

Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών σπουδών



Μαυρομμάτη Μαρία Ελένη, Ιωάννης

Λάρισα 2024

Βιοχημικές μελέτες της γαλεκτίνης-4

Biochemical Studies of Galectin-4

Τριμελής συμβουλευτική επιτροπή:

**Λεωνίδας Δημήτριος: Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Λάρισα, Ελλάδα**

Μπαλατσός Νικόλαος: Αναπληρωτής καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα, Ελλάδα

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

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες.....	
Περίληψη.....	
<i>Abstract</i>	
1. Εισαγωγή	
1.1 Υδατάνθρακες.....	
1.2 Ιστορική αναδρομή ανακάλυψης λεκτινών	
1.2.1 Ταξινόμηση λεκτινών	
1.2.2 Δομικά χαρακτηριστικά λεκτινών.....	
1.2.3 Πρακτικές εφαρμογές λεκτινών.....	
1.3 Γαλεκτίνες (Λεκτίνες τύπου S) – Χρονολογική πορεία ανακάλυψης τους.....	
1.3.1 Βασικά χαρακτηριστικά των Γαλεκτινών.....	
1.3.2 Κατηγοριοποίηση των ανθρώπινων Γαλεκτινών	
1.3.3 Γαλεκτίνες ως θεραπευτικά μόρια-στόχοι	
1.3.4 Δομή γαλεκτίνης-4	
1.3.5 Φυσιολογικές λειτουργίες της γαλεκτίνης-4	
1.3.6 Ο ρόλος της γαλεκτίνης-4 στον καρκίνο.....	
1.3.6.1 Ενδοκυττάρια επίπεδα γαλεκτίνης-4	
1.3.6.2 Εξωκυττάρια επίπεδα γαλεκτίνης-4.....	
1.4 Κρυσταλλογραφία.....	
1.4.1 Τι είναι κρύσταλλος.....	
1.4.2 Ιστορική αναδρομή κρυστάλλωσης πρωτεϊνών	
1.4.3 Κρυστάλλωση πρωτεϊνών.....	
1.5 Θερμιδομετρία Ισοθερμικής Τιτλοδότησης.....	
2. Σκοπός	
3. Υλικά και Μέθοδοι	

3.1 Υλικά- Αντιδραστήρια.....	
3.2 Οργανολογία.....	
3.3 Πλασμίδια και βακτηριακά στελέχη.....	
3.4 Στήλη υγρής χρωματογραφίας.....	
3.5 Μέθοδοι.....	
3.5.1 Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων.....	
3.5.2 Αξιοποίηση του <i>IPTG</i> για επαγωγή έκφρασης.....	
3.5.3 Χρωματογραφία.....	
3.5.4 Χρωματογραφία συγγένειας.....	
3.6 Πειραματική διαδικασία.....	
3.6.1 Επίστρωση μετασχηματισμένων βακτηριακών κυττάρων σε τρυβλία <i>petri</i>	
3.6.2 Παρασκευή υγρής καλλιέργειας.....	
3.6.3 Καθαρισμός γαλεκτίνης-4 <i>N</i> και -4 <i>C</i>	
3.6.4 Κρυσταλλώσεις γαλεκτίνης-4 <i>N</i> και -4 <i>C</i>	
3.6.5 Αξιοποίηση της μεθόδου Θερμιδομετρίας Ισοθερμικής Τιτλοδότησης (ITC) για προσδιορισμό της σταθεράς πρόσδεσης <i>K_d</i>	
4. Αποτελέσματα.....	
4.1 Καθαρισμός και απομόνωση της γαλεκτίνης-4 <i>N</i>	
4.2 Καθαρισμός και απομόνωση της γαλεκτίνης-4 <i>C</i>	
4.3 Κρυσταλλώσεις της γαλεκτίνης-4 <i>N</i>	
4.4 Μελέτες πρόσδεσης του προσδέτη 13 στη γαλεκτίνη-4 <i>N</i> και -4 <i>C</i>	
5. Συζήτηση.....	
6. Βιβλιογραφία.....	

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας από τον Οκτώβριο του 2023 έως και τον Φεβρουάριο του 2024. Θα ήθελα ιδιαίτερα να ευχαριστήσω τον καθηγητή Βιοχημείας και επιβλέποντα της διπλωματικής μου εργασίας Δρ. Λεωνίδα Δημήτριο, ο οποίος με χαρά έκανε δεκτό το αίτημά μου να εκπονήσω την διπλωματική μου εργασία υπό την επίβλεψή του. Η παρότρυνσή του να τα καταφέρω, η ενθάρρυνση καθώς και η καθοδήγησή του ήταν σημαντικά στοιχεία για την επίτευξη του στόχου. Στην συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την υπόλοιπη εξεταστική μου επιτροπή, Επίκουρο καθηγήτρια Σκαμνάκη Βασιλική και Αναπληρωτή καθηγητή Μπαλατσό Νικόλαο, οι οποίοι έδειξαν εμπιστοσύνη στο πρόσωπό μου για την εκπόνηση του θέματος που ανέλαβα.

Ένα ξεχωριστό ευχαριστώ θα ήθελα να αποδώσω στην Δρ. Τσαγκαράκου Αναστασία, η οποία σε όλο το διάστημα εκπόνησης της εργασίας μου χειρίστηκε με άψογο τρόπο το άγχος και την θέλησή μου για την επίτευξη της εργασίας. Η αδιάκοπη προσπάθεια και ο άπλετος χρόνος που διέθεσε για να με βοηθήσει κατέστη σημαντικός για την επιτυχία μου. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Δρ. Καντσάδη Νατάσσα, τον Δρ. Στραβοδήμο Γεώργιο, την Δρ. Δράκου Χριστίνα, τον Δρ. Κούλα Συμεών και τους υποψήφιους διδάκτορες Αλεξόπουλο Σεραφείμ και Γεωργαντόπουλο Αχιλλέα, οι οποίοι σε δύσκολες στιγμές διέθεσαν πολύτιμο χρόνο για την επίλυση των δυσκολιών που προέκυψαν.

Τέλος, δεν θα μπορούσαν να μην αναφερθώ στην οικογένεια μου και τους φίλους μου. Δύο αναπόσπαστα κομμάτια που σε δύσκολες στιγμές μου έδωσαν θάρρος και ώθηση να τα καταφέρω. Η επιμονή και η υπομονή τους ήταν δύο όπλα που με οδήγησαν στην επίτευξη της διπλωματικής μου εργασίας.

Περίληψη

Οι γαλεκτίνες ανήκουν σε μία οικογένεια πρωτεϊνών που διαθέτουν μία επικράτεια αναγνώρισης υδατανθράκων (*Carbohydrate Recognition Domain-CRD*), 135 καταλοίπων περίπου, μέσω της οποίας προσδένουν ειδικά β-γαλακτοζίτες. Οι γαλεκτίνες παρόλο που ανήκουν στην ίδια οικογένεια και έχουν υψηλή ομολογία μεταξύ τους, κάθε μία από αυτές εμφανίζει διαφορετική συγγένεια ως προς τους σακχαρίτες. Μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί τα τελευταία χρόνια έχουν αναδείξει τις ανθρώπινες γαλεκτίνες ως ιδιαίτερα σημαντικές καθώς συμμετέχουν σε πλήθος βιολογικών και παθολογικών διεργασιών. Συνεπώς αποτελούν φαρμακευτικούς στόχους για μεγάλο εύρος ασθενειών. Πιο συγκεκριμένα η γαλεκτίνη-4 ανήκει στην οικογένεια των διαδοχικά επαναλαμβανόμενων γαλεκτινών. Διαθέτει δύο επικράτειες αναγνώρισης υδατανθράκων, μία στο αμινοτελικό και μία στο καρβοξυτελικό άκρο, των οποίων η αμινοξική ομολογία είναι περίπου 40%. Η γαλεκτίνη-4 παίζει σημαντικό ρόλο τόσο στη φυσιολογική λειτουργία του εντέρου όσο και του κεντρικού νευρικού συστήματος. Ωστόσο, έχει διαπιστωθεί ότι αλλαγές στα ενδοκυττάρια επίπεδα παραγωγής της μπορούν να οδηγήσουν στην εμφάνιση διαφόρων τύπων καρκίνου, ενώ αλλαγές στα εξωκυττάρια επίπεδα της προωθούν τις μεταστάσεις των καρκινικών κυττάρων.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε κάθε επικράτεια πρόσδεσης υδατανθράκων της γαλεκτίνης-4 χωριστά. Πιο συγκεκριμένα έγινε παραγωγή, απομόνωση και καθαρισμός τόσο της γαλεκτίνης-4N όσο και της γαλεκτίνης-4C. Επίσης, έγιναν επιτυχείς προσπάθειες κρυστάλλωσης της πρώτης. Τέλος, πραγματοποιήθηκαν πειράματα θερμιδομετρίας ισοθερμικής τιτλοδότησης (ITC) με τον προσδέτη **13**. Η ένωση **13** έχει δειχθεί πως αποτελεί ισχυρό προσδέτη για τη γαλεκτίνη-3 με $K_d=18,4 \mu M$. Στόχος της μεταπτυχιακής διατριβής ήταν να διαπιστωθεί αν ο προσδέτης αυτός εμφανίζει συγγένεια για τις γαλεκτίνες -4N και -4C. Τα αποτελέσματα των μελετών θα αναδείξουν αν ο **13** αποτελεί κατάλληλη ένωση-οδηγό, για το σχεδιασμό νέων ανταγωνιστών της γαλεκτίνης-4 που θα μπορούσαν μελλοντικά να αξιοποιηθούν ως φάρμακα.

Λέξεις - κλειδιά:

Λεκτίνες, γαλεκτίνη-4, απομόνωση, συγγένεια, κρυστάλλωση, προσδέτης

Abstract

Galectins belong to a protein family that have a Carbohydrate Recognition Domain (CRD), about 135 residues long, which binds β -galactosides. Although galectins belong to the same family and they display a high degree of homology, each one displays different affinity for saccharides. Over the last years, galectins have emerged as pharmaceutical targets since they have crucial roles in many pathological processes. Galectin-4 is a tandem repeat galectin. Galectin-4 has two Carbohydrate Recognition Domains, one at the N-terminus and the other at the C-terminus and with 40% sequence homology. Galectin-4 promotes intestinal wound healing, and it has an important role in the function of the central nervous system. However, it has been reported that changes in its intracellular production levels can cause various types of cancer, while changes in its extracellular levels can promote cancer cells metastasis.

In this thesis, each Carbohydrate Recognition Domain (CRD) of galectin-4 was studied separately. Both galectin-4N and galectin-4C were expressed, isolated and purified. Also, galectin-4N was crystallized. Finally, Isothermal Titration Calorimetry (ITC) experiments were performed with the ligand **13**. This ligand has been previously shown to be a potent antagonist for galectin-3 displaying $K_d=18,4 \mu M$. The main purpose of this thesis was to determine whether this ligand displays significant potency against galectins -4N and -4C. Our studies will reveal whether this ligand can be a lead compound for the design of new galectin-4 specific antagonists, which in the future might be used as pharmaceutical agents.

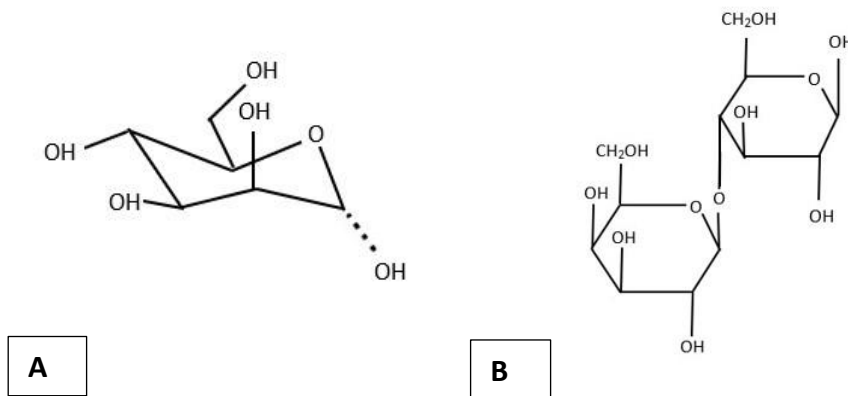
Keywords:

Lectins, galectin-4, isolated, affinity, crystallization, ligand

1. Εισαγωγή

1.1 Υδατάνθρακες

Η μελέτη των νουκλεϊκών οξέων, των πρωτεϊνών και των λιπιδίων που αποτελούν τις τρεις από τις τέσσερις κατηγορίες οργανικών μορίων απασχολεί τους ερευνητές από πολύ παλιά. Οι υδατάνθρακες, η τέταρτη κατηγορία οργανικών μορίων, είναι αρκετά πολύπλοκοι συνεπώς η μελέτη τους άρχισε να βρίσκεται στο πεδίο της έρευνας τα τελευταία μόνο χρόνια, λόγω της εξέλιξης της τεχνολογίας και της παροχής περισσότερων μέσων για την μελέτη δύσκολων μηχανισμών του συστήματος των οργανισμών. Οι υδατάνθρακες βρίσκονται σε μεγάλη αφθονία στη φύση. Μπορεί να είναι μονοσακχαρίτες (π.χ. D-μαννόζη), δισακχαρίτες (π.χ. λακτόζη) (Εικόνα 1), ολιγοσακχαρίτες ή πιο πολύπλοκα μόρια όπως πολυσακχαρίτες. Οι μονοσακχαρίτες μπορούν να τροποποιούνται χημικά με την προσθήκη υποκαταστατών, οι οποίοι συνδέονται μέσω δεσμών που ονομάζονται γλυκοζιτικοί. Τέτοιοι υδατάνθρακες εντοπίζονται συχνότερα στην επιφάνεια των κυττάρων. Συνεπώς, λόγω της πολυπλοκότητας τους και του εντοπισμού τους στην κυτταρική επιφάνεια, έχουν πολυποίκιλους ρόλους. Ενδεικτικά, λειτουργούν ως σηματοδοτικά μόρια, μόρια αναγνώρισης και μόρια προσκόλλησης. Επομένως, συμμετέχουν σε λειτουργίες όπως η εμβρυική ανάπτυξη, η κυτταρική διαφοροποίηση, η μεταγωγή σήματος και η αλληλεπίδραση παθογόνου-ξενιστή. Οι υδατάνθρακες σχηματίζουν σύμπλοκα με πρωτεΐνες μέσω γλυκοζιτικών δεσμών. Αλλαγές στη γλυκοζυλίωση των πρωτεϊνών προκαλούν προβλήματα σε όλες τις διεργασίες που αναφέρθηκαν προηγουμένως ότι συμμετέχουν αυτοί. Μία από τις πιο σημαντικές κατηγορίες πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με υδατάνθρακες είναι οι λεκτίνες (Ghazarian et al., 2010).



Εικόνα 1: Απεικόνιση του χημικού τύπου του μονοσακχαρίτη D-μαννόζη (A) και του δισακχαρίτη λακτόζη (B).

1.2 Ιστορική αναδρομή ανακάλυψης λεκτινών

Η πρώτη λεκτίνη εντοπίστηκε το 1888 σε καστορέλαιο από τον επιστήμονα Stillmark (Van Damme et al., 2022), ο οποίος μάλιστα διαπίστωσε πως είχε τοξική δράση. Ωστόσο, μετέπειτα μελέτες από τους επιστήμονες Landsteiner και Raubitschek (Van Damme et al., 2022) έδειξαν την ύπαρξη και άλλων λεκτινών, οι οποίες όμως δεν έφεραν τοξική δράση. Από περαιτέρω μελέτες διαπιστώθηκε η ικανότητα των λεκτινών να στοχεύουν κύτταρα επιλεκτικά φέροντας τα σε επαφή. Αυτό ήταν εφικτό καθώς διέθεταν επικράτειες αναγνώρισης υδατανθράκων (carbohydrate recognition domain), μέσω των οποίων αναγνώριζαν υδατάνθρακες που υπήρχαν στην επιφάνεια των κυττάρων. Για τον λόγο αυτό οι συγκεκριμένες πρωτεΐνες πήραν την ονομασία <<Λεκτίνη>>, η οποία προέρχεται από την λατινική λέξη <<legere>> που σημαίνει <<επιλέγω>> και στην πραγματικότητα σχετίζεται με την ικανότητα των λεκτινών να στοχεύουν επιλεκτικά τα κύτταρα τα οποία θα φέρουν σε επαφή. Με την πάροδο του χρόνου και την ολοκλήρωση επιπλέον μελετών βελτιώθηκε σημαντικά ο ορισμός <<Λεκτίνη>> αφού αποκτήθηκαν περαιτέρω στοιχεία για αυτές τις πρωτεΐνες, ένα από τα οποία είναι η απουσία ενζυμικής δραστηριότητας (Van Damme et al., 2022).

1.2.1 Ταξινόμηση λεκτινών

Οι λεκτίνες βρίσκονται σε πλήθος ζωντανών οργανισμών όπως τα ζώα, τα φυτά, τα βακτήρια και ο άνθρωπος. Ταξινομούνται σε διάφορους τύπους βάσει της δομικής τους ομοιότητας και προσδένουν γλυκάνες. Διευκολύνουν την επαφή των κυττάρων καθώς έχουν την ικανότητα πρόσδεσης ειδικών περιοχών των υδατανθράκων γειτονικών κυττάρων όπως αναφέρθηκε και παραπάνω. Αυτό είναι εφικτό καθώς οι λεκτίνες έχουν συνήθως δύο ή περισσότερες περιοχές πρόσδεσης για τους υδατάνθρακες. Τα σύμπλοκα των υδατανθράκων με τις λεκτίνες σχηματίζονται μέσω σχετικά ασθενών δεσμών. Αυτό που καθιστά τις λεκτίνες ικανές να συμμετέχουν σε βιολογικές διεργασίες του οργανισμού σε σύμπλοκα με τους υδατάνθρακες είναι η ανθεκτικότητα τους στην υψηλή θέρμανση και την πέψη. Ακόμη, η ταξινόμηση των λεκτινών που προέρχονται από σπονδυλωτά γίνεται με βάση τη δομή και τον υποκυτταρικό εντοπισμό τους. Η δεύτερη περίπτωση αφορά λεκτίνες που είτε βρίσκονται ως δομικά συστατικά στις μεμβράνες είτε είναι διαλυτές και βρίσκονται σε ενδοκυττάρια και μεσοκυττάρια υγρά (Radhakrishnan et al., 2021).

