



ΤΜΗΜΑ
**Βιοχημείας &
Βιοτεχνολογίας**
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Διπλωματική Εργασία

ΒΙΟΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΣΤΗΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗ ΓΑΛΕΚΤΙΝΗ 7

Νικόλαος Χαράλαμπου Βελιώτης

Σεπτέμβριος 2024, Λάρισα



ΤΜΗΜΑ
**Βιοχημείας &
Βιοτεχνολογίας**
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Diploma Thesis

BIOCHEMICAL STUDIES OF HUMAN GALECTIN 7

Nikolaos Charalampos Veliotis

September 2024, Larissa

Θέμα Διπλωματικής Εργασίας: **Βιοχημικές μελέτες στην ανθρώπινη γαλεκτίνη -7**

Όνομα: **Νικόλαος Χαράλαμπου Βελιώτης**

Επιβλέπων Καθηγητής: **Λεωνίδας Δημήτριος**

Εργαστήριο: **Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας**

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

ΛΕΩΝΙΔΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ

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

ΣΚΑΜΝΑΚΗ ΒΑΣΙΛΙΚΗ

Επίκουρη Καθηγήτρια Βιοχημείας-Μεταβολισμού, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Λάρισα, Ελλάδα

ΣΤΡΑΒΟΔΗΜΟΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ

Εντεταλμένος Διδάσκων στο Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Λάρισα, Ελλάδα

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η αυλαία του πρώτου κεφαλαίου της ακαδημαϊκής μου διαδρομής, αυτού του προπτυχιακού, κλείνει με την εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Η διπλωματική εργασία και η ενασχόληση μου με την γαλεκτίνη-7 μου ξεδίπλωσαν έναν νέο κόσμο, το κόσμο της δομικής βιοχημείας, τον οποίο ανυπομονώ να τον εξερευνήσω. Για αυτό τον λόγο, το κομμάτι των ευχαριστιών πηγάζει ως πραγματική μου ανάγκη.

Πρώτα και κύρια θέλω να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου, Δρ. Δημήτρη Λεωνίδα, που με δέχθηκε στο εργαστήριο του εγκρίνοντάς το αίτημα μου για εκπόνηση της διπλωματικής εργασίας, δίνοντας μου παράλληλα την ευκαιρία να έρθω σε επαφή με τον κλάδο της δομικής βιοχημείας. Η καθοδήγηση του, οι συμβουλές του, ήταν πολύτιμες, ενώ η πόρτα του γραφείου του ήταν πάντα «ανοιχτή». Ευχαριστώ θερμά, την Δρ. Βασιλική Σκαμνάκη και τον Δρ. Γιώργο Στραβοδήμο, οι οποίοι ως μέλη της συμβουλευτικής επιτροπής, συνέβαλαν τα μέγιστα για την επιτυχή εκπόνηση της διπλωματικής εργασίας. Ιδιαίτερα ευχαριστώ τον Δρ. Γιώργο Στραβοδήμο και την Δρ. Αναστασία Καντσάδη, καθώς ήτανε παρόντες σε κάθε απορία είχα, σε κάθε πρόβλημα που αντιμετώπιζα.

Θέλω να ευχαριστήσω τους φίλους και συνεργάτες ερευνητές κατά την διάρκεια της διπλωματικής Δρ. Χριστίνα Δράκου, Σταύρο Μαρινίδη, Μαριλένα Μαυρομμάτη. Ευχαριστώ τον φίλο και εξαίρετο ερευνητή Σεραφείμ Αλεξόπουλο, η βοήθεια του ήταν καθοριστική και του εύχομαι τα καλύτερα. Τέλος, νιώθω την ανάγκη να ευχαριστήσω την Δρ. Αναστασία Τσαγκαράκου, που αν και δεν συναντήθηκαν χρονικά οι πορείες μας στο εργαστήριο, η αξιέπαινη διδακτορική διατριβή της, ήτανε σύντροφος και οδηγός στην πολύμηνη διάρκεια της διπλωματικής.

Θα ήταν μεγάλη παράλειψή από μεριάς μου αν δεν ευχαριστούσα όλα τα μέλη του εργαστηρίου δομικής και λειτουργικής βιοχημείας. Εκτός από εξαιρετικοί επιστήμονες, όλα τα μέλη του εργαστηρίου, διαμόρφωσαν μια φιλική ευχάριστη ατμόσφαιρα, στην οποία η αλληλεγγύη η ανταλλαγή απόψεων και συμβουλών ήτανε αυτές που έδιναν στήριξη σε

κάθε μέλος του εργαστηρίου και σε μένα προσωπικά.

