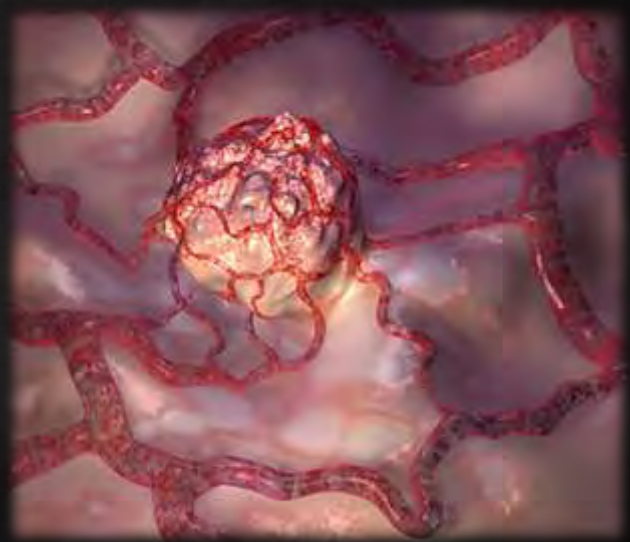


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Τίτλος Πτυχιακής Εργασίας

*Επίδραση πολυφαινολικών εκχυλισμάτων από *Vitisvinifera* στη
δραστικότητα της Ριβονουκλεάσης Α*



Επιμέλεια: Ταουκτσής Μαυρουδής

Λάρισα 2015

ΤΙΤΛΟΣ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΑΠΟ *Vitisvinifera* ΣΤΗ
ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΑΣΗΣ Α.

Τριμελής επιτροπή:

Δημήτριος Δ. Λεωνίδας (Επιβλέπων καθηγητής),
*Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας &
Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.*

Κομιώτης Δημήτριος, *Καθηγητής Οργανικής Χημείας με έμφαση
στη σύνθεση Βιοδραστικών Μορίων του τμήματος Βιοχημείας &
Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.*

Μπαλατσός Νικόλαος, *Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας του
τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου
Θεσσαλίας.*

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε το χρονικό διάστημα Σεπτέμβριος 2012 - Ιανουάριος 2013, στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Σε αυτό το σημείο θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον καθηγητή κ. Δημήτριο Λεωνίδα κυρίως για την εμπιστοσύνη αλλά και για την υπομονή που έδειξε κατά τη διάρκεια υλοποίησης της παρούσας πτυχιακής εργασίας. Επίσης πολύτιμη ήταν η συμβολή του στην ορθή διεκπεραίωση των πειραματικών διαδικασιών, παρέχοντας μου τις πολύτιμες υποδείξεις του και την επιτυχημένη καθοδήγηση του με σκοπό την ολοκλήρωση του θέματος που μου ανέθεσε.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στον κ. Δημήτρη Κομιώτη, καθώς και στον κ. Νικόλαο Μπαλατσό για τις πολύπλευρες πληροφορίες που μου προσέφεραν κατά την διάρκεια εκπόνησης της πτυχιακής μου εργασίας και για την συνεργασία τους.

Θα ήταν παράλειψη αν δεν ανέφερα την κα Χατζηλεοντιάδου Δήμητρα, υποψήφια διδάκτορα, διότι η συμβολή της ήταν καίρια καθώς ήμουν υπό τη συνεχή της παρατήρηση και η βοήθεια που μου προσέφερε ήταν πραγματικά ανεκτίμητη.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής βιοχημείας για την άψογη συνεργασία, καθώς και όσους βοήθησαν και συνέβαλαν στην εκπόνηση της συγκεκριμένης πτυχιακής εργασίας.

Περιεχόμενα

Abstract.....	7
Περίληψη	8
1 Εισαγωγή	9
1.1 Αγγειογένεση	9
1.2 Μηχανισμός της αγγειογένεσης	10
1.3 Ρύθμιση αγγειογένεσης.....	13
1.4 Αγγειογένεση στον καρκίνο	14
1.5 Ριβονουκλεάσες (RNases).....	15
1.6 Ριβονουκλεάσες και καρκίνος	16
1.7 Ανθρώπινη αγγειογενίνη.....	18
1.8 Η παγκρεατική ριβονουκλεάση A (RNaseA)	24
1.8.1 Η Δομή της RNase A.....	26
1.8.2 Το ενεργό κέντρο της RNase A- Καταλυτική δράση	27
1.8.3 Καταλυτικός μηχανισμός	29
1.9 Ενζυμική αναστολή.....	32
1.10 Φυτικά εκχυλίσματα ως εν δυνάμει αναστολείς της RNaseA και κατ' επέκταση της αγγειογενίνης.....	35
1.10.1 Εκχυλίσματα σταφυλιών	36
1.10.2 Σταφύλια-προέλευση και προετοιμασία εκχυλισμάτων	38
1.10.3 Προετοιμασία εκχυλισμάτων.....	39
Σκοπός της Εργασίας	41
Σχεδιασμός Πειραματικού Πρωτοκόλλου – Μέθοδοι – Υλικά και Όργανα	42
2 Απομόνωση Αγγειογενίνης.....	42
2.1 Υλικά	42
2.2 Όργανα	43
2.3 Περιγραφή της μεθόδου.....	44
3 Κινητική μελέτη της ριβονουκλεάσης A.....	50
3.1 Υλικά	50
3.2 Όργανα	51
3.3 Κινητική μελέτη της ριβονουκλεάσης A	51
3.4 Περιγραφή της μεθόδου.....	52

3.5	Επεξεργασία κινητικών δεδομένων για τον υπολογισμό της IC ₅₀	54
4	Αποτελέσματα	56
4.1	Αποτελέσματα απομόνωσης ργγο-GluAng.....	56
4.2	Αποτελέσματα κινητικής μελέτης RNAseA.....	59
4.2.1	Προσδιορισμός του IC ₅₀ της αναστολής του ενζύμου	60
5	Συζήτηση.....	64
6	Βιβλιογραφία	66

Abstract

Ribonucleases (RNases) are enzymes that catalyze the degradation of RNA either exo- or endonucleolytically. RNases become cytotoxic when they adsorb specifically to certain cells, enter the cytosol, degrade RNA and consequently inhibit protein synthesis leading to cell death. Studies have shown that several pancreatic RNase A homologues, including Angiogenin (Ang), Eosinophil-Derived Neurotoxin (EDN), and eosinophil cationic protein (ECP), utilize their enzymatic activities to bring forth potent physiological effects. This has led to widespread interest and increase in the development of synthetic or natural ribonuclease inhibitors. Herein, in this effort we assessed the inhibition of polyphenolic grape extracts on RNase A activity followed by initial studies on isolation and purification of the recombinant human Angiogenin (hAng). Detailed kinetic analysis and determination of the IC_{50} values revealed that polyphenolic grape extracts display a significant inhibitory effect on the activity of RNase A.

High degree of conservation of the catalytic center of the homologous members, such as the human angiogenin (hAng), which is involved in tumor formation in blood vessels, makes RNase A an ideal model for further examination. These inhibitors could serve as templates for the synthesis of efficient regulators of RNase A activity and as a consequence, on further studies, of hANG activity.

Περίληψη

Οι ριβονουκλεάσες (RNases) είναι ένζυμα που καταλύουν τον αποπολυμερισμό του RNA, είτε έξω- είτε ένδο-νουκλεολυτικά. Συγκεκριμένα, η παγκρεατική ριβονουκλεάση A (RiboNucleaseA, RNaseA) από βοοειδή είναι μια ενδονουκλεάση που καταλύει τον αποπολυμερισμό μονόκλωνων μορίων mRNA, σπάζοντας τους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς μεταξύ ριβονουκλεοτιδίων, που είναι συνδεδεμένα κυρίως με πυριμιδίνες. Τα μέλη της υπεροικογένειας της RNaseA έχουν προσελκύσει μεγάλο βιολογικό ενδιαφέρον, καθώς η ενδοριβονουκλεολυτική δραστηριότητα αυτών των πρωτεϊνών σχετίζεται με μια πληθώρα νεοπλασματικών και μολυσματικών ασθενειών. Γι αυτό το λόγο, προηγούμενες έρευνες στο εργαστήριο έχουν επικεντρωθεί στο σχεδιασμό επιλεκτικών και ισχυρών μορίων-αναστολέων, οι οποίοι θα μπορούσαν να έχουν φαρμακευτικό ενδιαφέρον. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η δράση διαφόρων εκχυλισμάτων αμπελοκομίας στην ενζυμική δράση της RNaseA και ακολούθησαν πρωταρχικά πειράματα απομόνωσης και καθαρισμού της ανασυνδυασμένης ανθρώπινης αγγειογενίνης (hAng).

Λεπτομερής κινητική ανάλυση και προσδιορισμός των τιμών IC_{50} αποκάλυψαν ότι τα εκχυλίσματα αυτά αναστέλλουν σημαντικά τη δράση της ριβονουκλεάσης A. Η RNaseA αποτελεί ιδανικό μοντέλο για κινητικές και δομικές μελέτες μικρομοριακών αναστολέων, εξαιτίας του υψηλού βαθμού συντήρησης του καταλυτικού της κέντρου με τα ομόλογα μέλη της, όπως η ανθρώπινη αγγειογενίνη (angiogenin), η οποία εμπλέκεται σε σχηματισμό όγκων στα αιμοφόρα αγγεία.

1 Εισαγωγή

1.1 Αγγειογένεση

Η αγγειογένεση (angiogenesis) είναι η φυσιολογική διαδικασία η οποία περιλαμβάνει την ανάπτυξη νέων αιμοφόρων αγγείων. (Chang-Ling, 2008). Μέσω των αιμοφόρων αγγείων μεταφέρονται θρεπτικά συστατικά, οξυγόνο και άλλα μόρια, όπως κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, σε όλους τους ιστούς του ανθρώπινου σώματος (Folkman, 2001, Jain et al., 2001).

Η αγγειογένεση εμπλέκεται τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε παθολογικές καταστάσεις. Στις φυσιολογικές καταστάσεις περιλαμβάνονται: η ανάπτυξη εμβρύων, η επούλωση πληγών και ο έμμηνος κύκλος κατά τον επανασηματισμό του ενδομητρίου. Παρόλα αυτά, υπάρχουν πολλές ασθένειες που οφείλονται στη συνεχή, ανεξέλεγκτη αγγειογένεση (J.S Penn 2008) όπως η αρθρίτιδα, όπου νέα τριχοειδή αγγεία του αίματος εισβάλλουν στις αρθρώσεις και καταστρέφουν τον χόνδρο και ο διαβήτης, όπου παρατηρείται εισβολή νέων τριχοειδών του αμφιβληστροειδή χιτώνα στον υαλώδη, όπου αιμορραγούν και προκαλούν τύφλωση. Εξαρτημένες από την αγγειογένεση είναι και η αύξηση των όγκων αλλά και η μετάσταση τους (Folkman et al,2007). Οι όγκοι πρέπει συνεχώς να διεγείρουν τη δημιουργία νέων τριχοειδών αιμοφόρων αγγείων ώστε να μπορέσουν να αυξηθούν. Επιπρόσθετα, τα νέα αγγεία που αιματώνουν έναν όγκο, «ανοίγουν το δρόμο» στα κύτταρα του όγκου ώστε αυτά να εισέλθουν στην κυκλοφορία του αίματος και να μεταναστεύουν, (μετάσταση).

Άλλες παθολογικές καταστάσεις όπου παρατηρείται σχηματισμός νέων αγγείων είναι η αθηροσκλήρωση, η ψωρίαση, η ρευματοειδής αρθρίτιδα κ.ά. (Jain et al., 2003). Η φυσιολογική αγγειογένεση διαρκεί περιορισμένο χρόνο, όπως μερικές ημέρες κατά τη διάρκεια του έμμηνου κύκλου ή μερικές εβδομάδες κατά την επούλωση των πληγών. Αντίθετα, η παθολογική αγγειογένεση μπορεί να διαρκέσει για χρόνια (Folkman et al., 2007).

Τα αγγεία ανάλογα με τη δομή και τη λειτουργία τους διακρίνονται σε αρτηρίες, τριχοειδή και φλέβες. Οι αρτηρίες απομακρύνουν το αίμα από την

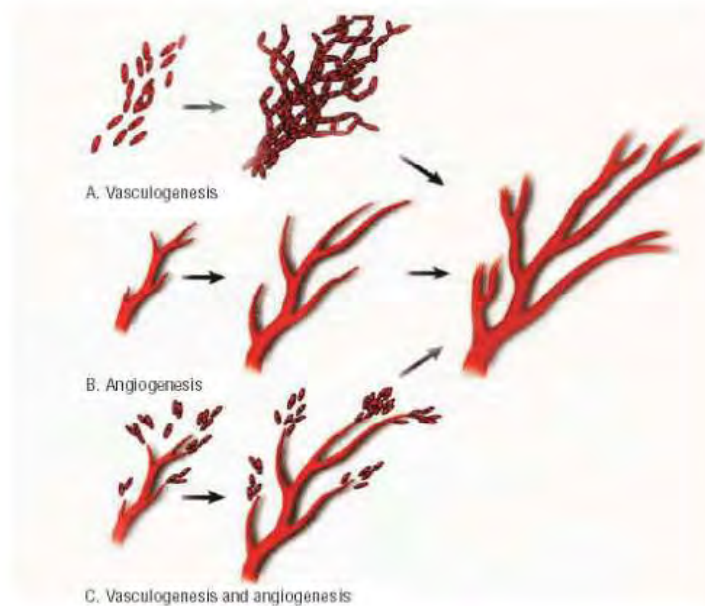
καρδιά και το τοίχωμά τους αποτελείται από τρεις στιβάδες (εσωτερική, μεσαία και εξωτερική). Το τριχοειδικό δίκτυο συμμετέχει στην ανταλλαγή ουσιών μεταξύ κυττάρων και ιστών. Οι φλέβες μεταφέρουν το αίμα στην καρδιά και αποτελούνται από τις ίδιες στιβάδες με αυτές των αρτηριών. (Folkman, 2001; Jain *et al.*, 2001).

Στις παθολογικές καταστάσεις αν και τα νέα αγγεία που δημιουργούνται έχουν παρόμοια δομή με τα φυσιολογικά, η μορφολογία τους δεν είναι φυσιολογική. Μελέτες έχουν δείξει ότι παρατηρούνται αλλαγές στην έκφραση γονιδίων και τα αγγεία είναι διογκωμένα και περιπλεγμένα. Παρατηρούνται επίσης ασυνέχειες στα τοιχώματά τους και μειωμένα επίπεδα σχηματισμού της βασικής μεμβράνης του αγγειακού αυλού (Di Tomaso *et al.*, 2005). Τα καρκινικά αγγεία χαρακτηρίζονται από χαοτική αιματική ροή και έλλειψη λειτουργικών λεμφαγγείων (Baish *et al.*, 2000, Hobbs *et al.*, 1998, Hashizume *et al.*, 2000, Jain *et al.*, 2000).

Τέλος, ορισμένα ενδοθηλιακά κύτταρα δεν εκφράζουν κοινούς ενδοθηλιακούς δείκτες και ίσως παρουσιάζουν αντίσταση στην απόπτωση, γι' αυτό και το τοίχωμα των καρκινικών αγγείων δεν αποτελείται πάντοτε μόνο από ενδοθηλιακά κύτταρα, αλλά και από καρκινικά κύτταρα οδηγώντας στο σχηματισμό των μωσαϊκών αγγείων (Chang *et al.*, 2000). Οι ανωμαλίες στην αρχιτεκτονική των αγγείων αντανακλούν την παθολογική τους φύση (Papetti and Herman, 2002)

1.2 Μηχανισμός της αγγειογένεσης

Το αγγειακό σύστημα αναπτύσσεται μέσω των μηχανισμών της αγγειακής διαφοροποίησης (vasculogenesis) και της αγγειογένεσης (angiogenesis). Κατά την αγγειακή διαφοροποίηση τα αιμοφόρα αγγεία αναπτύσσονται *de novo* από διαφοροποίηση αρχέγονων ενδοθηλιακών κυττάρων (αγγειοβλαστών) *insitu* με τελικό αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός άωρου πλέγματος, ενώ κατά την αγγειογένεση ο σχηματισμός νέων τριχοειδών αγγείων γίνεται από προϋπάρχοντα (Εικόνα 1) (Carmeliet, 2008).



Εικόνα 1: Απεικόνιση σχηματισμού αγγείων μέσω αγγειοποίησης και αγγειογένεσης (Llevadot et al., 2002)

Όταν δημιουργηθεί το κυρίως αγγειακό πλέγμα μέσω του μηχανισμού της αγγειακής διαφοροποίησης, τότε τα τριχοειδή αγγεία μπορούν να δημιουργηθούν από τα ήδη υπάρχοντα μέσω της διαδικασίας της αγγειογένεσης (Risau, 1997). Οι μηχανισμοί με τους οποίους μπορεί να συμβεί αυτό είναι δύο:

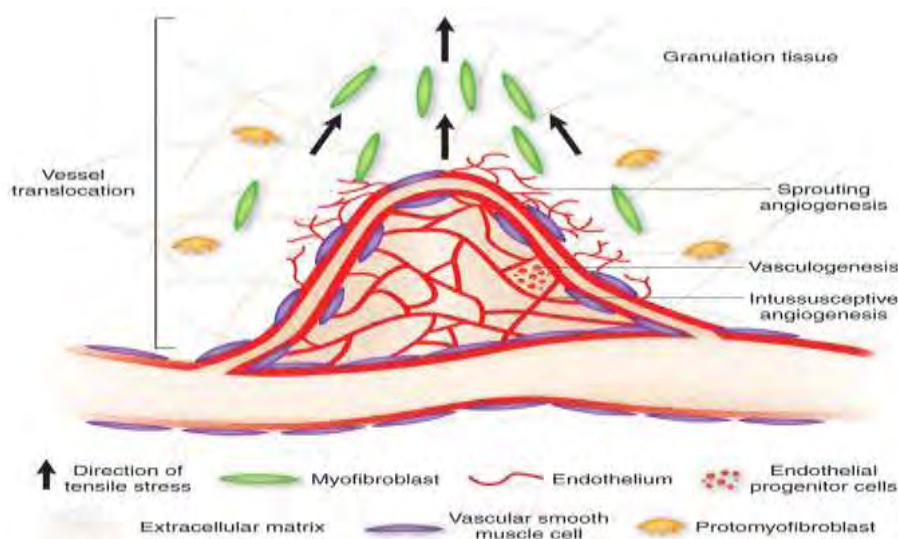
- Με εκβλάστηση (sprouting angiogenesis)

Η αγγειογένεση με εκβλάστηση ήταν η πρώτη αναγνωρισμένη μορφή αγγειογένεσης και η οποία επέρχεται σε αρκετά καλά αναγνωρισμένα στάδια. Αρχικά, αγγειογενετικοί αυξητικοί παράγοντες ενεργοποιούν υποδοχείς που βρίσκονται στα ενδοθηλιακά κύτταρα και στη συνέχεια, τα ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα αρχίζουν να εκκρίνουν πρωτεάσες οι οποίες αποικοδομούν τη βασική μεμβράνη και επιτρέπουν στα ενδοθηλιακά κύτταρα να διαφύγουν από τον υπάρχοντα ενδοθηλιακό τοίχο. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα έπειτα πολλαπλασιάζονται και δημιουργούν εκβλαστήσεις οι οποίες συνδέονται με γειτονικά αγγεία. Όσο μεγαλώνουν οι εκβλαστήσεις, τα ενδοθηλιακά κύτταρα μεταναστεύουν το ένα μετά το άλλο χρησιμοποιώντας μόρια προσκόλλησης (ιντεγκρίνες). Αυτές οι εκβλαστήσεις στη πορεία

σχηματίζουν θηλιές προκειμένου να φτιάξουν έναν πλήρες αυλό αγγείου όσο τα κύτταρα μεταναστεύουν στη περιοχή της αγγειογένεσης. Η εκβλάστηση πραγματοποιείται σε ένα ποσοστό αρκετών χιλιοστών την ημέρα και καθιστά ικανά τα νέα αγγεία να μεγαλώνουν κατά μήκος του αγγειακού δικτύου (Carmeliet *et al.*, 2011).

- Με διάσπαση των ήδη υπάρχοντων αγγείων-εγκολεασμό (Intussusceptive-splitting-angiogenesis)

Ο εγκολεασμός, γνωστός ως αγγειογένεση με διαχωρισμό, πρωτοπαρατηρήθηκε σε νεογνά αρουραίων. Σε αυτή τη μορφή αγγειακού σχηματισμού, το τριχοειδικό τοίχωμα εκτείνεται μέσα στον αυλό προκειμένου να διαχωριστεί σε δύο νέα. Υπάρχουν τέσσερις φάσεις αγγειογένεσης με εγκολεασμό. Ο εγκολεασμός είναι βασικός επειδή αναδιοργανώνει τα υπάρχοντα κύτταρα και επιτρέπει μία συντριπτική αύξηση του αριθμού των τριχοειδών χωρίς να πραγματοποιεί αύξηση του αριθμού των ενδοθηλιακών κυττάρων. Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό στην εμβρυϊκή ανάπτυξη εξαιτίας του γεγονότος ότι δεν υπάρχουν αρκετές πηγές ώστε να δημιουργηθεί ένα πλούσιο μικροαγγειακό δίκτυο με νέα κύτταρα (εικόνα 2) (Burri *et al.*, 2004).



Εικόνα 2 : Αγγείωση των ιστών μέσω των μηχανισμών εκβλάστησης, εγκολεασμού και αγγειοποίησης (Kilariski *et al.*, 2009)

1.3 Ρύθμιση αγγειογένεσης

Υπάρχουν διάφοροι παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν την αγγειογένεση είτε θετικά προωθώντας την (αγγειογενετικοί παράγοντες), είτε αρνητικά αναστέλλοντας την (αντιαγγειογενετικοί παράγοντες) (Papetti and Herman, 2002).

Οι σημαντικότεροι αγγειογενετικοί παράγοντες είναι οι αυξητικοί παράγοντες. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα εκφράζουν ένα μεγάλο αριθμό αυξητικών παραγόντων και των αντίστοιχων υποδοχέων τους που επάγουν την αγγειογένεση *in vivo*.

