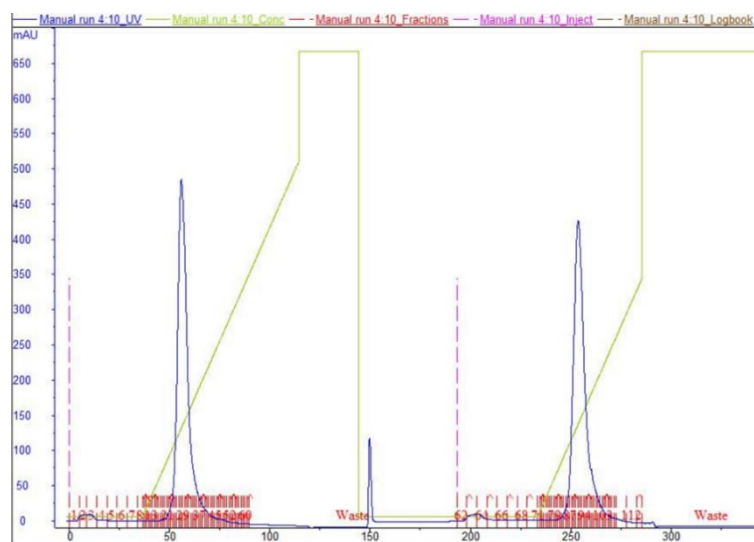


Εικόνα 51: Ανάλυση των εκλουσμένων πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου. IN: διάλυμα πρωτεϊνών που συλλέχθηκε στο *Flow Through*, από το προηγούμενο στάδιο καθαρισμού, FT: υπερδιήθημα, M: δείκτης μοριακών μαζών. Οι αριθμοί στις διαδρομές αντιστοιχούν στην αρίθμηση των κλασμάτων έκλουσης.



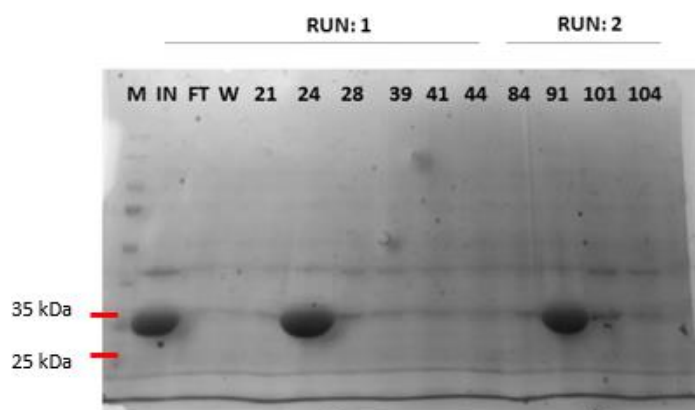
Σε αυτό το στάδιο καθαρισμού, επίσης, συλλέγεται το υπερδιήθημα, στο οποίο περιέχεται η πρωτεΐνη μας, η οποία πλέον δεν εμφανίζει αγκιστεία με τη στήλη και εκπλένεται χωρίς να αλληλεπιδρά με αυτή.

### 3<sup>ο</sup> Στάδιο καθαρισμού: Στήλη ηπαρίνης, HiTrap Heparin HP, 5 ml



Εικόνα 52: Χρωματογράφημα στήλης Ηπαρίνης (HiTrap Heparin HP, 5 ml). Πραγματοποιήθηκαν 2 Run στη στήλη, για τη δέσμευση μεγαλύτερης ποσότητας πρωτεΐνης. Η κόκκινη διακεκομμένη κάθετος αντιπροσωπεύει την εισαγωγή δείγματος πρωτεϊνών στη στήλη. Η πράσινη κάθετος καταδεικνύει την αρχή της έκλουσης της πρωτεΐνης.

Η πορεία της απομόνωσης ελέγχεται με ανάλυση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (Εικόνα 53).

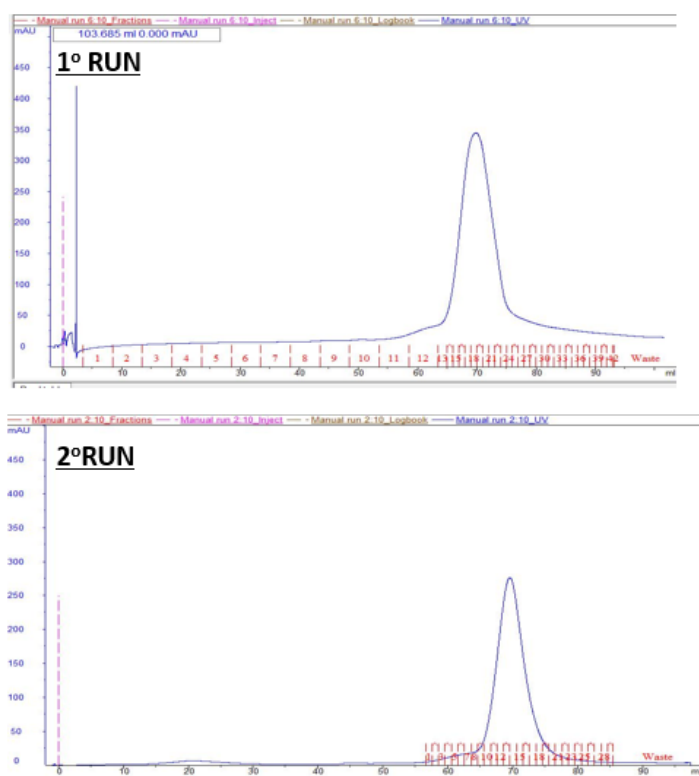


Εικόνα 53: Ανάλυση των εκλουσμένων πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου. IN: διάλυμα πρωτεϊνών που συλλέχθηκε στο Flow Through, από το προηγούμενο στάδιο καθαρισμού, FT:

υπερδιήθημα, M: δείκτης μοριακών μαζών. Οι αριθμοί στις διαδρομές αντιστοιχούν στην αρίθμηση των κλασμάτων έκλουσης.

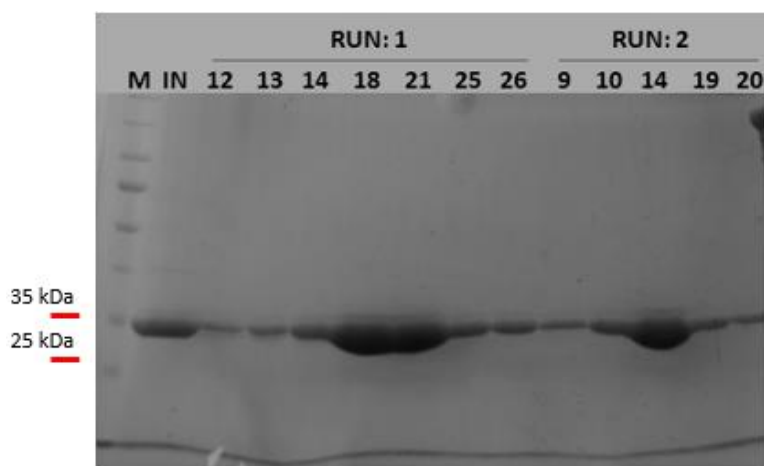
Όπως παρουσιάζεται στις Εικόνες 52 και 53, η έκλουση της πρωτεΐνης γίνεται στα κλάσματα 21-39, στο πρώτο Run και στα κλάσματα 84-101, στο δεύτερο Run, σύμφωνα με την τιμή της απορρόφησης σε μήκος κύματος 280 nm, τα οποία εν συνεχεία συλλέγονται, συμπυκνώνονται και τέλος, διέρχονται από την επόμενη στήλη καθαρισμού, Superdex S200 (Εικόνα 54).

#### 4<sup>ο</sup> Στάδιο καθαρισμού: Χρωματογραφία μοριακής διήθησης Superdex S200 (SEC, GE HealthCare)



Εικόνα 54. Χρωματογράφημα στήλης μοριακής διήθησης. Πραγματοποιήθηκαν 2 Run στη στήλη, για τη δέσμευση μεγαλύτερης ποσότητας πρωτεΐνης. Η κόκκινη διακεκομμένη κάθετος αντιπροσωπεύει την εισαγωγή δείγματος πρωτεϊνών στη στήλη. Η πράσινη κάθετος καταδεικνύει την αρχή της έκλουσης της πρωτεΐνης.

Η πορεία της απομόνωσης ελέγχεται με ανάλυση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (Εικόνα 55).



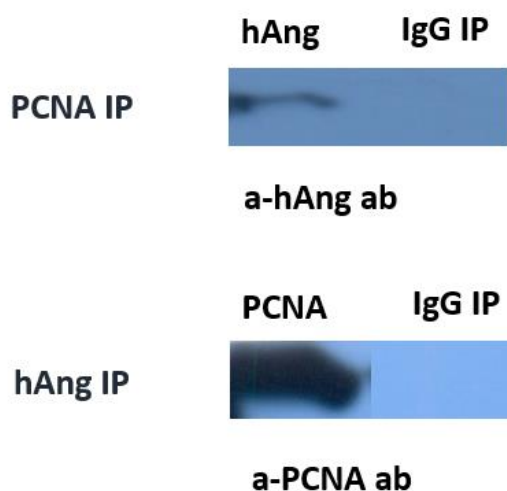
Εικόνα 55: Ανάλυση των εκλουσμένων πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου. IN: διάλυμα πρωτεϊνών που εκλούστηκαν από το προηγούμενο στάδιο καθαρισμού, M: δείκτης μοριακών μαζών. Οι αριθμοί στις διαδρομές αντιστοιχούν στην αρίθμηση των κλασμάτων έκλουσης.

Απόδοση του καθαρισμού: ο καθαρισμός του PCNA έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή 8 mg καθαρής πρωτεΐνης ανά λίτρο βακτηριακής καλλιέργειας.

#### 4.5. Ανοσοκατακρήμνιση της hAng και του PCNA *in vitro*

Μελέτες ανοσοκατακρήμνισης και πρωτεομικής ανάλυσης των αλληλεπιδράσεων της hAng, τόσο στον πυρήνα, όσο και στο κυτταρόπλασμα της ανθρώπινης υβριδικής κυτταρικής σειράς ενδοθηλιακών και καρκινικών κυττάρων πνεύμονα, EA.hy926, απέδειξαν την αλληλεπίδραση hAng-PCNA στο κυτταρόπλασμα αυτής της κυτταρικής σειράς (Chatzileontiadiou et al., 2017). Ένας από τους στόχους της διατριβής είναι η αποκάλυψη των μοριακών στοιχείων που διέπουν τις αλληλεπιδράσεις της hAng με το PCNA. Συνεπώς, αφού πραγματοποιήθηκε η απομόνωση επαρκούς ποσότητας PCNA, υψηλής καθαρότητας, το επόμενο βήμα είναι να διαπιστωθεί ότι η αλληλεπίδραση της hAng με το PCNA είναι άμεση, χωρίς να παρεμβάλλεται κάποιο άλλο μόριο ανάμεσα τους. Για το σκοπό αυτό έγιναν μελέτες ανοσοκατακρήμνισης (IP) της hAng με το PCNA *in vitro*, που περιγράφονται αναλυτικά στην ενότητα 3.2.8.1. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 56, κατά την κατακρήμνιση του PCNA κατακρημνίζεται μαζί του και η hAng και το αντίστροφο. Συνεπώς αποδεικνύεται ότι αυτές οι δύο πρωτεΐνες έχουν μια απευθείας αλληλεπίδραση, χωρίς να παρεμβάλλεται μεταξύ τους κανένα άλλο μόριο.





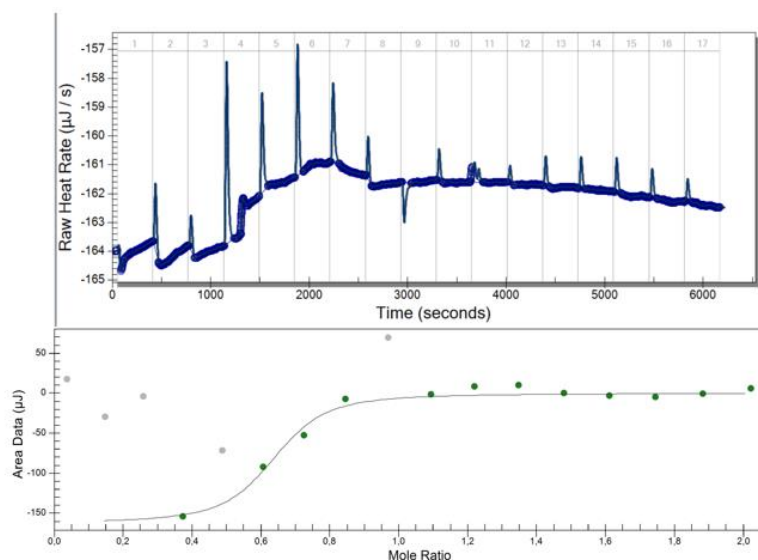
Εικόνα 56: Ανοσοκατακρήμνιση του συμπλόκου hAng-PCNA. Απεικονίζονται τα αποτελέσματα της ανοσοαποτύπωσης κατά Western με τα ειδικά μονοκλωνικά αντισώματα έναντι της hAng και του PCNA.

#### 4.6. Βιοφυσικός χαρακτηρισμός της αλληλεπίδρασης της hAng με το PCNA, μέσω θερμιδομετρίας ισοθερμικής τιτλοδότησης (Isothermal Titration Calorimetry, ITC)

Μετά τις μελέτες ανοσοκατακρήμνισης της hAng με το PCNA *in vitro*, που απέδειξαν ότι οι δύο πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν άμεσα, η αλληλεπίδραση αυτή χαρακτηρίστηκε και ποσοτικά, μέσω της θερμιδομετρίας ισοθερμικής τιτλοδότησης (ITC). Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με το πρόγραμμα Nanoanalyze software (TA Instruments, 2010), με τη σταθερά διάστασης  $K_d$  να ισούται με 130 nM ( $1,3 \times 10^{-7}$  M). Κατά κανόνα, αν η σταθερά διάστασης  $K_d$  έχει τιμές της τάξης των nM ( $10^{-9}$  M), τότε περιγράφει μια ισχυρή πρωτεϊνική αλληλεπίδραση, εάν όμως οι τιμές της είναι της τάξης των  $\mu$ M ( $10^{-6}$  M) ή της τάξης των mM ( $10^{-3}$  M), τότε αυτή περιγράφει μια μεσαία ή μια ασθενή αλληλεπίδραση, αντίστοιχα (Lin & Wu, 2019). Συνεπώς, σύμφωνα με την τιμή της  $K_d$ , η αλληλεπίδραση του συμπλόκου αυτού αποτελεί μία αρκετά ισχυρή αλληλεπίδραση. Οι πληροφορίες για τη στοιχειομετρία, την ενθαλπία, την εντροπία και την κινητική της δέσμευσης του συμπλόκου hAng-PCNA παρουσιάζονται στον Πίνακα 15, ενώ το προφίλ ITC για την τιτλοδότηση της hAng στο PCNA παρατίθεται στην Εικόνα 57.

Πίνακας 15: Θερμοδυναμικές παράμετροι για την πρόσδεση της hAng στο PCNA, από πειράματα ITC.

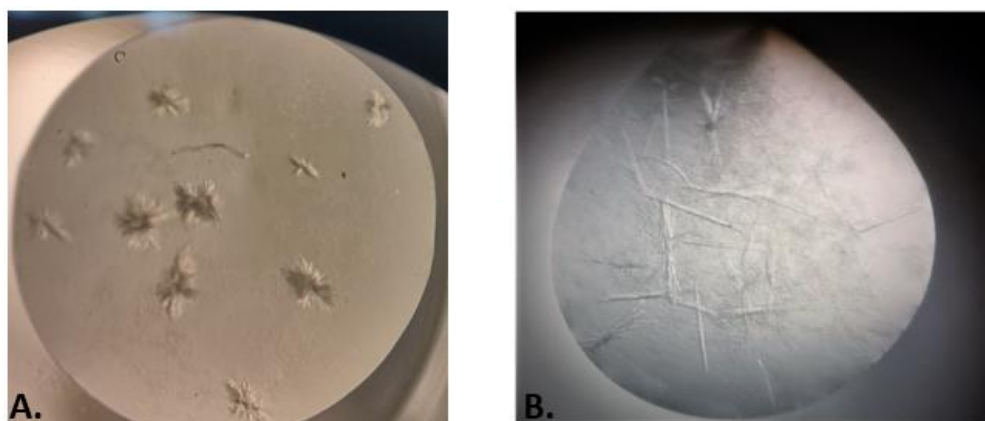
n	$K_d$ (M)	$\Delta H$ (kJ/mol)	$\Delta G$ (kJ/mol)
0,59	$1,3 \times 10^{-7}$	-101,5	-39,95



Εικόνα 57: Το προφίλ ITC για την τιτλοδότηση της hAng στο PCNA, σε θερμοκρασία 30 °C.

#### 4.7. Ανάπτυξη κρυστάλλων του συμπλόκου hAng-PCNA

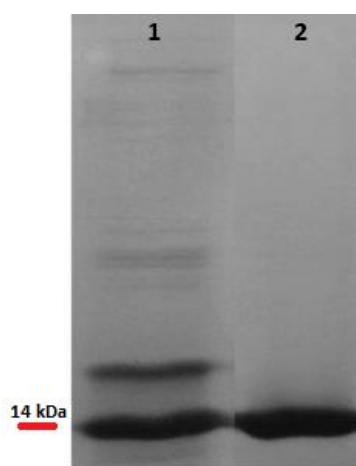
Μετά από σάρωση διαφόρων κρυσταλλογραφικών συνθηκών αναπτύχθηκαν κρύσταλλοι του συμπλόκου hAng-PCNA με την τεχνική της καθήμενης σταγόνας, σε συνθήκη κρυστάλλωσης 2 M  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  και 100 mM Tris-HCl pH 8,5 και σε θερμοκρασία 16°C, όπως περιγράφεται αναλυτικά στην ενότητα 3.2.12. Λόγω του μικρού μεγέθους των κρυστάλλων, οι οποίοι σχημάτιζαν συσσωματώματα, προχωρήσαμε σε βελτιστοποίηση της μορφολογίας τους με χρήση της τεχνικής της μικροσποράς, όπως περιγράφεται στην ενότητα 3.2.12.1. Στην Εικόνα 58 παρουσιάζονται οι κρύσταλλοι του συμπλόκου πριν και μετά την τεχνική της μικροσποράς, όπου είναι εμφανής η βελτίωση της μορφολογίας τους.



Εικόνα 58: Κρύσταλλοι του συμπλόκου hAng-PCNA. Α. Μικροί κρύσταλλοι, κακής ποιότητας που σχηματίζουν συσσωματώματα. Β. Βελτιωμένη μορφολογία κρυστάλλων μέσω microseeding. Μεγαλύτεροι σε μέγεθος κρύσταλλοι, χωρίς συσσωματώματα.

#### 4.8. Απομόνωση και καθαρισμός της επισημασμένης $^{15}\text{N}$ hAng

Επιπλέον στόχος της διατριβής είναι η χαρτογράφηση της περιοχής αλληλεπίδρασης του συμπλόκου hAng-PCNA, μέσω της φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR). Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε απομόνωση και καθαρισμός της επισημασμένης  $^{15}\text{N}$  hAng. Η διαδικασία απομόνωσης και καθαρισμού της επισημασμένης hAng είναι πανομοιότυπη με αυτήν της hAng άγριου τύπου, η οποία πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο του Holloway D.E. και των συνεργατών του (Holloway et al., 2001) και περιγράφεται αναλυτικά στις ενότητες 3.2.2.2 και 3.2.13.2. Παρακάτω παρατίθενται τα αποτελέσματα του χρωματογραφικού καθαρισμού της επισημασμένης  $^{15}\text{N}$  hAng με την απεικόνιση μιας πηκτής πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (Εικόνα 59).