Εκείνος δε που δε μπορεί να ζει μέσα στην κοινωνία με τους άλλους ή αυτός που δεν έχει ανάγκη από τίποτε, αυτός δεν έχει καμιά θέση στην πόλη, γιατί είναι ή θηρίο ή θεός (Αριστοτέλης, Πολιτικά Α, 1253.α25). Έτσι λοιπόν, καθώς ούτε θηρίο ούτε θεός είμαι, δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω όλους τους ανθρώπους «έξω» από το εργαστήριο. Μπορεί να μην γνωρίζουν να μου απαντήσουν σε απορίες σχετικά με την μείωση της εντροπίας ενός συστήματος, ωστόσο η στήριξη τους, η υπομονή τους, η φιλία τους η αγάπη τους αποτελούν φωτεινούς φάρους που δίνουν δύναμη και κουράγιο. Ευχαριστώ ταπεινά την οικογένεια μου, τα αδέρφια μου και τους γονείς μου. Ευχαριστώ φίλους, συντρόφους και τέλος ευχαριστώ την Κατερίνα για την υπομονή της.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	4	3.1.3 Λογισμικά	20
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	7	3.1.4 Αντιδραστήρια	21
ABSTRACT	7	3.2 ΑΡΧΗ ΤΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ	22
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8	3.2.1 Σύστημα έκφρασης ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών	22
1.1 ΓΑΛΕΚΤΙΝΕΣ, ΟΙ ΛΕΚΤΙΝΕΣ ΠΟΥ	8	3.2.2 Καθαρισμός και απομόνωση	23
ΠΡΟΣΔΕΝΟΥΝ Β-ΓΑΛΑΚΤΟΖΙΤΕΣ	8	3.2.3 Ηλεκτροφόρηση υπό αποδιατακτικές συνθήκες	24
1.1.1 Κώδικας των σακχάρων. Το τρίτο αλφάβητο της ζωής.	8	3.2.4 Θερμιδομετρία Ισοθερμικής Τίτλοδότησης (ITC)	25
1.1.2 Λεκτίνες, οι αναγνώστες του κώδικά	8	3.2.5 Κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ	28
1.1.3 Ταξινόμηση λεκτινών	8	3.3 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ	33
1.1.4 Β-Γαλακτοζίτες	8	3.3.1 Έκφραση γαλεκτίνης 7 σε βακτηριακές καλλιέργειες	33
1.1.5 Λεκτίνες τύπου S, γαλεκτίνες	9	3.3.2 Καθαρισμός και απομόνωση της	35
1.1.6 Κατηγοριοποίηση γαλεκτινών	9	γαλεκτίνης-7	35
1.2 Η ΑΝΘΡΩΠΙΝΗ ΓΑΛΕΚΤΙΝΗ-7	10	3.3.3 Ηλεκτροφόρηση γαλεκτίνης 7 υπό αποδιατακτικές συνθήκες	35
1.2.1 Τρισδιάστατη δομή της ανθρώπινης γαλεκτίνης-7	10	3.3.4 Κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ	36
1.2.2 Ιστολογικός εντοπισμός και λειτουργίες στον άνθρωπο της γαλεκτίνης-7	11	στην γαλεκτίνη-7	36
1.2.3, Η γαλεκτίνη-7 σχετίζεται με πολλές παθολογικές καταστάσεις στον άνθρωπο	11	3.3.5 Υπολογισμός σταθεράς πρόσδεσης για τις ενώσεις LL70, LL62 και LL65 μέσω	39
1.2.3.2 Καρκίνος και γαλεκτίνη-7	12	Θερμιδομετρία Ισοθερμικής Τίτλοδότησης.	39
1.2.4 Η ανθρώπινη γαλεκτίνη-7 είναι φαρμακευτικός στόχος	12	4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	40
1.3 ΚΑΤΕΥΘΥΝΟΜΕΝΟΣ ΑΠΟ ΤΗΝ ΔΟΜΗ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΦΑΡΜΑΚΩΝ (STRUCTURE BASED DRUG DESIGN)	14	4.1 Χημικός μετασχηματισμός	40
1.3.1 Κύκλος διεργασιών του SBDD	16	4.2 Καθαρισμός & απομόνωση γαλεκτίνης 7 ..	40
1.3.2 Κρυσταλλογραφία Ακτίνων Χ	17	4.2.1 Αποτελέσματα χρωματογραφίας συγγένειας λακτόζης	40
1.3.3 Θερμιδομετρία Ισοθερμικής Τίτλοδότησης (Isothermal Titration Calorimetry)	17	4.2.2 Αποτελέσματα χρωματογραφίας συγγένειας μοριακής διήθησης	40
2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ – ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΜΕΛΕΤΗΣ	19	4.3 Κρυστάλλωση γαλεκτίνης-7	40
3. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	20	4.3.1 Κρύσταλλοι γαλεκτίνης-7	40
3.1 ΟΡΓΑΝΑ ΚΑΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	20	4.3.2 Συγκρυστάλλωση γαλεκτίνης-7 με αναστολείς	40
3.1.1 Οργανολογία	20	4.4 Αποτελέσματα κρυσταλλογραφίας ακτίνων Χ των κρυστάλλων γαλεκτίνης-7	42
3.1.2 Βακτηριακά στελέχη & πλασμίδια	20	4.5 Αποτελέσματα πειραμάτων ITC	45
		5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	47

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	48
-----------------------	----

Σελίδες: 51

Συνολικές λέξεις: 16.400

Λέξεις κυρίως κειμένου: 14.000

Εικόνες: 26

Πίνακες: 14

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα διπλωματική εργασία παρουσιάζει μια εκτενή βιοχημική διερεύνηση της ανθρώπινης γαλεκτίνης-7, μιας πρωτεΐνης της οικογένειας των γαλεκτινών, οι οποίες χαρακτηρίζονται από την ικανότητά τους να δεσμεύουν β-γαλακτοζίτες. Η γαλεκτίνη-7, όπως όλες οι γαλεκτίνες, διαθέτει έναν τομέα αναγνώρισης υδατανθράκων (CRD). Η CRD, μια κοιλότητα υπεύθυνη για την αναγνώριση και δέσμευση β-γαλακτοζιτών είναι συντηρημένη δομικά σε όλες τις γαλεκτίνες.

Η γαλεκτίνη-7 εμπλέκεται σε πολλές φυσιολογικές και παθολογικές διεργασίες, όπως η απόπτωση, η ρύθμιση της ανοσολογικής απόκρισης και η επούλωση των ιστών. Η συμμετοχή της σε παθήσεις όπως οι διαταραχές της ομοιόστασης της επιδερμίδας και ο καρκίνος τονίζει περαιτέρω το θεραπευτικό της δυναμικό. Ιδίως στον καρκίνο, ο ρόλος της γαλεκτίνης-7 είναι διττός, καθώς μπορεί να καταστέλλει ή να προάγει την εξέλιξη του όγκου, ανάλογα με το είδους του καρκίνου και τον ιστό.

Η εργασία διερεύνα τις ιδιότητες δέσμευσης προσδετών υδατανθρακικής προέλευσης της γαλεκτίνης-7, χρησιμοποιώντας μια προσέγγιση σχεδιασμού φαρμάκων με βάση τη δομή. Για το σκοπό αυτό έγινε υπερέκφραση της πρωτεΐνης σε βακτηριακά κύτταρα, καθαρισμός και απομόνωση της, καθώς και δημιουργία κρυστάλλων γαλεκτίνης-7. Επιπλέον χρησιμοποιήθηκαν οι τεχνικές κρυσταλλογραφίας ακτίνων X και η θερμιδομετρία ισοθερμικής τιτλοδότησης (ITC). Η πρώτη για την αποσαφήνιση των τρισδιάστατων δομών της γαλεκτίνης-7 σε σύμπλοκο με πέντε διαφορετικούς προσδέτες. Η δεύτερη χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της συγγένειας τριών άλλων προσδετών.

Παρά την εκτενή ανάλυση, κανένας από τους ως προς διερεύνηση προσδέτες δεν έδειξε επιτυχή δέσμευση με τη γαλεκτίνη-7. Αυτά τα ευρήματα υποδηλώνουν ότι η ανάπτυξη αποτελεσματικών αναστολέων της γαλεκτίνης-7 μπορεί να απαιτεί προσδέτες με πολύ ειδικά χαρακτηριστικά, που περιλαμβάνουν διαφορετικές τροποποιήσεις στους υπό μελέτη ανταγωνιστές για επιτυχή πρόσδεση.

ABSTRACT

This thesis presents an extensive biochemical investigation of human galectin-7, a protein of the galectin family, which are characterized by their ability to bind β -galactosides. Galectin-7, like all galectins, contains a carbohydrate recognition domain (CRD), a conserved structure that forms a cavity responsible for recognizing and binding β -galactosides.

Galectin-7 is involved in many physiological and pathological processes, such as apoptosis, regulation of immune responses, and tissue healing. Its involvement in conditions like epidermal homeostasis disorders and cancer further highlights its therapeutic potential. Notably, in cancer, the role of galectin-7 is dual, as it can either suppress or promote tumor progression depending on the type of cancer and the tissue involved.

This study explores the carbohydrate-binding properties of galectin-7 using a structure-based drug design approach. For this purpose, the protein was overexpressed in bacterial cells, purified, isolated, and crystallized. Additionally, X-ray crystallography and isothermal titration calorimetry (ITC) were employed. The former was used to elucidate the three-dimensional structures of galectin-7 in complex with five different ligands, while the latter was used to determine the affinity of three other ligands.