Από την άλλη από τους σημαντικότερους φυσιολογικούς αναστολείς της είναι η αγγειοστατίνη και η ενδοστατίνη. Τα δύο αυτά μόρια ανήκουν σε μια κατηγορία παραγόντων που έχουν αντιαγγειογενετική δράση και προκύπτουν από πρωτεολυτική διάσπαση μεγαλύτερων φυσιολογικά παραγόμενων πρωτεϊνών. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι οι περισσότεροι παράγοντες αυτής της κατηγορίας προκύπτουν από πρωτεΐνες του εξωκυττάριου υγρού (κολλαγόνο, ινονεκτίνη) ή από ένζυμα που συμμετέχουν στην αναδιοργάνωση του εξωκυττάριου υγρού (πχ πλασμινογόνο) (Papetti and Herman, 2002).

Παρακάτω παρατίθεται πίνακας με τους σημαντικότερους φυσιολογικούς ρυθμιστές της αγγειογένεσης.

Πίνακας 1 : Κατηγοριοποίηση των ρυθμιστών της αγγειογένεσης (αγγειογενετικοί και αντιαγγειογενετικοί).

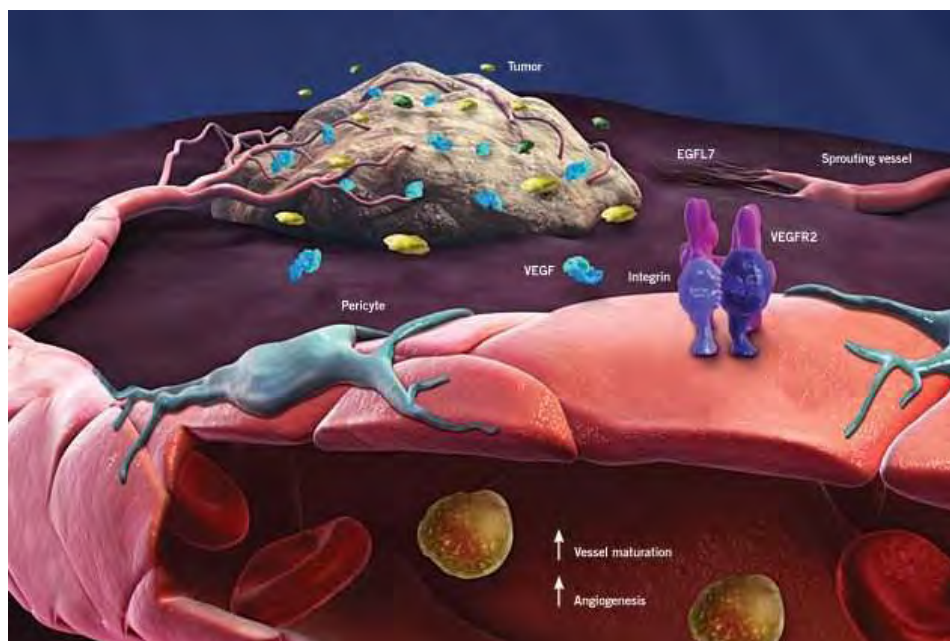
ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ	ΑΝΤΙΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ
VEGF	Αρρεστίνη
PIGF	Κουστατίνη
FGF-1, FGF-2	Τμήματα κολλαγόνου
HARP	EFC-XV
PDGF	Ενδορεπελλίνη
HGF/SF	Ενδοστατίνη
TGF-α	Τμήματα ινονεκτίνης
TGF-β	Φιμπουλίνη
EGF	Θρομβοσπονδίνη-1 και -2
IGF-1	Τουμστατίνη
TNF-α	Ιντερφερόνες
IL-8	Ιντερλευκίνες
IL-3	PEDF
Προσταγλαδίνη E1, E2	Παράγοντας αιμοπεταλίων-4
COX-2	Αγγειοστατίνη
Αγγειογενίνη	Ανιθρομβίνη III
Οιστρογόνα	2-Μεθοξυοιστραδιόλη
Προλιφερίνη	PEX
Τμήματα του υαλουρονικού οξέος	Τμήματα προλακτίνης
Ολιγοσακχαρίτες	sFlt-1
Ερυθροποιητίνη	TIMPs
G-CSF	Τροπονίνη 1
GM-CSF	Βασοστατίνη
VCAM-1	Plasminogen kringle 5
E-σελεκτίνη	
NO	
Αγγειοποιητίνη-1	

1.4 Αγγειογένεση στον καρκίνο

Η παθολογική αγγειογένεση είναι χαρακτηριστικό γνώρισμα του καρκίνου. Τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να εισχωρήσουν στο αίμα ή στα λεμφικά αγγεία, να μετακινηθούν μέσω της ενδοαγγειακής κυκλοφορίας, και στη συνέχεια να πολλαπλασιαστούν σε άλλη θέση (μετάσταση) (Folkman 1971). Για τη μεταστατική εξάπλωση του καρκίνου καίριο ρόλο παίζει η αύξηση και ανάπτυξη του αγγειακού δικτύου (καρκινική αγγειογένεση). Η καρκινική αγγειογένεση, λοιπόν, αναφέρεται στην ικανότητα ενός όγκου να προωθή τη δημιουργία νέων αιμοφόρων αγγείων (Hanahan *et al.*, 2011, Bergers *et al.*,

2003) ώστε να επιτραπεί η ανάπτυξη του όγκου, η εισβολή του στα κύτταρα του ξενιστή αλλά και η διάδοση του μέσω:

- μεταφοράς οξυγόνου και θρεπτικών στοιχείων απαραίτητων για την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων
- παραγωγής αυξητικών παραγόντων από τη δράση των οποίων επωφελούνται τα καρκινικά κύτταρα
- δημιουργίας των κατάλληλων συνθηκών για τη μετακίνηση των καρκινικών κυττάρων. (εικόνα 3) (Hanahan et al., 2011, Hicklin et al., 2005).



Εικόνα 3: Η αγγειογένεση είναι μια ελεγχόμενη διαδικασία που ρυθμίζεται από αγγειογόνους και αυξητικούς παράγοντες που εκκρίνονται τόσο από τα καρκινικά κύτταρα, όσο και από άλλα κύτταρα μέσα στο μικροπεριβάλλον όπου αναπτύσσεται ο όγκος (Nyberg et al., 2008)

1.5 Ριβονουκλεάσες (RNases)

Οι ριβονουκλεάσες αποτελούν ένζυμα που αποικοδομούν υδρολυτικά μόνο μόρια RNA. Οι ριβονουκλεάσες μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο κατηγορίες:

1. Ενδονουκλεάσες που είναι τα ένζυμα τα οποία διασπούν τόσο μονόκλωνα όσο και δίκλωνα μόρια RNA, ανάλογα με το ένζυμο που καταλύει την αντίδραση. Παραδείγματα που μπορούν να αναφερθούν σε αυτήν την κατηγορία είναι τα μόρια RNaseIII, RNaseA, RNaseT1, και RNaseH, όπως επίσης και σύμπλοκα πρωτεϊνών με RNA όπως RNaseP και το RNA-επαγώμενο σύμπλοκο αποσιώπησης.
2. Εξωνουκλεάσες που είναι τα ένζυμα που αποικοδομούν μόρια RNA μέσω απομάκρυνσης νουκλεοτιδίων από το 5' ή 3' άκρο της κάθε αλληλουχίας. Τα ένζυμα που απομακρύνουν νουκλεοτίδια από το 5' άκρο ονομάζονται 5'-3' εξωριβονουκλεάσες και αυτά που απομακρύνουν νουκλεοτίδια από το 3' άκρο ονομάζονται 3'-5' εξωριβονουκλεάσες. Παραδείγματα που μπορούν να αναφερθούν είναι τα μόρια RNase R, RNase II, RNase D, RNase T.

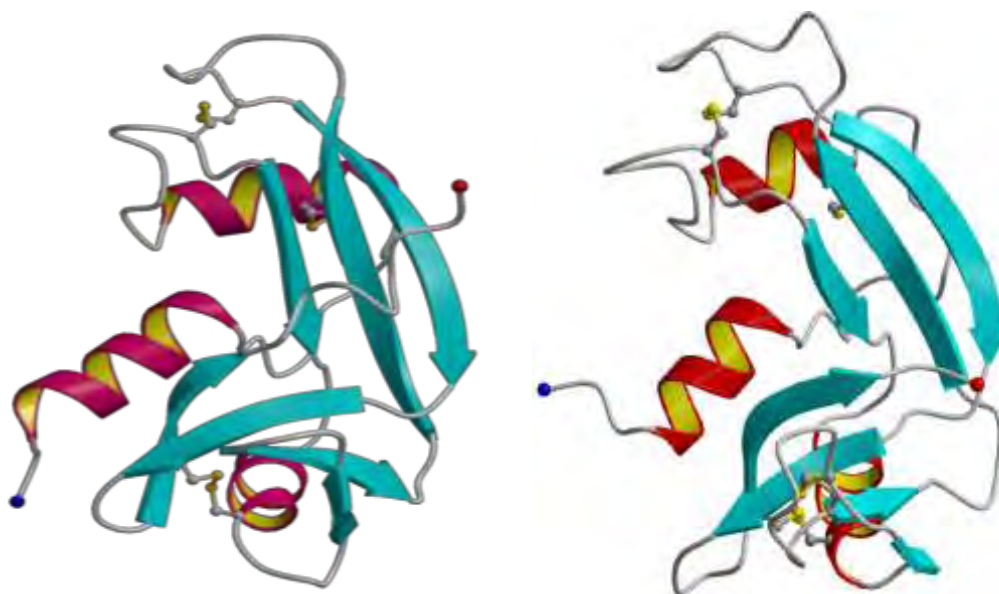
1.6 Ριβονουκλεάσες και καρκίνος

Στον γενικό όρο RISBASES (Ribonucleases with Special Biological Actions) περιλαμβάνονται �ιβονουκλεάσες με διάφορες βιολογικές λειτουργίες πέρα από την συνήθη καταλυτική τους δράση ως ένζυμα (D' Alessio et al., 1991). Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται μια προσπάθεια αξιοποίησης των �ιβονουκλεασών στην θεραπεία του καρκίνου. Έχει παρατηρηθεί ότι πολλές από αυτές έχουν αντικαρκινική δράση ενώ άλλες προάγουν τη δημιουργία όγκων. Για παράδειγμα, η βοεΐα σπερματική �ιβονουκλεάση (BS-RNase), μία ομοδιμερής �ιβονουκλεάση της οικογένειας της παγκρεατικής �ιβονουκλεάσης A (RNaseA), είναι ένας σημαντικός αντικαρκινικός παράγοντας μιας και εμφανίζει εκλεκτική κυτταροτοξική δράση έναντι καρκινικών κυττάρων *in vitro* και *in vivo*. Από την άλλη, αρκετά βιολογικά πειράματα έχουν δείξει ότι η αγγειογενίνη είναι από τους πιο σημαντικούς παράγοντες ανάπτυξης όγκων, καθώς προωθεί την αγγειογένεση (Fett et al., 1987).

Αντιλαμβανόμαστε ότι οι �ιβονουκλεάσες μπορούν να αποτελέσουν ένα σημαντικό όπλο ενάντια στον καρκίνο. Το σκεπτικό για την χρήση των �ιβονουκλεασών χωρίζεται σε δύο φάσεις. Η ιδιότητα τους ως κυτταροτοξικοί

παράγοντες των καρκινικών κυττάρων μπορεί να οδηγήσει στην δημιουργία μιας νέας κατηγορίας ‘φυσικών’ φαρμάκων ενάντια διαφόρων τύπων καρκίνου, χωρίς τις παρενέργειες της τυποποιημένης χημειοθεραπείας (Raines *et al.*, 1998). Ταυτόχρονα, θα πρέπει να αναπτυχθεί κάποιος ισχυρός αναστολέας που να αναστέλλει την αγγειογενίνη, ώστε να εμποδιστεί η ανάπτυξη του όγκου.

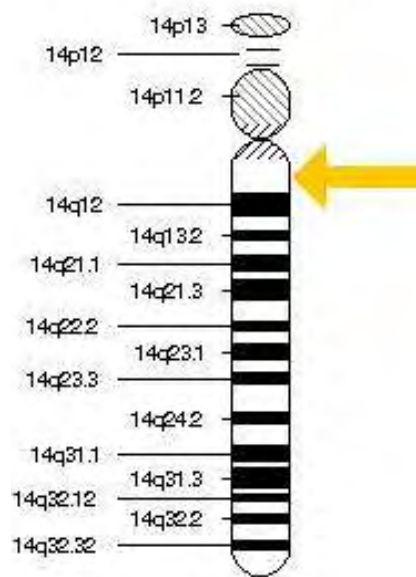
Προκειμένου να δημιουργήσουμε αναστολείς της αγγειογενίνης χρησιμοποιούμε ως “μοντέλο” την ριβονουκλεάση A (RNaseA), καθώς εμφανίζει μεγάλη αμινοξική και δομική ομοιότητα με την αγγειογενίνη ιδιαίτερα στο καταλυτικό κέντρο που φτάνει το 100% καθώς και γιατί η ριβονουκλεολυτική δραστηριότητα της αγγειογενίνης είναι πολύ χαμηλότερη από αυτήν της ριβονουκλεάσης A. Επομένως, χρησιμοποιώντας ως μοριακά μοντέλα εκκίνησης αναστολείς της RNase A, με τον κατάλληλο σχεδιασμό είναι δυνατό να ανακαλυφθούν νέοι ισχυροί και εξειδικευμένοι αναστολείς της αγγειογενίνης. Τέτοιοι αναστολείς μπορούν να αποτελέσουν τη βάση για ανάπτυξη νέων αντικαρκινικών φαρμάκων (εικόνα 4) (Leonidas *et al.* 2003).



Εικόνα 4: Αντιπαράθεση δομών ανθρώπινης αγγειογενίνης (δεξιά) και ανθρώπινης RNaseA (αριστερά).

1.7 Ανθρώπινη αγγειογενίνη

Η αγγειογενίνη αποτελεί ένζυμο μέλος της υπεροικογένειας των ριβονουκλεασών. Ο συμβολισμός ANG αντιστοιχεί στο όνομα του γονιδίου της αγγειογενίνης. Το γονίδιο ANG ανήκει στην οικογένεια γονιδίων RNASE που κωδικοποιούν για τις ριβονουκλεάσες και εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 14 μεταξύ των περιοχών 14q11.1-q11.2 (εικόνα 5).

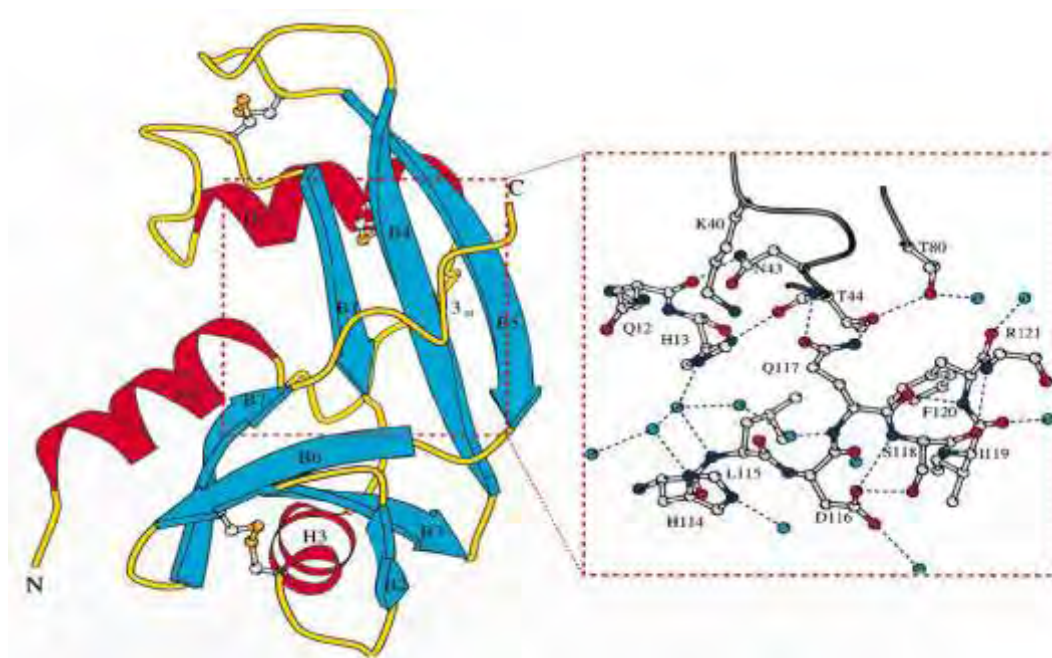


Εικόνα 5 : Η τοπολογία του ενζύμου ANG στο χρωμόσωμα 14.

Η αγγειογενίνη απομονώθηκε αρχικά από το θρεπτικό μέσο HT-29 ανθρώπινων κυττάρων αδενοκαρκινώματος του παχέως εντέρου, με βάση αποκλειστικά την αγγειογενετική της δράση στη δοκιμασία CAM (χοριοαλλαντοϊκή μεμβράνη εμβρύου κοτόπουλου) (Fett *et al.*, 1985).

Ακολούθως, έχει βρεθεί ότι κατανέμεται ευρέως στους ιστούς, με το ήπαρ να αποτελεί την κύρια πηγή για την κυκλοφορία της ANG στο πλάσμα (Weiner *et al.*, 1987).

Το mRNA που κωδικοποιεί για την ANG εκφράζεται σε ένα ευρύ φάσμα κυττάρων συμπεριλαμβανομένων των νεοπλασματικών κυττάρων, καθώς και φυσιολογικών επιθηλιακών κυττάρων, ινοβλαστών, περιφερικών αιματοκυττάρων, και αγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων. Η αγγειογενίνη είναι μια βασική, μονομερής πρωτεΐνη που αποτελείται από 123 αμινοξέα με μοριακό βάρος περίπου 14.400 Da, και είναι το πέμπτο μέλος της υπερικογένειας των παγκρεατικών ριβονουκλεασών (RNase). Παρουσιάζει 33% αμινοξική ομολογία και μία συνολική ομολογία 56% με την RNaseA, η οποία αποτελεί το πρώτο μέλος αυτής της υπερικογένειας (εικόνα 6) (Strydom *et al.*,1985).



Εικόνα 6 : Αναπαράσταση της δομής της αγγειογενίνης

Η αγγειογενίνη είναι ένας παράγοντας αγγειογένεσης, ενώ το πρωτότυπο μέλος της οικογένειας, η RNaseA δεν είναι. Έχει αναφερθεί ότι η αγγειογενίνη αλληλεπιδρά με ενδοθηλιακά και λεία μυϊκά κύτταρα για να επάγει ένα ευρύ φάσμα κυτταρικών αποκρίσεων συμπεριλαμβανομένης της κυτταρικής προσκόλλησης, της κυτταρικής μετανάστευσης, της εισβολής, του πολλαπλασιασμού και του σχηματισμού των σωληνοειδών δομών. Η ANG αποτελεί επίσης συστατικό του ανθρώπινου πλάσματος και κανονικά

κυκλοφορεί σε μία συγκέντρωση των 250-360 ng / ml (Shimoyama *et al.*, 1996)

Η μιτογόνος δραστικότητα της αγγειογενίνης προς τα ενδοθηλιακά κύτταρα αποτελεί ένα αναπάντητο ερώτημα. Οι περισσότεροι γνωστοί αγγειογενετικοί παράγοντες, όπως οι VEGF, bFGF, aFGF, και EGF είναι όλοι μιτογόνα των ενδοθηλιακών κυττάρων (Folkman *et al.*, 1987). Αλλά η μιτογόνος δραστικότητα της αγγειογενίνης δεν έχει ακόμη τεκμηριωθεί σαφώς, εκτός από μια μελέτη που δείχνει ότι η αγγειογενίνη διεγείρει τόσο την ενσωμάτωση θυμιδίνης όσο και τον πολλαπλασιασμό των ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων σε πειράματα κυτταροκαλλιέργειών (Hu *et al.*, 1997).

Τέσσερις πτυχές της αγγειογενίνης έχουν ανακαλυφθεί πως είναι αναγκαίες για τη διαδικασία της επαγόμενης αγγειογένεσης, οι οποίες είναι η δραστικότητα ριβονουκλεάσης, η αποικοδόμηση της βασικής μεμβράνης, η μεταγωγή σήματος, και η μετατόπισή της στον πυρήνα.

Δραστικότητα ριβονουκλεάσης: Η δραστικότητα ριβονουκλεάσης της ANG είναι αρκετές τάξεις μεγέθους (10⁵-10⁶) χαμηλότερη από εκείνη της RNase A. Παραδόξως, αυτή η χαμηλή αλλά μοναδική ριβονουκλεική δραστηριότητα είναι σημαντική για την βιολογική της δραστικότητα (Shapiro R *et al.*, 1986). Τα αμινοξικά κατάλοιπα που είναι σημαντικά για την κατάλυση (His13, Lys40 και His114) είναι καλά συντηρημένα από το ψάρι μέχρι και τον άνθρωπο (Riordan JF, 2001). Εκτεταμένες εργασίες κατευθυνόμενης μεταλλαγμένης έχουν δείξει ότι, μεταλλάγματα αγγειογενίνης με μειωμένη ενζυμική δραστικότητα έχουν όλα μειωμένη αγγειογενετική δραστηριότητα (Shapiro R *et al.*, 1986). Μερικά, αλλά όχι όλα τα μεταλλάγματα που έχουν ενισχυμένη ενζυμική δραστικότητα έχουν και αυξημένη αγγειογενετική δραστηριότητα (Harper JW *et al.*, 1986). Τα κύρια δομικά χαρακτηριστικά στα οποία οφείλεται η μειωμένη δραστικότητα ριβονουκλεάσης της αγγειογενίνης είναι: (i) η παρεμπόδιση της θέσης πρόσδεσης πυριμιδίνης από το κατάλοιπο Gln117, (ii) η ύπαρξη ενός δεσμού υδρογόνου μεταξύ της Thr44 και της Thr80 που καταστέλλει περαιτέρω την αποτελεσματικότητα της θέσης πρόσδεσης πυριμιδίνης, (iii) η απουσία ενός ομόλογου δεσμού υδρογόνου όπως αυτού μεταξύ His119-Asp121, που προάγει την κατάλυση στην RNase A, (iv) η

απουσία ομολόγων των δύο σημαντικών καταλοίπων πρόσδεσης πουρινών που υπάρχουν στην RNase A (Leonidas et al.,1999).