Υπάρχουν πέντε τύποι λεκτινών: Α) οι λεκτίνες τύπου C, Β) οι λεκτίνες τύπου I, Γ) οι λεκτίνες τύπου P, Δ) οι πενταξίνες και Ε) οι γαλεκτίνες ή λεκτίνες τύπου S. Όσον αφορά την πρώτη κατηγορία η πρόσδεση υδατανθράκων στις λεκτίνες τύπου C είναι ασβεστοεξαρτώμενη. Οι λεκτίνες τύπου I αποτελούν μία κατηγορία της υπεροικογένειας

των ανοσοσφαιρινών και έχουν την ικανότητα να αναγνωρίζουν ειδικά τόσο τα σιαλικά οξέα όσο και άλλους υδατανθρακικούς προσδέτες. Οι λεκτίνες τύπου *P* αναγνωρίζουν τις γλυκάνες που έχουν 6-φωσφορική манόζη (M6P) (Dahms et al., 2002), ενώ οι πενταξίνες είναι πενταμερείς πρωτεΐνες που παίζουν σημαντικό ρόλο στην έμφυτη ανοσία. Τέλος, οι γαλεκτίνες είναι μία υπεροικογένεια πρωτεϊνών, η οποία χαρακτηρίζεται από υψηλή συγγένεια πρόσδεσης για β-γαλακτοζίτες (Raposo et al., 2021).

1.2.2 Δομικά χαρακτηριστικά λεκτινών

Η εξειδίκευση της πρόσδεσης των λεκτινών με τους υδατάνθρακες εξαρτάται από την τρισδιάστατη δομή τους. Αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα πως υπάρχει ένα καλά συντηρημένο αμινοξικό προφίλ στην οικογένεια των λεκτινών. Συνεπώς, οι λεκτίνες είναι πρωτεΐνες που διαθέτουν υψηλά ποσοστά ομοιότητας στα αμινοξικά κατάλοιπα τους και πιο συγκεκριμένα σε αυτά που είναι υπεύθυνα για την δημιουργία συμπλόκου λεκτίνης-υδατάνθρακα. Ανάλογα με τη φύση των λεκτινών, αυτές μπορούν να διαθέτουν περισσότερες της μίας θέσεις πρόσδεσης για υδατάνθρακες. Η αλληλεπίδραση μεταξύ λεκτίνης και υδατάνθρακα πραγματοποιείται κυρίως με δεσμούς υδρογόνου και αλληλεπιδράσεις van der Waals (Raposo et al., 2021).

1.2.3 Πρακτικές εφαρμογές λεκτινών

Λόγω της υψηλής εξειδίκευσης τους οι λεκτίνες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ιατρική τόσο ως διαγνωστικά όσο και ως θεραπευτικά μόρια. Επιπλέον η κυτταρική βιολογία, η βιοχημεία και η ανοσολογία τις αξιοποιεί ως εργαλεία για την κατανόηση διαφόρων μηχανισμών. Πιο συγκεκριμένα οι λεκτίνες εμπλέκονται στη διαδικασία της μίτωσης. Συνεπώς η μελέτη των λεκτινών και της ενεργοποίησης των λεμφοκυττάρων από αυτές έδωσε πολλές πληροφορίες σχετικά με την διαδικασία της μίτωσης και της κυτταρικής ανάπτυξης. Μία χαρακτηριστική πρακτική εφαρμογή των λεκτινών είναι στην περίπτωση του καρκίνου. Η θεραπεία του θα πρέπει να στοχεύει εξειδικευμένα μόνο τα καρκινικά κύτταρα. Οι θεραπείες που διατίθενται μέχρι και σήμερα στις διάφορες περιπτώσεις καρκίνου δεν στοχεύουν ειδικά, συνεπώς έχουν παρενέργειες και επιπλοκές στους ασθενείς που τις λαμβάνουν. Μελέτες των τελευταίων ετών έχουν αναδείξει διάφορους τύπους λεκτινών ως θεραπευτικά μέσα στην καταπολέμηση του καρκίνου. Συγκεκριμένα αρκετές λεκτίνες έχουν επιδείξει αντικαρκινική δράση τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. Η δράση τους στηρίζεται στην ικανότητα τους να προσδένονται στις μεμβράνες των καρκινικών κυττάρων προκαλώντας κυτταροτοξικότητα και απόπτωση με αποτέλεσμα να αναστέλλεται η ανάπτυξη του όγκου. Ακόμα, οι λεκτίνες συνδέονται στα

ριβοσώματα αναστέλλοντας την πρωτεϊνική σύνθεση. Επιπλέον, οι λεκτίνες έχουν την ικανότητα να ενεργοποιούν τον καταρράκτη των κασπασών ενισχύοντας και πάλι την διαδικασία της απόπτωσης. Μία ακόμα εφαρμογή των λεκτινών είναι η αξιοποίηση τους ως αντιϊικοί παράγοντες. Οι ιοί διαθέτουν περίβλημα πάνω στο οποίο υπάρχουν γλυκοπρωτεΐνες. Οι γλυκοπρωτεΐνες είναι πρωτεΐνες, στις οποίες υπάρχουν προσδεμένες ομάδες γλυκανών. Οι λεκτίνες είναι μόρια που αλληλεπιδρούν ειδικά με τις γλυκάνες διαταράσσοντας έτσι τις αλληλεπιδράσεις των πρωτεϊνών του περιβλήματος των ιών με το κύτταρο ξενιστή. Συνεπώς, εμποδίζουν την προσβολή των κυττάρων ξενιστών από τους ιούς. Τέλος, οι λεκτίνες μπορούν να αξιοποιηθούν και ως αντιμυκητιακοί και εντομοκτόνοι παράγοντες, καθώς με την πρόσδεση τους στις μεμβράνες των μυκήτων, των βακτηρίων και των διαφόρων παθογόνων μικροοργανισμών επηρεάζουν τόσο τη δραστηριότητα όσο και τη βιωσιμότητα τους (Fern Bah et al., 2012, Chettri et al., 2021).

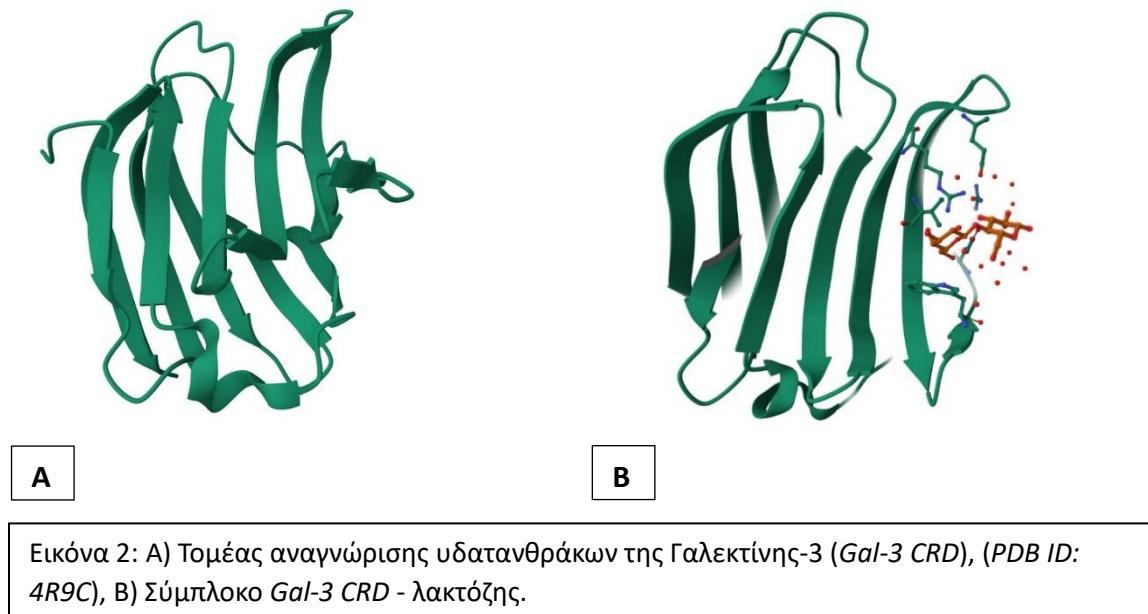
1.3 Γαλεκτίνες (Λεκτίνες τύπου S) – Χρονολογική πορεία ανακάλυψης τους

Το 1975 πραγματοποιήθηκε η πρώτη απομόνωση γαλεκτινών από σπονδυλωτά (Arthur et al., 2015). Το 1976 βρέθηκαν και απομονώθηκαν οι πρώτες γαλεκτίνες σε πτηνά και θηλαστικά και πιο συγκεκριμένα σε μυς κοτόπουλου και ιστούς καρδιάς και πνεύμονα μοσχαριού (Cummins et al., 2009). Για να απομονωθεί η γαλεκτίνη-1 (όπως ονομάζεται πλέον) ήταν απαραίτητη η παρουσία λακτόζης. Η απομόνωση της έγινε μέσω στήλης συγγένειας και συγκεκριμένα στήλη λακτόζης, καθώς οι γαλεκτίνες συνδέονται ειδικά στα μόρια λακτόζης. Το 1980 απομονώθηκε από ινοβλάστες ποντικού η γαλεκτίνη-3 με μοριακό βάρος 35 kDa, η οποία ήταν συνδεμένη ειδικά με β-γαλακτοζίτες (Cummins et al., 2009). Οι γαλεκτίνες αρχικά αναφέρονταν ως λεκτίνες τύπου S, καθώς είχε βρεθεί πως δρουν υπό αναγωγικές συνθήκες και είναι θειοεξαρτώμενες. Ο όρος <<Γαλεκτίνη>> χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1994, οπότε και συστηματοποιήθηκε η επίσημη ονοματολογία όλων των γαλεκτινών (Cummins et al., 2009). Η πρώτη γαλεκτίνη που βρέθηκε ονομάστηκε γαλεκτίνη-1, το πιο κοντινό ομόλογο αυτής ονομάστηκε γαλεκτίνη-2 και ακολούθησαν οι υπόλοιπες με βάση την σειρά ανακάλυψης τους (Liu et al., 2023).

1.3.1 Βασικά χαρακτηριστικά των Γαλεκτινών

Οι γαλεκτίνες είναι πρωτεΐνες που έχουν μία επικράτεια αναγνώρισης υδατανθράκων (*Carbohydrate Recognition Domain – CRD*), η οποία αποτελείται από περίπου 130 κατάλοιπα. Ωστόσο, για την αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης με τους υδατάνθρακες μόνο ένας μικρός αριθμός των καταλοίπων της CRD παίζει ρόλο (Εικόνα 2). Μελέτες 100

γαλεκτινών από διαφορετικούς οργανισμούς μέσω κρυσταλλογραφικών αναλύσεων με ακτίνες Χ έχουν οδηγήσει στο συμπέρασμα ότι τα 8 κατάλοιπα της *CRD*, που παίζουν ρόλο στην αλληλεπίδραση με τους υδατάνθρακες, είναι συντηρημένα, ενώ άλλα 12 είναι μερικώς συντηρημένα (Modenutti et al., 2019, Cummings et al., 2022).



1.3.2 Κατηγοριοποίηση των ανθρώπινων Γαλεκτινών

Στα θηλαστικά έχουν βρεθεί μέχρι σήμερα 15 γαλεκτίνες, ωστόσο μόνο 12 γονίδια που κωδικοποιούν για γαλεκτίνες έχουν βρεθεί στον άνθρωπο, εκ των οποίων τα δύο κωδικοποιούν για τη γαλεκτίνη-9. Οι ανθρώπινες γαλεκτίνες κατηγοριοποιούνται σε 3 μεγάλες ομάδες (Cummings et al., 2009):

- 1) Τις πρωτότυπες γαλεκτίνες
- 2) Τις χιμαιρικές γαλεκτίνες
- 3) Τις διαδοχικά επαναλαμβανόμενες γαλεκτίνες

Η πρώτη ομάδα αφορά τις γαλεκτίνες που διαθέτουν μόνο μία *CRD*, η οποία μπορεί να συνδεθεί με την *CRD* μίας πανομοιότυπης γαλεκτίνης σχηματίζοντας ομοδιμερή. Σε αυτή τη κατηγορία ανήκουν οι γαλεκτίνες 1, 2, 7, 10, 13, 14 και 16 (Εικόνα 3) (Modenutti et al., 2019, Cummings et al., 2009).



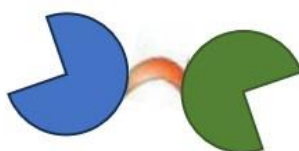
Εικόνα 3: Πρωτότυπη γαλεκτίνη

Στη δεύτερη ομάδα ανήκει η γαλεκτίνη-3, η μοναδική χιμαιρική γαλεκτίνη που έχει βρεθεί στα σπονδυλωτά μέχρι σήμερα. Η γαλεκτίνη-3 διαθέτει μία *CRD* και μία αμινοτελική περιοχή, η οποία είναι πλούσια σε κατάλοιπα προλίνης, γλυκίνης και τυροσίνης (Εικόνα 4). Μέσω αυτών των καταλοίπων συνδέεται με πρωτεΐνες που έχουν παρόμοια κατάλοιπα και συμμετέχουν σε διάφορες βιοχημικές διεργασίες του οργανισμού (Modenutti et al., 2019, Cummings et al., 2009).



Εικόνα 4: Χιμαιρική γαλεκτίνη

Στην τρίτη ομάδα ανήκουν οι γαλεκτίνες 4,8,9 και 12. Οι γαλεκτίνες αυτές διαθέτουν δύο *CRDs* με τη μία να βρίσκεται στο αμινοτελικό άκρο και την άλλη στο καρβοξυτελικό άκρο (Εικόνα 5). Οι δύο *CRDs* συνδέονται μεταξύ τους μέσω ενός πεπτιδίου μήκους περίπου 70 καταλοίπων, το οποίο είναι ευαίσθητο στην πρωτεόλυση. Επίσης, σε κάθε *CRD* μπορούν να προσδένονται ταυτόχρονα διαφορετικοί προσδέτες. Ενώ στις γαλεκτίνες της ίδιας οικογένειας το ποσοστό ομολογίας των *CRDs* είναι χαμηλό και το μοτίβο αναδίπλωσης τους είναι καλά συντηρημένο, στις διαδοχικά επαναλαμβανόμενες γαλεκτίνες δεν παρατηρείται το φαινόμενο αυτό. Συγκεκριμένα στην ομάδα αυτή τόσο η αμινοξική αλληλουχία όσο και το μοτίβο αναδίπλωσης των δύο *CRDs* της ίδιας γαλεκτίνης διαφέρει σημαντικά. Όσον αφορά την γαλεκτίνη-12 η *CRD* του καρβοξυτελικού άκρου εμφανίζει ποσοστό ομολογίας χαμηλότερο από 20% συγκριτικά με τις γαλεκτίνες της ίδιας οικογένειας (Modenutti et al., 2019, Cummings et al., 2009).



Εικόνα 5: Διαδοχικά επαναλαμβανόμενη

1.3.3 Γαλεκτίνες ως θεραπευτικά μόρια-στόχοι

Οι γαλεκτίνες αποτελούν μία κατηγορία πρωτεϊνών που παράγονται σε όλους σχεδόν τους κυτταρικούς τύπους. Ωστόσο, τα επίπεδα παραγωγής κάθε γαλεκτίνης διαφέρουν ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο. Συντίθενται στα ριβοσώματα και μεταφέρονται τόσο στον πυρήνα όσο και σε άλλες υποκυτταρικές περιοχές. Η λειτουργία κάθε γαλεκτίνης μπορεί να διαφέρει σημαντικά από αυτές των υπολοίπων. Επίσης, οι γαλεκτίνες έχουν πολυλειτουργικό ρόλο καθώς, ρυθμίζουν πολλαπλές κυτταρικές αποκρίσεις και βιολογικές λειτουργίες όπως τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την ανοσολογική απόκριση, τη διαφοροποίηση και την κυτταρική ανάπτυξη μέσω της αλληλεπίδρασης με γλυκολιπίδια και γλυκοπρωτεΐνες. Λόγω λοιπόν, της μεγάλης σημασίας των πρωτεϊνών αυτών για τη λειτουργία του ανθρώπινου οργανισμού μεταβολές στα φυσιολογικά επίπεδα παραγωγής τους συχνά οδηγεί σε σοβαρές παθήσεις. Συνεπώς, οι έρευνες πολλών εργαστηρίων παγκοσμίως επικεντρώθηκαν στην ανακάλυψη αλλά και τον σχεδιασμό μορίων-ανταγωνιστών των γαλεκτινών. Οι περισσότεροι ανταγωνιστές βασίζονται αρχικά στον δισακχαρίτη λακτόζη και τροποποιούνται στην πορεία με τέτοιο τρόπο ώστε ο καθένας από αυτούς να εξειδικεύεται και να στοχεύει σε μία μόνο γαλεκτίνη (Dings et al., 2018).

