



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ ΤΣΑΓΚΑΡΑΚΟΥ

Η ΔΟΜΙΚΗ ΒΑΣΗ ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗΣ ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΩΝ ΑΠΟ ΑΝΘΡΩΠΙΝΕΣ ΓΑΛΕΚΤΙΝΕΣ

ΔΕΚΕΜΒΡΙΟΣ 2023



Επιχειρησιακό Πρόγραμμα
Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού,
Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



«Η υλοποίηση της διδακτορικής διατριβής συγχρηματοδοτήθηκε από την Ελλάδα και την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση», 2014-2020, στο πλαίσιο της Πράξης με κωδικό ΟΠΣ 5113934 «Ενίσχυση του ανθρώπινου δυναμικού μέσω της υλοποίησης διδακτορικής έρευνας Υποδράση 2: Πρόγραμμα χορήγησης υποτροφιών ΙΚΥ σε υποψηφίους διδάκτορες των ΑΕΙ της Ελλάδας».

Η ΔΟΜΙΚΗ ΒΑΣΗ ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗΣ ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΩΝ ΑΠΟ ΑΝΘΡΩΠΙΝΕΣ ΓΑΛΕΚΤΙΝΕΣ

STRUCTURAL BASIS OF CARBOHYDRATE RECOGNITION BY HUMAN GALECTINS

Τριμελής συμβουλευτική επιτροπή

Δημήτριος Λεωνίδας (επιβλέπων)

Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα, Ελλάδα.

Βασιλική Σκαμνάκη

Επίκουρος καθηγήτρια Βιοχημείας-Μεταβολισμού, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα, Ελλάδα.

Άννα-Μαρία Ψαρρά

Αναπληρώτρια καθηγήτρια Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα, Ελλάδα.

Επταμελής εξεταστική επιτροπή

Δημήτριος Λεωνίδας (επιβλέπων)

Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα, Ελλάδα.

Βασιλική Σκαμνάκη

Επίκουρος καθηγήτρια Βιοχημείας-Μεταβολισμού, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα, Ελλάδα.

Άννα-Μαρία Ψαρρά

Αναπληρώτρια καθηγήτρια Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα, Ελλάδα.

Μαρία Κοντού

Επίκουρος καθηγήτρια Πρωτεϊνικής Χημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα, Ελλάδα.

Νικόλαος Μπαλατσός

Αναπληρωτής καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα, Ελλάδα.

Γεώργιος Κοντοπίδης

Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Κτηνιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Καρδίτσα, Ελλάδα.

Πέτρος Γκιάστας

Επίκουρος καθηγητής Βιοχημείας με εφαρμογές στη Βιοτεχνολογία, Τμήμα Βιοτεχνολογίας, Σχολή εφαρμοσμένης Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα, Ελλάδα.

ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ ΤΣΑΓΚΑΡΑΚΟΥ

ΔΟΜΙΚΗ ΒΑΣΗ ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗΣ ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΩΝ ΑΠΟ ΑΝΘΡΩΠΙΝΕΣ ΓΑΛΕΚΤΙΝΕΣ

ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ ΤΣΑΓΚΑΡΑΚΟΥ
2023

ΔΟΜΙΚΗ ΒΑΣΗ ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗΣ ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΩΝ ΑΠΟ ΑΝΘΡΩΠΙΝΕΣ ΓΑΛΕΚΤΙΝΕΣ

Αριθμός προκαταρκτικών σελίδων: 12

Συνολικός αριθμός σελίδων: 238

Αριθμός πινάκων: 37

Αριθμός διαγραμμάτων: 9

Αριθμός βιβλιογραφικών παραπομπών: 213

Μέρος της διδακτορικής διατριβής έχει παρουσιαστεί στις παρακάτω δημοσιεύσεις:

Strong Binding of C-Glycosyl-1,2-Thiodisaccharides to Galectin-3-Enthalpy-Driven Affinity Enhancement by Water-Mediated Hydrogen Bonds. **A. S. Tsagkarakou**, L. Lázár, G. Stravodimos, G. Kontopidis, H. Leffler, U. J. Nilsson, L. Somsák, and D. D. Leonidas, *Journal of Medicinal Chemistry*, 2023, 66, 12420-12431, <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.3c00882>

Δημοσιεύσεις σε συναφές αντικείμενο

1. High consistency of structure-based design and X-ray crystallography: Design, synthesis, kinetic evaluation, and crystallographic binding mode determination of biphenyl-N-acyl-β-D-glucopyranosylamines as glycogen phosphorylase inhibitors. **A.S. Tsagkarakou**, T. Fischer, S.M. Koulas, E. Kyriakis, G.A. Stravodimos, V.T. Skamnaki, P.G.V. Liggri, S.E. Zographos, R. Riedl, and D.D. Leonidas, *Molecules*, **2019** Apr 3;24(7). pii: E1322. doi: 10.3390/molecules24071322 (Two first authors equally contributed)
2. Affinity crystallography reveals anthocyanin binding at the inhibitor site of glycogen phosphorylase. C. Drakou, C. Gardeli, I. Tsialtas, S. Alexopoulos, A. Mallouchos, S.M. Koulas, **A. Tsagkarakou**, D.D. Leonidas, A.M. Psarra, V. Skamnaki, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2020**, 68, 37, pp. 10191-10199, doi: 10.1021/acs.jafc.0c04205
3. Structure activity relationship of the binding of p-coumaroyl glucose to glycogen phosphorylase and its effect on hepatic cell metabolic pathways. **A. S. Tsagkarakou**, S.A. Chasapi, S.M. Koulas, I. Tsialtas, E. Kyriakis, C. Drakou, S. Kun, L. Somsak, G.A. Spyroulias, A-M. Psarra, D.D. Leonidas, *European Journal of Medicinal Chemistry Reports*, **2021**, 3, 100011, doi: 10.1016/j.ejmcr.2021.100011
4. The druggability of the ATP binding site of glycogen phosphorylase kinase probed by coumarin analogues. S. Alexopoulos, A. Gkouskou, G. Stravodimos, **A. S. Tsagkarakou**, I. Tsialtas, D. Katounis, A-M. Psarra, D. D. Leonidas, G. Brachmachari, J. M. Hayes, V. Skamnaki, *Current Research in Chemical Biology*, 2022, 2, 100022, doi: 10.1016/j.crchbi.2022.100022
5. In vitro chondrogenesis induction by short peptides of the carboxy-terminal domain of Transforming Growth Factor β1. M. Pitou, E. Papachristou, R. M. Papi, D. Bratsios, G-M Kefala, **A. S. Tsagkarakou**, D. D. Leonidas, A. Aggeli, G. E. Papadopoulos, T. Choli-Papadopoulou, *Biomedical Materials, Biomaterials for Bone Regeneration*, 2023, Manuscript ID: biomedicines-2643255 (to be published)

Πίνακας Περιεχομένων

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	10
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	13
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	15
1.1 The <i>sugar code</i>	15
1.2 Υδατάνθρακες και ανακάλυψη φαρμάκων	17
1.3 Η οικογένεια των λεκτινών	17
1.3.1 Κατηγοριοποίηση ανθρώπινων λεκτινών	18
1.4 Λεκτίνες τύπου S	24
1.4.1 Η κατηγοριοποίηση των ανθρώπινων γαλεκτινών	26
1.5 Πρωτότυπες γαλεκτίνες	29
1.5.1 Γαλεκτίνη-1.....	29
1.5.2 Γαλεκτίνη-2.....	31
1.5.3 Γαλεκτίνη-7.....	32
1.5.4 Γαλεκτίνη-10.....	37
1.5.5 Γαλεκτίνη-13.....	39
1.5.6 Γαλεκτίνη-14.....	40
1.5.7 Γαλεκτίνη-16.....	42
1.6 Γαλεκτίνες επαναλαμβανόμενου τύπου	43
1.6.1 Γαλεκτίνη-4.....	43
1.6.2 Γαλεκτίνη-8.....	45
1.6.3 Γαλεκτίνη-9.....	52
1.6.4 Γαλεκτίνη-12.....	54
1.7 Γαλεκτίνες χιμαιρικού τύπου	56
1.7.1 Γαλεκτίνη-3.....	57
1.8 Γαλεκτίνες ως θεραπευτικοί στόχοι	72
1.9 Ορθολογικός σχεδιασμός φαρμάκων κατευθυνόμενος από τη δομή	76
1.10 Κατευθυνόμενος από τη δομή σχεδιασμός ανταγωνιστών έναντι των γαλεκτινών	78
1.10.1 Φασματοσκοπία φθορισμού της τρυπτοφάνης (<i>Tryptophan Fluorescence Spectroscopy, TFS</i>)	79
1.10.2 Πόλωση φθορισμού (<i>Fluorescence Polarization, FP</i>)	80
1.10.3 Θερμιδομετρία ισοθερμικής τιτλοδότησης (<i>Isothermal Titration Calorimetry</i>)	81
2. Αντικείμενο μελέτης	84
3. Υλικά και μέθοδοι	85
3.1 Όργανα.....	85
3.2 Βακτηριακές κυτταρικές σειρές.....	85
3.3 Γονίδια κλωνοποιημένα σε πλασμιδιακούς φορείς.....	85
3.4 Αντιδραστήρια.....	86
3.5 Λοιπά υλικά	87
3.6 Διαλύματα	87
4. Μέθοδοι	88
4.1 Αρχή μεθόδων	88

4.1.1 Παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών.....	88
4.1.2 Καθαρισμός και απομόνωση πρωτεϊνών	89
4.1.3 Μέτρηση της σταθεράς K_D	90
4.2 Κρυσταλλογραφία	96
4.2.1 Ανάπτυξη κρυστάλλων	96
4.2.2 Τι είναι κρύσταλλος;.....	97
4.2.3 Συλλογή κρυσταλλογραφικών δεδομένων.....	100
4.2.4 Το πρόβλημα της φάσης.....	101
4.2.5 Ανάλυση κρυσταλλογραφικών δεδομένων.....	102
4.2.6 Δείκτες Miller	102
4.2.7 Ο νόμος του Bragg.....	102
4.2.8 Μετασχηματισμοί Fourier.....	103
4.2.9 Ενσωμάτωση κρυσταλλογραφικών δεδομένων (Integration).....	104
4.2.10 Ρύθμιση κλίμακας και συγχώνευσης (Scaling and merging)	105
4.2.11 Αξιολόγηση των δεδομένων περίθλασης σε σχέση με την ευκρίνεια.....	105
4.2.12 Χάρτες ηλεκτρονικής πυκνότητας- Βελτιστοποίηση και αξιολόγηση του τελικού μοντέλου	107
4.3 Παρασκευή υλικού Lactose Sepharose 6B για χρωματογραφία συγγένειας	109
4.4 Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων	109
4.4.1 Χημικός μετασχηματισμός	110
4.5 Παραγωγή, καθαρισμός και απομόνωση ανθρώπινων γαλεκτίνων	110
4.5.1 Παραγωγή της ανασυνδυασμένης Γαλεκτίνης-3- CRD σε βακτηριακό σύστημα <i>E. coli</i>	110
4.5.2 Καθαρισμός και απομόνωση της Γαλεκτίνης-3- CRD	111
4.5.3 Παραγωγή της ανασυνδυασμένης Γαλεκτίνης-4C-CRD σε βακτηριακό σύστημα <i>E. coli</i>	112
4.5.4 Καθαρισμός και απομόνωση της γαλεκτίνης-4C-CRD.....	112
4.5.5 Παραγωγή της ανασυνδυασμένης Γαλεκτίνης-7 σε βακτηριακό σύστημα <i>E. coli</i>	112
4.5.6 Καθαρισμός και απομόνωση της Γαλεκτίνης-7	113
4.5.7 Παραγωγή της ανασυνδυασμένης Γαλεκτίνης-8N-CRD σε βακτηριακό σύστημα <i>E. coli</i>	113
4.5.8 Καθαρισμός και απομόνωση της Γαλεκτίνης-8N-CRD	113
4.6 Μελέτες προσδιορισμού της σταθεράς πρόσδεσης KD μέσω θερμιδομετρίας ισοθερμικής τιτλοδότησης (ITC)	113
4.7 Κρυστάλλωση Γαλεκτίνων	114
4.7.1 Κρυστάλλωση της Γαλεκτίνης-3-CRD	114
4.7.2 Κρυστάλλωση της γαλεκτίνης-4C-CRD	120
4.7.3 Κρυστάλλωση της Γαλεκτίνης-7	121
4.7.4 Κρυστάλλωση της γαλεκτίνης-8N-CRD	122
4.8 Συλλογή και ανάλυση κρυσταλλογραφικών δεδομένων για τις Γαλεκτίνες.....	122
4.8.1 Συλλογή κρυσταλλογραφικών δεδομένων.....	122
4.8.2 Επεξεργασία και ανάλυση των κρυσταλλογραφικών δεδομένων	123
5. Αποτελέσματα και συζήτηση.....	125
5.1 Καθαρισμός και απομόνωση της Γαλεκτίνης-3-CRD	125
5.2 Καθαρισμός και απομόνωση της Γαλεκτίνης-4C-CRD	127
5.3 Καθαρισμός και απομόνωση της Γαλεκτίνης-7	129
5.4 Καθαρισμός και απομόνωση της Γαλεκτίνης-8N-CRD.....	131
5.5 Κρυστάλλωση της γαλεκτίνης-3	133
5.6 Κρυστάλλωση της γαλεκτίνης-4C-CRD.....	133
5.7 Κρυστάλλωση της Γαλεκτίνης-7	134
5.8 Κρυστάλλωση της γαλεκτίνης-8N-CRD	135

5.9 Μελέτες πρόσδεσης C-Γλυκοσιλικών-1,2-Θειοδισακχαριτών στις υπό μελέτη Γαλεκτίνες .	136
5.9.1 Μελέτες πρόσδεσης C-Γλυκοσιλικών-1,2-Θειοδισακχαριτών στη Γαλεκτίνη-3-CRD	136
5.9.2 Μελέτες πρόσδεσης C-Γλυκοσιλικών-1,2-Θειοδισακχαριτών στη Γαλεκτίνη-7	149
5.9.3 Μελέτες πρόσδεσης C-Γλυκοσιλικών-1,2-Θειοδισακχαριτών στη Γαλεκτίνη-8N-CRD.....	160
5.10 Μελέτες πρόσδεσης 1,1-Θειοδισακχαρίτη στη Γαλεκτίνη-3-CRD	169
5.10.1. Μελέτες προσδιορισμού των θερμοδυναμικών παραμέτρων και των K_D για το σύμπλοκο του θειοδισακχαρίτη με τη γαλεκτίνη-3-CRD	169
5.10.2 Κρυσταλλογραφικές μελέτες του θειοδισακχαρίτη LL80 με τη Γαλεκτίνη-3-CRD	171
5.11 Κρυσταλλογραφικές μελέτες των ενώσεων KM με τη Γαλεκτίνη-3-CRD	176
5.12 Κρυσταλλογραφικές μελέτες των ενώσεων HA και KISZ με τη Γαλεκτίνη-3-CRD	182
5.12.1 Κρυσταλλογραφικές μελέτες των ενώσεων HA με τη Γαλεκτίνη-3-CRD	182
5.12.2 Κρυσταλλογραφικές μελέτες των ενώσεων KISZ με τη Γαλεκτίνη-3-CRD.....	188
.....	198
5.13 Κρυσταλλογραφικές μελέτες των ενώσεων KS782 και HL210-2 με τη Γαλεκτίνη-3-CRD ...	198
5.14 Κρυσταλλογραφικές μελέτες των ενώσεων HL με τη Γαλεκτίνη-3-CRD	207
6.1 Κρυσταλλογραφικές μελέτες πρόσδεσης της ένωσης HMOB11-1 στη γαλεκτίνη-7	215
ΕΠΙΛΟΓΟΣ	222
SUMMARY	224
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ	226
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	227

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Πέρασαν σχεδόν πέντε χρόνια από τότε που ξεκίνησα τη διδακτορική μου διατριβή. Πέντε έντονα και πυκνά χρόνια, που ξεκίνησαν με ένα μεγάλο χρονικό διάστημα περίπου, ενάμιση χρόνου εξερεύνησης και πολλών πειραμάτων ενός προγράμματος που δυστυχώς δεν ευδοκίμησε, την αλλαγή του θέματος της διδακτορικής έρευνας, δυσκολίες, εδραίωση φιλικών σχέσεων, πανδημία, εσωστρέφεια, βήματα εδραίωσης σχέσεων με τους Καθηγητές μου, έρευνα, πολλή έρευνα, ταξίδια, μοναξιά, συγγραφή, κι άλλη συγγραφή, μικρές και άλλοτε μεγαλύτερες εσωτερικές μάχες να μην εγκαταλείψω την προσπάθεια, χαρούμενες στιγμές και σε λίγες μέρες, κι αν όλα πάνε καλά στην επικείμενη εξέτασή μου, ένα διδακτορικό, που για εμάς τους δρομείς αντοχής σημαίνει πάντα πολλά περισσότερα από έναν τίτλο. Αυτός ο τερματισμός μοιάζει περισσότερο με μία αφετηρία. Παραθέτω εδώ με αρκετή συγκίνηση το ευχαριστήριό μου σημείωμα προς όλους όσους στάθηκαν δίπλα μου όλα αυτά τα χρόνια και στους οποίους οφείλω πολλά.

Το πρώτο ευχαριστώ το οφείλω στον επιβλέποντά μου, καθηγητή Δημήτρη Λεωνίδα, για την αμέριστη στήριξη και την πολύπλευρη συμπαράστασή του σε κάθε στάδιο αυτού του εγχειρήματος. Τον ευχαριστώ θερμά για τη συνεχή επιστημονική καθοδήγηση και την ακέραια εμπιστοσύνη που μου έδειξε σε κάθε πτυχή της πολυετούς συνεργασίας μας, από το 2016, για τις πολύτιμες ευκαιρίες που μου πρόσφερε στους τομείς της έρευνας, για την ελευθερία και το σεβασμό που επέδειξε στις ερευνητικές επιλογές μου και κυρίως για όλες τις φορές που με πέταξε μεσοπέλαγα για να μου μάθει να κολυμπάω, υπό τη διαρκεί εποπτεία του φυσικά. Οφείλω ένα ευχαριστώ στην υπόλοιπη τριμελή επιτροπή, Επίκουρο καθηγήτρια Βασιλική Σκαμνάκη και Αναπληρώτρια καθηγήτρια Άννα-Μαρία Ψαρρά, για την επιστημονική και ηθική στήριξη που αφειδώς μου παρείχαν κάθε φορά που τη χρειαζόμουν και για το πολύτιμο χρόνο που μου έχουν αφιερώσει. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω την υπόλοιπη επταμελή επιτροπή, Αναπληρωτή καθηγητή Νικόλαο Μπαλατσό και Επίκουρο καθηγήτρια Μαρία Κοντού για την άψογη συνεργασία όλα αυτά τα χρόνια, τον Καθηγητή Γιώργο Κοντοπίδη για την καθοδήγηση του και για τη φιλοξενία στο εργαστήριο του και τον Επίκουρο καθηγητή Πέτρο Γκιάστα που μου έκανε την τιμή να είναι μέλος της επιτροπής και για όλες τις φορές που χαρήκαμε και κλάψαμε μαζί σαν ομάδα για τις επιτυχημένες και μη αποστολές κρυστάλλων στο Αμβούργο, αντίστοιχα.

Ένα τεράστιο ευχαριστώ οφείλω στους συναδέλφους μου, Γιώργο Στραβοδής και Ευθύμη Κυριάκη που ήταν οι πρώτοι άνθρωποι που με ανέλαβαν το 2016 και δημιούργησαν όλα τα θεμέλια της ορθής πειραματικής διαδικασίας, στις μανούλες Χριστίνα Δράκου και Νατάσσα Καντσάδη, που ήταν δίπλα μου σε κάθε πειραματική δυσκολία ή προσωπική, στους πολυαγαπημένους μου, πλέον Αμερικάνους, Γιάννη Τσιάλτα και Θεοδώρα Σολοβού, που παρόλο κι αν η χιλιομετρική μας απόσταση είναι τεράστια, με κάθε τρόπο είναι δίπλα μου. Επιπλέον, ευχαριστώ πολύ τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου και φίλους Όλγα Παπαϊωάννου, Αχιλλέα Γεωργαντόπουλο και Σέφη Αλεξόπουλο για το υπέροχο κλίμα που δημιουργήσαμε και η καθημερινότητα ήταν πολύ πιο εύκολη για όλους μας. Τέλος, άφησα το Συμεών Κούλα, που χαρακτηριζόμαστε ως αδερφάκια, που ήταν πάντα δίπλα μου σε

κάθε πειραματική και προσωπική δυσκολία, που τσακωνόμασταν όλη μέρα αλλά ξεπερνούσαμε το κάθε πρόβλημα. Η βοήθεια και η στήριξή του όλα αυτά τα χρόνια είναι τεράστια και αν δεν υπήρχε, όλα αυτά τα χρόνια θα ήταν πολύ πιο δύσκολα.

Ευχαριστώ πολύ τους φίλους μου εκτός εργαστηρίου, Σταυρούλα και Αγγελική Κολτσιδά, Άλκηστης Γκέρδη, Ελευθερία Μαράνου, Ζωή Τσανή, Άννα Καρυώτη, Φιλιώ Νίκου και Ζωή Παπαθανασίου για την ψυχολογική τους στήριξη όλα αυτά τα χρόνια, που φτάσαμε σε σημείο να καταλαβαίνουν απόλυτα όλα μου τα πειράματα, και για όλες τις στιγμές που περάσαμε μαζί.

Η ολοκλήρωση της διατριβής θα ήταν κυριολεκτικά αδύνατη χωρίς την υλική, ηθική και έμπρακτη συμπαράσταση της οικογένειάς μου. Θέλω να ευχαριστήσω τους παππούδες μου Βασίλη, Αναστασία και Ανδρονίκη για την αγάπη και την στήριξή τους. Οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στους γονείς μου, Σταύρο και Καλούδα και στην θεία μου Χριστίνα, για όλα όσα κάνουν για εμένα καθημερινά και κυρίως για την αδιαπραγμάτευτη αγάπη και τη βαθιά πίστη τους σε μένα, βασικά συστατικά που έχουν δημιουργήσει μέσα μου μεγάλα αποθέματα δύναμης και αντοχής. Δημιούργησαν ένα σπίτι στο οποίο τα βιβλία, οι εφημερίδες, η αγάπη και η γνώση υπήρχαν πάντα με φυσικότητα, σαν νερό και οξυγόνο, και σαν αναγκαία εργαλεία, τόσο για τη βελτίωση της ύπαρξής μου όσο και για την κατανόηση του κόσμου γύρω μας, και λιγότερο ως μέσα για την επαγγελματική αποκατάσταση και την επιτυχία. Τους ευχαριστώ καθημερινά για αυτό το σπάνιο δώρο που πρόσφεραν, την αδερφή μου Ανδρονίκη, στην οποία είναι αφιερωμένη η διατριβή. Είναι δίπλα μου σε κάθε βήμα, σε κάθε χαρά και δυσκολία, με στηρίζει σε κάθε μου επιλογή και μου δίνει τη δύναμη να προχωράω και να μην τα παρατάω σε οποιαδήποτε δυσκολία. Θα είμαι για πάντα ευγνώμων.

Τέλος, ευχαριστώ θερμά το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ) για τη χορήγηση υποτροφίας κατά την εκπόνηση της Διδακτορικής μου διατριβής.

*Αφιερώνω τη διδακτορική διατριβή στην αδελφή μου,
Ανδρονίκη*

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η οικογένεια των λεκτινών περιλαμβάνει ένα μεγάλο εύρος πρωτεϊνών που προσδένουν επιλεκτικά υδατάνθρακες των γλυκοπρωτεϊνών της κυτταρικής επιφάνειας. Στην οικογένεια αυτή ανήκουν οι γαλεκτίνες. Οι γαλεκτίνες εμπλέκονται σε μια πληθώρα βιολογικών διεργασιών μέσω της πρόσδεσής τους σε γλυκοσυζεύγματα της κυτταρικής επιφάνειας, αναγνωρίζοντας τους β-γαλακτοζιδικούς επίτοπους. Ένα κοινό χαρακτηριστικό τους αποτελεί η ύπαρξη τουλάχιστον μιας καλά συντηρημένης επικράτειας αναγνώρισης υδατανθράκων (*Carbohydrate Recognition Domain, CRD*). Μέχρι σήμερα 16 γαλεκτίνες έχουν βρεθεί στα θηλαστικά ενώ οι 12 εκφράζονται και στον άνθρωπο. Οι ανθρώπινες γαλεκτίνες μπορούν να κατηγοριοποιηθούν με βάση την οργάνωση των *CRDs* σε τρεις ομάδες: τις πρωτότυπες γαλεκτίνες, οι οποίες περιέχουν μια *CRD* και σε αυτή την ομάδα ανήκουν οι γαλεκτίνες 1, 2, 7, 10, 13, 14 και 16, τις χιμαιρικού τύπου γαλεκτίνες που η *CRD* είναι συνδεδεμένη με μια επικράτεια που δεν είναι χαρακτηριστική της οικογένειας των λεκτινών και σε αυτή την ομάδα ανήκει η γαλεκτίνη-3 και στις επαναλαμβανόμενες τύπου γαλεκτίνες οι οποίες αποτελούνται από δύο *CRDs* και στην ομάδα αυτή ανήκουν οι γαλεκτίνες 4, 8, 9 και 12. Η *CRD* αποτελείται από 130-140 κατάλοιπα που σχηματίζουν μία σφαιρική δομή που είναι υπεύθυνη για τη σύνδεση των σακχαριτών. Το μοτίβο αναδίπλωσης της περιοχής αυτής αποτελείται από δύο αντιπαράλληλα β-πτυχωτά φύλλα που συγκροτούνται από 6 β-κλώνους που δημιουργούν την κοίλη πλευρά (*S1-S6*) και 5 β-κλώνους που δημιουργούν την κυρτή πλευρά (*F1-F5*). Η πρωτοταγής δομή των *CRDs* των ανθρώπινων γαλεκτινών είναι αρκετά συντηρημένη (20-50%). Εμπλέκονται σε πολλές παθολογικές καταστάσεις, όπως είναι οι καρδιαγγειακές παθήσεις, η ανάπτυξη και η εξέλιξη του καρκίνου, αυτοάνοσα νοσήματα και μεταβολικές διαταραχές. Λόγω των σημαντικών τους ρόλων, οι γαλεκτίνες θεωρούνται ως πρωτεΐνες στόχοι για την ανάπτυξη νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων.

Η μοναδική χιμαιρικού τύπου γαλεκτίνη-3 αποτελεί μία από τις πιο μελετημένες πρωτεΐνες της οικογένειας. Εμπλέκεται σε πολλές παθοφυσιολογικές καταστάσεις και γίνονται πολλές προσπάθειες για την ανάπτυξη ενώσεων που θα προσδένονται ειδικά και θα μπορούσαν να αποτελέσουν εν δυνάμει φάρμακα. Μέχρι σήμερα, έχουν πραγματοποιηθεί περίπου 31 κλινικές μελέτες, οι οποίες μελετούν την επίδραση των ενώσεων που προσδένονται στη γαλεκτίνη-3 στην ανάπτυξη καρκινικών όγκων, στην οστεοαρθρίτιδα, στην πνευμονική ίνωση καθώς και στη νόσο *COVID-19*. Οι ενώσεις αυτές είναι συνθετικές μικρού και μεγάλου μοριακού βάρους, μονοκλωνικά αντισώματα και φυσικά πολυμερή όπως οι πηκτίνες. Οι πιο ειδικοί και με υψηλή συγγένεια ανταγωνιστές ως προς τη γαλεκτίνη-3 που έχουν βρεθεί μέχρι σήμερα, είναι ανάλογα θειοδιγαλακτόζης που φέρουν υποκαταστάτες αρυλ-τριαζόλης στον *C3* και των δύο μορίων της γαλακτόζης, και εμφανίζουν τιμές K_D της τάξεως των *nM*. Μία τέτοια ένωση αποτελεί η *GB0139*, η οποία βρίσκεται σε φάση κλινικών μελετών *2b* για τη θεραπεία της πνευμονικής ίνωσης.

Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκαν 46 ενώσεις, με κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ και θερμιδομετρία ισοθερμικής τιτλοδότησης (*ITC*), με στόχο την εύρεση ενώσεων-οδηγών για την περαιτέρω ανάπτυξη ανταγωνιστών, που θα εμφανίζουν υψηλή εξειδίκευση και συγγένεια ως προς τη γαλεκτίνη-3. Μιας και οι πλέον ισχυροί ανταγωνιστές που έχουν βρεθεί για την γαλεκτίνη-3 μέχρι σήμερα ήταν παράγωγα θειοδιγαλακτοζιτών όπου τα δύο σάκχαρα συνδέονται μέσω θείου με 1→1 δεσμούς, η πρώτη ομάδα ενώσεων που μελετήθηκε είναι θειοδισακχαρίτες, στις οποίες τα δύο σάκχαρα συνδέονται μεταξύ τους μέσω θείου με 1→2 δεσμούς. Η δεύτερη συλλογή ενώσεων που μελετήθηκε περιλάμβανε ενώσεις που έχουν ένα κοινό κορμό β-D-γαλακτοπυρανοζίτη και φέρουν υποκαταστάτες, φαινυλίου, πυριμιδίνης, τριαζόλης, τετραζόλης και καρβονυλίων. Λόγω της υψηλής συντήρησης της *CRD* στην οικογένεια των λεκτινών η πρόσδεση των παραπάνω ενώσεων μελετήθηκε και στις γαλεκτίνες-7, 8*N* και 10, με στόχο τη διερεύνηση της εξειδίκευσής τους.

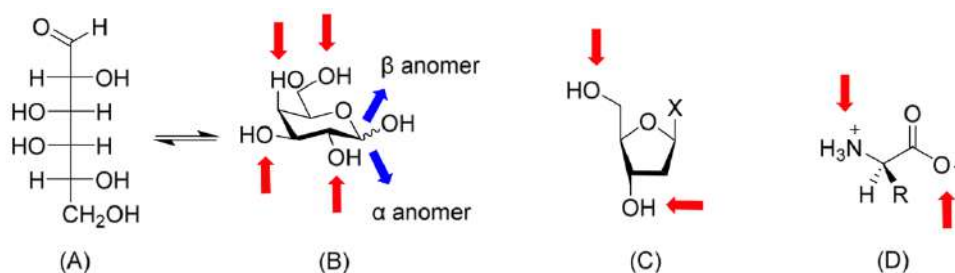
Από την πρώτη ομάδα ενώσεων, **13**, **14**, **15**, και **17**, βρέθηκε πως ο καλύτερος ανταγωνιστής ήταν ο **14** που εμφάνισε K_D 8 μM για τη γαλεκτίνη-3. Ανάλυση των παραμέτρων θερμοδυναμικής δέσμευσης των ανταγωνιστών στη γαλεκτίνη-3, αποκάλυψε ότι η ελεύθερη ενέργεια πρόσδεσης *Gibbs* (ΔG) τους κυριαρχείται από μεταβολές στην ενθαλπία (ΔH). Ο δομικός τρόπος σύνδεσης των 1,2-θειοδισακχαριτών στη γαλεκτίνη-3 μελετήθηκε με κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ αποκαλύπτοντας το μοναδικό ρόλο των διαμεσολαβούμενων από μόρια ύδατος αλληλεπιδράσεων δεσμών υδρογόνου στην ενίσχυση της πρόσδεσης μέσω ενίσχυσης της ενθαλπίας. Αυτό το ικρίωμα, 1,2-θειοδισακχαρίτη μπορεί να αποτελέσει μια νέα ένωση-οδηγό για την ανακάλυψη ανταγωνιστών της γαλεκτίνης-3.

Από τη δεύτερη ομάδα, 41 ενώσεων, βρέθηκε πως οι **LL80**, **HA087**, **HA088**, **KS782**, **HL210-2**, **KISZ322**, **KISZ340**, **KISZ333IAB**, **KM191**, **KM192**, **HL233**, **HL241**, **HL247** και **HL248**, εμφανίζουν επιλεκτικότητα για τη γαλεκτίνη-3, έναντι των γαλεκτινών-7, 8*N* και 10. Ανάλογα με τη σταθερά σύνδεσής τους, με βάση τον δομικό τρόπο πρόσδεσής τους στη γαλεκτίνη-3, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως νέες ενώσεις-οδηγοί για την ανάπτυξη εκλεκτικών ανταγωνιστών της γαλεκτίνης-3, παρέχοντας νέες προοπτικές για τη θεραπευτική προσέγγιση πληθώρας ασθενειών. Τέλος, μελετήθηκε ο δομικός τρόπος πρόσδεσης της ένωσης **HMOB11-1** στη γαλεκτίνη-7. Η ένωση αυτή εμφανίζει υψηλή συγγένεια πρόσδεσης (K_D = 2,4 μM), και σήμερα πραγματοποιούνται μελέτες *ex vivo* για την εύρεση της αποτελεσματικότητας της στη θεραπεία του καρκίνου των ωοθηκών.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

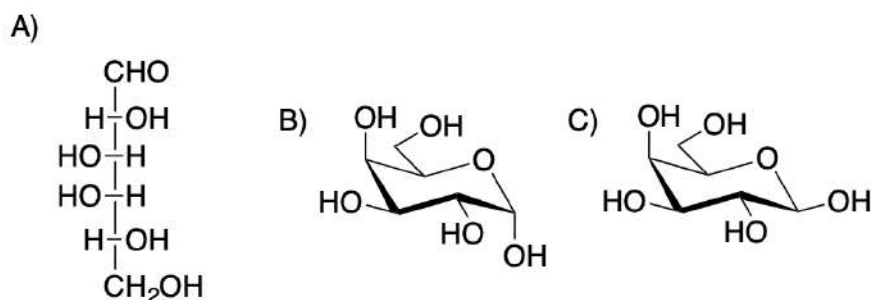
1.1 The sugar code

Οι υδατάνθρακες αποτελούν μια τάξη βιομορίων που ονομάστηκαν έτσι επειδή πίστευαν πως προέρχονται από την ένωση άνθρακα με νερό μιας και η στοιχειομετρική τους αναλογία σε άνθρακα, οξυγόνο και υδρογόνο παρέπεμπε στον τύπο $C_n(H_2O)_m$ [1]. Ο πιο απλός υδατάνθρακας που δεν μπορεί να υδρολυθεί σε μικρότερη μονάδα ονομάζεται μονοσακχαρίτης και είναι αλδεΐδη ή κετόνη. Οι υδατάνθρακες είναι χειρόμορφες ενώσεις που υπάρχουν ως εναντιομερή και συμβολίζονται ως *D* ή *L* ανάλογα αν τους στρέφει το πολωμένο φως δεξιά (*D*) ή αριστερά (*L*). Στα *D* εναντιομερή η ομάδα υδροξυλίου που βρίσκεται πιο μακριά από την ομάδα καρβονυλίου βρίσκεται στη δεξιά πλευρά ενώ στα *L* στην αριστερή, όταν απεικονίζεται σε προβολή κατά *Fischer*. Οι μονοσακχαρίτες υπάρχουν στο διάλυμα σε ισορροπία μεταξύ δύο δομών ανοιχτής και κυκλικής αλυσίδας. Η κυκλοποίηση δημιουργεί ένα ασύμμετρο κέντρο και ο άνθρακας αναφέρεται ως ανωμερικός, στο *C1* για τις αλδόζες ή στο *C2* για τις κετόζες. Σύμφωνα με τη στερεοχημεία του υποκαταστάτη στον ανωμερή άνθρακα, οι υδατάνθρακες μπορούν να αποδοθούν ως α ή β ανωμερή (Εικόνα 1). Οι μονοσακχαρίτες μπορούν να συνδεθούν μεταξύ τους μέσω γλυκοζιτικών δεσμών δημιουργώντας δισακχαρίτες (2 μονοσακχαρίτες), ολιγοσακχαρίτες (3-10 μονοσακχαρίτες) και πολυσακχαρίτες (>10 μονοσακχαρίτες) [2]. Στη φύση συναντάται μεγάλη ποικιλία ολιγοσακχαριτών, σε αντίθεση με άλλα βιομόρια. Κάθε υδροξυλομάδα στους μονοσακχαρίτες μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δέκτης γλυκοζιτικού δεσμού και κάθε γλυκοζιτικός δεσμός συνδέεται με α ή β ανωμερή υποκαταστάτη. Ο συνδυασμός των μονοσακχαριτών μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία διαφορετικών γραμμικών ή διακλαδισμένων πολυσακχαριτών, σε αντίθεση με τα νουκλεοτίδια και τα αμινοξέα τα οποία συνδέονται μόνο με γραμμικό τρόπο (Εικόνα 1) [3].



Εικόνα 1: Απεικόνιση της ανοιχτής μορφής των υδατανθράκων και των σημείων σύνδεσης για σχηματισμό ολιγομερών για υδατάνθρακες, νουκλεοτίδια και αμινοξέα. Οι υδατάνθρακες υπάρχουν στο διάλυμα ως ένα μείγμα ισορροπίας μορφών (A) ανοιχτής αλυσίδας προβολή κατά *Fischer* και (B) δακτυλίου προβολή κατά *Haworth*. Οι υδατάνθρακες μπορούν να συνδεθούν μέσω των υδροξυλίων που φέρουν κόκκινο βέλος για τη δημιουργία ολιγο-, πολυσακχαριτών. Αντιθέτως, τα (C) νουκλεϊκά οξέα και τα (D) αμινοξέα μπορούν να συνδεθούν μόνο με γραμμικό τρόπο.

Στη γαλακτόζη το α-ανωμερές αναφέρεται στην ομάδα υδροξυλίου του *C1* με κατεύθυνση προς τα κάτω (Εικόνα 2B) και το β-ανωμερές αναφέρεται στην ομάδα υδροξυλίου με κατεύθυνση προς τα πάνω (Εικόνα 2C) σε σχέση με το επίπεδο του δακτυλίου.



Εικόνα 2: (Α) Κατά Fischer προβολή της D-γαλακτόζης, (Β) δομή της α-D-γαλακτόζης, (C) δομή της β-D-γαλακτόζης προβολή κατά Haworth.

Λόγω της μεγάλης ποικιλομορφίας, οι υδατάνθρακες μπορούν να θεωρηθούν ως το τρίτο αλφάβητο της ζωής, μετά από τα νουκλεοτίδια και τα αμινοξέα, όπου τα γράμματα (μονοσακχαρίτες) συνδυάζονται με διαφορετικό και ποικίλο τρόπο σχηματίζοντας διαφορετικά μηνύματα (ολιγοσακχαρίτες) που κωδικοποιούν διαφορετικές βιολογικές πληροφορίες (*the sugar code*) [4]. Η πολύπλοκη ετερογένεια των υδατανθράκων είναι αποτέλεσμα διάφορων χαρακτηριστικών, όπως η δημιουργία γλυκοζιτικών δεσμών μεταξύ διαφόρων τύπων και αριθμού σακχάρων, τα δομικά χαρακτηριστικά αυτών των μορίων, ο τύπος του ανωμερικού δεσμού, η απουσία ή η παρουσία διακλαδώσεων και οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις. Για παράδειγμα, εάν σκεφτεί κάποιος την πολυπλοκότητα ενός μορίου δισακχαρίτη που αποτελείται από δύο πανομοιότυπα μόρια γλυκόζης και το συγκρίνει με ένα διπεπτιδίο που αποτελείται από δύο αμινοξικά κατάλοιπα αλανίνης, ο δισακχαρίτης μπορεί να παράγει έντεκα διαφορετικούς δισακχαρίτες, ενώ στην περίπτωση του διπεπτιδίου μπορεί να παραχθεί μόνο ένα. Σε αντιστοιχία μεγαλύτερης κλίμακας, τέσσερις διαφορετικοί μονοσακχαρίτες μπορούν να παράγουν 35.560 μοναδικά μόρια τετρασακχαριτών, ενώ τέσσερα αμινοξικά κατάλοιπα μπορούν να παράγουν μόνο 24 τετραπεπτιδία. Το ενδιαφέρον με τις γλυκάνες είναι ότι δεν κωδικοποιούνται γονιδιακά, αλλά κωδικοποιούν ένα τεράστιο εύρος βιολογικής πληροφορίας. Το γονιδίωμα κωδικοποιεί ένζυμα τα οποία τροποποιούν περαιτέρω τους υδατάνθρακες. Αρκετές ενζυμικές αντιδράσεις γλυκοσιδασών και γλυκοζυλοτρανσφερασών πραγματοποιούνται σε στόχο τη δημιουργία διαφορετικών δομών γλυκανών από τους μονοσακχαρίτες. Οι γλυκάνες μπορούν να τροποποιηθούν περαιτέρω με φωσφορυλίωση, θειίκωση και ακετυλίωση [2, 5, 6]. Η ποικιλομορφία των υδατανθράκων στη φύση αντανάκλαται στην ποικιλομορφία των βιολογικών τους λειτουργιών. Για παράδειγμα, τα βιομόρια αυτά είναι ζωτικής σημασίας για τα φυτά, καθώς δρουν τόσο ως μοριακό σκυρόδεμα των κυτταρικών τοιχωμάτων και ως προστασία από έντομα ή μικροοργανισμούς [7, 8]. Τα ευκαρυωτικά κύτταρα περιβάλλονται από ένα στρώμα ολιγοσακχαριτών συζευγμένων με πρωτεΐνες (γλυκοπρωτεΐνες) ή λιπίδια (γλυκολιπίδια) που αναφέρεται ως γλυκοκάλυκας [9, 10]. Ο γλυκοκάλυκας των ερυθρών αιμοσφαιρίων καθορίζει τον τύπο της ομάδας αίματος Α, Β, ή Ο. Επιπλέον, η αλλαγή του προτύπου της γλυκοζυλίωσης των γλυκανών σχετίζεται με την ύπαρξη καρκινικών κυττάρων.

Λόγω της αφθονίας και της ποικιλομορφίας των υδατανθράκων, μια μεγάλη ομάδα πρωτεϊνών, οι λεκτίνες, έχουν εξελιχθεί για να διαβάζουν την πληροφορία και να τη μεταφράζουν σε βιολογικές διαδικασίες [11].

1.2 Υδατάνθρακες και ανακάλυψη φαρμάκων

Οι υδατάνθρακες λόγω της πολυπλοκότητάς τους και των βιολογικών τους λειτουργιών, έχουν μελετηθεί εκτενώς ως θεραπευτικοί παράγοντες για τη θεραπεία πολλών ασθενειών. Από το 2020 έχουν εγκριθεί 54 φάρμακα τα οποία είναι ανάλογα υδατανθράκων. Τα φάρμακα αυτά κατηγοριοποιούνται σε αντικά, αντιπαρασιτικά/αντιβακτηριακά, αντικαρκινικά, αντιδιαβητικά, καρδιαγγειακά φάρμακα καθώς και φάρμακα για το νευρικό σύστημα. Για παράδειγμα, το 2012 βρέθηκε το φάρμακο *Dapagliflozin*, το οποίο αναστέλλει τη δράση του *SGLT2* για τη θεραπεία του σακχαρώδη διαβήτη. Το διάστημα 2012-2014 βρέθηκαν άλλα πέντε ανάλογα που δρουν με τον ίδιο τρόπο για τη θεραπεία του σακχαρώδη διαβήτη. Λόγω της σημαντικότητας των υδατανθράκων στην ανθρώπινη παθοφυσιολογία, υπάρχουν μεγάλες δυνατότητες ανάπτυξης νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων για τη θεραπεία πολλών ασθενειών. Η εύρεση νέων φαρμάκων με βάση τους υδατάνθρακες, με τη βοήθεια των επιστημονικών πεδίων της γλυκοχημείας, γλυκοβιολογίας, γλυκογονιδιωματικής και γλυκοπρωτεομικής αναμένεται να προσφέρει πολλά οφέλη και απαντήσεις στην ανθρώπινη υγεία και στους μηχανισμούς δράσεις της κάθε ασθένειας [12, 13].

1.3 Η οικογένεια των λεκτινών

Η οικογένεια των λεκτινών περιλαμβάνει ένα μεγάλο εύρος πρωτεϊνών που χαρακτηρίζεται από την ικανότητα τους να αλληλεπιδρά επιλεκτικά με υδατάνθρακες των γλυκολιπιδίων και των γλυκοπρωτεϊνών [14]. Ο όρος λεκτίνη προέρχεται από τη λατινική λέξη *Legere* που σημαίνει «επιλέγω». Η πρόσδεση των υδατανθράκων με τις λεκτίνες είναι τόσο ειδική όσο η αλληλεπίδραση μεταξύ αντιγόνου-αντισώματος ή ενός ενζύμου με το υπόστρωμά του [15]. Οι λεκτίνες δημιουργούν σύμπλοκα τόσο με ολιγοσακχαρίτες στην επιφάνεια των κυττάρων όσο και με ελεύθερες γλυκάνες και μονοσακχαρίτες. Ωστόσο, η πρόσδεση των μονοσακχαριτών στις λεκτίνες είναι σχετικά ασθενής με K_D της τάξης των μM - mM . Αρχικά, οι λεκτίνες βρέθηκαν και χαρακτηρίστηκαν από φυτά, αλλά τα επόμενα χρόνια απομονώθηκαν και από μικροοργανισμούς και ζώα. Μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι οι λεκτίνες των φυτών σε σχέση με των ζώων δεν εμφανίζουν κάποια δομική ομολογία, ωστόσο εμφανίζουν κοινή επιλεκτικότητα ως προς τους υδατάνθρακες. Η επιλεκτικότητα αυτή ίσως οφείλεται στην συνεξέλιξη των φυτικών και ζωικών γονιδίων των λεκτινών, υπογραμμίζοντας τη σημαντικότητα των συμπλόκων λεκτινών-υδατανθράκων στους οργανισμούς [14, 16]. Διαφορετικές λεκτίνες εμφανίζουν υψηλή συντήρηση σε αμινοξικά κατάλοιπα που είναι υπεύθυνα για την πρόσδεση σακχαριτών. Η ειδικότητα και η συγγένεια της λεκτίνης ως προς τον υδατάνθρακα εξαρτάται από τη δομή του υδατάνθρακα ή/και από τον προσανατολισμό του ανωμερικού υποκαταστάτη. Η δημιουργία του συμπλόκου λεκτίνης-υδατάνθρακα

πραγματοποιείται μέσω δεσμών υδρογόνου και αλληλεπιδράσεων *Van den Waals* μέσω των καταλοίπων της πρωτεΐνης και των ατόμων του υδατάνθρακα [11, 17]. Οι λεκτίνες μπορούν να κατηγοριοποιηθούν με διαφορετικούς τρόπους. Αρχικά, η πρώτη ομαδοποίηση βασίστηκε σύμφωνα με τον οργανισμό που εκφράζεται, δηλαδή φυτικές, ζωικές, λεκτίνες από μύκητες και ιικές. Ωστόσο, η κατηγοριοποίηση αυτή είναι αρκετά γενική χωρίς να διαφαίνεται η δομή και η λειτουργία της κάθε πρωτεΐνης. Ένας άλλος τρόπος ομαδοποίησης είναι με βάση την ειδικότητα που εμφανίζουν ως προς συγκεκριμένους μονοσακχαρίτες (*D*-γαλακτόζη, *N*-ακετυλ-*D*-γαλακτοζαμίνη, *D*-μαννόζη, *L*-φουκόζη, *N*-ακετυλ-*D*-γλυκοζαμίνη και σιαλικό οξύ). Η ταξινόμηση αυτή δεν είναι αρκετά επαρκής καθώς κάποιες λεκτίνες μπορούν να προσδέσουν περισσότερους από έναν τύπο σακχάρου. Ορισμένες ομάδες λεκτινών κατηγοριοποιήθηκαν με βάση τη λειτουργία και/ή τον εντοπισμό τους στους οργανισμούς. Για παράδειγμα, οι λεκτίνες τύπου *C* απαιτούν ιόντα ασβεστίου για την πρόσδεσή τους σε σάκχαρα. Ωστόσο, η ταξινόμηση αυτή είναι αρκετά δύσκολη, καθώς η λειτουργία κάποιων λεκτινών είναι ακόμα άγνωστη. Πιθανότατα, η καλύτερη κατηγοριοποίηση της οικογένειας των λεκτινών είναι σύμφωνα με την τρισδιάστατη δομή τους και τα δομικά μοτίβα που είναι υπεύθυνα για την πρόσδεση και αναγνώριση υδατανθράκων [14].

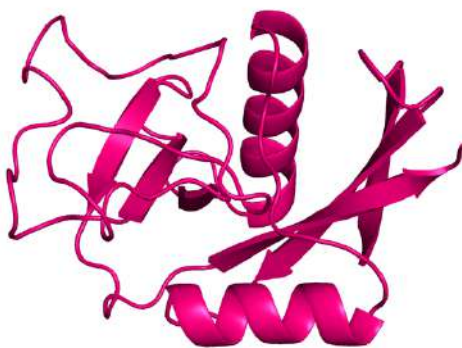
Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, οι γλυκάνες των κυττάρων λόγω της ποικιλομορφίας τους και της πολυπλοκότητάς τους, αποθηκεύουν μεγάλο αριθμό βιολογικών πληροφοριών που συμβάλλουν στην παθοφυσιολογία του ανθρώπινου οργανισμού. Οι τροποποιήσεις των γλυκανών οφείλονται στη δράση πολλών ενζύμων και ρυθμίζεται από ενδοκυτταρικά και περιβαλλοντικά σήματα, όπως το στρες, οι αυξητικοί παράγοντες, η διαθεσιμότητα σε οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά. Η δυσλειτουργία πολλών διαδικασιών που μπορεί να οδηγήσει σε αλλαγή της αρχιτεκτονικής των γλυκανών, όπως σε διαφορετική γλυκοζυλίωση συνδέεται άμεσα με την παθοφυσιολογία πολλών ασθενειών. Έτσι, αλλαγή της αρχιτεκτονικής των γλυκανών μπορεί να μεταβάλλει και τις κυτταρικές λειτουργίες στις οποίες εμπλέκονται. Οι πληροφορίες που κωδικοποιούνται από τις γλυκάνες μεταφράζονται από πρωτεΐνες που προσδέονται επιλεκτικά σε αυτές, τις λεκτίνες. Για το λόγο αυτό οι λεκτίνες αποτελούν φαρμακευτικούς στόχους σε ένα ευρύ φάσμα παθολογιών [18].

1.3.1 Κατηγοριοποίηση ανθρώπινων λεκτινών

Αρχικά, η κατηγοριοποίηση των λεκτινών βασίστηκε στην ομολογία της επικράτειας αναγνώρισης μορίων υδατανθράκων (*Carbohydrate Recognition Domain, CRD*). Με βάση αυτή, κατηγοριοποιήθηκαν στις λεκτίνες τύπου *C* οι οποίες χαρακτηρίζονται από την ασβεστοεξαρτώμενη πρόσδεση υδατανθράκων και στις λεκτίνες τύπου *S* ή αλλιώς γαλεκτίνες που εμφανίζουν θείο-εξαρτώμενη πρόσδεση [19]. Ωστόσο, πέρα από την ομολογία στην *CRD* οι πρωτεΐνες αυτές αποτελούνται και από άλλες περιοχές μη χαρακτηριστικές της οικογένειας επομένως κατηγοριοποιήθηκαν περαιτέρω όπως φαίνεται και παρακάτω [17, 20, 21].

1. Λεκτίνες τύπου *C*

Οι λεκτίνες τύπου C (CTLs) αποτελούν μια από τις μεγαλύτερες ομάδες της οικογένειας των λεκτινών. Η δέσμευση των υδατανθράκων είναι ασβεστοεξαρτώμενη, μέσω της πρόσδεσης των υδροξυλίων των σακχάρων με τις καρβονυλικές πλευρικές αλυσίδες συγκεκριμένων καλά συντηρημένων αμινοξέων των οποίων η διαμόρφωση συντονίζεται από την πρόσδεση ιόντων ασβεστίου. Ωστόσο, κάποιες CTLs προσδένουν σάκχαρα με μη ασβεστοεξαρτώμενο τρόπο. Η καλά συντηρημένη CRD των CTLs αποτελείται από 110-130 αμινοξικά κατάλοιπα. Το μοτίβο αναδίπλωσης της περιοχής αυτής αποτελείται από ένα αντιπαράλληλο β-πτυχωτό φύλλο που δομείται από δύο 2 κλώνους, όπου τα αμινοτελικά και τα καρβοξυτελικά κατάλοιπα συνδέονται με δυο α-έλικες και ένα αντιπαράλληλο β-πτυχωτό φύλλο που δομείται από τρεις κλώνους. Επιπλέον, αποτελείται από δυο καλά συντηρημένους δισουλφιδικούς δεσμούς και έως τέσσερις περιοχές πρόσδεσης ιόντων ασβεστίου. Οι CTLs εμφανίζουν διαφορετική εκλεκτικότητα ως προς το είδος του προσδέτη. Μπορούν να εμφανίζουν ειδικότητα ως προς υδατάνθρακες, πρωτεΐνες, λιπίδια και ανόργανα μόρια, τα οποία μπορούν να προσδεθούν σε διαφορετικές επικράτειες πέρα από την CRD. Κάποια από τα αμινοξικά κατάλοιπα που είναι υπεύθυνα για την ασβεστοεξαρτώμενη πρόσδεση σακχάρων είναι τα EPN που εμφανίζουν ειδικότητα ως προς τη μαννόζη, το μοτίβο QPD που προσδένει γαλακτόζη και το WND που δεσμεύει ασβέστιο. Οι λεκτίνες τύπου C κατηγοριοποιούνται περαιτέρω με βάση την αρχιτεκτονική της περιοχής αναγνώρισης υδατανθράκων, τους υδατάνθρακες που αναγνωρίζουν καθώς και τον ιστό που εκφράζονται [22, 23].



Εικόνα 3: Η τρισδιάστατη δομή μιας λεκτίνης τύπου C (PDB ID: 1TN3).

2. Χιτολεκτίνες

Οι χιτίνες αναγνωρίζονται και προσδένονται στις χιτολεκτίνες και αποτελούν υπόστρωμα για τις χιτινάσες. Οι χιτινάσες είναι τα ένζυμα τα οποία υδρολύουν αυτούς τους ολιγοσακχαρίτες. Οι χιτολεκτίνες, παρόλο που δημιουργούν σύμπλοκα με τις χιτίνες, δεν τις υδρολύουν, μιας και δεν έχουν ενζυμική δράση, όπως όλες οι λεκτίνες. Η κατηγορία αυτή αποτελείται από την παρόμοια με τη χιτινάση 3-1 (*chitinase like 3-1*), παρόμοια με τη χιτινάση 2 (*chitinase like 2*) και την οβιδουκτίνη (*oviductin*) οι οποίες προσδένονται στη χιτίνη και σε χιτο-ολιγοσακχαρίτες και στην SI-CLP (*stabilin-1 interacting chitinase-like protein*) η οποία αναγνωρίζει GalNAc, GlcNAc, ριβόζη και μαννόζη, εμφανίζοντας υψηλή συγγένεια για

ολιγοσακχαρίτες που αποτελούνται από τέσσερα σάκχαρα. Εκφράζονται στο λιπώδη ιστό, στα οστά, στους λεμφικούς ιστούς, στον εγκέφαλο, στους ενδοκρινείς αδένες, στο γαστρεντερικό σωλήνα, στους πνεύμονες και σε άλλους ιστούς [24].



Εικόνα 4: Η τρισδιάστατη δομή μιας χιτολεκτίνης (PDB ID: 1LJY).

3. Λεκτίνες τύπου *F*

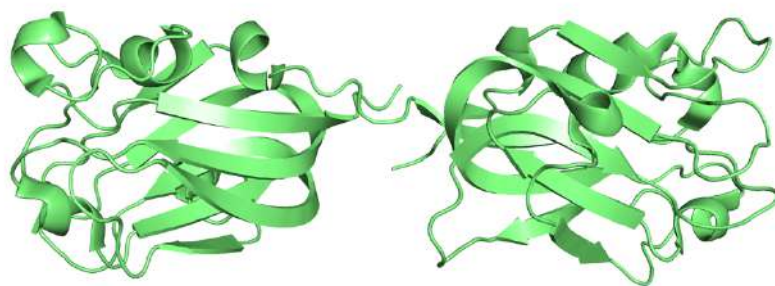
Οι λεκτίνες αυτές ονομάζονται και φουκολεκτίνες, αναγνωρίζουν την α -L-φουκόζη και αποτελούνται από μια επικράτεια αναγνώρισης υδατανθράκων και μία περιοχή πρόσδεσης ασβεστίου [24].

4. Λεκτίνες *F-box*

Οι λεκτίνες αυτές αποτελούν υπόστρωμα του συμπλόκου *SCF* (*Skp1*, *Cullin1* και *Rbx1* πρωτεΐνες). Αποτελούνται από μια επικράτεια *F-box* η οποία προσδένεται στην κινάση *SKP1*. Η οικογένεια των πρωτεϊνών αυτών είναι αρκετά μεγάλη, ωστόσο μόνο πέντε από αυτές αναγνωρίζουν γλυκοπρωτεΐνες [24].

5. Φικολίνες

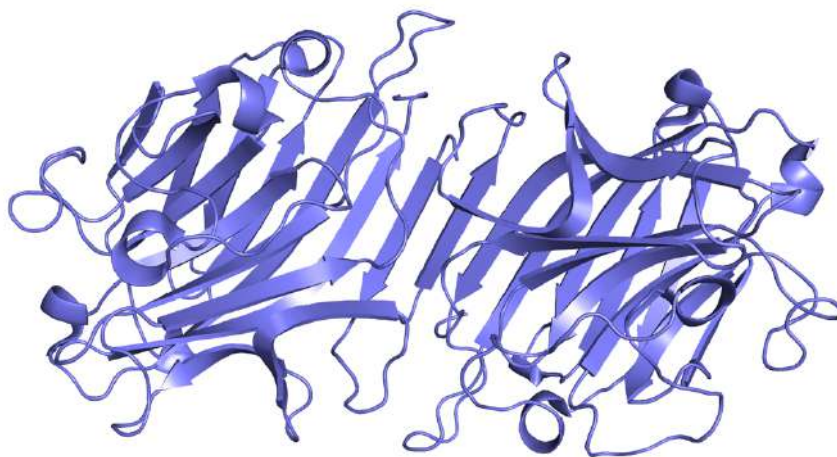
Οι φικολίνες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην έμφυτη ανοσία εμφανίζοντας επιλεκτικότητα σε υδατάνθρακες που υπάρχουν στην επιφάνεια των θετικών κατά *Gram* και αρνητικών κατά *Gram* βακτηρίων. Εμφανίζουν υψηλή συγγένεια ως προς *GlcNAc*, *GalNAc*, σιαλικό οξύ, φουκόζη, *N*-ακετυλο-γλυκόζη και *N*-ακετυλ-γαλακτόζη [24].



Εικόνα 5: Η τρισδιάστατη δομή μιας φικολίνης (PDB ID: 2D39).

6. Λεκτίνες τύπου «I»

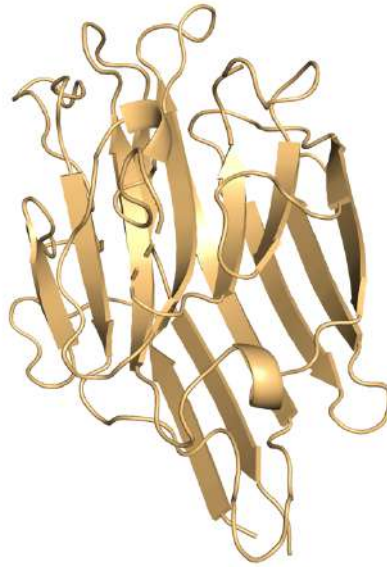
Αποτελούν οικογένεια των ανοσοσφαιρινών και εμφανίζουν επιλεκτικότητα ως προς υδατάνθρακες, μόρια σιαλικού οξέος και εκφράζονται σε πολλούς ιστούς [24].



Εικόνα 6: Η τρισδιάστατη δομή μιας λεκτίνης τύπου I (PDB ID: 1FX5).

7. Λεκτίνες τύπου L

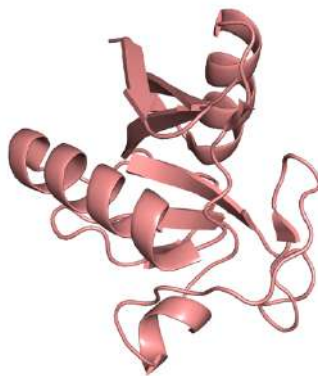
Το μοτίβο αναδίπλωσης των λεκτινών τύπου L αποτελείται από 2 αντιπαράλληλα β-πτυχωτά φύλλα που συνδέονται μεταξύ τους μέσω συνδετών. Εμφανίζουν επιλεκτικότητα ως προς πολλά είδη υδατανθράκων και δημιουργούν σύμπλοκα με ασβεστο-εξαρτώμενο τρόπο. Στην οικογένεια αυτή ανήκουν οι πεντραξίνες [24].



Εικόνα 7: Η τρισδιάστατη δομή μιας λεκτίνης τύπου L (PDB ID: 1SBD).

8. Λεκτίνες τύπου M

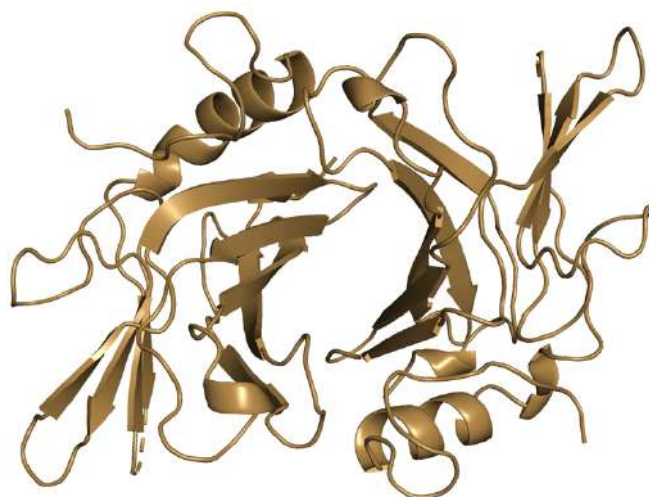
Η οικογένεια αυτή αποτελείται από α-μαννοζιδάσες, οι οποίες εμπλέκονται στην ωρίμανση και αποικοδόμηση ολιγοσακχαριτών συνδεδεμένων με ασπαραγίνη [24].



Εικόνα 8: Η τρισδιάστατη δομή μιας λεκτίνης τύπου M (PDB ID: 6JLI).

9. Λεκτίνες τύπου P

Οι λεκτίνες τύπου P αποτελούνται από υποδοχείς 6-φωσφορικής-μαννόζης και είναι υπεύθυνες για τη δημιουργία λειτουργικών λυσισωμάτων. Η επιλεκτικότητα τους οφείλεται στην ύπαρξη της φωσφορικής ομάδας. Η δημιουργία συμπλόκων πραγματοποιείται με παρουσία κατιόντων μαγγανίου [24].



Εικόνα 9: Η τρισδιάστατη δομή μιας λεκτίνης τύπου P (PDB ID: 1M6P).

10. Λεκτίνες τύπου R

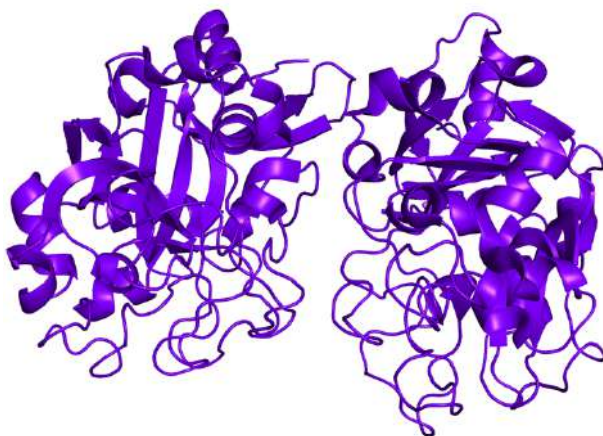
Οι λεκτίνες τύπου R είναι πρωτεΐνες-UDP ακετυλογαλακτοζαμινυλοτρανσφεράσες που περιέχουν μια περιοχή αναγνώρισης υδατανθράκων τύπου R, η οποία είναι συντηρημένη μεταξύ ζωικών και βακτηριακών λεκτινών. Τα μέλη αυτής της υπεροικογένειας αναγνωρίζουν κατάλοιπα *Gal/GalNAc* και εκφράζονται σε διάφορους ιστούς [24].



Εικόνα 10: Η τρισδιάστατη δομή μιας λεκτίνης τύπου R (PDB ID: 2RST).

11. Λεκτίνες τύπου X

Οι ιντελεκτίνες αποτελούνται από μία μη συντηρημένη επικράτεια λεκτινών, η οποία μοιάζει με το ινωδογόνο και από άλλη μια επικράτεια χαρακτηριστικής των ιντελεκτινών. Οι μηχανισμοί δράσης τους δεν είναι αρκετά μελετημένοι [24].



Εικόνα 11: Η τρισδιάστατη δομή μιας λεκτίνης τύπου X (PDB ID: 4WMO).

12. Ορφανές Λεκτίνες

Οι ορφανές λεκτίνες, δεν ανήκουν στις παραπάνω οικογένειες. Εμφανίζουν συγγένεια ως προς θειούχες γλυκοζαμινογλυκάνες [24].

13. Λεκτίνες τύπου S

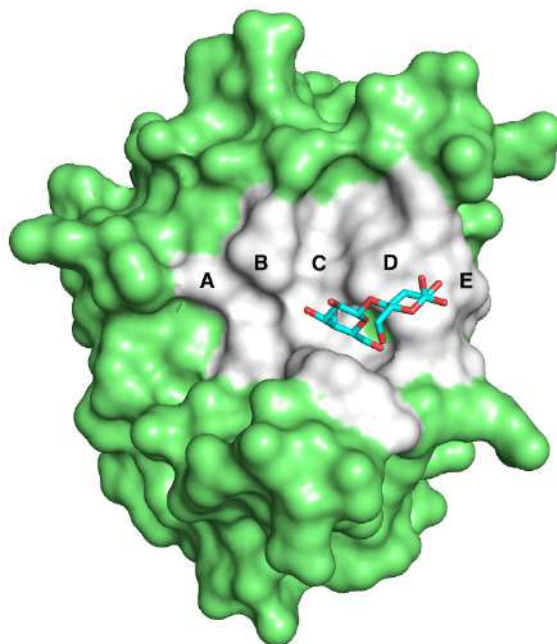
Οι λεκτίνες τύπου S ή γαλεκτίνες εμφανίζουν υψηλή συγγένεια ως προς β-γαλακτοζίτες. Οι πρωτεΐνες αυτές αποτελούν το κύριο θέμα της παρούσας διατριβής και θα αναλυθούν αναλυτικά παρακάτω [25].



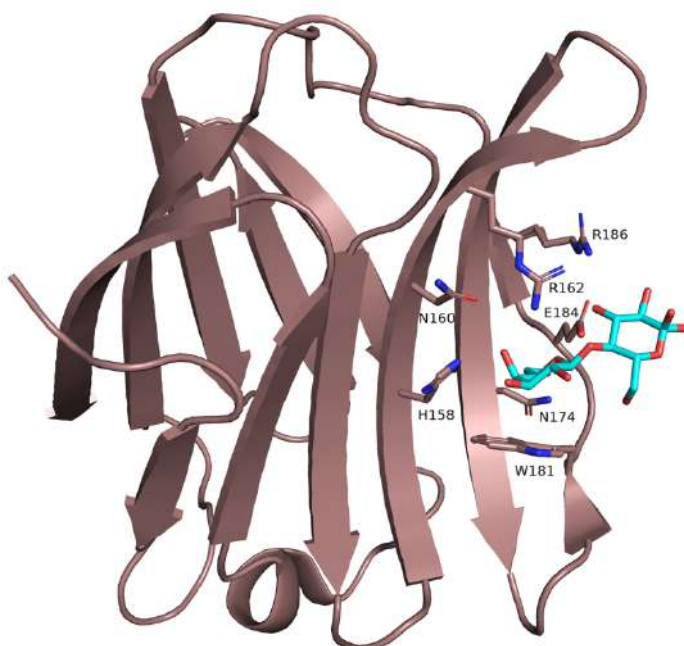
Εικόνα 12: Η τρισδιάστατη δομή μιας λεκτίνης τύπου S (PDB ID: 8QJ1).

1.4 Λεκτίνες τύπου S

Στην οικογένεια των λεκτινών ανήκουν οι λεκτίνες τύπου *S* ή αλλιώς γαλεκτίνες. Το *S* χρησιμοποιήθηκε καθώς είχε βρεθεί ότι οι γαλεκτίνες δρουν υπό αναγωγικές συνθήκες και είναι θειοεξαρωμένες. Ωστόσο, αυτό είναι χαρακτηριστικό της γαλεκτίνης-1, η πρώτη γαλεκτίνη που ανακαλύφθηκε [26]. Ο όρος γαλεκτίνες αναφέρθηκε για πρώτη φορά το 1994 ως εξής: «οι πρωτεΐνες που ανήκουν στην οικογένεια των γαλεκτινών θα πρέπει να συμμορφώνονται σε δύο κανόνες: να εμφανίζουν (α) συγγένεια ως προς β-γαλακτοζίτες και (β) υψηλή ομολογία στην πρωτοταγή δομή της επικράτειας πρόσδεσης υδατανθράκων [27]. Ανάμεσα στις πολλές ομάδες της οικογένειας των λεκτινών, οι γαλεκτίνες αποτελούν μια καλά συντηρημένη οικογένεια, που εμφανίζουν όμοια και μοναδική τρισδιάστατη δομή, υψηλή συγγένεια ως προς την πρόσδεση β-γαλακτοζιτών και ικανότητα ρύθμισης διαφορετικών βιολογικών αποκρίσεων [28]. Ένα κοινό χαρακτηριστικό μεταξύ τους αποτελεί η ύπαρξη τουλάχιστον μιας καλά συντηρημένης επικράτειας αναγνώρισης μορίων υδατανθράκων *CRD*. Η *CRD* τους αποτελείται από περίπου 130-140 αμινοξικά κατάλοιπα και το μοτίβο αναδίπλωσης της περιοχής αυτής αποτελείται από δύο αντιπαράλληλα β-πτυχωτά φύλλα που δομούνται από έξι κλώνους που δημιουργούν την κοίλη πλευρά (*S1-S6*) και πέντε κλώνους που δημιουργούν την κυρτή πλευρά (*F1-F5*). Η κοίλη πλευρά σχηματίζει μία αύλακα, που ονομάζεται περιοχή πρόσδεσης υδατανθράκων (*Carbohydrate Binding Site, CBS*) στην οποία μπορεί να προσδεθούν οι υδατάνθρακες [29, 30]. Η *CBS* διαιρείται στις περιοχές *A-E* όπως φαίνεται και στην Εικόνα 13. Η περιοχή *C* είναι η πιο συντηρημένη μεταξύ της οικογένειας των γαλεκτινών, και αποτελείται από τα συντηρημένα κατάλοιπα *His158, Asn160, Arg162, Asn174, Trp181, Glu184, Arg186* αριθμημένα από τη δομή της γαλεκτίνης-3 όπως φαίνεται και στην Εικόνα 14 [31]. Στην περιοχή αυτή προσδέεται η β-γαλακτόζη, ενώ στην λιγότερο συντηρημένη περιοχή *D* προσδέεται το κατάλοιπο του σακχάρου που βρίσκεται δίπλα στη β-γαλακτόζη (π.χ. η γλυκόζη εάν έχει προσδεθεί η λακτόζη). Ωστόσο, οι περιοχές *A, B* και *E* είναι πιο μεταβλητές και πιο ειδικές για κάθε λεκτίνη (Εικόνα 14) [30].



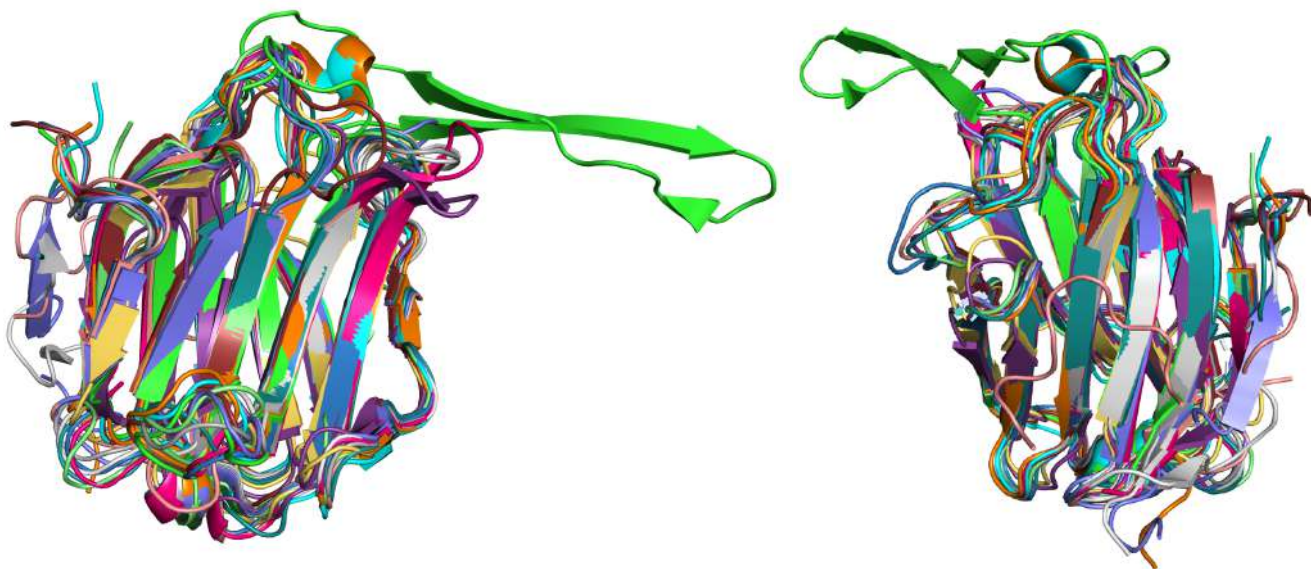
Εικόνα 13: Η CBS διαιρείται στις περιοχές A-E όπως φαίνεται και στην Εικόνα, σύμφωνα με τη δομή της CRD της γαλεκτίνης-3 (PDB ID: 3ZSJ). Η περιοχή C είναι η πιο συντηρημένη μεταξύ της οικογένειας των γαλεκτίνων, και αποτελείται από τα συντηρημένα κατάλοιπα His158, Asn160, Arg162, Asn174, Trp181, Glu184, Arg186 αριθμημένα από τη δομή της γαλεκτίνης-3. Στην περιοχή αυτή προσδένεται η β-γαλακτόζη, ενώ στην λιγότερο συντηρημένη περιοχή D προσδένεται η γλυκόζη. Ωστόσο, οι περιοχές A, B και E είναι λιγότερο συντηρημένες και πιο ειδικές για κάθε λεκτίνη. Με μπλε χρώμα παρουσιάζεται η λακτόζη.



Εικόνα 14: Τα συντηρημένα κατάλοιπα His158, Asn160, Arg162, Asn174, Trp181, Glu184, Arg186 αριθμημένα από τη δομή της γαλεκτίνης-3 (PDB ID: 3ZSJ). Με μπλε χρώμα παρουσιάζεται η λακτόζη.

1.4.1 Η κατηγοριοποίηση των ανθρώπινων γαλεκτίνων

Μέχρι σήμερα 16 γαλεκτίνες έχουν βρεθεί στα θηλαστικά ενώ οι 12 από αυτές εκφράζονται και στον άνθρωπο. Οι ανθρώπινες γαλεκτίνες μπορούν να κατηγοριοποιηθούν με βάση την οργάνωση των *CRDs* σε τρεις ομάδες: τις πρωτότυπες γαλεκτίνες, οι οποίες περιέχουν μια *CRD* και σε αυτή την ομάδα ανήκουν οι γαλεκτίνες 1, 2, 7, 10, 13, 14 και 16, τις χιμαιρικού τύπου γαλεκτίνες όπου η *CRD* είναι συνδεδεμένη με μια επικράτεια που δεν είναι χαρακτηριστική της οικογένειας των λεκτινών και σε αυτή την ομάδα ανήκει η γαλεκτίνη-3 και στις επαναλαμβανόμενες τύπου γαλεκτίνες οι οποίες αποτελούνται από δύο *CRDs* και στην ομάδα αυτή ανήκουν οι γαλεκτίνες 4, 8, 9 και 12 [32–35]. Οι δύο *CRDs* συνδέονται μέσω ενός πεπτιδίου μεγέθους περίπου 70 καταλοίπων που είναι ευαίσθητο σε πρωτεόλυση. Οι *CRDs* μπορούν να προσδένουν ταυτόχρονα δύο διαφορετικούς προσδέτες. Επιπλέον εμφανίζουν συγγένεια ως προς διαφορετικά μόρια υδατανθράκων. Συγκριτικές αναλύσεις μεταξύ της οικογένειας των γαλεκτινών έδειξαν κάποιες σημαντικές και ενδιαφέρουσες δομικές αποκλίσεις. Αρχικά, παρόλο που το ποσοστό ομολογίας κατά μέσο όρο είναι περίπου 20-50 %, το μοτίβο αναδίπλωσης της *CRD* είναι αρκετά συντηρημένο μεταξύ της οικογένειας. Επιπλέον, στις γαλεκτίνες επαναλαμβανόμενου τύπου οι δύο *CRD* εμφανίζουν μεγάλες αποκλίσεις τόσο στην αμινοξική αλληλουχία όσο και στη δομή. Τέλος, η C-*CRD* της γαλεκτίνης-12 εμφανίζει ποσοστό ομολογίας μικρότερο από 20% σε σχέση με τις υπόλοιπες πρωτεΐνες της οικογένειας, ωστόσο η τρισδιάστατη δομή της είναι ακόμα άγνωστη [29, 36]. Παρόλη την υψηλή ομολογία και το κοινό μοτίβο αναδίπλωσης (Εικόνα 15), οι γαλεκτίνες εμφανίζουν διαφορετική εξειδίκευση ως προς τους υδατάνθρακες λόγω της μοναδικής αρχιτεκτονικής και δυναμικής της *CBS* της κάθε πρωτεΐνης της οικογένειας [28].



Εικόνα 15: Η υπέρθεση των τρισδιάστατων δομών των *CRDs* των ανθρώπινων γαλεκτινών. Όπως φαίνεται, το μοτίβο αναδίπλωσης είναι αρκετά συντηρημένο, οι κύριες διαφορές παρατηρούνται στους βρόχους. Το χρώμα της κάθε γαλεκτίνης καθώς και τα PDB IDs είναι: γαλεκτίνη-1 με μωβ χρώμα (1GZW), γαλεκτίνη-2 με κίτρινο χρώμα (5DG2), γαλεκτίνη-3 με φούξια χρώμα (8OJI), γαλεκτίνη-4N με γκρι χρώμα (5DUW), γαλεκτίνη-4C με πετρόλ χρώμα (4YM0), γαλεκτίνη-7 με πράσινο χρώμα (1BKZ), γαλεκτίνη-8N με μωβ ανοιχτό χρώμα (2YV8), γαλεκτίνη-8C με σωμών χρώμα (4GXL), γαλεκτίνη-9N με γκρι ανοιχτό χρώμα (2D6K), γαλεκτίνη-9C με μπλε ανοιχτό χρώμα (3NV1), γαλεκτίνη-10 με πορτοκαλί χρώμα (1G86), γαλεκτίνη-13 με τουρκουάζ χρώμα (5XG7), γαλεκτίνη-14 με πράσινο έντονο χρώμα (6K2Y) και η γαλεκτίνη-16 με καφέ χρώμα (6LJP). Στην αριστερή εικόνα φαίνεται η S-πλευρά, ενώ στη δεξιά η F-πλευρά των *CRDs*.

Επιπλέον, ενώ κάποιες γαλεκτίνες όπως οι γαλεκτίνες 1 και 3, εκφράζονται σε πολλούς ιστούς [37, 38], άλλα μέλη της οικογένειας εντοπίζονται μόνο σε συγκεκριμένους ιστούς, όπως η γαλεκτίνη-7 εκφράζεται κυρίως στο δέρμα [39, 40], η γαλεκτίνη-12 στο λιπώδη ιστό [41, 42] και η γαλεκτίνη-10 στα ανθρώπινα ηωσινόφιλα [43, 44].

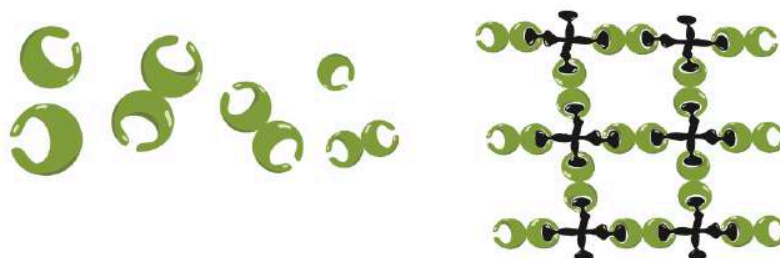
Οι γαλεκτίνες δρουν στο κυτοσόλιο, στον πυρήνα, στην κυτταρική μεμβράνη και στην εξωκυττάρια μήτρα. Εκκρίνονται από τα κύτταρα μέσω μιας μη κανονικής οδού που είναι ανεξάρτητη από το ενδοπλασματικό δίκτυο και το σύστημα *Golgi*, καθώς δεν περιέχουν κάποια αλληλουχία-σήμα για την εισαγωγή τους στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Στον εξωκυττάριο χώρο, οι γαλεκτίνες μπορούν να προσδεθούν σε γλυκοζυλιωμένους υποδοχείς στην επιφάνεια του κυττάρου. Η δημιουργία συμπλόκων προκαλεί ένα ευρύ φάσμα κυτταρικών αποκρίσεων. Ωστόσο, η υπερέκφραση των γαλεκτινών οδηγεί στην απορρύθμιση των βασικών κυτταρικών λειτουργιών οδηγώντας σε παθολογικές καταστάσεις. Για το λόγο αυτό, οι γαλεκτίνες θεωρούνται ως στόχοι για την ανάπτυξη νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων [45].

Παρόλο που το μοτίβο αναδίπλωσης των γαλεκτινών είναι αρκετά καλά συντηρημένο (Εικόνα 15), η τεταρτοταγή τους δομή μπορεί να διαφέρει. Οι γαλεκτίνες προσδένονται στους ολιγοσακχαρίτες είτε ως μονομερή, είτε ως διμερή, είτε ολιγομερίζονται δημιουργώντας συμπλέγματα υπερμοριακών δομών, που ονομάζονται πλέγματα (Εικόνα 16). Ο μηχανισμός δράσης εξαρτάται τόσο από τον προσδέτη όσο και από την ικανότητα δημιουργίας πλεγμάτων. Οι πρωτότυπες γαλεκτίνες σχηματίζουν διμερή κατά την πρόσδεσή τους σε ολιγοσακχαρίτες, τα οποία επηρεάζουν τη συγγένεια πρόσδεσης. Οι γαλεκτίνες επαναλαμβανόμενου τύπου αποτελούνται από δύο *CRDs* που συνδέονται μέσω ενός πεπτιδίου. Η ευελιξία των δύο *CRDs* να κινούνται ελεύθερα και με διαφορετικό προσανατολισμό παρέχει την ευελιξία δημιουργίας πλεγμάτων. Τέλος η χιμαιρική τύπου γαλεκτίνη-3, απουσία προσδετών είναι μονομερής, αλλά μπορεί να ολιγομεριστεί και να δημιουργήσει πενταμερή μέσω της *N*-τελικής περιοχής της. Σε αυτό το χαρακτηριστικό οφείλονται οι μοναδικές βιολογικές της δράσεις [45, 46].

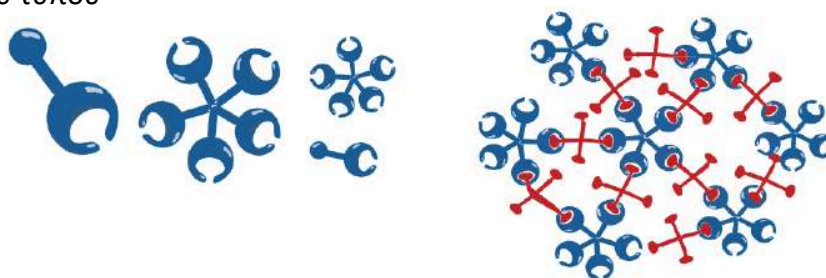
Ο ολιγομερισμός των γαλεκτινών είναι χαρακτηριστικός μεταξύ της οικογένειας των λεκτινών και αποτελεί βασικό στοιχείο για τη σηματοδότηση και τη λειτουργία τους. Στον ολιγομερισμό των γαλεκτινών οφείλονται η σταθερότητα τους και η δημιουργία συμπλόκων και συνεπώς και η βιολογική τους δράση. Η αλληλεπίδραση των γαλεκτινών με πολυσακχαρίτες μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία διαφορετικών πλεγμάτων, κάτι που οδηγεί στις διαφορετικές δράσεις της κάθε πρωτεΐνης της οικογένειας. Η δημιουργία πλεγμάτων γαλεκτίνης με ολιγοσακχαρίτες της κυτταρικής επιφάνειας είναι σημαντική για την έναρξη σηματοδοτικών μονοπατιών και για την κυτταρική προσκόλληση. Η πολυδυναμία των γαλεκτινών επιτρέπει την αναγνώριση διαφορετικών μορίων και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη μεταγωγή σήματος πολλών βιολογικών και παθολογικών διεργασιών. Όπως θα αναλυθεί περαιτέρω, οι γαλεκτίνες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση πολλών λειτουργιών που αφορούν φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις. Η

αποκάλυψη των βασικών χαρακτηριστικών της δομής και της επιλεκτικότητας της κάθε γαλεκτίνης είναι απαραίτητη για το σχεδιασμό νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων [47].

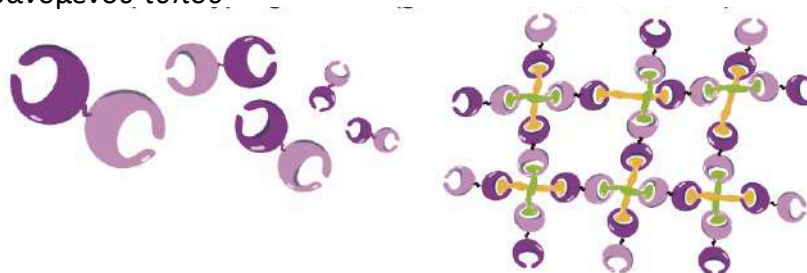
A. Πρωτότυπες



B. Χιμαιρικού τύπου



Γ. Επαναλαμβανόμενου τύπου



Εικόνα 16: Ο олиγομερισμός των γαλεκτίνων ανάλογα με την κατηγορία που ανήκουν και η δημιουργία πολυδύναμων πλεγμάτων.

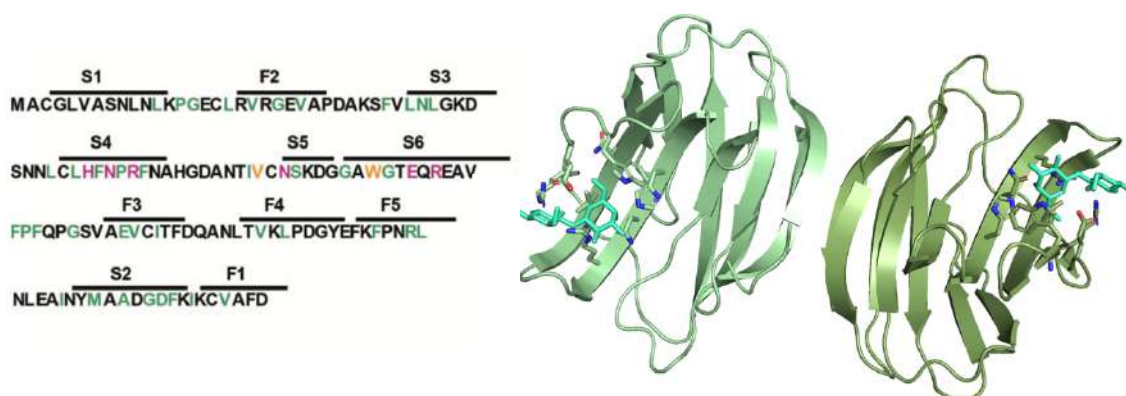
Τέλος, άξιο αναφοράς αποτελεί το γεγονός ότι τα μόρια ύδατος που συνδέονται σε κάθε γαλεκτίνη και ιδιαίτερα αυτά που βρίσκονται στη CBS διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο τόσο στην τρισδιάστατη δομή όσο και στη λειτουργία των πρωτεϊνών αυτών. Κατά τη δημιουργία συμπλόκων, τα μόρια ύδατος που βρίσκονται στη θέση πρόσδεσης εκτοπίζονται έτσι ώστε να προσδεθεί το σάκχαρο. Η εκτόπιση αυτή συνδέεται με τη μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας. Η υδρόφιλη φύση των υδατανθράκων καθώς και των γαλεκτίνων καθιστά αυτή τη συμβολή απαραίτητη τόσο στην αναγνώριση όσο και στην πρόσδεση τους.

1.5 Πρωτότυπες γαλεκτίνες

1.5.1 Γαλεκτίνη-1

Η γαλεκτίνη-1 είναι η πρώτη πρωτεΐνη της οικογένειας που ανακαλύφθηκε [37]. Έχει μοριακό βάρος 14 kDa [48] και αποτελείται από μια CRD. Το μοτίβο αναδίπλωσης της είναι αρκετά

συντηρημένο και όμοιο με αυτό της οικογένειας των γαλεκτινών (Εικόνα 17). Αποτελείται από δύο αντιπαράλληλα β-πτυχωτά φύλλα που δομούνται από έξι κλώνους που δημιουργούν την κοίλη πλευρά (S1-S6) και πέντε κλώνους που δημιουργούν την κυρτή πλευρά (F1-F5). Η CBS αποτελείται από τα συντηρημένα κατάλοιπα *His44*, *Asn46*, *Arg48*, *Val59*, *Asn61*, *Trp68*, *Glu71*, and *Arg73* [37]. Η γαλεκτίνη-1 εμφανίζεται ως ομοδιμερές που συγκροτείται μέσω αλληλεπιδράσεων των μονομερών και των καλά συντηρημένων υδρόφοβων καταλοίπων που σχηματίζουν ένα υδρόφοβο πυρήνα. Πιο συγκεκριμένα, δημιουργούνται 4 δεσμοί υδρογόνου ανάμεσα στα κατάλοιπα *Val5* και *Ser7* των *S1* κλώνων και 5 δεσμοί υδρογόνου ανάμεσα στα κατάλοιπα *Lys129*, *Phe133* and *Val131* των *F1* κλώνων. Επιπλέον, οι πλευρικές αλυσίδες μη-πολικών αμινοξέων των *S1* (*Leu4*, *Ala6* and *Leu9*) και *F1* (*Ile128*, *Val131*, *Phe133*) κλώνων εκτείνονται προς το εσωτερικό του μορίου δημιουργώντας έναν υδρόφοβο πυρήνα, που είναι υπεύθυνος για την σταθερότητα του ομοδιμερούς [49]. Ένα χαρακτηριστικό της γαλεκτίνης-1 είναι ότι σε χαμηλές συγκεντρώσεις, λόγω της τιμής της K_D των δύο μονομερών που είναι $\sim 7 \mu M$, διασπάται σε δυο μονομερή τα οποία μπορούν να δρουν και να προσδένονται σε υδατάνθρακες αλλά με χαμηλότερη αγκιστεία [37, 50]. Η γαλεκτίνη-1 για να δρα ως λεκτίνη απαιτεί την ύπαρξη θειοαναγωγικών συνθηκών, καθώς περιέχει έξι κατάλοιπα κυστεϊνών (*Cys2*, *Cys16*, *Cys42*, *Cys60*, *Cys88* και *Cys130*). Οι θειοαναγωγικές συνθήκες απαιτούνται για τη σταθερότητα του μοτίβου αναδίπλωσης της γαλεκτίνης-1 και της διατήρησης της τρισδιάστατης δομής της ώστε να μη δημιουργούνται ενδομοριακοί δισουλφιδικοί δεσμοί που θα διαταράσσουν την αναδίπλωση και τη διαμόρφωσή της [51–53].



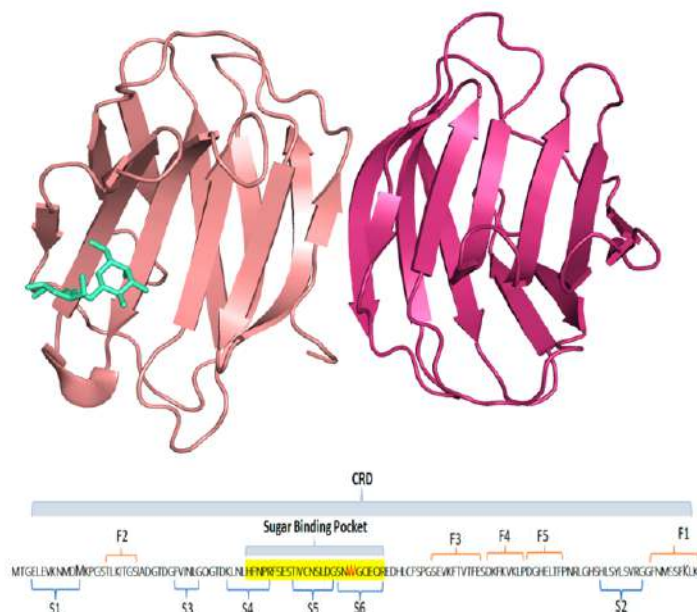
Εικόνα 17: Η τρισδιάστατη δομή του ομοδιμερούς της γαλεκτίνης-1 (PDB ID: 1GZW [49]). Με μπλε χρώμα φαίνεται η λακτόζη που προσδένεται στη CBS της γαλεκτίνης-1. Το μοτίβο αναδίπλωσης της γαλεκτίνης-1 είναι αρκετά καλά συντηρημένο. Με κίτρινο χρώμα αναγράφονται τα κατάλοιπα της CBS που είναι υπεύθυνα για την πρόσδεση προσδετών. Η περιοχή αυτή είναι η πιο συντηρημένη μεταξύ της οικογένειας των γαλεκτινών.

Η γαλεκτίνη-1 εκφράζεται στους περισσότερους ιστούς, όπως στο λιπώδη ιστό, στα αιμοφόρα αγγεία, στα αναπαραγωγικά όργανα κ.α. Εμπλέκεται σε πολλές βασικές κυτταρικές διαδικασίες όπως ο πολλαπλασιασμός, η απόπτωση και η αγγειογένεση [54] καθώς και σε πολλές παθολογικές καταστάσεις, όπως στον σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 και

στην παχυσαρκία [55], σε διάφορες μορφές καρκίνου [56] και στη ρευματοειδή αρθρίτιδα [57]. Η πρωτεΐνη αυτή θεωρείται ως στόχος για τη θεραπεία πολλών ασθενειών. Η εύρεση ενώσεων που θα προσδένονται ειδικά στη γαλεκτίνη-1 αποτελεί στόχο για τη θεραπεία του καρκίνου, καθυστερώντας την ανάπτυξη του όγκου και βελτιώνοντας την επιβίωση των ασθενών. Ήδη έχουν βρεθεί ισχυρές ενώσεις τόσο για τη γαλεκτίνη-1 όσο και για άλλες πρωτεΐνες της οικογένειας, οι οποίες βρίσκονται σε φάση κλινικών μελετών και θα αναλυθούν λεπτομερώς παρακάτω [56, 58].

1.5.2 Γαλεκτίνη-2

Η γαλεκτίνη-2 έχει μοριακό βάρος 14 *kDa*, και αποτελείται από μια *CRD* [59]. Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 18 το μοτίβο αναδίπλωσης της είναι αρκετά συντηρημένο. Η γαλεκτίνη-2 είναι μονομερές αλλά μπορεί να σχηματίσει ομοδιμερή που της παρέχουν την ικανότητα να προσδένεται σε υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας [60]. Το ομοδιμερές δημιουργείται μέσω 4 δεσμών υδρογόνου της κάθε β-πτυχωτής επιφάνειας μέσω των καταλοίπων 4-10 και 125-131 του κάθε μονομερούς [61, 62]. Η γαλεκτίνη-2 εκφράζεται στο γαστρεντερικό επιθήλιο, στον πλακούντα [63] καθώς και στο καρδιαγγειακό σύστημα [64]. Η πρωτεΐνη αυτή εμπλέκεται στη ρύθμιση πολλών παθοφυσιολογικών καταστάσεων όπως είναι η απόπτωση, η ανοσοαπόκριση, η ακεραιότητα του επιθηλιακού στρώματος και η φλεγμονή [62, 65]. Επιπλέον, η υπερέκφραση της γαλεκτίνης-2 έχει συσχετιστεί με αρκετές διαταραχές που σχετίζονται με την εγκυμοσύνη, με διάφορες μορφές καρκίνου και με φλεγμονώδεις νόσους του εντέρου [65–68]. Ωστόσο, ο τρόπος δράσης και η ρύθμιση της γαλεκτίνης-2 δεν έχουν διευκρινιστεί πλήρως. Η εύρεση των μοριακών μηχανισμών ρύθμισης και δράσης της γαλεκτίνης-2 μπορούν να οδηγήσουν στην εύρεση ισχυρών προσδετών με στόχο τη θεραπεία των παραπάνω ασθενειών [62].

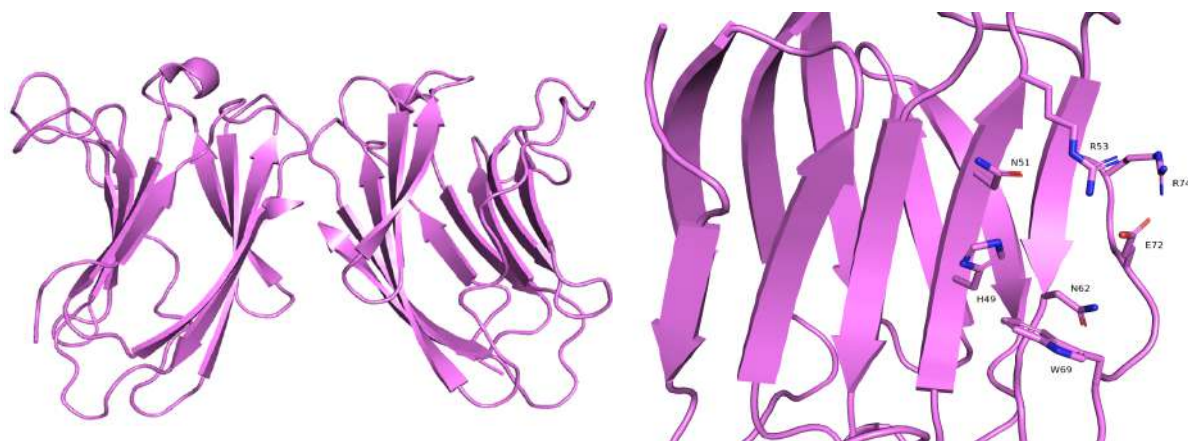


Εικόνα 18: Η τρισδιάστατη δομή του ομοδιμερούς της γαλεκτίνης-2 (PDB ID: 5DG2). Με πράσινο χρώμα φαίνεται η λακτόζη που προσδένεται στην CBS της γαλεκτίνης-2. Το μοτίβο ανδίπλωσης της γαλεκτίνης-2 είναι αρκετά καλά συντηρημένο. Με κίτρινο χρώμα αναγράφονται τα κατάλοιπα της CBS που είναι υπεύθυνα για την πρόσδεση σακχαριτών. Η περιοχή αυτή είναι η πιο συντηρημένη μεταξύ της οικογένειας των γαλεκτινών, και αποτελείται από τα κατάλοιπα His, Asn, Arg της S4, Asn της S5 και Trp, Glu, Arg της S6 [62].

1.5.3 Γαλεκτίνη-7

Η γαλεκτίνη-7 έχει μοριακό βάρος 15 *kDa* και αποτελείται από μια CRD. Εμφανίζει 38% αμινοξική ομολογία με τη γαλεκτίνη-1 και 27% με τη γαλεκτίνη-2. Η γαλεκτίνη-7 συντίθεται στο κυτταρόπλασμα και συσσωρεύεται στο κυτοσόλιο ή στον πυρήνα πριν εκκριθεί στην πλάσματική μεμβράνη ή στην εξωκυττάρια μήτρα. Όπως σε όλες τις γαλεκτίνες, η έκκριση και η μεταφορά της γαλεκτίνης-7 πραγματοποιούνται μέσω ενός απροσδιόριστου μη κλασικού εκκριτικού μηχανισμού. Η πρωτεΐνη αυτή κρυσταλλώνεται ως ομοδιμερές, αλλά δρα κυρίως ως μονομερές και λιγότερο ως ομοδιμερές. Το διμερές συγκροτείται μέσω δεσμών υδρογόνου μεταξύ 5 αμινοξικών καταλοίπων από το ένα μονομερές και 8 αμινοξικών καταλοίπων από το άλλο μονομερές, και μέσω αλληλεπιδράσεων *Van der Waal* μεταξύ των β-κλώνων F1-F5. Το μοτίβο αναδίπλωσης της CRD είναι καλά συντηρημένο, δημιουργώντας το μοτίβο στοιβαγμένων β-δομών (*jelly roll*). Η γαλεκτίνη-7 περιέχει ένα κατάλοιπο κυστεΐνης (Cys38), το οποίο δεν επηρεάζει την πρόσδεση υδατανθράκων, δεν εμπλέκεται στη δημιουργία των ομοδιμερών, ωστόσο δεν υπάρχουν ακόμα στοιχεία για την εμπλοκή του σε κάποιες από τις βιολογικές δράσεις της πρωτεΐνης. Επιπλέον, η CBS της γαλεκτίνης-7 περιέχει τα συντηρημένα κατάλοιπα His49, Asn51, Arg53, Asn62, Trp69, Glu72, Arg74 (Εικόνα 19). Ωστόσο, συγκριτικές μελέτες των δομών των γαλεκτινών-1, 2 και 7 έδειξαν ότι ο βρόχος που συνδέει τους β-κλώνους S4 και S5 είναι μεγαλύτερος στη γαλεκτίνη-1, σε σχέση με τις 2 και 7. Η διαφορά αυτή οδηγεί σε διαφορετική συγγένεια στην πρόσδεση υδατανθράκων λόγω της δημιουργίας διαφορετικών δεσμών υδρογόνου και αλληλεπιδράσεων *Van der Waals* [69]. Η πρόσδεση δισακχαριτών δεν επηρεάζει σημαντικά

τη διαμόρφωση της CRD, εκτός από κάποια μικρή αλλαγή της διαμόρφωσης των Arg74 και Gly75. Οι προσδέτες λακτόζη, γαλακτόζη, γαλακτοζαμίνη και N-ακετυλο-λακτοζαμίνη εμφανίζουν ακριβώς το ίδιο πρότυπο δημιουργίας συμπλόκων μέσω δεσμών υδρογόνου, αλληλεπιδράσεων *Van der Waals* και αλληλεπιδράσεων μέσω συντηρημένων μορίων ύδατος (*water-mediated interactions*), με τα συντηρημένα κατάλοιπα της CBS.



Εικόνα 19: Στην αριστερή εικόνα παρουσιάζεται το διμερές της γαλεκτίνης-7 (PDB ID: 1BKZ) (ροζ). Στη δεξιά εικόνα, παρουσιάζονται με ράβδους, τα συντηρημένα κατάλοιπα His49, Asn51, Arg53, Asn62, Trp69, Glu72, Arg74, της CBS της γαλεκτίνης-7 (ροζ).

Η γαλεκτίνη-7 δρα εντός και εκτός του κυττάρου και είναι υπεύθυνη για πολλές διαδικασίες όπως είναι η ρύθμιση της απόπτωσης, η κυτταρική μετανάστευση και η κυτταρική προσκόλληση. Επιπλέον, εμπλέκεται στην επούλωση τραυμάτων του κερατοειδούς ή της επιδερμίδας και σε πολλές παθολογικές διαδικασίες, όπως ο καρκίνος, κάποιες από τις οποίες θα αναλυθούν παρακάτω [70].

1.5.3.1 Γαλεκτίνη-7 και ο ρόλος της στον καρκίνο

Τα καρκινώματα, αποτελούν περίπου το 85% των ειδών του καρκίνου που εμφανίζονται στα επιθηλιακά κύτταρα. Η γαλεκτίνη-7 εμφανίζει διαφορετική ρύθμιση όσον αφορά την εξέλιξη του όγκου από έναν ιστολογικό τύπο στον άλλον. Συμβάλλει στη δημιουργία των λεμφωμάτων και του μελανώματος, είτε μέσω του νεοπλασματικού μετασχηματισμού, είτε μέσω της εξέλιξης του όγκου, είτε μέσω της ρύθμισης της κυτταρικής ανάπτυξης, του κυτταρικού κύκλου, της αγγειογένεσης, της απόπτωσης και της κυτταρικής μετανάστευσης. Επιπλέον, η γαλεκτίνη-7 μπορεί να έχει προστατευτική δράση έναντι κάποιων όγκων ανάλογα με τον τύπο του ιστού. Έχει βρεθεί ότι η αύξηση της έκφρασης της γαλεκτίνης-7 σε κάποιους καρκινικούς όγκους προκαλείται λόγω μετάλλαξης της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης p53. Η υψηλή αυτή έκφραση εμπλέκεται στη ρύθμιση της καρκινογένεσης, μέσω επαγωγής της απόπτωσης των κυττάρων T, των CD4⁺ και CD8⁺, όπως και στη ρύθμιση μέσω μακροφάγων και δενδροειδών κυττάρων [70–72]. Η γαλεκτίνη-7 συμβάλλει στην αύξηση της μετανάστευσης των καρκινικών κυττάρων, στη μείωση της κυτταρικής προσκόλλησης, στην εξέλιξη του όγκου καθώς και στη μετάστασή του μέσω της αύξησης της έκφρασης και της

δράσης των μεταλλοπρωτεασών *MMP* 2 και 9. Η ενίσχυση του πολλαπλασιασμού, της μετανάστευσης και της διεισδυτικότητας των καρκινικών κυττάρων ρυθμίζονται από τη γαλεκτίνη-7 μέσω των *erK1/2* και *JNK1/2* σηματοδοτικών μονοπατιών. Τέλος, η ικανότητα των καρκινικών κυττάρων να μεταναστεύουν ρυθμίζεται από την επαγόμενη από τη γαλεκτίνη-7 έκφραση του γονιδίου *COL4a*, που κωδικοποιεί την αλυσίδα α του κολλαγόνου τύπου IV. Επιπλέον, ενεργοποιεί το σηματοδοτικό μονοπάτι *P13/Akt*, το οποίο ρυθμίζει τις νεοπλασματικές ασθένειες ενισχύοντας τον πολλαπλασιασμό και τη βιωσιμότητα των καρκινικών κυττάρων [72].

1.5.3.2 Γαλεκτίνη-7 και καρκίνος των ωοθηκών

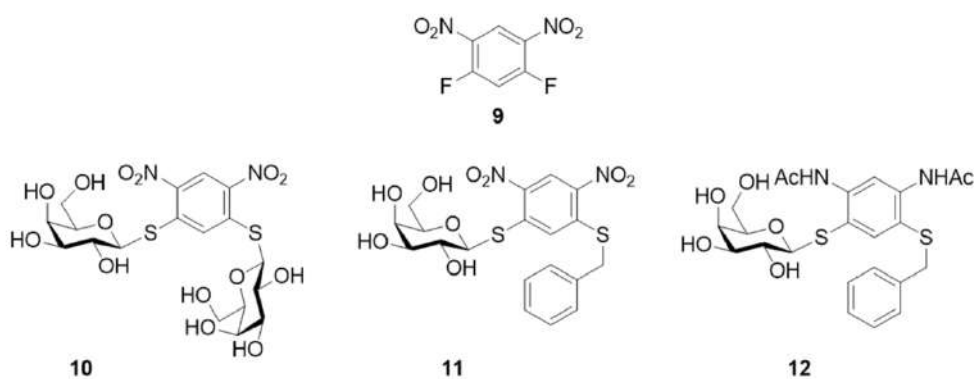
Ανοσοϊστοχημικές μελέτες αποκάλυψαν την αυξημένη έκφραση της γαλεκτίνης-7 σε επιθηλιακά καρκινικά κύτταρα των ωοθηκών ενώ μη ανιχνεύσιμα επίπεδα της πρωτεΐνης αυτής παρατηρήθηκαν σε υγιή ιστό. Η κυτταροπλασματική έκφραση της γαλεκτίνης-7 αποτελεί αρνητικό προγνωστικό παράγοντα για την εξέλιξη και την ύπαρξη του καρκίνου των ωοθηκών [72, 73]. Μελέτες *in vitro* έδειξαν ότι η έκφραση της γαλεκτίνης-7 στα καρκινικά κύτταρα των ωοθηκών ρυθμίζεται από μεταλλάξεις της *p53*. Επιπλέον, η αυξημένη έκφρασή της βρέθηκε να συσχετίζεται με τα ιστολογικά επίπεδα του όγκου, την προχωρημένη ηλικία και το υψηλό ποσοστό θνησιμότητας. Επιπρόσθετα, οι όγκοι που εμφανίζουν υψηλότερη έκφραση της γαλεκτίνης-7 έχουν μεγαλύτερο μέγεθος σε αντίθεση με αυτούς που εμφανίζουν χαμηλότερη έκφραση. Μελέτες μέσω αποσιώπησης *siRNA* της γαλεκτίνης-7 έδειξαν ότι αναστέλλεται ο πολλαπλασιασμός των καρκινικών κυττάρων. Υψηλά επίπεδα έκφρασης σχετίζονται με τη χαμηλή πρόγνωση του καρκίνου των ωοθηκών και εμπλέκονται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό [72, 73]. Παράλληλα, ανοσοϊστοχημική ανάλυση της έκφρασής της έδειξε ότι σε υγιή ιστό των ωοθηκών η πρωτεΐνη αυτή δεν εκφράζεται, ενώ εμφανίζονται υψηλά επίπεδα έκφρασης της σε κακοήθους όγκους. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι η αυξημένη έκφραση σχετίζεται με την εξέλιξη του όγκου μέσω της αυξημένης διεισδυτικότητας της καρκινικών κυττάρων και της προ-αποπτωτικής δράσης σε κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος [73, 74]. Τέλος, η στόχευση της εξωκυτταρικής γαλεκτίνης-7 είτε με ειδικούς προσδέτες για την *CRD* είτε με πεπτίδια που διαταράσσουν το διμερές μπορεί να είναι πιο αποτελεσματική από τη στόχευση της ενδοκυτταρικής γαλεκτίνης-7. Μελέτες έδειξαν ότι η εξωκυττάρια γαλεκτίνη-7 ελέγχει τα ενδοκυττάρια επίπεδα της γαλεκτίνης-7 μέσω αύξησης της μεταγραφής του γονιδίου *LGALS7* και επιπλέον, μέσω της επανεισόδου της εντός κυττάρων [74]. Όλα τα παραπάνω, αναδεικνύουν την πρωτότυπη αυτή γαλεκτίνη ως νέο και υποσχόμενο στόχο για τη θεραπεία του καρκίνου των ωοθηκών.

1.5.3.3 Γαλεκτίνη-7 και φαρμακευτικός στόχος

Η γαλεκτίνη-7 εκφράζεται κυρίως στα στρωματοποιημένα επιθήλια διαφόρων ιστών. Ενώ είναι γνωστό ότι έχει πολλαπλές βιολογικές λειτουργίες στον ανθρώπινο οργανισμό, μεγάλο μέρος του μοριακού τρόπου δράσης είναι ακόμα άγνωστος. Λόγω των ποικίλων ρόλων της

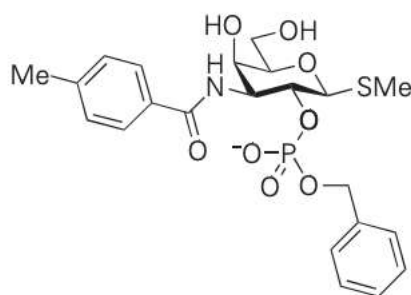
στην ανθρώπινη κυτταρική παθολογία κρίνεται αναγκαία η εύρεση ενώσεων που θα στοχεύουν ειδικά τη γαλεκτίνη-7, προκειμένου να βρεθούν οι μηχανισμοί της και να αποτελέσουν σημείο αναφοράς για νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις. Η χρήση μικρών μορίων που δεσμεύονται ισχυρά και ειδικά στη γαλεκτίνη-7 μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για την πρόγνωση και την παρακολούθηση ασθενειών σε αναζήτηση καλύτερης και εξατομικευμένης ιατρικής θεραπείας [70].

Η γαλεκτίνη-7 εμφανίζει υψηλή συγγένεια ως προς β-γαλακτοζίτες, ως εκ τούτου οι περισσότερες ενώσεις που εμφανίζουν υψηλή ειδικότητα είναι υδατάνθρακες ή ανάλογα σακχάρων. Οι πρώτοι εκλεκτικοί προσδέτες που ανακαλύφθηκαν για τη γαλεκτίνη-7 είχαν ως ικρίωμα β-γαλακτοζίτη και μια ομάδα 1,5-διφθορο-2,4-δινιτροβενζόλιο (**9**) (Εικόνα 20). Είχε συντεθεί μια βιβλιοθήκη 28 ενώσεων, όπου όλες εξετάστηκαν ως προς την ικανότητα πρόσδεσής τους στις γαλεκτίνες 1, 3, 7, 8*N* και 9*N*. Στην Εικόνα 20 φαίνονται οι τρεις ενώσεις **10**, **11** και **12**, οι οποίες εμφανίζουν εξειδίκευση μόνο ως προς τη γαλεκτίνη-7 με K_D περίπου 140-180 μM [75].



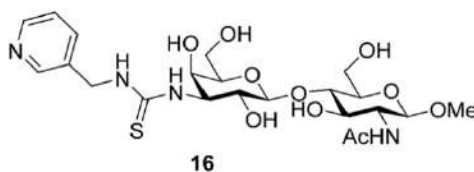
Εικόνα 20: Οι χημικές δομές του ικρίωματος 1,5-διφθορο-2,4-δινιτροβενζόλιο και των προσδετών **10**, **11**, **12** με K_D 170, 180 και 140 μM αντίστοιχα [75].

Μελέτες από ενώσεις ανάλογων του 2-Ο-βενζυλ-φωσφορικού γαλακτοζίτη οδήγησαν στην ανακάλυψη ενός ανταγωνιστή με $K_D = 450 \mu M$ (Εικόνα 21). Ο ανταγωνιστής αυτός προσδένεται μέσω αλληλεπιδράσεων της γαλακτόζης με τα πρωτεϊνικά κατάλοιπα, αλλά και μέσω δεσμών υδρογόνου που διαμεσολαβούνται από συντηρημένα μόρια ύδατος (*water-mediated interactions*) μεταξύ της φωσφορικής ομάδας και των μη συντηρημένων αμινοξικών καταλοίπων Arg31 και Asn51 της CRD της γαλεκτίνης-7. Η βενζυλομάδα δεν δημιουργεί δεσμούς και αλληλεπιδράσεις με κάποιο κατάλοιπο και επεκτείνεται εκτός της CRD, κάτι που χαρακτηρίζεται και από τους δισακχαρίτες που προσδένονται, καθώς ο ένας δακτύλιος βρίσκεται εκτός της CRD. Η χημική τροποποίηση με την προσθήκη άλλων υποκατάστατων στη θέση αυτή ίσως οδηγήσει στην ανακάλυψη πιο ισχυρών ανταγωνιστών με υψηλότερη συγγένεια ως προς τη γαλεκτίνη-7, ιδιαίτερα αξιοποιώντας τη δημιουργία αλληλεπιδράσεων με το μη συντηρημένο κατάλοιπο, Arg53 [76].



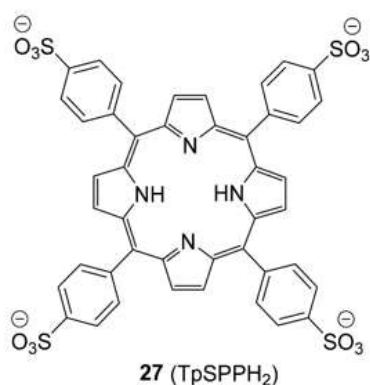
Εικόνα 21: Ένωση ανάλογη του 2-Ο-βενζυλφωσφορικού γαλακτοζίτη, με $K_D = 400 \mu M$.

Ακολούθησαν μελέτες πρόσδεσης τροποποιημένων ενώσεων β-γαλακτοζιτών που έφεραν στη θέση 3- ή -4 υποκαταστάτες, αλκινικούς βενζυλαιθέρες. Ωστόσο, οι ενώσεις αυτές εμφάνισαν ικανότητα πρόσδεσης τόσο στη γαλεκτίνη-7 όσο και στις γαλεκτίνες 1, 3, 8*N* και 9*N* [77]. Επίσης, παράγωγα της *N*-ακετυλολακτοζαμίνης, που φέρουν ομάδες θειουρίας στον C3 της γαλακτόζης (Εικόνα 22), προσδένονται στη γαλεκτίνη-7 με $K_D = 23 \mu M$ χωρίς όμως να εμφανίζουν εξειδίκευση καθώς προσδένονται και στις γαλεκτίνες 1, 3, 8*N* και 9*N* με σταθερές πρόσδεσης 35-47 μM [78].



Εικόνα 22: Η χημική δομή του προσδέτη του παραγώγου της θειουρείδικής *N*-ακετυλολακτοζαμίνης 16 [78].