Despite extensive analysis, none of the tested ligands showed successful binding with galectin-7. These findings suggest that the development of effective inhibitors for galectin-7 may require ligands with highly specific characteristics, including different structural modifications to the ligands studied to interact effectively with the target protein.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΓΑΛΕΚΤΙΝΕΣ, ΟΙ ΛΕΚΤΙΝΕΣ ΠΟΥ ΠΡΟΣΔΕΝΟΥΝ Β-ΓΑΛΑΚΤΟΖΙΤΕΣ

1.1.1 Κώδικας των σακχάρων. Το τρίτο αλφάβητο της ζωής.

Οι άνθρωποι επικοινωνούν μεταξύ τους με κώδικες, δηλαδή με ένα σύνολο συμβόλων και διαφορετικών μερών που αποθηκεύουν μια πληροφορία. Στη βιολογία υπάρχουν κώδικες όπως είναι ο γενετικός κώδικας που αποτελείται από νουκλεϊκά οξέα, ο κώδικας των πρωτεϊνών αλλά και ο κώδικας των σακχάρων (sugar code). Τα σάκχαρα είναι τα γράμματα αυτού του αλφαβήτου, που συνδυάζονται σε πολυσακχαρίτες και συνιστούν τις λέξεις, ενώ στο σύνολό τους κωδικοποιούν μια πληροφορία. Ένα κώδικας με μεγάλη πολυπλοκότητα, καθώς υπάρχουν αρκετά σάκχαρα μπορούν να συνδυαστούν με ποικίλους τρόπους σε αλυσίδες. Η κυτταρική επιφάνεια για παράδειγμα, με πλήθος πολυσακχαριτών, αποτελεί πλατφόρμα πάνω στην οποία σάκχαρα, πολυσακχαρίτες, γλυκοζίτες δημιουργούν ένα προφίλ το οποίο ορίζει την διακυτταρική επικοινωνία των κυττάρων. (Gabijs, 2018; Gabijs et al., 2022)

1.1.2 Λεκτίνες, οι αναγνώστες του κώδικά

Όπως κάθε κώδικας είναι απαραίτητο προκειμένου να είναι λειτουργικός να μπορεί να αποκωδικοποιηθεί-αναγνωστεί. Αυτή τον ρόλο επιτελούν στα κύτταρα οι λεκτίνες, οι οποίες ονομάστηκαν κατά το λατινικό *lēctus* (επιλέγω), καθώς οι διάφορες λεκτίνες «επιλέγουν» ειδικά κάθε πολυσακχαρίτη για να μεταφράσουν την πληροφορία. Εξαιτίας της ιδιότητας τους αυτής, έχουν εξέχοντα ρόλο σε πληθώρα κυτταρικών διεργασιών όπως είναι μεταγωγή σήματος, ανοσολογικές αποκρίσεις και σε βιοχημικά μονοπάτια που εμπλέκονται πρωτεΐνες και υδατάνθρακες. Η σύνδεση τους με τους υδατάνθρακες γίνεται ειδικά και μη αντιστρεπτά και υπαγορεύεται από τον προσανατολισμό των προσδετών. Ο Stillmark ήταν ο πρώτος που ανακάλυψε την ύπαρξη λεκτινών σε δείγμα από καστορέλαιο, 1888

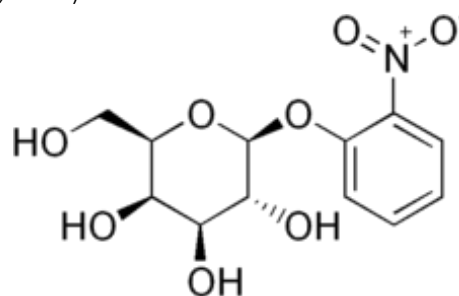
(Goldstein & Hayes, 1978). Έναν χρόνο αργότερα εντοπίστηκε η παρουσία λεκτινών και σε ζωικά δείγματα. Συνολικά στις αρχές του 20^{ου} αιώνα λεκτίνες είχαν εντοπιστεί σε φυτικούς οργανισμούς όπως μπιζέλια, φισικιά, φακές αλλά και σε ζωικούς (αστακός, σαλιγκάρι). Στον άνθρωπο η πρώτη λεκτίνη βρέθηκε στον ορό του πλάσματος (Beulaja Manikandan et al., 2020).

1.1.3 Ταξινόμηση λεκτινών

Οι λεκτίνες είναι πρωτεΐνες που συναντώνται σε πλήθος οργανισμών από τα βακτήρια και τα φυτά μέχρι τον άνθρωπο. Για την καλύτερη μελέτη και ανάλυση των συγκεκριμένων πρωτεϊνών και των ιδιοτήτων τους, προκύπτει η ανάγκη για ταξινόμηση τους. Η ταξινόμηση των λεκτινών γίνεται με βάση δύο κανόνες: 1. Υποκυτταρικός εντοπισμός, 2. Πρωτεϊνική δομή. Με βάση τον υποκυτταρικό τους εντοπισμό διακρίνονται σε μεμβρανικές λεκτίνες και σε λεκτίνες που είναι διαλυτές στο κυτταροδιάλυμα και στο μεσοκυττάριο υγρό. Οι κατηγορίες των λεκτινών είναι τύπου C, χιτολεκτίνες, τύπου F, F-Box, Ficolins, τύπου I, τύπου L, τύπου M, P-Type, τύπου R, τύπου X και τύπου S (Raposo et al., 2021).

1.1.4 Β-Γαλακτοζίτες

Τα γλυκοζιτικά παράγωγα της γαλακτόζης ονομάζονται γαλακτοζίτες (galactosides). Κάθε γαλακτοζίτης περιέχει ένα μόριο γαλακτόζης, που δημιουργεί γλυκοζιτικό δεσμό στον άνθρακα 1 με κάποιο άλλο μόριο. Ανάλογα με την στερεοχημεία του δεσμού χωρίζονται σε α-γαλακτοζίτες (ο δεσμός είναι κάτω από το επίπεδο της γαλακτόζης) και σε β-γαλακτοζίτες (ο δεσμός είναι πάνω από το επίπεδο της γαλακτόζης). Οι γαλακτοζίτες είναι είτε ολιγοσακχαρίτες είτε πολυσακχαρίτες, και απαντώνται σε γλυκοπρωτεΐνες και γλυκολιπίδια. Πιο γνωστός β-γαλακτοζίτης είναι ο δισακχαρίτης λακτόζη. (JEREMY M. BERG, 2021)



Εικόνα 1. Χημική δομή του ONPG (2-Νιτροφαινυλ-β-D-Γαλακτοπυρανοσίδη), ενός β-γαλακτοζίτη, Εικόνα από PubChem.