Εικόνα 59: Πηκτή 12 % SDS πολυακρυλαμιδίου, με χρώση Coomassie brilliant blue R-250. Στη διαδρομή 1 απεικονίζεται το πρωτεϊνικό κλάσμα, μετά τη στήλη SPFF, ενώ στη διαδρομή 2 απεικονίζεται το πρωτεϊνικό κλάσμα, μετά τη στήλη Resource RPC18.

Απόδοση του καθαρισμού: ο καθαρισμός της επισημασμένης  $^{15}\text{N}$  hAng, έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή 10 mg καθαρής πρωτεΐνης ανά λίτρο βακτηριακής καλλιέργειας.

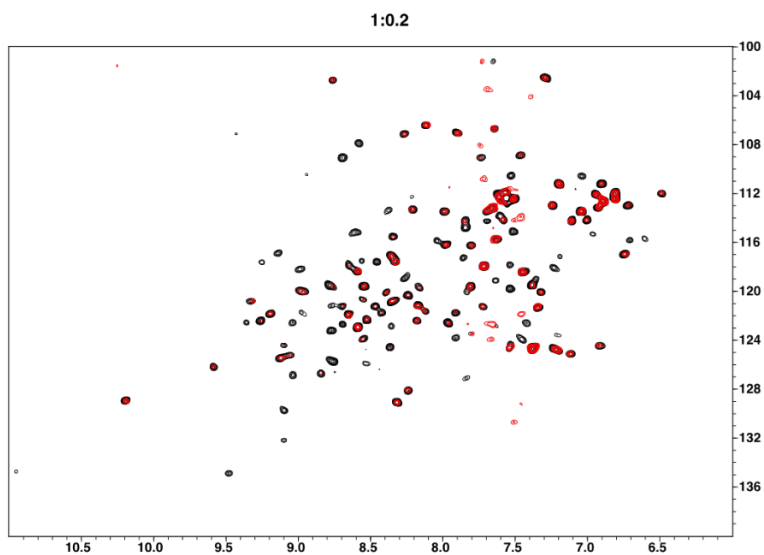
#### 4.9. Προσδιορισμός της επιφάνειας αλληλεπίδρασης της hAng και του PCNA μέσω φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR)

Στο πλαίσιο της διατριβής έγινε προσπάθεια χαρτογράφησης της επιφάνειας αλληλεπίδρασης της hAng με το PCNA, μέσω φασματοσκοπίας NMR, χρησιμοποιώντας τις διαφοροποιήσεις των χημικών μετατοπίσεων των σημάτων, οι οποίες είναι επακόλουθο της πρόσδεσης του PCNA στην επισημασμένη  $^{15}\text{N}$  hAng. Οι μελέτες φασματοσκοπίας NMR πραγματοποιήθηκαν στο Τμήμα Φαρμακευτικής του

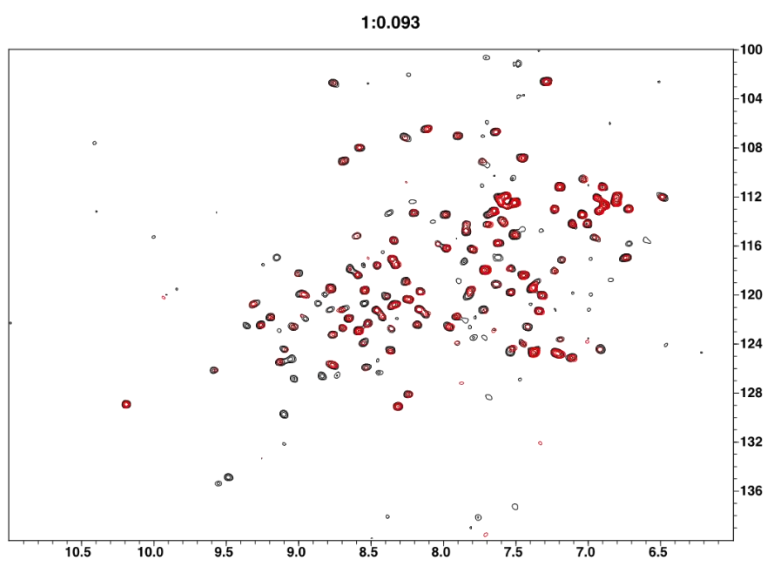
Πανεπιστημίου Πατρών από την υπ. Διδάκτορα Κατερίνα Τσίκα και τον Καθ. Γεώργιο Σπυρούλια.

Πραγματοποιήθηκαν δύο πειράματα τιτλοδότησης NMR της επισημασμένης  $^{15}\text{N}$  hAng για το μη επισημασμένο PCNA και στις *Εικόνες 60 και 61* παρουσιάζονται τα  $^1\text{H}$  - $^{15}\text{N}$  HSQC φάσματα που προέκυψαν από αυτά. Το πρώτο πείραμα τιτλοδότησης NMR της επισημασμένης  $^{15}\text{N}$  hAng στο μη επισημασμένο PCNA, έγινε σε αναλογία 1:0,2 ( $^{15}\text{N}$  hAng:PCNA) κι έδειξε ότι τα αμινοξικά κατάλοιπα της hAng, Ser37, Lys40, Ile42, Gly48, Arg70, Val78, Leu83, Ala96, Arg101, Ser118 και Phe120, εξαφανίζονται όταν στο διάλυμα της επισημασμένης  $^{15}\text{N}$  hAng προστίθεται το PCNA, άρα και βρίσκονται στην επιφάνεια αλληλεπίδρασης των δυο πρωτεϊνών (*Εικόνα 62*). Τα κατάλοιπα Lys40, Ile42, Ser118, τα οποία σύμφωνα με το πείραμα εξαφανίζονται, όταν οι δύο πρωτεΐνες έρχονται σε επαφή στο διάλυμα, αποτελούν μέρος των περιοχών του ενεργού κέντρου της hAng ( $\text{P}_1\text{B}_1$ ) (Leonidas et al., 1999). Στο δεύτερο πείραμα NMR της επισημασμένης  $^{15}\text{N}$  hAng στο μη επισημασμένο PCNA, η συγκέντρωση του δεύτερου μειώθηκε περίπου 20 φορές, καθώς η πρόσδεση του στην  $^{15}\text{N}$  hAng, κατά το πρώτο πείραμα, ήταν τόσο ισχυρή, με αποτέλεσμα το σύμπλοκο να κατακρημνίζεται αμέσως. Η αναλογία των δύο πρωτεϊνών στο δεύτερο πείραμα ήταν 1:0,093 ( $^{15}\text{N}$  hAng:PCNA), ενώ τα κατάλοιπα της  $^{15}\text{N}$  hAng που εξαφανίζονται κατά την προσθήκη του μη επισημασμένου PCNA, άρα και βρίσκονται στην επιφάνεια αλληλεπίδρασης τους, είναι τα εξής: Lys50, Ser72, Phe76, Thr80, Leu83, His84, Gly85, Tyr94, Thr97, Arg101, Val103, Val104, Leu115, Ser118, Ile119 (*Εικόνα 63*). Τέλος, τα αμινοξέα Leu83, Arg101 και Ser118 είναι κοινά και στα δύο πειράματα NMR και φαίνεται ότι βρίσκονται στην επιφάνεια αλληλεπίδρασης του συμπλόκου hAng-PCNA.

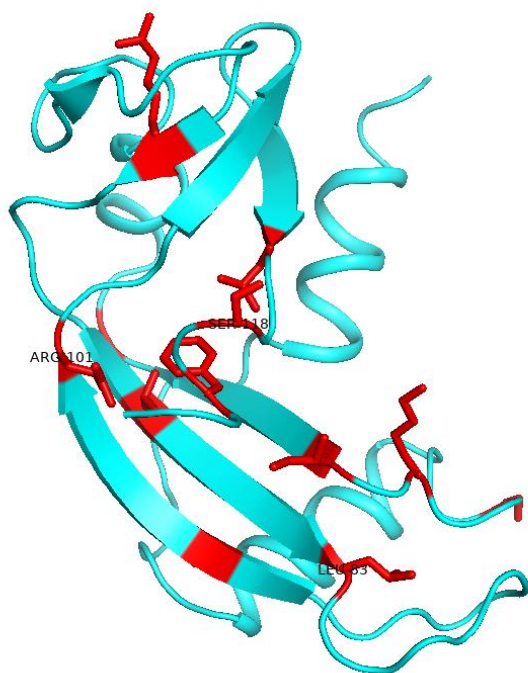
Εν συνεχεία, με βάση τα τρία κοινά αμινοξέα προχωρήσαμε στη δημιουργία του μοντέλου της τρισδιάστατης δομής του συμπλόκου hAng-PCNA, με τη βοήθεια αλγορίθμων docking και προσομοιώσεων Μοριακής Δυναμικής.



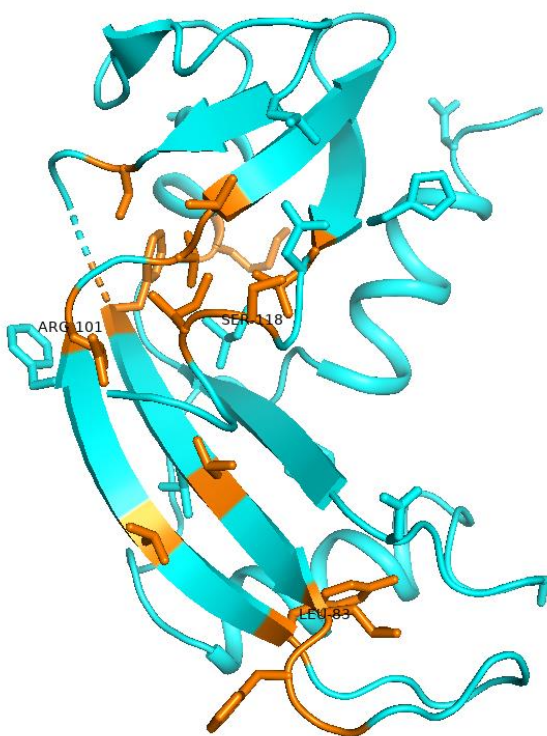
Εικόνα 60: Υπέρθυση  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  TROSY φάσματος από την τιτλοδότηση της  $^{15}\text{N}$  hANG με PCNA σε αναλογία 1:0,2 ( $^{15}\text{N}$  hAng:PCNA). Μαύρη χρώση για το αρχικό και κόκκινη για το τελικό στάδιο.



Εικόνα 61: Υπέρθυση  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  TROSY φάσματος από την τιτλοδότηση της  $^{15}\text{N}$  hANG με PCNA σε αναλογία 1:0,093 ( $^{15}\text{N}$  hAng:PCNA). Μαύρη χρώση για το αρχικό και κόκκινη για το τελικό στάδιο.



Εικόνα 62: Αναπαράσταση της επιφάνειας αλληλεπίδρασης της  $^{15}\text{N}$  hANG με το PCNA, σε αναλογία 1:0,2 ( $^{15}\text{N}$  hAng:PCNA). Με κόκκινο χρώμα έχουν χαρτογραφηθεί τα αμινοξέα που εξαφανίστηκαν, ενώ επισημαίνονται με ετικέτα τα 3 κοινά αμινοξέα των δύο πειραμάτων Leu83, Arg101 και Ser118.



Εικόνα 63: Αναπαράσταση της επιφάνειας αλληλεπίδρασης της  $^{15}\text{N}$  hANG με το PCNA, σε αναλογία 1:0,093 ( $^{15}\text{N}$  hAng:PCNA). Με πορτοκαλί χρώμα έχουν χαρτογραφηθεί τα αμινοξέα

που εξαφανίστηκαν, ενώ επισημαίνονται με ετικέτα τα 3 κοινά αμινοξέα των δύο πειραμάτων *Leu83*, *Arg101* και *Ser118*.

#### **4.10. Πρόβλεψη του Τρόπου Πρόσδεσης (Docking) της hAng με το PCNA με τη βοήθεια αλγορίθμων docking και Προσομοιώσεων Μοριακής Δυναμικής (Molecular dynamics simulations, MD)**

##### **4.10.1. Απεικόνιση του επικρατέστερου μοντέλου του συμπλόκου hAng-PCNA μετά από τις προσομοιώσεις Μοριακής Δυναμικής**

Με βάση τα κριτήρια της ελεύθερης ενέργειας ( $\Delta G$ ) και της σταθεράς διάστασης οξέος ( $pK_a$ ) του συμπλόκου hAng-PCNA, που περιγράφονται αναλυτικά στην ενότητα 3.2.14.1 και μετά την ολοκλήρωση των προσομοιώσεων Μοριακής δυναμικής, το μοντέλο μας απεικονίζεται στις *Εικόνες 64 και 65*. Η επιφάνεια αλληλεπίδρασης του συμπλόκου hAng-PCNA σχηματίζεται από 37 αμινοξικά κατάλοιπα του PCNA και 40 αμινοξικά κατάλοιπα της hAng, σε ασυνεχή τμήματα της πολυπεπτιδικής τους αλυσίδας (*Πίνακας 16*). Το σύμπλοκο hAng-PCNA σχηματίζει συνολικά 110 επαφές, 19 από τις οποίες αποτελούν εν δυνάμει δεσμούς υδρογόνου και 13 ιοντικούς δεσμούς (*Πίνακας 17*). Το PCNA κάνει εκτεταμένες επαφές με το ριβονουκλεολυτικό ενεργό κέντρο της hAng. Πιο συγκεκριμένα, στο σύμπλοκο hAng-PCNA, η αμινομάδα του καταλυτικού καταλοίπου Lys40 σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου με την καρβοξυλομάδα του καταλοίπου Asp29 του PCNA, ενώ ακόμη ένα κατάλοιπο του ενεργού κέντρου, το His13, σχηματίζει επίσης δεσμούς υδρογόνου με το κατάλοιπο Ser33 του PCNA. Επιπλέον, το κατάλοιπο His8 της hAng που παίζει έμμεσο ρόλο στην κατάλυση και βρίσκεται στην περιφέρεια του P1 κέντρου της, όπου επιτελείται η διάσπαση του φωσφοδιεστερικού δεσμού, σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου τόσο με το κατάλοιπο Ser32, όσο και με το Asp63 του PCNA. Ακόμη, αυτό σχηματίζει και δεσμούς vdw με το κατάλοιπο Cys62 του PCNA, ενώ το κατάλοιπο Gln12, που επίσης αποτελεί μέρος του υποκέντρου P1 της hAng, σχηματίζει δεσμούς vdw με το κατάλοιπο Glu55 του PCNA. Επιπλέον, το αμινοξικό κατάλοιπο Arg5, που βρίσκεται στο υποκέντρο P2 της hAng, σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου με το κατάλοιπο Glu55 του PCNA. Το Asn68 που βρίσκεται στο υποκέντρο B2 της hAng, σχηματίζει δύο δεσμούς υδρογόνου με τα κατάλοιπα Arg53 και Asp243 του PCNA, ενώ το Glu108, που αποτελεί επίσης μέρος του κέντρου B2 σχηματίζει δεσμούς vdw με το κατάλοιπο Glu55 του PCNA. Επιπροσθέτως, πολλές περιοχές της hAng εκτός του ενεργού της κέντρου είναι μέρος της διεπιφάνειας επαφής με το PCNA. Ο βρόχος 82–89 της hAng κάνει έναν ιδιαίτερα μεγάλο αριθμό επαφών με τα αμινοξέα Asp120, Asp122 και Glu<sub>124</sub>-Gln-Leu-Gly-Ile-Pro<sub>129</sub>, που αποτελούν τμήμα του βρόχου IDCL (118-134) του PCNA. Τέλος, το τμήμα του καρβοξυτελικού άκρου 118-123 της hAng κάνει επίσης έναν μεγάλο αριθμό επαφών με το PCNA, ιδιαίτερα με κατάλοιπα του

που βρίσκονται στο βρόχο IDCL. Οι δύο αυτές περιοχές αποτελούν τις περιοχές με την υψηλότερη συμπληρωματικότητα μεταξύ των δύο πρωτεϊνών.

*Πίνακας 16: Αμινοξέα της επιφάνειας αλληλεπίδρασης του συμπλόκου hAng-PCNA (Απόσταση ατόμων  $\leq 5 \text{ \AA}$ ).*

<b>hAng</b>	<b>PCNA</b>
ARG5	SER32, SER54, GLU55, TYR60
HIS8	SER32, CYS62, ASP63, ARG64, ASN65
GLN12	SER31, ARG64, ASN65
HIS13	SER31, SER33
GLY34	ARG64
LEU35	ARG64, ASN65
SER37	ARG64, ASN65, LEU66
PRO38	ARG64, LEU66, ALA67
LYS40	ASP29, ASN65, LEU66
ASP41	ASP29, GLN38, GLN125
ASN43	SER31, ASN65
ARG66	ARG53, GLU191, LYS240
GLU67	ARG53, LYS240, ASP243
ASN68	ARG53, ASP243
LEU69	ARG53
THR80	PRO129
LYS82	GLN125, LEU126, GLY127, ILE128, PRO129
LEU83	GLN125, LEU126, GLY127
HIS84	GLN125, LEU126, GLY127
GLY85	GLU124, GLN125
GLY86	ASP122, GLU124, GLN125
SER87	ASP122
PRO88	ASP122
TRP89	ASP120, ASP122
ARG95	GLY127
THR97	ILE128, PRO129
ARG101	GLU130



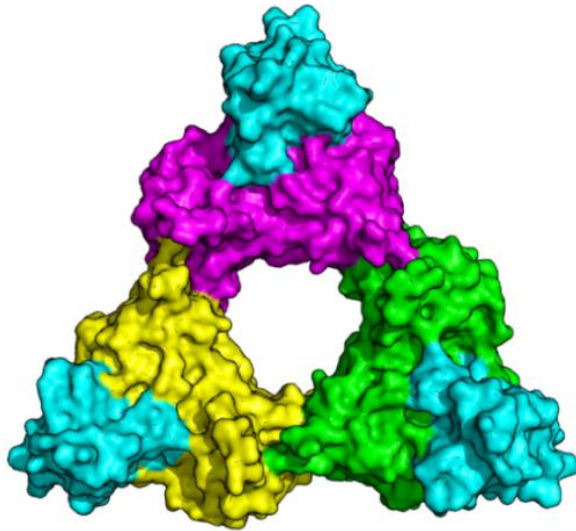
ALA106	SER54, GLU55
CYS107	GLU55
GLU108	GLU55
VAL113	SER32, SER33, SER54, GLU55
HIS114	SER32, SER33, THR51, ARG53, SER54
LEU115	SER33
ASP116	THR51
SER118	GLN49, THR51, HIS246, LYS248
ILE119	PRO129, GLU130, GLN131
PHE120	PRO129, GLU130
ARG121	ASP29, ASN36, GLN38, GLN49, THR51, ILE128, GLU130, TYR250
ARG122	LEU47, LEU126, ILE128, PRO129, GLU130, GLN131, TYR133, TYR250

Πίνακας 17: Εν δυνάμει δεσμοί υδρογόνου και ιοντικοί δεσμοί μεταξύ του PCNA και της hAng στο σύμπλοκο (απόσταση ατόμων  $\leq 3,4 \text{ \AA}$ )