Αποικοδόμηση βασικής μεμβράνης: Εκτός από τη ριβονουκλεϊκή δραστηριότητά της, η σύνδεση της αγγειογενίνης με την ενδοθηλιακή κυτταρική επιφάνεια είναι επίσης αναγκαία για τις βιολογικές λειτουργίες της, ενώ τα αμινοξικά κατάλοιπα 60 έως 68, καθώς και του Asn109 είναι κρίσιμα στη διαδικασία αυτή. Στην RNaseA, η αντίστοιχη αλληλουχία αμινοξέων αυτής της περιοχής είναι πολύ διαφορετική και αποτελεί μια πλευρά της θέσεως πρόσδεσης B2 (Shapiro R et al.,1989). Συνεπώς η ANG προσδένεται στα κύτταρα-στόχους (συμπεριλαμβανομένων των ενδοθηλιακών κυττάρων, των καρκινικών κυττάρων και των κινητικών νευρώνων) αλλά η RNase-A όχι. Μεταλλάξεις αυτών των καταλοίπων, οδηγούν σε απώλεια οποιασδήποτε αγγειογενετικής δραστηριότητας, ενώ η ενζυμική δραστηριότητα παραμένει ανέπαφη.

Κατά τη διάρκεια μιας προσπάθειας για τον προσδιορισμό του υποδοχέα της ANG σε ενδοθηλιακά κύτταρα, βρέθηκε αρχικά μία πρωτεΐνη 42-kDa η οποία αποσπάται από την επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων, ως ένα μόριο που συνδέεται με την αγγειογενίνη (Shapiro R et al.,1992) και αποτελεί την α- ακτίνη των λείων μυών (Shapiro R et al.,1987). Η ακτίνη της κυτταρικής επιφάνειας φαίνεται να εμπλέκεται στην αποικοδόμηση της βασικής μεμβράνης. Μετά από πρόσδεση της αγγειογενίνης στην ακτίνη, μερικά από τα σύμπλοκα αγγειογενίνης-ακτίνης αποκολλούνται από την επιφάνεια του κυττάρου. Στη συνέχεια, αυτό το σύμπλοκο επιταχύνει την καταλυόμενη από τον ιστικό ενεργοποιητή πλασμινογόνου (tPA)- παραγωγή της πλασμίνης από το πλασμινογόνο (Harper JW et al.,1988). Επομένως, μέσω του σχηματισμού συμπλόκου ακτίνης, η αγγειογενίνη προάγει την αποικοδόμηση της βασικής μεμβράνης και του εξωκυττάρου ιστού και έτσι επιτρέπει στα ενδοθηλιακά κύτταρα να διεισδύουν και να μεταναστεύουν εντός του περιαγγειακού ιστού, ένα κύριο χαρακτηριστικό της αγγειογένεσης (Russo N et al.,1994). Επιπλέον, η 1-fibulin, ένα σημαντικό μόριο για την σταθεροποίηση του τοιχώματος των αιμοφόρων αγγείων, συνδέεται με την αγγειογενίνη, υποδηλώνοντας ότι το σύμπλοκο ANG-fibulin-1 διαμορφώνει

τον σχηματισμό και τη σταθεροποίηση νέων αιμοφόρων αγγείων.

Μεταγωγή σήματος, πυρηνική μετατόπιση και rRNA μεταγραφή:

Επειδή η πρόσδεση της αγγειογενίνης στην ακτίνη δεν οδηγεί στη μεταγωγή σήματος εντός του κυττάρου, ένα μόριο 170-kDa ταυτοποιήθηκε αργότερα ως δυνητικός υποδοχέας της αγγειογενίνης και εντοπίστηκε στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων, και εκφράζεται μόνο σε αραιά καλλιεργημένα ενδοθηλιακά κύτταρα που αποκρίνονται στην αγγειογενίνη ($<2 \times 10^4$ κύτταρα/εκ.2) (Hu GF *et al.*,1991).

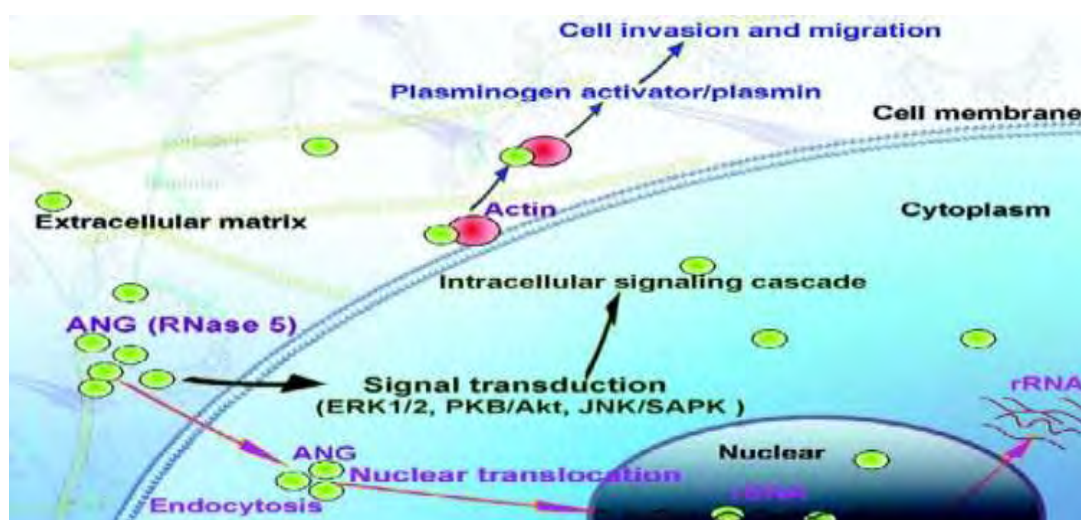
Επιπρόσθετα, η σύγκριση των επιμέρους δεδομένων αλληλουχίας αποκαλύπτουν ομολογία του υποδοχέα ANG με ορισμένους υποδοχείς κινασών τυροσίνης (RTK), υποδηλώνοντας ότι ο υποδοχέας αυτός της αγγειογενίνης μπορεί επίσης να είναι αποτελεί έναν RTK [PCT]. Αν και υπάρχει σχετική έλλειψη γνώσης σχετικά με τους υποδοχείς αγγειογενίνης, έχει βρεθεί ότι ενεργοποιούνται αρκετά σηματοδοτικά μονοπάτια μετά από διέγερση με αγγειογενίνη. Η ενεργοποίησή τους θεωρείται ένας σημαντικός μηχανισμός που οδηγεί σε κυτταρικό πολλαπλασιασμό και περαιτέρω αγγειογένεση. Φαίνεται ότι ο εν δυνάμει 170-kDa υποδοχέας και η ακτίνη δεν εκφράζονται ταυτόχρονα στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων.

Όταν η πληρότητα των κυττάρων είναι περίπου στο 70-80%, η ακτίνη εκφράζεται και δεσμεύεται ειδικά στην αγγειογενίνη (Shapiro R *et al.*,1987).

Αφού τα κύτταρα αρχίζουν να μεταναστεύουν και να εισβάλλουν μέσα στην βασική μεμβράνη, η τοπική πυκνότητα των κυττάρων στην περιοχή των μεταναστευόντων κυττάρων μειώνεται, προκαλώντας έτσι την έκφραση του εν δυνάμει 170-kDa υποδοχέα της αγγειογενίνης για τα υπόλοιπα γειτονικά κύτταρα. Αυτά τα κύτταρα αποκρίνονται στη διέγερση της αγγειογενίνης και συνεπώς θα διαιρούνται για να γεμίσουν το χώρο που δημιουργείται από τα κύτταρα που μεταναστεύουν. Η έκφραση του υποδοχέα μπορεί τότε να ανασταλλεί, εφόσον η κυτταρική πυκνότητα αυξάνεται. Πιθανολογείται ότι αυτή η εξαρτώμενη από την πυκνότητα έκφραση των υποδοχέων, μπορεί να

ρυθμίζει την επαγόμενη από αγγειογενίνη δημιουργία δικτύων μικροσωληνίσκων.

Πυρηνική μετατόπιση: Η ANG έχει αποδειχθεί ότι υφίστανται πυρηνική μετατόπιση σε ενδοθηλιακά κύτταρα (Moroiianu *et al.*,1994), σε καρκινικά κύτταρα (Kishimoto *et al.*, 2005), και σε κινητικούς νευρώνες (Kieran D *et al.*,2008). Το πρώτο βήμα που απαιτείται για την πυρηνική μετατόπιση της εξωγενούς ANG είναι η εσωτερίκευση της πρωτεΐνης, και φαίνεται να εμπλέκεται και ένας υποδοχέας ενδοκυττάρωσης σε αυτή τη διεργασία (Kishimoto *et al.*,2005). Το πυρηνικό σήμα εντοπισμού (NLS), βρίσκεται στο 30-MRRRGL-35 της πρωτεΐνης, με την R33 να είναι κρίσιμη για τη λειτουργία αυτή. Η μέθοδος είναι επίσης ανεξάρτητη των μικροσωληνίσκων και των λυσοσωματίων (Li R *et al.*,1997). Δεδομένου ότι το μοριακό βάρος της ANG είναι μικρότερο από το μέγεθος του πυρηνικού πόρου (50-kDa), ο πιο πιθανός μηχανισμός για την εισαγωγή της ANG στον πυρήνα μπορεί να περιλαμβάνει παθητική διάχυση της ANG μέσω του πυρηνικού πόρου στον πυρήνα και μέσω του NLS παραμονή στον πυρηνίσκο (Lixin R *et al.*,2001). Η πυρηνική μετατόπιση είναι απαραίτητη για τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, δεδομένου ότι θεωρείται ένας τρίτος αγγελιοφόρος και προάγει την ενεργοποίηση γονιδίων καθώς και την επαγωγή της μεταγραφής (εικόνα 7).



Εικόνα 7: Μηχανισμός δράσης της Αγγειογενίνης στην διαδικασία της αγγειογένεσης. Η αγγειογενίνη γνωστή επίσης και ως RNase 5, επάγει την αγγειογένεση κυρίως μέσω 4 μονοπατιών: την ριβονουκλεολυτική της δράση, την αποικοδόμηση της βασικής μεμβράνης, μεταγωγή σήματος και την πυρηνική μετατόπιση.

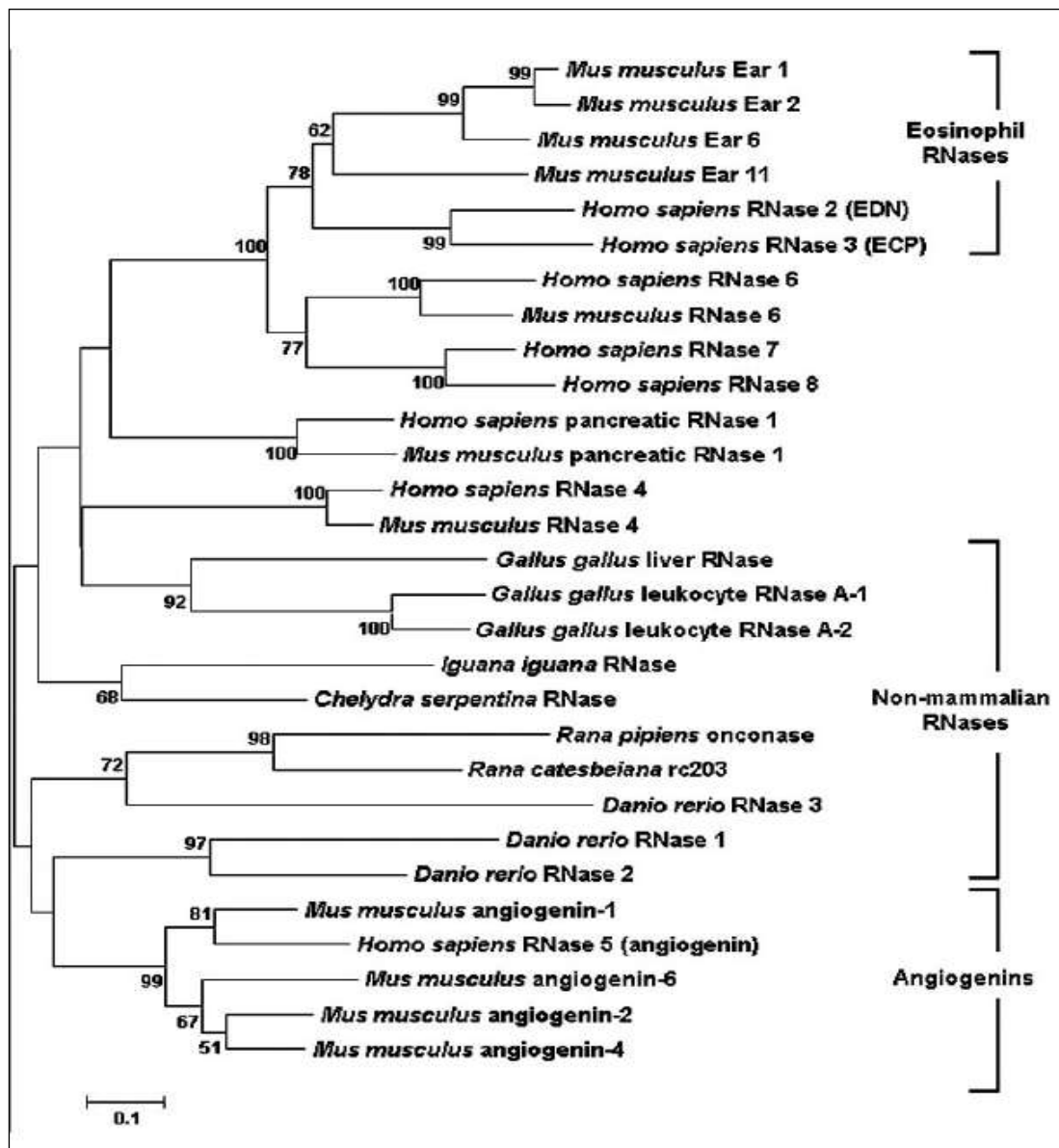
1.8 Η παγκρεατική ριβονουκλεάση A (RNaseA)

Η παγκρεατική ριβονουκλεάση A είναι ίσως η πιο καλά χαρακτηρισμένη από όλες τις γνωστές πρωτεΐνες των θηλαστικών. Πολλά από όσα έχουμε μάθει για τον καταλυτικό της μηχανισμό βοήθησαν στο να καταλάβουμε την εξέλιξη των γονιδίων της υπεροικογένειας των ριβονουκλεασών.

Η ριβονουκλεάση A αρχικά απομονώθηκε από παγκρεατικό ιστό και ήταν το αγαπημένο θέμα των δομικών και λειτουργικών μελετών από το 1950 έως και το 1960. Σε αυτό συνέβαλε η θερμοσταθερότητα που την χαρακτηρίζει και η σχετικά άφθονη συγκέντρωσή της στον παγκρεατικό ιστό. Η παγκρεατική ριβονουκλεάση A είναι μια ενδοριβονουκλεάση μοριακού βάρους 13.7 kDa, η οποία καταλύει την υδρόλυση των φωσφοδιεστερικών δεσμών στις αλυσίδες του RNA μέσω δύο διαδοχικών αντιδράσεων, μιας τρανσφωσφορυλίωσης και μιας υδρόλυσης.

Το 1980 απομονώθηκαν πολλές φαινομενικά μη σχετιζόμενες με την παγκρεατική ριβονουκλεάση A πρωτεΐνες από άλλους ιστούς. Τα γονιδιά τους κλωνοποιήθηκαν και αλληλουχήθηκαν και βρέθηκε τελικά ότι παρουσιάζουν σημαντική ομολογία με την παγκρεατική ριβονουκλεάση A. Οι πρωτεΐνες αυτές έγιναν μέλη της υπεροικογένειας της Ριβονουκλεάσης A. Σε αυτές συμπεριλαμβάνονται και η αγγειογενίνη (ριβονουκλεάση 5), η ηωσινόφιλη κατιονική πρωτεΐνη (ECP: ριβονουκλεάση 3), η ηωσινόφιλη νευροτοξίνη (EDN: ριβονουκλεάση 2) και μερικές άλλες ακόμα κυτταροτοξίνες [Rosenberg 2008]. Ένα φυλογενετικό δέντρο των ριβονουκλεασών αυτής της υπεροικογένειας φαίνεται στην Εικόνα 8.

Όλες οι ριβονουκλεάσες αυτής της υπεροικογένειας στην δραστική τους μορφή έχουν μερικές χαρακτηριστικές αλληλουχίες. Περιέχουν από 6–8 κατάλληλα τοποθετημένες κυστεΐνες που σχηματίζουν δισουλφιδικούς δεσμούς και όλες έχουν 2 ιστιδίνες και μία λυσίνη, όπου τα παραπάνω παρουσιάζουν ένα σταθερό μοτίβο αλληλουχίας (CKXXNTF). Τέλος, κατά κανόνα οι ριβονουκλεάσες αυτής της υπεροικογένειας βρίσκονται σε ένα μόνο εξόνιο στο χρωμόσωμα 14 [Rosenberg 2008].



Εικόνα 8: Φυλογενετικό δέντρο της υπεροικογένειας της ριβονουκλεάσης A.

Η παγκρεατική ριβονουκλεάση Α από βοοειδή, κατέχει εξέχουσα θέση στη μοριακή βιολογία. Ήταν το πρώτο ένζυμο και η τρίτη πρωτεΐνη που αλληλουχήθηκε, ενώ η κρυσταλλογραφική δομή της προσδιορίστηκε πριν από πενήντα χρόνια. Έχουν καθοριστεί πάνω από εκατό ομόλογα της RNaseA σε όλα τα τετράποδα, ενώ πρόσφατα προσδιορίστηκε μια υπεροικογένεια ριβονουκλεασών στα μηρυκαστικά, στην οποία κατέχει εξέχουσα θέση η RNaseA.

Η αξιοσημείωτη σταθερότητα του ενζύμου και η δυνατότητα να απομονώνεται εύκολα και σε μεγάλες ποσότητες, το καθιστά ένα ιδιαίτερα κατάλληλο μοντέλο για μελέτες πρωτεϊνών. Η ριβονουκλεάση Α αποτέλεσε το πρώτο μοντέλο πρωτεΐνης για πολλές φασματοσκοπικές μεθόδους προσδιορισμού δομής.

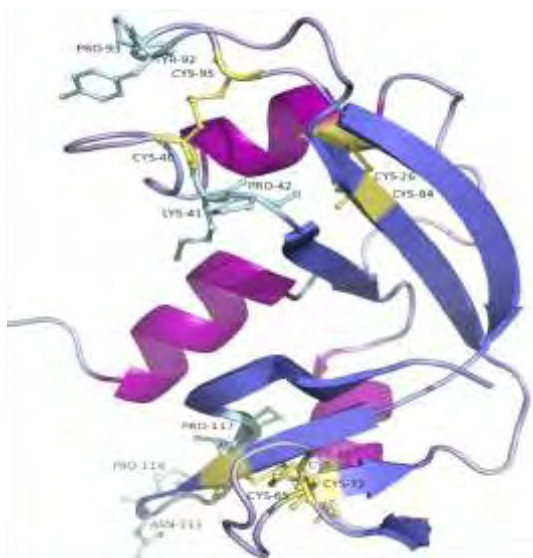
1.8.1 Η Δομή της RNase A

Η RNaseA είναι μια ενδονουκλεάση που καταλύει τον αποπολυμερισμό μονόκλωνων mRNA, διασπώντας τους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς μεταξύ γειτονικών ριβονουκλεοτιδίων, που είναι συνδεδεμένα κυρίως με πυριμιδίνες. Πρόκειται για μια μικρή πρωτεΐνη με μοριακό βάρος 13.686 Da, ενώ η πολυπεπτιδική της αλυσίδα αποτελείται από 124 κατάλοιπα, τα περισσότερα από τα οποία είναι βασικά (εικόνα 9).



Εικόνα 9 : Η δομή της παγκρεατικής ριβονουκλεάσης Α.

Η δευτεροταγής δομή της RNaseA (Εικόνα 9) αποτελείται από τρεις α-έλικες και επτά αντιπαράλληλα β-φύλλα, ενώ σχηματίζονται τέσσερις δισουλφιδικοί δεσμοί μεταξύ 8 καταλοίπων Cys : 26-84, 40-95, 58-110, 67-72.. Το N-τελικό της άκρο περιλαμβάνει μια α-αλυσίδα, ενώ συνδέεται με το κύριο σώμα της πρωτεΐνης με έναν ευκίνητο βρόχο. Το C-τελικό άκρο σχηματίζει μια φουρκέτα που αποτελείται από δυο β-φύλλα και περιέχει κυρίως υδρόφοβα κατάλοιπα σε αντίθεση με το N-τελικό άκρο (εικόνα 10).



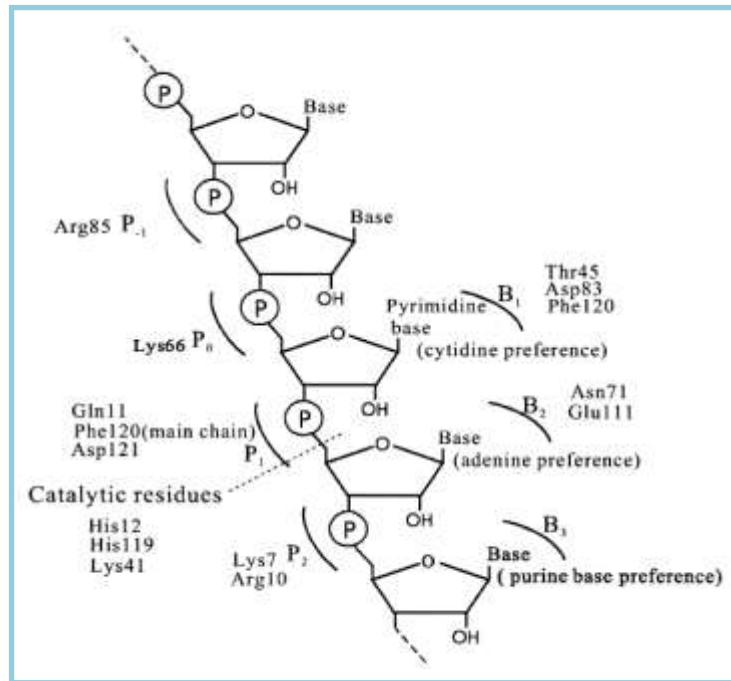
Εικόνα 10 : Οι δισουλφιδικοί δεσμοί και οι πεπτιδικοί X-Pro της βόειας παγκρεατικής ριβονουκλεάσης A.

1.8.2 Το ενεργό κέντρο της RNase A- Καταλυτική δράση

Το ενεργό κέντρο του ενζύμου είναι υπεύθυνο για την αναγνώριση των αρνητικά φορτισμένων φωσφορικών ομάδων του υποστρώματος RNA. Έχει ειδικότητα πρόσδεσης στις πυριμιδίνες της 3' θέσης του φωσφοδιεστερικού δεσμού που υδρολύεται και στις πουρίνες της 5' θέσης που συνήθως ακολουθείται από γουανίνη.