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, οι πρωτότυπες γαλεκτίνες, διμερίζονται και σε μερικές περιπτώσεις ολιγομερίζονται κατά την πρόσδεσή τους σε πολυσακχαρίτες. Επομένως, η ανάλυση των συμπλόκων της γαλεκτίνης-7 με δενδρομερή θα μπορούσε να προσφέρει απαντήσεις σχετικά με τα δομικά χαρακτηριστικά του σχηματισμού υπερμοριακών συγκροτημάτων των γαλεκτινών. Σύμφωνα με μια πρόσφατη μελέτη, η πρόσδεση δενδρομερών οδήγησε στη δημιουργία περισσότερων δεσμών υδρογόνου μεταξύ της επιφάνειας του διμερισμού, χωρίς όμως να επηρεάζεται η σταθερότητα του διμερούς. Επιπλέον, η δημιουργία δεσμών μεταξύ της ένωσης και των μη συντηρημένων αμινοξικών καταλοίπων *Arg31*, *Ser68* και *Asp55* μπορεί να αξιοποιηθεί για την εύρεση εξειδικευμένων ενώσεων για τη γαλεκτίνη-7 [79]. Στην Εικόνα 23 παρουσιάζεται το δενδρομερές (*TrSPPH2*), το οποίο δεν αποτελεί ανάλογο β-γαλακτοζίτη, που προσδένεται στη διεπιφάνεια του ομοδιμερούς της γαλεκτίνης-7. Το δενδρομερές εμφάνισε σταθερά πρόσδεσης 9,5 μM και οδήγησε σε σημαντική μείωση τα επίπεδα της επαγόμενης από τη γαλεκτίνη-7 απόπτωση των ανθρώπινων κυττάρων *Jurkat T* [80].



Εικόνα 23: Η χημική δομή του προσδέτη της γαλεκτίνης-7 27 (TpSPPH2), ο οποίος δεν είναι ανάλογος β-γαλακτοζίτη [80].

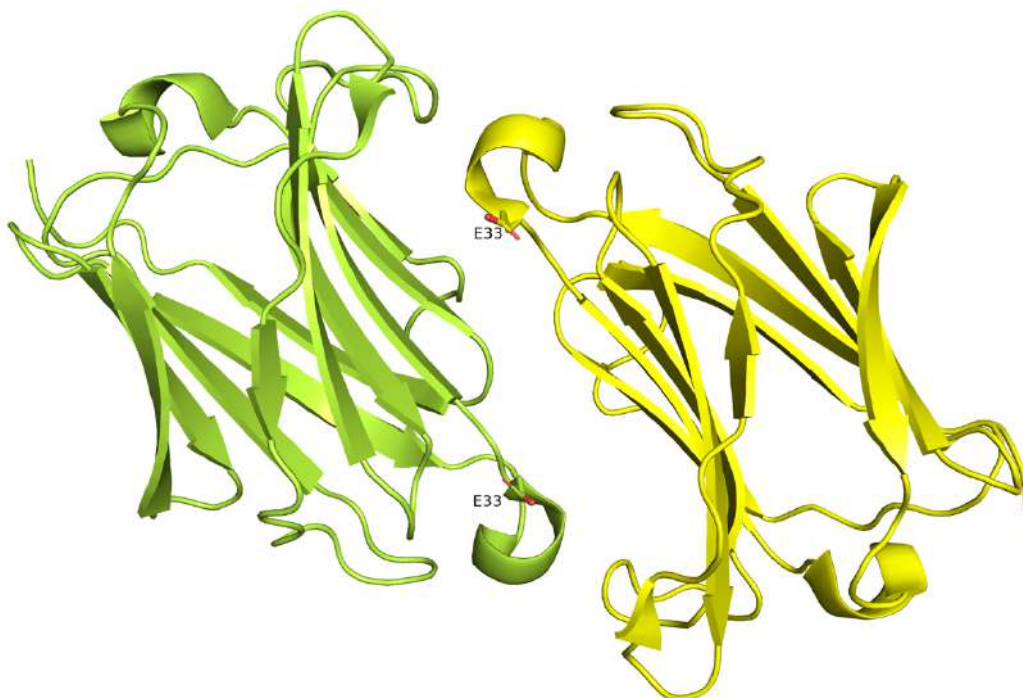
1.5.4 Γαλεκτίνη-10

Η γαλεκτίνη-10 έχει μοριακό βάρος 17 *kDa* και αποτελείται από μια *CRD*. Η πρωτεΐνη αυτή εκφράζεται στα ηωσινόφιλα και δημιουργεί αυθόρμητα κρυστάλλους που έχουν ονομασθεί κρύσταλλοι *Charcot-Leyden* (*CLCs*) [81] στα πρωτογενή κοκκία του κυτταροπλάσματος ή στο λύμα των ηωσινόφιλων κατά τη διάρκεια εκτεταμένων ηωσινόφιλων φλεγμονωδών αποκρίσεων. Οι *CLCs*, που χαρακτηρίζονται από το εξαγωνικό και διπυραμιδικό σχήμα τους, θεωρούνται δείκτες για διάφορες ασθένειες που σχετίζονται με τη δράση των ηωσινόφιλων, όπως είναι το άσθμα, ατοπική δερματίτιδα, καρκίνος του παχέος εντέρου και αλλεργική ρινίτιδα [82–84].

Η γαλεκτίνη-10 αποτελείται από 142 αμινοξικά κατάλοιπα και εμφανίζει υψηλή ομολογία με τις υπόλοιπες γαλεκτίνες. Η τρισδιάστατη κρυσταλλική δομή της αποδεικνύει την υψηλή συντήρηση της *CRD* της οικογένειας των γαλεκτινών [85]. Παρόλη την υψηλή συντήρηση, εμφανίζονται κάποιες διαφορές τόσο στο τρόπο δημιουργίας των ομοδιμερών όσο και στα αμινοξικά κατάλοιπα της *CBS*. Η γαλεκτίνη-10 υπάρχει και δρα ως ομοδιμερές. Ωστόσο, η συγκρότηση του ομοδιμερούς είναι τελείως διαφορετική από αυτή των γαλεκτινών 1, 2 και 7 που αναφέρθηκαν προηγουμένως. Σε αντίθεση με τις γαλεκτίνες 1 και 2 που διμερίζονται μέσω δεσμών υδρογόνου και ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων μέσω των *F1* και *S1* κλώνων, στη γαλεκτίνη-10 το ομοδιμερές συγκροτείται μέσω δεσμών υδρογόνου και αλληλεπιδράσεων *Van der Waals* της κυρτής πλευράς (*F-face*). Έτσι οι *CBS* των δυο μονομερών βρίσκονται σε αντίθετες πλευρές του διμερούς [49, 86]. Εντούτοις, η εμπλοκή δύο καταλοίπων (*Trp127* και *Glu33*) της *CBS* στο διμερισμό οδηγεί σε παρεμπόδιση της *CBS* του ενός μονομερούς από το άλλο (Εικόνα 24) [82]. Ωστόσο, η αντικατάσταση των *Glu33* ή *Trp127* από αλανίνη έδειξε ότι η γαλεκτίνη-10 μπορεί να προσδέσει τη λακτόζη με χαμηλή συγγένεια, ενώ το ομοδιμερές δεν εμφανίζει συγγένεια ως προς την πρόσδεση β-γαλακτοζιτών και κατ' επέκταση με τη λακτόζη [83]. Οι διαφορές αυτές υποδεικνύουν ότι η ειδικότητα της γαλεκτίνης-10 καθώς και οι βιολογικοί της ρόλοι και οι μηχανισμοί δράσης της ενδέχεται να είναι διαφορετικοί από τις υπόλοιπες γαλεκτίνες. Αν και η *CBS* της γαλεκτίνης-10 συγκροτείται κυρίως από τα συντηρημένα κατάλοιπα, *His53*, *Asn65*, *Trp72*, εμφανίζονται διαφορές στις θέσεις 55 και 57 όπου βρίσκονται ένα *Glu* και μια *Cys*, ενώ στις υπόλοιπες

γαλεκτίνες βρίσκεται *Asn* και *Arg*, αντίστοιχα. Επίσης, στο *CBS* βρίσκονται και τρία κατάλοιπα, *Lys73*, *Gln74* και *Gln75* τα οποία δεν είναι συντηρημένα στις υπόλοιπες γαλεκτίνες. Οι παραπάνω αμινοξικές διαφορές καθώς και οι διαφορές του ομοδιμερούς είναι υπεύθυνες για τη χαμηλή συγγένεια της γαλεκτίνης-10 για δισακχαρίτες [82]. Η γαλεκτίνη-10 αν και εμφανίζει χαμηλή συγγένεια δημιουργεί σύμπλοκα με μονοσακχαρίτες και πιο συγκεκριμένα με τη *D*-γλυκόζη, τη *D*-γαλακτόζη, τη *D*-μαννόζη, *D*-αλλόζη, *L*-φουκόζη, *D*-αρραβινόζη και τη *D*-*N*-ακετυλογαλακτοζαμίνη. Η *Glu33* δημιουργεί δεσμό υδρογόνου με τους παραπάνω μονοσακχαρίτες καθιστώντας το κατάλοιπο αυτό απαραίτητο για την αναγνώριση μονοσακχαριτών. Ενδιαφέρον παρουσιάζει και η αγχιστεία της γαλεκτίνης-10 για μονοσακχαρίτες που έχουν ένα ή κανένα αξονικό υδροξύλιο ενώ δε δημιουργεί σύμπλοκα με μονοσακχαρίτες που περιέχουν δύο αξονικά υδροξύλια, για παράδειγμα τη *D*-αλτρόζη, καθώς αυτές δεν μπορούν να δημιουργήσουν αλληλεπιδράσεις επιστοίβαξης με το κατάλοιπο *Trp72* [85, 87].

Η γαλεκτίνη-10 θεωρείται ως αρκετά υποσχόμενος βιοδείκτης [84] και φαρμακευτικός στόχος για τη θεραπεία πολλών ασθενειών. Οι *CLCs* βρίσκονται στους αεραγωγούς ασθενών που εμφανίζουν βλέννα, υψηλό *IgE* ορού και υψηλό δείκτη ηωσινόφιλων στους ιστούς, δηλαδή σε ασθένειες όπως άσθμα, κυστική ίνωση και αλλεργική βρογχοπνευμονική ασπεργίλλωση. Οι ασθένειες αυτές εμφανίζουν υψηλά ποσοστά υποτροπής μετά από χειρουργικές επεμβάσεις, επομένως υπάρχει ανάγκη για νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις. Οι *CLCs* είναι αρκετά σταθεροί και ανθεκτικοί και παραμένουν στον οργανισμό ακόμα και μετά από κάποιες θεραπείες. Επομένως, η εύρεση ειδικών αντισωμάτων ή ενώσεων που θα προσδένονται με υψηλή συγγένεια στην πρωτεΐνη αυτή με απώτερο στόχο την καταστροφή των *CLCs* αποτελεί σημαντικό βήμα για τη θεραπεία αυτών των ασθενειών [88].

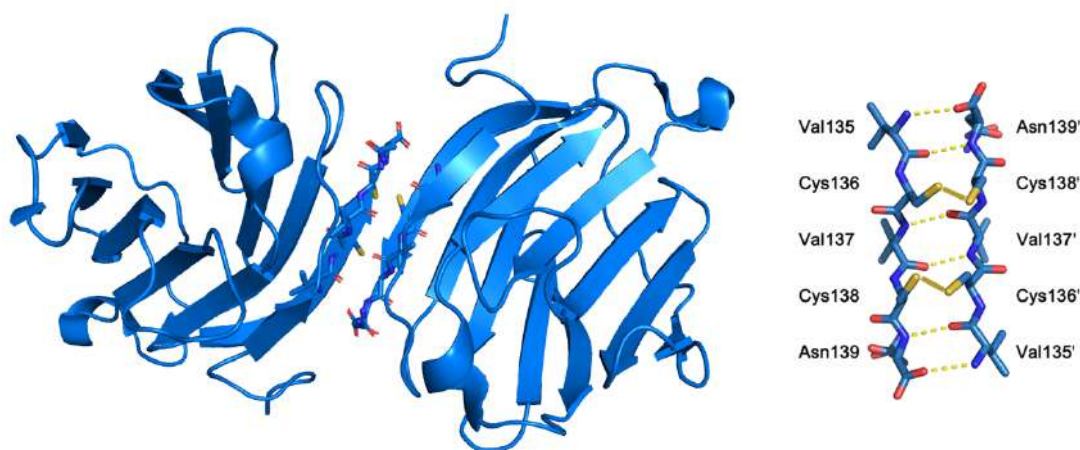


Εικόνα 24: Το ομοδιμερές της γαλεκτίνης-10 (PDB ID: 5XRH). Το μοτίβο αναδίπλωσης της CRD είναι καλά συντηρημένο και χαρακτηριστικό της οικογένειας των γαλεκτίνων. Η κοίλη πλευρά της γαλεκτίνης-10 (*S*-face) είναι υπεύθυνη για το διμερισμό

της πρωτεΐνης, με αποτέλεσμα οι CBS να είναι αρκετά κοντά μεταξύ τους. Το κατάλοιπο Glu33 της κοίλης πλευράς S, που φαίνεται στην εικόνα, του ενός μονομερούς παρεμποδίζει την CBS του άλλου μονομερούς.

1.5.5 Γαλεκτίνη-13

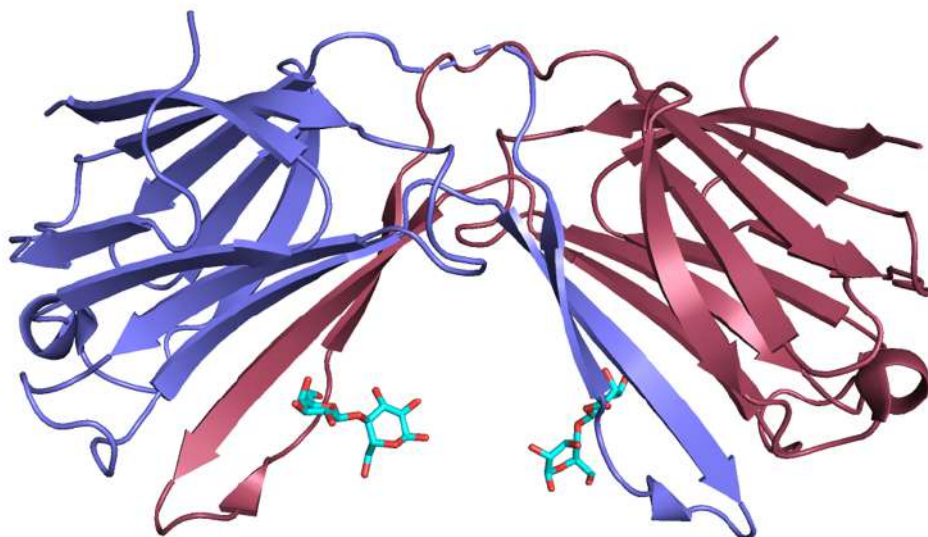
Η γαλεκτίνη-13 ή αλλιώς πρωτεΐνη του πλακούντα 13 (*Placental Protein 13*, PP13) έχει μοριακό βάρος 16 *kDa* και αποτελείται από μια CRD. Η πρωτεΐνη αυτή εμφανίζει 54% αμινοξική ομολογία με τη γαλεκτίνη-10. Συντίθεται στο κυτταρόπλασμα και μεταφέρεται στην εξωκυττάρια μήτρα μέσω μη κλασσικού μονοπατιού έκκρισης [89]. Η γαλεκτίνη-13 δρα ως ομοδιμερές που σταθεροποιείται μέσω δύο δισουλφιδικών δεσμών και έξι δεσμών υδρογόνου μέσω των καταλοίπων Val135, Cys136, Val137, Cys138 και Asn139 που βρίσκονται στον κλώνο F1 των μονομερών [90] (Εικόνα 25). Το μοτίβο αναδίπλωσης της CRD είναι καλά συντηρημένο και η τρισδιάστατη δομή αρκετά όμοια με αυτή των γαλεκτινών. Ωστόσο, παρά την συντήρηση της τρισδιάστατης δομής εμφανίζονται σημαντικές διαφορές στα κατάλοιπα της CBS. Στο β-κλώνο S4 υπάρχει η Arg53 ενώ στις υπόλοιπες γαλεκτίνες στην ίδια θέση βρίσκεται μια ιστιδίνη η οποία δημιουργεί δεσμό με το O4 του σακχάρου σταθεροποιώντας έτσι το σύμπλοκο γαλεκτίνης-β-γαλακτοζίτη. Επιπλέον, η γαλεκτίνη-13 περιέχει στη θέση 57 μια ιστιδίνη (His57), ενώ στις υπόλοιπες γαλεκτίνες στη θέση αυτή βρίσκεται μια αργινίνη (Arg) η οποία συμμετέχει σε δεσμό υδρογόνου με το O3 του β-γαλακτοζίτη. Λόγω αυτών των αμινοξικών διαφορών, η γαλεκτίνη-13 δεν εμφανίζει συγγένεια ως προς τη λακτόζη. Μελέτες όπου η Arg53 και η His57 της γαλεκτίνης-13 μεταλλάχθηκαν σε His και Arg, αντίστοιχα, έδειξαν ότι λακτόζη δεν μπορεί να προσδεθεί σε αυτή την πρωτεΐνη [90]. Λόγω αυτών των διαφορών στην CBS, πιθανότατα θεωρείται ότι η γαλεκτίνη αυτή είναι σημαντική για τη διατήρηση του πλακούντα μέσω μηχανισμών που είναι ακόμα άγνωστοι. Η γαλεκτίνη-13 εκφράζεται στον πλακούντα, στην σπλήνα, στους νεφρούς, και σε κάποιους καρκινικούς τύπους όπως είναι το αδеноκαρκίνωμα και το κακοήθες μελάνωμα [91]. Επειδή, η έκφραση της γαλεκτίνης-13 σχετίζεται με ανωμαλίες κατά τη διάρκεια της κύησης, είναι σημαντικό να βρεθούν οι φυσικοί προσδέτες της καθώς και οι μηχανισμοί δράσης της [89, 90, 92].



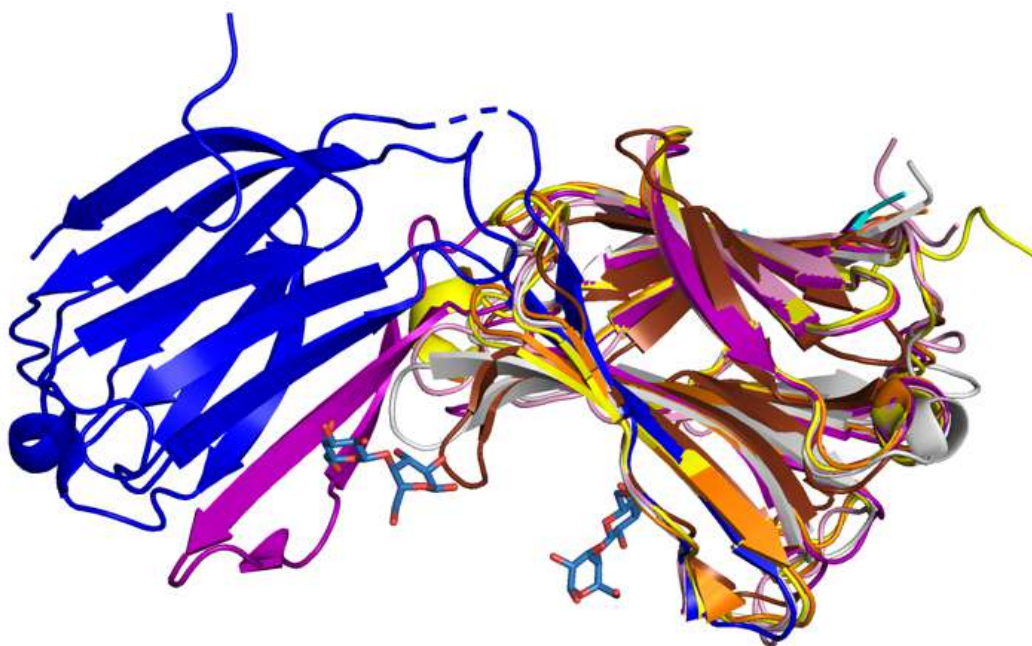
Εικόνα 25: Η τρισδιάστατη δομή του ομοδιμερούς της γαλεκτίνης-13 (PDB ID: 5XG7). Η γαλεκτίνη-13 δρα ως ομοδιμερές που σταθεροποιείται μέσω δύο δισουλφιδικών δεσμών και έξι δεσμών υδρογόνου μέσω των καταλοίπων Val135, Cys136, Val137, Cys138 και Asn139 που βρίσκονται στον κλώνο F1 των μονομερών.

1.5.6 Γαλεκτίνη-14

Η γαλεκτίνη-14 έχει μοριακό βάρος 14.8 kDa και αποτελείται από μια CRD. Η πρωτεΐνη αυτή εμφανίζει 78% αμινοξική ομολογία με τη γαλεκτίνη-13, κάτι που εξηγεί την υψηλή συντήρηση των τρισδιάστατων δομών των μονομερών των δύο πρωτεϊνών. Ωστόσο οι τεταρτοταγείς δομές και η δημιουργία των ομοδιμερών είναι διαφορετικές [83, 93]. Η δημιουργία των ομοδιμερών δεν γίνεται μέσω αλληλεπιδράσεων των β-κλώνων F, αλλά μέσω αλληλεπιδράσεων των β-κλώνων S5 και S6. Στους κλώνους αυτούς βρίσκονται κάποια συντηρημένα κατάλοιπα όπως τα Asn65, Trp72, και Glu75. Οι β-κλώνοι S5 και S6 του κάθε μονομερούς αλληλεπιδρούν άμεσα με το άλλο μονομερές για να δημιουργηθεί η CBS. Το μοτίβο αναδίπλωσης του κάθε μονομερούς είναι καλά συντηρημένο και χαρακτηριστικό για την οικογένεια των γαλεκτινών, ωστόσο το σχήμα και η αρχιτεκτονική του ομοδιμερούς διαφέρει συγκριτικά με τις υπόλοιπες πρωτότυπες γαλεκτίνες (Εικόνα 26) [93]. Υπέρθεση των τρισδιάστατων δομών των μονομερών των γαλεκτινών 1, 3, 8N, 10 και 13 και του ομοδιμερούς της γαλεκτίνης-14 αποδεικνύουν ότι εμφανίζουν παρόμοια αρχιτεκτονική, ωστόσο οι κλώνοι S5' και S6' της γαλεκτίνης-14 του μονομερούς Α είναι από το μονομερές Β. Επιπλέον, ο κλώνος S6 είναι μεγαλύτερος συγκριτικά με τις υπόλοιπες πρωτότυπες γαλεκτίνες (Εικόνα 27) [93]. Επιπροσθέτως, υπάρχουν κάποιες διαφορές στα συντηρημένα αμινοξικά κατάλοιπα της CBS. Στη γαλεκτίνη-14, όπως και στη 13, τα κατάλοιπα 53, 55 και 57 που κατέχουν σημαντικό ρόλο στην πρόσδεση της γαλακτοπυρανόζης μέσω αλληλεπιδράσεων δεσμού υδρογόνου και κατιονικών αλληλεπιδράσεων π, είναι His, Arg και Gln. Στις γαλεκτίνες 1, 3, 8N και 10, τα ισοδύναμα κατάλοιπα είναι Arg, Asn και His. Τέλος, στη γαλεκτίνη-14 τα υπόλοιπα κατάλοιπα Asn65, Trp72, και Glu75 είναι συντηρημένα. Λόγω αυτών των διαφορών, η γαλεκτίνη-14 εμφανίζει χαμηλή συγγένεια ως προς τη λακτόζη. Η κρυσταλλογραφική δομή του συμπλόκου γαλεκτίνης-14-λακτόζης, προσδιορίσθηκε μετά από εμβάπτιση των κρυστάλλων της γαλεκτίνης-14 με υψηλή συγκέντρωση λακτόζης για μεγάλο χρονικό διάστημα [93]. Οι παραπάνω διαφορές τόσο στην αμινοξική αλληλουχία όσο και στην τεταρτοταγή δομή αυτής της πρωτεΐνης, επηρεάζουν τη εξειδίκευση της ως προς τους προσδέτες και κατ' επέκταση τη βιολογική της δράση (Εικόνα 27). Η γαλεκτίνη-14 εκφράζεται στον πλακούντα και η υπερέκφραση της ίσως εμπλέκεται σε επιπλοκές κατά την εγκυμοσύνη. Οι δομικές διαφορές ανάμεσα στις γαλεκτίνες-13 και 14 ενδέχεται να οφείλονται στις διαφορετικές βιολογικές λειτουργίες της κάθε πρωτεΐνης. Επιπλέον, η γαλεκτίνη-14 προσδένεται στο μεταγραφικό παράγοντα c-Rel, και ίσως η βιολογική της δράση σχετίζεται με την ανοσολογική ανοχή του πλακούντα. Επειδή, η έκφραση της γαλεκτίνης-13 και της 14 σχετίζονται με ανωμαλίες κατά τη διάρκεια της κύησης, είναι σημαντικό να βρεθούν οι φυσικοί προσδέτες τους καθώς και οι μηχανισμοί δράσης τους [92, 93].



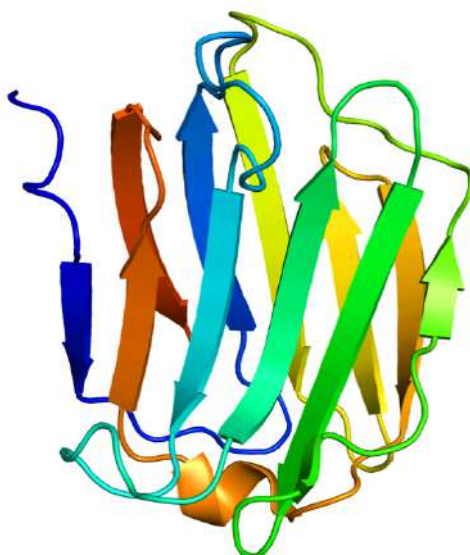
Εικόνα 26: Το ομοδιμερές της γαλεκτίνης-14 (PDB ID: 6K2Z). Το μονομερές A απεικονίζεται σε ροζ και το μονομερές B σε μωβ χρώμα. Τα μόρια της λακτόζης που προσδένονται στην CBS απεικονίζονται σε μπλε χρώμα.



Εικόνα 27: Υπέρθεση της γαλεκτίνης-14 (ομοδιμερές, μονομερές A σε μπλε χρώμα, μονομερές B σε φούξια χρώμα PDB ID: 6K2Z) με τις γαλεκτίνες 1 (καφέ χρώμα PDB ID: 1GZW), 3 (γκρι χρώμα PDB ID: 2NN8), 8N (ροζ χρώμα PDB ID: 5GZD), 10 (κίτρινο χρώμα PDB ID: 5XRH), 13 (πορτοκαλί χρώμα, PDB ID: 5XG7). Με μπλε χρώμα φαίνονται τα μόρια της λακτόζης που προσδένονται στη γαλεκτίνη-14. Η υπέρθεση των τρισδιάστατων δομών των μονομερών των γαλεκτινών 1, 3, 8N, 10 και 13 και του ομοδιμερούς της γαλεκτίνης-14 αποδεικνύουν ότι εμφανίζουν παρόμοια αρχιτεκτονική, ωστόσο οι κλώνοι S5' και S6' της γαλεκτίνης-14 του μονομερούς A είναι από το μονομερές B. Επιπλέον, ο κλώνος S6 είναι μεγαλύτερος συγκριτικά με τις υπόλοιπες πρωτότυπες γαλεκτίνες.

1.5.7 Γαλεκτίνη-16

Η γαλεκτίνη-16 έχει μοριακό βάρος 18 *kDa* και αποτελείται από μια *CRD* (Εικόνα 28). Τα γονίδια των γαλεκτινών 13, 14 και 16 είναι αρκετά συντηρημένα μεταξύ τους σε σχέση με τις υπόλοιπες γαλεκτίνες, και εκφράζονται όπως αναφέρθηκε και παραπάνω στον πλακούντα και πιο συγκεκριμένα στη διεπιφάνεια μεταξύ μητέρας και εμβρύου. Παρόλο που η ομολογία της αμινοξικής τους αλληλουχίας είναι περίπου στο 60%, η τεταρτοταγής τους δομή διαφέρει [94, 95]. Η πρωτεΐνη αυτή κρυσταλλώνεται και δρα ως μονομερές σε αντίθεση με τις γαλεκτίνες 13 και 14 [95]. Το μοτίβο αναδίπλωσης της *CRD* είναι αρκετά καλά συντηρημένο και χαρακτηριστικό της οικογένειας των γαλεκτινών (Εικόνα 28). Ωστόσο, εμφανίζονται σημαντικές διαφορές στα αμινοξικά κατάλοιπα της *CBS*. Όπως και οι γαλεκτίνες 13 και 14, στη γαλεκτίνη 16 τα κατάλοιπα 55 και 57 που κατέχουν σημαντικό ρόλο στην πρόσδεση της γαλακτοπυρανόζης μέσω αλληλεπιδράσεων δεσμού υδρογόνου και κατιονικών αλληλεπιδράσεων π, είναι Arg και Gln ενώ στις γαλεκτίνες 1, 3, 8N και 10, τα ισοδύναμα κατάλοιπα είναι Asn και His. Λόγω αυτών των διαφορών, η γαλεκτίνη-16 εμφανίζει αρκετά χαμηλή συγγένεια για τη λακτόζη παρόμοια με τις γαλεκτίνες 13 και 14. Μετάλλαξη των καταλοίπων αυτών σε ασπαραγίνη και αργινίνη αντίστοιχα, έδειξε ότι μπορεί να προσδεθεί η λακτόζη. Η γαλεκτίνη-16, όπως προαναφέρθηκε, δεν διμερίζεται επομένως παραμένει άγνωστος ο τρόπος πρόσδεσής της στην κυτταρική επιφάνεια [95]. Η έκφραση των γαλεκτινών 13, 14 και 16 είναι σημαντική στον επαναπρογραμματισμό της μεταγραφικής δραστηριότητας των τροφοβλαστών. Συμμετέχει στη διαφοροποίηση και σύντηξη των λαχνών των κυτταροτροφοβλαστών σε ένα πολυκύτταρο συγκύτιο το οποίο βρίσκεται σε άμεση επαφή με το μητρικό αίμα. Το συγκύτιο αυτό, είναι υπεύθυνο για την ανταλλαγή αερίων, θρεπτικών συστατικών και αποβλήτων μεταξύ του εμβρύου και της μητέρας, μεσολαβεί στην ορμονική ρύθμιση και σχηματίζει έναν ανοσοολογικό φραγμό κατά τη διάρκεια της κύησης. Η δυσλειτουργία στην έκφραση αυτών των πρωτεϊνών σχετίζεται με σοβαρές διαταραχές τόσο για τη μητέρα όσο και για το έμβρυο, όπως η προεκλαμψία, [89, 92]. Παρόλο, που το γονίδιο της γαλεκτίνης-16 έχει βρεθεί εδώ και μια δεκαετία, η ρύθμιση και ο μηχανισμός δράσης αυτής της πρωτεΐνης παραμένει άγνωστος. Πολλές βιοπληροφορικές μελέτες έχουν υποδείξει ότι η έκφραση της γαλεκτίνης-16 αλλάζει σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις, όπως η νόσος *Alzheimer*, ο καρκίνος του μαστού και ο διαβήτης τύπου 2. Η γαλεκτίνη-16 θεωρείται αρκετά υποσχόμενος στόχος για τη θεραπεία αρκετών ασθενειών, για αυτό το λόγο θεωρείται αναγκαία η ανακάλυψη των μοριακών της μηχανισμών και των βιολογικών της δράσεων [94, 95].



Εικόνα 28: Η τρισδιάστατη δομή της γαλεκτίνης-16 (PDB ID: 6LJP). Το μοτίβο αναδίπλωσης της CRD είναι καλά συντηρημένο μεταξύ των γαλεκτινών.

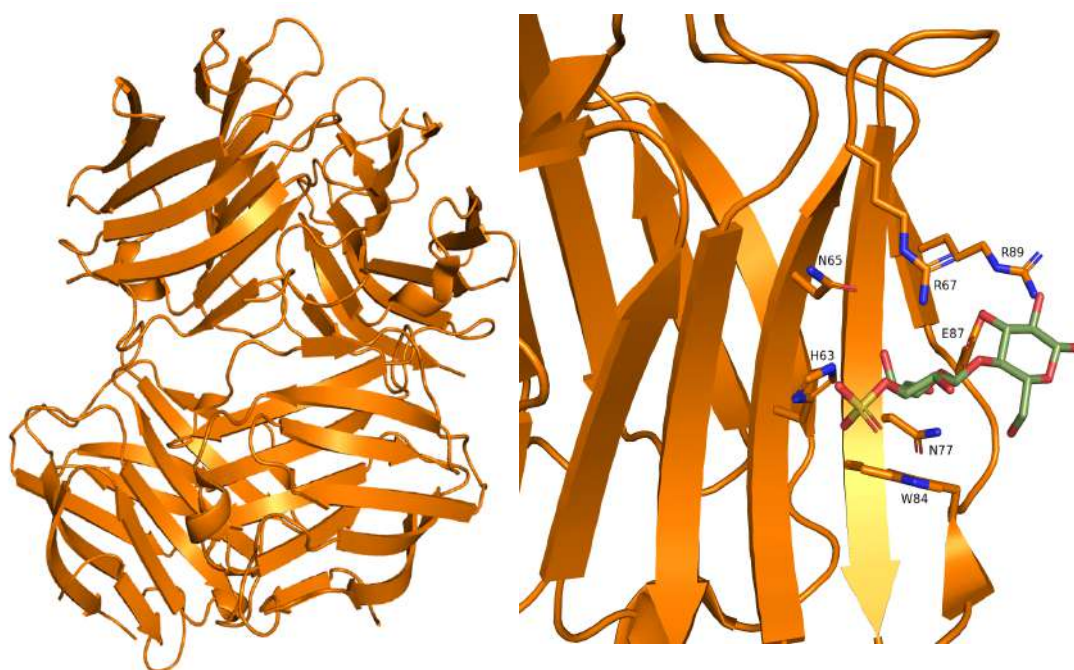
1.6 Γαλεκτίνες επαναλαμβανόμενου τύπου

1.6.1 Γαλεκτίνη-4

Η γαλεκτίνη-4 αποτελείται από δύο CRDs. Το μοριακό της βάρος είναι 36 *kDa* και αποτελείται από 323 αμινοξικά κατάλοιπα. Η *N*-τελική CRD (1-150) και η *C*-τελική CRD (179-323) έχουν μοριακό μέγεθος 16-17 *kDa*. Η ομολογία μεταξύ της *N*-τελικής και *C*-τελικής CRD είναι περίπου στο 40%. Οι δύο CRDs συνδέονται μεταξύ τους μέσω ενός εύκαμπτου πεπτιδίου που αποτελείται από 30 κατάλοιπα, πλούσιο σε προλίνες και γλυκίνες και ευαίσθητο σε πρωτεόλυση [96]. Είναι υπεύθυνο για τις ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των δύο CRDs και σχετίζεται με τη δραστικότητα ως προς την επαγωγή κάποιων συγκεκριμένων βιολογικών αποκρίσεων, μέσω της ορθής τοποθέτησης των CRDs [97].

Η αρχιτεκτονική της γαλεκτίνης-4*N*-CRD είναι καλά συντηρημένη μεταξύ της οικογένειας των γαλεκτινών, καθώς αποτελείται από δύο αντιπαράλληλα β-πτυχωτά φύλλα, *F1-F5* και *S1-S6*, όπου η κοίλη πλευρά σχηματίζει την CBS στην οποία προσδένονται οι υδατάνθρακες. Τα κατάλοιπα των περιοχών *C* και *D* της CBS είναι συντηρημένα, ωστόσο εμφανίζονται διαφορές στα κατάλοιπα των περιοχών *A*, *B* και *E*, οι οποίες αποκαλύπτουν την εξειδίκευση της. Η CBS αποτελείται από τα καλά συντηρημένα αμινοξικά κατάλοιπα *His63*, *Asn65*, *Arg67*, *Asn77*, *Trp84*, *Glu87* και το λιγότερο συντηρημένο *Arg89* (Εικόνα 29). Επιπλέον, η γαλεκτίνη-4*N*-CRD εμφανίζει υψηλή αγγιστεία για θειικούς σακχαρίτες, λόγω της ύπαρξης του μη συντηρημένου καταλοίπου *Arg45* το οποίο αλληλεπιδρά με το θειικό τμήμα του σακχάρου. Επιπρόσθετα, κρυσταλλογραφικά δεδομένα έχουν αποκαλύψει την πρόσδεση κατιόντων ασβεστίου στην CBS της γαλεκτίνης-4*N*-CRD. Παρόλο, που ίσως τα ιόντα ασβεστίου να προέρχονται από το διάλυμα κρυστάλλωσης που περιείχε οξικό ασβέστιο, περαιτέρω μελέτες πρέπει να πραγματοποιηθούν έτσι ώστε να διερευνηθεί εάν η πρόσδεση ιόντων

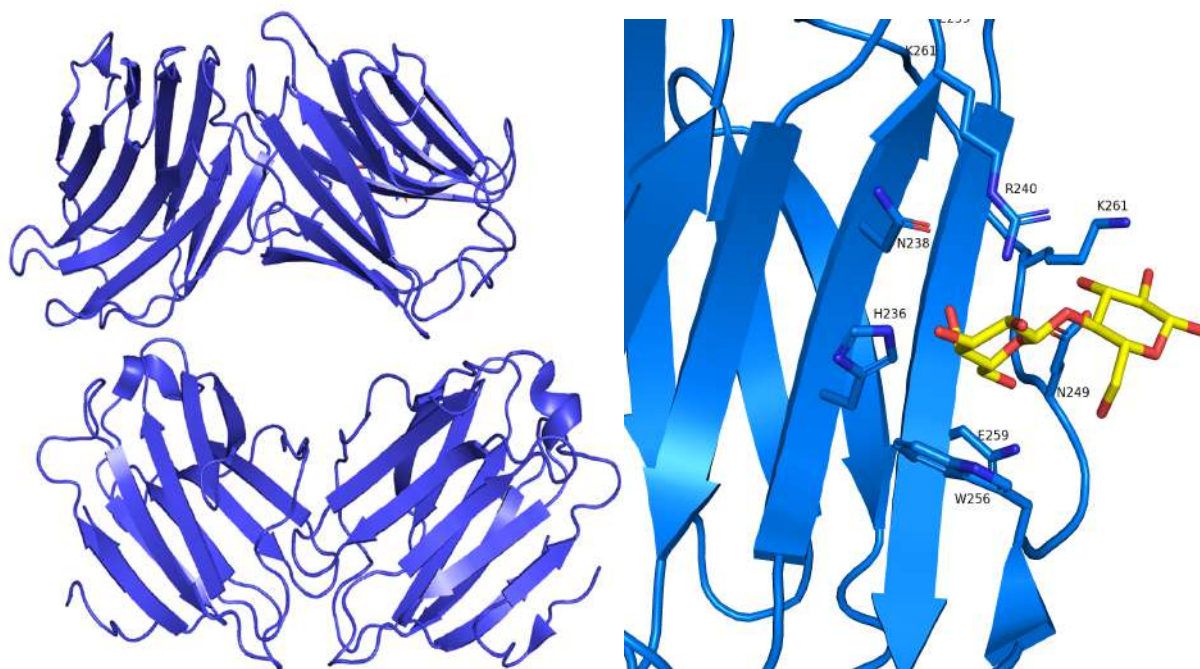
ασβεστίου έχει κάποια βιολογική σημασία. Καθώς η γαλεκτίνη-4 εμπλέκεται στη σταθεροποίηση των λιπιδικών σχεδίων, έρχεται σε επαφή με υψηλές συγκεντρώσεις ιόντων ασβεστίου, τα οποία σταθεροποιούν τους συνδέσμους πρόσδεσης μέσω καδχερινών και η σηματοδότηση μέσω ασβεστίου πραγματοποιείται μέσω καναλιών που βρίσκονται στη λιπιδική σχεδία. Πιθανότατα, η υψηλή συγκέντρωση ασβεστίου θα μπορούσε να προκαλεί τη σταθεροποίηση των κλώνων S4-S5 της CBS της γαλεκτίνης-4 το οποίο θα μπορούσε να οδηγήσει σε περαιτέρω σταθεροποίηση των λιπιδικών σχεδίων και των συνδέσμων πρόσφυσης [98].



Εικόνα 29: Η γαλεκτίνη-4-N (PDB ID: 5DUW) κρυσταλλώνεται ως τετραμέρες, όπως απεικονίζεται στην αριστερή εικόνα. Στη δεξιά εικόνα, απεικονίζεται η δομή του συμπλόκου γαλεκτίνης-4-N-3'-θειικής λακτόζης (πράσινο χρώμα). Τέλος, απεικονίζονται και τα καλά συντηρημένα κατάλοιπα, His63, Asn65, Arg67, Asn77, Trp84, Glu87 και το λιγότερο συντηρημένο Arg89, της CBS.

Η δομή της γαλεκτίνης-4C-CRD είναι καλά συντηρημένη μεταξύ της οικογένειας των γαλεκτινών. Η CBS αποτελείται από τα καλά συντηρημένα κατάλοιπα His236, Asn238, Arg240, Asn249, Trp256, Glu259 και το μη συντηρημένο Lys261 (Εικόνα 30) [99]. Η γαλεκτίνη-4C-CRD, όπως και η -N-CRD, μπορούν να δημιουργήσουν σύμπλοκα με θεικούς σακχαρίτες. Παρόλο που η -C-CRD δεν περιέχει το κατάλοιπο της Arg που περιέχει η N-CRD, η θεική ομάδα αλληλεπιδρά με το συντηρημένο κατάλοιπο Trp256 σταθεροποιώντας το σύμπλοκο [100]. Επιπλέον, εμφανίζονται κάποιες διαφορές στη συγγένεια που εμφανίζουν οι CRDs της γαλεκτίνης-4. Πιο συγκεκριμένα, η -N-CRD εμφανίζει σταθερά πρόσδεσης περίπου 1.3 mM ενώ η -C-CRD 1.9 mM για τη λακτόζη. Η διαφορά αυτή οφείλεται στην παρουσία της Arg89 στη -N-CRD, η οποία αλληλεπιδρά με τα υδροξύλια της λακτόζης, ενώ η C-CRD στην ίδια θέση περιέχει το κατάλοιπο Lys261 το οποίο δεν αλληλεπιδρά με τον ίδιο τρόπο [98, 100]. Τέλος,

η γαλεκτίνη-4C-CRD αναγνωρίζει τα αντιγόνα των ομάδων αίματος A και B πιο ισχυρά από τη N-CRD [98].



Εικόνα 30: Η γαλεκτίνη-4C (PDB ID: 4YMO) κρυσταλλώνεται ως τετραμερές, όπως απεικονίζεται στην αριστερή εικόνα. Στη δεξιά εικόνα, απεικονίζεται η δομή του συμπλόκου γαλεκτίνης-4C-λακτόζης (κίτρινο χρώμα). Τέλος, απεικονίζονται και τα καλά συντηρημένα κατάλοιπα, His236, Asn238, Arg240, Asn249, Trp256, Glu259 και το μη συντηρημένο Lys261, της CBS.

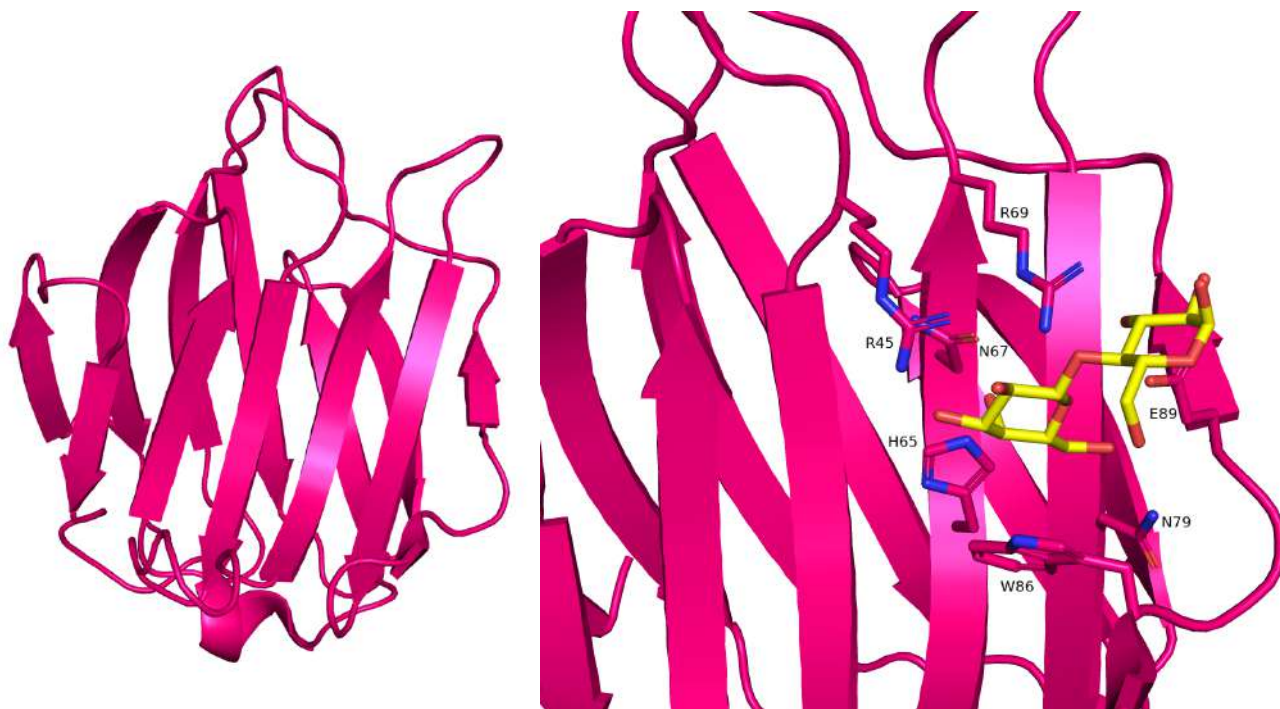
Η γαλεκτίνη-4 εκφράζεται στο γαστρεντερικό σωλήνα, σταθεροποιεί τις λιπιδικές σχεδίες στρατολογώντας τις γλυκοπρωτεΐνες της λιπιδικής σχεδίας στην επιφάνεια των εντεροκυττάρων. Η πρωτεΐνη αυτή σταυροσυνδέει συνδυασμούς σουλφατιδίων, θειωμένης χοληστερόλης, N- και O- γλυκοζυλιωμένων πρωτεϊνών και αντιγονικών ομάδων αίματος μέσω των δύο CRDs της με στόχο τη σταθεροποίηση της λιπιδικής σχεδίας [96]. Επιπλέον, εκφράζεται στα νευρικά κύτταρα, δρώντας ως ρυθμιστής της μυελίνωσης μέσω της αναστολής της ωρίμανσης των ολιγοδενδροκυττάρων, εξαιτίας των αλληλεπιδράσεων της με σουλφατίδια και με τη γλυκοζυλιωμένη αξονική μεμβράνη L1 [101]. Επιπρόσθετα, η γαλεκτίνη-4 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε διάφορους τύπους καρκίνου. Η γαλεκτίνη-4 λειτουργεί ως ογκοκατασταλτικός παράγοντας του ανθρώπινου καρκίνου του παχέος εντέρου και του παγκρέατος, ενώ στον καρκίνο του ήπατος και του πνεύμονα, η έκφρασή της συνδέεται με αυξημένα επίπεδα μετάστασης και εξέλιξης του καρκίνου γεγονός που αναδεικνύει τη γαλεκτίνη-4 ως υποσχόμενο στόχο για την ανάπτυξη φαρμάκων [96–98, 102].

1.6.2 Γαλεκτίνη-8

Η γαλεκτίνη-8 αποτελείται από δύο CRDs που συνδέονται μεταξύ του μέσω ενός πεπτιδίου. Αποτελείται από 317 κατάλοιπα και έχει μοριακό βάρος 38 kDa. Ο πεπτιδικός σύνδεσμος που συνδέει τα δύο CRDs είναι ευαίσθητος στην πρωτεόλυση. Οι δύο CRDs εμφανίζουν ομολογία

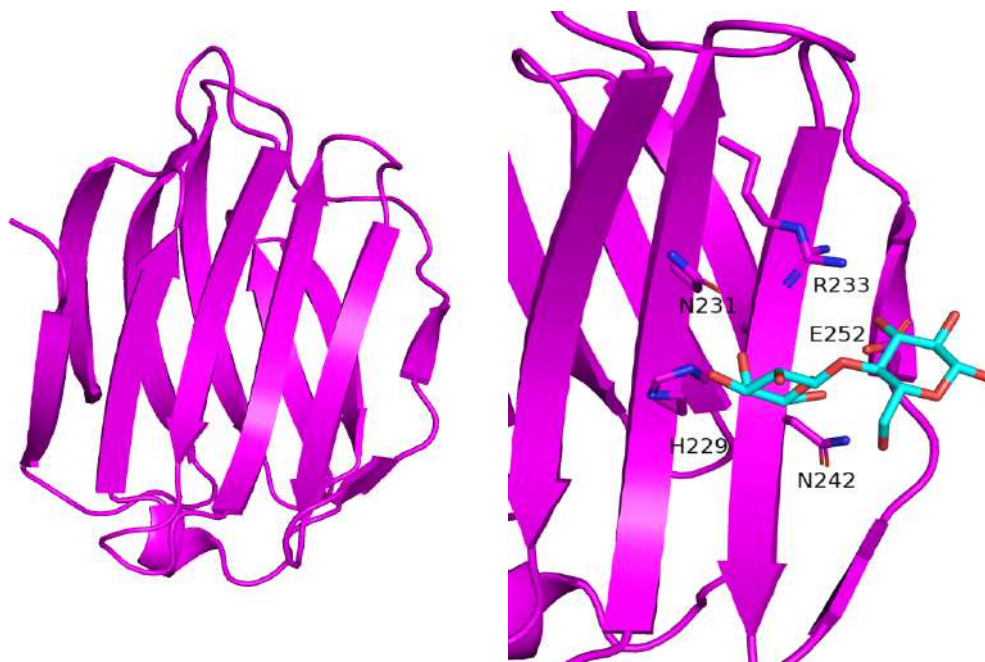
περίπου 40%, ωστόσο εμφανίζουν διαφορές ως προς την εξειδίκευση τους σε γλυκάνες. Η *N-CRD* αναγνωρίζει ένα μεγάλο εύρος γλυκανών, σε σχέση με τη *C-CRD* η οποία εμφανίζει εξειδίκευση ως προς ανιονικά σάκχαρα [103].

Το μοτίβο αναδίπλωσης της *N-CRD* είναι καλά συντηρημένο και αποτελείται από αντιπαράλληλα β-πτυχωτά φύλλα που δομούνται από 6 κλώνους που δημιουργούν την κοίλη πλευρά (*S1-S6*) και 5 κλώνους που δημιουργούν την κυρτή πλευρά (*F1-F5*). Ο τρόπος πρόσδεσης της λακτόζης είναι αρκετά παρόμοιος με τις υπόλοιπες γαλεκτίνες. Ο β-γαλακτοζίτης είναι θαμμένος στην περιοχή πρόσδεσης που δημιουργείται από τους κλώνους *S4-S6*. Τα κατάλοιπα *Arg45*, *His65*, *Asn67*, *Arg69*, *Asn79* και *Glu89* δημιουργούν δεσμούς υδρογόνου με τη λακτόζη. Το καλά συντηρημένο κατάλοιπο *Trp86* δημιουργεί αλληλεπιδράσεις *Van der Waals* με τη γαλακτόζη με παρόμοιο τρόπο με τις υπόλοιπες γαλεκτίνες. Τα κατάλοιπα *Gln47*, *Trp86* και *Arg59* συμμετέχουν σε δεσμούς υδρογόνου μέσω μορίων ύδατος με τη λακτόζη. Το κατάλοιπο της *Arg45* είναι συντηρημένο μόνο στις γαλεκτίνες 8*N*, 3 και 7, ωστόσο οι διαμορφώσεις της πλευρικής της αλυσίδας διαφέρουν σε από τις αντίστοιχες στις γαλεκτίνες-3 και 7. Το κατάλοιπο αυτό βρίσκεται στο βρόχο μεταξύ των β-κλώνων *S3* και *S4* ο οποίος εμφανίζει κάποιες διαφορές με την υπόλοιπη οικογένεια. Πιο συγκεκριμένα, είναι πιο μακρής και πιο κοντά στους υδατανθρακικούς προσδέτες. Η *N-CRD* εμφανίζει συγγένεια ως προς 3-*O*-θειική και 3-*O*-σιαλική λακτόζη, με τα πιο σημαντικά κατάλοιπα να είναι τα *Arg59* και *Gln47*. Η *CBS* της γαλεκτίνης-8*N-CRD* αποτελείται από 3 περιοχές τις *A*, *B* και *C*. Η περιοχή *A* εμπλέκεται στην αναγνώριση της λακτόζης και είναι συντηρημένη. Αποτελείται από έξι κατάλοιπα (*His65*, *Asn67*, *Arg69*, *Asn79*, *Trp86* και *Glu89*), ενώ η ίδια περιοχή στις γαλεκτίνες-1, 2, 3, 4 και 7 αποτελείται από 7-9 κατάλοιπα. Η περιοχή *B* αποτελείται από τα κατάλοιπα *Arg45*, *Gln47* και *Arg59*, και εμπλέκεται στην αναγνώριση υδατανθράκων ή όξινων υποκαταστατών, συμπεριλαμβανομένων της θειικής ομάδας και του σιαλικού οξέος, στο *O3* του μη αναγωγικού άκρου της γαλακτόζης. Το πιο σημαντικό κατάλοιπο είναι η *Arg59* η οποία βρίσκεται στο βρόχο *S3-S4*. Η περιοχή *C* είναι υπεύθυνη για την πρόσδεση μεγαλύτερων ολιγοσακχαριτών. Η περιοχή αυτή αποτελείται από τα κατάλοιπα *Asp49*, *Gln51* και *Tyr141*, όπου το τελευταίο αποτελεί το πιο σημαντικό κατάλοιπο καθώς δημιουργεί αλληλεπιδράσεις *Van der Waals* με τον ολιγοσακχαρίτη (Εικόνα 31) [103, 104].

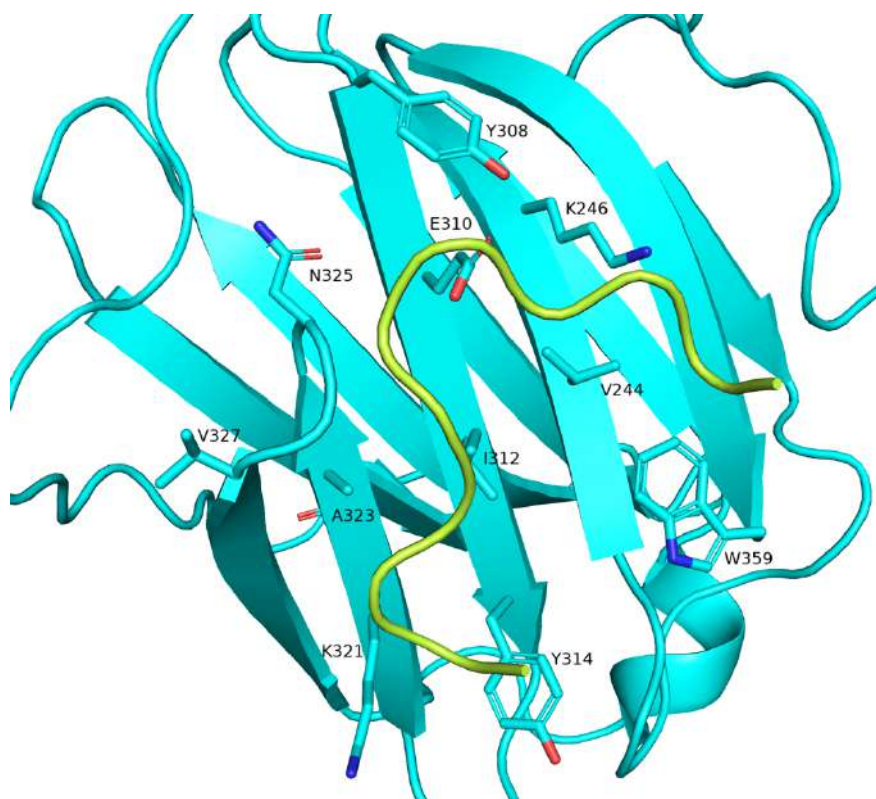


Εικόνα 31: Η γαλεκτίνη-8N (PDB ID: 5TFS) κρυσταλλώνεται ως μονομερές. Στη δεξιά εικόνα, παρουσιάζεται η δομή του συμπλόκου γαλεκτίνης-8-N-λακτόζης, καθώς και τα συντηρημένα κατάλοιπα που είναι υπεύθυνα για την πρόσδεση των β-γαλακτοζιτών, Arg45, His65, Asn67, Arg69, Asn79, Trp86 και Glu89.

Η C-CRD εμφανίζει ίδιο μοτίβο αναδίπλωσης δημιουργώντας μια κοίλη και μια κυρτή πλευρά αποτελούμενη από δύο αντιπαράλληλα β-πτυχωτά φύλλα. Αποτελείται από τα καλά συντηρημένα κατάλοιπα His229, Asn231, Arg233, Asn242, Trp249 και Glu252 (Εικόνα 32). Εμφανίζει συγγένεια ως προς πολυλακτοζαμίνες, αντιγονικές ομάδες αίματος και τον υποδοχέα αυτοφαγίας NDP52. Οι κρυσταλλογραφικές μελέτες της C-CRD είναι σχετικά λιγότερες από αυτές για τη N-CRD. Αποτελέσματα δομικών μελετών της C-CRD με ένα κομμάτι της NDP52 (NDP52₃₇₁₋₃₈₁) έδειξαν ότι προσδένεται στην κυρτή πλευρά, δηλαδή στους β-κλώνους F1-F5. Η NDP52₃₇₁₋₃₈₁ προσδένεται στην περιοχή αυτή μέσω αλληλεπιδράσεων *van der Waals* και δεσμών υδρογόνου με τα κατάλοιπα Val244, Lys246, Tyr308, Glu310, Ile312, Tyr314, Lys321, Val322, Ala323, Asn325, Val328, και Trp359. Η NDP52₃₇₁₋₃₈₁ προσδένεται σαν άγκιστρο στην C-CRD της γαλεκτίνης-8 μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων και δεσμών υδρογόνου. Μεταλλάξεις των παραπάνω καταλοίπων έδειξαν ότι το πλέον σημαντικό για την πρόσδεση είναι το κατάλοιπο Glu310. Μελέτες που πραγματοποιήθηκαν για την εύρεση εάν η NDP52₃₇₁₋₃₈₁ προσδένεται στα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας αποκάλυψαν πως λόγω της έλλειψης των καταλοίπων Ile312 και Ala323 αυτό δεν είναι δυνατό (Εικόνα 33) [105].



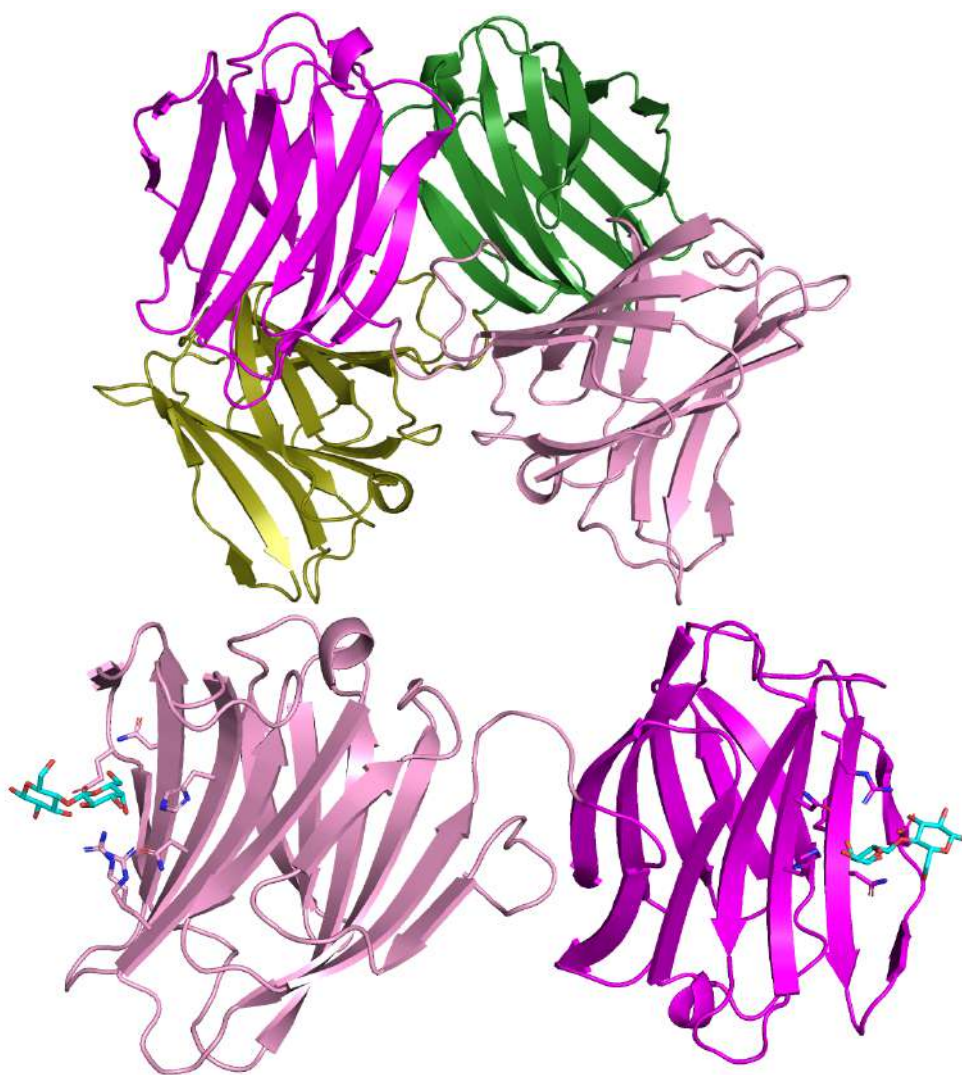
Εικόνα 32: Η δομή της γαλεκτίνης-8C (PDB ID: 4GXL). Στη δεξιά εικόνα, παρουσιάζεται το σύμπλοκο γαλεκτίνης-8C-λακτόζης, καθώς και τα συντηρημένα κατάλοιπα που είναι υπεύθυνα για την πρόσδεση των β-γαλακτοζιτών His229, Asn231, Arg233, Asn242 και Glu252.



Εικόνα 33: Η NDP52₃₇₁₋₃₈₁ (πράσινο χρώμα) προσδένεται στην περιοχή της F1-F5 πλευράς της γαλεκτίνης-8C (μπλε χρώμα) (PDB ID: 4GXL), μέσω αλληλεπιδράσεων Van der Waals και δεσμών υδρογόνου με τα αμινοξικά κατάλοιπα Val244, Lys246, Tyr308, Glu310, Ile312, Tyr314, Lys321, Val322, Ala323, Asn325, Val328, και Trp359.

Η αυτοφαγία ρυθμίζει πολλές κυτταρικές διεργασίες, όπως η αποικοδόμηση πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων, η καταστροφή κατεστραμμένων οργανιδίων και η άμυνα έναντι σε παθογόνους μικροοργανισμούς. Η επιλεκτική αυτοφαγία διαμεσολαβείται μέσω σημάτων που ανιχνεύονται από εξειδικευμένους υποδοχείς. Η επιλεκτική αυτοφαγία των βακτηρίων ξεκινά από τρεις υποδοχείς, τον *NDP52*, την *p62* και την οπτινευρίνη, οι οποίοι ανιχνεύουν τις πολυουβικουιτυλιωμένες πρωτεΐνες των βακτηρίων, οι οποίες ουβικουιτυλιώνονται στο κυτοσόλιο των ανθρώπινων κυττάρων. Ο *NDP52* αποτελείται από μια περιοχή *NDP52*₃₇₁₋₃₈₁ η οποία προσδένεται στη *C-CRD* της γαλεκτίνης-8 και ενισχύει την αυτοφαγία, μέσω *NDP52*, των σωματιδίων που έχουν καταστραφεί λόγω των παθογόνων μικροοργανισμών και παράλληλα σταματάει ο πολλαπλασιασμός των μικροοργανισμών στα ανθρώπινα κύτταρα. Η διαμεσολαβούμενη από τη γαλεκτίνη-8 αυτοφαγία ενεργοποιεί φλεγμονώδη σηματοδότηση, αλλά ο ακριβής τρόπος παραμένει άγνωστος. Το σύμπλοκο της *C-CRD* της γαλεκτίνης-8 με τον *NDP52* παρέχει τη βάση για πειραματικές προσπάθειες επιλεκτικού χειρισμού της σηματοδότησης της γαλεκτίνης-8 προς την αυτοφαγία [105, 106].

Επιπλέον, υπάρχουν δομικές μελέτες ολόκληρης της γαλεκτίνης-8, οι οποίες ενδέχεται να προσφέρουν απαντήσεις για την αναδίπλωσή της. Όπως έχει αναφερθεί οι δυο *CRDs* της γαλεκτίνης-8 συνδέονται από ένα πεπτίδιο που είναι ευαίσθητο σε πρωτεόλυση. Κρυσταλλογραφικές μελέτες μιας μεταλλαγμένης μορφής της γαλεκτίνης-8, όπου το συνδετικό πεπτίδιο είχε αντικατασταθεί από δύο αμινοξικά κατάλοιπα, *His* και *Met*, ώστε να μην μπορεί να πρωτεολυθεί απεκάλυψαν πως οι δύο *CRDs* αναδιπλώνονται σε σχήμα καμπύλης και οι δυο *CBSs* βρίσκονται σχεδόν κάθετα η μια από την άλλη. Η γαλεκτίνη-8 κρυσταλλώνεται ως διμερές μέσω αλληλεπιδράσεων των *F1-F5* β-κλώνων των *C-CRDs*. Δεδομένα σχετικά με τη δημιουργία διμερών ή ολιγομερών δεν υπάρχουν, ωστόσο η δημιουργία διμερών σχετίζεται με τη βιολογική της δράση (Εικόνα 34) [107].



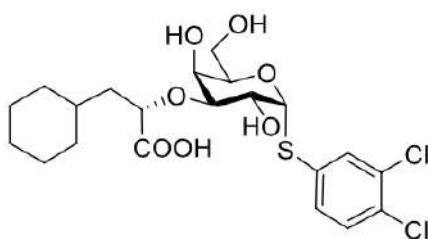
Εικόνα 34: Η επαναλαμβανόμενου τύπου γαλεκτίνη-8 (PDB ID: 3VKL) κρυσταλλώνεται ως διμερές, όπως φαίνεται στην αριστερή εικόνα. Το ένα μονομερές αποτελείται από τη N-CRD με χρυσό χρώμα και τη C-CRD με πράσινο χρώμα, ενώ το άλλο μονομερές με ροζ και μωβ χρώμα, αντίστοιχα. Στην κάτω εικόνα παρουσιάζεται το μονομερές της γαλεκτίνης-8, όπου οι δύο CRDs συνδέονται η μια δίπλα στην άλλη. Επιπλέον, σε κάθε μονομερές παρουσιάζεται η λακτόζη (μπλε χρώμα), η οποία έχει προσδεθεί στις CBSs των N- και C-CRDs και με ράβδους απεικονίζονται τα καλά συντηρημένα κατάλοιπα της κάθε CRD.

Η γαλεκτίνη-8 αρχικά βρέθηκε στον προστάτη και σε καρκινικά κύτταρα του πνεύμονα και αργότερα βρέθηκε να εκφράζεται σε αρκετούς ιστούς και σε καρκινικά κύτταρα [108]. Η γαλεκτίνη-8 δρα στον πυρήνα, στο κυτοσόλιο και στην εξωκυττάρια μήτρα. Ρυθμίζει την διαμεσολαβούμενη από ιντεγκρίνες κυτταρική προσκόλληση και την απόπτωση. Η επαγωγή της προσκόλλησης των ουδετερόφιλων είναι ένα μοναδικό χαρακτηριστικό της γαλεκτίνης-8. Η γαλεκτίνη-8 ρυθμίζει την ομοιόσταση των *T*-κυττάρων και εμπλέκεται στη ρευματοειδή αρθρίτιδα και σε αυτοάνοσα νοσήματα. Περαιτέρω, η γαλεκτίνη-8 αναγνωρίζει επιλεκτικά βακτήρια που εκφράζουν αντιγόνα ομάδων αίματος, ενώ η γαλεκτίνη-8C έχει αποδειχθεί ότι στρατολογεί επιλεκτικά τον *NDP52* για την καταπολέμηση των παθογόνων [103]. Ενδοκυτταρικά η γαλεκτίνη-8 δημιουργεί αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών αλλά προσδένεται και σε γλυκάνες της κυτταρικής μεμβράνης με εξειδίκευση για θειογλυκάνες και παράγωγα σιαλικού οξέος. Η παρουσία θειικών ομάδων ή ομάδων σιαλικού οξέος στις γλυκάνες προσθέτει αρνητικά φορτισμένα χαρακτηριστικά στην κυτταρική επιφάνεια και

είναι σημαντική για τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ κυττάρων ή μεταξύ κυττάρων και μήτρας. Τα μόρια σιαλικού οξέος στα μη αναγωγικά άκρα των γλυκοπρωτεϊνών και των γλυκολιπιδίων κατανέμονται σε όλα τα σπονδυλωτά, τους ιούς, τα βακτήρια, τα φυτά και άλλα ασπόνδυλα και έχουν σημαντικό ρόλο στις διάφορες βιολογικές λειτουργίες αυτών των γλυκανών. Αρκετοί ιοί προσδένονται σε ένα κύτταρο μέσω αλληλεπιδράσεων μεταξύ της γλυκοπρωτεΐνης αιμοσυγκολλητίνη και του σιαλικού οξέος στην επιφάνεια των επιθηλιακών κυττάρων στον πνεύμονα και το λαιμό. Επιπλέον, τα θειικά γλυκοσφιγγολιπίδια δρουν ως υποδοχείς για πολλές τοξίνες. Αρκετά αντιικά φάρμακα αποτελούν ισχυρούς αναστολείς της νευραμινιδάσης, του ενζύμου που διασπά τα σιαλικά οξέα ανοίγοντας την κυτταρική μεμβράνη για την έξοδο των ιών όπως η οσελταμιβίρη (*Tamiflu*). Μια εναλλακτική προσέγγιση μπορεί να αποτελέσει η γαλεκτίνη-8N χρησιμοποιώντας τις πληροφορίες της κρυσταλλικής δομής του συμπλόκου γαλεκτίνης-8N-σιαλικού οξέος [104].

1.6.2.1 Γαλεκτίνη-8 και θεραπευτικοί στόχοι

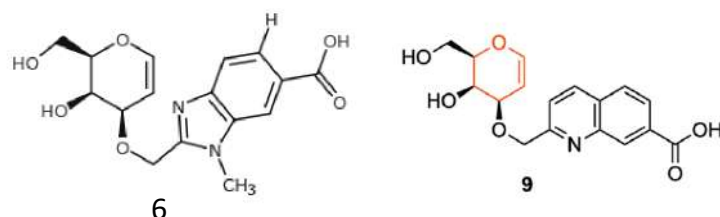
Μέχρι σήμερα υπάρχει μικρός αριθμός μελετών για την ανάπτυξη ανταγωνιστών που θα προσδένονται στη N- ή C-CRD της γαλεκτίνης-8. Ανάλογα της ένωσης 3-O-(1-καρβοξυεθυλ)-β-D-γαλακτοπυρανοσίδης, με χημικές τροποποιήσεις στις θέσεις -1 και -3 της γαλακτόζης, οδήγησαν στην ανακάλυψη ενός ανταγωνιστή, με K_D 12 μM . Η συγκεκριμένη ένωση (Εικόνα 35) εμφανίζει υψηλή συγγένεια ως προς τη N-CRD της γαλεκτίνης-8 και λιγότερη ως προς τις υπόλοιπες γαλεκτίνες. Πιο συγκεκριμένα, ο ανταγωνιστής προσδένεται μέσω ενός δικτύου δεσμών υδρογόνου της γαλακτόζης με τα καλά συντηρημένα κατάλοιπα Arg45, His65, Asn79 και Glu89 ενώ η καρβοξυλική ομάδα δημιουργεί μια γέφυρα άλατος με το κατάλοιπο Arg59. Η χαμηλή τιμή της K_D οφείλεται στη δημιουργία δεσμού αλογόνου του χλωρίου με την καρβονυλομάδα της Gly87. Η ένωση αυτή δεν εμφάνισε σημαντική συγγένεια για τη C-CRD της γαλεκτίνης-8 ή για τις γαλεκτίνες 1, 3, 9N και 9C [109].



Εικόνα 35: Η χημική δομή της 3-O-(1-καρβοξυεθυλ)-β-D-γαλακτοπυρανοσίδης που προσδένεται ισχυρά στη N-CRD της γαλεκτίνης-8 [109].

Μελέτες με παράγωγα της D-γαλακτάλης, με υποκαταστάτες βενζιμιδαζολίου και μεθυλοκινονυλίου στη θέση 3 της γαλακτόζης, οδήγησαν στην ανακάλυψη δύο άλλων ανταγωνιστών (Εικόνα 36), με K_D 48 μM . Τα συγκεκριμένα παράγωγα εμφανίζουν υψηλή συγγένεια ως προς τη N-CRD της γαλεκτίνης-8 και λιγότερη ως προς τις υπόλοιπες γαλεκτίνες. Πιο συγκεκριμένα, η **6** προσδένεται μέσω ενός δικτύου δεσμών υδρογόνου μέσω της γαλακτόζης με τα καλά συντηρημένα κατάλοιπα Arg45, His65, Arg69 και Glu89. Το

βενζιμιδαζόλιο της **6** δημιουργεί κατιονική αλληλεπίδραση π με την *Arg45*, ενώ το άζωτο του βενζιμιδαζολίου δημιουργεί αλληλεπίδραση διπόλου-διπόλου με τα *Gln47* και *Arg59*. Επιπλέον, η καρβοξυλική ομάδα του βενζιμιδαζολίου δημιουργεί δεσμό υδρογόνου μέσω μορίων ύδατος με τη *Gly142*. Όσον αφορά την πρόσδεση της **9**, η κινολίνη αλληλεπιδρά με την *Arg45* και η καρβοξυλική ομάδα δημιουργεί δεσμό υδρογόνου μέσω μορίων ύδατος με τα *Gln47* και *Arg45*. Η *C-CRD* της γαλεκτίνης-8 δεν εμφάνισε συγγένεια έναντι της συγκεκριμένης ένωσης, ενώ εμφάνισε υψηλές K_D για τις γαλεκτίνες 1, 3, 4*N*, 4*C* 7, 9*N* και 9*C* [110].



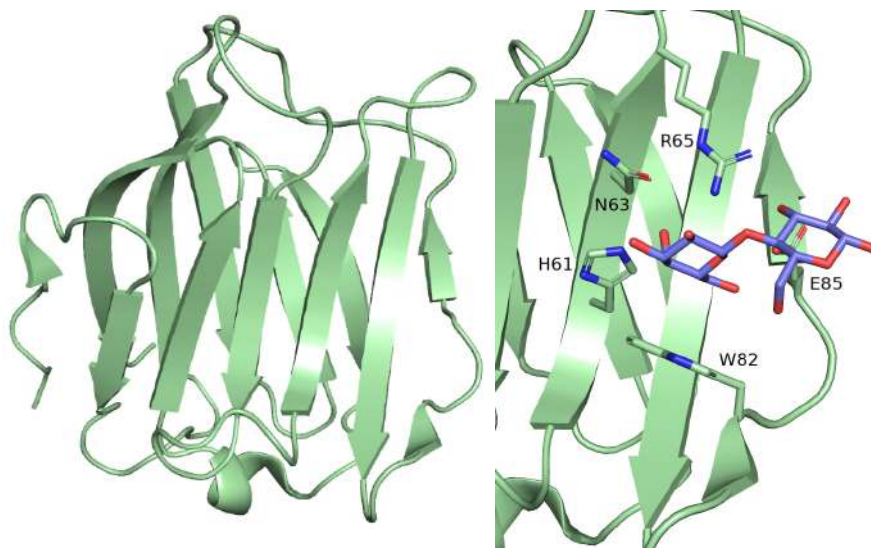
Εικόνα 36: Ανάλογα της D-γαλακτάλης, με χημικές τροποποιήσεις στη θέση -3 της γαλακτόζης με υποκαταστάτες βενζιμιδαζολίου και μεθυλοκινονυλίου που προσδένονται ισχυρά στην *N-CRD* της γαλεκτίνης-8 [110].

Αυτές οι ενώσεις μπορεί να χρησιμοποιηθούν ως βάση για την ανάπτυξη νέων ανταγωνιστών που θα εμφανίζουν εξειδίκευση ως προς τη γαλεκτίνη-8*N* και ίσως παράσχει μια νέα προοπτική στη θεραπευτική προσέγγιση ασθενειών [109, 110].

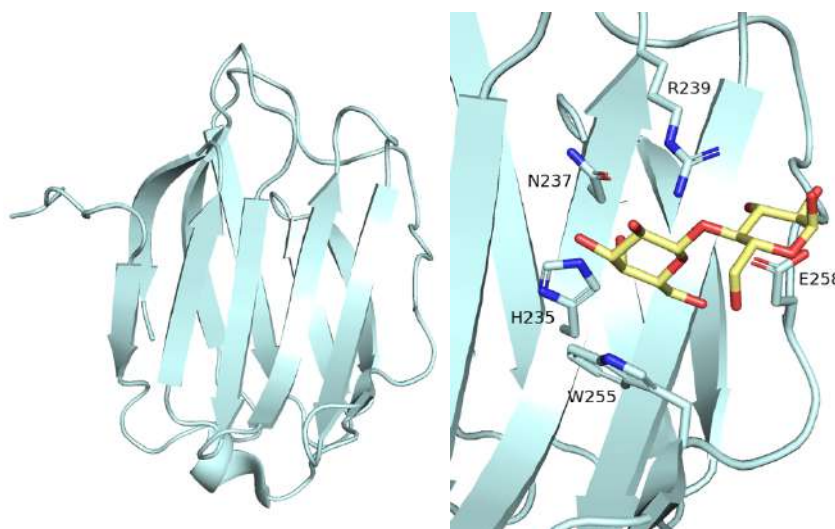
1.6.3 Γαλεκτίνη-9

Η γαλεκτίνη-9 αποτελείται από δύο εξελικτικά συντηρημένες *CRDs*. Το συνολικό μοριακό της βάρος είναι 34-39 *kDa* και αποτελείται από 355 κατάλοιπα. Η *N*-τελική *CRD* αποτελείται από 148 αμινοξέα και η *C*-τελική *CRD* από 149. Οι δύο *CRDs* συνδέονται μεταξύ τους μέσω ενός εύκαμπτου πεπτιδίου 14-56 καταλοίπων. Ο πεπτιδικός συνδέτης είναι υπεύθυνος για τη δημιουργία πολυμερών επιτρέποντας την περιστροφή των *CRDs*, παρέχοντας στη γαλεκτίνη-9 σημαντική βιολογική αξία. Επιπλέον, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη σωστή τοποθέτηση των *CRDs*, στην ένθεσή της στη μεμβράνη και στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών. Τέλος, ο συνδέτης περιέχει θέσεις πρόσδεσης μεταλλοπρωτεασών, θρομβίνης και ελαστάσης και είναι ευαίσθητος σε πρωτεόλυση [111]. Το μοτίβο αναδίπλωσης της γαλεκτίνης-9*N-CRD* (Εικόνα 37) και της *C-CRD* (Εικόνα 38) είναι καλά συντηρημένο, αποτελούμενο από 5 (*F1-F5*) β-κλώνους και 6 (*S1-S6*) β κλώνους. Τα υψηλά συντηρημένα κατάλοιπα *Arg*, *Glu*, *His*, *Asn* και *Trp* υπάρχουν στις *CBSs* των *CRDs* της γαλεκτίνης-9. Η *Arg* και το *Glu* είναι υπεύθυνα για την αναγνώριση των υδατανθράκων, η *Asn* και η *His* διευκολύνουν τη σωστή τοποθέτηση της *CRD* ως προς τον υδατάνθρακα και η *Trp* δημιουργεί αλληλεπιδράσεις π-επιστοίβαξης με το δακτύλιο της γαλακτοπυρανόζης διευκολύνοντας το σχηματισμό δεσμών υδρογόνου με τα -OH του β-γαλακτοζίτη. Οι δύο *CRDs* της γαλεκτίνης-9 εμφανίζουν διαφορετική συγγένεια έναντι σακχαριτών, επιτρέποντάς της να σχηματίζει

πολυσθενή πλέγματα με τις γλυκάνες της κυτταρικής επιφάνειας [111, 112]. Η γαλεκτίνη-9N-CRD εμφανίζει υψηλότερη συγγένεια ως προς τις ολιγο-λακτοζαμίνες και τα γλυκολιπίδια, τον πολυσακχαρίτη *Forssman* και τους Α-εξασακχαρίτες σε σχέση με τη γαλεκτίνη-9C-CRD, αλλά εμφανίζει παρόμοια ειδικότητα ως προς τους διακλαδισμένους ολιγοσακχαρίτες. Επιπλέον, η γαλεκτίνη-9 εμφανίζει υψηλή συγγένεια ως προς σιαλιωμένους ολιγοσακχαρίτες [113].

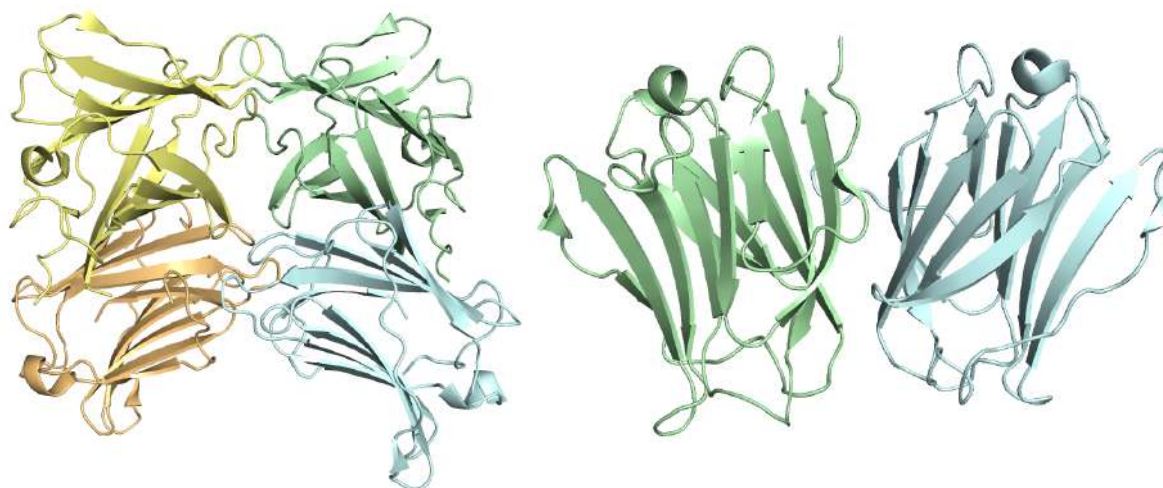


Εικόνα 37: Η γαλεκτίνη-9N (PDB ID: 2DXK) κρυσταλλώνεται ως μονομερές, όπως απεικονίζεται στην αριστερή εικόνα. Στη δεξιά εικόνα, απεικονίζεται το σύμπλοκο γαλεκτίνης-4N-λακτόζης καθώς και τα καλά συντηρημένα κατάλοιπα, His61, Asn63, Arg65, Trp82, Glu85, της CBS.



Εικόνα 38: Η γαλεκτίνη-9C (PDB ID: 3NV1) κρυσταλλώνεται ως μονομερές, όπως απεικονίζεται στην αριστερή εικόνα. Στη δεξιά εικόνα, απεικονίζεται η δομή του συμπλόκου γαλεκτίνης-4C-λακτόζης και τα καλά συντηρημένα κατάλοιπα, His235, Asn237, Arg239, Trp255, Glu258, της CBS.

Κρυσταλλογραφικές μελέτες της γαλεκτίνης-9, όπου ο πεπτιδικός συνδέτης αποτελείται μόνο από 8 αμινοξικά κατάλοιπα μεταλλαγμένος με τέτοιο τρόπο ώστε να μην είναι ευαίσθητος στην πρωτεόλυση, έδειξαν ότι οι δύο CRDs αλληλεπιδρούν μεταξύ τους μέσω πέντε δεσμών υδρογόνου και υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων μεταξύ των καταλοίπων της κυρτής πλευράς. Λόγω αυτού του προσανατολισμού (*back to back*), οι δύο CBS βρίσκονται στα δύο άκρα του μορίου, η μία απέναντι από την άλλη (Εικόνα 39) [114].



Εικόνα 39: Η επαναλαμβανόμενου τύπου γαλεκτίνη-9 (PDB ID: 3WV6) κρυσταλλώνεται ως διμερές, όπως φαίνεται στην αριστερή εικόνα. Το ένα μονομερές αποτελείται από τη N-CRD με κίτρινο χρώμα και τη C-CRD με πορτοκαλί χρώμα, ενώ το άλλο μονομερές με πράσινο και μπλε χρώμα, αντίστοιχα. Στη δεξιά εικόνα απεικονίζεται το μονομερές της γαλεκτίνης-9, όπου οι δύο CRDs συνδέονται μεταξύ τους.

Η γαλεκτίνη-9 εκφράζεται στους περισσότερους ιστούς και εντοπίζεται σε πολλά κυτταρικά διαμερίσματα όπως στον πυρήνα, στην κυτταρική μεμβράνη και στην εξωκυττάρια μήτρα. Εμπλέκεται σε πολλές φυσιολογικές λειτουργίες, όπως η κυτταρική ανάπτυξη, η κυτταρική προσκόλληση και η διαφοροποίηση [111]. Επιπλέον, μεσολαβεί στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ ξενιστή και παθογόνου κατά τη διάρκεια μικροβιακών λοιμώξεων. Υπερέκφραση της γαλεκτίνης-9 εμφανίζεται σε διάφορους τύπους καρκίνου και σε άλλες ασθένειες όπως η ενδομητρίωση και ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2 [111, 115]. Η μελέτη των μεταβολών στα επίπεδα της γαλεκτίνης-9 και η χρήση της ως βιοδείκτης θα αποτελέσει σημαντικό εργαλείο για την παρακολούθηση σοβαρών ασθενειών. Επιπλέον, αποτελεί στόχο η εύρεση νέων ανταγωνιστών που θα προσδένονται ειδικά στη γαλεκτίνη-9. Οι νέες αυτές ενώσεις μπορεί να αποτελούν νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις με στόχο τη μείωση των επιπέδων της γαλεκτίνης-9 και τη βελτίωση των κλινικών αποτελεσμάτων σε ιογενείς λοιμώξεις, σε αυτοάνοσα νοσήματα και στον καρκίνο [111, 115]

1.6.4 Γαλεκτίνη-12

Η γαλεκτίνη-12 έχει δύο CRDs, αποτελείται από 336 κατάλοιπα και έχει μοριακό βάρος 38 kDa. Η δομή της γαλεκτίνης αυτή δεν είναι γνωστή. Η αμινοξική της αλληλουχία εμφανίζει

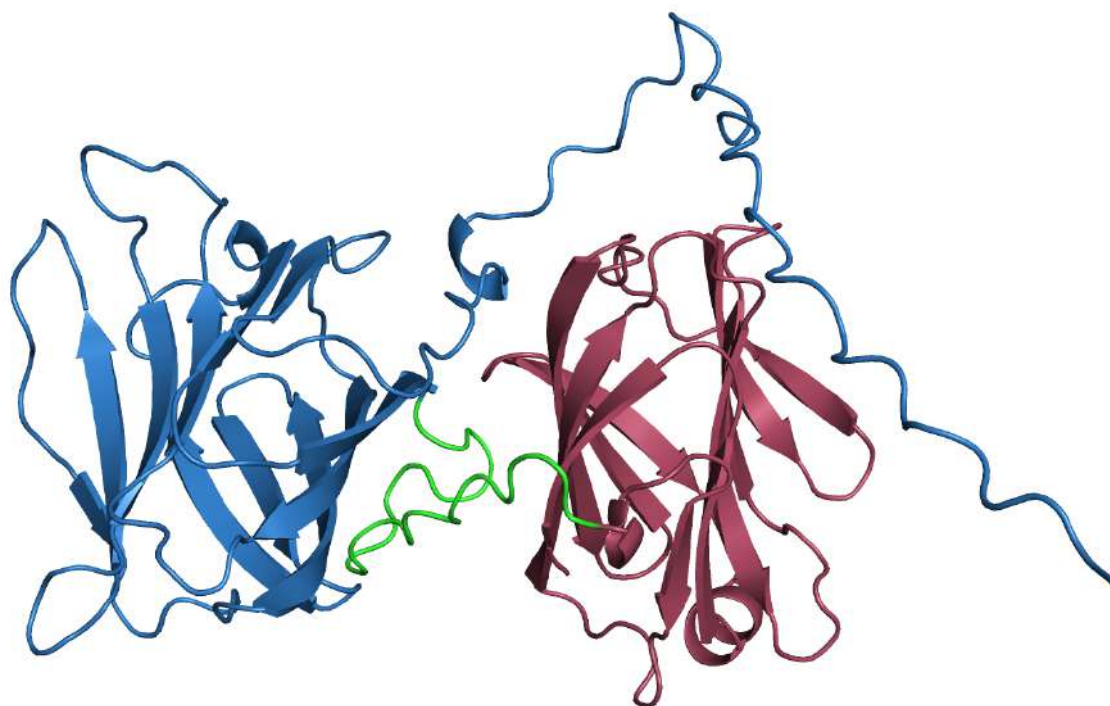
διαφορές σε σχέση με τις υπόλοιπες πρωτεΐνες της οικογένειας των γαλεκτινών. Η *N-CRD* της εμφανίζει ομολογία περίπου 38% με την υπόλοιπη οικογένεια, ενώ η *C-CRD* περίπου 30%. Η *N-CRD* αποτελείται από τα συντηρημένα κατάλοιπα της *CBS*, τα οποία είναι υπεύθυνα για την πρόσδεση β-γαλακτοζιτών. Αντίθετα, η *C-CRD* της γαλεκτίνης-12 δεν εμφανίζει παρόμοια συντήρηση, εκτός από την *Trp257*. Η γαλεκτίνη-12 εμφανίζει πολύ χαμηλή συγγένεια για τη λακτόζη, γεγονός που αποδίδεται στη συγγένεια που εμφανίζει μόνο η *N-CRD* και όχι η *C-CRD* (Εικόνα 40). Συγκριτικά με τις υπόλοιπες γαλεκτίνες, η *C-CRD* είναι αρκετά υδρόφοβη, κάτι που εξηγείται από το γεγονός ότι εκφράζεται κυρίως στο λιπώδη ιστό [116, 117].

Η γαλεκτίνη-12 εκφράζεται στα λιποσώματα (σταγονίδια λιπιδίων, *lipid droplets*, *LDs*) υπό φυσιολογικές συνθήκες [42]. Τα *LDs* βρίσκονται κυρίως στα λιποκύτταρα και αποτελούν κύριο μέσο αποθήκευσης και καταβολισμού της ενέργειας, διαδικασίες που ρυθμίζονται από ορμόνες και πολλά μεταβολικά σηματοδοτικά μονοπάτια. Έχειδειχθεί πως η γαλεκτίνη-12 δρα ως ρυθμιστής της λιπόλυσης μέσω ρύθμισης της σηματοδότησης της λιπολυτικής πρωτεϊνικής κινάσης *A* (*PKA*) [42, 117]. Μέσω αυτής της σηματοδότησης το σήμα κατευθύνεται σε συγκεκριμένες κυτταρικές περιοχές, όπου κάποια από τα υποστρώματα φωσφορυλιώνονται και ενεργοποιούνται ή αδρανοποιούνται. Η γαλεκτίνη-12 εντοπίζεται στη λιπολυτική σηματοδότηση δρώντας ως πρωτεΐνη ικρίωμα που αλληλεπιδρά με συγκεκριμένα μόρια της σηματοδότησης [41, 118].

Τα λιποκύτταρα στα οποία δεν εκφράζεται η γαλεκτίνη-12 παρουσιάζουν αυξημένη μιτοχονδριακή αναπνοή. Αν και αυτό μπορεί να εξηγηθεί από την αυξημένη διαθεσιμότητα λιπαρών οξέων στα μιτοχόνδρια ως αποτέλεσμα της αυξημένης λιπόλυσης σε αυτά τα κύτταρα, δεν μπορεί να αποκλειστεί ένας πιο άμεσος ρόλος της γαλεκτίνης-12 στη μιτοχονδριακή δραστηριότητα [41, 117]. Ορισμένα μιτοχόνδρια βρίσκονται σε στενή σύνδεση με λιποσταγονίδια στα λιποκύτταρα και θα μπορούσε να υπάρχει ανταλλαγή επιφανειακών υλικών μεταξύ των δύο οργανιδίων. Η γαλεκτίνη-12 στη διεπιφάνεια των δύο οργανιδίων θα μπορούσε επίσης να ρυθμίζει τις τοπικές λιπιδικές ροές λιπαρών οξέων από τα λιπιδικά σταγονίδια προς τα μιτοχόνδρια για οξείδωση. Σε κάθε περίπτωση, η αυξημένη οξείδωση των λιπαρών οξέων και η μιτοχονδριακή αναπνοή εν όψει της ενισχυμένης λιπόλυσης μπορεί να συμβάλλει στη μεγαλύτερη ενεργειακή δαπάνη στους οργανισμούς που δεν εκφράζουν τη γαλεκτίνη-12. Ο συνδυασμός αυτών των παραγόντων μειώνει το λιπώδη ιστό και αποτρέπει την αύξηση των επιπέδων λιπαρών οξέων στην κυκλοφορία, περιορίζει την εναπόθεση λιπιδίων στους ευαίσθητους στην ινσουλίνη ιστούς, με αποτέλεσμα τη βελτίωση της ευαισθησίας στην ινσουλίνη. Θα πρέπει ωστόσο να σημειωθεί ότι η φυσιολογική ποσότητα λιπώδους ιστού είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της ενεργειακής ομοιόστασης και γενετικοί χειρισμοί που μειώνουν την ικανότητα αποθήκευσης λίπους στον ιστό αυτό συχνά οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα λιπαρών οξέων στην κυκλοφορία, έκτοπη εναπόθεση λιπιδίων στους μυς και το ήπαρ και μειωμένη ευαισθησία στην ινσουλίνη [118]. Επιπλέον, τα λευκοκύτταρα συσσωρεύουν λιπιδικά σταγονίδια σε φλεγμονώδεις καταστάσεις. Εκτός από τον γνωστό ρόλο τους ως τόπος αποθήκευσης λιπιδίων, τα λιπιδικά σταγονίδια περιέχουν επίσης πολλά σηματοδοτικά μόρια που ρυθμίζουν όχι μόνο τον ενεργειακό μεταβολισμό, αλλά και πολλές άλλες κυτταρικές διεργασίες [41, 42]. Ωστόσο, ο

ακριβής ρόλος της γαλεκτίνης-12 στην ανοσολογική απόκριση παραμένει άγνωστος. Επιπρόσθετα, οι περισσότερες γαλεκτίνες δημιουργούν σύμπλοκα με γλυκάνες. Ωστόσο, δεν έχουν βρεθεί ακόμα μόρια τα οποία εμφανίζουν συγγένεια με τη γαλεκτίνη-12. Η πρόσδεση αυτών ίσως επηρεάζει την πρόσδεσή της σε άλλα μόρια της μεταβολικής οδού. Οι μεταβολές της διατροφικής κατάστασης έχουν ως αποτέλεσμα αλλαγές στα επίπεδα των ενδιάμεσων προϊόντων, τα οποία λειτουργούν ως αλλοστερικοί τροποποιητές των ενζύμων των μεταβολικών σηματοδοτικών μονοπατιών, με στόχο τη μεταβολική ομοιόσταση. Ίσως η δράση της γαλεκτίνης-12 να ρυθμίζεται με παρόμοιο τρόπο. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η *C-CRD* της γαλεκτίνης-12, δεν περιέχει τα συντηρημένα κατάλοιπα της *CBS* των γαλεκτινών, και ίσως δημιουργεί σύμπλοκα με άλλα μη υδατανθρακικά μόρια. Η εύρεση αυτών των ειδικών προς τη γαλεκτίνη-12 μόρια θα δώσει απαντήσεις ως προς τη βιολογική της δράση [118].

Παρόλο, που η δράση της στα λιποκύτταρα είναι καλά μελετημένη, άγνωστη είναι η δράση της σε άλλους κυτταρικούς τύπους. Περαιτέρω μελέτες, κυρίως δομικές (Εικόνα 40), για την εύρεση μορίων που προσδένονται σε αυτή θα βοηθήσουν στην κατανόηση του τρόπου ρύθμισης της κυτταρικής ομοιόστασης καθώς και στην κατανόηση των βιολογικών της ρόλων. Τέλος, η γαλεκτίνη-12 θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως θεραπευτικός στόχος για τη θεραπεία μεταβολικών διαταραχών που σχετίζονται με την παχυσαρκία και το σακχαρώδη διαβήτη τύπου-2 [119].



Εικόνα 40: Η επαναλαμβανόμενου τύπου γαλεκτίνη-12 (Uniprot ID: Q96DT0). Δεν υπάρχουν δεδομένα ως προς την τρισδιάστατη δομή της. η εικόνα αυτή δημιουργήθηκε μέσω του διακομιστή AlphaFold [120].

1.7 Γαλεκτίνες χιμαιρικού τύπου

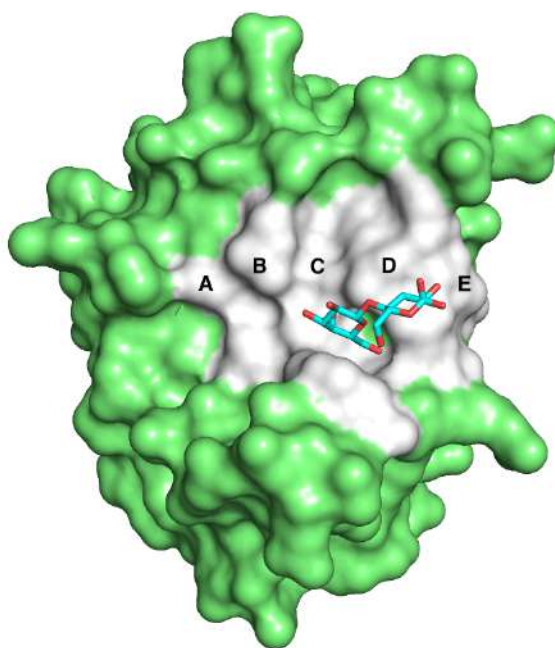
1.7.1 Γαλεκτίνη-3

Η γαλεκτίνη-3 αποτελεί τη μοναδική πρωτεΐνη της οικογένειας που ανήκει στις χιμαιρικού τύπου γαλεκτίνες. Η πρωτεΐνη αυτή, όπως και η πρωτότυπη γαλεκτίνη-1, αποτελούν τις πιο καλά μελετημένες πρωτεΐνες της οικογένειας των γαλεκτινών. Εμπλέκεται σε πολλές παθοφυσιολογικές διαδικασίες και εκφράζεται σε πολλούς κυτταρικούς τύπους και ιστούς, που θα αναλυθούν παρακάτω. Επιπλέον, εκφράζεται σε πολλά είδη, τόσο στα σπονδυλωτά όσο και στα θηλαστικά και εμφανίζει υψηλή ομολογία μεταξύ των ειδών, γεγονός που την καθιστά αρκετά σημαντική εξελικτικά πρωτεΐνη.

Η γαλεκτίνη-3 έχει μοριακό βάρος 35 *kDa*. Αποτελείται από δύο επικράτειες, την *N*-επικράτεια (*N-Terminal Domain*, *ND*) μη χαρακτηριστική της οικογένειας των γαλεκτινών και την *C*-επικράτεια, η οποία αποτελεί την *CRD*. Η *ND* έχει μέγεθος 110-130 κατάλοιπων και αποτελείται από ομόλογες επαναλήψεις *Pro-Gly-Ala-Tyr-Pro-Gly*, ακολουθούμενη από τρία πρόσθετα κατάλοιπα. Εμφανίζει υψηλή ομολογία μεταξύ των ειδών. Επιπλέον, εμφανίζει ομολογία περίπου 33% με το κολλαγόνο της αλυσίδας α1 (*II*) του χόνδρου και περίπου 29% με ορισμένα σύμπλοκα ετερογενών πυρηνικών ριβονουκλεοπρωτεϊνών (*hnRNP*). Η *ND* δεν εμφανίζει συγγένεια ως προς μόρια υδατανθράκων, ωστόσο είναι απαραίτητη για τη βιολογική δράση της γαλεκτίνης-3. Πιο συγκεκριμένα, το κατάλοιπο της, *Tyr102*, συμβάλει μαζί με τα κατάλοιπα της *CRD* στην πρόσδεση υδατανθράκων και είναι υπεύθυνο για τη δημιουργία πολυμερών, καθώς η γαλεκτίνη-3 είναι η μοναδική πρωτεΐνη της οικογένειας που δημιουργεί πενταμερή [121]. Επιπρόσθετα, τα πρώτα 11 κατάλοιπα της *ND*, τα οποία προηγούνται από τις επαναλαμβανόμενες περιοχές, είναι υπεύθυνα για την έκκριση της γαλεκτίνης-3 εμφανίζοντας υψηλή συντήρηση σε όλα τα είδη. Πιο συγκεκριμένα, η γαλεκτίνη-3 συντίθεται στα ελεύθερα ριβοσώματα του κυτοσολίου και δεν περιέχει κάποια αλληλουχία για τη μεταφορά της στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Η αλληλουχία της *ND*, *Tyr-Pro-Ser-Ala-Pro-Gly-Ala-Tyr*, είναι υπεύθυνη για την εξωκύττωση της γαλεκτίνης-3 και τη δράση της στην εξωκυττάρια μήτρα [121, 122]. Το κατάλοιπο *Ser6* είναι υπεύθυνο για την αντι-αποπτωτική δράση της γαλεκτίνης-3, καθώς η φωσφορυλίωση του καταλοίπου αυτού λειτουργεί ως διακόπτης για την πρόσδεσή της και κατ' επέκταση για τη βιολογική της δράση [38, 123]. Επιπλέον, η φωσφορυλίωση της *Ser6* είναι υπεύθυνη για τη μεταφορά της από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα και ρυθμίζει την πρόσδεσή της σε μόρια. Πιο συγκεκριμένα, οδηγεί στη μείωση της συγγένειας πρόσδεσης, όμως η ικανότητα δημιουργίας συμπλόκων επανέρχεται μέσω της αποφωσφορυλίωσης της *Ser6* [124]. Έχει αναφερθεί ότι η κίνηση της συνθάσης του γλυκογόνου 3β (*Glycogen Synthase Kinase 3β*, *GSK3β*) φωσφορυλιώνει τη γαλεκτίνη-3, καθώς περιέχει το μοτίβο *S⁹²XXXS⁹⁶*. Ωστόσο, οι βιολογικές συνέπειες και ο ακριβής μηχανισμός των επιδράσεων της φωσφορυλίωσης δεν έχουν διευκρινιστεί ακόμα [125]. Επιπλέον, η κίνηση τυροσίνης *c-Abl* και η *CKI* μπορούν να φωσφορυλιώνουν κατάλοιπα σερίνης (*Ser6*: *CKI*) και τυροσίνης (*Tyr79*, *Tyr107* και *Tyr118*: *c-Abl*), ρυθμίζοντας τη δράση της [124, 126]. Η βιολογική δράση της γαλεκτίνης-3 ρυθμίζεται από την πρωτεόλυσή της. Η πρωτεόλυση πραγματοποιείται από τις μεταλλοπρωτεάσες της εξωκυττάριας μήτρας (*MMPs*) και το ειδικό αντιγόνο του προστάτη (*PSA*). Η φωσφορυλίωση της *Tyr107* από την *c-*

Abi ρυθμίζει την πρωτεόλυση της γαλεκτίνης-3 από το *PSA* μεταξύ των καταλοίπων *Tyr107-Gly108*. Οι *MMPs* πρωτεολύουν τη γαλεκτίνη-3 μεταξύ των αμινοξικών καταλοίπων *Ala62-Tyr63* και *Gly32-Ala33* εκτός της *CRD*. Η φωσφορυλίωση και η πρωτεόλυση ρυθμίζουν τη δράση της γαλεκτίνης-3 καθώς αλλάζουν τις ιδιότητες της, τον κυτταρικό εντοπισμό της και την αλληλεπίδρασή της με μόρια [126].

Η *CRD* της γαλεκτίνης-3 αποτελείται από 135 αμινοξικά κατάλοιπα και είναι η επικράτεια που προσδένει υδατάνθρακες. Το μοτίβο αναδίπλωσης είναι καλά συντηρημένο και αποτελείται από δύο αντιπαράλληλα β-πτυχωτά φύλλα που δομούνται από 6 κλώνους που δημιουργούν την κοίλη πλευρά (*S1-S6*) και 5 κλώνους που δημιουργούν την κυρτή πλευρά (*F1-F5*). Η κοίλη πλευρά σχηματίζει μία αύλακα που αποτελεί τη *CBS* και η οποία διακρίνεται στις περιοχές *A-E* (Εικόνα 41). Η περιοχή *C* αποτελείται από τα κατάλοιπα *His158, Asn160, Arg162, Asn174* και *Trp181* και είναι αρκετά συντηρημένη στην οικογένεια των γαλεκτινών, ενώ η περιοχή *D* που είναι λιγότερο συντηρημένη αποτελείται από τα κατάλοιπα *Arg162, Trp181, Glu184, Arg186*. Στην περιοχή *C* προσδένεται η β-γαλακτόζη, ενώ στη *D* προσδένεται το σάκχαρο που βρίσκεται δίπλα στη β-γαλακτόζη [127, 128].



Εικόνα 41: Η *CBS* της γαλεκτίνης-3 διαιρείται στις περιοχές *A-E* (PDB ID: 3ZSJ). Με μπλε χρώμα παρουσιάζεται η λακτόζη.

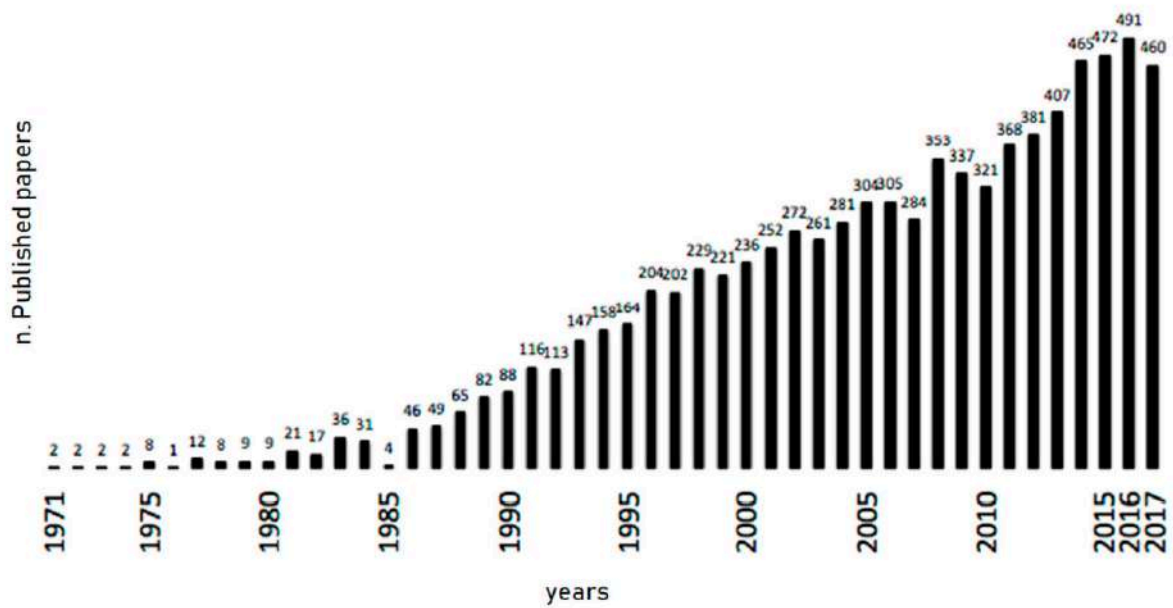
Ενδιαφέρων αποτελεί το γεγονός ότι η πρόσδεση ανταγωνιστών στη *CBS* της γαλεκτίνης-3 αυξάνει την εντροπία χωρίς όμως να προκαλούνται αλλαγές στη τρισδιάστατη δομή της πρωτεΐνης. Η *CRD* εμφανίζει μια χωρική ευελιξία, επιτρέποντας το σχεδιασμό εν δυνάμει φαρμάκων με βάση στατικές δομές [38, 129]. Επιπλέον, η *CBS* περιέχει καλά συντηρημένα μόρια ύδατος που εκτοπίζονται κατά τη σύνδεση ανταγωνιστών οδηγώντας σε μεταβολές της ενθαλπίας. Τα κατάλοιπα *His158* και η *Glu184*, των περιοχών *C* και *D* της *CBS*, είναι αρκετά σημαντικά για την σταθεροποίηση των συμπλόκων μέσω δεσμών υδρογόνου με τις λειτουργικές ομάδες των γλυκανών [127]. Η *CBS* αποτελείται από τα συντηρημένα

κατάλοιπα *His158, Asn160, Arg162, Asn174, Trp181, Glu184, Arg186* (*C* και *D* περιοχές). Σημαντικά κατάλοιπα για την πρόσδεση μορίων είναι τα *Arg144* και *Ala146* τα οποία βρίσκονται στην περιοχή *B* και είναι χαρακτηριστικά της γαλεκτίνης-3. Η *CRD* περιέχει το μοτίβο *NWGR*, το οποίο είναι καλά συντηρημένο μεταξύ της οικογένειας *Bcl-2* και είναι υπεύθυνο για την αντι-αποπτωτική δραστηριότητα της πρωτεΐνης αυτής. Η γαλεκτίνη-3 εμφανίζει υψηλή συγγένεια για β-γαλακτοζίτες. Πιο συγκεκριμένα, η πρόσδεση της λακτόζης και της *N*-ακετυλολακτοζαμίνης σταθεροποιείται μέσω δεσμών υδρογόνου με τα κατάλοιπα *His158, Arg162, Asn160, Glu184, Asn174* και με συντηρημένα μόρια ύδατος [130]. Επιπλέον, εμφανίζει υψηλή συγγένεια για πολύπλοκους ολιγοσακχαρίτες, όπως παράγωγα πολύ-*N*-ακετυλολακτοζαμίνης (*GlcNAc*) που αποτελούνται από πολλές μονάδες δισακχαριτών *GlcNAc* που συνδέονται με β-1,3 γλυκοζιτικούς δεσμούς. Η δημιουργία αυτών των σταθερών συμπλόκων οφείλεται στην *Arg144*, καθώς στη *ND* [131, 132]. Μέχρι σήμερα, έχουν βρεθεί αρκετοί φυσικοί προσδέτες της γαλεκτίνης-3 και χωρίζονται με βάση την περιοχή που βρίσκονται, σε εξωκυτταρικούς, ενδοκυτταρικούς και πυρηνικούς. Λόγω της υψηλής συγγένειας που εμφανίζει με γλυκάνες πολυλακτοζαμίνης, η γαλεκτίνη-3 προσδένεται σε γλυκοζυλιωμένα μόρια της εξωκυττάριας μήτρας, όπως είναι η λαμίνη, η φιμπρονεκτίνη, η τενασκίνη και η πρωτεΐνη πρόσδεσης *Mac-2*. Επιπρόσθετα, οι ιντεγκρίνες, μόρια προσκόλλησης της κυτταρικής επιφάνειας, μπορούν να προσδεθούν με υψηλή συγγένεια στην γαλεκτίνη-3. Η πρόσδεση αυτή στη μία ή και στις δύο υπομονάδες της ιντεγκρίνης, ρυθμίζει την ενεργοποίηση της ιντεγκρίνης επηρεάζοντας την πρόσδεσή της σε άλλα μόρια [132]. Η γαλεκτίνη-3 δρα και ενδοκυτταρικά και αλληλεπιδρά με τις κυτταροκερατίνες, *CBP70, Chrp, Gemin4, Alix/AIP-1* και *Bcl-2* [132, 133]. Οι κυτταροκερατίνες προσδένονται στην *CRD* της γαλεκτίνης-3, καθώς φέρουν μια γλυκάνη συνδεδεμένη με α-δεσμό με *GalNAc*, μετά από μεταφραστική τροποποίηση. Οι υπόλοιπες πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη αυτή και δεν προσδένονται στην *CRD*. Τέλος, η γαλεκτίνη-3 δρα και στον πυρήνα και μπορεί να αλληλεπιδράσει με πρωτεΐνες ενός μακρομοριακού συμπλόκου που εμπλέκονται στο μάτισμα, κάτι που αναδεικνύει το ρόλο της στη συγκρότηση του σωματίου ματίσματος [132, 133]. Κάποιες από τις πρωτεΐνες αυτές είναι οι *Gemin-4*, η πρωτεΐνη *SMN*, η *Gemin-2*, η *Gemin-3*, ορισμένες από τις πρωτεΐνες πυρήνα *Sm* των *snRNPs*. Επιπλέον, αλληλεπιδρά με την *ALG-2 interacting protein-1 (AIP-1)*. Η πρωτεΐνη αυτή είναι ασβεστοεξαρτώμενη και εμπλέκεται στον κυτταρικό θάνατο [132, 133].

1.7.1.1 Γαλεκτίνη-3 και ο ρόλος της σε ασθένειες

Η γαλεκτίνη-3 εκφράζεται σε πολλούς ιστούς, εμπλέκεται σε πολλές βιολογικές καταστάσεις και ρυθμίζει πολλές παθολογικές καταστάσεις. Αποτελεί μία από τις πιο μελετημένες γαλεκτίνες (Εικόνα 42) και έχει αναφερθεί ότι εμπλέκεται σε πάρα πολλές ασθένειες (Εικόνα 43). Τα τελευταία χρόνια μελέτες έχουν αναδείξει τη σημαντικότητα της πρωτεΐνης αυτής ως διαγνωστικό ή προγνωστικό δείκτη αλλά και ως θεραπευτικό στόχο για διάφορες ασθένειες [133]. Η γαλεκτίνη-3 βρίσκεται κυρίως στον πυρήνα και στο κυτταρόπλασμα αλλά μπορεί να εκκριθεί και στην εξωκυττάρια μήτρα και στα βιολογικά υγρά. Στο κυτταρόπλασμα,

διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην κυτταρική επιβίωση λόγω της αλληλεπίδρασής της με πρωτεΐνες όπως η *Bcl-2*, η οποία αναστέλλει την απόπτωση, και τη συνδεδεμένη με την γουανωσίνη-5'-τριφωσφορική (*GTP*) *K-Ras*, καθώς η γαλεκτίνη-3 είναι διαμεσολαβητής της εξαρτώμενης από την *p53* απόπτωσης [132]. Στον πυρήνα, προάγει την ωρίμανση του *mRNA* και τη ρύθμιση της μεταγραφής των γονιδίων. Στην εξωκυττάρια μήτρα είναι υπεύθυνη για την κυτταρική προσκόλληση και για αλληλεπιδράσεις μεταξύ κυττάρων εξωκυττάριας μήτρας [38, 132]. Η γαλεκτίνη-3 ενσωματώνεται στα ελεύθερα ριβοσώματα του κυτταροπλάσματος και δε φέρει κάποια αλληλουχία σήματος για τη μεταφορά της στο ενδοπλασματικό δίκτυο (*ER*). Μεταφέρεται στον πυρήνα με παθητική διάχυση ή ενεργή μεταφορά [121]. Η πρωτεΐνη εκκρίνεται στην εξωκυττάρια μήτρα με εξωκυττάρωση, που δεν συνδέεται με την κλασική οδό έκκρισης μέσω του δικτύου *Golgi* ή του *ER* [121, 132]. Αν και η έκφραση της γαλεκτίνης-3 σχετίζεται κυρίως με επιθηλιακά κύτταρα και μυελοειδή κύτταρα, εκφράζεται επίσης σε πολλούς άλλους τύπους κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των κυττάρων του δέρματος, του επιθηλίου του παχέος εντέρου και του προστάτη [126]. Εκφράζεται επίσης στους σιελογόνους αδένες, το πάγκρεας, τους νεφρούς, τους ενδοηπατικούς χοληφόρους πόρους, τους ινοβλάστες, τα κερατινοκύτταρα, τα κύτταρα *Schwann* και το γαστρικό βλεννογόνο. Επιπρόσθετα, εκφράζεται σε κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, δηλαδή ουδετερόφιλα, ηωσινόφιλα και μαστοκύτταρα, κύτταρα *Langerhans*, δένδριτικά κύτταρα, μονοκύτταρα και μακροφάγα από διάφορους ιστούς [129, 133]. Σε ορισμένους άλλους τύπους κυττάρων, όπως τα λεμφοκύτταρα, η γαλεκτίνη-3 γενικά δεν εκφράζεται, αν και η έκφρασή της μπορεί να ενεργοποιηθεί από διάφορα ερεθίσματα [132, 133]. Επιπλέον, η γαλεκτίνη-3 εμπλέκεται στην παθολογία πολλών ιστών. Εκφράζεται σε καρκινικούς όγκους του παγκρέατος, του ήπατος, του παχέος εντέρου, του μαστού, του πνεύμονα, του προστάτη, της κεφαλής και του τραχήλου, του νευρικού συστήματος και του θυρεοειδούς, γεγονός που αναδεικνύει τη σημαντικότητα της γαλεκτίνης-3 στην παθοφυσιολογία του ανθρώπινου οργανισμού. Η υπερέκφραση της γαλεκτίνης-3 σχετίζεται με αντιδράσεις του ανοσοποιητικού συστήματος και έχουν μεγάλο αντίκτυπο στο μεταβολισμό [38, 133].



Εικόνα 42: Η γαλεκτίνη-3 αποτελεί μία από τις πιο μελετημένες γαλεκτίνες. Ο αριθμός των δημοσιευμένων εργασιών για την γαλεκτίνη-3, αυξάνεται με την πάροδο του χρόνου, υποδεικνύοντας τη σημασία της πρωτεΐνης. Οι μελέτες αφορούν τόσο την ανάλυση των βιολογικών της ρόλων, όσο και την εύρεση ανταγωνιστών της [133].