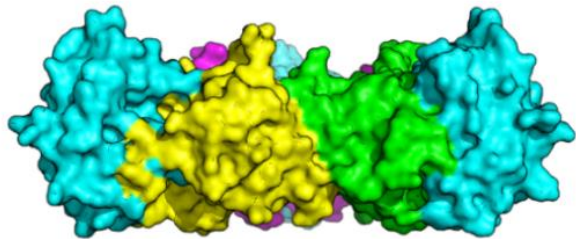
Δεσμοί Υδρογόνου		Ιοντικοί δεσμοί	
hAng	PCNA	hAng	PCNA
ARG5/NH2	GLU55/OE2	ARG5/NH1	GLU55/OE2
HIS8/ND1	SER32/OG	ARG5/NH1	GLU55/OE1
HIS8	ASP63	ARG5/CZ	GLU55/OE2
HIS13	SER33	ARG5/CZ	GLU55/OE1
LYS40/NZ	ASP29/OD1	ARG66/NH2	GLU191/OE1
ARG66/NH2	GLU19/OE2	ARG66/NH1	GLU191/OE2
ASN68/OD1	ARG53/NH1	ARG66/CZ	GLU191/OE2
ASN68/ND2	ASP243/O	GLU67/OE1	ARG53/CZ
LYS82	GLN125	ARG101/CZ	GLU130/OE1
LYS82/NZ	LEU126/O	ARG101/NH1	GLU130/OE1
GLY85/N	GLN125/O	ARG101/CZ	GLU130/OE2
SER87/N	ASP122/OD2	ARG101/NH1	GLU130/OE2
TRP89/NE1	ASP122/OD1	ARG121/CZ	ASP29/OD2
ARG101/NH2	GLU130/OE1		
LEU115/N	SER33/OG		
ARG122/NH2	PRO129/O		
ARG122/NH1	GLN131/NE2		

PRO123/O	TYR133/OH		
PRO123	TYR250		
<b>Σύνολο: 19</b>		<b>Σύνολο: 13</b>	

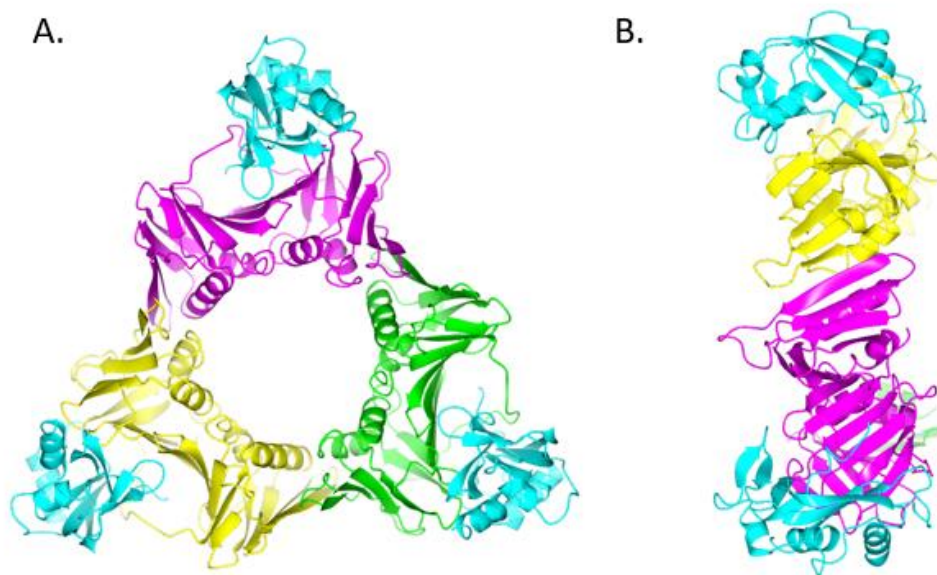
A



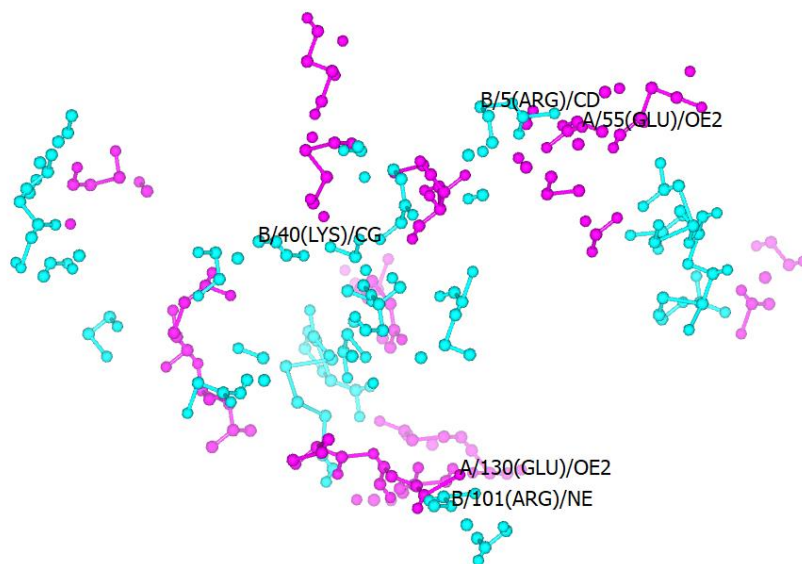
B



Εικόνα 64: Απεικόνιση του μοντέλου της 3D δομής του συμπλόκου hAng-PCNA που φαίνεται από το μπροστινό μέρος (A) και το πλάι (B), με τις επιμέρους υπομονάδες του PCNA χρωματισμένες με κίτρινο, πράσινο και μωβ. Με κυανό χρώμα απεικονίζονται τα 3 μόρια της hAng που προσδένονται σε ένα τριμερές μόριο PCNA.



Εικόνα 65: Απεικόνιση του μοντέλου της 3D δομής του συμπλόκου hAng-PCNA που φαίνεται από το μπροστινό μέρος (A) και το πλάι (B), με τις επιμέρους υπομονάδες του PCNA χρωματισμένες με κίτρινο, πράσινο και μωβ. Με κυανό χρώμα απεικονίζονται τα 3 μόρια της hAng που προσδέονται σε ένα τριμερές μόριο PCNA. Η εικόνα δημιουργήθηκε με το πρόγραμμα CCP4MG (Potterton et al., 2002).



Εικόνα 66: Απεικόνιση των αμινοξέων της επιφάνειας αλληλεπίδρασης του συμπλόκου hAng-PCNA που σχηματίζουν εν δυνάμει δεσμούς υδρογόνου και ιοντικούς δεσμούς. Με μωβ απεικονίζονται τα αμινοξέα του PCNA και με κυανό χρώμα τα αμινοξέα της hAng. Η εικόνα δημιουργήθηκε με το πρόγραμμα CCP4MG (Potterton et al., 2002).

Σύμφωνα με το μοντέλο η hAng προσδένεται στην εξωτερική επιφάνεια του PCNA, όπου υπάρχει ένα ισχυρό αρνητικό ηλεκτροστατικό δυναμικό. Όπως συμβαίνει και με το σύμπλοκο της hAng με τον ανθρώπινο πλακουντιακό αναστολέα ριβονουκλεασών (RI), η στενή δέσμευση μεταξύ του PCNA και της hAng μπορεί να οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στις ευνοϊκές αλληλεπιδράσεις Κουλομπ, καθώς το PCNA εμφανίζει σημαντικό αρνητικό φορτίο και η hAng σημαντικά θετικό. Ακόμη, με βάση το μοντέλο μας, η δομή του PCNA κατά την αλληλεπίδραση του με την hAng δεν αλλάζει σημαντικά, γεγονός που έρχεται σε συμφωνία με τις μέχρι τώρα γνωστές κρυσταλλικές δομές του PCNA με άλλες πρωτεΐνες ή πεπτίδια. Γενικά, η δομή του PCNA δε μεταβάλλεται κατά τη δέσμευση των πεπτιδίων PIP, ενώ παρατηρούνται μόνο μικρές μεταβολές στη δομή του βρόχου IDCL (Dieckman et al., 2012). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της Θερμιδομετρίας Ισοθερμικής Τιτλοδότησης (ITC), η στοιχειομετρία της αντίδρασης της hAng με το PCNA είναι 1:1 ως προς το μονομερές του PCNA, δηλαδή ένα μόριο της hAng προσδένεται σε ένα μονομερές PCNA, με αποτέλεσμα σε ένα τριμερές μόριο PCNA να προσδένονται τρία μόρια hAng. Στις μέχρι τώρα γνωστές κρυσταλλικές δομές των συμπλόκων του PCNA με άλλες πρωτεΐνες ή πεπτίδια, η στοιχειομετρία είναι τρία μόρια ανά τριμερές PCNA, ενώ σε κάθε τέτοιο σύμπλοκο η διαμόρφωση των τριών δεσμευμένων πεπτιδίων είναι κρυσταλλογραφικά ταυτόσημη (De Biasio & Blanco, 2013). Ωστόσο, εξαίρεση αποτελεί η δομή του συμπλόκου FEN1-PCNA, όπου τα τρία μόρια της πρωτεΐνης FEN1 συνδέονται με το PCNA σε διαφορετική θέση σε σχέση με την υπομονάδα του PCNA στην οποία δεσμεύονται (Dieckman et al., 2012a).

Γενικά, το μοντέλο μας είναι ένα αξιόπιστο μοντέλο, καθώς βασίστηκε στο Rigid body docking, μια προσέγγιση που αντιμετωπίζει τόσο τον προσδέτη, όσο και τον υποδοχέα ως άκαμπτα/σταθερά μόρια, ενώ μόνο ο βρόχος IDCL του PCNA αφέθηκε ελεύθερος (flexible). Αυτό είναι θεμιτό, καθώς λόγω του τριμερούς που σχηματίζει το PCNA, η δομή του δε μπορεί να αλλάζει σημαντικά, ενώ η hAng επίσης, λόγω των τριών δισουλφιδικών δεσμών που διαθέτει, είναι μια αρκετά σταθερή πρωτεΐνη. Ακόμη, η στοιχειομετρία των δύο πρωτεϊνικών μορίων, που χρησιμοποιήθηκε στο μοντέλο, βασίστηκε στα πειραματικά αποτελέσματα από το ITC, ενώ για την επιφάνεια αλληλεπίδρασης του συμπλόκου, χρησιμοποιήθηκαν τα αποτελέσματα από τη χαρτογράφηση της επιφάνειας αλληλεπίδρασης της hAng με το PCNA, μέσω φασματοσκοπίας NMR. Μέχρι σήμερα, λίγες είναι οι υπάρχουσες δομές από σύμπλοκα PCNA με πρωτεΐνες πλήρους μήκους, καθιστώντας με αυτό τον τρόπο τις πληροφορίες για τη δομή και ιδιαίτερα για την διεπιφάνεια του συμπλόκου hAng-PCNA, που παίρνουμε από το μοντέλο, ιδιαίτερα σημαντικές. Παρόλα αυτά η επίλυση της κρυσταλλικής δομής του συμπλόκου αυτού καθίσταται αναγκαία, τόσο για την πειραματική επιβεβαίωση του μοντέλου μας, όσο και για τη διεξαγωγή ασφαλέστερων συμπερασμάτων σχετικά με τον τρόπο αλληλεπίδρασης των δύο πρωτεϊνών.

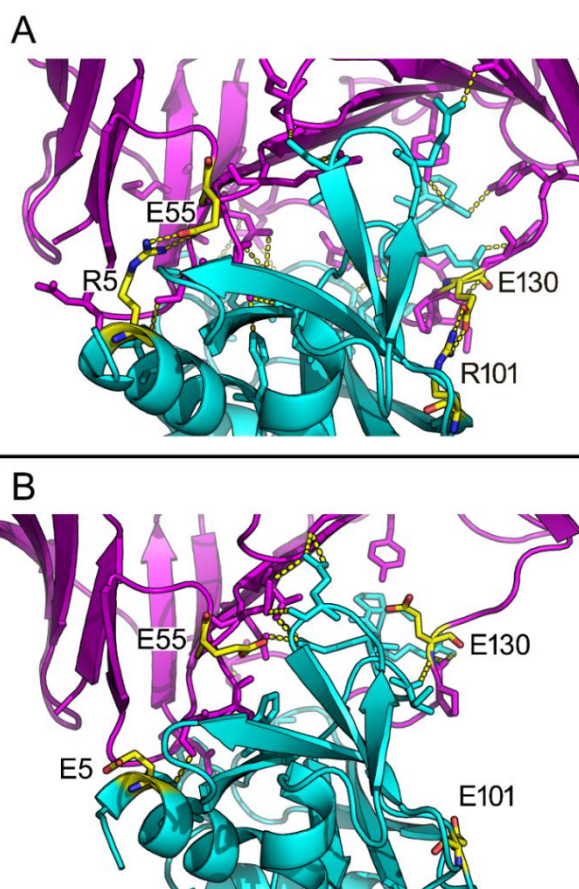
Για να εξετάσουμε τη σταθερότητα της συγκεκριμένης αλληλεπίδρασης προχωρήσαμε στην *in silico* δημιουργία μεταλλάξεων ορισμένων αμινοξικών καταλοίπων της hAng που σύμφωνα με το μοντέλο μας, βρίσκονται στην επιφάνεια αλληλεπίδρασης των δύο πρωτεϊνών, όπως περιγράφεται αναλυτικά στην ενότητα 3.2.15. Τα κατάλοιπα που επιλέχθηκαν να αλλάξουν, είναι δύο αργινίνες της hAng, η Arg5 και η Arg101, που βρίσκονται στην επιφάνεια διεπαφής της hAng με το PCNA. Τα δύο αυτά αμινοξέα βρίσκονται περίπου στα δύο άκρα της διεπιφάνειας, «πιάνοντας» το σύμπλοκο κι από τις δύο πλευρές και σταθεροποιώντας το με δεσμούς υδρογόνου και ιοντικούς δεσμούς. Συγκεκριμένα, η Arg5 αλληλεπιδρά με το γλουταμικό οξύ Glu55 του PCNA, ενώ η Arg101 με το Glu130 του PCNA. Συνεπώς, η εφαρμογή απωστικών δυνάμεων, μέσω της αντικατάστασης των δύο αυτών αργινίνων από γλουταμικό οξύ, αναμένεται να αποσταθεροποιήσει την αλληλεπίδραση των δύο πρωτεϊνών.

Επιπλέον, η Arg5 αποτελεί μέρος της υποπεριοχής P<sub>2</sub> της hAng, συμμετέχοντας στην πρόσδεση των περιφερειακών ομάδων του υποστρώματος, ενώ είναι επίσης σημαντική για την αλληλεπίδραση της hAng με τον RI (Shapiro & Vallee, 1992). Η Arg101, από την άλλη μεριά, δεν εμπλέκεται σε καμία συντηρημένη περιοχή της hAng. Παρόλα αυτά, η Arg101 εντοπίζεται στην επιφάνεια της δομής της hAng, στην ορθογώνια προεξοχή που σχηματίζεται από τη σύνδεση των β πτυχωτών φύλλων B6 και B7, γεγονός που κάνει την αργινίνη αυτή να έχει μεγαλύτερη πιθανότητα να αλληλεπιδράσει με το PCNA ή άλλες πρωτεΐνες. Μάλιστα, νέα μελέτη έδειξε πως το συγκεκριμένο αμινοξύ αποτελεί το κρίσιμο κατάλοιπο που εμπλέκεται στην αλληλεπίδραση της hAng με την α-ακτινίνη 2 (ACTN2), μία πρωτεΐνη του κυτταροσκελετού, που αναγνωρίστηκε ως πρωτεΐνη άμεσης αλληλεπίδρασης της hAng στο κυτταρόπλασμα (Weng et al., 2022).

Εν κατακλείδι, το σύμπλοκο της μεταλλαγμένης μορφής, hAng R5ER101E, με το PCNA, υποβλήθηκε σε προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής, έτσι ώστε να διαπιστωθεί εάν οι συγκεκριμένες μεταλλάξεις μπορούν να αποσταθεροποιήσουν ή όχι την πρόσδεση των δύο πρωτεϊνών. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα μας, το πρωτεϊνικό σύμπλοκο αποσταθεροποιείται, με τους δεσμούς υδρογόνου μεταξύ τους από 19 να μειώνονται σε 9 (Πίνακας 18). Στην Εικόνα67 φαίνεται η επιφάνεια αλληλεπίδρασης του συμπλόκου hAng-PCNA και του συμπλόκου hAng R5ER101E-PCNA, ενώ διακρίνονται οι δεσμοί υδρογόνου και οι ιοντικοί δεσμοί μεταξύ των αμινοξικών καταλοίπων της διεπιφάνειας επαφής πριν και μετά τις μεταλλάξεις των αμινοξέων Arg5 και Arg101 της hAng σε γλουταμικό οξύ, Glu.

Πίνακας 18: Εν δυνάμει δεσμοί υδρογόνου και ιοντικοί δεσμοί μεταξύ του PCNA και της hAng R5ER101E στο σύμπλοκο (Απόσταση ατόμων  $\leq 3,4 \text{ \AA}$ ).

Δεσμοί Υδρογόνου		Ιοντικοί δεσμοί	
hAng R5ER101E	PCNA	hAng R5ER101E	PCNA
HIS8/ND1	SER32/OG	GLU67/OE2	ARG53/NH1
PRO38/O	ASN65/ND2	GLU67/OE1	LYS240/NZ
SER87/OG	ASP122/OD2	GLU67/OE2	LYS240/NZ
HSE114/ND1	SER33/O		
ILE119/O	GLU130/N		
ARG121/NH1	ASN36/OD1		
ARG121/NH2	THR51/OG1		
ARG122/NH2	PRO129/O		
PRO123/O	TYR250/OH		
<b>Σύνολο: 9</b>		<b>Σύνολο: 3</b>	



Εικόνα 67: Απεικόνιση της επιφάνειας αλληλεπίδρασης του συμπλόκου hAng-PCNA (A) και του συμπλόκου hAng R5ER101E-PCNA (B). Με κυανό χρώμα απεικονίζεται η επιφάνεια της

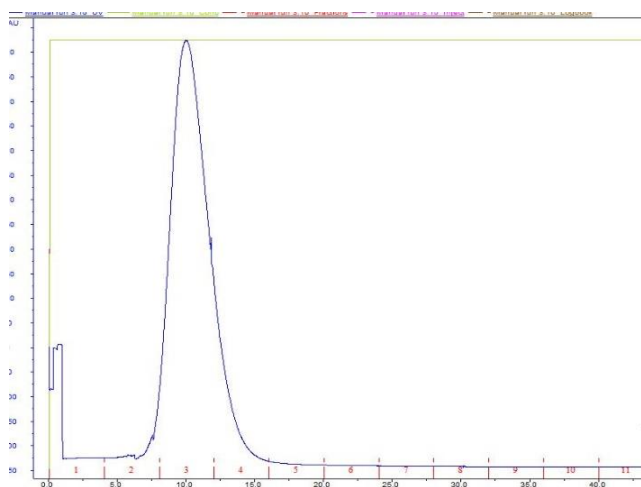
hAng, ενώ με μωβ του PCNA. Στην εικόνα διακρίνονται οι δεσμοί υδρογόνου και ιοντικοί δεσμοί μεταξύ των αμινοξικών καταλοίπων της διεπιφάνειας επαφής πριν (A) και μετά τις μεταλλάξεις των αμινοξέων R5 και R101 της hAng σε γλουταμικό οξύ (E).