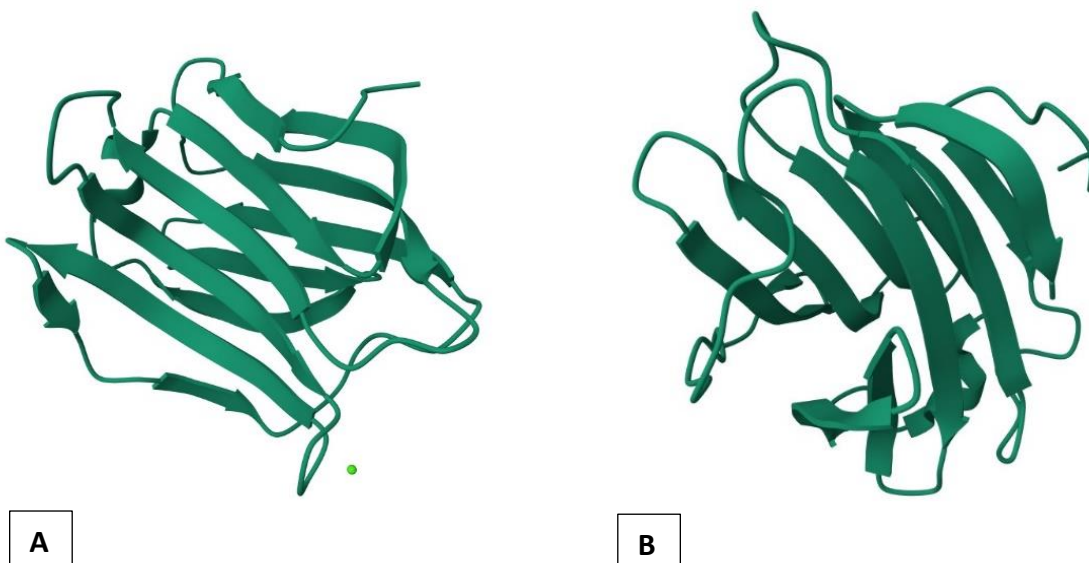
1.3.4 Δομή γαλεκτίνης-4

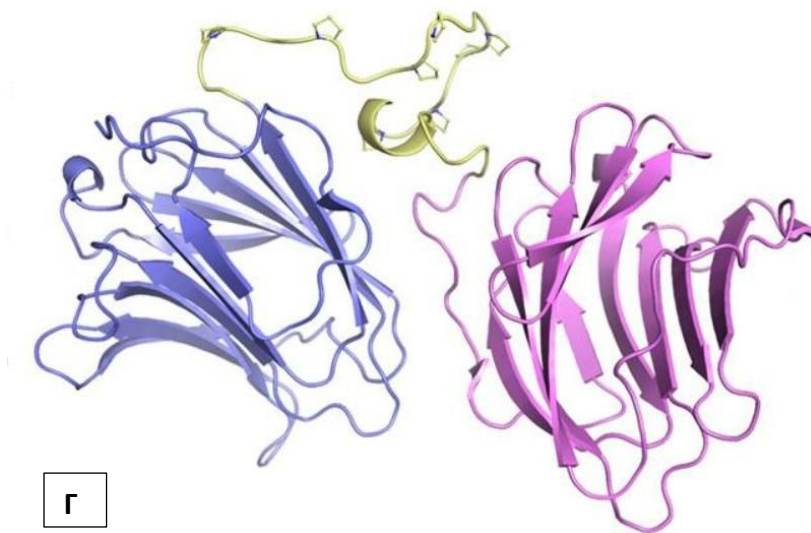
Η γαλεκτίνη-4 ανήκει στην οικογένεια των διαδοχικά επαναλαμβανόμενων γαλεκτινών και κωδικοποιείται από το γονίδιο *LGALS4*. Όσον αφορά την ανθρώπινη γαλεκτίνη-4 το γονίδιο που την κωδικοποιεί βρίσκεται στο χρωμόσωμα 19 q13.1-13.3. Η κωδική περιοχή αποτελείται από 9 εξόνια και το μήκος της είναι περίπου 1 kb. Συνεπώς, έχει 323 αμινοξικά κατάλοιπα και μοριακό βάρος 36 kDa. Τα κατάλοιπα 1 έως 150 απαρτίζουν τη CRD που βρίσκεται στο αμινοτελικό άκρο, τα 151 έως και 178 τον πεπτιδικό συνδέτη και τα 179 έως και 323 τη CRD που βρίσκεται στο καρβοξυτελικό άκρο. Οι δύο CRDs έχουν αμινοξική ομολογία περίπου 40%. Ο πεπτιδικός συνδέτης, ο οποίος αποτελείται περίπου από 30 κατάλοιπα είναι υπεύθυνος για τις ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις των 2 CRDs, είναι πλούσιος σε προλίνες και γλυκίνες, είναι εύκαμπτος και ευαίσθητος στην πρωτεόλυση. Επίσης, έχει βρεθεί πως παίζει ρόλο στην επαγωγή ορισμένων βιολογικών αποκρίσεων του οργανισμού, ωστόσο, η ευαισθησία του στην πρωτεόλυση καθιστά δύσκολη τη μελέτη ολόκληρης της γαλεκτίνης-4. Για αυτό το λόγο πραγματοποιούνται μελέτες κάθε CRD μεμονωμένα παρά το ενδιαφέρον που έχει ο πεπτιδικός συνδέτης του οποίου η μελέτη θα μπορούσε να προσφέρει πλήθος γνώσεων σχετικά με τις βιολογικές διεργασίες που συμμετέχει (Rustiguel et al., 2016).

Η αρχιτεκτονική της ανθρώπινης γαλεκτίνης-4N-CRD είναι καλά συντηρημένη μεταξύ των μελών της οικογένειας των γαλεκτινών. Συγκεκριμένα, αποτελείται από 2

αντιπαράλληλα β-πτυχωτά φύλλα, *F1-F5* και *S1-S6* και η κοίλη πλευρά (*S1-S6*) δημιουργεί την περιοχή πρόσδεσης υδατανθράκων (*Carbohydrate Binding Site – CBS*) (Εικόνα 6). Η CBS αποτελείται από 5 υποκέντρα που ονομάζονται *A*, *B*, *C*, *D* και *E* (Bum-Erdene et al., 2016). Το υποκέντρο *C* είναι υπεύθυνο για τη δέσμευση των β-γαλακτοζιτών. Υπάρχει και ένα δεύτερο υποκέντρο για τη δέσμευση β-γαλακτοζιτών, το *D*. Ωστόσο τα δύο αυτά υποκέντρα διαφέρουν καθώς το *D* εμφανίζει μικρότερη εξειδίκευση ως προς τη δέσμευση επομένως, μπορούν να προσδεθούν πολλοί διαφορετικοί σακχαρίτες. Συνεπώς, αυτή η θέση προσδίδει μία μικρή εξειδίκευση ως προς την πρόσδεση σακχαριτών μεταξύ των διαφορετικών γαλεκτινών. Όμως, αυτή η εξειδίκευση είναι αρκετά μικρή αφού μελέτες έδειξαν ότι τα κατάλοιπα των περιοχών *C* και *D* της CBS είναι καλά συντηρημένα μεταξύ γαλεκτινών της ίδιας οικογένειας. Η εξειδίκευση αυτή εξαρτάται κυρίως από τα υποκέντρα *A* και *B*, τα οποία εμφανίζουν χαμηλή συντήρηση στα κατάλοιπα συγκριτικά με άλλες γαλεκτίνες, οπότε κάθε γαλεκτίνη εμφανίζει διαφορετική συγγένεια με κάθε προσδέτη. Τέλος, όσον αφορά το υποκέντρο *E* εξειδικεύει σε μεγαλύτερο βαθμό την πρόσδεση σακχαριτών αυξάνοντας ακόμα περισσότερο τη συγγένεια μεταξύ προσδέτη και γαλεκτίνης (Leffler et al., 2002).

Η αρχιτεκτονική της γαλεκτίνης-4C-CRD είναι παρόμοια με αυτή της γαλεκτίνης-4N-CRD. Αυτό πρακτικά σημαίνει πως παρατηρούνται και πάλι 2 αντιπαράλληλα β-πτυχωτά φύλλα, *F1-F5* και *S1-S6* (Εικόνα 6). Μεταξύ των καταλοίπων της CRD του καρβοξυτελικού άκρου, η *Tyr320* φαίνεται πως παίζει καθοριστικό ρόλο, καθώς αποτελεί στόχο φωσφορυλίωσης από τις κινάσες *SRC* επηρεάζοντας άμεσα την έκκριση της γαλεκτίνης-4. Ωστόσο, δεν έχει παρατηρηθεί κάποια επίδραση της φωσφορυλίωσης στη συγγένεια πρόσδεσης των υδατανθράκων. Τέλος, όπως στο αμινοτελικό άκρο έτσι και στο καρβοξυτελικό η κοίλη πλευρά (*S1-S6*) δημιουργεί την CBS, στην οποία τα κατάλοιπα των περιοχών *C* και *D* είναι καλά συντηρημένα σε σχέση με γαλεκτίνες της ίδιας οικογένειας ενώ τα αμινοξικά κατάλοιπα των περιοχών *A*, *B* και *E* δεν είναι (Bum-Erdene et al., 2015).





Εικόνα 6: Α) Γαλεκτίνη-4N-CRD (PDB ID: 5DUV), Β) Γαλεκτίνη-4C-CRD (PDB ID: 4YM3), Γ) Ολόκληρη η δομή της γαλεκτίνης-4 (Rustiguel et al., 2016).

1.3.5 Φυσιολογικές λειτουργίες της γαλεκτίνης-4

Η γαλεκτίνη-4 παράγεται φυσιολογικά στα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου. Συνεπώς, είναι μία πρωτεΐνη αρκετά σημαντική στην αντιμετώπιση των εντερικών διαταραχών. Σε περιπτώσεις όπως το πεπτικό έλκος, τις εντερικές λοιμώξεις ή τη διάτρηση του εντέρου η γαλεκτίνη-4 παίζει καθοριστικό ρόλο. Συγκεκριμένα, σε όλες αυτές τις περιπτώσεις είναι απαραίτητη η μετανάστευση φυσιολογικών γειτονικών επιθηλιακών κυττάρων για την αποκατάσταση του εντερικού φραγμού που έχει υποστεί καταστροφή. Η γαλεκτίνη-4 όπως αποδείχθηκε παίζει καθοριστικό ρόλο στην ενίσχυση της μετακίνησης αυτών των κυττάρων. Αυτό το επιτυγχάνει μέσω του συμπλόκου καντερίνης-κατενινών, οι οποίες συνδέονται άμεσα με τις πρωτεΐνες ακτίνη και μυοσίνη που με τη σειρά τους επηρεάζουν την σταθερότητα των επιθηλιακών κυττάρων. Ωστόσο, ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο η γαλεκτίνη-4 μεσολαβεί στην μετανάστευση των επιθηλιακών κυττάρων του εντέρου είναι άγνωστος. Η μετανάστευση των κυττάρων δεν αποτελεί τον μοναδικό τρόπο αποκατάστασης του εντερικού φραγμού. Ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η ωρίμανση και η διαφοροποίηση των κυττάρων σε επιθηλιακά αποτελούν εξίσου σημαντικούς τρόπους. Η γαλεκτίνη-4 παίζει σημαντικό ρόλο και σε αυτές τις διεργασίες. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η ενίσχυση της έκφρασης της κυκλίνης B1 από την γαλεκτίνη-4 με αποτέλεσμα την ενίσχυση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού καθώς οι κυκλίνες είναι γνωστά μόρια ενίσχυσης του κυτταρικού κύκλου (Cao et al., 2016).

Ο νευράξονας είναι απαραίτητος για την ταχεία μετάδοση των νευρικών ερεθισμάτων με στόχο τη σωστή λειτουργία του κεντρικού νευρικού συστήματος. Η γαλεκτίνη-4 έχει

φανεί πως παίζει έμμεσο ρόλο στην ανάπτυξη του νευράξονα. Συγκεκριμένα, το μόριο προσκόλλησης νευρικών κυττάρων L1 (NCAM1) είναι μία γλυκοπρωτεΐνη του νευράξονα, η οποία ρυθμίζει την ανάπτυξη του νευρίτη και τη νευρική αγωγιμότητα. Η γαλεκτίνη-4 μέσω της CRD αλληλεπιδρά με μόρια NCAM1 δημιουργώντας συστάδες από αυτά, προάγοντας την ανάπτυξη των νευριτών. Επομένως, η παραγωγή της γαλεκτίνη-4 είναι ζωτικής σημασίας για τη σωστή οργάνωση και λειτουργία κεντρικού νευρικού συστήματος (Chaudhary et al., 2022).

Οι νευράξονες όταν περιβάλλονται από μυελίνη ονομάζονται εμύελοι ενώ όταν δεν περιβάλλονται ονομάζονται αμύελοι. Η μυελίνη συντίθεται από ολιγοδενδροκύτταρα και η παρουσία της παίζει σημαντικό ρόλο, καθώς βελτιώνει την αποδοτικότητα αγωγής των δυναμικών ενέργειας από τους νευράξονες, γεγονός που είναι σημαντικό, ειδικά σε περιστάσεις στις οποίες οι αποστάσεις είναι μεγάλες. Η γαλεκτίνη-4 διαπιστώθηκε πως παράγεται σε ολιγοδενδροκύτταρα και ενισχύει τον πολλαπλασιασμό αυτών, συνεπώς αυξάνεται και η παραγωγή της μυελίνης. Επίσης, η παραγωγή της στα ολιγοδενδροκύτταρα προάγει την έκφραση του γονιδίου της βασικής πρωτεΐνης της μυελίνης (Myelin Basic Protein – MBP). Η MBP αλληλεπιδρά με τα λιπίδια στη μεμβράνη της μυελίνης διατηρώντας τη σταθερότητα της δομής και της λειτουργίας της. Διαπιστώνεται λοιπόν η σημασία της παρουσίας της γαλεκτίνης-4 στην διαδικασία παραγωγής μυελίνης και επακολούθως στην αποδοτικότερη μεταφορά των νευρικών ώσεων (Chaudhary et al., 2022).

1.3.6 Ο ρόλος της γαλεκτίνης-4 στον καρκίνο

1.3.6.1 Ενδοκυττάρια επίπεδα γαλεκτίνης-4

Η αλλαγή στα επίπεδα έκφρασης της γαλεκτίνης-4 έχει βρεθεί ότι σχετίζεται σε πολλούς τύπους καρκίνου. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν η ανάπτυξη και εξέλιξη του ηπατοκυτταρικού και παγκρεατικού καρκινώματος, ο καρκίνος του παχέος εντέρου, του μαστού, του στομάχου και του πνεύμονα (Cao et al., 2016).

Μία σύγκριση των επιπέδων έκφρασης της γαλεκτίνης-4 σε φυσιολογικό και καρκινικό ιστό παχέος εντέρου έδειξε πως στον δεύτερο τα επίπεδα της ενδοκυττάρια ήταν αρκετά μειωμένα. Πρακτικά η μείωση της παραγωγής της γαλεκτίνης-4 προκάλεσε αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της μετάστασης των καρκινικών κυττάρων. Η γαλεκτίνη-4 όταν παράγεται σε φυσιολογικά επίπεδα εμποδίζει την καρκινογένεση και τον πολλαπλασιασμό μέσω των σηματοδοτικών μονοπατιών Wnt/ β-κατενίνης και IL-6/NF-kB/STAT3. Στο πρώτο μονοπάτι η γαλεκτίνη-4 προκαλεί τη συσσώρευση των πρωτεϊνών Wnt, με αποτέλεσμα αυτές να αδυνατούν να επιτελέσουν τη φυσιολογική τους λειτουργία δηλαδή να προάγουν τη συσσώρευση της β-κατενίνης. Η β-κατενίνη αποικοδομείται από το πρωτεάσωμα, οπότε δεν εισέρχεται στον πυρήνα προκειμένου να ενεργοποιήσει ρυθμιστές του κυτταρικού κύκλου όπως η κυκλίνη D1 και αυτό έχει ως

αποτέλεσμα την αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Όσον αφορά το δεύτερο σηματοδοτικό μονοπάτι η γαλεκτίνη-4 φυσιολογικά μειώνει τα επίπεδα παραγωγής της IL-6 αναστέλλοντας την ενεργοποίηση του πυρηνικού μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ (Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) και του STAT3 (Signal transducer and activator of transcription 3). Τόσο ο ένας όσο και ο άλλος παράγοντας επάγουν την μεταγραφή του DNA και επακολουθώς τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Συνεπώς η αναστολή της ενεργοποίησης τους οδηγεί σε αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Επομένως, όταν η παραγωγή της γαλεκτίνης-4 μειώνεται σημαντικά αντιστρέφονται όλες αυτές οι διεργασίες οδηγώντας στα αντίθετα αποτελέσματα δηλαδή στην υπερ-ενεργοποίηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και την πρόκληση του καρκίνου (Cao et al., 2016, Fan et al., 2013).

Αντίστοιχα αποτελέσματα λήφθηκαν κατά τη μελέτη και άλλων τύπων καρκίνου όπως ο καρκίνος του παγκρέατος και ο ηπατοκυτταρικός καρκίνος. Αντιθέτως, κατά την μελέτη του καρκίνου του πνεύμονα και του στομάχου τόσο ο πολλαπλασιασμός όσο και η μετάσταση οφείλονταν στα αυξημένα επίπεδα παραγωγής της γαλεκτίνης-4 (Cao et al., 2016).

1.3.6.2 Εξωκυττάρια επίπεδα γαλεκτίνης-4

Η γαλεκτίνη-4 όπως και άλλες γαλεκτίνες δεν εκκρίνεται μόνο ενδοκυττάρια αλλά και εξωκυττάρια και μπορεί να εισέλθει στο κυκλοφορικό σύστημα (Cao et al., 2016). Μελετήθηκαν δείγματα ορού ασθενών με καρκίνο του παχέος εντέρου και διαπιστώθηκε ότι τα επίπεδα της γαλεκτίνης-4 ήταν από 5 έως 31 φορές πιο αυξημένα σε σχέση με δείγματα ορού υγιών δοτών. Συγκεκριμένα, η γαλεκτίνη-4 αλληλεπιδρά με το ενδοθήλιο των αγγείων συμβάλλοντας στην αύξηση των επιπέδων κυκλοφορίας τόσο των κυτοκινών (ιντερλευκίνη-6) όσο και των χημειοκινών. Μελέτες έχουν δείξει ότι η αύξηση των επιπέδων ορισμένων κυτοκινών μπορεί να συμβάλλει σημαντικά στην πρόκληση και την εξέλιξη καρκινικών όγκων. Μία σύγκριση δειγμάτων ορού ασθενών που διαγνώστηκαν με όγκο και ασθενών στους οποίους έχουν εμφανιστεί και μεταστάσεις έδειξε ότι στη δεύτερη περίπτωση τα επίπεδα της γαλεκτίνης-4 ήταν ακόμα πιο υψηλά (Chen et al., 2014). Συγκεκριμένα η γαλεκτίνη-4 παίζει σημαντικό ρόλο στη μετάσταση καθώς προωθεί την προσκόλληση καρκινικών κυττάρων στα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων. Πιο συγκεκριμένα, η γαλεκτίνη-4 αλληλεπιδρά με τον διασκαχαρίτη Thomsen-Friedenreich, ο οποίος είναι συνδεδεμένος με την διαμεμβρανική πρωτεΐνη Mucin-1 (MUC1). Η αλληλεπίδραση της γαλεκτίνης-4 με την MUC1 προκαλεί πόλωση της κυτταρικής μεμβράνης προκαλώντας αύξηση των μορίων κυτταρικής προσκόλλησης, συνεπώς συσώρευση των καρκινικών κυττάρων. Τα μόρια κυτταρικής προσκόλλησης όπως είναι γνωστό συμμετέχουν σε διεργασίες μία από τις οποίες είναι η μετανάστευση των κυττάρων (Cao et al., 2016, Horm et al., 2013). Έτσι διευκολύνουν τη μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων ενισχύοντας την εμφάνιση μεταστάσεων σε ασθενείς με

καρκίνο. Αντίστοιχα αποτελέσματα λήφθηκαν κατά την μελέτη δειγμάτων ορού ασθενών με ηπατοκυτταρικό καρκίνο και καρκίνο του μαστού (Cao et al., 2016).