Aa	Bb	Cc	Dd	Ee	Ff	Gg	Hh	Ii
Asthma	Blood test	Cancer	Degenerative Aortic Stenosis	Endometriosis	Fibrosis	Gastritis	Heart	Inflammation
Atherosclerosis		Cerebral infarction	Diabetes Mellitus	Enteric nervous system			HIV Infection	Interstitial lung disease
Atopic Dermatitis		COPD		Encephalitis				
aaa	bbb	ccc	ddd	eee	fff	ggg	hhh	iii

Jj	Kk	Ll	Mm	Nn	Oo	Pp	Qq
Juvenile Idiopathic Arthritis	Kidney	Liver Fibrosis	Mortality	NASH	Obesity	Pneumonia	Q Fever
						Pulmonary hypertension	
						Plaque Psoriasis	
jjj	kkk	lll	mmm	nnn	ooo	ppp	qqq

Rr	Ss	Tt	Uu	Vv	Ww	Xx	Yy	Zz
Rheumatoid Arthritis	Sepsis	Target therapy	Urinary tract infections	Venous Thrombosis	Wound Healing	X syndrome of the heart	Yeast infection – Candidiasis	Zoster-related pain
	Systemic Sclerosis							
rrr	sss	ttt	uuu	vvv	www	xxx	yyy	zzz

Εικόνα 43: Αλφαβητικά οι παθολογικές καταστάσεις και οι ασθένειες που εμπλέκεται η γαλεκτίνη-3 [133].

1.7.1.1.1 Γαλεκτίνη-3 και ίνωση

Η ίνωση των ιστών αποτελεί μια από τις πιο σοβαρές νόσους και αποτελεί χαρακτηριστικό στην παθοφυσιολογία πολλών ασθενειών, όπως είναι οι καρδιοαγγειακές ασθένειες, ο καρκίνος, και οι χρόνιες ασθένειες του πνεύμονα, των νεφρών και του ήπατος. Η χρόνια ίνωση οδηγεί στην συσσώρευση μορίων της εξωκυττάριας μήτρας που οδηγεί στην καταστροφή της αρχιτεκτονικής του ιστού και στην καταστροφή του επικείμενου οργάνου. Οι θεραπευτικές προσεγγίσεις είναι αρκετά περιορισμένες, με κύρια να αποτελεί την ολική μεταμόσχευση του οργάνου. Ωστόσο, η συμβατότητα του δότη, το κόστος και η νοσηρότητα της μεταμόσχευσης οδηγούν στην άμεση εύρεση νέων θεραπευτικών προσεγγίσεων. Μελέτες έχουν αναδείξει ότι η γαλεκτίνη-3 ρυθμίζει τη δράση των ινοβλαστών και των μακροφάγων σε ιστούς με χρόνια φλεγμονή. Η υπερέκφραση της σε ιστούς με χρόνια φλεγμονή ενεργοποιεί τους μυοϊνοβλάστες δημιουργώντας ουλές. Μελέτες σε ποντίκια που δεν εκφράζουν τη γαλεκτίνη-3 εμφανίζουν μειωμένη ίνωση στον πνεύμονα, στην καρδιά και στο ήπαρ. Η πρωτεΐνη αυτή αποτελεί το κύριο μέλος της οικογένειας των γαλεκτινών που ρυθμίζουν την ίνωση, ωστόσο η γαλεκτίνη-1 και η γαλεκτίνη-9 έχουν βρεθεί ότι εμπλέκονται στην πνευμονική και ηπατική ίνωση. Λόγω αυτού, γεννιέται το ερώτημα εάν η αναστολή της δράσης μιας γαλεκτίνης ή περισσότερων που εμπλέκονται στην ίδια πάθηση θα μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως θεραπευτική προσέγγιση. Η αποτελεσματικότητα μπορεί να αξιολογηθεί μέσω κλινικών μελετών με τη μέτρηση των φαρμακοδυναμικών βιοδεικτών για κάθε γαλεκτίνη που εμπλέκεται. Ωστόσο, η εύρεση ενώσεων που θα εμφανίζουν επιλεκτικότητα ως προς την ευρύτερη οικογένεια των γαλεκτινών μπορεί να οδηγήσει σε αρνητικές επιδράσεις. Για παράδειγμα, η γαλεκτίνη-7 έχει βρεθεί ότι εμφανίζει αντι-ινωτική δράση [134].

1.7.1.1.2 Γαλεκτίνη-3 και καρδιακή ίνωση

Υπάρχουν πολλές αναφορές που αναδεικνύουν το ρόλο της γαλεκτίνης-3 στις καρδιακές παθήσεις. Μέχρι σήμερα έχουν δημοσιευθεί περίπου 700 δημοσιεύσεις που αναφέρουν ότι η υψηλή έκφραση της γαλεκτίνης-3 θεωρείται ως βιοδείκτης για βλάβες στην καρδιακή ανεπάρκεια, το εγκεφαλικό επεισόδιο και άλλες καρδιαγγειακές παθήσεις, τόσο οξείες όσο και μακροπρόθεσμες. Η υψηλή συγκέντρωση της γαλεκτίνης-3 έχει συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο θνησιμότητας τόσο σε οξείες όσο και σε χρόνιες καρδιακές παθήσεις, συμπεριλαμβανομένου του ανευρύσματος της κοιλιακής αορτής, του οξέος στεφανιαίου συνδρόμου, φλεβικής θρομβοεμβολής, κολπικής μαρμαρυγής, πνευμονικής αρτηριακής υπέρτασης, καρδιακής ανεπάρκειας και αορτικής στένωσης. Έχει βρεθεί πως η γαλεκτίνη-3 μπορεί να παρέχει ανεξάρτητες προγνωστικές πληροφορίες για τη νοσηρότητα και τη θνησιμότητα της καρδιακής ανεπάρκειας [133].

1.7.1.1.3 Γαλεκτίνη-3 και Πνευμονική ίνωση

Η γαλεκτίνη-3 έχει αναδειχθεί ως βιοδείκτης και προγνωστικός παράγοντας για την ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση, καθώς υψηλή έκφραση της πρωτεΐνης αυτής έχει βρεθεί στον ορό καθώς και στο βρογχοκυψελιδικό υγρό ασθενών. Μελέτες σε ποντίκια που δεν εκφράζουν τη γαλεκτίνη-3 έδειξαν ότι δεν εμφανίζουν πνευμονική ίνωση επαγόμενη από βλεομυκίνη. Επιπλέον, οι πρωτεΐνες κάποιων ιών, όπως των κορονοϊών, των ορθομυξοϊών και των τοροϊών, αποτελούνται από μια περιοχή αναγνώρισης υδατανθράκων μέσω της οποίας προσδένονται σε σιαλογλυκάνες της κυτταρικής επιφάνειας. Η πρόσδεση ενισχύεται μέσω της πρόσδεσης της γαλεκτίνης-3. Μια μελέτη ποντικών που είχαν μολυνθεί από πνευμονόκοκκο και *influenza* έδειξε αλλαγή στα πρότυπα γλυκοζυλίωσης και υψηλή έκφραση της γαλεκτίνης-3 στο βρογχοκυψελιδικό χώρο που προάγει την προσκόλληση του πνευμονιόκοκκου. Επιπλέον, η πρόσδεση της γαλεκτίνης-3 στην επιφάνεια των επιθηλιακών κυττάρων αύξησε την έκφραση των *SOCS1* και *RIG1* και ενεργοποίησε τα σηματοδοτικά μονοπάτια *ERK*, *AKT* ή *JAK/STAT1*, οδηγώντας σε αυξημένη έκφραση και απελευθέρωση προφλεγμονωδών κυτοκινών κατά τη διάρκεια της λοίμωξης με γρίπη και *Streptococcus pneumoniae*. Μέχρι σήμερα, δεν υπάρχουν θεραπευτικές προσεγγίσεις για την οξεία πνευμονική βλάβη. Ωστόσο, η χρήση ειδικών ενώσεων επιλεκτικές ως προς τη γαλεκτίνη-3 μπορεί να προσφέρει προστασία τόσο στην οξεία φάση όσο και στις μακροπρόθεσμες ινώσεις. Παρακάτω θα αναφερθούν κάποιοι ανταγωνιστές της γαλεκτίνης-3, οι οποίοι βρίσκονται σε φάση κλινικών μελετών για τη θεραπεία της πνευμονικής ίνωσης [133].

1.7.1.1.4 Γαλεκτίνη-3 και καρκίνος

Η γαλεκτίνη-3 εκφράζεται σε πολλούς καρκινικούς όγκους. Ανάλογα με το τύπο του όγκου και την ικανότητα μετάστασης υπερ- ή υπο- εκφράζεται. Για παράδειγμα, υπερεκφράζεται σε μεγάλο βαθμό στα καρκινώματα του παχέος εντέρου, της κεφαλής και του τραχήλου, του ήπατος, του στομάχου, του ενδομήτριου, του θυρεοειδούς, του δέρματος και του μαστού, ενώ υποεκφράζεται στον καρκίνο του προστάτη, της ουροδόχου κύστης, των νεφρών και του βλεννογόνου. Κατά την εξέλιξη ορισμένων καρκίνων, όπως του καρκίνου του παχέος εντέρου, της γλώσσας και του προστάτη, έχουν παρατηρηθεί αλλαγές στον κυτταρικό εντοπισμό της γαλεκτίνης-3 καθώς μετακινείται από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα. Η μετακίνηση αυτή γίνεται μέσω της φωσφορυλίωσης της *Ser6* που βρίσκεται στην *ND*. Η μείωση της έκφρασης της γαλεκτίνης-3 σε ορισμένους τύπους καρκίνου ίσως οφείλεται στη μεθυλίωση του *DNA* στον υποκινητή της γαλεκτίνης-3. Η γαλεκτίνη-3 ρυθμίζει την εξέλιξη του όγκου και τη μετάσταση σε αρκετούς καρκινικούς τύπους μέσω διαφόρων διαδικασιών, όπως της αγγειογένεσης, της κυτταρικής προσκόλλησης, αναστολή της απόπτωσης. Κατά τη διάρκεια της μετάστασης του καρκίνου, τα καρκινικά κύτταρα, αφού αποκολληθούν από την πρωτογενή περιοχή του όγκου, σχηματίζουν δευτερογενείς όγκους συσσωματώνονται με άλλα καρκινικά κύτταρα και μεταναστεύουν στις δευτερογενείς περιοχές. Κατά τη μετανάστευση, τα καρκινικά κύτταρα συνδέονται με τα ενδοθηλιακά κύτταρα, ενδεχομένως μέσω αλληλεπιδράσεων πρωτεϊνών-υδατανθράκων, και διεισδύουν μέσα από τα στρώματα

των ενδοθηλιακών κυττάρων και τις βασικές μεμβράνες. Μελέτες υποδεικνύουν ότι η γαλεκτίνη-3 εμπλέκεται στα περισσότερα στάδια της μετάστασης μέσω της προώθησης της ομότυπης κυτταρικής προσκόλλησης και της ετερότυπης συσσωμάτωσης μέσω της πρόσδεσης σε γλυκοσυζεύγματα και των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των καρκινικών κυττάρων και των ενδοθηλιακών κυττάρων, της αγγειογένεσης και της μετάστασης του όγκου. Η γαλεκτίνη-3 εμπλέκεται στο μηχανισμό διαφυγής του ανοσοποιητικού συστήματος των καρκινικών κυττάρων, μέσω απόπτωσης των T-κυττάρων από την εξωκυττάρια γαλεκτίνη-3. Μέσω της υπερέκφρασης της γαλεκτίνης-3 τα καρκινικά κύτταρα αμύνονται έναντι των T-κυττάρων. Η απόπτωση των T-κυττάρων πραγματοποιείται μέσω της πρόσδεσης της εξωκυττάριας γαλεκτίνης-3 στο σύμπλοκο *CD29/CD7*, ενεργοποιώντας ένα σηματοδοτικό μονοπάτι μέσω της απελευθέρωσης του κυτοχρώματος *c* και ενεργοποίηση της κασπάσης-3. Η απόπτωση πραγματοποιείται μέσω δύο οδών σηματοδότησης, μέσω *Fas* (*apo-1/CD95*) ή μέσω του *TRAIL* (*TNF-related apoptosis-inducing ligand* ή *Apo2-L*) [135, 136].

1.7.1.2 Γαλεκτίνη-3 ως βιοδείκτης

Ένα βασικό ερώτημα της γλυκοβιολογίας και της φαρμακολογίας είναι εάν οι γαλεκτίνες και πιο συγκεκριμένα η γαλεκτίνη-3 αποτελεί αιτιολογικό παράγοντα ή δευτερεύον της εμφάνισης και εξέλιξης συγκεκριμένων ασθενειών [18, 137]. Η έρευνα σχετικά με την ικανότητα της γαλεκτίνης-3 να προβλέπει τη βραχυπρόθεσμη και μακροπρόθεσμη νοσηρότητα και θνησιμότητα έχει δώσει πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα, ανοίγοντας ένα δρόμο για τη χρήση της ως βιοδείκτη. Μέχρι σήμερα, οι μελέτες για την καρδιακή ανεπάρκεια έχουν διεξαχθεί κυρίως για τον έλεγχο της προγνωστικής της αξίας σε σύγκριση με το γενικό πληθυσμό. Σε αυτούς τους ασθενείς, η γαλεκτίνη-3 αποτελεί σημαντικό προγνωστικό παράγοντα του κινδύνου θνησιμότητας μετά τη συνεκτίμηση της ηλικίας και του φύλου. Με βάση αυτά τα ευρήματα, έχει προταθεί μια εξέταση αίματος [136] για την εύρεση και ποσοτικοποίηση της γαλεκτίνης-3, με στόχο την αξιολόγηση ασθενών με καρδιακή ανεπάρκεια και για τη διαχείριση ασθενών με οξεία καρδιακή ανεπάρκεια που εισάγονται στο τμήμα επειγόντων περιστατικών. Μεγάλο ενδιαφέρον προκάλεσε η κλινική δοκιμή *PREVEND* (*Prevention of Renal and Vascular END stage disease*), η μεγαλύτερη μελέτη μέχρι σήμερα με τη μεγαλύτερη περίοδο παρατήρησης για τη διερεύνηση των επιπέδων της γαλεκτίνης-3 [126, 136]. Μελετήθηκαν συνολικά 7968 άτομα από το γενικό πληθυσμό και παρακολουθήθηκαν για 10 έτη. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα επίπεδα της γαλεκτίνης-3 στον ορό αυξάνονται με την ηλικία και οι γυναίκες έχουν υψηλότερα επίπεδα κατά μέσο όρο από τους άνδρες. Σε αυτή τη μελέτη, υπήρξε σαφής συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων της γαλεκτίνης-3 στον ορό και της αύξησης της θνησιμότητας από όλες τις προαναφερθείσες αιτίες, γεγονός που υποδηλώνει ότι η μέτρηση των επιπέδων της μπορεί όχι μόνο να προβλέψει αποτελεσματικά την πρόγνωση των ασθενών, αλλά μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί σε διάφορες άλλες παθολογίες. Οι ασθενείς επανεισάγονται συχνά στο νοσοκομείο μετά την αρχική τους ανάρρωση. Η ανίχνευση της γαλεκτίνης-3 στα συλλεγμένα σωματικά υγρά μπορεί ενδεχομένως να βελτιώσει την τρέχουσα διαχείριση της καρδιακής

ανεπάρκειας. Επιπλέον, η γνώση της αξίας του ποσοτικού προσδιορισμού της γαλεκτίνης-3 στο σάλιο ασθενών με καρδιακή ανεπάρκεια ως εργαλείο για τη διαστρωμάτωση της πρόγνωσης έχει αποτελέσει αποτελεσματικό μέσο για τη μείωση των ποσοστών επανανοσηλείας. Οι ασθενείς με συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 172,58 ng/mL ενδέχεται να διατρέχουν υψηλότερο κίνδυνο για μελλοντική επανανοσηλεία από ό,τι οι ασθενείς με χαμηλότερες συγκεντρώσεις. Εάν αυτά τα αποτελέσματα επιβεβαιωθούν σε μια μεγάλη πολυκεντρική κλινική δοκιμή, η μέτρηση των συγκεντρώσεων της γαλεκτίνης-3 στο σάλιο θα μπορούσε να αποτελέσει μέρος μιας αξιολόγησης-ρουτίνας των ασθενών με καρδιακή ανεπάρκεια [126, 135, 136].

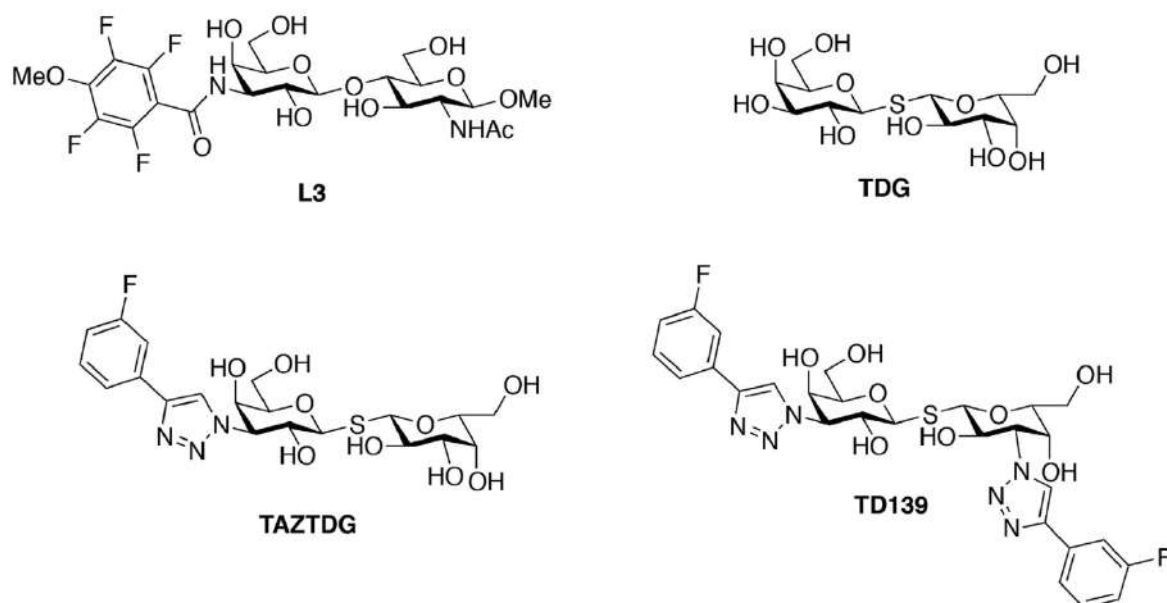
1.7.1.3 Γαλεκτίνη-3 και σχεδιασμός φαρμάκων

Η γαλεκτίνη-3 θεωρείται ως ελκυστικός φαρμακευτικός στόχος. Κατά βάση έχει χρησιμοποιηθεί η τρισδιάστατη δομή των συμπλόκων της γαλεκτίνης-3 με φυσικούς προσδέτες για τη μελέτη των αλληλεπιδράσεων που συγκροτούν το σύμπλοκο καθώς, η ενεργοποίηση των βιολογικών της ρόλων πραγματοποιείται μέσω της πρόσδεσης υδατανθράκων στη CRD της γαλεκτίνης-3 [38]. Η CRD βρίσκεται στην επιφάνεια και αποτελείται από πολικά αμινοξικά κατάλοιπα. Οι φυσικοί προσδέτες όπως η λακτόζη και η *N*-ακετυλολακτοζαμίνη προσδένονται μέσω ενός δικτύου δεσμών υδρογόνου μεταξύ των -OH τους με τις πλευρικές αλυσίδες των πολικών αμινοξικών καταλοίπων και με συντηρημένα μόρια ύδατος. Επιπλέον, το σύμπλοκο σταθεροποιείται μέσω αλληλεπιδράσεων *Van der Waals*. Δύο βασικά μη συντηρημένα κατάλοιπα, Arg144 και Arg186, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη δημιουργία ενώσεων που θα αλληλεπιδρούν με αυτά και ενδεχομένως να προσδώσουν στις ενώσεις εξειδίκευση [38]. Οι ενώσεις που μελετώνται ως εν δυνάμει ανταγωνιστές των γαλεκτινών και πιο συγκεκριμένα της γαλεκτίνης-3 κατηγοριοποιούνται σε ενώσεις μικρού μοριακού βάρους και μεγάλου μοριακού βάρους που προσδένονται στην CRD και σε αλλοστερικούς τροποποιητές που προσδένονται σε περιοχές εκτός από της CRD. Η καλύτερη προσέγγιση για το σχεδιασμό επιλεκτικών συνθετικών προσδετών βασίζεται στην χημική τροποποίηση της γαλακτόζης με την προσθήκη υποκαταστατών έτσι ώστε να δημιουργείται ένα νέο δίκτυο δεσμών που θα σταθεροποιεί το σύμπλοκο. Άξιο αναφοράς αποτελεί το γεγονός, ότι οι πιο επιλεκτικές ενώσεις για τη γαλεκτίνη-3, και για την κάθε γαλεκτίνη, είναι εκείνες οι οποίες αλληλεπιδρούν με τις περιοχές της CBS που δεν είναι τόσο συντηρημένες, όπως είναι η C. Φυσικοί προσδέτες που αλληλεπιδρούν και με τις υπόλοιπες περιοχές της CBS εμφανίζουν υψηλότερη συγγένεια [134]. Αρκετές προσπάθειες έχουν γίνει μέχρι σήμερα για να βρεθεί η κατάλληλη τροποποίηση των σακχάρων έτσι ώστε να εξισορροπηθεί η υψηλή δραστηριότητα με την επιλεκτικότητα ως προς την κάθε γαλεκτίνη.

1.7.1.4 Ανταγωνιστές της γαλεκτίνης-3

Η θειοδιγαλακτόζη (TDG) εμφανίζει υψηλή συγγένεια ως προς την οικογένεια των γαλεκτινών. Η ένωση αυτή έχει χρησιμοποιηθεί ως βάση για το σχεδιασμό εν δυνάμει

φαρμάκων. Οι σακχαρίτες αυτοί είναι πιο ανθεκτικοί στις γλυκοζιδάσες και εμφανίζουν συγγένεια για πολλά μέλη της οικογένειας των γαλεκτινών.



Εικόνα 44: Η χημική δομή ανάλογων της TDG.

Από τις παραπάνω ενώσεις (Εικόνα 44), η **TD139** εμφανίζει την υψηλότερη συγγένεια έναντι της γαλεκτίνης-3. Ο ανταγωνιστής αυτός έχει εγκριθεί ως θεραπευτική αγωγή για την ιδιοπαθή πνευμονική ίνωση. Τα παραπάνω παράγωγα αποτελούνται είτε από δύο ίδιους ή διαφορετικούς υποκαταστάτες στους C3-/C3'. Η περιοχή της TDG προσδένεται στις περιοχές C και D της CBS των γαλεκτινών. Οι δύο αρωματικοί υποκαταστάτες της **TD139** δημιουργούν αλληλεπιδράσεις επιστοιβάξης π με τα κατάλοιπα Arg144 και Arg186 της γαλεκτίνης-3, τα οποία βρίσκονται στις περιοχές B και E της CBS, κάτι που δικαιολογεί την υψηλή συγγένεια. Η γαλεκτίνη-1 έχει μία αργινίνη (Arg73) στην περιοχή E και καμία στη B, ενώ οι γαλεκτίνες 3 και 7 περιέχουν μία αργινίνη και στις δύο περιοχές. Η ένωση **TD139** εμφανίζει υψηλή συγγένεια ως προς τις γαλεκτίνες 1 και 3, αλλά όχι ως προς τη γαλεκτίνη-7. Η πρόσδεση της **TD139** στις γαλεκτίνες 1 και 7 πραγματοποιείται μέσω αλληλεπιδράσεων με την περιοχή E παρά με την περιοχή B. Η **TAZTDG** εμφανίζει δύο τρόπους πρόσδεσης στις γαλεκτίνες, με προτίμηση για τις περιοχές C-E στις γαλεκτίνες 1 και 7 και για τις περιοχές B-D στη γαλεκτίνη-3. Το σύμπλοκο γαλεκτίνη-3-**TD139** εμφανίζει το μεγαλύτερο αριθμό αλληλεπιδράσεων, παρόμοιο με τον αριθμό για το σύμπλοκο γαλεκτίνη-3-**L3**, συμπεριλαμβανομένων δικτύων γεφυρών άλατος και αλληλεπιδράσεων *van der Waals* στις κύριες περιοχές C και D της CBS [130]. Για τα σύμπλοκα με τις **TD139** και **L3**, ωστόσο, δημιουργούνται διαφορετικές αλληλεπιδράσεις στις περιοχές B και E. Συγκεκριμένα, παρόλο που το αρωματικό αμίδιο της **L3** και η 4-φθοροφαινυλομάδα της **TD139** βρίσκονται και οι δύο μεταξύ των Arg144 και Ala146 στην περιοχή B, ο υποκαταστάτης της **TD139** εκτείνεται βαθύτερα στην αύλακα που σχηματίζεται από τα Arg144 και Ala146. Δημιουργείται έτσι ένα φθοριόφιλο

μικροπεριβάλλον στο οποίο το τελικό άτομο φθορίου της **TD139** μπορεί να σχηματίσει πολλαπλές, ορθογώνιες πολικές αλληλεπιδράσεις (δηλαδή δεσμούς φθορίου) με τα άτομα της πρωτεϊνικής ραχοκοκαλιάς με μέση απόσταση μικρότερη των 3,5 Å. Επιπλέον, τα τμήματα 4-φθοροφαινυλίου και τριαζόλης στο άλλο άκρο της **TD139** σχηματίζουν αλληλεπιδράσεις επιστοίβαξης π με την Arg186 στην περιοχή E. Οι φθοριοφιλικές αλληλεπιδράσεις και η αλληλεπίδραση επιστοίβαξης π στην περιοχή E πιθανώς ευθύνονται για την 50πλάσια αύξηση της αχιστείας για τη γαλεκτίνη-3 σε σύγκριση με εκείνη της **L3** ($K_D = 3,3 \mu M$). Στη γαλεκτίνη-1, τα κατάλοιπα Ser29 και Val31 αντιστοιχούν στα κατάλοιπα Arg144 και Ala146 της γαλεκτίνης-3. Παρόλο που το τμήμα 4-φθοροφαινυλίου φαίνεται να προσδένεται με παρόμοιο τρόπο στην αύλακα που σχηματίζεται από τα κατάλοιπα Ser29 και Val31, ο υποκαταστάτης μετατοπίζεται από τη Val31 κατά $\sim 16^\circ$, με αποτέλεσμα το σχηματισμό μόνο δύο αλληλεπιδράσεων φθορίου-πρωτεΐνης σε σύγκριση με τις τέσσερις που παρατηρούνται στο σύμπλοκο με τη γαλεκτίνη-3 [130]. Στη γαλεκτίνη-7 τα αμινοξικά κατάλοιπα Arg31 και His33 αντιστοιχούν στα κατάλοιπα Arg144 και Ala146 της γαλεκτίνης-3, αλλά η Arg31 είναι μετατοπισμένη στην περιοχή B και έτσι δεν αλληλεπιδρά με τον υποκαταστάτη 4-φθοροφαινυλίου της **TD139** [130]. Πιθανώς παρεμποδιζόμενη από το ιμιδαζόλιο της His33, το οποίο αποτελεί μεγαλύτερο κατάλοιπο από αυτά των γαλεκτινών-1 και -3 (Val31 και Ala146 αντίστοιχα), η 4-φθοροφαινυλομονάδα στρέφεται $\sim 50^\circ$ μακριά σε σύγκριση με τη θέση της στο σύμπλοκο της γαλεκτίνης-3 και ο ελεύθερος χώρος που δημιουργείται στην περιοχή B της γαλεκτίνης-7 καταλαμβάνεται από δύο μόρια ύδατος. Ο τρόπος με τον οποίο το τμήμα 4-φθοροφαινυλο-τριαζόλης της **TD139** συνδέεται στην περιοχή E είναι αποτέλεσμα των δικτύων γέφυρας άλατος των γαλεκτινών δηλαδή, Asp54-Arg73-Glu71 της γαλεκτίνης-1, Glu165-Arg186-Glu184 της γαλεκτίνης-3 και Glu58-Arg74-Glu72 και της γαλεκτίνης-7. Δηλαδή, το δίκτυο προσανατολίζει το κατάλοιπο Arg να αλληλεπιδράσει με τον αρωματικό υποκαταστάτη. Στις δομές των γαλεκτινών 3 και 7, υπάρχουν παρόμοιες αλληλεπιδράσεις επιστοίβαξης π μεταξύ του 4-φθοροφαινυλο-τριαζολίου και των Arg186 και Arg74, των γαλεκτινών 3 και 7, αντίστοιχα [130].

1.7.1.4.1 Γαλεκτίνη-3 και εν δυνάμει φάρμακα μικρού μοριακού βάρους

Τα φάρμακα μικρού μοριακού μεγέθους εμφανίζουν κάποια πλεονεκτήματα έναντι των φαρμάκων μεγαλύτερου. Κάποια από αυτά είναι η δυνατότητα σχεδιασμού μιας μικρότερης ένωσης με κατάλληλα χαρακτηριστικά, όπως είναι η πολικότητα και η βιοσταθερότητα (καταλληλόλητα για τη δια του στόματος χορήγηση), και μπορούν να συντεθούν με μεγαλύτερη ευκολία και σε μεγαλύτερη κλίμακα αλλά και να αναλυθούν ευκολότερα σε φαρμακοκινητικές μελέτες [135, 138]. Λίγες κλινικές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί για ενώσεις που στοχεύουν τη γαλεκτίνη-3 [138]. Προκλινικές μελέτες έδειξαν ότι η χορήγηση της **TDG** μειώνει τη μεταστατική ικανότητα καρκίνου του πνεύμονα, του μαστού και τους παχέος εντέρου σε ποντίκια [139]. Η *Galecto Biotech* παράγει μικρού μοριακού βάρους ανταγωνιστές, που έχουν ως βάση το **TDG**, όπως την **TD139** (που αργότερα ονομάστηκε **GB0139**) και την **GB1211** οι οποίες εμφανίζουν συγγένεια της τάξεως των nM (2.3-25 nM) ως

προς τη γαλεκτίνη-3. Προσδένονται στην CRD της γαλεκτίνης-3 με υψηλή συγγένεια, ωστόσο η **TD139** εμφανίζει σημαντική συγγένεια και για τη γαλεκτίνη-1 ($K_D = 220 \text{ nM}$) αλλά χαμηλότερη συγγένεια για άλλες γαλεκτίνες. Η *Galecto Biotech* ολοκλήρωσε πρόσφατα την κλινική δοκιμή φάσης 1/2^α (NCT02257177) για την αξιολόγηση της ασφάλειας, της φαρμακοκινητικής και της φαρμακοδυναμικής της εισπνεόμενης ένωσης **TD139** [140]. Η ένωση στην κλινική φάση 1/2^α αξιολογήθηκε σε 36 υγιή άτομα και 24 ασθενείς ιδιοπαθούς πνευμονικής ίνωσης (IPF). Η **TD139** απορροφάται γρήγορα και είναι ασφαλής σε ασθενείς με IPF και σε υγιή άτομα. Η μεταφορά της ένωσης στους ιστούς στόχους επιβεβαιώθηκε με βρογχοσκόπηση κατά της διάρκεια της χορήγησης. Σε συνέχεια της παραπάνω μελέτης προγραμματίζεται μελέτη κλινικής φάσης 2b (GALACTIC-1, NCT03832946) για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας και της ασφάλειας της εισπνεόμενης ένωσης **GB0139** σε ασθενείς με IPF. Παράλληλα, έχει ξεκινήσει κλινική δοκιμή φάσης 2 της **TD139** ή **GB0139** (DEFINE, NCT04473053) για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητά της σε ασθενείς με COVID-19 [141, 142]. Η μελέτη αυτή αποσκοπεί στην χρήση της εισπνεόμενης ένωσης **GB0139** ως θεραπευτική προσέγγιση για ασθενείς που νοσηλεύονται με COVID-19, εάν μπορεί να μειωθεί το υικό φορτίο και η σοβαρότητα της νόσου καθώς και να μετρήσει τυχόν αλλαγές στους βιοδείκτες του αίματος. Η κλινική δοκιμή βρίσκεται ακόμα υπό εξέλιξη, ωστόσο τα πρώτα αποτελέσματα ήταν αρκετά ενθαρρυντικά. Η *Galecto Biotech* ανέπτυξε ένα νέο συνθετικό ανταγωνιστή της γαλεκτίνης-3 με όνομα **GB1211**, για διά του στόματος χορήγηση, ως θεραπευτική αγωγή της ηπατικής ίνωσης και ολοκλήρωσε κλινική μελέτη φάσης 1 (NCT03809052) και 1b (GULLIVER-1, NCT04607655) για την αξιολόγηση της ασφάλειας, της φαρμακοκινητικής και της φαρμακοδυναμικής. Ωστόσο, η παραπάνω δοκιμή αποσύρθηκε για άγνωστο λόγο. Παράλληλα, ξεκίνησε μια κλινική μελέτη φάσης 1 για την αξιολόγηση της ασφάλειας της **GB1211** σε ασθενείς με ηπατική δυσλειτουργία (GULLIVER-2, NCT05009680). Επιπλέον, προγραμματίζονται μελέτες για τη διερεύνηση της ασφάλειας και της αποτελεσματικότητας της **GB1211** σε συνδυασμό με ατεζολιζουμάμπη σε ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα (NSCLC) (NCT05240131) [134, 135, 143, 144]. Στο δισακχαριδικό ανταγωνιστή **GB0139**, οι αρωματικοί υποκαταστάτες που διακοσμούν τις δύο μονάδες γαλακτοπυρανόζης δημιουργούν ισχυρές αλληλεπιδράσεις επιστοίβαξης π με αυτά τα κατάλοιπα. Στους συνθετικούς μονοσακχαρίτες, όπου δημιουργείται μόνο αλληλεπίδραση επιστοίβαξης π με την Arg144, το σύμπλοκο σταθεροποιείται με τις αλληλεπιδράσεις του ανωμερικού υποκαταστάτη με την υπόλοιπη CBS, οδηγώντας σε ισχυρά επιλεκτικούς ανταγωνιστές, όπως ο **GB1211** [138].

Πρόσφατα, ανακαλύφθηκαν μονοσακχαρίτες που εμφανίζουν υψηλή συγγένεια ως προς τη γαλεκτίνη-3. Η ένωση **GB1107** (3,4-διχλωροφαινυλο-3-δεοξυ-3-[4(3,4,5-τριφθοροφαινυλο)-1H-1,2,3-τριαζολ-1-υλ]-1-θειο-α-D-γαλακτοπυρανοσίδη) από την *Galecto Biotech* εμφανίζει υψηλή συγγένεια ($K_D = 37 \text{ nM}$) με την CRD της γαλεκτίνης-3. Τόσο η **TD139** όσο και η **GB1107** μπορούν να διαπεράσουν την κυτταρική μεμβράνη. Η **GB1107** χαρακτηρίζεται από καλή βιοδιαθεσιμότητα κατά τη δια του στόματος χορήγηση. Δείχθηκε ότι η χορήγηση της **GB1107** μείωσε την ανάπτυξη του αδενοκαρκινώματος του πνεύμονα σε ανθρώπους και ποντίκια και μείωσε τη μεταστατική ικανότητα σε μοντέλα ποντικών. Η θεραπεία με την ένωση **GB1107**

προάγει την πόλωση των μακροφάγων *M1* του όγκου και τη διήθηση των *CD8(+)* *T*-κυττάρων. Επιπλέον, ενίσχυσε τις επιδράσεις ενός αναστολέα του ανοσολογικού σημείου ελέγχου *PD-L1* για την αύξηση της έκφρασης των κυτταροτοξικών (*IFNgamma*, γκρενζύμη B, περφορίνη-1, *Fas ligand*) και αποπτωτικών (διασπασμένη κασπάση-3) μορίων. Θα πρέπει να αναφερθεί ότι οι χημικές τροποποιήσεις των γλυκανών και η αξιολόγησή τους ως ανταγωνιστές έναντι των γαλεκτινών στον καρκίνο αποτελούν έντονο πεδίο έρευνας. Επιπλέον, συνθετικές γλυκοαμίνες απέδειξαν αντικαρκινική δράση [143].

Τέλος, έχει δημιουργηθεί μια βιβλιοθήκη που αποτελείται από νέες βιοδραστικές ενώσεις. Αυτή περιλαμβάνει μονοσακχαριδικές ενώσεις στις οποίες έχει αντικατασταθεί η γαλακτόζη από ταλόζη, και οι οποίες εμφανίζουν επιλεκτικότητα ως προς τη γαλεκτίνη-3. Η εξειδίκευση των ανταγωνιστών αυτών οφείλεται κατά κύριο λόγο στην ευκινησία της πλευρικής αλυσίδας της *Arg144*. Η ευκινησία αυτή της επιτρέπει να έχει διαφορετικές διαμορφώσεις και να αλληλεπιδρά με την αρωματική ομάδα στον *C3'* υποκαταστάτη των παραγώγων *N*-ακετυλολακτοζαμίνης (*Lac-NAc*). Επιπλέον, η κοιλότητα που δημιουργείται μέσω της *Arg144* και μιας περιοχής του βρόχου που συνδέει τα β-φύλλα *S4* και *S5* επιτρέπει στη γαλεκτίνη-3 να δημιουργεί σύμπλοκα με τροποποιήσεις στο *C2* της ταλόζης (η ταλόζη είναι το *C2* επιμερές της γαλακτόζης με αξονική κατεύθυνση του *O2* σε αντίθεση με τον ισημερινό υποκαταστάτη *O2* της γαλακτόζης) [137, 138].

1.7.1.4.2 Γαλεκτίνη-3 και εν δυνάμει φάρμακα μεγάλου μοριακού βάρους

Οι πηκτίνες φυτικής προέλευσης είτε στη φυσική τους μορφή είτε χημικά τροποποιημένες αποτελούν ανταγωνιστές της γαλεκτίνης-3 και έχουν διερευνηθεί κλινικά. Οι συγκεκριμένες ενώσεις δεν εμφανίζουν ιδιαίτερη εξειδίκευση ως προς μια γαλεκτίνη αν και προσδένονται στη γαλεκτίνη-3 με υψηλή συγγένεια ($2,6-10 \mu M$) [135]. Πιο συγκεκριμένα, οι πηκτίνες, μια οικογένεια δομικά πολύπλοκων πολυσακχαριτών μοριακού μεγέθους 50-180 *kDa* που βρίσκονται κυρίως στα κυτταρικά τοιχώματα των φυτών χρησιμοποιούνται ευρέως στη βιομηχανία τροφίμων για τη δημιουργία πηκτωμάτων [145]. Αποτελούνται από τρεις κύριους πολυσακχαρίτες: την ομογαλακτουρονάνη (*HG*), τη ραμνογαλακτουρονάνη-*I* (*RG-I*) και τις γαλακτουρονάνες (*GS*) [145]. Οι πηκτίνες πρέπει να τροποποιηθούν από το *pH* και τη θερμότητα για να αποκτήσουν διαλυτότητα και βιολογικές επιδράσεις. Η υδρόλυση επάγει την έκθεση των γαλακτοζιτών οι οποίοι προσδένονται στις γαλεκτίνες. Ωστόσο, οι πηκτίνες δεν είναι αφομοιώσιμες στον ανθρώπινο εντερικό σωλήνα και οι χημικές τροποποιήσεις τους μπορεί να αυξήσουν την απορροφητικότητά τους. Θα πρέπει επίσης να αναφερθεί ότι οι πηκτίνες προκαλούν βιολογικές επιδράσεις ανεξάρτητες από την πρόσδεσή τους στις γαλεκτίνες. Επομένως απαιτείται περαιτέρω μελέτη και έρευνα όσον αφορά τους μηχανισμούς μέσω των οποίων οι πηκτίνες προκαλούν τις βιολογικές τους επιδράσεις. Ένας από τους πιο μελετημένους ανταγωνιστές της γαλεκτίνης-3 είναι η τροποποιημένη πηκτίνη εσπεριδοειδών (*MCP*), η οποία λαμβάνεται με μερική υδρόλυση της πηκτίνης εσπεριδοειδών [145]. Λειτουργικά, η *MCP* προσδένεται στη γαλεκτίνη-3 και αναστέλλει την πρόσδεση της στα ενδοθηλιακά κύτταρα και, κυρίως, την προσκόλληση των όγκων του μαστού. Επιπλέον,

η θεραπεία με *MCP* επάγει σημαντικές μεταβολικές αλλαγές στα μακροφάγα που σχετίζονται με τον όγκο, γεγονός που επηρεάζει την ανάπτυξη και τη μετάστασή του. Η χορήγηση *MCP* αναστέλλει την ανάπτυξη, την αγγειογένεση και τη μετάσταση του μελανώματος, του θυρεοειδούς, του μαστού και του παχέος εντέρου, καθώς και την αυθόρμητη μετάσταση σε ένα μοντέλο καρκίνου του προστάτη ποντικού [143]. Πρόσφατα, χρησιμοποιήθηκαν πολύ-λειτουργικά γλυκονανοσωματίδια που στοχεύουν στη γαλεκτίνη-3, που έφεραν *MCP*. Αυτά τα νανοσωματίδια έχει δείχθει ότι μειώνουν την κυτταρική προσκόλληση και επηρεάζουν σημαντικά στάδια εξέλιξης του καρκίνου [135, 145]. Η *MCP* διατίθεται στο εμπόριο ως συμπλήρωμα διατροφής και μέχρι σήμερα έχουν ολοκληρωθεί δύο κλινικές μελέτες για τη θεραπευτική της χρήση για το νεόπλασμα του προστάτη (*FDA*, *NCT01681823*, κλινική φάση 2) και την υπέρταση (*NCT01960946*). Επιπλέον, έχει ξεκινήσει μια κλινική μελέτη φάσης 3 για την *MCP* ως θεραπευτική προσέγγιση για την οστεοαρθρίτιδα του γόνατος (*NCT02800629*), αλλά τα αποτελέσματα είναι ακόμα άγνωστα [135].

Επιπλέον, έχουν αναφερθεί πολλά ανάλογα των *MCPs* όπως είναι τα *PectaSol-C*, *GCS-100*, *GM-CT-01* και *GR-MD-02*. Το *PectaSol-C* έχει μοριακό βάρος που κυμαίνεται από 5-10 kDa με 5% περιεκτικότητα σε μονογαλακτουρονικό οξύ. Μελέτες *in vitro* ανέφεραν την αποτελεσματικότητα της *PectaSol-C MCP* στον καρκίνο του προστάτη, του μαστού και των ωοθηκών, ιδίως εάν χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με άλλες θεραπείες [135, 143]. Είναι ενδιαφέρον ότι κλινικές μελέτες φάσης 2 έδειξαν ενθαρρυντικά βιολογικά αποτελέσματα σε ασθενείς με καρκίνο του προστάτη (*NCT01681823*). Ένα άλλο ανάλογο, ο *GCS-100*, ένας σύνθετος πολυσακχαρίτης που παρασκευάζεται από τροποποιημένη πηκτίνη εσπεριδοειδών, έχει αναδειχθεί ως θεραπευτική αγωγή για διάφορες μορφές του πολλαπλού μυελώματος, συμπεριλαμβανομένων εκείνων που εμφανίζουν ανθεκτικότητα στη δεξαμεθαζόνη, τη μελφαλάνη και τη δοξορουβικίνη. Η *GCS-100* δρα ανταγωνιστικά καθώς προσδένεται στη γαλεκτίνη-3 και παρεμποδίζει την πρόσδεσή της στα λεμφοκύτταρα *CD4+* και *CD8+* που διηθούνται από τον όγκο, ενισχύοντας την κυτταροτοξικότητα και αποκαθιστώντας την έκκριση *IFN-γ*. Συνολικά, αυτά τα πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα οδήγησαν τη *La Jolla Pharmaceuticals* να ξεκινήσει κλινικές δοκιμές για την ένωση *GCS-100* (*NCT00514696*). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το 25% των ασθενών εμφάνισε μερική ανταπόκριση. Επιπλέον, η χρήση του *GCS-100* έχει επίσης αξιολογηθεί στη χρόνια νεφρική νόσο (φάση 1 *NCT01717248* και φάση 2a *NCT01843790*) [135, 143].

Ένας άλλος πολυσακχαρίτης που προέρχεται από πηκτίνη και μπορεί να αναστέλλει τις γαλεκτίνες είναι ο *GM-CT-01* ή *DAVANAT®*. Αυτός ο πολυσακχαρίτης εξάγεται από σπόρους γκουάρ, υποβάλλεται σε ελεγχόμενη μερική χημική αποικοδόμηση και ανακαλύφθηκε από την *Galectin Therapeutics*. Η ραχοκοκαλιά της γαλακτομαννάνης του πολυσακχαρίτη αποτελείται από (1,4)-συνδεδεμένες μονάδες β-D-μαννοπυρανοσυλίου, στις οποίες συνδέεται ένα απλό α-D-γαλακτοπυρανοσύλιο με (1,6)-δεσμό. *In vitro*, το *GM-CT-01* ενισχύει τις κυτταροτοξικές ιδιότητες των λεμφοκυττάρων *CD8(+)* που διηθούν τον όγκο και την ικανότητά τους να παράγουν *IFN-γ*. Πράγματι, αυτή η πηκτίνη εμποδίζει τις γλυκοζυλιωμένες κυτταροκίνες να προσδεθούν στη γαλεκτίνη-3. Επιπλέον, τέτοιες μελέτες έδειξαν ευεργετικά αποτελέσματα του *GM-CT-01* σε μοντέλα καρκίνου του παχέος εντέρου. Μια κλινική μελέτη

φάσης 1 (NCT00054977) έδειξε ότι η GM-CT-01 ήταν αποτελεσματική σε διαφορετικούς τύπους όγκων [135, 143].

Η *Galectin Therapeutics* ανέπτυξε επίσης τον πολυσακχαρίτη GR-MD-02 (μπελαπεκτίνη) από πηκτίνη μήλου μέσω χημικής τροποποίησης. Ο GR-MD-02 αποτελείται από γαλακτουρονικό οξύ, γαλακτόζη, αραβινόζη, ραμνόζη και μικρότερες ποσότητες άλλων σακχάρων. Η ένωση αυτή εμφανίζει αγχιστεία για τη γαλεκτίνη-1 αλλά υψηλότερη για τη γαλεκτίνη-3. Η χορήγηση GR-MD-02 προκάλεσε σημαντική μείωση της ηπατικής ίνωσης σε πειραματικά μοντέλα μη αλκοολικής στεατοηπατίτιδας. Μία κλινική μελέτη φάσης 1 που ολοκληρώθηκε το 2015 (NCT01899859) την χρησιμοποίησε ως αγωγή σε άτομα με NASH και προχωρημένη ηπατική ίνωση. Με βάση τα θετικά αποτελέσματα, η *Galectin Therapeutics*, ξεκίνησε δύο μελέτες φάσης 2, η μία για ασθενείς με προχωρημένη ηπατική ίνωση (NCT02421094) και η δεύτερη σε ασθενείς με κίρρωση του ήπατος (NCT02462967). Η χρήση της GR-MD-02 δεν εμφάνισε σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες, αλλά η θεραπεία δεν εμφάνισε στατιστικά σημαντική διαφορά στη θεραπεία της ίνωσης. Οι χρηματοδοτούμενες μελέτες από το *Providence Portland Medical Center* της GR-MD-02 με ταυτόχρονη χορήγηση του *Pembrolizumab* σε ασθενείς με μελάνωμα διεξάγονται σήμερα (NCT02117362, NCT02575404, NCT04987996) [135].

Τέλος, η *BioOxyTran* ανέπτυξε πρόσφατα μια διά του στόματος χορηγούμενη ένωση, την *ProLectin-M* και διερεύνησε την αποτελεσματικότητά της σε ασθενείς με COVID-19 που εμφάνιζαν ήπια έως μέτρια συμπτώματα και δεν χρειάστηκαν υποστήριξη με οξυγόνο (NCT04512027). Ο στόχος ήταν η πρόσδεση της ένωσης στη Ν-τελική περιοχή της πρωτεΐνης ακίδας τους SARS-CoV-2 η οποία εμφανίζει υψηλή δομική ομολογία με την ανθρώπινη γαλεκτίνη-3 και η μείωση της μετάδοσης του ιού. Τα αποτελέσματα τα οποία έγιναν πρόσφατα διαθέσιμα, έδειξαν ότι όλα τα άτομα ήταν αρνητικά με RT-PCR για τον SARS-CoV-2 από την 3^η μέρα και μετά. Μετά από αυτά τα αποτελέσματα, η εταιρεία ξεκίνησε δύο νέες μελέτες, φάσης 1b/2a (NCT05733780) και φάσης 3 (NCT05096052) για την αξιολόγηση της ασφάλειας, της αποτελεσματικότητας και της φαρμακοκινητικής της από διά του στόματος χορήγησης της *ProLectin-M*, αλλά τα αποτελέσματα δεν έχουν ανακοινωθεί ακόμα [135]. Η *BioOxyTran* μετά από τα θετικά αποτελέσματα από τη δια του στόματος χορήγησης της *ProLectin-M* σε ασθενείς με COVID-19, ανέπτυξε μερικά ενδοφλέβια ενέσιμα φάρμακα με βάση την *ProLectin-M* (*ProLectin-I*, *ProLectin-F*, *ProLectin-V* και *ProLectin-A*) για διάφορες ιογενείς νόσους, συμπεριλαμβανομένων της COVID-19, της γρίπης, της πνευμονικής ίνωσης, της ευλογιάς των πιθήκων, του έμπολα και του ARDS. Η *Glycomimetics* συνθέτει γλυκομιμητικούς ανταγωνιστές μικρού μοριακού βάρους έναντι της γαλεκτίνης-3 για τη θεραπεία του καρκίνου, ινωτικών παθήσεων και πρόσφατα ανακάλυψαν μια ισχυρή ένωση την GMI2093. Επιπρόσθετα, η *Galectin Therapeutics* έχει ξεκινήσει ένα πρόγραμμα εύρεσης υδατανθρακικών ενώσεων μικρού μοριακού βάρους, τόσο υποδόριας όσο και διά του στόματος χορήγησης. Το 2018, η *G3 Pharmaceuticals* σύναψε συμφωνία αποκλειστικής άδειας χρήσης με το *Henry Ford Health System* για το σχεδιασμό ανταγωνιστών της γαλεκτίνης-3 για τη θεραπεία της καρδιακής ανεπάρκειας. Η *GlycoMantra*, αναπτύσσει ανασυνδυασμένους ανταγωνιστές της γαλεκτίνης-3 με βάση χημικές τροποποιήσεις του

φαρμάκου *TFD100*. Έχουν επίσης, αναπτυχθεί αρκετοί ανταγωνιστές (όπως οι *GM101*, *GM102* κ.λπ.) που εμφανίζουν συγγένεια για τη γαλεκτίνη-3 της τάξεως των *ρM*. Συνεπώς, είναι πιθανό σύντομα να αναπτυχθεί μια στοχευμένη θεραπεία η οποία θα διαταράσσει τα σύμπλοκα της γαλεκτίνης-3 με τους φυσικούς προσδέτες [136].

Ο κυτταρικός εντοπισμός της γαλεκτίνης-3 αποτελεί μία πρόκληση. Η ενδοκυτταρική γαλεκτίνη-3 συνδέεται γενικά περισσότερο με αποπτωτικά μονοπάτια ή μονοπάτια επιβίωσης. Ενώσεις με κυτταροδιεισδυτικότητα που θα στοχεύουν την ενδοκυτταρικά εκφραζόμενη γαλεκτίνη-3 θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την ενεργοποίηση της απόπτωσης σε κακοήγη κύτταρα που υπερεκφράζουν γαλεκτίνη-3, ενώ η στόχευση εξωκυτταρικής γαλεκτίνης-3 θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία φλεγμονωδών και ινωτικών καταστάσεων. Μέχρι σήμερα, δεν έχουν αναφερθεί ζητήματα ασφάλειας με τους αναστολείς εξωκυτταρικής στόχευσης **GB0139** ή **GR-MD-02**. Εναλλακτικές στρατηγικές για την ανακάλυψη μη υδατανθρακικών χημικών ενώσεων αναδύονται όλο και περισσότερο, αλλά το θεραπευτικό τους δυναμικό δεν έχει ακόμη αποδειχθεί. Μια άλλη ανεκμετάλλευτη δυνατότητα είναι η πρόσδεση μονοκλωνικών αντισωμάτων στην *CRD* της γαλεκτίνης-3 τα οποία θα εμφανίζουν επιλεκτικότητα ως προς την πρωτεΐνη-στόχο. Τέλος, η στόχευση της *ND*, που εμπλέκεται στον ολιγομερισμό της γαλεκτίνης-3, είναι μια ενδιαφέρουσα αναδυόμενη πρόταση, αν και η ευκαμψία της περιοχής αυτής καθώς και η ευαισθησία που εμφανίζει στην πρωτεόλυση, δυσκολεύει το δομικό χαρακτηρισμό της *ND*, για παράδειγμα, με κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ. Καθώς ορισμένες λειτουργίες της γαλεκτίνης-3 πλήρους μήκους ρυθμίζονται από τη φωσφορυλίωση, τότε ο περαιτέρω δομικός χαρακτηρισμός της *ND* θα διευρύνει την τρέχουσα κατανόηση των πολυλειτουργικών ρόλων της *in vivo* και μπορεί να οδηγήσει στη μελλοντική ανάπτυξη νέων/μη υδατανθρακικών αναστολέων που στοχεύουν στη χημειοκινετική γαλεκτίνη-3 [18, 135–137].

1.8 Γαλεκτίνες ως θεραπευτικοί στόχοι

Όπως αναφέρθηκε και εκτενέστερα παραπάνω, οι γαλεκτίνες αποτελούνται από μια καλά συντηρημένη επικράτεια, με μέγεθος περίπου 130 αμινοξικών καταλοίπων, στην οποία προσδένονται υδατάνθρακες που αποτελούνται από β-γαλακτοζίτες. Η επιλεκτικότητα αυτή προσδίδει στην οικογένεια την ικανότητα να ρυθμίζει μία πληθώρα βιολογικών λειτουργιών. Παρόλο την υψηλή συντήρηση, η επιλεκτικότητα της κάθε γαλεκτίνης είναι διαφορετική και προκαλείται από τα αμινοξικά κατάλοιπα των μη καλά συντηρημένων περιοχών της επικράτειας. Εμπλέκονται και ρυθμίζουν πολλές παθολογικές καταστάσεις όπως είναι ο καρκίνος, καρδιοαγγειακές παθήσεις, νευρολογικές παθήσεις, στην απόκριση του ανοσοποιητικού συστήματος, στις αυτοάνοσες ασθένειες κτλ [25, 121]. Πολλές μελέτες έχουν αναδείξει τις γαλεκτίνες ως θεραπευτικούς στόχους για τη θεραπεία πολλών ασθενειών. Οι φυσικοί προσδέτες των γαλεκτίνων δεν είναι τόσο ισχυροί έτσι ώστε να μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ενώσεις για θεραπευτική προσέγγιση πολλών ασθενειών. Για παράδειγμα η λακτόζη προσδένεται στη γαλεκτίνη-3 με σταθερά πρόσδεσης μεταξύ 0.04-

1 mM, στη γαλεκτίνη-4 με σταθερά πρόσδεσης 0,9-2,0 mM και στις γαλακτίνες-7, -10 και -13 με αρκετά πιο υψηλή σταθερά πρόσδεσης, ενώ η N-ακετυλολακτοζαμίνη προσδένεται πιο ισχυρά με σταθερά πρόσδεσης 50 μM στη γαλεκτίνη-1, 30-200 μM στη γαλεκτίνη-3, 1-2 mM στη γαλεκτίνη-4. Αρκετές, μέχρι σήμερα, προσπάθειες έχουν πραγματοποιηθεί με στόχο την εύρεση ανταγωνιστών που θα προσδένονται ισχυρά και θα εμφανίζουν ειδικεύση ως προς τα μέλη της οικογένειας των γαλεκτινών. Οι ανταγωνιστές αυτοί μπορεί να είναι είτε ενώσεις με βάση υδατάνθρακες ή φυσικούς προσδέτες των γαλεκτινών και στοχεύουν την CRD, σύνθετοι υδατάνθρακες φυτικής προέλευσης που αποτελούνται από μόρια γαλακτόζης και πεπτιδομιμητικά που στοχεύουν άλλες περιοχές των γαλεκτινών και επηρεάζουν τη συγγένεια και την πρόσδεση στην CRD [146]. Οι πρώτες ενώσεις που σχεδιάστηκαν αποτελούνται από χημικά τροποποιημένους μονο- ή δισακχαρίτες οι οποίοι βασίζονται στη δομή της γαλακτόζης, της λακτόζης, της TDG, της ταλόζης και της λακτουλόζης. Οι ενώσεις αυτές δρουν ανταγωνιστικά, ικανές να προσδένονται στην CRD των γαλεκτινών εμποδίζοντας την πρόσδεση των φυσικών προσδετών. Έχουν αναπτυχθεί αρκετές τροποποιήσεις των φυσικών προσδετών με στόχο τη βελτίωση της συγγένειας. Πιο συγκεκριμένα, η προσθήκη ενός ατόμου θείου στο γλυκοζιτικό δεσμό στην TDG καθιστά το μόριο πιο ανθεκτικό στις γλυκοζιδάσες. Προκλινικές μελέτες έδειξαν ότι η χορήγηση της TDG μειώνει τη μεταστατική ικανότητα καρκίνου του πνεύμονα, του μαστού και τους παχέος εντέρου σε ποντίκια, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω [143, 144]. Οι πηκτίνες είναι μια άλλη κατηγορία ανταγωνιστών που προσδένονται στην οικογένεια των γαλεκτινών. Ένα μεγάλο εύρος τέτοιων ενώσεων έχουν συντεθεί, έχουν μελετηθεί και έχουν αποδειχθεί ότι αποτελούν υποσχόμενοι ανταγωνιστές έναντι των γαλεκτινών και αποτελούν μια εν δυνάμει νέα θεραπευτική προσέγγιση. Ωστόσο, οι ενώσεις αυτές έχουν μικρό χρόνο ημιζωής και μη αποτελεσματική βιοκατανομή. Ένα καλό παράδειγμα αυτών των αναστολέων της γαλεκτίνης είναι το *Davanat* (GM-CT-01) ή η τροποποιημένη πηκτίνη εσπεριδοειδών (MCP), φυσικοί πολυσακχαρίτες με ανασταλτική δράση έναντι των γαλεκτινών. Επιπλέον, γίνονται μελέτες για την εύρεση ενώσεων με βάση τους υδατάνθρακες με βελτιωμένες φαρμακοκινητικές ιδιότητες. Μία νέα προσέγγιση αποτελεί η δημιουργία νανοσωματιδίων ή βιοϋλικών που θα φέρουν, έπειτα από χημική τροποποίηση, υποκαταστάτες και ομάδες υδατανθρακικής φύσεως που θα εμφανίζουν συγγένεια και επιλεκτικότητα έναντι του κάθε μέλους της οικογένειας των λεκτινών. Εκτός από τη βελτίωση των φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων, αυτά τα νανοσωματίδια ή τα βιοϋλικά μπορούν επίσης να χρησιμεύσουν ως φορείς μεταφοράς κυτταροτοξικών φαρμάκων προς καρκινικούς όγκους [147]. Επιπλέον, έχουν αναφερθεί ενώσεις που δεν αλληλεπιδρούν άμεσα με τη CRD των γαλεκτινών και λειτουργούν ως αλλοστερικοί τροποποιητές καθώς προσδένονται σε περιοχές εκτός των CRDs αλλά προκαλούν αλλαγές σε αυτή την περιοχή, επηρεάζοντας τη συγγένεια ως προς την πρόσδεση των φυσικών προσδετών και κατ' επέκταση των βιολογικών λειτουργιών των γαλεκτινών. Για παράδειγμα, η *in vivo* πρόσδεση της γαλεκτίνης-1 με το μόριο λακτόζη-πουρπουρινιμίδη μείωσε την ανάπτυξη ινοσάρκωματος που προκλήθηκε από ακτινοβολία. Η ανάλυση μοριακής μοντελοποίησης έδειξε ότι η ένωση αυτή δεν προσδένεται στην CRD. Παρόμοιες μελέτες με πορφυρίνη συνδεδεμένη με γαλακτόζη κατέδειξαν αντικαρκινικά αποτελέσματα

σε καρκίνους της ουροδόχου κύστης. Στην περίπτωση αυτή, η πρόσδεση αυτής της ένωσης με τη γαλεκτίνη-1 δημιουργεί οξειδωτικό στρες και απόπτωση των καρκινικών κυττάρων που υπερεκφράζουν αυτή τη γαλεκτίνη. Ωστόσο, η αλλοστερική ρύθμιση μπορεί επίσης να πραγματοποιηθεί με τη χρήση μη υδατανθρακικών μορίων. Οι μη υδατανθρακικές ενώσεις περιλαμβάνουν ετεροκυκλικές ενώσεις, ή βασίζονται σε πεπτίδια και πεπτιδομιμητικά, όπως το OTX008 (PTX008/*Calixarene* 0118) που είναι ένας αλλοστερικός ανταγωνιστής της γαλεκτίνης-1 ή το *Anginex* (β -per25) που είναι ένα συνθετικό πεπτίδιο που προσδένεται στη γαλεκτίνη-1 και παρουσιάζει αντι-αγγειογενετική και αντικαρκινική δράση [147]. Η φαρμακοκινητική και η αντικαρκινική δράση του OTX008 ή σε συνδυασμό με άλλες θεραπείες αξιολογήθηκαν σε ασθενείς με μελάνωμα και καρκίνο του θυρεοειδούς και των ωοθηκών. Πραγματοποιήθηκε μια μελέτη φάσης 1 του OX008 σε ασθενείς με προχωρημένους όγκους (NCT01724320), ωστόσο δεν έχουν αναφερθεί τα αποτελέσματα [143, 147]. Παράλληλα, έχει αναπτυχθεί ένα πεπτίδιο ειδικού αντιγόνου *Thomsen-Friedenreich* (P-30) με ικανότητα πρόσδεσης στη γαλεκτίνη-3. Η εύρεση αυτή οδήγησε στην ανακάλυψη νέων πεπτιδίων. Τα πεπτίδια αυτά προσδένονται στην CRD της γαλεκτίνης-3 και το καλύτερο εμφανίζει συγγένεια πρόσδεσης της τάξεως των μM . Ωστόσο, δεν έχουν αναφερθεί λειτουργικές μελέτες για τα πεπτίδια αυτά [143, 147]. Θεραπευτική προσέγγιση αποτελεί και η χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων (*mAb*) έναντι των γαλεκτινών, τα οποία θα εμφανίζουν υψηλή εκλεκτικότητα. Ανάλογα με τα *mAbs* μπορούν να προσδένονται είτε στην CRD ή σε άλλες περιοχές δρώντας ως αλλοστερικοί ρυθμιστές. Για παράδειγμα, έχει βρεθεί ένα αντίσωμα το οποίο αναγνωρίζει και προσδένεται σε επίτοπο εκτός της CRD της γαλεκτίνης-1 και εμφανίζει υψηλή συγγένειας περίπου στα 500 nM . Επιπλέον, έχουν αναφερθεί και *mAbs* που στοχεύουν τη γαλεκτίνη-3 τόσο στην CRD όσο και σε περιοχές εκτός. Ωστόσο, η χρήση *mAbs* εμφανίζει αρκετά μειονεκτήματα όσον αφορά τη βιοκατανομή τους, καθώς προσδένονται μόνο στις εξωκυττάρια γαλεκτίνες και την επιλεκτικότητά τους. Απαιτούνται περισσότερες μελέτες και έρευνες για την κατανόηση του τρόπου δράσης τους καθώς και για την σωστή χρήση τους ως εν δυνάμει θεραπευτική προσέγγιση [143]. Τέλος, πολλές μελέτες πραγματοποιούνται για την χρήση της παρεμβολής *RNA* για τον έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης των γαλεκτινών. Οι στρατηγικές παρεμβολής *RNA* περιλαμβάνουν παροδικούς (*siRNA*) ή σταθερούς (φορείς που κωδικοποιούν *shRNA*) τελεστές. Αυτή η στρατηγική θα μπορούσε να είναι αποτελεσματική καθώς η νουκλεοτιδική αλληλουχία των γαλεκτινών δεν είναι τόσο συντηρημένη όσο η αμινοξική. Η συγγένεια και η επιλεκτικότητα καθιστούν το *siRNA* και τις χημικές του τροποποιήσεις μια αποτελεσματική προσέγγιση για την αναστολή οποιουδήποτε στόχου μέσω της μείωσης της γονιδιακής τους έκφρασης και η αξιολόγησή τους σε κλινικές δοκιμές είναι πολλά υποσχόμενη. Αν και τα φάρμακα που βασίζονται στη δημιουργία συμπλόκων με τις πρωτεΐνες εμφανίζουν υψηλή ειδίκευση, οι στόχοι τους περιορίζονται κυρίως στους υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας ή στις εξωκυττάρια πρωτεΐνες. Αντίθετα, η ειδική αποικοδόμηση του μεταγράφου της γαλεκτίνης από το *siRNA* οδηγεί σε σημαντική μείωση της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης, επηρεάζοντας τις λειτουργίες στις οποίες εμπλέκονται οι γαλεκτίνες. Ωστόσο, πρέπει να επιλυθούν διάφορα εμπόδια πριν τεθεί το *siRNA* σε κλινική χρήση. Πρώτον, μια επιλεκτική βιοκατανομή

αποφεύγοντας μια μη ειδική βιοκατανομή που θα ήταν υπεύθυνη για ανεπιθύμητες ενέργειες καθώς και η βελτίωση της σταθερότητας του *siRNA* και η αύξηση της ημιζωής τους σε βιολογικά υγρά. Έχουν αναπτυχθεί ειδικά συστήματα, χημικά τροποποιημένα *RNA* και νανοσωματίδια, για την προστασία του *siRNA* από την αποικοδόμησή του από νουκλεάσες και τη μεταφορά του στις περιοχές στόχους. Αυτές οι στρατηγικές έχουν δείξει αποτελεσματικότητα σε κάποιο βαθμό. Ωστόσο, όλες αυτές οι προσεγγίσεις αντιμετωπίζουν διαφορετικά προβλήματα σχετικά με την ασφάλεια, το κόστος παραγωγής και συχνά κακή συσχέτιση μεταξύ *in vitro* και *in vivo* αποτελεσματικότητας, καθιστώντας την ανάπτυξή τους μια σημαντική πρόκληση. Από την άλλη πλευρά, η ενδογενής έκφραση αρκετών γαλεκτινών υπόκειται σε γονιδιακό έλεγχο από *miRNAs*. Έχει αναφερθεί ότι τα *miRNA*-22 και -2467 ρυθμίζουν την έκφραση της γαλεκτίνης-1, τα *miR*-424-3p, -873 και -128 ρυθμίζουν τη γαλεκτίνη-3, *miR*-1236-3p ρυθμίζει τη γαλεκτίνη-8 και τα *miR* -455-5p και -22 ρυθμίζουν τη γαλεκτίνη-9. Η εύρεση αυτή οδηγεί την ανάπτυξη νέων θεραπευτικών στρατηγικών. Για παράδειγμα, έχει αποδειχθεί ότι η ρεσβερατρόλη προκαλεί τη μεταγραφή του *miR*-424-3p, η οποία καταστέλλει την έκφραση της γαλεκτίνης-3. Ωστόσο, απαιτείται αρκετή μελέτη όσον αφορά την αποτελεσματικότητα μάς τέτοιας στρατηγικής [143, 144].

Αρκετές είναι οι προκλήσεις για την ανακάλυψη και ανάπτυξη εν δυνάμει φαρμάκων έναντι των μελών της οικογένειας των γαλεκτινών. Αρχικά, ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα είναι η ειδικότητα, λόγω της υψηλής αμινοξικής ομολογίας και της υψηλής συντήρησης. Επιπλέον, αρκετά μέλη της οικογένειας όπως οι γαλεκτίνες 8, 9, 12 εμφανίζουν πολλές ισομορφές. Επιπλέον, μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των γαλεκτινών δημιουργούν διαφορετικές παραλλαγές. Επιπρόσθετα, οι τεταρτοταγείς δομικές διαμορφώσεις των γαλεκτινών εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από τις ιδιότητες του μικροπεριβάλλοντος. Για παράδειγμα, η ισορροπία μεταξύ των μονομερών και των διμερών της γαλεκτίνης-1 εξαρτάται από την οξειδοαναγωγική κατάσταση του κυτταρικού μικροπεριβάλλοντος. Σε αυτό το πλαίσιο, οι θεραπευτικές στρατηγικές μέσω γονιδιακής ρύθμισης ίσως είναι οι μοναδικές εναλλακτικές από την άποψη της εξειδίκευσης.

Η εξειδίκευση του ανταγωνιστή είναι ένα σημαντικό σημείο, καθώς διαφορετικά μέλη γαλεκτινών συχνά προκαλούν αντίθετα βιολογικά αποτελέσματα. Επομένως, τα *in vivo* βιολογικά αποτελέσματα μπορεί να είναι πολύπλοκα εάν οι ενώσεις αναστέλλουν ταυτόχρονα διαφορετικά μέλη της οικογένειας. Σημαντικό εμπόδιο αποτελεί η φαρμακοκινητική καθώς και η βιοκατανομή των ενώσεων. Αρκετές από αυτές τις ενώσεις είναι πολικά μόρια, χαμηλού μοριακού βάρους, με διαφορετικές ικανότητες ως προς τη διάχυση μέσω της πλασματικής μεμβράνης και τη δράση τους στις ενδοκυτταρικές γαλεκτίνες. Οι ενώσεις μεγάλου μοριακού βάρους καθώς και τα *mAbs* πιθανότατα προσδένονται μόνο στις εξωκυτταρικές γαλεκτίνες. Επιπλέον, πολλές από αυτές τις ενώσεις παγιδεύονται σε όργανα με υψηλή ροή αίματος, όπως το ήπαρ, και αδρανοποιούνται μέσω μεταβολικών διεργασιών. Επιπλέον, άλλες φαρμακοκινητικές ιδιότητες μπορούν επίσης να ληφθούν υπόψη. Ειδικότερα, πολλοί από τους αναστολείς είναι ευαίσθητοι στην ενζυμική υδρόλυση από γλυκοζιδάσες, πρωτεάσες ή νουκλεάσες. Ως εκ τούτου, η ανάπτυξη

ανθεκτικών στην αποικοδόμηση ενώσεων με εκλεκτική βιοκατανομή θα ήταν ιδιαίτερα επιθυμητή [121, 143, 148].

1.9 Ορθολογικός σχεδιασμός φαρμάκων κατευθυνόμενος από τη δομή

Οι παραδοσιακές μέθοδοι ανακάλυψης φαρμάκων βασίζονταν μέσω τυχαίας διαλογής φυσικών προϊόντων και παρατήρησης των αποτελεσμάτων σε γνωστές ασθένειες. Μπορεί να χρειαστούν πολλά χρόνια έρευνας για να μετατραπεί μια φαρμακευτική ουσία σε φάρμακο που θα είναι αποτελεσματικό και ανεκτό από τον ανθρώπινο οργανισμό. Το ποσοστό επιτυχίας είναι αρκετό χαμηλό καθώς πολλές ενώσεις δεν μπορούν να περάσουν τις κλινικές μελέτες ή μπορεί να εμφανίζουν αρκετές παρενέργειες. Στις αρχές της δεκαετίας του 1980, η δυνατότητα ορθολογικού σχεδιασμού φαρμάκων με τη χρήση πρωτεϊνικών δομών αποτελούσε ανεκπλήρωτο στόχο για πολλούς επιστήμονες. Οι πρώτες μελέτες ξεκίνησαν στα μέσα της δεκαετίας του '80 και στις αρχές της δεκαετίας του '90. Ωστόσο, η ολοκλήρωση της χαρτογράφησης του ανθρώπινου γονιδιώματος, η ταχύτατη εξέλιξη της πρωτεομικής και της δομικής γονιδιωματικής καθώς και η εξέλιξη των βιοπληροφορικών συστημάτων οδήγησαν σε ταχεία άνθηση της μεθόδου. Σήμερα, οι μέθοδοι δομικής και μοριακής βιολογίας συμβάλλουν στην ταχύτερη και πιο αποδοτική από πλευράς κόστους ανακάλυψη πρωτοπόρων ουσιών σε σχέση με τις παραδοσιακές μεθόδους ανακάλυψης φαρμάκων. Τεχνικές της δομικής βιολογίας και πιο συγκεκριμένα, η κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ καθώς και ο πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός (*NMR*) χρησιμοποιούνται ευρέως ώστε να σχεδιαστούν ενώσεις με μεγάλη αγκιστεία ως προς τα μόρια στόχους. Πρώτο βήμα στη μέθοδο του κατευθυνόμενου από τη δομή σχεδιασμού φαρμάκων (*SBDD*, *Structure Based Drug Design*) αποτελεί η εύρεση του στόχου. Η επιλογή ενός φαρμακευτικού στόχου γίνεται σε βιολογική και βιοχημική βάση και μπορεί να είναι είτε πρωτεΐνη είτε νουκλεϊκά οξέα. Οι πρωτεΐνες και τα ένζυμα αποτελούν τους κύριους στόχους του *SBDD* καθώς εμπλέκονται σε αρκετές παθολογικές καταστάσεις, μέσω βλαβών στη ρύθμιση ή στη λειτουργία τους. Ο *SBDD* επικεντρώνεται στην τρισδιάστατη (3D) δομή των πρωτεϊνών-στόχων και των ασθενειών σε μοριακό επίπεδο. Πρόκειται για μια επαναληπτική διαδικασία με πολλαπλούς κύκλους που εκτελούνται για να οδηγηθεί το βελτιστοποιημένο υποψήφιο φάρμακο σε κλινική δοκιμή [149, 150]. Ο πρώτος κύκλος αποτελείται από την κλωνοποίηση του ανθρώπινου γονιδίου, την υψηλή έκφραση, τον καθαρισμό και το δομικό και βιοχημικό χαρακτηρισμό της πρωτεΐνης-στόχου. Η εύρεση της τρισδιάστατης δομής μπορεί να γίνει μέσω της κρυσταλλογραφίας ακτίνων-Χ, *NMR* και κρυο-ηλεκτρονικής μικροσκοπίας (*Cryo-EM*). Οι τεχνικές αυτές φέρουν αρκετά πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα. Η κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ αποτελεί την πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική και μπορεί να παρέχει δεδομένα υψηλής ευκρίνειας, παρέχοντας τη δυνατότητα παρατήρησης μορίων ύδατος ή μετάλλων τα οποία εμφανίζουν σημαντικό ρόλο στη σταθερότητα αλλά και στη δράση των πρωτεϊνών. Τα δεδομένα αυτά είναι απαραίτητα για τον *SBDD*. Ακολούθως, απαιτείται η εύρεση μιας ένωσης οδηγού η οποία θα χρησιμοποιηθεί ως βάση για τη δημιουργία άλλων ενώσεων. Ως ένωση οδηγός μπορεί να είναι το φυσικό υπόστρωμα της

πρωτεΐνης στόχου ή κάποιοι συμπαράγοντες [149, 151]. Νέες ενώσεις οδηγοί μπορούν να βρεθούν μέσω υψηλής απόδοσης διαλογή συλλογών (*HTS*), κρυσταλλογραφίας συγγένειας, σχεδιασμού φαρμάκων μέσω θραυσμάτων (*FBDD*) και μέσω του σχεδιασμού φαρμάκων *in silico* (*CADD*).

Η διαλογή υψηλής απόδοσης αποτελεί μία μέθοδο για την εύρεση ενώσεων οδηγών που μπορούν περαιτέρω να τροποποιηθούν χημικά για το σχεδιασμό εν δυνάμει φαρμάκων. Η *HTS* είναι αρκετά αυτοματοποιημένη ώστε με χαμηλό κόστος και σε σύντομο χρονικό διάστημα να δοκιμάζονται πολλές ενώσεις έναντι ενός συγκεκριμένου στόχου. Το ποσοστό επιτυχίας κυμαίνεται περίπου στο 50%. Η μέθοδος αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί και σε πρωτεϊνικούς κρυστάλλους, αλλά αποτελεί αρκετά δαπανηρή και χρονοβόρα μέθοδος. Ως εκ τούτου, μόνο τα αρχικά ευρήματα χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση του τρόπου πρόσδεσης τους στην πρωτεΐνη-στόχο με επακόλουθη βελτιστοποίηση [152].

Ο σχεδιασμός φαρμάκων με βάση τα θραύσματα ενώσεων χρησιμοποιείται για την εύρεση μικρών χημικών ενώσεων, από μικρές βιβλιοθήκες μικρών και απλών μορίων, που θα προσδένονται σε ένα μεγάλο εύρος θεραπευτικών στόχων. Η διαφορά μεταξύ της *HTS* και του *FBDD* εμφανίζεται στις βιβλιοθήκες διαλογής, με την πρώτη τεχνική να αποτελείται από μεγαλύτερες βιβλιοθήκες με μεγαλύτερα μόρια. Αρχικά, τα θραύσματα αξιολογούνται με βάση την πρόσδεσή τους στην πρωτεΐνη-στόχο με δομικές μελέτες και μέσω βιοφυσικών μελετών μπορεί να βρεθεί η σταθερά πρόσδεσής τους. Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι πολλά θραύσματα μπορούν να προσδεθούν σε κοντινές περιοχές της πρωτεΐνης-στόχου. Η ένωση αυτών για τη δημιουργία μιας μεγαλύτερης ένωσης μπορεί να οδηγήσει σε μια ένωση υψηλότερης συγγένειας και ειδικότητας. Σημαντικό βήμα σε αυτή τη μέθοδο όπως και στην *HTS* αποτελεί η χημική τροποποίηση των αρχικών ευρημάτων, ωστόσο, πολλές ενώσεις δεν μπορούν να συντεθούν στο εργαστήριο [153].

Ο σχεδιασμός φαρμάκων *in silico* χρησιμοποιείται στη διαλογή πολλών ενώσεων, οι οποίες στη συνέχεια θα τροποποιηθούν ως προς τη συγκεκριμένη πρωτεΐνη-στόχο. Για την κατασκευή κατάλληλων μοντέλων ελλιμενισμού (*docking*) χρησιμοποιούνται δεδομένα από κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ και μελετών *NMR*, ωστόσο αν δεν υπάρχουν δεδομένα, κατασκευάζονται μοντέλα ομόλογου συνδυασμού με χρήση υπολογιστών. Μέσω αλγορίθμων πολλές ενώσεις ελέγχονται εάν μπορούν να προσδεθούν στην πρωτεΐνη-στόχο και στη συνέχεια αξιολογούνται με βιοχημικές μεθόδους στο εργαστήριο. Οι πιο υποσχόμενες ενώσεις βελτιστοποιούνται περαιτέρω και ακολουθεί νέα διαδικασία βελτιστοποίησης με κύριο στόχο την εύρεση πιο ισχυρών ενώσεων [149].

Η κρυσταλλογραφία συγγένειας αποτελεί μία μέθοδο κατά την οποία από ένα μίγμα φυσικών ουσιών μπορούν να βρεθούν νέες βιοδραστικές ουσίες. Η μεθοδολογία που ακολουθείται αποτελείται από την εκχύλιση των δραστικών ουσιών από φυτά όπου πραγματοποιούνται δοκιμές δραστικότητας έναντι της πρωτεΐνης-στόχου και στη συνέχεια, περαιτέρω καθαρισμός του εκχυλίσματος και δοκιμές δραστικότητας. Η μεθοδολογία αυτή απαιτεί χρόνο και κόστος. Η κρυσταλλογραφία συγγένειας μειώνει το κόστος και τις εργατώρες, καθώς μέσω εμβάπτισης των πρωτεϊνικών κρυστάλλων με τα εκχυλίσματα η/οι ένωση/εις με τη μεγαλύτερη συγγένεια θα προσδεθεί/ούν στην πρωτεΐνη στόχο. Ωστόσο,

εμφανίζονται κάποιες δυσκολίες ως προς την εύρεση της ένωσης καθώς το εκχύλισμα περιέχει μια πληθώρα ενώσεων και μορίων. Ωστόσο, η μέθοδος αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη σάρωση εκχυλισμάτων με υψηλή απόδοση, με στόχο την εύρεση νέων βιοδραστικών φυσικών ενώσεων τόσο για τη χρήση τους ως εν δυνάμει φάρμακα όσο και για τον κατευθυνόμενο από τη δομή σχεδιασμό φαρμάκων [154].

Οι παραπάνω μέθοδοι μπορούν να οδηγήσουν στην εύρεση νέων βιοδραστικών ενώσεων που θα εμφανίζουν συγγένεια ως προς την πρωτεΐνη-στόχο. Οι ενώσεις που θα εμφανίζουν υψηλή συγγένεια, της τάξεως των μM , αξιολογούνται περαιτέρω σε δεύτερο κύκλο. Ο δεύτερος κύκλος αποτελείται από το δομικό χαρακτηρισμό και την αξιολόγηση του τρόπου πρόσδεσης των υποσχόμενων ενώσεων στην πρωτεΐνη-στόχο και με βάση αυτά τα δεδομένα οι ενώσεις βελτιστοποιούνται περαιτέρω με υπολογιστικές μεθόδους [149]. Οι ενώσεις που επιλέγονται για βελτιστοποίηση θα πρέπει να είναι εφικτό να συντεθούν στο εργαστήριο και να αξιολογηθούν ως προς διάφορους περιοριστικούς παράγοντες. Οι παράγοντες αυτοί έχουν να κάνουν με βάση τις ιδιότητες *ADMET* (*absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity*), δηλαδή την απορρόφηση, κατανομή, μεταβολισμό, απέκκριση και τοξικότητα, έτσι ώστε να εμφανίσουν θετικό αποτέλεσμα στις κλινικές μελέτες. Αφού βρεθούν οι πρώτες υποψήφιες ενώσεις ακολουθούν και άλλοι κύκλοι βελτιστοποίησης ώστε να προκύψουν νέες ενώσεις που θα εμφανίζουν υψηλότερη συγγένεια και ειδικότητα ως προς την πρωτεΐνη-στόχο. Στον ακόλουθο πίνακα αναγράφονται φάρμακα που έχουν ανακαλυφθεί μέσω του *SBDD* και βρίσκονται διαθέσιμα στην αγορά [149, 155].

Πίνακας 1: Φάρμακα που έχουν ανακαλυφθεί μέσω του *SBDD* και βρίσκονται διαθέσιμα στην αγορά [155].

Φάρμακο	Πρωτεΐνη-στόχος	Εταιρεία
Dorzolamid	Carbonic Anhydrase	Merck Sharp and Dohme (Harlow, UK)
Saquinavir	HIV Protease	Roche (Welwyn, UK)
Zanamivir	Neuraminidase	Biota (Melbourne, Australia)
AG85, AG337, AG331	Thymidylate synthase	Agouron (La Jolla, CA, USA)
Ro466240	Thrombin	Roche (Basel, Switzerland)
Imatinib	BCR-ABL	Novartis (Basel)

1.10 Κατευθυνόμενος από τη δομή σχεδιασμός ανταγωνιστών έναντι των γαλεκτινών

Όπως αναφέρθηκε και στις παραπάνω ενότητες, οι γαλεκτίνες αποτελούν μια μεγάλη κατηγορία των λεκτινών, που εμπλέκονται σε πολλές παθοφυσιολογικές καταστάσεις. Ο πλήρης μηχανισμός δράσης τους δεν είναι ακόμα γνωστός αλλά κάποιες από τις ασθένειες που εμπλέκονται είναι οι καρδιοαγγειακές ασθένειες, αυτοάνοσα νοσήματα, ο καρκίνος, η φλεγμονή και πολλές άλλες. Οι γαλεκτίνες έχουν αναφερθεί ως βιοδείκτες και ως θεραπευτικοί στόχοι για την αντιμετώπιση των παθολογικών καταστάσεων. Για αυτό το λόγο, η λειτουργική σημασία των γαλεκτινών έχει οδηγήσει τους τομείς της έρευνας στον ακαδημαϊκό χώρο αλλά και στο χώρο της βιομηχανίας στην ανάπτυξη νέων θεραπευτικών

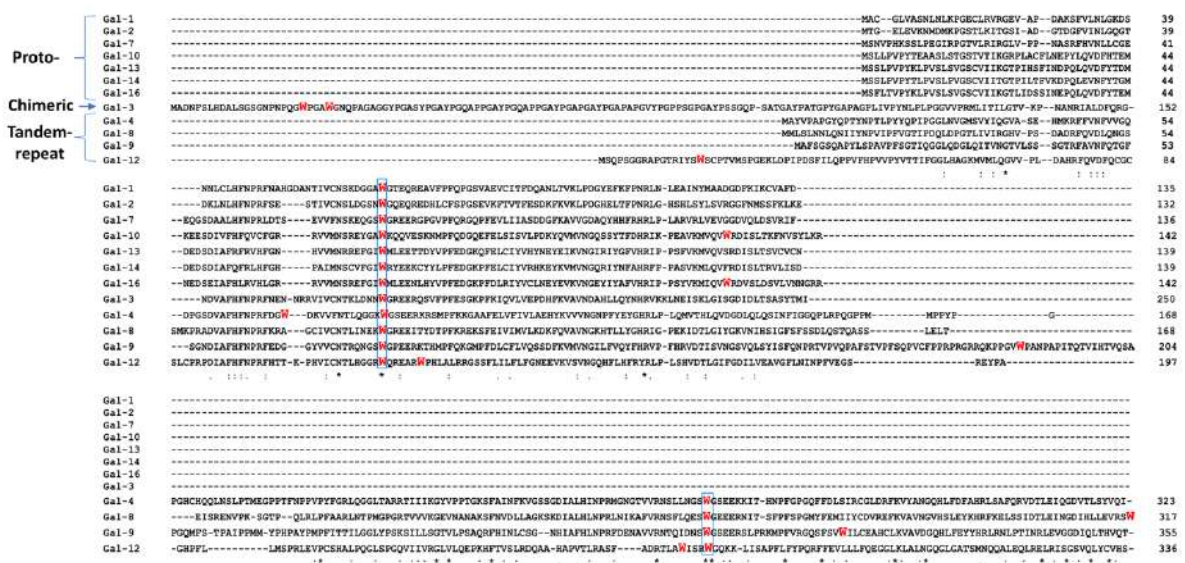
προσεγγίσεων που στοχεύουν τις γαλεκτίνες. Οι προσεγγίσεις αυτές βασίζονται κυρίως στην εύρεση ενώσεων που εμφανίζουν υψηλή συγγένεια και εξειδίκευση ως προς το κάθε μέλος της οικογένειας των γαλεκτινών, λίγες παρενέργειες και καλά φαρμακοκινητικά και φαρμακοδυναμικά χαρακτηριστικά [54, 121, 146].

Η αξιολόγηση του τρόπου πρόσδεσης των ενώσεων στις γαλεκτίνες μπορεί να διεξαχθεί με κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ [156], (μέθοδος που θα αναλυθεί παρακάτω μιας και αποτελεί την κύρια χρησιμοποιούμενη μέθοδος της παρούσας διατριβής), φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (*Nuclear Magnetic Resonance, NMR*) [157] και *Cryo-EM* [158]. Η αξιολόγηση της αγκιστείας μεταξύ της ένωσης και της πρωτεΐνης μπορεί να διεξαχθεί με θερμιδομετρία ισοθερμικής τιτλοδότησης (*Isothermal Titration Calorimetry*) [159], φασματοσκοπία φθορισμού της τρυπτοφάνης (*Tryptophan Fluorescence Spectroscopy, TFS*) [160] και φθορίζουσα πόλωσης του φωτός (*Fluorescence polarization, FP*) [161]. Ωστόσο, αυτές οι μέθοδοι βασίζονται στη δημιουργία συμπλόκων, με πολύπλοκο και συγκεκριμένο εξοπλισμό και κάποιες από τις παραπάνω έχουν περιορισμένη ευαισθησία ανίχνευσης και εμφανίζουν πολλά προβλήματα κατά την εφαρμογή τους.

1.10.1 Φασματοσκοπία φθορισμού της τρυπτοφάνης (*Tryptophan Fluorescence Spectroscopy, TFS*)

Το αμινοξικό κατάλοιπο της τρυπτοφάνης (*Trp*) εκπέμπει εγγενή φθορισμό, ο οποίος μπορεί να μετρηθεί με φασματοσκοπία φθορισμού. Εάν το κατάλοιπο *Trp* της πρωτεΐνης δημιουργεί αλληλεπιδράσεις με την υπό μελέτη ένωση, οποιαδήποτε αλλαγή στο μικροπεριβάλλον της *Trp* μεταβάλλει το φάσμα φθορισμού και προκαλεί μετατόπιση της μέγιστης κορυφής καθώς και την έντασης του φθορισμού. Το ινδόλιο της *Trp* θεωρείται η κυρίαρχη πηγή απορρόφησης *UV* σε μήκος κύματος ~280 nm και εκπομπής σε μήκος κύματος ~350 nm στις πρωτεΐνες.

Ανάλυση των αμινοξικών αλληλουχιών των ανθρώπινων γαλεκτινών έδειξε ότι υπάρχει τουλάχιστον ένα κατάλοιπο *Trp* στην *CRD* κάθε γαλεκτίνης που σημειώνεται σε μπλε αγκύλη στην Εικόνα 45. Οι πρωτότυπες γαλεκτίνες 10 (*Trp127*) και 16 (*Trp127*) περιέχουν ένα επιπλέον κατάλοιπο *Trp* στις *CRDs* τους, η χιμαιρική γαλεκτίνη-3 πέρα από την *Trp* στην *CRD*, έχει και άλλα δύο κατάλοιπα *Trp* στην *ND* (*Trp22* και *Trp26*). Οι επαναλαμβανόμενου τύπου γαλεκτίνες 4, 8, 9 και 12 έχουν από ένα τουλάχιστον κατάλοιπο *Trp* στις *CRDs* τους. Πιο συγκεκριμένα, η *N-CRD*-γαλεκτίνη-4 έχει από δύο κατάλοιπα *Trp* (*Trp71* και *Trp84*), η *C-CRD*-γαλεκτίνη-8 έχει δύο κατάλοιπα *Trp* (*Trp 249* και *Trp317*) ενώ η *C-CRD*-γαλεκτίνη-9 έχει δύο κατάλοιπα *Trp* (*Trp287*, *Trp309*) και ένα (*Trp185*) στην περιοχή του πεπτιδικού συνδέτη. Η γαλεκτίνη-12 περιέχει τέσσερα κατάλοιπα *Trp* στις δύο *CRD* της, δύο (*Trp117* και *Trp123*) στην *N-CRD* και δύο (*Trp265* και *Trp269*) στην *C-CRD*. Υπάρχουν αρκετές μελέτες για την εύρεση της σταθεράς πρόσδεσης ενώσεων στις γαλεκτίνες με τη μέθοδο αυτή [160].



Εικόνα 45: ανάλυση των αμινοξικών αλληλουχιών των ανθρώπινων γαλεκτινών χωρισμένες στις υποκατηγορίες τους. Πιο συγκεκριμένα οι πρωτότυπες γαλεκτίνες: γαλεκτίνη-1 (UniProt code: P09382), γαλεκτίνη -2 (P05162), γαλεκτίνη -7 (P47929), γαλεκτίνη -10 (Q05315), γαλεκτίνη -13 (Q9UHV8), γαλεκτίνη -14 (Q8TCE9-1) και γαλεκτίνη -16 (A8MUM7), οι χιμαιρικού τύπου: γαλεκτίνη -3 (P17931) και επαναλαμβανόμενου τύπου: γαλεκτίνη -4 (P56470), γαλεκτίνη -8 (O00214-1), γαλεκτίνη -9 (O00182-1) και γαλεκτίνη -12 (Q96DT0-1). Τα κατάλοιπα της τρυπτοφάνης επισημαίνονται με κόκκινο χρώμα, τα συντηρημένα κατάλοιπα των CRDs επισημαίνονται με (*), οι συντηρημένες υποκαταστάσεις με (:) και οι ημι-συντηρημένες υποκαταστάσεις με (.) [160].

1.10.2 Πόλωση φθορισμού (Fluorescence Polarization, FP)

Μέσω του φθορισμού μπορεί να ανιχνευτεί η πρόσδεση μίας σημασμένης ένωσης σε μια πρωτεΐνη. Η πόλωση φθορισμού (FP) μετρά την κινητική και τη θερμοδυναμική σύνδεση πρωτεΐνης-ένωσης. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην αρχική πολωμένη εκπομπή φθορισμού η οποία αποπολώνεται με την πάροδο του χρόνου, ταχύτερα για την ελεύθερη από ότι για την προσδεμένη ένωση. Χρησιμοποιείται ευρέως στις αναλύσεις ανταγωνιστικής πρόσδεσης, όπου τα επισημασμένα μόρια προσδένονται στην πρωτεΐνη και στη συνέχεια εκτοπίζονται από μη επισημασμένους ανταγωνιστές για τη μέτρηση της συγγένειας τόσο των επισημασμένων όσο και των μη επισημασμένων μορίων. Η γραμμική αναλογία της FP προς το ποσοστό προσδεμένων/μη προσδεμένων μορίων μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό της IC_{50} (η συγκέντρωση της μη επισημασμένης ένωσης που είναι απαραίτητη για να εκτοπιστεί η μισή συγκέντρωση της επισημασμένης ένωσης). Η αντίστοιχη K_i/K_D (K_i αποτελεί η σταθερά αναστολής της μη επισημασμένης ένωσης) μπορεί να υπολογιστεί χρησιμοποιώντας τις κατάλληλες εξισώσεις Cheng-Prusoff [162]. Οι K_D s που μετρούνται σε διαφορετικές θερμοκρασίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την εκτίμηση της ενθαλπίας πρόσδεσης μέσω της ανάλυσης van't Hoff [163].

Η FP απαιτεί σχετικά μικρότερες ποσότητες πρωτεΐνης σε αντίθεση με την ITC. Επιπλέον, ως τεχνική είναι αρκετά εύκολη και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για μεγάλο αριθμό μη επισημασμένων ενώσεων. Αντίθετα, το κόστος παραγωγής και σύνθεσης επισημασμένων ενώσεων είναι αρκετά υψηλό. Επιπλέον, το σήμα που προσδιορίζεται δεν αποτελεί άμεση απόκριση της πρόσδεσης αλλά ανάλογή της. Ο αυτοφθορισμός, ή η σκέδαση του φωτός

μπορούν να προκαλέσουν προβλήματα στον υπολογισμό της πρόσδεσης. Τέλος, η μη ειδική πρόσδεση της επισημασμένης ένωσης, οι προσμίξεις, συσσωματώματα της πρωτεΐνης ή/και της επισημασμένης ένωσης μπορούν επίσης να δυσχεράνουν τους υπολογισμούς της συγγένειας πρόσδεσης. Γι' αυτό το λόγο απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή για την αποφυγή σφαλμάτων κατά τη μέτρηση της *FP* [164–166].

1.10.3 Θερμιδομετρία ισοθερμικής τιτλοδότησης (Isothermal Titration Calorimetry)

Η *ITC* αποτελεί μια βιοφυσική μέθοδο που αξιολογεί το θερμοδυναμικό μηχανισμό ενός συστήματος. Η μέθοδος αυτή δεν απαιτεί τη σήμανση της πρωτεΐνης ή της ένωσης, αλλά οι υπολογισμοί γίνονται με βάση την αλλαγή της θερμότητας του συστήματος. Με βάση την αλλαγή αυτή υπολογίζεται η σταθερά K_D , η στοιχειομετρία n , η αλλαγή της ενθαλπίας ΔH , η αλλαγή της ελεύθερης ενέργειας ΔG και η αλλαγή της εντροπίας ΔS . Η εύρεση της ΔH αποτελεί σημαντικό βήμα για της αξιολόγηση και το χαρακτηρισμό των δυνάμεων που απαιτούνται για τη δημιουργία των συμπλόκων μέσω αλληλεπίδρασης της πρωτεΐνης με την ένωση, κάτι αναγκαίο και απαραίτητο για την εύρεση και το σχεδιασμό εν δυνάμει φαρμάκων. Κατά το σχεδιασμό φαρμάκων η αξιολόγηση της συγγένειας από μόνη της μπορεί να μην παρέχει σαφή ένδειξη για τη περαιτέρω βελτιστοποίησή της. Όμως, η γνώση της θερμοδυναμικής της αντίδρασης, δηλαδή η μεταβολή της εντροπίας και της ενθαλπίας μπορεί να παρέχει σημαντικές πληροφορίες στη βελτιστοποίηση των ενώσεων.

Όταν μια πρωτεΐνη αλληλεπιδρά με μία ένωση απελευθερώνεται ή απορροφάται ενέργεια, ανάλογα με το εάν η αντίδραση αυτή είναι εξώθερμη ή ενδόθερμη, αντίστοιχα. Ο προσδιορισμός της θερμότητας αναλύει το μηχανισμό της αλληλεπίδρασης. Πιο συγκεκριμένα, ένα σύστημα πρωτεΐνης-ένωσης-διαλύτη είναι ένα θερμοδυναμικό σύστημα που αποτελείται από τη διαλυμένη ουσία (δηλαδή τα μόρια της πρωτεΐνης και της ένωσης) και το διαλύτη, δηλαδή το ρυθμιστικό διάλυμα. Σε ένα τέτοιο σύστημα, υπάρχουν πολύπλοκες αλληλεπιδράσεις και ανταλλαγές θερμότητας μεταξύ αυτών των ουσιών- και η σχέση μεταξύ τους και ο τρόπος με τον οποίο η μεταφορά θερμότητας σχετίζεται με διάφορες μεταβολές ενέργειας υπαγορεύονται από τους νόμους της θερμοδυναμικής. Ως αποτέλεσμα, οι κινητήριες δυνάμεις που υπαγορεύουν την πρόσδεση πρωτεΐνης και ένωσης είναι αποτέλεσμα διαφόρων αλληλεπιδράσεων και ανταλλαγών ενέργειας μεταξύ της πρωτεΐνης, της ένωσης και του ρυθμιστικού διαλύματος. Η ελεύθερη ενέργεια *Gibbs*, η οποία είναι ένα θερμοδυναμικό δυναμικό που μετρά την ικανότητα ενός θερμοδυναμικού συστήματος να επιτελεί μέγιστο ή αντιστρεπτό έργο σε σταθερή θερμοκρασία και πίεση (ισόθερμο, ισοβαρές), είναι ένα από τα σημαντικότερα θερμοδυναμικά μεγέθη για τον χαρακτηρισμό των κινητήριων δυνάμεων.

Η πρόσδεση της πρωτεΐνης με μια ένωση πραγματοποιείται μόνο όταν η μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας *Gibbs* (ΔG) του συστήματος είναι αρνητική, όταν το σύστημα φτάσει σε κατάσταση ισορροπίας σε σταθερή πίεση και θερμοκρασία. Επειδή η έκταση της πρόσδεσης πρωτεΐνης-ένωσης καθορίζεται από το μέγεθος της αρνητικής ΔG , μπορεί να θεωρηθεί ότι η ΔG καθορίζει τη σταθερότητα κάθε συγκεκριμένου συμπλόκου ή τη συγγένεια πρόσδεσης

μιας ένωσης με μία συγκεκριμένη πρωτεΐνη. Πρέπει να σημειωθεί ότι η ελεύθερη ενέργεια είναι συνάρτηση των καταστάσεων ενός συστήματος και, ως εκ τούτου, οι ΔG ορίζονται απλώς από την αρχική και την τελική θερμοδυναμική κατάσταση, ανεξάρτητα από την οδό που συνδέει αυτές τις δύο καταστάσεις. Η ενθαλπία είναι ένα μέτρο της συνολικής ενέργειας ενός θερμοδυναμικού συστήματος, δηλαδή το άθροισμα των εσωτερικών ενεργειών της διαλυμένης ουσίας και του διαλύτη και της ποσότητας ενέργειας που απαιτείται για να δημιουργηθεί χώρος για το σύστημα. Η ΔH είναι αρνητική στις εξώθερμες (δηλαδή στους σχηματισμούς των ενεργειακά ευνοϊκών μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των ατόμων) και θετική στις ενδόθερμες (δηλαδή στις διαταραχές των ενεργειακά ευνοϊκών μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων) αντιδράσεις. Κατά τη διάρκεια της πρόσδεσης, η ΔH αντικατοπτρίζει την ενεργειακή μεταβολή του συστήματος όταν η ένωση προσδένεται στην πρωτεΐνη. Η ενθαλπία ερμηνεύεται ως οι μεταβολές της ενέργειας που προκύπτουν από τους σχηματισμούς μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων (αλληλεπιδράσεις *van der Waals*, δεσμοί υδρογόνου, ζεύγη ιόντων και οποιεσδήποτε άλλες πολικές και μη πολικές αλληλεπιδράσεις) στη διεπιφάνεια πρόσδεσης. Ωστόσο, το θερμικό αποτέλεσμα μιας αντίδρασης πρόσδεσης είναι μια σφαιρική ιδιότητα ολόκληρου του συστήματος, που περιλαμβάνει συνεισφορές όχι μόνο από τη διαλυμένη ουσία αλλά και από το διαλύτη. Στην πραγματικότητα, η μεταβολή της ενθαλπίας κατά την πρόσδεση είναι αποτέλεσμα του σχηματισμού και της κατάργησης πολλών αλληλεπιδράσεων, συμπεριλαμβανομένης της κατάργησης των δεσμών υδρογόνου και των αλληλεπιδράσεων *van der Waals* που σχηματίζονται μεταξύ της πρωτεΐνης και του διαλύτη και μεταξύ της ένωσης και του διαλύτη, του σχηματισμού των μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ της πρωτεΐνης και της ένωσης. Αυτές οι επιμέρους συνιστώσες μπορεί να συνεισφέρουν είτε ευνοϊκά είτε όχι και η καθαρή μεταβολή της ενθαλπίας είναι αποτέλεσμα του συνδυασμού αυτών των καταστάσεων.

Η εντροπία είναι ένα μέτρο του πόσο ομοιόμορφα θα κατανεμηθεί η θερμική ενέργεια στο συνολικό θερμοδυναμικό σύστημα. Ο δεύτερος νόμος της θερμοδυναμικής ορίζει ότι η θερμότητα ρέει πάντα αυθόρμητα από περιοχές υψηλότερης θερμοκρασίας σε περιοχές χαμηλότερης θερμοκρασίας. Αυτό μειώνει τον βαθμό τάξης του αρχικού συστήματος και, επομένως, η εντροπία θα μπορούσε επίσης να θεωρηθεί ως μέτρο της αταξίας στα άτομα και τα μόρια ενός συστήματος. Η ΔS είναι μια συνολική θερμοδυναμική ιδιότητα ενός συστήματος, με τα θετικά και αρνητικά πρόσημά της να υποδηλώνουν τη συνολική αύξηση και μείωση του βαθμού ελευθερίας του συστήματος, αντίστοιχα [159, 160, 167].

Η αυθόρμητη πρόσδεση μίας ένωσης σε μία πρωτεΐνη πραγματοποιείται όταν η μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας είναι αρνητική. Η αρνητική μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας κατά την πρόσδεση, δηλαδή η διαφορά της ελεύθερης ενέργειας μεταξύ του συμπλόκου και της ελεύθερης πρωτεΐνης, καθορίζει την σταθερότητα του συμπλόκου, ή με άλλα λόγια η μείωση της ελεύθερης ενέργειας του συστήματος είναι αυτή που προκαλεί την πρόσδεση πρωτεΐνης-ένωσης [167].

Η ITC , ως βασικό εργαλείο για το χαρακτηρισμό των αλληλεπιδράσεων μεταξύ πρωτεΐνης και ένωσης, έχει αποκτήσει ευρείες εφαρμογές τους τομείς της βιοφυσικής, της βιοχημείας, της εύρεσης, σχεδιασμού και ανάπτυξης εν δυνάμει φαρμάκων, της βιοτεχνολογίας και άλλων

επιστημονικών κλάδων. Η βελτιστοποίηση της ειδικότητας και της συγγένειας εν δυνάμει φαρμάκων αποτελεί σημαντικό στόχο στη βιομηχανία των φαρμάκων. Για να επέλθει η βελτίωση των παραπάνω, απαιτείται η αύξηση της συγγένειας πρόσδεσης και της ελεύθερης ενέργειας μέσω της βελτιστοποίησης της ενθαλπίας και της εντροπίας των συμπλόκων. Μέσω της *ITC* μπορεί να προσδιοριστεί το θερμοδυναμικό προφίλ της πρόσδεσης της πρωτεΐνης με τις ενώσεις και να παρέχει τις απαραίτητες ενδείξεις για της βελτιστοποίηση των παραγόντων πρόσδεσης [159, 167].

2. Αντικείμενο μελέτης

Παρόλη την υψηλή συντήρηση, η εξειδίκευση της κάθε γαλεκτίνης είναι διαφορετική και οφείλεται στα κατάλοιπα των μη καλά συντηρημένων περιοχών της επικράτειας πρόσδεσης σακχαριτών. Οι γαλεκτίνες αποτελούν σήμερα επικυρωμένους φαρμακευτικούς στόχους για πολλές παθολογικές καταστάσεις όπως είναι ο καρκίνος, καρδιοαγγειακές παθήσεις, νευρολογικές παθήσεις, αυτοάνοσες ασθένειες κτλ. [25, 121] Η μοναδική χιμαιρικού τύπου γαλεκτίνη-3 εκφράζεται στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε πολλές παθοφυσιολογικές καταστάσεις, όπως η καρκινογένεση, η αθηροσκλήρωση, ο διαβήτης και η επούλωση των πληγών [122]. Λόγω της λειτουργικότητας της, η πρωτεΐνη αυτή αποτελεί επικυρωμένο φαρμακευτικό στόχο για την εύρεση ανταγωνιστών που θα εμφανίζουν εξειδίκευση και υψηλή αχιστεία, για την ανάπτυξη φαρμάκων. Ο πιο ισχυροί και ειδικοί ανταγωνιστές της γαλεκτίνης-3 που έχουν βρεθεί μέχρι σήμερα, είναι ανάλογα θειοδιγαλακτόζης που φέρουν υποκαταστάτες αρυλ-τριαζόλης στον C3 και των δύο μορίων της γαλακτόζης, και εμφανίζουν τιμές K_D της τάξεως των nM [168–170].

Στόχος της διατριβής ήταν η ανακάλυψη νέων ενώσεων οδηγών για την ανάπτυξη ειδικών ανταγωνιστών για την γαλεκτίνη-3. Έτσι μελετήθηκε η πρόσδεση 46 ενώσεων τόσο στη γαλεκτίνη-3 όσο και στις γαλεκτίνες 7 και 8N με κρυσταλλογραφία ακτίνων X και ITC. Οι ενώσεις αυτές είχαν κοινό κορμό το β-D-γαλακτοπυρανοζίτη και διαφορετικούς υποκαταστάτες, όπως ομάδες φαινυλίου, πυριμιδίνης, τριαζόλης, τετραζόλης και καρβονυλίων. Επιπλέον, μελετήθηκαν και ενώσεις θειοδισακχαριτών, οι οποίες αποτελούνται από δύο σάκχαρα που προσδένονται μεταξύ τους μέσω 1→2 δεσμών αντί 1→1, που έχουν ήδη μελετηθεί [58, 140]. Η μελέτη που παρουσιάζεται στην παρούσα διδακτορική διατριβή παρέχει σημαντικές πληροφορίες σε ότι αφορά τον κατευθυνόμενο από τη δομή σχεδιασμό ενώσεων, που θα εμφανίζουν εξειδίκευση ως προς τη χιμαιρικού τύπου γαλεκτίνη-3.

3. Υλικά και μέθοδοι

3.1 Όργανα

Όργανο μοντέλο	Εταιρεία
Akta purifier UPC900	GE Healthcare
Συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρησης: Mini-PROTEAN tetra cell	Bio-Rad
Φασματοφωτόμετρο ορατού/υπεριώδους φωτός: UV-1600PC	VWR
Συσκευή μέτρησης pH: 827 pH Lab	Metrohm
Φυγόκεντρος: Eppendorf 5417R	Eppendorf
Φυγόκεντρος 50 mL, 500 mL	Hitachi
Συσκευή παραγωγής υπερήχων	Witeg
Heat Block	Nippon Genetics
Υδατόλουτρο: Wisebath	Witeg
Αναλυτικός ζυγός	KERN
Παρασκευαστικός ζυγός	KERN
Ανακινούμενος ψυχόμενος επωαστήρας	LabTech
Ρομποτικό σύστημα σάρωσης συνθηκών κρυστάλλωσης: OryxNano	Douglas Instruments

3.2 Βακτηριακές κυτταρικές σειρές

Βακτηριακές στέλεχος (DE3)	Εταιρεία
BL21Gold	Agilent technologies
B834	Novagen
B834 pLysS	Novagen
Rosetta2	Novagen
Origami	Novagen
XI1 Blue	Novagen
DH5A	Novagen

3.3 Γονίδια κλωνοποιημένα σε πλασμιδιακούς φορείς

Γονίδιο	Πλασμίδιο
Γαλεκτίνη-3-CRD	pET28a
Γαλεκτίνη-4C-CRD	pET28c
Γαλεκτίνη-7	pET22
Γαλεκτίνη-8N-CRD	pET28

3.4 Αντιδραστήρια

Acetic acid	SDS
Acrylamide	Serva
Ammonium Persulfate (APS)	Serva
Ampicillin	Serva
Bis acrylamide	Serva
Bradford protein Assay 5x	Biorad
Bromophenol Blue	Research Organics
Calcium Chloride Dehydrate (CaCl ₂)	Merck
Coomasie Brilliant Blue R-250	Fluka
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Panreac
Disodium hydrogen phosphate (Na ₂ HPO ₄)	Merck
Dithiothreitol (DTT)	Applichem
Ethanol Absolute	Sigma
Ethylenediaminetetraacetic (EDTA)	Panreac
Glycerol	Applichem
Glycine	Serva
Hydrochloric acid 37% (HCl)	Applichem
Imidazole 99%	Sigma
Kanamycin	
Lactose	
LB-Agar	Serva
Methanol	Scharleu
Monopotassium Dihydrogen phosphate (KH ₂ PO ₄)	Merck
Monosodium dihydrogen orthophosphate (NaH ₂ PO ₄)	Merck
Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)	Applichem
Potassium chloride (KCl)	Merck
Protease inhibitors	Roch
Sodium chloride	Scharleu
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	Serva
Sodium hydroxide	Merck
TEMED	Invitrogen
Tris Ultra-Pure	Applichem
Triton X-100	Panreac
Tryptone	Serva
Yeast extract	Serva
β-Mercaptoethanol (β-Merc)	Sigma

3.5 Λοιπά υλικά

Υλικά	Εταιρεία
Φίλτρα συμπύκνωσης με κατώφλι 10 kDa	Amicon Ultra-4, Meck Millipore
Μεμβράνες διαπίδυσης με κατώφλι 10 kDa	Amicon Ultra-4, Meck Millipore
Πιάτα κρυστάλλωσης 96 θέσεων: SWISSCI MRC 2 Well	Jena Bioscience
Φίλτρα για φιλτράρισμα διαλυμάτων: Omni pore membrane filter	Merc Millipore
Φίλτρα σύριγγας 0.2 μm	Sartorius
Φίλτρα σύριγγας 0.45 μm	Sartorius

3.6 Διαλύματα

PBS, pH 7.4	137 mM NaCl 2.7 mM KCl 10 mM Na_2HPO_4 1,8 mM KH_2PO_4
MEPBS, pH 7.4	4 mM β -μερκαπτοαιθανόλη 2 mM EDTA 137 mM NaCl 2.7 mM KCl 10 mM Na_2HPO_4 1,8 mM KH_2PO_4
LB Broth	10 g/L NaCl 10g/L Tryptone 5 g/L yeast

4. Μέθοδοι

4.1 Αρχή μεθόδων

4.1.1 Παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών

Η τεχνολογία του ανασυνδυασμένου *DNA* αποτελεί μια από τις μεγαλύτερες ανακαλύψεις, καθώς επιτρέπει την παραγωγή ανθρώπινων πρωτεϊνών σε βακτηριακά στελέχη. Η τεχνολογία αυτή οδήγησε στην ανάπτυξη της φαρμακοβιομηχανίας, στην εύρεση νέων φαρμάκων και θεραπευτικών στόχων, καθώς και στο χαρακτηρισμό πολλών πρωτεϊνών. Πλέον, χρησιμοποιούνται και άλλα συστήματα έκφρασης πρωτεϊνών, όπως είναι τα έντομα, οι ζύμες, τα φυτά και κύτταρα θηλαστικών, με το κάθε σύστημα να έχει τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματά του. Τα πιο βασικά πλεονεκτήματα των βακτηριακού συστήματος αποτελούν η γρήγορη ανάπτυξή τους και το χαμηλό κόστος τόσο στον εξοπλισμό όσο και στην παραγωγή της πρωτεΐνης-στόχου. Επιπρόσθετα, τα βακτήρια δεν μπορούν να επιτελέσουν μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, όπως φωσφορυλίωση ή γλυκοζυλίωση. Ωστόσο, το ότι δεν μπορούν να επιτελέσουν μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις μπορεί να θεωρηθεί και ως μειονέκτημα, εάν αυτές είναι σημαντικές και απαραίτητες για τη δομή και τη λειτουργία της πρωτεΐνης-στόχου. Κάποια άλλα μειονεκτήματα του συστήματος αποτελούν τα χαμηλά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου, η έκφραση του γονιδίου πριν την προσθήκη του επαγωγέα της υπερέκφρασης και η δημιουργία έγκλειστων σωμάτων, λόγω της δημιουργίας συσσωματωμάτων την παραγόμενης πρωτεΐνης. Για την επίλυση των παραπάνω, έχουν αναπτυχθεί πολλές μέθοδοι, κάποιες από τις οποίες θα αναφερθούν παρακάτω [171].

4.1.1.1 Αντιμετώπιση επίλυσης των προβλημάτων κατά την παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών στο σύστημα *E. coli*

Ένα από τα βασικά μειονεκτήματα του βακτηριακού συστήματος είναι τα χαμηλά επίπεδα της παραγόμενης πρωτεΐνης. Τα 61 κωδικόνια δεν χρησιμοποιούνται με την ίδια συχνότητα. Πιο συγκεκριμένα, τα μείζονα κωδικόνια βρίσκονται σε γονίδια που εκφράζονται σε υψηλά επίπεδα, ενώ τα σπάνια βρίσκονται σε γονίδια που εκφράζονται σε χαμηλά επίπεδα, ανάλογα με τον οργανισμό που γίνεται η πρωτεϊνοσύνθεση. Όταν τα κωδικόνια που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή της πρωτεΐνης-στόχου διαφέρουν σημαντικά από τη μέση χρήση κωδικονίων του βακτηρίου, τότε παρατηρούνται προβλήματα κατά την παραγωγή της πρωτεΐνης-στόχου. Πιο συγκεκριμένα, η μειωμένη σταθερότητα του *mRNA* λόγω καθυστέρησης της μετάφρασης, ο πρώιμος τερματισμός της μεταγραφής ή/και της μετάφρασης, καθώς και η αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης αποτελούν τα κυριότερα προβλήματα. Λόγω αυτών, μπορεί να παρατηρηθεί μειωμένη ή και μηδενική παραγωγή της πρωτεΐνης-στόχου. Κάποιοι τρόποι για τη βελτίωση της παραγόμενης πρωτεΐνης είναι η αλλαγή του δεύτερου κωδικονίου, η συνέκφραση του γονιδίου-στόχου με γονίδια που κωδικοποιούν έναν αριθμό σπάνιων κωδικονίων και η αντικατάσταση των σπάνιων κωδικονίων σε όλο το γονίδιο-στόχο με άλλα πιο φιλικά για την *E. coli* [172].

Η παραγόμενη πρωτεΐνη πολλές φορές είναι αδιάλυτη και συσσωρεύεται στα έγκλειστα σωματίδια. Κάποιοι από τους κύριους λόγους αναφέρθηκαν στο εδάφιο 4.1.1. Μέσα στα έγκλειστα σωματίδια η πρωτεΐνη-στόχος έχει χάσει τη τριτοταγή δομή της. Για να επανέλθει η πρωτεΐνη στην αρχική της δομή θα πρέπει να επιτευχθεί αποδιάταξη και στη συνέχεια επαναδίπλωση της πρωτεΐνης, κάτι το οποίο είναι αρκετά δύσκολο για μια πρωτεΐνη μεγάλου μοριακού βάρους. Για να βελτιωθεί η διαλυτότητα της πρωτεΐνης-στόχου έχουν αναπτυχθεί κάποιες μέθοδοι, όπως η μείωση του ρυθμού της πρωτεϊνικής σύνθεσης μέσω μείωσης της θερμοκρασίας επαγωγής και της συγκέντρωσης του επαγωγέ της υπερέκφρασης, η επιλογή του κατάλληλου θρεπτικού υλικού και η συνέκφραση με μοριακούς συνοδούς [171]. Επιπλέον, μπορεί να γίνει η χρήση συγκεκριμένων στελεχών *E. coli*, να δημιουργηθεί μια χιμαιρική πρωτεΐνη, όπου θα συζευχθεί με μια άλλη πρωτεΐνη, όπως η *GST*, η *SUMO* κ.α., οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ετικέτα για τον καθαρισμό της [171, 173].

4.1.2 Καθαρισμός και απομόνωση πρωτεϊνών

4.1.2.1 Ταχεία υγρή χρωματογραφία πρωτεϊνών (Fast Liquid Protein Chromatography-FPLC)

Παλαιότερα, η απομόνωση μιας πρωτεΐνης αποτελούσε μια αρκετά δύσκολη και χρονοβόρα διαδικασία. Πλέον, η ανάπτυξη της χρωματογραφίας και του συστήματος για τον καθαρισμό πρωτεϊνών *FPLC*, έχει οδηγήσει στον καθαρισμό πολλών πρωτεϊνών, των οποίων δεν μπορούσε να επιτευχθεί προηγουμένως [174].