#### 4.11. Απομόνωση και καθαρισμός των μεταλλαγμάτων hAng R5E και hAng R5ER101E

Με στόχο την πειραματική επιβεβαίωση του μοντέλου μας σχεδιάστηκαν και κατασκευάστηκαν πλασμίδια για την ετερόλογη έκφραση δυο μεταλλαγμένων μορφών της hAng, το μετάλλαγμα hAng R5E και το μετάλλαγμα hAng R5ER101E, όπου τα κατάλοιπα Arg5 και Arg101 αντικαταστάθηκαν από γλουταμινικό οξύ (E). Τα αμινοξέα αυτά, βάσει του μοντέλου μας, βρίσκονται στη επιφάνεια αλληλεπίδρασης του συμπλόκου και παίζουν καθοριστικό ρόλο στην αλληλεπίδραση των δυο πρωτεϊνών. Η απομόνωση και ο καθαρισμός των hAng R5E και hAng R5ER101E έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο του Holloway D.E. και των συνεργατών του (Holloway et al., 2001), όπως περιεγράφηκε στην ενότητα 3.2.2.2. Παρακάτω παρατίθενται τα αποτελέσματα του χρωματογραφικού καθαρισμού των δύο μεταλλαγμάτων με την απεικόνιση τόσο χρωματογραφημάτων, όσο και των αντίστοιχων πηκτών πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες.

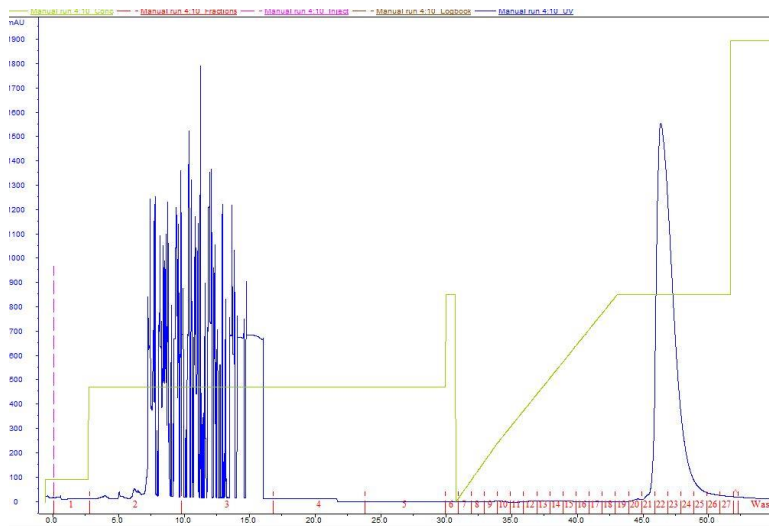
##### Αποτελέσματα χρωματογραφικού καθαρισμού του μεταλλάγματος hAng R5E

Όπως παρουσιάζεται στην *Εικόνα 68*, κατά τη διάρκεια της απομόνωσης, η έκλυση της πρωτεΐνης γίνεται στα κλάσματα 3-4 σύμφωνα με την τιμή της απορρόφησης σε μήκος κύματος 280 nm, τα οποία εν συνεχεία συλλέγονται και διέρχονται από τη δεύτερη στήλη καθαρισμού, RPC 18 (*Εικόνα 69*).



*Εικόνα 68: Χρωματογράφημα της κατιονανταλλακτικής στήλης SPFF. Με πράσινη γραμμή απεικονίζεται η συγκέντρωση του διαλύματος έκλυσης, ενώ με μπλε γραμμή απεικονίζεται η απορρόφηση σε μήκος κύματος 280 nm.*





Εικόνα 69: Χρωματογράφημα της στήλης ανάστροφης φάσης, RPC 18. Με πράσινη γραμμή απεικονίζεται η συγκέντρωση του διαλύματος έκλουσης, ενώ με μπλε γραμμή απεικονίζεται η απορρόφηση σε μήκος κύματος 280 nm.

Η πορεία της απομόνωσης του μεταλλάγματος hAng R5E ελέγχεται με ανάλυση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (Εικόνα 70).

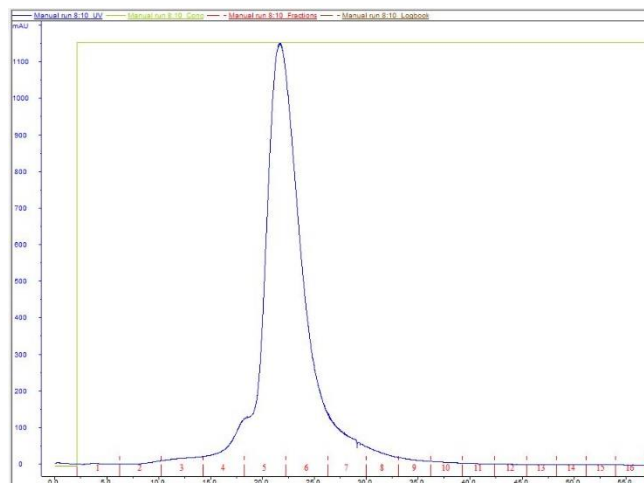


Εικόνα 70: Πηκτή 12 % SDS πολυακρυλαμιδίου, με χρώση Coomassie brilliant blue R-250. Στη διαδρομή 1 απεικονίζεται το πρωτεϊνικό κλάσμα, μετά τη στήλη SPFF, ενώ στη διαδρομή 2 απεικονίζεται το πρωτεϊνικό κλάσμα, μετά τη στήλη Resource RPC18.

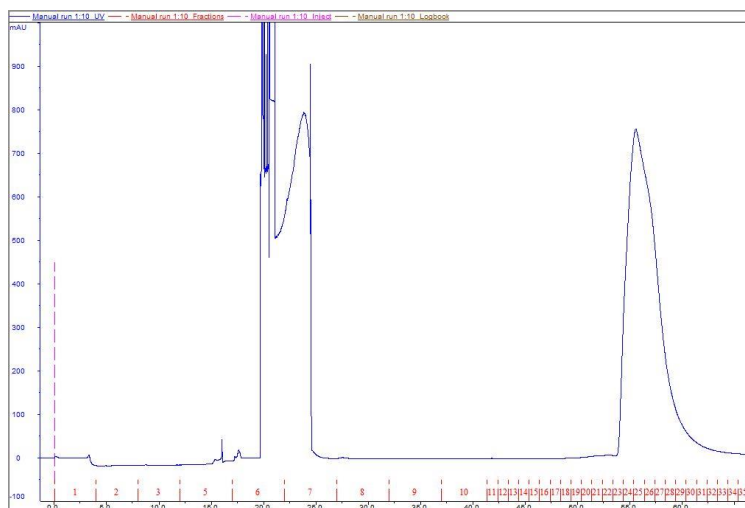


## Αποτελέσματα χρωματογραφικού καθαρισμού του μεταλλάγματος hAng R5ER101E

Όπως παρουσιάζεται στην *Εικόνα 71*, κατά τη διάρκεια της απομόνωσης, η έκλυση της πρωτεΐνης γίνεται στα κλάσματα 5-7 σύμφωνα με την τιμή της απορρόφησης σε μήκος κύματος 280 nm, τα οποία εν συνεχεία συλλέγονται και διέρχονται από τη δεύτερη στήλη καθαρισμού, RPC 18 (*Εικόνα 72*).



*Εικόνα 71: Χρωματογράφημα της κατιονανταλλακτικής στήλης SPFF. Με πράσινη γραμμή απεικονίζεται η συγκέντρωση του διαλύματος έκλυσης, ενώ με μπλε γραμμή απεικονίζεται η απορρόφηση σε μήκος κύματος 280 nm.*



*Εικόνα 72: Χρωματογράφημα της στήλης ανάστροφης φάσης, RPC 18. Με μπλε γραμμή απεικονίζεται η απορρόφηση σε μήκος κύματος 280 nm.*

Η πορεία της απομόνωσης του μεταλλάγματος hAng R5ER101E ελέγχεται με ανάλυση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (*Εικόνα 73*).



Εικόνα 73: Πηκτή 12 % SDS πολυακρυλαμιδίου, με χρώση Coomassie brilliant blue R-250. Στη διαδρομή 1 απεικονίζεται το πρωτεϊνικό κλάσμα, μετά τη στήλη SPFF, ενώ στη διαδρομή 2 απεικονίζεται το πρωτεϊνικό κλάσμα, μετά τη στήλη Resource RPC18.

Απόδοση του καθαρισμού: ο καθαρισμός των μεταλλαγμάτων hAng R5E και hAng R5ER101E, έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή 6 mg καθαρής πρωτεΐνης κάθε μεταλλάγματος ανά λίτρο βακτηριακής καλλιέργειας.

#### 4.12. Βιοφυσικός χαρακτηρισμός της αλληλεπίδρασης των μεταλλαγμάτων της hAng S28AT36AS37AS87A, R5E και R5ER101E με το PCNA, μέσω θερμοδομετρίας ισοθερμικής τιτλοδότησης (ITC)

Για την επιβεβαίωση του μοντέλου του συμπλόκου hAng-PCNA, που προέκυψε από docking, πραγματοποιήθηκε ποσοτικός χαρακτηρισμός της αλληλεπίδρασης των μεταλλαγμάτων της hAng με το PCNA, με θερμοδομετρία ισοθερμικής τιτλοδότησης (ITC). Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με το πρόγραμμα Nanoanalyze software (TAInstruments, 2010). Συγκεκριμένα, η σταθερά διάστασης  $K_d$  της πρόσδεσης του μεταλλάγματος hAng S28AT36AS37AS87A στο PCNA ισούται με 192 nM ( $1,922 \times 10^{-7}$  M) και δε διαφέρει σημαντικά από την τιμή της  $K_d$  της πρόσδεσης της hAng αγρίου τύπου στο PCNA ( $K_d = 130$  nM). Με βάση την κρυσταλλική δομή του συγκεκριμένου μεταλλάγματος, οι 4 μεταλλάξεις δεν άλλαξαν σημαντικά τη δομή της hAng (RMSD C $^{\alpha}$ : 0,730 Å). Επιπλέον, η μικρή διαφορά στην τιμή της  $K_d$ , σε σχέση με τη φυσική πρωτεΐνη, μπορεί να δικαιολογηθεί από το γεγονός ότι δύο από τα τέσσερα αμινοξέα που μεταλλάχθηκαν, βρίσκονται, σύμφωνα με το μοντέλο μας, στην επιφάνεια διεπαφής του συμπλόκου hAng-PCNA. Τα αμινοξέα αυτά είναι: η Ser37 που αλληλεπιδρά με τα αμινοξικά κατάλοιπα του PCNA Arg64, Asn65 και Leu66, καθώς και η Ser87 που σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου με το κατάλοιπο Asp122 του PCNA.

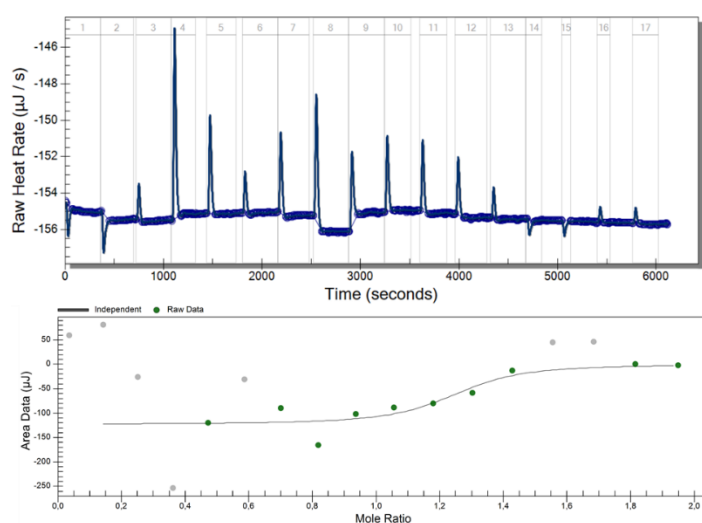
Εν συνεχεία, η σταθερά διάστασης  $K_d$  της πρόσδεσης του PCNA στο μετάλλαγμα hAng R5E ισούται με 218 nM ( $2,18 \times 10^{-7}$  M), ενώ η  $K_d$  της πρόσδεσής του στο μετάλλαγμα hAng R5ER101E ισούται με 1,16  $\mu$ M ( $1,16 \times 10^{-6}$  M). Όσον αφορά το πρώτο μετάλλαγμα, η τιμή της  $K_d$  είναι σχεδόν διπλάσια από την τιμή της  $K_d$  της πρόσδεσης της hAng αγρίου τύπου στο PCNA ( $K_d = 130$  nM), γεγονός που υποδηλώνει πως το σύμπλοκο των δυο πρωτεϊνών αποσταθεροποιείται ελαφρώς από τη συγκεκριμένη μετάλλαξη. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνεται και από τη δραματική αλλαγή του  $\Delta H$  από -101 KJ/mol σε -15 KJ/mol. Ακόμη μεγαλύτερη διαφορά μεταξύ των σταθερών διάστασης  $K_d$  παρατηρείται συγκρίνοντας αυτή της πρόσδεσης του PCNA στο δεύτερο μετάλλαγμα της hAng, hAng R5ER101E, με αυτή της πρόσδεσης της hAng αγρίου τύπου στο PCNA. Αναλυτικότερα οι δυο σταθερές διάστασης διαφέρουν μεταξύ τους ως προς μία τάξη μεγέθους, με την  $K_d$  του συμπλόκου hAng R5ER101E- PCNA να είναι της τάξης των  $\mu$ M ( $10^{-6}$  M). Όπως έχει αναφερθεί και νωρίτερα στη διατριβή, κατά κανόνα, αν η σταθερά διάστασης  $K_d$  έχει τιμές της τάξης των nM ( $10^{-9}$  M), τότε περιγράφει μια ισχυρή πρωτεϊνική αλληλεπίδραση, εάν όμως οι τιμές της είναι της τάξης των  $\mu$ M ( $10^{-6}$  M) ή της τάξης των mM ( $10^{-3}$  M), τότε αυτή περιγράφει μια μεσαία ή μια ασθενή αλληλεπίδραση, αντίστοιχα (Lin & Wu, 2019). Με την αλλαγή των δύο καταλοίπων αργινίνης της hAng, R5 και R101, σε γλουταμικό οξύ, αποσταθεροποιήθηκε η αλληλεπίδραση του συμπλόκου hAng-PCNA, καθώς τα δύο αυτά αμινοξέα φαίνεται ότι παίζουν μείζονα ρόλο στην αλληλεπίδραση αυτή. Αυτό έρχεται σε συμφωνία με το μοντέλο μας, καθώς σύμφωνα με αυτό και με τα πειραματικά δεδομένα από το NMR, τα συγκεκριμένα αμινοξέα βρίσκονται στην επιφάνεια διεπαφής των δύο πρωτεϊνών. Συνεπώς, σύμφωνα με τα παραπάνω, η αλληλεπίδραση του συμπλόκου hAng-PCNA, μετά την αλλαγή των δύο αυτών αμινοξικών καταλοίπων, μετατράπηκε από μια ισχυρή σε μία μεσαία αλληλεπίδραση, επιβεβαιώνοντας πειραματικά το μοντέλο της τρισδιάστατης δομής του συμπλόκου hAng-PCNA, που προέκυψε από docking.

Τέλος, σύμφωνα με τα αποτελέσματα των πειραμάτων ITC, όσον αφορά το τετραπλό μετάλλαγμα της hAng, hAng S28AT36AS37AS87A, οι μεταλλάξεις των σερινών Ser37 και Ser87 σε αλανίνες, φαίνεται να έχουν μικρή επίδραση στην τιμή της  $K_d$ , ενώ δεν είναι τόσο δραστικές όσο οι μεταλλάξεις στις αργινίνες Arg5 και Arg101. Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με το ότι η δομή της φυσικής πρωτεΐνης δεν αλλάζει σημαντικά από τις τέσσερις αυτές μεταλλάξεις, μας επιτρέπει να θεωρήσουμε πως και οι μεταλλάξεις της hAng, R5E και R5ER101E, δεν αλλάζουν επίσης σημαντικά τη δομή της φυσικής πρωτεΐνης.

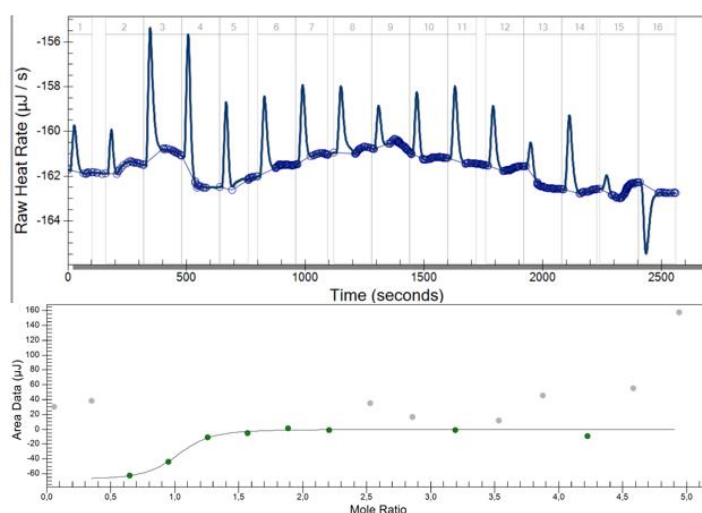
Οι πληροφορίες για τη στοιχειομετρία, την ενθαλπία, την εντροπία και την κινητική της δέσμευσης των συμπλόκων του PCNA με τα μετάλλαγματα hAng S28AT36AS37AS87A, R5E και R5ER101E παρουσιάζονται στον Πίνακα 19, ενώ το προφίλ ITC για την τιτλοδότηση του PCNA στα μετάλλαγματα της hAng παρατίθεται στις Εικόνες 74, 75 και 76.

Πίνακας 19: Θερμοδυναμικές παράμετροι για την πρόσδεση του PCNA στα μεταλλάγματα hAng R5E και hAng R5ER101E, από πειράματα ITC.

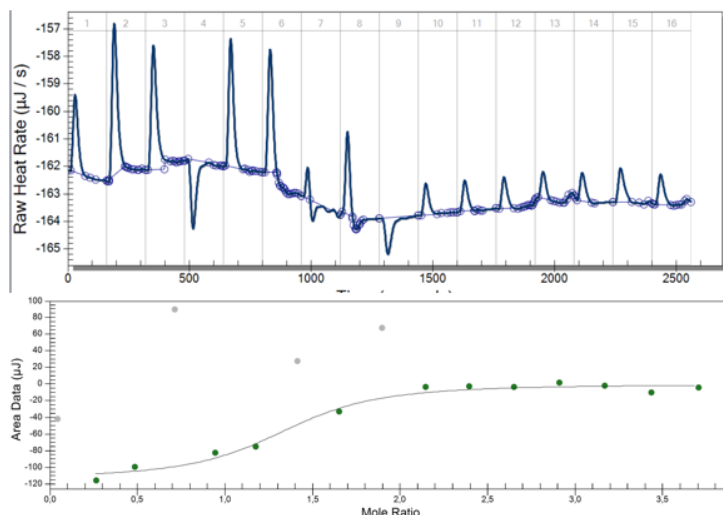
	n	Kd (M)	ΔH (kJ/mol)	ΔG (kJ/mol)
hAng	0,59	$1,3 \times 10^{-7}$	-101,5	-39,95
hAng S28AT36AS37AS87A	1,157	$1,922 \times 10^{-7}$	-89,74	-38,98
hAng R5E	0,89	$2,18 \times 10^{-7}$	-15,17	-38,65
hAng R5ER101E	1,28	$1,16 \times 10^{-6}$	-25,4	-34,45



Εικόνα 74: Το προφίλ ITC για την τιτλοδότηση του μεταλλάγματος hAng S28AT36AS37AS87A στο PCNA, σε θερμοκρασία 30°C.



Εικόνα 75: Το προφίλ ITC για την τιτλοδότηση του PCNA στο μετάλλαγμα hAng R5E, σε θερμοκρασία 30°C.



Εικόνα 76: Το προφίλ ITC για την τιτλοδότηση του PCNA στο μετάλλαγμα hAng R5EE101E, σε θερμοκρασία 30°C.