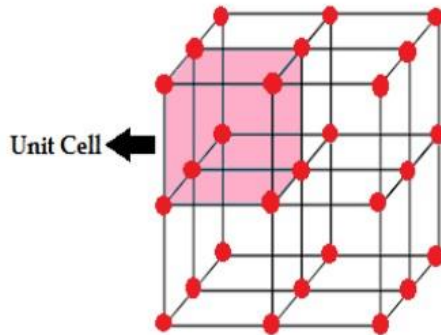
1.4 Κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ

Οι κρυσταλλογραφικές μελέτες κρίνονται απαραίτητες για πολλούς κλάδους όπως η χημεία, η φαρμακολογία και η δομική βιολογία (Deschamps, 2010). Η κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ αποτελεί ένα ισχυρό και απαραίτητο εργαλείο για τη δομική βιολογία είναι η κύρια τεχνική προσδιορισμού της δομής βιολογικών μορίων και πρωτεϊνών. Περίπου το 90% των πρωτεϊνών που έχουν κατατεθεί μέχρι και σήμερα στην Protein Data Bank έχουν προκύψει με την αξιοποίηση της κρυσταλλογραφίας ακτίνων Χ (Timofeev et al., 2023). Στον κόσμο της βιολογίας η δομή ενός μορίου συνδέεται άρρηκτα με την λειτουργία του. Στόχος λοιπόν της κρυσταλλογραφίας είναι η απόκτηση της τρισδιάστατης μοριακής δομής των μορίων που συγκροτούν έναν κρύσταλλο, καθώς η γνώση της ολοκληρωμένης δομής μίας πρωτεΐνης θα βοηθήσει σημαντικά στην κατανόηση της λειτουργίας της (Deschamps, 2010). Βασικό βήμα της κρυσταλλογραφίας αποτελεί η ανάπτυξη κρυστάλλων. Με την έκθεση τους στις ακτίνες Χ προκύπτουν τα μοτίβα περίθλασης. Αυτά μετά από κατάλληλη επεξεργασία παρέχουν πληροφορίες για τη συμμετρία των κρυστάλλων, όπως επίσης και για το μέγεθος της επαναλαμβανόμενης μοναδιαίας κυψελίδας που συνθέτει τον κρύσταλλο. Από την έκθεση των κρυστάλλων στις ακτίνες Χ προκύπτει ένα περιθλασίγραμμα. Βάσει της έντασης των αμαυρώσεων του περιθλασιγράμματος μπορεί να γίνει προσδιορισμός του συντελεστή της δομής μέσου του οποίου μπορεί να δημιουργηθεί ο χάρτης ηλεκτρονιακής πυκνότητας. Η αξιοποίηση περαιτέρω προγραμμάτων θα συμβάλει στη βελτίωση του χάρτη και στην απόκτηση της μοριακής δομής αξιοποιώντας παράλληλα και την αλληλουχία της πρωτεΐνης που μελετάται (Smyth et al., 2000).

1.4.1 Τι είναι κρύσταλλος

Ο κρύσταλλος αποτελεί μία φάση της στερεάς κατάστασης και χαρακτηρίζεται από την περιοδική διευθέτηση των ατόμων και των μορίων που τον αποτελούν. Το βασικό χαρακτηριστικό των κρυστάλλων είναι η στοιχειώδης κυψελίδα. Η στοιχειώδης κυψελίδα είναι ένα

μοτίβο που έχει παραλληλεπίπεδο σχήμα, η επανάληψη του οποίου δημιουργεί τον κρύσταλλο (Εικόνα 7). Πιο συγκεκριμένα πλήθος διαδοχικών κυψελίδων που είναι πανομοιότυπες όσον αφορά διάσταση και περιεχόμενο συγκροτούν τον κρύσταλλο. Σε κάθε στοιχειώδη κυψελίδα δεν είναι απαραίτητο ένα μόνο πρωτεϊνικό μόριο εν αντιθέσει, αυτό που συνηθίζεται πλέον είναι η ύπαρξη πολλών αντιγράφων της πρωτεΐνης (Γλυκός, 2015).



Εικόνα 7: Η μοναδιαία κυψελίδα στην κρυσταλλική δομή (Gosar et al., 2019).

1.4.2 Ιστορική αναδρομή κρυστάλλωσης πρωτεϊνών

Ο πρώτος πρωτεϊνικός κρύσταλλος παρατηρήθηκε το 1840 (Timofeev et al., 2023). Η πρωτεΐνη αυτή ήταν η αιμοσφαιρίνη. Το 1851 έγινε περιγραφή για πρώτη φορά μίας μεθόδου παραγωγής κρυστάλλων από ερυθροκύτταρα (Timofeev et al., 2023). Το πρώτο περιθλασίγραμμα από κρύσταλλο αιμοσφαιρίνης ελήφθη το 1934. Η πρώτη δομή πρωτεΐνης ήταν αυτή της μυοσφαιρίνης και ελήφθη το 1958 (Timofeev et al., 2023), ενώ το 1971 δημιουργήθηκε η Τράπεζα Δεδομένων Πρωτεϊνών (Protein Data Bank – PDB), (Timofeev et al., 2023). Ξεκίνησε με επτά δομές πρωτεϊνών, ωστόσο, κάθε χρόνο αυξανόταν σημαντικά ο αριθμός των πρωτεϊνικών δομών που κατατίθενται στη βάση. Έως το 2022 οι καταθέσεις δομών που προέκυψαν από πειραματικές μεθόδους είχαν ξεπεράσει τις 195.000. Ως επί των πλείστων οι πρωτεΐνες που μελετώνται με κρυσταλλογραφία είναι ανασυνδυασμένες. Τα βήματα που ακολουθούνται για την μελέτη των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών είναι η έκφραση του γονιδίου της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης, ο καθαρισμός της, η κρυστάλλωση της, η έκθεση του κρυστάλλου στις ακτίνες x, η λήψη περιθλασιγράμματος και επεξεργασία του προκειμένου να προκύψει ο χάρτης ηλεκτρονιακής πυκνότητας. Με την αξιοποίηση κατάλληλων προγραμμάτων ο χάρτης βελτιστοποιείται και τελικά προκύπτει η δομή της υπό μελέτη πρωτεΐνης (Timofeev et al., 2023).

1.4.3 Κρυστάλλωση πρωτεϊνών

Η κρυστάλλωση της πρωτεΐνης αποτελεί ένα από τα πιο μεγάλα και ταυτόχρονα πιο απρόβλεπτα στάδια ενός κρυσταλλογραφικού πειράματος. Για την ανάπτυξη των κρυστάλλων αξιοποιούνται διαλύματα αλάτων καθώς και κατακρημνιστικοί παράγοντες με στόχο τη μείωση της διαλυτότητας, όπως οργανικά πολυμερή και κυρίως πολυαιθυλογλυκόλες με διαφορετικά μοριακά βάρη. Για τον σχηματισμό κρυστάλλων θα πρέπει στο διάλυμα να επιτευχθεί ένα επίπεδο υπερκορεσμού της πρωτεΐνης. Για το σκοπό αυτό το πρωτεϊνικό δείγμα πρέπει να συμπυκνωθεί κατά το δυνατόν περισσότερο χωρίς ωστόσο, να καθιζάνει ή να κατακρημνίζεται (οι τιμές κυμαίνονται συνήθως από 2 έως 50 mg/mL), (Dessau et al., 2011). Για την επίτευξη του υπερκορεσμού δεν αρκούν τα διαλύματα αλάτων και οι κατακρημνιστικοί παράγοντες όπως ήδη αναφέρθηκαν αλλά σημαντικό ρόλο παίζουν και το ρυθμιστικό διάλυμα, το pH, η θερμοκρασία και η συγκέντρωση της πρωτεΐνης. Επίσης, η δημιουργία του κρυστάλλου επηρεάζεται και από μεταλλικά ιόντα, αναστολείς και συμπαράγοντες που την τροποποιούν δομικά (Timofeev et al., 2023, McPherson et al., 2014).

1.5 Θερμιδομετρία Ισοθερμικής Τιτλοδότησης

Η θερμιδομετρία ισοθερμικής τιτλοδότησης (Isothermal Titration Calorimetry) είναι μία τεχνική που επιτρέπει την ανάλυση της αλληλεπίδρασης ενός πρωτεϊνικού μορίου και ενός προσδέτη. Η μέθοδος αυτή παρακολουθεί τις αλλαγές στη θερμότητα που προκαλούνται από τις μακρομοριακές αλληλεπιδράσεις χωρίς να υπάρχουν περιορισμοί στο ρυθμιστικό ή το μοριακό βάρος των μακρομορίων (Saronaro, 2018).

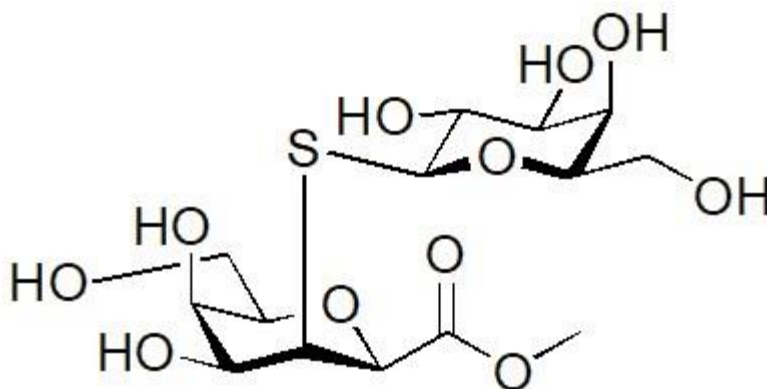
Οι μακρομοριακές αλληλεπιδράσεις είναι ιδιαίτερα σημαντικές καθώς αποτελούν την βάση για την κατανόηση των οδών μεταγωγής σήματος. Η μελέτη των αλληλεπιδράσεων αυτών προσφέρει τη βαθύτερη κατανόηση των μοριακών μηχανισμών, οι οποίοι αποτελούν τη βάση των φυσιολογικών και μη διεργασιών, καθώς και του σχεδιασμού φαρμάκων. Κατά την ITC μετρείται η μεταβολή της θερμότητας κατά τη σύνδεση των δύο μορίων (πρωτεΐνης – προσδέτη). Η ITC εμφανίζει ορισμένα πλεονεκτήματα. Πιο συγκεκριμένα δεν απαιτείται σήμανση της πρωτεΐνης ή της ένωσης-προσδέτη, αντιθέτως οι υπολογισμοί βασίζονται στην αλλαγή της θερμότητας. Επίσης, είναι η μόνη τεχνική που επιτρέπει τον προσδιορισμό της σταθεράς δέσμευσης K_b και των μεταβολών της ελεύθερης ενέργειας δέσμευσης $Gibbs$ (ΔG), της ενθαλπίας (ΔH) και της εντροπίας (ΔS) σε ένα μόνο πείραμα (Saronaro, 2018, Brown, 2009).

Η ITC έχει ιδιαίτερη ισχύ στην ανάπτυξη φαρμακευτικών προϊόντων καθώς βοηθάει στην μελέτη πλήθους πιθανών ενώσεων-προσδετών και στην επιλογή των καταλληλότερων. Πιο συγκεκριμένα σε περιπτώσεις που δύο ή και περισσότερες υπό μελέτη ενώσεις έχουν παρόμοια συγγένεια δέσμευσης με το πρωτεϊνικό μόριο που μελετάται, επιλέγεται εκείνη με την καταλληλότερη τιμή ΔH . Αυτό συμβαίνει καθώς η τιμή ΔH

αντικατοπτρίζει την ενεργειακή μεταβολή στο σύστημα που προκαλείται όταν ο προσδέτης προσδένεται στην πρωτεΐνη. Η τιμή ΔH είναι θετική στις ενδόθερμες αντιδράσεις και αρνητική στις εξώθερμες. Η ενθαλπία ουσιαστικά αντιπροσωπεύει τις ενεργειακές μεταβολές που προκαλούνται από τις μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις όπως δεσμοί υδρογόνου και αλληλεπιδράσεις van der Waals που δημιουργούνται κατά την αλληλεπίδραση προσδέτη-πρωτεΐνης (Ladbury, 2018). Η εντροπία από την άλλη αποτελεί μέτρο του πόσου ομοιόμορφα θα γίνει κατανομή της θερμικής ενέργειας στο θερμοδυναμικό σύστημα. Σύμφωνα με τον δεύτερο νόμο της θερμοδυναμικής η θερμότητα ρέει από περιοχές υψηλότερης σε περιοχές χαμηλότερης θερμοκρασίας. Αυτό φυσικά μειώνει το βαθμό τάξης του αρχικού συστήματος, συνεπώς η εντροπία (S) θα μπορούσε να θεωρηθεί ως μέτρο της αταξίας στα άτομα και μόρια ενός συστήματος. Τέλος, η ΔS αποτελεί μία συνολική θερμοδυναμική ιδιότητα ενός συστήματος της οποίας τα θετικά και αρνητικά πρόσημα υποδεικνύουν την αύξηση και μείωση του βαθμού ελευθερίας του συστήματος αντίστοιχα. Η αυθόρμητη πρόσδεση μίας ένωσης-προσδέτη στην υπό μελέτη πρωτεΐνη γίνεται όταν η μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας έχει αρνητική τιμή. Κατά την πρόσδεση των δύο μορίων η αρνητική μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας, δηλαδή η διαφορά στην ελεύθερη ενέργεια που παρατηρείται μεταξύ του συμπλόκου προσδέτη-πρωτεΐνης και της ελεύθερης πρωτεΐνης καθορίζει το μέγεθος της σταθερότητας του συμπλόκου ή πιο συγκεκριμένα η μείωση της ελεύθερης ενέργειας είναι αυτή που ενισχύει τη δημιουργία του συμπλόκου προσδέτη-πρωτεΐνης (Du et al., 2016).

2. Σκοπός

Το θέμα της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η παραγωγή, η απομόνωση, ο καθαρισμός, η κρυστάλλωση των γαλεκτίνων-4N και -4C, καθώς και η μελέτη της συγγένειας πρόσδεσης αυτών με τον προσδέτη **13** (Εικόνα 8), ο οποίος μελετήθηκε στο παρελθόν ως προς τη συγγένεια πρόσδεσης και με την γαλεκτίνη-3 και έδειξε πως είναι ισχυρός ανταγωνιστής (Lázár et al., 2023). Η γαλεκτίνη-4 είναι μία γαλεκτίνη που συμβάλλει στη φυσιολογική λειτουργία του εντέρου, του κεντρικού νευρικού συστήματος, καθώς και άλλων συστημάτων του οργανισμού. Για αυτό το λόγο η διατήρηση των φυσιολογικών επιπέδων αυτής κρίνεται απαραίτητη. Μελέτες έχουν αποδείξει πως μεταβολές στα ενδοκυττάρια επίπεδα της γαλεκτίνης-4 και συγκεκριμένα μείωση αυτών οδηγεί στον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των κυττάρων με αποτέλεσμα την καρκινογένεση. Από την άλλη, αύξηση των εξωκυττάρων επιπέδων της προωθεί τη μετάσταση των καρκινικών κυττάρων σε άλλους ιστούς και όργανα. Συνεπώς, η γαλεκτίνη-4 θα αποτελέσει μελλοντικά σημαντικό θεραπευτικό στόχο. Σκοπός λοιπόν είναι η εύρεση εν δυνάμει ανταγωνιστών που θα ανταγωνίζονται τους φυσικούς προσδέτες της και θα ελέγχουν την λειτουργία της.