Το ενεργό κέντρο της RNaseA σχηματίζεται από τρία κύρια κατάλοιπα: την His 12, την His 119 και τη Lys 41. Οι δύο His, όπως περιγράφεται παρακάτω, είναι υπεύθυνες για την υδρόλυση του φωσφοδιεστερικού δεσμού,

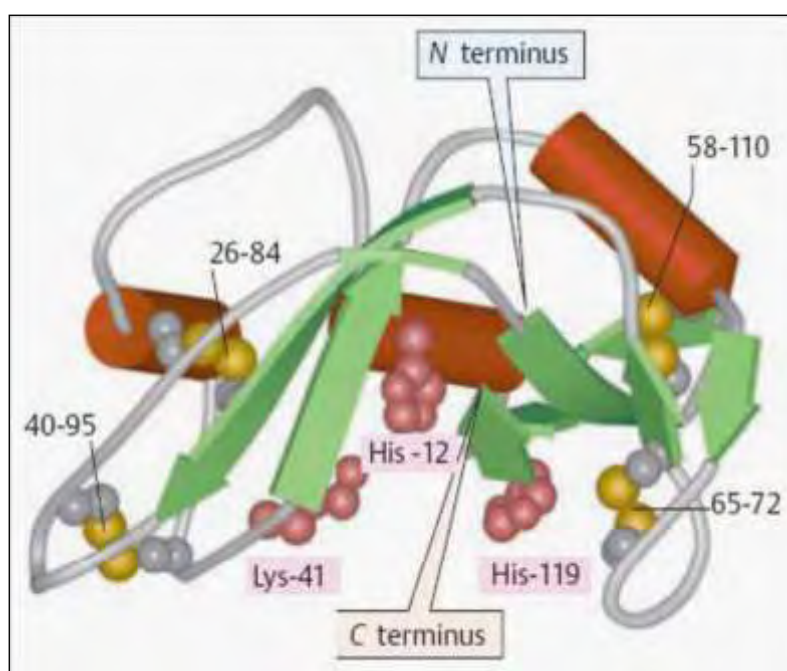
ενώ η Lys λόγω του θετικού της φορτίου αλληλεπιδρά με τις αρνητικά φορτισμένες φωσφορικές ομάδες. Αντικατάσταση των His 12 και His 119 από κατάλοιπα Asp 12 ή Glu 12, είχε ως αποτέλεσμα όχι μόνο τη μείωση της καταλυτικής δράσης του ενζύμου, αλλά και την αποσταθεροποίησή του, γεγονός που αποδεικνύει τον κυρίαρχο ρόλο των δυο αυτών καταλοίπων στη λειτουργία της ενδονουκλεάσης (εικόνα 11).



Εικόνα 11 : Απεικόνιση των περιοχών πρόσδεσης του υποστρώματος.

Οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις των αμινοξέων του ενεργού κέντρου δεν είναι αποκλειστικά υπεύθυνες για την πρόσδεση του υποστρώματος. Υπάρχουν κατάλοιπα σε μη καταλυτικές υπομονάδες της RNaseA που αλληλεπιδρούν με τις φωσφορικές ομάδες του υποστρώματος. Έτσι, εκτός από το υποκέντρο ρ_1 , που αποτελεί το ενεργό κέντρο, υπάρχουν δύο ακόμα υποκέντρα, το ρ_2 που περιλαμβάνει τα βασικά κατάλοιπα Lys 7 και Arg 10 και το ρ_0 που περιλαμβάνει την Lys 66 (Εικόνα 10). Στο ρ_2 προσδένονται οι φωσφορικές ομάδες που βρίσκονται γειτονικά της 3' θέσης κοπής, ενώ στο ρ_0 προσδένονται οι φωσφορικές ομάδες που βρίσκονται γειτονικά της 5' θέσης. Οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις του υποκέντρου ρ_2 είναι σημαντικές τόσο στην κατάλυση όσο και στη δραστηκότητα

ενδονουκλεάσης, ενώ το υποκέντρο p_o συνεισφέρει μόνο στην πρόσδεση του RNA (εικόνα 12).



Εικόνα 12 : Το καταλυτικό κέντρο της RNaseA.

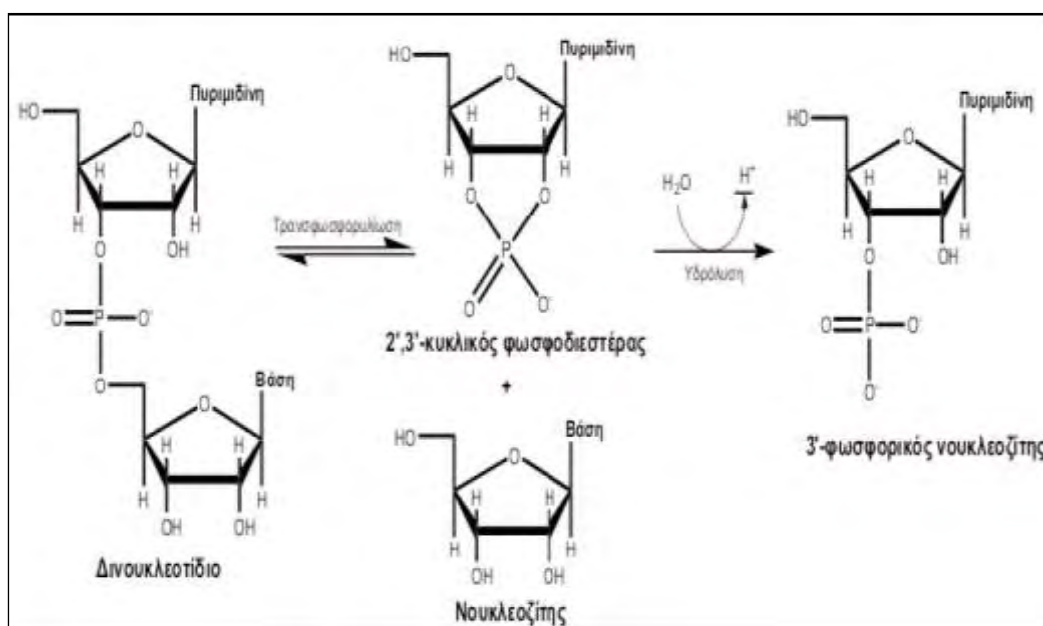
1.8.3 Καταλυτικός μηχανισμός

Όπως έχει προαναφερθεί, η ριβονουκλεάση A καταλύει την διάσπαση φωσφοδιεστερικών δεσμών του RNA. Η υδρόλυση που καταλύεται από την ριβονουκλεάση A γίνεται σε δύο στάδια, μέσω ενός 2',3'-κυκλικού φωσφοδιεστέρα (Εικόνα 13). Στο πρώτο στάδιο, γίνεται η τρανσφωσφορυλίωση του 3',5'-φωσφοδιεστερικού δεσμού από την 5' θέση του ενός νουκλεοτιδίου στην 2' θέση του γειονικού. Αποτέλεσμα είναι η διάσπαση του δεσμού του υποστρώματος, ο σχηματισμός ενός 2',3'-κυκλικό-φωσφοδιεστέρα με ελεύθερο το 3'-φωσφορικό άκρο και η απελευθέρωση μιας 5'-OH ομάδας. Στο δεύτερο στάδιο, γίνεται η υδρόλυση του 2',3'-κυκλικού-φωσφοδιεστέρα δίνοντας μια 3'-μονοφωσφορική ομάδα [Mohamed Moussaoui et al,1998].

Η αντίδραση τρανσφωσφορυλίωσης είναι ταχύτερη και αντιστρεπτή σε σχέση με την υδρόλυση, η οποία είναι πρακτικά μη αντιστρεπτή. Ο 2',3'-

κυκλικός-φωσφοδιεστέρας δεν είναι ένα ενδιάμεσο, αλλά κανονικό προϊόν καθώς απελευθερώνεται μετά την τρανσφωσφορυλίωση. Το στάδιο της υδρόλυσης δεν ξεκινά παρά μόνο όταν δεν υπάρχει πλέον υπόστρωμα για τρανσφωσφορυλίωση [Stryer et al, 2002].

Το νουκλεοτίδιο, το οποίο βρίσκεται στην 3'-πλευρά του δεσμού του υποστρώματος που διασπάται από το ένζυμο πρέπει να είναι μια πυριμιδίνη, γιατί ο πουρινικός δακτύλιος είναι πολύ μεγάλος για να χωρέσει στο ενεργό κέντρο χωρίς να το στρεβλώσει.



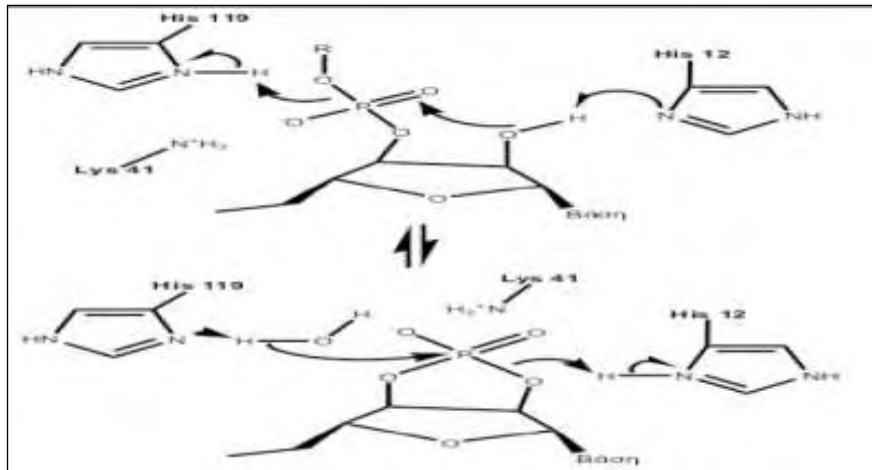
Εικόνα 13 : Η αντίδραση που καταλύεται από την ριβονουκλεάση Α.

Όπως είδαμε, τα κατάλοιπα που παίζουν ρόλο στην κατάλυση είναι η His12, His119 και η Lys41. Η αντίδραση αρχίζει με την προσβολή του φωσφόρου του δεσμού που διασπάται από το 2'-Ο με τον ακόλουθο τρόπο: πρώτα, η μη ιοντισμένη μορφή της His12 προσλαμβάνει ένα πρωτόνιο από το 2'-OH, το οποίο αυξάνει τον πυρηνόφιλο χαρακτήρα αυτού του Ο. Την ίδια στιγμή η πρωτονιωμένη μορφή της His119 παρέχει το πρωτόνιό της στο 5'-Ο, και το 2'-Ο σχηματίζει δεσμό με το Ρ, ο οποίος μεταβατικά σχηματίζει δεσμούς με πέντε άτομα οξυγόνου. Αυτή η πεντασθενής μεταβατική κατάσταση σταθεροποιείται ηλεκτροστατικά από τη θετικά φορτισμένη

πλευρική αλυσίδα της Lys41 που βρίσκεται πολύ κοντά. Ο δεσμός μεταξύ P και του 5'-O διασπάται όταν το πρωτόνιο από την His119 έχει μεταφερθεί πλήρως σε αυτό το άτομο O. Την ίδια στιγμή, σχηματίζεται μεταξύ του P και του 2'-O παράγοντα το 2',3'-κυκλικό ενδιάμεσο.

Το δεύτερο στάδιο αυτής της αντίδρασης, που είναι η υδρόλυση του κυκλικού ενδιαμέσου, είναι σχεδόν μία αντίστροφη πορεία του πρώτου σταδίου με τη διαφορά ότι ένα μόριο ύδατος αντικαθιστά το 5'-O που είχε απομακρυνθεί. Τώρα ο δότης πρωτονίων είναι η His12 και ο δέκτης πρωτονίων είναι η His119. Η παρουσία της His στο ενεργό κέντρο πολλών ενζύμων οφείλεται στην ικανότητα της να δρα είτε ως οξύ είτε ως βάση σε φυσιολογικό pH.

Η γεωμετρία της πεντασθενούς μεταβατικής κατάστασης έχει ενδιαφέρον. Όταν ο φώσφορος γίνει πεντασθενής, η γεωμετρία τετραέδρου του φωσφόρου στο RNA αλλάζει σε μια τριγωνική διπυραμίδα. Ο φώσφορος καταλαμβάνει το κέντρο, τρία άτομα οξυγόνου βρίσκονται στο ισημερινό επίπεδο και δύο στις κορυφές της διπυραμίδας. Κατά τον σχηματισμό του κυκλικού ενδιαμέσου, το απερχόμενο 5'-O βρίσκεται στη μία κορυφή και το εισερχόμενο 2'-O βρίσκεται στην άλλη κορυφή της διπυραμίδας. Κατά την υδρόλυση αυτού του ενδιαμέσου ένα άτομο O από το νερό βρίσκεται στη μία κορυφή και το 2'-O βρίσκεται στην άλλη. Σε κάθε στάδιο, μία κορυφή καταλαμβάνεται από την επιτιθέμενη πυρηνόφιλη ομάδα και η άλλη κορυφή από την ομάδα που απομακρύνεται (εικόνα 14) [Stryer et al,2002].



Εικόνα 14: Ο μηχανισμός κατάλυσης

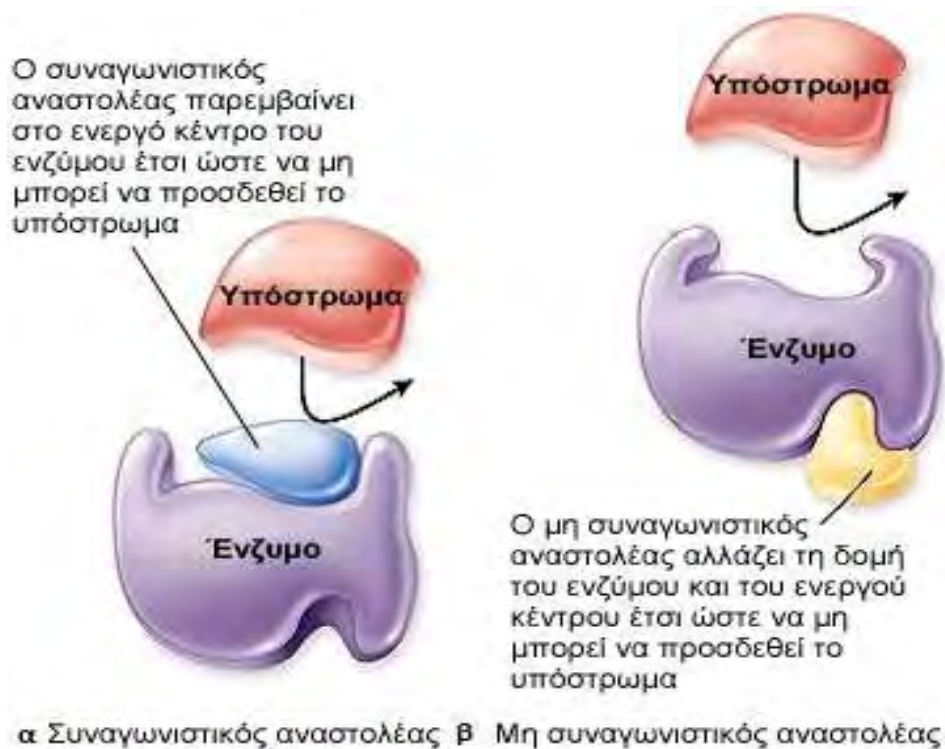
1.9 Ενζυμική αναστολή

Η ενζυμική αναστολή μπορεί να είναι είτε αντιστρεπτή είτε μη αντιστρεπτή. Ένας μη αντιστρεπτός αναστολέας διαχωρίζεται πολύ αργά από το ένζυμο στόχο, διότι συνδέεται πολύ ισχυρά με το ένζυμο, είτε ομοιοπολικά είτε μη ομοιοπολικά.

Η αντιστρεπτή αναστολή, σε αντίθεση με τη μη αντιστρεπτή αναστολή, χαρακτηρίζεται από έναν ταχύ διαχωρισμό του συμπλόκου ενζύμου – αναστολέα. Στη συναγωνιστική αναστολή το ένζυμο μπορεί να προσδένει υποστρώματα (σχηματίζοντας το σύμπλοκο ES) ή αναστολέα (EI), αλλά όχι και τα δύο (ESI). Ο συναγωνιστικός αναστολέας μοιάζει με το υπόστρωμα και προσδέεται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου (Εικόνα 15). Ως εκ τούτου, το υπόστρωμα εμποδίζεται από το να προσδεθεί στο ίδιο ενεργό κέντρο. Ένας συναγωνιστικός αναστολέας ελαττώνει την ταχύτητα της κατάλυσης με το να ελαττώνει την αναλογία των μορίων του ενζύμου που είναι προσδεμένα στο υπόστρωμα. Σε μια οποιαδήποτε συγκέντρωση του αναστολέα, η συναγωνιστική αναστολή μπορεί να ξεπεραστεί με αύξηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος. Κάτω από αυτές τις συνθήκες το υπόστρωμα συναγωνίζεται τον αναστολέα για το ενεργό κέντρο. Στη μη συναγωνιστική αναστολή, η οποία είναι επίσης αντιστρεπτή, ο αναστολέας και το υπόστρωμα

μπορούν να προσδένονται ταυτόχρονα σε ένα μόριο ενζύμου σε διαφορετικές περιοχές πρόσδεσης.

Ένας μη συναγωνιστικός αναστολέας δρα ελαττώνοντας τον αριθμό μετατροπής ενός ενζύμου, παρά με το να ελαττώνει την αναλογία μορίων του ενζύμου που είναι προσδεμένα στο υπόστρωμα. Η μη συναγωνιστική αναστολή, σε αντίθεση με τη συναγωνιστική αναστολή, δεν μπορεί να ξεπεραστεί με αύξηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος. Ένα πιο περίπλοκο σχήμα, που ονομάζεται μεικτή αναστολή παράγεται όταν ένας αναστολέας και επηρεάζει την πρόσδεση του υποστρώματος και μεταβάλλει τον αριθμό μετατροπής του ενζύμου.

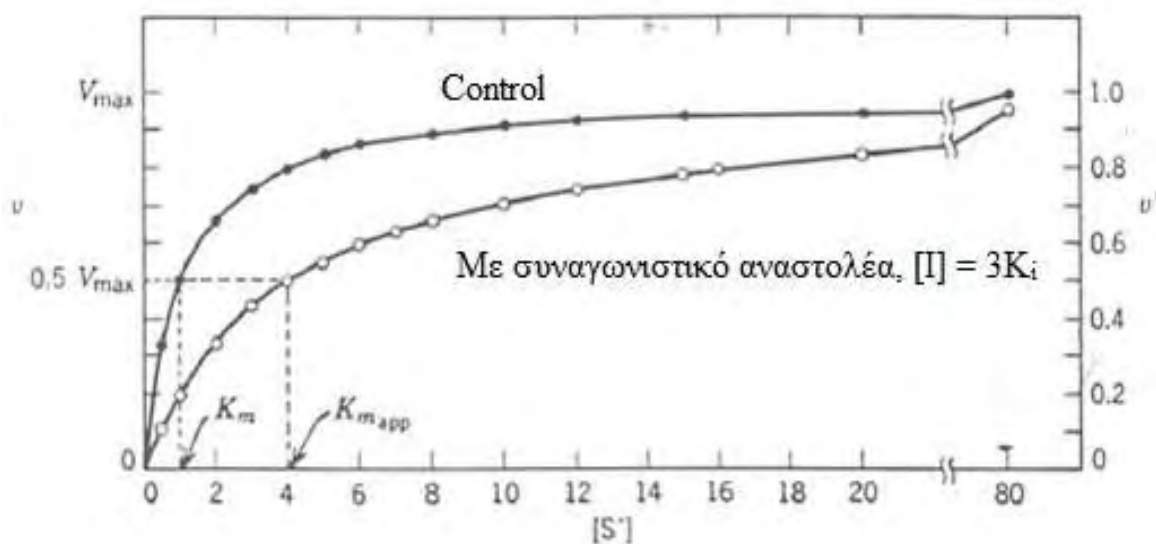


Εικόνα 15 α) Συναγωνιστική αναστολή: πρόσδεση του αναστολέα στο ενεργό κέντρο του ενζύμου με αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της πρόσδεσης του υποστρώματος, β) Μη συναγωνιστική αναστολή: πρόσδεση του αναστολέα σε άλλη θέση και όχι στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Με αυτό τον τρόπο αλλάζει η δομή του ενζύμου και η πρόσδεση του υποστρώματος στο ενεργό κέντρο του είναι αδύνατη.

Προκειμένου να γίνει μια διάκριση στο είδος της αναστολής θα πρέπει να γίνουν κινητικές μελέτες. Ουσιαστικά θα πρέπει να γίνουν οι μετρήσεις των ταχυτήτων της κατάλυσης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρώματος και αναστολέα. Στη συναγωνιστική αναστολή, ο αναστολέας συναγωνίζεται με το υπόστρωμα για το ενεργό κέντρο. Η σταθερά αναστολής (K_i) δίνεται από τη σχέση: $K_i = [E][I]/[EI]$. Όταν υπάρχει συναγωνιστικός αναστολέας, η ταχύτητα μπορεί να φτάσει τη μέγιστη τιμή (V_{max}), όπως παρουσιάζεται και στην εικόνα 16, διότι αυξάνοντας την ποσότητα του υποστρώματος η αναστολή μπορεί να υπερνικηθεί. Εντούτοις, η φαινομενική τιμή της K_M , μεταβάλλεται. Αυτή η νέα τιμή της K_M , που καλείται K_M^{app} είναι αριθμητικά ίση με

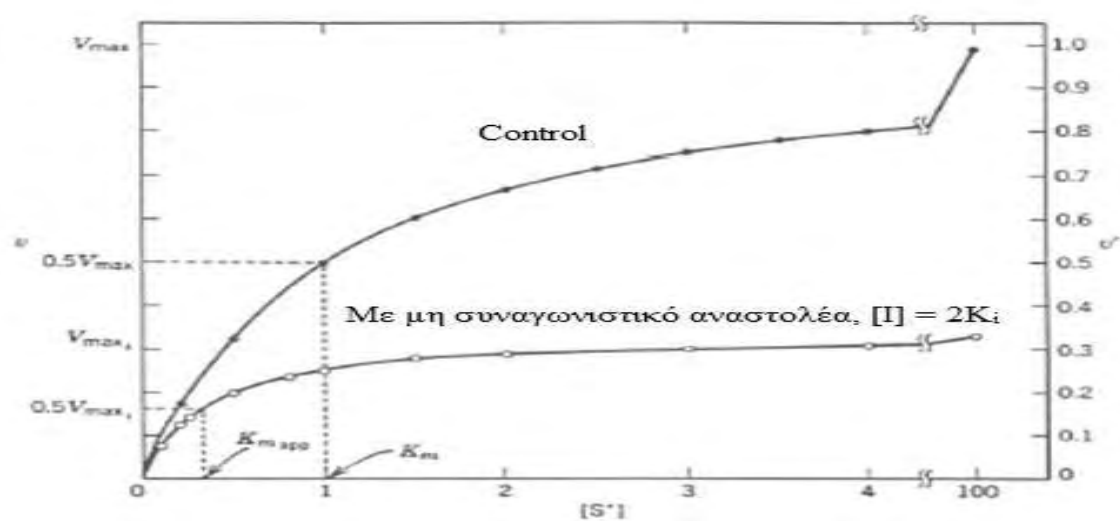
$$K_M^{app} = K_M (1 + [I]/K_i),$$

όπου $[I]$ είναι η συγκέντρωση του αναστολέα και K_i είναι η σταθερά διάστασης του συμπλόκου ενζύμου – αναστολέα. Καθώς αυξάνεται η τιμή $[I]$, αυξάνεται και η τιμή K_M^{app} . Ένα ένζυμο θα έχει την ίδια V_{max} όταν υπάρχει συναγωνιστικός αναστολέας, όπως και όταν δεν υπάρχει.