#### 4.13. Συμπεράσματα

Η αναγνώριση και η ταυτοποίηση των πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με την hAng μπορεί να βοηθήσει στην καλύτερη κατανόηση των βιολογικών της ρόλων, καθώς και των μηχανισμών δράσης της. Πρόσφατη μελέτη, ανέδειξε το PCNA, ως μια αλληλεπιδρώσα πρωτεΐνη της hAng στο κυτταρόπλασμα της ανθρώπινης υβριδικής κυτταρικής σειράς ενδοθηλιακών και καρκινικών κυττάρων πνεύμονα (Chatzileontiadiou et al., 2017). Στην παρούσα διατριβή τα μοριακά συστατικά της αλληλεπίδρασης της hAng με το PCNA προσδιορίστηκαν με το συνδυασμό διάφορων τεχνικών βιοφυσικής. Αναλυτικότερα, μέσω μελετών ανοσοκατακρήμνισης (IP) της hAng με το PCNA *in vitro*, αποδείχθηκε πως οι δύο πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν άμεσα, χωρίς να παρεμβάλλεται κάποιο άλλο μόριο μεταξύ τους. Επιπλέον, η αλληλεπίδραση αυτή ποσοτικοποιήθηκε με θερμιδομετρία ισοθερμικής τιτλοδότησης (ITC), λαμβάνοντας πληροφορίες σχετικά με τη στοιχειομετρία, την ενθαλπία, την εντροπία και την κινητική δέσμευσης των δύο πρωτεϊνών, αποκαλύπτοντας πως πρόκειται για μία ισχυρή αλληλεπίδραση με σταθερά διάστασης  $K_d = 130$  nM, ενώ πραγματοποιήθηκε επίσης, χαρτογράφηση της επιφάνειας αλληλεπίδρασης τους με φασματοσκοπία NMR. Κάνοντας χρήση όλων των παραπάνω πληροφοριών προχωρήσαμε στη δημιουργία του μοντέλου της τρισδιάστατης δομής του συμπλόκου hAng-PCNA, με τη βοήθεια αλγορίθμων docking και Προσομοιώσεων Μοριακής Δυναμικής. Για να εξετάσουμε τη σταθερότητα της αλληλεπίδρασης προχωρήσαμε στη δημιουργία μεταλλάξεων των καταλοίπων της hAng Arg5 και Arg101 που βρίσκονται, σύμφωνα με το μοντέλο μας, στην επιφάνεια διεπαφής των δύο πρωτεϊνών και αλληλεπιδρούν με τα κατάλοιπα του PCNA, Glu55 και Glu130, αντίστοιχα. Δημιουργήθηκε έτσι το διπλό μετάλλαγμα της hAng, hAng

R5ER101E, όπου οι δύο αργινίνες αντικαταστάθηκαν με γλουταμικό οξύ, ενώ πραγματοποιήθηκε βιοφυσικός χαρακτηρισμός της αλληλεπίδρασης του hAng R5ER101E με το PCNA, μέσω θερμιδομετρίας ισοθερμικής τιτλοδότησης, όπου και το μοντέλο μας επιβεβαιώθηκε πειραματικά, καθώς η αλληλεπίδραση του συμπλόκου hAng-PCNA, μετά την αλλαγή των δύο αυτών αμινοξικών καταλοίπων, μετατράπηκε από μια ισχυρή σε μία μεσαία αλληλεπίδραση. Παρόλα αυτά, η επίλυση της κρυσταλλικής δομής του συμπλόκου αυτού καθίσταται αναγκαία, τόσο για την πειραματική επιβεβαίωση του μοντέλου μας, όσο και για τη διεξαγωγή ασφαλέστερων συμπερασμάτων τόσο για τον τρόπο αλληλεπίδρασης των δύο πρωτεϊνών, όσο και για τους βιολογικούς τους ρόλους.

### Πιθανός βιολογικός ρόλος του συμπλόκου hAng-PCNA

Μελέτες έχουν δείξει πως η άλφα-ακτινίνη 2 (ACTN2), μια κυτταροσκελετική πρωτεΐνη, αναγνωρίστηκε ως πρωτεΐνη άμεσης αλληλεπίδρασης της hAng στο κυτταρόπλασμα, ενώ σύμφωνα με μία νέα μελέτη η πρωτεΐνη αυτή συνδέεται με τα αμινοξικά κατάλοιπα 83-105 της hAng. Η Arg101 αποτελεί το πιο κρίσιμο κατάλοιπο της αλληλεπίδρασης αυτής, καθώς όταν αυτή αντικαθίσταται από Ile, η αλληλεπίδραση των δυο πρωτεϊνών εξαφανίζεται. Επίσης, η υπερέκφραση του τμήματος της ACTN2 383-632, το οποίο αλληλεπιδρά με την hAng, αναστέλλει την κινητικότητα και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του όγκου, παρεμβαίνοντας στην αλληλεπίδραση hAng-ACTN2, παρέχοντας έναν πιθανό μηχανισμό δράσης της hAng στην ανάπτυξη και τη μετάσταση του όγκου (Weng et al., 2022). Ακόμη, σύμφωνα με το μοντέλο του συμπλόκου hAng-PCNA, μεγάλο τμήμα της περιοχής αλληλεπίδρασης της hAng με την ACTN2, ανήκει επίσης και στην επιφάνεια αλληλεπίδρασης της πρώτης με το PCNA (Πίνακας 16), ενώ αντικατάσταση του καταλοίπου Arg101 και του Arg5, αποσταθεροποίησαν την αλληλεπίδραση hAng-PCNA, μετατρέποντας την από ισχυρή σε μία μεσαία αλληλεπίδραση. Συνεπώς, το PCNA, λόγω της παρόμοιας επιφάνειας αλληλεπίδρασης με την ACTN2 για την hAng, πιθανόν να δρα ως ανταγωνιστής της ACTN2 για τη θέση πρόσδεσης στην hAng, μειώνοντας ταυτόχρονα και την ενζυμική δράση της δεύτερης. Με αυτό τον τρόπο το PCNA πιθανόν να ρυθμίζει έναν εν δυνάμει μηχανισμό δράσης της hAng, στην ανάπτυξη και τη μετάσταση του όγκου.

Επιπλέον, το PCNA αποτελεί έναν κύριο ρυθμιστή του κυτταρικού κύκλου (Zhu et al., 2014), ενώ σύμφωνα με το μοντέλο μας, κάνει εκτεταμένες επαφές με το ριβονουκλεολυτικό ενεργό κέντρο της hAng. Συγκεκριμένα, το καταλυτικό κατάλοιπο Lys40 της δεύτερης, δημιουργεί δεσμούς υδρογόνου με το κατάλοιπο Asp29 του PCNA, ενώ ακόμη ένα κατάλοιπο του ενεργού κέντρου, το His13, σχηματίζει επίσης δεσμούς υδρογόνου με το κατάλοιπο Ser33 του PCNA, εμποδίζοντας έτσι την πρόσβαση στο ενεργό κέντρο της hAng. Συνεπώς, το PCNA πιθανόν να μπορεί να

λειτουργεί κι ως ένας ακόμη ρυθμιστής της δράσης της hAng, αναστέλλοντας την ενζυμική της δράση, όπου χρειάζεται, ανάλογα κάθε φορά με τις ανάγκες του κυττάρου. Παρόλα αυτά ο βιολογικός ρόλος της αλληλεπίδρασης των δύο πρωτεϊνών δεν έχει διευκρινιστεί ακόμα και απαιτούνται περισσότερες μελλοντικές βιοχημικές-μοριακές μελέτες για την αποσαφήνιση του.

## **SUMMARY**

Human angiogenin (hAng), an unusual member of the secreted ribonuclease family, is a potent angiogenic factor with a role in a variety of physiological and pathological conditions. hAng presents in normal human tissues and fluids, such as plasma, amniotic fluid, tumor microenvironment, and cerebrospinal fluid. It plays a major role in the growth and establishment of human tumors since it is a potent stimulator of new blood vessels through the process of angiogenesis. It is involved in each stage of oncogenesis, making it a diagnostic and prognosis cancer marker and a validated pharmaceutical target for drug development for human malignancies.

The Ph.D. thesis mainly focuses on the interactions of hAng with proliferating cell nuclear antigens (PCNA). PCNA, the eukaryotic DNA sliding clamp, was first shown to act as a processivity factor of DNA polymerase  $\delta$ , which is required for DNA synthesis during replication. However, besides DNA replication, PCNA functions are associated with other vital cellular processes such as chromatin remodeling, DNA repair, sister-chromatid cohesion, and cell cycle control.

Molecular details of the hAng-PCNA interaction were determined by a combination of various biophysical methods. The two proteins were shown to interact directly, through immunoprecipitation (IP) studies of hAng with PCNA *in vitro* and their interaction was quantified by isothermal titration calorimetry (ITC), obtaining information on stoichiometry, enthalpy, entropy, and binding kinetics of the association. ITC experiments also revealed that the hAng-PCNA association is strong with a  $K_d$  value in the nanomolar range ( $K_d = 130$  nM). Moreover, their interaction surface was mapped by NMR spectroscopy. Based on this information, we created a model of the 3D structure of the hAng-PCNA complex using docking and molecular dynamics simulations. The validity of the model was tested by mutating hAng residues Arg5 and Arg101, which are at the molecular interface of the two proteins and interact with PCNA residues Glu55 and Glu130, respectively. Thus, we generated a single and a double mutant of hAng, hAng R5E and R5ER101E, replacing the two arginines by glutamic acid. Subsequently, biophysical characterization of the interaction of each of the hAng variants PCNA by ITC experiments validated the model was since the hAng-PCNA interaction was converted from a strong association to a medium-strength association with  $K_d$  values of 218 nM and 1160 nM, for each variant, respectively.

Recent studies have shown that phosphorylation of serine-threonine residues enables hAng to evade cytosolic ribonuclease inhibitor (RI) and enter the nucleus. Among the serine-threonine residues of hAng, four are of special interest, Ser87, which is at the molecular interface of the RI-hAng complex, and a cluster of three residues near the NLS, Ser28, Thr36, and Ser37. To investigate whether these residues contribute significantly to the conformation of hAng, crystallographic studies of the mutants hAng S28AT36AS37A and hAng S28AT36AS37AS87A were performed, where



these residues were replaced by alanine. The structural studies revealed that these mutations do not cause any significant change in the structure of hAng.

## **BIBΛIOΓΡΑΦΙΑ**

1. A Guide to Polyacrylamide Gel Electrophoresis and Detection. (2012). In *Bio-Rad* (p. 47).
2. Acharya, K. R., Shapiro, R., Allen, S. C., Riordan, J. F., & Vallee, B. L. (1994). Crystal structure of human angiogenin reveals the structural basis for its functional divergence from ribonuclease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(8), 2915–2919. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.8.2915>
3. Äkta. (n.d.). *FPLC System Manual 18-1140-45*.
4. Alongi, K. S., & Shields, G. C. (2010). Theoretical calculations of acid dissociation constants. A review article. In *Annual Reports in Computational Chemistry* (Vol. 6, Issue C). Elsevier Masson SAS. [https://doi.org/10.1016/S1574-1400\(10\)06008-1](https://doi.org/10.1016/S1574-1400(10)06008-1)
5. Andreani, J., Faure, G., & Guerois, R. (2013). InterEvScore: A novel coarse-grained interface scoring function using a multi-body statistical potential coupled to evolution. *Bioinformatics*, 29(14), 1742–1749. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt260>
6. Arbel, M., Choudhary, K., Tfilin, O., & Kupiec, M. (2021). PCNA loaders and unloaders—One ring that rules them all. *Genes*, 12(11). <https://doi.org/10.3390/genes12111812>
7. Banks, D., Wu, M., Higa, L. A., Gavrilova, N., Quan, J., Ye, T., Kobayashi, R., Sun, H., & Zhang, H. (2006). L2DTL/CDT2 and PCNA interact with p53 and regulate p53 polyubiquitination and protein stability through MDM2 and CUL4A/DDB1 complexes. *Cell Cycle*, 5(15), 1719–1729. <https://doi.org/10.4161/cc.5.15.3150>
8. Banks, D., Wu, M., Higa, L. A., Gavrilova, N., Quan, J., Ye, T., Kobayashi, R., Sun, H., & Zhang, H. (2006). L2DTL/CDT2 and PCNA interact with p53 and regulate p53 polyubiquitination and protein stability through MDM2 and CUL4A/DDB1 complexes. *Cell Cycle*, 5(15), 1719–1729. <https://doi.org/10.4161/cc.5.15.3150>
9. Beintema, J. J., & Kleideidam, R. G. (1998). The ribonuclease A superfamily: General discussion. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 54(8), 825–832. <https://doi.org/10.1007/s000180050211>
10. Belyakova NV, Pantina RA, Kovalev RA, Filatov MV, Naryzhny SN. Quaternary structures of human cytoplasmic and nuclear PCNA are the same. *Biomed Khim.* 2017 Jul;63(4):356-360. Russian. doi: 10.18097/PBMC20176304356. PMID: 28862608.
11. Benov, L., & Al-Ibraheem, J. (2002). Disrupting *Escherichia coli*: A comparison of methods. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 35(4), 428–431. <https://doi.org/10.5483/bmbrep.2002.35.4.428>

12. Berg, J. M., Tymoczko, J. L., & Stryer, L. (2009). *Biochemistry* (5th ed.).
13. Bergfors, T. (2003). Seeds to crystals. *Journal of Structural Biology*, 142(1), 66–76. [https://doi.org/10.1016/S1047-8477\(03\)00039-X](https://doi.org/10.1016/S1047-8477(03)00039-X)
14. Bhardwaj, V. K., & Purohit, R. (2020). A new insight into protein-protein interactions and the effect of conformational alterations in PCNA. *International Journal of Biological Macromolecules*, 148, 999–1009. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.01.212>
15. Blaser, J., Triebel, S., Kopp, C., & Tschesche, H. (1993). A Highly Sensitive Immunoenzymometric Assay for the Determination of Angiogenin. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 31(8), 513–516. <https://doi.org/10.1515/cclm.1993.31.8.513>
16. Blundell, T. L., & Johnson, L. N. (1976). *Protein Crystallography*. Academic Press, London.
17. Boehm, E. M., Gildenberg, M. S., & Washington, M. T. (2016). The Many Roles of PCNA in Eukaryotic DNA Replication. In *Enzymes* (Vol. 39, pp. 231–254). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.enz.2016.03.003>
18. Bonvin, A. M. (2006). Flexible protein-protein docking. *Current Opinion in Structural Biology*, 16(2), 194–200. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2006.02.002>
19. Bornhorst, J. A., & Falke, J. J. (2000). [16] Purification of proteins using polyhistidine affinity tags. In *Biotechnology Proteins to PCR* (pp. 245–254). [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(00\)26058-8](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(00)26058-8)
20. Bouayad, D., Pederzoli-Ribeil, M., Mocek, J., Candalh, C., Arlet, J. B., Hermine, O., Reuter, N., Davezac, N., & Witko-Sarsat, V. (2012). Nuclear-to-cytoplasmic relocalization of the proliferating cell nuclear antigen (PCNA) during differentiation involves a chromosome region maintenance 1 (CRM1)-dependent export and is a prerequisite for PCNA antiapoptotic activity in mature neutrophils. *Journal of Biological Chemistry*, 287(40), 33812–33825. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.367839>
21. Bowman, G. D., O'Donnell, M., & Kuriyan, J. (2004). Structural analysis of a eukaryotic sliding DNA clamp-clamp loader complex. *Nature*, 429(6993), 724–730. <https://doi.org/10.1038/nature02585>
22. Bradshaw, W. J., Rehman, S., Pham, T. T. K., Thiyagarajan, N., Lee, R. L., Subramanian, V., & Acharya, K. R. (2017). Structural insights into human angiogenin variants implicated in Parkinson's disease and Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Scientific Reports*, 7(January), 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep41996>
23. Brown, R. B., & Audet, J. (2008). Current techniques for single-cell lysis. *Journal of the Royal Society Interface*, 5(SUPPL.2). <https://doi.org/10.1098/rsif.2008.0009.focus>
24. Bruning, J. B., & Shamoo, Y. (2004). Structural and thermodynamic analysis

- of human PCNA with peptides derived from DNA polymerase- $\delta$  p66 subunit and flap endonuclease-1. *Structure*, 12(12), 2209–2219. <https://doi.org/10.1016/j.str.2004.09.018>
25. Burgers, P. M. J. (2009). Polymerase dynamics at the eukaryotic DNA replication fork. *Journal of Biological Chemistry*, 284(7), 4041–4045. <https://doi.org/10.1074/jbc.R800062200>
  26. Carter, P. (1986). Site-directed mutagenesis. *The Biochemical Journal*, 237(1), 1–7. <https://doi.org/10.1042/bj2370001>
  27. Castaño, A., & Maurer, M. S. (2015). Protonation and pK changes in protein-ligand binding. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 20(2), 163–178. <https://doi.org/10.1017/S0033583513000024.Protonation>
  28. Chatzileontiadou, D. S. M., Samiotaki, M., Alexopoulou, A. N., Cotsiki, M., Panayotou, G., Stamatiadi, M., Balatsos, N. A. A., 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. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.7b00335>
  29. Chatzileontiadou, D. S. M., Tsika, A. C., Diamantopoulou, Z., Delbé, J., Badet, J., Courty, J., Skamnaki, V. T., Parmenopoulou, V., Komiotis, D., Hayes, J. M., Spyroulias, G. A., & Leonidas, D. D. (2018). Evidence for Novel Action at the Cell-Binding Site of Human Angiogenin Revealed by Heteronuclear NMR Spectroscopy, in silico and in vivo Studies. *ChemMedChem*, 13(3), 259–269. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201700688>
  30. Chatzileontiadou, D. S. M., Tsirkone, V. G., Dossi, K., Kassouni, A. G., Liggri, P. G. V., Kantsadi, A. L., Stravodimos, G. A., Balatsos, N. A. A., Skamnaki, V. T., & Leonidas, D. D. (2016). The ammonium sulfate inhibition of human angiogenin. *FEBS Letters*, 590, 3005–3018. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12335>
  31. Chavali, G. B., Papageorgiou, A. C., Olson, K. A., Fett, J. W., Hu, G. F., Shapiro, R., & Acharya, K. R. (2003). The crystal structure of human angiogenin in complex with an antitumor neutralizing antibody. *Structure*, 11(7), 875–885. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(03\)00131-X](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(03)00131-X)
  32. Chen, M. L., Wu, R. M., Tai, C. H., & Lin, C. H. (2014). Mutational analysis of Angiogenin gene in Parkinson's disease. *PLoS ONE*, 9(11), 9–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112661>
  33. Cheng, C. W., Rifai, A., Shuk-Man, K. A., Shui, H. A. I., Lin, Y. F., Lee, W. H., & Chen, A. (2005). Calcium-binding proteins annexin A2 and S100A6 are sensors of tubular injury and recovery in acute renal failure. *Kidney International*, 68(6), 2694–2703. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2005.00740.x>
  34. Click, T. H., Ganguly, D., & Chen, J. (2010). Intrinsically disordered proteins