Εικόνα 8: Χημική δομή προσδέτη **13**

3. Υλικά και Μέθοδοι

3.1 Υλικά – Αντιδραστήρια

Αντιδραστήριο	Εταιρεία
1. Acetic acid	Honeywell Fluka
2. Acrylamide	PanReac AppliChem
3. Ammonium Persulfate (APS)	Serva
4. Bis acrylamide	PanReac AppliChem
5. b-Mercaptoethanol	Ardlich - Chemistry
6. Bradford	Bio – Rad
7. Bromophenol Blue	Research Organics
8. Calcium acetate	Thermo Fisher Scientific
9. Coomassie Brilliant Blue R-250	Sigma-Aldrich
10. Dimethyl sulfoxide (DMSO)	PanReac AppliChem
11. Disodium Phosphate (Na_2HPO_4)	PanReac AppliChem
12. Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	Scharlau Chemic
13. Glycerin	Kalo Cosmetics
14. Glycine	Apollo Scientific
15. Isopropyl b-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)	FluoroChem
16. Kanamycin	PanReac AppliChem
17. Luria Bertani Broth (LB Broth)	Merck
18. Luria Bertani Agar (LB Agar)	Fisher BioReagents
19. Magnesium Chloride (MgCl_2)	Alfa Aesar
20. N, N, N', N' tetramethylethylenediamine (TEMED)	PanReac AppliChem
21. Polyethylene glycol 4000 (PEG4000)	Sigma-Aldrich
22. Polyethylene glycol 8000 (PEG8000)	Sigma-Aldrich
23. Potassium Chloride (KCl)	Merck
24. Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)	Merck
25. Sodium Chloride (NaCl)	Sigma-Aldrich
26. Sodium Dodecyl sulfate (SDS)	Serva
27. Tris-hydrochloride (Tris-HCl)	Serva
28. Tryptone	Sigma-Aldrich
29. Yeast	Melford Biolaboratories

3.2 Οργανολογία

Όργανο	Εταιρεία
1. AKTA purifier (FPLC System)	GE healthcare Life Sciences
2. Ανιχνευτής ακτίνων Χ	maxPerts GmbH
3. Πιπέτες	Gilson
4. Κάθετη συσκευή ηλεκτροφόρησης (minigel)	Biorad
5. Στερεοσκόπιο	Olympus TL2
6. Συσκευή μέτρησης pH	Metrohm
7. Σύστημα περίθλασης ακτίνων x	Microstar Bruker Rotating Anode
8. Σύστημα ψύξης αζώτου	Oxford Cryosystems
9. Φασματοφωτόμετρο	VWR
10. Φίλτρα με πόρους 0.22 μM	Sartorius System
11. Φίλτρα με πόρους 0.45 μM	Sartorius System
12. Φίλτρα συμπίκνωσης με cut-off 10 kDa	Sartorius System
13. Φυγόκεντρος 1	Centrifuge 5814R, Eppendorf
14. Φυγόκεντρος 2	Z36HK, HermLe
15. Φυγόκεντρος 3	CR-22N Himac, HITACHI
16. Ρομποτικό σύστημα σάρωσης συνθηκών κρυστάλλωσης OryxNano	Douglas instruments
17. Heat Block	Nippon Genetics
18. Nano-ITC	TA Instruments

3.3 Πλασμίδια και βακτηριακά στελέχη

1. Πλασμίδιο	Pet28a	
2. Βακτήρια	E-coli BL-21 Gold (DE3)	Agilent technologies

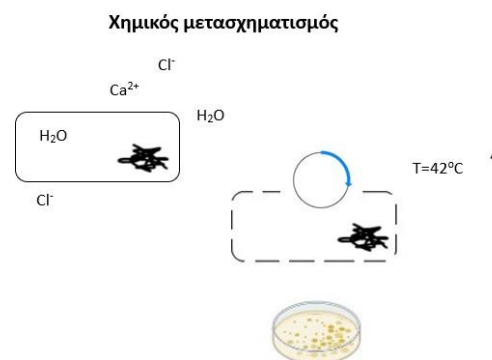
3.4 Στήλη υγρής χρωματογραφίας

1. Στήλη συγγένειας	Lactosyl Sepharose 4CLB	GE Healthcare Life Sciences
---------------------	-------------------------	-----------------------------

3.5 Μέθοδοι

3.5.1 Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων

Υπάρχουν τρεις μέθοδοι οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων στα βακτήρια. Συγκεκριμένα αυτές είναι η σύζευξη, η μεταγωγή και ο μετασχηματισμός. Μετασχηματισμός είναι η διαδικασία πρόσληψης εξωγενών τμημάτων DNA από κύτταρα τα οποία έχουν καταστεί δεκτικά. Τα βακτήρια είναι ικανά να μετασχηματιστούν είτε με φυσικό τρόπο, είτε με τεχνητό. Ωστόσο, δεν διαθέτουν όλα τα βακτηριακά είδη την ικανότητα μετασχηματισμού με φυσικό τρόπο. Για παράδειγμα το *Escherichia coli* που αποτελεί το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο βακτηριακό είδος για τη διαδικασία του μετασχηματισμού, δεν διαθέτει ικανότητα φυσικού μετασχηματισμού. Συνεπώς, κρίνεται απαραίτητο να τροποποιηθεί χημικά προκειμένου να γίνει δεκτικό σε εξωγενή τμήματα DNA (Hasegawa et al., 2018). Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει τόσο χημικές, όσο φυσικές και ηλεκτρικές μεταβολές ώστε να μετατραπούν οι μεμβράνες των βακτηρίων σε διαπερατές, με αποτέλεσμα να προσληφθεί το πλασμιδιακό DNA. Όσον αφορά τις ηλεκτρικές μεταβολές που επιδέχονται οι βακτηριακές κυτταρικές μεμβράνες, μία διαδικασία που ονομάζεται ηλεκτροδιάτρηση, πραγματοποιείται εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου που προκαλεί οπές στις μεμβράνες. Ωστόσο, η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδος από αυτές είναι ο χημικός μετασχηματισμός (Εικόνα 9). Κατά τον χημικό μετασχηματισμό χρησιμοποιούνται χημικές ενώσεις, οι οποίες μετατρέπουν τις κυτταρικές μεμβράνες σε διαπερατές ως προς το πλασμιδιακό DNA. Συνεπώς, ο βασικός παράγοντας που καθορίζει την αποτελεσματικότητα του μετασχηματισμού είναι τα κατιόντα της χημικής ουσίας που χρησιμοποιήθηκε. Η χημική ουσία που χρησιμοποιείται συνήθως στα εργαστήρια είναι το χλωριούχο ασβέστιο (CaCl_2). Αυτή η χημική ουσία μπορεί να βοηθήσει στην επεξεργασία μεγάλου πλήθους βακτηριακών κυττάρων, τα οποία αποθηκεύονται στους -80°C για μεγάλα χρονικά διαστήματα. Ουσιαστικά η μέθοδος αυτή στηρίζεται στις χαμηλές θερμοκρασίες και στην ιδιότητα των κατιόντων ασβεστίου (Ca^{2+}) να συνδέονται με τόσο με φωσφορικές όσο και με άλλες ομάδες αρνητικά φορτισμένες στη μεμβράνη των βακτηριακών κυττάρων προκειμένου να επιτρέψουν την προσκόλληση στη μεμβράνη του πλασμιδιακού DNA (Ren et al., 2019).



Εικόνα 9: Χημικός μετασχηματισμός

3.5.2 Αξιοποίηση του IPTG για επαγωγή έκφρασης

Το βακτήριο *Escherichia coli* αποτελεί το συνηθέστερο σύστημα έκφρασης και παραγωγής των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών. Το βακτήριο αυτό δεν μπορεί να επιτελέσει διάφορες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις όπως για παράδειγμα είναι η γλυκοζυλίωση, ωστόσο χρησιμοποιείται στην παραγωγή του 69% των φαρμάκων που χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση του καρκίνου έναντι του υπόλοιπου 26% των φαρμάκων που παράγονται σε κύτταρα θηλαστικών. Ωστόσο, για την παραγωγή της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης δεν παίζει ρόλο μόνο η επιλογή του κατάλληλου βακτηριακού στελέχους αλλά και του φορέα έκφρασης (π.χ. πλασμίδιο), των κατάλληλων συνθηκών που απαιτεί για την παραγωγή της η κάθε πρωτεΐνη, καθώς και των στρατηγικών καθαρισμού των πρωτεϊνών. Ο πιο συχνά χρησιμοποιούμενος φορέας έκφρασης που χρησιμοποιείται για την παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών είναι το πλασμίδιο. Τα πλασμίδια αποτελούν σημαντικούς φορείς διότι διαθέτουν πολλά πλεονεκτήματα που τους καθιστούν ικανούς για την παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών 2 από τα οποία είναι η ικανότητα αντιγραφής τους και ο υποκινητής που φέρουν. Ιδιαίτερα σημαντική είναι η διαδικασία σχεδιασμού των πλασμιδίων καθώς συμβάλλει σημαντικά στη διατήρηση της ισορροπίας ανάμεσα στους μηχανισμούς της μεταγραφής και μετάφρασης στο κύτταρο ξενιστή προκειμένου να είναι εφικτή η αντιμετώπιση προβλημάτων από την παραγωγή ετερόλογων πρωτεϊνών. Ένα από τα πιο γνωστά συστήματα που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή ετερόλογης πρωτεΐνης είναι το σύστημα *pET*. Ο υποκινητής αυτού του συστήματος είναι ο T7 και η έκφραση του επιθυμητού γονιδίου ελέγχεται από τον χειριστή *lac*. Απουσία λακτόζης παρεμποδίζεται η έκφραση του γονιδίου-στόχου, συνεπώς και η παραγωγή της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης. Παρουσία όμως, της ισοπροπυλ β-D-1 θειογαλακτοπυρανοσίδης (IPTG) που αποτελεί ένα ανάλογο λακτόζης, ο χειριστής σταματάει να παρεμποδίζει την έκφραση του γονιδίου, επομένως είναι πλέον εφικτή η μεταγραφή και η μετάφραση του και η υπερπαραγωγή της ετερόλογης πρωτεΐνης (Gomes et al., 2020).

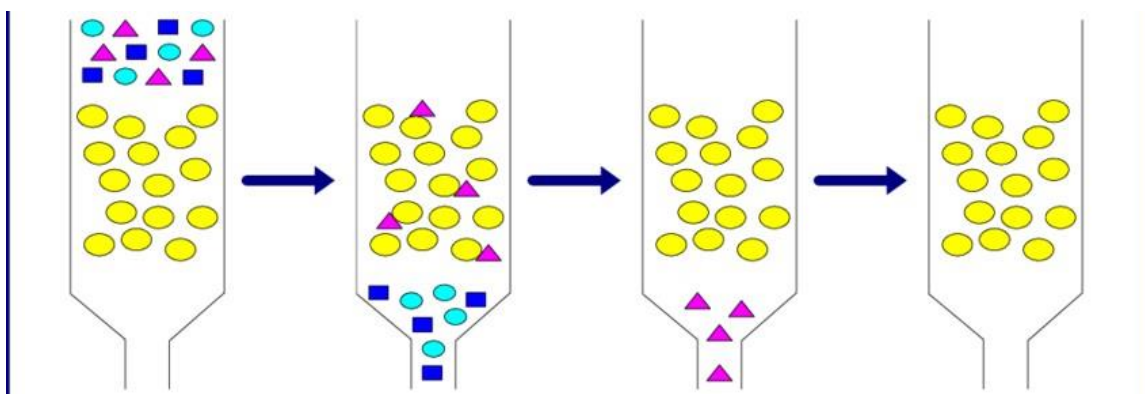
3.5.3 Χρωματογραφία

Μία σημαντική τεχνική που χρησιμοποιείται καθώς διαχωρίζει, ταυτοποιεί και καθαρίζει τα συστατικά ενός μείγματος με στόχο την ποσοτική και ποιοτική ανάλυση είναι η χρωματογραφία συγγένειας. Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών επιτυγχάνεται βάσει του φορτίου, του μεγέθους, του σχήματος και της ικανότητας σύνδεσης με τη στατική φάση. Δυο είναι τα ήδη των φάσεων στη χρωματογραφία, η στατική και η κινητή. Η κινητή φάση μπορεί να διαχωριστεί σε επιμέρους κατηγορίες. Μπορεί να είναι υγρή, επομένως ονομάζεται υγρή χρωματογραφία (*Liquid chromatography – LC*) ή να είναι αέρια οπότε ονομάζεται αέρια χρωματογραφία (*Gas chromatography – GC*). Όπως αναφέρθηκε παραπάνω ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών γίνεται βάσει κάποιων χαρακτηριστικών που φέρουν αυτές όπως το μέγεθος και η συγγένεια σύνδεσης με τη στατική φάση. Πιο συγκεκριμένα ορισμένα πρωτεϊνικά μόρια που χαρακτηρίζονται από μικρή συγγένεια

σύνδεσης με τη στατική φάση θα μείνουν συνδεδεμένα σε αυτή τη φάση για μικρό χρονικό διάστημα και θα περάσουν συντομότερα στην κινητή φάση, οπότε θα αποβληθούν ταχύτερα από το σύστημα. Αντιθέτως, μόρια με υψηλή συγγένεια για τη στατική φάση θα μείνουν προσδεδεμένα σε αυτή για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, οπότε θα καθυστερήσουν να περάσουν στη κινητή φάση και θα αποβληθούν σε μετέπειτα χρόνο από τα υπόλοιπα πρωτεϊνικά μόρια. Στόχος όμως, της μεθόδου αυτής δεν αποτελεί μόνο ο αποτελεσματικός διαχωρισμός αλλά και το χρονικό διάστημα στο οποίο θα πραγματοποιηθεί αυτός. Συνεπώς, υπάρχει πλήθος μεθόδων χρωματογραφίας όπως για παράδειγμα είναι η χρωματογραφία συγγένειας, μοριακής διήθησης, ιοντοανταλλαγής και πολλές άλλες (Coskun, 2016).

3.5.4 Χρωματογραφία συγγένειας

Μία από τις χαρακτηριστικές μεθόδους χρωματογραφίας είναι η χρωματογραφία συγγένειας (Εικόνα 10). Η χρωματογραφία συγγένειας συμβάλλει στον καθαρισμό μίας ομάδας μορίων ή ενός μόνο μορίου από ένα μείγμα και στηρίζεται στην αλληλεπίδραση μεταξύ δύο μορίων, τα οποία είναι η πρωτεΐνη και ο προσδέτης. Πιο συγκεκριμένα ο προσδέτης δεσμεύεται στο υλικό πλήρωσης της στήλης και αυτό αποτελεί τη στατική φάση. Συνεπώς όταν φορτωθεί το δείγμα μέσα στο οποίο υπάρχει η υπό μελέτη πρωτεΐνη μαζί με πλήθος άλλων, αυτή συνδέεται με τον προσδέτη και παραμένει εκεί ενώ οι υπόλοιπες πρωτεΐνες απομακρύνονται από τη στήλη. Ωστόσο, ένα φαινόμενο που παρατηρείται συχνά είναι η μη ειδική σύνδεση στη στήλη ορισμένων πρωτεϊνών. Για αυτό το λόγο πραγματοποιούνται πλύσεις της στήλης προκειμένου να απομακρυνθούν οι πρωτεΐνες που έχουν προσδεθεί μη ειδικά. Οι αλληλεπιδράσεις που παρατηρούνται μεταξύ στήλης και μη ειδικά προσδεμένων πρωτεϊνών είναι ιοντικές και υδρόφοβες. Οι ιοντικές αλληλεπιδράσεις μπορούν να μειωθούν εάν αυξηθούν τα άλατα ή αλλάξει το pH , ενώ οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις μειώνονται εάν μειωθούν τα άλατα, αλλάξει το pH ή προστεθεί *Triton*, το οποίο είναι επιφανειοδραστικός παράγοντας. Αφού έχουν πραγματοποιηθεί πλύσεις και έχουν απομακρυνθεί οι μη ειδικά προσδεμένες πρωτεΐνες, ακολουθεί η έκλυση της επιθυμητής πρωτεΐνης. Αυτό είναι εφικτό εφόσον μειωθούν οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ της πρωτεΐνης και του προσδέτη. Υπάρχουν δύο τύποι για την έκλυση της υπό μελέτη πρωτεΐνης, η ειδική και η μη ειδική έκλυση. Στην πρώτη περίπτωση το σύμπλοκο βάλλεται από παράγοντες που είτε ανταγωνίζονται για σύνδεση με τον προσδέτη είτε με την πρωτεΐνη, συνεπώς το σύμπλοκο διασπάται και η πρωτεΐνη εκλύεται. Αυτό που καθορίζει την διάσπαση του συμπλόκου είναι τόσο ο όγκος όσο και η συγκέντρωση της ουσίας που θα αξιοποιηθεί για να αποσταθεροποιήσει το σύμπλοκο. Στη δεύτερη περίπτωση της μη ειδικής έκλυσης τροποποιούνται οι συνθήκες του διαλύτη προκειμένου να μειωθεί η σταθερά του ρυθμού σύνδεσης και να αυξηθεί η σταθερά του ρυθμού διάστασης, ώστε το σύμπλοκο τελικά να διασπαστεί (Coskun, 2016, Urh, 2019).



Εικόνα 10: Χρωματογραφία συγγένειας. Στην εικόνα φαίνονται τα πρωτεϊνικά μόρια που έχουν συγγένεια για τη στήλη με κίτρινο χρώμα. Με μωβ χρώμα φαίνονται αυτά που συνδέονται μη ειδικά και με μπλε και γαλάζιο φαίνονται αυτά που δεν είναι ειδικά για τη στήλη και απομακρύνονται απευθείας. Σε μετέπειτα χρόνο απομακρύνονται και αυτά που έχουν προσδεθεί μη ειδικά (Adibah et al., 2016).

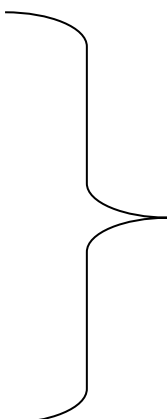
3.6 Πειραματική διαδικασία

3.6.1 Επίστρωση μετασχηματισμένων βακτηριακών κυττάρων σε τρυβλία *petri*

Αρχικά, μετασχηματισμένα βακτηριακά στελέχη *E. coli* BL21 επιστρώθηκαν σε τρυβλία *petri*. Ο μετασχηματισμός των βακτηρίων έγινε με πλασμίδια *pET28a*. Τα πλασμίδια που αξιοποιήθηκαν με στόχο της παραγωγή της γαλεκτίνης-4N και -4C είχαν τα γονίδια γαλεκτίνης-4N και γαλεκτίνης-4C αντίστοιχα. Τα πλασμίδια αυτά εμφάνιζαν ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό καναμυκίνη. Για την έκφραση των γονιδίων ήταν απαραίτητη η παρουσία του *IPTG*, καθώς ο υποκινητής υπό τον έλεγχο του οποίου βρίσκεται η έκφραση των γονιδίων ενεργοποιείται παρουσία αυτού του ανάλογου λακτόζης. Ο λόγος που χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά BL21 είναι γιατί εκεί παρατηρείται βέλτιστη υπερέκφραση των δύο γονιδίων, συνεπώς και βέλτιστη υπερπαραγωγή της πρωτεΐνης. Στα τρυβλία χρησιμοποιήθηκε *LB agar* ως θρεπτικό μέσο. Επίσης, στο θρεπτικό μέσο προστέθηκε το αντιβιοτικό καναμυκίνη σε συγκέντρωση 35 $\mu\text{g}/\text{mL}$ για τη γαλεκτίνη-4N και 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ για τη γαλεκτίνη-4C, καθώς όπως αναφέρθηκε και παραπάνω σε αυτό το αντιβιοτικό εμφάνιζαν ανθεκτικότητα τα βακτήρια που μετασχηματίστηκαν. Τέλος, τα τρυβλία τοποθετήθηκαν σε επωαστήρα θερμοκρασίας 37°C ολονύχτια.