Τα βήματα καθαρισμού μιας πρωτεΐνης είναι τα εξής. Αρχικά, τα βακτηριακά κύτταρα διαλυτοποιούνται σε ένα διάλυμα λύσης, λύονται με τη χρήση υπερήχων και το διαλυτό κλάσμα συλλέγεται με φυγοκέντρηση. Στη συνέχεια, η στήλη καθαρισμού εξισορροπείται με ένα διάλυμα (*Buffer A*) και το διαλυτό κλάσμα εφαρμόζεται στη στήλη. Η πρωτεΐνη-στόχος προσδένεται στη στήλη, είτε λόγω συγγένειας είτε λόγω βιοχημικών χαρακτηριστικών, και οι υπόλοιπες πρωτεΐνες απομακρύνονται από τη στήλη. Αυτό το στάδιο ονομάζεται *Flow Through*. Έπειτα, ακολουθεί η έκπλυση της στήλης με το *Buffer A* για να απομακρυνθούν οι πρωτεΐνες που έχουν προσδεθεί μη ειδικά στη στήλη (*Wash*). Η πρωτεΐνη-στόχος εκλούεται από τη στήλη με τη χρήση διαλύματος που περιέχει κάποιο παράγοντα που ανταγωνίζεται την πρόσδεση της πρωτεΐνης-στόχου στη στήλη, ή ένα διάλυμα με διαφορετικό *pH* ή με διαφορετική ιοντική σύσταση κ.α.. Το στάδιο αυτό ονομάζεται *Elution* [174].

Παρακάτω θα αναλυθούν κάποια από τα είδη χρωματογραφίας που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή.

4.1.2.2 Χρωματογραφία συγγένειας

Η χρωματογραφία συγγένειας βασίζεται στην εξειδίκευση αναγνώρισης μεταξύ δύο παραγόντων. Πιο συγκεκριμένα, το υλικό της μήτρας συνδέεται ομοιοπολικά με έναν προσδέτη που εμφανίζει συγγένεια ως προς την πρωτεΐνη-στόχο.

1. Χρωματογραφία συγγένειας με ακινητοποιημένη λακτόζη

Η λακτόζη είναι ακινητοποιημένη σε σφαιρίδια σεφαρόζης 6B. Η στήλη αυτή χρησιμοποιήθηκε για τον καθαρισμό των γαλεκτινών που θα αναλυθούν παρακάτω [175]. Η στήλη αυτή παρασκευάστηκε στο εργαστήριο μας.

4.1.2.3 Χρωματογραφία μοριακής διήθησης (Size exclusion chromatography)

Η SEC διαχωρίζει τις πρωτεΐνες με βάση το μοριακό τους βάρος. Η πρωτεΐνη-στόχος δεν προσδένεται στο υλικό της στήλης. Η στήλη εξισορροπείται με διάλυμα ώστε να γεμίσει όλος ο όγκος της. Οι πρωτεΐνες μεγάλου μοριακού βάρους δεν εισέρχονται από τους πόρους της στήλης και εξέρχονται πρώτες. Αντίθετα, οι μικρού μοριακού βάρους πρωτεΐνες διέρχονται από τους πόρους της στήλης και καθυστερούν να εξέλθουν από τη στήλη. Εάν το δείγμα περιέχει συσσωματώματα πρωτεϊνών, εξέρχονται στο νεκρό όγκο λόγω του μεγάλου μοριακού τους βάρους [176].

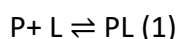
4.1.3 Μέτρηση της σταθεράς K_D

4.1.3.1 Θερμιδομετρία Ισοθερμικής Τιτλοδότησης (Isothermal Titration Calorimetry, ITC)

Η θερμιδομετρία ισοθερμικής τιτλοδότησης (ITC) αποτελεί μια βιοφυσική μέθοδο που επιτρέπει το θερμοδυναμικό μηχανισμό ενός συστήματος. Η μέθοδος αυτή δεν απαιτεί τη σήμανση της πρωτεΐνης ή της ένωσης, αλλά οι υπολογισμοί γίνονται με βάση την αλλαγή της θερμότητας του συστήματος. Όταν μια πρωτεΐνη αλληλεπιδρά με μία ένωση απελευθερώνεται ή απορροφάται ενέργεια, ανάλογα με το εάν η αντίδραση αυτή είναι εξώθερμη ή ενδόθερμη, αντίστοιχα. Με βάση την αλλαγή αυτή υπολογίζεται η σταθερά K_D , η στοιχειομετρία n , η αλλαγή της ενθαλπίας ΔH , η αλλαγή της ελεύθερης ενέργειας ΔG και η αλλαγή της εντροπίας ΔS . Ο προσδιορισμός της θερμότητας αναλύει το μηχανισμό της αλληλεπίδρασης [167].

4.1.3.1.1 Κινητική δέσμευσης πρωτεΐνης-ένωσης

Όταν μία πρωτεΐνη P και μία ένωση L με αμοιβαία συγγένεια βρίσκονται στο ίδιο διάλυμα, η χρόνο-εξαρτώμενη σύνδεση μεταξύ τους μπορεί να διατυπωθεί ως εξής:



Όπου, PL αντιπροσωπεύει το σύμπλοκο πρωτεΐνης-ένωσης, k_{on} αποτελεί την κινητική σταθερά ταχύτητας που αντιπροσωπεύει την αντίδραση πρόσδεσης ενώ k_{off} την αντίδραση διάσπασης του συμπλόκου. Οι μονάδες των k_{on} και k_{off} είναι $M^{-1} \cdot s^{-1}$ και s^{-1} , αντίστοιχα. Σε ισορροπία, η αντίδραση πρόσθιας δέσμευσης $P + L \rightarrow PL$ πρέπει να εξισορροπείται από την αντίδραση αντίστροφης διάσπασης $PL \rightarrow P + L$ και αυτό γράφεται:

$$k_{on}[P][L] = k_{off}[PL] \quad (2)$$

όπου οι αγκύλες αντιπροσωπεύουν τη συγκέντρωση ισορροπίας οποιουδήποτε μοριακού είδους. Η σταθερά πρόσδεσης K_b (μονάδα μέτρησης M^{-1}) ορίζεται τότε από:

$$K_b = \frac{k_{on}}{k_{off}} = \frac{[PL]}{[P][L]} = \frac{1}{K_d} \quad (3)$$

όπου K_d (σε μονάδα M) ονομάζεται σταθερά διάστασης. Επομένως, ο γρήγορος ρυθμός σύνδεσης που συνοδεύεται από αργό ρυθμό διάσπασης θα δώσει υψηλή/χαμηλή σταθερά σύνδεσης/διάσπασης και, ως εκ τούτου, υψηλή συγγένεια σύνδεσης.

4.1.3.1.2 Βασικές έννοιες και θερμοδυναμικές σχέσεις

Η ελεύθερη ενέργεια πρόσδεσης ΔG° , η οποία αναφέρεται στη μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας που μετράται υπό συνθήκες πίεσης 1 atm , θερμοκρασίας 298 K και πραγματικών συγκεντρώσεων αντιδρώντων (πρωτεΐνη και ένωσης) 1 M , σχετίζεται με τη σταθερά δέσμευσης K_b μέσω της σχέσης *Gibbs*:

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K_b \quad (4)$$

όπου R είναι η παγκόσμια σταθερά των αερίων ($1,987 \text{ cal} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$) και T είναι η θερμοκρασία σε βαθμούς *Kelvin*. Από την εξίσωση (1) προκύπτει ότι όσο μεγαλύτερη είναι η σταθερά σύνδεσης K_b , τόσο πιο αρνητική είναι η τυπική ελεύθερη ενέργεια σύνδεσης, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι κινητικές παράμετροι (k_{on} και k_{off} και ο λόγος τους K_b) καθορίζουν τις θερμοδυναμικές ιδιότητες του συμπλόκου, δηλαδή τη σταθερότητα του συμπλόκου και τη συγγένεια πρόσδεσης μεταξύ πρωτεΐνης και ένωσης.

Η ελεύθερη ενέργεια πρόσδεσης (ΔG) σε οποιαδήποτε χρονική στιγμή κατά τη διάρκεια μιας πρόσδεσης δίνεται από:

$$\Delta G = \Delta G^\circ + RT \ln Q \quad (5)$$

όπου το Q είναι το πηλίκο αντίδρασης, το οποίο ορίζεται ως ο λόγος της συγκέντρωσης του συμπλόκου πρωτεΐνης-ένωσης προς το γινόμενο των συγκεντρώσεων της ελεύθερης πρωτεΐνης και της ελεύθερης ένωσης σε οποιαδήποτε χρονική στιγμή. Όταν $Q = K_b$ μια αντίδραση πρόσδεσης βρίσκεται σε ισορροπία και $\Delta G = 0$. Η ΔG μπορεί επίσης να αναλυθεί στην ενθαλπική και εντροπική συνεισφορά της με την ακόλουθη θεμελιώδη εξίσωση:

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S \quad (6)$$

όπου ΔH και ΔS είναι η μεταβολή της ενθαλπίας και της εντροπίας του συστήματος κατά την πρόσδεση της ένωσης, αντίστοιχα, και T είναι η θερμοκρασία σε *Kelvin*.

Η εντροπία είναι ένα μέτρο του πόσο ομοιόμορφα θα κατανεμηθεί η θερμική ενέργεια στο συνολικό θερμοδυναμικό σύστημα. Ο δεύτερος νόμος της θερμοδυναμικής ορίζει ότι η θερμότητα ρέει πάντα αυθόρμητα από περιοχές υψηλότερης θερμοκρασίας σε περιοχές χαμηλότερης θερμοκρασίας. Αυτό μειώνει τον βαθμό τάξης του αρχικού συστήματος και, επομένως, η εντροπία θα μπορούσε επίσης να θεωρηθεί ως μέτρο της αταξίας στα άτομα και τα μόρια ενός συστήματος. Η ΔS είναι μια συνολική θερμοδυναμική ιδιότητα ενός

συστήματος, με τα θετικά και αρνητικά πρόσημά της να υποδηλώνουν τη συνολική αύξηση και μείωση του βαθμού ελευθερίας του συστήματος, αντίστοιχα. Η συνολική μεταβολή της εντροπίας που σχετίζεται με τη δέσμευση (η εντροπία δέσμευσης ΔS) μπορεί να αναλυθεί σε τρεις εντροπικούς όρους:

$$\Delta S = \Delta S_{\text{solv}} + \Delta S_{\text{conf}} + \Delta S_r/t \quad (7)$$

όπου η ΔS_{solv} αντιπροσωπεύει τη μεταβολή της εντροπίας του διαλύτη, που έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση του διαλύτη κατά τη δέσμευση, η οποία συχνά συμβάλλει ευνοϊκά στην εντροπία δέσμευσης λόγω της μεγάλης θετικής τιμής της. Η ΔS_{conf} αντιπροσωπεύει τη μεταβολή της εντροπίας διαμόρφωσης που αντανάκλα τις αλλαγές στην ελευθερία διαμόρφωσης τόσο της πρωτεΐνης όσο και της ένωσης κατά την πρόσδεση, η οποία μπορεί να συμβάλει ευνοϊκά ή δυσμενώς στην εντροπία δέσμευσης, επειδή οι βαθμοί ελευθερίας του συμπλόκου μπορεί να αυξηθούν ή να μειωθούν σε σύγκριση με εκείνους της μη δεσμευμένης, ελεύθερης πρωτεΐνης και της ένωσης. Το $\Delta S_r/t$ αντιπροσωπεύει την απώλεια μεταφραστικών και περιστροφικών βαθμών ελευθερίας της πρωτεΐνης και της ένωσης κατά το σχηματισμό του συμπλόκου, η οποία μειώνει τον αριθμό των σωματιδίων στο διάλυμα και συμβάλλει δυσμενώς στην εντροπία σύνδεσης. Οι τρεις παραπάνω εντροπικοί όροι καθορίζουν την καθαρή μεταβολή εντροπίας, με τη θετική και την αρνητική καθαρή μεταβολή εντροπίας να συμβάλλουν ευνοϊκά και δυσμενώς στην ελεύθερη ενέργεια σύνδεσης, αντίστοιχα. Γενικά, οι αντιδράσεις πρόσδεσης θα πρέπει να ξεπεράσουν τις εντροπικές ποινές (δηλ. την αρνητική $\Delta S_r/t$ κατά τη σύνδεση) είτε μέσω μεγάλου κέρδους εντροπίας του διαλύτη (θετική ΔS_{solv}) είτε μέσω ευνοϊκών αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-ένωσης (που οδηγούν σε αρνητική ΔH πρόσδεσης), αν πρόκειται να πραγματοποιηθεί η πρόσδεση [159, 167].

4.1.3.1.3 Δυνάμεις οδήγησης δέσμευσης και αντιστάθμιση ενθαλπίας-εντροπίας

Η αυθόρμητη πρόσδεση μίας ένωσης σε μία πρωτεΐνη πραγματοποιείται όταν η μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας είναι αρνητική. Η αρνητική μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας κατά την πρόσδεση, δηλαδή η διαφορά της ελεύθερης ενέργειας μεταξύ του συμπλόκου και της ελεύθερης πρωτεΐνης, καθορίζει την σταθερότητα του συμπλόκου, ή με άλλα λόγια η μείωση της ελεύθερης ενέργειας του συστήματος είναι αυτή που προκαλεί την πρόσδεση πρωτεΐνης-ένωσης. Τόσο η αναδίπλωση μιας πρωτεΐνης όσο και η δημιουργία συμπλόκου προκαλούνται από τη μείωση της συνολικής ελεύθερης ενέργειας *Gibbs* του συστήματος.

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η μεταβολή της ενθαλπίας και η μεταβολή της εντροπίας, καθορίζουν το πρόσημο και το μέγεθος της ελεύθερης ενέργειας πρόσδεσης. Με άλλα λόγια, η ΔH και η ΔS αποτελούν κινητήριους παράγοντες για τη δημιουργία του συμπλόκου πρωτεΐνης-ένωσης. Οι συνεισφορές της ΔH και της ΔS στη ΔG είναι στενά συνδεδεμένες. Για παράδειγμα, η στενή πρόσδεση που προκύπτει από πολλές ευνοϊκές μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μορίων πρόσδεσης θα οδηγήσει σε μεγάλη αρνητική μεταβολή

της ενθαλπίας, αλλά αυτό συνήθως συνοδεύεται από αρνητική μεταβολή της εντροπίας λόγω του περιορισμού της κινητικότητας των αλληλεπιδρώντων μορίων, με τελικό αποτέλεσμα μια μεσαίου μεγέθους μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας πρόσδεσης. Ομοίως, ένα μεγάλο κέρδος εντροπίας συνοδεύεται συνήθως από μια ενθαλπική ποινή (θετική μεταβολή ενθαλπίας) λόγω της ενέργειας που απαιτείται για τη διακοπή των μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων. Το φαινόμενο αυτό (η μεσαίου μεγέθους μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας που προκαλείται από τις συμπληρωματικές μεταβολές μεταξύ ενθαλπίας και εντροπίας) ονομάζεται αντιστάθμιση ενθαλπίας-εντροπίας. Τα κύρια προβλήματα είναι ότι η αντιστάθμιση θα μπορούσε να είναι α) παραπλανητική ερμηνεία των δεδομένων που λαμβάνονται από ένα σχετικά στενό εύρος θερμοκρασιών ή από ένα περιορισμένο εύρος για τις ελεύθερες ενέργειες, β) αποτέλεσμα τυχαίων πειραματικών και συστηματικών σφαλμάτων και γ) αποτέλεσμα μεροληψίας επιλογής δεδομένων. Παρ' όλα αυτά, η αντιστάθμιση ενθαλπίας-εντροπίας έχει παρατηρηθεί πολύ συχνά σε θερμοδυναμικές μελέτες πρόσδεσης βιολογικών συστημάτων και οι αναλύσεις των συλλεχθέντων θερμοδομετρικών δεδομένων για τη δημιουργία συμπλόκου πρωτεΐνης-ένωσης και τα αποτελέσματα θεωρητικών μελετών υποδηλώνουν ότι πρόκειται για ένα γνήσιο και κοινό φυσικό φαινόμενο, αν και πρέπει να τηρούνται αυστηρά κριτήρια για την απόδοση των πραγματικών φαινομένων αντιστάθμισης. Η αντιστάθμιση ενθαλπίας-εντροπίας μπορεί να οφείλεται στους σχηματισμούς και τις διαταραχές των ασθενών μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων. Πολλαπλοί παράγοντες φαίνεται να επηρεάζουν τη συμπεριφορά αντιστάθμισης, συμπεριλαμβανομένων των δομικών και θερμοδυναμικών ιδιοτήτων του διαλύτη (υδροφόβη επίδραση, διαλυτοποίηση και πολλά μόρια ύδατος), της ευελιξίας της θέσης πρόσδεσης της ένωσης ή των περιοχών που περιβάλλουν τη θέση αυτή, της μοριακής δομής της ένωσης και των μεταβολών των διαμοριακών δυνάμεων κατά τη διάρκεια της διαδικασίας πρόσδεσης. Επιπλέον, έχουν προταθεί οι μηχανισμοί μεταγωγής εντροπίας-ενθαλπίας για την εξήγηση της αντιστάθμισης εντροπίας-ενθαλπίας. Επειδή η αντιστάθμιση ενθαλπίας-εντροπίας δεν οδηγεί σε δραματική μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας σύνδεσης, η διάκριση μεταξύ της εντροπικής και της ενθαλπικής συνεισφοράς στην ελεύθερη ενέργεια πρόσδεσης είναι σημαντική στους τομείς του ορθολογικού σχεδιασμού φαρμάκων. Η ιδανική στρατηγική βελτιστοποίησης είναι η μεγιστοποίηση της ευνοϊκής ενθαλπικής ή εντροπικής συμβολής με ταυτόχρονη ελαχιστοποίηση της εντροπικής ή ενθαλπικής ποινής. Ο απώτερος στόχος είναι να προκληθεί η μεγαλύτερη μείωση της ελεύθερης ενέργειας πρόσδεσης, εξουδετερώνοντας έτσι τις μη ιδανικές επιδράσεις της αντιστάθμισης ενθαλπίας-εντροπίας σε θερμοδυναμικό επίπεδο [167].

4.1.3.1.4 Αρχή μεθόδου ITC

Τα δομικά και δυναμικά δεδομένα από μόνα τους, ακόμη και όταν συνδυάζονται με τις πιο εξελιγμένες υπολογιστικές μεθόδους, δεν μπορούν να παρέχουν πληροφορίες σχετικά με τα πλήρη θερμοδυναμικά προφίλ που αποτελούνται από την ελεύθερη ενέργεια σύνδεσης, την

εντροπία και την ενθαλπία και, ως εκ τούτου, μπορεί να μην προβλέπουν με ακρίβεια τη συγγένεια πρόσδεσης. Η *ITC*, παρέχει ποσοτικά θερμοδυναμικά δεδομένα που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη μελέτη της σταθερότητας του συμπλόκου και τη διαλεύκανση των κινητήριων δυνάμεων πρόσδεσης. Η *ITC* είναι η μόνη προσέγγιση για την άμεση μέτρηση της ανταλλαγής θερμότητας κατά τον σχηματισμό συμπλόκων σε σταθερή θερμοκρασία και έχει γίνει απαραίτητο εργαλείο για τον προσδιορισμό των δυνάμεων που οδηγούν τη διαδικασία πρόσδεσης ή σταθεροποιούν τις διαμοριακές αλληλεπιδράσεις.

Ένα τυπικό πείραμα *ITC* περιλαμβάνει τρία βήματα: (i) η ένωση τιτλοδοτείται σε διάλυμα ίδιο με αυτό που είναι διαλυμένη η πρωτεΐνη, (ii) μετράται η θερμότητα που απελευθερώνεται ή απορροφάται και σχετίζεται με ένα συμβάν πρόσδεσης και (iii) τα πρωτογενή δεδομένα *ITC* υποβάλλονται σε επεξεργασία και προσαρμόζονται για να παραχθούν η σταθερά πρόσδεσης (K_b), η ελεύθερη ενέργεια *Gibbs* της πρόσδεσης (ΔG), η ενθαλπία πρόσδεσης (ΔH) και η εντροπία (ΔS), καθώς και η στοιχειομετρία (n) του συμβάντος πρόσδεσης. Επιπλέον, όταν εκτελούνται πειράματα *ITC* σε διαφορετικές θερμοκρασίες, μπορεί να ληφθεί η μεταβολή της θερμοχωρητικότητας (ΔC_p) μιας αντίδρασης πρόσδεσης.

Τα όργανα *ITC* κάνουν χρήση ενός σχεδίου αντιστάθμισης ισχύος, το οποίο είναι υπεύθυνο για τη διατήρηση της ίδιας θερμοκρασίας στην κυψελίδα δείγματος που περιέχει την πρωτεΐνη και στην κυψελίδα αναφοράς που είναι γεμάτη με ρυθμιστικό διάλυμα ίδιο με αυτό που είναι διαλυμένη η πρωτεΐνη και η ένωση. Κατά τη διάρκεια του πειράματος, ένα σύστημα τιτλοδότησης τιτλοδοτεί την ένωση στην κυψελίδα που βρίσκεται η πρωτεΐνη σε γνωστές ποσότητες. Η τιτλοδότηση προκαλεί είτε έκλυση είτε απορρόφηση θερμότητας (ανάλογα με τη φύση της αντίδρασης) και, ως εκ τούτου, ανισορροπία θερμοκρασίας μεταξύ της κυψελίδας αναφοράς και της κυψελίδας της πρωτεΐνης. Η εν λόγω ανισορροπία αντισταθμίζεται με τη διαμόρφωση της ανατροφοδοτούμενης ισχύος που εφαρμόζεται στον θερμαντήρα της κυψέλης: οι εξώθερμες και οι ενδόθερμες αντιδράσεις μειώνουν και αυξάνουν την ισχύ στην κυψέλη δείγματος, αντίστοιχα. Οι συνολικές μετρήσεις συνίστανται στη χρονικά εξαρτώμενη εισαγωγή της ισχύος που απαιτείται για τη διατήρηση ίδιας θερμοκρασίας μεταξύ της κυψελίδας αναφοράς και της κυψελίδας της πρωτεΐνης.

Τα πρωτογενή δεδομένα είναι η ισχύς που εφαρμόζεται στην κυψελίδα της πρωτεΐνης ως συνάρτηση του χρόνου και αποτελούνται από μια σειρά κορυφών που επιστρέφουν στη βασική γραμμή, με την περιοχή κάτω από κάθε κορυφή να αντιστοιχεί στη θερμότητα που αναπτύσσεται σε κάθε τιτλοδότηση της ένωσης. Κατά τη διάρκεια της τιτλοδότησης της ένωσης, η θέση πρόσδεσής της φτάνει σε κορεσμό, με αποτέλεσμα το μέγεθος της κορυφής να μειώνεται σταδιακά. Προς το τέλος της αντίδρασης το μέγεθος της περιοχής της κορυφής και αφού έχει επέλθει κορεσμός παρατηρείται μόνο η θερμότητα της αραίωσης. Η καμπύλη πρόσδεσης (η μορφή ισόθερμης πρόσδεσης), η οποία λαμβάνεται μέσω μετασχηματισμού των πρωτογενών δεδομένων *ITC*, αντιπροσωπεύει τη θερμότητα αντίδρασης ανά τιτλοδότηση ως συνάρτηση του λόγου της συνολικής συγκέντρωσης της ένωσης προς τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης $[L]/[P]$. Τέλος, η προσαρμογή της καμπύλης πρόσδεσης σε ένα συγκεκριμένο μοντέλο πρόσδεσης μπορεί να δώσει τις παραμέτρους K_b , ΔH και n από ένα μόνο πείραμα. Η σταθερά πρόσδεσης K_b μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον υπολογισμό της

τυπικής ελεύθερης ενέργειας πρόσδεσης ΔG° σύμφωνα με την εξίσωση (1)- η ελεύθερη ενέργεια πρόσδεσης ΔG μπορεί να υπολογιστεί από τη ΔG° σύμφωνα με την εξίσωση (2)- και η εντροπία πρόσδεσης ΔS μπορεί να υπολογιστεί σύμφωνα με την εξίσωση (4). Η ΔC_p , η οποία είναι ένα θερμοδυναμικό μέγεθος που μετρά τη μεταβολή της θερμότητας με σταθερή θερμοκρασία και πίεση, μπορεί να ληφθεί μέσω του προσδιορισμού των τιμών ΔH σε ένα εύρος θερμοκρασιών κατά την τιτλοδότηση και στην συνέχεια μέσω του υπολογισμού της κλίσης της εξαρτώμενης από τη θερμοκρασία καμπύλης ΔH με ανάλυση της γραμμικής παλινδρόμησης. Οι τιμές ΔH , ΔS και ΔG είναι άμεσα εξαρτώμενες από τη θερμοκρασία μέσω της ΔC_p σύμφωνα με την παρακάτω εξίσωση:

$$\Delta H(T) = \Delta H(T_0) + \Delta C_p(T-T_0) \quad (8)$$

$$\Delta S(T) = \Delta S(T_0) + \Delta C_p \ln \left(\frac{T}{T_0} \right) \quad (9)$$

$$\Delta G(T) = \Delta H(T_0) - T\Delta S(T_0) + \Delta C_p \left(T - T_0 - T \ln \frac{T}{T_0} \right) \quad (10)$$

Όπου T και T_0 αναφέρονται στη θερμοκρασία και στην θερμοκρασία αναφοράς, αντίστοιχα. Η ΔC_p παρέχει μια σύνδεση μεταξύ των θερμοδυναμικών παραμέτρων και των δομικών πληροφοριών των πρωτεϊνών. Τα μόρια ύδατος τα οποία αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη και με την περιοχή πρόσδεσης της ένωσης έχουν διαφορετικές ιδιότητες. Κατά το σχηματισμό του συμπλόκου πραγματοποιείται η απομάκρυνση κάποιων μορίων ύδατος με παράλληλη αλλαγή της θερμοχωρητικότητας. Το μέγεθος της ΔC_p είναι ανάλογο με το ποσό της επιφάνειας πρόσδεσης. Η αλλαγή της διαμόρφωσης κατά την πρόσδεση, μπορεί να έχει θετική ή αρνητική συμβολή στη ΔC_p , ανάλογα με τη μετατόπιση (*burial*) των μη πολικών (αρνητική ΔC_p) ή των πολικών (θετική ΔC_p) επικρατειών. Η στοιχειομετρία (n) προσδιορίζεται από την αναλογία των γνωστών συγκεντρώσεων της πρωτεΐνης και της ένωσης στο σημείο ισοδυναμίας.

Κατά την αξιολόγηση και προσαρμογή των αποτελεσμάτων, η στοιχειομετρία n καθορίζεται από τον αριθμό των περιοχών πρόσδεσης της πρωτεΐνης για την ένωση. Εάν μια πρωτεΐνη αποτελείται από περισσότερες από μία επικράτειες πρόσδεσης, κατά την τιτλοδότηση δημιουργούνται πολλαπλά γεγονότα κατά την πρόσδεση. Ο προσδιορισμός της στοιχειομετρίας n αποτελεί σημαντικό σημείο για το χαρακτηρισμό του μηχανισμού πρόσδεσης όσο και την κατανόηση των βιολογικών δράσεων της υπό μελέτη πρωτεΐνης.

Τέλος, σημαντικό βήμα αποτελεί η διεξαγωγή πειραμάτων ελέγχου για των προσδιορισμό μη ειδικών αλλαγών της θερμότητας, ώστε να λαμβάνεται για την αξιολόγηση μόνο η θερμότητα δημιουργίας του συμπλόκου. Η ανταλλαγή θερμότητας που ανιχνεύεται είναι το συνολικό θερμικό αποτέλεσμα που πραγματοποιείται στην κυψελίδα της πρωτεΐνης κατά την τιτλοδότηση της ένωσης. Το σύνολο αυτό αποτελείται όχι μόνο από τη θερμότητα που απορροφάτε ή απελευθερώνεται κατά την πρόσδεση αλλά και από θερμικά αποτελέσματα που προκύπτουν από την αραίωση της πρωτεΐνης και της ένωσης, την ανάμιξη διαλυμάτων που δεν φέρουν την ίδια σύνθεση, τις διαφορετικές θερμοκρασίες μεταξύ της κυψελίδας πρωτεΐνης και σύριγγας κλπ. [159, 167].

4.1.3.1.5 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της θερμιδομετρίας ισοθερμικής τιτλοδότησης

Μέσω της *ITC* προσδιορίζονται οι θερμοδυναμικές παράμετροι ενθαλπία, εντροπία, η στοιχειομετρία και σταθερά πρόσδεσης. Η τεχνική αυτή δεν προϋποθέτει την τροποποίηση ή επισήμανση της πρωτεΐνης ή της ένωσης και δεν εμφανίζει περιορισμούς στο μέγεθος της πρωτεΐνης. Επιπλέον, εμφανίζει υψηλή ακρίβεια και επαναληψιμότητα και το σφάλμα των μετρήσεων είναι περίπου στο 10%. Τέλος, εμφανίζει υψηλή ευαισθησία, με δυνατότητα μέτρησης συγγένειας στο εύρος των mM με 10^{-2} μ M. Ωστόσο, η τεχνική αυτή εμφανίζει και κάποια μειονεκτήματα. Αρχικά, η θερμότητα που μετράται αντιστοιχεί στο συνολικό θερμικό αποτέλεσμα. Η αξιολόγηση της θερμότητας της πρόσδεσης είναι αρκετά περίπλοκη, παρά την υψηλή ευαισθησία. Υπάρχουν ακόμα κάποια προβλήματα για την αξιολόγηση της θερμότητας, καθώς εάν η πρόσδεση εμφανίζει χαμηλή ενθαλπία πρόσδεσης και όταν η πρόσδεση είναι αργή. Επιπλέον, απαιτείται υψηλή ποσότητα τόσο της πρωτεΐνης όσο και της ένωσης, κάτι το οποίο έχει υψηλό κόστος και παράλληλα πολλές πρωτεΐνες ή και ενώσεις δεν μπορούν να παρασκευαστούν ή συντεθούν σε υψηλές ποσότητες [159].

4.2 Κρυσταλλογραφία

4.2.1 Ανάπτυξη κρυστάλλων

Ένας κρύσταλλος αποτελεί την στερεή κατάσταση ενός ομοιογενούς υδατικού διαλύματος. Οι πρωτεϊνικοί κρύσταλλοι αναπτύσσονται σε συνθήκες όπου αποτρέπεται η μετουσίωση της πρωτεΐνης, μέσω αργής και ελεγχόμενης καταβύθισής της από το κατάλληλο υδατικό διάλυμα. Η καταβύθιση μπορεί να επιτευχθεί, μέσω μιας διαδικασίας που ονομάζεται εξαλάτωση, με τη χρήση μια σειρά ενώσεων όπως είναι τα άλατα και οι οργανικοί διαλύτες. Μία από τις πιο συνηθισμένες καταβυθιστικές ενώσεις αποτελεί η *PEG* που υπάρχει διαθέσιμη σε διάφορα μοριακά μεγέθη. Η αργή καταβύθιση μιας πρωτεΐνης επιτυγχάνεται με την προσθήκη ενός καταβυθιστικού παράγοντα σε ένα υδατικό διάλυμα, στο οποίο βρίσκεται η πρωτεΐνη, σε συγκέντρωση ελάχιστα λιγότερη από αυτή που οδηγεί την καταβύθιση της πρωτεΐνης. Όταν βρεθεί η κατάλληλη συγκέντρωση, τότε, ακολουθεί η αργή εξάτμιση του ύδατος με παράλληλη αύξηση της συγκέντρωσης τόσο του καταβυθιστικού παράγοντα όσο και της πρωτεΐνης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, η πρωτεΐνη να μην είναι πλέον διαλυτή και μπορεί να καταβυθιστεί δημιουργώντας είτε κρύσταλλο είτε άμορφο ίζημα [177]. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται διάχυση ατμών και είναι η πιο συνηθισμένη τεχνική κρυστάλλωσης. Πιο συγκεκριμένα, η συνθήκη κρυστάλλωσης τοποθετείται σε μια δεξαμενή, στο κέντρο της οποίας υπάρχει θέση για την τοποθέτηση του πρωτεϊνικού δείγματος, χωρίς την άμεση επαφή των δύο υγρών. Η πρωτεΐνη, αφού αναμιχθεί με μικρή ποσότητα του διαλύματος της δεξαμενής σε συγκεκριμένη αναλογία, τοποθετείται στο βοθρίο και το σύστημα σφραγίζεται αεροστεγώς. Ακολουθεί, η απομάκρυνση μορίων ύδατος από την σταγόνα που βρίσκεται η πρωτεΐνη προς τη δεξαμενή μέχρι να επιτευχθεί η εξισορρόπηση

της τάσης ατμών του ύδατος στη σταγόνα της πρωτεΐνης και στο διάλυμα της δεξαμενής [178]. Η ανάπτυξη ενός πρωτεϊνικού κρυστάλλου εξαρτάται από τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης, την ιοντική ισχύ και το pH του ρυθμιστικού διαλύματος αλλά και από τη θερμοκρασία που θα αναπτυχθούν. Αποτελεί μια αρκετά χρονοβόρα διαδικασία προκειμένου να αναπτυχθούν καλοσχηματισμένοι κρύσταλλοι και κατάλληλοι για περίθλαση ακτίνων-Χ [177]. Επιπλέον, εξαρτάται από τη βιοχημική καθαρότητα του πρωτεϊνικού δείγματος, η οποία πρέπει να είναι μεγαλύτερη από 95%. Ο όρος αυτός χρησιμοποιείται για την περιγραφή ενός δείγματος το οποίο αποτελείται από ένα μακρομόριο σε πολλά αντίγραφα. Επιπρόσθετα, το πρωτεϊνικό δείγμα πρέπει να εμφανίζει δομική καθαρότητα, δηλαδή όλα τα μόρια της πρωτεΐνης να έχουν την ίδια διαμόρφωση. Συνεπώς, τα κατάλληλα ρυθμιστικά διαλύματα καθώς η μέθοδοι κρυστάλλωσης επιλέγονται με σκοπό να συνεισφέρουν στη φυσική δομή του μακρομορίου [178].

Η ανάπτυξη ενός κρυστάλλου χωρίζεται σε δύο σημαντικά βήματα:

A. Πυρήνωση

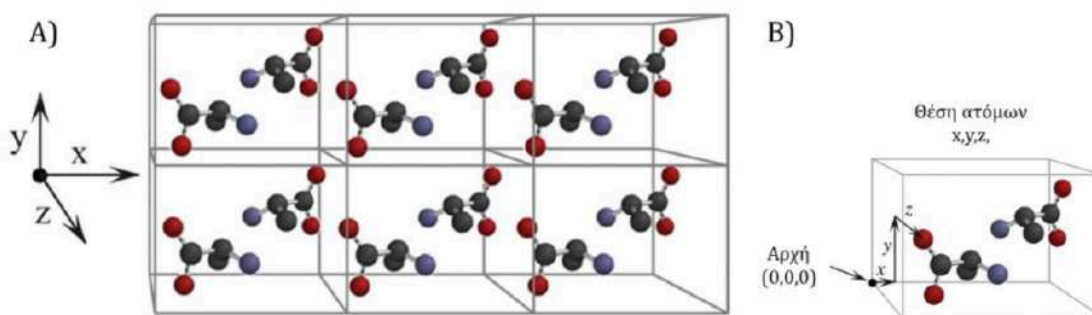
B. Αύξηση του μεγέθους του σχηματισμένου κρυστάλλου (μετασταθερή φάση)

Η πυρήνωση αποτελεί κρίσιμη διαδικασία για την ανάπτυξη ενός κρυστάλλου και συμβαίνει όταν η συγκέντρωση του μακρομορίου γίνει υψηλότερη από αυτή που του επιτρέπει να μείνει στη διαλυτή φάση. Μόρια του μακρομορίου προστίθενται στις κρυσταλλικές επιφάνειες σε συγκεντρώσεις χαμηλότερες από τον υπερκορεσμό, κοντά στην εγγενή διαλυτότητα. Το βήμα αυτό είναι και το πιο σημαντικό, καθώς εάν η συγκέντρωση του μακρομορίου δεν φτάσει τον υπερκορεσμό, ο πυρήνας δεν σχηματίζεται και ο κρύσταλλος δεν μπορεί να αναπτυχθεί [178]. Ωστόσο, η δημιουργία ενός υπέρκορου διαλύματος θα οδηγήσει στο σχηματισμό πολλών πυρήνων, κάτι το οποίο θα οδηγήσει σε κατανάλωση των μορίων της πρωτεΐνης που υπάρχουν στο διάλυμα. Αυτό θα οδηγήσει στην ανάπτυξη πολλών μικροσκοπικών κρυστάλλων, οι οποίοι δεν είναι κατάλληλοι για περίθλαση ακτίνων-Χ. Επομένως, η συνθήκη κρυστάλλωσης πρέπει να τροποποιείται με τέτοιο τρόπο ώστε να υπάρχει ισορροπία μεταξύ των δύο καταστάσεων, για να αναπτυχθούν καλοσχηματισμένοι μονοκρύσταλλοι, οι οποίοι θα παρέχουν δεδομένα υψηλής ευκρίνειας, αντί ιζήματος [178]. Τόσο η διαδικασία κρυστάλλωσης όσο και η βελτιστοποίηση των κρυστάλλων αποτελεί μια αρκετά απαιτητική και χρονοβόρα διαδικασία και ορισμένες φορές μη επιτυχή. Αρκετές εταιρείες έχουν αναπτύξει κιτ πολλών συνθηκών κρυστάλλωσης, όπου σε κάθε συνθήκη μεταβάλλονται πολλοί παράγοντες ταυτόχρονα. Επιπλέον, η ανάπτυξη ρομποτικών συστημάτων κρυστάλλωσης έχει ελαχιστοποιήσει τον όγκο της απαιτούμενης πρωτεΐνης.

4.2.2 Τι είναι κρύσταλλος;

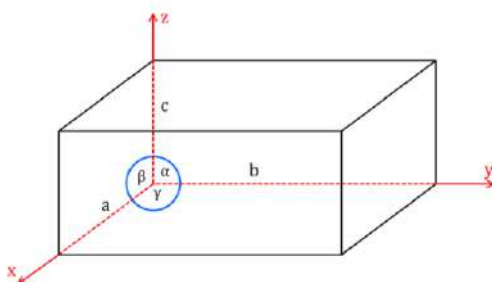
Οι κρύσταλλοι είναι στερεά σώματα που αποτελούνται από ακριβείς επαναλήψεις ενός συμμετρικού μοτίβου. Παράγονται από ένα μόριο το οποίο επαναλαμβάνεται από ένα

σύνολο πράξεων συμμετρίας. Η μονάδα που περιγράφει έναν κρύσταλλο είναι η μοναδιαία κυψελίδα. Με άλλα λόγια, ένας κρύσταλλος μπορεί να τεμαχιστεί νοητά σε πολλά μικρά κομμάτια έως ότου φτάσουμε σε ένα σημείο που δεν μπορούμε να τον κόψουμε άλλο, δηλαδή στη μοναδιαία κυψελίδα. Για να περιγραφεί ένας κρύσταλλος χρειάζεται η λιγότερο συμμετρική μονάδα, καθώς και η συμμετρία που δημιουργεί τον κρύσταλλο [178]. Η μοναδιαία κυψελίδα μπορεί να χωριστεί σε μια οντότητα η οποία δεν εμφανίζει καμία συμμετρία και ονομάζεται ασύμμετρη μονάδα. Επομένως, αφού κάθε επίπεδο του κρυστάλλου μπορεί να παραχθεί με εφαρμογή τελεστών συμμετρίας στην ασύμμετρη μονάδα, μπορεί να επιτευχθεί ο προσδιορισμός της δομής μιας πρωτεΐνης με τον προσδιορισμό των θέσεων των ατόμων της πρωτεΐνης της ασύμμετρης μονάδας στις τρεις διαστάσεις x, y, z [178]. Το συμμετρικό πλέγμα μετατοπίζεται ως προς τις τρεις διαστάσεις δημιουργώντας το κρυσταλλικό πλέγμα. Τα γειτονικά σημεία του κρυσταλλικού πλέγματος συνδέονται μεταξύ τους δημιουργώντας τις μοναδιαίες κυψελίδες, οι οποίες αποτελούνται από όλα τα άτομα των μοτίβων του κρυσταλλικού πλέγματος και κατ' επέκταση της ασύμμετρης μονάδας. Στην Εικόνα 46 φαίνεται μια τέτοια συστοιχία μορίων και οι γραμμές χωρίζουν τον κρύσταλλο σε μοναδιαίες κυψελίδες. Για να προσδιοριστεί η θέση ενός ατόμου στο χώρο χρησιμοποιείται ένα σύνολο συντεταγμένων x, y, z , όπου μία από τις κορυφές της μοναδιαίας κυψελίδας χρησιμοποιείται ως αρχή του συστήματος των συντεταγμένων $[x, y, z = 0 \text{ ή } (0, 0, 0)]$ [177].



Εικόνα 46: Α. Απεικονίζονται έξι μοναδιαίες κυψελίδες σε ένα κρυσταλλικό πλέγμα. Κάθε μοναδιαία κυψελίδα αποτελείται από δύο κατάλοιπα αλανίνης. Β. Μία μοναδιαία κυψελίδα που περιγράφει ότι ο προσδιορισμός των συντεταγμένων x, y, z ορίζει την τοποθέτηση κάθε ατόμου ενός μορίου μέσα στη μοναδιαία κυψελίδα [177].

Οι διαστάσεις της μοναδιαίας κυψελίδας ορίζονται από τα μήκη a, b και c , ενώ οι ακμές ορίζουν το σύνολο των διανυσματικών αξόνων x, y, z . Η σχέση μεταξύ των μηκών a, b , και c και των γωνιών μεταξύ των αξόνων καθορίζουν τα χαρακτηριστικά της μοναδιαίας κυψελίδας. Οι γωνίες α, β , και γ που σχηματίζονται μεταξύ των αξόνων ορίζουν μαζί με τα μήκη το μέγεθος και τη μορφή κάθε μοναδιαίας κυψελίδας [178].



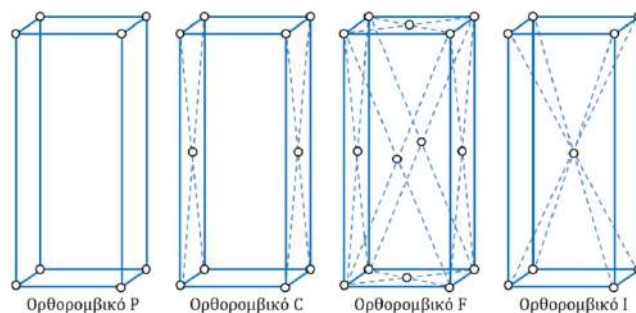
Εικόνα 47: Η μοναδιαία κυψελίδα με τους διανυσματικούς άξονες x, y, z , τα μήκη a, b, c και οι γωνίες α, β και γ . Αυτά τα στοιχεία καθορίζουν τη μορφή της κάθε μοναδιαίας κυψελίδας.

Η κύρια ταξινόμηση των κρυστάλλων βασίζεται στα επτά διαφορετικά κρυσταλλικά συστήματα που φαίνονται στον παρακάτω Πίνακα 2. Η κατηγοριοποίηση αυτή βασίζεται στις γωνίες και στα μήκη της μοναδιαίας κυψελίδας [177].

Πίνακας 2: Τα επτά κρυσταλλικά συστήματα και οι παράμετροί τους [177].

Κρυσταλλικό σύστημα	Παράμετροι με βάση τα μήκη και τις γωνίες
Κυβικό	$a=b=c$ και $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$
Τετραγωνικό	$a=b \neq c$ και $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$
Ορθορομβικό	$a \neq b \neq c$ και $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$
Ρομβοεδρικό	$a=b=c$ και $\alpha=\beta=\gamma \neq 90^\circ$
Εξαγωνικό	$a=b \neq c$ και $\alpha=\beta=90^\circ, \gamma=120^\circ$
Μονοκλινές	$a \neq b \neq c$ και $\alpha=\gamma=90^\circ, \beta \neq 90^\circ$
Τρικλινές	$a \neq b \neq c$ και $\alpha \neq \beta \neq \gamma \neq 90^\circ$

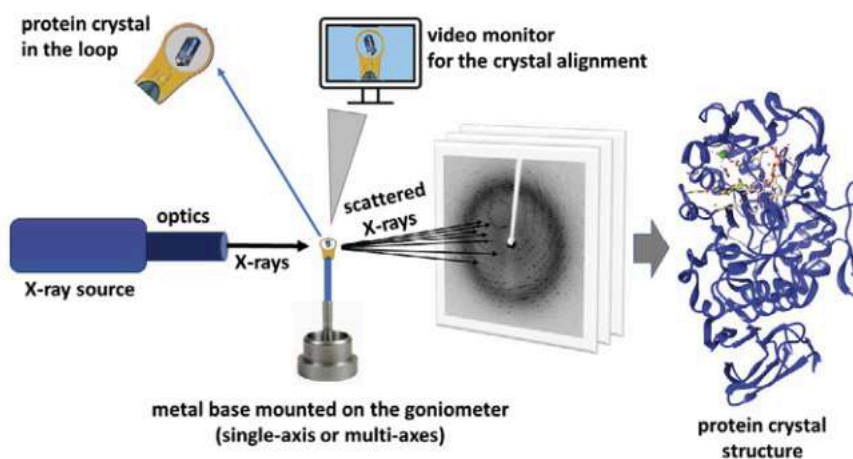
Οι περιορισμοί που τίθενται για τη μορφή της μοναδιαίας κυψελίδας επιτρέπουν την ύπαρξη 14 κρυσταλλικών πλεγμάτων. Αυτά αποτελούν τα κρυσταλλικά πλέγματα *Bravais*. Ο συνδυασμός των 14 κρυσταλλικών πλεγμάτων *Bravais* και των επιτρεπτών τύπων συμμετρίας που μπορούν να εφαρμοστούν με βάση τις περιστροφές και τις ελικώσεις παράγουν 65 διαφορετικές ομάδες χώρου που μπορούν να υπάρχουν στη φύση. Αν μπορούν να εφαρμοστούν όλοι οι τελεστές συμμετρίας μπορούν να παραχθούν 230 ομάδες χώρου [178]. Στην Εικόνα 48 παριστάνεται ένα παράδειγμα των κρυσταλλικών πλεγμάτων *Bravais* ως προς το ορθορομβικό κρυσταλλικό σύστημα. Εάν τα σημεία του κρυσταλλικού πλέγματος εντοπίζονται μόνο στις κορυφές της μοναδιαίας κυψελίδας, τότε η μοναδιαία κυψελίδα είναι απλή και το κρυσταλλικό πλέγμα συμβολίζεται ως *P* (*primitive*). Εάν βρίσκονται στα κέντρα κάθε μίας από τις δύο παράλληλες έδρες ονομάζεται κεντρωμένο και συμβολίζεται ως *C* (*centered*). Εάν υπάρχουν 6 έδρες ονομάζεται κεντρωμένο *F* (*face-centered*). Εάν βρίσκεται στο κέντρο της μοναδιαίας κυψελίδας είναι ενδοκεντρωμένη και το κρυσταλλικό πλέγμα συμβολίζεται *I*. Η ομάδα χώρου (*space group*) ορίζεται από τη συμμετρία της στοιχειώδους κυψελίδας και τον τύπο του κρυσταλλικού πλέγματος [178]. Επομένως, η ομάδα χώρου περιγράφει την εσωτερική συμμετρία της μοναδιαίας κυψελίδας, χρησιμοποιώντας τελεστές και στοιχεία συμμετρίας [177, 178].



Εικόνα 48: Τα 4 από τα κρυσταλλικά πλέγματα Bravais ως προς το ορθορομβικό κρυσταλλικό σύστημα και οι 4 πιθανοί τύποι κρυσταλλικού πλέγματος.

4.2.3 Συλλογή κρυσταλλογραφικών δεδομένων

Κατά τη συλλογή των κρυσταλλογραφικών δεδομένων ένας πρωτεϊνικός κρύσταλλος τοποθετείται πάνω σε ένα γωνιόμετρο μεταξύ μιας πηγής ακτίνων-Χ και ενός ανιχνευτή. Ο κρύσταλλος χρησιμοποιείται ως ενισχυτής σήματος, καθώς εάν τοποθετούσαμε μια μοναδιαία κυψελίδα το σήμα θα ήταν αρκετά ασθενές και δεν θα μπορούσαμε να παρατηρήσουμε τις περιθλάσεις. Στην Εικόνα 49 παρουσιάζεται η διάταξη κατά την οποία πραγματοποιείται η συλλογή των δεδομένων ακτίνων-Χ, καθώς και τα περιθλασιγράμματα. Το κάθε περιθλασιγράμματα αντιστοιχεί σε μία «φωτογραφία» της πρωτεΐνης σε μια συγκεκριμένη θέση. Για να υπολογιστεί η τρισδιάστατη δομή ολόκληρης της πρωτεΐνης θα πρέπει ο κρύσταλλος να περιστραφεί ώστε να συλλεχθούν τα περιθλασιγράμματα σε διαφορετικές γωνίες και στη συνέχεια να κατασκευαστεί το τρισδιάστατο είδωλο της πρωτεΐνης [179].



Εικόνα 49: Η διάταξη συλλογής δεδομένων περίθλασης ακτίνων-Χ από ένα πρωτεϊνικό κρύσταλλο.

Η περιστροφή του κρυστάλλου πραγματοποιείται μέσω του γωνιόμετρου, όπου εκεί τοποθετείται ο κρύσταλλος [179]. Η συλλογή των δεδομένων, για περίπου 90% των δομών που έχουν κατατεθεί στην *PDB* (*Protein Data Bank*), γίνεται με την χρήση υγρού αζώτου, το οποίο δεν παγώνει τον κρύσταλλο αλλά τον υαλοποιεί καθώς χρησιμοποιείται

κρυοπροστατευτικό διάλυμα. Η συλλογή σε χαμηλές θερμοκρασίες προστατεύει τον κρύσταλλο και αυξάνει τον χρόνο ζωής του μέσω μείωσης της βλάβης που προκαλείται από την ακτινοβολία [180]. Όταν ξεκινήσει η συλλογή των δεδομένων και ο κρύσταλλος εκτίθεται σε δέσμη ακτίνων-Χ, κάθε ηλεκτρόνιο του κρυστάλλου πραγματοποιεί εξαναγκασμένη ταλάντωση. Με άλλα λόγια, κάθε ηλεκτρόνιο εκπέμπει δευτερογενώς ακτινοβολία με μήκος κύματος ίδιο της προσπίπτουσας ακτινοβολίας προς όλες τις κατευθύνσεις. Το κύμα που εξέρχεται από τον κρύσταλλο προς κάποια κατεύθυνση αποτελεί το άθροισμα όλων των κυμάτων των ηλεκτρονίων του κρυστάλλου [179]. Εάν μπορούσαμε ένα χρησιμοποιήσουμε φακούς γνωρίζοντας το πλάτος, το μήκος και τη φάση των κυμάτων, τότε θα ήταν εφικτή η δημιουργία ενός ανεστραμμένου και μεγεθυμένου είδωλου της πρωτεΐνης. Η χρήση φακών όμως δεν είναι εφικτή, κάτι που οφείλεται στη φύση των ακτίνων-Χ, καθώς δεν υπάρχουν φακοί που να μπορούν να αλλάξουν τη διεύθυνση διάδοσης των ακτίνων. Επιπρόσθετα, η φύση των ακτίνων-Χ δεν επιτρέπει να προσδιοριστεί η φάση των κυμάτων που περιθλώνται [179]. Η δράση των φακών μπορεί να αντικατασταθεί μαθηματικά μέσω εξισώσεων σύνθεσης *Fourier*. Οι ιδιότητες των κυμάτων είναι η διεύθυνση διάδοσης του κύματος, το μήκος τους, το πλάτος τους όπου όσο μεγαλύτερο το πλάτος τόσο πιο φωτεινό είναι το κύμα, και η φάση η οποία περιγράφει την περιοδική μεταβολή του κύματος. Εάν υπολογιστούν όλες οι παραπάνω ιδιότητες, τότε μπορεί να κατασκευαστεί το είδωλο του αντικειμένου. Από το περιθλασίγραμμα μπορούν να υπολογιστούν το πλάτος, το μήκος και η διεύθυνση διάδοσης του κύματος. Η ένταση της αμαύρωσης στο περιθλασίγραμμα υποδηλώνει το πλάτος των κυμάτων, ενώ η θέση πρόσπτωσης των κυμάτων προσδιορίζει τη διεύθυνση διάδοσης των κυμάτων. Το μήκος κύματος των κυμάτων που σκεδάζονται είναι το ίδιο με αυτό της προσπίπτουσας ακτινοβολίας. Εάν είναι γνωστή και η φάση του κύματος μπορούμε να ανακτήσουμε το είδωλο της πρωτεΐνης [179].

4.2.4 Το πρόβλημα της φάσης

Ο προσδιορισμός της φάσης των κυμάτων είναι αρκετά δύσκολος, καθώς τα κύματα αλλάζουν φάση αρκετές φορές κάθε δευτερόλεπτο. Κάποιες από τις μεθοδολογίες που χρησιμοποιούνται για την εύρεση της φάσης αναγράφονται παρακάτω.

Α. Μοριακή αντικατάσταση: Αν οι ιδιότητες των κυμάτων ήταν γνωστές τότε θα μπορούσαμε να ανασκευάσουμε το είδωλο της πρωτεΐνης και αντίστροφα. Εάν η τρισδιάστατη δομή που μελετάμε μοιάζει αρκετά ή εμφανίζει ομολογία με μία ήδη γνωστή πρωτεΐνη, με τη μοριακή αντικατάσταση μπορούν να βρεθούν κάποιες αρχικές φάσεις για την υπό μελέτη πρωτεΐνη και στη συνέχεια να βελτιστοποιηθεί το μοντέλο [179].

Β. Ισόμορφη αντικατάσταση με χρήση βαρέων μετάλλων: το πρόβλημα εύρεσης της φάσης μετατίθεται στον προσδιορισμό της φάσης της περίθλασης ενός ή περισσότερων βαρέων ατόμων που έχουν προσδεθεί σε συγκεκριμένες θέσεις στην πρωτεΐνη [179].

Γ. *MAD, SAD*: Η συλλογή των δεδομένων βασίζεται σε διαφορετικά μήκη κύματος στα οποία κάποια άτομα, όπως το σελήνιο, σκεδάζουν διαφορετικά σε σχέση με τα υπόλοιπα άτομα της πρωτεΐνης. Το πρόβλημα της φάσης μετατίθεται στα άτομα αυτά [179].

4.2.5 Ανάλυση κρυσταλλογραφικών δεδομένων

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, κατά τη συλλογή των κρυσταλλογραφικών δεδομένων ένας πρωτεϊνικός κρύσταλλος τοποθετείται πάνω σε ένα γωνιόμετρο μεταξύ μιας πηγής ακτίνων-Χ και ενός ανιχνευτή. Τα πειραματικά αποτελέσματα είναι τα περιθλασιγράμματα. Το κύμα που εξέρχεται από τον κρύσταλλο προς μια συγκεκριμένη κατεύθυνση αποτελεί το άθροισμα όλων των κυμάτων των ηλεκτρονίων του κρυστάλλου. Όταν το κύμα αυτό προσπίπτει στον ανιχνευτή τότε παρατηρούνται αμαυρώσεις, εάν το άθροισμα των κυμάτων είναι ενισχυτικό. Η κάθε αμαύρωση αποτελεί το άθροισμα των κυμάτων από κάθε ηλεκτρόνιο του κρυστάλλου. Οι διαστάσεις της μοναδιαίας κυψελίδας καθορίζουν την κάθε διεύθυνση στην οποία θα παρατηρηθεί περίθλαση. Οι θέσεις των ηλεκτρονίων στο εσωτερικό του κρυστάλλου καθορίζουν τη φάση και το πλάτος των περιθλώμενων κυμάτων. Η κάθε αμαύρωση ή, με άλλα λόγια, η διεύθυνση του κάθε περιθλώμενου κύματος χαρακτηρίζεται από τους δείκτες *Miller* (h, k, l) [179].

4.2.6 Δείκτες *Miller*

Σε ένα κρυσταλλικό πλέγμα τα κρυσταλλικά επίπεδα και διευθύνσεις περιγράφονται από τους δείκτες *Miller*. Οι ακέραιοι αριθμοί ή δείκτες *Miller*, h, k και l , δείχνουν τον αριθμό των επιπέδων που υπάρχουν στους άξονες x, y, z , αντίστοιχα. Δηλαδή, οι δείκτες *Miller* δείχνουν σε πόσα τμήματα τέμνονται οι πλευρές a, b και c , αντίστοιχα, από μια οικογένεια επιπέδων. Μια οικογένεια επιπέδων με δείκτες hkl περιλαμβάνει επίπεδα του πλέγματος, με απόσταση d ανάμεσα σε δύο παράλληλα διαδοχικά επίπεδα. Η απόσταση d είναι άμεσα σχετιζόμενη με τις διαστάσεις της μοναδιαίας κυψελίδας και το κρυσταλλικό σύστημα. Οι δείκτες *Miller* αποτελούν επίσης δείκτες που μετρούν συντεταγμένες στο περιθλασίγραμμα και τη διαφορά δρόμων μεταξύ των κυμάτων. Επιπλέον, οι δείκτες αντιστοιχούν σε διαφορετικές γωνίες περίθλασης και μετρούν το φαινομενικό λ με το οποίο οι ανακλάσεις συμβάλλουν στη δημιουργία του ειδώλου. Τα κύματα διαδίδονται από διαφορετική κατεύθυνση και φαίνεται ότι συμβάλλουν με διαφορετικό μήκος κύματος αλλά στην πραγματικότητα οφείλεται στις διαφορετικές διευθύνσεις διάδοσης του κύματος. Τέλος οι δείκτες *Miller* αποτελούν και δείκτες ευκρίνειας. Πιο συγκεκριμένα, οι μικροί αριθμοί h δηλώνουν μικρές γωνίες περίθλασης, άρα περιέχουν πληροφορίες χαμηλής ευκρίνειας. Αυτό οφείλεται γιατί οι μικρές γωνίες βρίσκονται κοντά στη διεύθυνση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας, δηλαδή κοντά στην αρχή των αξόνων [179].

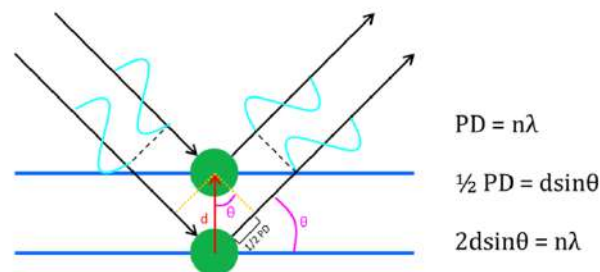
4.2.7 Ο νόμος του Bragg

Η θεωρία της περίθλασης βασίζεται στο νόμο του *Bragg*. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, οι δείκτες *Miller* ορίζουν παράλληλα κρυσταλλογραφικά επίπεδα τα οποία απέχουν μεταξύ τους απόσταση d και τέμνουν τη μοναδιαία κυψελίδα στους άξονες a, b και c . Τα παράλληλα

αυτά νοητά επίπεδα τα οποία διατρέχουν τον κρύσταλλο ερμηνεύουν την περίθλαση. Ο νόμος του *Bragg* ορίζει την περίθλαση από ένα επίπεδο, συνδέοντας τα μήκη κύματος της ακτινοβολίας με τη γωνία πρόσπτωσης στα διαδοχικά παράλληλα επίπεδα. Για να υπάρχει ενισχυτική/θετική συμβολή θα πρέπει τα δύο περιθλώμενα κύματα να έχουν την ίδια φάση. Με άλλα λόγια, θα πρέπει να εμφανίζονται την ίδια χρονική στιγμή τα ίδια μέγιστα και ελάχιστα. Για να είναι κάτι τέτοιο εφικτό, το μήκος της διαδρομής του περιθλώμενου και του προσπίπτοντος κύματος (*PD*) να ισούται με ακέραιο πολλαπλάσιο (*n*) του *λ* της προσπίπτουσας ακτινοβολίας. Στην Εικόνα 50 παρουσιάζονται δύο παράλληλα επίπεδα. Εάν εφαρμοστούν οι κανόνες της τριγωνομετρίας προκύπτει ο παρακάτω τύπος:

$$2d\sin\theta = n\lambda$$

Η σχέση αυτή δείχνει ότι η θετική συμβολή συμβαίνει για γωνίες περίθλασης, που είναι ακέραιες τιμές του *n* [178] και οι διευθύνσεις των κυμάτων που θα παρατηρηθεί περίθλαση εξαρτώνται από το *d*. Με άλλα λόγια εξαρτώνται από τις διαστάσεις της μοναδιαίας κυψελίδας [179].



Εικόνα 50: Στην εικόνα περιγράφεται ο νόμος του *Bragg*. Οι μπλε γραμμές αποτελούν δύο από τα παράλληλα επίπεδα που διατρέχουν τον κρύσταλλο. Οι πράσινες σφαίρες αντιπροσωπεύουν τα σημεία του κρυσταλλικού πλέγματος. Η προσπίπτουσα ακτινοβολία έρχεται από την αριστερή πλευρά και σκεδάζεται από τη δεξιά πλευρά. Αν η απόσταση μεταξύ των επιπέδων ισούται με *d* και εξαρτάται από τις διαστάσεις της μοναδιαίας κυψελίδας και τα δύο κύματα εμφανίζουν διαφορά μήκους διαδρομής ίση με ακέραιο πολλαπλάσιο του μήκους κύματος, τότε τα δύο κύματα θα συμβάλλουν ενισχυτικά στα περιθλασιγράμματα.

4.2.8 Μετασχηματισμοί Fourier

Ένας πρωτεϊνικός κρύσταλλος αποτελεί μία περιοδική συνάρτηση, η οποία μπορεί να αναλυθεί σε απλά κύματα όταν ο κρύσταλλος εκτεθεί σε ακτίνες-Χ, οι οποίες στη συνέχεια περιθλώνται και καταγράφονται στον ανιχνευτή ως περιθλασιγράμματα. Εάν είναι γνωστά όλα τα χαρακτηριστικά του κύματος που περιθλάται τότε μέσω του μετασχηματισμού Fourier μπορεί να υπολογιστεί το είδωλο του μορίου του κρυστάλλου. Ο *Fourier* έδειξε ότι η περιοδική συνάρτηση αναλύεται σε άθροισμα απλών κυμάτων. Ο υπολογισμός της τρισδιάστατης δομής της πρωτεΐνης από τα περιθλασιγράμματα, εφόσον είναι γνωστά τα χαρακτηριστικά του κύματος, λέγεται σύνθεση *Fourier*, ενώ η αντίστροφη πορεία, δηλαδή ο προσδιορισμός των κυμάτων που θα περιθλώνταν από ένα πρωτεϊνικό κρύσταλλο που θα βρισκόταν μπροστά από μια δέσμη ακτίνων-Χ ονομάζεται ανάλυση *Fourier*. Με άλλα λόγια, είναι εφικτός ο υπολογισμός του φάσματος περίθλασης που θα έδινε ένα είδωλο, εάν είναι γνωστή η δομή του και αντίστροφα. Ο μετασχηματισμός *Fourier* χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό των φάσεων μέσω μοριακής αντικατάστασης. Πιο συγκεκριμένα, συγκρίνονται

τα περιθλασιγράμματα της άγνωστης σε σχέση με τη γνωστή πρωτεΐνη και εφαρμόζεται βελτιστοποίηση στα σημεία που υπάρχουν διαφορές [179].

Για κάποιο κύμα με δείκτες *Miller hkl* το πλάτος ($|F_{hkl}|$) και η φάση (ϕ_{hkl}) αναπαρίστανται από τον παράγοντα δομής F_{hkl} . Οι ιδιότητες της μοναδιαίας κυψελίδας ορίζουν τη διεύθυνση του κύματος και το πλάτος και η φάση ορίζονται από την εσωτερική δομή του κρυστάλλου. Με άλλα λόγια, η φάση και το πλάτος ορίζονται ως το άθροισμα της συμβολής όλων των κυμάτων που προκάλεσαν την σκέδαση όλων των ηλεκτρονίων του κρυστάλλου σε μια διεύθυνση. Εάν υπάρχουν διαφορετικές διευθύνσεις, η συμβολή των κυμάτων είναι διαφορετική με αποτέλεσμα οι παράγοντες δομής να έχουν διαφορετικά πλάτη καθώς και φάσεις. Τα ηλεκτρόνια σκεδάζουν τις ακτίνες-Χ, επομένως αυτό που προκύπτει από το πείραμα είναι η κατανομή ηλεκτρονίων με τη μορφή πυκνότητας ως συνάρτηση της θέσης x, y, z εντός στη μοναδιαία κυψελίδα. Η συνάρτηση αυτή, $\rho(x, y, z)$, ονομάζεται συνάρτηση ηλεκτρονιακής πυκνότητας. Ένας παράγοντας δομής F_{hkl} περιγράφεται ως το άθροισμα των ηλεκτρονιακών πυκνοτήτων στον όγκο της μοναδιαίας κυψελίδας (V) [179] :

$$\vec{F}_{hkl} = \int_x \int_y \int_z \rho(xyz) e^{2\pi i(hx+ky+lz)} dV$$

Όπου:

- F_{hkl} : παράγοντας δομής
- dV : ο όγκος της μοναδιαίας κυψελίδας
- xyz : συντεταγμένες του στοιχειώδους όγκου
- $2\pi(hx + ky + lz)$: φάση στις συγκεκριμένες συντεταγμένες
- $\rho(xyz)$: το πλάτος του κύματος που περιγράφεται ως τιμή της ηλεκτρονιακής πυκνότητας
- hkl : οι δείκτες *Miller* του παράγοντα δομής

Η εφαρμογή της σύνθεσης *Fourier* οδηγεί σε μια εξίσωση της ηλεκτρονιακής πυκνότητας και προσδιορίζει την ηλεκτρονιακή πυκνότητα σε κάθε σημείο της μοναδιαίας κυψελίδας:

$$\rho(xyz) = \sum_{hkl} |\vec{F}_{hkl}| e^{i\phi_{hkl}} e^{-2\pi i(hx+ky+lz)}$$

Όπου:

- $|F_{hkl}|$: πλάτος του παράγοντα δομής F_{hkl}
- $\rho(xyz)$: συνάρτηση ηλεκτρονιακής πυκνότητας
- ϕ_{hkl} : φάση του παράγοντα F_{hkl}
- $-2\pi(hx + ky + lz)$: πόσο συνεισφέρει ο παράγοντας F_{hkl} στη διαμόρφωση της ηλεκτρονιακής πυκνότητας στη θέση xyz [179].

4.2.9 Ενσωμάτωση κρυσταλλογραφικών δεδομένων (Integration)

Κατά τη συλλογή των κρυσταλλογραφικών δεδομένων, τα πειραματικά αποτελέσματα της περίθλασης ακτίνων-Χ είναι οι αμαυρώσεις που υπάρχουν στον ανιχνευτή. Ο κρύσταλλος είναι τοποθετημένος πάνω στο γωνιόμετρο και περιστρέφεται με στόχο τη συλλογή πολλών περιθλασιγραμμάτων, τα οποία αποτελούνται από πολλές αμαυρώσεις. Η ενσωμάτωση των

κρυσταλλογραφικών δεδομένων ή αλλιώς *integration* είναι μία διαδικασία κατά την οποία πραγματοποιείται η μέτρηση της έντασης των αμαυρώσεων στον καταγραφέα. Πιο συγκεκριμένα, οι τιμές κάθε πίκσελ ενώνονται ώστε να υπολογιστεί η ένταση της κάθε αμαύρωσης. Αποτελεί μία σχετικά απλή διαδικασία αν δεν υπάρχει θόρυβος στο περιθλασίγραμμα. Ο θόρυβος επηρεάζει τον ακριβή εντοπισμό της κάθε αμαύρωσης και στο να ληφθεί υπόψη ο μη μηδενικός θόρυβος του περιθλασιγράμματος. Επομένως, απαιτείται ο ορισμός κάποιων ορίων στο επίπεδο του θορύβου, έτσι ώστε να επιτευχθεί ο ακριβής διαχωρισμός των αδύναμων αμαυρώσεων από το θόρυβο. Μία βασική μεθοδολογία που ακολουθείται είναι η χρήση του προφίλ των έντονων αμαυρώσεων ως πρότυπο στο οποίο μπορούν να ταιριάζουν οι πιο αδύναμες αμαυρώσεις [181, 182].

4.2.10 Ρύθμιση κλίμακας και συγχώνευσης (Scaling and merging)

Τα δεδομένα που προκύπτουν μετά την ενσωμάτωση, λόγω αλλαγών στη ένταση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας, βλάβης του κρυστάλλου, μη ομοιόμορφης απόκρισης του ανιχνευτή, δεν βρίσκονται όλα στην ίδια κλίμακα. Κρίνεται σημαντική η ρύθμιση κλίμακας, έτσι ώστε όλες αυτές οι αλλαγές που συμβαίνουν κατά τη συλλογή των δεδομένων να απαλειφθούν, και όλες οι ανακλάσεις να τοποθετηθούν στη ίδια κλίμακα εντάσεων. Επιπλέον, κάποιες ανακλάσεις εμφανίζουν την ίδια ένταση, λόγω συμμετρίας του κρυστάλλου, και πρέπει να συγχωνευτούν. Έτσι, προκύπτουν οι μοναδικές ανακλάσεις με το σφάλμα τους, λόγω συγχώνευσης των ισοδύναμων αμαυρώσεων [181, 182].

4.2.11 Αξιολόγηση των δεδομένων περίθλασης σε σχέση με την ευκρίνεια

Η ευκρίνεια (*resolution*) ορίζεται ως η ελάχιστη απόσταση των επιπέδων του κρυσταλλικού πλέγματος που παρέχουν μετρήσιμη περίθλαση ακτίνων-Χ. Η μονάδα μέτρησής της είναι το *Angstrom* (Å). Με άλλα λόγια καθορίζει την ελάχιστη απόσταση που υπάρχει μεταξύ των δομικών χαρακτηριστικών ώστε να μπορούν να διακρίνονται στο χάρτη της ηλεκτρονιακής πυκνότητας, δηλαδή ορίζει το επίπεδο της λεπτομέρειας και της αξιοπιστίας της δομής. Πιο αναλυτικά, όσο υψηλότερη είναι η ευκρίνεια τόσο πιο λεπτομερής και αξιόπιστος είναι χάρτης της ηλεκτρονιακής πυκνότητας, καθώς η υψηλή ευκρίνεια μεταφράζεται ως χαμηλή απόσταση d με αποτέλεσμα να υπάρχει μεγαλύτερος αριθμός μετρήσιμων αμαυρώσεων, άρα να διακρίνονται περισσότερες λεπτομέρειες στην κρυσταλλική δομή και να είναι πιο αξιόπιστη [156]. Σύμφωνα με το νόμο του *Bragg*, η σχέση μεταξύ της γωνίας και της απόστασης μεταξύ των επιπέδων των επαναλαμβανόμενων μονάδων είναι αντιστρόφως ανάλογη. Πιο συγκεκριμένα, οι μικρές αποστάσεις οδηγούν σε μεγαλύτερες γωνίες περίθλασης και τελικά σε αμαυρώσεις μεγαλύτερης ακτίνας από το κέντρο του περιθλασιγράμματος. Άρα, όσο μικρότερη είναι η απόσταση μεταξύ των αμαυρώσεων, τόσο υψηλότερης ευκρίνειας είναι τα πειραματικά δεδομένα [179]. Η υψηλή ευκρίνεια ορίζεται από την ποιότητα του κρυστάλλου και το μήκος κύματος της πηγής ακτίνων-Χ. Η ευκρίνεια διακρίνεται σε ατομική ευκρίνεια σε 1.2-0.65 Å, ενδιάμεση σε 2.7-2.0 Å και χαμηλή από 2.7

Å και παραπάνω. Σε πειραματικά δεδομένα ενδιάμεσης ευκρίνειας παρατηρούνται και τα μόρια ύδατος που είναι συνδεδεμένα με την πρωτεΐνη. Σε δεδομένα με ευκρίνεια χαμηλότερη του 1 Å παρατηρούνται και τα άτομα υδρογόνου [156]. Οι στατιστικοί δείκτες της επεξεργασίας των κρυσταλλογραφικών δεδομένων δείχνουν κατά πόσο καλά και αξιόπιστα είναι τα πειραματικά δεδομένα για τη συγκεκριμένη ευκρίνεια που αναλύθηκαν. Συνήθως χρησιμοποιούνται οι παρακάτω στατιστικοί δείκτες.

- Πολλαπλότητα (*redundancy, multiplicity*): ορίζεται ο μέσος αριθμός των μετρήσεων για κάθε μια μοναδική αμαύρωση. Πιο συγκεκριμένα, όσο μεγαλύτερη είναι η πολλαπλότητα τόσο πιο αξιόπιστη και ακριβής είναι η μέτρηση του μέσου όρου της έντασης της κάθε αμαύρωσης. Για να υπάρχει αξιοπιστία της δομής θα πρέπει ο δείκτης αυτός να είναι μεγαλύτερος από 3 [156].
- R_{merge} (R_{sym} , R_{int}): εκτιμά το εύρος των εντάσεων των συμμετρικά ισοδύναμων αμαυρώσεων που συμβάλλουν για τη δημιουργία μιας μοναδικής ανάκλασης. Πιο συγκεκριμένα, η τιμή θα πρέπει να είναι μικρότερη από 10%. Στη στοιβάδα υψηλής ευκρίνειας μπορεί να έχει τιμή 30-40% για χαμηλής συμμετρίας κρυστάλλους και 60% για κρυστάλλους με υψηλή συμμετρία. Είναι επιθυμητό η πολλαπλότητα την μετρήσεων να είναι υψηλή επειδή βελτιώνει την ποιότητα των δεδομένων συγχώνευσης σε σχέση με την ένταση των αμαυρώσεων και τα εκτιμώμενα σφάλματα. Ωστόσο, ο δείκτης αυτός δεν είναι τόσο χρήσιμος καθώς δεν υπολογίζει την πολλαπλότητα των μετρήσεων [156].
- I/σ : αποτελεί δείκτη αξιολόγησης της ευκρίνειας των δεδομένων και ορίζεται ως ο λόγος της έντασης της αμαύρωσης ως προς το σφάλμα της μέτρησης. Το όριο της ευκρίνειας ορίζεται σε εκείνη την ευκρίνεια όπου αυτός ο δείκτης έχει στη μέση τιμή στην εξωτερική στοιβάδα ίση περίπου με 2. Τιμές μικρότερες του 2 ίσως εμφανίζουν υψηλά σφάλματα, ενώ μία τιμή μεγαλύτερη του 2 υποδηλώνει ότι υπάρχει η πιθανότητα καλύτερης περίθλασης από τον κρύσταλλο αλλά η ευκρίνεια των δεδομένων περιορίζεται από κάποιες συνθήκες κατά τη διάρκεια της συλλογής τους [156].
- $CC^{1/2}$: αποτελεί ένα δείκτη όπου είναι μια στατιστικώς σημαντική τιμή για να αποφασιστεί ποια δεδομένα είναι σημαντικά. Τα πειραματικά δεδομένα χωρίζονται σε δύο μέρη, κάθε ένα από το οποίο περιέχει τυχαία τις μισές μετρήσεις των ανακλάσεων για κάθε μοναδική ανάκλαση. Στη συνέχεια, υπολογίζεται ο συντελεστής συσχέτισης *Pearson* (CC) μεταξύ της μέσης τιμής των ανακλάσεων από το κάθε μέρος που είχαν χωριστεί τα δεδομένα. Η τιμή αυτή είναι κοντά στο 1.0 σε δεδομένα χαμηλής ευκρίνειας και κοντά στο 0.1 σε δεδομένα υψηλής ευκρίνειας [183].
- Πληρότητα (*completeness*): ορίζεται ως η πιθανότητα να έχουν μετρηθεί θεωρητικά όλες οι μοναδικές ανακλάσεις σε συγκεκριμένη ευκρίνεια. Η τιμή αυτή θα πρέπει να βρίσκεται κοντά στο 100%. Ωστόσο, λόγω καταστροφής του κρυστάλλου κάποιες αμαυρώσεις μπορεί να μην έχουν μετρηθεί, με αποτέλεσμα η πληρότητα να είναι χαμηλότερη του 100% και να επηρεάζεται ο χάρτης της ηλεκτρονιακής πυκνότητας [156].

4.2.12 Χάρτες ηλεκτρονιακής πυκνότητας- Βελτιστοποίηση και αξιολόγηση του τελικού μοντέλου

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, μέσω του μετασχηματισμού *Fourier*, εφόσον γνωρίζουμε τις φάσεις, μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε τις πειραματικές ανακλάσεις (F_{obs}) για τον υπολογισμό του χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας. Οι φάσεις (ϕ_{calc}) υπολογίζονται μέσω μοριακής αντικατάστασης, όπου η γνωστή δομή τοποθετείται στη μοναδιαία κυψελίδα αλλάζοντας τη θέση και τον προσανατολισμό ώστε τα πειραματικά δεδομένα να ταιριάζουν με αυτά που προκύπτουν από τη γνωστή δομή. Ακολουθεί μια διαδικασία βελτιστοποίησης, με την εφαρμογή περιορισμών (*restrained refinement*), των συντεταγμένων των ατόμων στο χώρο (x,y,z) αλλά και των τελεστών θερμικής κίνησης (B), που θα αναλυθεί παρακάτω. Η δομή που προκύπτει αποτελεί το αρχικό μοντέλο όπου θα μελετηθούν οι χάρτες της ηλεκτρονιακής πυκνότητας. Η ακρίβεια αυτού του χάρτη εξαρτάται από την ακρίβεια των φάσεων του μοντέλου που χρησιμοποιήθηκε. Για να βελτιστοποιηθεί περαιτέρω ο χάρτης της υπό μελέτης δομής, χρησιμοποιείται και ο διαφορικός χάρτης ηλεκτρονιακής πυκνότητας. Ο χάρτης αυτός υπολογίζεται με βάση τις διαφορές που εμφανίζονται μεταξύ των πειραματικών και των υπολογισμένων πλατών, δηλαδή των εντάσεων των ανακλάσεων, χρησιμοποιώντας τις φάσεις του μοντέλου. Με άλλα λόγια, αποτελεί το χάρτη $F_{obs}-F_{calc}$, ϕ_{calc} . Αυτός ο χάρτης εμφανίζει τις διαφορές μεταξύ των πειραματικών μετρήσεων και της δομής του μοντέλου και παρατηρούνται δύο τύποι πυκνότητας. Εμφανίζεται η θετική πυκνότητα, η οποία υπάρχει στα πειραματικά δεδομένα, και η αρνητική πυκνότητα η οποία δηλώνει περιοχές που δεν υπάρχουν στα πειραματικά δεδομένα αλλά υπάρχουν στη δομή μοντέλο. Ο χάρτης $F_{obs}-F_{calc}$, ϕ_{calc} που χρησιμοποιείται είναι μία υπέρθεση των δύο τύπων χαρτών που αναφέρθηκαν, ο οποίος μας δείχνει τις βελτιώσεις που πρέπει να κάνουμε ώστε το μοντέλο να ενσωματωθεί όσο το δυνατόν καλύτερα στην ηλεκτρονική πυκνότητα. Πολλές φορές οι χάρτες ηλεκτρονιακής πυκνότητας περιέχουν θόρυβο, λόγω των σφαλμάτων που προκύπτουν κατά τον προσδιορισμό των χαρτών. Για την αποφυγή λαθών κατά τη βελτιστοποίηση, ενδείκνυται η χρήση μιας καλής μονάδας απεικόνισης, όπου για τον χάρτη $2F_{obs}-F_{calc}$, ϕ_{calc} είναι το 1σ, ενώ για το χάρτη $F_{obs}-F_{calc}$, ϕ_{calc} είναι το 3σ. Το σ αντιστοιχεί στη ρίζα της μέσης τετραγωνικής τιμής της απόκλισης της ηλεκτρονιακής πυκνότητας από τη μέση ηλεκτρονική πυκνότητα όλης της μοναδιαίας κυψελίδας, ή αλλιώς *rmsd* (*root mean square deviation*) [156]. Στη συνέχεια, πραγματοποιούνται οι κατάλληλες αλλαγές στο αρχικό μοντέλο. Η αξιολόγηση των αλλαγών πραγματοποιείται μέσω *restrained refinement* και αξιολογούνται οι παρακάτω δείκτες.

- ***Rfactor***: ο δείκτης αυτός υποδηλώνει την ασυμφωνία μεταξύ των πλατών των παραγόντων δομής που υπολογίζονται από το μοντέλο και από τα πλάτη που μετρήθηκαν πειραματικά. Ο δείκτης ορίζεται από την παρακάτω σχέση:

$$\frac{\sum |F_{obs}| - |F_{calc}|}{\sum F_{obs}} \quad [178]$$

Μέσω του δείκτη αυτού εκφράζεται η απόκλιση της πραγματικής δομής σε σχέση με τη δομή μοντέλο. Η τιμή του πρέπει να είναι μικρότερη του 20% για μία καλά προσδιορισμένη δομή.

Μια χαμηλή τιμή όμως μπορεί να προκύψει απλά και μόνο προσθέτοντας μόρια ύδατος ώστε να καλυφθεί η θετική ηλεκτρονιακή πυκνότητα που παρατηρείται, ακόμα και αν το μοντέλο δεν είναι ακριβές [178].

- **R_{free} :** ο δείκτης αυτός υπολογίζεται όπως και ο παραπάνω, με τη διαφορά ότι επιλέγονται τυχαίες περιθλάσεις, περίπου το 5% των συνολικών περιθλάσεων. Οι περιθλάσεις διαχωρίζονται στην αρχή και δεν χρησιμοποιούνται στη βελτιστοποίηση των δεδομένων η οποία γίνεται με βάση τις υπόλοιπες περιθλάσεις. Ο δείκτης αυτός εμφανίζει υψηλότερη ευαισθησία, σε αντίθεση με τον R_{factor} , και χρησιμοποιείται για να αποφευχθεί η υπερ-βελτιστοποίηση του μοντέλου. Στα αρχικά στάδια βελτιστοποίησης ο R_{free} έχει υψηλότερες τιμές, σε σχέση με τον R_{factor} , αλλά στα τελικά στάδια εμφανίζουν παρόμοιες τιμές. Η βέλτιστη διαφορά τους είναι περίπου στο 7%. Η τιμή του R_{free} πρέπει να είναι μικρότερη ή ίση του 28%, ενώ του R_{factor} μικρότερη ή ίση του 25% [156].
- **Πληρότητα (*occupancy*):** αποτελεί μία τιμή που δείχνει σε πόσα μόρια της μοναδιαίας κυψελίδας ένα συγκεκριμένο άτομο βρίσκεται ακριβώς στην ίδια θέση. Η τιμή αυτή για όλα τα άτομα θα είναι 1.00 εάν όλα τα μόρια στον κρύσταλλο είναι ίδια. Σε κάποιες περιπτώσεις, η πλευρική αλυσίδα κάποιων καταλοίπων μπορεί να έχει δύο ή περισσότερες διαμορφώσεις. Επομένως, η βελτιστοποίηση της δομής είναι πιο αντιπροσωπευτική εάν το κατάλοιπο περιγραφεί με όλες τις διαφορετικές διαμορφώσεις. Για παράδειγμα, για ένα κατάλοιπο με δύο διαμορφώσεις, η πληρότητα για κάθε διαμόρφωση ισούται με 0.5 ή αν φαίνεται πως στα περισσότερα μόρια επικρατεί η μία έναντι της άλλης, τότε μπορεί να τροποποιηθεί κατάλληλα. Η τροποποίηση της πληρότητας μπορεί να εφαρμοστεί και στην περίπτωση πρόσδεσης ενώσεων, οι οποίοι μπορεί να μην έχουν προσδεθεί σε όλα τα μόρια της πρωτεΐνης του κρυστάλλου [177].
- **Τελεστής B (*B-factor*):** οι παράγοντες θερμικής κίνησης B αποτελούν μέτρο με το οποίο τα άτομα ταλαντώνονται στις 3 διαστάσεις. Το νέφος της ηλεκτρονιακής πυκνότητας επηρεάζεται γύρω από τον πυρήνα του κάθε ατόμου επειδή οι παράγοντες θερμικής κίνησης επιδρούν στον ατομικό παράγοντα σκέδασης σύμφωνα με τον παρακάτω τύπο:

$$B=8\pi^2u^2$$

Όπου u^2 υποδηλώνει το τετράγωνο της μέσης τιμής του εύρους ταλάντωσης ενός ατόμου από τη θέση ηρεμίας. Οι υψηλές τιμές των παραγόντων θερμικής κίνησης ειδικά για τα μόρια ύδατος δηλώνουν ότι η βελτιστοποίηση των μορίων του διαλύτη δεν έχει γίνει προσεχτικά [177].

- **Παράγοντας θερμικής κίνησης *Wilson*:** ο δείκτης αυτός προκύπτει από την ανάλυση ενός διαγράμματος της μέσης έντασης της αμαύρωσης ως προς το λόγο $\sin^2(\theta)/\lambda^2$. Το διάγραμμα αυτό αποτελεί το διάγραμμα *Wilson*. Ο δείκτης αυτός δείχνει το βαθμό της τάξης στον κρύσταλλο. Εάν είναι υψηλός δηλαδή μεγαλύτερος από $50 \text{ \AA}^2$ τότε πιθανότατα υπάρχει διαταραχή στην κρυσταλλική δομή. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε

δυσκολία στον καθορισμό όλων των τμημάτων της πρωτεΐνης ακόμα και αν η ευκρίνεια είναι ικανοποιητική [184].

- **Τετραγωνική ρίζα της μέσης τιμής απόκλισης (*r.m.s.d.*):** ο δείκτης αυτός δείχνει τις αποκλίσεις από τις ιδανικές γεωμετρικές παραμέτρους, μήκη και γωνίες, των δεσμών του μοντέλου. Αυτοί οι παράμετροι λειτουργούν ως περιορισμοί κατά τη βελτιστοποίηση. Όσον αφορά τις τιμές που μπορεί να έχει, για τα μήκη η τιμή θα πρέπει να είναι μικρότερη από 0,02 Å, ενώ για τις γωνίες μικρότερη από 4° [185].
- **Διάγραμμα *Ramachandran*:** το διάγραμμα *Ramachandran* δείχνει αν κάθε κατάλοιπο της πρωτεΐνης εμφανίζει σωστές γωνίες ϕ και ψ , καθώς πολλοί συνδυασμοί γωνιών ϕ και ψ δεν είναι επιτρεπτοί. Το κατάλοιπο θα βρίσκεται σε μη επιτρεπτή θέση εάν οι γωνίες είναι μη επιτρεπτές [185].

PDB-REDO: κατά τα τελικά στάδια των βελτιστοποιήσεων ελέγχεται η απόσταση μεταξύ των πλευρικών ομάδων μεταξύ δύο αμινοξέων, με βάση τους περιορισμούς που υπάρχουν. Το *PDB-REDO* είναι ένας διακομιστής, το οποίο χρησιμοποιεί μια σειρά προγραμμάτων με αυτοματοποιημένο τρόπο ώστε να βελτιστοποιήσει της γεωμετρία της δομής και τις αλληλεπιδράσεις που δημιουργούνται μεταξύ των καταλοίπων της πρωτεΐνης. Επιπλέον, επιλέγει στρατηγική βελτιστοποίησης της δομής, δηλαδή πόσοι κύκλοι θα γίνουν και με ποιον τρόπο θα γίνει η βελτιστοποίηση των τελεστών B (χρήση *TLS*, ανισοτροπική κ.α.). Τέλος, παράγονται νέοι στατιστικοί δείκτες και μπορούμε να ελέγξουμε όλες τις αλλαγές που έχουν γίνει [186, 187].

4.3 Παρασκευή υλικού Lactose Sepharose 6B για χρωματογραφία συγγένειας

Αρχικά, 60 mL *Sepharose 6B* τοποθετήθηκαν σε απιονισμένο ύδωρ και αναδεύτηκαν για να μην υπάρχουν συσσωματώματα. Το υλικό μεταφέρθηκε σε χωνί *Buchner* και πλύθηκε με 1 L απιονισμένο ύδωρ και έπειτα με 1 L διάλυμα 0.5 M Na_2CO_3 , pH 11. Το υλικό μεταφέρθηκε σε ποτήρι ζέσεως και προστέθηκε 10% v/v *vinyl sulfone*. Ακολούθησε ανάδευση για 70 min. Στη συνέχεια, το υλικό πλύθηκε με 1 L διάλυμα 0,5 M Na_2CO_3 , pH 11, μεταφέρθηκε σε ποτήρι ζέσεως και προστέθηκε 60 mL διαλύματος 0,5 M Na_2CO_3 , pH 11, το οποίο περιέχει 6 gr λακτόζης. Ακολούθησε, 16 ώρες ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Με το πέρας της ανάδευσης, το υλικό πλύθηκε με διάλυμα 0,5 M Na_2CO_3 , pH 11 και εξισορροπήθηκε με διάλυμα *PBS*, pH 7,4. Τέλος, ακολούθησε η συσκευασία της στήλης *XK50 GE Healthcare Life Sciences*, σύμφωνα με το εγχειρίδιο χρήσης.

4.4 Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων

Μετασχηματισμός ονομάζεται η διαδικασία κατά την οποία εισάγεται ένας πλασμιδιακός φορέας σε βακτηριακά κύτταρα. Υπάρχουν αρκετοί τρόποι μετασχηματισμού, όπου οι πιο συνηθισμένοι είναι ο χημικός, ο ηλεκτρικός μετασχηματισμός, η βαλλιστική μέθοδος και ο μετασχηματισμός με χρήση υπερήχων.

4.4.1 Χημικός μετασχηματισμός

Κατά το χημικό μετασχηματισμό, χρησιμοποιούνται κύτταρα τα οποία έχουν επεξεργαστεί με $CaCl_2$, ώστε να είναι δεκτικά στην εισαγωγή πλασμιδίου. Αρχικά, γίνεται η προσθήκη του πλασμιδιακού φορέα στα δεκτικά βακτηριακά κύτταρα και επωάζονται στον πάγο για 30 λεπτά. Ακολουθεί επώαση στους $42^\circ C$ για 45 δευτερόλεπτα και έπειτα ξανά σε πάγο για 1 λεπτό. Η απότομη επώαση σε διαφορετικές θερμοκρασίες οδηγεί σε εκπόλωση της βακτηριακής μεμβράνης των δεκτικών κυττάρων με στόχο την εισαγωγή του επιθυμητού πλασμιδίου εντός των κυττάρων. Η μεταφορά των κυττάρων σε πάγο οδηγεί στην επαναφορά της κυτταρικής μεμβράνης στην αρχική της κατάσταση, έτσι ώστε να εγκλωβιστεί εντός του κυττάρου το επιθυμητό πλασμίδιο. Στη συνέχεια, προστίθενται 900 μL θρεπτικού υλικού και ακολουθεί η ανάπτυξη των κυττάρων σε θερμοκρασία $37^\circ C$ σε επωαστήρα υπό ανακίνηση 210 *rpm* για μία ώρα. Τέλος, επιστρώθηκε μια ποσότητα των κυττάρων σε τρυβλία *Petri* σε στερεό θρεπτικό υλικό (*LB agar*) παρουσία αντιβιοτικού για επιλογή των βακτηρίων στα οποία εισήχθη το επιθυμητό πλασμίδιο. Η ανάπτυξη αποικιών πραγματοποιήθηκε μετά από 16 ώρες επώασης σε θερμοκρασία $37^\circ C$ [188].

4.5 Παραγωγή, καθαρισμός και απομόνωση ανθρώπινων γαλεκτινών

Οι πλασμιδιακοί φορείς των ανθρώπινων γαλεκτινών-3, 4*N*, 7 και 8*N* ήταν ευγενική προσφορά του *Prof. Hakon Leffler* από το Πανεπιστήμιο του *Lund*. Στον παρακάτω Πίνακα αναγράφονται οι πλασμιδιακοί φορείς που φέρουν τα γονίδια των υπό μελέτη ανθρώπινων γαλεκτινών.

Πίνακας 3: Οι πλασμιδιακοί φορείς που φέρουν τα ανθρώπινα γονίδια των υπό μελέτη γαλεκτινών.

Πλασμιδιακός φορέας	Γονίδιο
pET28a	Γαλεκτίνη-3-CRD
pET28	Γαλεκτίνη-8N-CRD
pET28c	Γαλεκτίνη-4C-CRD
pET22	Γαλεκτίνη-7

4.5.1 Παραγωγή της ανασυνδυασμένης Γαλεκτίνης-3- CRD σε βακτηριακό σύστημα *E. coli*

Το επιθυμητό γονίδιο εισήχθη σε χημειοδεκτικά βακτηριακά κύτταρα *E. coli* και πιο συγκεκριμένα στο βακτηριακό στέλεχος *BL21-GOLD (DE3)* μέσω χημικού μετασχηματισμού (εδάφιο 4.4.1). Το αντιβιοτικό που χρησιμοποιήθηκε ήταν η κανακυμίνη σε συγκέντρωση 50 $\mu g/mL$. Στη συνέχεια, επιλέχθηκε μία από τις αποικίες που αναπτύχθηκαν και αναπτύχθηκε σε υγρό θρεπτικό υλικό *LB-Broth* κατά *Miller*, με παρουσία καναμυκίνης 50 $\mu g/mL$. Η υγρή

καλλιέργεια αναπτύχθηκε μετά από 16 ώρες σε επωαστήρα υπό ανακίνηση, σε θερμοκρασία 37° C, 210 rpm. Μετά το πέρας της ανάπτυξης, 10 mL της καλλιέργειας μεταφέρθηκαν σε 1 L υγρού θρεπτικού υλικού *LB-Broth* κατά *Miller* και προστέθηκε το αντιβιοτικό καναμυκίνη συγκέντρωσης 50 µg/mL. Πριν γίνει η προσθήκη των βακτηριακών κυττάρων, λήφθηκε δείγμα τυφλού μάρτυρα για την παρακολούθηση της ανάπτυξης μέσω φασματοφωτομετρίας, σε μήκος κύματος στα 600 nm. Η καλλιέργεια τοποθετήθηκε σε επωαστήρα υπό ανακίνηση, σε θερμοκρασία 37° C, 210 rpm, μέχρις ότου η οπτική απορρόφηση σε μήκος κύματος 600 nm φτάσει 0,6-0,7. Ακολούθως, προστέθηκε 1 mM IPTG και η καλλιέργεια τοποθετήθηκε σε επωαστήρα υπό ανακίνηση, σε θερμοκρασία 37° C, 210 rpm για 3 ώρες. Τέλος, πραγματοποιήθηκε η συλλογή των βακτηριακών κυττάρων μέσω φυγοκέντρωσης σε θερμοκρασία 4° C, 6000 rpm για 30 λεπτά.

4.5.2 Καθαρισμός και απομόνωση της Γαλεκτίνης-3- CRD

Το ίζημα των βακτηριακών κυττάρων διαλύθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα λύσης *MEPBS*, pH 7.4. Επιπλέον, προστέθηκε αναστολέας πρωτεασών, 1 mM *PMSF*. Ακολούθησε η λύση των κυττάρων με εφαρμογή υπερήχων (70% *amplitude*, 30 s εφαρμογή, 30 s παύση στους 4° C για 5 κύκλους) και προστέθηκε στο πρωτεϊνικό δείγμα διάλυμα βενζονάσης, το οποίο επώαστηκε για 10 λεπτά στον πάγο. Το διαλυτό πρωτεϊνικό δείγμα συλλέχθηκε μετά από φυγοκέντρωση για 45 λεπτά, στους 4° C και 16000 rpm. Το υπερκείμενο (διαλυτό πρωτεϊνικό δείγμα) πέρασε από φίλτρο με πόρους διαμέτρου 0,45 µm, υποβλήθηκε σε χρωματογραφικό καθαρισμό μέσω του συστήματος *AKTA-FPLC* (*GE Healthcare*). Τα ρυθμιστικά διαλύματα, σε όλα τα στάδια της διαδικασίας, είχαν φιλτραριστεί με πόρους διαμέτρου 0,20 µm και απαερωθεί σε υδατόλουτρο υπερήχων.

1° βήμα καθαρισμού: Στήλη χρωματογραφία συγγένειας (*Lactose Sepharose 6B*)

Αρχικά, έγινε η εξισορρόπηση της στήλης με *MEPBS*, pH 7,4 με περίπου πέντε όγκους στήλης. Ακολούθησε η εισαγωγή του πρωτεϊνικού δείγματος με ροή 0,4 mL/min και συλλέχθηκαν κλάσματα των 5 mL. Το στάδιο αυτό ονομάζεται *Flow Through*. Στη συνέχεια, έγινε η έκπλυση της στήλης περίπου με πέντε όγκους *MEPBS*, pH 7,4 (*Wash*) με ροή 1 mL/min και συλλέχθηκαν κλάσματα των 5 mL. Τέλος, ακολούθησε η έκλυση της γαλεκτίνης-3-CRD με ρυθμιστικό διάλυμα *MEPBS*, pH 7,4, 150 mM λακτόζη με ροή 1 mL/min και συλλέχθηκαν κλάσματα των 5 mL.

Για τον έλεγχο της πορείας καθαρισμού, τα συλλεχθέντα κλάσματα αναλύθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (*SDS-PAGE*). Τα κλάσματα της έκλυσης που περιείχαν τη γαλεκτίνης-3-CRD συλλέχθηκαν και υποβλήθηκαν σε εκτεταμένη διαπίδυση έναντι διαλύματος 10 mM *Tris-HCl*, pH 7,5. Μετά το πέρας της διαπίδυσης, το δείγμα συμπυκνώθηκε με φίλτρο συμπύκνωσης με κατώφλι 10 kDa, σε όγκο 600 µL.

2° βήμα καθαρισμού: Στήλη μοριακής διήθησης (*Superdex 75*)

Αρχικά, έγινε η εξισορρόπηση της στήλης με 10 mM *Tris-HCl*, pH 7,5 για ένα όγκο στήλης. Το συμπυκνωμένο δείγμα υποβλήθηκε σε διαύγαση 18000 rpm, 4° C για 30 λεπτά, εφαρμόστηκε στη *Superdex 75*, με ροή 0,5 mL/min και συλλέχθηκαν κλάσματα των 5 mL.

Για τον έλεγχο της πορείας καθαρισμού, τα συλλεχθέντα κλάσματα αναλύθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (*SDS-PAGE*). Τα κλάσματα που περιείχαν τη γαλεκτίνη-3-CRD συλλέχθηκαν και συμπυκνώθηκαν με φίλτρο συμπύκνωσης με κατώφλι 10 kDa, σε όγκο 300 µL. Τέλος, η γαλεκτίνη-3-CRD αποθηκεύτηκε στους -80° C.

4.5.3 Παραγωγή της ανασυνδυασμένης Γαλεκτίνης-4C-CRD σε βακτηριακό σύστημα *E. coli*

Το επιθυμητό γονίδιο της γαλεκτίνης-4C-CRD εισήχθη σε χημειοδεκτικά βακτηριακά κύτταρα *E. coli* και πιο συγκεκριμένα στο βακτηριακό στέλεχος *BL21-GOLD (DE3)* μέσω χημικού μετασχηματισμού (εδάφιο 4.4.1). Το αντιβιοτικό που χρησιμοποιήθηκε ήταν η κανακυμίνη σε συγκέντρωση 50 µg/mL. Ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων και η παραγωγή της επιθυμητής πρωτεΐνης έγινε με τον ίδιο τρόπο που αναφέρθηκε στο εδάφιο 4.5.1.

4.5.4 Καθαρισμός και απομόνωση της γαλεκτίνης-4C-CRD

Ο καθαρισμός και η απομόνωση της γαλεκτίνης-4C-CRD πραγματοποιήθηκε, όπως στο εδάφιο 4.5.2, με τη διαφορά ότι δεν χρησιμοποιήθηκε η στήλη μοριακής διήθησης. Πιο συγκεκριμένα, ως πρώτο βήμα καθαρισμού χρησιμοποιήθηκε η στήλη χρωματογραφίας συγγένειας (*Lactose Sepharose 6B*). Τα κλάσματα της έκλουσης που περιείχαν τη γαλεκτίνη-4C-CRD συλλέχθηκαν και υποβλήθηκαν για εκτεταμένη διαπίδυση έναντι διαλύματος *PBS*, pH 7,4. Μετά το πέρας της διαπίδυσης, το δείγμα συμπυκνώθηκε με φίλτρο συμπύκνωσης με κατώφλι 10 kDa, σε όγκο 150 µL. Τέλος, η γαλεκτίνη-4C-CRD αποθηκεύτηκε στους -80° C.

4.5.5 Παραγωγή της ανασυνδυασμένης Γαλεκτίνης-7 σε βακτηριακό σύστημα *E. coli*

Το επιθυμητό γονίδιο της γαλεκτίνης-7-CRD εισήχθη σε χημειοδεκτικά βακτηριακά κύτταρα *E. coli* και πιο συγκεκριμένα στο βακτηριακό στέλεχος *BL21-GOLD (DE3)* μέσω χημικού μετασχηματισμού (εδάφιο 4.4.1). Το αντιβιοτικό που χρησιμοποιήθηκε ήταν η αμπικιλίνη σε συγκέντρωση 34 µg/mL. Στη συνέχεια, επιλέχθηκε μία από τις αποικίες που αναπτύχθηκαν και αναπτύχθηκε σε υγρό θρεπτικό υλικό *LB-Broth* κατά *Miller*, με παρουσία αμπικιλίνης 34 µg/mL. Η υγρή καλλιέργεια αναπτύχθηκε μετά από 16 ώρες σε επωαστήρα υπό ανακίνηση, σε θερμοκρασία 37° C, 210 rpm. Μετά το πέρας της ανάπτυξης, 10 mL της καλλιέργειας μεταφέρθηκαν σε 1 L υγρού θρεπτικού υλικού *LB-Broth* κατά *Miller* και προστέθηκε το αντιβιοτικό αμπικιλίνης συγκέντρωσης 34 µg/mL. Πριν γίνει η προσθήκη των βακτηριακών κυττάρων, λήφθηκε δείγμα τυφλού μάρτυρα για την παρακολούθηση της ανάπτυξης μέσω φασματοφωτομετρίας, σε μήκος κύματος στα 600 nm. Η καλλιέργεια τοποθετήθηκε σε επωαστήρα υπό ανακίνηση, σε θερμοκρασία 37° C, 210 rpm, μέχρις ότου η οπτική απορρόφηση σε μήκος κύματος 600 nm φτάσει 0,6-0,7. Ακολούθως, προστέθηκε

0,5 mM IPTG και η καλλιέργεια τοποθετήθηκε σε επωαστήρα υπό ανακίνηση, σε θερμοκρασία 18° C, 210 rpm για 16 ώρες. Τέλος, πραγματοποιήθηκε η συλλογή των βακτηριακών κυττάρων μέσω φυγοκέντρησης σε θερμοκρασία 4° C, 6000 rpm για 30 λεπτά.

4.5.6 Καθαρισμός και απομόνωση της Γαλεκτίνης-7

Ο καθαρισμός και η απομόνωση της γαλεκτίνης-4C-CRD πραγματοποιήθηκε, όπως στο εδάφιο 4.5.2. Πιο συγκεκριμένα, ως πρώτο βήμα καθαρισμού χρησιμοποιήθηκε η στήλη χρωματογραφίας συγγένειας (*Lactose Sepharose 6B*). Τα κλάσματα της έκλουσης που περιείχαν τη γαλεκτίνη-7 συλλέχθηκαν και υποβλήθηκαν για εκτεταμένη διαπίδυση έναντι διαλύματος 50 mM *Tris-HCl*, pH 8,0, 0,3 M *NaCl*. Στη συνέχεια, χρησιμοποιήθηκε η στήλη μοριακής διήθησης (*Superdex 75*) με διάλυμα 50 mM *Tris-HCl*, pH 8,0, 0,3 M *NaCl*. Τα κλάσματα που περιείχαν τη γαλεκτίνη-7 συλλέχθηκαν και συμπυκνώθηκαν με φίλτρο συμπύκνωσης με κατώφλι 10 kDa, σε όγκο 70 μL. Τέλος, η γαλεκτίνη-7 αποθηκεύτηκε στους -80° C.

4.5.7 Παραγωγή της ανασυνδυασμένης Γαλεκτίνης-8N-CRD σε βακτηριακό σύστημα *E. coli*

Το επιθυμητό γονίδιο της γαλεκτίνης-8N-CRD εισήχθη σε χημειοδεκτικά βακτηριακά κύτταρα *E. coli* και πιο συγκεκριμένα στο βακτηριακό στέλεχος *BL21-GOLD (DE3)* μέσω χημικού μετασχηματισμού (εδάφιο 4.4.1). Το αντιβιοτικό που χρησιμοποιήθηκε ήταν η καναμυκίνη σε συγκέντρωση 50 μg/mL. Ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων και η παραγωγή της επιθυμητής πρωτεΐνης έγινε με τον ίδιο τρόπο που αναφέρθηκε στο εδάφιο 4.5.1.

4.5.8 Καθαρισμός και απομόνωση της Γαλεκτίνης-8N-CRD

Ο καθαρισμός και η απομόνωση της γαλεκτίνης-8N-CRD πραγματοποιήθηκε, όπως στο εδάφιο 4.5.2, με τη διαφορά ότι δεν χρησιμοποιήθηκε η στήλη μοριακής διήθησης. Πιο συγκεκριμένα, ως πρώτο βήμα καθαρισμού χρησιμοποιήθηκε η στήλη χρωματογραφίας συγγένειας (*Lactose Sepharose 6B*). Τα κλάσματα της έκλουσης που περιείχαν τη γαλεκτίνη-8N-CRD συλλέχθηκαν και υποβλήθηκαν για εκτεταμένη διαπίδυση έναντι διαλύματος *PBS*, pH 7,4. Μετά το πέρας της διαπίδυσης, το δείγμα συμπυκνώθηκε με φίλτρο συμπύκνωσης με κατώφλι 10 kDa, σε όγκο 300 μL και αποθηκεύτηκε στους -80° C.

4.6 Μελέτες προσδιορισμού της σταθεράς πρόσδεσης KD μέσω θερμιδομετρίας ισοθερμικής τιτλοδότησης (ITC)

Τα πειράματα *ITC* πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Βιοχημείας του Τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Γεώργιου Κοντοπίδη. Το μηχάνημα το οποίο χρησιμοποιήθηκε ήταν το *Nano-ITC (TA Instruments)*, όπου ο όγκος της κυψελίδας ήταν 1038 μL, ο όγκος της σύριγγας 250 μL, η θερμοκρασία τους 25°

C και η ταχύτητα ανάδευσης στα 170 rpm. Στην κυψελίδα προστέθηκε 20 μ M γαλεκτίνη-3-CRD η οποία βρισκόταν σε ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM Tris-HCl, pH 7,5. Στην κυψελίδα μάρτυρα προστέθηκε ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM Tris-HCl, pH 7,5. Οι προσδέτες λακτόζη, TDG, **13**, **14**, **15**, **17** και **LL80** ήταν διαλυμένοι στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα 10 mM Tris-HCl, pH 7,5. Ο κάθε προσδέτης τοποθετήθηκε στη σύριγγα και τιτλοδοτήθηκε στην κυψελίδα της πρωτεΐνης. Η συγκέντρωση του κάθε προσδέτη ήταν 1 mM λακτόζη, 2 mM TDG, 0,3 mM **13**, 0,4 mM **14**, 0,4 mM **15**, 0,6 mM **17** και 0,5 mM **LL80**. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ITC για την εύρεση των σταθερών πρόσδεσης και των θερμοδυναμικών παραμέτρων της πρόσδεσης της TDG στις γαλεκτίνες-7 (20 μ M) και 8N (40 μ M). Η συγκέντρωση της TDG ήταν 5 και 2 mM, αντίστοιχα. Στην κυψελίδα προστέθηκε Η τιτλοδότηση πραγματοποιήθηκε με 16 ενέσεις των 15 μ L η κάθε μία, με 150 δευτερόλεπτα επώαση ανάμεσα σε κάθε ένεση. Για την ανάλυση των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα NanoAnalyze (TA Instruments). Πιο συγκεκριμένα, για την ανάλυση των θερμοδυναμικών παραμέτρων χρησιμοποιήθηκε το μοντέλο *independent model*, καθώς η γαλεκτίνη-3-CRD, 7 και 8N έχουν μόνο μία περιοχή πρόσδεσης υδατανθράκων.

4.7 Κρυστάλλωση Γαλεκτινών

4.7.1 Κρυστάλλωση της Γαλεκτίνης-3-CRD

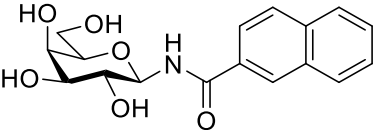
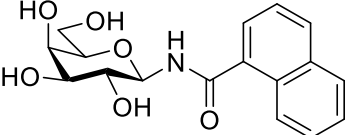
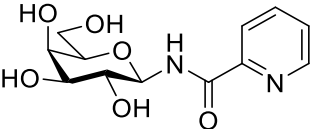
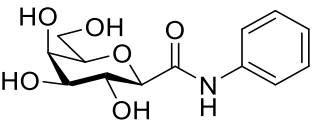
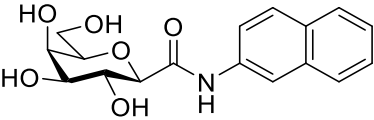
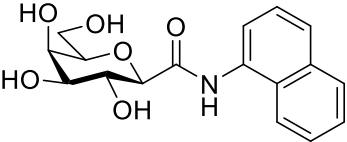
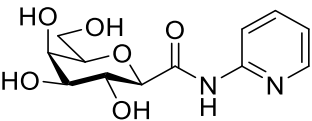
Οι προσπάθειες ανάπτυξης κρυστάλλων της γαλεκτίνης-3-CRD πραγματοποιήθηκαν τόσο με τη χρήση του ρομποτικού συστήματος κρυστάλλωσης OryxNano (Douglas Instruments), όσο και χειρωνακτικά χρησιμοποιώντας ειδικά πλαστικά σκεύη με τη μέθοδο της διάχυσης ατμών επικαθήμενης σταγόνας. Αρχικά πραγματοποιήθηκε η σάρωση πολλών συνθηκών κρυστάλλωσης (JBScreen 1-4, Jena Bioscience, PEG-Malonate, Molecular Dimensions). Κρύσταλλοι αναπτύχθηκαν σε συνθήκη που περιείχε 0,1 M Tris-HCl, pH 7,5, 0,2 M $MgCl_2$ και 20% (w/v) PEG 4000. Για την ανάπτυξη καλοσχηματισμένων και μεγάλων κρυστάλλων ακολούθησε περαιτέρω βελτιστοποίηση των συνθηκών κρυστάλλωσης, δοκιμάζοντας διαφορετικές συγκεντρώσεις του καταβυθιστικού παράγοντα PEG, καθώς και διαφορετικά pH του ρυθμιστικού διαλύματος. Μετά από αρκετές προσπάθειες, η βέλτιστη συνθήκη ανάπτυξης κρυστάλλων ευρέθηκε να είναι σε διάλυμα κρυστάλλωσης 0,1 M Tris-HCl, pH 8,5, 0,2 M $MgCl_2$, 35% (w/v) PEG 8000. Οι κρύσταλλοι αναπτύχθηκαν στους 16° C και σε συγκέντρωση πρωτεΐνης 20-30 mg/mL, μετά από μία μέρα.

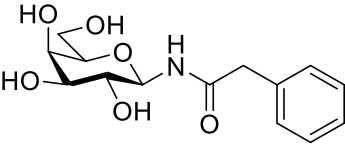
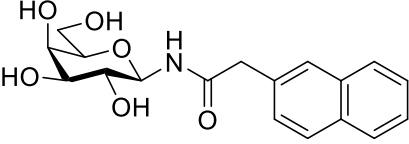
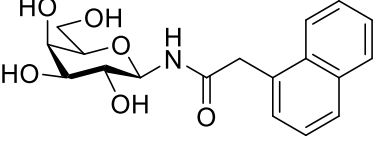
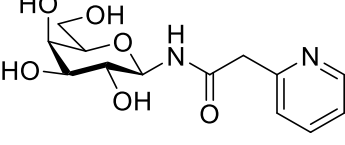
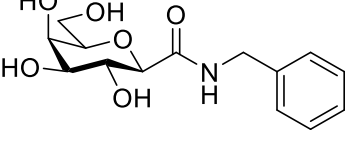
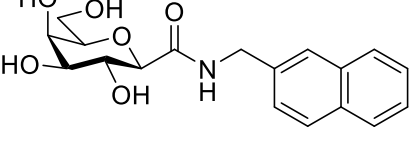
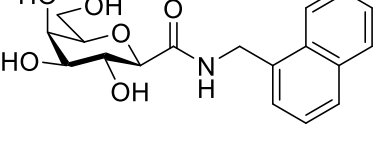
Μελετήθηκε κρυσταλλογραφικά η πρόσδεση των παρακάτω 46 ενώσεων στη γαλεκτίνη-3 (Πίνακας 4). Οι ενώσεις αυτές συντέθηκαν από την ομάδα του Professor László Somsák, από το πανεπιστήμιο του Debrecen Ουγγαρίας.

Πίνακας 4: Τα ονόματα και οι χημικές δομές των ενώσεων που μελετήθηκαν.

Όνομα	Χημική δομή
KM194	
KM191	
KM192	
BEva972	
BEva973	
HÁ081	
HÁ087	
HÁ088	
KISZ322	
KISZ340	
KISZ333IAB	

Όνομα	Χημική δομή
KS782	
HL208	
HL210-2	
HL211	
HL209	
KS778	
KS779	
KS780	
KS781	
HL219	

Όνομα	Χημική δομή
HL220	
HL221	
HL222	
HL232	
HL231	
HL230	
HL233	

Όνομα	Χημική δομή
HL238	
HL239	
HL240	
HL247	
HL241	
HL248	
HL249	

Όνομα	Χημική δομή
HL250	
14	
15	
13	
17	
LL93	
LL80	

Όνομα	Χημική δομή
JJ 211	
JJ 212	
JJ 213	
JJ 215	
JJ 216	

Οι ενώσεις **13, 14, 15, 17, LL80, LL93, JJ211, JJ212, JJ213, JJ215** και **JJ216** είναι υδατοδιαλυτές. Οι κρύσταλλοι της γαλεκτίνης-3-CRD εμβαπτίστηκαν με τις υδατοδιαλυτές ενώσεις. Πιο συγκεκριμένα, οι ενώσεις διαλύθηκαν στη συνθήκη κρυστάλλωσης και οι κρύσταλλοι εμβαπτίστηκαν με 10 mM **13, 14, 15, 17** και 50 mM **LL80, LL93, JJ211, JJ212, JJ213, JJ215** και **JJ216**. Όλες οι υπόλοιπες δεν είναι υδατοδιαλυτές και έτσι διαλύθηκαν σε *DMSO*. Οι κρύσταλλοι της γαλεκτίνης-3-CRD εμβαπτίστηκαν σε διαλύματα των παραπάνω μη υδατοδιαλυτών ενώσεων του διαλύματος κρυστάλλωσης στο οποίο υπήρχε 5-12% (v/v) *DMSO* σε τελική συγκέντρωση 24-10 mM.

4.7.2 Κρυστάλλωση της γαλεκτίνης-4C-CRD

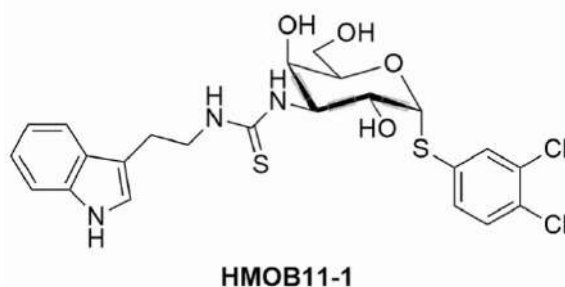
Οι προσπάθειες ανάπτυξης κρυστάλλων της γαλεκτίνης-4C-CRD πραγματοποιήθηκαν τόσο με τη χρήση του ρομποτικού συστήματος κρυστάλλωσης *OryxNano* (*Douglas Instruments*), όσο και χειρωνακτικά χρησιμοποιώντας ειδικά πλαστικά σκεύη με τη μέθοδο της διάχυσης ατμών επικαθήμενης σταγόνας. Αρχικά πραγματοποιήθηκε η σάρωση πολλών συνθηκών κρυστάλλωσης (*JBScreen 1-4, Jena Bioscience, PEG-Malonate, Molecular Dimensions, Ammonium sulfate, Molecular Dimensions*). Παράλληλα, μελετήθηκαν και πολλές συνθήκες κρυστάλλωσης οι οποίες αποτελούνταν από διαφορετικές συγκεντρώσεις θειικού αμμωνίου, διαφορετικά ρυθμιστικά διαλύματα με εύρος pH από 5-9 και διαφορετικοί καταβυθιστικοί παράγοντες και άλατα. Μετά από πολλές προσπάθειες, αναπτύχθηκαν κρύσταλλοι σε συνθήκη κρυστάλλωσης 0,1 M *Hepes-NaOH*, pH 7,0, 4% (w/v) *PEG 400* και 1.6 M θειικού

αμμωνίου. Οι κρύσταλλοι αναπτύχθηκαν στους 16° C και σε συγκέντρωση πρωτεΐνης 8 mg/mL, μετά από 4 μήνες.