- in a physics-based world. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(12), 5292–5309. <https://doi.org/10.3390/ijms11125292>
35. Collaborative Computational Project, N. 4. (1994). The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 50(5), 760–763. <https://doi.org/10.1107/S0907444994003112>
  36. Conn, G. L. (2019). Application of Isothermal Titration Calorimetry (ITC) to Biomolecular Interactions. *Biomolecular and Bioanalytical Techniques*, 279–305. <https://doi.org/10.1002/9781119483977.ch12>
  37. Corthell, J. T. (2014). Immunoprecipitation. *Basic Molecular Protocols in Neuroscience: Tips, Tricks, and Pitfalls*, 77–81. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-801461-5.00008-3>
  38. Couchman, J. R. (2003). Syndecans: Proteoglycan regulators of cell-surface microdomains? *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4(12), 926–937. <https://doi.org/10.1038/nrm1257>
  39. Crabtree, B., Thiyagarajan, N., Prior, S. H., Wilson, P., Iyer, S., Ferns, T., Shapiro, R., Brew, K., Subramanian, V., & Acharya, K. R. (2007). Characterization of human angiogenin variants implicated in amyotrophic lateral sclerosis. *Biochemistry*, 46(42), 11810–11818. <https://doi.org/10.1021/bi701333h>
  40. Crabtree, B., Thiyagarajan, N., Prior, S. H., Wilson, P., Iyer, S., Ferns, T., Shapiro, R., Brew, K., Subramanian, V., & Acharya, K. R. (2007). Characterization of human angiogenin variants implicated in amyotrophic lateral sclerosis. *Biochemistry*, 46(42), 11810–11818. <https://doi.org/10.1021/bi701333h>
  41. Cucci, L. M., Satriano, C., Marzo, T., & La Mendola, D. (2021). Angiogenin and copper crossing in wound healing. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(19), 1–14. <https://doi.org/10.3390/ijms221910704>
  42. Curran, T. P., Shapiro, R., & Riordan, J. F. (1993). Alteration of the Enzymatic Specificity of Human Angiogenin by Site-Directed Mutagenesis. *Biochemistry*, 32(9), 2307–2313. <https://doi.org/10.1021/bi00060a023>
  43. Czech, A., Wende, S., Mörl, M., Pan, T., & Ignatova, Z. (2013). Reversible and Rapid Transfer-RNA Deactivation as a Mechanism of Translational Repression in Stress. *PLoS Genetics*, 9(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003767>
  44. D'Alessio, G., DiDonato, A., Parente, A., & Piccoli, R. (1991). Seminal RNase - A unique member of the ribonuclease superfamily. *Trends Biochem. Sci.* 16, 104-106 (1991), 3(2), 30604. <https://builtsurvey.utm.my/>
  45. Dauter, Z., & Wlodawer, A. (2016). Progress in protein crystallography. *Protein & Peptide Letters*, 23(3), 201–210. <https://doi.org/10.2174/0929866523666160106153524>

46. De Biasio, A., & Blanco, F. J. (2013). Proliferating cell nuclear antigen structure and interactions: Too many partners for one dancer? In *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology* (1st ed., Vol. 91). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-411637-5.00001-9>
47. De Biasio, A., Campos-Olivas, R., Sánchez, R., López-Alonso, J. P., Pantoja-Uceda, D., Merino, N., Villate, M., Martín-García, J. M., Castillo, F., Luque, I., & Blanco, F. J. (2012). Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) interactions in solution studied by NMR. *PloS One*, 7(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048390>
48. De Chiara, A., Pederzoli-Ribeil, M., Mocek, J., Candalh, C., Mayeux, P., Millet, A., & Witko-Sarsat, V. (2013). Characterization of cytosolic proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in neutrophils: antiapoptotic role of the monomer. *Journal of Leukocyte Biology*, 94(4), 723–731. <https://doi.org/10.1189/jlb.1212637>
49. De March, M., Barrera-Vilarmau, S., Crespan, E., Mentegari, E., Merino, N., Gonzalez-Magaña, A., Romano-Moreno, M., Maga, G., Crehuet, R., Onesti, S., Blanco, F. J., & De Biasio, A. (2018). P15PAF binding to PCNA modulates the DNA sliding surface. *Nucleic Acids Research*, 46(18), 9816–9828. <https://doi.org/10.1093/nar/gky723>
50. Debnath, J., Dasgupta, S., & Pathak, T. (2012). Dinucleosides with non-natural backbones: A new class of ribonuclease A and angiogenin inhibitors. *Chemistry - A European Journal*, 18(6), 1618–1627. <https://doi.org/10.1002/chem.201102816>
51. Debnath, J., Dasgupta, S., & Pathak, T. (2014). Amino and carboxy functionalized modified nucleosides: A potential class of inhibitors for angiogenin. *Bioorganic Chemistry*, 52, 56–61. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2013.11.005>
52. Dessau, M. A., & Modis, Y. (2010). Protein crystallization for X-ray crystallography. *Journal of Visualized Experiments*, 9(47), 1–6. <https://doi.org/10.3791/2285>
53. Dickson, K. A., Haigis, M. C., & Raines, R. T. (2005). Ribonuclease Inhibitor: Structure and Function. In *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* (Vol. 80, Issue 05, pp. 349–374). [https://doi.org/10.1016/S0079-6603\(05\)80009-1](https://doi.org/10.1016/S0079-6603(05)80009-1)
54. Dickson, K. A., Kang, D.-K., Kwon, Y. S., Kim, J. C., Leland, P. A., Kim, B.-M., Chang, S.-I., & Raines, R. T. (2009). Ribonuclease Inhibitor Regulates Neovascularization by Human Angiogenin. *Biochemistry*, 48(18), 3804–3806. <https://doi.org/10.1021/bi9005094>
55. Dieckman, L. M., Freudenthal, B. D., & Washington, M. T. (2012). PCNA structure and function: Insights from structures of PCNA complexes and post-translationally modified PCNA. *Subcellular Biochemistry*, 62, 281–299.

- [https://doi.org/10.1007/978-94-007-4572-8\\_15](https://doi.org/10.1007/978-94-007-4572-8_15)
56. Dominguez, C., Boelens, R., & Bonvin, A. M. J. J. (2003). HADDOCK: A protein-protein docking approach based on biochemical or biophysical information. *Journal of the American Chemical Society*, *125*(7), 1731–1737. <https://doi.org/10.1021/ja026939x>
  57. Durbin, S. D., & Feher, G. (1996). PROTEIN CRYSTALLIZATION. *Annual Review of Physical Chemistry*, *47*(1), 171–204. <https://doi.org/10.1146/annurev.physchem.47.1.171>
  58. Dutta, A. K., Rösgen, J., & Rajarathnam, K. (2015). Using isothermal titration calorimetry to determine thermodynamic parameters of protein–glycosaminoglycan interactions. *Methods in Molecular Biology*, *1229*, 315–324. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1714-3\\_25](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1714-3_25)
  59. Dyer, K. D., & Rosenberg, H. F. (2006). The RNase a superfamily: Generation of diversity and innate host defense. *Molecular Diversity*, *10*(4), 585–597. <https://doi.org/10.1007/s11030-006-9028-2>
  60. Emsley, P., & Cowtan, K. (2004). Coot : model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, *60*(12), 2126–2132. <https://doi.org/10.1107/S0907444904019158>
  61. Emsley, P., & Cowtan, K. (2004). Coot: Model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, *60*(12 I), 2126–2132. <https://doi.org/10.1107/S0907444904019158>
  62. Evans, P. R., & Murshudov, G. N. (2013). How good are my data and what is the resolution? *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, *69*(7), 1204–1214. <https://doi.org/10.1107/S0907444913000061>
  63. Fasoli, S., Bettin, I., Montioli, R., Fagagnini, A., Peterle, D., Laurents, D. V., & Gotte, G. (2021). Dimerization of human angiogenin and of variants involved in neurodegenerative diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(18). <https://doi.org/10.3390/ijms221810068>
  64. Feiten, M. C., Di Luccio, M., Santos, K. F., de Oliveira, D., & Oliveira, J. V. (2017). X-Ray Crystallography as a Tool to Determine Three-Dimensional Structures of Commercial Enzymes Subjected to Treatment in Pressurized Fluids. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *182*(2), 429–451. <https://doi.org/10.1007/s12010-016-2336-9>
  65. Fett, J. W., Olson, K. A., & Rybak, S. M. (1994). A Monoclonal Antibody to Human Angiogenin. Inhibition of Ribonucleolytic and Angiogenic Activities and Localization of the Antigenic Epitope. *Biochemistry*, *33*(18), 5421–5427. <https://doi.org/10.1021/bi00184a010>
  66. Fett, J. W., Strydom, D. J., Lobb, R. R., Alderman, E. M., Bethune, J. L., Riordan, J. F., & Vallee, B. L. (1985). Isolation and Characterization of Angiogenin, an Angiogenic Protein from Human Carcinoma Cells.



- Biochemistry, 24(20), 5480–5486. <https://doi.org/10.1021/bi00341a030>
67. Freyer, M. W., & Lewis, E. A. (2008). Isothermal Titration Calorimetry: Experimental Design, Data Analysis, and Probing Macromolecule/Ligand Binding and Kinetic Interactions. *Methods in Cell Biology*, 84(07), 79–113. [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(07\)84004-0](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(07)84004-0)
68. Fu, H., Feng, J., Liu, Q., Sun, F., Tie, Y., Zhu, J., Xing, R., Sun, Z., & Zheng, X. (2009). Stress induces tRNA cleavage by angiogenin in mammalian cells. *FEBS Letters*, 583(2), 437–442. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.12.043>
69. Gao, X., & Xu, Z. (2008). Mechanisms of action of angiogenin. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 40(7), 619–624. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7270.2008.00442.x>
70. Garg, P., & Burgers, P. M. J. (2005). DNA polymerases that propagate the eukaryotic DNA replication fork. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 40(2), 115–128. <https://doi.org/10.1080/10409230590935433>
71. Garzon, J. I., López-Blanco, J. R., Pons, C., Kovacs, J., Abagyan, R., Fernandez-Recio, J., & Chacon, P. (2009). FRODOCK: A new approach for fast rotational protein-protein docking. *Bioinformatics*, 25(19), 2544–2551. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp447>
72. Ghossein, Y. S., & Chae, C. B. (1997). Anti-angiogenin activity of the peptides complementary to the receptor-binding site of angiogenin. *Journal of Biological Chemistry*, 272(39), 24294–24299. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.39.24294>
73. Gomes, X. V., & Burgers, P. M. J. (2001). ATP utilization by yeast replication factor C: I. ATP-mediated interaction with DNA and with proliferating cell nuclear antigen. *Journal of Biological Chemistry*, 276(37), 34768–34775. <https://doi.org/10.1074/jbc.M011631200>
74. González-Magaña, A., & Blanco, F. J. (2020). Human PCNA structure, function and interactions. *Biomolecules*, 10(4), 1–19. <https://doi.org/10.3390/biom10040570>
75. Gottifredi, V., & Gastón, S. (2010). NIH Public Access. *DNA Repair*, 9, 358–364. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2009.12.003.PCNA-coupled>
76. Gray, J. J. (2006). High-resolution protein-protein docking. *Current Opinion in Structural Biology*, 16(2), 183–193. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2006.03.003>
77. Greenlee-Wacker, M., Mallery, C., Rigby, K. M., Kobayashi, S. D., Porter, A. R., DeLeo, F. R., & Nauseef, W. M. (2014). Phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by human neutrophils prevents macrophage efferocytosis and induces programmed necrosis. *NIH Public Access*, 192(10), 4709–4717. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1302692.Phagocytosis>



78. Greenway, M. J., Alexander, M. D., Ennis, S., Traynor, B. J., Corr, B., Frost, E., Green, A., & Hardiman, O. (2004). A novel candidate region for ALS on chromosome 14q11.2. *Neurology*, 63(10), 1936–1938. <https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000144344.39103.F6>
79. Gulbis, J. M., Kelman, Z., Hurwitz, J., O'Donnell, M., & Kuriyan, J. (1996). Structure of the C-terminal region of p21(WAF1/CIP1) complexed with human PCNA. *Cell*, 87(2), 297–306. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81347-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81347-1)
80. Halperin, I., Ma, B., Wolfson, H., & Nussinov, R. (2002). Principles of docking: An overview of search algorithms and a guide to scoring functions. *Proteins: Structure, Function and Genetics*, 47(4), 409–443. <https://doi.org/10.1002/prot.10115>
81. Hawkes, C. M., & Janata, J. (1973). Isothermal Titration Calorimeter. *Analytical Letters*, 6(2), 163–169. <https://doi.org/10.1080/00032717308062192>
82. Healthcare, G. E. (2018). Size Exclusion Chromatography: Principles and Methods. *GE Healthcare*, 1–122. <https://cdn.gelifesciences.com/dmm3bwsv3/AssetStream.aspx?mediaformatid=10061&destinationid=10016&assetid=11639>
83. Healthcare, G. E., & Sciences, L. (1994). High-throughput Process Development with PreDictor Plates Handbooks from GE Healthcare GST Gene Fusion System. *J. Mol. Biol*, 238(2), 815–832.
84. Hernandez-Santoyo, A., Yair, A., Altuzar, V., Vivanco-Cid, H., & Mendoza-Barrer, C. (2013). Protein-Protein and Protein-Ligand Docking. In *Protein Engineering - Technology and Application*. InTech. <https://doi.org/10.5772/56376>
85. Hildebrand, P. W., Rose, A. S., & Tiemann, J. K. S. (2019). Bringing Molecular Dynamics Simulation Data into View. *Trends in Biochemical Sciences*, 44(11), 902–913. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2019.06.004>
86. Hishiki, A., Hashimoto, H., Hanafusa, T., Kamei, K., Ohashi, E., Shimizu, T., Ohmori, H., & Sato, M. (2009). Structural basis for novel interactions between human translesion synthesis polymerases and proliferating cell nuclear antigen. *Journal of Biological Chemistry*, 284(16), 10552–10560. <https://doi.org/10.1074/jbc.M809745200>
87. Hoang, T. T., & Raines, R. T. (2017). Molecular basis for the autonomous promotion of cell proliferation by angiogenin. *Nucleic Acids Research*, 45(2), 818–831. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1192>
88. Hoege, C., Pfander, B., Moldovan, G. L., Pyrowolakis, G., & Jentsch, S. (2002). RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature*, 419(6903), 135–141. <https://doi.org/10.1038/nature00991>

89. Holloway, D. E., Hares, M. C., Shapiro, R., Subramanian, V. & Acharya, K. R. High-level expression of three members of the murine angiogenin family in *Escherichia coli* and purification of the recombinant proteins. *Protein Expr. Purif.* **22**, 307–317 (2001).
90. Hooper, L. V., Stappenbeck, T. S., Hong, C. V., & Gordon, J. I. (2003). Angiogenins: A new class of microbicidal proteins involved in innate immunity. *Nature Immunology*, **4**(3), 269–273. <https://doi.org/10.1038/ni888>
91. Hooper, L. V., Stappenbeck, T. S., Hong, C. V., & Gordon, J. I. (2003). Angiogenins: A new class of microbicidal proteins involved in innate immunity. *Nature Immunology*, **4**(3), 269–273. <https://doi.org/10.1038/ni888>
92. Horsfall, A. J., Vandborg, B. A., Kowalczyk, W., Chav, T., Scanlon, D. B., Abell, A. D., & Bruning, J. B. (2021). Unlocking the PIP-box: A peptide library reveals interactions that drive high-affinity binding to human PCNA. *Journal of Biological Chemistry*, **296**, 100773. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100773>
93. Hospital, T. G., Defense, N., Hospital, R. I., & Island, R. (2005). Calcium-binding proteins annexin A2 and S100A6 are sensors of tubular injury and recovery in acute renal failure. *Journal of Biological Chemistry*, **280**, 2694–2703. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2005.00740.x>
94. Hp, H. H. (2012). HiTrap affinity columns. *Manual*, 1–16.
95. 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. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.17.9791>
96. 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. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.17.9791>
97. Hu, G. F., Riordan, J. F., & Vallee, B. L. (1994). Angiogenin promotes invasiveness of cultured endothelial cells by stimulation of cell-associated proteolytic activities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **91**(25), 12096–12100. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.25.12096>
98. 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. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.6.2204>
99. Hu, G. F., Xu, C. J., & Riordan, J. F. (2000). Human angiogenin is rapidly translocated to the nucleus of human umbilical vein endothelial cells and binds to DNA. *Journal of Cellular Biochemistry*, **76**(3), 452–462. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4644\(20000301\)76:3<452::AID-](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4644(20000301)76:3<452::AID-)

100. Humphrey, W., Dalke, A., & Schulten, K. (1996). VMD: Visual molecular dynamics. *Journal of Molecular Graphics*, 14(1), 33–38. [https://doi.org/10.1016/0263-7855\(96\)00018-5](https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5)
101. Ilari, A., & Savino, C. (2008). Protein structure determination by X-ray crystallography. *Methods in Molecular Biology*, 452, 63–87. [https://doi.org/10.1007/978-1-60327-159-2\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-60327-159-2_3)
102. Iłzicka, J. (2008). Cerebrospinal fluid angiogenin level in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Clinica Croatica*, 47(2), 77–79. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18949901>
103. Ivanov, P., Emara, M. M., Villen, J., Gygi, S. P., & Anderson, P. (2011). Angiogenin-Induced tRNA Fragments Inhibit Translation Initiation. *Molecular Cell*, 43(4), 613–623. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.06.022>
104. Jenkins, J. L., & Shapiro, R. (2003). Identification of small-molecule inhibitors of human angiogenin and characterization of their binding interactions guided by computational docking. *Biochemistry*, 42(22), 6674–6687. <https://doi.org/10.1021/bi034164e>
105. Joo Yeo, K., Hwang, E., Min, K. M., Jee, J. G., Lee, C. K., Hwang, K. Y., Jeon, Y. H., Chang, S. I., & Cheong, H. K. (2014). The dual binding site of angiogenin and its inhibition mechanism: The crystal structure of the rat angiogenin-heparin complex. *Chemical Communications*, 50(85), 12966–12969. <https://doi.org/10.1039/c4cc05175k>
106. Kao, R. Y. T., Jenkins, J. L., Olson, K. A., Key, M. E., Fett, J. W., & Shapiro, R. (2002). A small-molecule inhibitor of the ribonucleolytic activity of human angiogenin that possesses antitumor activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(15), 10066–10071. <https://doi.org/10.1073/pnas.152342999>
107. Kar, J. R., & Singhal, R. S. (2015). Investigations on ideal mode of cell disruption in extremely halophilic *Actinopolyspora halophila* (MTCC 263) for efficient release of glycine betaine and trehalose. *Biotechnology Reports*, 5(1), 89–97. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2014.12.005>
108. Kelman, Z. (1997). PCNA: structure, functions and interactions.
109. Kieran, D., Sebastia, J., Greenway, M. J., King, M. A., Connaughton, D., Concannon, C. G., Fenner, B., Hardiman, O., & Prehn, J. H. M. (2008). Control of motoneuron survival by angiogenin. *Journal of Neuroscience*, 28(52), 14056–14061. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3399-08.2008>
110. Kieran, D., Sebastia, J., Greenway, M. J., King, M. A., Connaughton, D., Concannon, C. G., Fenner, B., Hardiman, O., & Prehn, J. H. M. (2008). Control of motoneuron survival by angiogenin. *Journal of Neuroscience*, 28(52), 14056–14061. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3399-08.2008>

