

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ανθρώπινη αγγειογενίνη (hAng) αποτελεί έναν ισχυρό αγγειογενετικό παράγοντα με σημαντικό ρόλο σε πληθώρα φυσιολογικών και παθολογικών καταστάσεων και στην εγκατάσταση και μετάσταση μεγάλης ποικιλίας όγκων. Εμφανίζει ποικίλους μηχανισμούς δράσης, οι οποίοι συμβάλλουν στην κυτταρική ανάπτυξη και την επιβίωση. Παρουσιάζει ριβονουκλεολυτική δραστηριότητα, η οποία μολονότι είναι σημαντικά χαμηλότερη από αυτή της ομόλογής της RNase A, εντούτοις είναι απαραίτητη για την αγγειογενετική της δράση. Η εξωκυττάρια hAng ενεργοποιεί διάφορα μονοπάτια μεταγωγής σήματος και επιπλέον εμπλέκεται στην αποικοδόμηση του εξωκυττάριου ιστού επάγοντας την κυτταρική μετανάστευση και την εισβολή. Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης, συσσωρεύεται στον πυρήνα/πυρηνίσκο προάγοντας τη μεταγραφή μορίων mRNA και τη μεταγραφή και επεξεργασία μορίων rRNA, ενώ κάτω από συνθήκες στρες, στο κυτταρόπλασμα, προάγοντας το σχηματισμό μορίων tiRNA αναστέλλοντας έτσι την έναρξη της μετάφρασης. Λόγω της εξαιρετικής αγγειογενετικής της δράσης η hAng αποτελεί φαρμακευτικό στόχο για την ανάπτυξη αντιαγγειογενετικών φαρμάκων για την αντιμετώπιση νεοπλασματικών παθήσεων.

Στην παρούσα διατριβή, πραγματοποιήθηκαν βιοχημικές μελέτες της δράσης της hAng με απώτερο σκοπό την κατανόηση του βιολογικού της ρόλου. Αρχικά, με στόχο τη αποσαφήνιση της σχέσης δομής και λειτουργίας της hAng, διεξήχθη κρυσταλλογραφική μελέτη του συμπλόκου hAng-θεικών ανιόντων. Μελέτες ενζυμικής κινητικής έδειξαν πως αν και η ανασταλτική ισχύς του θεικού αμμωνίου στην hAng είναι παρόμοια με αυτήν σε δύο άλλες ομόλογες ριβονουκλεάσες (RNase A και EDN), η δομική βάση της αναστολής στην hAng διαφέρει. Σε αντίθεση με τις RNase A και EDN, όπου η αναστολή οφείλεται στην πρόσδεση των ανιόντων στο ενεργό κέντρο, στην hAng αποδίδεται στη σύνδεση των ανιόντων σε περιφερειακές περιοχές σύνδεσης του υποστρώματος στο ένζυμο. Αυτές οι θέσεις πρόσδεσης των θεικών ανιόντων στην hAng, οδήγησαν στη χαρτογράφηση κέντρων σύνδεσης εκτεταμένων ανιονικών πολυμερών, όπως τα μόρια RNA, στην πρωτεΐνη.

Στη συνέχεια, μελετήθηκε η εξειδίκευση του ενεργού κέντρου της hAng με τη βοήθεια μικρών νουκλεοζιτών, με στόχο τον κατευθυνόμενο από τη δομή

σχεδιασμό αναστολέων του ενζύμου, ως εν δυνάμει αντικαρκινικά φάρμακα. Λόγω της παρεμπόδισης του ενεργού κέντρου της hAng από τη διαμόρφωση του καρβοξυτελικού άκρου, ο σχεδιασμός αναστολέων βασίζεται σε δομές συμπλόκων της RNase A και της EDN. Κινητικές και κρυσταλλογραφικές μελέτες δύο σειρών τροποποιημένων νουκλεοζιτών στην RNase A και στην EDN, ανέδειξαν τους ισχυρότερους αναστολείς, οι οποίοι αξιολογήθηκαν εν συνεχεία στην hAng για την αντιαγγειογενετική τους δράση *in vivo*. Η ένωση με τη μεγαλύτερη ανασταλτική ισχύ *in vivo*, μελετήθηκε περαιτέρω για την ικανότητα αναστολής της ριβονουκλεολυτικής δραστηριότητας της hAng *in vitro*. Εντούτοις, ο αναστολέας αυτός παρουσίασε χαμηλή αναστολή της ριβονουκλεολυτικής δραστηριότητας της hAng *in vitro*. Η ανάλυση της σύνδεσης του αναστολέα αυτού στην hAng με φασματοσκοπία NMR αποκάλυψε πως ο αναστολέας συνδέεται πρωταρχικά στο κέντρο σύνδεσης της πρωτεΐνης στην κυτταρική μεμβράνη, παρεμποδίζοντας την είσοδο της hAng στο κύτταρο και δευτερευόντως στο καταλυτικό της κέντρο αναστέλλοντας τη ριβονουκλεολυτική της δραστηριότητα. Ο αναστολέας αυτός είναι ο πρώτος που αναφέρεται με διττή δράση έναντι της hAng.

Τέλος, μελέτες ανοσοκατακρήμνισης στον πυρήνα και στο κυτταρόπλασμα σε ενδοθηλιακά κύτταρα και πρωτεομική ανάλυση αποκάλυψαν σημαντικές πληροφορίες για τα κυτταρικά μονοπάτια που συμμετέχει η hAng. Έτσι, η φασματομετρία μάζας οδήγησε στην ταυτοποίηση ενός συνόλου πιθανών πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων της hAng σε κάθε κυτταρικό διαμέρισμα. Η ομαδοποίηση των πρωτεϊνών με βάση τα σύμπλοκα που συγκροτούν, αποκάλυψε σημαντικές λεπτομέρειες των μονοπατιών στα οποία εμπλέκεται η hAng αλλά και νέους εν δυνάμει βιολογικούς ρόλους. Το πυρηνικό αντιγόνο πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων (PCNA), ήταν η αμέσως επόμενη από την hAng στατιστικά σημαντική πρωτεΐνη που ταυτοποιήθηκε. Ο PCNA κατακρημνίστηκε με την hAng στο κυτταρόπλασμα, αλλά όχι στον πυρήνα. Η αλληλεπίδραση hAng-PCNA επιβεβαιώθηκε με πειράματα ανοσοκατακρήμνισης, ανοσοαποτύπωσης και ανοσοκυτταροχημείας. Περαιτέρω βιοχημικές μελέτες απαιτούνται για την αποσαφήνιση της βιολογικής σημασίας της ειδικής αυτής αλληλεπίδρασης στο κυτταρόπλασμα.