4.7.3 Κρυστάλλωση της Γαλεκτίνης-7

Οι προσπάθειες ανάπτυξης κρυστάλλων της γαλεκτίνης-7 πραγματοποιήθηκαν τόσο με τη χρήση του ρομποτικού συστήματος κρυστάλλωσης *OryxNano* (*Douglas Instruments*), όσο και χειρωνακτικά χρησιμοποιώντας ειδικά πλαστικά σκεύη με τη μέθοδο της διάχυσης ατμών επικαθήμενης σταγόνας. Αρχικά πραγματοποιήθηκε η σάρωση πολλών συνθηκών κρυστάλλωσης (*JBScreen* 1-4, *Jena Bioscience*, *PEG-Malonate*, *Molecular Dimensions*). Μικροκρυσταλλικό ίζημα αναπτύχθηκε σε συνθήκη που περιείχε 0.1 M *Tris-HCl* pH 7.5, 20% (w/v) *PEG* 4000, 0.1 M *NaCl* και 15% (v/v) γλυκερόλη. Για την ανάπτυξη καλοσχηματισμένων κρυστάλλων ακολούθησε περαιτέρω βελτιστοποίηση των συνθηκών κρυστάλλωσης, δοκιμάζοντας διαφορετικές συγκεντρώσεις του καταβυθιστικού παράγοντα *PEG*, καθώς και διαφορετικά pH του ρυθμιστικού διαλύματος και διαφορετικές συγκεντρώσεις γλυκερόλης. Μετά από αρκετές προσπάθειες, η βέλτιστη συνθήκη ανάπτυξης κρυστάλλων ευρέθηκε να είναι 0,1 M *Tris-HCl*, pH 8.0, 0.1 M *NaCl*, 15% (w/v) *PEG* 4000 και 15% (v/v) γλυκερόλη. Οι κρύσταλλοι αναπτύχθηκαν στους 16° C και σε συγκέντρωση πρωτεΐνης 10 mg/mL, μετά από δύο μέρες.

Επιπλέον, μελετήθηκαν οι παραπάνω 46 ενώσεις για την εύρεση του τρόπου πρόσδεσης τους στη γαλεκτίνη-7 (Πίνακας 4). Οι ενώσεις με όνομα **13**, **14**, **15**, **17**, **LL80**, **LL93**, **JJ211**, **JJ212**, **JJ213**, **JJ215** και **JJ216** είναι υδατοδιαλυτές. Οι κρύσταλλοι της γαλεκτίνης-7 εμβαπτίστηκαν σε διαλύματα των ενώσεων αυτών στο διάλυμα κρυστάλλωσης 2 mM **13**, **14**, **15**, **17**, **LL80**, **LL93**, **JJ211**, **JJ212**, **JJ213**, **JJ215** και **JJ216**. Όλες οι υπόλοιπες δεν είναι υδατοδιαλυτές και διαλύθηκαν σε *DMSO*. Οι κρύσταλλοι της γαλεκτίνης-7 εμβαπτίστηκαν σε διαλύματα των ενώσεων αυτών στο διάλυμα κρυστάλλωσης που περιείχε 2,5 % (v/v) *DMSO* σε τελική συγκέντρωση 5 mM. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκαν και πειράματα συγκρυστάλλωσης. Επιπλέον μελετήθηκε ο τρόπος πρόσδεσης της ένωσης **HMOB-11-1** (Εικόνα 51) στη γαλεκτίνη-7. Η ένωση αυτή είναι μη υδατοδιαλυτή και διαλύθηκε σε *DMSO*. Πραγματοποιήθηκε συγκρυστάλλωση της γαλεκτίνης-7 (10 mg/mL) με την ένωση αυτή σε συγκέντρωση 2,5 mM, 5% (v/v) *DMSO*. Οι κρύσταλλοι αναπτύχθηκαν μετά από 3 μέρες σε ρυθμιστικό διάλυμα που περιείχε 0,1 M *Tris-HCl*, pH 8,0, 0,1 M *NaCl*, 15% (w/v) *PEG* 4000 και 15% (v/v) γλυκερόλη.



Εικόνα 51: Η χημική δομή της ένωσης HMOB-11-1.

4.7.4 Κρυστάλλωση της γαλεκτίνης-8N-CRD

Οι προσπάθειες ανάπτυξης κρυστάλλων της γαλεκτίνης-8N-CRD πραγματοποιήθηκαν τόσο με τη χρήση του ρομποτικού συστήματος κρυστάλλωσης *OryxNano* (*Douglas Instruments*), όσο και χειρωνακτικά χρησιμοποιώντας ειδικά πλαστικά σκεύη με τη με τη μέθοδο της διάχυσης ατμών επικαθήμενης σταγόνας. Αρχικά πραγματοποιήθηκε σάρωση συνθηκών κρυστάλλωσης *JBScreen* 1-4 (*Jena Bioscience*). Κρύσταλλοι αναπτύχθηκαν σε συνθήκη που περιείχε 20% (w/v) PEG 4000, 0.1 M Tris- κιτρικό νάτριο, pH 5,6, 20% (v/v) 2- ισοπροπανόλη. Οι κρύσταλλοι αναπτύχθηκαν στους 16° C και σε συγκέντρωση πρωτεΐνης 20 mg/mL, μετά από δύο μέρες.

Η σύνδεση των παρακάτω 46 ενώσεων στη γαλεκτίνη-8N μελετήθηκε κρυσταλλογραφικά. Οι ενώσεις με όνομα **13**, **14**, **15**, **17**, **LL80**, **LL93**, **JJ211**, **JJ212**, **JJ213**, **JJ215** και **JJ216** είναι υδατοδιαλυτές. Πραγματοποιήθηκε συγκρυστάλλωση της γαλεκτίνης-8N-CRD (20 mg/mL) με τις παραπάνω ενώσεις (Πίνακας 4) σε συγκέντρωση 1 mM. Οι κρύσταλλοι αναπτύχθηκαν μετά από 24 ώρες σε ρυθμιστικό διάλυμα που περιείχε 20% (v/v) PEG 4000, 0,1 M Tris-κιτρικό νάτριο pH 5,6, 20% (v/v) 2-ισοπροπανόλη. Όλες οι υπόλοιπες δεν είναι υδατοδιαλυτές και είναι διαλυμένες σε DMSO. Πραγματοποιήθηκε συγκρυστάλλωση της γαλεκτίνης-8N (10 mg/mL) με τις παραπάνω ενώσεις σε συγκέντρωση 5 mM, 2,5% v/v DMSO.

4.8 Συλλογή και ανάλυση κρυσταλλογραφικών δεδομένων για τις Γαλεκτίνες

4.8.1 Συλλογή κρυσταλλογραφικών δεδομένων

Η συλλογή των κρυσταλλογραφικών δεδομένων διεξήχθη στο σύστημα κρυσταλλογραφίας ακτίνων X *Microstar Bruker Rotating Anode* (2,7 KW / $\lambda=1.5419 \text{ \AA}$) με ανιχνευτή *mar345dtb* (*marXperts GmbH*) στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και στις εγκαταστάσεις συγχροτρονικής ακτινοβολίας *EMBL-Hamburg*, Γερμανίας, στο σταθμό P13 με ανιχνευτή *EIGER 16M*. Ο κάθε κρύσταλλος των γαλεκτινών λαμβάνεται με τη χρήση βρόχου, εμβαπτίζεται σε κρυοπροστατευτικό διάλυμα και τοποθετείται στο γωνιόμετρο. Η συλλογή των κρυσταλλογραφικών δεδομένων πραγματοποιείται με εκροή υγρού αζώτου, σε χαμηλή θερμοκρασία των 100 K. Οι χαμηλές θερμοκρασίες προστατεύουν τους κρυστάλλους από τις

υψηλές θερμοκρασίες, με στόχο να ληφθούν τα καλύτερα δεδομένα. Τα κρυοπροστατευτικά διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για την κάθε γαλεκτίνη αναφέρονται στον Πίνακα 5.

Πίνακας 5: Τα κρυοπροστατευτικά διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε γαλεκτίνη.

Πρωτεΐνη	Κρυοπροστατευτικό διάλυμα
Γαλεκτίνη-3-CRD	20% (v/v) γλυκερόλη, 0,1 M Tris-HCl, pH 8,5, 0,2 M MgCl ₂ και 35% (w/v) PEG 8000
Γαλεκτίνη-7	30% (v/v) γλυκερόλη, 0,1 M Tris-HCl, pH 8,0, 0,1 M NaCl, 15% (w/v) PEG 4000
Γαλεκτίνη-8-N-CRD	30% (v/v) γλυκερόλη, 20% (w/v) PEG 4000, 0,1 M Tris- κιτρικό νάτριο, pH 5,6 και 20% (v/v) 2- ισοπροπανόλη

Ακολουθήσε η συλλογή των δεδομένων περίθλασης ακτίνων Χ. Οι πιο βασικές παράμετροι για τη συλλογή των περιθλασιγραμμάτων είναι η θερμοκρασία που πραγματοποιήθηκε στους 100 K, η απόσταση κρυστάλλου ανιχνευτή, από την οποία εξαρτάται η ευκρίνεια των κρυσταλλογραφικών δεδομένων και η περιστροφή του κρυστάλλου ανά εικόνα. Η περιστροφή των κρυστάλλων στο σύστημα κρυσταλλογραφίας ακτίνων Χ *Microstar Bruker Rotating Anode* ήταν 1°, ενώ στις εγκαταστάσεις συγχροτρονικής ακτινοβολίας *EMBL-Hamburg*, στο σταθμό P13 ήταν 0,1°.

4.8.2 Επεξεργασία και ανάλυση των κρυσταλλογραφικών δεδομένων

Η επεξεργασία των κρυσταλλογραφικών δεδομένων περίθλασης έγινε με τα προγράμματα *Mosflm* [189] και *XDS* [190]. Η συγχώνευση των εντάσεων των περιθλάσεων πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα *Aimless* [191]. Η βέλτιστη ευκρίνεια προσδιορίστηκε με βάση το κριτήριο $CC^{1/2}$ [192]. Ο προσδιορισμός των φάσεων για σύμπλοκα της γαλεκτίνης-3-CRD έγινε με διεργασίες *Fourier* με το πρόγραμμα *REFMAC* [191]. Χρησιμοποιήθηκε η γνωστή δομή του συμπλόκου γαλεκτίνης-3-CRD-λακτόζης (*PDB ID: 2NN8*), καθώς δεν υπάρχει ελεύθερη από προσδέτες δομή. Για τον προσδιορισμό των φάσεων στα σύμπλοκα της γαλεκτίνης-7 και της γαλεκτίνης-8N-CRD χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της μοριακής αντικατάστασης με τα ειδικά προγράμματα *Phaser* [193] και *MolRep* [194] και οι δομές των ελεύθερων γαλεκτινών (*PDB ID: 1BKZ* και *PDB ID: 5T7S* αντίστοιχα). Μέσω των προγραμμάτων αυτών επιλύεται το πρόβλημα της φάσης και βασίζεται στην ύπαρξη μιας ήδη υπάρχουσας πρωτεϊνικής δομής που θα χρησιμοποιηθεί ως μοντέλο για τη λύση των νέων δομών. Στη συνέχεια, μέσω του προγράμματος *REFMAC* [195], με 10 κύκλους βελτιστοποίησης, ακολούθησε η βελτιστοποίηση των συντεταγμένων των ατόμων του μορίου στο χώρο (xyz) αλλά και των τελεστών θερμικής κίνησης (*B-factor*). Ακολούθως, έγινε η μελέτη των χαρτών $2F_{obs}-F_{calc}$, με στόχο την εύρεση θετικών ηλεκτρονιακών πυκνοτήτων στην *CBS* των γαλεκτινών. Οι θετικές ηλεκτρονιακές πυκνότητες υποδηλώνουν την πρόσδεση της ένωσης στη συγκεκριμένη περιοχή πρόσδεσης. Για την κατασκευή του δομικού μοντέλου

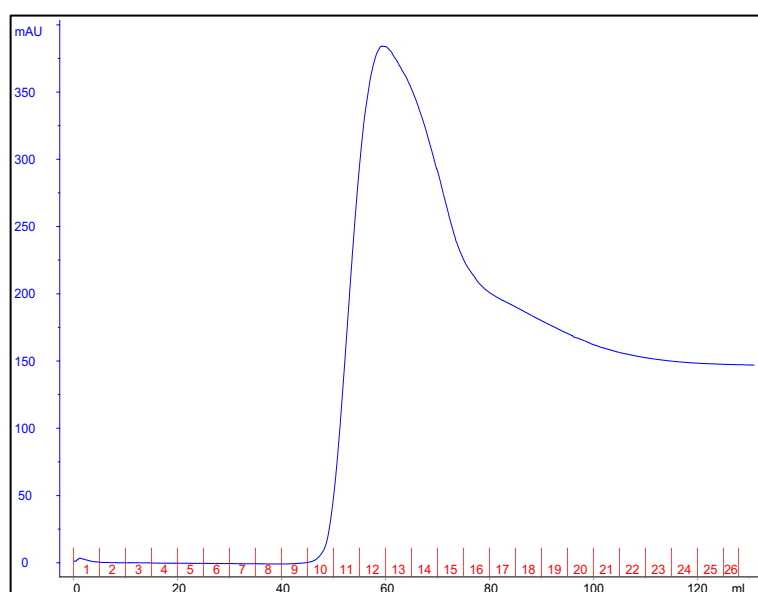
του ανταγωνιστή χρησιμοποιήθηκαν τα προγράμματα *AceDRG* [196] και *JLigand* [197]. Μέσω του προγράμματος *Coot* [198] έγινε η προσθήκη των ενώσεων στους χάρτες ηλεκτρονικής πυκνότητας, η γενική αναπροσαρμογή του μοντέλου και πιο συγκεκριμένα, η μετακίνηση των πλευρικών αλυσίδων κάποιων καταλοίπων, η προσθήκη εναλλακτικών διαμορφώσεων των πλευρικών αλυσίδων κάποιων καταλοίπων καθώς και η προσθήκη ή η διαγραφή μορίων ύδατος. Έπειτα, ακολούθησε περαιτέρω βελτιστοποίηση του μοντέλου μέσω του προγράμματος *REFMAC* [195] (*restrained refinement*) και οι αλλαγές αξιολογήθηκαν από το ταίριασμά τους στους νέους χάρτες ηλεκτρονικής πυκνότητας, από τη γεωμετρία, από τους τελεστές *B* και από το διάγραμμα *Ramachandran*. Η πληρότητα των ενώσεων στην περιοχή πρόσδεσης αξιολογήθηκε μέσω βελτιστοποίησης της πληρότητας (*occupancy refinement*) μέσω του προγράμματος *REFMAC* [195]. Τέλος, η εγκυρότητα της πορείας βελτιστοποίησης ελέγχθηκε χρησιμοποιώντας το διαδικτυακό διακομιστή *PDB-REDO* [186, 187, 199]. Καθώς υπήρχαν παραπάνω από πέντε ανακλάσεις για κάθε άτομο, εξετάστηκε το ισотροπικό και το ανισοτροπικό μοντέλο των τελεστών *B*. Η ανάλυση των δεσμών υδρογόνου και των αλληλεπιδράσεων *Van der Waals* πραγματοποιήθηκε μέσω του προγράμματος *CONTACT* που υπάρχει στη σειρά των προγραμμάτων του *CCP4* [191]. Για τους δεσμούς υδρογόνου εφαρμόστηκαν ως μέγιστες αποστάσεις τα 3.35 Å, ενώ για τις αλληλεπιδράσεις *Van der Waals* τα 4.00 Å. Η κατασκευή των εικόνων για την αναπαράσταση των τρισδιάστατων δομών έγινε μέσω των προγραμμάτων *CCP4 Molecular Graphics* [200] και *Pymol* [201].

5. Αποτελέσματα και συζήτηση

5.1 Καθαρισμός και απομόνωση της Γαλεκτίνης-3-CRD

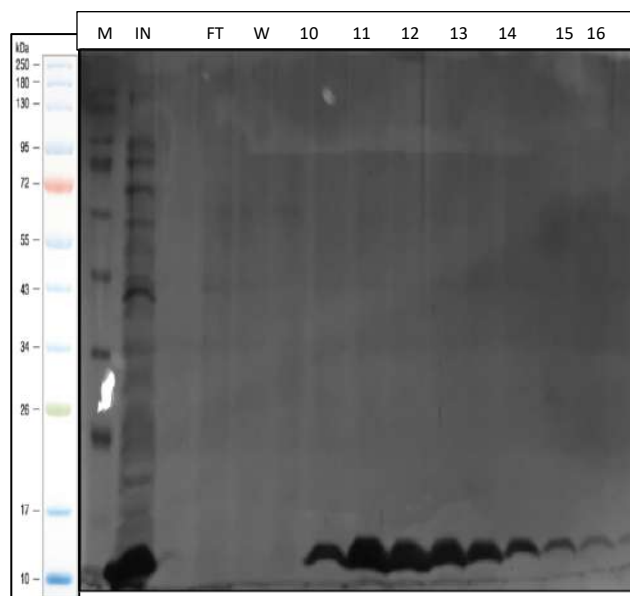
Η διαδικασία αναλύεται λεπτομερώς στο εδάφιο 4.5.2. Παρακάτω παρουσιάζονται τα χρωματογραφήματα καθώς και οι πηκτές πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες *SDS-PAGE*, κατά την πορεία του καθαρισμού. Το μοριακό βάρος της γαλεκτίνης-3-CRD είναι 15 *kDa*.

1^ο βήμα καθαρισμού: Στήλη χρωματογραφία συγγένειας (*Lactose Sepharose 6B*)



Εικόνα 52: Το χρωματογράφημα του 1^{ου} βήματος καθαρισμού της Γαλεκτίνης-3-CRD. Πιο συγκεκριμένα, φαίνεται το στάδιο της έκλουσης. Η μπλε γραμμή αντιπροσωπεύει την απορρόφηση σε μήκος κύματος 280 nm.

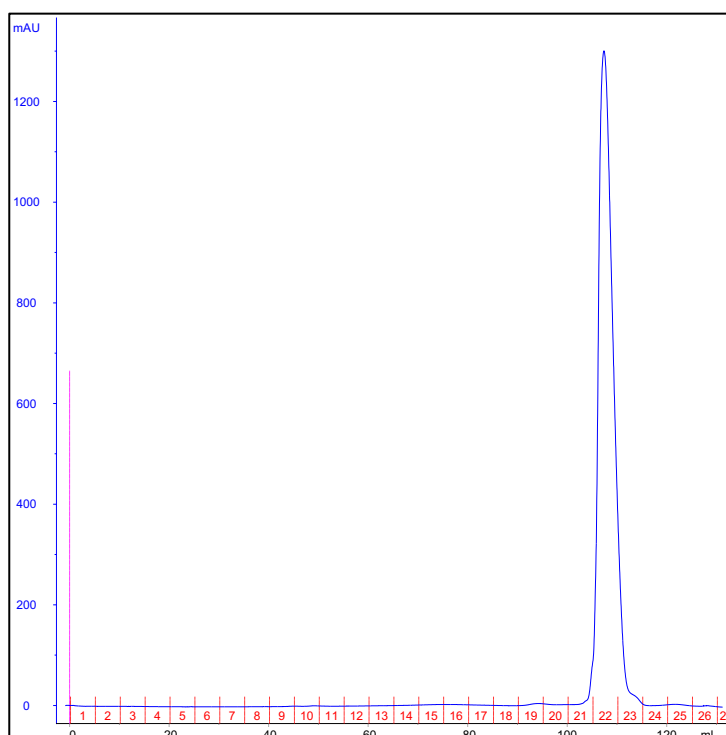
Στην παραπάνω Εικόνα φαίνεται το χρωματογράφημα του 1^{ου} βήματος καθαρισμού και πιο συγκεκριμένα, της έκλουσης.



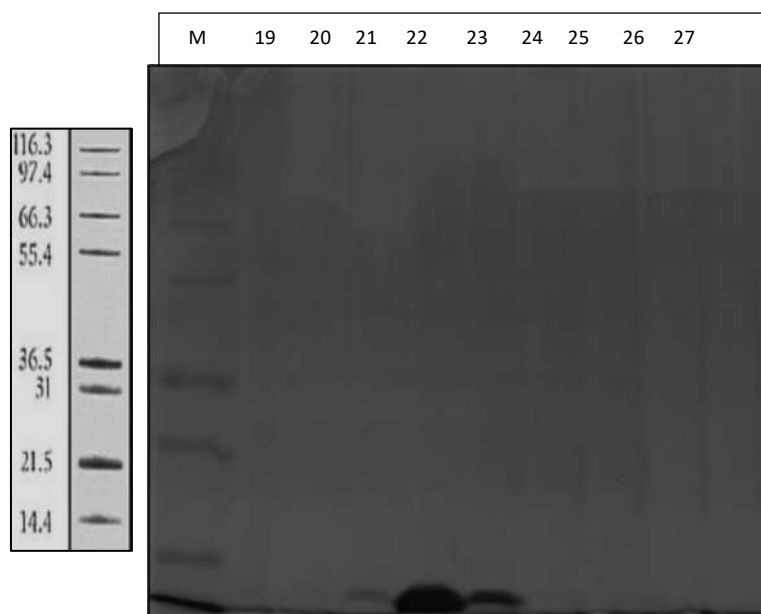
Εικόνα 53: Η ανάλυση SDS-PAGE του 1^{ου} βήματος καθαρισμού. Όπου M, είναι ο μάρτυρας μοριακού βάρους, IN είναι το διαλυτό πρωτεϊνικό δείγμα μετά τη φυγοκέντρηση των βακτηριακών κυττάρων, FT είναι το στάδιο κατά το οποίο εξέρχονται οι πρωτεΐνες που δεν προσδένονται στη στήλη, W είναι το στάδιο κατά το οποίο εξέρχονται οι πρωτεΐνες που έχουν προσδεθεί μη ειδικά στη στήλη και 10-26 είναι τα κλάσματα της έκλουσης σύμφωνα με το χρωματογράφημα.

Τα κλάσματα της έκλουσης που περιείχαν τη γαλεκτίνη-3-CRD συλλέχθηκαν και υποβλήθηκαν για εκτεταμένη διαπίδυση έναντι διαλύματος 10 mM Tris-HCl, pH 7,5. Μετά το πέρας της διαπίδυσης, το δείγμα συμπυκνώθηκε με φίλτρο συμπύκνωσης με κατώφλι 10 kDa, στα 600 μ L.

2^ο βήμα καθαρισμού: Στήλη μοριακής διήθησης (Superdex 75)



Εικόνα 54: Το χρωματογράφημα του 2^{ου} βήματος καθαρισμού της Γαλεκτίνης-3-CRD. Η μπλε γραμμή αντιπροσωπεύει την απορρόφηση σε μήκος κύματος 280 nm.



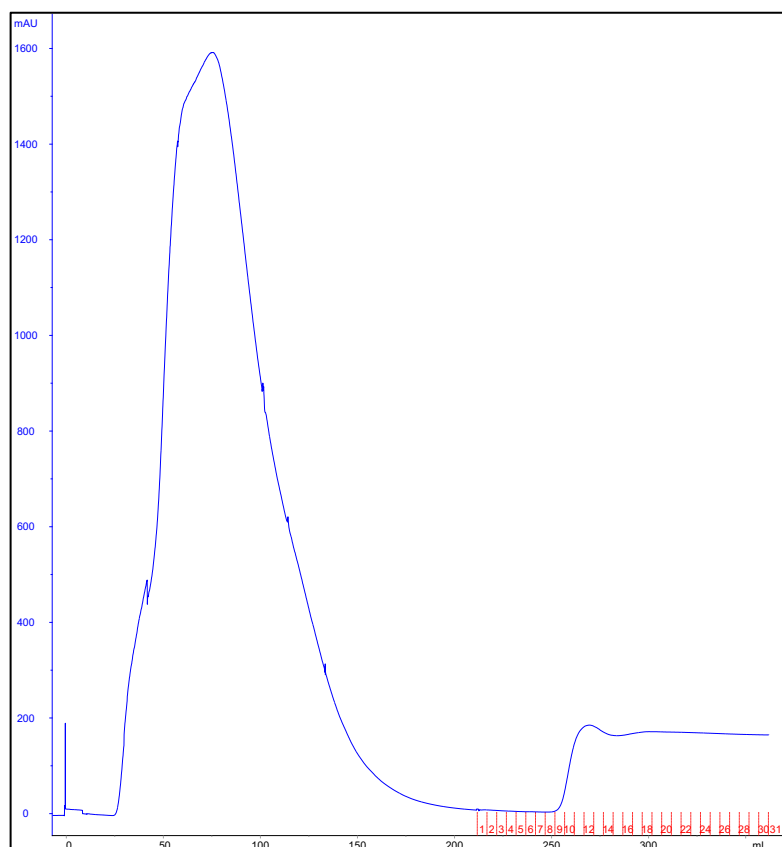
Εικόνα 55: Η ανάλυση SDS-PAGE του 2^{ου} βήματος καθαρισμού. Όπου M, είναι ο μάρτυρας μοριακού βάρους και 19-27 είναι τα κλάσματα σύμφωνα με το χρωματογράφημα.

Τα κλάσματα που περιείχαν τη γαλεκτίνη-3-CRD συλλέχθηκαν και συμπυκνώθηκαν με φίλτρο συμπύκνωσης με κατώφλι 10 kDa, σε 300 μ L. Τέλος, η γαλεκτίνη-3-CRD αποθηκεύτηκε στους -80° C. Η τελική απόδοση ήταν 30 mg ανά λίτρο υγρής βακτηριακής καλλιέργειας.

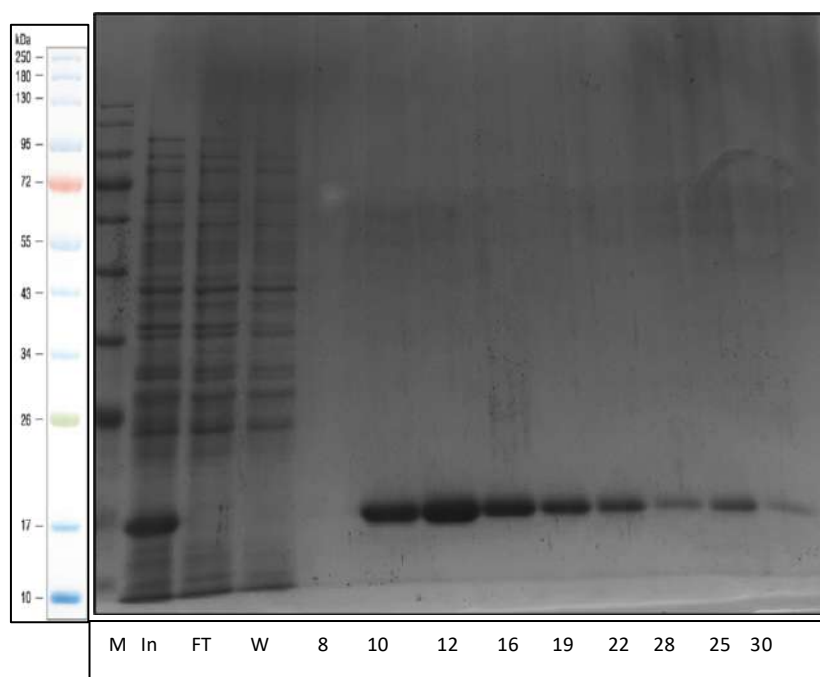
5.2 Καθαρισμός και απομόνωση της Γαλεκτίνης-4C-CRD

Η διαδικασία αναλύεται λεπτομερώς στο εδάφιο 4.5.4. Παρακάτω παρουσιάζεται το χρωματογράφημα καθώς και οι πηκτές πολυακρυλαμίδιου υπό αποδιατακτικές συνθήκες SDS-PAGE, κατά την πορεία του καθαρισμού. Το μοριακό βάρος της γαλεκτίνης-4C-CRD είναι 16,4 kDa.

1^ο βήμα καθαρισμού: Στήλη χρωματογραφία συγγένειας (*Lactose Sepharose 6B*)



Εικόνα 55: Το χρωματογράφημα του 1^{ου} θήματος καθαρισμού της γαλεκτίνης-4C-CRD. Η μπλε γραμμή αντιπροσωπεύει την απορρόφηση σε μήκος κύματος 280 nm.



Εικόνα 56: Η ανάλυση SDS-PAGE του 1^{ου} θήματος καθαρισμού. Όπου M, είναι ο μάρτυρας μοριακού βάρους, IN είναι το διαλυτό πρωτεϊνικό δείγμα μετά τη φυγοκέντρηση των βακτηριακών κυττάρων, FT είναι το στάδιο κατά το οποίο εξέρχονται οι πρωτεΐνες που δεν προσδένονται στη στήλη, W είναι το στάδιο κατά το οποίο εξέρχονται οι πρωτεΐνες που έχουν προσδεθεί μη ειδικά στη στήλη και 8-30 είναι τα κλάσματα της έκλουσης σύμφωνα με το χρωματογράφημα.

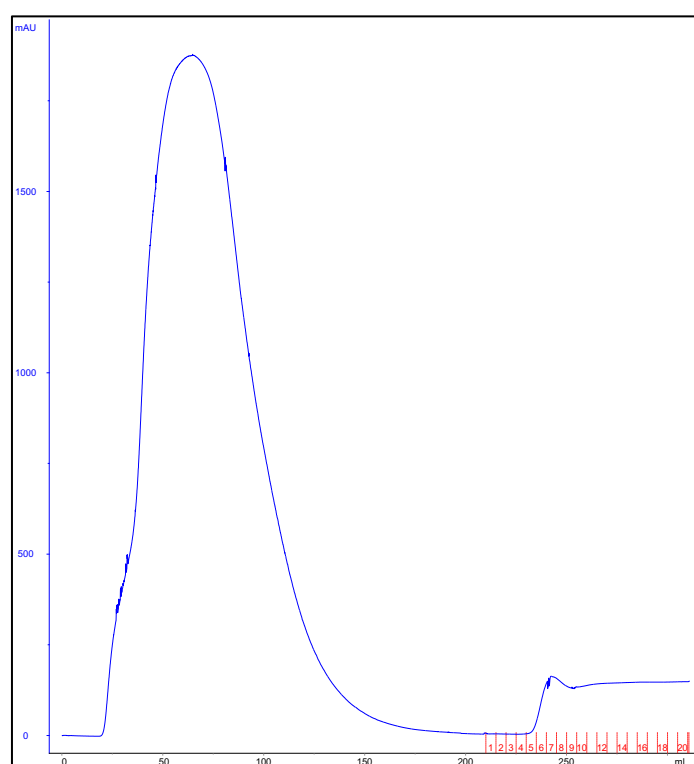
Τα κλάσματα της έκλουσης που περιείχαν τη γαλεκτίνη-4C-CRD συλλέχθηκαν και υποβλήθηκαν για εκτεταμένη διαπίδυση έναντι διαλύματος PBS, pH 7,4.

Μετά το πέρας της διαπίδυσης, το δείγμα συμπυκνώθηκε με φίλτρο συμπύκνωσης με κατώφλι 10 *kDa*, στα 150 μL . Τέλος, η γαλεκτίνη-4C-CRD αποθηκεύτηκε στους -80°C . Η τελική απόδοση ήταν 5 *mg* ανά λίτρο υγρής βακτηριακής καλλιέργειας.

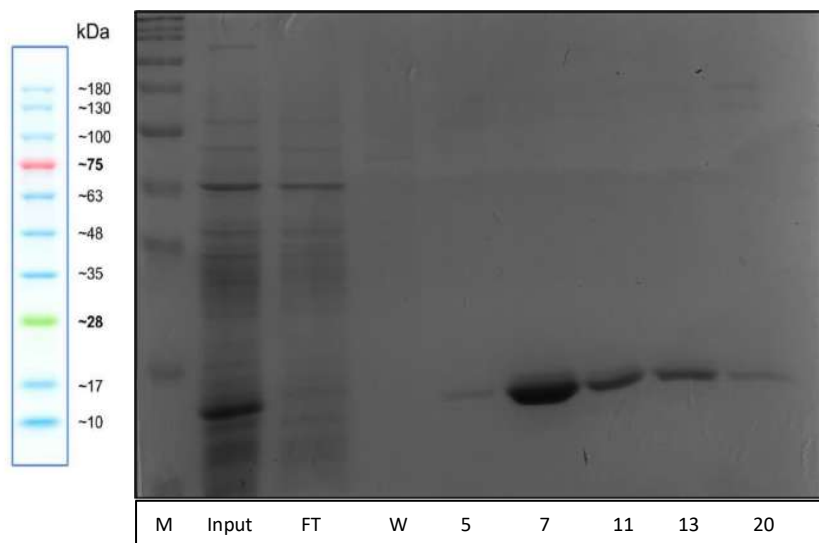
5.3 Καθαρισμός και απομόνωση της Γαλεκτίνης-7

Η διαδικασία αναλύεται λεπτομερώς στο εδάφιο 4.5.6. Παρακάτω παρουσιάζεται το χρωματογράφημα καθώς και οι πηκτές πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες *SDS-PAGE*, κατά την πορεία του καθαρισμού. Το μοριακό βάρος της γαλεκτίνης-7 είναι 15,1 *kDa*.

1^ο βήμα καθαρισμού: Στήλη χρωματογραφία συγγένειας (*Lactose Sepharose 6B*)



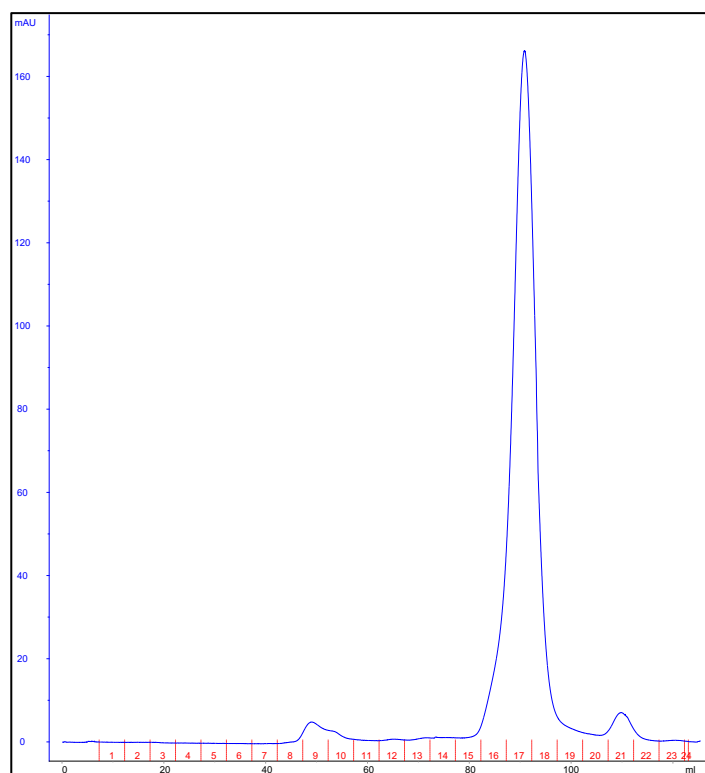
Εικόνα 58: Το χρωματογράφημα του 1^{ου} βήματος καθαρισμού της γαλεκτίνης-7. Η μπλε γραμμή αντιπροσωπεύει την απορρόφηση σε μήκος κύματος 280 nm.



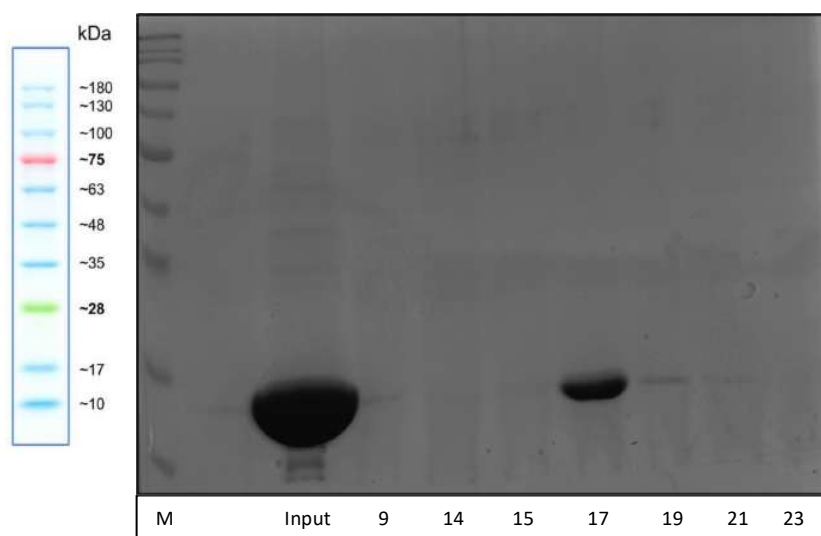
Εικόνα 59: Η ανάλυση SDS-PAGE του 1^{ου} βήματος καθαρισμού. Όπου M, είναι ο μάρτυρας μοριακού βάρους, IN είναι το διαλυτό πρωτεϊνικό δείγμα μετά τη φυγοκέντρηση των βακτηριακών κυττάρων, FT είναι το στάδιο κατά το οποίο εξέρχονται οι πρωτεΐνες που δεν προσδένονται στη στήλη, W είναι το στάδιο κατά το οποίο εξέρχονται οι πρωτεΐνες που έχουν προσδεθεί μη ειδικά στη στήλη και 5-20 είναι τα κλάσματα της έκλουσης σύμφωνα με το χρωματογράφημα.

Τα κλάσματα της έκλουσης που περιείχαν τη γαλεκτίνης-7 συλλέχθηκαν και υποβλήθηκαν σε εκτεταμένη διαπίδυση έναντι διαλύματος 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 0,3 M NaCl. Μετά το πέρας της διαπίδυσης, το δείγμα συμπυκνώθηκε με φίλτρο συμπύκνωσης με κατώφλι 10 kDa, σε 600 μL.

2^ο βήμα καθαρισμού: Στήλη μοριακής διήθησης (Superdex 75)



Εικόνα 60: Το χρωματογράφημα του 2^{ου} βήματος καθαρισμού της γαλεκτίνης-7. Η μπλε γραμμή αντιπροσωπεύει την απορρόφηση σε μήκος κύματος 280 nm.



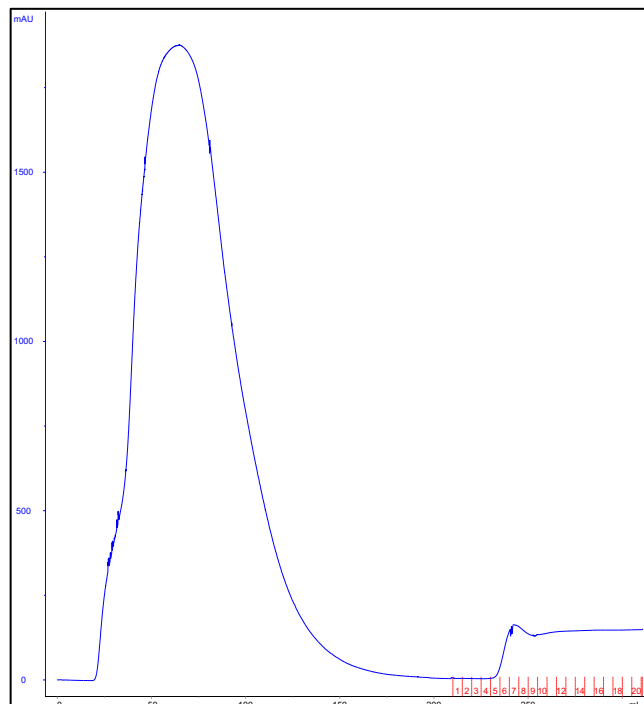
Εικόνα 61: Η ανάλυση SDS-PAGE του 2^{ου} βήματος καθαρισμού. Όπου M, είναι ο μάρτυρας μοριακού βάρους, Input είναι το δείγμα που φορτώθηκε στη στήλη και 9-23 είναι τα κλάσματα σύμφωνα με το χρωματογράφημα.

Τα κλάσματα που περιείχαν τη γαλεκτίνη-7 συλλέχθηκαν και συμπυκνώθηκαν με φίλτρο συμπύκνωσης με κατώφλι 10 kDa, σε 100 μ L. Τέλος, η γαλεκτίνη-7 αποθηκεύτηκε στους -80° C. Η τελική απόδοση ήταν 1,2 mg ανά λίτρο υγρής βακτηριακής καλλιέργειας.

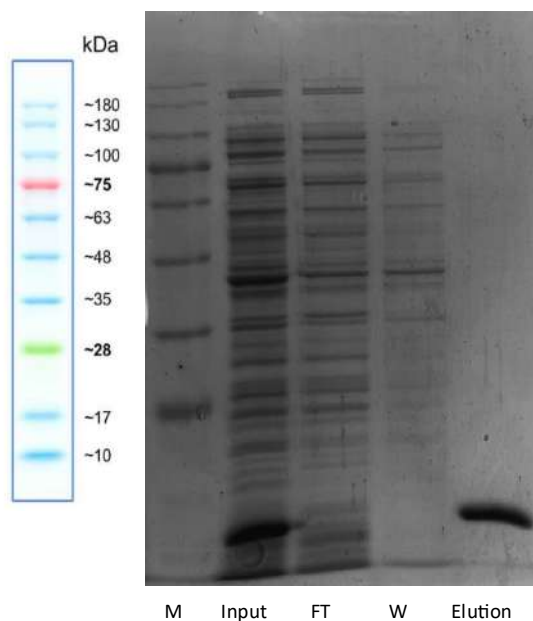
5.4 Καθαρισμός και απομόνωση της Γαλεκτίνης-8N-CRD

Η διαδικασία αναλύεται λεπτομερώς στο εδάφιο 4.5.8. Παρακάτω παρουσιάζονται τα χρωματογραφήματα καθώς και οι πηκτές πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες SDS-PAGE, κατά την πορεία του καθαρισμού. Το μοριακό βάρος της γαλεκτίνης-8N-CRD είναι 16,7 kDa.

1^ο βήμα καθαρισμού: Στήλη χρωματογραφία συγγένειας (*Lactose Sepharose 6B*)



Εικόνα 62: Το χρωματογράφημα του 1^{ου} βήματος καθαρισμού της γαλεκτίνης-8N-CRD. Η μπλε γραμμή αντιπροσωπεύει την απορρόφηση σε μήκος κύματος 280 nm.



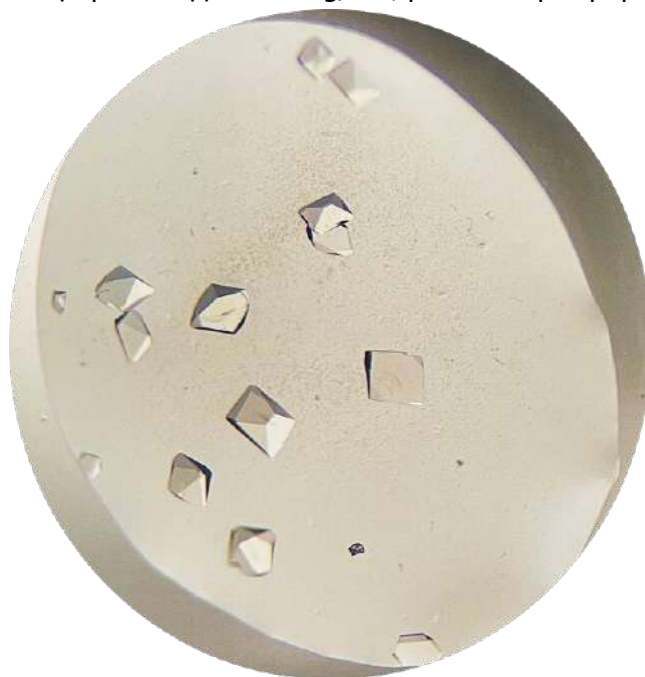
Εικόνα 63: Η ανάλυση SDS-PAGE του 1^{ου} βήματος καθαρισμού. Όπου M, είναι ο μάρτυρας μοριακού βάρους, IN είναι το διαλυτό πρωτεϊνικό δείγμα μετά τη φυγοκέντρηση των βακτηριακών κυττάρων, FT είναι το στάδιο κατά το οποίο εξέρχονται οι πρωτεΐνες που δεν προσδένονται στη στήλη, W είναι το στάδιο κατά το οποίο εξέρχονται οι πρωτεΐνες που έχουν προσδεθεί μη ειδικά στη στήλη και elution είναι τα κλάσματα της έκλουσης σύμφωνα με το χρωματογράφημα.

Τα κλάσματα της έκλουσης που περιείχαν τη γαλεκτίνη-8N-CRD συλλέχθηκαν και υποβλήθηκαν σε εκτεταμένη διαπίδυση έναντι διαλύματος PBS, pH 7,4.

Μετά το πέρας της διαπίδυσης, το δείγμα συμπυκνώθηκε με φίλτρο συμπύκνωσης με κατώφλι 10 *kDa*, σε 300 μL . Η τελική απόδοση ήταν 15 *mg* ανά λίτρο υγρής βακτηριακής καλλιέργειας.

5.5 Κρυστάλλωση της γαλεκτίνης-3

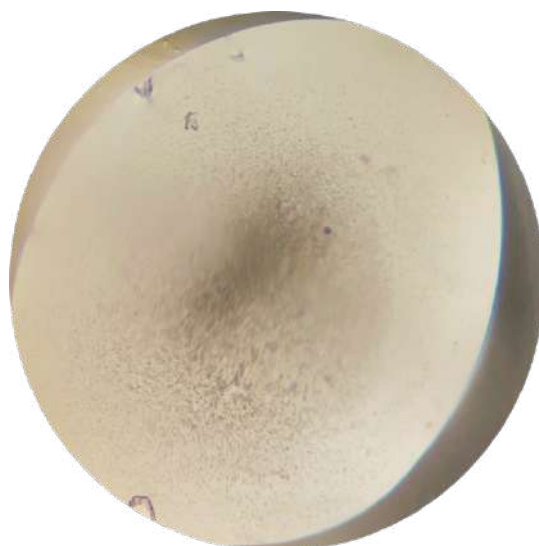
Όπως αναφέρθηκε στο εδάφιο 4.7.1, έγιναν αρκετές προσπάθειες για την ανάπτυξη καλοσχηματισμένων κρυστάλλων. Η βέλτιστη συνθήκη ανάπτυξης κρυστάλλων ήταν 0,1 *M* *Tris-HCl*, *pH* 8,5, 0,2 *M* *MgCl₂*, and 35% (w/v) *PEG* 8000. Οι κρύσταλλοι αναπτύχθηκαν στους 16° C και σε συγκέντρωση πρωτεΐνης 20-30 *mg/mL*, μετά από μία μέρα (Εικόνα 68).



Εικόνα 68: Οι κρύσταλλοι της γαλεκτίνης-3-CRD που αναπτύχθηκαν σε συνθήκη 0.1 *M* *Tris-HCl*, *pH* 8,5, 0,2 *M* *MgCl₂* και 35% (w/v) *PEG* 8000.

5.6 Κρυστάλλωση της γαλεκτίνης-4C-CRD

Όπως αναφέρθηκε στο εδάφιο 4.7.2, χρησιμοποιήθηκαν τα κιτ κρυστάλλωσης *JBScreen* 1-4 (*Jena Bioscience*) και *PEG-Malonate* (*Molecular Dimensions*) και *Ammonium sulfate* (*Molecular Dimensions*). Παράλληλα, μελετήθηκαν και πολλές συνθήκες κρυστάλλωσης οι οποίες αποτελούνταν από διαφορετικές συγκεντρώσεις θειικού αμμωνίου, διαφορετικά ρυθμιστικά διαλύματα με εύρος *pH* από 5-9 και διαφορετικοί καταβυθιστικοί παράγοντες και άλατα. Μετά από πολλές προσπάθειες, αναπτύχθηκαν κρύσταλλοι σε συνθήκη κρυστάλλωσης 0,1 *M* *Hepes-NaOH*, *pH* 7,0, 4% (w/v) *PEG* 400 και 1,6 *M* θειικό αμμώνιο. Οι κρύσταλλοι αναπτύχθηκαν στους 16° C και σε συγκέντρωση πρωτεΐνης 8 *mg/mL*, μετά από 4 μήνες (Εικόνα 69).



Εικόνα 69: Οι κρύσταλλοι της γαλεκτίνης-4C-CRD που αναπτύχθηκαν σε συνθήκη 0,1 M HEPES-NaOH, pH 7,0, 4% (w/v) PEG 400 και 1,6 M θειικό αμμώνιο.

5.7 Κρυστάλλωση της Γαλεκτίνης-7

Όπως αναφέρθηκε στο εδάφιο 4.7.3 έγιναν αρκετές προσπάθειες ως προς την εύρεση της κατάλληλης συνθήκης για την ανάπτυξη κρυστάλλων. Στην Εικόνα 70 φαίνονται οι πρώτοι κρύσταλλοι που αναπτύχθηκαν. Ωστόσο, οι συγκεκριμένοι έδιναν κρυσταλλογραφικά δεδομένα περίθλασης ακτίνων Χ χαμηλής ευκρίνειας. Ακολούθησε η περαιτέρω βελτιστοποίηση της συνθήκης κρυστάλλωσης και αναπτύχθηκαν οι παρακάτω κρύσταλλοι σε διάλυμα 0,1 M Tris-HCl, pH 8,0, 0,1 M NaCl, 15% (w/v) PEG 4000 και 15% (v/v) γλυκερόλη. Οι κρύσταλλοι αναπτύχθηκαν στους 16° C και σε συγκέντρωση πρωτεΐνης 10 mg/mL, μετά από δύο μέρες (Εικόνα 71).



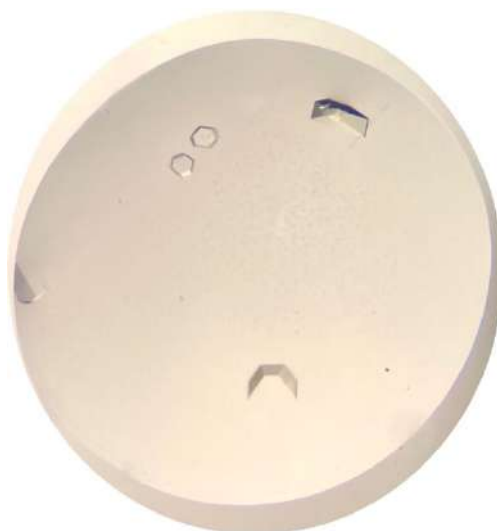
Εικόνα 70: Οι πρώτες προσπάθειες ανάπτυξης κρυστάλλων της Γαλεκτίνης-7. Οι κρύσταλλοι παρείχαν κρυσταλλογραφικά δεδομένα περίθλασης ακτίνων-Χ χαμηλής ευκρίνειας.



Εικόνα 71: Οι κρύσταλλοι της Γαλεκτίνης-7 που αναπτύχθηκαν συνθήκη 0,1 M Tris-HCl, pH 8,0, 0,1 M NaCl, 15% (w/v) PEG 4000 και 15% (v/v) γλυκερόλη.

5.8 Κρυστάλλωση της γαλεκτίνης-8N-CRD

Οι προσπάθειες ανάπτυξης κρυστάλλων της Γαλεκτίνης-8N-CRD πραγματοποιήθηκαν τόσο με τη χρήση του ρομποτικού συστήματος κρυστάλλωσης *OryxNano* (Douglas Instruments), όσο και χειρωνακτικά χρησιμοποιώντας ειδικά πλαστικά σκεύη με τη μέθοδο διάχυσης ατμών και πιο συγκεκριμένα με *επικαθήμενη σταγόνα*. Οι κρύσταλλοι που αναπτύχθηκαν παρουσιάζονται στην παρακάτω Εικόνα σε συνθήκη 20% (w/v) PEG 4000, 0,1 M Tris- κιτρικό νάτριο, pH 5,6, 20% (v/v) 2- ισοπροπανόλη. Οι κρύσταλλοι αναπτύχθηκαν στους 16° C και σε συγκέντρωση πρωτεΐνης 20 mg/mL, μετά από δύο μέρες (Εικόνα 72).



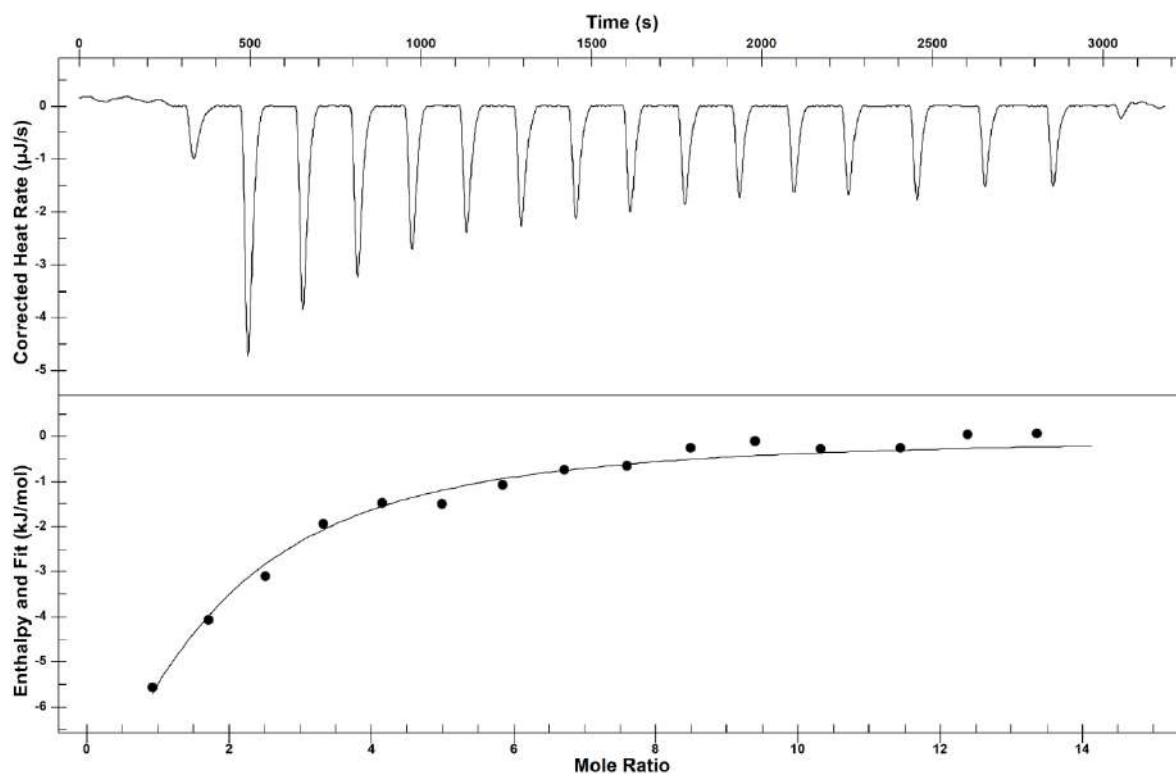
Εικόνα 72: Οι κρύσταλλοι της Γαλεκτίνης-8N-CRD που αναπτύχθηκαν σε συνθήκη 20% (w/v) PEG 4000, 0,1 M Tris- κιτρικό νάτριο, pH 5,6, 20% (v/v) 2- ισοπροπανόλη.

5.9 Μελέτες πρόσδεσης C-Γλυκοσιλικών-1,2-Θειοδισακχαριτών στις υπό μελέτη Γαλεκτίνες

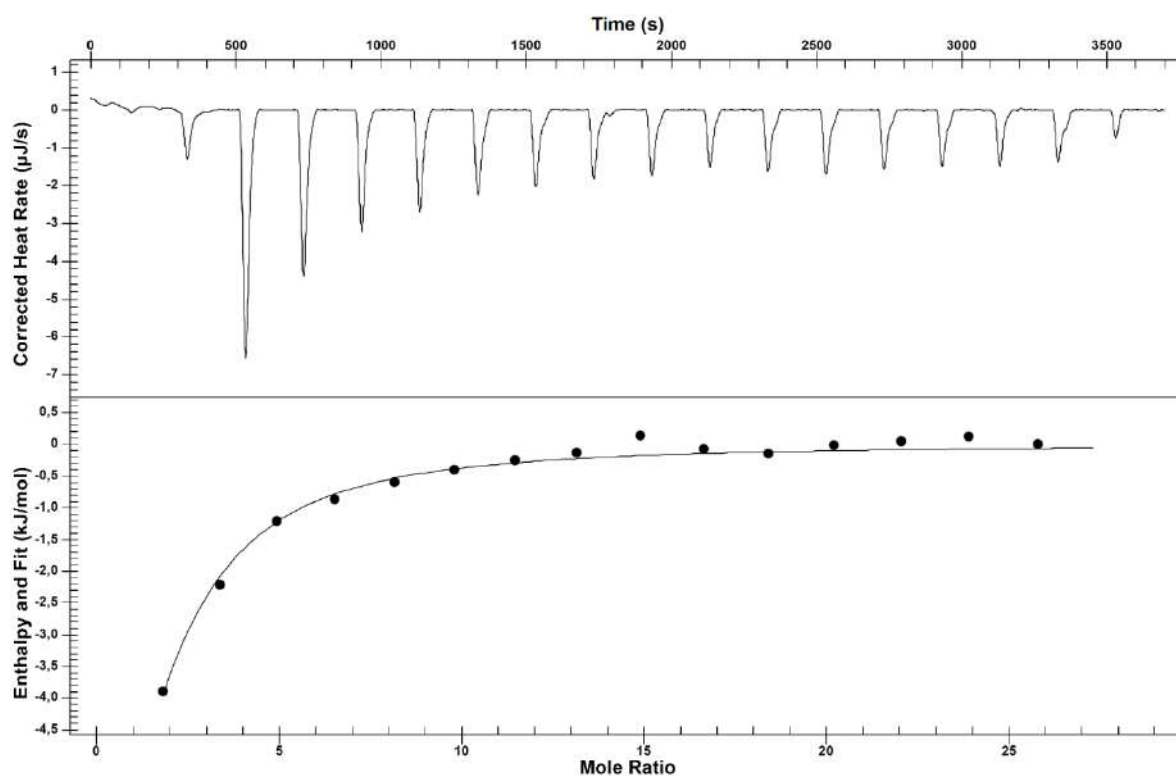
5.9.1 Μελέτες πρόσδεσης C-Γλυκοσιλικών-1,2-Θειοδισακχαριτών στη Γαλεκτίνη-3-CRD

5.9.1.1 Μελέτες προσδιορισμού των θερμοδυναμικών παραμέτρων και των K_d για τα σύμπλοκα των C-Γλυκοσιλικών-1,2-Θειοδισακχαριτών με τη Γαλεκτίνη-3-CRD

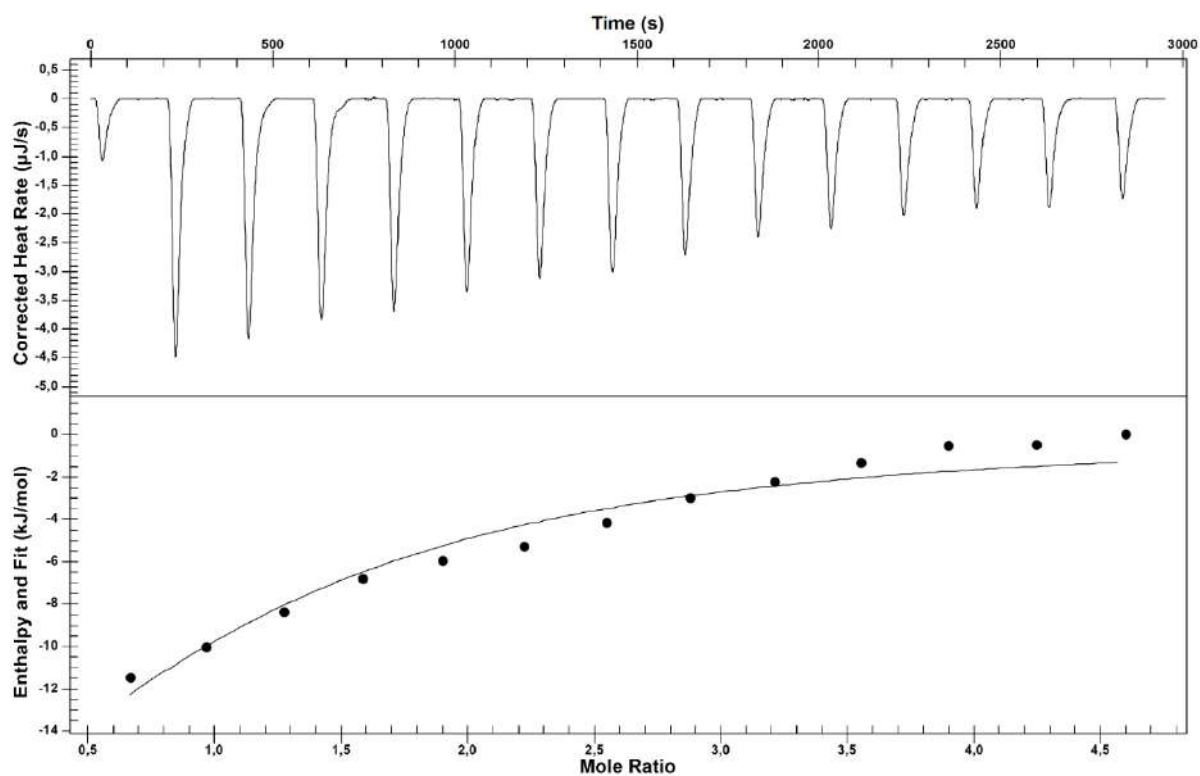
Η *TDG* εμφανίζει υψηλή συγγένεια ως προς την οικογένεια των γαλεκτινών, όπως έχει αναλυθεί στο εδάφιο 1.7.1.2. Οι δισακχαρίτες αυτοί δεν διασπώνται από τις γλυκοζιδάσες και εμφανίζουν συγγένεια για πολλά μέλη της οικογένειας. Για το λόγο αυτό, μελετήθηκε η πρόσδεση μια σειρά ενώσεων ανάλογων της *TDG*, με τη διαφορά ότι οι δύο δακτύλιοι των σακχάρων συνδέονται μέσω 1→2 δεσμού θείου και όχι με 1→1 δεσμό. Όπως αναφέρθηκε και στο εδάφιο 4.5, τα πειράματα *ITC* διεξήχθησαν σε θερμοκρασία 25°C, ο όγκος της κυψελίδας ήταν 1038 μL και της σύριγγας 250 μL και η ταχύτητα ανάδευσης 170 *rpm*. Αρχικά, προστέθηκε στο θερμιδόμετρο το ρυθμιστικό διάλυμα (0,1 M *Tris-HCl*, pH 7,5) ως τυφλός μάρτυρας. Η γαλεκτίνη-3-CRD (20 μM) σε ρυθμιστικό διάλυμα 0,1 M *Tris-HCl*, pH 7,5 προστέθηκε στην κυψελίδα. Η κάθε υπό μελέτη ένωση ήταν διαλυμένη στο ίδιο ακριβώς ρυθμιστικό διάλυμα (0,1 M *Tris-HCl*, pH 7,5). Η κάθε ένωση προστέθηκε στη σύριγγα και τιτλοδοτήθηκε στην κυψελίδα που περιείχε την πρωτεΐνη. Οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 1 mM λακτόζη, 2 mM *TDG*, 0,4 mM **13**, 0,3 mM **14**, 0,4 mM **15** και 0,6 mM **17**. Η τιτλοδότηση πραγματοποιήθηκε με 16 ενέσεις ανά 150 s. Η ανάλυση των δεδομένων έγινε με το πρόγραμμα *NanoAnalyze* (TA instruments). Η γαλεκτίνη-3-CRD περιέχει μόνο μια περιοχή πρόσδεσης, επομένως για την εύρεση των θερμοδυναμικών παραμέτρων καθώς και της K_D χρησιμοποιήθηκε το μοντέλο “*independent model*”. Παρακάτω αναγράφονται οι τιμές των K_D και τα διαγράμματα του κάθε πειράματος *ITC*, καθώς και οι χημικές δομές των υπό μελέτη ενώσεων (Πίνακας 5).



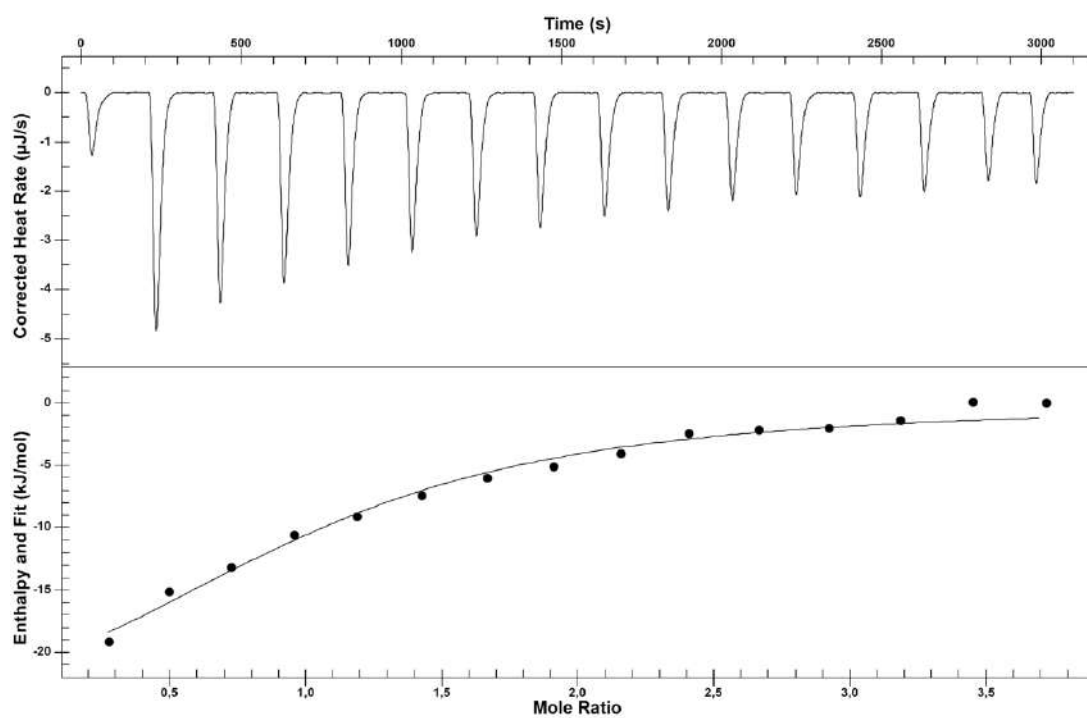
Εικόνα 74: Τα αποτελέσματα ITC του συμπλόκου γαλεκτίνης-3- CRD-λακτόζης.



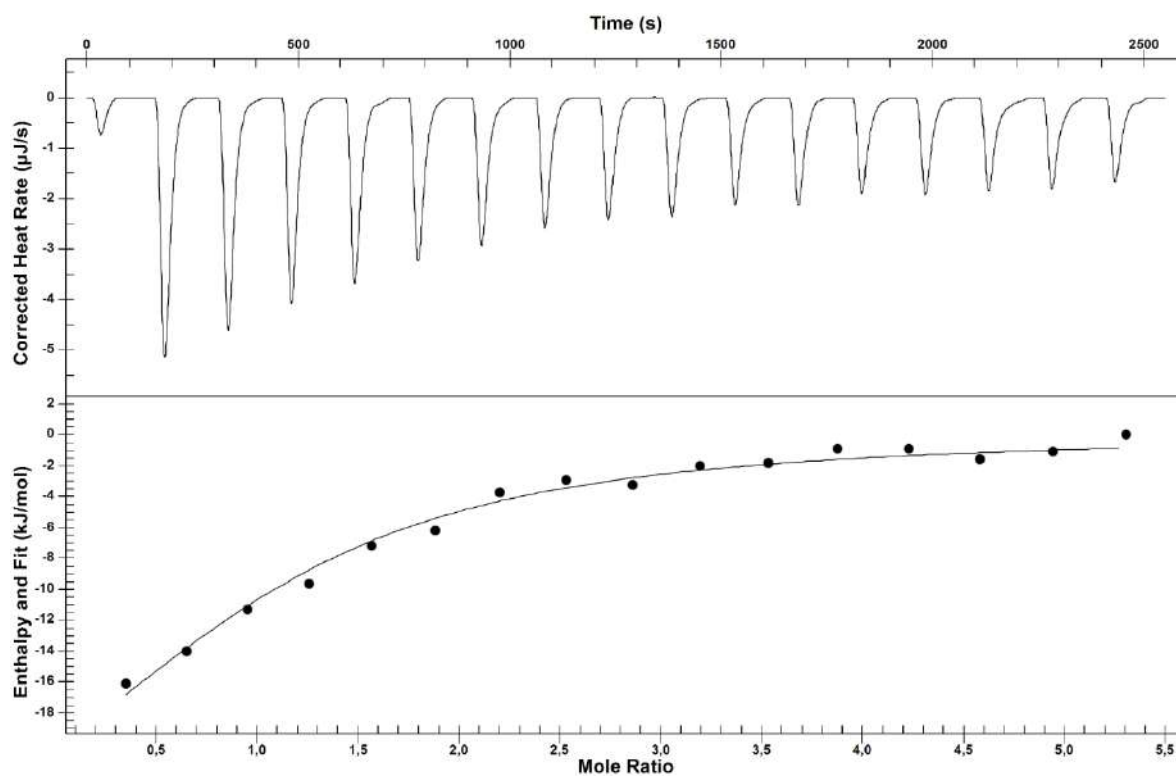
Εικόνα 75: Τα αποτελέσματα ITC του συμπλόκου γαλεκτίνης-3- CRD-TDG.



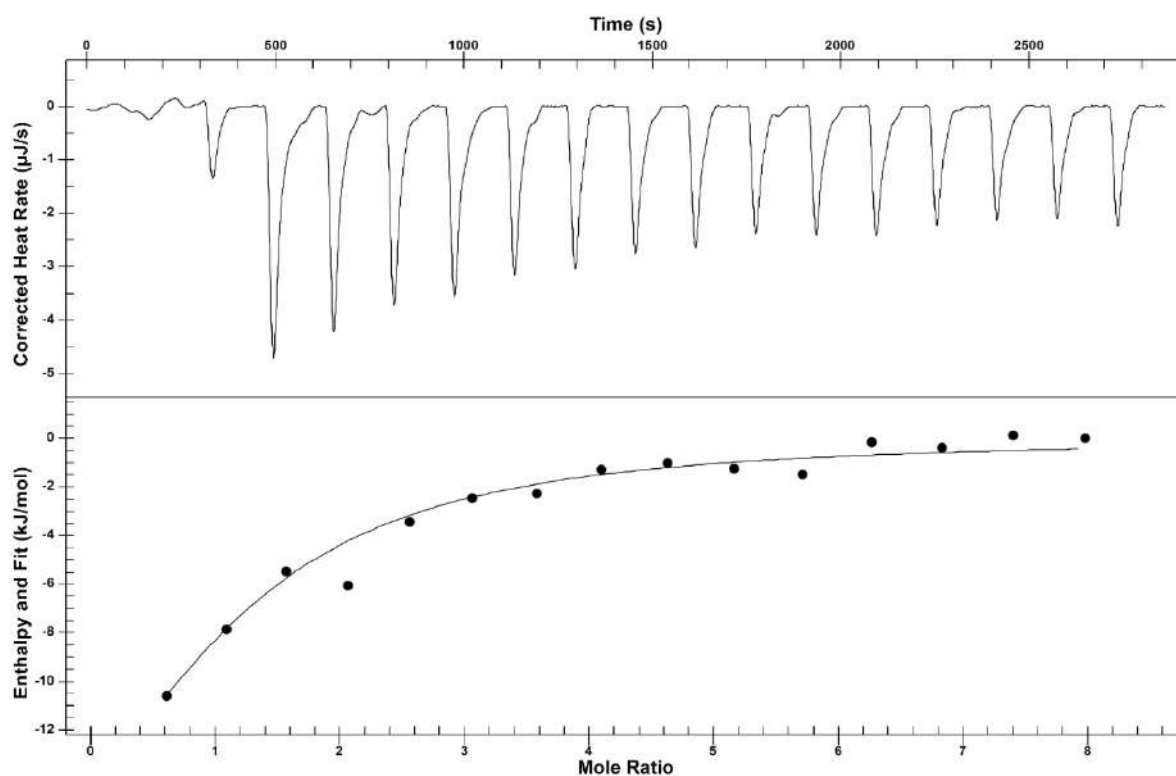
Εικόνα 76: Τα αποτελέσματα ITC του συμπλόκου γαλεκτίνης-3- CRD-13.



Εικόνα 77: Τα αποτελέσματα ITC του συμπλόκου γαλεκτίνης-3- CRD-14.



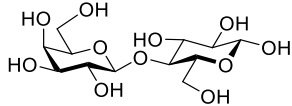
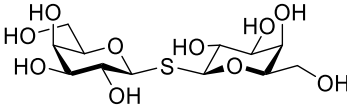
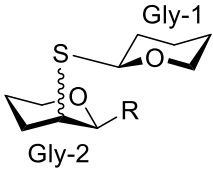
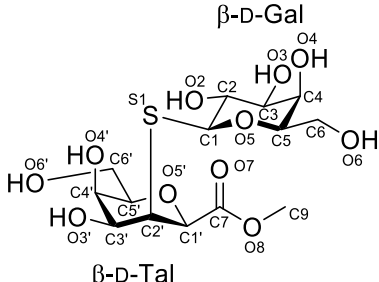
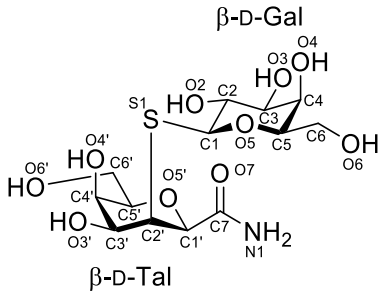
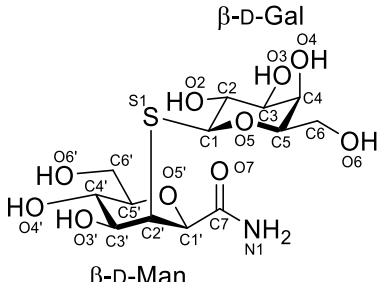
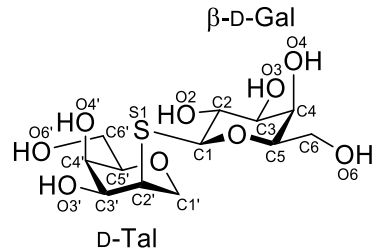
Εικόνα 78: Τα αποτελέσματα ITC του συμπλόκου γαλεκτίνης-3- CRD-15.



Εικόνα 79: Τα αποτελέσματα ITC του συμπλόκου γαλεκτίνης-3- CRD-17.

Πίνακας 5: Οι θερμοδυναμικές παράμετροι των συμπλόκων της Γαλεκτίνης-3-CRD στους 25° C [128].

Ένωση	Χημική δομή και κρυσταλλογραφική αρίθμηση	ITC			
		K_d (μM)	ΔH (kJ/mol)	ΔG (kJ/mol)	$-T\Delta S$ (kJ/mol)

<i>Lactose</i>		43,1±4,5	-22,9±1,1	-24,9	-2,03
<i>TDG</i>		44,2±4,6	-19,8±0,9	-24,9	-5,06
	 Η γενική ονομασία των δύο γλυκοζυλικών μονάδων των υπό μελέτη ενώσεων				
13	 β-D-Gal β-D-Tal	18,4±3,7	-32,3±2,3	-27,0	5,2
14	 β-D-Gal β-D-Tal	8,9±1,2	-29,0±1,2	-28,8	0,2
15	 β-D-Gal β-D-Man	14,3±1,6	-32,4±1,3	-27,6	4,8
17	 β-D-Gal D-Tal	21,3±2,6	-27,1±1,3	-26,7	0,4

Οι υπό μελέτη ενώσεις φαίνεται ότι έχουν αυξημένη αγκιστεία έναντι της *TDG* και της λακτόζης. Οι ενώσεις **13** και **17** εμφανίζουν χαμηλότερη αγκιστεία έναντι της **15**, η οποία

όμως είναι χαμηλότερη από αυτή της **14**. Οι ενώσεις αυτές είναι 1,2-θειοδισακχαρίτες και σύμφωνα με τον Πίνακα 1 παρατηρούμε ότι οι διαφορετικοί υποκαταστάτες καθώς και η διαφορετική στερεοχημεία επηρεάζουν τη συγγένεια πρόσδεσης. Η στερεοχημική δομή των γλυκοζυλομάδων (*Gly-1* και *Gly-2*) (Πίνακας 5) επηρεάζει επίσης τη συγγένεια πρόσδεσης. Έτσι, στο *Gly-1*, παρατηρούμε ότι όλες οι ενώσεις είναι *D-galacto*. Η αλλαγή της στερεοχημικής δομής του *Gly-2* από *D-talo* σε *D-manno* οδήγησε σε μείωση της συγγένειας [128]. Ο υποκαταστάτης *C1'* σχετίζεται με την αύξηση της συγγένειας, όπου η καρβαοϋλομάδα της **14** εμφανίζει αυξημένη ισχύ, έναντι του μεθυλεστέρα της **15**. Παράλληλα, το αξονικό *HO4'* της **15** ευνοεί τη σύνδεση περισσότερο από το ισημερινό *HO4'* της **14**.

Η μελέτη των θερμοδυναμικών παραμέτρων έδειξε ότι η αύξηση της συγγένειας πρόσδεσης των ενώσεων σε σχέση με τη λακτόζη και τη *TDG*, οφείλεται στην ενθαλπία, όπως φαίνεται στον Πίνακα 5, καθώς εμφανίζουν χαμηλότερες τιμές ΔH , το οποίο αποτελεί ευνοϊκό χαρακτηριστικό για εν δυνάμει φάρμακα. Η ΔH της πρόσδεσης της *TDG* είναι μικρότερη, κάτι που μπορεί να οφείλεται στις δυνάμεις των δεσμών υδρογόνου του συμπλόκου, ή/και στη σημαντικά διαφορετική θερμοδυναμική ενυδάτωση της μη δεσμευμένης *TDG* έναντι του συμπλόκου. Συνολικά, τα αποτελέσματά μας υποδεικνύουν μια πολύπλοκη θερμοδυναμική συμπεριφορά της πρόσδεσης, που δεν μπορεί να οφείλεται μόνο στους άμεσους δεσμούς υδρογόνου μεταξύ προσδέτη και πρωτεΐνης [128].

5.9.1.2 Κρυσταλλογραφικές μελέτες των C-Γλυκοσιλικών-1,2-Θειοδισακχαριτών με τη Γαλεκτίνη-3-CRD

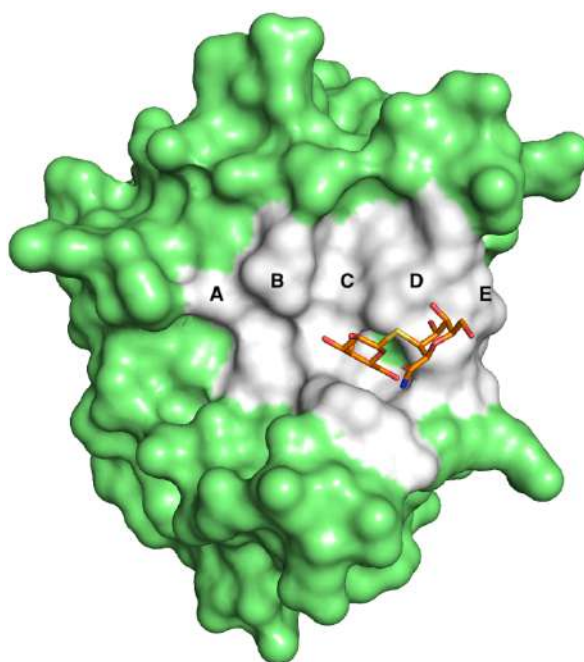
Οι κρύσταλλοι της γαλεκτίνης-3-CRD εμβαπτίστηκαν με διαλύματα των ενώσεων **13**, **14**, **15** και **17** σε συγκέντρωση 10 mM και με την *TDG* σε συγκέντρωση 5 mM, για 2 μέρες. Η συλλογή των κρυσταλλογραφικών δεδομένων για τα σύμπλοκα με τους 1,2-θειοδισακχαρίτες πραγματοποιήθηκε στο σύστημα *Microstar Bruker Rotating Anode* (2,7 KW / λ =1,5419 Å) με ανιχνευτή *mar345dtb* (*marXperts GmbH*), ενώ του συμπλόκου με την *TDG* στις εγκαταστάσεις συγχροτρονικής ακτινοβολίας *EMBL-Hamburg* στο σταθμό *P13*. Ο εμβαπτισμένος με την ένωση κρύσταλλος της CRD της γαλεκτίνης-3 λαμβάνεται με την χρήση βρόχου, εμβαπτίζεται σε κρυσπροστατευτικό διάλυμα 20% (v/v) γλυκερόλης, 0,1 M *Tris-HCl* pH 8,5, 0,2 M *MgCl₂*, 35% (w/v) *PEG 8000*. Στον Πίνακα 6 αναγράφονται τα στατιστικά στοιχεία που προέκυψαν από την επεξεργασία των κρυσταλλογραφικών δεδομένων περίθλασης ακτίνων Χ.

Πίνακας 6: Σύνοψη των παραμέτρων της επεξεργασίας των δεδομένων περίθλασης και της διαδικασίας της βελτιστοποίησης για τα σύμπλοκα της Γαλεκτίνης-3-CRD με τις παραπάνω ενώσεις. Οι τιμές στην παρένθεση αφορούν την εξωτερική στοιβάδα ευκρίνειας.

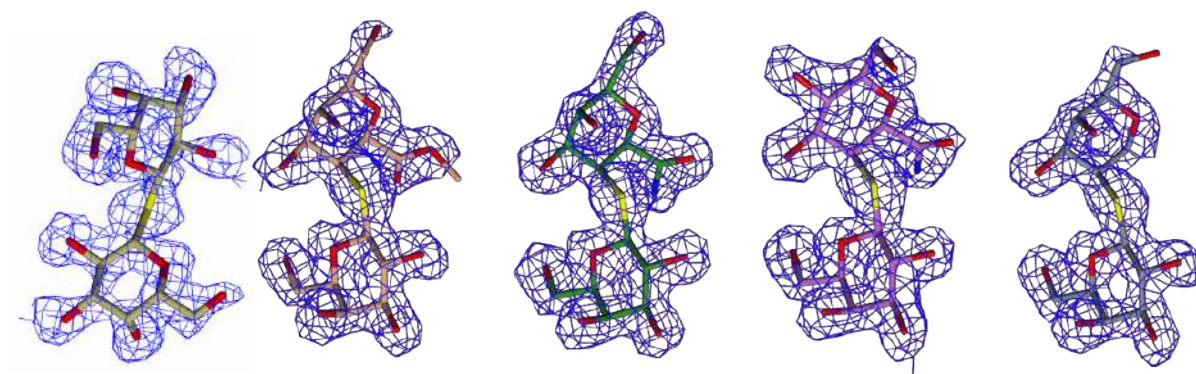
Galectin-3 Complex	TDG	13	14	15	17
Ομάδα συμμετρίας χώρου			$P2_12_12_1$		
Διαστάσεις μοναδιαίας κυψελίδας (Å)	35,9, 57,4	35,9, 57,9	36,1, 57,8, 61,8	36,0, 57,4, 62,3	35,9, 58,1, 62,5
Ευκρίνεια (Å)	1,80	1,75	1,80	1,80	1,80
Εξωτερική στοιβάδα (Å)	1,84-1,80	1,78-1,75	1,84-1,80	1,84-1,80	1,84-1,80

Ανακλάσεις	59508 (3366)	62508 (3302)	67117(3862)	67826 (3623)	61571 (3407)
Μοναδικές ανακλάσεις	11982 (691)	13748 (738)	12469 (714)	12426 (677)	12637 (708)
R _{merge}	0,097 (0,117)	0,069 (0,188)	0,072 (0,207)	0,041 (0,118)	0,044 (0,071)
Πληρότητα (%)	96,7 (97,6)	99,9 (100)	99,8 (99,2)	99,2 (96)	99,9 (100)
I/σ(I)	17,2 (13,9)	12,7 (4,9)	14,7 (6,4)	26 (10,6)	26,2 (17,0)
Πολλαπλότητα	5,0 (4,9)	4,5 (4,5)	5,4 (5,4)	5,5 (5,4)	4,9 (4,8)
CC ^{1/2}	0,967 (0,959)	0,995 (0,962)	0,996 (0,961)	0,998 (0,988)	0,997 (0,994)
B Wilson (Å ²)	7,8	16,2	15,8	14,2	14,0
Ανακλάσεις που χρησιμοποιήθηκαν στη βελτιστοποίηση	11009	13111	11755	11714	11927
Αριθμός μορίων διαλύτη	219	237	248	258	216
Αριθμός ατόμων της ένωσης	23	26	25	25	22
R (%)	26,7	11,8	15,6	14,9	14,7
R _{free} (%)	34,6	12,4	21,5	19,1	19,4
r.m.s.d. σε μήκη δεσμών (Å)	0,0082	0,013	0,0081	0,0093	0,0109
r.m.s.d. σε γωνίες δεσμών (°)	1,65	1,95	1,53	1,61	1,72
Μέση τιμή B (Å ²)					
Άτομα πρωτεΐνης	6,5	13,9	13,6	11,7	11,7
Μόρια διαλύτη	14,8	26,2	25,5	24,7	25,6
Άτομα ένωσης	7,5	23,2	16,7	18,1	17,8
PDB entry	8PPN	8OJI	8OJK	8OJM	8OJO

Όπως αναφέρθηκε στο εδάφιο 1.7.1, η CRD της γαλεκτίνης-3 αποτελείται από δύο αντιπαράλληλα β-πτυχωτά φύλλα δομημένα από 6 κλώνους που δημιουργούν την κοίλη πλευρά (S1-S6) και 5 κλώνους που δημιουργούν την κυρτή πλευρά (F1-F5). Η κοίλη πλευρά σχηματίζει μία αύλακα, που ονομάζεται περιοχή πρόσδεσης υδατανθράκων (*Carbohydrate Binding Site, CBS*) στην οποία προσδένονται οι υδατάνθρακες. Η CBS της γαλεκτίνης-3 χωρίζεται περαιτέρω στις περιοχές A-E (Εικόνα 80). Η περιοχή C αποτελείται από τα αμινοξικά κατάλοιπα *His158, Asn160, Arg162, Asn174* και *Trp181* και είναι αρκετά συντηρημένη στην οικογένεια των γαλεκτινών, ενώ η περιοχή D αποτελείται από τα κατάλοιπα *Arg162, Trp181, Glu184, Arg186*. Στην περιοχή C προσδέεται η β-γαλακτόζη, ενώ στη λιγότερο συντηρημένη περιοχή D προσδέεται το σάκχαρο που βρίσκεται δίπλα στη β-γαλακτόζη. Οι περιοχές A, B και E αποτελούνται από κατάλοιπα που χαρακτηρίζουν την κάθε γαλεκτίνη και είναι κυρίως υπεύθυνα για τη βιολογική τους δράση. Όλα τα σύμπλοκα έχουν προσδιορισθεί στην ίδια ακριβώς ευκρίνεια (1,80 Å). Όλες οι ενώσεις έχουν προσδεθεί στη CRD της γαλεκτίνης-3 και όλα τα άτομα της κάθε ένωσης βρίσκονται εντός της ηλεκτρονικής πυκνότητας (Εικόνα 81). η πρόσδεσή τους δεν προκάλεσε κάποια αλλαγή στη διαμόρφωση της πεπτιδικής αλυσίδας.



Εικόνα 80: Η πρόσδεση της ένωσης LL63 στις περιοχές C και D της CRD της Γαλεκτίνης-3. Η ένωση φαίνεται με πορτοκαλί χρώμα και οι περιοχές A-E φαίνονται με λευκό χρώμα.



Εικόνα 81: Χάρτες $2F_o - F_c$ που υπολογίστηκαν για τις ενώσεις TDG (λαδί), **13** (καφέ), **14** (πράσινο), **15** (μωβ) και **17** (γκρι). Οι χάρτες είναι προσαρμοσμένοι σε 1.0 σ πριν την ενσωμάτωση των μορίων των αναστολέων στη διαδικασία της βελτιστοποίησης.

Όλες οι ενώσεις αλληλεπιδρούν με τις περιοχές C και D με παρόμοιο τρόπο, συμμετέχοντας σε ένα καλά συντηρημένο δίκτυο δεσμών υδρογόνου. Στον Πίνακα 7 παρουσιάζονται οι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ της CRD της γαλεκτίνης-3 και των ατόμων της κάθε ένωσης.

Πίνακας 7: Οι δεσμοί υδρογόνου που αναπτύσσονται μεταξύ των ενώσεων και των καταλοίπων της CRD της γαλεκτίνης-3.

Άτομα ένωσης	Κατάλοιπα πρωτεΐνης και μόρια ύδατος			
	13	14	15	17
O2	Water-89	Water-89	Water-89 Water-134 Water-177	Water-89
O3	Water-31 Water-97	Water-31 Water-97	Water-31 Water-97	Water-31 Water-97

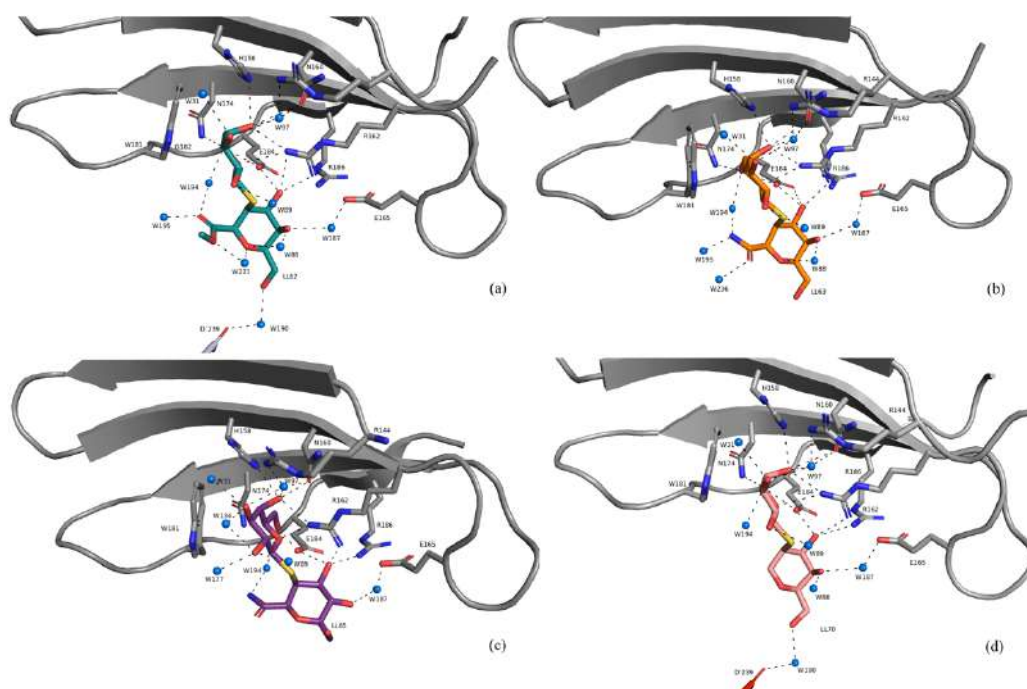
			Water-134	
O4	His158(NE2) Asn160(OD1) Arg162(NH2) Water-97	His158(NE2) Asn160(OD1) Arg162(NH2) Water-97	His158(NE2) Asn160(OD1) Arg162(NH2) Water-97	His158(NE2) Asn160(OD1) Arg162(NH2) Water-97
O5	Arg162(NH2)	Arg162(NH2)	Arg162(NH2)	Arg162(NH2)
O6	Asn174(ND2) Glu184(OE2) Water-194	Asn174(ND2) Glu184(OE2) Water-194	Asn174(ND2) Glu184(OE2) Water-194	Asn174(ND2) Glu184(OE2) Water-194
O3'	Arg162(NH1; NH2) Glu184(OE2) Arg186(NH2)	Arg162(NH1) Glu184(OE1; OE2)	Arg162(NH1) Glu184(OE2) Arg186(NH2)	Arg162(NH1) Glu184(OE2) Arg186(NH2)
O4'	Water-88 Water-187	Water-88 Water-187	Water-187	Water-88 Water-187
O5'	Water-88 Water-221	Water-88		
O6'	Water-190			Water-190
O7	Water-194 Water-195	Water-236		
O8	Water-221			
N1		Water-194 Water-195	Water-194	
Συνολικοί δεσμοί υδρογόνου	10	9	9	9

Και οι τέσσερις ανταγωνιστές προσδένονται μέσω πρόσδεσης του β-γαλακτοζίτη (*Gly-1*), στην περιοχή *C*, δημιουργώντας δεσμούς υδρογόνου με τα άτομα των πλευρικών αλυσίδων των καταλοίπων *His158*, *Asn160*, *Arg162*, *Asn174* και *Glu184* και αλληλεπιδράσεις επιστοίβαξης με την πλευρική αλυσίδα της *Trp181*. Αυτό το δομικό μοντέλο πρόσδεσης είναι όμοιο με αυτό της γαλακτόζης της λακτόζης, της *TDG* και άλλων υδατανθρακικών ενώσεων. Το δεύτερο σάκχαρο (*Gly-2*), και των τεσσάρων ενώσεων προσδένεται μερικώς στην περιοχή *D* με παρόμοια διαμόρφωση. Οι δίεδρες γωνίες του θειογλυκοσιδικού δεσμού, *O5-C1-C2'-C3'*, *O5-C1-C2'-C1'*, *C2-C1-C2'-C3'*, and *C2-C1-C2'-C1'* των ενώσεων **13**, **14**, **15** και **17** έχουν τιμές από 57° έως 64°, από -133° έως -142°, από -56° έως 66° και από 97° έως 105°, αντίστοιχα. Οι αντίστοιχες γωνίες της *TDG* έχουν τιμές 56°, -147°, -75° και 80°. Οι τελεστές *B* είναι παρόμοιοι (Πίνακας 6), με την διαφορά ότι αυτοί της μονάδας *Gly-2* είναι 1.5 με 1.7 υψηλότεροι συγκριτικά με εκείνους της *Gly-1*. Κατά μέσο όρο, οι **13**, **14**, **15** και **17** εμφανίζουν 14%, 38%, 33% και 34% μικρότερους παράγοντες *B*, αντίστοιχα, σε σύγκριση με την *TDG* κατά την πρόσδεση στη γαλεκτίνη-3 [128].

Κατά την πρόσδεση των ανταγωνιστών σχεδόν το 50% της επιφάνειας κάθε ένωσης θάβεται (44,7%, 45,6%, 45,7% και 46,5% των **13**, **14**, **15** και **17**, αντίστοιχα). Στην επιφάνεια της πρωτεΐνης, συνολικά 158, 159, 162 και 142 Å² της προσβάσιμης στο διαλύτη επιφάνειας χάνεται κατά τη δέσμευση των **13**, **14**, **15** και **17**, αντίστοιχα. Η συνολική θαμμένη επιφάνεια (πρωτεΐνη συν την ένωση) είναι 392, 392, 397 και 363 Å² για τα σύμπλοκα της γαλεκτίνης-3 με τους **13**, **14**, **15** και **17**, αντίστοιχα. Η μεγαλύτερη συνεισφορά στα σύμπλοκα των **13** και

17 προέρχεται από μη πολικά κατάλοιπα (98,5% και 82,3%, αντίστοιχα), ενώ εκείνα των **14** και **15** προέρχεται από πολικά κατάλοιπα (62,0% και 61,8%, αντίστοιχα).

Η *Gly-2* των 1,2-θειοδιασκαχαριτών δημιουργεί δεσμούς υδρογόνου με τις πλευρικές αλυσίδες των καταλοίπων της περιοχής *D*, *Arg162* και *Glu184*. Μεταξύ των τεσσάρων ενώσεων παρατηρούνται διαφορές στους δεσμούς υδρογόνου που δημιουργεί το *O3'* της *Gly-2*. Το υδροξύλιο αυτό δημιουργεί δεσμούς υδρογόνου με τις πλευρικές αλυσίδες των καταλοίπων *Arg162(NH1)* και *Glu184(OE2)*. Επιπλέον, στα σύμπλοκα με τις **13** και **17** δημιουργείται δεσμός υδρογόνου με την *Arg162(NH2)*, ενώ η **14** δημιουργεί δεσμό υδρογόνου με το *Glu184(OE1)*. Επιπρόσθετα, το υδροξύλιο *OE6'* των **13** και **17** δημιουργεί δεσμό υδρογόνου με την πλευρική αλυσίδα του καταλοίπου *Asp239* του κρυσταλλογραφικά συμμετρικού μορίου. Ωστόσο, οι δεσμοί αυτοί δεν λαμβάνονται υπόψιν για τον τρόπο πρόσδεσης των ενώσεων αυτών. Συνολικά η **13** δημιουργεί 10 δεσμούς υδρογόνου με τα κατάλοιπα της πρωτεΐνης, ενώ οι **14**, **15** και **17** δημιουργούν 9 δεσμούς (Εικόνα 82) [128].



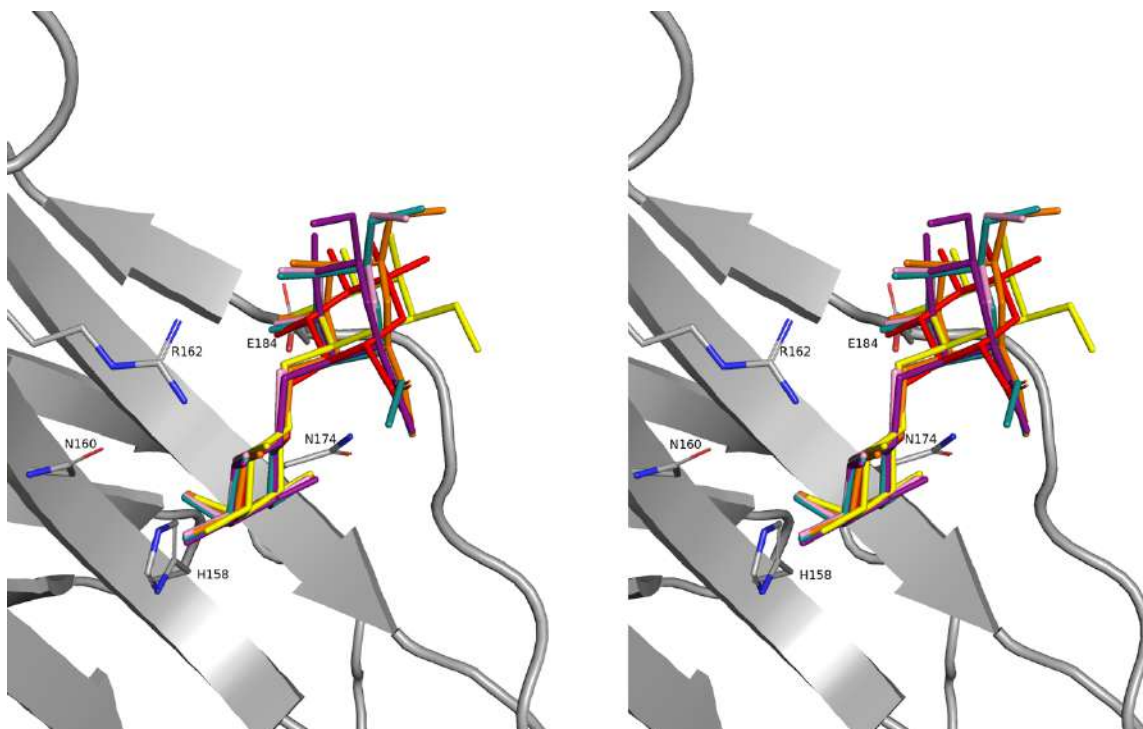
Εικόνα 82: Οι δεσμοί υδρογόνου που δημιουργούνται κατά την πρόσδεση των (α) **13**, (β) **14**, (γ) **15** και (δ) **17** στην CRD της γαλεκτίνης-3. Με διακεκομμένες γραμμές φαίνονται οι δεσμοί υδρογόνου και ως μπλε σφαίρες αναπαρίστανται τα μόρια ύδατος.

Οι τέσσερις υπό μελέτη ενώσεις δημιουργούν ένα δίκτυο δεσμών υδρογόνου με καλά συντηρημένα μόρια ύδατος με τις πλευρικές αλυσίδες των ατόμων των καταλοίπων *Arg144*, *Asp148*, *Asn260*, *Glu165* και *Ser237*. Επιπλέον, η **17** δημιουργεί αλληλεπίδραση δεσμού υδρογόνου διαμεσολαβούμενη από μόρια ύδατος με τη *Lys176*, η **13** με την κύρια και πλευρική αλυσίδα των καταλοίπων *Gln150*, *Asn153*, *Trp181* και *Gly182*, η **14** με τα κατάλοιπα *Asn143*, *Asn164*, *Asn180* και *Trp181* και η **15** με τα κατάλοιπα *Gln150*, *Asn153* και *Asn166*. Και στα τέσσερα σύμπλοκα η *Gly-1* δημιουργεί αλληλεπιδράσεις *Van der Waals* με τα κατάλοιπα *His158*, *Asn160*, *Arg162*, *Asn174* και *Glu184*, ενώ η *Gly-2* με τα κατάλοιπα *Arg162* και *Glu184*. Συνολικά, οι **13**, **14**, **15** και **17** συμμετέχουν σε 62, 66, 61 και 62 δεσμούς υδρογόνου,

αλληλεπιδράσεις *Van der Waals* και αλληλεπιδράσεις δεσμών υδρογόνου διαμεσολαβούμενες από μόρια ύδατος (*water-mediated*), αντίστοιχα.

Οι διαφορές που παρατηρούνται στην συγγένεια πρόσδεσης δεν μπορούν να αποδοθούν στις δομικές διαφορές που παρατηρούνται στον τρόπο πρόσδεσης των ενώσεων. Φαίνεται ότι οι διαφορές στη συγγένεια προέρχεται από το συνδυασμό του αριθμού των αλληλεπιδράσεων (δεσμοί υδρογόνου, αλληλεπιδράσεις *Van der Waals* και αλληλεπιδράσεις δεσμών υδρογόνου διαμεσολαβούμενες από μόρια ύδατος). Πιο συγκεκριμένα, ενώ η **13** δημιουργεί ένα παραπάνω δεσμό υδρογόνου από τους υπόλοιπους ανταγωνιστές, αυτός εξισορροπείται από το μεγαλύτερο αριθμό αλληλεπιδράσεων *Van der Waals* που δημιουργούν οι υπόλοιποι ανταγωνιστές σε σχέση με την **13**. Η **15** δημιουργεί τον ίδιο αριθμό δεσμών υδρογόνου με την **17** και παρόμοιο αριθμό αλληλεπιδράσεων *Van der Waals* (40 και 44, αντίστοιχα), αλλά δημιουργεί περισσότερες αλληλεπιδράσεις διαμεσολαβούμενες από μόρια ύδατος (12 και 8, αντίστοιχα), κάτι που μπορεί να εξηγήσει την υψηλότερη συγγένεια που εμφανίζει η **15**. Τέλος, η **14** εμφανίζει την υψηλότερη σταθερά διάστασης, κάτι που μπορεί να οφείλεται στο μεγάλο αριθμό αλληλεπιδράσεων *Van der Waals* και αλληλεπιδράσεις διαμεσολαβούμενες από μόρια ύδατος που δημιουργεί σε σχέση με τις υπόλοιπες ενώσεις (43 και 14, αντίστοιχα). Επιπλέον, σημαντικό ρόλο στη συγγένεια πρόσδεσης των ενώσεων έχουν οι αλλαγές στην εντροπία κατά την πρόσδεση τους ή/και η θερμοδυναμική της ενυδάτωσης των ενώσεων. Για παράδειγμα, παρόλο που οι τελεστές B της *Gly-1* και των τεσσάρων ενώσεων είναι σχεδόν ίδιοι, οι ενώσεις **14** και **15** εμφανίζουν χαμηλότερο τελεστή B στη *Gly-2*, υποδεικνύοντας ότι ο υποκαταστάτης στον C1' (-CONH₂) προσδίδει μεγαλύτερη ακαμψία στην ένωση σε σχέση με τον υποκαταστάτη -COOMe της ένωσης **13** ή την αφαίρεσή του από την ένωση **17**.

Συγκριτική δομική ανάλυση του τρόπου πρόσδεσης των 1,2-θειοδισακχαριτών με την TDG και τη λακτόζη (Εικόνα 83) έδειξε ότι η *Gly-1* προσδένεται ακριβώς με τον ίδιο τρόπο, ενώ οι *Gly-2* λόγω του διαφορετικού δεσμού προσδένονται με διαφορετικό προσανατολισμό. Ωστόσο, οι πλευρικές αλυσίδες των καταλοίπων *Arg162* και *Glu184* δημιουργούν δεσμούς υδρογόνου με τη *Gly-2* (HO3' των **13**, **14**, **15** και **17**, HO2 της TDG και HO3 της λακτόζης). Το γεγονός αυτό, υποδεικνύει ότι τόσο ο διαφορετικός δεσμός, ο υποκαταστάτης του C1' καθώς και ο παραπάνω δεσμός που δημιουργείται, οδηγούν στην αύξηση της συγγένειας πρόσδεσης των συγκεκριμένων ενώσεων έναντι της λακτόζης και της TDG.



Εικόνα 83: Στερεοαπεικόνιση του τρόπου πρόσδεσης της **13** (μπλε χρώμα), της **14** (πορτοκαλί χρώμα), της **15** (μωβ χρώμα), της **17** (ροζ χρώμα), της TDG (κίτρινο χρώμα) και της λακτόζης (κόκκινο χρώμα). Με γκρι χρώμα φαίνεται η CBS της Γαλεκτίνης-3.

Αρκετά ενδιαφέρον αποτελεί το σημαντικό κέρδος στην ενθαλπία που παρατηρείται κατά την πρόσδεση των 1,2-θειοδισακχαριτών έναντι της TDG, το οποίο είναι περίπου 1.2 με 1.6 φορές μεγαλύτερο, αν και αυτό αντισταθμίζεται από δυσμενείς μεταβολές της εντροπίας (Πίνακας 5). Η υψηλότερη συγγένεια πρόσδεσης σε σχέση με τη λακτόζη και τη TDG, που εμφανίζουν οι **13**, **14**, **15** και **17** ίσως οφείλεται στις αλληλεπιδράσεις *Van der Waals* που δημιουργούνται με την περιοχή D. Ωστόσο, το κέρδος της ενθαλπίας μπορεί να οφείλεται και σε περισσότερους παράγοντες όπως π.χ. διαφορές στην ενυδάτωση αλλά και στις αλληλεπιδράσεις των ανταγωνιστών που διαμεσολαβούνται από μόρια ύδατος, οι οποίες όμως αντισταθμίζονται από πτώσεις της εντροπίας. Η TDG και η λακτόζη δημιουργούν 5 δεσμούς υδρογόνου με μόρια ύδατος, ενώ οι **13**, **14**, **15** και **17** δημιουργούν 9, 9, 8 και 7, αντίστοιχα (Πίνακας 7). Να σημειωθεί ότι η **13** δημιουργεί ένα παραπάνω δεσμό υδρογόνου αλλά λιγότερες αλληλεπιδράσεις *Van der Waals* σε σχέση με την **14**, αλλά η τελευταία εμφανίζει υψηλότερη συγγένεια. Και οι δύο ενώσεις δημιουργούν 14 αλληλεπιδράσεις διαμεσολαβούμενες από μόρια ύδατος με τα κατάλοιπα της γαλεκτίνης-3-CRD. Ωστόσο, η πρόσδεση της **14** σταθεροποιεί το δίκτυο μορίων ύδατος γύρω από την ένωση, όπως φαίνεται στην Εικόνα 84, όπως φαίνεται και από ένα μόριο ύδατος το οποίο δεν συντηρείται στην πρόσδεση της **13**. Αντίθετα, στο σύμπλοκο της γαλεκτίνης-3-CRD με την **13**, υπάρχουν τέσσερα μόρια ύδατος [128].

πρόσδεση της ένωσης. Έτσι, εξετάστηκε η συμβολή του δικτύου μορίων ύδατος σε μία απόσταση 5 Å γύρω από την ένωση, έχοντας ως μοντέλο το σύμπλοκο της γαλεκτίνης-3-CRD με τη *TDG*, η οποία προσδιορίστηκε στις ίδιες συνθήκες και στην ίδια ευκρίνεια (1,8 Å). Συγκρίνοντας τα δίκτυα μορίων ύδατος μεταξύ των συμπλόκων της γαλεκτίνης-3-CRD με τις **13**, **14**, **15** και **17** και του συμπλόκου-μοντέλο, οι ΔG_{calc} υπολογίστηκαν σε -3,99, -3,87, -3,96 και -4,02 kcal/ mol·K, αντίστοιχα. Οι τιμές αυτές υποδεικνύουν ότι το μοτίβο των τιμών της ΔG_{calc} συμφωνεί με τη συγγένεια πρόσδεσης, και η **14** εμφανίζει την υψηλότερη τιμή ΔG_{calc} . Τα δίκτυα μορίων ύδατος μπορούν να συμβάλλουν σημαντικά στη συγγένεια πρόσδεσης, επομένως, κατά το σχεδιασμό πιο ισχυρών ανταγωνιστών της γαλεκτίνης-3 CRD, ο παράγοντας αυτός θα πρέπει να λαμβάνεται σοβαρά υπόψη. Συνοπτικά, οι 1,2-θειοδιασκαχαρίτες εμφανίζουν υψηλότερη αγκιστεία έναντι της *TDG*. Επιπλέον, φαίνεται ότι η C-γλυκοζυλική λειτουργική ομάδα ή, γενικότερα, η θέση 1' του δακτυλίου *Gly-2* μπορεί να τροποποιηθεί περαιτέρω, με στόχο τη δημιουργία πιο ισχυρών ανταγωνιστών. Οι πολικές τροποποιήσεις ευνοούν την αύξηση της αγκιστείας περισσότερο από τις μη πολικές (π.χ. -CONH₂ έναντι -COOMe). Επίσης, η χημική τροποποίηση των ενώσεων αυτών με την προσθήκη υποκαταστατών ή αύξησης του μεγέθους τους, μπορεί να οδηγήσει στην αντικατάσταση μορίων ύδατος εντός της θέσης πρόσδεσης της γαλεκτίνης-3, με στόχο το σχηματισμό άμεσων αλληλεπιδράσεων αντί έμμεσων (με τη μεσολάβηση μορίων ύδατος), και την ενίσχυση της δραστηριότητας και της εκλεκτικότητας των ενώσεων. Η υψηλότερη συγγένεια πρόσδεσης οφείλεται κυρίως στην ενθαλπία, σύμφωνα με τις μελέτες *ITC*. Οι 1,2-θειοδιασκαχαρίτες έχουν τον ίδιο αριθμό δεσμών υδρογόνου με τη γαλεκτίνη-3 με εκείνους της λακτόζης και της *TDG*, σύμφωνα με τη δομική ανάλυση, αλλά δημιουργούν μεγαλύτερο αριθμό δεσμών υδρογόνου με τη μεσολάβηση μορίων ύδατος. Επιπλέον, τα κέρδη ενθαλπίας που προκαλούνται από τους δεσμούς υδρογόνου αντισταθμίζονται, όπως αναμενόταν, εν μέρει από δυσμενείς αλλαγές στην εντροπία για τους 1,2-θειοδιασκαχαρίτες. Μια ενδιαφέρουσα στρατηγική για τη βελτίωση της ισχύος, π.χ., της **14** θα ήταν η χημική προσθήκη στους C3 και C3' με υποκαταστάτες αρυλ-τριαζολυλίου ανάλογα. Για παράδειγμα, η κλινική ένωση GB0139 είναι ένα παράγωγο *TDG* που φέρει 3-φθοροφαινυλο-τριαζολικές ομάδες στα C3 και C3', η οποία οδηγεί σε τιμή K_D της τάξεως των 2 nM [169], επομένως η προσθήκη υποκαταστατών στους C3 και C3' της **14** με ομάδες 3-φθοροφαινυλ-τριαζόλης είναι ένα ελκυστικό επόμενο βήμα για τη δημιουργία ενώσεων που θα προσδένονται πιο ισχυρά και ειδικά στη γαλεκτίνη-3-CRD.

5.9.2 Μελέτες πρόσδεσης C-Γλυκοσιλικών-1,2-Θειοδιασκαχαριτών στη Γαλεκτίνη-7

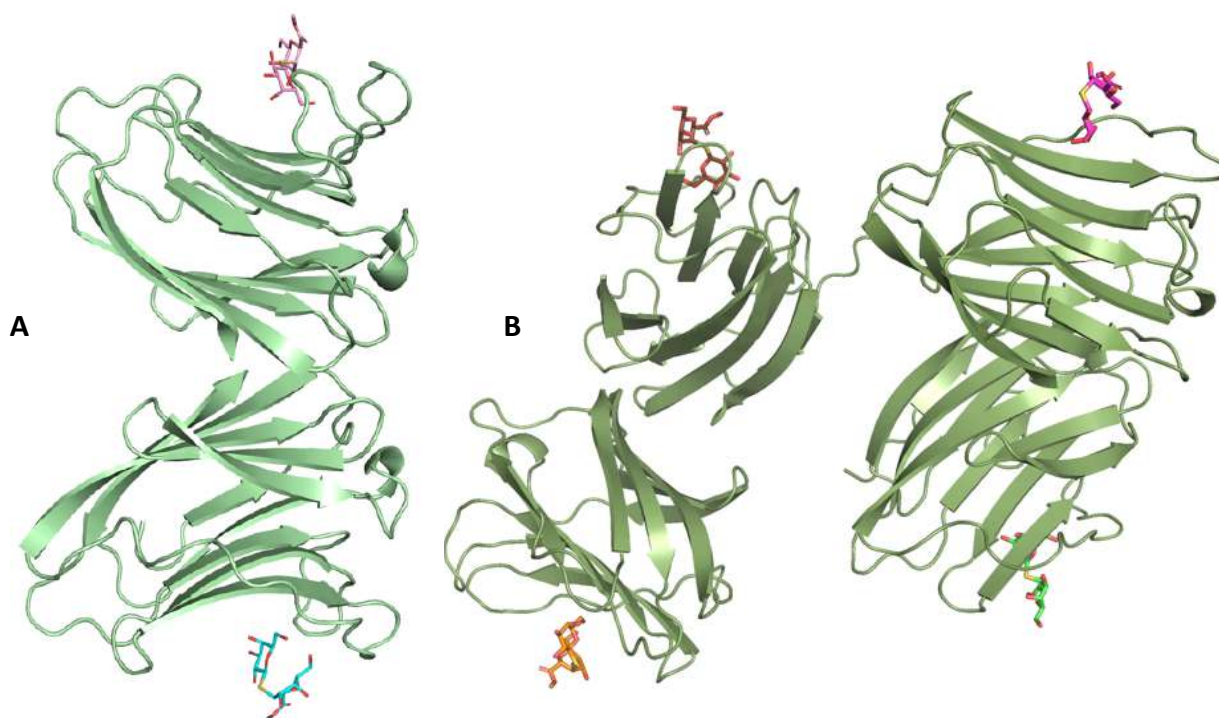
Πραγματοποιήθηκε συγκρουστικότητα των υπό μελέτη ενώσεων, *TDG*, **13**, **14**, **15** και **17** με τελική συγκέντρωση 1 mM. Οι κρύσταλλοι των συμπλόκων της γαλεκτίνης-7 (10 mg/mL) αναπτύχθηκαν στους 16° C, σε συνθήκη 0,1 M Tris-HCl, pH 8,0, 0,1 M NaCl, 15% (w/v) PEG 4000 και 15% (v/v) γλυκερόλη, σε 0,1 M Tris-HCl, pH 7,0, 0,1 M NaCl, and 15% (w/v) PEG 3350 και 15% (v/v) γλυκερόλη, σε 0,1 M Tris-HCl, pH 8,0, 0,1 M NaCl, and 20% (w/v) PEG 8000 και 15% (v/v) γλυκερόλη και σε συνθήκη 0,1 M Tris-HCl, pH 8,0, 0,1 M NaCl, and 15% (w/v) PEG

8000 και 15% (ν/ν) γλυκερόλη, αντίστοιχα. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε εμφάνιση των κρυστάλλων της γαλεκτίνης-7 σε διαλύματα των υπό μελέτη ενώσεων, συγκέντρωσης 1 mM. Η συλλογή των κρυσταλλογραφικών δεδομένων περίθλασης ακτίνων Χ για τα σύμπλοκα διεξήχθη στις εγκαταστάσεις συγχροτρονικής ακτινοβολίας *EMBL-Hamburg* στο σταθμό P13. Ο κάθε κρύσταλλος λαμβάνεται με την χρήση βρόχου, εμβαπτίζεται σε κρυσπροστατευτικό διάλυμα 30% (ν/ν) γλυκερόλης με την εκάστοτε συνθήκη κρυστάλλωσης. Από τις παραπάνω ενώσεις μόνο η ένωση **13** προσδέθηκε στον κρύσταλλο. Στον Πίνακα 8 αναγράφονται τα στατιστικά που προέκυψαν από την επεξεργασία των δεδομένων περίθλασης τόσο του εμβαπτισμένου κρυστάλλου της γαλεκτίνης-7 με την ένωση **13** (σύμπλοκο Α), όσο και του συμπλόκου της συγκρυστάλλωσης με την ένωση **13** (σύμπλοκο Β).

Πίνακας 8: Σύνοψη των παραμέτρων της επεξεργασίας των δεδομένων περίθλασης και της διαδικασίας της βελτιστοποίησης για τα σύμπλοκα της γαλεκτίνης-7-CRD με την **13**. Οι τιμές στην παρένθεση αφορούν την εξωτερική στοιβάδα ευκρίνειας.