3.6.2 Παρασκευή υγρής καλλιέργειας

Μετά την ολονύχτια επώαση των τρυβλίων παρασκευάστηκαν υγρές καλλιέργειες. Το θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε ήταν *LB broth*. Στις φλάσκες προστέθηκε το αντιβιοτικό καναμυκίνη με συγκέντρωση $35 \mu\text{g/mL}$ τόσο για τη γαλεκτίνη-4N όσο και για τη γαλεκτίνη-4C. Ακολούθησε ο εμβολιασμός, σε κάθε φλάσκα, μίας αποικίας από τα τρυβλία που παρέμειναν στον επωαστήρα ολονύχτια. Στη συνέχεια οι φλάσκες τοποθετήθηκαν σε επωαστήρα υπό κίνηση (210 rpm) και πάλι ολονύχτια, σε θερμοκρασία 37°C . Επόμενο βήμα ήταν η ανακαλλιέργεια με στόχο την ομοιογένεια. Πιο συγκεκριμένα λήφθηκε ποσότητα 10 mL από τις φλάσκες που είχαν επωαστεί το προηγούμενο βράδυ στους 37°C και εισήχθη σε 4 φλάσκες που περιλάμβαναν 1 L υγρής καλλιέργειας η κάθε μία. Αυτό το βήμα ήταν όμοιο τόσο για τη γαλεκτίνη-4N όσο και τη γαλεκτίνη-4C. Οι φλάσκες επανατοποθετήθηκαν στον επωαστήρα υπό κίνηση (210 rpm) για χρονικό διάστημα περίπου 2,5 ωρών έως ότου επιτευχθεί οπτική απορρόφηση $0,5 - 0,6$, σε μήκος κύματος 600 nm . Αφού ολοκληρώθηκε και αυτό το βήμα, ακολούθησε η προσθήκη *IPTG* σε συγκέντρωση $0,1 \text{ mM}$. Στην περίπτωση της γαλεκτίνης-4N, οι φλάσκες στις οποίες προστέθηκε το *IPTG* τοποθετήθηκαν ολονύχτια στους 16°C , σε κινούμενο επωαστήρα (210 rpm). Στην περίπτωση της γαλεκτίνης-4C, οι φλάσκες μετά την προσθήκη του *IPTG* τοποθετήθηκαν στους 37°C για 3 ώρες και πάλι σε κινούμενο επωαστήρα (210 rpm). Το *IPTG* και στις δύο περιπτώσεις εκκίνησε τη μεταγραφή και μετάφραση των γονιδίων, συνεπώς και την παραγωγή των επιθυμητών πρωτεϊνών. Κατόπιν, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση 25 λεπτών, σε θερμοκρασία 4°C , σε 5000 rpm . Από την φυγοκέντρηση προέκυψε το ίζημα. Για την διαλυτοποίηση του ιζήματος το διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε περιλάμβανε:

137 mM NaCl		pH= 7.4
2,7 mM KCl		
2 mM EDTA		
4 mM b-mercaptoethanol		
10 mM Na ₂ HPO ₄		
1,8 mM KH ₂ PO ₄		

Μετά την διαλυτοποίηση του ιζήματος προέκυψε ένα διάλυμα, το οποίο τοποθετήθηκε σε πάγο. Κατόπιν εφαρμόστηκαν υπέρηχοι με στόχο να λυθούν τα βακτηριακά κύτταρα και να επιτευχθεί απελευθέρωση των συστατικών που υπάρχουν στο εσωτερικό των κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα εφαρμόζονταν στο διάλυμα 30 δευτερόλεπτα υπέρηχοι και 30 δευτερόλεπτα παύση για 5 φορές. Συνεπώς, η διαδικασία διήρκεσε συνολικά 5 λεπτά. Τέλος, μετά την εφαρμογή υπερήχων ακολούθησε φυγοκέντρηση σε 11.600 rcf , για 45

λεπτά, στους 4°C. Το υπερκείμενο που προέκυψε από την φυγοκέντρωση φιλτραρίστηκε σε φίλτρο με 0,45 μm .

3.6.3 Καθαρισμός γαλεκτίνης-4N και γαλεκτίνης-4C

Για τον καθαρισμό των γαλεκτινών-4N και 4C αξιοποιήθηκε το σύστημα AKTA-FPLC. Συγκεκριμένα τα βήματα ήταν τα εξής:

- **Στήλη συγγένειας (*Lactosyl Sepharose 4CLB*)**

Εξισορρόπηση στήλης → για την εξισορρόπηση αξιοποιήθηκε απαερωμένο διάλυμα A. Το διάλυμα αυτό αποτελούνται από 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 2 mM EDTA, 4 mM β -mercaptoethanol, 10 mM Na_2HPO_4 , 1,8 mM KH_2PO_4 . Η ροή ήταν 1 mL/min.

Φόρτωμα δείγματος → κατόπιν φορτώθηκε το δείγμα που περιλάμβανε τόσο την πρωτεΐνη-στόχο όσο και τις υπόλοιπες πρωτεΐνες με ροή 0,4 mL/min. Στη συνέχεια αφέθηκαν να περάσουν 40 mL/min με την ίδια ροή και σε αυτό το βήμα απομακρύνθηκαν όλες οι μη ειδικές για τη στήλη πρωτεΐνες (*flow through*)

Έκπλυση στήλης → στο βήμα αυτό αφέθηκαν να περάσουν δύο όγκοι στήλης, περίπου 130 mL από το buffer A, προκειμένου να ξεπλυθεί σε επαρκή βαθμό η στήλη με σκοπό να απομακρυνθούν όλες οι πρωτεΐνες που προσδέθηκαν μη ειδικά σε αυτή. Η ροή ήταν και πάλι 1 mL/min.

Έκλουση → τέλος πραγματοποιήθηκε αλλαγή ρυθμιστικού διαλύματος προκειμένου να γίνει έκλουση της πρωτεΐνης-στόχου. Το ρυθμιστικό διάλυμα B που χρησιμοποιήθηκε περιλάμβανε 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 2 mM EDTA, 4 mM β -mercaptoethanol, 10 mM Na_2HPO_4 , 1,8 mM KH_2PO_4 και 150 mM λακτόζη. Σε αυτό το βήμα επιτεύχθηκε η απομάκρυνση από τη στήλη της ειδικά προσδεμένης πρωτεΐνης, δηλαδή αυτής που εμφανίζει συγγένεια με αυτή. Η ροή για την έκλουση ήταν 1 mL/min. Ο όγκος που συλλέχθηκε ήταν 80 mL σε κλάσματα των 5 mL.

- **Συμπύκνωση**

Τα κλάσματα που προέκυψαν από το βήμα της έκλουσης ενώθηκαν και συμπυκνώθηκαν με φίλτρο που είχε κατώφλι 10 kDa. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν αρκετοί κύκλοι φυγοκεντρήσεων καθένας από τους οποίους είχε διάρκεια 15 λεπτά, στα 4000 rcf, στους 4°C. Η διαδικασία τερματίστηκε όταν πλέον ο όγκος έφτασε λίγα μικρόλιτρα.

Τέλος, προσδιορίστηκε η συγκέντρωση του τελικού δείγματος προκειμένου να μελετηθεί αν έφτασε στα επιθυμητά επίπεδα. Αυτό πραγματοποιήθηκε μέσω φωτομέτρησης στα 280 nm με βάση το νόμο του Beer-Lambert:

$$A = e b c$$

Όπου A = η απορρόφηση στα 280 nm

e = ο συντελεστής μοριακής απορρόφησης

b = το πάχος της κυψελίδας

c = η συγκέντρωση

Τελικά, μία ποσότητα των γαλεκτίνων-4N και 4C αξιοποιήθηκε για κρυσταλλώσεις, ενώ η υπόλοιπη ποσότητα αποθηκεύτηκε στους -80°C για μετέπειτα χρήση.

3.6.4 Κρυσταλλώσεις γαλεκτίνων 4N και 4C

Υπάρχουν αρκετές μέθοδοι για την κρυστάλλωση μίας πρωτεΐνης. Στην παρούσα περίπτωση για την κρυστάλλωση τόσο της γαλεκτίνης-4N όσο και της γαλεκτίνης-4C χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της καθήμενης σταγόνας. Για την κρυστάλλωση μίας πρωτεΐνης βασικό ρόλο παίζουν οι συνθήκες κρυστάλλωσης. Όπως διαπιστώθηκε έπειτα από αρκετές δοκιμές για την κρυστάλλωση της γαλεκτίνης-4N η συνθήκη ήταν η εξής: 18% (w/v) PEG 8000, 0,1 M Tris, pH=8,5 και 0,2 M οξικό ασβέστιο. Για τη γαλεκτίνη-4C η συνθήκη ήταν: 4% (w/v) PEG 400, 0,1 M HEPES-NaOH, pH=7,0 και 1,6 M θειικό αμμώνιο. Οι κρύσταλλοι της γαλεκτίνης-4N εμφανίζονται μετά από 17 μέρες, ενώ της γαλεκτίνης-4C μετά από 4 μήνες.

3.6.5 Αξιοποίηση της μεθόδου Θερμιδομετρίας Ισοθερμικής Τιτλοδότησης (ITC) για προσδιορισμό της σταθεράς πρόσδεσης K_d

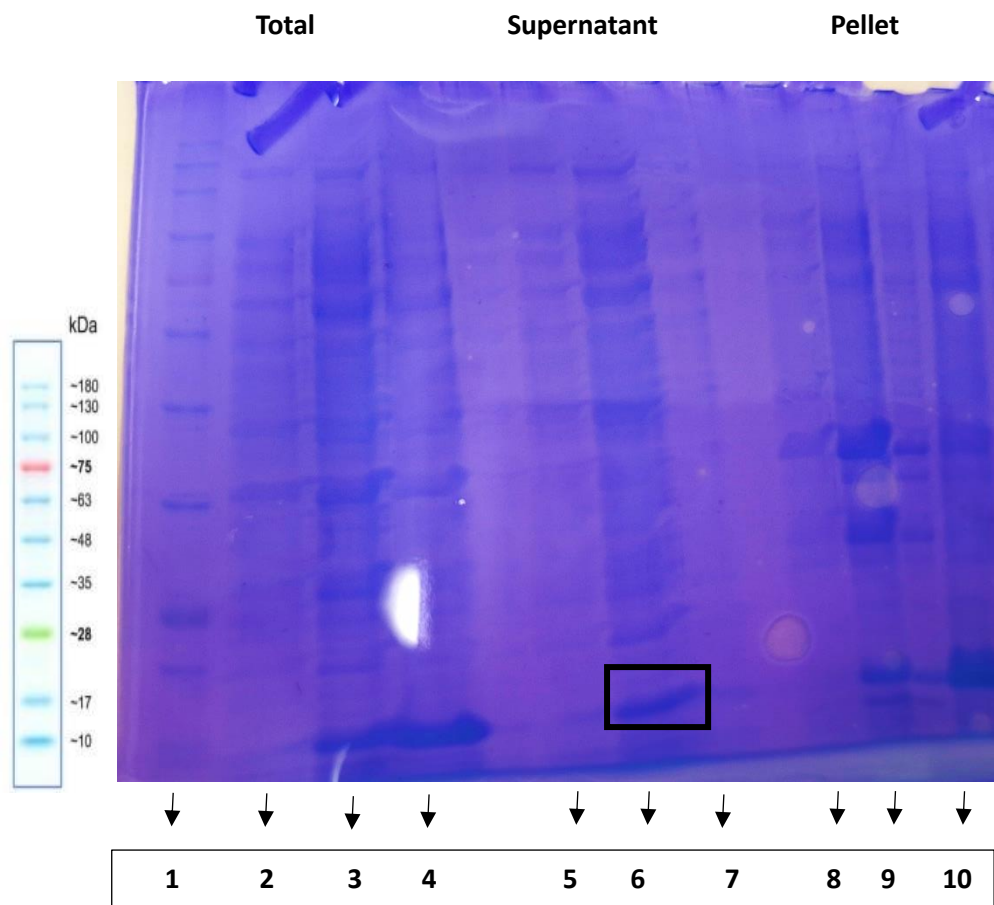
Μία ποσότητα από το τελικό δείγμα των πρωτεϊνών που προέκυψε μετά τη συμπύκνωση χρησιμοποιήθηκε για πειράματα ITC. Ανάμεσα σε ένα πλήθος προσδετών κρίνεται σημαντικό να βρεθούν οι καταλληλότεροι ως προς τη συγγένειας δέσμευσης στην υπό μελέτη πρωτεΐνη. Για αυτό το λόγο αξιοποιείται η μέθοδος του ITC, η οποία μελετά τις αλλαγές στη θερμότητα που προκαλούνται λόγω των μακρομοριακών αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσονται μεταξύ του προσδέτη και της πρωτεΐνης. Συνεπώς, από τις αλλαγές αυτές μπορεί να διαπιστωθεί ποιο μόριο-προσδέτης δεσμεύεται ισχυρά στη γαλεκτίνη-4N και ποιο στη γαλεκτίνη-4C. Στην παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκαν μελέτες πρόσδεσης του προσδέτη **13** στη γαλεκτίνη-4N και -4C μέσω της μεθόδου ITC. Τα πειράματα διεξήχθησαν στο Εργαστήριο Βιοχημείας, του τμήματος Κτηνιατρικής, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας υπό την επίβλεψη του καθηγητή Κοντοπίδη Γεωργίου, όπου αξιοποιήθηκε το μηχάνημα Nano-ITC (TA Instruments). Το μηχάνημα αυτό διαθέτει μία

κυψελίδα με όγκο 1038 μL και μία σύριγγα με όγκο 250 μL . Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία 20° C και ταχύτητα ανάδευσης 200 *rpm*. Η διαδικασία που περιγράφεται ακολουθήθηκε τόσο για τη γαλεκτίνη-4*N* όσο και τη γαλεκτίνη-4*C*. Αρχικά, προστέθηκαν στην κυψελίδα 0,3 *mM* της πρωτεΐνης. Και οι δύο πρωτεΐνες βρίσκονταν σε ρυθμιστικό διάλυμα 100 *mM Tris-HCl*, *pH*=7,5. Ο προσδέτης **13** που μελετήθηκε ήταν διαλυμένος στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα 100 *mM Tris-HCl*, *pH*=7,5. Σε επόμενο βήμα, ο προσδέτης **13** τοποθετήθηκε στη σύριγγα και έπειτα τιτλοδοτήθηκε στην κυψελίδα που βρισκόταν η πρωτεΐνη. Η συγκέντρωση του **13** ήταν 0,5 *mM*. Ο προσδέτης τιτλοδοτήθηκε με 21 ενέσεις των 10 μL η κάθε μία, με 200 δευτερόλεπτα επώαση ανάμεσα σε κάθε ένεση. Στόχος ήταν η εύρεση των σταθερών πρόσδεσης και των θερμοδυναμικών παραμέτρων του **13** με τη γαλεκτίνη-4*N* και τη γαλεκτίνη-4*C*. Για την ανάλυση των δεδομένων αξιοποιήθηκε το πρόγραμμα *NanoAnalyze* (TA instruments).