1.1.5 Λεκτίνες τύπου S, γαλεκτίνες

Η πολύπλοκη εξέλιξη του ζωικού βασιλείου δημιούργησε την ανάγκη για πιο πολύπλοκες και ειδικές διεργασίες στην αναγνώριση γλυκανών. Οι γαλεκτίνες είναι μια οικογένεια 16 (Kaminker & Timoshenko, 2021) μέχρι σήμερα ζωικών λεκτινών που ξεχωρίζουν για την ειδική πρόσδεση β-γαλακτοζιτών (β -GALactosites +LECTINS= GALEC-TINS). Αρχικά ονομάστηκαν λεκτίνες τύπου S, καθότι οι δυο πρώτες που ανακαλύφθηκαν (γαλεκτίνες 1 και 2), απαιτούσαν αναγωγικές συνθήκες για να είναι λειτουργικές (S sulphydryl/θείο που υποδηλώνει τον αναγωγικό παράγοντα), με την ανακάλυψη, ωστόσο των υπολοίπων γαλακτινών φάνηκε ότι το αναγωγικό περιβάλλον ήταν χαρακτηριστικό μόνο αυτών των δύο. Το κοινό χαρακτηριστικό όλων των γαλεκτινών είναι η επικράτεια αναγνώρισης υδατανθράκων (Carbogydrate-Recognition-Domain, CRD), που αποτελείται από περίπου 130 αμινοξέα και έχει υψηλό βαθμό συντήρησης ανάμεσα στις διάφορες γαλεκτίνες. Οι διάφορες γαλεκτίνες μπορεί να έχουν είτε μία είτε περισσότερες CRD. Οι γαλεκτίνες ανήκουν στην κατηγορία των διαλυτών λεκτινών και δεν περιέχουν κάποια σηματοδοτική αλληλουχία πεπτίδιο, επομένως βρίσκονται κυρίως στο κυτταροδιάλυμα, ενώ κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες μπορούν να βρεθούν στον πυρήνα. Πάρα το γεγονός ότι δεν υπάρχει πεπτίδιο έκκρισής οι γαλεκτίνες είναι πρωτεΐνες που μπορούν εκκριθούν και επομένως να δράσουν εξωκυτταρικά (Yang et al., 2008) .

Οι γαλεκτίνες σχηματίζουν ένα δίκτυο πρωτεϊνών για την εκτέλεση κυτταρικών διεργασιών είτε γλυκανοεξαρτώμενων είτε ανεξάρτητων από γλυκάνες τόσο ενδοκυτταρικά όσο και εξωκυτταρικά. Εξωκυτταρικά οι πρωτεΐνες δένονται στην κυτταρική επιφάνεια και στην εξωκυττάρια μήτρα σε διαφορά αντιγόνα και υποδοχείς (Johannes et al., 2018). Ενδοκυτταρικά, πολλές μελέτες αναδεικνύουν ότι η δράση των γαλεκτινών είναι ανεξάρτητη από την CRD και συμμετέχουν σε μεταγωγικά μονοπάτια μέσω πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων. Στον άνθρωπο οι γαλεκτίνες έχουν, σημαντικό ρόλο σε πληθώρα φυσιολογικών και παθολογικών διαδικασιών σε διάφορους ιστούς. Διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανοσολογική απόκριση του οργανισμού, στην ανάπτυξη καρκινικών όγκων καθώς

και σε διάφορες ασθένειες όπως είναι η αρτηριοσκλήρυνση, ο διαβήτης (Sewgobind et al., 2021).

1.1.6 Κατηγοριοποίηση γαλεκτινών

Ανάλογα με την τρισδιάστατη δομή των γαλεκτινών χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες α) πρωτότυπες γαλεκτίνες β) διαδοχικά επαναλαμβανόμενες γαλεκτίνες γ) χιμαιρικές γαλεκτίνες. Οι πρωτότυπες γαλεκτίνες (γαλεκτίνη-1,-2,-5,-7,-10,-11,-13,-14,-15,-16) χαρακτηρίζονται από την μια CRD που διαθέτουν. Οι διαδοχικά επαναλαμβανόμενες γαλεκτίνες (γαλεκτίνη-4,-6,-8,-9,-12) έχουν δύο ομόλογες διακριτές CRD οι οποίες διαχωρίζονται από μια περιοχή συνδέτη, ενδιάμεσα αυτών. Τέλος η γαλεκτίνη-3 είναι η μόνη χιμαιρική γαλεκτίνη με μία CRD. Το χαρακτηριστικό της είναι η αμινοτελική επικράτεια που δεν συναντάται στις λεκτίνες, μέσω της οποίας συνδέεται με άλλες πρωτεΐνες (Beulaja Manikandan et al., 2020).

Η κάθε γαλεκτίνη έχει ένα διαφορετικό προφίλ αναγνώρισης υδατανθράκων με την κάθε μία να προτιμάει και να εξειδικεύεται σε συγκεκριμένους γαλακτοζίτες. Ορισμένες γαλεκτίνες είναι πολυσθενείς, δηλαδή συνδέονται με πάνω από ένα μόρια σε αυτές, ενώ υπάρχουν γαλεκτίνες που είναι μονοσθενείς. Αυτό εξαρτάται από το εάν οι γαλεκτίνες σχηματίζουν διμερή (γαλεκτίνη-1,-2), που ενώ έχουν μια CRD μπορούν να προσδέσουν δύο μόρια, ενώ η γαλεκτίνη-3 που σχηματίζει πενταμερή μπορεί να προσδένει πολλούς γαλακτοζίτες.(Masuyer et al., 2012).

1.2 Η ΑΝΘΡΩΠΙΝΗ ΓΑΛΕΚΤΙΝΗ-7

Η ανθρώπινη γαλεκτίνη-7 (hGal-7) είναι μέλος των πρωτότυπων γαλεκτινών που βρίσκονται σε διαλυτή μορφή και απομονώθηκε για πρώτη φορά από επιδερμικό ιστό. Μέχρι σήμερα έχει βρεθεί ότι η γαλεκτίνη-7 συμμετέχει σε ένα ευρύ φάσμα διαδικασιών στον ανθρώπινο οργανισμό και ότι συνδέεται με διάφορες παθολογικές καταστάσεις.