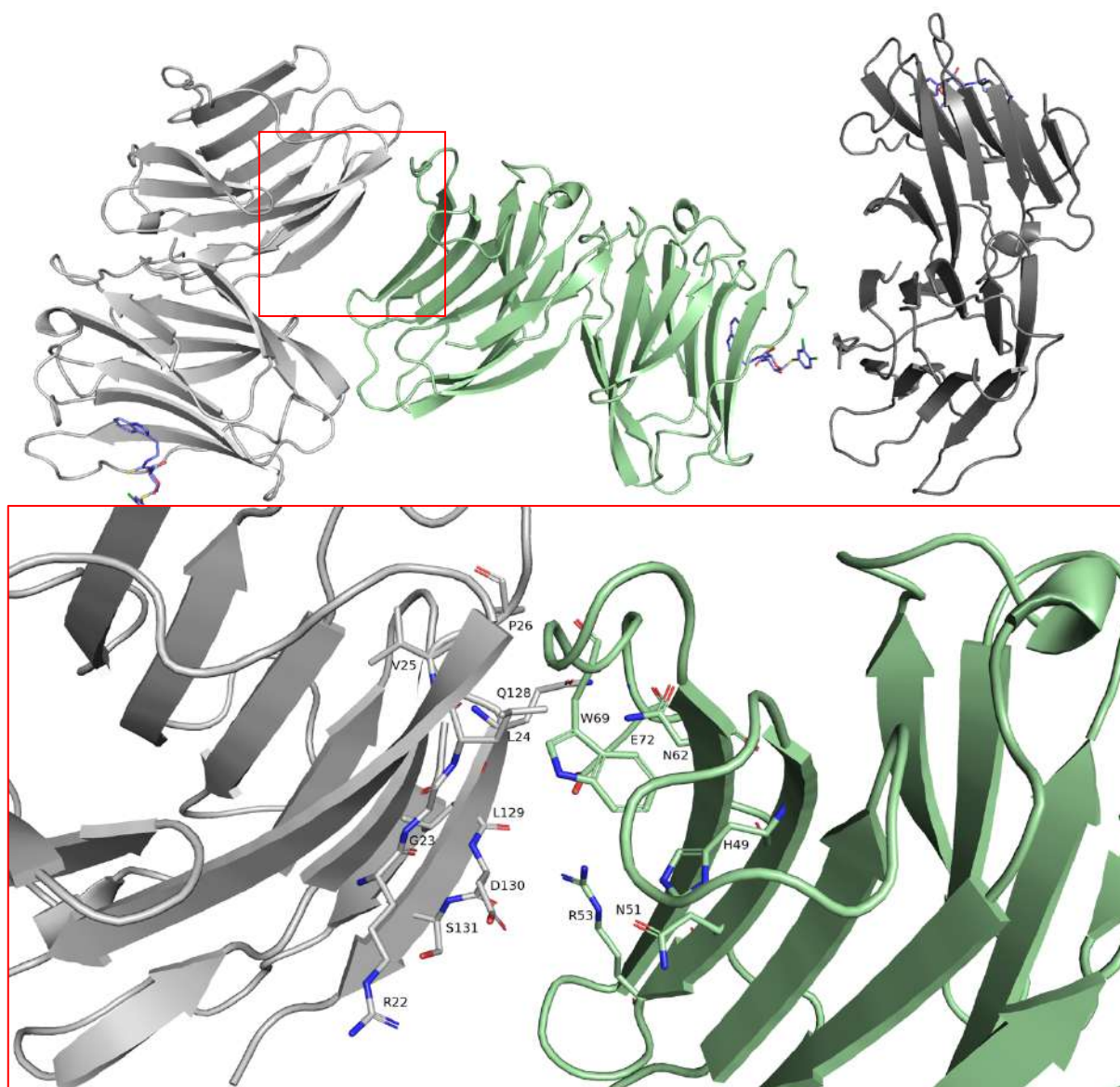
Σύμπλοκο Γαλεκτίνης-7	Σύμπλοκο Α	Σύμπλοκο Β
Ομάδα συμμετρίας χώρου	$P4_12_12$	$P2_12_12_1$
Διαστάσεις μοναδιαίας κυψελίδας (Å)	77,0, 77,0, 100,2	77,0, 77,0, 100,0
Ευκρίνεια (Å)	1,76	1,80
Εξωτερική στοιβάδα (Å)	1,79-1,76	1,84-1,80
Ανακλάσεις	343068 (19766)	320446 (19459)
Μοναδικές ανακλάσεις	30613 (1700)	55975 (3285)
R_{merge}	0,136 (1,014)	0,117 (0,717)
Πληρότητα (%)	100 (100)	100 (100)
$I/\sigma(I)$	10,9 (2,3)	8,5 (2,0)
Πολλαπλότητα	11,2 (11,6)	5,7 (5,9)
$CC^{1/2}$	0,998 (0,834)	0,996 (0,784)
B Wilson (Å ²)	23,85	28,91
Ανακλάσεις που χρησιμοποιήθηκαν για τη βελτιστοποίηση	28998	53054
Αριθμός μορίων διαλύτη	308	623
Αριθμός ατόμων της ένωσης	26	26
R (%)	15,5	15,7
R_{free} (%)	19,2	20,6
r.m.s.d. σε μήκη δεσμών (Å)	0,010	0,015
r.m.s.d. σε γωνίες δεσμών (°)	1,8	1,8
	Μέση τιμή B (Å ²)	
Άτομα πρωτεΐνης	22,9 (Chain A)	23,3 (Chain A)
	25,3 (Chain B)	27,1 (Chain B)
		23,5 (Chain C)
		27,0 (Chain D)
Μόρια διαλύτη	37,9	37,4
Άτομα ένωσης	34,1 (Chain A)	20,2 (Chain A)
		14,4 (Chain B)
	28,4 (Chain B)	20,0 (Chain C)
		13,7 (Chain D)

Η επεξεργασία των δεδομένων περίθλασης έδειξε ότι το σύμπλοκο που σχηματίστηκε με εμφάνιση του κρυστάλλου με διάλυμα της **13** ήταν διμερές (όπως και η ελεύθερη μορφή της γαλεκτίνης-7 [203]), ενώ το σύμπλοκο που σχηματίστηκε με συγκρυστάλλωση, ήταν τετραμερές (Εικόνα 85).

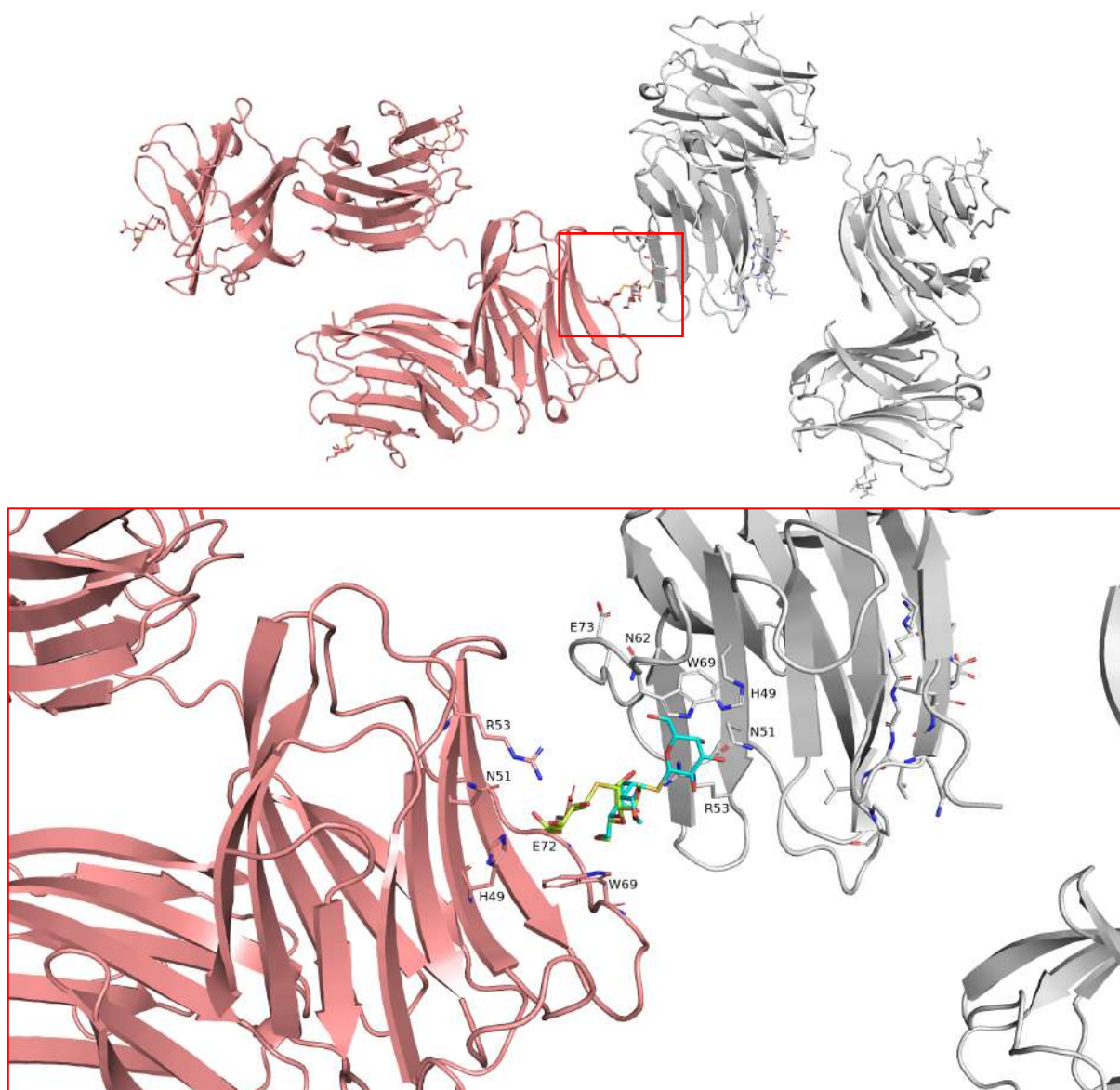


Εικόνα 85: Η τρισδιάστατη δομή Α. του διμερούς και Β. του τετραμερούς του συμπλόκου γαλεκτίνη-7-13. Με ράβδους απεικονίζεται η ένωση.

Η γαλεκτίνη-7 σε αντίθεση με τις υπόλοιπες μονομερές γαλεκτίνες προσδένει υδατάνθρακες ως μονομερές και όχι ως διμερές. Το διμερές της πρωτεΐνης αυτής δημιουργείται μέσω των β-κλώνων *F1-F5*, το οποίο σταθεροποιείται μέσω δεσμών υδρογόνου μεταξύ πέντε καταλοίπων του μορίου Α και οχτώ καταλοίπων του μορίου Β και αλληλεπιδράσεων *Van der Waals*. Οι ανταγωνιστές προσδέονται κρυσταλλογραφικά μόνο στο μόριο Β λόγω παρεμποδίσεων του κρυσταλλικού πλέγματος στο κέντρο πρόσδεσης του μορίου Α. Η περιοχή πρόσδεσης υδατανθράκων στο μονομερές Α μπλοκάρεται από τα συμμετρικά κατάλοιπα 22-26 και 128-131 (Εικόνα 86). Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώνεται καθώς η γαλεκτίνη-7, σε αντίθεση με τις πρωτότυπες γαλεκτίνες 1 και 2, αναγνωρίζει τους υδατάνθρακες ως μονομερές και όχι ως διμερές [204]. Ωστόσο, τόσο στο σύμπλοκο του διμερούς όσο και του τετραμερούς, παρόλο που δημιουργείται με τον ίδιο τρόπο μέσω των β-κλώνων *F1-F5*, η ένωση προσδέθηκε σε όλα τα μόρια της πρωτεΐνης, καθώς τα συμμετρικά μόρια δεν μπλοκάρουν την πρόσδεση υδατανθράκων (Εικόνα 87). Με άλλα λόγια, το κρυσταλλικό πλέγμα είναι διαφορετικό.



Εικόνα 86: Η διμερής γαλεκτίνη-7 (πράσινο χρώμα). Η περιοχή πρόσδεσης υδατανθράκων στο μονομερές Α (πράσινο χρώμα) παρεμποδίζεται από τα συμμετρικά κατάλοιπα 22-26 και 128-131 του συμμετρικού μορίου (γκρι χρώμα). Με γκρι χρώμα παρουσιάζονται τα συμμετρικά μόρια, με πράσινο χρώμα η γαλεκτίνη-7. Ως ράβδοι σε γκρι χρώμα απεικονίζονται τα κατάλοιπα του συμμετρικού και ως πράσινο τα κατάλοιπα της περιοχής πρόσδεσης υδατανθράκων του μονομερούς Α της γαλεκτίνης-7.



Εικόνα 87: Η τετραμερής γαλεκτίνη-7 (ροζ χρώμα) που έχει προσδεθεί η ένωση **13**. Η περιοχή πρόσδεσης υδατανθράκων στο μονομερές A (ροζ χρώμα) δεν παρεμποδίζεται από τα συμμετρικά κατάλοιπα 22-26 και 128-131 του συμμετρικού μορίου (γκρι χρώμα). Με γκρι χρώμα παρουσιάζονται τα συμμετρικά μόρια, με ροζ χρώμα το σύμπλοκο της γαλεκτίνης-7. Σε γκρι χρώμα απεικονίζονται τα κατάλοιπα του συμμετρικού και σε πράσινο τα κατάλοιπα της περιοχής πρόσδεσης υδατανθράκων του μονομερούς A της γαλεκτίνης-7.

Η *Gly-1* της ένωσης σε όλα τα μόρια δημιουργεί ένα δίκτυο δεσμών υδρογόνου με τα συντηρημένα αμινοξικά κατάλοιπα. Πιο συγκεκριμένα, η ομάδα O4 δημιουργεί δεσμούς υδρογόνου (Πίνακας 9) με τα κατάλοιπα *His49*, *Asn51*, *Arg53*, η O5 με τα *Arg53* και *Glu72* και η O6 με τα *Asn62* και *Glu72*. Επιπλέον η πρόσδεση της *Gly-1* σταθεροποιείται μέσω αλληλεπιδράσεων *Van der Waals* με τα κατάλοιπα *His49*, *Arg53*, *Asn62*, *Glu72* και αλληλεπιδράσεις επιστοίβαξης με την *Trp69*. Ωστόσο, παρατηρούνται διαφορές ως προς την πρόσδεση του *Gly-2*. Στο μονομερές A του διμερούς (Εικόνα 90) όπως και στο A και C του τετραμερούς (Εικόνα 93) το *Gly-2* προσδένεται με διαφορετικό προσανατολισμό. Πιο συγκεκριμένα μόνο η ομάδα O6' δημιουργεί δεσμό υδρογόνου με την *Arg69*, ενώ

δημιουργούνται και αλληλεπιδράσεις *Van der Waals* (Πίνακας 10) με τα κατάλοιπα *Asn62*, *Gly70*, *Glu72* και *Trp69*. Αντίθετα, η *Gly-2* στα μόρια Β του μονομερούς και Β και D του τετραμερούς δημιουργεί δεσμούς υδρογόνου μέσω των *O3'* και *O4'* με τα κατάλοιπα *Arg53*, *Glu72* και *Arg74*, ενώ δημιουργεί και αλληλεπιδράσεις *Van der Waals* με τα *Arg53* και *Glu72*.

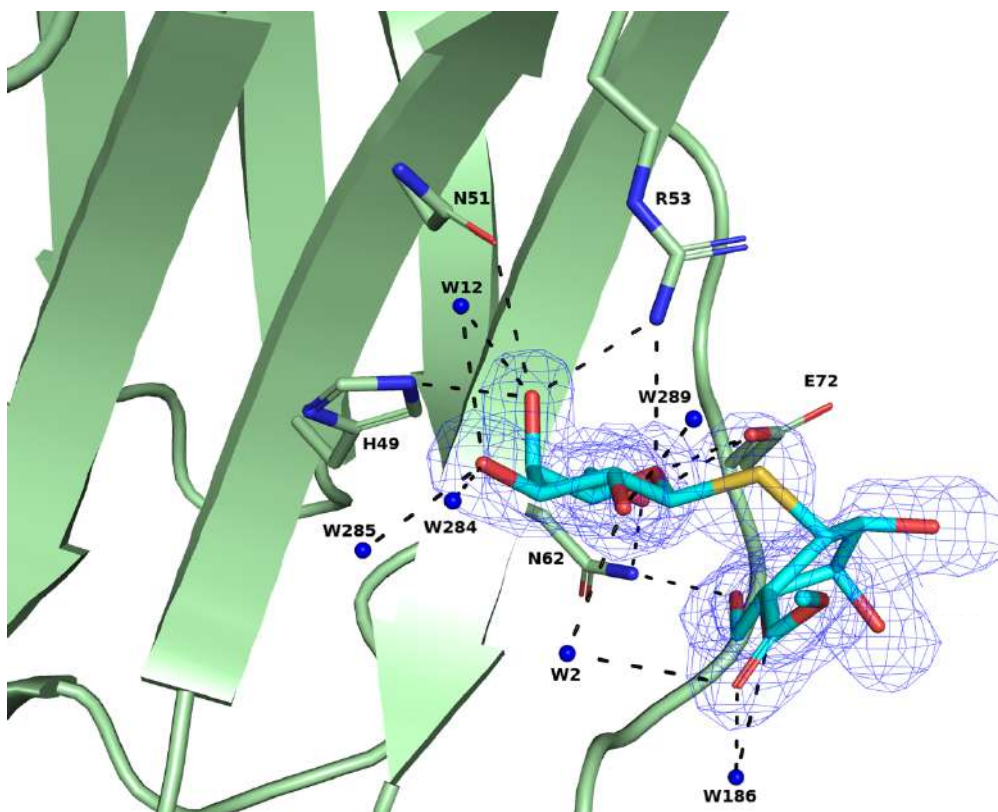
Πίνακας 9: Οι δεσμοί υδρογόνου που δημιουργούνται μεταξύ της 13 με τα κατάλοιπα της γαλεκτίνης-7 και με μόρια ύδατος. Στον πίνακα αναφέρεται και το διμερές και το τετραμερές. Σε παρένθεση είναι η απόσταση σε Å.

Άτομα ένωσης	Κατάλοιπα πρωτεΐνης και μόρια ύδατος του διμερούς		Κατάλοιπα πρωτεΐνης και μόρια ύδατος του τετραμερούς			
	A	B	A	B	C	D
O2	Water-289 (2,7) Water-2 (2,8)	Water-16 (2,8) Water-138 (2,7)	Water-149 (2,8) Water-390 (2,6) Water-563 (3,3)	Water-313 (2,8) Water-432 (2,8)	Water-163 (2,9) Water-449 (2,6)	Water-317 (2,7) Water-392 (2,8)
O3	Water-12 (2,9) Water-284 (2,8) Water-285 (2,7)	Water-19 (2,9) Water-185 (2,9)	Water-65 (2,9) Water-297 (2,8) Water-563 (2,8)	Water-109 (2,9) Water-572 (3,1)	Water-57 (2,9) Water-557 (2,8)	Water-104 (2,9) Water-496 (3,1)
O4	His49(NE2) (2,8) Asn51(OD1) (3,1) Arg53(NH2) (2,9) Water-12 (3,1)	His49(NE2) (2,8) Asn51(OD1) (3,1) Arg53(NH2) (2,9) Water-19 (3,0)	His49(NE2) (2,9) Asn51(OD1) (3,1) Arg53(NH2) (2,9) Water-65 (3,1)	His49(NE2) (2,8) Asn51(OD1) (3,1) Arg53(NH2) (2,9) Water-109 (3,0)	His49(NE2) (2,9) Asn51(OD1) (3,1) Arg53(NH2) (2,9) Water-57 (3,1)	His49(NE2) (2,8) Asn51(OD1) (3,1) Arg53(NH2) (2,9) Water-104 (3,0)
O5	Arg53(NH2) (3,1) Glu72(OE2) (3,3)	Arg53(NH2) (2,8) Water-282 (3,3)	Arg53(NH2) (3,1) Glu72(OE2) (3,3)	Arg53(NH2) (2,8)	Arg53(NH2) (3,1)	Arg53(NH2) (2,8)
O6	Asn62(ND2) (2,9) Glu72(OE2) (2,6)	Asn62(ND2) (2,9) Glu72(OE2) (2,6) Water-282 (2,9)	Asn62(ND2) (2,9) Glu72(OE2) (2,7)	Asn62(ND2) (2,9) Glu72(OE2) (2,6) Water-567 (2,9)	Asn62(ND2) (2,9) Glu72(OE2) (2,7)	Asn62(ND2) (2,9) Glu72(OE2) (2,6) Water-612 (3,0)
O3'		Arg53(NH1) (2,9) Arg53(NH2) (3,3) Glu72(OE1) (3,3) Glu72(OE2) (2,6) Arg74(NH2) (3,3)		Arg53(NH1) (2,9) Arg53(NH2) (3,3) Glu72(OE1) (3,3) Glu72(OE2) (2,6) Arg74(NH2) (3,3)		Arg53(NH1) (2,9) Arg53(NH2) (3,3) Glu72(OE1) (3,3) Glu72(OE2) (2,6) Arg74(NH2) (3,3)
O4'		Arg53(NH1) (3,1) Water-18 (2,7) Water-181 (2,7)		Arg53(NH1) (3,1) Water-463 (2,7)	Water-566 (2,9)	Arg53(NH1) (3,1) Water-617 (2,7) Water-621 (2,7)
O5'	Water-186 (2,9)		Water-616 (2,9)		Water-565 (3,0)	
O6'	Asn62(ND2) (2,9)		Asn62(ND2) (3,0) Water-620 (3,3)		Asn62(ND2) (3,0)	Water-621 (3,3)
O7	Water-2 (3,3) Water-186 (2,5)		Water-616 (3,1) Water-619 (2,8)		Water-623 (3,2) Water-565 (2,6)	
O8						
Συνολικοί δεσμοί υδρογόνου	8	12	8	12	7	12

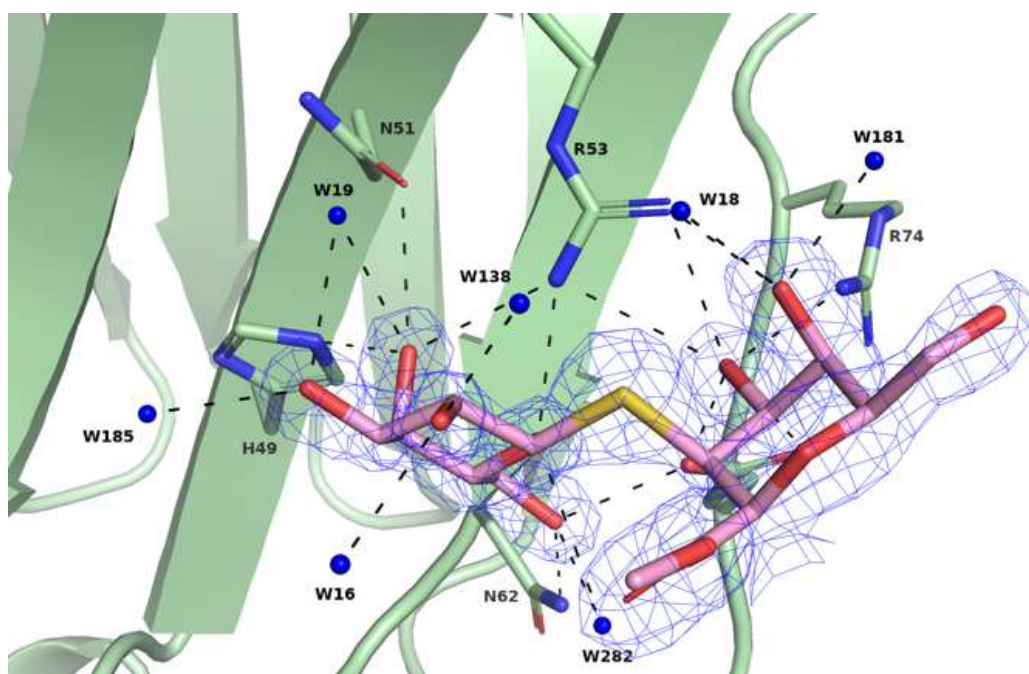
Πίνακας 10: Οι αλληλεπιδράσεις *Van der Waals* που δημιουργούνται μεταξύ της LL62 με τα κατάλοιπα της γαλεκτίνης-7 και με μόρια ύδατος. Στον πίνακα αναφέρεται και το διμερές και το τετραμερές.

Inhibitor atom LL62	Protein Residues (atoms)					
	Chain A					
	A	B	A	B	C	D
O2	Water-284	Water-287				Water-622
O3	Water-131	Water-16 Water-287	Water-149	Water-432	Water-163	Water-392 Water-622
O4	His49(CD2, CE1)	His49(CE1, CD2) Asn51(CG) Glu72(OE2)	His49(CD2, CE1)	His49(CD2, CE1) Asn51(CG) Glu72(OE2) Water-567	His49(CD2, CE1) Glu72(OE2)	His49(CE1, CD2) Glu72(OE2) Water-612
O5						
O6	Val60(CG1) Asn62(CB, CG) Glu72(CG, CD)	Asn62(CG, CB) Trp69(CG) Glu72(CG, CD)	Val60(CG1) Asn62(CG, CB) Glu72(CG, CD)	Asn62(CB, CG) Glu72(CG, CD)	Val60(CG1) Asn62(CB, CG) Glu72(CG, CD)	Asn62(CG, CB) Trp69(CG) Glu72(CG, CD)
O3'		Arg53(CZ) Glu72(CD)		Arg53(CZ) Glu72(CD)		Arg53(CZ) Glu72(CD)
O5'					Water-566	
O6'	Trp69(CB)	Water-181	Trp69(CB)	Water-463	Trp69(CB)	

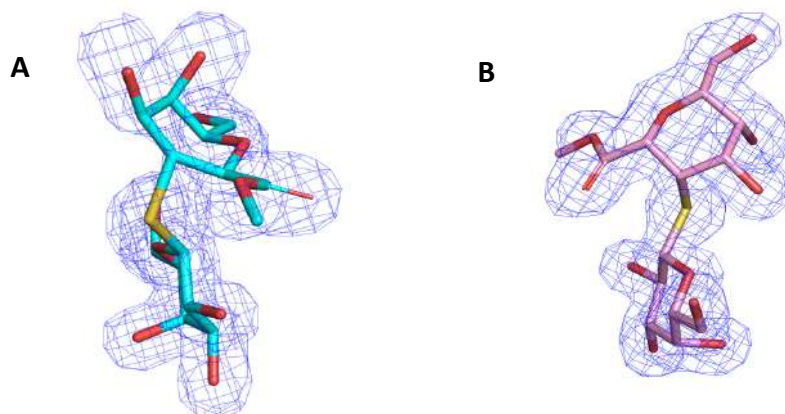
	Gly70(O) Glu72(CG, CD, OE2) Water-15		Gly70(O) Glu72(CG, OE2, CD)		Gly70(O) Glu72(CG, CD, OE2) Water-561 Water-163	
O7			Water-149	Water-567 Water-568	Water-612 Water-613	
O8	Water-188					
S1	Water-1 Water-289	Arg53(NH1, NH2) Water-18 Water-138	Water-390 Water-611 Water-614	Arg53(NH1, NH2) Water-313	Water-31 Water-449	Arg53(NH1, NH2) Water-317 Water-617
C1	Arg53(NH2)	Arg53(NH2) Water-282	Arg53(NH2)	Arg53(NH2) Water-567	Arg53(NH2)	Arg53(NH2) Water-612
C2	Arg53(NH2) Water-2 Water-289	Arg53(NH2) Water-16 Water-19 Water-138	Arg53(NH2) Water-149 Water-390	Arg53(NH2) Water-109 Water-313 Water-432	Arg53(NH2) Water-163 Water-449	Arg53(NH2) Water-104 Water-317 Water-392
C3	Trp69(CZ2) Water-2 Water-12 Water-284 Water-285	Trp69(NE1) Water-16 Water-19 Water-185	Trp69(CZ2) Water-65 Water-149 Water-297 Water-563	Water-109 Water-432	Trp69(CZ2) Water-57 Water-163 Water-557	Trp69(NE1) Water-104 Water-392
C4	His49(NE2, CD2) Arg53(NH2) Trp69(CH2, CZ2) Water-12	His49(NE2) Arg53(NH2) Trp69(CZ2, NE1, CE2) Water-19	His49(NE2, CD2) Arg53(NH2) Trp69(CH2, CZ2) Water-65	His49(NE2) Arg53(NH2) Trp69(NE1, CE2, CZ2) Water-109	His49(NE2, CD2) Arg53(NH2) Trp69(CH2, CZ2) Water-57	His49(NE2) Arg53(NH2) Trp69(CZ2, NE1, CE2) Water-104
C5	Arg53(NH2) Trp69(CD2, CE2)	Arg53(NH2) Trp69(NE1, CE2, CD2) Water-282	Arg53(NH2) Trp69(CE2, CD2)	Arg53(NH2) Trp69(NE1, CE2, CD2) Water-567	Arg53(NH2) Trp69(CD2, CE2)	Arg53(NH2) Trp69(NE1, CE2, CD2) Water-612
C6	His49(CD2) Arg53(NH2) Val60(CG1) Asn62(ND2) Trp69(CE3) Glu72(OE2)	His49(CD2) Arg53(NH2) Asn62(ND2) Trp69(CD2, CE3) Glu72(OE2) Water-282	His49(CD2) Arg53(NH2) Val60(CG1) Glu72(OE2) Asn62(ND2) Trp69(CE3)	His49(CD2) Arg53(NH2) Asn62(ND2) Trp69(CD2, CE3) Glu72(OE2) Water-567	His49(CD2) Arg53(NH2) Val60(CG1) Asn62(ND2) Glu72(OE2)	His49(CD2) Arg53(NH2) Asn62(ND2) Trp69(CD2, CE3) Glu72(OE2) Water-612
C1'	Water-186		Water-616		Water-565	
C2'		Glu72(OE2) Water-282		Glu72(OE2) Water-567		Glu72(OE2) Water-612
C3'	Glu72(OE2) Water-1	Arg53(NH1) Glu72(CD, OE1, OE2)	Glu72(OE2) Water-611	Arg53(NH1) Glu72(CD, OE1, OE2)	Glu72(OE2) Water-31	Arg53(NH1) Glu72(CD, OE1, OE2)
C4'	Glu72(CD, OE2)	Arg53(NH1) Water-181 Water-18	Glu72(OE2, CD)	Arg53(NH1) Water-463	Glu72(CD, OE2)	Arg53(NH1) Water-617 Water-621
C5'	Glu72(OE2)		Glu72(OE2) Water-616		Glu72(OE2)	
C6'	Asn62(ND2) Trp69(CB, CG) Water-15	Water-181	Trp69(CB, CG, CD1) Water-616 Water-620 Water-616 Water-619	Water-463	Trp69(CB, CG) Water-561	Water-621
C7	Water-186		Water-390		Water-565	
C9	Water-188 Water-289				Water-449	
Συνολικός αριθμός αλληλεπιδράσεων	36	37	36	35	35	36



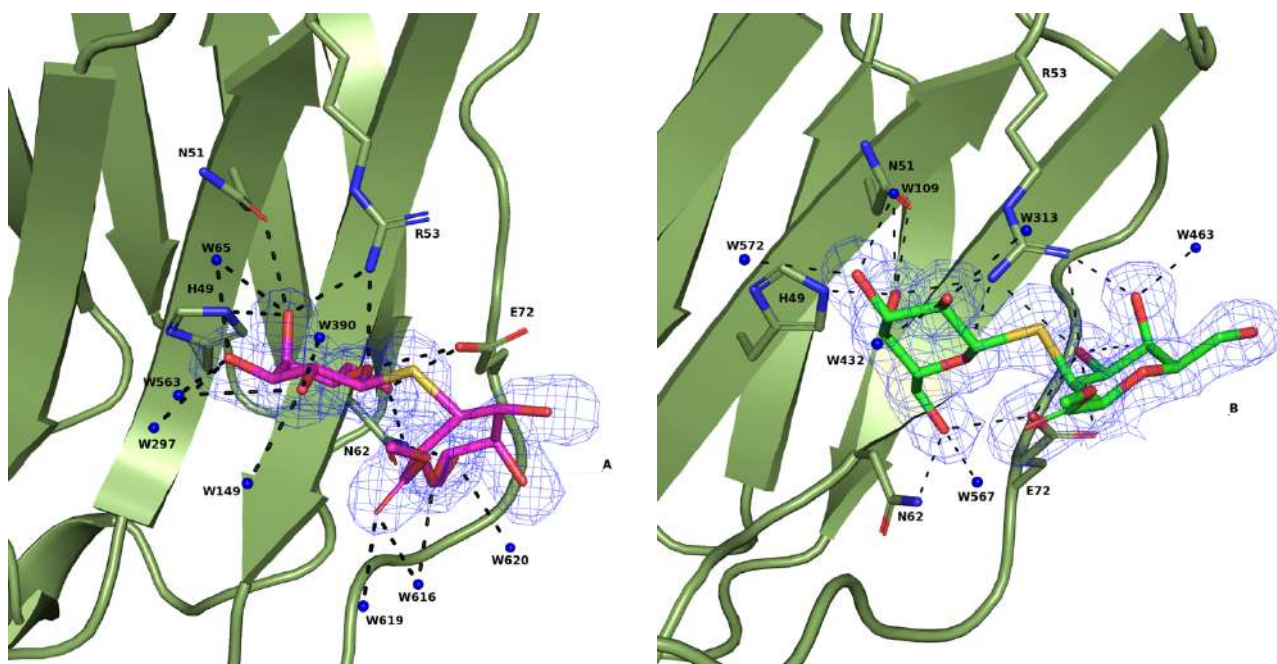
Εικόνα 88: Οι δεσμοί υδρογόνου που σχηματίζονται μεταξύ των ατόμων της **13** (μπλε χρώμα) με τα κατάλοιπα της γαλεκτίνης-7 του μονομερούς A του διμερούς (πράσινο χρώμα). Με πράσινες ράβδους φαίνονται τα συντηρημένα κατάλοιπα της CRD της πρωτεΐνης, με μπλε σφαίρες τα μόρια ύδατος και με διακεκομμένες γραμμές οι δεσμοί υδρογόνου.



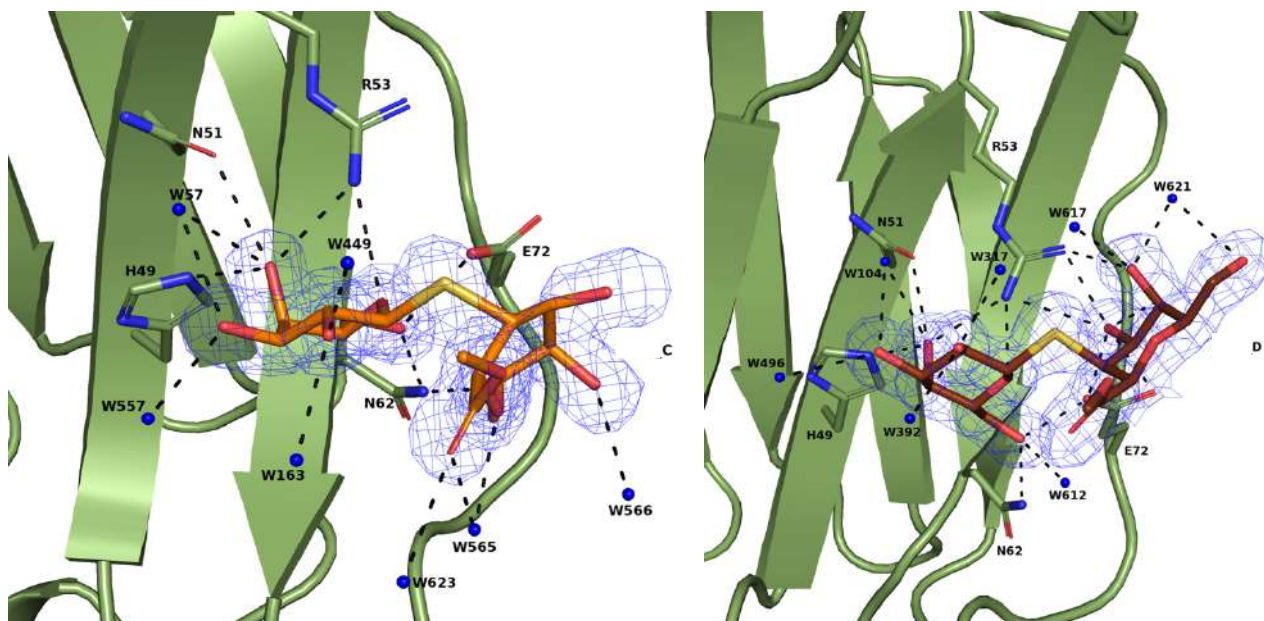
Εικόνα 89: Οι δεσμοί υδρογόνου που σχηματίζονται μεταξύ των ατόμων της **13** (ροζ χρώμα) με τα κατάλοιπα της γαλεκτίνης-7 του μονομερούς B του διμερούς (πράσινο χρώμα). Με πράσινες ράβδους φαίνονται τα συντηρημένα κατάλοιπα της CRD της πρωτεΐνης, με μπλε σφαίρες τα μόρια ύδατος και με διακεκομμένες γραμμές οι δεσμοί υδρογόνου.



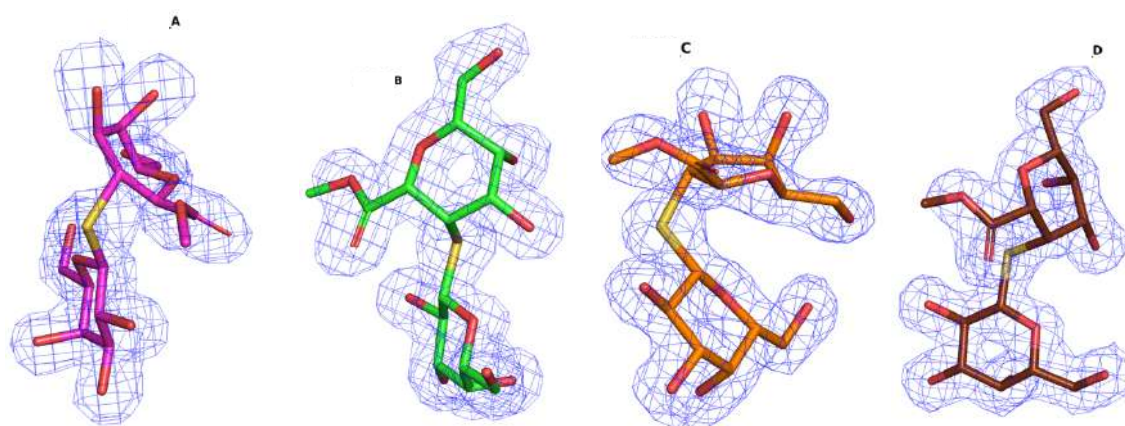
Εικόνα 90: Οι 2Fo-Fc χάρτες που υπολογίστηκαν σε 1.0σ για την πρόσδεση των ενώσεων στα δύο μονομερή της διμερούς γαλεκτίνης-7.



Εικόνα 91: Οι δεσμοί υδρογόνου που σχηματίζονται μεταξύ των ατόμων την ένωσης **13** (ροζ χρώμα για το μονομερές A και πράσινο χρώμα για το B) με τα κατάλοιπα της γαλεκτίνης-7 του ενός διμερούς (πράσινο χρώμα του τετραμερούς). Με πράσινες ράβδους φαίνονται τα συντηρημένα κατάλοιπα της CRD της πρωτεΐνης, με μπλε σφαίρες τα μόρια ύδατος και με διακεκομμένες γραμμές οι δεσμοί υδρογόνου.



Εικόνα 92: Οι δεσμοί υδρογόνου που σχηματίζονται μεταξύ των ατόμων της **13** (πορτοκαλί χρώμα για το μονομερές C και καφέ χρώμα για το D) με τα κατάλοιπα της γαλεκτίνης-7 του δεύτερου διμερούς (πράσινο χρώμα του τετραμερούς). Με πράσινες ράβδους φαίνονται τα συντηρημένα κατάλοιπα της CRD της πρωτεΐνης, με μπλε σφαίρες τα μόρια ύδατος και με διακεκομμένες γραμμές οι δεσμοί υδρογόνου.

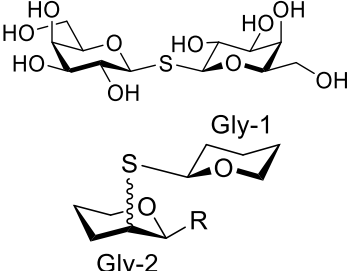


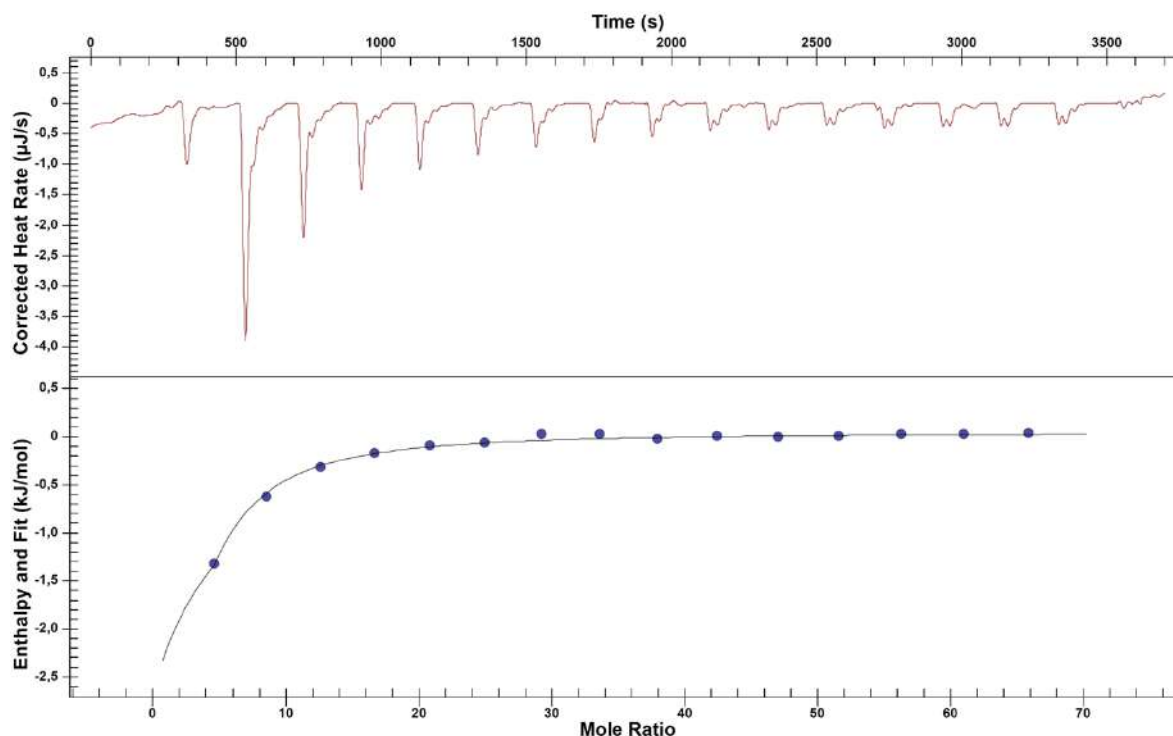
Εικόνα 93: Οι 2Fo-FC χάρτες που υπολογίστηκαν σε 1.0 σ για την πρόσδεση της **13** στα τέσσερα μονομερή της τετραμερούς γαλεκτίνης-7.

Επιπλέον, παρατηρούνται και διαμεσολαβούμενοι από μόρια ύδατος δεσμοί υδρογόνου με τις πλευρικές αλυσίδες των καταλοίπων *Arg31*, *Asn51*, *Glu58*, *Lys64* και *Trp69*, τα οποία συμβάλλουν στη σταθεροποίηση του συμπλόκου. Συνολικά, παρατηρούμε ότι ο δακτύλιος της γαλακτόζης προσδέεται ακριβώς με τον ίδιο τρόπο σε όλα τα μονομερή, σε αντίθεση με το δακτύλιο της πυρανόζης, εμφανίζοντας υψηλότερη συγγένεια και πιθανότητα, υψηλότερη ΔH . Η ένωση **13** προσδέεται πιο ισχυρά στο μονομερές B, του διμερούς και στα μονομερή B και D, του τετραμερούς. Ο δακτύλιος της πυρανόζης είναι πιο ευέλικτος και αυτό αποδεικνύεται από τον τρόπο πρόσδεσης του στο μονομερές A, του διμερούς και στα A και

C του τετραμερούς. Η αλλαγή στη στερεοδιαμόρφωση και στον προσανατολισμό της ένωσης κατά την πρόσδεση υποδεικνύει ότι η ένωση αυτή δεν εμφανίζει υψηλή ειδικότητα ως προς τη γαλεκτίνη-7, αλλά εμφανίζει πιθανότατα μεγαλύτερη συγγένεια έναντι των υπόλοιπων θειοδιασακχαριτών, που δεν προσδέθηκαν. Η TDG εμφανίζει χαμηλή συγγένεια ως προς τη γαλεκτίνη-7, μιας και δεν κατέστη δυνατό να δημιουργηθεί το σύμπλοκο στον κρύσταλλο. Τα πειράματα ITC έγιναν σε θερμοκρασία 25° C, ο όγκος της κυψελίδας ήταν 1038 μ L και της σύριγγας 250 μ L και η ταχύτητα ανάδευσης 170 rpm. Αρχικά, προστέθηκε στο μηχάνημα το ρυθμιστικό διάλυμα (0,1 M Tris-HCl, pH 8,0, 0,3 M NaCl) ως τυφλός μάρτυρας. Η γαλεκτίνη-7 (20 μ M) σε ρυθμιστικό διάλυμα 0,1 M Tris-HCl, pH 8,0, 0,3 M NaCl προστέθηκε στην κυψελίδα. Η TDG (5 mM) ήταν διαλυμένη στο ίδιο ακριβώς ρυθμιστικό διάλυμα, προστέθηκε στην σύριγγα και τιτλοδοτήθηκε στην κυψελίδα που περιείχε την πρωτεΐνη. Η τιτλοδότηση πραγματοποιήθηκε με 16 ενέσεις ανά 150 s. Η ανάλυση των δεδομένων έγινε με το πρόγραμμα NanoAnalyze (TA instruments). Η γαλεκτίνη-7 περιέχει μόνο μια περιοχή πρόσδεσης, επομένως για την εύρεση των θερμοδυναμικών παραμέτρων καθώς και της K_D χρησιμοποιήθηκε το μοντέλο “independent model”. Παρακάτω αναγράφεται η τιμή της K_D και το διάγραμμα του πειράματος ITC, καθώς και η χημική δομή της TDG (Πίνακας 11).

Πίνακας 21: Οι θερμοδυναμικές παράμετροι του συμπλόκου της γαλεκτίνης-7 με την TDG.

Ένωση	Χημική δομή και κρυσταλλογραφική αρίθμηση	ITC			
		K_d (μ M)	ΔH (kJ/mol)	ΔG (kJ/mol)	$-T\Delta S$ (kJ/mol)
TDG	 Η γενική ονομασία των δύο γλυκοζυλικών μονάδων των υπό μελέτη ενώσεων	100,8 $\pm$ 6,8	-15,8 $\pm$ 0,4	-22,4	-6,7



Εικόνα 94: Τα αποτελέσματα ITC του συμπλόκου γαλεκτίνης-7-TDG.

Η ένωση **13** δεν εμφανίζει υψηλή συγγένεια για τη γαλεκτίνη-3, ενώ σε σύγκριση με τις υπόλοιπες υπό μελέτη ενώσεις, εμφανίζει εξειδίκευση ως προς τη γαλεκτίνη-7.

5.9.3 Μελέτες πρόσδεσης C-Γλυκοσιλικών-1,2-Θειοδιασχαριτών στη Γαλεκτίνη-8N-CRD

Οι κρύσταλλοι της γαλεκτίνης-8N-CRD (20 mg/mL) αναπτύχθηκαν στους 16° C, σε συνθήκη 20% (w/v) PEG 4000, 0,1 M Tris- κιτρικό νάτριο, pH 5,6, 20% (v/v) 2- ισοπροπανόλη, Πραγματοποιήθηκε συγκρυστάλλωση των υπό μελέτη ενώσεων, TDG, **13**, **14**, **15** και **17** με τελική συγκέντρωση 1 mM, Η συλλογή των δεδομένων για τα σύμπλοκα στις εγκαταστάσεις συγχροτρονικής ακτινοβολίας EMBL-Hamburg στο σταθμό P13, Ο κάθε κρύσταλλος της N-CRD της γαλεκτίνης-8 λαμβάνεται με την χρήση βρόχου, εμβαπτίζεται σε κρυοπροστατευτικό διάλυμα 30% (v/v) γλυκερόλης, 20% (w/v) PEG 4000, 0,1 M Tris- κιτρικό νάτριο, pH 5,6, 20% (v/v) 2- ισοπροπανόλη, Στον Πίνακα 12 αναγράφονται τα στατιστικά που προέκυψαν από την επεξεργασία των κρυσταλλογραφικών δεδομένων περίθλασης ακτίνων Χ.

Πίνακας 12: Σύνοψη των παραμέτρων της επεξεργασίας των κρυσταλλογραφικών δεδομένων περίθλασης ακτίνων Χ και της διαδικασίας της βελτιστοποίησης για τα σύμπλοκα της γαλεκτίνης-8-N-CRD με τις TDG, **13**, **14** και **15**. Οι τιμές στην παρένθεση αφορούν την εξωτερική στοιβάδα ευκρίνειας.

Σύμπλοκο γαλεκτίνης-8N	TDG	13	14	15
Ομάδα συμμετρίας χώρου			C_{121}	
Διαστάσεις μοναδιαίας κυψελίδας (Å)	59,0, 39,2, 55,7	59,0, 38,6, 56,2	61,4, 40,2, 69,7	59,1, 39,2, 56,4
Ευκρίνεια (Å)	1,71	1,90	1,78	1,90

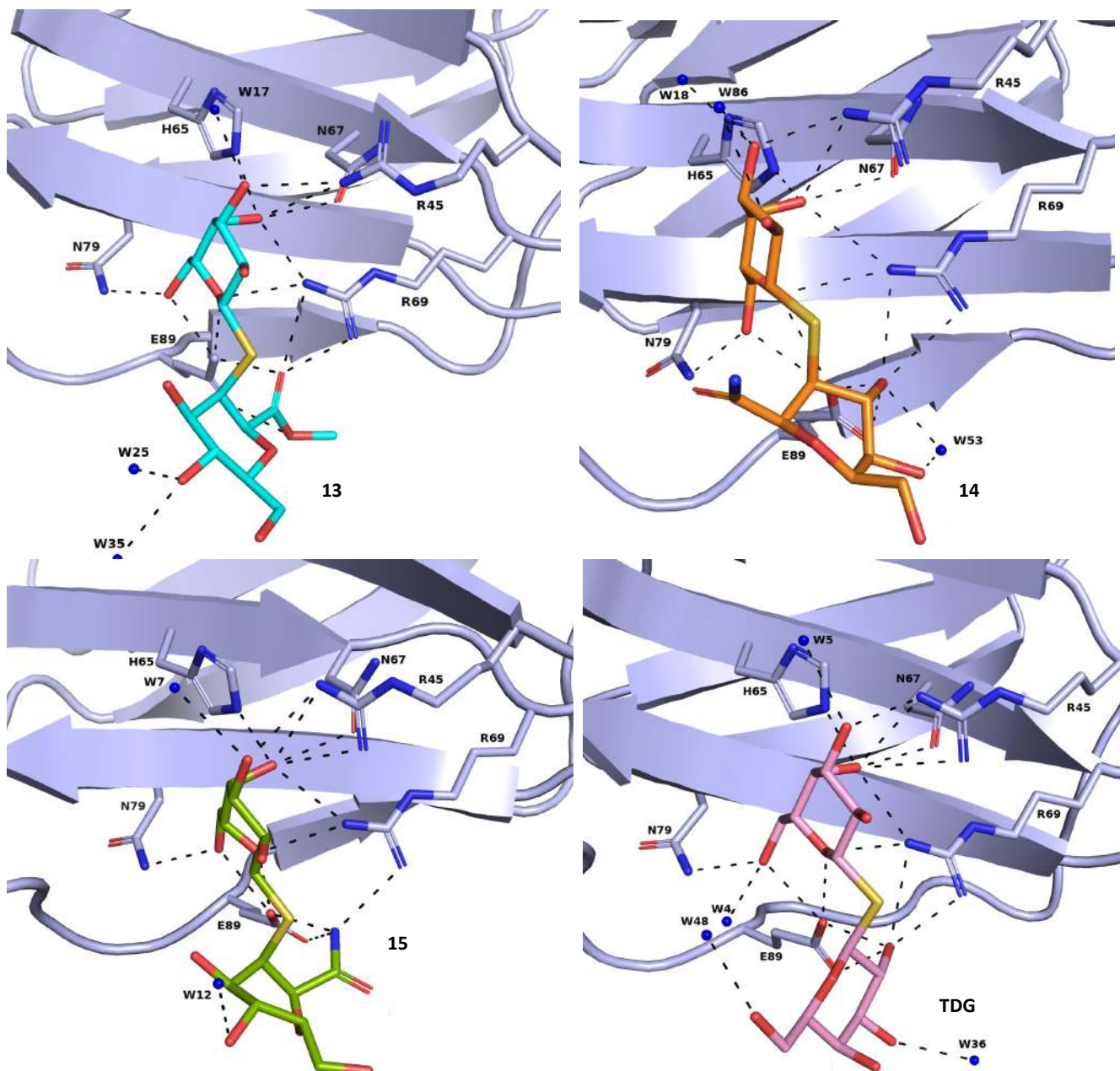
Εξωτερική στοιβάδα (Å)	1,74-1,71	1,94-1,90	1,82-1,78	1,94-1,90
Ανακλάσεις	84703 (3722)	65360 (4322)	100536 (5662)	64861 (4438)
Μοναδικές ανακλάσεις	12509 (573)	9546 (631)	14804 (832)	9497 (643)
R _{merge}	0,214 (1,306)	0,104 (0,596)	0,077 (0,803)	0,188 (2,527)
Πληρότητα (%)	94,2 (84,1)	98,9 (98,6)	99,0 (99,0)	97,1 (96,8)
I/σ(I)	6,0 (2,2)	8,3 (2,6)	11,5 (2,3)	3,1 (0,5)
Πολλαπλότητα	6,8 (6,5)	6,8 (6,8)	6,8 (6,8)	6,8 (6,9)
CC ^{1/2}	0,973 (0,503)	0,994 (0,936)	0,998 (0,797)	0,990 (0,774)
B Wilson (Å ²)	22,9	41,7	29,4	43,0
Ανακλάσεις που χρησιμοποιήθηκαν για τη βελτιστοποίηση	11892	9046	14116	8863
Αριθμός μορίων διαλύτη	76	35	90	55
Αριθμός ατόμων της ένωσης	23	26	25	25
R (%)	22,3	20,1	18,4	24,6
R _{free} (%)	28,7	24,9	24,3	32,4
r.m.s.d. σε μήκη δεσμών (Å)	0,007	0,012	0,009	0,010
r.m.s.d. σε γωνίες δεσμών (°)	1,3	1,8	1,6	1,7
	Μέση τιμή B (Å ²)			
Άτομα πρωτεΐνης	44,5	53,8	42,3	49,9
Μόρια διαλύτη	41,1	49,6	52,2	45,9
Άτομα ένωσης	39,4	67,1	43,3	59,9

Και οι τέσσερις ενώσεις προσδένονται μέσω πρόσδεσης της *Gly-1*, δηλαδή του β-γαλακτοζιτη, στους β-κλώνους *S4*, *S5* και *S6* της *CBS* της γαλεκτίνης-8*N*. Πιο συγκεκριμένα, η ομάδα *O3* δημιουργεί δεσμούς υδρογόνου με το κατάλοιπο *Arg45*, η *O4* με τα κατάλοιπα *Arg45*, *His65*, *Asn67* και *Arg69* και η *O6* με τα *Asn79* και *Glu89*. Αυτό το δομικό μοντέλο πρόσδεσης είναι παρόμοιο με αυτό της γαλακτόζης της λακτόζης και άλλων υδατανθρακικών ενώσεων [104]. Το δεύτερο σάκχαρο, *Gly-2*, εμφανίζει διαφορές ως προς τους δεσμούς υδρογόνου που δημιουργούνται. Πιο συγκεκριμένα, οι ομάδες *O7* και *O8* της **13** σχηματίζουν τέσσερις δεσμούς υδρογόνου με τα κατάλοιπα *Arg69* και *Glu89*, ενώ οι ίδιες ομάδες των υπόλοιπων ενώσεων όχι. Επιπλέον, η *O3'* της **14** δημιουργεί δεσμούς υδρογόνου με τα κατάλοιπα *Arg69* και *Glu89*, ενώ οι υπόλοιπες ενώσεις όχι. Η ομάδα της *N1* της **15** δημιουργεί δεσμούς υδρογόνου με τα κατάλοιπα *Arg69* και *Glu89*, ενώ το ίδιο άτομο της ένωσης **14** δεν δημιουργεί. Τέλος, η ομάδα *O2'* της *TDG* δημιουργεί δεσμούς με τα κατάλοιπα *Arg69* και *Glu89*. Συνολικά οι **13**, **14** και **15** δημιουργούν δεκατρείς δεσμούς υδρογόνου με τα κατάλοιπα της πρωτεΐνης, ενώ η *TDG* δεκατέσσερις (Πίνακας 13 και Εικόνα 95). Αυτές οι διαφορές οφείλονται στο διαφορετικό τρόπο πρόσδεσης της περιοχής *Gly-2* των ενώσεων στη περιοχή πρόσδεσης της πρωτεΐνης (Εικόνα 96).

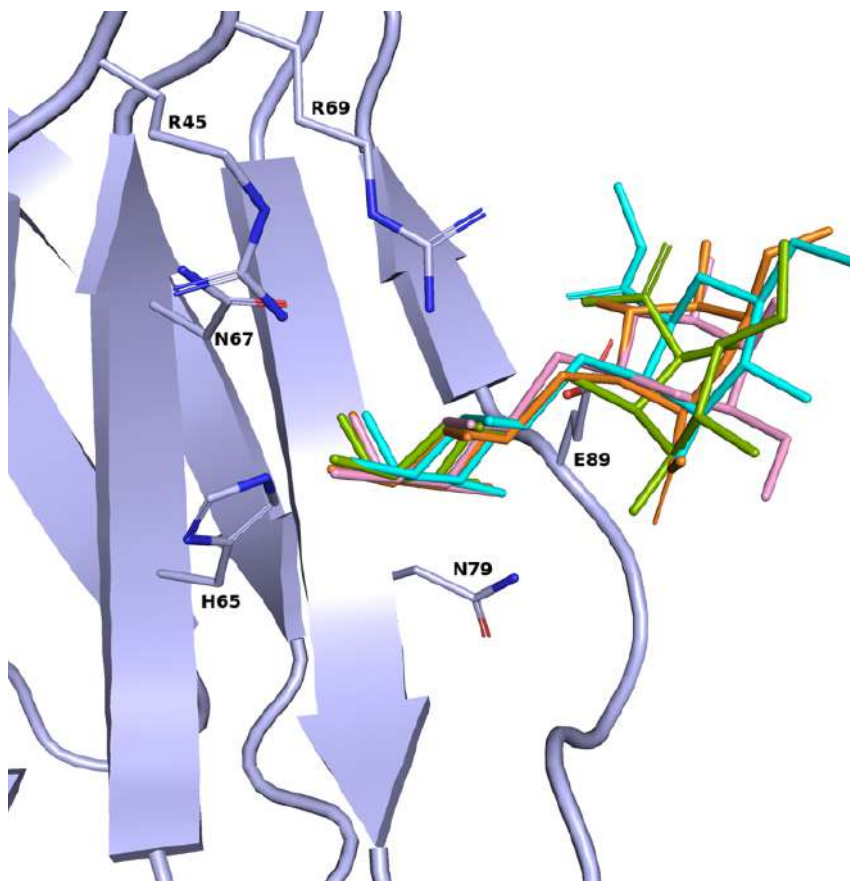
Πίνακας 13: Οι δεσμοί υδρογόνου που δημιουργούνται μεταξύ των ενώσεων με τα κατάλοιπα της γαλεκτίνης-8*N*-CRD και με μόρια ύδατος. Σε παρένθεση είναι η απόσταση σε Å.

Άτομα ένωσης	Κατάλοιπα πρωτεΐνης και μόρια ύδατος			
	13	14	15	TDG
O2		Water-86 (3,1)		
O3	Arg45(NH2) (3,2) Water-17 (2,5)	Arg45(NH2) (2,8) Water-18 (2,8) Water-86 (2,5)	Arg45(NH2) (3,3) Water-7 (2,9)	Arg45(NH2) (2,8) Water-5 (2,8)

O4	Arg45(NH2) (3,2) His65(NE2) (2,9) Arg69(NH2) (2,6) Asn67(OD1) (3,1)	Arg45(NH2) (2,9) His65(NE2) (2,7) Arg69(NH2) (2,9) Asn67(OD1) (3,1)	Arg45(NH1) (3,2) Arg45(NH2) (3,2) His65(NE2) (2,8) Arg69(NH2) (3,0) Asn67(OD1) (3,1)	Arg45(NH1) (3,3) Arg45(NH2) (3,0) His65(NE2) (2,8) Asn67(OD1) (3,1) Arg69(NH2) (2,9)
O5	Arg69(NH2) (2,9) Glu89(OE2) (3,1)	Arg69(NH2) (3,0) Glu89(OE2) (3,3)	Arg69(NH2) (2,9) Glu89(OE2) (3,2)	Arg69(NH2) (2,8) Glu89(OE2) (3,2)
O6	Glu89(OE2) (2,6) Asn79(ND2) (2,8)	Glu89(OE2) (2,7) Asn79(ND2) (2,9)	Glu89(OE2) (2,7) Asn79(ND2) (3,2)	Glu89(OE2) (2,7) Asn79(ND2) (2,9)
O2'				Water-4 (2,9) Arg69(NH1) (2,8) Arg69(NH2) (3,2) Glu89(OE2) (2,5) Glu89(OE1) (3,2) Water-36 (2,6)
O3'		Arg69(NH2) (3,3) Glu89(OE2) (2,5) Glu89(OE1) (3,3) Arg69(NH1) (2,8) Water-53 (2,8)		
O4'	Water-25 (2,4) Water-35 (3,3)	Water-53 (2,6)	Water-12 (3,2)	
O6'				Water-48 (2,7)
O7	Arg69(NH1) (2,6) Arg69(NH2) (3,0) Glu89(OE2) (2,7)			
O8	Glu89(OE1) (2,9)			
N1			Arg69(NH1) (3,0) Glu89(OE1) (3,2) Glu89(OE2) (2,6)	
Συνολικού δεσμοί υδρογόνου	13	13	13	14



Εικόνα 95: Οι δεσμοί υδρογόνου που δημιουργούνται κατά την πρόσδεση των **13**, **14**, **15** και TDG στην CRD της γαλεκτίνης-8-N (μωβ χρώμα). Με ράβδους φαίνονται τα κατάλοιπα της πρωτεΐνης, με μπλε σφαίρες τα μόρια ύδατος και με μαύρες διακεκομμένες γραμμές οι δεσμοί υδρογόνου.



Εικόνα 96: Υπέρθεση των συμπλόκων **13** (μπλε χρώμα), **14** (πορτοκαλί χρώμα), **15** (πράσινο χρώμα) και TDG (ροζ χρώμα). Με μωβ χρώμα φαίνεται η περιοχή πρόσδεσης της γαλεκτίνης-8-N.

Επιπλέον, οι υπό μελέτη ενώσεις δημιουργούν ένα δίκτυο δεσμών υδρογόνου με συντηρημένα μόρια ύδατος. Πιο συγκεκριμένα, η **13** δημιουργεί δεσμό υδρογόνου διαμεσολαβούμενη από μόριο ύδατος με τις πλευρικές αλυσίδες του καταλοίπου *Arg59*, ενώ η **14** με τις πλευρικές αλυσίδες των καταλοίπων *Gln47*, *Arg59* και *Glu89* και η **15** με τις πλευρικές αλυσίδες των καταλοίπων *Gln47* και *Arg59*. Τέλος, η TDG δημιουργεί ένα μεγαλύτερο δίκτυο δεσμών υδρογόνου με συντηρημένα μόρια ύδατος, που πιθανός οφείλεται στη χαμηλότερη ευκρίνεια των δεδομένων περίθλασης, με τα κατάλοιπα *Arg59*, *Gln47*, *Trp86*, *Gly87*, *Arg88*, *Glu89* και *Ile91*.

Η *Gly-1* των ανταγωνιστών δημιουργεί αλληλεπιδράσεις Van der Waals με τις πλευρικές αλυσίδες των καταλοίπων *Arg45*, *His65*, *Asn67*, *Arg69*, *Val77*, *Asn79*, *Trp86* και *Glu89*. Η *Gly-2* δημιουργεί αλληλεπιδράσεις με τα κατάλοιπα *Arg69* και *Glu89*. Επίσης, το S1 της **15** δημιουργεί δύο αλληλεπιδράσεις με τα κατάλοιπα *Arg69* και *Glu89*, ενώ οι υπόλοιπες μόνο με το *Arg69*. Συνολικά, οι ενώσεις **13**, **14**, **15** και TDG σχηματίζουν 42, 43, 38 και 45 αλληλεπιδράσεις Van der Waals, αντίστοιχα (Πίνακας 14).

Πίνακας 14: Οι αλληλεπιδράσεις Van der Waals που δημιουργούνται μεταξύ των ενώσεων με τα κατάλοιπα της γαλεκτίνης-8N-CRD και με μόρια ύδατος.

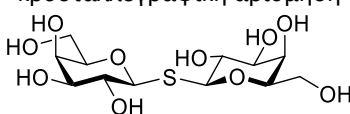
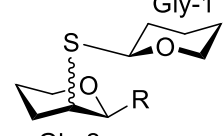
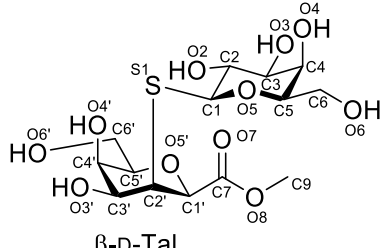
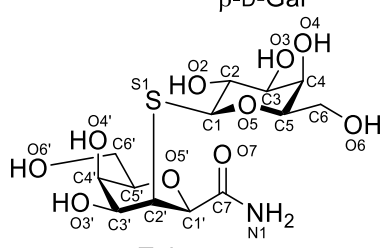
Άτομα ένωσης	Κατάλοιπα πρωτεΐνης και μόρια ύδατος
--------------	--------------------------------------

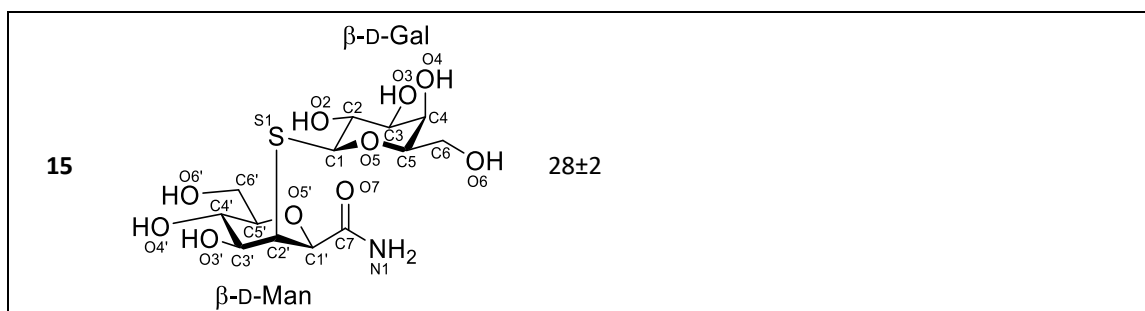
	13	14	15	TDG
O3		Arg45(CZ, NH1)	Arg45(NH1, CZ)	Arg45(CZ)
O4	His65(CE1, CD2) Asn67(CG) Arg69(CZ)	His65(CE1, CD2) Arg45(CZ, NH1) Asn67(CG)	Arg45(CZ) His65(CE1, CD2) Asn67(CG)	Arg45(CZ) His65(CE1, CD2) Asn67(CG)
O5				Water-4
O6	Asn79(CB, CG) Glu89(CG, CD)	Glu89(CG, CD) Asn79(CB, CG) Val77(CG1)	Asn79(CB) Glu89(CG, CD) Val77(CG1)	Glu89(CG, CD) Asn79(CB, CG)
O2'				Arg69(CZ) Glu89(CD)
O3'	Water-25	Arg69(CZ) Glu89(CD)	Water-21	Glu89(OE1) Water-30
O4'				Water-44
O5'	Water-26			Water-4 Water-48
O6'	Water-26			Water-66
O7	Arg69(CZ) Glu89(CD, OE1)		Water-25	
O8	Glu89(OE2, CD) Arg69(NH1)			
N1			Glu89(CD) Arg69(NH2, CZ)	
S1	Arg69(NH2)	Arg69(NH2)	Arg69(NH2) Glu89(OE2)	Arg69(NH2) Water-43
C1'	Glu89(OE2)		Glu89(OE2)	Glu89(OE2) Water-4
C2'	Glu89(OE2)	Glu89(OE2)	Glu89(OE2)	Arg69(NH1) Glu89(OE2, CD)
C3'		Glu89(OE2) Arg69(NH1) Water-53		Water-43 Glu89(CD, OE1, OE2) Water-36
C4'	Water-25 Water-26	Glu89(OE2) Water-53	Water-12	
C5'	Water-26			Water-48 Water-66 Water-4
C6'	Water-26			Water-44 Water-48 Water-66
C1	Arg69(NH2)	Arg69(NH2)	Arg69(NH2)	Arg69(NH2)
C2	Arg69(NH2)	Arg69(NH2) Arg45(NH1) Water-86	Arg45(NH1) Arg69(NH2)	Arg69(NH2) Arg45(NH1)
C3	Trp86(NE1) Water-17	Arg45(NH2) Trp86(NE1) Water-18 Water-86	Trp86(NE1) Water-7 Water-8	Arg45(NH2) Trp86(NE1) Water-5 Water-38
C4	Arg69(NH2) Trp86(NE1, CZ2, CE2) His65(NE2) Water-17	Arg45(NH2) His65(NE2, CE1, CD2) Arg69(NH2) Trp86(NE1, CZ2, CE2)	His65(CE1, NE2) Arg69(NH2) Trp86(CE2, CZ2, NE1)	Arg45(NH2) Arg69(NH2) Trp86(CE2, CZ2, NE1) His65(CE1, NE2)
C5	Arg69(NH2) Glu89(OE2) Trp86(CD1, NE1, CE2)	Arg69(NH2) His65(NE2) Trp86(CD1, NE1, CE2, CD2)	Arg69(NH2) His65(NE2) Trp86(NE1, CE2)	Arg69(NH2) Glu89(OE2) Trp86(CD1, NE1, CE2, CD2)
C6	Glu89(OE2) Arg69(NH2)	Trp86(CD2) His65(NE2, CD2)	Val77(CG1) His65(NE2, CD2)	Water-4 Glu89(OE2) Arg69(NH2)

	His65(NE2, CD2) Asn79(ND2) Val77(CG1)	Asn79(ND2) Glu89(OE2)	Glu89(OE2)	His65(NE2, CD2) Asn79(ND2) Val77(CG1) Trp86(CD2) Water-4
C7	Arg69(NH1) Glu89(OE1, OE2, CD)		Glu89(OE1, OE2) Arg69(NH1) Water-25	
C9	Glu89(OE1) Arg69(NH1)			
Συνολικές αλληλεπιδράσεις	42	43	38	45

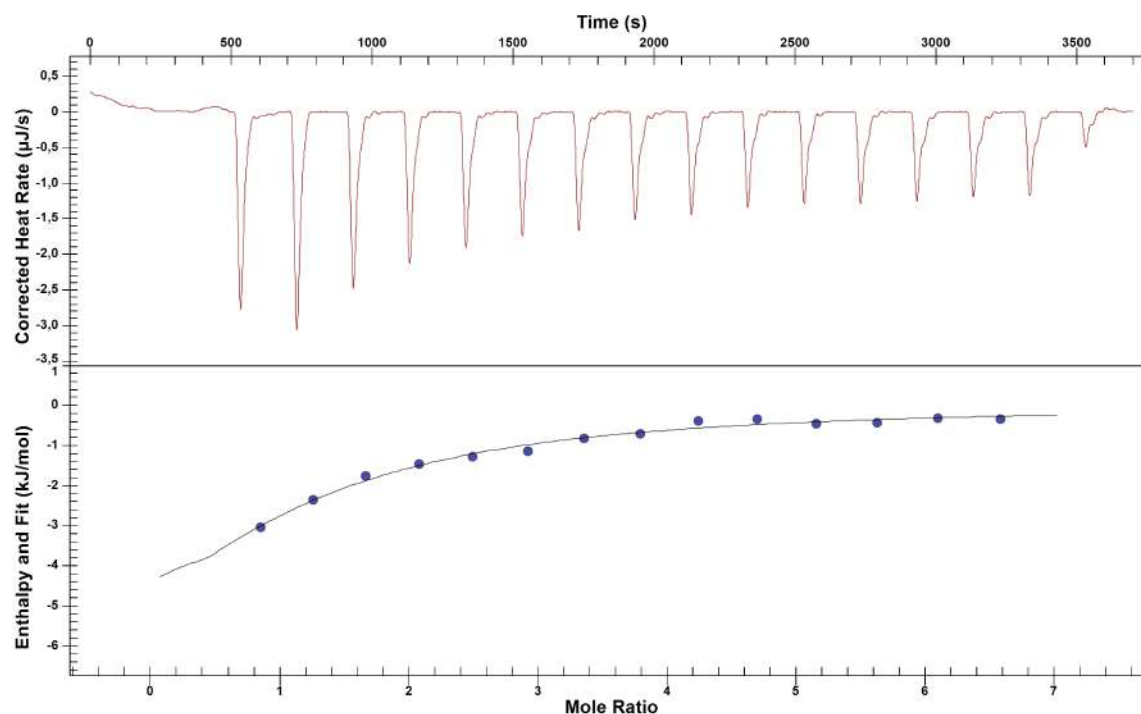
Σύμφωνα με τις μελέτες προσδιορισμού της K_D με φθορισμό (Πίνακας 15) φαίνεται ότι η **15** εμφανίζει τη μεγαλύτερη αγχιστεία για τη γαλεκτίνη-8N-CRD. Με άλλα λόγια, η συγγένεια αυξάνεται με την αλλαγή της στερεοχημικής δομής της *Gly-2*, από *D-talo* σε *D-manno*, ενώ η γαλεκτίνη-3 εμφανίζει μεγαλύτερη συγγένεια ως προς τις *D-talo*.

Πίνακας 15: Οι χημικές δομές και η αρίθμηση των υπό μελέτη ενώσεων. Παράλληλα αναγράφονται και οι τιμές K_D που υπολογίστηκαν με FP για όλα τα σύμπλοκα και με ITC για το σύμπλοκο με την TDG.

Ένωση	Χημική δομή και κρυσταλλογραφική αρίθμηση	FP K_D (μM)	K_D (μM)	ΔH (kJ/mol)	ITC ΔG (kJ/mol)	$-\Delta S$ (kJ/mol)
TDG		61±5	51,1±5,1	-10,3±0,3	-23,9	-13,5
13	Gly-1  Gly-2 Η γενική ονομασία των δύο γλυκοζυλικών μονάδων των υπό μελέτη ενώσεων β-D-Gal  β-D-Tal	37±4				
14	β-D-Gal  β-D-Tal	37±3				



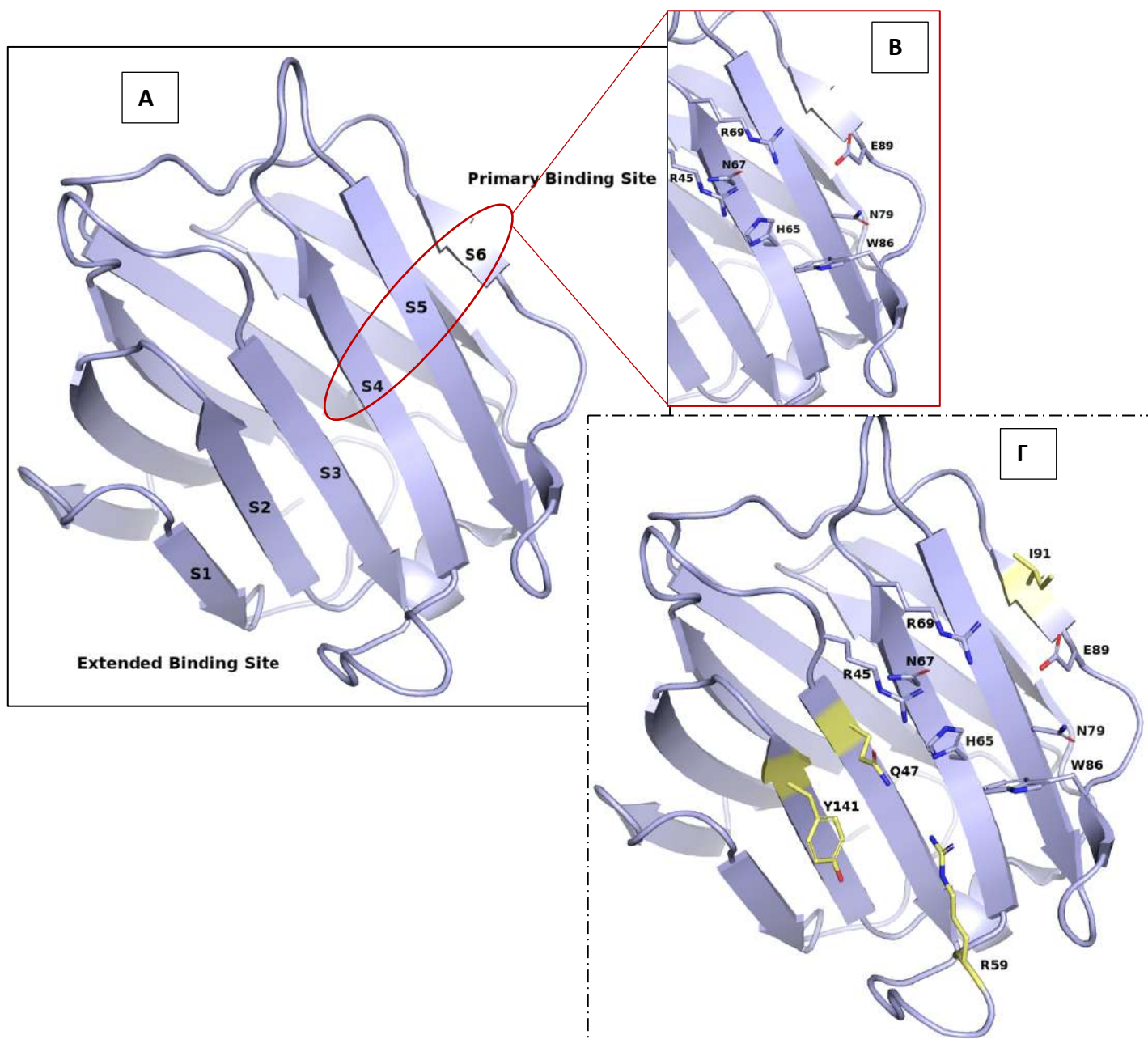
Τα πειράματα ITC έγιναν σε θερμοκρασία 25° C, ο όγκος της κυψελίδας ήταν 1038 μ L και της σύριγγας 250 μ L και η ταχύτητα ανάδευσης 170 rpm. Αρχικά, προστέθηκε στο μηχανήμα το ρυθμιστικό διάλυμα (PBS, pH 7,4) ως τυφλός μάρτυρας. Η γαλεκτίνη-8N (40 μ M) σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS, pH 7,4 προστέθηκε στην κυψελίδα. Η TDG (1 mM) ήταν διαλυμένη στο ίδιο ακριβώς ρυθμιστικό διάλυμα, προστέθηκε στην σύριγγα και τιτλοδοτήθηκε στην κυψελίδα που περιείχε την πρωτεΐνη. Η τιτλοδότηση πραγματοποιήθηκε με 16 ενέσεις ανά 150 δευτερόλεπτα. Η ανάλυση των δεδομένων έγινε με το πρόγραμμα *NanoAnalyze* (TA instruments). Η γαλεκτίνη-8N περιέχει μόνο μια περιοχή πρόσδεσης, επομένως για την εύρεση των θερμοδυναμικών παραμέτρων καθώς και της K_D χρησιμοποιήθηκε το μοντέλο “independent model”. Στον Πίνακα 15 αναγράφεται η τιμή της K_D και το διάγραμμα του πειράματος ITC (Εικόνα 97), καθώς και η χημική δομή της TDG.



Εικόνα 97: Τα αποτελέσματα ITC του συμπλόκου γαλεκτίνης-8N-TDG.

Οι ενώσεις αυτές εμφανίζουν μεγαλύτερη ειδικότητα ως προς τη CRD της γαλεκτίνης-3 έναντι της 8N. Ωστόσο, θα ήταν χρήσιμο να μελετηθούν οι θερμοδυναμικές παράμετροι πρόσδεσης, καθώς σύμφωνα με τα κρυσταλλογραφικά δεδομένα φαίνεται ότι η TDG δημιουργεί περισσότερους δεσμούς και αλληλεπιδράσεις.

Η γαλεκτίνη-8N-CRD εμφανίζει πιο εκτεταμένη περιοχή πρόσδεσης για ολιγοσακχαρίτες. Πιο αναλυτικά, όπως αναφέρθηκε και στο εδάφιο 1.6.2, το μοτίβο αναδίπλωσης είναι καλά συντηρημένο αποτελούμενο από δύο αντιπαράλληλα β-πτυχωτά φύλλα. Η περιοχή πρόσδεσης αποτελείται από τους β-κλώνους S1-S6, όπου οι β-κλώνοι S4-S6 αποτελούνται από τα καλά συντηρημένα κατάλοιπα Arg45, His65, Asn67, Arg69, Asn79, Glu89 και Trp86 τα οποία είναι υπεύθυνα για την αναγνώριση και την πρόσδεση της β-γαλακτόζης. Η περιοχή αυτή χαρακτηρίζεται ως πρωταρχική περιοχή πρόσδεσης, “*primary binding site*”. Οι β-κλώνοι S1-S3 δημιουργούν μια εκτεταμένη περιοχή πρόσδεσης, η οποία εμφανίζει συγγένεια ως προς ολιγοσακχαρίτες και αποτελείται από τα μη συντηρημένα κατάλοιπα Gln47, Arg59, Ile91 και Tyr141. Η περιοχή αυτή ονομάζεται εκτεταμένη περιοχή πρόσδεσης, “*extended binding site*” (Εικόνα 98). Η περιοχή αυτή αναγνωρίζει 3-Ο-θειική και 3-Ο-σιαλική λακτόζη καθώς και λακτοτετραόζη (LNT). Επομένως, θα πρέπει να συντεθούν ενώσεις οι οποίες θα αλληλεπιδρούν με τα κατάλοιπα της εκτεταμένης περιοχής πρόσδεσης με στόχο την αύξηση της ειδικότητας και της συγγένειας ως προς της γαλεκτίνη-8N-CRD [103].



Εικόνα 98: Α. Η τρισδιάστατη δομή της γαλεκτίνης-8-N-CRD. Αναγράφονται οι β-κλώνοι της περιοχής πρόσδεσης και η πρωτεύουσα και η εκτεταμένη περιοχές. Β. Με μπλε χρώμα απεικονίζονται τα καλά συντηρημένα κατάλοιπα της περιοχής πρόσδεσης και με κίτρινα τα μη συντηρημένα κατάλοιπα, τα οποία είναι υπεύθυνα για την ειδικότητα που εμφανίζει η πρωτεΐνη αυτή για ολιγοσακχαρίτες με θειική και σιαλική λακτόζη.

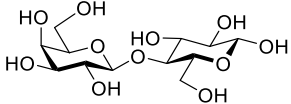
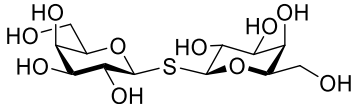
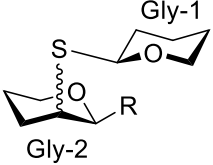
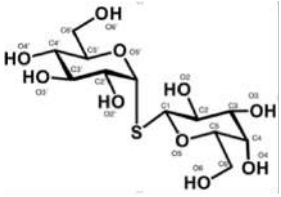
5.10 Μελέτες πρόσδεσης 1,1-Θειοδισακχαρίτη στη Γαλεκτίνη-3-CRD

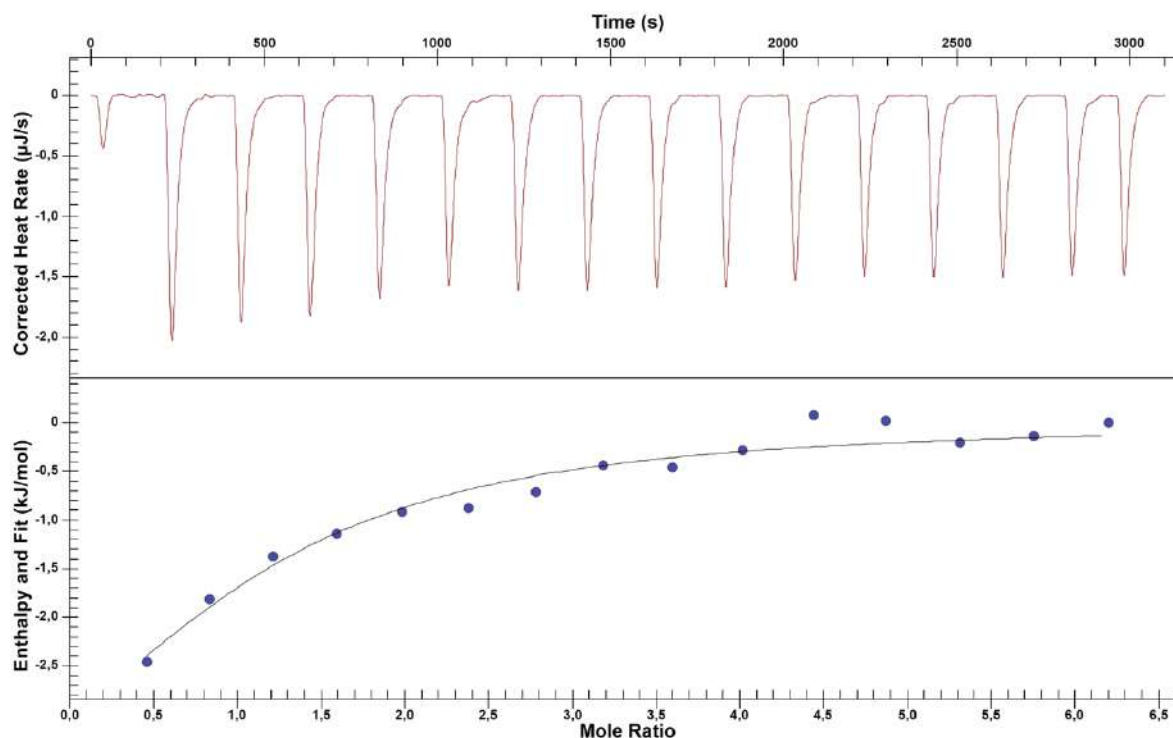
5.10.1. Μελέτες προσδιορισμού των θερμοδυναμικών παραμέτρων και των K_D για το σύμπλοκο του θειοδισακχαρίτη με τη γαλεκτίνη-3-CRD

Τα πειράματα *ITC* έγιναν σε θερμοκρασία 25° C, ο όγκος της κυψελίδας ήταν 1038 μ L και της σύριγγας 250 μ L και η ταχύτητα ανάδευσης 170 *rpm*. Αρχικά, προστέθηκε στο μηχανήμα το ρυθμιστικό διάλυμα (0,1 M *Tris-HCl*, pH 7,5) ως τυφλός μάρτυρας. Η γαλεκτίνη-3-CRD (20

μM) σε ρυθμιστικό διάλυμα 0,1 M *Tris-HCl*, pH 7,5 προστέθηκε στην κυψελίδα. Η υπό μελέτη ένωση ήταν διαλυμένη στο ίδιο ακριβώς ρυθμιστικό διάλυμα (0,1 M *Tris-HCl*, pH 7,5). Η ένωση προστέθηκε στη σύριγγα και τιτλοδοτήθηκε στην κυψελίδα που περιείχε την πρωτεΐνη. Η συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε ήταν 0,5 mM **LL80**. Η τιτλοδότηση πραγματοποιήθηκε με 16 ενέσεις ανά 150 s. Η ανάλυση των δεδομένων έγινε με το πρόγραμμα *NanoAnalyze* (TA instruments). Η γαλεκτίνη-3-CRD περιέχει μόνο μια περιοχή πρόσδεσης, επομένως για την εύρεση των θερμοδυναμικών παραμέτρων καθώς και της K_D χρησιμοποιήθηκε το μοντέλο “*independent model*”. Παρακάτω παρουσιάζονται η K_D και το διάγραμμα του πειράματος *ITC*, καθώς και η χημική δομή της υπό μελέτη ένωσης (Πίνακας 16).

Πίνακας 16: Οι θερμοδυναμικές παράμετροι συμπλόκων της γαλεκτίνης-3-CRD στους 25°

Ένωση	Χημική δομή και κρυσταλλογραφική αρίθμηση	ITC			
		K_D (μM)	ΔH (kJ/mol)	ΔG (kJ/mol)	$-T\Delta S$ (kJ/mol)
Lactose		43,1±4,5	-22,9±1,1	-24,4	-2,03
TDG		44,2±4,6	-19,8±0,9	-24,9	-5,06
	 Η γενική ονομασία των δύο γλυκοζυλικών μονάδων των υπό μελέτη ενώσεων				
LL80		19,2±3,6	-5,5±0,4	-26,9	-21,4



Εικόνα 99: Τα αποτελέσματα ITC του συμπλόκου γαλεκτίνης-3-LL80.

Η τιμή ΔH της πρόσδεσης της **LL80** είναι μεγαλύτερη, σε σύγκριση με της **TDG** και των ενώσεων του εδαφίου 5.9.1.1, κάτι που μπορεί να οφείλεται στις δυνάμεις των δεσμών υδρογόνου του συμπλόκου, ή/και στη σημαντικά διαφορετική θερμοδυναμική ενυδάτωση της μη δεσμευμένης **LL80** έναντι του συμπλόκου. Συνολικά, τα αποτελέσματα μας υποδεικνύουν μια πολύπλοκη θερμοδυναμική συμπεριφορά της πρόσδεσης, που δεν οφείλεται μόνο στους άμεσους δεσμούς υδρογόνου μεταξύ προσδέτη και πρωτεΐνης.

5.10.2 Κρυσταλλογραφικές μελέτες του θειοδιασκαχαρίτη **LL80** με τη Γαλεκτίνη-3-CRD

Οι κρύσταλλοι της γαλεκτίνης-3-CRD εμβαπτίστηκαν με διάλυμα της **LL80** συγκέντρωσης 50 mM, για 2 μέρες. Η συλλογή των κρυσταλλογραφικών δεδομένων περίθλασης ακτίνων Χ για το σύμπλοκο πραγματοποιήθηκε όπως στο εδάφιο 5.9.1.2. Στον Πίνακα 16 αναγράφονται τα στατιστικά στοιχεία που προέκυψαν από την επεξεργασία των δεδομένων.

Πίνακας 16: Σύνοψη των παραμέτρων της επεξεργασίας των δεδομένων περίθλασης και της διαδικασίας της βελτιστοποίησης για το σύμπλοκο της Γαλεκτίνης-3-CRD με την παραπάνω ένωση. Οι τιμές στην παρένθεση αφορούν την εξωτερική στοιβάδα ευκρίνειας.

Σύμπλοκο γαλεκτίνης-3	LL80
Ομάδα συμμετρίας χώρου	$P2_12_12_1$
Διαστάσεις μοναδιαίας κυψελίδας (Å)	35,9, 57,4 62,2
Ευκρίνεια (Å)	1,75
Εξωτερική στοιβάδα (Å)	1,78-1,75
Ανακλάσεις	70247 (3607)
Μοναδικές ανακλάσεις	13646 (738)

R_{merge}	0,083 (0,262)
Πληρότητα (%)	99,9 (100)
$I/\sigma(I)$	11,5 (4,5)
Πολλαπλότητα	5,1 (4,9)
$CC^{1/2}$	0,996 (0,916)
B Wilson ($\text{\AA}^2$)	13,844
Ανακλάσεις που χρησιμοποιήθηκαν για τη βελτιστοποίηση	12985
Αριθμός μορίων διαλύτη	247
Αριθμός ατόμων της ένωσης	23
R (%)	11,9
R_{free} (%)	12,2
r.m.s.d. στο μήκος δεσμών ($\text{\AA}$)	0,010
r.m.s.d. στις γωνίες των δεσμών ($^\circ$)	1,74
Μέση τιμή B ($\text{\AA}^2$)	
Άτομα πρωτεΐνης	11,2
Μόρια διαλύτη	24,7
Άτομα ένωσης	21,4

Η **LL80** αλληλεπιδρά με τις περιοχές *C* και *D* με παρόμοιο τρόπο όπως η *TDG*, δημιουργώντας ένα καλά συντηρημένο δίκτυο δεσμών υδρογόνου. Στον Πίνακα 14 παρουσιάζονται οι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των καταλοίπων της *CRD* της γαλεκτίνης-3 και των ατόμων του ανταγωνιστή. Πιο συγκεκριμένα, η *Gly-1*, προσδένεται στην περιοχή *C*, δημιουργώντας δεσμούς υδρογόνου με τις πλευρικές αλυσίδες των καταλοίπων *His158*, *Asn160*, *Arg162*, *Asn174* και *Glu184* και αλληλεπιδράσεις επιστοίβαξης με την πλευρική αλυσίδα της *Trp181*. Αυτό το δομικό μοντέλο πρόσδεσης είναι παρόμοιο με αυτό της γαλακτόζης της λακτόζης, της *TDG* και άλλων υδατανθρακικών ενώσεων [128, 205].

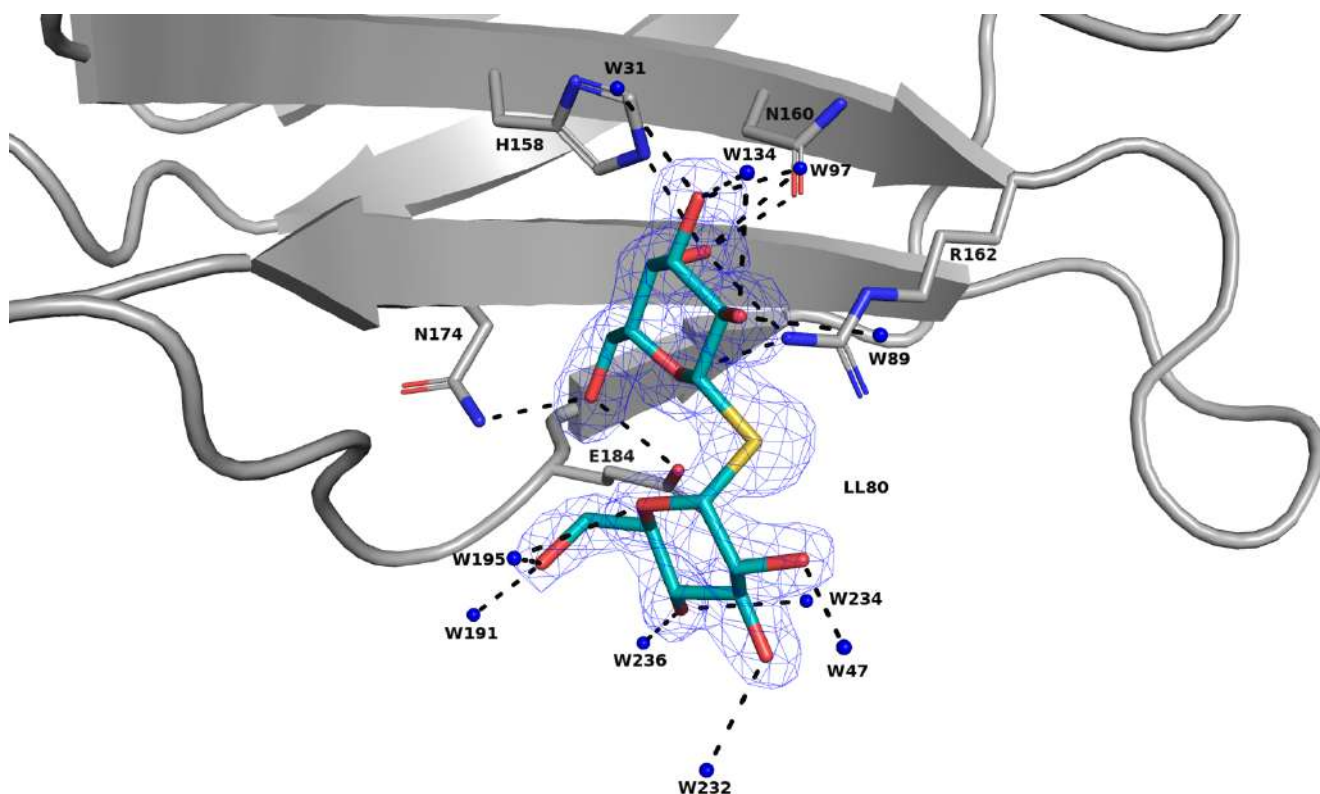
Το δεύτερο σάκχαρο, *Gly-2*, προσδένεται μερικώς στην περιοχή *D* με διαφορετική διαμόρφωση. Τα υδροξύλια του *Gly-2* δεν δημιουργούν δεσμούς υδρογόνου με τα κατάλοιπα της πρωτεΐνης, αλλά με καλά συντηρημένα μόρια ύδατος (Πίνακας 17 και Εικόνα 100). Η **LL80** δημιουργεί 6 δεσμούς υδρογόνου με τα κατάλοιπα της πρωτεΐνης, σε αντίθεση με τις ενώσεις του εδαφίου 5.9. που δημιουργούν 9 με 10. Το γεγονός αυτό αποτελεί σημαντική ένδειξη για τη χαμηλότερη συγγένεια της ένωσης αυτής.

Πίνακας 17: Οι δεσμοί υδρογόνου που αναπτύσσονται μεταξύ της ένωσης **LL80** και των καταλοίπων της *CRD* της Γαλεκτίνης-3. Οι αριθμοί σε παρένθεση είναι η απόσταση σε $\text{\AA}$.

Άτομα ένωσης LL80	Κατάλοιπα πρωτεΐνης και μόρια ύδατος
O2	Water-89 (2,85) Water-134 (3,09)
O3	Water-31 (2,83) Water-97 (2,70) Water-134 (2,85)
O4	His158(NE2) (2,78) Asn160(OD1) (3,01) Arg162(NH2) (2,86) Water-97 (2,90)
O5	Arg162(NH2) (3,05)
O6	Asn174(ND2) (2,90) Glu184(OE2) (2,78)

O2'	Water-47 (2,80)
O3'	Water-232 (2,96)
O4'	Water-234 (2,99)
	Water-236 (2,89)
O5'	Water-195 (3,00)
O6'	Water-191 (2,71)
	Water-195 (2,62)
Συνολικοί δεσμοί υδρογόνου	6

Η *Gly*-1 της **LL80** δημιουργεί αλληλεπιδράσεις *Van der Waals* με τα κατάλοιπα *His*158, *Asn*160, *Arg*162, *Asn*174, *Glu*184 και *Trp*181 (Πίνακας 18). Η *Gly*-2 δημιουργεί αλληλεπιδράσεις *Van der Waals* με τα κατάλοιπα *Trp*181 και *Glu*184, σε αντίθεση με τις ενώσεις του εδαφίου 5.9.1, που δημιουργούν με τα κατάλοιπα *Arg*162 και *Glu*184. Αυτό οφείλεται στη διαφορετική διαμόρφωση της **LL80** κατά την πρόσδεση στην πρωτεΐνη, ενώ οι ενώσεις του εδαφίου 5.9.1 προσδένονται με παρόμοιο τρόπο (Εικόνα 101). Συνολικά, η **LL80** δημιουργεί 32 αλληλεπιδράσεις *Van der Waals* (Πίνακας 18).



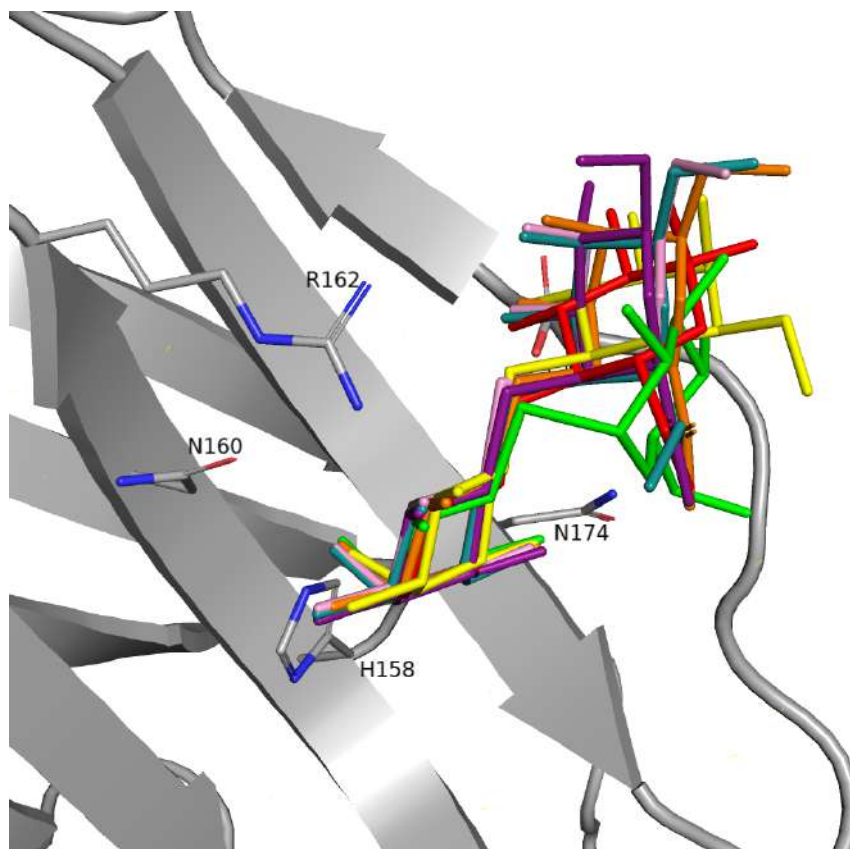
Εικόνα 100: Οι δεσμοί υδρογόνου που δημιουργούνται κατά την πρόσδεση της **LL80** στην CRD της γαλεκτίνης-3 (γκρι χρώμα). Με ράβδους φαίνονται τα κατάλοιπα της πρωτεΐνης, με μπλε σφαίρες τα μόρια ύδατος και με μαύρες διακεκομμένες γραμμές οι δεσμοί υδρογόνου.

Πίνακας 18: Οι αλληλεπιδράσεις *Van der Waals* που αναπτύσσονται μεταξύ της ένωσης **LL80** και των καταλοίπων της CRD της Γαλεκτίνης-3.

Άτομα ένωσης LL80	Κατάλοιπα πρωτεΐνης και μόρια ύδατος Αλληλεπιδράσεις <i>Van der Waals</i> ~4.0
O2	Water-238
O3	Water-238
O4	His158(CE1, CD2)
	Asn160(CG)

O5	Arg162(CZ) Glu184(OE2) Water-1
O6	Glu184(CG, CD) Asn174(CB, CG)
C1	Arg162(NH2)
C2	Arg162(NH2) Water-89 Water-97 Water-134
C3	Trp181(NE1) Water-31 Water-197 Water-134
C4	His158(NE2, CE1, CD2) Trp181(CE2, CZ2) Arg162 (NH2) Water-97
C5	Trp181(CE2, CD2, NE1) Arg162(NH2)
C6	His158(CD2) Asn174(CB, ND2) Arg162(NH2) Glu184(OE2)
S1	Water-1 Water-89
O3'	Water-234
O4'	Glu184(OE2) Water-1 Water-186
O6'	Trp181(CB)
C1'	Water-195
C2'	Water-47
C3'	Water-1 Water-234 Water-232
C4'	Water-1 Water-234
C5'	Glu184(OE2) Water-1 Water-195
C6'	Trp181(CB) Glu184(OE2) Water-191 Water-195
Συνολικές αλληλεπιδράσεις	
32	

Η **LL80** δημιουργεί ένα δίκτυο δεσμών υδρογόνου με καλά συντηρημένα μόρια ύδατος με τις κύριες και πλευρικές αλυσίδες τόσο των καλά συντηρημένων καταλοίπων *His158*, *Asn160*, *Arg162*, *Asn174*, *Glu184* και *Trp181*, όσο και των μη συντηρημένων *Asn143*, *Arg144*, *Asp148*, *Phe163*, *Asn164*, *Asn180*, *Gly182*, *Arg183* και *Ser237*. Διαφορές εμφανίζονται μεταξύ της ένωσης **LL80** και των ενώσεων της ενότητας 5.9.1. Πιο συγκεκριμένα, η **LL80** δεν δημιουργεί δίκτυο δεσμών υδρογόνου με τα κατάλοιπα *Glu165*, *Lys176*, *Gln150*, *Asn153* και *Asn166*. Οι διαφορές αυτές οφείλονται στον τρόπο πρόσδεσης των ενώσεων αυτών (Εικόνα 101).



Εικόνα 101: Απεικόνιση του τρόπου πρόσδεσης της **13** (μπλε χρώμα), της **14** (πορτοκαλί χρώμα), της **15** (μωβ χρώμα), της **17** (ροζ χρώμα), της **LL80** (πράσινο χρώμα), της **TDG** (κίτρινο χρώμα) και της λακτόζης (κόκκινο χρώμα). Με γκρι χρώμα φαίνεται η **CBS** της Γαλεκτίνης-3.

Συμπερασματικά, η ένωση **LL80** προσδένεται στη **CRD** της γαλεκτίνης-3 με παρόμοιο τρόπο, όπως η **TDG** και η λακτόζη. Πιο συγκεκριμένα, η ένωση προσδένεται μέσω της **Gly-1**, στην περιοχή C, δημιουργώντας δεσμούς υδρογόνου με τις πλευρικές αλυσίδες των ατόμων των καταλοίπων **His158**, **Asn160**, **Arg162**, **Asn174** και **Glu184** και αλληλεπιδράσεις επιστοίβαξης με την πλευρική αλυσίδα της **Trp181**. Αντίθετα, η **Gly-2** δεν δημιουργεί δεσμούς υδρογόνου με τα κατάλοιπα της πρωτεΐνης, αλλά με συντηρημένα μόρια ύδατος. Το σύμπλοκο σταθεροποιείται μέσω έξι δεσμών υδρογόνου, 32 αλληλεπιδράσεων *Van der Waals* και 33 αλληλεπιδράσεις διαμεσολαβούμενες από μόρια ύδατος. Η ένωση αυτή παρόλο που δημιουργεί λιγότερους δεσμούς υδρογόνου και αλληλεπιδράσεις *Van der Waals*, εμφανίζει υψηλότερη συγγένεια έναντι της **TDG** και της λακτόζης, γεγονός που οφείλεται κυρίως στο δίκτυο δεσμών υδρογόνου με καλά συντηρημένα μόρια ύδατος με τις κύριες και πλευρικές αλυσίδες τόσο των καλά συντηρημένων καταλοίπων όσο και των μη της **CRD** της γαλεκτίνης-3. Επιπλέον, η **LL80** εμφανίζει χαμηλότερη συγγένεια έναντι των ενώσεων της ενότητας 5.10.1, λόγω διαφορών στον τρόπο πρόσδεσης και στον αριθμό των συνολικών αλληλεπιδράσεων. Επιπρόσθετα, η πρόσδεση της **LL80** εμφανίζει τιμή ΔH υψηλότερη σε σχέση με τους υπόλοιπους 1,2-θειοδισακχαρίτες, κάτι που καθιστά την πρόσδεση λιγότερο ιδανική σε σχέση με τους 4 1,2-θειοδισακχαρίτες, αλλά εμφανίζει διαφορά στην εντροπία του συμπλόκου. Η πρόσδεση της **LL80** εμφανίζει ένα μεγάλο κέρδος εντροπίας που

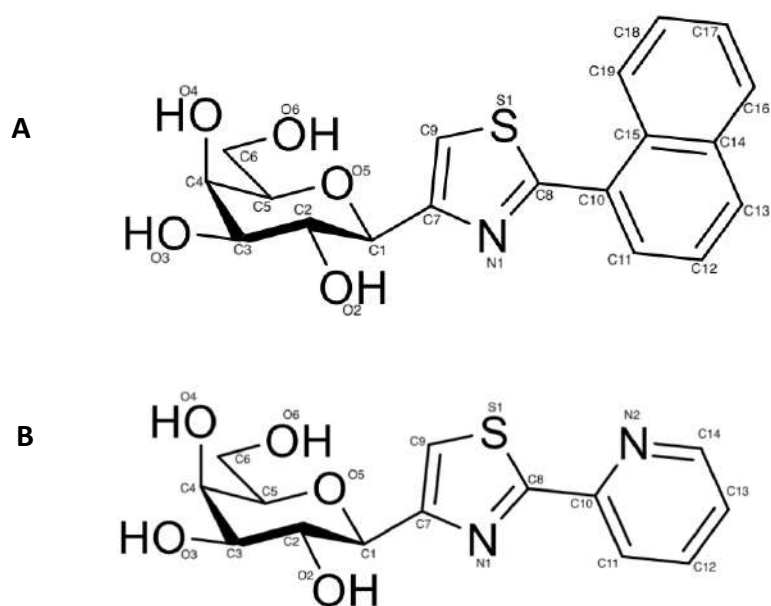
συνοδεύεται από μείωση της ενθαλπίας, λόγω της ενέργειας που απαιτείται για τη διακοπή των μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων. Η πρόσδεση εμφανίζει υψηλό κέρδος εντροπίας που αντισταθμίζει της θετική μεταβολή της ενθαλπίας. Επομένως, η κατηγορία των 1,2-έναντι των 1,1-θειοδισακχαριτών μπορούν να θεωρηθούν καλύτεροι ανταγωνιστές ή μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ενώσεις-οδηγοί, όπου μέσω χημικής τροποποίησης και προσθήκης νέων υποκαταστατών, να δημιουργηθούν ενώσεις που θα εμφανίζουν χαμηλότερη συγγένεια και ειδικότητα έναντι της γαλεκτίνης-3.

5.11 Κρυσταλλογραφικές μελέτες των ενώσεων **KM** με τη Γαλεκτίνη-3-CRD

Οι κρύσταλλοι της γαλεκτίνης-3-CRD εμβαπτίστηκαν σε διαλύματα των ενώσεων **KM191** και **KM192** συγκέντρωσης 5 mM, με 2,5% (v/v) DMSO, για 4 μέρες. Η συλλογή των δεδομένων για το σύμπλοκο με την **KM191** πραγματοποιήθηκε στην πηγή συγχροτρονικής ακτινοβολίας στο EMBL στο Αμβούργο, στο σταθμό P13, ενώ για το σύμπλοκο **KM192** όπως αναφέρθηκε στο εδάφιο 5.9.2. Στον Πίνακα 19 αναγράφονται τα στατιστικά από την επεξεργασία των κρυσταλλογραφικών δεδομένων περίθλασης ακτίνων Χ.

Πίνακας 19: Σύνοψη των παραμέτρων της επεξεργασίας των κρυσταλλογραφικών δεδομένων περίθλασης ακτίνων Χ και της διαδικασίας της βελτιστοποίησης για το σύμπλοκο της γαλεκτίνης-3-CRD με τις ενώσεις **KM191** και **KM192**. Οι τιμές στην παρένθεση αφορούν την εξωτερική στοιβάδα ευκρίνειας.

Σύμπλοκο γαλεκτίνης-3	KM191	KM192
Ομάδα συμμετρίας χώρου	$P2_12_12_1$	$P2_12_12_1$
Διαστάσεις μοναδιαίας κυψελίδας (Å)	35,0, 57,3, 61,8	36,0, 57,8, 62,2
Ευκρίνεια (Å)	1,43	1,90
Εξωτερική στοιβάδα (Å)	1,45-1,43	1,94-1,90
Ανακλάσεις	115730 (2486)	41546 (1547)
Μοναδικές ανακλάσεις	23421 (1000)	10560 (472)
R_{merge}	0,068 (0,358)	0,045 (0,119)
Πληρότητα (%)	99,0 (88,6)	97,9 (70,0)
$I/\sigma(I)$	12,1 (2,7)	17,2 (8,6)
Πολλαπλότητα	4,9 (2,5)	3,9 (3,3)
$CC^{1/2}$	0,994 (0,726)	0,998 (0,967)
B Wilson (Å ²)	20,648	12,085
Ανακλάσεις που χρησιμοποιήθηκαν για τη βελτιστοποίηση	22223	10032
Αριθμός μορίων διαλύτη	144	196
Αριθμός ατόμων της ένωσης	26	22
R (%)	18,1	15,9
R_{free} (%)	22,1	20,7
r.m.s.d. μήκη δεσμών (Å)	0,017	0,005
r.m.s.d. γωνίες δεσμών (°)	2,2	1,3
Μέση τιμή B (Å ²)		
Άτομα πρωτεΐνης	20,8	11,6
Μόρια διαλύτη	30,9	21,7
Άτομα ένωσης	34,0	30,4

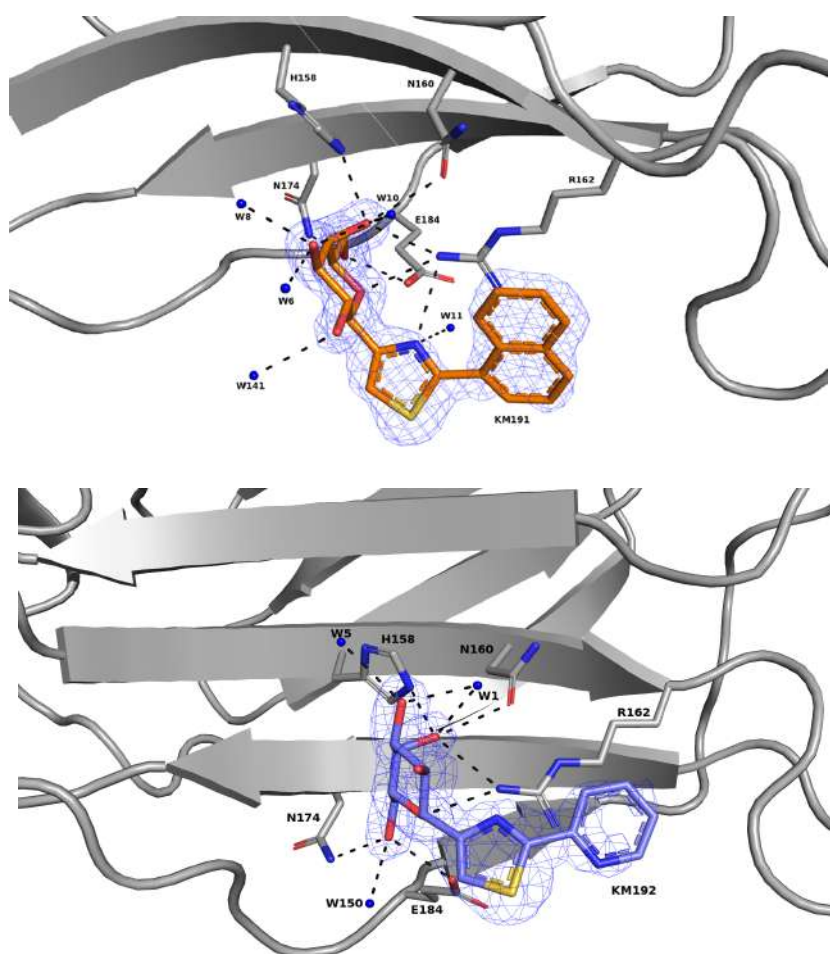


Εικόνα 102: Η χημική δομή των ενώσεων Α. **KM191** Β. **KM192** και η αρίθμηση που χρησιμοποιήθηκε στα κρυσταλλογραφικά πειράματα.

Η πρόσδεση των ενώσεων γίνεται πρωτίστως με τη σύνδεση του β-γαλακτοζίτη στις περιοχές C και D της CBS της γαλεκτίνης-3. Στον Πίνακα 20 αναγράφονται οι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ της CRD της γαλεκτίνης-3 και των ατόμων των ενώσεων. Ο τρόπος πρόσδεσης του δακτυλίου του β-γαλακτοζίτη γίνεται με παρόμοιο τρόπο όπως παρατηρήθηκε και στην προηγούμενη ενότητα. Πιο συγκεκριμένα, σχηματίζονται δεσμοί υδρογόνου με τα καλά συντηρημένα κατάλοιπα *His158*, *Asn160*, *Arg162*, *Asn174* και *Glu184*. Οι διαφορές που παρατηρούνται βρίσκονται στους δεσμούς υδρογόνου που δημιουργούνται μεταξύ συντηρημένων μορίων υδάτων. Η ένωση **KM191** δημιουργεί δύο παραπάνω δεσμούς υδρογόνου με συντηρημένα μόρια ύδατος μέσω της O2 και της O3 (Πίνακας 20).

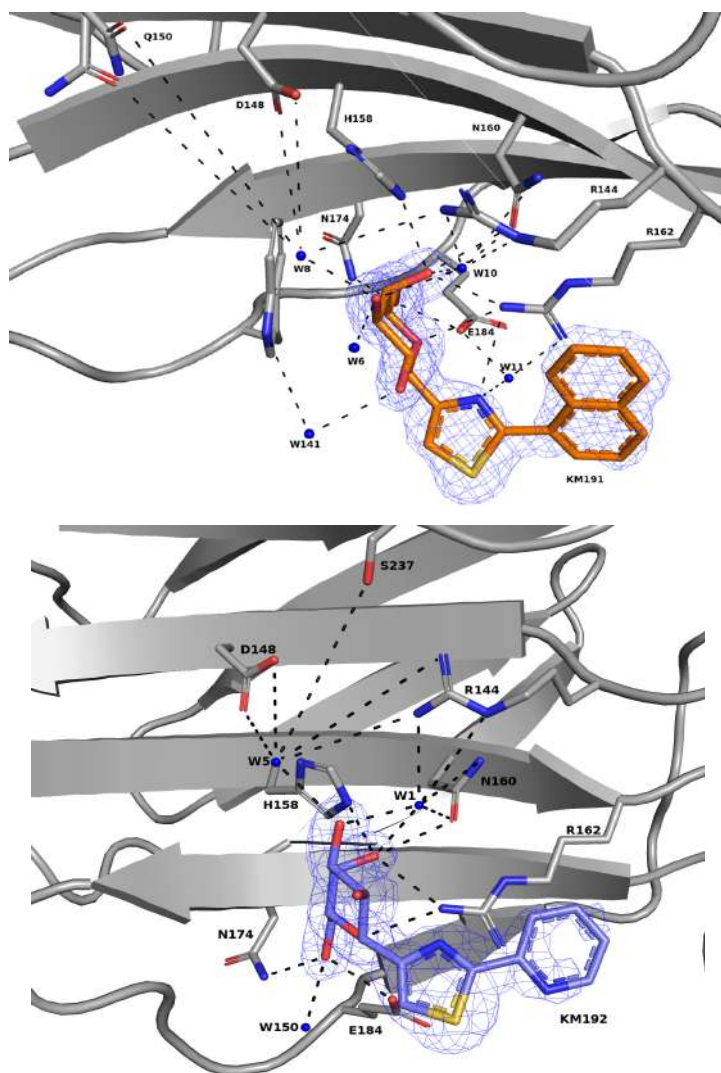
Πίνακας 20: Οι δεσμοί υδρογόνου που αναπτύσσονται μεταξύ των ενώσεων **KM191** και **KM192** και των καταλοίπων της CRD της γαλεκτίνης-3. Σε παρένθεση η απόσταση σε Å.