Εικόνα 16 : Διάγραμμα της ταχύτητας μιας ενζυμικής αντίδρασης ως προς τη συγκέντρωση του υποστρώματος παρουσία και απουσία συναγωνιστικού αναστολέα

Στη μη συναγωνιστική αναστολή (Εικόνα 17), το υπόστρωμα μπορεί να προσδένεται στο σύμπλοκο ενζύμου – αναστολέα. Εντούτοις, το σύμπλοκο ενζύμου–αναστολέα –υποστρώματος δεν παράγει προϊόν. Η τιμή της V_{max} ελαττώνεται σε μια νέα τιμή που καλείται V_{max}^{app} ενώ δεν αλλάζει η τιμή της K_M . Στην ουσία ο αναστολέας ελαττώνει τη συγκέντρωση του λειτουργικού ενζύμου. Το ένζυμο που απομένει συμπεριφέρεται ως ένα περισσότερο αραιό διάλυμα του ενζύμου. Η μη συναγωνιστική αναστολή δεν μπορεί να υπερνικηθεί με την αύξηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος (Stryer, et al, 2002)



Εικόνα 17 : Διάγραμμα της ταχύτητας μιας ενζυμικής αντίδρασης ως προς τη συγκέντρωση του υποστρώματος παρουσία και απουσία μη συναγωνιστικού αναστολέα.

1.10 Φυτικά εκχυλίσματα ως εν δυνάμει αναστολείς της RNaseA και κατ' επέκταση της αγγειογενίνης

Τα φυτικά εκχυλίσματα και οι ευεργετικές τους δράσεις στο ανθρώπινο σώμα μελετούνται από την αρχαιότητα. Τα εκχυλίσματα σταφυλιών συγκεκριμένα, και τα παράγωγά του (χυμός) έχουν μελετηθεί ευρέως λόγω των ευεργετικών επιδράσεων που προσδίδουν στην ανθρώπινη υγεία [Apostolou et al 2013]. Στην παρούσα εργασία ασχοληθήκαμε με τις πιθανές ευεργετικές ιδιότητες σε αντικαρκινικές θεραπείες των υποπροϊόντων αμπελοκομίας (*Vitisvinifera*).

Υπάρχουν λίγες μελέτες εκχυλισμάτων που έχουν ως αντικείμενο εκχυλίσματα από στελέχη σταφυλιού. Συνήθως αντικείμενο των μελετών αυτών είναι τα κύρια παράγωγα του σταφυλιού: καρπός, χυμός, οίνος. Ελάχιστες, προς το παρόν, είναι οι μελέτες που σχετίζονται με μέρη του σταφυλιού τα οποία δεν μπορούν να καταναλωθούν και τις περισσότερες φορές αποτελούν παραπροϊόντα της εκάστοτε βιομηχανικής επεξεργασίας σταφυλιού (πχ οινοποίηση) όπως είναι τα κοτσάνια του ή τα κουκούτσια του.

1.10.1 Εκχυλίσματα σταφυλιών

Γενικά, έχουν πραγματοποιηθεί μελέτες σε εκχυλίσματα που προέρχονται από ελληνικές ποικιλίες *Vitisvinifera* με ποικίλα αντικείμενα:

- την εκτίμηση του συνόλου του πολυφαινολικού περιεχομένου (TPC)
- τον προσδιορισμό των πολυφαινολών που υπάρχουν σε αυτά
- την αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής τους δράσης
- την προστασία έναντι ROS επαγόμενης βλάβης του DNA
- την αναστολή της ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων του ήπατος (HepG2), και του τραχήλου της μήτρας (HeLa).

Το *Vitisvinifera* (σταφύλι), μία από τις μεγαλύτερες καλλιέργειες στον κόσμο, ήταν μέρος της ανθρώπινης διατροφής από την αρχαιότητα. Εκτιμάται ότι τα συνολικά ποσά της παραγωγής σταφυλιών ήταν πάνω από 60 εκατομμύρια τόνους. Κατά τα τελευταία χρόνια, εκχυλίσματα σταφυλιών και κρασί αποτελούν το κέντρο της προσοχής πολλών μελετών σχετικά με τις ευεργετικές επιδράσεις τους ανθρώπινη υγεία. Για παράδειγμα, ερευνητικές ομάδες έχουν δείξει ότι εκχυλίσματα σταφυλιών παρουσίασαν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση και εμπόδισαν αντιδρώντα είδη οξυγόνου (ROS) που προκαλούν βλάβη του DNA. Όπως είναι γνωστό, η υπερβολική παραγωγή των ROS στον οργανισμό μπορεί να οδηγήσει σε μια σειρά από εκφυλιστικές ασθένειες όπως ο καρκίνος, τα καρδιαγγειακά νοσήματα και νευρο-εκφυλιστικές ασθένειες, αλλά και η πρόωρη γήρανση και η βλάβη του DNA [Apostolou et al 2013].

Διαφορετικοί μοριακοί μηχανισμοί έχουν προταθεί για τις προστατευτικές επιδράσεις των εκχυλισμάτων των σταφυλιών, όπως είναι η επαγωγή της απόπτωσης μέσω της διαφοροποίησης των ρυθμιστών τόσο της σηματοδότησης των κυττάρων όσο και του κυτταρικού κύκλου, η αναστολή των ενζύμων με καθοριστικό ρόλο στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (π.χ. ανθρώπινη τοποϊσομεράση Ι) και η αναστολή της αγγειογένεσης. Επιπλέον, εκχυλίσματα σταφυλιών εμφανίζονται να προλαμβάνουν την εμφάνιση καρδιαγγειακών νόσων, όπως επίσης παρουσιάζουν αντιμικροβιακή, αντιυπερτασική, και κατά του έλκους δραστηριότητα.

Αξίζει να σημειωθεί, ότι τα συμπληρώματα διατροφής που αναφέρονται ως «εκχυλίσματα σπόρων σταφυλιού» καταναλώνονται σε όλο τον κόσμο λόγω των ευεργετικών τους ιδιοτήτων στην ανθρώπινη υγεία. Ωστόσο, οι περισσότερες μελέτες που αφορούν σταφύλια, αναφέρονται σε εκχυλίσματα από τη φλούδα, τους σπόρους, τον χυμό και το πυρηνέλαιο. Από την άλλη πλευρά, υπάρχουν μόνο λίγες μελέτες που αναφέρονται σε εκχυλίσματα από σπόρους, τσαμπιά και στέμφυλα, ελάχιστα μελετημένα υποπροϊόντα που παράγονται σε μεγάλες ποσότητες (περίπου 5% του αρχικού σταφυλιού) κατά τη διάρκεια της διαδικασίας οινοποίησης, καθιστώντας την εκμετάλλευσή τους ενδιαφέρων στόχο της έρευνας. Για παράδειγμα, προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι οι μίσχοι των σταφυλιών είναι πλούσιοι σε πολυφαινόλες, όπως φλαβονοειδή, στιλβένια, και φαινολικά οξέα, τις πιο σημαντικές φυτοχημικές ενώσεις που βρίσκονται στα σταφύλια [Apostolou et al, 2013].

Υποπροϊόντα σταφυλιού που προέρχονται από τη διαδικασία οινοποίησης χρησιμοποιούνται συνήθως για εκτροφή των ζώων και για παρασκευή φυσικών οργανικών λιπασμάτων (κομποστοποίηση) που αποτελούν διαδικασίες περιορισμένου οικονομικού ενδιαφέροντος. Επιπλέον, τα απόβλητα οίνου, προκαλούν περιβαλλοντικά προβλήματα, με αποτέλεσμα η ενδεχόμενη εκμετάλλευσή τους ως συμπληρώματα διατροφής ή ως μια πηγή υψηλής προστιθέμενης αξίας σε πολυφαινόλες είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα λόγω του ότι συνδυάζει ένα κερδοφόρο εγχείρημα με την προστασία του περιβάλλοντος στις ζώνες παραγωγής κρασιού.

Ως εκ τούτου, ο κύριος στόχος της παρούσας μελέτης είναι η εξέταση εκχυλισμάτων από σπόρους, τσαμπιά και στέμφυλα από τις πιο σημαντικές Ελληνικές ποικιλίες σταφυλιού για την ικανότητα τους να αναστέλλουν το ένζυμο RNaseA με σκοπό να μελετηθούν ως εν δυνάμει αντικαρκινικά φάρμακα.

Όπως είναι γνωστό, η γεωγραφική περιοχή, συμπεριλαμβανομένων των εδαφικών και κλιματικών συνθηκών, επηρεάζει το φαινολικό περιεχόμενο των σταφυλιών, λόγω της επιρροής τους στη βιοχημική σύνθεση των ενώσεων αυτών, και κατά συνέπεια των βιολογικών τους ιδιοτήτων. Ως εκ τούτου καθίσταται σαφές πως η έρευνα των τοπικών ποικιλιών είναι καίρια και καθοριστική [Apostolou et al 2013].

1.10.2 Σταφύλια-προέλευση και προετοιμασία εκχυλισμάτων

Τα δείγματα που μελετήθηκαν ήταν εκχυλίσματα από σπόρους σταφυλιού, στέμφυλα και στελέχη που λαμβάνεται από μερικές από τις πιο αντιπροσωπευτικές κόκκινες ποικιλίες που καλλιεργούνται στην Ελλάδα (Μοσχόμαυρο, Μαυροτράγανο, Μανδηλάρια).

Τα δείγματα ελήφθησαν από το νησί της Σαντορίνης, την περιοχή της Θεσσαλίας (περιοχή Τυρνάβου) της Δυτικής Μακεδονίας το νησί της Κεφαλονιάς και της Κρήτης [Apostolou et al 2013].



***Εικόνα 18 :** Ποικιλίες σταφυλιών από αριστερά: Μανδηλάρια, Μαυροτράγανο, Μοσχόμαυρο.*

Αφαιρέθηκαν χειροκίνητα οι βλαστοί και οι σπόροι από τους καρπούς του σταφυλιού, οι καρποί ζυγίστηκαν, αποξηράνθηκαν μέσω ψύχους (freeze-dried), επεξεργάστηκαν μηχανικά ώστε να αλεσθούν (millpowdered), και τα εκχυλίσματα σε μορφή σκόνης πλέον αποθηκεύτηκαν σε καταψύκτη. Βόστρυχοι και γίγαρτα (κοτσάνια και σπέρματα) ελήφθησαν άμεσα μέσω χειροκίνητου διαχωρισμού κατά τη διάρκεια των διαδικασιών αποβοστρύχωσης και εκκοκκίσεως. Αυτά τα δείγματα αποξηράνθηκαν μέσω αέρα, επεξεργάστηκαν μηχανικά ώστε να αλεσθούν, και αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία δωματίου [Apostolou et al, 2013].

1.10.3 Προετοιμασία εκχυλισμάτων

(Η διαδικασία της επεξεργασίας των δειγμάτων έγινε από την ερευνητική ομάδα του καθ. Σ. Χαρουτουιαν στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.)

Πενήντα γραμμάρια αποξηραμένου δείγματος (σπόροι σταφυλιών, τα υπολείμματα, ή σπέρματα/καρποί σε σκόνη) εναποτέθηκε σε ένα μίγμα 200 mL μεθανόλης (MeOH)/H₂O/1.0N HCl (90:9.5:0.5 v /v) και επεξεργάστηκε με υπερήχους σε ένα λουτρό υπερήχων για 10 λεπτά. Ο διαλύτης διαχωρίστηκε με διήθηση, και το υπόλοιπο στερεό επανα-εκχυλίσθηκε τρεις επιπλέον φορές, χρησιμοποιώντας τον ίδιο διαλύτη μέσω της ίδιας διαδικασίας.

Τα εκχυλίσματα, έπειτα, εξατμίστηκαν υπό κενό, με αποτέλεσμα την παραγωγή ενός εναιωρήματος, το οποίο διαλύθηκε σε 30 mL MeOH/H₂O(1:1) και φυγοκεντρήθηκε για 10 λεπτά (7000 rpm). Το υπερκείμενο υγρό εκχυλίσθηκε με πετρελαϊκό αιθέρα (3x30 mL) με σκοπό την απομάκρυνση των λιπιδίων και συμπυκνώθηκε υπό κενό. Το υπόλειμμα που απέμεινε χύθηκε σε 30ml άλμης και εκχυλίσθηκε επανειλημμένα με οξικό αιθυλεστέρα (EtOAc, 4x30 mL). Έτσι, όλα τα σάκχαρα παρέμειναν στην υδατική φάση. Στη συνέχεια, τα συνθετικά οργανικά στρώματα ξηράνθηκαν πάνω από άνυδρο θειικό μαγνήσιο και εξατμίστηκαν υπό κενό. Τέλος το παραμένον στερεό ζυγίστηκε και διαλύθηκε σε DMSO 100% (το κάθε 1mg διαλύθηκε σε 1000μl DMSO 100%) και στη συνέχεια ρυθμίστηκε το pH 6,8 (πεχαμετρικό χαρτί) με

διάλυμα 0,1M NaOH. Για να αποφευχθεί η υποβάθμιση στην πολυφαινολική σύσταση, όλες οι προαναφερθείσες δραστηριότητες εκτελέστηκαν απουσία άμεσου ηλιακού φωτός και σε θερμοκρασίες κάτω των 35°C [Apostolou et al, 2013].

Σκοπός της Εργασίας

Σε αρκετές έρευνες η RNase A αποτελεί μοντέλο για τη μελέτη μελών της υπεροικογένειας των ριβονουκλεασών. Όπως αναπτύξαμε σε προηγούμενα κεφάλαια οι κύριοι λόγοι που καθιστούν την RNase A προσφιλές μοντέλο είναι αφενός η αξιοσημείωτη σταθερότητα της και η ευκολία καθαρισμού της και αφετέρου ο υψηλός βαθμός συντήρησης του ενεργού κέντρου του ενζύμου, σε σχέση με τα άλλα μέλη της υπεροικογένειας.

Σκοπός της παρούσας εργασίας αποτελεί η μελέτη της επίδρασης πολυφαινολικών εκχυλισμάτων αμπέλου (*vitisvinifera*), των ποικιλιών Μανδηλάρια, Μαυροτράγανου και Μοσχόμαυρου στην λειτουργία του ενζύμου ριβονουκλεάση A και κατά συνέπεια σε μετέπειτα μελέτες στη λειτουργία του ενζύμου αγγειογενίνη. Η πειραματική διαδικασία αφορούσε την κινητική μελέτη του ενζύμου RNaseA παρουσία των εκχυλισμάτων αυτών καθώς και πρωταρχικά πειράματα απομόνωσης και καθαρισμού της ανασυνδυασμένης ανθρώπινης αγγειογενίνης (hAng).

Απώτερος στόχος της έρευνας είναι η ενδεχόμενη εύρεση νέων μορίων βιο-ιατρικού ενδιαφέροντος, που πιθανών βρίσκονται στα εκχυλίσματα της αμπέλου, και την αξιοποίηση τους στο σχεδιασμό νέων εν δυνάμει ογκοκατασταλτικών φαρμάκων.

Σχεδιασμός Πειραματικού Πρωτοκόλλου – Μέθοδοι – Υλικά και Όργανα

Στην παρούσα ενότητα παρουσιάζονται διεξοδικά οι μέθοδοι που εφαρμόστηκαν για την επίτευξη των ερευνητικών στόχων καθώς και τα υλικά και τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε πειραματική διαδικασία.

2 Απομόνωση Αγγειογενίνης

2.1 Υλικά

- Θρεπτικό υλικό *LB-Broth*, αποστειρωμένο (Applichem Panreac)
- *Transindole-3-acrylicacid 99%* (ινδόλιο) (Merck): 100mg ινδόλιο διαλυμένο σε 5ml 100% αιθυλική αλκοόλη
- *10x άλατα M9*: 1lt, pH 7.4 - αποστειρωμένο (Sigma)
- *MgSO₄*: 1M, 100lt- αποστειρωμένο (Applichem Panreac)
- *CaCl₂*: 100mM, 50ml-αποστειρωμένο (Merck)
- *Na₂ EDTA 0,5M*: 0,5M, 100ml, pH 8,0-αποστειρωμένο (Panreac)
- *20% (+) γλυκόζη*: 500ml-αποστειρωμένο με φίλτρο 0,22μm (Serva)
- *NaCl 5M*: 5M, 250ml (Merck)
- *Αμπικιλίνη (Ampicillin sodium salt)*: 25mg/ml, 50ml-αποστειρωμένο (Serva)
- *10% Casaminoacids*: 250ml - αποστειρωμένο (Becton Dickinson and Co.)
- Κωνικές φιάλες καλλιέργειας 2 Lt - αποστειρωμένες
- *PMSF*: βρίσκεται σε μορφή σκόνης και έτσι ζυγίζονται 0,5487g και διαλυτοποιούνται σε διάλυμα που αποτελείται από 10% DMF 0,7ml και 90%v/v ισοποροπανόλης 6,3ml. Ο τελικός όγκος του διαλύματος βρίσκεται στα 7ml (Applichem Panreac)
- *TSOPB*: 1lt, pH 9,0. Το διάλυμα αυτό αποτελείται από 20 mM Tris, 10% σουκρόζη (ChemLab), 10 mM 1,10-phenanthroline (Sigma), 0,25 mM benzamidine (Sigma) και 0,5mM Na₂EDTA

- *Λυσοζύμη*: 2,5 ml 25 mg/ml. Ζυγίζονται 12 mg λυσοζύμης (Applichem Panreac) και διαλύονται σε 6 ml TSOBP.
- *0,4M Φωσφορικό κάλιο pH 7,2*- αποστειρωμένο (Merck)
- Μembrάνες διαπίδυσης 7000 cutoff (Serva)
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης (Biorad)
- Κατιοντοανταλλακτική στήλη HiTrap SP Sepharose FF 1ml (GE Healthcare)
- Ρυθμιστικά διαλύματα:
 - Διάλυμα A: (10 mM Tris-HCl και 0,2 M χλωριούχο νάτριο V=1lt, pH 8,0) το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως διάλυμα εξισορρόπησης και έκπλυσης της στήλης HitrapSPFF.
 - Διάλυμα B: (10 mM Tris-HCl και 0,6 M χλωριούχο νάτριο, pH 8.0) το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την έκλουση των πρωτεϊνών από τη στήλη HitrapSPFF.

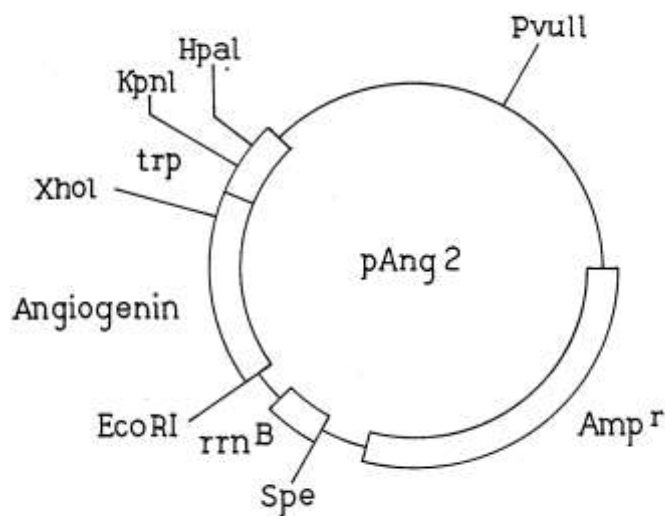
2.2 Όργανα

- Αναλυτικός Ζυγός (Orma, Italy)
- Πεχάμετρο (Metrohm 691, Switzerland)
- Κυψελίδες-οπτικής διαδρομής 1cm (Hellma QS, Germany)
- Φασματοφωτόμετρο ορατού υπεριώδους (Genesis 10 UV)
- Περισταλτική αντλία (peristaltic pump - P1 GE Healthcare)
- Κλασματοσυλλέκτης (Pharmacia Biotech LKB Superfrac Fraction Collector 18-1010-19 45W 50/60Hz)



2.3 Περιγραφή της μεθόδου

Το πλασμίδιο που φέρει το γονίδιο της αγγειογενίνης είχε εισαχθεί σε κύτταρα στελέχους W3110 της *E.coli* (Shapiro R, *et al.*, 1988). Το γονίδιο που κωδικοποιεί για την ANG συντέθηκε χημικά και τοποθετήθηκε στο φορέα pANG2 για ακριβή έκφραση της πρωτεΐνης Met(-1), υπό τον έλεγχο του προαγωγέα της τρυπτοφάνης (Kunkel T.A., 1985). Με τον τρόπο αυτό προέκυψε ο πλασμιδιακός φορέας pANG3, στον οποίο το αρχικό κωδικόνιο μεθειονίνης που υπήρχε στον pANG2, έχει αντικατασταθεί από μία αλληλουχία DNA (GTGAAACAAAGCACTATTGCACTGGCACTATTACCGT TACTGTTTACCCCTGTGACAAAAGCC), η οποία κωδικοποιεί για το σηματοδοτικό πεπτίδιο rhoA της *E.coli*, το οποίο επιτρέπει στη Gln-1 μορφή της ANG να εκκρίνεται απευθείας στο κυτταρόπλασμα (Dodt *et al.*, 1986). Η δομή του φορέα pANG2 παρουσιάζεται στην Εικόνα 19.