1.2.1 Τρισδιάστατη δομή της ανθρώπινης γαλεκτίνης-7

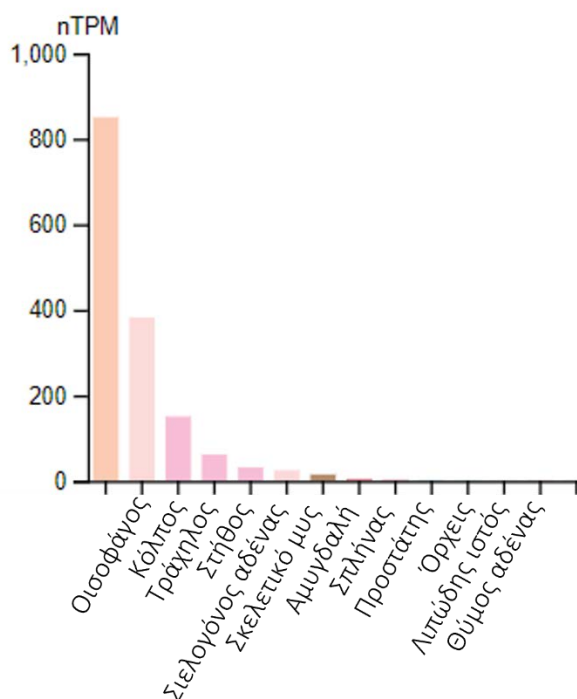
Η hGal-7 είναι μια μονομερής γαλεκτίνη με μία CRD και με μοριακό βάρος περίπου 15 kDa, αποτελούμενη από 136 αμινοξέα. Η δομή της πρωτεΐνης βρέθηκε με την μέθοδο της κρυσταλλογραφίας ακτίνων Χ το 1998 (Leonidas et al., 1998). Αν και η πρωτεΐνη ασκεί τη βιολογική της δράση στο διάλυμα με τη μορφή μονομερούς, εντούτοις κρυσταλλώνεται ως διμερές. Η γαλεκτίνη-7 υιοθετεί την υπερδευτεροταγή δομή στοιβαγμένων β-δομών (jelly roll) με 6 αντιπαράλληλα β-φύλλα των S κλώνων (S1-S6) και 5 F κλώνων (F1-F5) σε μορφή β-σάντουιτς και ένα βρόχο 3_{10} μεταξύ του κλώνου F5 του ενός β φύλλου και του κλώνου S2 του απέναντι φύλλου. Παρουσιάζει αρκετά μεγάλη δομική ομοιότητα με τις γαλεκτίνες-1,-2, και κυρίως με την γαλεκτίνη-10. Όπως όλες οι γαλεκτίνες έχει την περιοχή CRD που αποτελείται από τα συντηρημένα αμινοξικά κατάλοιπα H49, N51, R53, N62, W69, E72, R74 που βρίσκονται σε μια έσω κοίλη δομή στην επιφάνεια των κλώνων S4-S5-S6. Στην κοιλότητα αυτή προσδένονται οι διάφορες προσδέτες και συνάπτουν δεσμούς υδρογόνου και ιοντικές αλληλεπιδράσεις με τα συντηρημένα κατάλοιπα. Παρόλο που οι γαλεκτίνες-1,-2 και-10 μοιράζονται την ίδια αμινοξική αλληλουχία όσον αφορά την CRD έχουν αξιοσημείωτες διαφορές στην τρισδιάστατη χωροδιάταξη τους. Αυτό συμβαίνει εξαιτίας του διαφορετικού μήκους του βρόχου που ενώνει τους κλώνους S4 και S5. Συγκεκριμένα ο βρόχος αυτός είναι βραχύτερος στη γαλεκτίνη-7, με αποτέλεσμα η R31 να καταλαμβάνει τη θέση στο χώρο της H52 στη γαλεκτίνη-1 που είναι σχετικά κοντά στην CRD και επομένως πιθανόν να εμπλέκεται και να επηρεάζει την σύνδεση προσδετών (Leonidas et al., 1998).



Εικόνα 2. **Επάνω**) Η τριτοταγής δομής της γαλεκτίνης 7 ως μονομερές όπως προσδιορίστηκε από τον Δ. Λεωνίδα. Στην εικόνα αυτή ονοματίζονται οι β-κλώνοι. **Κάτω**) Η κρυσταλλική δομή της γαλεκτίνης 7 ως διμερές (1 υπομονάδα πορτοκαλί, 1 υπομονάδα πράσινο) Στην δομή φαίνονται και τα μόρια νερού. Ακόμη διακρίνεται μια κοίλη δομή, η CRD Κωδικός PDB: 1KBZ.

1.2.2 Ιστολογικός εντοπισμός και λειτουργίες στον άνθρωπο της γαλεκτίνης-7

Η γαλεκτίνη 7 εντοπίζεται κυρίως στην κροσσωτή επιθηλιακή στιβάδα σε διάφορα σημεία της επιδερμίδας, στον κερατοειδή χιτώνα του οφθαλμού, σε ιστούς όπως η γλώσσα, ο οισοφάγος, το στομάχι και κατά τη διαδικασία διαφοροποίησης των κερατινοκυττάρων. Ακόμη, η γαλεκτίνη 7 έχει βρεθεί να υπερεκφράζεται σε κύτταρα του θύμου αδένος και σε επιθηλιακά μυϊκά κύτταρα του μαστικού αδένος.



Εικόνα 3. Οι ιστοί στους οποίους εκφράζεται το γονίδιο της γαλεκτίνης 7 στον άνθρωπο, ως μεταγράψωμα. Τα δεδομένα είναι από τη βάση ATLAS, nTPM είναι (transcripts per million, μετάγραφα ανά εκατομμύριο) και υποδηλώνει το μέγεθος της μεταγραφικής ενεργότητας σε κάθε ιστό.

Όπως όλες οι γαλεκτίνες έτσι και η γαλεκτίνη 7 είναι πρωτεΐνη που μπορεί να εκκριθεί χωρίς κάποια ειδική σηματοδοτική αλληλουχία. Ο μηχανισμός αυτός είναι προς το παρόν αδιευκρίνιστος και δεν υπάγεται σε κάποιο κλασσικό μηχανισμό έκκρισης. Η παραγωγή της πρωτεΐνης γίνεται στο κυτταρόπλασμα και μετά μπορεί είτε να κατευθυνθεί στον πυρήνα είτε να εκκριθεί είτε να παραμείνει στο κυτταροδιάλυμα, κάτι που εξαρτάται από το κύτταρο στο οποίο και εκφράζεται και την ειδική λειτουργία του κυττάρου. Η γαλεκτίνη-7 μπορεί είτε να προάγει καρκινικούς όγκους είτε να λειτουργεί ογκοπροστατευτικά, ανάλογα με τα μεταγωγικά μονοπάτια που

συμμετέχει. Η απόπτωση, ο διαχωρισμός, η διαφοροποίηση, η κυτταρική προσκόλληση και η μετανάστευση των κυττάρων είναι λειτουργίες στις οποίες η γαλεκτίνη 7 παίζει καθοριστικό ρόλο.