Άτομα ένωσης	Κατάλοιπα πρωτεΐνης και μόρια ύδατος	
	KM191	KM192
O2	Water-141 (3,1)	
O3	Water-8 (2,7)	Water-1 (2,6)
	Water-6 (3,3)	Water-5 (2,8)
	Water-10 (2,8)	
	Water-10 (3,0)	
O4	His158(NE2) (2,7)	His158(NE2) (2,7)
	Asn160(OD1) (3,1)	Asn160(OD1) (3,1)
	Arg162(NH2) (2,9)	Arg162(NH2) (2,9)
	Water-10 (3,0)	Water-1 (2,7)
O5	Arg162(NH2) (3,0)	Arg162(NH2) (2,9)
O6	Asn174(ND2) (2,9)	Asn174(ND2) (2,9)
	Glu184(OE2) (2,6)	Glu184(OE2) (2,7)
		Water-150 (3,1)
N1	Arg162(NH2) (3,2)	Arg162(NH2) (2,9)
	Water-11 (3,3)	



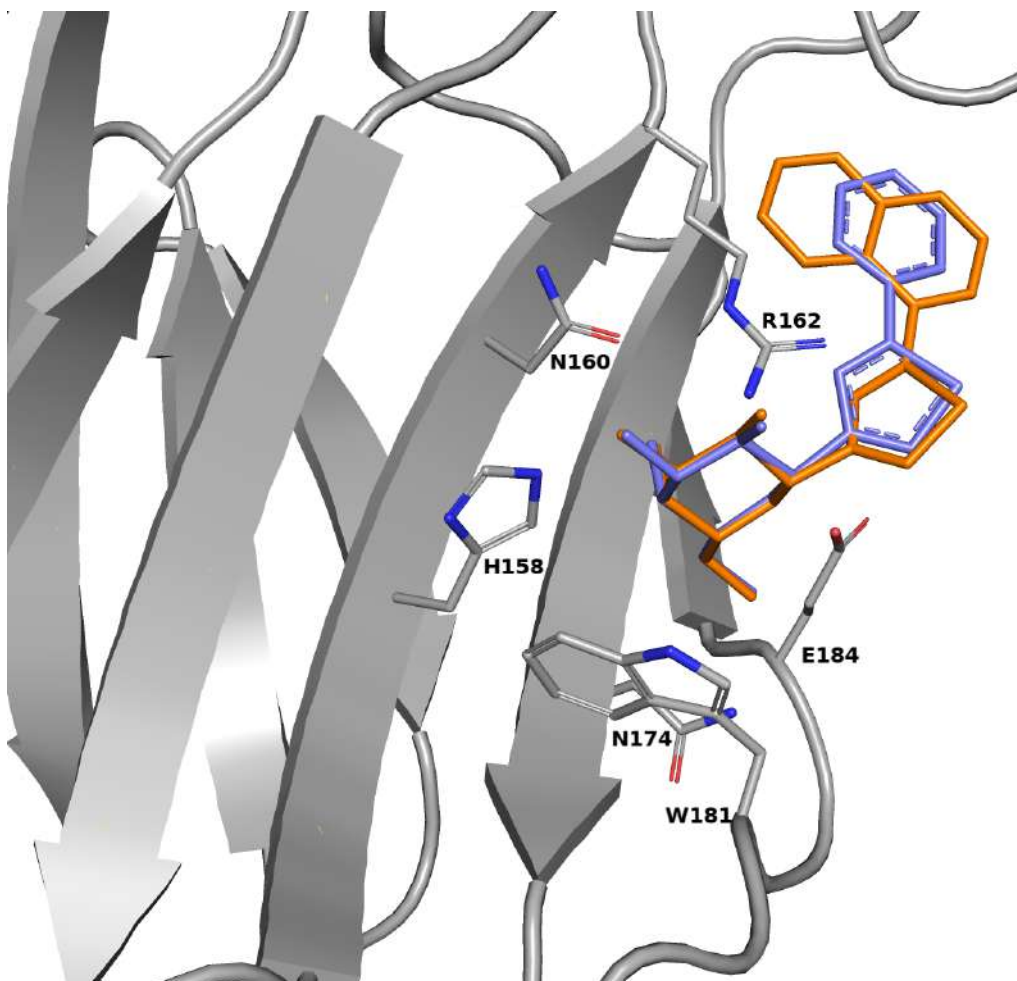
Εικόνα 103: Οι δεσμοί υδρογόνου που δημιουργούνται κατά την πρόσδεση Α. της **KM191** και Β. **KM192** στην CRD της Γαλεκτίνης-3. Με διακεκομμένες γραμμές απεικονίζονται οι δεσμοί υδρογόνου και ως μπλε σφαίρες αναπαρίστανται τα μόρια ύδατος. Παρουσιάζονται οι χάρτες 2Fo-Fc για των ενώσεων. Ο χάρτης ήταν προσαρμοσμένος σε 1.0 σ πριν την ενσωμάτωση των μορίων των ενώσεων στη διαδικασία της βελτιστοποίησης.

Στα δύο σύμπλοκα, μόρια ύδατος διαμεσολαβούν αλληλεπιδράσεις μέσω δεσμών υδρογόνου. Πιο συγκεκριμένα, στο σύμπλοκο της **KM191** τρία μόρια ύδατος διαμεσολαβούν αλληλεπιδράσεις μεταξύ του β-γαλακτοζίτη και των καταλοίπων της πρωτεΐνης *Trp181*, *Arg144*, *Asp148*, *Gln150* και *Asn160*, ενώ ένα μόριο ύδατος διαμεσολαβεί αλληλεπιδράσεις με την ομάδα *N1* του προσδέτη και τα κατάλοιπα *Arg162* και *Glu184*. Αντίθετα, στο σύμπλοκο της **KM192** δύο μόρια ύδατος διαμεσολαβούν αλληλεπιδράσεις μέσω δεσμών υδρογόνου μεταξύ του β-γαλακτοζίτη και των καταλοίπων *Arg144*, *Asp148*, *Asn160* και *Ser237* (Εικόνα 104). Κατά την πρόσδεση της η **KM191** δημιουργεί έντεκα αλληλεπιδράσεις δεσμών υδρογόνου διαμεσολαβούμενες από μόρια ύδατος, ενώ η **KM192** εννέα. Ωστόσο, η πρόσδεση της **KM191** σταθεροποιείται μέσω δύο αλληλεπιδράσεων του *N1* με τα κατάλοιπα της πρωτεΐνης, κάτι που δεν παρατηρείται στο σύμπλοκο **KM192**. Αντίθετα, η πρόσδεση της **KM192** δημιουργεί αλληλεπίδραση μεταξύ της *O3* του β-γαλακτοζίτη με το κατάλοιπο της *Ser237*, κάτι που δεν παρατηρείται κατά την πρόσδεση της **KM191**.



Εικόνα 104: οι δεσμοί υδρογόνου και οι αλληλεπιδράσεις μέσω δεσμών υδρογόνου μέσω των συντηρημένων μορίων υδάτων που δημιουργούνται κατά την πρόσδεση των **KM191** και **KM192** στην CRD της γαλεκτίνης-3. Με διακεκομμένες γραμμές απεικονίζονται οι δεσμοί υδρογόνου και ως μπλε σφαίρες αναπαρίστανται τα μόρια ύδατος. Παρουσιάζονται οι χάρτες 2Fo-Fc για των ενώσεων. Ο χάρτης ήταν προσαρμοσμένος σε 1.0 σ πριν την ενσωμάτωση των μορίων των ενώσεων στη διαδικασία της βελτιστοποίησης.

Η υπέρθεση των δύο συμπλόκων δείχνει ότι ο β-γαλακτοζίτης της κάθε ένωσης προσδένεται ακριβώς με τον ίδιο τρόπο, ενώ ο υπόλοιπος συνδέτης με διαφορετικό προσανατολισμό (Εικόνα 105).



Εικόνα 105: Υπέρθεση των δύο συμπλόκων. Με γκρι χρώμα φαίνεται η CRD της γαλεκτίνης-3, με πορτοκαλί χρώμα η ένωση **KM191** και με μωβ χρώμα η **KM192**. Στην εικόνα απεικονίζονται τα καλά συντηρημένα κατάλοιπα της CBS της γαλεκτίνης-3.

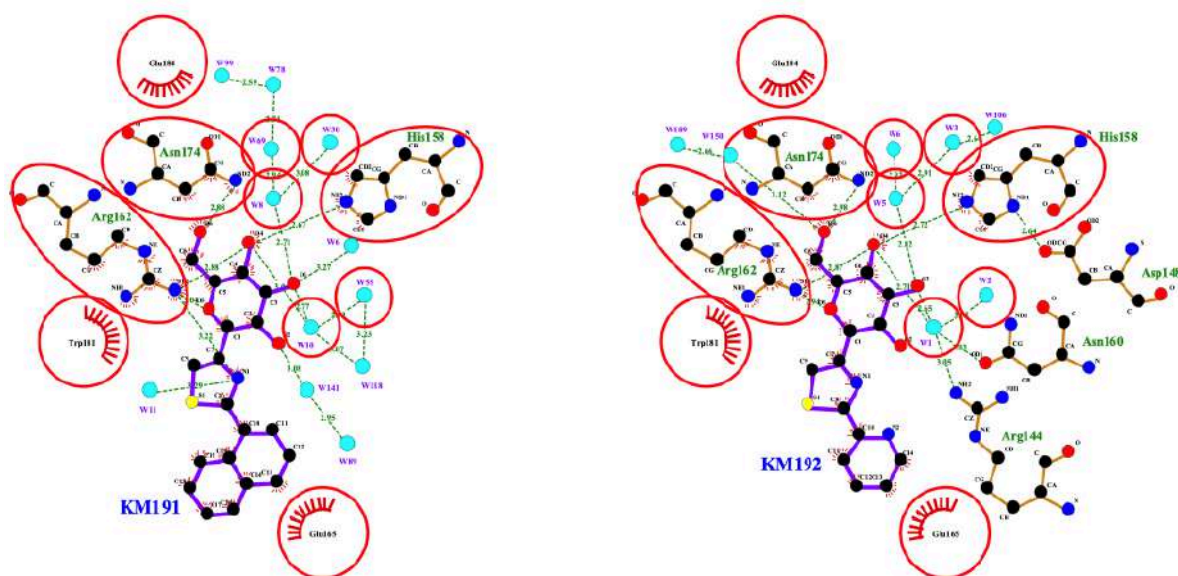
Ο β-γαλακτοζίτης των **KM191** και **KM192** δημιουργεί 27 και 30 αλληλεπιδράσεις *Van der Waals* (Πίνακας 21), αντίστοιχα, με τα καλά συντηρημένα κατάλοιπα *His158*, *Asn160*, *Arg162*, *Asn174*, *Trp181* και *Glu184*. Ο δακτύλιος του 4-θειαζολίου προσδένεται με παρόμοιο τρόπο αλλά διαφορετικό προσανατολισμό. Η πρόσδεση της **KM191** σχηματίζει τέσσερις αλληλεπιδράσεις, ενώ η πρόσδεση της **KM192** έξι αλληλεπιδράσεις *Van der Waals* με τις πλευρικές αλυσίδες της *Arg162*. Η ομάδα του ναφθαλενίου της **KM191** δημιουργεί 16 αλληλεπιδράσεις *Van der Waals* με τις πλευρικές αλυσίδες των *Arg162* και *Glu165*, συγκριτικά με την ομάδα της πυριδίνης της **KM192** η οποία δημιουργεί 12 αλληλεπιδράσεις με τις πλευρικές αλυσίδες των ίδιων καταλοίπων. Επιπλέον, το N2 της ομάδας της πυριδίνης της **KM192** σχηματίζει δύο αλληλεπιδράσεις *Van der Waals* με τις πλευρικές αλυσίδες των *Arg162* και *Glu165*. Λόγω των αλληλεπιδράσεων αυτών η ένωση **KM194**, που αντί για ομάδα πυριδίνης περιέχει ομάδα φαινυλίου, δεν εμφανίζει συγγένεια έναντι της γαλεκτίνης-3.

Πίνακας 21: Οι αλληλεπιδράσεις *Van der Waals* που αναπτύσσονται μεταξύ των ενώσεων **KM191** και **KM192** και των καταλοίπων της CRD της Γαλεκτίνης-3.

Άτομα ένωσης	Κατάλοιπα πρωτεΐνης και μόρια ύδατος
	KM191 KM192

O2	Water-6	
	Water-118	
O3	His158(NE2)	
O4	His158(CE1)	His158(CE1, CD2)
	Asn160(CG)	Asn160(CG)
O5	Glu184(OE2)	Glu184(OE2)
	Water-11	Water-92
		Water-150
O6	Asn174(CB, CG)	Asn174(CB, CG)
	Glu184(CG, CD)	Glu184(CG, CD)
C1	Arg162(NH2)	Arg162(NH2)
		Water-150
C2	Arg162(NH2)	Arg162(NH2)
	Water-10	Water-1
	Water-141	
C3	Trp181(NE1)	Trp181(NE1, CE2)
	Water-8	Water-1
	Water-10	Water-5
C4	His158(CE1, NE2, CD2)	His158(CE1, NE2, CD2)
	Trp181(CE2, CZ2)	Trp181(CE2, CZ2, NE1)
	Arg162 (NH2)	Arg162 (NH2)
	Water-10	Water-1
C5	Trp181(CE2, CD2, NE1)	Trp181(CE2, CD1, CD2, CG, NE1)
	Arg162(NH2)	Arg162(NH2)
		Water-150
C6	His158(CD2)	His158(CD2)
	Trp181(CD2, CE3)	Trp181(CD2)
	Asn174(ND2)	Asn174(ND2)
	Arg162(NH2)	Arg162(NH2)
	Glu184(OE2)	Glu184(OE2)
C7	Arg162(NH2)	Arg162(NH2)
	Water-11	Water-92
C8	Arg162(NH1)	Arg162(CZ, NH1, NH2)
	Water-11	Water-92
C9		Water-92
C10	Arg162(NH1)	Arg162(CZ, NH1)
	Water-11	
C11		Arg162(NE, CZ, NH1)
C12		Arg162(CD, NH1)
C13	Glu165(CG)	Glu165(CG)
C14	Arg162(NH1)	Glu165(CG, OE2)
C15	Arg162(CZ, NH1)	
C16	Arg162(CD)	
	Water-39	
C17	Arg162(CG, CD, NE)	
	Water-39	
	Water-55	
C18	Arg162(CZ, CD, NE)	
	Water-55	
	Water-118	
C19	Arg162(CZ, NH1, NH2, NE)	
	Water-55	
	Water-118	
N1	Arg162(NH1, CZ)	Arg162(CZ, NH1)
		Water-92
N2		Arg162(NH1)
		Glu165(OE2)
S1		Water-92
Συνολικές αλληλεπιδράσεις	47	48

Συμπερασματικά, παρόλο που η **KM191** δημιουργεί περισσότερες διαμεσολαβούμενες από μόρια ύδατος αλληλεπιδράσεις από την **KM192**, οι ενώσεις αυτές δημιουργούν ίδιο αριθμό δεσμών υδρογόνου και η **KM192** μία περισσότερη αλληλεπίδραση *Van der Waals*. όπως παρουσιάζεται και στην Εικόνα 48 η πρόσδεση και των δύο ενώσεων σταθεροποιείται με παρόμοιο τρόπο. Η εύρεση της τιμής K_D της κάθε ένωσης και η μελέτη των θερμοδυναμικών παραμέτρων θα δώσουν απαντήσεις ως προς την ειδικότητα καθώς και τον τρόπο δημιουργίας του συμπλόκου. Ωστόσο, και οι δύο ενώσεις θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως ενώσεις-οδηγοί για το σχεδιασμό νέων εν δυνάμει πιο ειδικών ανταγωνιστών για τη γαλεκτίνη-3.



Εικόνα 107: Διαγράμματα LigPlot για τα σύμπλοκα της γαλεκτίνης-3-CRD με την **KM191** και **KM192**. Οι δεσμοί υδρογόνου απεικονίζονται με πράσινες διακεκομμένες γραμμές ενώ τα κόκκινα τόξα απεικονίζουν τα κατάλοιπα που συμμετέχουν σε αλληλεπιδράσεις *van der Waals* με τα άτομα της κάθε ένωσης. Οι κόκκινοι κύκλοι και ελλείψεις αναδεικνύουν τα κατάλοιπα που βρίσκονται σε ισοδύναμες θέσεις και στα δύο σύμπλοκα.

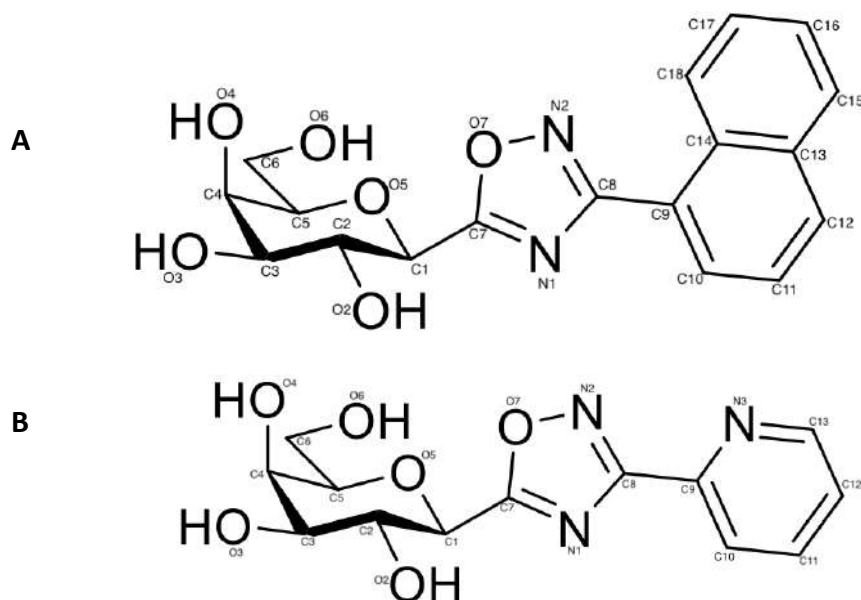
5.12 Κρυσταλλογραφικές μελέτες των ενώσεων **HA** και **KISZ** με τη Γαλεκτίνη-3-CRD

5.12.1 Κρυσταλλογραφικές μελέτες των ενώσεων **HA** με τη Γαλεκτίνη-3-CRD

Οι κρύσταλλοι της γαλεκτίνης-3-CRD εμβαπτίστηκαν με διαλύματα των **HA087** και **HA088** συγκέντρωσης 16 mM, σε 8% (v/v) **DMSO**, για 4 μέρες. Η συλλογή των κρυσταλλογραφικών δεδομένων περίθλασης ακτίνων Χ πραγματοποιήθηκε όπως αναφέρθηκε στο εδάφιο 5.9.2. Στον Πίνακα 22 αναγράφονται τα στατιστικά που προέκυψαν από την επεξεργασία των δεδομένων.

Πίνακας 22: Σύνοψη των παραμέτρων της επεξεργασίας των δεδομένων περίθλασης και της διαδικασίας της βελτιστοποίησης για το σύμπλοκο της Γαλεκτίνης-3-CRD με τις ενώσεις **HA087** και **HA088**. Οι τιμές στην παρένθεση αφορούν την εξωτερική στοιβάδα ευκρίνειας.

Σύμπλοκο γαλεκτίνης-3	HA087	HA088
Ομάδα συμμετρίας χώρου	$P2_12_12_1$	$P2_12_12_1$
Διαστάσεις μοναδιαίας κυψελίδας (Å)	36,1, 57,9, 62,6	36,1, 57,8, 62,4
Ευκρίνεια (Å)	1,93	1,90
Εξωτερική στοιβάδα (Å)	1,98-1,93	1,95-1,90
Ανακλάσεις	39800 (2610)	79874 (3791)
Μοναδικές ανακλάσεις	10385 (683)	10719 (654)
R_{merge}	0,024 (0,053)	0,029 (0,099)
Πληρότητα (%)	99,9 (100)	99,5 (92,4)
$I/\sigma(I)$	35,2 (19,4)	44,4 (17,5)
Πολλαπλότητα	3,8 (3,8)	7,5 (5,8)
$CC^{1/2}$	0,999 (0,995)	1,000 (0,991)
B Wilson (Å ²)	12,074	14,123
Ανακλάσεις που χρησιμοποιήθηκαν για τη βελτιστοποίηση	9870	10185
Αριθμός μορίων διαλύτη	250	233
Αριθμός ατόμων της ένωσης	26	22
R (%)	14,2	14,9
R_{free} (%)	19,9	18,4
r.m.s.d. μήκη δεσμών (Å)	0,007	0,007
r.m.s.d. γωνίες δεσμών (°)	1,4	1,4
Μέση τιμή B (Å ²)		
Άτομα πρωτεΐνης	11,2	13,2
Μόρια διαλύτη	23,0	24,7
Άτομα ένωσης	25,8	46,1

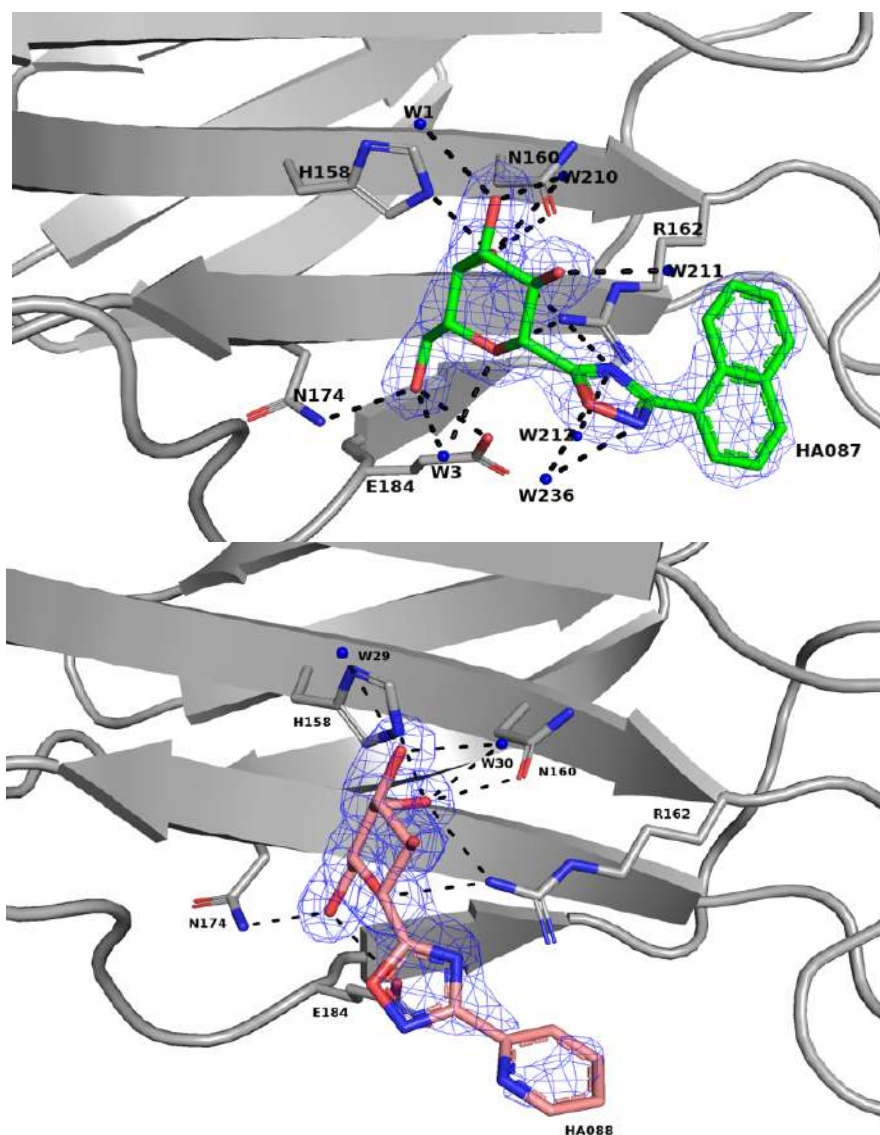


Εικόνα 108: Η χημική δομή των ενώσεων Α. **HA087** Β. **HA088** και η αρίθμηση που χρησιμοποιήθηκε στα κρυσταλλογραφικά πειράματα.

Η πρόσδεση των ενώσεων γίνεται πρωτίστως με τη σύνδεση του β-γαλακτοζίτη στις περιοχές C και D της CBS της γαλεκτίνης-3. Στον Πίνακα 23 αναγράφονται οι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ της CRD της γαλεκτίνης-3 και των ατόμων των ενώσεων. Ο τρόπος πρόσδεσης του δακτυλίου του β-γαλακτοζίτη γίνεται με παρόμοιο τρόπο όπως παρατηρήθηκε και στην προηγούμενη ενότητα, σχηματίζοντας δεσμούς υδρογόνου με τα καλά συντηρημένα κατάλοιπα His158, Asn160, Arg162, Asn174 και Glu184. Οι διαφορές που παρατηρούνται βρίσκονται στους δεσμούς υδρογόνου που δημιουργούνται μεταξύ συντηρημένων μορίων υδάτων. Η ένωση **HA087** δημιουργεί τρεις παραπάνω δεσμούς υδρογόνου μεταξύ του β-γαλακτοζίτη με συντηρημένα μόρια ύδατος μέσω του O2 και του O5. Επιπλέον, το N1 του δακτυλίου της 5-1,2,4 οξαδιαζόλης της **HA087** δημιουργεί δεσμό υδρογόνου με το κατάλοιπο Arg162 και με ένα μόριο ύδατος, ενώ η ίδια ομάδα της ένωσης **HA088** δεν σχηματίζει (Εικόνα 109).

Πίνακας 23: Οι δεσμοί υδρογόνου που αναπτύσσονται μεταξύ των **HA087** και **HA088** και των καταλοίπων της CRD της γαλεκτίνης-3. Σε παρένθεση η απόσταση σε Å.

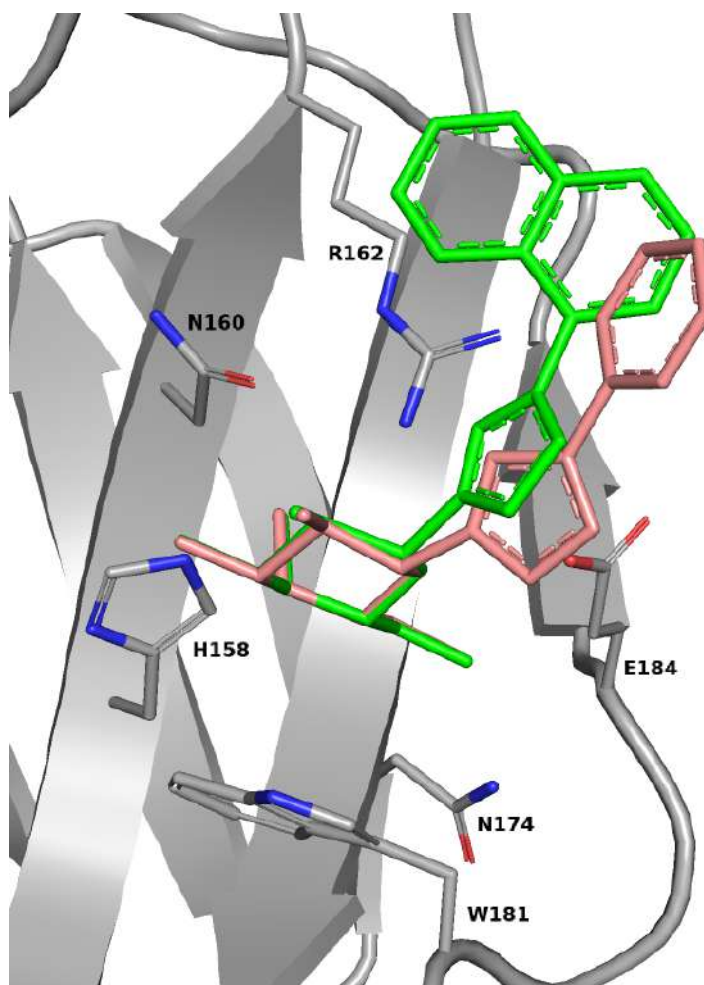
Άτομα ένωσης	Κατάλοιπα πρωτεΐνης και μόρια ύδατος	
	HA087	HA088
O2	Water-211 (2,7)	
O3	Water-1 (2,8)	Water-29 (2,9)
	Water-210 (2,7)	Water-30 (2,7)
O4	His158(NE2) (2,7)	His158(NE2) (2,7)
	Asn160(OD1) (3,0)	Asn160(OD1) (2,9)
	Arg162(NH2) (2,9)	Arg162(NH2) (2,8)
	Water-210 (2,9)	Water-30 (2,8)
O5	Arg162(NH2) (3,1)	Arg162(NH2) (3,1)
	Water-3 (3,2)	
O6	Asn174(ND2) (2,8)	Asn174(ND2) (2,9)
	Glu184(OE2) (2,6)	Glu184(OE2) (2,7)
	Water-3 (3,1)	
O7	Water-236 (2,9)	
N1	Arg162(NH2) (3,2)	
	Water-212 (3,0)	
N2	Water-236 (3,2)	
Συνολικοί δεσμοί υδρογόνου	7	6



Εικόνα 109: Η πρόσδεση των **HA087** και **HA088** στην CRD της Γαλεκτίνης-3. Με διακεκομμένες γραμμές απεικονίζονται οι δεσμοί υδρογόνου και ως μπλε σφαίρες αναπαρίστανται τα μόρια ύδατος. Παρουσιάζονται οι χάρτες 2Fo-Fc για των ενώσεων. Ο χάρτης ήταν προσαρμοσμένος σε 1.0 σ πριν την ενσωμάτωση των μορίων των ενώσεων στη διαδικασία της βελτιστοποίησης.

Στα δύο σύμπλοκα, μόρια ύδατος διαμεσολαβούν αλληλεπιδράσεις δεσμών υδρογόνου. Η **HA087** σχηματίζει 41 αλληλεπιδράσεις, ενώ η **HA088** 14. Πιο συγκεκριμένα, στο σύμπλοκο **HA087** τέσσερα μόρια ύδατος διαμεσολαβούν αλληλεπιδράσεις μεταξύ του β-γαλακτοζίτη και των καταλοίπων *Arg144*, *Asn143*, *Asp148*, *Asn160*, *Arg162*, *Phe163*, *Asn164*, *Gly182*, *Arg183*, *Glu184* και *Ser237*, ενώ δύο μόρια ύδατος διαμεσολαβούν αλληλεπιδράσεις με το N1, N2 και O7 του δακτυλίου της 5-1,2,4 οξαδιαζόλης και τα κατάλοιπα *Arg162*, *Gly182*, *Arg183* και *Glu184*. Αντίθετα, στο σύμπλοκο **HA088** δύο μόρια ύδατος διαμεσολαβούν αλληλεπιδράσεις δεσμών υδρογόνου μεταξύ του β-γαλακτοζίτη και των *Arg144*, *Asn143*, *Asp148*, *Asn160*, *Phe163*, *Asn164* και *Ser237*. Τα άτομα του δακτυλίου της 5-1,2,4 οξαδιαζόλης της **HA088** δεν σχηματίζουν αλληλεπιδράσεις. Λόγω αυτών των διαφορών, η ένωση **HA087** μπορεί να εμφανίζει υψηλότερη συγγένεια ως προς τη γαλεκτίνη-3.

Η υπέρθεση των δύο συμπλόκων δείχνει ότι ο β-γαλακτοζίτης της κάθε ένωσης προσδένεται ακριβώς με τον ίδιο τρόπο, ενώ ο υπόλοιπος συνδέτης με διαφορετικό προσανατολισμό (Εικόνα 110).



Εικόνα 110: Υπέρθεση των δύο συμπλόκων. Με γκρι χρώμα φαίνεται η CRD της γαλεκτίνης-3, με πράσινο χρώμα η ένωση **HA087** και με ροζ χρώμα η **HA088**. Στην εικόνα φαίνονται με ράβδους τα καλά συντηρημένα κατάλοιπα της CBS της γαλεκτίνης-3.

Ο β-γαλακτοζίτης της **HA087** και της **HA088** δημιουργεί 28 και 29 αλληλεπιδράσεις *Van der Waals*, αντίστοιχα, με τα καλά συντηρημένα κατάλοιπα *His158*, *Asn160*, *Arg162*, *Val172*, *Asn174*, *Trp181* και *Glu184* (Πίνακας 23).

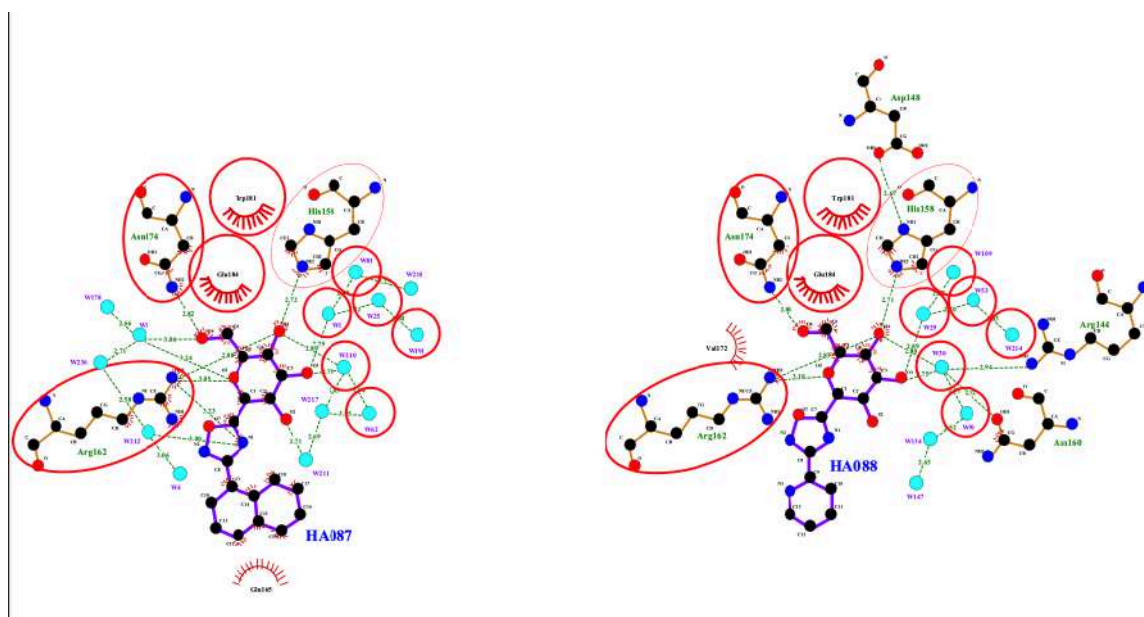
Ο δακτύλιος της 5-1,2,4 οξαδιαζόλης προσδένεται με διαφορετικό προσανατολισμό. Η **HA087** σχηματίζει τρεις αλληλεπιδράσεις *Van der Waals* με την πλευρική αλυσίδα της *Arg162*, ενώ η **HA088** καμία. Η ομάδα του ναφθαλενίου της **HA087** δημιουργεί 13 αλληλεπιδράσεις *Van der Waals* με τις πλευρικές αλυσίδες των *Arg162* και *Glu165*, συγκριτικά με την ομάδα της πυριδίνης της **HA088** η οποία δεν δημιουργεί καμία αλληλεπίδραση με αυτά τα κατάλοιπα.

Πίνακας 23: Οι αλληλεπιδράσεις Van der Waals που αναπτύσσονται μεταξύ των **HA087** και **HA088** και των καταλοίπων της CRD της Γαλεκτίνης-3.

Άτομα ένωσης	Κατάλοιπα πρωτεΐνης και μόρια ύδατος	
	HA087	HA088
O2	Water-217	
O3	His158(NE2)	
	Water-217	
O4	His158(CE1, CD2)	His158(CE1, CD2)
	Asn160(CG)	Asn160(CG)
		Arg162(CZ)
O5	Glu184(OE2)	Glu184(OE2)
	Water-212	Water-31
	Water-236	
O6	Asn174(CB, CG)	Asn174(CB, CG)
	Glu184(CG, CD)	Glu184(CG, CD)
		Water-201
O7	Water-211	
C1	Arg162(NH2)	Arg162(NH2)
	Water-3	
	Water-236	
C2	Arg162(NH2)	Arg162(NH2)
	Water-210	Water-30
	Water-211	
	Water-217	
C3	Trp181(NE1, CE2)	Trp181(NE1, CE2)
	Water-1	Water-29
	Water-210	Water-30
C4	His158(CE1, NE2, CD2)	His158(CE1, NE2, CD2)
	Trp181(CE2, CZ2)	Trp181(CE2, CZ2)
	Arg162 (NH2)	Arg162 (NH2)
	Water-210	Water-30
C5	Trp181(CE2, CD2, CG, NE1)	Trp181(CE2, NH2, NE1)
	Arg162(NH2)	Arg162(NH2)
	Water-3	
C6	Val172(CG1)	Val172(CG1)
	Asn174(ND2)	Asn174(ND2, CB)
	Arg162(NH2)	Arg162(NH2)
	Glu184(OE2)	Glu184(OE2)
	Water-3	His158(CD2)
C7	Arg162(NH2)	Water-31
	Water-211	
	Water-212	
	Water-236	
C8	Water-211	Water-31
	Water-212	
	Water-236	
C9	Arg162(NH1)	Water-31
	Water-212	
C10	Water-4	Water-31
	Water-212	Water-32
C11	Water-4	
C12	Glu165(CG)	
C13	Arg162(NH1)	
	GLU165(CG)	
C14	Arg162(NH1)	
C15	Glu165(CB, CG)	
C16	Water-107	
	Water-154	
	Water-245	
C17	Arg162(CZ, NH1, CD, NE)	
	Water-62	

	Water-107	
	Water-217	
	Water-245	
C18	Arg162(CZ, NH1)	
	Water-211	
N1	Arg162(NH1, CZ)	Water-31
	Water-211	
	Water-236	
N2		
Συνολικές αλληλεπιδράσεις	45	79

Επιπλέον, ο τελεστής *B* της **HA087** είναι σχεδόν ο μισός σε σχέση με αυτόν της **HA088**. Πιο συγκεκριμένα, ο τελεστής *B factor* της **HA087**, δηλαδή ο δακτύλιος της 5-1,2,4 οξαδιαζόλης και η ομάδα του ναφθαλενίου είναι ο μισός σε σχέση με το αυτόν της **HA088**. Αυτό σημαίνει ότι η **HA088** εμφανίζει μεγαλύτερη ακαμψία και το σύμπλοκο είναι πιο σταθερό. όπως παρουσιάζεται και στην Εικόνα 111 το σύμπλοκο της **HA087** σταθεροποιείται με πέντε μόρια ύδατος τα οποία δεν υπάρχουν στο σύμπλοκο με την **HA088**. Τέλος, συγκριτικά με όλα τα παραπάνω, πιθανόν η **HA087** εμφανίζει μεγαλύτερη εξειδίκευση ως προς τη γαλεκτίνη-3 και θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως ένωση-οδηγός για το σχεδιασμό άλλων ενώσεων που θα εμφανίζουν μεγαλύτερη συγγένεια ως προς τη γαλεκτίνη-3.



Εικόνα 111: Διαγράμματα LigPlot για τα σύμπλοκα της γαλεκτίνης-3-CRD με **HA087** και **HA088**. Οι δεσμοί υδρογόνου απεικονίζονται με πράσινες διακεκομμένες γραμμές και τα κόκκινα τόξα απεικονίζουν τα κατάλοιπα που συμμετέχουν σε αλληλεπιδράσεις van der Waals με τα άτομα της κάθε ένωσης. Οι κόκκινοι κύκλοι και ελλείψεις υποδεικνύουν τα κατάλοιπα που βρίσκονται σε ισοδύναμες θέσεις και στα δύο σύμπλοκα.

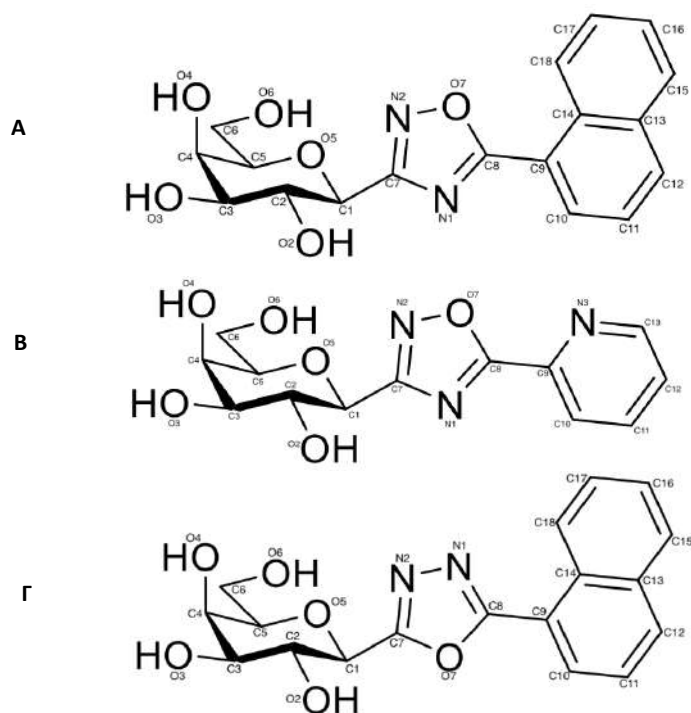
5.12.2 Κρυσταλλογραφικές μελέτες των ενώσεων **KISZ** με τη Γαλεκτίνη-3-CRD

Οι κρύσταλλοι της γαλεκτίνης-3-CRD εμβαπτίστηκαν σε διαλύματα των **KISZ232**, **KISZ340** και **KISZ333IAB** συγκέντρωσης 20 mM, στα οποία υπήρχε 10% (v/v) *DMSO*, για 5 ημέρες. Η συλλογή των κρυσταλλογραφικών δεδομένων περίθλασης ακτίνων Χ πραγματοποιήθηκε

όπως αναφέρθηκε στο εδάφιο 5.9.2. Στον Πίνακα 24 αναγράφονται τα στατιστικά στοιχεία που προέκυψαν από την επεξεργασία των δεδομένων.

Πίνακας 24: Σύνοψη των παραμέτρων της επεξεργασίας των κρυσταλλογραφικών δεδομένων περίθλασης ακτίνων Χ και της διαδικασίας της βελτιστοποίησης για το σύμπλοκο της Γαλεκτίνης-3-CRD με τις **KISZ232**, **KISZ340** και **KISZ333IAB**. Οι τιμές στην παρένθεση αφορούν την εξωτερική στοιβάδα ευκρίνειας.

Σύμπλοκο της γαλεκτίνης-3	KISZ232	KISZ340	KISZ333IAB
Ομάδα συμμετρίας χώρου	$P2_12_12_1$	$P2_12_12_1$	$P2_12_12_1$
Διαστάσεις μοναδιαίας κυψελίδας (Å)	35,9, 57,7 62,3	36,2, 58,3, 62,7	34,2, 56,9, 61,5
Ευκρίνεια (Å)	1,90	1,91	1,90
Εξωτερική στοιβάδα (Å)	1,95-1,90	1,95-1,91	1,94-1,90
Ανακλάσεις	42200 (1757)	81195 (4669)	70320 (2281)
Μοναδικές ανακλάσεις	10422 (524)	10776 (705)	9790 (431)
R_{merge}	0,045 (0,204)	0,027 (0,088)	0,082 (0,222)
Πληρότητα (%)	97,2 (76,3)	100 (99,7)	98,2 (71,8)
$I/\sigma(I)$	21,4 (5,7)	47,5 (21,9)	14,9 (5,9)
Πολλαπλότητα	4,0 (3,4)	7,5 (6,6)	7,2 (5,3)
$CC^{1/2}$	0,999 (0,935)	1,0 (0,994)	0,997 (0,936)
B Wilson (Å ²)	15,337	13,012	15,905
Ανακλάσεις που χρησιμοποιήθηκαν για τη βελτιστοποίηση	9906	10239	9272
Αριθμός μορίων διαλύτη	216	253	184
Αριθμός ατόμων της ένωσης	26	22	26
R (%)	15,6	14,7	15,8
R_{free} (%)	21,5	21,3	20,3
r.m.s.d. σε μήκη δεσμών (Å)	0,005	0,010	0,005
r.m.s.d. σε γωνίες δεσμών (°)	1,35	1,58	1,28
	Μέση τιμή B (Å ²)		
Άτομα πρωτεΐνης	14,9	10,5	15,8
Μόρια διαλύτη	26,3	22,9	24,0
Άτομα ένωσης	30,5	23,8	29,8



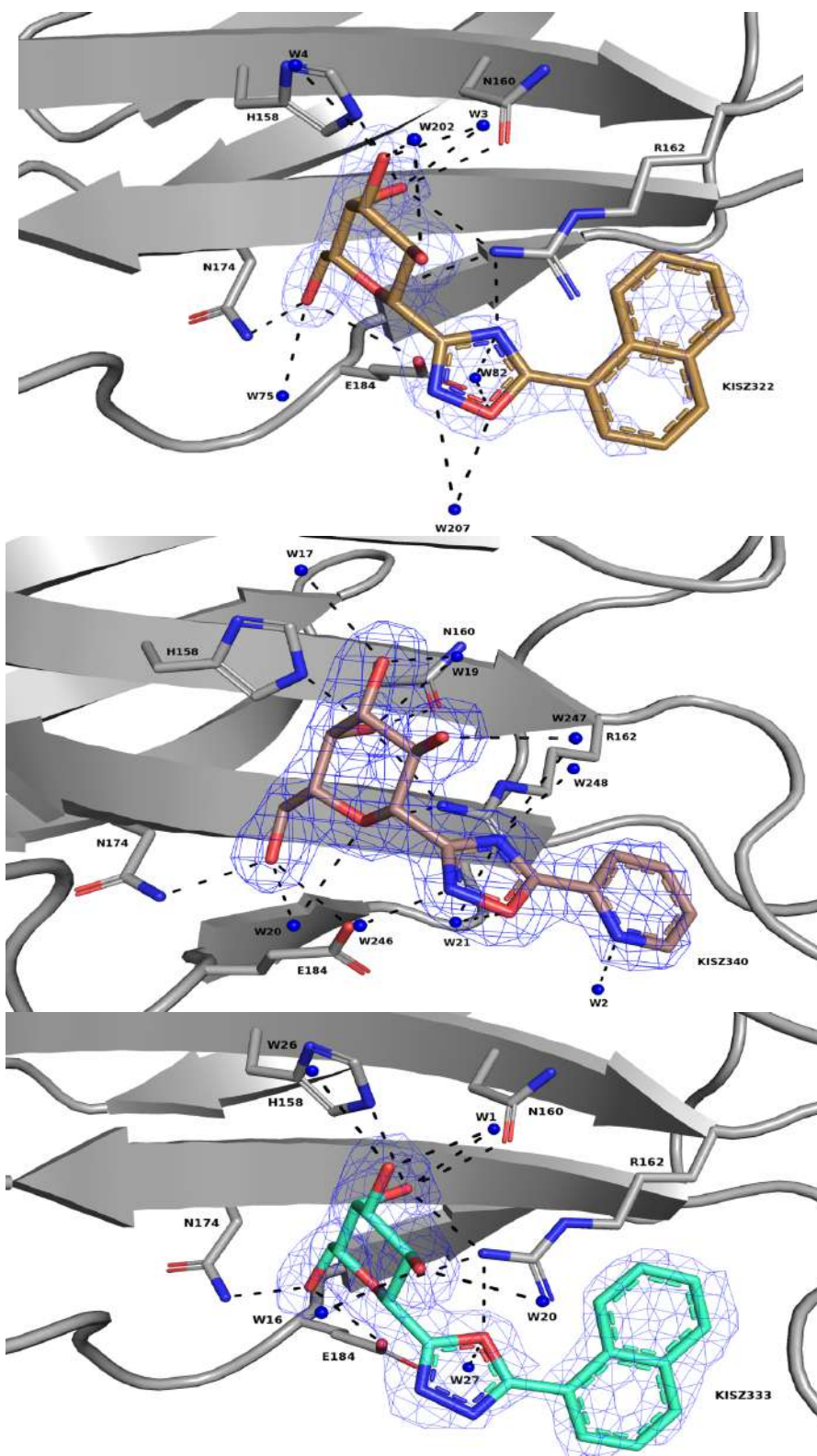
Εικόνα 1812: Η χημική δομή των ενώσεων Α. **KISZ320** Β. **KISZ340** και Γ. **KISZ333IAB** και η αρίθμηση που χρησιμοποιήθηκε στα κρυσταλλογραφικά πειράματα.

Η πρόσδεση των ενώσεων γίνεται πρωτίστως με τη σύνδεση του β-γαλακτοζίτη στις περιοχές C και D της CBS της γαλεκτίνης-3. Στον Πίνακα 25 αναγράφονται οι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ της CRD της γαλεκτίνης-3 και των ατόμων των ενώσεων. Ο τρόπος πρόσδεσης του δακτυλίου του β-γαλακτοζίτη γίνεται με παρόμοιο τρόπο όπως και στην προηγούμενη ενότητα, σχηματίζοντας δεσμούς υδρογόνου με τα καλά συντηρημένα κατάλοιπα *His158*, *Asn160*, *Arg162*, *Asn174* και *Glu184*. Οι διαφορές που παρατηρούνται βρίσκονται στους δεσμούς υδρογόνου που δημιουργούνται μεταξύ συντηρημένων μορίων υδάτων, όπου οι **KISZ322** και η **KISZ340** δημιουργούν 6, ενώ η **KISZ333IAB** 5 δεσμούς υδρογόνου μεταξύ του β-γαλακτοζίτη με συντηρημένα μόρια ύδατος. Επιπλέον, το N1 του δακτυλίου της 3-1,2,4 οξαδιαζόλης της **KISZ322** δημιουργεί δεσμό υδρογόνου με την *Arg162* και με ένα μόριο ύδατος, ενώ η ίδια ομάδα της **KISZ340** σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου με τρία μόρια ύδατος, ενώ το N2 των δύο ενώσεων δημιουργεί δεσμούς υδρογόνου με ένα μόριο ύδατος. Το N3 του δακτυλίου της 3-1,2,4 οξαδιαζόλης της **KISZ340** δημιουργεί ένα δεσμό υδρογόνου με ένα μόριο ύδατος. Το O7 της 3-1,2,4 οξαδιαζόλης της **KISZ322** σχηματίζει δύο δεσμούς υδρογόνου με δύο μόρια ύδατος, ενώ της **KISZ340** ένα δεσμό με ένα μόριο ύδατος. Ο δακτύλιος της 5-1,3,4-οξαδιαζόλης της **KISZ333IAB** δημιουργεί μέσω του O7 ένα δεσμό υδρογόνου με το κατάλοιπο *Arg162* και ένα δεσμό υδρογόνου με ένα μόριο ύδατος (Πίνακας 25 και Εικόνα 113).

Πίνακας 25: Οι δεσμοί υδρογόνου που αναπτύσσονται μεταξύ των **KISZ322**, **KISZ340** και **KISZ333IAB** και των καταλοίπων της CRD της Γαλεκτίνης-3 Σε παρένθεση η απόσταση σε Å.

Άτομα ένωσης	Κατάλοιπα πρωτεΐνης και μόρια ύδατος		
	KISZ322	KISZ340	KISZ333IAB

O2	Water-202 (3,2)	Water-247 (2,9)	Water-16 (2,9)
O3	Water-3 (2,8)	Water-17 (2,9)	Water-20 (2,9)
	Water-4 (2,9)	Water-19 (2,8)	Water-1 (2,9)
	Water-202 (2,8)		Water-26 (3,1)
O4	His158(NE2) (2,8)	His158(NE2) (2,7)	His158(NE2) (2,8)
	Asn160(OD1) (3,1)	Asn160(OD1) (3,1)	Asn160(OD1) (3,1)
	Arg162(NH2) (2,9)	Arg162(NH2) (2,9)	Arg162(NH2) (2,9)
	Water-3 (2,8)	Water-19 (2,8)	Water-1 (3,0)
O5	Arg162(NH2) (3,0)	Arg162(NH2) (3,1)	Arg162(NH2) (3,1)
		Water-20 (3,3)	
O6	Asn174(ND2) (2,8)	Asn174(ND2) (2,8)	Asn174(ND2) (2,8)
	Glu184(OE2) (2,7)	Glu184(OE2) (2,7)	Glu184(OE2) (2,6)
	Water-75 (3,1)	Water-20 (3,1)	
O7	Water-82 (3,2)	Water-21 (3,4)	Arg162(NH2) (3,3)
	Water-207 (2,7)		Water-27 (2,9)
N1	Arg162(NH2) (3,2)	Water-21 (3,1)	
	Water-82 (3,0)	Water-247 (3,3)	
		Water-248 (3,2)	
N2	Water-207 (3,2)	Water-246, (2,4)	
N3		Water-2 (3,3)	
Συνολικοί δεσμοί υδρογόνου		6	7



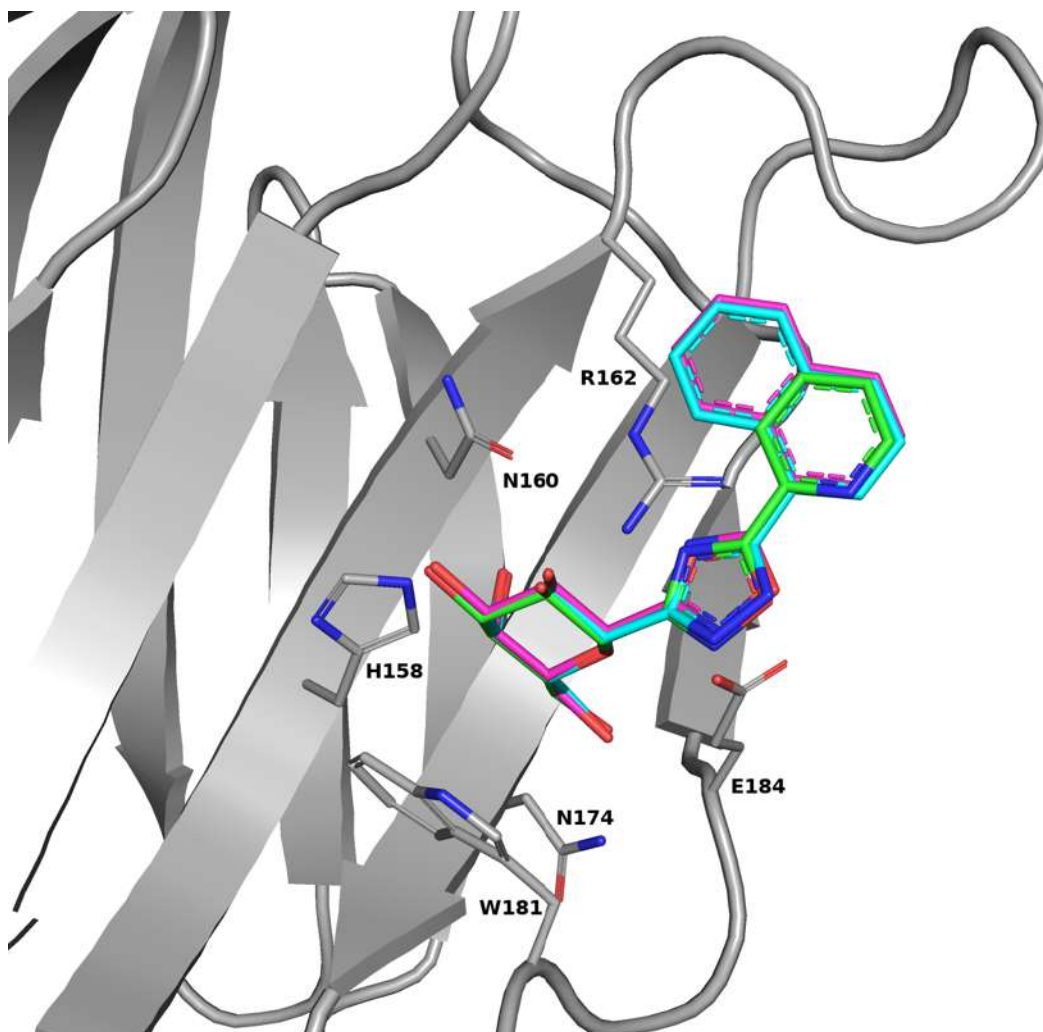
Εικόνα 113: Η πρόσδεση των **KISZ322**, **KISZ340** και **KISZ333IAB** στην CRD της Γαλεκτίνης-3. Με διακεκομμένες γραμμές απεικονίζονται οι δεσμοί υδρογόνου και ως μπλε σφαίρες αναπαρίστανται τα μόρια ύδατος. Παρουσιάζονται οι χάρτες 2Fo-Fc για των ενώσεων. Ο χάρτης ήταν προσαρμοσμένος σε 1.0 σ πριν την ενσωμάτωση των μορίων των ενώσεων στη διαδικασία της βελτιστοποίησης.

Στα τρία σύμπλοκα, μόρια ύδατος διαμεσολαβούν αλληλεπιδράσεις δεσμών υδρογόνου. Η πρόσδεση και των τριών ενώσεων σχηματίζει αλληλεπιδράσεις δεσμών υδρογόνου μέσω των

ατόμων του β-γαλακτοζίτη και των καταλοίπων της πρωτεΐνης. Πιο συγκεκριμένα, η **KISZ322** δημιουργεί 19 αλληλεπιδράσεις μέσω δύο μορίων ύδατος με τις πλευρικές αλυσίδες των *Arg143*, *Arg144*, *Asp148*, *Glu150*, *Gly152*, *Asn153*, *Asn160*, *Phe163*, *Asn164*, *Lys176* και *Ser237*. Η **KISZ340** σχηματίζει 22 αλληλεπιδράσεις μέσω τριών μορίων ύδατος με τα κατάλοιπα *Asn119*, *Arg144*, *Ala145*, *Asp148*, *Asn160*, *Arg162*, *Gln150*, *Lys233*, *Gly235* και *Ser237*. Η **KISZ333IAB** σχηματίζει 15 αλληλεπιδράσεις μέσω τριών μορίων ύδατος με τις πλευρικές αλυσίδες των καταλοίπων *Asn143*, *Arg144*, *Asp148*, *Asn160*, *Asn164*, *Trp181* και *Ser237*.

Επιπρόσθετα, παρατηρούνται αλλαγές των διαμεσολαβούμενων από μόρια ύδατος δεσμών υδρογόνου που σταθεροποιούν το δακτύλιο της οξαδιαζόλης. Έτσι, τα O7 και N1 του δακτυλίου 3-1,2,4-οξαδιαζόλης της **KISZ322** συμμετέχει σε 5 αλληλεπιδράσεις δεσμών υδρογόνου με τις *Arg162*, *Glu165* και *Glu184* ενώ, τα O7, N1 και N3 της **KISZ340** 15 αλληλεπιδράσεις δεσμών υδρογόνου με *Arg144*, *Asn160*, *Arg162*, *Glu165* και *Glu184* και το O7 της **KISZ333IAB** 3 με *Arg162* και *Glu184*. Σύμφωνα με τα παραπάνω, φαίνεται ότι η **KISZ322** εμφανίζει υψηλότερη εξειδίκευση και πιθανότατα πιο ισχυρή συγγένεια έναντι των άλλων δύο.

Παρόλο των παραπάνω διαφορών, η υπέρθεση των τριών συμπλόκων δείχνει πως και οι τρεις ενώσεις προσδένονται με παρόμοιο τρόπο και προσανατολισμό στη CBS της γαλεκτίνης-3 (Εικόνα 114).



Εικόνα 114: Υπέρθεση των τριών συμπλόκων. Με γκρι χρώμα φαίνεται η CRD της γαλεκτίνης-3, με ροζ χρώμα η **KISZ322**, με πράσινο χρώμα η **KISZ340** και με μπλε χρώμα η **KISZ333IAB**. Στην εικόνα φαίνονται με ράβδους τα καλά συντηρημένα κατάλοιπα της CBS της γαλεκτίνης-3.

Ο β-γαλακτοζίτης των **KISZ322**, **KISZ340** και **KISZ333IAB** δημιουργεί 28, 31 και 29 αλληλεπιδράσεις *Van der Waals*, αντίστοιχα, με τα καλά συντηρημένα κατάλοιπα της His158, Asn160, Arg162, Asn174, Trp181 και Glu184 (Πίνακας 26).

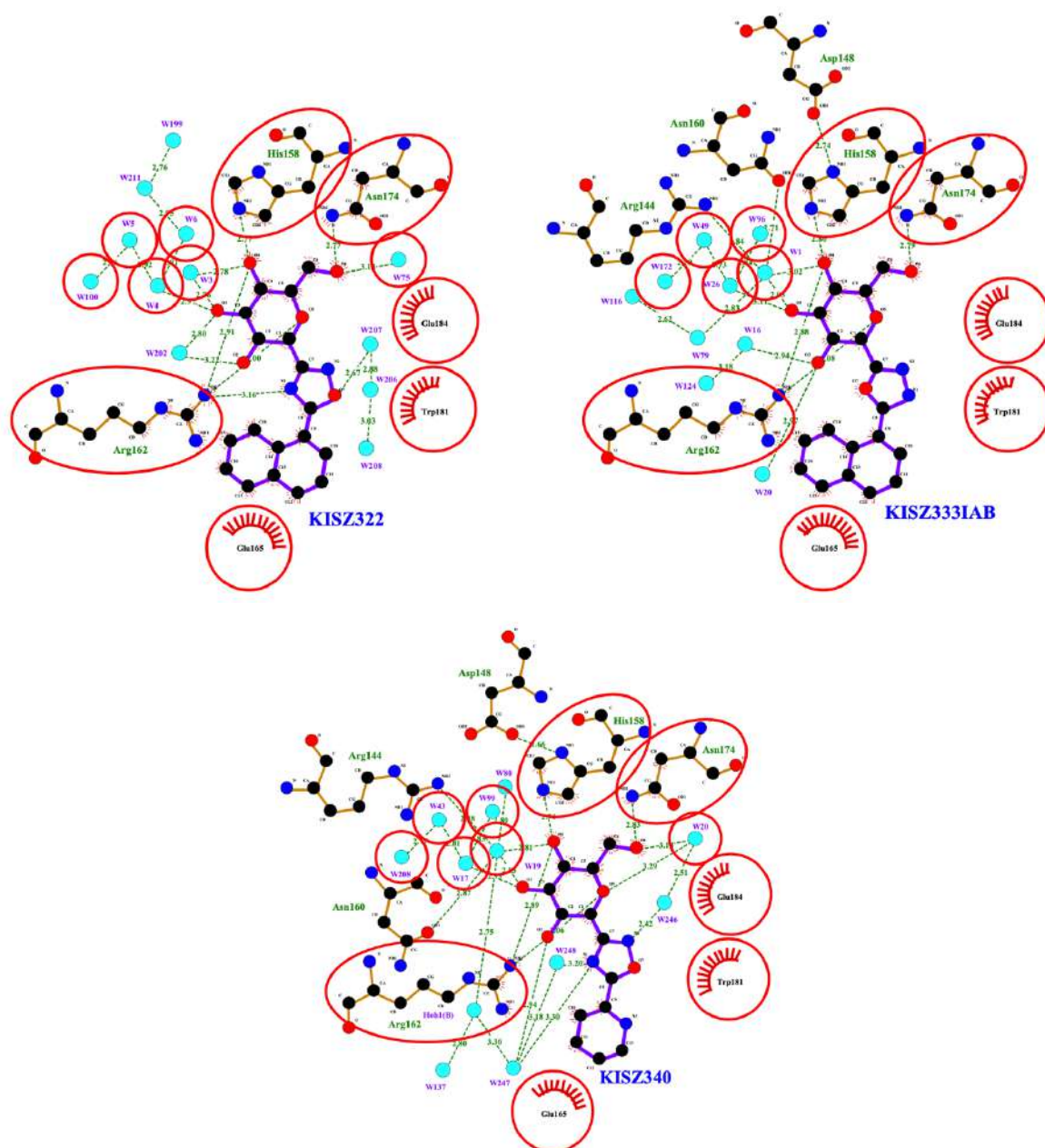
Ο δακτύλιος της 3-1,2,4-οξαδιαζόλης των **KISZ322** και **KISZ340** σχηματίζει 4 αλληλεπιδράσεις *Van der Waals* μέσω των ατόμων C7, C8 και N1 και 4 μέσω των ατόμων C7 και N1, αντίστοιχα, με τις πλευρικές αλυσίδες της Arg162. Παράλληλα, ο δακτύλιος 5-1,3,4-οξαδιαζόλης της **KISZ333IAB** δεν δημιουργεί κάποια αλληλεπίδραση με τα κατάλοιπα της πρωτεΐνης, παρά μόνο με μόρια ύδατος. Η ομάδα του ναφθαλενίου των **KISZ322** και **KISZ333IAB** δημιουργεί 18 και 14 αλληλεπιδράσεις *Van der Waals*, αντίστοιχα με τις πλευρικές αλυσίδες των Arg162 και Glu165, συγκριτικά με την ομάδα της πυριδίνης της **KISZ340** η οποία δημιουργεί μόνο 4 αλληλεπιδράσεις με τα ίδια κατάλοιπα. Συνολικά, οι **KISZ322**, **KISZ340** και **KISZ333IAB** δημιουργούν 53, 39 και 44 τέσσερις αλληλεπιδράσεις *Van der Waals*, αντίστοιχα.

Πίνακας 26: Οι αλληλεπιδράσεις Van der Waals που αναπτύσσονται μεταξύ των **KISZ322**, **KISZ340** και **KISZ333IAB** και των καταλοίπων της CRD της γαλεκτίνης-3.

Άτομα ένωσης	Κατάλοιπα πρωτεΐνης και μόρια ύδατος		
	KISZ322	KISZ340	KISZ333IAB
O2	Water-1		
O3		Water-1	Water-128
O4	His158(CE1, CD2) Asn160(CG)	His158(CE1, CD2) Asn160(CG)	His158(CE1, CD2) Asn160(CG)
O5	Glu184(OE2) Water-75 Water-82	Glu184(OE2) Water-21	Glu184(OE2) Water-27
O6	Glu184(CG, CD) Asn174(CB, CG)	Glu184(CG, CD) Asn174(CB, CG)	Glu184(CG, CD) Asn174(CB, CG) Water-164
O7	Water-206	Water-246	Arg162(NH1, CZ) Water-20
C1	Arg162(NH2)	Arg162(NH2) Water-20 Water-246	Arg162(NH2)
C2	Arg162(NH2) Water-3 Water-202	Arg162(NH2) Water-19 Water-247	Arg162(NH2) Water-16 Water-20
C3	Trp181(NE1) Water-3 Water-4 Water-202	Trp181(NE1, CE2) Water-17 Water-19 Water-132	Trp181(NE1) Water-1
C4	His158(NE2, CD2) Trp181(CE2, CZ2, NE1) Arg162 (NH2) Water-3	His158(NE2, CD2, CE1) Trp181(CE2, CZ2, NE1) Arg162 (NH2) Water-19	His158(NE2, CD2) Trp181(CE2, CZ2, NE1) Arg162 (NH2) Water-1
C5	Trp181(CE2, CD2, NE1, CG) Arg162(NH2) Water-75	Trp181(CE2, CD2, NE1, CG) Arg162(NH2) Water-20	Trp181(CE2, CD2, NE1) Arg162(NH2)
C6	His158(CD2) Trp181(CD2) Asn174(CB, ND2) Arg162(NH2) Glu184(OE2)	His158(CD2) Trp181(CD2, CE3) Asn174(CB, ND2) Arg162(NH2) Glu184(OE2)	His158(CD2) Val172(CG1) Asn174(CB, ND2) Arg162(NH2) Glu184(OE2)
C7	Arg162(NH2) Water-82	Arg162(NH2) Water-20 Water-21 Water-246 Water-247	Arg162(NH2) Water-27
C8	Arg162(NH1) Water-82 Water-206 Water-207	Water-21 Water-247 Water-248	Water-20 Water-27 Water-28
C9	Arg162(NH1) Water-82 Water-206	Arg162(NH1) Water-2 Water-21 Water-248	Arg162(NH1) Water-27 Water-28
C10	Water-82 Water-206 Water-207	Arg162(NH1) Water-248	Water-27 Water-28
C11	Water-206	Arg162(NH1) Glu165(OE2) Water-2 Water-136 Water-248 Water-225	
C12	Glu165(CG)	Water-2	Glu165(CG)

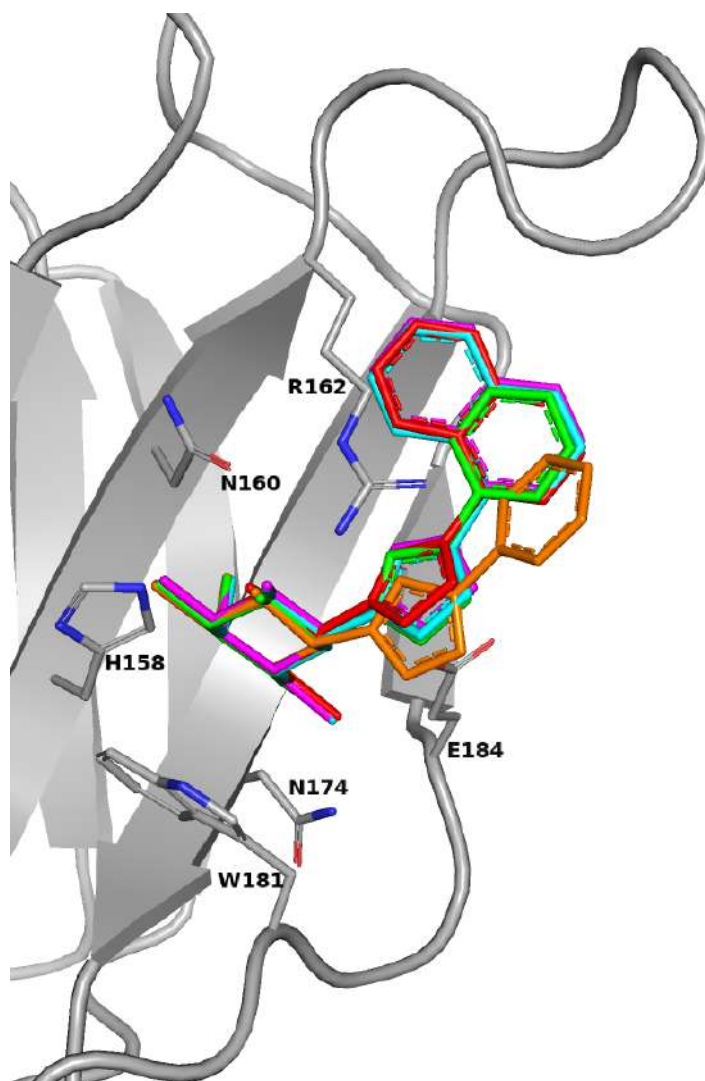
		Water-225	
		Water-229	
C13	Arg162(NH1)	Water-2	Glu165(CG)
	Glu165(OE2, CG)	Water-229	
C14	Arg162(CZ, NH1)		Arg162(NH1)
C15	Glu165(CB, CG)		Glu165(CG)
	Water-210		
C16	Arg162(CD)		Arg162(CD)
	Water-209		Water-116
	Water-210		
C17	Arg162(CD, NE, CZ, NH1)		Arg162(CZ, NH1, CD, NE)
	Water-1		Water-79
	Water-2		Water-116
	Water-209		
C18	Arg162(NH2, NE, CZ, NH1)		Arg162(CZ, NH1, NH2, NE)
	Water-1		Water-20
N1	Arg162(CZ, NH1)	Arg162(CZ, NH1, NH2)	Water-27
			Water-28
N2	Water-82	Water-20	Water-27
		Water-21	
N3		Water-22	
Συνολικές αλληλεπιδράσεις	53	39	44

Ο τελεστής *B* της **KISZ340** είναι μικρότερος σε σχέση με αυτούς των άλλων δύο ενώσεων. Αυτό σημαίνει ότι η **KISZ340** εμφανίζει μεγαλύτερη ακαμψία και το σύμπλοκο είναι πιο σταθερό. Επιπλέον το σύμπλοκο της **KISZ340** σταθεροποιείται με τρία μόρια ύδατος, τα οποία δεν υπάρχουν στα άλλα δύο σύμπλοκα (Εικόνα 115). Πιθανότατα η **KISZ340** εμφανίζει μεγαλύτερη εξειδίκευση ως προς τη γαλεκτίνη-3 και θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως ένωση-οδηγός για το σχεδιασμό άλλων ενώσεων που θα εμφανίζουν μεγαλύτερη εξειδίκευση και συγγένεια ως προς τη γαλεκτίνη-3.



Εικόνα 115: Διαγράμματα LigPlot για τα σύμπλοκα της γαλεκτίνης-3-CRD με τις **KISZ322**, **KISZ340** και **KISZ333IAB**. Οι δεσμοί υδρογόνου απεικονίζονται με πράσινες διακεκομμένες γραμμές και τα κόκκινα τόξα απεικονίζουν τα κατάλοιπα που συμμετέχουν σε αλληλεπιδράσεις van der Waals με τα άτομα της κάθε ένωσης. Οι κόκκινοι κύκλοι και ελλείψεις αναδεικνύουν τα κατάλοιπα που βρίσκονται σε ισοδύναμες θέσεις και στα τρία σύμπλοκα.

Η υπέρθεση των συμπλόκων **HA087**, **HA088**, **KISZ322**, **KISZ340** και **KISZ333IAB** (Εικόνα 116) υποδεικνύει ότι ο β-γαλακτοζίτης προσδένεται με παρόμοιο τρόπο. Επιπλέον, ο υπόλοιπος συνδέτης των **HA087**, **KISZ322**, **KISZ340** και **KISZ333IAB** προσδένεται παρόμοια, ενώ ο **HA088** προσδένεται με διαφορετικό προσανατολισμό. Συγκριτικά με όλα τα παραπάνω, οι **HA087** και **KISZ340** θα μπορούσαν να εμφανίζουν υψηλότερη εξειδίκευση και συγγένεια ως προς τη γαλεκτίνη-3, λόγω της χαμηλότερης τιμής των τελεστών *B* και των δεσμών και αλληλεπιδράσεων που σταθεροποιούν το κάθε σύμπλοκο.



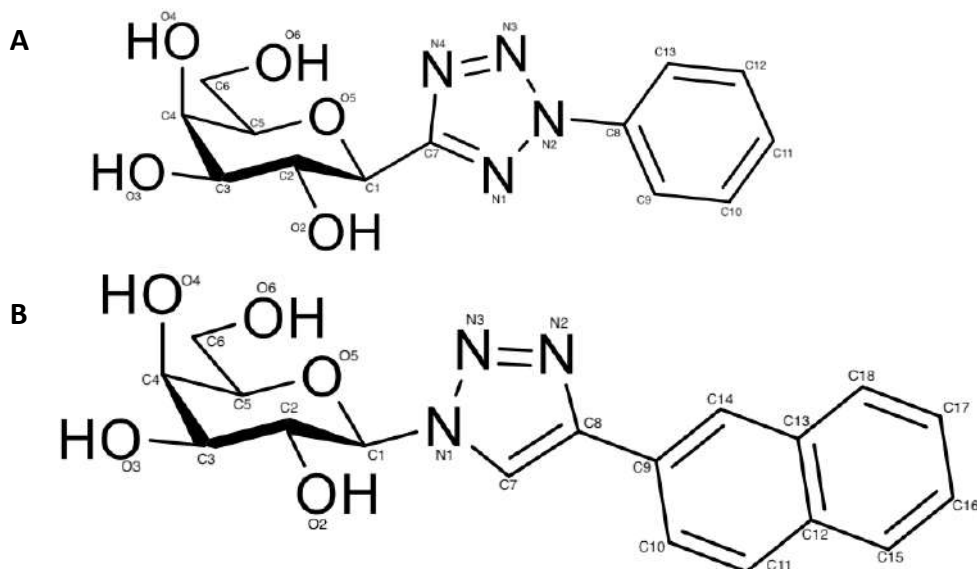
Εικόνα 116: Υπέρθεση των πέντε συμπλόκων. Με γκρι χρώμα φαίνεται η CRD της γαλεκτίνης-3, με ροζ χρώμα η **KISZ322**, με πράσινο χρώμα η **KISZ340**, με μπλε χρώμα η **KISZ333IAB**, με κόκκινο χρώμα η **HA087** και με πορτοκαλί χρώμα η **HA087**. Στην εικόνα φαίνονται με ράβδους τα καλά συντηρημένα κατάλοιπα της CBS της γαλεκτίνης-3.

5.13 Κρυσταλλογραφικές μελέτες των ενώσεων KS782 και HL210-2 με τη Γαλεκτίνη-3-CRD

Οι κρύσταλλοι της γαλεκτίνης-3-CRD εμβαπτίστηκαν σε διαλύματα των **KS782** και **HL210-2** συγκέντρωσης 10 mM, που είχαν και 5% (v/v) DMSO, για 1 ημέρα και 12 h, αντίστοιχα. Η συλλογή των κρυσταλλογραφικών δεδομένων περίθλασης ακτίνων X πραγματοποιήθηκε όπως αναφέρθηκε στο εδάφιο 5.9.2. Στον Πίνακα 27 αναγράφονται τα στατιστικά στοιχεία που προέκυψαν από την επεξεργασία των δεδομένων.

Πίνακας 27: Σύνοψη των παραμέτρων της επεξεργασίας των κρυσταλλογραφικών δεδομένων περίθλασης ακτίνων Χ και της διαδικασίας της βελτιστοποίησης για το σύμπλοκο της γαλεκτίνης-3-CRD με τις **KS782** και **HL210-2**. Οι τιμές στην παρένθεση αφορούν την εξωτερική στοιβάδα ευκρίνειας.

Σύμπλοκο γαλεκτίνης-3	KS782	HL210-2
Ομάδα συμμετρίας χώρου	$P2_12_12_1$	$P2_12_12_1$
Διαστάσεις μοναδιαίας κυψελίδας (Å)	35,8, 57,7, 62,1	36,2, 58,1, 63,0
Ευκρίνεια (Å)	1,95	1,70
Εξωτερική στοιβάδα (Å)	2,00-1,95	1,73-1,70
Ανακλάσεις	35426 (2448)	114603 (4812)
Μοναδικές ανακλάσεις	9446 (653)	15253 (784)
R_{merge}	0,087 (0,346)	0,034 (0,075)
Πληρότητα (%)	95,8 (93,4)	99,8 (97,0)
$I/\sigma(I)$	10,5 (3,6)	45,3 (21,4)
Πολλαπλότητα	3,8 (3,7)	7,5 (6,1)
$CC^{1/2}$	0,995 (0,829)	0,998 (0,994)
B Wilson (Å ²)	13,297	13,373
Ανακλάσεις που χρησιμοποιήθηκαν για τη βελτιστοποίηση	10200	14375
Αριθμός μορίων διαλύτη	230	277
Αριθμός ατόμων της ένωσης	22	26
R (%)	16,1	15,6
R_{free} (%)	22,7	18,8
r.m.s.d. σε μήκη δεσμών (Å)	0,004	0,011
r.m.s.d. σε γωνίες δεσμών (°)	1,24	1,78
	Μέση τιμή B (Å ²)	
Άτομα πρωτεΐνης	12,7	10,6
Μόρια διαλύτη	25,9	24,1
Άτομα ένωσης	23,6	18,3



Εικόνα 117: Η χημική δομή των ενώσεων Α. **KS782** Β. **HL210-2** και η αρίθμηση που χρησιμοποιήθηκε στα κρυσταλλογραφικά πειράματα.

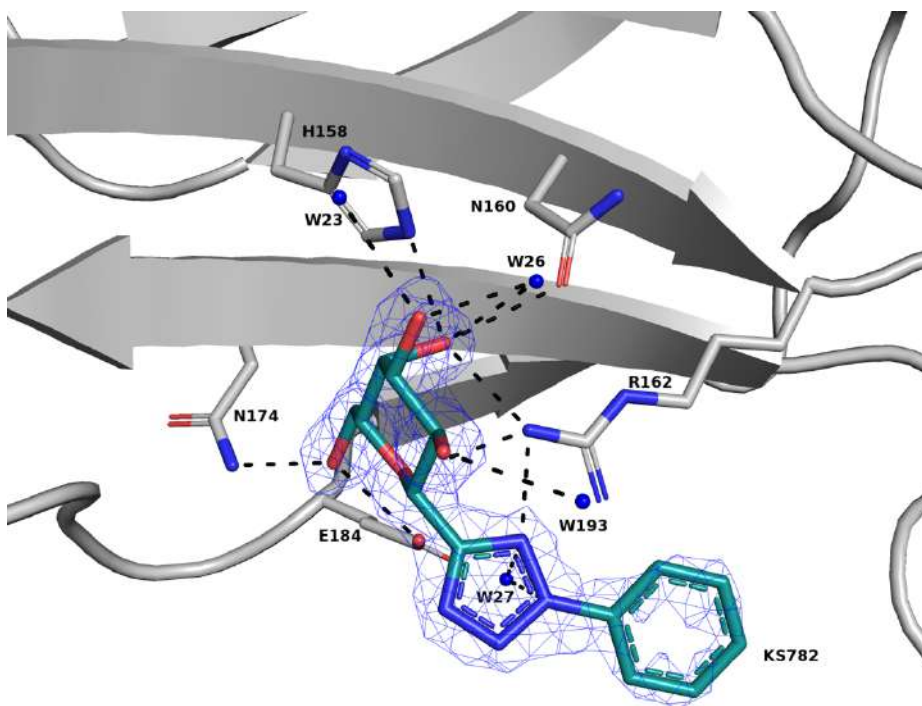
Η πρόσδεση των ενώσεων γίνεται πρωτίστως με τη σύνδεση του β-γαλακτοζίτη στις περιοχές C και D της CBS της γαλεκτίνης-3. Στον Πίνακα 28 αναγράφονται οι δεσμοί υδρογόνου μεταξύ της CRD της γαλεκτίνης-3 και των ατόμων των ενώσεων. Ο τρόπος πρόσδεσης του δακτυλίου

του β-γαλακτοζίτη γίνεται με παρόμοιο τρόπο όπως παρατηρήθηκε και στην προηγούμενη ενότητα, σχηματίζοντας δεσμούς υδρογόνου με τα καλά συντηρημένα κατάλοιπα *His158*, *Asn160*, *Arg162*, *Asn174* και *Glu184*. Κατά την πρόσδεση οι δύο ενώσεις σχηματίζουν 6 δεσμούς υδρογόνου με τα παραπάνω κατάλοιπα. Η **KS782** συμμετέχει σε 4 δεσμούς υδρογόνου με συντηρημένα μόρια ύδατος, ενώ η **HL210-2** 6.

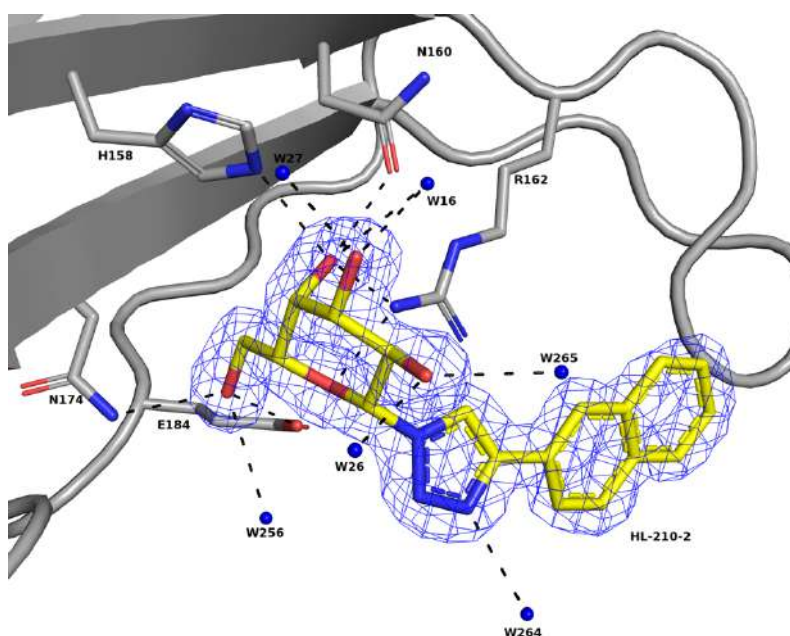
Επιπλέον, το N1 της τετραζόλης της **KS782** δημιουργεί ένα δεσμό υδρογόνου με το κατάλοιπο *Arg162* και με δύο μόρια ύδατος, ενώ η ομάδα 1-1,2,3-τριαζόλης της **HL210-2** σχηματίζει ένα δεσμό υδρογόνου με ένα μόριο ύδατος και κανένα δεσμό με κάποιο κατάλοιπο (Πίνακας 28 και Εικόνα 118 και 119).

Πίνακας 28: Οι δεσμοί υδρογόνου που αναπτύσσονται μεταξύ των **KS782** και **HL210-2** και των καταλοίπων της CRD της γαλεκτίνης-3. Σε παρένθεση η απόσταση σε Å.

Άτομα ένωσης	Κατάλοιπα πρωτεΐνης και μόρια ύδατος	
	KS782	HL210-2
O2	Water-193 (2,9)	Water-26 (2,7)
		Water-265 (2,9)
O3	Water-23 (2,9)	Water-16 (2,7)
	Water-26 (2,7)	Water-27 (2,8)
O4	His158(NE2) (2,8)	His158(NE2) (2,7)
	Asn160(OD1) (3,1)	Asn160(OD1) (3,1)
	Arg162(NH2) (2,8)	Arg162(NH2) (2,9)
	Water-26 (2,8)	Water-16 (2,9)
O5	Arg162(NH2) (3,0)	Arg162(NH2) (3,0)
O6	Asn174(ND2) (2,9)	Asn174(ND2) (2,9)
	Glu184(OE2) (2,7)	Glu184(OE2) (2,7)
		Water-256 (3,2)
N1	Arg162(NH2) (3,3)	
	Water-27 (3,1)	
N2	Water-27 (3,1)	Water-264 (2,9)
Συνολικοί δεσμοί υδρογόνου	7	6



Εικόνα 118: Η σύνδεση της **KS782** στην CRD της Γαλεκτίνης-3. Με διακεκομμένες γραμμές απεικονίζονται οι δεσμοί υδρογόνου και ως μπλε σφαίρες αναπαρίστανται τα μόρια ύδατος. Παρουσιάζονται οι χάρτες 2Fo-Fc για των ενώσεων. Ο χάρτης ήταν προσαρμοσμένος σε 1.0 σ πριν την ενσωμάτωση των μορίων των ενώσεων στη διαδικασία της βελτιστοποίησης.



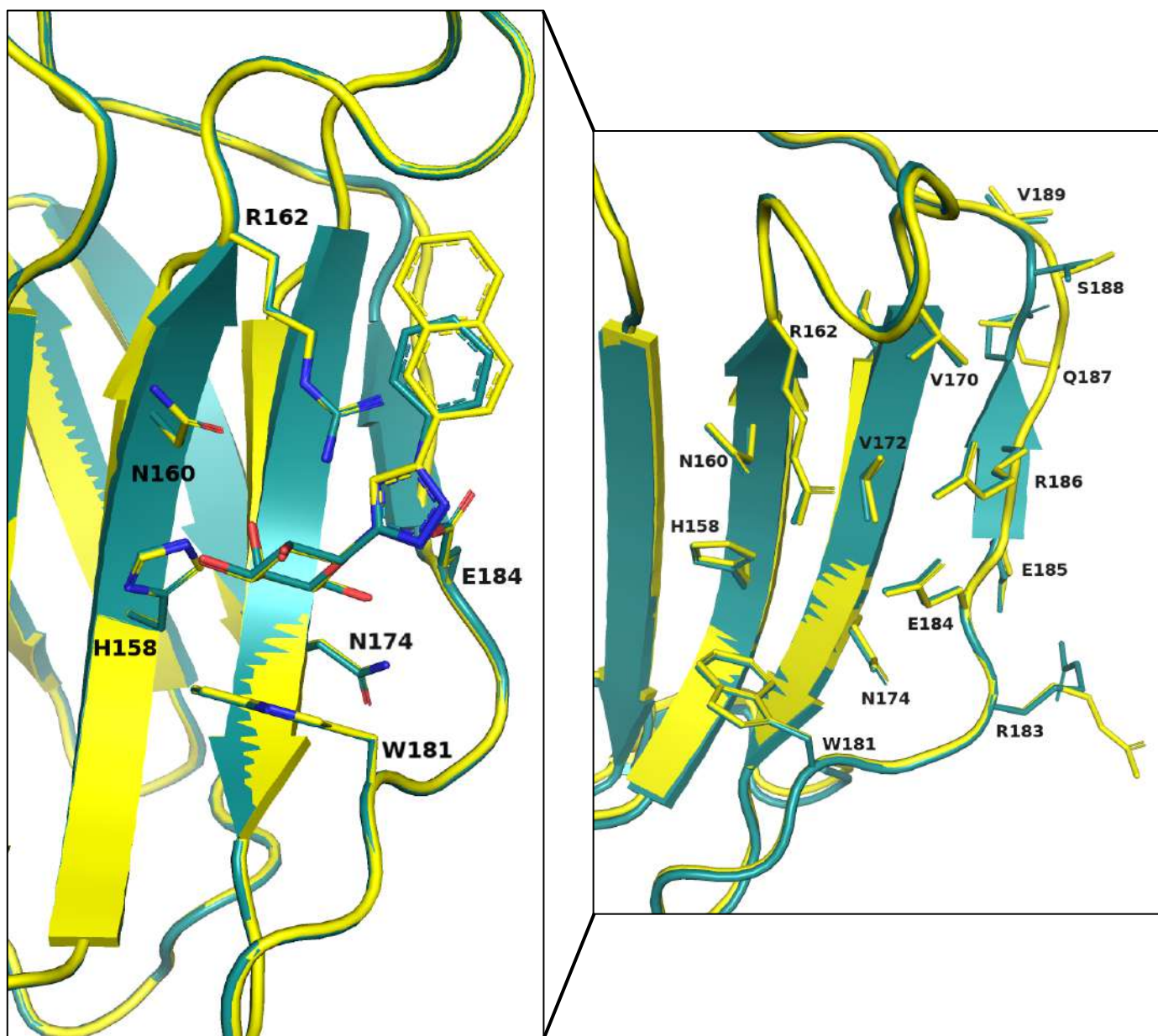
Εικόνα 119: Η πρόσδεση της **HL210-2** στην CRD της Γαλεκτίνης-3. Με διακεκομμένες γραμμές απεικονίζονται οι δεσμοί υδρογόνου και ως μπλε σφαίρες αναπαρίστανται τα μόρια ύδατος. Παρουσιάζονται οι χάρτες 2Fo-Fc για των ενώσεων. Ο χάρτης ήταν προσαρμοσμένος σε 1.0 σ πριν την ενσωμάτωση των μορίων των ενώσεων στη διαδικασία της βελτιστοποίησης.

Στα δύο σύμπλοκα, μόρια ύδατος διαμεσολαβούν αλληλεπιδράσεις δεσμών υδρογόνου. Η πρόσδεση και των δύο ενώσεων σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου μέσω των ατόμων του β-γαλακτοζίτη και τις πλευρικές αλυσίδες των καταλοίπων της πρωτεΐνης. Πιο συγκεκριμένα, η **KS782** δημιουργεί 8 αλληλεπιδράσεις μέσω δύο μορίων ύδατος με τις πλευρικές αλυσίδες των *Arg144*, *Asp148*, *Asn160* και *Ser237*. Παράλληλα, η **HL210-2** σχηματίζει 27 αλληλεπιδράσεις μέσω πέντε μορίων ύδατος με τα *Arg144*, *Asp148*, *Asn160*, *Glu165*, *Trp181*, *Arg183*, *Glu184* και *Ser237*.

Επιπρόσθετα, παρατηρούνται αλλαγές των διαμεσολαβούμενων από μόρια ύδατος δεσμών υδρογόνου που σχηματίζονται σταθεροποιώντας τον υπόλοιπο συνδέτη. Πιο συγκεκριμένα, ένα μόριο ύδατος που αλληλεπιδρά με τα άτομα *N1* και *N2* της ομάδας τετραζόλης της **KS782** διαμεσολαβεί σε τέσσερις δεσμούς υδρογόνου με τις πλευρικές αλυσίδες των *Arg162* και *Glu184*. Επιπρόσθετα, το *N2* της ομάδας 1-1,2,3-τριαζόλης της **HL210-2** σχηματίζει 7 αλληλεπιδράσεις δεσμών υδρογόνου με τις πλευρικές αλυσίδες των *Glu165*, *Arg183* και *Glu184*.

Σύμφωνα με τα παραπάνω, φαίνεται ότι ίσως η **HL210-2** εμφανίζει πιθανότατα πιο ισχυρή συγγένεια για την γαλεκτίνη-3 έναντι της **KS782**, λόγω της σταθεροποίησης του προσδέτη με περισσότερους διαμεσολαβούμενους από μόρια ύδατος δεσμούς υδρογόνου με τα κατάλοιπα της πρωτεΐνης. Ωστόσο, αυτές οι διαφορές μπορεί να οφείλονται και στη διαφορά που παρατηρείται στην ευκρίνεια των δεδομένων περίθλασης.

Αν παρατηρήσουμε την υπέρθεση των δύο συμπλόκων (Εικόνα 61) βλέπουμε ότι ο β-γαλακτοζίτης, η ομάδα τετραζολίου και η 1-1,2,3 τριαζόλη προσδέονται παρόμοια, αλλά η ομάδα φαινυλίου και η ομάδα ναφθαλενίου των **KS782** και **HL210-2**, αντίστοιχα προσδέονται με διαφορετικό προσανατολισμό. Ωστόσο, εμφανίζονται και κάποιες διαφορές ως προς την τρισδιάστατη δομή της πρωτεΐνης και πιο συγκεκριμένα στο β-κλώνο S6. Επιπλέον, παρατηρείται διαφορά στη διαμόρφωση του καταλοίπου *Arg183*, το οποίο δημιουργεί αλληλεπιδράσεις διαμεσολαβούμενες από μόρια ύδατος με την **HL210-2**. Η διαφορά αυτή μπορεί να οφείλεται στην ισχυρή πρόσδεση της ένωσης **HL210-2** έναντι της **KS782** και των παραπάνω ενώσεων, ή μπορεί να εμφανίζει κάποιο ενεργειακό κόστος, κάτι το οποίο θα πρέπει να επαλειφθεί με βάση τις θερμοδυναμικές παραμέτρους του συμπλόκου καθώς και με τον υπολογισμό της σταθεράς πρόσδεσής της. Η τιμή της *r.m.s.d* του συμπλόκου της **HL210-2** τόσο με το σύμπλοκο της **KS782** όσο και με της λακτόζης ήταν 0.222 και 0.187 Å για τα α-άτομα C, αντίστοιχα. Οι τιμές αυτές υποδεικνύουν ότι δεν παρατηρείται σημαντική αλλαγή στη συνολική διαμόρφωση της πρωτεΐνης κατά την πρόσδεση της ένωσης.



Εικόνα 120: Η υπέρθεση των συμπλόκων **KS782** (πράσινο χρώμα) και **HL210-2** (κίτρινο χρώμα). Με ράβδους παρουσιάζονται τα κατάλοιπα της γαλεκτίνης-3.

Ο β-γαλακτοζίτης των **KS782** και **HL210-2** δημιουργεί 28 και 30 αλληλεπιδράσεις Van der Waals, αντίστοιχα, με τα καλά συντηρημένα κατάλοιπα *His158*, *Asn160*, *Arg162*, *Asn174*, *Trp181* και *Glu184* και με τη *Val172* η **KS782** (Πίνακας 29).

Η ομάδα της τετραζόλης της **KS782** σχηματίζει 4 αλληλεπιδράσεις Van der Waals, μέσω των ατόμων C7, N1 και N2, με τις πλευρικές αλυσίδες της *Arg162* και 4 με μόρια ύδατος. Η ομάδα της 1-1,2,3-τριαζόλης της **HL210-2** δημιουργεί, μέσω των ατόμων C7, C8, N1, N2 και N3, 5 αλληλεπιδράσεις Van der Waals με τις πλευρικές αλυσίδες της *Arg162* και 11 με μόρια ύδατος. Η ομάδα φαινυλίου της **KS782** σχηματίζει, μέσω των ατόμων C8-C13, 3 αλληλεπιδράσεις Van der Waals με τις πλευρικές αλυσίδες των *Arg162* και *Glu165*, ενώ η ομάδα ναφθαλενίου της **HL210-2**, μέσω των ατόμων C9-C18, σχηματίζει 13 αλληλεπιδράσεις

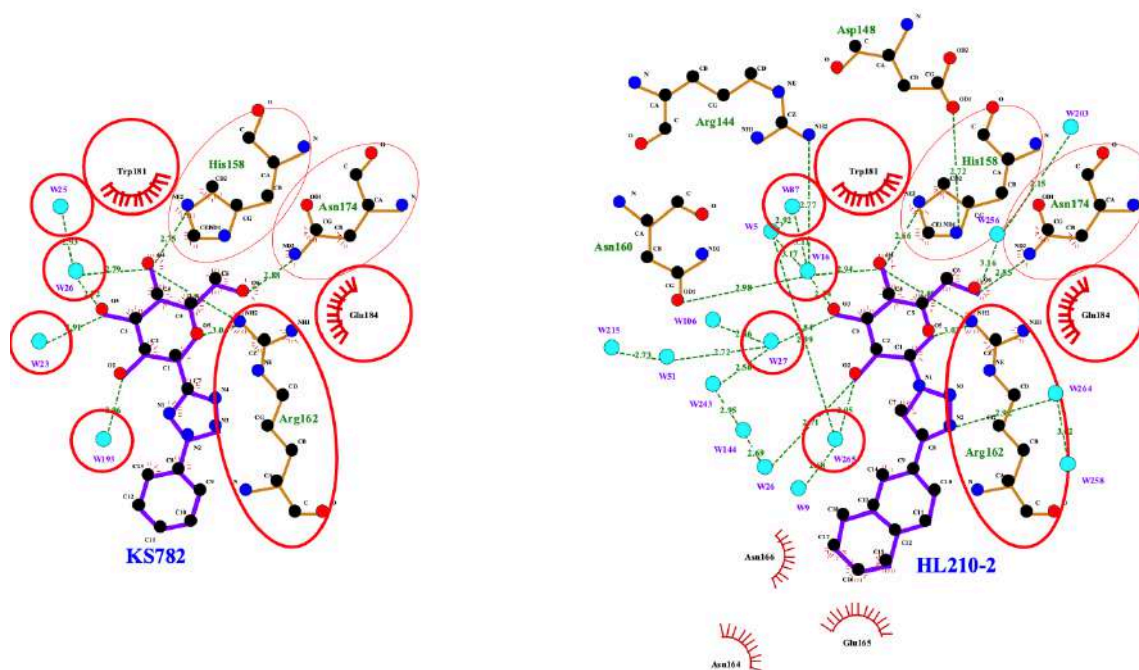
με τις πλευρικές αλυσίδες των *Arg162*, *Glu165* και *Asn166*. Συνολικά, **KS782** και **HL210-2** δημιουργούν 35 και 49 αλληλεπιδράσεις *Van der Waals*, αντίστοιχα.

Πίνακας 29: Οι αλληλεπιδράσεις *Van der Waals* που αναπτύσσονται μεταξύ των **KS782** και **HL210-2** και των καταλοίπων της CRD της Γαλεκτίνης-3.

Άτομα ένωσης	Κατάλοιπα πρωτεΐνης και μόρια ύδατος KS782	HL210-2
O4	His158(CE1, CD2) Asn160(CG)	His158(CE1, CD2) Asn160(CG)
O5	Glu184(OE2) Water-27	Glu184(OE2) Water-256
O6	Asn174(CB, CG) Glu184(CG, CD) Water-206	Asn174(CB, CG) Glu184(CG, CD) Water-203
C1	Arg162(NH2)	Arg162(NH2) Water-26 Water-256
C2	Arg162(NH2) Water-26 Water-193	Arg162(NH2) Water-5 Water-16 Water-26 Water-265
C3	Trp181(NE1) Water-23 Water-26	Trp181(NE1, CZ2, CE2) Water-16 Water-26 Water-27
C4	His158(CE1, NE2, CD2) Trp181(CE2, CZ2) Arg162 (NH2) Water-26	His158(CE1, NE2, CD2) Trp181(CE2, CZ2, NE1) Arg162 (NH2) Water-16
C5	Trp181(CE2, CD2, NE1, CG) Arg162(NH2)	Trp181(CE2, CD2, CG, NE1) Arg162(NH2) Water-256
C6	His158(CD2) Trp181(CD2) Asn174(ND2) Arg162(NH2) Glu184(OE2) Val172(CG1)	His158(CD2) Asn174(ND2, CB) Arg162(NH2) Glu184(OE2)
C7	Arg162(NH2) Water-193 Water-27	Arg162(CZ, NH1, NH2) Water-265 Water-5
C8	Arg162(NH1) Water-27	Arg162(NH1) Water-9 Water-264 Water-265
C9	Water-157	Arg162(NH1) Water-28
C10	Water-102	Water-25 Water-28 Water-30 Water-258
C11	Glu165(CG) Water-102 Water-194 Water-222	Water-10 Water-258 Water-28
C12	Water-106 Water-222	Water-10 Water-28 Water-246

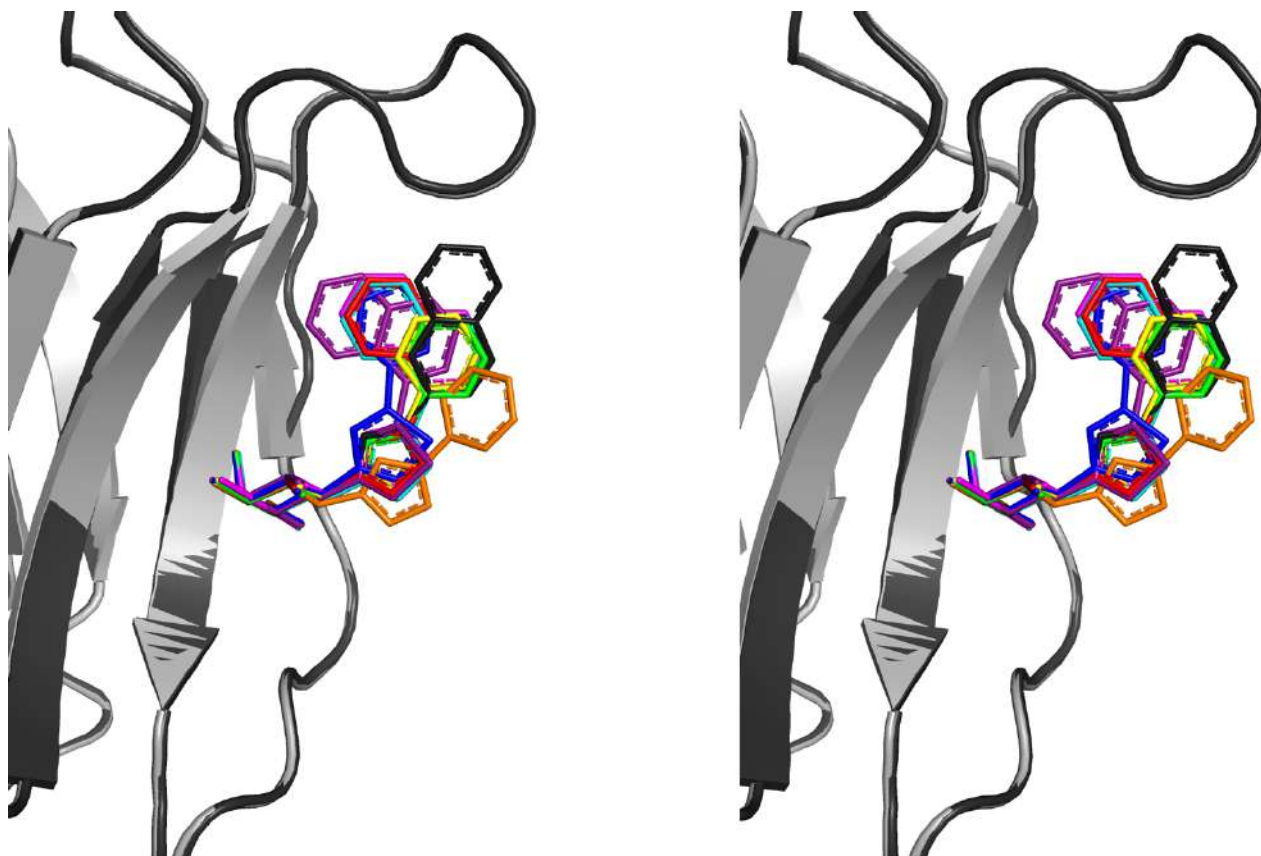
C13	Arg162(NH1) Water-193	Water-240
C14		Arg162(NH1)
C15		Glu165(CG) Asn166(ND2, OD1) Water-8 Water-10 Water-246
C16		Glu165(CA, CG) Asn166(N, OD1, CG) Water-7 Water-8 Water-147 Water-246
C17		Asn164(O) Glu165(CA, CG) Water-7 Water-147 Water-240 Water-24 Glu165(CG) Water-24 Water-240
C18		Arg162(NH2) Water-265
N1	Arg162(NH1, CZ) Water-193	Water-9
N2	Arg162(NH1) Water-193	Water-25
N3	Water-27	Water-9 Water-256 Water-264
N4	Water27	
Συνολικές αλληλεπιδράσεις		49
	35	

Επιπλέον, ο τελεστής *B* της **HL210-2** είναι μικρότερος σε σχέση με αυτόν της **KS782**. Αυτό υποδεικνύει μειωμένη ευελιξία της ένωσης κατά τη δημιουργία του συμπλόκου. Το σύμπλοκο **HL210-2** σταθεροποιείται με περισσότερα μόρια ύδατος και διαμεσολαβούμενες από μόρια ύδατος αλληλεπιδράσεις με τα κατάλοιπα *Arg144*, *Asp148* και *Asn160*, σε αντίθεση με αυτό της **KS782** (Εικόνα 121).



Εικόνα 121: Διαγράμματα LigPlot για τα σύμπλοκα της γαλεκτίνης-3-CRD με την **HL210-2** και **KS782**. Οι δεσμοί υδρογόνου απεικονίζονται με πράσινες διακεκομμένες γραμμές και τα κόκκινα τόξα απεικονίζουν τα κατάλοιπα που συμμετέχουν σε αλληλεπιδράσεις van der Waals. Οι κόκκινοι κύκλοι και ελλείψεις αναδεικνύουν τα κατάλοιπα που βρίσκονται σε ισοδύναμες θέσεις και στα δύο σύμπλοκα.

Η υπέρθεση των συμπλόκων **KM191**, **KM192**, **HA087**, **HA088**, **KISZ322**, **KISZ340**, **KISZ333IAB**, **KS782** και **HL210-2** (Εικόνα 122) υποδεικνύει ότι ο β-γαλακτοζίτης προσδένεται παρόμοια. Επιπλέον, ο υπόλοιπος συνδέτης των **KM191**, **KM192**, **HA087**, **KISZ322**, **KISZ340**, **KISZ333IAB**, **KS782** και **HL210-2** προσδένεται με παρόμοιο προσανατολισμό, ενώ ο συνδέτης της **HA088** προσδένεται με διαφορετικό. Επιπρόσθετα, παρατηρείται και διαφορά στη στερεοδιαμόρφωση της γαλεκτίνης-3 και πιο συγκεκριμένα, αλλαγή στο β-κλώνο S6 κατά την πρόσδεση της **HL210-2**. Η αλλαγή στη διαμόρφωση, πιθανότατα οφείλεται στη σταθεροποίηση του συμπλόκου και μπορεί να αποφέρει κάποιο ενεργειακό κόστος. Ωστόσο, πρέπει να πραγματοποιηθούν περαιτέρω μελέτες σχετικά με την εύρεση της σταθεράς πρόσδεσης καθώς και των θερμοδυναμικών παραμέτρων για την αξιολόγηση της αλλαγής αυτής.



Εικόνα 122: Στερεοαπεικόνιση της πρόσδεσης των ενώσεων **KM191** (μωβ χρώμα), **KM192** (μπλε σκούρο χρώμα), **HA087** (κόκκινο χρώμα), **HA088** (πορτοκαλί χρώμα), **KISZ322** (ροζ χρώμα), **KISZ340** (πράσινο χρώμα), **KISZ333IAB** (μπλε ανοιχτό χρώμα), **KS782** (κίτρινο χρώμα) και **HL210-2** (μαύρο χρώμα). Με γκρι ανοιχτό χρώμα φαίνεται η γαλεκτίνη-3, ενώ με γκρι σκούρο χρώμα φαίνεται η υπέρδεση του συμπλόκου της γαλεκτίνης-3- **HL210-2**.

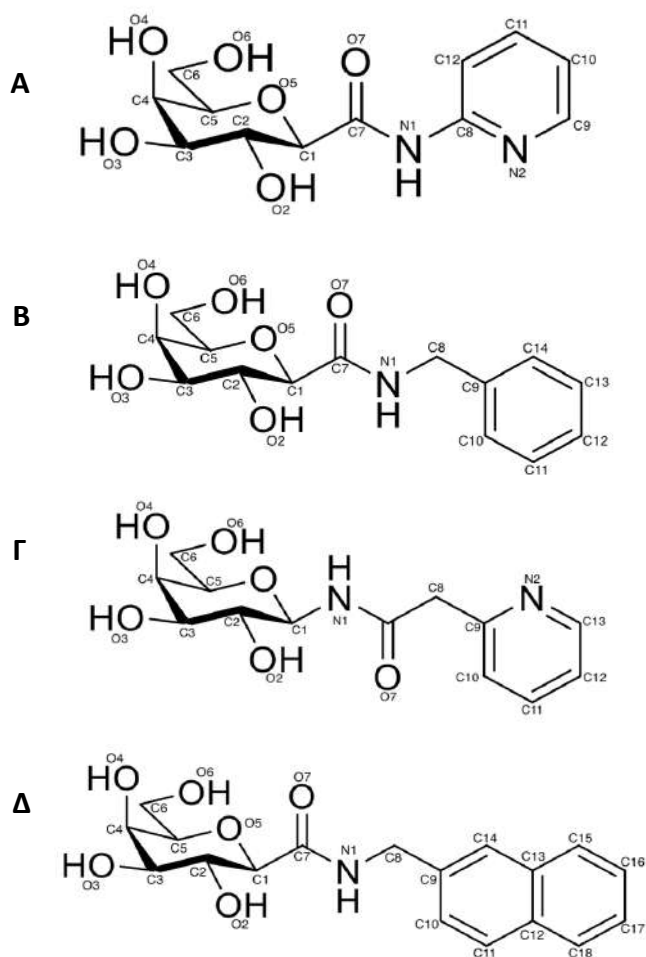
5.14 Κρυσταλλογραφικές μελέτες των ενώσεων HL με τη Γαλεκτίνη-3-CRD

Οι κρύσταλλοι της γαλεκτίνης-3-CRD εμβαπτίστηκαν σε διαλύματα των **HL233**, **HL241**, **HL247** και **HL248** συγκέντρωσης 10 mM, που είχαν και 5% (v/v) DMSO, για 2, 2, 3 και 3 ημέρες, αντίστοιχα. Η συλλογή των κρυσταλλογραφικών δεδομένων περιθλασης ακτίνων Χ πραγματοποιήθηκε όπως αναφέρθηκε στο εδάφιο 5.9.2. Στον Πίνακα 30 αναγράφονται τα στατιστικά στοιχεία που προέκυψαν από την επεξεργασία των δεδομένων.

Πίνακας 30: Σύνοψη των παραμέτρων της επεξεργασίας των κρυσταλλογραφικών δεδομένων περιθλασης ακτίνων Χ και της διαδικασίας της βελτιστοποίησης για το σύμπλοκο της γαλεκτίνης-3-CRD με τις **HL233**, **HL241**, **HL247** και **HL248**. Οι τιμές στην παρένθεση αφορούν την εξωτερική στοιβάδα ευκρίνειας.

Σύμπλοκο γαλεκτίνης-3	HL233	HL241	HL247	HL248
Ομάδα συμμετρίας χώρου	$P2_12_12_1$	$P2_12_12_1$	$P2_12_12_1$	$P2_12_12_1$
Διαστάσεις μοναδιαίας κυψελίδας (Å)	36,1, 57,9, 62,6	36,1, 57,9, 62,3	36,0, 57,5, 62,1	36,2, 57,9, 62,7
Ευκρίνεια (Å)	1,90	1,90	1,90	1,90
Εξωτερική στοιβάδα (Å)	1,94-1,90	1,94-1,90	1,94-1,90	1,94-1,90
Ανακλάσεις	43333 (1764)	43660 (1602)	47799 (1739)	53054 (2242)
Μοναδικές ανακλάσεις	10743 (535)	10647 (495)	10493 (464)	10674 (549)
R_{merge}	0,031 (0,095)	0,047 (0,107)	0,040 (0,134)	0,031 (0,082)
Πληρότητα (%)	98,8 (80,5)	98,4 (74,8)	97,9 (67,7)	98,1 (83,6)

$I/\sigma(I)$	20,8 (10,5)	15,2 (9,4)	21,6 (8,5)	21,6 (8,5)
Πολλαπλότητα	4,0 (3,3)	4,1 (3,2)	4,6 (3,7)	5,0 (4,1)
$CC^{1/2}$	0,999 (0,984)	0,997 (0,977)	0,999 (0,970)	0,998 (0,992)
B Wilson ($\text{\AA}^2$)	13,470	12,136	13,528	12,393
Ανακλάσεις που χρησιμοποιήθηκαν για τη βελτιστοποίηση	10206	10119	9970	10151
Αριθμός μορίων διαλύτη	225	193	217	246
Αριθμός ατόμων της ένωσης	20	21	21	25
R (%)	15,6	16,5	16,5	13,8
R _{free} (%)	22,2	23,7	23,2	19,7
r.m.s.d. σε μήκη δεσμών ($\text{\AA}$)	0,005	0,004	0,005	0,010
r.m.s.d. σε γωνίες δεσμών ($^\circ$)	1,3	1,2	1,3	1,6
	Μέση τιμή B ($\text{\AA}^2$)			
Άτομα πρωτεΐνης	12,8	11,7	13,1	11,3
Μόρια διαλύτη	26,1	22,8	23,8	23,6
Άτομα ένωσης	26,8	25,7	27,3	30,7



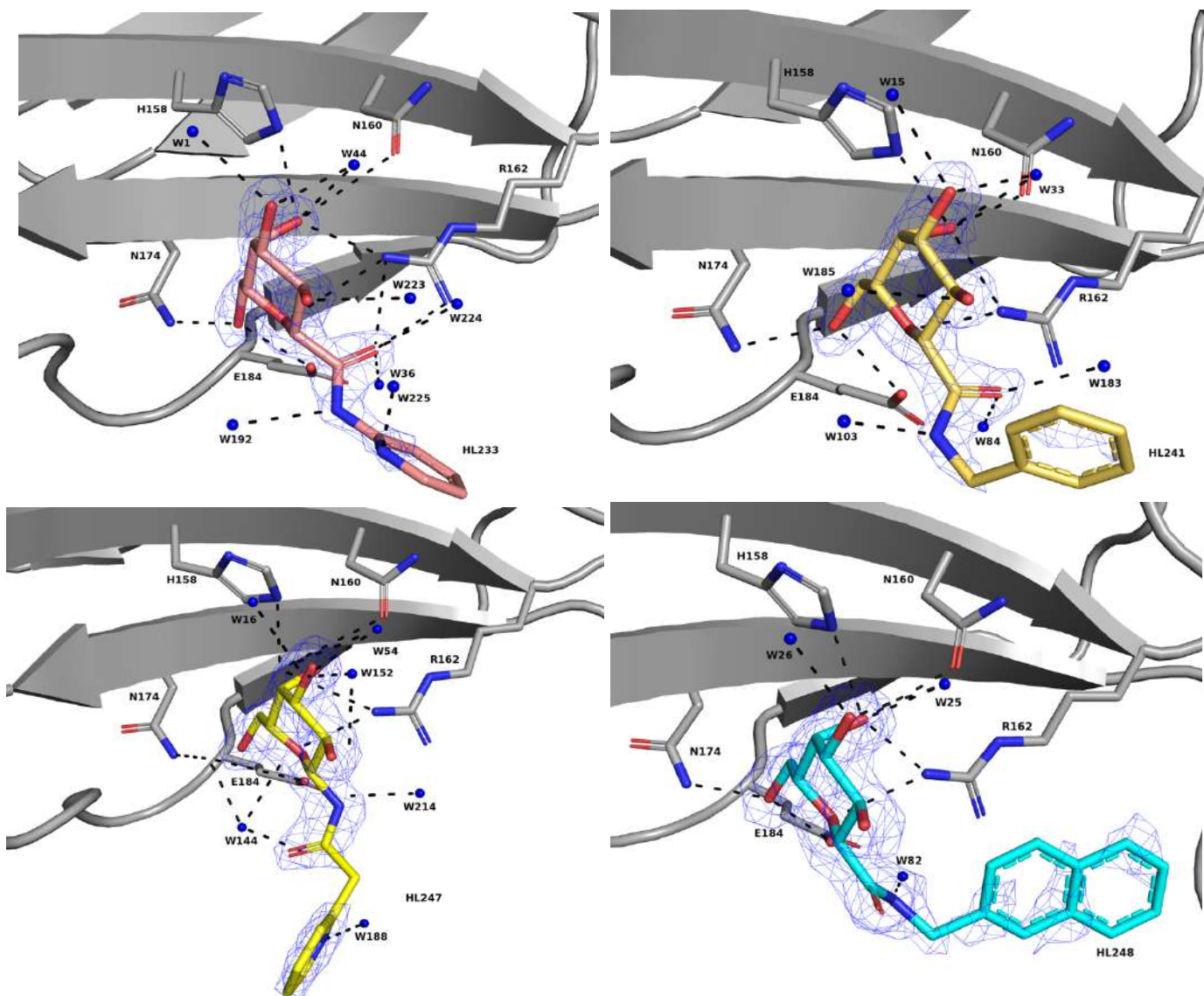
Εικόνα 123: Η χημική δομή των ενώσεων Α. **HL233** Β. **HL241** Γ. **HL247** Δ. **HL248** και η αρίθμηση που χρησιμοποιήθηκε στα κρυσταλλογραφικά πειράματα.