Εικόνα 19 : Δομή του πλασμιακού φορέα pANG2 (Shapiro R,*et al.*, 1987).

Πειραματική διαδικασία

Παρασκευάζονται αρχικά οι μικρές υγρές βακτηριακές καλλιέργειες στις οποίες, σε 3 ml LB-Broth (αποστειρωμένο) προστίθεται το αντιβιοτικό αμπικιλίνη ώστε η τελική του συγκέντρωση να είναι 50 mg/ml. Εν συνεχεία εμβολιάζονται με μικρή ποσότητα βακτηρίων αποθηκευμένων στους -80 °C με γλυκερόλη και επωάζονται σε θερμοκρασία 37 °C για 17 ώρες, σε στροφές ταχύτητας 250rpm.

Αποστειρώνονται τέσσερις φλάσκες καλλιέργειας χωρητικότητας 2Lt σε κάθε μία από τις οποίες περιέχονται 900 ml νερό. Σε κάθε φλάσκα προστίθενται 100 mL 10X M9 άλατα, 2 mL 1M MgSO₄, 1 mL 100 mM CaCl₂, 21 mL 20% γλυκόζη και 40 mL 10% casamino acids. Τέλος προστίθενται σε κάθε φλάσκα 2 mL αμπικιλίνης 25mg/mL, 1mL από το διάλυμα ινδολο-ακρυλικού οξέος και 3mL από την καλλιέργεια.

Οι φλάσκες τοποθετούνται σε επωαστήρα-αναδευτήρα στους 37 °C σε στροφές ταχύτητας 200 rpm και 16 ώρες μετά, προστίθενται σε αυτές, 10 mL 20% γλυκόζη, 20 mL 10% casamino acids και 1mL 20mg/mL διαλύματος ινδολοακρυλικού οξέος. Ακολουθεί ανάδευση των καλλιεργείων στους 37 °C για 2 ώρες επιπλέον.

Μετά το πέρας της επώασης, οι βακτηριακές καλλιέργειες μοιράζονται σε 6 falcon και φυγοκεντρούνται για 15 λεπτά σε 5800g στους 4 °C. Το υπερκείμενο απορρίπτεται ενώ κρατάμε το ίζημα, στο οποίο έχουν καθιζάνει τα βακτηριακά κύτταρα τα οποία τοποθετούνται σε πάγο. Σε κάθε falcon προστίθενται 62 mL παγωμένο TSORB και 330 μLPMSF και αναδεύονται. Τα βακτηριακά ιζήματα επαναδιαλύονται με χρήση γυάλινης ράβδου και με επαναλαμβανόμενο πιπετάρισμα. Αφού εναιωρηθούν πλήρως τα δείγματα ενώνονται σε 2 φιάλες τύπου falcon.

Σε κάθε μία από τις φιάλες προστίθενται 4mL 0.5 MEDTA, 8 mL 5 M NaCl, 2.5 mL 2 mg/mL λυσοζύμη και 1 mL 0.45 MPMSF και επωάζονται για 1 ώρα υπό ανάδευση στους 4 °C. Προστίθεται τέλος 1 mL PMSF επιπλέον σε κάθε φιάλη και τα διαλύματα των κυττάρων υφίστανται την επίδραση υπερήχων διάρκειας 40 sec για τρεις φορές με ενδιάμεσες παύσεις των 40

sec αντίστοιχα (τέσσερις κύκλοι). Η λύση των κυττάρων γίνεται σε χαμηλή θερμοκρασία (διατήρηση σε πάγο) για την αποφυγή υπερθέρμανσης που θα οδηγήσει σε μετουσίωση των πρωτεϊνών. Τα δείγματα φυγοκεντρούνται για 30 λεπτά σε 23,400g και 4°C.

Χρωματογραφικός καθαρισμός αγγειογενίνης

Η χρωματογραφία αποτελεί μία τεχνική διαχωρισμού πρωτεϊνών και γενικά βιολογικών μορίων. Χαρακτηριστικό γνώρισμα όλων των χρωματογραφικών τεχνικών είναι η διανομή των διαφόρων συστατικών ενός μίγματος μεταξύ μίας κινητής και μίας στατικής φάσης. Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός του μίγματος διαφόρων ενώσεων βασίζεται στη διαφορετική ταχύτητα μετακίνησης του κάθε συστατικού του μίγματος μέσα στο χρωματογραφικό σύστημα, λόγω της διαφορετικής του συγγένειας ως προς τις δύο μη αναμειγνυόμενες φάσεις, που βρίσκονται σε σχετική κίνηση η μία με την άλλη. Η κατανομή των συστατικών στις φάσεις εξαρτάται από φαινόμενα όπως η επιφανειακή προσρόφηση, η διαλυτότητα, η συμπλοκοποίηση, ο σχηματισμός άλατος, ο σχηματισμός δεσμού υδρογόνου ή ακόμη μπορεί να εξαρτάται από το μέγεθος και το σχήμα των μορίων. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής, κατά την οποία τα πρωτεϊνικά μόρια διαχωρίζονται με βάση το φορτίο τους.

Βάση αυτής της μεθόδου, ο διαχωρισμός πραγματοποιείται με αντιστρεπτή προσρόφηση ιόντων σε δύο στάδια. Στο πρώτο στάδιο, προστίθεται το δείγμα το οποίο και προσροφάται και ουσίες που δε συγκρατούνται από τη στήλη απομακρύνονται με προσθήκη κατάλληλου διαλύτη. Το μίγμα των συστατικών που έχουν συγκρατηθεί από τη στήλη απομακρύνονται από αυτή σε διαφορετικές χρονικές στιγμές ανάλογα με το φορτίο που φέρουν με την προσθήκη κατάλληλων διαλυτών. Η στατική φάση της χρωματογραφικής στήλης μπορεί να αποτελείται από πολυμερείς ενώσεις μεγάλου μοριακού βάρους, όπως οι ιοντοανταλλάκτες της δεξτράνης (Sephadex) και της αγαρόζης (Sephrose). Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε ως στατική φάση για τη στήλη η ρητίνη αγαρόζης. Ανάλογα με το είδος των ιοντίσιμων ομάδων που φέρουν διακρίνονται σε ανιονανταλλάκτες και κατιονανταλλάκτες. Γνωρίζοντας ότι η αγγειογενίνη

είναι μία θετικά φορτισμένη πρωτεΐνη χρησιμοποιήθηκε κατιοανταλλακτική στήλη, όπου οι κατιοανταλλάκτες διαθέτουν όξινες ομάδες με κατιόντα ικανά να ανταλλάγουν με κατιόντα του διαλύματος. Ειδικότερα, ο καθαρισμός έγινε με χρήση της κατιοντοανταλλακτικής στήλης GE Healthcare HiTrap SP FF 1ml.

Στην παρούσα μελέτη ο καθαρισμός της αγγειογενίνης με την στήλη HiTrap SP FF έγινε χειροκίνητα με χρήση περισταλτικής αντλίας (peristaltic pump-P1 GE Healthcare) ενώ για την συλλογή των κλασμάτων χρησιμοποιήθηκε κλασματοσυλλέκτης (Pharmacia Biotech LKB Superfrac Fraction Collector 18-1010-19 45W 50/60Hz).

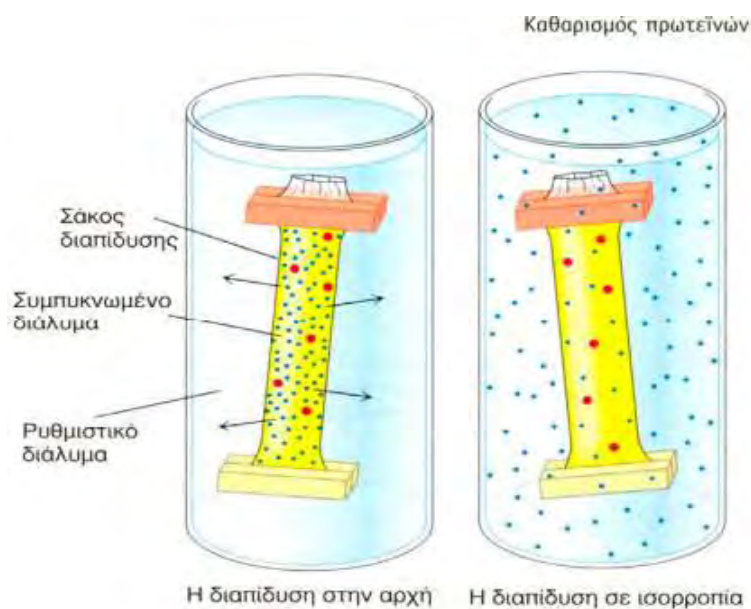
- Καθαρισμός Αγγειογενίνης με τη κατιοανταλλακτική στήλη SPFF

Η εξισορρόπηση της στήλης γίνεται με το διάλυμα A (10mM Tris-HCl και 0,2M χλωριούχο νάτριο V=1lt, pH 8,0), έτσι ώστε να είναι δυνατή η πρόσδεση της αγγειογενίνης σε αυτή, ακολουθεί η διέλευση του πρωτεϊνικού δείγματος διαμέσου της στήλης, η έκπλυση ώστε η τιμή της απορρόφησης των κλασμάτων να φτάσει την τιμή μηδέν και τέλος η έκλουση της αγγειογενίνης που γίνεται με εφαρμογή 100% (v/v) διαλύματος B (10mM Tris-HCl και 0,6M χλωριούχο νάτριο, pH 8.0). Αυτό επιτυγχάνεται μέσω σταδιακής αύξησης της ιονικής ισχύος. Όσο αυξάνεται η ιονική ισχύς, απομακρύνονται πρωτεΐνες από τη στήλη ανάλογα με την ισχύ πρόσδεσής τους σε αυτή. Επομένως, αρχικά θα παρατηρηθεί έκλουση των ασθενώς προσδεδεμένων πρωτεϊνών και στη συνέχεια εκλούνται οι ισχυρότερα προσδεδεμένες.

Το έκλουσμα που εξέρχεται από τη στήλη συλλέγεται σε δοκιμαστικούς σωλήνες. Τα δείγματα φωτομετρούνται σε φωτόμετρο υπεριώδους και ελέγχεται η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη με μέτρηση της οπτικής απορρόφησης σε μήκος κύματος 280nm. Συλλέγονται τα κλάσματα που κατά την έκλουση παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη απορρόφηση.

Διαπίδυση: μετά την ανάκτηση της πρωτεΐνης από τη στήλη SPFF εφαρμόζεται η τεχνική της διαπίδυσης. Διαπίδυση είναι το φαινόμενο της ανάμειξης δυο αερίων ή υγρών σωμάτων μέσα από πορώδες διάφραγμα. Το διάφραγμα, μέσα από το οποίο περνούν τα μόρια, έχει πολύ λεπτούς

πόρους που επιτρέπουν τη διακίνηση μόνο ουσιών σχετικά χαμηλού μοριακού βάρους. Η αρχή της μεθόδου φαίνεται στο παρακάτω σχήμα.



Εικόνα 20 : Διαπίδυση: Τα μεγάλα μόρια δε μπορούν να εξέλθουν από την ημιπερατή μεμβράνη. Τα μικρά όμως μόρια, σταδιακά εξέρχονται από το πυκνό διάλυμα του εσωτερικού της μεμβράνης στο λιγότερο πυκνό ρυθμιστικό διάλυμα.

Τα μεγάλα μόρια δε μπορούν να εξέλθουν από την ημιπερατή μεμβράνη. Τα μικρά όμως μόρια, σταδιακά εξέρχονται από το πυκνό διάλυμα του εσωτερικού της μεμβράνης στο λιγότερο πυκνό ρυθμιστικό διάλυμα. Το παρασκεύασμα τοποθετείται μέσα σε σάκο από ημιπερατή μεμβράνη, ο οποίος βυθίζεται σε μεγάλο όγκο νερού ή κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος, όπου και παραμένει για 16 ώρες συνήθως και υπό ήπια ανάδευση. Οι πόροι της μεμβράνης έχουν τέτοιο μέγεθος ώστε να μπορούν να τη διαπεράσουν μόνο μικρού μεγέθους σωματίδια όπως τα ιόντα, ενώ μεγάλα μόρια όπως οι πρωτεΐνες παραμένουν μέσα στον σάκο. Οι μεμβράνες διαπίδυσης χαρακτηρίζονται από το λεγόμενο cutoff, μία τιμή που δείχνει το μικρότερο μέγεθος των πρωτεϊνών που μπορεί να συγκρατηθεί στη μεμβράνη. Πρωτεΐνες με μέγεθος μικρότερο του cutoff απομακρύνονται. Στην παρούσα εργασία, τοποθετήθηκε το διάλυμα της

πρωτεΐνης μέσα σε μεμβράνες, οι οποίες κατόπιν τοποθετήθηκαν σε 500 mL διαλύματος A HiTrap SPFF. Με αυτό τον τρόπο μπορεί να επιτευχθεί η απομάκρυνση του χλωριούχου νατρίου. Εφόσον το πρωτεϊνικό δείγμα βρίσκεται στο διάλυμα A, η διαδικασία καθαρισμού με τη στήλη HiTrap SPFF επαναλαμβάνεται για δεύτερη φορά όπως ακριβώς έχει αναφερθεί παραπάνω.

Κυκλοποίηση πρωτεΐνης

Αφού ολοκληρωθεί και ο δεύτερος καθαρισμός της πρωτεΐνης από τη στήλη, η αγγειογενίνη υφίσταται κυκλοποίηση. Με βάση αυτή τη διαδικασία η ποσότητα της ανασυνδυασμένης Gln-1Ang που αποκτήθηκε μετατρέπεται στην αυθεντική <Glu-1 ανθρώπινη μορφή, όπου η γλουταμίνη μετατρέπεται σε πυρο-γλουταμινικό (pyroGlu) με κυκλοποίηση του αμινοτελικού της άκρου μη ενζυμικά. Η διαδικασία πραγματοποιείται με την προσθήκη 0.4M δισόξινου φωσφορικούκαλίου όγκου ίσου με τον όγκο του πρωτεϊνικού δείγματος σε θερμοκρασία 37°C για 21 ώρες .

Συμπύκνωση πρωτεΐνης

Μετά τον καθαρισμό της πρωτεΐνης γίνεται διαπίδυση σε υπερκάθαρο νερό (MilliQ) και έπειτα ακολουθεί η συμπύκνωσή της με ειδικό φίλτρο φυγοκέντρωσης για διαχωρισμό πρωτεϊνών μοριακού βάρους 3000 Da και άνω, (3000MWCO) μέχρι η συγκέντρωση της πρωτεΐνης να είναι 20mg/mL. Η αγγειογενίνη αποθηκεύεται στους -20°C μετά την προσθήκη 50% γλυκερόλης.

3 Κινητική μελέτη της ριβονουκλεάσης A

3.1 Υλικά

- Βοεία παγκρεατική ριβονουκλεάση A (type XII-A). (Sigma-Aldrich)
- Ribonucleic acid transfer baker's yeast. (Sigma-Aldrich)
- Diethyl pyro carbonat (DEPC). (Research Organics)
- Acetic acid (100%). (Merck)
- Sodium acetate. (Merck)
- NaH_2PO_4 . (Merck)
- Lanthanum Nitrate. (Sigma)
- Perchloric acid (60%). (Fluca)
- Ρυθμιστικά διαλύματα :
 - Οξικό οξύ [CH_3COOH]/ οξικό νάτριο [$\text{C}_2\text{H}_3\text{Na}_2$], το οποίο χρησιμοποιήθηκε σε όλα τα κινητικά πειράματα σε συγκέντρωση 0,1 M και $\text{pH}=6$, προκειμένου να διατηρείται σταθερό το pH , αλλά και η ιοντική ισχύς. Το διάλυμα αυτό χρησιμοποιήθηκε ως διάλυμα χρήσης, δηλαδή ως το διάλυμα στο οποίο διαλύεται το ένζυμο RNaseA.
 - Sodium Phosphate ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 / \text{Na}_2\text{HPO}_4$) σε συγκέντρωση 50 mM και $\text{pH}=7,4$, το οποίο αποτέλεσε και το διάλυμα της αντίδρασης (reaction buffer). Να σημειωθεί πως στο διάλυμα αντίδρασης διαλύεται και το υπόστρωμά μας (tRNA).
 - Διάλυμα τερματισμού της αντίδρασης (stop solution). Χρησιμοποιήθηκαν 40mM Lanthanum Nitrate [$\text{La}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6(\text{H}_2\text{O})$] και 6% Perchloric acid [HClO_4].

3.2 Όργανα

- Αναλυτικός Ζυγός (Orma, Italy)
- Πεχάμετρο (Metrohm 691, Switzerland)
- Κυψελίδες-οπτικής διαδρομής 1cm (Hellma QS, Germany)
- Φασματοφωτόμετρο ορατού υπεριώδους (Genesis 10 UV)



3.3 Κινητική μελέτη της ριβονουκλεάσης A

Μέτρηση συγκεντρώσεων

Η μέτρηση των συγκεντρώσεων του ενζύμου και του υποστρώματος γίνεται φωτομετρικά. Η συγκέντρωση υπολογίζεται σύμφωνα με την σχέση:

$$\text{Συγκέντρωση} = \text{Απορρόφηση} / \text{Σταθερά απορρόφησης}$$

Συγκεκριμένα, η συγκέντρωση της ριβονουκλεάσης A προσδιορίστηκε φωτομετρικά σε μήκος κύματος 278 nm χρησιμοποιώντας συντελεστή μοριακής απορρόφησης $\epsilon_{278} = 9800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ για κυψελίδα οπτικής διαδρομής 1 cm (Sela & Anfinsen, 1957-Dostal & Matousek, 1973). Η συγκέντρωση του υποστρώματος tRNA προσδιορίζεται, επίσης, φωτομετρικά σε μήκος κύματος 260 nm χρησιμοποιώντας ως συντελεστή μοριακής απορρόφησης $\epsilon_{260} = 9250 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ και θεωρώντας ότι τιμή οπτικής απορρόφησης ίση με τη μονάδα αντιστοιχεί σε συγκέντρωση ίση με 1,42 μM .

3.4 Περιγραφή της μεθόδου

Η δραστικότητα της RNaseA προσδιορίστηκε ακολουθώντας μια μέθοδο κατακρήμνισης και έχοντας ως υπόστρωμα tRNA ζύμης σύμφωνα με τα πειράματα των Anfinsen et al. (Anfinsen C.B. et al. *J Biol. Chem.* 1954)

Κινητική μελέτη της Ριβονουκλεάσης A

Προσδιορισμός IC₅₀ εκχυλισμάτων

Η παρουσία αναστολέα στο μίγμα της αντίδρασης έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της ταχύτητας υδρόλυσης του tRNA και απελευθέρωσης μορίων CMP. Η μείωση αυτή μπορεί να εκφραστεί ως αναστολή σύμφωνα με γνωστά μοντέλα ενζυμικής αναστολής.

Η σταθερά IC₅₀ ορίζεται ως η συγκέντρωση του αναστολέα η οποία προκαλεί 50% μείωση της ενζυμικής δραστικότητας. Ο προσδιορισμός της προϋποθέτει την μελέτη της κινητικής του ενζύμου με κάποιο αναστολέα στην περιοχή της IC₅₀ και για συγκεκριμένη συγκέντρωση tRNA. Η συγκέντρωση tRNA που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της IC₅₀ είναι η 7μM. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε βασίστηκε στη μέθοδο του Anfinsen (1954) , όπως αυτή τροποποιήθηκε από την Slifman (1986).

Για τον προσδιορισμό απαιτείται η παρασκευή ενός διαλύματος χρήσης (reaction buffer), στο οποίο διαλύεται το υπόστρωμα (tRNA) και περιέχει τα εξής αντιδραστήρια: 0,2 M NaH₂PO₄ και 0,2 M Na₂HPO₄ με pH 7,4.

Αρχικά, παρασκευάζονται μεγάλης συγκέντρωσης διαλύματα (stock solutions) όλων των αντιδραστηρίων, κατάλληλοι όγκοι των οποίων αναμιγνύονται για την παρασκευή του διαλύματος χρήσης λίγο πριν πραγματοποιηθεί ο προσδιορισμός. Σε κάθε διάλυμα προστίθεται και διάλυμα εκχυλίσματος διαφορετικής συγκέντρωσης. Οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν βρίσκονται κυρίως ανάμεσα στα 1 μg/mL και 100 μg/mL και εξετάζουμε και τις συγκεντρώσεις 0,1 μg/mL και 100 μg/mL ως ακραίες τιμές. Η πειραματική διαδικασία είναι η ακόλουθη. Μετά τη διάλυση του tRNA στο διάλυμα χρήσης, υπολογίζονται οι ακριβείς ποσότητες αντιδραστηρίων

που απαιτούνται για την αντίδραση. Ο τελικός όγκος της αντίδρασης είναι 300 μl, ενώ η έναρξή της πραγματοποιείται μόλις προστεθεί το ένζυμο. Η RNase A έχει αραιωθεί με το ρυθμιστικό διάλυμα CH₃COOH/CH₃COONa (pH 5,5-6,0), ώστε να προκύψει διάλυμα συγκέντρωσης 10 nM. Η αντίδραση σταματά μετά από ένα λεπτό (1 min) με προσθήκη 300 μl διαλύματος τερματισμού (stop solution) που αποτελείται από 40mM Lanthanum Nitrate και 6% Perchloric acid (συμβάλλουν στην κατακρήμνιση του μη υδρολυμένου tRNA). Το πείραμα πραγματοποιείται στους 30°C σε pH 7,4. Γι αυτό το λόγο, πριν την έναρξη της αντίδρασης το διάλυμα χρήσης μαζί με το υπόστρωμα και παρουσία ή απουσία αναστολέα επωάζονται για 10 λεπτά σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 30°C. Κατόπιν, όπως προαναφέραμε, προστίθεται το ένζυμο, οπότε και ξεκινά η αντίδραση. Μετά από 1 λεπτό αφού έχει προστεθεί η RNase A, τερματίζουμε την αντίδραση και τοποθετούμε τους σωλήνες στον πάγο. Στη συνέχεια, τα δείγματα φυγοκεντρώνται σε θερμοκρασία 4°C, στις 14.500 στροφές (rpm) για 15 λεπτά, όπου καθιζάνει το αδιάλυτο υπόστρωμα που δεν χρησιμοποιήθηκε στην αντίδραση. Έπειτα, παραλαμβάνονται 580μl από το υπερκείμενο και φωτομετρούνται. Να σημειωθεί πως για κάθε πείραμα, χρησιμοποιείται μια κυψελίδα υπεριώδους και πως πάντα υπάρχει ένα διάλυμα αναφοράς (τυφλό) το οποίο περιέχει ότι και το εκάστοτε δείγμα εκτός από το ένζυμο και το υπόστρωμα, με το οποίο μηδενίζουμε το φωτόμετρο πριν φωτομετρήσουμε το δείγμα. Επιπλέον, εκτός από το διάλυμα αναφοράς (tRNA=0), παρασκευάζεται και ένα διάλυμα για κάθε μία συγκέντρωση υποστρώματος το οποίο περιέχει ότι και το εκάστοτε δείγμα εκτός από το ένζυμο, των οποίων οι απορροφήσεις αφαιρούνται από αυτές των δειγμάτων, έτσι ώστε να αφαιρείται η τιμή του ενδογενώς υδρολυμένου tRNA. Τα διαλύματα αυτά αποτελούν τα τυφλά (blank). Ο ποσοτικός προσδιορισμός του υδρολυμένου tRNA που παράγεται, πραγματοποιείται με καταγραφή της οπτικής απορρόφησης σε μήκος κύματος 260nm.