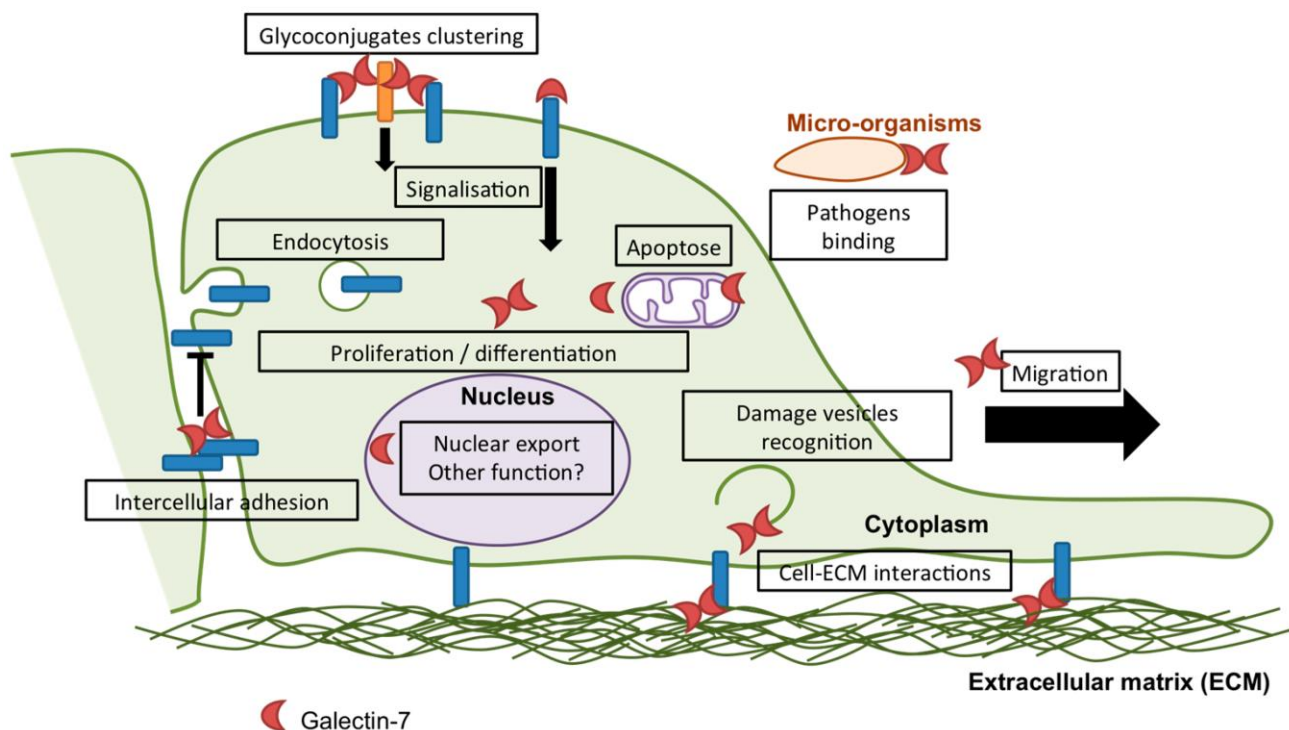
Μια άλλη λειτουργία στην οποία εμφανίζεται η γαλεκτίνη-7 είναι η επούλωση πληγών στον ιστό του κερατοειδούς χιτώνα του ματιού. Πιο συγκεκριμένα υπερεκφράζεται στην διαδικασία της επανεπιθηλιοποίησης του τραύματος ρυθμίζοντας τη μετακίνηση και τη προσκόλληση των κυττάρων (Advedissian, Deshayes, et al., 2017)

1.2.3, Η γαλεκτίνη-7 σχετίζεται με πολλές παθολογικές καταστάσεις στον άνθρωπο

Εξαιτίας του ευρύ φάσματος των λειτουργιών της γαλεκτίνης-7 σε κυτταρικό επίπεδο και την σημασία των λειτουργιών που ελέγχει, ανάλογα ευρύ είναι και το φάσμα το παθολογικών καταστάσεων που εμπλέκεται. Παρακάτω θα γίνει αναφορά στις διάφορες διαταραχές που είναι, τουλάχιστον μέχρι σήμερα, γνωστός ο ρόλος της γαλεκτίνης-7.

1.2.3.1 Η γαλεκτίνη -7 σε διαταραχές της επιδερμίδας

Ο πιο γνωστός παθολογικός ρόλος της γαλεκτίνης-7 είναι η επαγωγή της αποπτωτικής απάντησης των κερατινοκυττάρων ύστερα από την έκθεσή τους σε ακτινοβολία UVB. Πιο συγκεκριμένα σε ορισμένες από τις αρχικές αποπτωτικές λειτουργίες της p53 στα κερατινοκύτταρα διαμεσολαβεί η γαλεκτίνη 7 μέσω της ενεργοποίησης του μονοπατιού JNK (Bernerd et al., 1999). Άλλη ερευνητική ομάδα επίσης έδειξε ότι η γαλεκτίνη-7 υπερεκφράζεται σε ασθενείς με ακτινική κεράτωση (Yamaguchi et al., 2013). Άλλα πειράματα που έγιναν σε ποντίκια, έφεραν στο φως το ρόλο της στην επούλωση τραυμάτων, μέσω της αλληλεπίδρασης της γαλεκτίνης-7 με την E-καδερίνη στη μεμβράνη που προκαλεί την κυτταρική προσκόλληση (Gendronneau et al., 2008). Η γαλεκτίνη 7 συμμετέχει επίσης στην εμφάνιση *συστημικής σκλήρωσης*, μια διαταραχή του συνδετικού ιστού με ίνωση του δέρματος και φλεγμονές, καθώς βρέθηκε ότι τα επίπεδα της είναι εμφανώς μειωμένα στους ασθενείς (Advedissian, Proux-Gillardeaux, et al., 2017; Gendronneau et al., 2015).



Εικόνα 4. Λειτουργίες και ρόλοι της γαλεκτίνης -7 σε ένα επιθηλιακό κύτταρο, Πηγή: (Advedissian, Deshayes, et al., 2017).

1.2.3.2 Καρκίνος και γαλεκτίνη-7

Ποσοστό 85% των καρκινικών όγκων αναπτύσσονται σε επιθηλιακά κύτταρα, συνεπώς η γαλεκτίνη-7 είναι αναμενόμενο να διαδραματίζει ρόλο σε διάφορους καρκίνους (Sewgobind et al., 2021). Ο κακοήθης νεοπλασματικός όγκος που αφορά επιθηλιακά κύτταρα συναντάται στη βιβλιογραφία ως καρκίνωμα. Η γαλεκτίνη 7 δεν έχει κάποιο συγκεκριμένο ρόλο όσον αφορά την εξέλιξη ενός καρκινώματος καθώς σε ορισμένους καρκίνους μπορεί να ευνοεί την ανάπτυξη τους, ενώ σε άλλους η έκφρασή της μπορεί να είναι ανασταλτικός παράγοντας για την εξέλιξη του καρκινώματος (Advedissian, Deshayes, et al., 2017; Advedissian, Proux-Gillardeaux, et al., 2017). Επιπλέον, η δράση της γαλεκτίνης-7 δεν περιορίζεται μόνο σε καρκινώματα, αλλά φαίνεται να ρυθμίζει την έκβαση τόσο μελανωμάτων (καοήθης όγκος του δέρματος), όσο και λεμφωμάτων (όγκος λεμφοκυττάρων). Και σε αυτές τις περιπτώσεις καρκίνου η γαλεκτίνη 7 ανάλογα με τον καρκινικό τύπο και τον ιστό έχει διττό ρόλο. (Sewgobind et al., 2021)

Για παράδειγμα, στο καρκίνωμα των βλεννογόνων επιθηλιακών κυττάρων του οισοφάγου, τα επίπεδα της γαλεκτίνης-7 είναι αρκετά υψηλά και σχετίζονται με τον βαθμό σοβαρότητας της νόσου (Zhu et al., 2010). Αντίθετα σε ποντίκια με καρκίνο στο

θυροειδή αδένα, η γαλεκτίνη-7 ήταν σε πολύ χαμηλά επίπεδα, ενώ στα ποντίκια που εμβολιάζονταν με την γαλεκτίνη 7 ο καρκίνος ήταν σημαντικά ηπιότερος (Moisan et al., 2003). Στην περίπτωση του λεμφώματος του θύμου αδένα, η γαλεκτίνη 7 υπερεκφράζεται καθώς ο καρκίνος οδεύει σε πιο επιθετική συμπεριφορά και σε μεταστατικό χαρακτήρα (Demers et al., 2005). Παρόμοιο ρόλο φαίνεται ότι έχει η γαλεκτίνη και στην επιθετική συμπεριφορά του καρκίνου του μαστού και στην μετάσταση του στους πνεύμονες και στα οστά (Demers et al., 2010). Τέλος, στον καρκίνο του προστάτη η γαλεκτίνη-7 δρα ογκοπροστατευτικά, καθώς αναστέλλει την ικανότητα των κυττάρων να μεταναστεύουν και επομένως εμποδίζει την δημιουργία όγκου (Labrie et al., 2015).