111. King, T., & Vallee, B. (1991). Neovascularisation of the meniscus with angiogenin. An experimental study in rabbits. *The Journal of Bone and Joint Surgery. British Volume*, 73-B(4), 587–590. <https://doi.org/10.1302/0301-620X.73B4.1712788>
112. 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. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208223>
113. Kishimoto, K., Yoshida, S., Ibaragi, S., Yoshioka, N., Hu, G. F., & Sasaki, A. (2014). Neamine inhibits oral cancer progression by suppressing angiogenin-mediated angiogenesis and cancer cell proliferation. *Anticancer Research*, 34(5), 2113–2122.
114. Kishimoto, K., Yoshida, S., Ibaragi, S., Yoshioka, N., Okui, T., Hu, G. F., & Sasaki, A. (2012). Hypoxia-induced up-regulation of angiogenin, besides VEGF, is related to progression of oral cancer. *Oral Oncology*, 48(11), 1120–1127. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2012.05.009>
115. Koutroubakis, I. E., Xidakis, C., Karmiris, K., Sfiridaki, A., Kandidaki, E., & Kouroumalis, E. A. (2004). Serum angiogenin in inflammatory bowel disease. *Digestive Diseases and Sciences*, 49(11–12), 1758–1762. <https://doi.org/10.1007/s10620-004-9565-4>
116. Krishna, T. S. R., Kong, X. P., Gary, S., Burgers, P. M., & Kuriyan, J. (1994). Crystal structure of the eukaryotic DNA polymerase processivity factor PCNA. *Cell*, 79(7), 1233–1243. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90014-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90014-0)
117. Kumar, K., Jenkins, J. L., Jardine, A. M., & Shapiro, R. (2003). Inhibition of mammalian ribonucleases by endogenous adenosine dinucleotides. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 300(1), 81–86. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(02\)02800-0](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(02)02800-0)
118. Kurien, B. T., & Hal Scofield, R. (2015). Western blotting: Methods and protocols. *Western Blotting: Methods and Protocols*, 3, 1–509. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2694-7>
119. Lai, K., Luo, C., Zhang, X., Ye, P., Zhang, Y., He, J., & Yao, K. (2016). Regulation of angiogenin expression and epithelial-mesenchymal transition by HIF-1 $\alpha$  signaling in hypoxic retinal pigment epithelial cells. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1862(9), 1594–1607. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.05.023>
120. Lapid, C., & Gao, Y. (2003). *PrimerX*. <https://www.bioinformatics.org/primerx/index.htm>
121. Leavitt, S., & Freire, E. (2001). Direct measurement of protein binding energetics by isothermal titration calorimetry. *Current Opinion in Structural Biology*, 11(5), 560–566. [https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(00\)00248-7](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(00)00248-7)

122. Lee, F. S., Shapiro, R., & Vallee, B. L. (1989). Tight-binding inhibition of angiogenin and ribonuclease A by placental ribonuclease inhibitor. *Biochemistry*, 28(1), 225–230. <https://doi.org/10.1021/bi00427a031>
123. Lee, H. S., Lee, I. S., Kang, T. C., Jeong, G. B., & Chang, S. I. (1999). Angiogenin is involved in morphological changes and angiogenesis in the ovary. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 257(1), 182–186. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.0359>
124. Lee, S. H., Kim, K. W., Joo, K., & Kim, J. C. (2016). Angiogenin ameliorates corneal opacity and neovascularization via regulating immune response in corneal fibroblasts. *BMC Ophthalmology*, 16(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12886-016-0235-z>
125. Lee, S. H., Kim, K. W., Min, K. M., Kim, K. W., Chang, S. I., & Kim, J. C. (2014). Angiogenin reduces immune inflammation via inhibition of tank-binding kinase 1 expression in human corneal fibroblast cells. *Mediators of Inflammation*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/861435>
126. 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. <https://doi.org/10.1021/bi0117899>
127. Leonidas, D. D., Shapiro, R., Allen, S. C., Subbarao, G. V., Veluraja, K., & Acharya, K. R. (1999). Refined crystal structures of native human angiogenin and two active site variants: Implications for the unique functional properties of an enzyme involved in neovascularisation during tumour growth. *Journal of Molecular Biology*, 285(3), 1209–1233. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1998.2378>
128. Leonidas, D. D., Shapiro, R., Subbarao, G. V., Russo, A., & Acharya, K. R. (2002). Crystallographic studies on the role of the C-terminal segment of human angiogenin in defining enzymatic potency. *Biochemistry*, 41(8), 2552–2562. <https://doi.org/10.1021/bi015768q>
129. Li, J., Valero, F., Yanagawa, H., Hiraishi, T., Taguchi, S., Mendoza-barrera, C., Tukiainen, H., Siljander, P., & Rauvala, H. (n.d.). *PROTEIN ENGINEERING - TECHNOLOGY AND Edited by Tomohisa Ogawa*.
130. Li, L., Pan, X. Y., Shu, J., Jiang, R., Zhou, Y. J., & Chen, J. X. (2014). Ribonuclease inhibitor up-regulation inhibits the growth and induces apoptosis in murine melanoma cells through repression of angiogenin and ILK/PI3K/AKT signaling pathway. *Biochimie*, 103(1), 89–100. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2014.04.007>
131. 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.
132. Li, S., & Hu, G.-F. (2012). Emerging role of angiogenin in stress response and cell survival under adverse conditions. *Journal of Cellular Physiology*, 187

- 227(7), 2822–2826. <https://doi.org/10.1002/jcp.23051>
133. Lin, K., & Wu, G. (2019). Isothermal Titration Calorimetry Assays to Measure Binding Affinities In Vitro. In *The Scattered Pearls* (Vol. 1893, pp. 257–272). Gorgias Press. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8910-2\\_19](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8910-2_19)
  134. Logisz, C. C., & Hovis, J. S. (2005). Effect of salt concentration on membrane lysis pressure. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1717(2), 104–108. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2005.10.002>
  135. Maga, G., & Hübscher, U. (2003). Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): A dancer with many partners. *Journal of Cell Science*, 116(15), 3051–3060. <https://doi.org/10.1242/jcs.00653>
  136. Mailand, N., Gibbs-Seymour, I., & Bekker-Jensen, S. (2013). Regulation of PCNA-protein interactions for genome stability. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 14, Issue 5, pp. 269–282). <https://doi.org/10.1038/nrm3562>
  137. Maiti, T. K., De, S., Dasgupta, S., & Pathak, T. (2006). 3'-N-Alkylamino-3'-deoxy-ara-uridines: A new class of potential inhibitors of ribonuclease A and angiogenin. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 14(4), 1221–1228. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2005.09.049>
  138. Majka, Jerzy (2004). The PCNA–RFC Families of DNA Clamps and Clamp Loaders. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* (Vol 78 pp. 227–260). [https://doi:10.1016/s0079-6603\(04\)78006-x](https://doi:10.1016/s0079-6603(04)78006-x)
  139. Mansilla, S. F., de la Vega, M. B., Calzetta, N. L., Siri, S. O., & Gottifredi, V. (2020). Cdk-independent and pcna-dependent functions of p21 in dna replication. *Genes*, 11(6), 1–17. <https://doi.org/10.3390/genes11060593>
  140. Marzo, T., Ferraro, G., Cucci, L. M., Pratesi, A., Hansson, Ö., Satriano, C., Merlino, A., & La Mendola, D. (2022). Oxaliplatin inhibits angiogenin proliferative and cell migration effects in prostate cancer cells. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 226, 111657. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2021.111657>
  141. Maveyraud, L., & Mourey, L. (2020). Protein X-ray crystallography and drug discovery. *Molecules*, 25(5). <https://doi.org/10.3390/molecules25051030>
  142. McPherson, A. (2007). Chapter 2 - Protein Crystallization. In *Methods Molecular Biology* (Vol. 1607). <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7000-1>
  143. McPherson, A., & Gavra, J. A. (2014). Introduction to protein crystallization. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications*, 70(1), 2–20. <https://doi.org/10.1107/S2053230X13033141>
  144. Meller, J. (2001). Molecular Dynamics. In *eLS* (Vol. 278, Issue 5704, pp. 585–586). Wiley. <https://doi.org/10.1038/npg.els.0003048>
  145. Moldovan, G. L., Pfander, B., & Jentsch, S. (2007). PCNA, the Maestro of the Replication Fork. In *Cell* (Vol. 129, Issue 4, pp. 665–679). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.003>



146. Monti, D. M., Yu, W., Pizzo, E., Shima, K., Hu, M. G., Di Malta, C., Piccoli, R., D'Alessio, G., & Hu, G.-F. (2009). Characterization of the angiogenic activity of zebrafish ribonucleases. *FEBS Journal*, 276(15), 4077–4090. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07115.x>
147. Moroianu, J., & Riordan, J. F. (1994). Identification of the Nucleolar Targeting Signal of Human Angiogenin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 203(3), 1765–1772. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1994.2391>
148. 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. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.5.1677>
149. Müller, R., Misund, K., Holien, T., Bachke, S., Gilljam, K. M., Våtsveen, T. K., Rø, T. B., Bellacchio, E., Sundan, A., & Otterlei, M. (2013). Targeting Proliferating Cell Nuclear Antigen and Its Protein Interactions Induces Apoptosis in Multiple Myeloma Cells. *PLoS ONE*, 8(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070430>
150. Murshudov, G. N., Vagin, A. A., & Dodson, E. J. (1997). Refinement of Macromolecular Structures by the Maximum-Likelihood Method. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 53(3), 240–255. <https://doi.org/10.1107/S09074444996012255>
151. Mutagenesis, S. (2008). *KAPA HiFi DNA Polymerase Site-directed Mutagenesis*. 1–5. [http://www.google.co.uk/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&ved=OCCwQFjAB&url=http%3A%2F%2Fwww.kapabiosystems.com%2Fpublic%2Fpdfs%2Fkapa-hifi-pcr-kits%2FKAPA\\_HiFi\\_Site\\_Directed\\_Mutagenesis\\_Note.pdf&ei=HsyHUMe2CuijOQWgqICYBQ&usg=AFQjCNEs33CW8GsdvdpawZ](http://www.google.co.uk/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&ved=OCCwQFjAB&url=http%3A%2F%2Fwww.kapabiosystems.com%2Fpublic%2Fpdfs%2Fkapa-hifi-pcr-kits%2FKAPA_HiFi_Site_Directed_Mutagenesis_Note.pdf&ei=HsyHUMe2CuijOQWgqICYBQ&usg=AFQjCNEs33CW8GsdvdpawZ)
152. *NAMD TUTORIAL* (Issue December). (2010).
153. Naryzhny, S. N., & Lee, H. (2010). Proliferating cell nuclear antigen in the cytoplasm interacts with components of glycolysis and cancer. *FEBS Letters*, 584(20), 4292–4298. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.09.021>
154. Ohayon, D., De Chiara, A., Chapuis, N., Candalh, C., Mocek, J., Ribeil, J. A., Haddaoui, L., Ifrah, N., Hermine, O., Bouillaud, F., Frchet, P., Bouscary, D., & Witko-Sarsat, V. (2016). Cytoplasmic proliferating cell nuclear antigen connects glycolysis and cell survival in acute myeloid leukemia. *Scientific Reports*, 6(May), 1–15. <https://doi.org/10.1038/srep35561>
155. Olson, K. A., Fett, J. W., French, T. C., Key, M. E., & Vallee, B. L. (1995). Angiogenin antagonists prevent tumor growth in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(2), 442–446. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.2.442>

156. Panda, A., Karhadkar, S., Acharya, B., Banerjee, A., De, S., & Dasgupta, S. (2021). Enhancement of angiogenin inhibition by polyphenol-capped gold nanoparticles. *Biopolymers*, 112(7). <https://doi.org/10.1002/bip.23429>
157. 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. *EMBO Journal*, 16(17), 5162–5177. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.17.5162>
158. Paunesku, T., Mittal, S., Protić, M., Oryhon, J., Korolev, S. V., Joachimiak, A., & Woloschak, G. E. (2001). Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): Ringmaster of the genome. *International Journal of Radiation Biology*, 77(10), 1007–1021. <https://doi.org/10.1080/09553000110069335>
159. Peng, Y., Li, L., Huang, M., Duan, C., Zhang, L., & Chen, J. (2014). Angiogenin interacts with ribonuclease inhibitor regulating PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in bladder cancer cells. *Cellular Signalling*, 26(12), 2782–2792. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2014.08.021>
160. Phillips, J. C., Braun, R., Wang, W., Gumbart, J., Tajkhorshid, E., Villa, E., Chipot, C., Skeel, R. D., Kalé, L., & Schulten, K. (2005). Scalable molecular dynamics with NAMD. *Journal of Computational Chemistry*, 26(16), 1781–1802. <https://doi.org/10.1002/jcc.20289>
161. Piccoli, R., Olson, K. A., Vallee, B. L., & Fett, J. W. (1998). Chimeric anti-angiogenin antibody cAb 26-2F inhibits the formation of human breast cancer xenografts in athymic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(8), 4579–4583. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.8.4579>
162. Pierce, M. M., Raman, C. S., & Nall, B. T. (1999). <Isothermal Titration Calorimetry of Protein-D-Protein.pdf>. *Methods*, 19(1999), 213–221. <http://www.idealibrary.comon>
163. Pizzo, E., Sarcinelli, C., Sheng, J., Fusco, S., Formiggini, F., Netti, P., Yu, W., D'Alessio, G., & Hu, G. (2013). Ribonuclease/angiogenin inhibitor 1 regulates stress-induced subcellular localization of angiogenin and controls its growth and survival activities. *Journal of Cell Science*, November. <https://doi.org/10.1242/jcs.134551>
164. Potterton, E., McNicholas, S., Krissinel, E., Cowtan, K., & Noble, M. (2002). The CCP 4 molecular-graphics project. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 58(11), 1955–1957. <https://doi.org/10.1107/S0907444902015391>
165. Prehn, J. H. M., & Jirström, E. (2020). Angiogenin and tRNA fragments in Parkinson's disease and neurodegeneration. *Acta Pharmacologica Sinica*, 41(4), 442–446. <https://doi.org/10.1038/s41401-020-0375-9>
166. Prives, C., & Gottifredi, V. (2008). The p21 and PCNA partnership: A new twist for an old plot. *Cell Cycle*, 7(24), 3840–3846.



- <https://doi.org/10.4161/cc.7.24.7243>
167. Prozeller, D., Morsbach, S., & Landfester, K. (2019). Isothermal titration calorimetry as a complementary method for investigating nanoparticle-protein interactions. *Nanoscale*, 11(41), 19265–19273. <https://doi.org/10.1039/c9nr05790k>
  168. Pyatibratov, M. G., Tolkatchev, D., Plamondon, J., Xu, P., Ni, F., & Kostyukova, A. S. (2010). Binding of human angiogenin inhibits actin polymerization. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 495(1), 74–81. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2009.12.024>
  169. Quignot, C., Postic, G., Bret, H., Rey, J., Granger, P., Murail, S., Chacón, P., Andreani, J., Tufféry, P., & Guerois, R. (2021). InterEvDock3: A combined template-based and free docking server with increased performance through explicit modeling of complex homologs and integration of covariation-based contact maps. *Nucleic Acids Research*, 49(W1), W277–W284. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab358>
  170. Raines, R. T. (1998). Rinonuclease A. *Chemical Reviews*, 98(96), 1045–1065. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0021951764901733%0Ahttp://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja00073a079%0Ahttp://xlink.rsc.org/?DOI=C4CS00395K%0Ahttp://xlink.rsc.org/?DOI=C3CS60096C%0Ahttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24765641%0Ahttp://pubs.acs.org/doi>
  171. Rajashekhar, G., Loganath, A., Roy, A. C., Chong, S. S., & Wong, Y. C. (2005). Extracellular matrix-dependent regulation of angiogenin expression in human placenta. *Journal of Cellular Biochemistry*, 96(1), 36–46. <https://doi.org/10.1002/jcb.20507>
  172. Rhodes, G. (1993). Crystallography made crystal clear: a guide for users of macromolecular models. *Londres: Academic Press*.
  173. Riordan, J. F. (2001). Angiogenin. *Methods in Enzymology*, 341, 263–273. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(01\)41157-8](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(01)41157-8)
  174. Ritchie, D. (2008). Recent Progress and Future Directions in Protein-Protein Docking. *Current Protein & Peptide Science*, 9(1), 1–15. <https://doi.org/10.2174/138920308783565741>
  175. Rosenberg, H. F. (2008). RNase A ribonucleases and host defense: an evolving story. *Journal of Leukocyte Biology*, 83(5), 1079–1087. <https://doi.org/10.1189/jlb.1107725>
  176. Rosental, B., Brusilovsky, M., Hadad, U., Oz, D., Appel, M. Y., Afergan, F., Yossef, R., Rosenberg, Lior Ann Aharoni, A., Cerwenka, A., Campbell, K. S., Braiman, A., & Porgador, A. (2011). Proliferating Cell Nuclear Antigen is a novel inhibitory ligand for the natural cytotoxicity receptor NKp44. *Journal of Addictions Nursing*, 187(11), 5693–5702. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102267>
  177. 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), 804–808. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.2.804>
178. 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. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.8.3243>
179. Russo, N., Shapiro, R., Acharya, K. R., Riordan, J. F., & Vallee, B. L. (1994). Role of glutamine-117 in the ribonucleolytic activity of human angiogenin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(8), 2920–2924. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.8.2920>
180. Rutkoski, T. J., & Raines, R. T. (2008). Evasion of Ribonuclease Inhibitor as a Determinant of Ribonuclease Cytotoxicity. *Curr Pharm Biotechnol*, 9(3), 185–189. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>
181. 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. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.648>
182. Saikia, M., Krokowski, D., Guan, B. J., Ivanov, P., Parisien, M., Hu, G. F., Anderson, P., Pan, T., & Hatzoglou, M. (2012). Genome-wide identification and quantitative analysis of cleaved tRNA fragments induced by cellular stress. *Journal of Biological Chemistry*, 287(51), 42708–42725. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.371799>
183. Sakurai, S., Kitano, K., Yamaguchi, H., Hamada, K., Okada, K., Fukuda, K., Uchida, M., Ohtsuka, E., Morioka, H., & Hakoshima, T. (2005). Structural basis for recruitment of human flap endonuclease 1 to PCNA. *EMBO Journal*, 24(4), 683–693. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600519>
184. Sarangdhar, M. A., & Allam, R. (2021). Angiogenin (Ang)—ribonuclease inhibitor (rnh1) system in protein synthesis and disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(3), 1–11. <https://doi.org/10.3390/ijms22031287>
185. Saridakis, E., & Chayen, N. E. (2003). Systematic Improvement of Protein Crystals by Determining the Supersolubility Curves of Phase Diagrams. *Biophysical Journal*, 84(2), 1218–1222. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(03\)74936-4](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(03)74936-4)
186. Sayle, R. (1995). RASMOL: biomolecular graphics for all. *Trends in Biochemical Sciences*, 20(9), 374–376. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(00\)89080-5](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(00)89080-5)
187. Schmitt, J., Hess, H., & Stunnenberg, H. G. (1993). Affinity purification of