4. Αποτελέσματα

4.1 Καθαρισμός και απομόνωση της γαλεκτίνης-4N

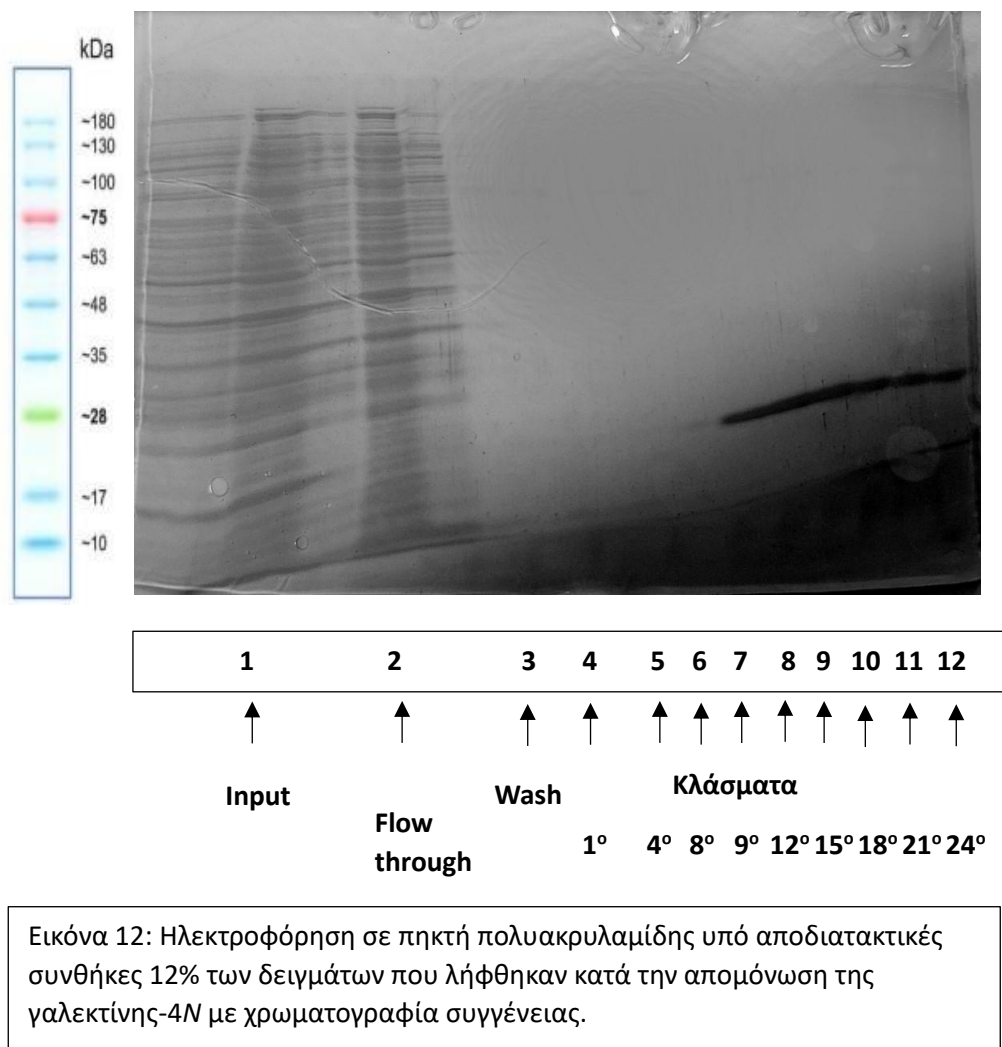
Αρχικά έγινε έλεγχος των καταλληλότερων συνθηκών για την υπερπαραγωγή της γαλεκτίνης-4N. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκαν μελέτες έκφρασης του γονιδίου παρουσία *IPTG* τόσο στους 18°C όσο και στους 37°C. Η διαφορά μεταξύ των δύο συνθηκών είναι ότι στην πρώτη περίπτωση η διαδικασία γίνεται πιο αργά συνεπώς υπάρχουν λιγότερες πιθανότητες να συμβούν λάθη κάτι που αντιστρέφεται στη δεύτερη περίπτωση που η υπερέκφραση γίνεται σε αρκετά υψηλή θερμοκρασία. Για να διαπιστωθεί η ιδανικότερη μεταξύ των δύο πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης υπό αποδιατακτικές συνθήκες 12%. Τα δείγματα που φορτώθηκαν είχαν την εξής σειρά: 1 → *marker*, 2 → δείγμα πριν την προσθήκη *IPTG* (*total*), 3 → δείγμα μετά την προσθήκη *IPTG* στους 18°C (*total*), 4 → δείγμα μετά την προσθήκη *IPTG* στους 37°C (*total*), 5 → δείγμα πριν τη προσθήκη *IPTG* (*supernatant*), 6 → δείγμα μετά την προσθήκη *IPTG* στους 18°C (*supernatant*), 7 → δείγμα μετά την προσθήκη *IPTG* στους 37°C (*supernatant*), 8 → δείγμα πριν τη προσθήκη *IPTG* (*pellet*), 9 → δείγμα μετά τη προσθήκη *IPTG* στους 18°C (*pellet*), 10 → δείγμα μετά την προσθήκη *IPTG* στους 37°C (*pellet*). Όπως είναι γνωστό η γαλεκτίνη-4N είναι διαλυτή, συνεπώς βάσει των ζωνών που έχουν ληφθεί από την ηλεκτροφόρηση όπως παρουσιάζεται παρακάτω (Εικόνα 11) δίνεται έμφαση στις 3 μεσαίες ζώνες που είναι τα δείγματα που λήφθηκαν από το υπερκείμενο (*supernatant*). Διαπιστώθηκε ότι πιο έντονη είναι η ζώνη από το δείγμα στο οποίο πραγματοποιήθηκε η υπερέκφραση παρουσία *IPTG* στους 18°C. Ενώ όπως φαίνεται από τις τρεις τελευταίες ζώνες η γαλεκτίνη-4N σε δείγματα που λήφθηκαν από το ίζημα (*pellet*) εμφανίζει πιο έντονη ζώνη στους 37°C και όχι στους 18°C. Αυτό πρακτικά σημαίνει ότι η υπερπαραγωγή της γαλεκτίνης-4N στους 37°C οδηγεί την πρωτεΐνη να καταλήγει στο μη διαλυτό μέρος, γεγονός που δεν είναι επιθυμητό, αφού δεν μπορεί να απομονωθεί. Συνεπώς θεωρήθηκε πως οι βέλτιστες συνθήκες για την υπερπαραγωγή της πρωτεΐνης είναι οι 18°C.



Εικόνα 11: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης υπό αποδιατακτικές συνθήκες 12% των δειγμάτων που λήφθηκαν κατά την πραγματοποίηση ελέγχου με στόχο την εύρεση των καταλληλότερων και αποδοτικότερων συνθηκών παραγωγής της γαλεκτίνης-4N.

Στο πρώτο βήμα καθαρισμού και απομόνωσης της γαλεκτίνης-4N προστέθηκε το δείγμα της πρωτεΐνης στη στήλη χρωματογραφίας συγγένειας (*Lactosyl Sepharose 4CLB*). Πιο συγκεκριμένα τα μόρια της γαλεκτίνης-4N προσδέθηκαν στα μόρια λακτόζης της στήλης. Συνεπώς, μόρια τα οποία δεν εμφάνιζαν καμία συγγένεια με τη στήλη απομακρύνθηκαν απευθείας από αυτή (*flow through*). Σε επόμενο βήμα ακολούθησε η έκπλυση της στήλης με το ρυθμιστικό διάλυμα Α και απομακρύνθηκαν όσα μόρια είχαν προσδεθεί στη στήλη μη ειδικά (*Wash*). Έπειτα έγινε έκλυση της γαλεκτίνης-4N με τη χρήση κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος Β. Το διάλυμα αυτό περιλάμβανε ακριβώς ότι και το ρυθμιστικό διάλυμα Α, συν τη λακτόζη σε υψηλότερη συγκέντρωση από αυτή της στήλης προκειμένου να ανταγωνιστεί για την πρόσδεση με τα μόρια της γαλεκτίνης ώστε να απομακρυνθούν από τη στήλη και να επιτευχθεί η έκλυση τους. Συγκεκριμένα λήφθηκαν 25 κλάσματα των 5 mL. Έπειτα, για να διαπιστωθεί σε ποια από αυτά έγινε η έκλυση πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης υπό

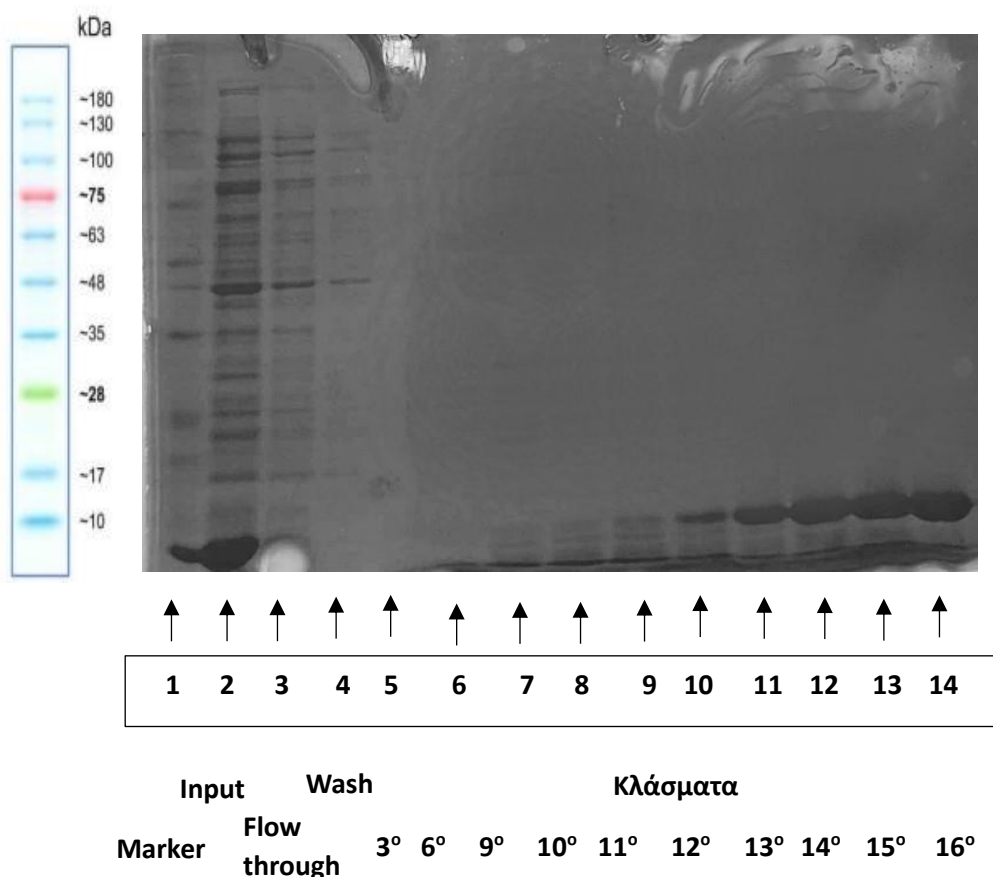
αποδιατακτικές συνθήκες 12% (SDS-PAGE). Μέσω αυτής της μεθόδου διαπιστώθηκαν όχι μόνο τα κλάσματα στα οποία έγινε η έκλουση αλλά και η καθαρότητα της πρωτεΐνης. Η εικόνα (Εικόνα 12) που προέκυψε από τη μέθοδο αυτή φαίνεται παρακάτω:



Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 12 η έκλουση της γαλεκτίνης-4N έγινε στα κλάσματα 12 με 27 τα οποία ενώθηκαν και ακολούθησε εκτεταμένη διαπίδυση έναντι διαλύματος PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄). Για τη διαπύδυση χρησιμοποιήθηκαν μεμβράνες με κατώφλι 10 kDa. Κατόπιν, ακολούθησε συμπύκνωση του δείγματος με φίλτρο που είχε κατώφλι 10 kDa στα 540 μL. Η απόδοση του καθαρισμού ήταν 4,3 mg/mL. Η συγκέντρωση προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Bradford σε μήκος κύματος 595 nm.

4.2 Καθαρισμός και απομόνωση της γαλεκτίνης-4C

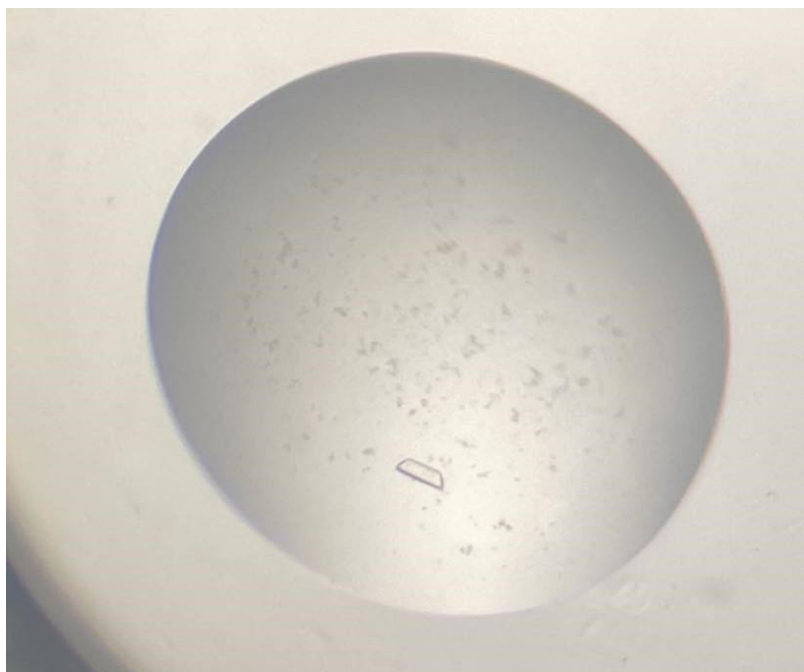
Κατά την απομόνωση της γαλεκτίνης-4C τα βήματα που ακολουθήθηκαν είναι τα ίδια με αυτά που περιγράφηκαν στο εδάφιο 4.1 κατά την απομόνωση της γαλεκτίνης-4N. Παρακάτω (Εικόνα 13 και 14) φαίνονται οι πηκτές πολυακρυλαμίδης υπό αποδιατακτικές συνθήκες 12% που προέκυψαν από τα δείγματα που λήφθηκαν κατά τα την απομόνωση της γαλεκτίνης-4C με χρωματογραφία συγγένειας. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε τόσο για να διαπιστωθούν τα κλάσματα στα οποία έγινε η έκλυση της πρωτεΐνης όσο και να αποδειχθεί η καθαρότητας της. Οι εικόνες που προέκυψαν είναι οι εξής:



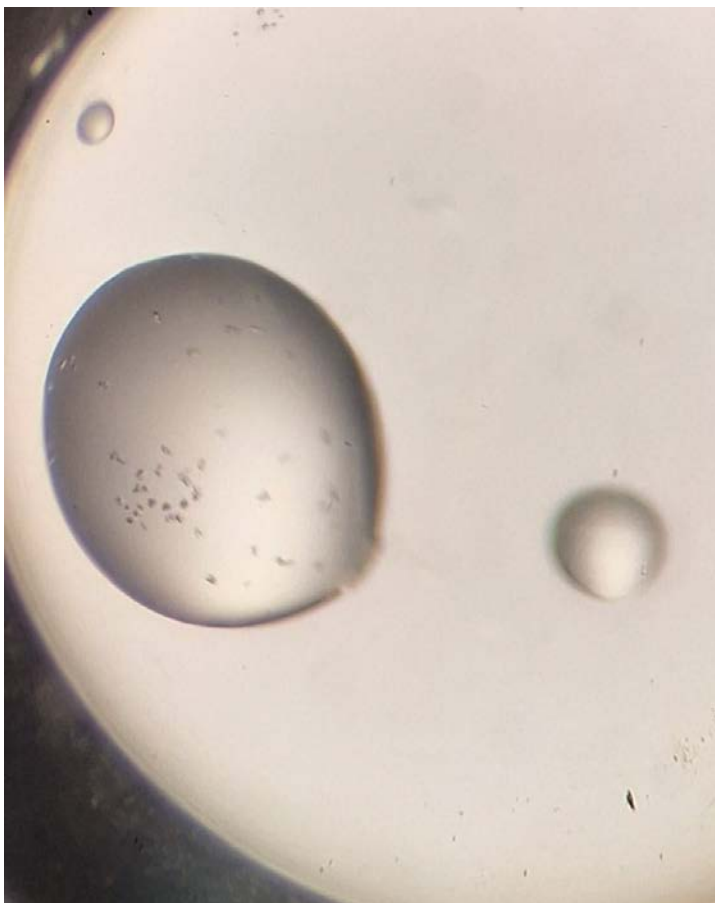
Εικόνα 13: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης υπό αποδιατακτικές συνθήκες 12% των δειγμάτων που λήφθηκαν κατά την απομόνωση της γαλεκτίνης-4C με χρωματογραφία συγγένειας.

Κρυσταλλώσεις της γαλεκτίνης-4N

Μετά την απομόνωση και τον καθαρισμό της γαλεκτίνης-4N μία ποσότητα χρησιμοποιήθηκε για κρυσταλλώσεις. Καθώς, δεν ήταν γνωστή η συνθήκη για την κρυστάλλωση της συγκεκριμένης γαλεκτίνης πραγματοποιήθηκε screening με το kit JBScreen Basic. Συγκεκριμένα το kit αυτό περιλαμβάνει 96 διαφορετικές συνθήκες. Ωστόσο, μόνο σε μία συνθήκη παρατηρήθηκε ένας μικρός κρύσταλλος (Εικόνα 15), ο οποίος μετά από έκθεση σε ακτίνες X διαπιστώθηκε πως ήταν αλάτι. Για αυτό το λόγο έγιναν βιβλιογραφικές μελέτες προκειμένου να βρεθεί εάν έχει καταγραφεί κάποια περίπτωση κρυστάλλωσης της από άλλα ερευνητικά εργαστήρια. Τα ευρήματα που προέκυψαν σε συνδυασμό με κάποιες διαφοροποιήσεις που πραγματοποιήθηκαν οδήγησαν να ληφθούν κάποιοι πολύ μικροί σε μέγεθος κρύσταλλοι. Η συνθήκη που χρησιμοποιήθηκε ήταν: 16% PEG 8000, 0,1M Tris-pH:8,5 και 0,2M CaCl₂ και οι κρύσταλλοι που δημιουργήθηκαν φαίνονται στην Εικόνα 16:

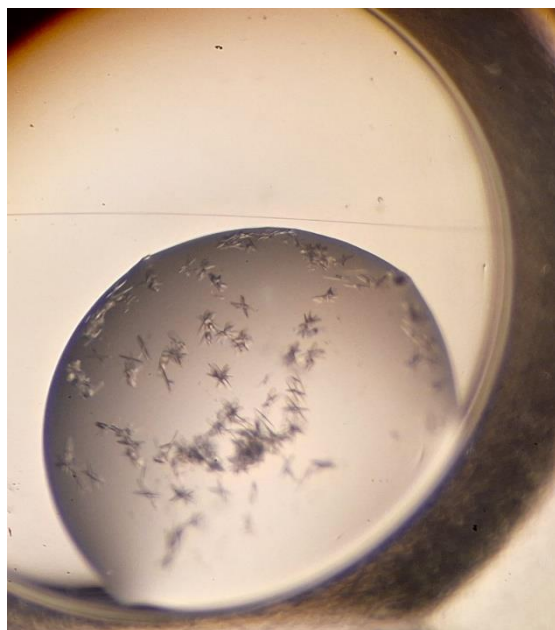


Εικόνα 15:
Αποτελέσματα από
την πρώτη
προσπάθεια
κρυστάλλωσης της
γαλεκτίνης-4N,
αξιοποιώντας το kit
κρυστάλλωσης
JBScreen Basic.



Εικόνα 16:
Αποτελέσματα από
την δεύτερη
προσπάθεια
κρυστάλλωσης της
γαλεκτίνης-4*N*.

Συνεπώς ακολούθησαν επιπλέον προσπάθειες για να βελτιωθεί τόσο το μέγεθος όσο και η ποιότητα των κρυστάλλων. Πιο συγκεκριμένα έγινε αλλαγή του αλατιού που χρησιμοποιήθηκε στη συνθήκη. Το χλωριούχο ασβέστιο (CaCl_2) αντικαταστάθηκε με 0,2 *M* οξικό ασβέστιο ($(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Ca}$). Οι κρύσταλλοι που αναπτύχθηκαν παρουσιάζονται στην Εικόνα 17:



Εικόνα 17: Αποτελέσματα από τη τρίτη προσπάθεια κρυστάλλωσης της γαλεκτίνης-4N.