Η ειδική δραστηριότητα (specific activity, $\mu\text{molmin}^{-1}\text{mg}^{-1}$) αποτελεί έκφραση της ποσότητας, αλλά και της δραστηριότητας ενός ένζυμου. Ορίζεται ως τα mg του ένζυμου που προκαλούν μετατροπή 1 μmol υποστρώματος (ή παρασκευή 1 μmol προϊόντος) ανά 1 λεπτό σε καθορισμένες συνθήκες.

3.5 Επεξεργασία κινητικών δεδομένων για τον υπολογισμό της IC₅₀.

Η στατιστική επεξεργασία των κινητικών δεδομένων έγινε με το πρόγραμμα Grafit, εφαρμόζοντας μη γραμμική παλινδρόμηση (non-linear regression) και θεωρώντας ότι τα σφάλματα είναι ίδια για κάθε πειραματική τιμή (ομοσκεδαστικότητα 'simpleweighting'). Εφ' όσων η αντίδραση πραγματοποιείται σε έναν μόνο χρόνο, 1min, η εξίσωση που χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό της ειδικής δραστηριότητας είναι η εξής:

$$\text{Sp. activity} = \frac{(\text{OD-Blank})}{516,4 \cdot 0,006} \mu\text{moles CMP} / \text{min} \cdot \text{nmoles ενζύμου}$$

όπου 516,4: είναι ο συντελεστής απορρόφησης του tRNA

0,006: τα nmoles του ενζύμου στην αντίδραση

Στον προσδιορισμό της σταθεράς IC₅₀, οι ειδικές δραστηριότητες παρουσία αναστολέα μετατρέπονται σε επί τοις εκατό αναστολή χρησιμοποιώντας την ειδική δραστηριότητα του ενζύμου απουσία αναστολέα. Από τα πειραματικά δεδομένα εξάγονται οι ειδικές δραστηριότητες του ενζύμου για την εκάστοτε περίπτωση και υπολογίζεται η επί τοις εκατό αναστολή για κάθε συγκέντρωση αναστολέα βάσει του τύπου:

$$\% \text{αναστολή} = \frac{\text{s.a.}_{\text{control}} - \text{s.a.}_i}{\text{s.a.}_{\text{control}}} \times 100\%$$

όπου: **s.a.**_{control} : η ειδική δραστηριότητα του ενζύμου απουσία αναστολέα

s.a._i: η ειδική δραστηριότητα του ενζύμου παρουσία i συγκεντρώσεως αναστολέα

Η τιμή IC₅₀ υπολογίζεται με βάση τον τύπο:

$$y = \frac{100\%}{1 + \left(\frac{x}{IC_{50}}\right)^s}$$

όπου: s: η κλίση της ευθείας

Στην εξίσωση θεωρείται ότι η παράμετρος y μειώνεται όσο η x αυξάνει.

Το πείραμα για την εξαγωγή της IC_{50} θεωρείται επιτυχές, εφόσον υπάρχουν εκατέρωθεν της τιμής της τουλάχιστον δύο συγκεντρώσεις αναστολέα, που προκαλούν αναστολή από 10%-50% και 50%-90%. Η τιμή της IC_{50} προκύπτει από το διάγραμμα **%αναστολή=f([I])**. Από την τιμή της IC_{50} προκύπτει κατά προσέγγιση η τιμή της σταθεράς αναστολής K_i που αποτελεί όπως και η K_m έκφραση της συγγένειας του ενζύμου ως προς το υπόστρωμα της αντίδρασης παρουσία ενός αναστολέα βάση του τύπου:

$$IC_{50} = \left(1 + \frac{[S]}{K_m}\right) K_i$$

Όπου [S] η συγκέντρωση του υποστρώματος.

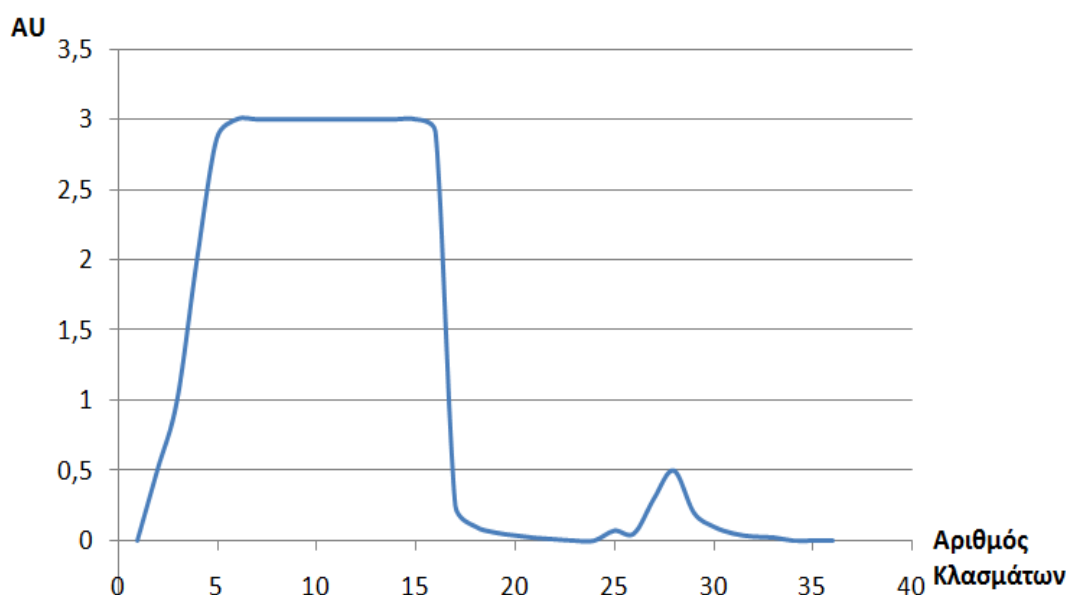
4 Αποτελέσματα

4.1 Αποτελέσματα απομόνωσης rygo-GluAng

Για την απομόνωση και τον καθαρισμό της Ang, χρησιμοποιήθηκε δύο φορές η στήλη HiTrapSPFF.

Αποτελέσματα πρώτου καθαρισμού από τη στήλη HiTrapSPFF

Για την εξισορρόπηση της στήλης χρησιμοποιήθηκαν 10 όγκοι στήλης (10mL) διαλύματος A (10 mM Tris-HCl και 0.2 M NaCl, pH 8.0). Ακολούθησε η διέλευση του δείγματος των πρωτεϊνών (κλάσματα 1-15 στην Εικόνα 21) και στη συνέχεια η έκπλυση της στήλης με 30 όγκους στήλης (30mL) διαλύματος A (κλάσματα 15-20 στην Εικόνα 21). Κατά τις δύο αυτές διαδικασίες συλλέγονται κλάσματα των 5mL. Τέλος, έγινε έκλουση της πρωτεΐνης με εφαρμογή 100% (v/v) διαλύματος B (10 mM Tris-HCl και 0.6M NaCl, pH 8.0), και συλλέγονταν κλάσματα του 1mL. Η ροή διέλευσης των διαλυμάτων από τη στήλη ήταν 1ml/min. Τα αποτελέσματα του καθαρισμού της Ang από τη στήλη αυτή παρουσιάζονται στην (Εικόνα 21), όπου στον οριζόντιο άξονα φαίνονται οι αριθμοί των κλασμάτων, ενώ στον κατακόρυφο άξονα οι τιμές απορρόφησης των πρωτεϊνών σε μήκος κύματος 280nm.

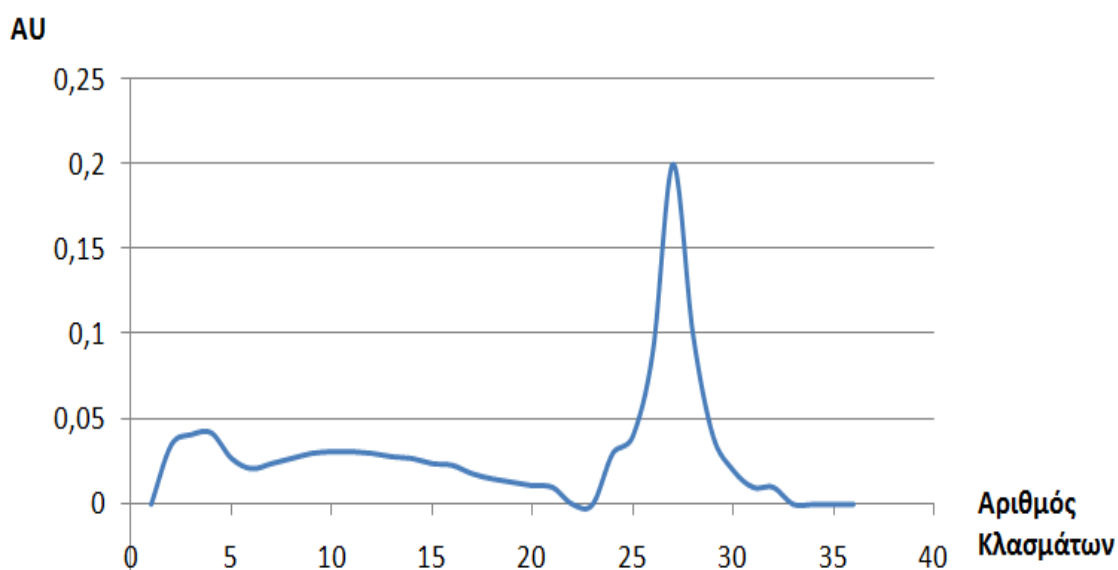


Εικόνα 21 : Αποτελέσματα πρώτου σταδίου καθαρισμού της Ang από τη στήλη SPFF. Στον οριζόντιο άξονα φαίνονται οι αριθμοί των κλασμάτων, ενώ στον κατακόρυφο άξονα οι τιμές απορρόφησης των πρωτεϊνών στα 280nm.

Συλλέχθηκαν 8 κλάσματα (25-32) συνολικού όγκου 8ml τα οποία εμφάνισαν τη μέγιστη τιμή απορρόφησης σε μήκος κύματος 280nm, κατά την έκλουση με το διάλυμα Β. Με τη βοήθεια της εξίσωσης Lambert-Beer $A=ε \cdot b \cdot C$ υπολογίζεται η ποσότητα της πρωτεΐνης που ανακτήθηκε. Για $\epsilon=0,83 \text{ (mg/ml)}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ και $b=1 \text{ cm}$, από τη στήλη SPFF λαμβάνονται 4,65mg πρωτεΐνης. Τα κλάσματα συλλέχθηκαν, ενώθηκαν και μετά τη διαπύδιση σε διάλυμα εξισορρόπησης, ακολούθησε ο δεύτερος καθαρισμός τους.

- Αποτελέσματα δεύτερου καθαρισμού από τη στήλη HiTrapSPFF

Ακολούθησε δεύτερος καθαρισμός της Ang με τη στήλη HiTrapSPFF μετά από την ενοποίηση των κλασμάτων που συλλέχθηκαν από τον πρώτο καθαρισμό. Η στήλη εξισορροπήθηκε όπως έχει ήδη αναφερθεί στον πρώτο καθαρισμό και αφού το πρωτεϊνικό δείγμα διαπεράσει τη στήλη, γίνεται η έκλουση των πρωτεϊνών με το διάλυμα Β. Τα αποτελέσματα του δεύτερου καθαρισμού της Ang από τη στήλη παρουσιάζονται στην (Εικόνα 22), όπου στον οριζόντιο άξονα φαίνονται οι αριθμοί των κλασμάτων που εξέρχονται από τη στήλη ενώ στον κατακόρυφο άξονα φαίνονται οι τιμές απορρόφησης των πρωτεϊνών σε μήκος κύματος 280nm.

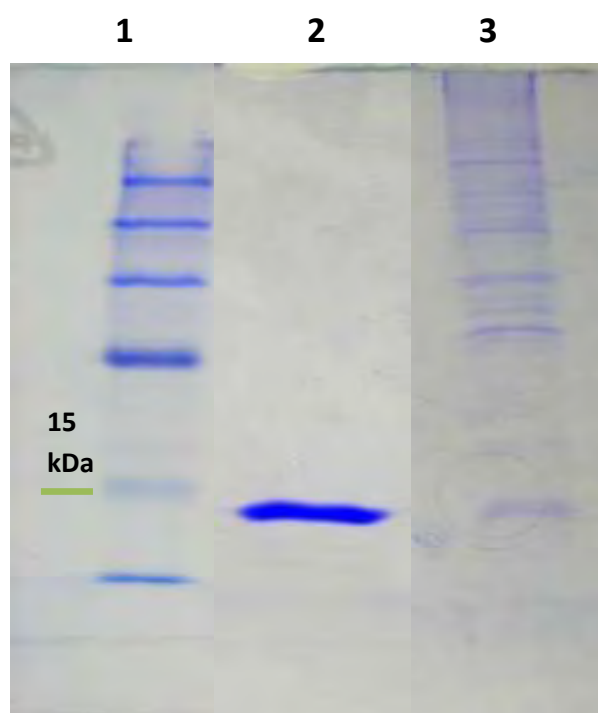


Εικόνα 22 : Αποτελέσματα δεύτερου σταδίου καθαρισμού της Ang από τη στήλη SPFF. Στον οριζόντιο άξονα φαίνονται οι αριθμοί των κλασμάτων, ενώ στον κατακόρυφο άξονα οι τιμές απορρόφησης των πρωτεϊνών στα 280nm

Συλλέχθηκαν 7 κλάσματα (25-31) συνολικού όγκου 7ml τα οποία εμφάνισαν μέγιστη τιμή απορρόφησης σε μήκος κύματος 280nm. Η ποσότητα της πρωτεΐνης που ανακτήθηκε από τη στήλη, υπολογίζεται μέσω του τύπου $\epsilon=0,83 \text{ (mg/ml)}^{-1}\text{cm}^{-1}$ και $b=1\text{cm}$, ότι είναι 0.63mg πρωτεΐνης.

Συνεπώς η συνολική απόδοση του καθαρισμού είναι 0.63mg/4L βακτηριακής καλλιέργειας.

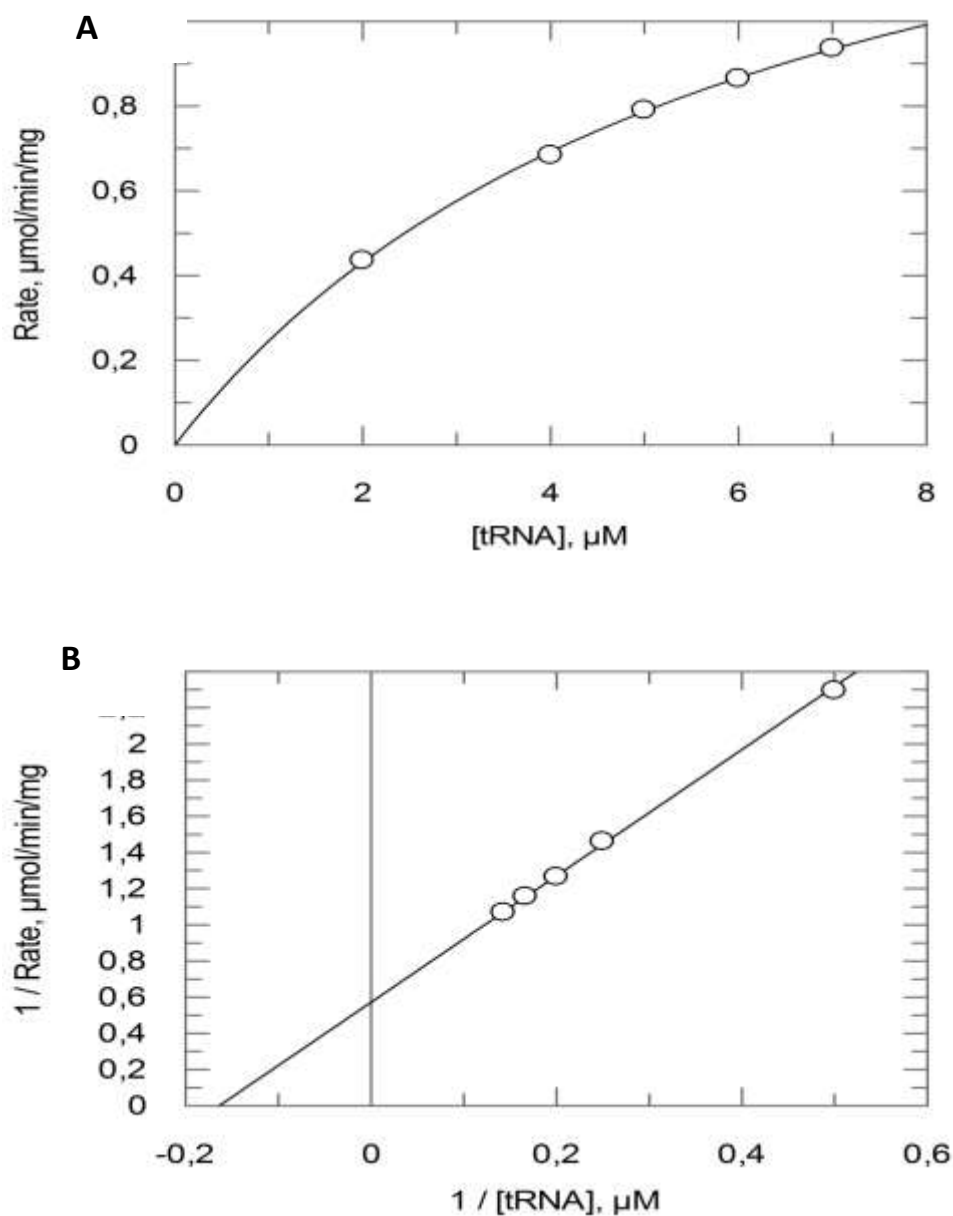
Στη συνέχεια έγινε ανάλυση με Gel Coomasie Staining τα αποτελέσματα του οποίου φαίνονται στην (εικόνα 23).



Εικόνα 23 : Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης των πρωτεϊνικών δειγμάτων σε αποδιατακτική πηκτή SDS πολυακρυλαμιδίου 10%. Στην διαδρομή 1 παρουσιάζεται ο μάρτυρας με την τελευταία μπάντα να αντιστοιχεί στα 10 kDa. Στην διαδρομή 2 αντιστοιχεί το δείγμα μετά τη δεύτερη στήλη και στη διαδρομή 3 το δείγμα μετά την πρώτη στήλη. Η Ang εμφανίζεται στα 14kDa.

4.2 Αποτελέσματα κινητικής μελέτης RNaseA.

Τα χαρακτηριστικά του ενζύμου βρέθηκαν να είναι: $K_m=6,11 \pm 0,27 \mu\text{M}$, και $V_{\text{max}}=1,75 \pm 0,04 \mu\text{mol CMP}/(\text{mg}\times\text{min})$.



Εικόνα 19: Διάγραμμα κινητικής μελέτης της RNaseA σε διάφορες συγκεντρώσεις υποστρώματος tRNA (0, 2, 4, 6, 8 μM). **A.** Το διάγραμμα (υπερβολή) παρουσιάζει την ταχύτητα ως προς τη συγκέντρωση του υποστρώματος. **B.** Το αντίστροφο διάγραμμα Lineweaver-Burk που δείχνει τη σχέση του υποστρώματος και της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης από το οποίο προκύπτουν οι τιμές K_m και V_{max} .

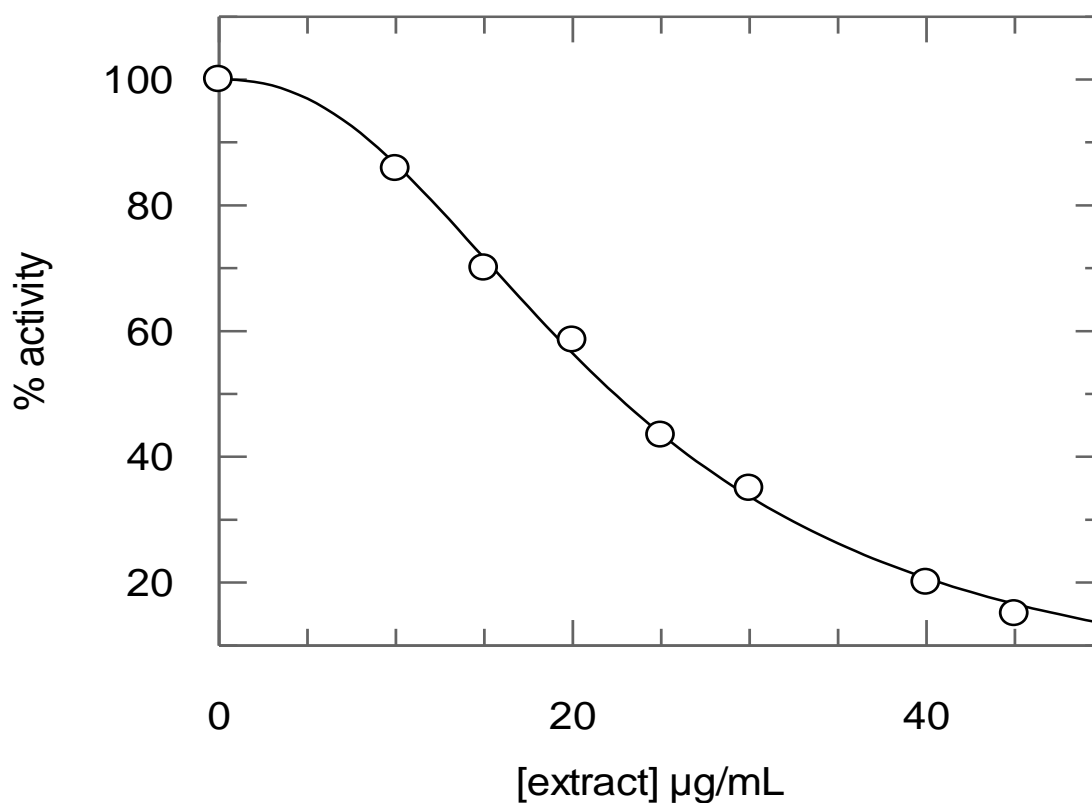
4.2.1 Προσδιορισμός του IC_{50} της αναστολής του ενζύμου

Στα διαγράμματα που ακολουθούν προσδιορίζεται η τιμή της IC_{50} των εκχυλισμάτων Μοσχόμαυρο και Μανδηλάρια. Όπως έχει προαναφερθεί, η IC_{50} αποτελεί τη συγκέντρωση του αναστολέα που προκαλεί αναστολή της δραστηριότητας του ενζύμου κατά 50%.