Η πρόσδεση του β-γαλακτοζίτη της κάθε ένωσης γίνεται με ένα τυπικό πρότυπο δεσμών υδρογόνου (Πίνακας 31 και Εικόνα 124) και αλληλεπιδράσεων *Van der Waals* (Πίνακας 32)

στις περιοχές C και D της CBS της γαλεκτίνης-3. Το καρβονύλιο της **HL233** σχηματίζει 2 δεσμούς υδρογόνου με τις πλευρικές αλυσίδες της Arg162 και 2 δεσμούς με δύο μόρια ύδατος, ενώ η ίδια ομάδα στις ενώσεις **HL241**, **HL247** και **HL248** σχηματίζει 2 δεσμούς υδρογόνου με δύο μόρια ύδατος, ένα δεσμό με ένα μόριο ύδατος και κανένα δεσμό, αντίστοιχα (Πίνακας 29 και Εικόνα 65). Επιπρόσθετα, η ομάδα της αμίνης και στις τέσσερις ενώσεις σχηματίζει ένα δεσμό υδρογόνου με ένα μόριο ύδατος (Πίνακας 31 και Εικόνα 124). Συνολικά, η πρόσδεση της κάθε ένωσης **HL233**, **HL241**, **HL247** και **HL248** σχηματίζει 8, 6, 6 και 6 δεσμούς υδρογόνου, αντίστοιχα.

Πίνακας 31: Οι δεσμοί υδρογόνου που αναπτύσσονται μεταξύ των **HL233**, **HL241**, **HL247** και **HL248** και των καταλοίπων της CRD της Γαλεκτίνης-3. Σε παρένθεση η απόσταση σε Å.

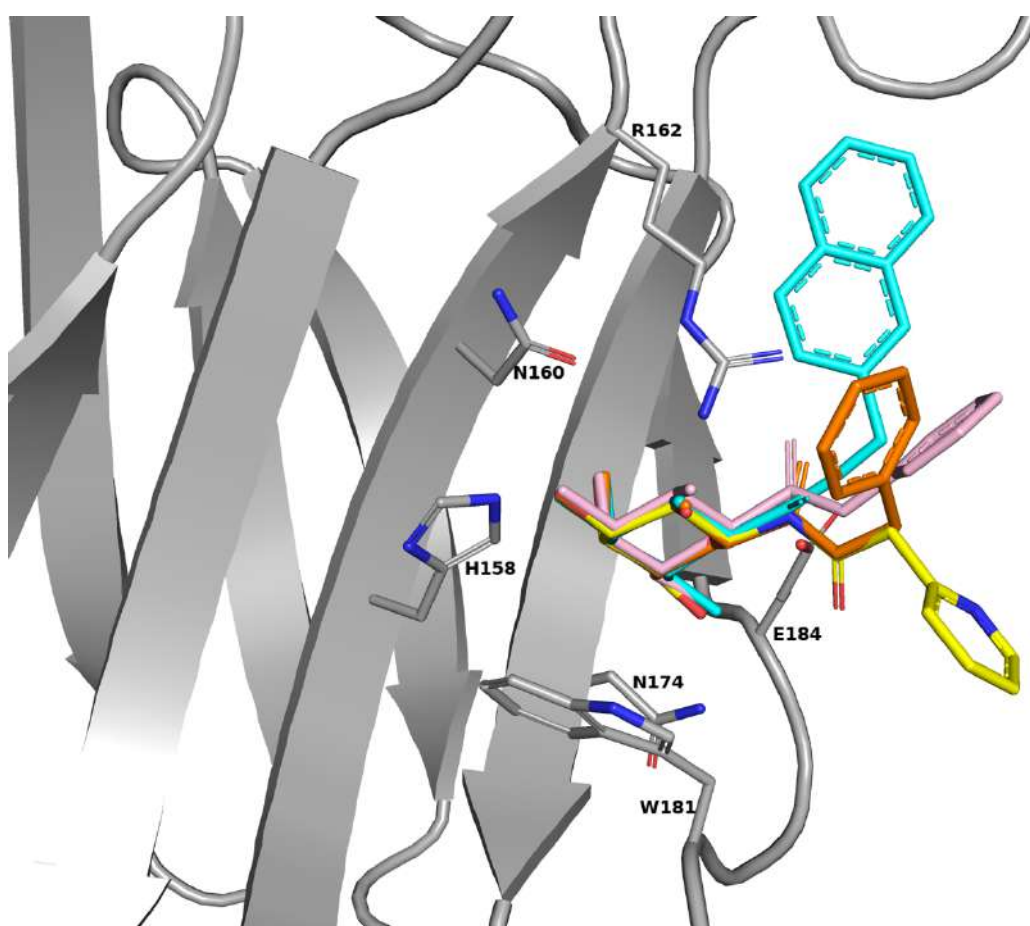
Άτομα ένωσης	Κατάλοιπα πρωτεΐνης και μόρια ύδατος			
	HL233	HL241	HL247	HL248
O2	Water-223 (2,7)	Water-185 (3,2)	Water-152 (3,2)	
O3	Water-1 (2,9)	Water-15 (2,8)	Water-16: (3,0)	Water-25 (2,8)
	Water-44 (2,7)	Water-33 (2,6)	Water-54 (2,6) Water-152 (2,7)	Water-26 (2,8)
O4	His158(NE2) (2,8)	His158(NE2) (2,8)	His158(NE2) (2,8)	His158(NE2) (2,7)
	Asn160(OD1) (3,1)	Asn160(OD1) (3,1)	Asn160(OD1) (3,1)	Asn160(OD1) (3,1)
	Arg162(NH2) (2,9)	Arg162(NH2) (2,8)	Arg162(NH2) (2,8)	Arg162(NH2) (2,8)
	Water-44 (2,8)	Water-33 (2,7)	Water-54 (2,8)	Water-25 (2,9)
O5	Arg162(NH2) (3,1)	Arg162(NH2) (3,1)	Arg162(NH2) (3,1) Water-144 (3,3)	Arg162(NH2) (3,1)
O6	Asn174(ND2) (2,9)	Asn174(ND2) (2,8)	Asn174(ND2) (2,8)	Asn174(ND2) (2,8)
	Glu184(OE2) (2,7)	Glu184(OE2) (2,8)	Glu184(OE2) (2,8) Water-144 (2,9)	Glu184(OE2) (2,6)
O7	Arg162(NH1) (3,3)	Water-84 (3,0)	Water-144 (2,4)	
	Arg162(NH2) (2,9)	Water-183 (2,6)		
	Water-36 (2,8)			
	Water-224 (2,8)			
N1	Water-192 (3,1)	Water-103 (2,9)	Water-214 (2,6)	Water-82 (2,7)
N2	Water-225 (2,6)		Water-188 (2,8)	
Συνολικοί δεσμοί υδρογόνου	8	6	6	6



Εικόνα 124: Οι δεσμοί υδρογόνου που δημιουργούνται κατά την πρόσδεση των **HL233**, **HL241**, **HL247** και **HL248** στην CRD της γαλεκτίνης-3. Με διακεκομμένες γραμμές απεικονίζονται οι δεσμοί υδρογόνου και ως μπλε σφαίρες αναπαρίστανται τα μόρια ύδατος. Παρουσιάζονται οι χάρτες 2Fo-Fc για των ενώσεων. Ο χάρτης ήταν προσαρμοσμένος σε 1.0 σ πριν την ενσωμάτωση των μορίων των ενώσεων στη διαδικασία της βελτιστοποίησης.

Στα τέσσερα σύμπλοκα, μόρια ύδατος διαμεσολαβούν αλληλεπιδράσεις δεσμών υδρογόνου. Η πρόσδεση των ενώσεων σχηματίζει αλληλεπιδράσεις δεσμών υδρογόνου μέσω των ατόμων του β-γαλακτοζίτη και των πλευρικών αλυσίδων των καταλοίπων της πρωτεΐνης. Πιο συγκεκριμένα, η **HL233** δημιουργεί 21 αλληλεπιδράσεις μέσω δύο μορίων ύδατος, με τα *Tyr118*, *Asn119*, *Asn143*, *Arg144*, *Ala146*, *Asp148*, *Gln150*, *Asn160*, *Phe163*, *Asn164*, *Asn166*, *Gly235*, *Ser237* και *Gly238*. Η **HL241** σχηματίζει 16 αλληλεπιδράσεις μέσω τριών μορίων ύδατος, με τα *Asn143*, *Arg144*, *Asp148*, *Asn160*, *Phe163*, *Asn180* και *Trp181*. Η **HL247** δημιουργεί 20 αλληλεπιδράσεις μέσω δύο μορίων ύδατος, με τα *Asn143*, *Arg144*, *Asp148*, *Asn153*, *Gln150*, *Asn160*, *Phe163*, *Asn164*, *Lys176*, *Trp181* και *Ser237*. Η **HL248** σχηματίζει 15

αλληλεπιδράσεις μέσω δύο μορίων ύδατος, με τις πλευρικές αλυσίδες των *Arg144*, *Asn143*, *Asp148*, *Asn160*, *Phe163*, *Asn164* και *Ser237*, όπως φαίνεται στους παρακάτω πίνακες. Επιπρόσθετα, παρατηρούνται αλλαγές στους δεσμούς υδρογόνου που διαμεσολαβούνται από μόρια ύδατος. Πιο συγκεκριμένα, ένα μόριο ύδατος που αλληλεπιδρά με την ομάδα καρβονυλίου των ενώσεων **HL233** και **HL241** διαμεσολαβεί τρεις και δύο αλληλεπιδράσεις δεσμών υδρογόνου, αντίστοιχα, με τις πλευρικές αλυσίδες των *Arg162* και *Glu184* και *Glu165*. Επιπρόσθετα, η αμινομάδα των **HL241** και **HL248** διαμεσολαβεί σε 3 και 10 αλληλεπιδράσεις δεσμών υδρογόνου, αντίστοιχα με τις πλευρικές αλυσίδες των *Trp181* και *Asn180*, και *Arg162*, *Glu165*, *Asn166*, *Trp181*, *Asn180* και *Glu184*. Οι διαφορές αυτές δικαιολογούνται από τον τρόπο πρόσδεσης των ενώσεων αυτών, που αποκαλύπτονται από την υπέρθεση των συμπλόκων (Εικόνα 125). Ο β-γαλακτοζίτης προσδένεται παρόμοια, ενώ ο υπόλοιπος συνδέτης με διαφορετικό προσανατολισμό. Αυτό οφείλεται στη διαφορετική θέση του καρβονυλίου μεταξύ των **HL233**, **HL241** και **HL248**, σε αντίθεση με την **HL247**, η οποία προσδένεται σε αντίθετη κατεύθυνση.



Εικόνα 125: Υπέρθεση των τεσσάρων συμπλόκων. Με γκρι χρώμα φαίνεται η CRD της γαλεκτίνης-3, με ροζ χρώμα η **HL233**, με πορτοκαλί χρώμα η **HL241**, με κίτρινο χρώμα η **HL247** και με μπλε χρώμα η **HL248**. Στην εικόνα φαίνονται με ράβδους τα καλά συντηρημένα κατάλοιπα της CBS της γαλεκτίνης-3.

Η πρόσδεση του β-γαλακτοζίτη της κάθε ένωσης γίνεται με ένα τυπικό πρότυπο αλληλεπιδράσεων *Van der Waals* (Πίνακας 32) στις περιοχές C και D της CBS της γαλεκτίνης-

3. Εμφανίζονται πολλές διαφορές στις αλληλεπιδράσεις που δημιουργούνται μεταξύ των καταλοίπων της πρωτεΐνης και τα άτομα του συνδέτη. Η καρβονυλομάδα της **HL233** δημιουργεί μία αλληλεπίδραση *Van der Waals* με την Arg162 και 4 μορίων ύδατος, ενώ η ίδια ομάδα των υπόλοιπων ενώσεων δημιουργεί αλληλεπιδράσεις μόνο με μόρια ύδατος (Πίνακας 30). Επιπρόσθετα, η αμινομάδα των **HL233** και **HL247** δημιουργεί αλληλεπιδράσεις *Van der Waals* με δύο μόρια ύδατος και η **HL248** δημιουργεί ένα δεσμό υδρογόνου με την Arg162, ενώ η **HL241** δεν δημιουργεί καμία αλληλεπίδραση. Η ομάδα 2-πυριμιδίνης της **HL233** δεν δημιουργεί αλληλεπιδράσεις *Van der Waals* με κατάλοιπα την πρωτεΐνης αλλά με 11 μόρια ύδατος, ενώ η ομάδα της 6-πυριμιδίνης της **HL247** με 6 μόρια ύδατος. Η ομάδα φαινυλίου της **HL241** δημιουργεί 4 αλληλεπιδράσεις *Van der Waals* με 4 μόρια ύδατος. Τέλος, η ομάδα ναφθαλενίου της **HL248** δημιουργεί 18 αλληλεπιδράσεις *Van der Waals* με τα Arg162, Asn164 και Glu165 και 16 με μόρια ύδατος, τα οποία αποτελούν ένδειξη για την πιο ισχυρή πρόσδεση της ένωσης αυτής.

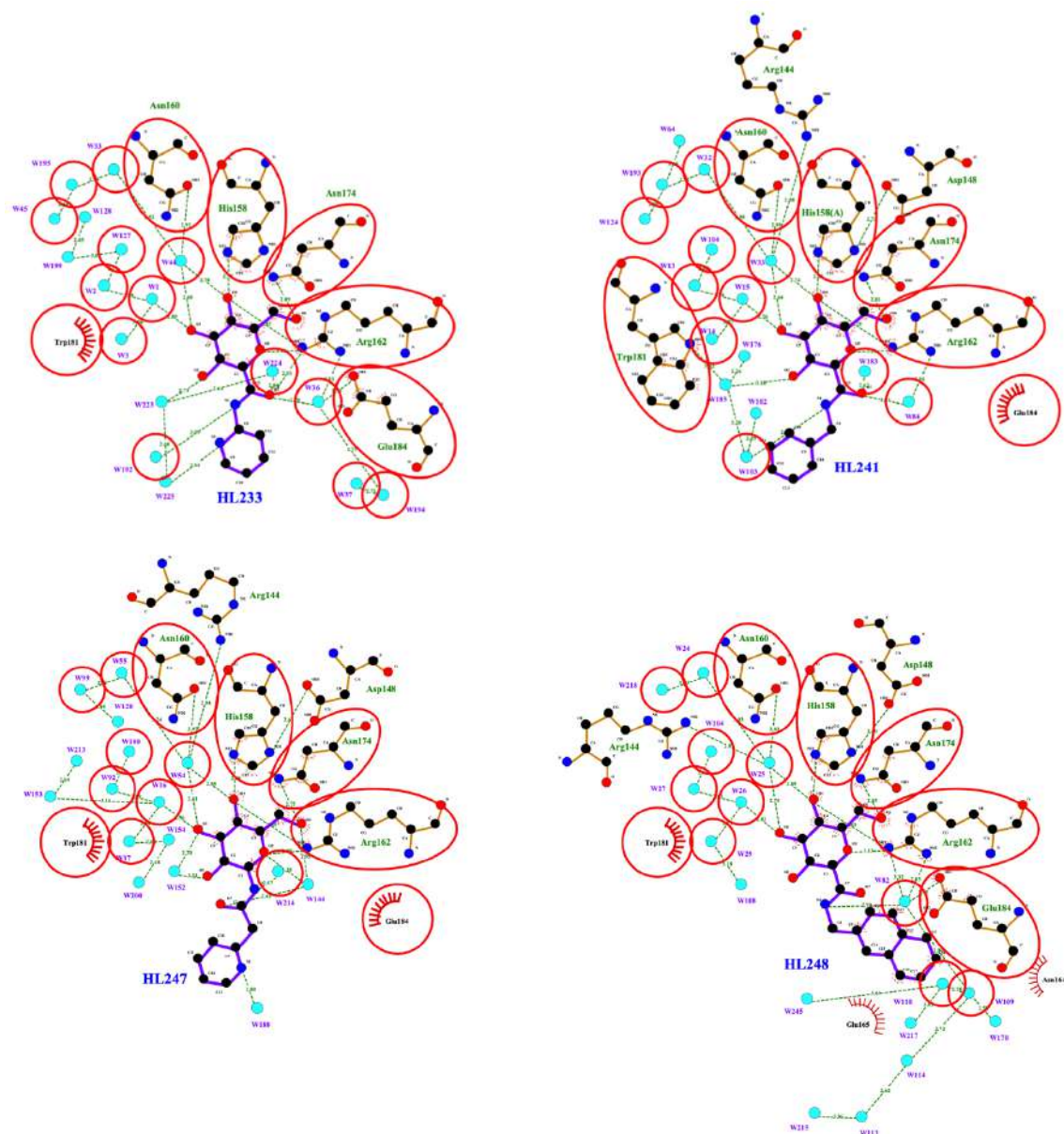
Πίνακας 32: Οι αλληλεπιδράσεις *Van der Waals* που αναπτύσσονται μεταξύ των ενώσεων **HL233**, **HL241**, **HL247** και **HL248** και των καταλοίπων της CRD της Γαλεκτίνης-3.

Άτομα ένωσης	HL233	Κατάλοιπα πρωτεΐνης και μόρια ύδατος		
	HL241	HL247	HL248	
O2	Water-225 Water-192		Water-213 Water-214 Water-153	Water-103
O3				His158(NE2)
O4	His158(CE1, CD2) Asn160(CG)	His158(CE1, CD2) Asn160(CG) Arg162(CZ)	His158(CE1, CD2)	His158(CE1, CD2) Asn160(CG)
O5	Glu184(OE2) Water-36	Glu184(OE2) Water-84	Glu184(OE2) Water-33	Glu184(OE2) Water-82 Water-112
O6	Glu184(CG, CD) Asn174(CB, CG) Water-191	Glu184(CG, CD) Asn174(CB, CG) Water-156	Glu184(CG, CD) Asn174(CB, CG)	Asn174(CB, CG) Glu184(CG, CD) Water-112 Water-215
O7	Arg162(CZ) Water-223	Arg162(NH1, NH2, CZ)	Water-188	
C1	Arg162(NH2) Water-192	Arg162(NH2) Water-103	Arg162(NH2) Water-144 Water-214	Arg162(NH2) Water-112
C2	Arg162(NH2) Water-44 Water-223	Arg162(NH2) Water-33 Water-185	Arg162(NH2) Water-54 Water-152 Water-214	Water-25 Water-103
C3	Trp181(NE1) Water-1 Water-44	Trp181(NE1, CE2) Water-15 Water-33 Water-185	Trp181(NE1, CE2) Water-16 Water-54 Water-152	Trp181(NE1, CE2, CZ2) Water-25 Water-26
C4	His158(NE2, CD2) Trp181(CE2, CZ2) Arg162 (NH2) Water-44	His158(CE1, NE2, CD2) Trp181(CE2, CZ2, NE1) Arg162 (NH2) Water-33	His158(CE1, NE2, CD2) Trp181(CE2, CZ2, NE1) Arg162 (NH2) Water-54	His158(CE1, NE2, CD2) Trp181(CE2, CZ2, NE1) Arg162 (NH2) Water-25
C5	Trp181(CE2, CD2, NE1, CG) Arg162(NH2)	Trp181(CE2, CD1, CD2, NE1, CG) Arg162(NH2)	Trp181(CE2, CD2, NE1, CG) Arg162(NH2) Water-144	Trp181(CE2, CD2, NE1, CG) Arg162(NH2)
C6	His158(CD2)	His158(NE2, CD2)	Asn174(CB, ND2)	Asn174(CB, ND2)

	Trp181(CD2)	Asn174(ND2)	Arg162(NH2)	Arg162(NH2)
	Asn174(ND2)	Arg162(NH2)	Glu184(OE2)	Glu184(OE2)
	Arg162(NH2)	Glu184(OE2)	Val172(CG1)	Val172(CG1)
	Glu184(OE2)	Val172(CG1)	Water-144	
	Val172(CG1)			
C7	Arg162(NH2)	Water-84	Water-144	Water-82
	Water-36	Water-183	Water-188	
	Water-192	Water-103	Water-214	
	Water-223			
	Water-224			
C8	Water-192	Water-103	Water-188	Water-82
	Water-225		Water-214	Water-109
				Water-170
C9	Water-225		Water-188	Arg162(NH1)
				Water-82
C10		Water-103		Arg162(CZ, NH1, NH2)
				Water-82
				Water-103
C11	Water-37			Arg162(NE, CZ, NH1, NH2)
	Water-194			Water-103
C12	Water-36			Arg162(NH1)
	Water-37			
	Water-194			
C13		Water-183	Water-188	Water-110
C14		Water-183		Water-110
C15				Water-23
				Water-218
C16				Asn164(O)
				Glu165(CA, CB, CG)
				Water-23
				Water-81
C17				Glu165(CA, CB, CG)
				Water-81
C18				Glu165(CG)
				Water-110
				Water-217
N1	Water-36		Water-33	Arg162(NH2)
	Water-225		Water-144	
N2	Water-192			
Συνολικές αλληλεπιδράσεις	29	35	28	48

Οι τελεστές *B* των ενώσεων είναι περίπου οι ίδιοι. Σύμφωνα με όλα τα παραπάνω, πιθανότατα η **HL248**, η οποία δημιουργεί περισσότερες αλληλεπιδράσεις μέσω δεσμών υδρογόνου που διαμεσολαβούνται από μόρια ύδατος καθώς και περισσότερες αλληλεπιδράσεις *Van der Waals*, εμφανίζει μεγαλύτερη συγγένεια ως προς τη γαλεκτίνη-3. Ακόμα, η **HL248** σταθεροποιείται από έξι μόρια ύδατος τα οποία δεν υπάρχουν στα υπόλοιπα σύμπλοκα (Εικόνα 126). Η ένωση αυτή θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως ένωση-οδηγός, όπου με την κατάλληλη χημική τροποποίηση και προσθήκη υποκαταστατών να συντεθούν ενώσεις που θα εμφανίζουν υψηλότερη συγγένεια και πιο ισχυρή πρόσδεση στην πρωτεΐνη στόχο. Ωστόσο, κρίνεται αναγκαία η μελέτη του θερμοδυναμικού προφίλ δημιουργίας του συμπλόκου της κάθε ένωσης που έχει μελετηθεί καθώς και η εύρεση της σταθεράς πρόσδεσης. Παρόλο που εμφανίζονται διαφορές στις αλληλεπιδράσεις *Van der Waals* και στους δεσμούς υδρογόνου κατά την πρόσδεση των ενώσεων, η ερμηνεία τους είναι αρκετά

δύσκολη καθώς δεν παρατηρείται κάποια αλλαγή στην τρισδιάστατη δομή της πρωτεΐνης, πέρα από την πρόσδεση της **HL210-2**.



Εικόνα 126: Διαγράμματα LigPlot για τα σύμπλοκα της γαλεκτίνης-3-CRD με την **HL233**, **HL241**, **HL247** και **HL248**. Οι δεσμοί υδρογόνου απεικονίζονται με πράσινες διακεκομμένες γραμμές και τα κόκκινα τόξα παρουσιάζουν τα κατάλοιπα που συμμετέχουν σε αλληλεπιδράσεις van der Waals. Οι κόκκινοι κύκλοι και ελλείψεις αναδεικνύουν τα κατάλοιπα που βρίσκονται σε ισοδύναμες θέσεις και στα τέσσερα σύμπλοκα.

Για όλες τις παραπάνω ενώσεις που προσδένονται στη γαλεκτίνη-3 υπολογίστηκε η ελεύθερη ενέργεια πρόσδεσης (Πίνακας 33), μέσω του διαδικτυακού διακομιστή *PRODIGY LIG* [206, 207].

Πίνακας 33: Οι τιμές της ελεύθερης ενέργειας πρόσδεσης και οι τιμές K_D που υπολογίστηκαν μέσω του προγράμματος PRODIGY.

Ένωση	ΔG (Kcal/mol)	K_D (μM)
KM191	-8,21	0,9
KM192	-7,06	6,6
KS782	-6,22	27,5
KISZ340	-6,54	16,1
KISZ333	-7,75	2,1
KISZ322	-7,71	2,2
HL2102	-7,22	5,1
HL248	-8,13	1,1
HL247	-6,40	20,4
HL241	-6,80	10,4
HL233	-6,56	15,5
HA088	-6,54	16,1
HA087	-7,63	2,6
LL80	-7,23	5,0

Παρατηρούμε ότι όλες οι ενώσεις εμφανίζουν τιμές K_D της τάξεως των μM , με καλύτερη να αναδεικνύεται η **KM191** και η **HL248**. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τα κρυσταλλογραφικά δεδομένα, όπως αναλύθηκε και στα παραπάνω εδάφια. Ωστόσο, οι υπολογισμοί των τιμών πραγματοποιήθηκαν και για τις ενώσεις τους εδαφίου 5.9.1.2, όπως φαίνεται και στον Πίνακα 34.

Πίνακας 34: Οι τιμές της ελεύθερης ενέργειας πρόσδεσης και οι τιμές K_D που υπολογίστηκαν μέσω του προγράμματος PRODIGY για τις ενώσεις του εδαφίου 5.9.1.2.

Ένωση	ΔG (Kcal/mol)	K_D (μM)
13	-7,34	4,1
14	-6,94	8,2
15	-6,91	8,6
17	-7,14	5,8

Οι τιμές αυτές, πέρα από την τιμή K_D της **14**, δεν συμφωνούν με τα πειραματικά αποτελέσματα. Εν τούτοις, αυτές οι τιμές δείχνουν ότι οι ενώσεις αυτές εμφανίζουν σημαντική αγχιστεία ως προς τη γαλεκτίνη-3. Το πρόγραμμα αυτό μπορεί να κάνει μια αρχική εκτίμηση ως προς την εξειδίκευση ενώσεων έναντι της πρωτεΐνης στόχου αλλά δεν μπορεί να γίνει ακριβής εκτίμηση, καθώς τα πειραματικά με τα υπολογιστικά δεδομένα εμφανίζουν σημαντικές διαφορές (Πίνακας 34).

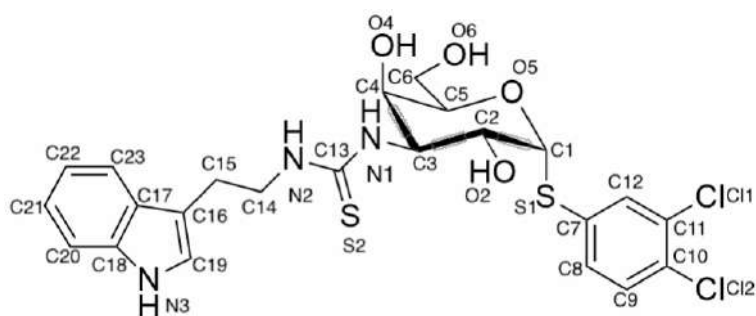
6.1 Κρυσταλλογραφικές μελέτες πρόσδεσης της ένωσης **HMOB11-1** στη γαλεκτίνη-7

Πραγματοποιήθηκε συγκρυστάλλωση της υπό μελέτη ένωσης **HMOB11-1**, σε συγκέντρωση 1 mM, με τη γαλεκτίνη-7 (10 mg/mL). Οι κρύσταλλοι αναπτύχθηκαν σε 0,1 M Tris-HCl, pH 8,0,

0,1 M NaCl, and 20% (w/v) PEG 8000, μετά από 4 ημέρες. Η συλλογή των κρυσταλλογραφικών δεδομένων περίθλασης ακτίνων Χ διεξήχθη στις εγκαταστάσεις συγχροτρονικής ακτινοβολίας EMBL-Hamburg στο σταθμό P13. Ο κάθε κρύσταλλος λαμβάνεται με την χρήση βρόχου, εμβαπτίζεται σε κρυοπροστατευτικό διάλυμα 30% (v/v) γλυκερόλης με συνθήκη κρυστάλλωσης. Στον Πίνακα 35 αναγράφονται τα στατιστικά που προέκυψαν από την επεξεργασία των δεδομένων.

Πίνακας 35: Σύνοψη των παραμέτρων της επεξεργασίας των κρυσταλλογραφικών δεδομένων περίθλασης ακτίνων Χ και της διαδικασίας της βελτιστοποίησης για το σύμπλοκο της γαλεκτίνης-7 με την ένωση HMOB-11-1. Οι τιμές στην παρένθεση αφορούν την εξωτερική στοιβάδα ευκρίνειας.

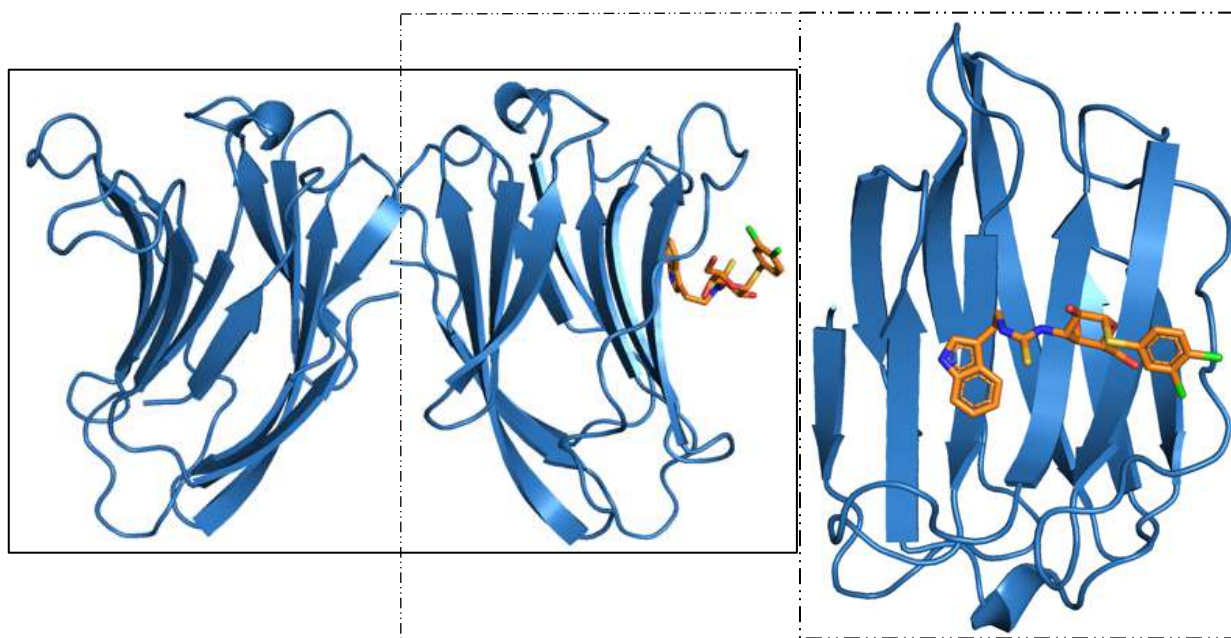
Σύμπλοκο γαλεκτίνης-7	HMOB11-1
Ομάδα συμμετρίας χώρου	$P2_12_12_1$
Διαστάσεις μοναδιαίας κυψελίδας (Å)	53,9 65,5 74,3
Ευκρίνεια (Å)	1,72
Εξωτερική στοιβάδα	1,75-1,72
Ανακλάσεις	192386 (9697)
Μοναδικές ανακλάσεις	28742 (1470)
R_{merge}	0,045 (0,966)
Πληρότητα (%)	99,8 (97,7)
$I/\sigma(I)$	17,0 (1,6)
Πολλαπλότητα	6,7 (6,6)
$CC^{1/2}$	0,999 (0,808)
B Wilson (Å ²)	40,5
Ανακλάσεις που χρησιμοποιήθηκαν για τη βελτιστοποίηση	27235
Αριθμός μορίων διαλύτη	166
Αριθμός ατόμων της ένωσης	34
R (%)	18,7
R_{free} (%)	22,3
r.m.s.d. σε μήκη δεσμών (Å)	0,014
r.m.s.d. σε γωνίες δεσμών (°)	1,9
Μέση τιμή B (Å ²)	
Άτομα πρωτεΐνης A	34,2
Άτομα πρωτεΐνης B	51,2
Μόρια διαλύτη	48,6
Άτομα ένωσης	58,6



HMOB11-1

Εικόνα 127: Η χημική δομή της ένωσης **HMOB11-1** και η αρίθμηση που χρησιμοποιήθηκε στα κρυσταλλογραφικά πειράματα.

Το σύμπλοκο της γαλεκτίνης-7 κρυσταλλώθηκε ως διμερές (Εικόνα 128), όπως αναφέρθηκε και στο εδάφιο 5.9.2. Πιο συγκεκριμένα, το διμερές κρυσταλλώνεται μέσω των β-κλώνων F1-F5 και σταθεροποιείται μέσω δεσμών υδρογόνου που δημιουργούνται μεταξύ οχτώ καταλοίπων του μονομερούς A με οχτώ κατάλοιπα του μονομερούς B και αλληλεπιδράσεων *Van der Waals*. Η ένωση έχει προσδεθεί μόνο στο μονομερές B. Η περιοχή πρόσδεσης υδατανθράκων στο μονομερές A μπλοκάρει από τα συμμετρικά κατάλοιπα 22-26 και 128-131. Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώνεται καθώς η γαλεκτίνη-7, σε αντίθεση με τις πρωτότυπες γαλεκτίνες 1 και 2, αναγνωρίζει τους υδατάνθρακες ως μονομερές και όχι ως διμερές [86]. Το μονομερές B εμφανίζει μεγαλύτερη τιμή του τελεστή *B* καθώς δημιουργούνται περισσότερες αλληλεπιδράσεις τόσο με την ένωση όσο και με το συμμετρικό μόριο.

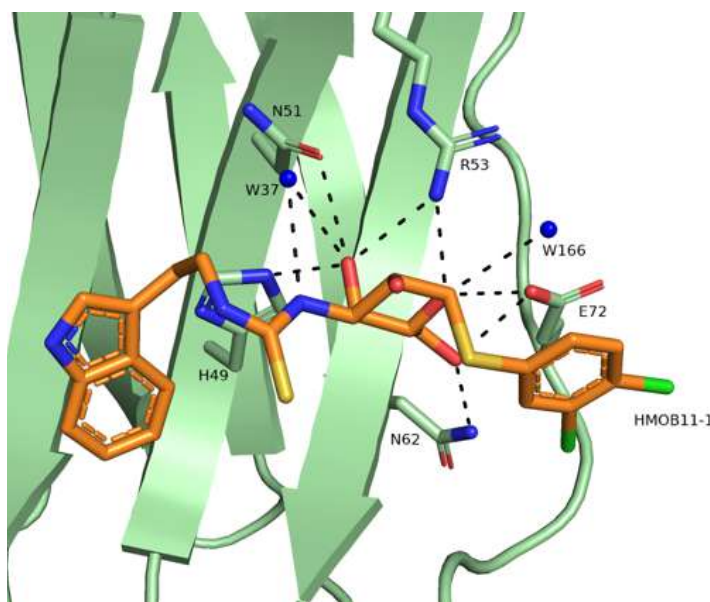


Εικόνα 128: Το διμερές του συμπλόκου γαλεκτίνης-7-**HMOB11-1**.

Ο β-γαλακτοζίτης της **HMOB11-1** δημιουργεί το ίδιο πρότυπο δεσμών υδρογόνου και αλληλεπιδράσεων *Van der Waals* με τα συντηρημένα κατάλοιπα της γαλεκτίνης-7, ίδιο με αυτό της λακτόζης και άλλων υδατανθρακικών ενώσεων [79, 86, 208]. Πιο συγκεκριμένα, το O4 δημιουργεί δεσμούς υδρογόνου με τα His49, Asn51, Arg53, το O5 με τα Arg53 και Glu72 και το O6 με τα Asn62 και Glu72. Επιπλέον η πρόσδεση της Gly-1 σταθεροποιείται μέσω αλληλεπιδράσεων *Van der Waals* με τα His49, Arg53, Val60, Asn62, Glu72 και αλληλεπιδράσεις επιστοίβαξης με την Trp69. Συνολικά δημιουργούνται 7 δεσμοί υδρογόνου με τα κατάλοιπα της πρωτεΐνης μέσω του β-γαλακτοζίτη (Πίνακας 36 και Εικόνα 129).

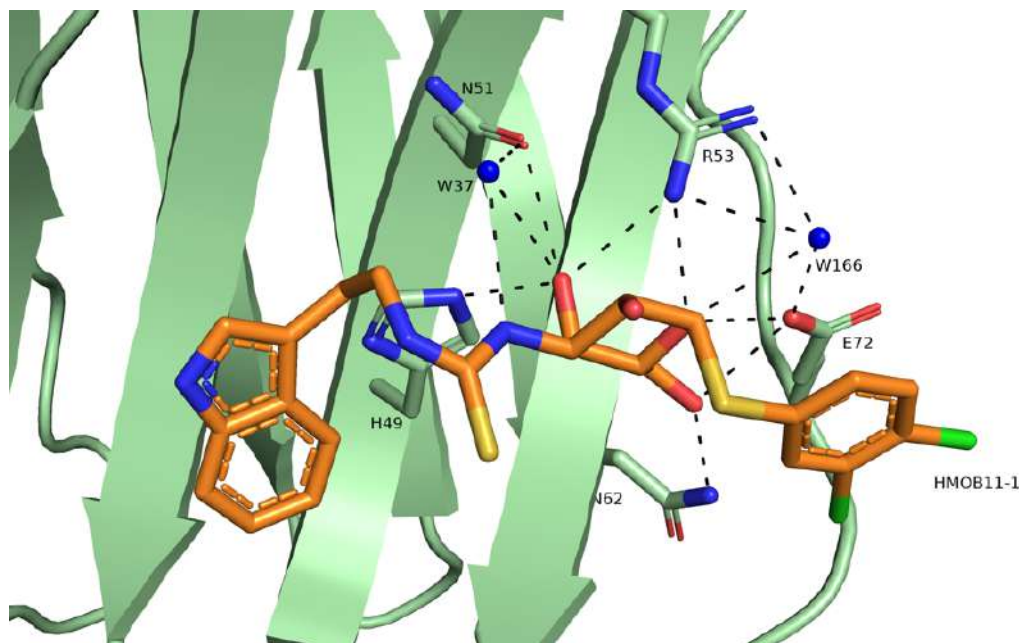
Πίνακας 36: Οι δεσμοί υδρογόνου που δημιουργούνται μεταξύ των ατόμων της ένωσης **HMOB11-1** με τα κατάλοιπα της γαλεκτίνης-7. Σε παρένθεση η απόσταση σε Å.

Άτομα ένωσης HMOB-11-1	Κατάλοιπα πρωτεΐνης και μόρια ύδατος
O4	His49(NE2) (2,8) Asn51(OD1) (3,2) Arg53(NH2) (3,0) Water37 (3,2)
O5	Arg53(NH2) (2,9) Glu72(OE2) (3,2) Water-166 (3,2)
O6	Asn62(ND2) (2,8) Glu72(OE2) (2,8)
N1	Water-37 (3,3)
Συνολικοί δεσμοί υδρογόνου	7



Εικόνα 129: Οι δεσμοί υδρογόνου που δημιουργούνται μεταξύ της ένωσης **HMOB11-1** (πορτοκαλί χρώμα) με τα κατάλοιπα της γαλεκτίνης-7 (πράσινο χρώμα). Με μπλε σφαίρες απεικονίζονται τα μόρια ύδατος, ως ράβδοι φαίνονται τα κατάλοιπα της πρωτεΐνης και με διακεκομμένες μαύρες γραμμές απεικονίζονται οι δεσμοί υδρογόνου.

Ένα δίκτυο αλληλεπιδράσεων 5 δεσμών υδρογόνου που διαμεσολαβείται από μόρια ύδατος με τις πλευρικές αλυσίδες των *Asn51*, *Arg53* και *Glu72* σταθεροποιεί περαιτέρω την πρόσδεση. Το κατάλοιπο *Asn51* είναι μη συντηρημένο και αποτελεί μοναδικό χαρακτηριστικό της γαλεκτίνης-7, έναντι των υπόλοιπων γαλεκτινών (Εικόνα 130).



Εικόνα 130: Οι δεσμοί υδρογόνου και το δίκτυο αλληλεπιδράσεων που διαμεσολαβείται από μόρια ύδατος που δημιουργούνται μεταξύ της ένωσης **HMOB11-1** (πορτοκαλί χρώμα) με τα κατάλοιπα της γαλεκτίνης-7 (πράσινο χρώμα). Με μπλε σφαίρες απεικονίζονται τα μόρια ύδατος, ως ράβδοι τα κατάλοιπα της πρωτεΐνης και με διακεκομμένες μαύρες γραμμές οι δεσμοί υδρογόνου.

Το σύμπλοκο σταθεροποιείται μέσω αλληλεπιδράσεων *Van der Waals* με τα μη συντηρημένα κατάλοιπα της γαλεκτίνης-7. Πιο συγκεκριμένα, οι C15, C19 και N3 σχηματίζουν αλληλεπιδράσεις *Van der Waals* με την *His33* και τα C21 και C22 με την *Lys64*. Επιπλέον, το N3 δημιουργεί αλληλεπίδραση με το μη συντηρημένο κατάλοιπο *Glu122* και το C22 με τα *Asn35* και *Leu37*. Συνολικά δημιουργούνται 46 αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ατόμων της ένωσης **HMOB11-1** με τα κατάλοιπα της πρωτεΐνης (Πίνακας 37).

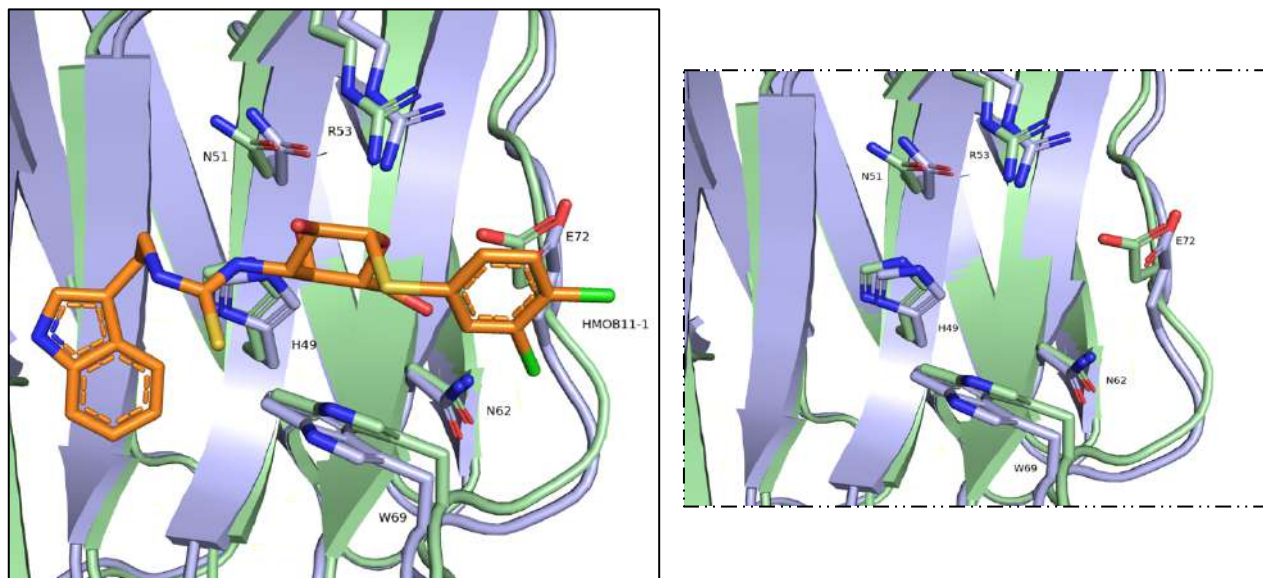
Πίνακας 37: Οι αλληλεπιδράσεις *Van der Waals* που δημιουργούνται μεταξύ των ατόμων της **HMOB11-1** με τα κατάλοιπα της πρωτεΐνης.

Άτομα ένωσης	Κατάλοιπα πρωτεΐνης και μόρια ύδατος
O4	His49(CE1, CD2)
O6	Asn62(CG, CB)
	Glu72(CG, CD)
S1	Trp69(NE1)
S2	Trp69(CZ2, NE1)
C1	Arg53(NH2)
	Water-166
C2	Arg53(NH2)
	Water-37

C3	Trp69(CZ2) Water-37
C4	His49(NE2, CD2) Arg53(NH2) Trp69(CZ2, CE2)
C5	Arg53(NH2) Trp69(CE2) Glu72(OE2)
C6	His49(CD2) Arg53(NH2) Val60(CG1) Asn62(CB, ND2) Glu72(OE2)
C7	Glu72(OE2) Water-166
C8	Water-166
C9	Glu72(OE2) Water-166
C10	Glu72(CD, OE1, OE2)
C11	Glu72(CD, OE2)
C12	Trp69(CG, CD1) Glu72(OE2)
C14	Water-37
C15	His33(ND1) His49(CE1, NE2) Water-37
C16	His33(NE2) His49(CE1)
C17	Asn35(OD1) His49(CE1)
C18	Asn35(OD1)
C19	His33(NE2, CD2, CE1) Water-128
C20	Asn35(OD1) His49(ND1, CE1) Trp69(CH2, CZ2)
C21	Lys64(NZ) Trp69(CH2, CZ2)
C22	Asn35(OD1) Leu37(CD2) Lys64(NZ)
C23	Asn35(OD1)
CI1	Asn62(ND2) Trp69(CB) Gly70(O) Glu72(CG) Water-8 Water-131
CI2	Glu72(OE1) Water-8 Water-9
N3	Asn35(OD1) His33(NE2) Glu122(OE2) Water-128
Συνολικές αλληλεπιδράσεις	
46	

Η τιμή της *r.m.s.d.* που προέκυψε μετά από της υπέρθεση του συμπλόκου **HMOB11-1** ως προς τη δομή της ελεύθερης από ενώσεις γαλεκτίνη-7 (*PDB ID: 1BKZ*) για όλη την πρωτεΐνη

ήταν 0.6 Å για τα α-άτομα C (Εικόνα 131). Οι τιμή αυτή υποδεικνύει ότι δεν παρατηρείται σημαντική αλλαγή στη συνολική διαμόρφωση της πρωτεΐνης κατά την πρόσδεση της ένωσης.



Εικόνα 131: Η υπέρθεση του συμπλόκου της γαλεκτίνης-7 με την **HMOB11-1** (πράσινο χρώμα) με την ελεύθερη από ενώσεις γαλεκτίνης-7 (μωβ χρώμα).

Με όλα τα παραπάνω, φαίνεται πως η ένωση αυτή εμφανίζει υψηλή εξειδίκευση ως προς τη γαλεκτίνη-7 καθώς το σύμπλοκο δημιουργεί ένα δίκτυο δεσμών υδρογόνου διαμεσολαβούμενο από μόρια ύδατος και αλληλεπιδράσεις *Van der Waals* με τα μη συντηρημένα κατάλοιπα της γαλεκτίνης-7 ($K_D = 2,4 \mu M$). Η συγγένεια των ενώσεων που στοχεύουν τη γαλεκτίνη-7 αυξάνεται με τη δημιουργία δεσμών και αλληλεπιδράσεων με τα κατάλοιπα *Arg31*, *His33*, *Asn35*, *Asn51*, *Lys64* και *Glu122* [70]. Λόγω της υψηλής συγγένειας και ειδικότητας, πραγματοποιούνται πειράματα *ex vivo* για την εύρεση της επίδρασης της σε κατάλληλες κυτταρικές σειρές, με στόχο την αντιμετώπιση του καρκίνου των ωοθηκών. Τα πειράματα αυτά εκτελούνται από τους συνεργάτες μας στο Πανεπιστήμιο *Lund* υπό την επίβλεψη του *Prof. Ulf Nilsson*.

ΕΠΙΛΟΓΟΣ

Οι γαλεκτίνες αποτελούνται από μια καλά συντηρημένη επικράτεια, με μέγεθος περίπου 130 αμινοξικών καταλοίπων, στην οποία προσδένονται υδατάνθρακες που αποτελούνται από β-γαλακτοζίτες. Η επιλεκτικότητα αυτή προσδίδει στην οικογένεια την ικανότητα να ρυθμίζει μία πληθώρα βιολογικών λειτουργιών. Παρόλη την υψηλή συντήρηση, η επιλεκτικότητα της κάθε γαλεκτίνης είναι διαφορετική και προκαλείται από τα αμινοξικά κατάλοιπα των μη καλά συντηρημένων περιοχών της επικράτειας. Εμπλέκονται και ρυθμίζουν πολλές παθολογικές καταστάσεις όπως είναι ο καρκίνος, καρδιοαγγειακές παθήσεις, νευρολογικές παθήσεις, στην απόκριση του ανοσοποιητικού συστήματος, στις αυτοάνοσες ασθένειες κτλ. [25, 121]. Πολλές μελέτες έχουν αναδείξει τις γαλεκτίνες ως θεραπευτικούς στόχους για τη θεραπεία πολλών ασθενειών. Αρκετές, μέχρι σήμερα, προσπάθειες έχουν πραγματοποιηθεί με στόχο την εύρεση ανταγωνιστών που θα προσδένονται ισχυρά και θα εμφανίζουν ειδικεύση ως προς τα μέλη της οικογένειας των γαλεκτινών. Οι ανταγωνιστές αυτοί μπορεί να είναι είτε ενώσεις με βάση υδατάνθρακες ή φυσικούς προσδέτες των γαλεκτινών που στοχεύουν στην *CRD*, σύνθετοι υδατάνθρακες φυτικής προέλευσης που αποτελούνται από μόρια γαλακτόζης και πεπτιδομιμητικά που στοχεύουν άλλες περιοχές των γαλεκτινών και επηρεάζουν τη συγγένεια και την πρόσδεση στην *CRD* [146]. Οι πρώτες ενώσεις που σχεδιάστηκαν αποτελούνται από χημικά τροποποιημένους μονο- ή δισακχαρίτες οι οποίοι βασίζονται στη δομή της γαλακτόζης, της λακτόζης, της *TDG*, της ταλόζης και της λακοτουλόζης [169, 209, 210]. Οι ενώσεις αυτές δρουν ανταγωνιστικά, ικανές να προσδένονται στην *CRD* των γαλεκτινών εμποδίζοντας την πρόσδεση των φυσικών προσδετών. Έχουν αναπτυχθεί αρκετές τροποποιήσεις των φυσικών προσδετών με στόχο τη βελτίωση της συγγένειας. Η μοναδική χημειοειδική τύπου γαλεκτίνη-3 αποτελεί μία από τις πιο μελετημένες πρωτεΐνες της οικογένειας. Εμπλέκεται σε πολλές παθοφυσιολογικές καταστάσεις και γίνονται πολλές προσπάθειες για την ανάπτυξη ενώσεων που θα προσδένονται ειδικά και θα μπορούσαν να εξελιχθούν ως εν δυνάμει φάρμακα [54, 211, 212]. Μέχρι σήμερα, έχουν πραγματοποιηθεί περίπου 31 κλινικές μελέτες, οι οποίες μελετούν την επίδραση των ενώσεων που προσδένονται στη γαλεκτίνη-3 στην ανάπτυξη καρκινικών όγκων, στην οστεοαρθρίτιδα, στην πνευμονική ίνωση καθώς και στη νόσο *COVID-19* [135, 137, 144]. Οι ενώσεις αυτές μπορεί να είναι συνθετικές μικρού και μεγάλου μοριακού βάρους, μονοκλωνικά αντισώματα και φυσικά πολυμερή όπως είναι οι πηκτίνες [54, 58]. Οι πιο ειδικοί και με υψηλή συγγένεια ανταγωνιστές ως προς τη γαλεκτίνη-3 που έχουν βρεθεί μέχρι σήμερα, είναι ανάλογα θειοδιγαλακτόζης που φέρουν υποκαταστάτες άρυλ-τριαζόλης στον C3 και των δύο μορίων της γαλακτόζης, και εμφανίζουν τιμές K_D της τάξεως των *nM* [168–170]. Μία τέτοια ένωση αποτελεί η GB0139, η οποία βρίσκεται σε φάση 2b κλινικών μελετών για τη θεραπεία της πνευμονικής ίνωσης (NCT03832946) [213].

Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκαν σαράντα έξι ενώσεις, με κρυσταλλογραφία ακτινών-Χ και μελέτες *ITC*, με στόχο την εύρεση της κατάλληλων ενώσεων-οδηγών για την περαιτέρω ανάπτυξη νέων ανάλογων, που θα εμφανίζουν υψηλή εξειδίκευση και συγγένεια ως προς τη γαλεκτίνη-3. Οι ενώσεις αυτές αποτελούνται από τον κοινό κορμό του β-D-

γαλακτοπυρανοζίτη και φέρουν διαφορετικούς υποκαταστάτες, όπως ομάδες φαινυλίου, πυριμιδίνης, τριαζόλης, τετραζόλης και καρβονυλίων. Επιπλέον, μελετήθηκαν και ενώσεις θειοδισακχαριτών,, οι οποίες αποτελούνται από δύο σάκχαρα που προσδένονται μεταξύ τους μέσω 1→2 δεσμών παρά με 1→1, που έχουν ήδη μελετηθεί [58, 140]. Λόγω της υψηλής συντήρησης της *CRD* στην οικογένεια των λεκτινών η πρόσδεση των παραπάνω ενώσεων μελετήθηκε και σε άλλα μέλη της οικογένειας αυτής και πιο συγκεκριμένα στις γαλεκτίνες-7 και 8*N*, με στόχο την εύρεση ειδικών ενώσεων-οδηγών για τη γαλεκτίνη-3.

Στην παρούσα διατριβή, βρέθηκαν οι ενώσεις **HA087**, **HA088**, **KS782**, **HL210-2**, **KISZ322**, **KISZ340**, **KISZ333IAB**, **KM191**, **KM192**, **HL233**, **HL241**, **HL247** και **HL248**, οι οποίες εμφανίζουν επιλεκτικότητα στην γαλεκτίνη-3, έναντι των γαλεκτινών-7, και 8*N*. Λόγω αυτού, με περαιτέρω μελέτες σχετικά με την εύρεση των τιμών K_D και των θερμοδυναμικών παραμέτρων πρόσδεσής τους, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ενώσεις-οδηγοί για την ανάπτυξη νέων εκλεκτικών και ισχυρών ενώσεων έναντι της γαλεκτίνης-3, παρέχοντας νέες προοπτικές για τη θεραπευτική προσέγγιση πληθώρας ασθενειών. Επιπλέον, μελετήθηκε ο τρόπος πρόσδεσης των 1,2-θειοδισακχαριτών, όπου βρέθηκε επιλεκτικότητα των διαφορετικών ανάλογων στις υπό μελέτη γαλεκτίνες. Πιο συγκεκριμένα, η **14** εμφανίζει χαμηλή συγγένεια έναντι της γαλεκτίνης-3, ενώ η **13** εμφανίζει επιλεκτικότητα έναντι της γαλεκτίνης-7 και η **17** έναντι της γαλεκτίνης-8. Οι διαφορές αυτές μπορούν να αξιοποιηθούν κατάλληλα για την ανάπτυξη ειδικών ενώσεων που θα στοχεύουν στην ειδική πρόσδεση σε κάθε μέλος. Στη γαλεκτίνη-10 δεν προσδέθηκε καμία ένωση. Τέλος, μελετήθηκε ο τρόπος πρόσδεσης της ένωσης **HMOB11-1** στη μονομερή γαλεκτίνη-7. Η ένωση αυτή εμφανίζει υψηλή συγγένεια πρόσδεσης της τάξεως των μM και πραγματοποιούνται μελέτες *ex vivo* για την εύρεση της αποτελεσματικότητας της για τη θεραπεία του καρκίνου των ωοθηκών.

SUMMARY

Galectins are involved in many biological processes, generally functioning by interacting with various cell surface glycoconjugates, targeting β -galactoside epitopes. The β -galactoside binding feature is attributed to the evolutionally conserved carbohydrate recognition domain (CRD) where the glycan binding takes place. Currently, 16 galectins have been found in mammals out of which 12 are expressed in humans. Human galectins can be divided into three subgroups according to their CRD distribution: the prototype galectins, which contain one CRD (galectins 1, 2, 7, 10, 13, 14 and 16), the tandem-repeat galectins which consist of two CRDs (galectins 4, 8, 9 and 12) and the chimera-type galectins (galectin-3). The only member of chimeric galectins has a single CRD at the C-terminus and a short non-lectin peptide motif at the N-terminus. Its CRD consists of 130-140 residues which fold into two antiparallel β -sheets of 6 (S1-S6) and 5 β -strands (F1- F5), respectively. Galectins have a role in many pathophysiological processes such as cardiovascular diseases, cancer development and progression, autoimmune diseases, and metabolic disorders.

The unique chimera-type galectin-3 is one of the most well-studied members of this family. Galectin-3 is involved in a plethora of diseases, with emphasis those associated with chronic inflammation, and it is currently a validated pharmaceutical target. Pharmaceutical industry is employing various strategies, for the design and development of potent synthetic small molecule antagonists or large biologics from natural sources to target galectin-3 for therapeutic intervention. The most potent antagonists thus far, are thiodigalactoside derivatives carrying aryl-triazolyl moieties attached to C-3 of both galactose units with affinities for galectin-3 in the low nanomolar range. One compound of this class, GB0139, is currently in phase 2b clinical trials against lung fibrosis (NCT03832946).

Acknowledging the potential of galectin-3 for the development of potent drugs, we studied the binding of 46 compounds to galectin-3 by X-ray crystallography and ITC. We studied two group of compounds. The first group were thiodisaccharides, where the two sugar rings are linked via sulfur by 1 $\rightarrow$ 2 bonds instead of 1 $\rightarrow$ 1 which was present in the thiodigalactosides studied thus far. The second group were compounds that had a β -D-galactopyranoside core decorated with various substituents such as phenyl, pyrimidine, triazole, tetrazole and carbonyl groups. Due to the high conservation of galectins' CRD their binding mode was also studied in galectins 7, 8N and 10.

The best antagonist of the first group displayed a K_D value of 8 μ M for galectin-3. Analysis of the thermodynamic binding parameters revealed that the binding Gibbs free energy (ΔG) of the compounds in the first group was dominated by enthalpy (ΔH). The structural mode of binding of 1,2-thiodisaccharides to galectin-3 was studied by X-ray crystallography that uncovered the unique role of water-mediated hydrogen bonds in conferring enthalpy-driven affinity enhancement for the new antagonists. This 1,2-thiodisaccharide type scaffold represents a new lead for galectin-3 inhibitor discovery and offers several possibilities for further development.

From 41 compounds in the second group, 14 antagonists were found to be more selective for galectin-3, over galectins 7, 8N and 10. These antagonists can serve as lead compounds for the development of selective galectin-3 compounds, providing new perspectives for the therapeutic intervention of various diseases. In parallel, we determined the structural mode of binding of a potent antagonist ($K_D = 2.4 \mu\text{M}$) of galectin-7 to highlight the structural elements that confer selectivity for this galectin.

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

Συντμήσεις αμινοξέων	
Αλανίνη	Ala (A)
Αργινίνη	Arg (R)
Ασπαραγίνη	Asn (N)
Ασπαρτικό	Asp (D)
Βαλίνη	Val (V)
Γλουταμίνη	Gln (Q)
Γλουταμινικό	Glu (E)
Γλυκίνη	Gly (G)
Θρεονίνη	Thr (T)
Ισολευκίνη	Ile (I)
Ιστιδίνη	His (H)
Κυστεΐνη	Cys (C)
Λευκίνη	Leu (L)
Λυσίνη	Lys (K)
Μεθειονίνη	Met (M)
Προλίνη	Pro (P)
Σερίνη	Ser (S)
Τρυπτοφάνη	Trp (W)
Τυροσίνη	Tyr (Y)
Φαινυλαλανίνη	Phe (F)

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Kaltner, H., Abad-Rodríguez, J., Corfield, A.P., Kopitz, J., Gabius, H.-J.: The sugar code: letters and vocabulary, writers, editors and readers and biosignificance of functional glycan–lectin pairing. *Biochemical Journal*. 476, 2623–2655 (2019). <https://doi.org/10.1042/BCJ20170853>
2. Robert J., Ouellette, J., David Rawn: *Principles of Organic Chemistry*. (2015)
3. Gabius, H.J., Cudic, M., Diercks, T., Kaltner, H., Kopitz, J., Mayo, K.H., Murphy, P. V., Oscarson, S., Roy, R., Schedlbauer, A., Toegel, S., Romero, A.: What is the Sugar Code?, (2022)
4. Gabius, H.J., Roth, J.: *An introduction to the sugar code*, (2017)
5. Cummings, R.D.: The repertoire of glycan determinants in the human glycome. *Mol Biosyst*. 5, 1087 (2009). <https://doi.org/10.1039/b907931a>
6. Yarema, K.J., Bertozzi, C.R.: Characterizing glycosylation pathways. *Genome Biol*. 2, (2001)
7. Kaltner, H., Abad-Rodríguez, J., Corfield, A.P., Kopitz, J., Gabius, H.-J.: The sugar code: Letters and vocabulary, writers, editors and readers and biosignificance of functional glycan–lectin pairing, (2019)
8. Trouvelot, S., Héloir, M.C., Poinssot, B., Gauthier, A., Paris, F., Guillier, C., Combier, M., Trdá, L., Daire, X., Adrian, M.: Carbohydrates in plant immunity and plant protection: Roles and potential application as foliar sprays, (2014)
9. VanTeeffelen, J.W., Brands, J., Stroes, E.S., Vink, H.: Endothelial Glycocalyx: Sweet Shield of Blood Vessels, (2007)
10. Nieuwdorp, M., Meuwese, M.C., Mooij, H.L., Ince, C., Broekhuizen, L.N., Kastelein, J.J.P., Stroes, E.S.G., Vink, H.: Measuring endothelial glycocalyx dimensions in humans: a potential novel tool to monitor vascular vulnerability. *J Appl Physiol* (1985). 104, 845–52 (2008). <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00440.2007>
11. Gabius, H.-J.: *Animal lectins*, (1997)
12. Cao, X., Du, X., Jiao, H., An, Q., Chen, R., Fang, P., Wang, J., Yu, B.: Carbohydrate-based drugs launched during 2000–2021. *Acta Pharm Sin B*. 12, 3783–3821 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2022.05.020>
13. Wang, J., Zhang, Y., Lu, Q., Xing, D., Zhang, R.: Exploring Carbohydrates for Therapeutics: A Review on Future Directions. *Front Pharmacol*. 12, (2021). <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.756724>
14. Ghazarian, H., Idoni, B., Oppenheimer, S.B.: A glycobiology review: Carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics, (2011)
15. Minko, T.: Drug targeting to the colon with lectins and neoglycoconjugates. *Adv Drug Deliv Rev*. 56, 491–509 (2004). <https://doi.org/10.1016/j.addr.2003.10.017>
16. Gorelik, E., Galili, U., Raz, A.: On the role of cell surface carbohydrates and their binding proteins (lectins) in tumor metastasis. (2001)
17. Lectins: Function, structure, biological properties and potential applications.
18. Mariño, K. V., Cagnoni, A.J., Croci, D.O., Rabinovich, G.A.: Targeting galectin-driven regulatory circuits in cancer and fibrosis, (2023)
19. Drickamer, K.: Two Distinct Classes of Carbohydrate-recognition Domains in Animal Lectins". (1988)
20. Raposo, C.D., Canelas, A.B., Barros, M.T.: Human lectins, their carbohydrate affinities and where to find them. *Biomolecules*. 11, 1–22 (2021). <https://doi.org/10.3390/biom11020188>
21. Kiran K. Kumar: Biological role of lectins: A review. *J. of Orofacial Sciences*. 4, (2012)

22. Radhakrishnan, A., Chellapandian, H., Ramasamy, P., Jeyachandran, S.: Back2Basics: animal lectins: an insight into a highly versatile recognition protein. *J Proteins Proteom.* (2022). <https://doi.org/10.1007/s42485-022-00102-4>
23. Mayer, S., Raulf, M.K., Lepenies, B.: C-type lectins: their network and roles in pathogen recognition and immunity, (2017)
24. Raposo, C.D., Canelas, A.B., Barros, M.T.: Human lectins, their carbohydrate affinities and where to find them. *Biomolecules.* 11, 1–22 (2021). <https://doi.org/10.3390/biom11020188>
25. Cooper, D.N.W., Barondes, S.H.: MINI REVIEW God must love galectins; He made so many of them 2. Oxford University Press *Glycobiology* (1999)
26. Dodd, R.B., Drickamer, K.: Lectin-like proteins in model organisms: implications for evolution of carbohydrate-binding activity. *Glycobiology.* 11, 71R-79R (2001). <https://doi.org/10.1093/glycob/11.5.71R>
27. Barondes, S.H., Castronovo, V., Cooper, D.N.W., Cummings, R.D., Drickamer, K., Felzi, T., Gitt, M.A., Hirabayashi, J., Hughes, C., Kasai, K., Leffler, H., Liu, F.-T., Lotan, R., Mercurio, A.M., Monsigny, M., Pillai, S., Poirer, F., Raz, A., Rigby, P.W.J., Rini, J.M., Wang, J.L.: Galectins: A family of animal β -galactoside-binding lectins. *Cell.* 76, 597–598 (1994). [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90498-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90498-7)
28. Di Lella, S., Sundblad, V., Cerliani, J.P., Guardia, C.M., Estrin, D.A., Vasta, G.R., Rabinovich, G.A.: When galectins recognize glycans: From biochemistry to physiology and back again. *Biochemistry.* 50, 7842–7857 (2011). <https://doi.org/10.1021/bi201121m>
29. Modenutti, C.P., Capurro, J.I.B., Di Lella, S., Martí, M.A.: The Structural Biology of Galectin-Ligand Recognition: Current Advances in Modeling Tools, Protein Engineering, and Inhibitor Design, (2019)
30. Chan, Y.C., Lin, H.Y., Tu, Z., Kuo, Y.H., Hsu, S.T.D., Lin, C.H.: Dissecting the structure–Activity relationship of galectin–Ligand interactions, (2018)
31. Seetharaman, J., Kanigsberg, A., Slaaby, R., Leffler, H., Barondes, S.H., Rini, J.M.: X-ray crystal structure of the human galectin-3 carbohydrate recognition domain at 2.1-Å resolution. *J Biol Chem.* 273, 13047–52 (1998). <https://doi.org/10.1074/jbc.273.21.13047>
32. Hirabayashi, J., Kasai, K.-I.: The family of metazoan metal-independent β -galactoside-binding lectins: structure, function and molecular evolution. (1993)
33. Houzelstein, D., Gonçalves, I.R., Fadden, A.J., Sidhu, S.S., Cooper, D.N.W., Drickamer, K., Leffler, H., Poirier, F.: Phylogenetic analysis of the vertebrate galectin family. *Mol Biol Evol.* 21, 1177–87 (2004). <https://doi.org/10.1093/molbev/msh082>
34. Si, Y., Yao, Y., Jaramillo Ayala, G., Li, X., Han, Q., Zhang, W., Xu, X., Tai, G., Mayo, K.H., Zhou, Y., Su, J.: Human galectin-16 has a pseudo ligand binding site and plays a role in regulating c-Rel-mediated lymphocyte activity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects.* 1865, 129755 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2020.129755>
35. Bertuzzi, S., Quintana, J.I., Ardá, A., Gimeno, A., Jiménez-Barbero, J.: Targeting Galectins With Glycomimetics, (2020)
36. Ri-Yao Yang: Galectins: structure, function and therapeutic potential. <https://doi.org/10.1017/S1462399408000719>
37. Camby, I., Le Mercier, M., Lefranc, F., Kiss, R.: Galectin-1: a small protein with major functions. *Glycobiology.* 16, 137R-157R (2006). <https://doi.org/10.1093/glycob/cwl025>
38. Dumić, J., Dabelić, S., Flögel, M.: Galectin-3: An open-ended story, (2006)
39. Bernerd, F., Sarasin, A., Magnaldo, T.: Galectin-7 overexpression is associated with the apoptotic process in UVB-induced sunburn keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96, 11329–34 (1999). <https://doi.org/10.1073/pnas.96.20.11329>

40. Gendronneau, G., Sidhu, S.S., Delacour, D., Dang, T., Calonne, C., Houzelstein, D., Magnaldo, T., Poirier, F.: Galectin-7 in the control of epidermal homeostasis after injury. *Mol Biol Cell*. 19, 5541–9 (2008). <https://doi.org/10.1091/mbc.e08-02-0166>
41. Hotta, K., Funahashi, T., Matsukawa, Y., Takahashi, M., Nishizawa, H., Kishida, K., Matsuda, M., Kuriyama, H., Kihara, S., Nakamura, T., Tochino, Y., Bodkin, N.L., Hansen, B.C., Matsuzawa, Y.: Galectin-12, an Adipose-expressed Galectin-like Molecule Possessing Apoptosis-inducing Activity. *J Biol Chem*. 276, 34089–97 (2001). <https://doi.org/10.1074/jbc.M105097200>
42. Yang, R.-Y., Hsu, D.K., Yu, L., Chen, H.-Y., Liu, F.-T.: Galectin-12 is required for adipogenic signaling and adipocyte differentiation. *J Biol Chem*. 279, 29761–6 (2004). <https://doi.org/10.1074/jbc.M401303200>
43. Itoh, A., Nonaka, Y., Nakakita, S. ichi, Yoshida, H., Nishi, N., Nakamura, T., Kamitori, S.: Structures of human galectin-10/monosaccharide complexes demonstrate potential of monosaccharides as effectors in forming Charcot-Leyden crystals. *Biochem Biophys Res Commun*. 525, 87–93 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.02.037>
44. Sakula, A.: Charcot-Leyden crystals and Curschmann spirals in asthmatic sputum. (1986)
45. Modenutti, C.P., Capurro, J.I.B., Di Lella, S., Martí, M.A.: The Structural Biology of Galectin-Ligand Recognition: Current Advances in Modeling Tools, Protein Engineering, and Inhibitor Design, (2019)
46. Yang, R.Y., Rabinovich, G.A., Liu, F.T.: Galectins: Structure, function and therapeutic potential. *Expert Rev Mol Med*. 10, (2008). <https://doi.org/10.1017/S1462399408000719>
47. Di Lella, S., Sundblad, V., Cerliani, J.P., Guardia, C.M., Estrin, D.A., Vasta, G.R., Rabinovich, G.A.: When galectins recognize glycans: From biochemistry to physiology and back again. *Biochemistry*. 50, 7842–7857 (2011). <https://doi.org/10.1021/bi201121m>
48. Haudek, K.C., Patterson, R.J., Wang, J.L.: SR proteins and galectins: what's in a name? *Glycobiology*. 20, 1199–1207 (2010). <https://doi.org/10.1093/glycob/cwq097>
49. López-Lucendo, M.F., Solís, D., André, S., Hirabayashi, J., Kasai, K.I., Kaltner, H., Gabius, H.J., Romero, A.: Growth-regulatory human galectin-1: Crystallographic characterisation of the structural changes induced by single-site mutations and their impact on the thermodynamics of ligand binding. *J Mol Biol*. 343, 957–970 (2004). <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.08.078>
50. Cho, M., Cummings, R.D.: Galectin-1, a β -Galactoside-binding Lectin in Chinese Hamster Ovary Cells. *Journal of Biological Chemistry*. 270, 5198–5206 (1995). <https://doi.org/10.1074/jbc.270.10.5198>
51. Inagaki, Y., Sohma, Y., Horie, H., Nozawa, R., Kadoya, T.: Oxidized galectin-1 promotes axonal regeneration in peripheral nerves but does not possess lectin properties. *Eur J Biochem*. 267, 2955–2964 (2000). <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2000.01311.x>
52. Tracey, B.M., Feizib, T., Abbott, W.M., Carruthers, R.A., Green, B.N., Lawson, A.M.: THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Subunit Molecular Mass Assignment of 14,654 Da to the Soluble B-Galactoside-binding Lectin from Bovine Heart Muscle and Demonstration of Intramolecular Disulfide Bonding Associated with Oxidative Inactivation*. (1992)
53. Yamaoka, K., Ingendoh, A., Tsubuki, S., Nagai, Y., Sanai, Y.: Structural and Functional Characterization of a Novel Tumor-Derived Rat Galectin-1 Having Transforming Growth Factor (TGF) Activity: The Relationship between Intramolecular Disulfide Bridges and TGF Activity. *J Biochem*. 119, 878–886 (1996). <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a021325>
54. Johannes, L., Jacob, R., Leffler, H.: Galectins at a glance. *J Cell Sci*. 131, (2018). <https://doi.org/10.1242/jcs.208884>
55. Fryk, E., Silva, V.R.R., Jansson, P.A.: Galectin-1 in Obesity and Type 2 Diabetes, (2022)

56. Rabinovich, G.A.: Galectin-1 as a potential cancer target, (2005)
57. Rabinovich, G.A., Daly, G., Dreja, H., Tailor, H., Riera, C.M., Hirabayashi, J., Chernajovsky, Y.: Recombinant galectin-1 and its genetic delivery suppress collagen-induced arthritis via T cell apoptosis. *J Exp Med.* 190, 385–98 (1999). <https://doi.org/10.1084/jem.190.3.385>
58. Sethi, A., Sanam, S., Alvala, R., Alvala, M.: An updated patent review of galectin-1 and galectin-3 inhibitors and their potential therapeutic applications (2016–present), (2021)
59. Si, Y., Feng, S., Gao, J., Wang, Y., Zhang, Z., Meng, Y., Zhou, Y., Tai, G., Su, J.: Human galectin-2 interacts with carbohydrates and peptides non-classically: New insight from X-ray crystallography and hemagglutination. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 48, 939–947 (2016). <https://doi.org/10.1093/abbs/gmw089>
60. Tamura, M., Tanaka, T., Fujii, N., Tanikawa, T., Oka, S., Takeuchi, T., Hatanaka, T., Kishimoto, S., Arata, Y.: Potential Interaction between Galectin-2 and MUC5AC in Mouse Gastric Mucus. (2020)
61. Nielsen, M.I., Stegmayr, J., Grant, O.C., Yang, Z., Nilsson, U.J., Boos, I., Carlsson, M.C., Woods, R.J., Unverzagt, C., Leffler, H., Wandall, H.H.: Galectin binding to cells and glycoproteins with genetically modified glycosylation reveals galectin–glycan specificities in a natural context. *Journal of Biological Chemistry.* 293, 20249–20262 (2018). <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.004636>
62. Negedu, M.N., Duckworth, C.A., Yu, L.-G.: Galectin-2 in Health and Diseases. *Int J Mol Sci.* 24, (2022). <https://doi.org/10.3390/ijms24010341>
63. Charkiewicz, K., Goscik, J., Raba, G., Laudanski, P.: Syndecan 4, galectin 2, and death receptor 3 (DR3) as novel proteins in pathophysiology of preeclampsia. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine.* 34, 2965–2970 (2021). <https://doi.org/10.1080/14767058.2019.1676410>
64. Yildirim, C., Vogel, D.Y.S., Hollander, M.R., Baggen, J.M., Fontijn, R.D., Nieuwenhuis, S., Haverkamp, A., de Vries, M.R., Quax, P.H.A., Garcia-Vallejo, J.J., van der Laan, A.M., Dijkstra, C.D., van der Pouw Kraan, T.C.T.M., van Royen, N., Horrevoets, A.J.G.: Galectin-2 induces a proinflammatory, anti-arteriogenic phenotype in monocytes and macrophages. *PLoS One.* 10, e0124347 (2015). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124347>
65. Panjwani, N.: Role of galectins in re-epithelialization of wounds. *Ann Transl Med.* 2, 89 (2014). <https://doi.org/10.3978/j.issn.2305-5839.2014.09.09>
66. Sindrewicz, P., Lian, L.-Y., Yu, L.-G.: Interaction of the Oncofetal Thomsen–Friedenreich Antigen with Galectins in Cancer Progression and Metastasis. *Front Oncol.* 6, (2016). <https://doi.org/10.3389/fonc.2016.00079>
67. Meister, S., Hahn, L., Beyer, S., Mannewitz, M., Perleberg, C., Schnell, K., Anz, D., Corradini, S., Schmoeckel, E., Mayr, D., Hasbargen, U., Zati Zehni, A., Mahner, S., Jeschke, U., Kolben, T.: Regulatory T Cell Apoptosis during Preeclampsia May Be Prevented by Gal-2. *Int J Mol Sci.* 23, 1880 (2022). <https://doi.org/10.3390/ijms23031880>
68. Paclik, D., Lohse, K., Wiedenmann, B., Dignass, A.U., Sturm, A.: Galectin-2 and -4, but not Galectin-1, promote intestinal epithelial wound healing in vitro through a TGF-beta-independent mechanism. *Inflamm Bowel Dis.* 14, 1366–1372 (2008). <https://doi.org/10.1002/ibd.20499>
69. Leonidas, D.D., Vatzaki, E.H., Vorum, H., Celis, J.E., Madsen, P., Acharya, K.R.: Structural Basis for the Recognition of Carbohydrates by Human Galectin-7 †, ‡. (1998)
70. Sewgobind, N. V., Albers, S., Pieters, R.J.: Functions and inhibition of galectin-7, an emerging target in cellular pathophysiology, (2021)
71. Mielczarek-Palacz, A., Kondera-Anasz, Z., Smycz-Kubańska, M., Englisz, A., Janusz, A., Królewska-Daszczynska, P., Wendlocha, D.: The role of galectins-1, 3, 7, 8 and 9 as potential diagnostic and therapeutic markers in ovarian cancer (Review), (2022)

72. Kaur, M., Kaur, T., Kamboj, S.S., Singh, J.: Roles of galectin-7 in cancer, (2016)
73. Kim, H.-J., Jeon, H.-K., Lee, J.-K., Sung, C.O., Do, I.-G., Choi, C.H., Kim, T.-J., Kim, B.-G., Bae, D.-S., Lee, J.-W.: Clinical significance of galectin-7 in epithelial ovarian cancer. *Anticancer Res.* 33, 1555–61 (2013)
74. Bibens-Laulan, N., St-Pierre, Y.: Intracellular galectin-7 expression in cancer cells results from an autocrine transcriptional mechanism and endocytosis of extracellular galectin-7. *PLoS One.* 12, e0187194 (2017). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187194>
75. Cumpstey, I., Carlsson, S., Leffler, H., Nilsson, U.J.: Synthesis of a phenyl thio- β -d-galactopyranoside library from 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzene: discovery of efficient and selective monosaccharide inhibitors of galectin-7. *Org Biomol Chem.* 3, 1922 (2005). <https://doi.org/10.1039/b502354h>
76. Masuyer, G., Jabeen, T., Öberg, C.T., Leffler, H., Nilsson, U.J., Acharya, K.R.: Inhibition mechanism of human galectin-7 by a novel galactose- benzylphosphate inhibitor. *FEBS Journal.* 279, 193–202 (2012). <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08414.x>
77. Bergh, A., Leffler, H., Sundin, A., Nilsson, U.J., Kann, N.: Cobalt-mediated solid phase synthesis of 3-O-alkynylbenzyl galactosides and their evaluation as galectin inhibitors. *Tetrahedron.* 62, 8309–8317 (2006). <https://doi.org/10.1016/j.tet.2006.06.057>
78. Salameh, B.A., Sundin, A., Leffler, H., Nilsson, U.J.: Thioureido N-acetyllactosamine derivatives as potent galectin-7 and 9N inhibitors. *Bioorg Med Chem.* 14, 1215–1220 (2006). <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2005.09.050>
79. Ramaswamy, S., Sleiman, M.H., Masuyer, G., Arbez-Gindre, C., Micha-Screttas, M., Calogeropoulou, T., Steele, B.R., Acharya, K.R.: Structural basis of multivalent galactose-based dendrimer recognition by human galectin-7. *FEBS Journal.* 282, 372–387 (2015). <https://doi.org/10.1111/febs.13140>
80. López de los Santos, Y., Bernard, D.N., Egesborg, P., Létourneau, M., Lafortune, C., Cuneo, M.J., Urvoas, A., Chatenet, D., Mahy, J.-P., St-Pierre, Y., Ricoux, R., Doucet, N.: Binding of a Soluble *meso* -Tetraarylporphyrin to Human Galectin-7 Induces Oligomerization and Modulates Its Pro-Apoptotic Activity. *Biochemistry.* 59, 4591–4600 (2020). <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.0c00736>
81. Charcot JM, Robin C.: Observation de Leukocythemia. *C R Mem Soc Biol.* (1853)
82. Su, J., Gao, J., Si, Y., Cui, L., Song, C., Wang, Y., Wu, R., Tai, G., Zhou, Y.: Galectin-10: A new structural type of prototype galectin dimer and effects on saccharide ligand binding. *Glycobiology.* 28, 159–168 (2018). <https://doi.org/10.1093/glycob/cwx107>
83. Su, J.: A brief history of Charcot-Leyden crystal protein/galectin-10 research. *Molecules.* 23, (2018). <https://doi.org/10.3390/molecules23112931>
84. Tomizawa, H., Yamada, Y., Arima, M., Miyabe, Y., Fukuchi, M., Hikichi, H., Melo, R.C.N., Yamada, T., Ueki, S.: Galectin-10 as a Potential Biomarker for Eosinophilic Diseases, (2022)
85. Leonidas, D.D., Elbert, B.L., Zhou, Z., Leffler, H., Ackerman, S.J., Acharya, R.: Crystal structure of human Charcot-Leyden crystal protein, an eosinophil lysophospholipase, identifies it as a new member of the carbohydrate-binding family of galectins.
86. Leonidas, D.D., Vatzaki, E.H., Vorum, H., Celis, J.E., Madsen, P., Acharya, K.R.: Structural Basis for the Recognition of Carbohydrates by Human Galectin-7. *Biochemistry.* 37, 13930–13940 (1998). <https://doi.org/10.1021/bi981056x>
87. Itoh, A., Nonaka, Y., Nakakita, S. ichi, Yoshida, H., Nishi, N., Nakamura, T., Kamitori, S.: Structures of human galectin-10/monosaccharide complexes demonstrate potential of monosaccharides as effectors in forming Charcot-Leyden crystals. *Biochem Biophys Res Commun.* 525, 87–93 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.02.037>
88. Persson, E.K., Verstraete, K., Heyndrickx, I., Gevaert, E., Aegerter, H., Percier, J.M., Deswarte, K., Verschueren, K.H.G., Dansercoer, A., Gras, D., Chanez, P., Bachert, C., Gonçalves, A., Van Gorp, H., De Haard, H., Blanchetot, C., Saunders, M., Hammad, H.,

- Savvides, S.N., Lambrecht, B.N.: Protein crystallization promotes type 2 immunity and is reversible by antibody treatment. *Science*. 364, (2019). <https://doi.org/10.1126/science.aaw4295>
89. Than, N.G., Pick, E., Bellyei, S., Szigeti, A., Burger, O., Berente, Z., Janaky, T., Boronkai, A., Kliman, H., Meiri, H., Bohn, H., Than, G.N., Sumegi, B.: Functional analyses of placental protein 13/galectin-13. *Eur J Biochem*. 271, 1065–1078 (2004). <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.2004.04004.x>
 90. Su, J., Wang, Y., Si, Y., Gao, J., Song, C., Cui, L., Wu, R., Tai, G., Zhou, Y.: Galectin-13, a different prototype galectin, does not bind β -galactosides and forms dimers via intermolecular disulfide bridges between Cys-136 and Cys-138. *Sci Rep*. 8, (2018). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19465-0>
 91. Than, N.G., Sumegi, B., Than, G.N., Berente, Z., Bohn, H.: Isolation and Sequence Analysis of a cDNA Encoding Human Placental Tissue Protein 13 (PP13), a New Lysophospholipase, Homologue of Human Eosinophil Charcot-Leyden Crystal Protein. *Placenta*. 20, 703–710 (1999). <https://doi.org/10.1053/plac.1999.0436>
 92. Than, N.G., Romero, R., Goodman, M., Weckle, A., Xing, J., Dong, Z., Xu, Y., Tarquini, F., Szilagyi, A., Gal, P., Hou, Z., Tarca, A.L., Kim, C.J., Kim, J.-S., Haidarian, S., Uddin, M., Bohn, H., Benirschke, K., Santolaya-Forgas, J., Grossman, L.I., Erez, O., Hassan, S.S., Zavodszky, P., Papp, Z., Wildman, D.E.: A primate subfamily of galectins expressed at the maternal-fetal interface that promote immune cell death.
 93. Si, Y., Li, Y., Yang, T., Li, X., Ayala, G.J., Mayo, K.H., Tai, G., Su, J., Zhou, Y.: Structure–function studies of galectin-14, an important effector molecule in embryology. *FEBS Journal*. 288, 1041–1055 (2021). <https://doi.org/10.1111/febs.15441>
 94. Kaminker, J.D., Timoshenko, A. V.: Expression, regulation, and functions of the galectin-16 gene in human cells and tissues. *Biomolecules*. 11, (2021). <https://doi.org/10.3390/biom11121909>
 95. Si, Y., Yao, Y., Jaramillo Ayala, G., Li, X., Han, Q., Zhang, W., Xu, X., Tai, G., Mayo, K.H., Zhou, Y., Su, J.: Human galectin-16 has a pseudo ligand binding site and plays a role in regulating c-Rel-mediated lymphocyte activity. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*. 1865, (2021). <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2020.129755>
 96. Cao, Z.Q., Guo, X.L.: The role of galectin-4 in physiology and diseases, (2016)
 97. Rustiguel, J.K., Soares, R.O.S., Meisburger, S.P., Davis, K.M., Malzbender, K.L., Ando, N., Dias-Baruffi, M., Nonato, M.C.: Full-length model of the human galectin-4 and insights into dynamics of inter-domain communication. *Sci Rep*. 6, (2016). <https://doi.org/10.1038/srep33633>
 98. Bum-Erdene, K., Leffler, H., Nilsson, U.J., Blanchard, H.: Structural characterisation of human galectin-4 N-terminal carbohydrate recognition domain in complex with glycerol, lactose, 3'-sulfo-lactose, and 2'-fucosyllactose. *Sci Rep*. 6, (2016). <https://doi.org/10.1038/srep20289>
 99. Rustiguel, J.K., Kumagai, P.S., Dias-Baruffi, M., Costa-Filho, A.J., Nonato, M.C.: Recombinant expression, purification and preliminary biophysical and structural studies of C-terminal carbohydrate recognition domain from human galectin-4. *Protein Expr Purif*. 118, 39–48 (2016). <https://doi.org/10.1016/j.pep.2015.09.026>
 100. Bum-Erdene, K., Leffler, H., Nilsson, U.J., Blanchard, H.: Structural characterization of human galectin-4 C-terminal domain: elucidating the molecular basis for recognition of glycosphingolipids, sulfated saccharides and blood group antigens. *FEBS Journal*. 282, 3348–3367 (2015). <https://doi.org/10.1111/febs.13348>
 101. Velasco, S., Díez-Revuelta, N., Hernández-Iglesias, T., Kaltner, H., André, S., Gabius, H.-J., Abad-Rodríguez, J.: Neuronal Galectin-4 is required for axon growth and for the organization of axonal membrane L1 delivery and clustering. *J Neurochem*. 125, 49–62 (2013). <https://doi.org/10.1111/jnc.12148>

102. Abdelfattah, M.M., Helwa, R.: Galectins dysregulation: A way for cancer cells to invade and pervade. *Oncol Res.* 30, 129–135 (2022). <https://doi.org/10.32604/or.2022.026838>
103. Bohari, M.H., Yu, X., Zick, Y., Blanchard, H.: Structure-based rationale for differential recognition of lacto- and neolacto- series glycosphingolipids by the N-terminal domain of human galectin-8. *Sci Rep.* 6, (2016). <https://doi.org/10.1038/srep39556>
104. Ideo, H., Matsuzaka, T., Nonaka, T., Seko, A., Yamashita, K.: galectin-8-n-domain recognition mechanism for sialylated and sulfated glycans. *Journal of Biological Chemistry.* 286, 11346–11355 (2011). <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.195925>
105. Li, S., Wandel, M.P., Li, F., Liu, Z., He, C., Wu, J., Shi, Y., Randow, F.: Sterical hindrance promotes selectivity of the autophagy cargo receptor NDP52 for the danger receptor galectin-8 in antibacterial autophagy. *Sci Signal.* 6, (2013). <https://doi.org/10.1126/scisignal.2003730>
106. von Muhlinen, N., Thurston, T., Ryzhako, G., Bloor, S., Randow, F.: NDP52, a novel autophagy receptor for ubiquitin-decorated cytosolic bacteria. *Autophagy.* 6, 288–289 (2010). <https://doi.org/10.4161/auto.6.2.11118>
107. Yoshida, H., Nishi, N., Nakakita, S.I., Kamitori, S.: Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of a protease-resistant mutant form of human galectin-8. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.* 65, 512–514 (2009). <https://doi.org/10.1107/S1744309109013554>
108. Bidon-Wagner, N., Le Pennec, J.-P.: Human galectin-8 isoforms and cancer. Kluwer Academic Publishers (2004)
109. Girardi, B., Manna, M., Van Klaveren, S., Tomašič, T., Jakopin, Ž., Leffler, H., Nilsson, U.J., Ricklin, D., Mravljak, J., Schwardt, O., Anderluh, M.: Selective Monovalent Galectin-8 Ligands Based on 3-Lactoylgalactoside. *ChemMedChem.* 17, (2022). <https://doi.org/10.1002/cmdc.202100514>
110. Hassan, M., Baussière, F., Guzelj, S., Sundin, A.P., Håkansson, M., Kovačič, R., Leffler, H., Tomašič, T., Anderluh, M., Jakopin, Ž., Nilsson, U.J.: Structure-Guided Design of <sc>d</sc>-Galactal Derivatives with High Affinity and Selectivity for the Galectin-8 N-Terminal Domain. *ACS Med Chem Lett.* 12, 1745–1752 (2021). <https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.1c00371>
111. Moar, P., Tandon, R.: Galectin-9 as a biomarker of disease severity, (2021)
112. Itoh, A., Fukata, Y., Miyanaka, H., Nonaka, Y., Ogawa, T., Nakamura, T., Nishi, N.: Optimization of the inter-domain structure of galectin-9 for recombinant production. *Glycobiology.* 23, 920–925 (2013). <https://doi.org/10.1093/glycob/cwt023>
113. Yoshida, H., Teraoka, M., Nishi, N., Nakakita, S.I., Nakamura, T., Hirashima, M., Kamitori, S.: X-ray structures of human galectin-9 C-terminal domain in complexes with a biantennary oligosaccharide and sialyllactose. *Journal of Biological Chemistry.* 285, 36969–36976 (2010). <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.163402>
114. Yoshida, H., Nishi, N., Wada, K., Nakamura, T., Hirashima, M., Kuwabara, N., Kato, R., Kamitori, S.: X-ray structure of a protease-resistant mutant form of human galectin-9 having two carbohydrate recognition domains with a metal-binding site. *Biochem Biophys Res Commun.* 490, 1287–1293 (2017). <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.07.009>
115. Lv, Y., Ma, X., Ma, Y., Du, Y., Feng, J.: A new emerging target in cancer immunotherapy: Galectin-9 (LGALS9), (2022)
116. Maller, S.M., Cagnoni, A.J., Bannoud, N., Sigaut, L., Pérez Sáez, J.M., Pietrasanta, L.I., Yang, R.Y., Liu, F.T., Croci, D.O., Di Lella, S., Sundblad, V., Rabinovich, G.A., Mariño, K. V.: An adipose tissue galectin controls endothelial cell function via preferential recognition of 3-fucosylated glycans. *FASEB Journal.* 34, 735–753 (2020). <https://doi.org/10.1096/fj.201901817R>

117. Wan, L., Yang, R.Y., Liu, F.T.: Galectin-12 in cellular differentiation, apoptosis and polarization, (2018)
118. Yang, R.-Y., Havel, P., Liu, F.-T.: Galectin-12. *Adipocyte*. 1, 96–100 (2012). <https://doi.org/10.4161/adip.19465>
119. Yang, R.-Y., Havel, P., Liu, F.-T.: Galectin-12. *Adipocyte*. 1, 96–100 (2012). <https://doi.org/10.4161/adip.19465>
120. Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Žídek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohl, S.A.A., Ballard, A.J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., Back, T., Petersen, S., Reiman, D., Clancy, E., Zielinski, M., Steinegger, M., Pacholska, M., Berghammer, T., Bodenstein, S., Silver, D., Vinyals, O., Senior, A.W., Kavukcuoglu, K., Kohli, P., Hassabis, D.: Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*. 596, 583–589 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>
121. Yang, R.Y., Rabinovich, G.A., Liu, F.T.: Galectins: Structure, function and therapeutic potential. *Expert Rev Mol Med*. 10, (2008). <https://doi.org/10.1017/S1462399408000719>
122. Liu, F.: Intracellular functions of galectins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 1572, 263–273 (2002). [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(02\)00313-6](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(02)00313-6)
123. Barboni, E.A.M., Bawumia, S., Henrick, K., Hughes, R.C.: Molecular modeling and mutagenesis studies of the N-terminal domains of galectin-3: evidence for participation with the C-terminal carbohydrate recognition domain in oligosaccharide binding. *Glycobiology*. 10, 1201–1208 (2000). <https://doi.org/10.1093/glycob/10.11.1201>
124. Mazurek, N., Conklin, J., Byrd, J.C., Raz, A., Bresalier, R.S.: Phosphorylation of the β -galactoside-binding protein galectin-3 modulates binding to its ligands. *Journal of Biological Chemistry*. 275, 36311–36315 (2000). <https://doi.org/10.1074/jbc.M003831200>
125. Shimura, T., Takenaka, Y., Fukumori, T., Tsutsumi, S., Okada, K., Hogan, V., Kikuchi, A., Kuwano, H., Raz, A.: Implication of Galectin-3 in Wnt Signaling.
126. Lima, T., Perpétuo, L., Henrique, R., Fardilha, M., Leite-Moreira, A., Bastos, J., Vitorino, R.: Galectin-3 in prostate cancer and heart diseases: a biomarker for these two frightening pathologies?, (2023)
127. Manzonei, F., Saraboji, K., Sprenger, J., Kumar, R., Noresson, A.L., Nilsson, U.J., Leffler, H., Fisher, S.Z., Schrader, T.E., Ostermann, A., Coates, L., Blakeley, M.P., Oksanen, E., Logan, D.T.: Perdeuteration, crystallization, data collection and comparison of five neutron diffraction data sets of complexes of human galectin-3C. *Acta Crystallogr D Struct Biol*. 72, 1194–1202 (2016). <https://doi.org/10.1107/S2059798316015540>
128. Lázár, L., Tsagkarakou, A.S., Stravodimos, G., Kontopidis, G., Leffler, H., Nilsson, U.J., Somsák, L., Leonidas, D.D.: Strong Binding of C -Glycosyl-1,2-Thiodisaccharides to Galectin-3—Enthalpy-Driven Affinity Enhancement by Water-Mediated Hydrogen Bonds. *J Med Chem*. 66, 12420–12431 (2023). <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.3c00882>
129. Romero, A., Gabius, H.-J.: Galectin-3: is this member of a large family of multifunctional lectins (already) a therapeutic target? *Expert Opin Ther Targets*. 23, 819–828 (2019). <https://doi.org/10.1080/14728222.2019.1675638>
130. Hsieh, T.J., Lin, H.Y., Tu, Z., Lin, T.C., Wu, S.C., Tseng, Y.Y., Liu, F.T., Hsu, S.T.D., Lin, C.H.: Dual thio-digalactoside-binding modes of human galectins as the structural basis for the design of potent and selective inhibitors. *Sci Rep*. 6, (2016). <https://doi.org/10.1038/srep29457>
131. Hirabayashi, J., Hashidate, T., Arata, Y., Nishi, N., Nakamura, T., Hirashima, M., Urashima, T., Oka, T., Futai, M., Muller, W.E.G., Yagi, F., Kasai, K.: Oligosaccharide specificity of galectins: a search by frontal affinity chromatography. *Biochimica et Biophysica Acta*

- (BBA) - General Subjects. 1572, 232–254 (2002). [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(02\)00311-2](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(02)00311-2)
132. Krześlak, A., Lipińska, A.: GALECTIN-3 AS A MULTIFUNCTIONAL PROTEIN. (2004)
 133. Sciacchitano, S., Lavra, L., Morgante, A., Ulivieri, A., Magi, F., De Francesco, G.P., Bellotti, C., Salehi, L.B., Ricci, A.: Galectin-3: One molecule for an alphabet of diseases, from A to Z, (2018)
 134. Slack, R.J., Mills, R., Mackinnon, A.C.: The therapeutic potential of galectin-3 inhibition in fibrotic disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 130, 105881 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2020.105881>
 135. Ahmed, R., Anam, K., Ahmed, H.: Development of Galectin-3 Targeting Drugs for Therapeutic Applications in Various Diseases, (2023)
 136. Hara, A., Niwa, M., Noguchi, K., Kanayama, T., Niwa, A., Matsuo, M., Hatano, Y., Tomita, H.: Galectin-3 as a next-generation biomarker for detecting early stage of various diseases, (2020)
 137. Blanchard, H., Yu, X., Collins, P.M., Bum-Erdene, K.: Galectin-3 inhibitors: A patent review (2008-present). *Expert Opin Ther Pat.* 24, 1053–1065 (2014). <https://doi.org/10.1517/13543776.2014.947961>
 138. Bouffette, S., Botez, I., De Ceuninck, F.: Targeting galectin-3 in inflammatory and fibrotic diseases. *Trends Pharmacol Sci.* (2023). <https://doi.org/10.1016/j.tips.2023.06.001>
 139. Lázár, L., Tsagkarakou, A.S., Stravodimos, G., Kontopidis, G., Leffler, H., Nilsson, U.J., Somsák, L., Leonidas, D.D.: Strong Binding of C -Glycosyl-1,2-Thiodisaccharides to Galectin-3—Enthalpy-Driven Affinity Enhancement by Water-Mediated Hydrogen Bonds. *J Med Chem.* (2023). <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.3c00882>
 140. Hirani, N., MacKinnon, A.C., Nicol, L., Ford, P., Schambye, H., Pedersen, A., Nilsson, U.J., Leffler, H., Sethi, T., Tantawi, S., Gravelle, L., Slack, R.J., Mills, R., Karmakar, U., Humphries, D., Zetterberg, F., Keeling, L., Paul, L., Molyneaux, P.L., Li, F., Funston, W., Forrest, I.A., Simpson, A.J., Gibbons, M.A., Maher, T.M.: Target inhibition of galectin-3 by inhaled TD139 in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *European Respiratory Journal.* 57, 2002559 (2021). <https://doi.org/10.1183/13993003.02559-2020>
 141. Gajovic, N., Markovic, S.S., Jurisevic, M., Jovanovic, M., Arsenijevic, N., Mijailovic, Z., Jovanovic, M., Jovanovic, I.: Galectin-3 as an important prognostic marker for COVID-19 severity. *Sci Rep.* 13, 1460 (2023). <https://doi.org/10.1038/s41598-023-28797-5>
 142. Sigamani, A., Mayo, K.H., Miller, M.C., Chen-Walden, H., Reddy, S., Platt, D.: An Oral Galectin Inhibitor in COVID-19—A Phase II Randomized Controlled Trial. *Vaccines (Basel).* 11, 731 (2023). <https://doi.org/10.3390/vaccines11040731>
 143. Laderach, D.J., Compagno, D.: Inhibition of galectins in cancer: Biological challenges for their clinical application, (2023)
 144. Compagno, D., Tiraboschi, C., Garcia, J.D., Rondón, Y., Corapi, E., Velazquez, C., Laderach, D.J.: Galectins as checkpoints of the immune system in cancers, their clinical relevance, and implication in clinical trials, (2020)
 145. Keizman, D., Frenkel, M., Peer, A., Rosenbaum, E., Sarid, D., Leibovitch, I., Mano, R., Yossepowitch, O., Wolf, I., Geva, R., Margel, D., Rouvinov, K., Stern, A., Dresler, H., Kushnir, I., Eliaz, I.: Modified Citrus Pectin Treatment in Non-Metastatic Biochemically Relapsed Prostate Cancer: Long-Term Results of a Prospective Phase II Study. *Nutrients.* 15, (2023). <https://doi.org/10.3390/nu15163533>
 146. Dings, R.P.M., Miller, M.C., Griffin, R.J., Mayo, K.H.: Galectins as molecular targets for therapeutic intervention, (2018)
 147. Martín-Saldaña, S., Chevalier, M.T., Pandit, A.: Therapeutic potential of targeting galectins – A biomaterials-focused perspective. *Biomaterials.* 286, 121585 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2022.121585>

148. Klyosov, A.A., Traber, P.G.: Galectins in Disease and Potential Therapeutic Approaches. (2012)
149. Anderson, A.C.: Review The Process of Structure-Based Drug Design speed at which drug leads can be identified and evaluated in silico. Structure-based drug design is most powerful when. *Chem Biol.* 10, 787–797 (2003). <https://doi.org/10.1016/j>
150. Hughes, J., Rees, S., Kalindjian, S., Philpott, K.: Principles of early drug discovery. *Br J Pharmacol.* 162, 1239–1249 (2011). <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.01127.x>
151. Congreve, M., Andrews, S.: Send Orders for Reprints to reprints@benthamscience.ae Perspective in Medicinal Chemistry: Structure-Based Drug Design. (2017)
152. Schiebel, J., Krimmer, S.G., Röwer, K., Knörlein, A., Wang, X., Park, A.Y., Stieler, M., Ehrmann, F.R., Fu, K., Radeva, N., Krug, M., Huschmann, F.U., Glöckner, S., Weiss, M.S., Mueller, U., Klebe, G., Heine, A.: High-Throughput Crystallography: Reliable and Efficient Identification of Fragment Hits. *Structure.* 24, 1398–1409 (2016). <https://doi.org/10.1016/j.str.2016.06.010>
153. Doak, B.C., Norton, R.S., Scanlon, M.J.: The ways and means of fragment-based drug design. *Pharmacol Ther.* 167, 28–37 (2016). <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.07.003>
154. Aguda, A.H., Lavalley, V., Cheng, P., Bott, T.M., Meimetis, L.G., Law, S., Nguyen, N.T., Williams, D.E., Kaleta, J., Villanueva, I., Davies, J., Andersen, R.J., Brayer, G.D., Brömme, D.: Affinity Crystallography: A New Approach to Extracting High-Affinity Enzyme Inhibitors from Natural Extracts. *J Nat Prod.* 79, 1962–1970 (2016). <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b00215>
155. Wang, X., Song, K., Li, L., Chen, L.: Structure-Based Drug Design Strategies and Challenges. *Curr Top Med Chem.* 18, 998–1006 (2018). <https://doi.org/10.2174/1568026618666180813152921>
156. Wlodawer, A., Minor, W., Dauter, Z., Jaskolski, M.: Protein crystallography for non-crystallographers, or how to get the best (but not more) from published macromolecular structures, (2008)
157. Blinder, S.M.: Nuclear magnetic resonance. Introduction to Quantum Mechanics. 315–335 (2021). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822310-9.00026-4>
158. Carroni, M., Saibil, H.R.: Cryo electron microscopy to determine the structure of macromolecular complexes, (2016)
159. Duff, M.R., Grubbs, J., Howell, E.E.: Isothermal titration calorimetry for measuring macromolecule-ligand affinity. *Journal of Visualized Experiments.* (2011). <https://doi.org/10.3791/2796>
160. Sindrewicz, P., Li, X., Yates, E.A., Turnbull, J.E., Lian, L.Y., Yu, L.G.: Intrinsic tryptophan fluorescence spectroscopy reliably determines galectin-ligand interactions. *Sci Rep.* 9, (2019). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47658-8>
161. Sörme, P., Kahl-Knutsson, B., Huflejt, M., Nilsson, U.J., Leffler, H.: Fluorescence polarization as an analytical tool to evaluate galectin–ligand interactions. *Anal Biochem.* 334, 36–47 (2004). <https://doi.org/10.1016/j.ab.2004.06.042>
162. Yung-Chi, C., Prusoff, W.H.: Relationship between the inhibition constant (KI) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I50) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol.* 22, 3099–3108 (1973). [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(73\)90196-2](https://doi.org/10.1016/0006-2952(73)90196-2)
163. Zhukov, A., Karlsson, R.: Statistical aspects of van’t Hoff analysis: a simulation study. *Journal of Molecular Recognition.* 20, 379–385 (2007). <https://doi.org/10.1002/jmr.845>
164. Sörme, P., Kahl-Knutsson, B., Huflejt, M., Nilsson, U.J., Leffler, H.: Fluorescence polarization as an analytical tool to evaluate galectin-ligand interactions. *Anal Biochem.* 334, 36–47 (2004). <https://doi.org/10.1016/j.ab.2004.06.042>

165. Ghisaidoobe, A., Chung, S.: Intrinsic Tryptophan Fluorescence in the Detection and Analysis of Proteins: A Focus on Förster Resonance Energy Transfer Techniques. *Int J Mol Sci.* 15, 22518–22538 (2014). <https://doi.org/10.3390/ijms151222518>
166. Moczek, G., Ross, J.A.: Fluorescence techniques in analysis of protein-ligand interactions. *Methods in Molecular Biology.* 1008, 169–210 (2013). https://doi.org/10.1007/978-1-62703-398-5_7
167. Du, X., Li, Y., Xia, Y.-L., Ai, S.-M., Liang, J., Sang, P., Ji, X.-L., Liu, S.-Q.: Insights into Protein–Ligand Interactions: Mechanisms, Models, and Methods. *Int J Mol Sci.* 17, 144 (2016). <https://doi.org/10.3390/ijms17020144>
168. Delaine, T., Collins, P., MacKinnon, A., Sharma, G., Stegmayr, J., Rajput, V.K., Mandal, S., Cumpstey, I., Larumbe, A., Salameh, B.A., Kahl-Knutsson, B., van Hattum, H., van Scherpenzeel, M., Pieters, R.J., Sethi, T., Schambye, H., Oredsson, S., Leffler, H., Blanchard, H., Nilsson, U.J.: Galectin-3-Binding Glycomimetics that Strongly Reduce Bleomycin-Induced Lung Fibrosis and Modulate Intracellular Glycan Recognition. *ChemBioChem.* 17, 1759–1770 (2016). <https://doi.org/10.1002/cbic.201600285>
169. Delaine, T., Cumpstey, I., Ingrassia, L., Mercier, M. Le, Okechukwu, P., Leffler, H., Kiss, R., Nilsson, U.J.: Galectin-Inhibitory Thiodigalactoside Ester Derivatives Have Antimigratory Effects in Cultured Lung and Prostate Cancer Cells. *J Med Chem.* 51, 8109–8114 (2008). <https://doi.org/10.1021/jm801077j>
170. Cumpstey, I., Salomonsson, E., Sundin, A., Leffler, H., Nilsson, U.J.: Double Affinity Amplification of Galectin–Ligand Interactions through Arginine–Arene Interactions: Synthetic, Thermodynamic, and Computational Studies with Aromatic Diamido Thiodigalactosides. *Chemistry – A European Journal.* 14, 4233–4245 (2008). <https://doi.org/10.1002/chem.200701932>
171. Terpe, K.: Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: From molecular and biochemical fundamentals to commercial systems, (2006)
172. Cohen, S.N.: DNA cloning: A personal view after 40 years, (2013)
173. Costa, S., Almeida, A., Castro, A., Domingues, L.: Fusion tags for protein solubility, purification, and immunogenicity in *Escherichia coli*: The novel Fh8 system, (2014)
174. Madadlou, A., O’Sullivan, S., Sheehan, D.: Fast Protein Liquid Chromatography. Presented at the (2011)
175. Massa, S.M., Cooper, D.N.W., Leffler, H., Barondes, S.H.: L-29, an Endogenous Lectin, Binds to Glycoconjugate Ligands with Positive Cooperativity. (1993)
176. Size Exclusion Chromatography 2.
177. Rhodes, G.: Crystallography made crystal clear : a guide for users of macromolecular models. Boston: Elsevier/Academic Press. xxv, 306 p. (2006)
178. Van Holde, K.E. (Kensal E., Johnson, W.Curtis., Ho, P.S.: Principles of physical biochemistry. Pearson/Prentice Hall (2006)
179. Γλυκός, Ν.Μ.: Μία μη μαθηματική εισαγωγή στην κρυσταλλογραφία πρωτεϊνών. ΣΥΝΔΕΣΜΟΣ ΕΛΛΗΝΙΚΩΝ ΑΚΑΔΗΜΑΪΚΩΝ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΩΝ (2015)
180. Haas, D.J.: The early history of cryo-cooling for macromolecular crystallography. *IUCrJ.* 7, 148–157 (2020). <https://doi.org/10.1107/S2052252519016993>
181. Powell, H.R.: X-ray data processing, (2017)
182. Powell, H.R.: A beginner’s guide to X-ray data processing Beginner’s Guide. (2021)
183. Karplus, P.A., Diederichs, K.: Linking crystallographic model and data quality. *Science* (1979). 336, 1030–1033 (2012). <https://doi.org/10.1126/science.1218231>
184. French, S., K.S. Wilson: On the treatment of the negative intensity observations. . *Acta Crystallogr. A* 34, 517–525 (1978)
185. Berg J.M., Tymoczko J.L., Stryer L.: Biochemistry. New York: W.H. Freeman (2012)

186. Joosten, R.P., Salzemann, J., Bloch, V., Stockinger, H., Berglund, A.-C., Blanchet, C., Bongcam-Rudloff, E., Combet, C., Da Costa, A.L., Deleage, G., Diarena, M., Fabbretti, R., Fettahi, G., Flegel, V., Gisel, A., Kasam, V., Kervinen, T., Korpelainen, E., Mattila, K., Pagni, M., Reichstadt, M., Breton, V., Tickle, I.J., Vriend, G.: PDB_REDO: automated re-refinement of X-ray structure models in the PDB. *J Appl Crystallogr.* 42, 376–384 (2009). <https://doi.org/10.1107/S0021889809008784>
187. Joosten, R.P., Long, F., Murshudov, G.N., Perrakis, A.: The PDB_REDO server for macromolecular structure model optimization. *IUCrJ.* 1, 213–20 (2014). <https://doi.org/10.1107/S2052252514009324>
188. Yoshida, N., Sato, M.: Plasmid uptake by bacteria: a comparison of methods and efficiencies. *Appl Microbiol Biotechnol.* 83, 791–798 (2009). <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2042-4>
189. Batty, T.G.G., Kontogiannis, L., Johnson, O., Powell, H.R., Leslie, A.G.W.: iMOSFLM: A new graphical interface for diffraction-image processing with MOSFLM. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 67, 271–281 (2011). <https://doi.org/10.1107/S0907444910048675>
190. Kabsch, W.: XDS. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 66, 125–132 (2010). <https://doi.org/10.1107/S0907444909047337>
191. Collaborative Computational Project, N. 4: The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 50, 760–763 (1994). <https://doi.org/10.1107/S0907444994003112>
192. Evans, P.R., Murshudov, G.N.: How good are my data and what is the resolution? *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 69, 1204–1214 (2013). <https://doi.org/10.1107/S0907444913000061>
193. Grayling, M.J.: phaseR: An R Package for Phase Plane Analysis of Autonomous ODE Systems. *R J.* 6, 43 (2014). <https://doi.org/10.32614/RJ-2014-023>
194. Vagin, A., Teplyakov, A.: *MOLREP*: an Automated Program for Molecular Replacement. *J Appl Crystallogr.* 30, 1022–1025 (1997). <https://doi.org/10.1107/S0021889897006766>
195. Vagin, A.A., Steiner, R.A., Lebedev, A.A., Potterton, L., McNicholas, S., Long, F., Murshudov, G.N.: REFMAC5 dictionary: Organization of prior chemical knowledge and guidelines for its use. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 60, 2184–2195 (2004). <https://doi.org/10.1107/S0907444904023510>
196. Long, F., Nicholls, R.A., Emsley, P., Gražulis, S., Merkys, A., Vaitkus, A., Murshudov, G.N.: AceDRG: A stereochemical description generator for ligands. *Acta Crystallogr D Struct Biol.* 73, 112–122 (2017). <https://doi.org/10.1107/S2059798317000067>
197. Lebedev, A.A., Young, P., Isupov, M.N., Moroz, O. V., Vagin, A.A., Murshudov, G.N.: JLigand: A graphical tool for the CCP4 template-restraint library. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 68, 431–440 (2012). <https://doi.org/10.1107/S090744491200251X>
198. Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W.G., Cowtan, K.: Features and development of Coot. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 66, 486–501 (2010). <https://doi.org/10.1107/S0907444910007493>
199. Joosten, R.P., Joosten, K., Murshudov, G.N., Perrakis, A.: PDB_REDO: constructive validation, more than just looking for errors. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 68, 484–96 (2012). <https://doi.org/10.1107/S0907444911054515>
200. McNicholas, S., Potterton, E., Wilson, K.S., Noble, M.E.M.: Presenting your structures: the CCP4mg molecular-graphics software. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 67, 386–94 (2011). <https://doi.org/10.1107/S0907444911007281>
201. Schrödinger, L., & D.W.: PyMOL. (2020)
202. Darby, J.F., Hopkins, A.P., Shimizu, S., Roberts, S.M., Brannigan, J.A., Turkenburg, J.P., Thomas, G.H., Hubbard, R.E., Fischer, M.: Water Networks Can Determine the Affinity of Ligand Binding to Proteins. *J Am Chem Soc.* 141, 15818–15826 (2019). <https://doi.org/10.1021/jacs.9b06275>

203. Leonidas, D.D., Vatzaki, E.H., Vorum, H., Celis, J.E., Madsen, P., Acharya, K.R.: Structural Basis for the Recognition of Carbohydrates by Human Galectin-7 †, ‡. (1998)
204. Leonidas, D.D., Vatzaki, E.H., Vorum, H., Celis, J.E., Madsen, P., Acharya, K.R.: Structural Basis for the Recognition of Carbohydrates by Human Galectin-7 †, ‡. (1998)
205. Dahlqvist, A., Mandal, S., Peterson, K., Håkansson, M., Logan, D.T., Zetterberg, F.R., Leffler, H., Nilsson, U.J.: 3-Substituted 1-Naphthamidomethyl-C-galactosyls Interact with Two Unique Sub-Sites for High-Affinity and High-Selectivity Inhibition of Galectin-3. *Molecules*. 24, (2019). <https://doi.org/10.3390/molecules24244554>
206. Kurkcuoglu, Z., Koukos, P.I., Citro, N., Trellet, M.E., Rodrigues, J.P.G.L.M., Moreira, I.S., Roel-Touris, J., Melquiond, A.S.J., Geng, C., Schaarschmidt, J., Xue, L.C., Vangone, A., Bonvin, A.M.J.J.: Performance of HADDOCK and a simple contact-based protein–ligand binding affinity predictor in the D3R Grand Challenge 2. *J Comput Aided Mol Des*. 32, 175–185 (2018). <https://doi.org/10.1007/s10822-017-0049-y>
207. Vangone, A., Schaarschmidt, J., Koukos, P., Geng, C., Citro, N., Trellet, M.E., Xue, L.C., Bonvin, A.M.J.J.: Large-scale prediction of binding affinity in protein–small ligand complexes: the PRODIGY-LIG web server. *Bioinformatics*. 35, 1585–1587 (2019). <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty816>
208. St-Pierre, Y., Biron-Pain, K., Campion, C., Lavoie, G., Bouchard, F., Couillard, J.: Potential directions for drug development against galectin-7 in cancer, (2009)
209. Adria Æ N Rabinovich, G.: Galectins: an evolutionarily conserved family of animal lectins with multifunctional properties; a trip from the gene to clinical therapy.
210. Van Hattum, H., Branderhorst, H.M., Moret, E.E., Nilsson, U.J., Leffler, H., Pieters, R.J.: Tuning the preference of thiodigalactoside- and lactosamine-based ligands to galectin-3 over galectin-1. *J Med Chem*. 56, 1350–1354 (2013). <https://doi.org/10.1021/jm301677r>
211. Kim, B.W., Beom Hong, S., Hoe Kim, J., Hoon Kwon, D., Song, H.K.: Structural basis for recognition of autophagic receptor NDP52 by the sugar receptor galectin-8. *Nat Commun*. 4, (2013). <https://doi.org/10.1038/ncomms2606>
212. Lindstedts, R., Apodacaf, G., Barondess, S.H., Mostovf, K.E., Lefflersb, H.: THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Apical Secretion of a Cytosolic Protein by Madin-Darby Canine Kidney Cells EVIDENCE FOR POLARIZED RELEASE OF AN ENDOGENOUS LECTIN BY A NONCLASSICAL SECRETORY PATHWAY*. (1993)
213. Galecto Biotech AB: A Study to Test the Efficacy and Safety of Inhaled GB0139 in Subjects With Idiopathic Pulmonary Fibrosis (IPF)



Επιχειρησιακό Πρόγραμμα
Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού,
Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



«Η υλοποίηση της διδακτορικής διατριβής συγχρηματοδοτήθηκε από την Ελλάδα και την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση», 2014-2020, στο πλαίσιο της Πράξης με κωδικό ΟΠΣ 5113934 «Ενίσχυση του ανθρώπινου δυναμικού μέσω της υλοποίησης διδακτορικής έρευνας Υποδράση 2: Πρόγραμμα χορήγησης υποτροφιών IKY σε υποψηφίους διδάκτορες των ΑΕΙ της Ελλάδας».