Τέλος έγινε μία επιπλέον αλλαγή στη συνθήκη που χρησιμοποιήθηκε και πιο συγκεκριμένα αντί για 16% *PEG* 8000 χρησιμοποιήθηκε 18% *PEG* 8000 και όλα τα υπόλοιπα παρέμειναν ίδια. Τελικά, προέκυψαν οι κρύσταλλοι που παρουσιάζονται στην Εικόνα 18:

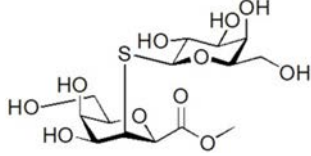


Εικόνα 18: Αποτελέσματα από τη βελτιστοποίηση της συνθήκης που έδωσε τους κρυστάλλους της εικόνας 18.

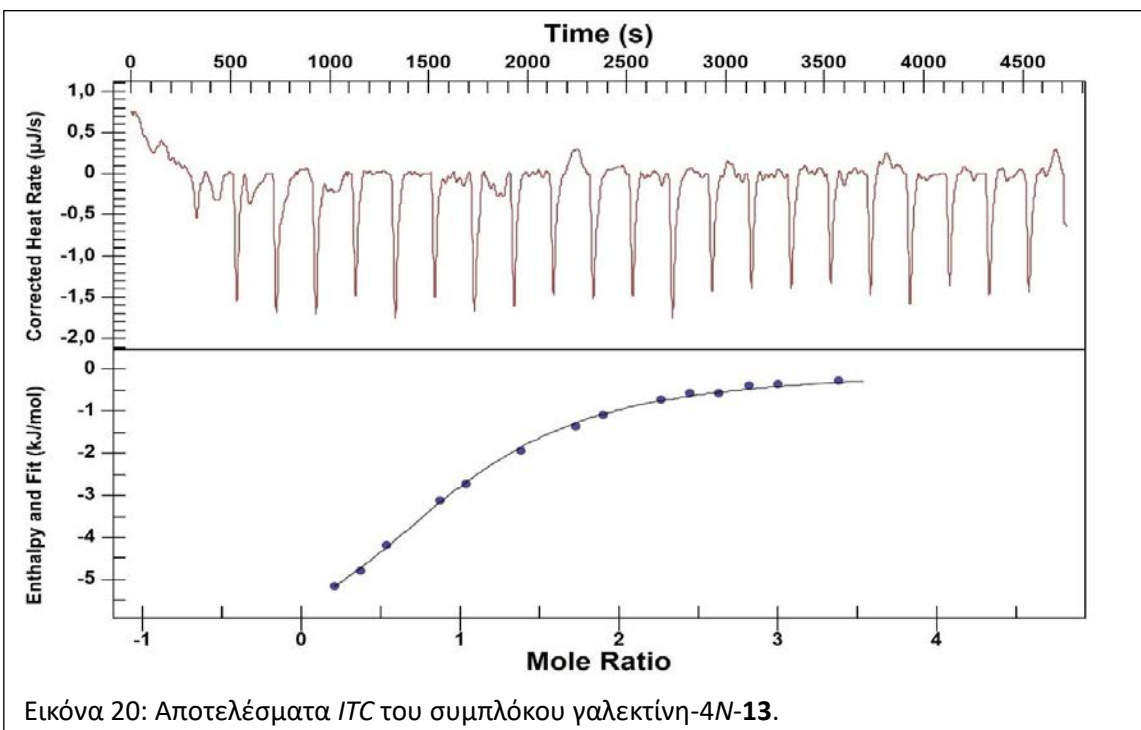
Συμπερασματικά μεταξύ των διαφορετικών συνθηκών που δοκιμάστηκαν η συνθήκη που οδηγούσε στο σχηματισμό καταλληλότερων κρυστάλλων ήταν: 18% *PEG* 8000, 0,1M *Tris-HCl* pH:8,5 και 0,2M $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Ca}$.

Μελέτες πρόσδεσης του προσδέτη **13** στη γαλεκτίνη-4N και -4C

Όπως περιγράφηκε στο εδάφιο 3.6.5 τα πειράματα *ITC* πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία 20°C, η κυψελίδα είχε όγκο 1038 μL , η σύριγγα 250 μL και η ταχύτητα ανάδευσης ήταν 200 *rpm*. Το δείγμα της γαλεκτίνης-4N (0,03 *mM*) υποβλήθηκε σε εκτεταμένη διαπίδυση έναντι του ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl, pH=7,5 και έπειτα προστέθηκε στην κυψελίδα. Κατόπιν, ο προσδέτης **13** (500 *mM*) που ήταν διαλυμένος στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα προστέθηκε στη σύριγγα και τιτλοδοτήθηκε στην κυψελίδα με την πρωτεΐνη. Η τιτλοδότηση έγινε με 21 ενέσεις, των 10 μL , σε 200 δευτερόλεπτα. Σε επόμενο βήμα τα δεδομένα που προέκυψαν αναλύθηκαν με το πρόγραμμα *NanoAnalyze* (TA Instruments). Η χημική δομή του προσδέτη **13** και η τιμή της K_d φαίνονται στον Πίνακα 1, ενώ τα διαγράμματα που προέκυψαν από την επεξεργασία των δεδομένων φαίνονται στην Εικόνα 19:

Χημική δομή προσδέτη 13	K_d (μM)	ΔH (kJ/mol)	ΔG (kJ/mol)	$-T\Delta S$ (kJ/mol)
	10,4 $\pm$ 0,5	-7,4 $\pm$ 0,1	-28,0	-20,6

Πίνακας 1: Χημική δομή του προσδέτη **13** και οι τιμές K_d , ΔH , ΔG και $T\Delta S$ που προέκυψαν από τα πειράματα *ITC*.



Η ίδια ακριβώς διαδικασία, με τις ίδιες ποσότητες και παραμέτρους ακολουθήθηκε και για τη γαλεκτίνη-4C. Ωστόσο, μετά τη διεξαγωγή του πειράματος *ITC* και επεξεργασία των δεδομένων που προέκυψαν διαπιστώθηκε πως ο προσδέτης **13** δεν εμφανίζει καμία συγγένεια δέσμευσης με αυτή την πρωτεΐνη μέχρι τη συγκέντρωση 5 *mM*.

5. Συζήτηση

Ένας προσδέτης θεωρείται ισχυρός όταν εμφανίζει υψηλή συγγένεια πρόσδεσης με την πρωτεΐνη και πιο συγκεκριμένα στην παρούσα περίπτωση με τη γαλεκτίνη-4N και τη γαλεκτίνη-4C. Στην παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε μελέτη της συγγένειας πρόσδεσης του προσδέτη **13** τόσο με τη CRD του αμινοτελικού όσο και του καρβοξυτελικού άκρου της γαλεκτίνης-4. Διαπιστώθηκε πως υπάρχει σημαντική συγγένεια πρόσδεσης με τη γαλεκτίνη-4N με K_d 10,4 μM και δεν εμφάνισε καμία συγγένεια πρόσδεσης με τη γαλεκτίνη-4C. Αυτό μπορεί να οδηγήσει στο συμπέρασμα πως ο συγκεκριμένος προσδέτης είναι ειδικός για τη γαλεκτίνη-4N και όχι για τη γαλεκτίνη-4C. Εντούτοις, ο **13** έχει εμφάνισει παρόμοια σταθερά πρόσδεσης ($K_d=15,6 \mu M$) ως προς τη γαλεκτίνη-3 (Lázár et al., 2023), υποδηλώνοντας πως δεν είναι ειδικός ανταγωνιστής για τη γαλεκτίνη-4 ή τη γαλεκτίνη-3. Στην παρούσα εργασία δόθηκε έμφαση και στην εύρεση της συνθήκης κρυστάλλωσης της γαλεκτίνης-4N, καθώς επόμενο βήμα αποτελεί η εμβάπτιση των κρυστάλλων με τον προσδέτη **13**, ώστε να μελετηθεί και κρυσταλλογραφικά το σύμπλοκο που δημιουργείται. Η δομική ανάλυση της σύνδεσης του **13** στη γαλεκτίνη-4N θα αποκαλύψει τη δομική βάση της σημαντικής του αγκιστείας προς την πρωτεΐνη αυτή προσφέροντας πιθανούς τρόπους για τη βελτίωση της συγγένειας του.

6. Βιβλιογραφία

- Adibah, F., Majid, A., Loh, M., 2006. Monoclonal IGG Production and its Purification Challenges. <https://www.researchgate.net/publication/234841302>
- Arthur, C., Baruffi, M-D., Cummings, R., Stowell, S., 2015. Evolving Mechanistic Insights into Galectin Functions. *Methods Mol Biol.* 1207: 1–35. doi: 10.1007/978-1-4939-1396-1_1.
- Brown, A., 2009. Analysis of Cooperativity by Isothermal Titration Calorimetry. *International Journal of Molecular Sciences.* 10(8), 3457-3477; <https://doi.org/10.3390/ijms10083457>.
- Bum-Erdene, K., Leffler, H., Nilsson U., Blanchard, H., 2016. Structural characterization of human galectin-4 N-terminal carbohydrate recognition domain in complex with glycerol, lactose, 3'-sulfo-lactose and 2'-fucosyllactose. *Scientific Reports* volume. 6:20289. DOI: 10.1038/srep20289
- Bum-Erdene, K., Leffler, H., Nilsson, U., Blanchard, H., 2015. Structural characterization of human galectin-4 C-terminal domain: elucidating the molecular basis for recognition of glycosphingolipids, sulfated saccharides and blood group antigens. *The FEBS Journal.* doi:10.1111/febs.13348.
- Cao, Z-Q., Guo, X-L., 2016. The role of galectin-4 in physiology and diseases. *Protein & Cell.* 7(5): 314–324. doi: 10.1007/s13238-016-0262-9.
- Chaudhary, S., Chaudhary, S., Rawat, S., Kulkarni, A., Bilgrami, A., Perveen, A., Alghamdi, B., Al Zughaibi, T., Ashraf, G., Zubair Alam, M., Hussain, T., 2022. Galectins—Potential Therapeutic Targets for Neurodegenerative Disorders. *International Journal of Molecular Sciences.* 23(19): 11012. doi: 10.3390/ijms231911012.
- Chen, C., Duckworth, C., Fu, B., Pritchard, D., Rhodes, J., Yu, L-G., 2014. Circulating galectins -2, -4 and -8 in cancer patients make important contributions to the increased circulation of several cytokines and chemokines that promote angiogenesis and metastasis. *British Journal of Cancer – Nature.* 110(3): 741–752. doi: 10.1038/bjc.2013.793.
- Chettri, D., Boro, M., Sarkar, L., Verma, A.K., 2021. Lectins: Biological significance to biotechnological application. *Carbohydr. Res.* 506, 108367.

Coskun, O., 2016. Separation techniques: Chromatography. Northern Clinics Of Istanbul. 3(2): 156–160. doi: 10.14744/nci.2016.32757

Cummings, R., Liu, FT., 2009. Galectins. Essentials of Glycobiology. Chapter 33.

Cummings, R., Liu, F-T., Rabinovich, G., Stowell, S., Vasta, G., 2022. Galectins. Essentials of Glycobiology. Chapter 36.

Dahms, N., Hancock, M., 2002. P-type lectins. Cold Spring Harbor. 1572(2-3):317-40. doi: 10.1016/s0304-4165(02)00317-3.

Deschamps, J., 2010. X-ray crystallography of chemical compounds. Volume 86. Issues 15–16. Pages 585-589. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2009.02.028>.

Dessau, M., Modis, Y., 2011. Protein Crystallization for X-ray Crystallography. Journal of Visualized Experiments. (47): 2285. doi: 10.3791/2285.

Dings, P., Miller, M., Griffin, P., Mayo K., 2018. Galectins as Molecular Targets for Therapeutic Intervention. International Journal of Molecular Sciences. 19(3), 905. <https://doi.org/10.3390/ijms19030905>.

Du, X., Li, Y., Xia, Y-L., Ai, S-M., Liang, J., Sang, P., Ji, X-L., Liu, S-Q., 2016. Insights into Protein–Ligand Interactions: Mechanisms, Models, and Methods. International Journal of Molecular Sciences. 17(2), 144; <https://doi.org/10.3390/ijms17020144>.

Fan, Y., Mao, R., Yang, J., 2013. NF-κB and STAT3 signaling pathways collaboratively link inflammation to cancer. Protein & Cell. 4(3): 176–185. DOI 10.1007/s13238-013-2084-3

Fern Bah, C-S., Fei Fang, E., Bun Ng, T., 2012. Medicinal Applications of Plant Lectins. Antitumor Potential and other Emerging Medicinal Properties of Natural Compounds. 10: 55–74. doi: 10.1007/978-94-007-6214-5_5.

Ghazarian, H., Idoni, B., Oppenheimer S., 2010. A glycobiology review: Carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics. Acta Histochem. 236-247. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2010.02.004>.

Gomes, L., Monteiro, G., Mergulhao, F., 2020. The Impact of IPTG Induction on Plasmid Stability and Heterologous Protein Expression by Escherichia coli Biofilms. International Journal of Molecular Sciences. 21(2), 576. <https://doi.org/10.3390/ijms21020576>.

Gosar, A., Hussain, S., Shaikh, T., 2019. POLYMORPHISM AND POLYMORPH CHARACTERISATION IN PHARMACEUTICALS. Journal of Biomedical and Pharmaceutical Research. Volume 8, Issue 5, 52-59. <https://doi.org/10.32553/jbpr.v8i5.652>.

Hasegawa, H., Suzuki, E., Maeda, S., 2018. Horizontal Plasmid Transfer by Transformation in *Escherichia coli*: Environmental Factors and Possible Mechanisms. *Frontiers in Microbiology*. 9: 2365. doi: 10.3389/fmicb.2018.02365

Horm, T., Schroeder, J., 2013. MUC1 and metastatic cancer. *Cell Adhesion & Migration*. 7(2): 187–198. doi: 10.4161/cam.23131.

Kruger, N., 2009. The Bradford Method for Protein Quantitation. p. 17-24, in: J. M. Walker, (Ed.). *The Protein Protocols Handbook*. Humana Press. Totowa, NJ.

Ladbury, J., 2018. Application of Isothermal Titration Calorimetry in the Biological Sciences: Things Are Heating Up! *Biotechniques*. <https://doi.org/10.2144/04376TE01>.

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

Liu, D., Zhu, H., Li, C., 2023. Galectins and galectin-mediated autophagy regulation: new insights into targeted cancer therapy. *Biomarker Research*. 11:22. <https://doi.org/10.1186/s40364-023-00466-9>.

McPherson, A., Gavira, J., 2014. Introduction to protein crystallization. *Acta Crystallographica Section F*. 70(Pt 1): 2–20. doi: 10.1107/S2053230X13033141.

Modenutti, C., Blanco Capurro, J., Di Lella, S., Martí, M., 2019. The Structural Biology of Galectin-Ligand Recognition: Current Advances in Modeling Tools, Protein Engineering, and Inhibitor Design. *Frontiers in Chemistry*. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00823>.

Prasada, S., Mandal, I., Singh, S., Paul, A., Mandal, B., Venkatramani, R., Swaminathan, R., 2017. Near UV-Visible electronic absorption originating from charged amino acids in a monomeric protein. *Chemical Science*. 8(8): 5416–5433. doi: 10.1039/c7sc00880e.

Radhakrishnan, A., Park, K., Kwak, I-S., Jaabir, M., Sivakamavalli, J., 2021. Classification of Lectins. *Springer*. 64–85. https://doi.org/10.1007/978-981-16-7462-4_3

Raposo, C.D., Canelas, A.B., Barros, M.T., 2021. Human Lectins, Their Carbohydrate Affinities and Where to Find Them. *Biomolecules*. 11(2): 188. doi: 10.3390/biom11020188

Ren, J., Karna, S., Lee, H-M., Yoo, S-M., Na, D., 2019. Artificial transformation methodologies for improving the efficiency of plasmid DNA transformation and

simplifying its use. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 103:9205–9215.
<https://doi.org/10.1007/s00253-019-10173-x>

Rustiguel, J., Soares, R., Meisburger, S., Davis, K., Malzbender, K., Ando, N., Dias-Baruffi, M., Nonato, M-C., 2016. Full-length model of the human galectin-4 and insights into dynamics of inter-domain communication. *Scientific Reports*. 6:33633. DOI: 10.1038/srep33633.

Saponaro, A., 2018. Isothermal Titration Calorimetry: A Biophysical Method to Characterize the Interaction between Label-free Biomolecules in Solution. *Bio-protocol*. 8(15): e2957. doi: 10.21769/BioProtoc.2957.

Sasse, J., Gallagher, S., 2009. Staining proteins in gels. *Current Protocols in Molecular Biology*. Chapter 10. Unit 10.6. doi: 10.1002/0471142727.mb1006s85.

Smyth, M.S., Martin, J.H., 2000. x ray crystallography. *Journal of Molecular Pathology*. 53(1): 8–14. doi: 10.1136/mp.53.1.8

Taylor, G., 2010. Introduction to phasing. *Acta Crystallographica D Biol Crystallographica*. 66(Pt 4): 325–338. doi: 10.1107/S0907444910006694.

Timofeev, V., Samygina, V., 2023. Protein Crystallography: Achievements and Challenges. *Crystals-Journal Imprint – MDPI*. 13(1), 71. <https://doi.org/10.3390/cryst13010071>.

Urh, M., Simpson, D., Zhao, K., 2009. Chapter 26 Affinity Chromatography: General Methods. *Methods in Enzymology*. Volume 463. Pages 417-438.
[https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)63026-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)63026-3)

Van Damme, E., 2022. 35 years in plant lectin research: a journey from basic science to applications in agriculture and medicine. *Glycoconjugate Journal*. 39:83–97.
<https://doi.org/10.1007/s10719-021-10015-x>.

Γλυκός, Ν.Μ., 2015. Μία μη μαθηματική εισαγωγή στην κρυσταλλογραφία πρωτεϊνών ΣΥΝΔΕΣΜΟΣ ΕΛΛΗΝΙΚΩΝ ΑΚΑΔΗΜΑΪΚΩΝ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΩΝ, Αθήνα.