Μοσχόμαυρο γίγαρτα 2011

$$IC_{50} = 22.37 \pm 0.27 \mu\text{g/mL}$$

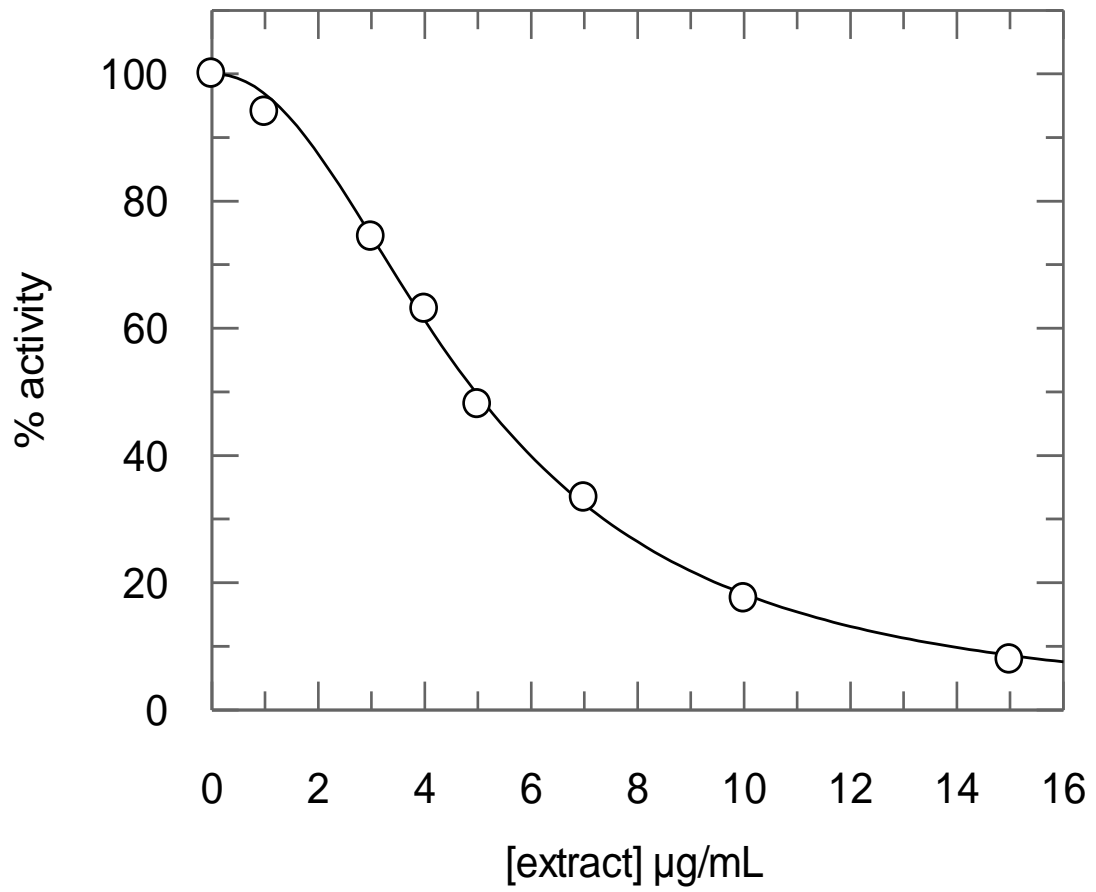
Για [tRNA] = 7 μM



Μανδηλάρια γίγαρτα 2011

$IC_{50} = 4.95 \pm 0.08 \mu\text{g/mL}$

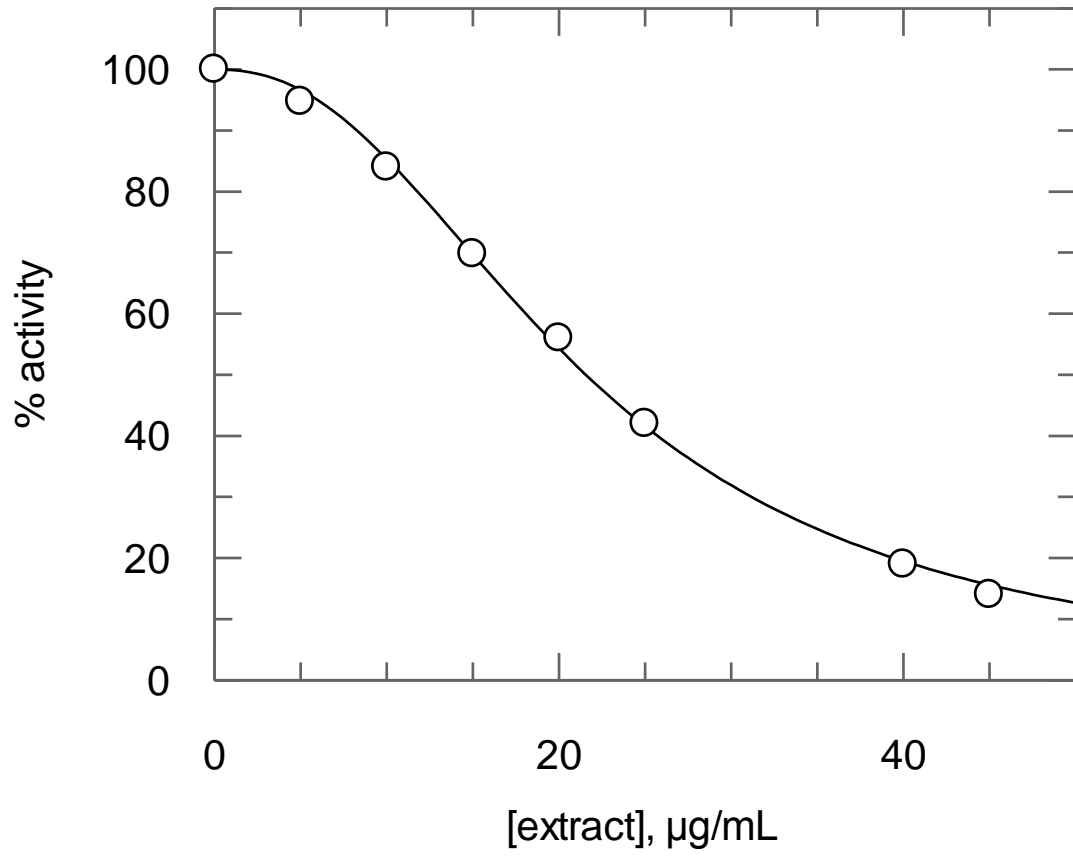
Για $[tRNA] = 7 \mu\text{M}$



Μανδηλάρια βόστρυχοι 2011

$IC_{50} = 21.57 \pm 0.27 \mu\text{g/mL}$

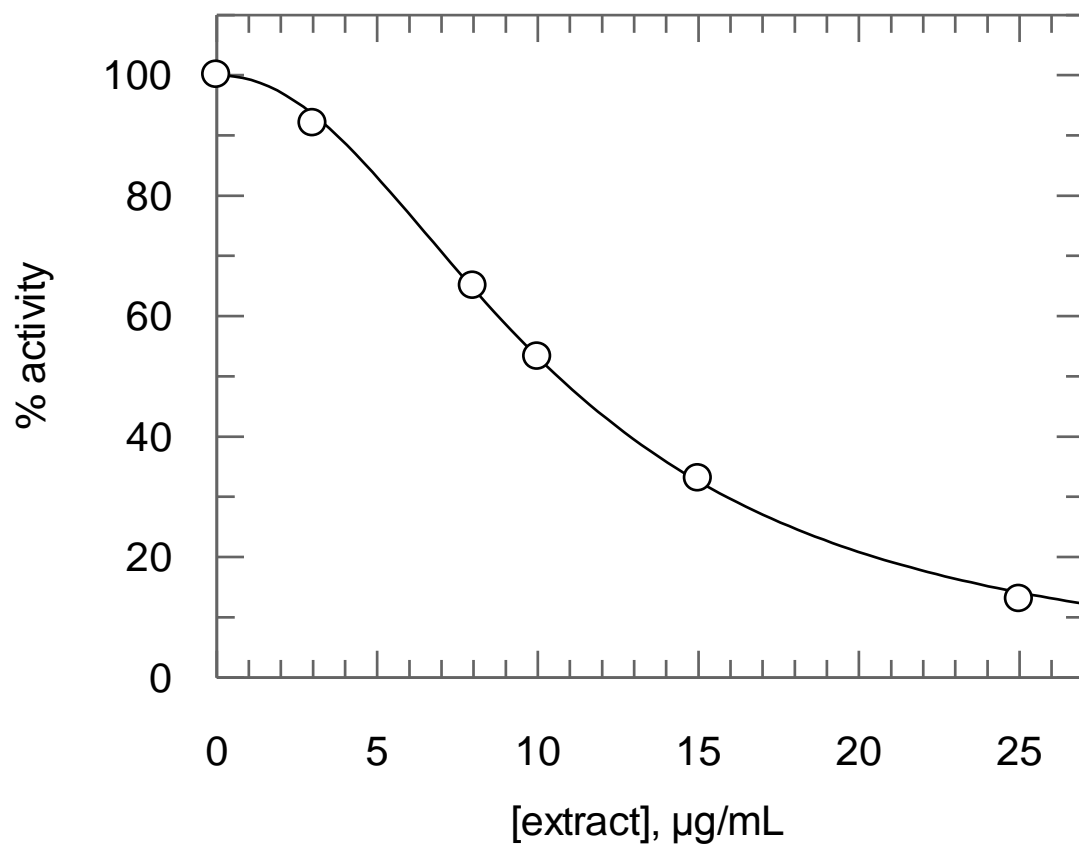
Για $[\text{tRNA}] = 7 \mu\text{M}$



Μαυροτράγανο γίγαρτα 2011

$IC_{50} = 10.62 \pm 0.12 \mu\text{g/mL}$

Για $[\text{tRNA}] = 7 \mu\text{M}$



5 Συζήτηση

Στην παρούσα εργασία η οποία διεκπεραιώθηκε στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας, έγιναν πρωταρχικά πειράματα απομόνωσης και καθαρισμού της ανασυνδυσασμένης ανθρώπινης αγγειογενίνης (hAng), με τη χρήση μίας μόνο κατιοανταλλακτικής στήλης (HiTrapSPFF) και την απόδοση του καθαρισμού της να είναι 0.63 mg ανά 4L βακτηριακής καλλιέργειας. Όπως είναι γνωστό, η δραστικότητα ριβονουκλεάσης της hAng, η οποία είναι απαραίτητη για τη αγγειογενετική της δράση, είναι αρκετές τάξεις μεγέθους (10⁵-10⁶) χαμηλότερη από εκείνη της RNase A. Προκειμένου λοιπόν να αναπτυχθούν αναστολείς έναντι της αγγειογενίνης χρησιμοποιούμε ως “μοντέλο” την ριβονουκλεάση A (RNaseA). Ο λόγος είναι πως τα δύο αυτά ένζυμα, εμφανίζουν μεγάλη αμινοξική και δομική ομολογία και ιδιαίτερα στο καταλυτικό κέντρο που φτάνει το 100%.

Στη συνέχεια λοιπόν, μελετήθηκαν φυτικά πολυφαινολικά εκχυλίσματα αμπέλου των ποικιλιών Μανδηλάρια, Μοσχόμαυρο και Μαυροτράγανο, για την πιθανή ανασταλτική δράση τους στην ενζυμική δραστικότητα της RNaseA. Τα χαρακτηριστικά του ενζύμου βρέθηκαν να είναι $K_m = 6,11 \pm 0.27 \mu\text{M}$, και $V_{max} = 1.75 \pm 0.04 \mu\text{mol CMP}/(\text{mg} \times \text{min})$, ενώ οι συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων που προκάλεσαν 50% αναστολή της ενζυμικής δραστικότητας (IC_{50}) βρέθηκαν να είναι:

- 1) Μοσχόμαυρο Γίγαρτα 2011, $IC_{50} = 22.37 \pm 0.27 \mu\text{g/mL}$
- 2) Μανδηλάρια Γίγαρτα 2011, $IC_{50} = 4.95 \pm 0.08 \mu\text{g/mL}$
- 3) Μανδηλάρια Βόστρυχοι 2011, $IC_{50} = 21.57 \pm 0.27 \mu\text{g/mL}$
- 4) Μαυροτράγανο Γίγαρτα 2011, $IC_{50} = 10.62 \pm 0.12 \mu\text{g/mL}$

Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν πως η αναστολή των εκχυλισμάτων είναι αρκετά σημαντική. Για την ταυτοποίηση του δραστικού συστατικού των εκχυλισμάτων και την *in vivo* αποτελεσματικότητά του θα ακολουθήσουν μελέτες κυτταροκαλλιιεργειών *ex vivo*, καθώς και κρυσταλλογραφικές μελέτες περίθλασης ακτίνων X στην RNaseA.

Τέλος, χρησιμοποιώντας ως μοριακά μοντέλα εκκίνησης αναστολείς της RNase A, με τον κατάλληλο σχεδιασμό είναι δυνατό να ανακαλυφθούν νέοι ισχυροί και εξειδικευμένοι αναστολείς έναντι της hAng. Τέτοιοι αναστολείς μπορούν να αποτελέσουν τη βάση για ανάπτυξη νέων αντικαρκινικών φαρμάκων.

6 Βιβλιογραφία

Avey, H. P., M. O. Boles, et al. (1967). "Structure of ribonuclease." *Nature* 213 (5076): 557-562.

Apostolou A., Stagos D., Galitsiou E., Spyrou A., Haroutounian S., Portesis N., Trizoglou I., A. Hayes W., Kouretas D. (2013) Assessment of polyphenolic content, antioxidant activity, protection against ROS-induced DNA damage and anticancer activity of *Vitisvinifera* stem extracts, *Food and Chemical Toxicology*, Available online on <http://www.sciencedirect.com/>

Aravind, L. and E. V. Koonin (2001). "A natural classification of ribonucleases." *Methods Enzymol* 341: 3-28.

Bond, M. D. &Vallee, B. L. (1990). Replacement of residues 8-22 of angiogenin with 7-21 of RNase A selectively affects protein synthesis inhibition and angiogenesis, *Biochemistry*, 29(13): 3341-3349.

Cafaro, V., Bracale, A., Formiggini, F., Notomista, E., D'Alessio, G. & Di Donato, A. (1998). Protein engineering of ribonucleases, *Biochimie*, 80, 905-909.

Curran, T. P., R. Shapiro, et al. (1993). "Alteration of the enzymatic specificity of human angiogenin by site-directed mutagenesis." *Biochemistry* 32(9): 2307-2313.

Curran TP, Shapiro R, Riordan JF and Vallee BL. Modulation of the activity of angiogenin by mutagenesis at Asp-116. *Biochim Biophys Acta* 1993; 1202:281-286.

D'Alessio, G., A. Di Donato, et al. (1991). Seminal RNase: a unique member of the ribonuclease superfamily. *Trends BiochemSci*, 16(3), 104-106.

D'Alessio, G., & Riordan, J. F. (1997). *Ribonucleases: Structures and Functions*. New York: Academic Press.

Di Tomaso, et al, Surrogate markers for antiangiogenic therapy and dose-limiting toxicities for bevacizumab with radiation and chemotherapy: continued experience of a phase I trial in rectal cancer patients. *J ClinOncol*. 2005 23(31):8136-9.

Fett, J. W., Bethune, J. L et al. (1987). Induction of angiogenesis by mixtures of two angiogenic proteins, angiogenin and acidic fibroblast growth factor, in the chick chorioallantoic membrane. *Biochem Biophys Res Commun*, 146(3), 1122-1131.

Folkman J. Angiogenesis-dependent diseases. *Semin Oncol*. 2001 (6):536-42.

Hallahan, T. W., R. Shapiro, et al. (1992). "Importance of asparagine-61 and asparagine-109 to the angiogenic activity of human angiogenin." *Biochemistry* 31(34): 8022-8029.

Harper JW, Fox EA, Shapiro R and Vallee BL. Mutagenesis of residues flanking Lys-40 enhances the enzymatic activity and reduces the angiogenic potency of angiogenin. *Biochemistry* 1990; 29:7297-7302.

Harper JW and Vallee BL. Mutagenesis of aspartic acid-116 enhances the ribonucleolytic activity and angiogenic potency of angiogenin. *Proc Natl AcadSci U S A* 1988, 85:7139-7143.

James F. Riordan. *Ribonucleases: structures and Functions* 1997, 14:445-489.

Kao, R. Y., 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, *Proc Natl AcadSci U S A*, 99(15), 10066-10071.

Kieran D, Sebastia J, Greenway MJ, King MA, Connaughton D, Concannon CG, Fenner B, Hardiman O and Prehn JH. Control of motoneuron survival by angiogenin. *J Neurosci* 2008, 28:14056-14061.

Kilarski WW1, Gerwins P. A new mechanism of blood vessel growth - hope for new treatment strategies. *Discov Med.* 2009 (40):23-7.

Kishimoto K, Liu S, Tsuji T, Olson KA and Hu GF. Endogenous angiogenin in endothelial cells is a general requirement for cell proliferation and angiogenesis. *Oncogene* 2005, 24:445-456.

Leland, P. A., Schultz L. W. Kim B.M., Raines R.T.,(1998). "Ribonuclease A variants with potent cytotoxic activity. " *Proc Natl AcadSci U S A* 95(18): 10407-10412.

Leonidas, D. D., Chavali, G. B. et al. (2003). High-resolution crystal structures of ribonuclease A complexed with adenylic and uridylic nucleotide inhibitors. Implications for structure-based design of ribonucleolytic inhibitors., *Protein Sci* 12(11), 2559-2574.

Li R, Riordan JF and Hu G. Nuclear translocation of human angiogenin in cultured human umbilical artery endothelial cells is microtubule and lysosome independent. *Biochem Biophys Res Commun* 1997, 238:305-312.

Moroianu J and Riordan JF. Nuclear translocation of angiogenin in proliferating endothelial cells is essential to its angiogenic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91:1677-1681.

Moussaoui, M., Nogues, M. V. et al. (1998). The subsites structure of bovine pancreatic ribonuclease A accounts for the abnormal kinetic behavior with cytidine 2',3'-cyclic phosphate. *J Biol Chem* 273(40), 25565-25572.

Papetti M1, Herman IM, Mechanisms of normal and tumor-derive angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2002 (5):C947-70.

Riordan JF. Angiogenin. *Methods Enzymol* 2001; 341:263-273.

Ronald Raines, Ribonuclease A., 1998 *Chem Rev* 7, 98(3):1045-1066.

Rosenberg, H. F. (2008). "RNase A ribonucleases and host defense: an evolving story." *J Leukoc Biol* 83(5): 1079-1087.

Russo N, Shapiro R, Acharya KR, Riordan JF and Vallee BL. Role of glutamine-117 in the ribonucleolytic activity of human angiogenin. Proc Natl Acad Sci U S A 1994, 91:2920-2924

Rybak, S. M., D. S. Auld, et al. (1989). "C-terminal angiogenin peptides inhibit the biological and enzymatic activities of angiogenin." Biochem Biophys Res Commun 162(1): 535-543.

Shapiro, R. and B. L. Vallee (1989). "Site-directed mutagenesis of histidine-13 and histidine-114 of human angiogenin. Alanine derivatives inhibit angiogenin-induced angiogenesis." Biochemistry 28(18): 7401-7408.

Shapiro R, Fox EA and Riordan JF. Role of lysines in human angiogenin: chemical modification and site-directed mutagenesis. Biochemistry 1989; 28:1726-1732.

Shapiro R., Harper W.J., Fox E.A., Jansen H-W, Hein F., Uhlmann E.. Expression of Met(-1) Angiogenin in Escherichia coli: Conversion to the Authentic <Glu-1 Protein. ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, 1988, 175,450-461.

Shapiro R and Vallee BL. Site-directed mutagenesis of histidine-13 and histidine-114 of human angiogenin. Alanine derivatives inhibit angiogenin-induced angiogenesis. Biochemistry 1989, 28:7401-7408.

Shapiro R and Vallee BL. Identification of functional arginines in human angiogenin by site-directed mutagenesis. Biochemistry 1992, 31:12477-12485.

Shapiro R, Riordan JF and Vallee BL. Characteristic ribonucleolytic activity of human angiogenin. Biochemistry 1986; 25:3527-3532.

Shapiro R, Strydom DJ, Olson KA and Vallee BL. Isolation of angiogenin from normal human plasma. Biochemistry 1987; 26:5141-5146.

Strydom DJ, Fett JW, Lobb RR, Alderman EM, Bethune JL, Riordan JF and Vallee BL. Amino acid sequence of human tumor derived angiogenin. Biochemistry 1985; 24:5486-5494.

Stryer, L., 1997 .Biochemistry, 3th ed. W.H. Freeman.

Subramanian V and Feng Y. A new role for angiogenin in neurite growth and pathfinding: implications for amyotrophic lateral sclerosis. Hum Mol Genet

2007, 16:1445-1453.

Weiner HL, Weiner LH and Swain J Tissue distribution and developmental expression of the messenger RNA encoding angiogenin. L. Science 1987; 237:280-282

Wu D, Yu W, Kishikawa H, Folkerth RD, Iafrate AJ, Shen Y, Xin W, Sims K, Hu GF (2007) Angiogenin loss-of-function mutations in amyotrophic lateral sclerosis. Ann Neurol 62 (6):609–617

Yoshioka N, Wang L, Kishimoto K, Tsuji T and Hu GF. A therapeutic target for prostate cancer based on angiogenin-stimulated angiogenesis and cancer cell proliferation. Proc Natl Acad Sci USA 2006; 103:14519-14524.