1.2.4 Η ανθρώπινη γαλεκτίνη-7 είναι φαρμακευτικός στόχος

Το πλήθος των παθολογικών καταστάσεων που εμπλέκεται η γαλεκτίνη-7, από διαταραχές της ομοιόστασης της επιδερμίδας μέχρι και την εμφάνιση επιθετικών καρκινικών όγκων, καθιστά την γαλεκτίνη-7 και τις αλληλεπιδράσεις της δελεαστικό θεραπευτικό στόχο (St-Pierre et al., 2009). Η βαθύτερη κατανόηση της αλληλεπίδρασης της γαλεκτίνης-7 με τους διάφορους υδατάνθρακες που προσδένει καθώς και με μόρια που δεν προσδένονται

φυσιολογικά σε αυτή, ανοίγει τον δρόμο για την δημιουργία νέων αποτελεσματικών φαρμάκων. Υπάρχουν προσεγγίσεις για την εύρεση μικρομοριακών ενώσεων είτε υδατανθρακικής προέλευσης είτε μη υδατανθρακικής με πιθανή φαρμακευτική δράση. Αυτή την στιγμή, γίνεται έρευνα για την ανάπτυξη ενώσεων, χωρίς ωστόσο καμιά από αυτές να μπορεί να θεωρηθεί ακόμα αποτελεσματικό φάρμακο (Sewgobind et al., 2021).

Η περιοχή CRD προσδίδει την ικανότητα στη γαλεκτίνη-7 να προσδένει β-γαλακτοζίτες, επομένως οι περισσότεροι μικρομοριακοί αναστολείς που σχεδιάζονται για την γαλεκτίνη-7 είναι σχεδιασμένοι με βάση υδατανθρακικούς σκελετούς. Οι ενώσεις αυτές λειτουργούν γλυκομιμητικά, μιμούνται δηλαδή το πρότυπο της σύνδεσης των φυσικών προσδετών της γαλεκτίνης-7. Τα πλεονεκτήματα αυτών των ενώσεων είναι η αντοχή τους σε υδρόλυση από γλυκοσιδάσες και η ισχυρή και επιλεκτική σύνδεση αυτών με την πρωτεΐνη στόχο. Ωστόσο μια μεγάλη πρόκληση για την εύρεση τέτοιων ενώσεων στην γαλεκτίνη-7 είναι η έλλειψη επιλεκτικότητας, εξαιτίας της μεγάλης δομικής ομοιότητας της CRD στην οικογένεια των γαλεκτινών. Επιπλέον πρόκληση είναι ο πολυποίκιλος ρόλος της γαλεκτίνης-7 σε κάθε ασθένεια, ο διαφορετικός κυτταρικός και ιστολογικός εντοπισμός της (Sewgobind et al., 2021).

1.2.4.1 Μικρομοριακές ενώσεις υδατανθρακικής προέλευσης

Όπως είναι αναμενόμενο οι προσπάθειες σύνθεσης προσδέτη βασίστηκαν σε ικρίωμα β-γαλακτοζίτη φτάνοντας στη δημιουργία μιας βιβλιοθήκης 28 ενώσεων. Οι αρχικές προσπάθειες εστίασαν στην εξέλιξη των ανταγωνιστών γαλεκτίνης-1 και -3. Μια τέτοια προσπάθεια είναι η χημική ένωση TD139 (8) (Εικόνα 5), ένας θείο-γαλακτοζίτης, η οποία έχει εγκριθεί για την φάση IIB των κλινικών δοκιμών για την ασθένεια την ιδιοπαθούς πνευμονικής ίνωσης. Η συγκεκριμένη ένωση παρουσιάζει αναστολή αναφορικά με τις γαλεκτίνες-1,-3 η οποία είναι 200 φορές εντονότερη από την αντίστοιχη αναστολή στην γαλεκτίνη-7. Από μελέτες κρυσταλλογραφίας (Εικόνα 6) φάνηκε ότι η διαφορά αυτή οφείλεται στο ότι οι θέσεις των καταλοίπων R144, A146 των γαλεκτινών-1,-3 καταλαμβάνονται από τα κατάλοιπα R31, H33 στην γαλεκτίνη-7 αντίστοιχα. Έτσι η R31 δεν είναι σε θέση να αλληλεπιδράσει με

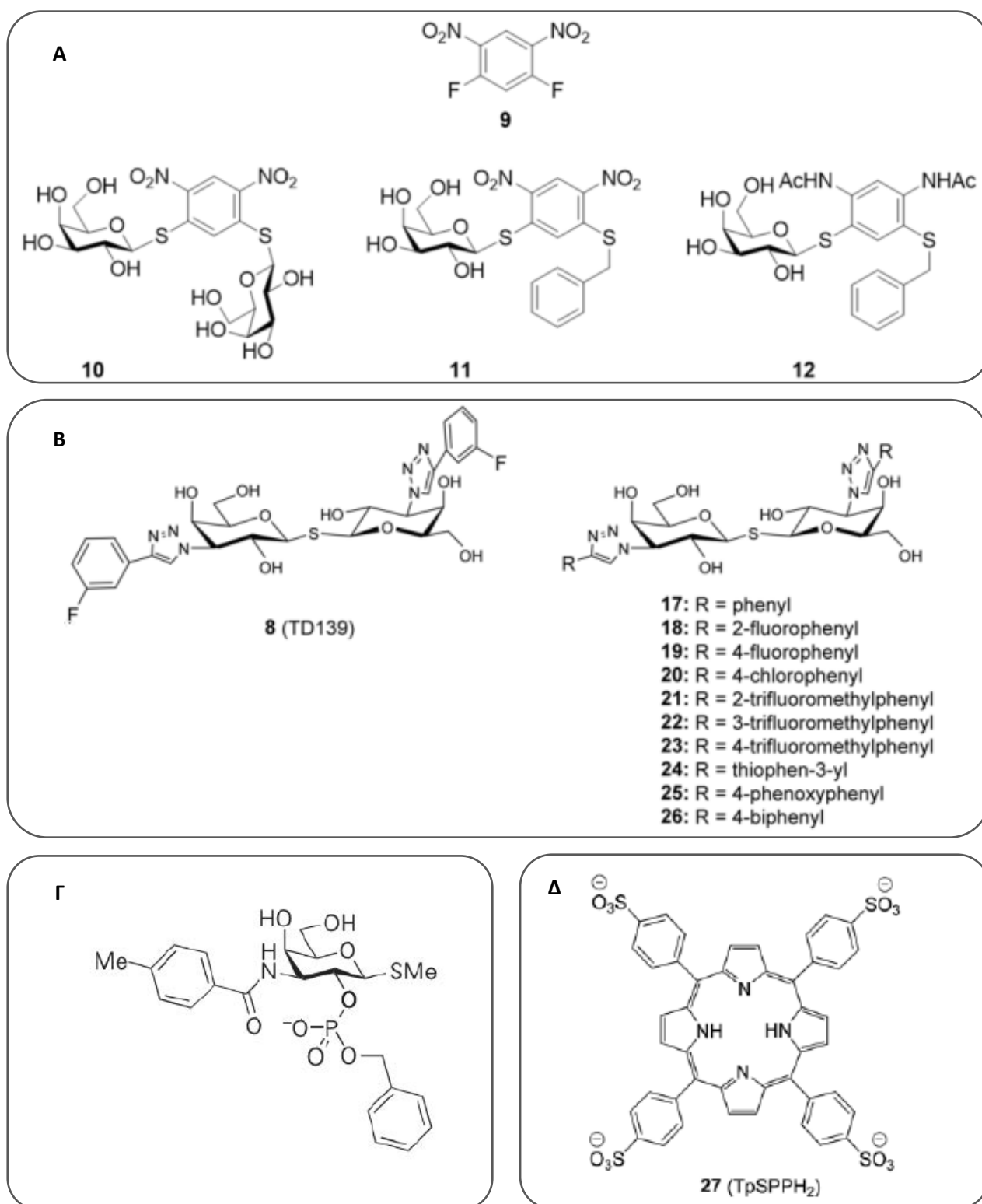
το 4-φθορο-φαινύλιο της TD139, ενώ η H33 ως ογκωδέστερο κατάλοιπο από την A146 μεταβάλλει την τρισδιάστατη δομή. Πιο πρόσφατα δημιουργήθηκε βιβλιοθήκη με βάση την TD139 στην οποία το 4-φθορο-φαινύλιο της TD139, υποκαταστάθηκε από διάφορες ομάδες (Εικόνα 5.B).

