

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

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

Οι μοριακές λεπτομέρειες της αλληλεπίδρασης της hAng με το PCNA προσδιορίστηκαν με συνδυασμό διάφορων μεθόδων βιοφυσικής. Μέσω μελετών ανοσοκατακρήμνισης (IP) της hAng με το PCNA *in vitro*, αποδείχθηκε πως οι δύο πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν άμεσα, ενώ η αλληλεπίδραση ποσοτικοποιήθηκε με θερμιδομετρία ισοθερμικής τιτλοδότησης (ITC), λαμβάνοντας πληροφορίες σχετικά με τη στοιχειομετρία, την ενθαλπία, την εντροπία και την κινητική σχηματισμού του συμπλόκου των δύο πρωτεϊνών, αποκαλύπτοντας πως πρόκειται για μία ισχυρή αλληλεπίδραση με σταθερά διάστασης $K_d = 130$ nM. Ακόμη, πραγματοποιήθηκε χαρτογράφηση της επιφάνειας αλληλεπίδρασης τους με φασματοσκοπία NMR, ενώ βάσει των παραπάνω πληροφοριών δημιουργήθηκε ένα μοντέλο της τρισδιάστατης δομής του συμπλόκου hAng-PCNA, με τη βοήθεια αλγορίθμων ελλιμενισμού (docking) και προσομοιώσεων μοριακής δυναμικής. Η σταθερότητα της αλληλεπίδρασης ελέγχθηκε με τη δημιουργία μεταλλάξεων των καταλοίπων της hAng, Arg5 και Arg101 που βρίσκονται, σύμφωνα με το μοντέλο, στην επιφάνεια διεπαφής των δύο πρωτεϊνών και αλληλεπιδρούν με τα κατάλοιπα του PCNA, Glu55 και Glu130 αντίστοιχα. Παράχθηκαν έτσι, δύο μεταλλάγματα (R5E και R5ER101E), όπου οι δύο αργινίνες αντικαταστάθηκαν από γλουταμικό οξύ. Εν συνεχεία, πραγματοποιήθηκε βιοφυσικός χαρακτηρισμός της αλληλεπίδρασης των μεταλλαγμάτων της hAng με το PCNA, με ITC. Τα αποτελέσματα επιβεβαίωσαν την ορθότητα του μοντέλο, καθώς η αλληλεπίδραση του συμπλόκου hAng-PCNA, μετά την αλλαγή των συγκεκριμένων αμινοξέων, μετατράπηκε από μια ισχυρή σε μία μεσαία αλληλεπίδραση με σταθερές διάστασης, $K_d = 218$ nM και $K_d = 1160$ nM, για τα μεταλλάγματα R5E και R5ER101E, αντίστοιχα.

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

κατάλοιπα αντικαταστάθηκαν από αλανίνη, οι οποίες αποκάλυψαν πως οι συγκεκριμένες μεταλλάξεις δεν αλλάζουν σημαντικά τη δομή της πρωτεΐνης.