- histidine-tagged proteins. *Molecular Biology Reports*, 18(3), 223–230. <https://doi.org/10.1007/BF01674434>
188. Schneidman-Duhovny, D., Inbar, Y., Nussinov, R., & Wolfson, H. J. (2005). PatchDock and SymmDock: Servers for rigid and symmetric docking. *Nucleic Acids Research*, 33(SUPPL. 2). <https://doi.org/10.1093/nar/gki481>
189. Scott A. Hollingsworth, & Ron O. Dror. (2018). Molecular dynamics simulation for all. *Neuron*, 99(6)(1), 1129–1143. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.08.011.Molecular>
190. Sebesta, M., Burkovics, P., Juhasz, S., Zhang, S., Szabo, J. E., Lee, M. Y. W. T., Haracska, L., & Krejci, L. (2013). Role of PCNA and TLS polymerases in D-loop extension during homologous recombination in humans. *DNA Repair*, 12(9), 691–698. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2013.05.001>
191. Selitsky, S. R., Baran-Gale, J., Honda, M., Yamane, D., Masaki, T., Fannin, E. E., Guerra, B., Shirasaki, T., Shimakami, T., Kaneko, S., Lanford, R. E., Lemon, S. M., & Sethupathy, P. (2015). Small tRNA-derived RNAs are increased and more abundant than microRNAs in chronic hepatitis B and C. *Scientific Reports*, 5, 1–7. <https://doi.org/10.1038/srep07675>
192. Shapiro, R. (1998). Structural features that determine the enzymatic potency and specificity of human angiogenin: Threonine-80 and residues 58-70 and 116-123. *Biochemistry*, 37(19), 6847–6856. <https://doi.org/10.1021/bi9800146>
193. Shapiro, R., & Vallee, B. L. (1987). Human placental ribonuclease inhibitor abolishes both angiogenic and ribonucleolytic activities of angiogenin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(8), 2238–2241. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.8.2238>
194. Shapiro, R., & Vallee, B. L. (1989). Site-Directed Mutagenesis of Histidine-13 and Histidine-114 of Human Angiogenin. Alanine Derivatives Inhibit Angiogenin-Induced Angiogenesis. *Biochemistry*, 28(18), 7401–7408. <https://doi.org/10.1021/bi00444a038>
195. Shapiro, R., & Vallee, B. L. (1992). Identification of Functional Arginines in Human Angiogenin By Site-Directed Mutagenesis. *Biochemistry*, 31(49), 12477–12485. <https://doi.org/10.1021/bi00164a026>
196. Shapiro, R., Riordan, J. F., & Vallee, B. L. (1986). Characteristic Ribonucleolytic Activity of Human Angiogenin. *Biochemistry*, 25(12), 3527–3532. <https://doi.org/10.1021/bi00360a008>
197. Shapiro, R., Strydom, D. J., Olson, K. A., & Vallee, B. L. (1987). Isolation of Angiogenin from Normal Human Plasma. *Biochemistry*, 26(16), 5141–5146. <https://doi.org/10.1021/bi00390a037>
198. Shapiro, R.; Wade Harper, J.; Fox, EA.; Jansen, H.W.; Friedrich, H.; Uhlmann, E. . (1988). Expression of Met- ( - 1 ) Angiogenin in Escherichia Conversion to the Authentic < Glu-1 Protein ' co / i : Construction of Human Angiogenin

- Expression Plasmids. *Analytical Biochemistry*, 175, 450–461.
199. Sheng, J., & Xu, Z. (2016). Three decades of research on angiogenin: A review and perspective. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 48(5), 399–410. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmv131>
  200. Shibata, A., Ibaragi, S., Mandai, H., Tsumura, T., Kishimoto, K., Okui, T., Hassan, N. M. M., Shimo, T., Omori, K., Hu, G. F., Takashiba, S., Suga, S., & Sasaki, A. (2016). Synthetic terrein inhibits progression of head and neck cancer by suppressing angiogenin production. *Anticancer Research*, 36(5), 2161–2168.
  201. Shimoyama, S., Gansauge, F., Gansauge, S., Negri, G., Oohara, T., & Beger, H. G. (1996). Increased angiogenin expression in pancreatic cancer is related to cancer aggressiveness. *Cancer Research*, 56(12), 2703–2706. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8665497>
  202. Shu, J., Huang, M., Tian, Q., Shui, Q., Zhou, Y., & Chen, J. (2015). Downregulation of angiogenin inhibits the growth and induces apoptosis in human bladder cancer cells through regulating AKT/mTOR signaling pathway. *Journal of Molecular Histology*, 46(2), 157–171. <https://doi.org/10.1007/s10735-014-9608-x>
  203. Sievers, K., & Ficner, R. (2022). Structure of angiogenin dimer bound to double-stranded RNA. *Acta Crystallographica Section F Structural Biology Communications*, 78(9), 330–337. <https://doi.org/10.1107/s2053230x22008317>
  204. Simons, M., & Horowitz, A. (2001). Syndecan-4-mediated signalling. 13, 855–862.
  205. Singh, S. M., & Panda, A. K. (2005). Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 99(4), 303–310. <https://doi.org/10.1263/jbb.99.303>
  206. Size Exclusion Chromatography: Principles and Methods. (2018). *GE Healthcare*, 1–122. <https://cdn.gelifesciences.com/dmm3bwsv3/AssetStream.aspx?mediafor matid=10061&destinationid=10016&assetid=11639>
  207. Skog, J., Würdinger, T., van Rijn, S., Meijer, D. H., Gainche, L., Curry, W. T., Carter, B. S., Krichevsky, A. M., & Breakefield, X. O. (2008). Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nature Cell Biology*, 10(12), 1470–1476. <https://doi.org/10.1038/ncb1800>
  208. Skorupa, A., King, M. A., Aparicio, I. M., Dussmann, H., Coughlan, K., Breen, B., Kieran, D., Concannon, C. G., Marin, P., & Prehn, J. H. M. (2012). Motoneurons secrete angiogenin to induce RNA cleavage in astroglia. *Journal of Neuroscience*, 32(15), 5024–5038. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6366-11.2012>

209. Slade, D. (2018). Maneuvers on PCNA rings during DNA replication and repair. *Genes*, 9(8). <https://doi.org/10.3390/genes9080416>
210. Soncin, F. (1992). Angiogenin supports endothelial and fibroblast cell adhesion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(6), 2232–2236. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.6.2232>
211. Sorrentino, S. (2010). The eight human “canonical” ribonucleases: Molecular diversity, catalytic properties, and special biological actions of the enzyme proteins. *FEBS Letters*, 584(11), 2194–2200. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.04.018>
212. Sorrentino, S., Glitz, D. G., Hamann, K. J., Loegering, D. A., Checkel, J. L., & Gleich, G. J. (1992). Eosinophil-derived neurotoxin and human liver ribonuclease. Identity of structure and linkage of neurotoxicity to nuclease activity. *Journal of Biological Chemistry*, 267(21), 14859–14865. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)42119-9](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)42119-9)
213. Spong, C. Y., Ghidini, A., Sherer, D. M., Pezzullo, J. C., Ossandon, M., & Eglinton, G. S. (1997). Angiogenin: A marker for preterm delivery in midtrimester amniotic fluid. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 176(2), 415–418. [https://doi.org/10.1016/S0002-9378\(97\)70508-8](https://doi.org/10.1016/S0002-9378(97)70508-8)
214. Steidinger, T. U., Standaert, D. G., & Yacoubian, T. A. (2011). A neuroprotective role for angiogenin in models of Parkinson’s disease. *Journal of Neurochemistry*, 116(3), 334–341. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.07112.x>
215. Stoimenov, I., & Helleday, T. (2009). PCNA on the crossroad of cancer. *Biochemical Society Transactions*, 37(3), 605–613. <https://doi.org/10.1042/BST0370605>
216. Strzalka, W., & Ziemienowicz, A. (2011). Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): A key factor in DNA replication and cell cycle regulation. *Annals of Botany*, 107(7), 1127–1140. <https://doi.org/10.1093/aob/mcq243>
217. Studier, F. W., & Moffatt, B. A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of Molecular Biology*, 189(1), 113–130. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(86\)90385-2](https://doi.org/10.1016/0022-2836(86)90385-2)
218. TAInstruments. (2010). TA Instruments NanoAnalyze. *Nano*, September, 1–50.
219. Tang, D., Liu, X., Chen, K., Li, Z., Dai, Y., Xu, J., Zhang, H. T., Gao, X., & Liu, L. (2020). Cytoplasmic PCNA is located in the actin belt and involved in osteoclast differentiation. *Aging*, 12(13), 13297–13317. <https://doi.org/10.18632/aging.103434>
220. Tello-Montoliu, A., Patel, J. V., & Lip, G. Y. H. (2006). Angiogenin: A review

- of the pathophysiology and potential clinical applications. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 4(9), 1864–1874. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2006.01995.x>
221. Thakar, T., Leung, W., Nicolae, C. M., Clements, K. E., Shen, B., Bielinsky, A. K., & Moldovan, G. L. (2020). Ubiquitinated-PCNA protects replication forks from DNA2-mediated degradation by regulating Okazaki fragment maturation and chromatin assembly. *Nature Communications*, 11(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16096-w>
  222. Thiyagarajan, N., Ferguson, R., Subramanian, V., & Acharya, K. R. (2012). Structural and molecular insights into the mechanism of action of human angiogenin-ALS variants in neurons. *Nature Communications*, 3, 1114–1121. <https://doi.org/10.1038/ncomms2126>
  223. Thomas, S. P., Hoang, T. T., Ressler, V. T., & Raines, R. T. (2018). Human angiogenin is a potent cytotoxin in the absence of ribonuclease inhibitor. *Rna*, 24(8), 1018–1027. <https://doi.org/10.1261/rna.065516.117>
  224. Tonan, K., Xu, P., Jenkins, J. L., Russo, A., Shapiro, R., & Ni, F. (2003). Unexpected binding mode for 2'-phosphoadenosine-based nucleotide inhibitors in complex with human angiogenin revealed by heteronuclear NMR spectroscopy. *Biochemistry*, 42(38), 11137–11149. <https://doi.org/10.1021/bi030066h>
  225. Tonan, K., Xu, P., Jenkins, J. L., Russo, A., Shapiro, R., & Ni, F. (2003). Unexpected Binding Mode for 2'-Phosphoadenosine-Based Nucleotide Inhibitors in Complex with Human Angiogenin Revealed by Heteronuclear NMR Spectroscopy. *Biochemistry*, 42(38), 11137–11149. <https://doi.org/10.1021/bi030066h>
  226. Toschi, L., & Bravo, R. (1988). Changes in cyclin/proliferating cell nuclear antigen distribution during DNA repair synthesis. *Journal of Cell Biology*, 107(5), 1623–1628. <https://doi.org/10.1083/jcb.107.5.1623>
  227. Travali, S., Ku, D. H., Rizzo, M. G., Ottavio, L., Baserga, R., & Calabretta, B. (1989). Structure of the human gene for the proliferating cell nuclear antigen. *Journal of Biological Chemistry*, 264(13), 7466–7472. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)83257-4](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)83257-4)
  228. Trouillon, R., Kang, D. K., Park, H., Chang, S. I., & Ohare, D. (2010). Angiogenin induces nitric oxide synthesis in endothelial cells through PI-3 and akt kinases. *Biochemistry*, 49(15), 3282–3288. <https://doi.org/10.1021/bi902122w>
  229. Tsuji, T., Sun, Y., Kishimoto, K., Olson, K. A., Liu, S., Hirukawa, S., & Hu, G. F. (2005). Angiogenin is translocated to the nucleus of HeLa cells and is involved in ribosomal RNA transcription and cell proliferation. *Cancer Research*, 65(4), 1352–1360. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-2058>



230. Vallee, B. L., & Riordan, J. F. (1997). Organogenesis and angiogenin. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 53(10), 803–815. <https://doi.org/10.1007/s000180050101>
231. van Es, M. A., Schelhaas, H. J., van Vught, P. W. J., Ticozzi, N., Andersen, P. M., Groen, E. J. N., Schulte, C., Blauw, H. M., Koppers, M., Diekstra, F. P., Fumoto, K., LeClerc, A. L., Keagle, P., Bloem, B. R., Scheffer, H., van Nuenen, B. F. L., van Blitterswijk, M., van Rheenen, W., Wills, A.-M., ... van den Berg, L. H. (2011). Angiogenin variants in Parkinson disease and amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of Neurology*, 70(6), 964–973. <https://doi.org/10.1002/ana.22611>
232. Van Es, M. A., Veldink, J. H., Schelhaas, H. J., Bloem, B. R., Soodaar, P., Van Nuenen, B. F. L., Verbeek, M., Van De Warrenburg, B. P., & Van Den Berg, L. H. (2014). Serum angiogenin levels are elevated in ALS, but not Parkinson's disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 85(12), 1439–1440. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2013-307168>
233. Velazquez-Campoy, A., Leavitt, S. A., & Freire, E. (2004). Characterization of protein-protein interactions by isothermal titration calorimetry. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 261, 35–54. <https://doi.org/10.1385/1-59259-762-9:035>
234. Vlachakis, D., Bencurova, E., Papangelopoulos, N., & Kossida, S. (2014). Current state-of-the-art molecular dynamics methods and applications. In *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology* (1st ed., Vol. 94). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800168-4.00007-X>
235. Waga, S., Hannon, G., Beach, D., & Stillman, B. (1994). The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature*, 369, 574–578.
236. Walls, D., & Walker, J. M. (2017). Protein Chromatography. *Protein Chromatography*, 1485, 423. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6412-3>
237. Wan, H., Li, Y., Fan, Y., Meng, F., Chen, C., & Zhou, Q. (2012). A site-directed mutagenesis method particularly useful for creating otherwise difficult-to-make mutants and alanine scanning. *Analytical Biochemistry*, 420(2), 163–170. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2011.09.019>
238. Weiner, H. L., Weiner, L. H., & Swain, J. L. (1987). Tissue distribution and developmental expression of the messenger RNA encoding angiogenin. *Science*, 237(4812), 280–282. <https://doi.org/10.1126/science.2440105>
239. Weng, C., Dong, H., Bai, R., Sheng, J., Chen, G., Ding, K., Lin, W., Chen, J., & Xu, Z. (2022). Angiogenin promotes angiogenesis via the endonucleolytic decay of miR-141 in colorectal cancer. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 27(March), 1010–1022. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2022.01.017>
240. Weng, C., Dong, H., Chen, G., Zhai, Y., Bai, R., Hu, H., Lu, L., & Xu, Z. (2012). MiR-409-3p inhibits HT1080 cell proliferation, vascularization and

- metastasis by targeting angiogenin. *Cancer Letters*, 323(2), 171–179.  
<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.04.010>
241. Weng, C., Dong, H., Mao, J., Lang, X., & Chen, J. (2022). Characterization and Function of the Interaction of Angiogenin With Alpha-Actinin 2. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 9(April), 1–10.  
<https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.837971>
242. Weremowicz, S., Fox, E. A., Morton, C. C., & Vallee, B. L. (1990). Localization of the human angiogenin gene to chromosome band 14q11, proximal to the T cell receptor  $\alpha/\delta$  locus. *American Journal of Human Genetics*, 47(6), 973–981.
243. Witko-Sarsat, V., & Ohayon, D. (2016). Proliferating cell nuclear antigen in neutrophil fate. *Immunological Reviews*, 273(1), 344–356.  
<https://doi.org/10.1111/imr.12449>
244. Witko-Sarsat, V., Mocek, J., Bouayad, D., Tamassia, N., Ribeil, J. A., Candalh, C., Davezac, N., Reuter, N., Mouthon, L., Hermine, O., Pederzoli-Ribeil, M., & Cassatella, M. A. (2010). Proliferating cell nuclear antigen acts as a cytoplasmic platform controlling human neutrophil survival. *Journal of Experimental Medicine*, 207(12), 2631–2645.  
<https://doi.org/10.1084/jem.20092241>
245. Wlodawer, a, Minor, W., Dauter, Z., & Jaskolski, M. (2008). Protein crystallography for non-crystallographers, or how to get the best (but not more) from .... *FEBS Journal*, 275(1), 1–21. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.06178.x.Protein>
246. Wu, D., Yu, W., Kishikawa, H., Folkerth, R. D., Iafrate, A. J., Shen, Y., Xin, W., Sims, K., & Hu, G. F. (2007). Angiogenin loss-of-function mutations in amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of Neurology*, 62(6), 609–617.  
<https://doi.org/10.1002/ana.21221>
247. Xia, W., Fu, W., Cai, X., Wang, M., Chen, H., Xing, W., Wang, Y., Zou, M., Xu, T., & Xu, D. (2015). Angiogenin promotes U87MG cell proliferation by activating NF- $\kappa$ B signaling pathway and downregulating its binding partner FHL3. *PLoS ONE*, 10(2), 1–12.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116983>
248. Xu, Z. ping, Monti, D. M., & Hu, G. F. (2001). Angiogenin activates human umbilical artery smooth muscle cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 285(4), 909–914.  
<https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5255>
249. Xu, Z. ping, Tsuji, T., Riordan, J. F., & Hu, G. fu. (2003). Identification and characterization of an angiogenin-binding DNA sequence that stimulates luciferase reporter gene expression. *Biochemistry*, 42(1), 121–128.  
<https://doi.org/10.1021/bi020465x>
250. Yamasaki, S., Ivanov, P., Hu, G. F., & Anderson, P. (2009). Angiogenin cleaves



- tRNA and promotes stress-induced translational repression. *Journal of Cell Biology*, 185(1), 35–42. <https://doi.org/10.1083/jcb.200811106>
251. Yan, Y., Zhang, D., Zhou, P., Li, B., & Huang, S. Y. (2017). HDOCK: A web server for protein-protein and protein-DNA/RNA docking based on a hybrid strategy. *Nucleic Acids Research*, 45(W1), W365–W373. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx407>
  252. Yang, H., Yuan, L., Ibaragi, S., Li, S., Shapiro, R., Vanli, N., Goncalves, K. A., Yu, W., Kishikawa, H., Jiang, Y., Hu, A. J., Jay, D., Cochran, B., Holland, E. C., & Hu, G. (2022). Angiogenin and plexin-B2 axis promotes glioblastoma progression by enhancing invasion, vascular association, proliferation and survival. *British Journal of Cancer*, 127(3), 422–435. <https://doi.org/10.1038/s41416-022-01814-6>
  253. Yeo, K. J., Jee, J. G., Hwang, E., Kim, E. H., Jeon, Y. H., & Cheong, H. K. (2017). Interaction between human angiogenin and the p53 TAD2 domain and its implication for inhibitor discovery. *FEBS Letters*, 591(23), 3916–3925. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12899>
  254. Yin, L., Xie, Y., Yin, S., Lv, X., Zhang, J., Gu, Z., Sun, H., & Liu, S. (2015). The S-nitrosylation status of PCNA localized in cytosol impacts the apoptotic pathway in a Parkinson's disease paradigm. *PLoS ONE*, 10(2), 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117546>
  255. 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. <https://doi.org/10.1155/2018/1984718>
  256. Yu, W., Goncalves, K. A., Li, S., Kishikawa, H., Sun, G., Yang, H., Vanli, N., Wu, Y., Jiang, Y., Hu, M. G., Friedel, R. H., & Hu, G. (2017). Plexin-B2 Mediates Physiologic and Pathologic Functions of Angiogenin. *Cell*, 171(4), 849–864.e25. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.10.005>
  257. Yurina, N. V., Ageeva, T. A., Goryachkin, A. M., Varaksin, N. A., Ryabicheva, T. G., Ostanin, A. A., Chernykh, E. R., Romashchenko, A. V., Proskurina, A. S., Bogachev, S., & Purtov, A. V. (2021). Effects of recombinant angiogenin on collagen fiber formation and angiogenesis in the dermis of wistar rats. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*, 14, 187–196. <https://doi.org/10.2147/CCID.S294825>
  258. Zheleva, D. I., Zhelev, N. Z., Fischer, P. M., Duff, S. V., Warbrick, E., Blake, D. G., & Lane, D. P. (2000). A quantitative study of the in vitro binding of the C-terminal domain of p21 to PCNA: Affinity, stoichiometry, and thermodynamics. *Biochemistry*, 39(25), 7388–7397. <https://doi.org/10.1021/bi992498r>
  259. Zhu, Q., Chang, Y., Yang, J., & Wei, Q. (2014). Post-translational modifications of proliferating cell nuclear antigen: A key signal integrator for DNA damage response (review). *Oncology Letters*, 7(5), 1363–1369.

<https://doi.org/10.3892/ol.2014.1943>

260. Zuilkoski, C. M., & Skibbens, R. V. (2020). PCNA antagonizes cohesin-dependent roles in genomic stability. PLoS ONE, 15(10 October), 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235103>
261. Γλυκος, Ν. Μ. (2015). *Μία μη μαθηματική εισαγωγή στην κρυσταλλογραφία πρωτεϊνών.*