Ακόμη, μελετήθηκε και ο β-γαλακτοζίτης με υποκατάστατη 1,5-διφ-θορο-2,4-δινιτροβενζόλιο (9). Με βάση αυτό το ικρίωμα δημιουργήθηκαν (Εικόνα 5.A) ειδικές για τις γαλεκτίνες ενώσεις, των οποίων η πρόσδεση μελετήθηκε στις γαλεκτίνες-1,-3,-7,-8N και-9N. Οι ενώσεις **10**, **11** και **12** προσδένονται ισχυρά και επιλεκτικά στην γαλεκτίνη-7 με K_D 170, 180 και 140 μ M αντίστοιχα. (Cumpstey et al., 2005; Hsieh et al., 2016)

Άλλες μελέτες πρόσδεσης χημικών ανάλογων του 2-Ο-βενζυλ-φωσφορικού γαλακτοζίτη οδήγησαν στην ανακάλυψη ισχυρού ανταγωνιστή με K_D = 450 μ M (Εικόνα 5.Γ) Στη συνέχεια της ανάπτυξης αυτού του προσδέτη ακολουθήθηκε προσέγγιση με υποκατάσταση ομάδων ακτινικών βενζυλαιθέρων στη θέση 3- ή-4, χωρίς ωστόσο να προσδένονται επιλεκτικά στην γαλεκτίνη-7 (Masuyer et al., 2012). Επίσης, παράγωγα της Ν-ακετυλολακτοζαμίνης, που φέρουν ομάδες θειουρίας στον C3 της γαλακτόζης, προσδένονται στη γαλεκτίνη-7 με K_D = 23 μ M χωρίς όμως να εμφανίζουν εξειδίκευση, καθώς προσδένονται και στις γαλεκτίνες-1,-3,-8N και-9N με σταθερές πρόσδεσης 35-47 μ M (Salameh et al., 2006).

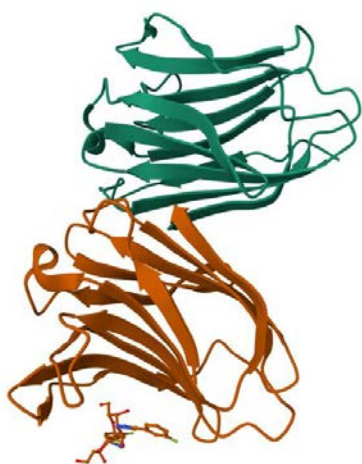
1.2.4.2 Μικρομοριακές ενώσεις μη υδατανθρακικής προέλευσης

Υπάρχουν φαρμακευτικές προσεγγίσεις που στοχεύουν την γαλεκτίνη-7 και εστιάζουν στην σύνθεση ανταγωνιστών μη υδατανθρακικής προέλευσης. Συγκεκριμένα με τέτοια προσέγγιση είναι η σύνθεση της ένωσης TrSPPH2 (Εικόνα 5.Δ) με βασικό κορμό προφυρίνης η οποία μειώνει σε σημαντικό βαθμό την αποπτωτική απάντηση σε Τλεμφοκύτταρα (López De Los Santos et al., 2020). Επίσης, ερευνώνται ενώσεις, ανταγωνιστές πεπτιδικής φύσεως τέτοιοι ώστε τα αμινοξικά κατάλοιπα, να σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου, υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις με συγκεκριμένα αμινοξικά κατάλοιπα της γαλεκτίνης-7.

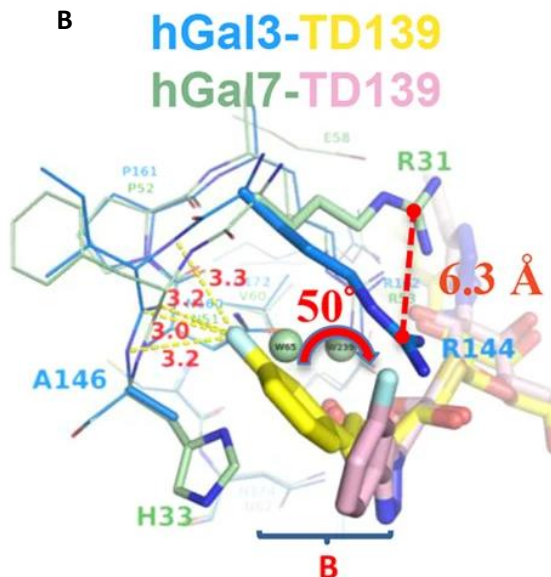


Εικόνα 5. Ανταγωνιστές γαλεκτίνες 7. Η αρίθμηση αντιστοιχεί στον αριθμό τους στην βιβλιοθήκη. **A).** 1,5-διφθορο-2,4-δινιτροβενζόλιο (9) και τα ανάλογα του (10, 11, 12). **B.)** Η TD139 με τους διάφορους υποκατάστατες R (17-26) στη θέση φθορο-φαινυλομάδα. **Γ).** 2-O-βενζυλ-φωσφορικού γαλακτοζίτης **Δ)** μη υδατανθρακικής προέλευσης TpSPPH₂. (Hsieh et al., 2016; Masuyer et al., 2012; Salameh et al., 2006).

A



B

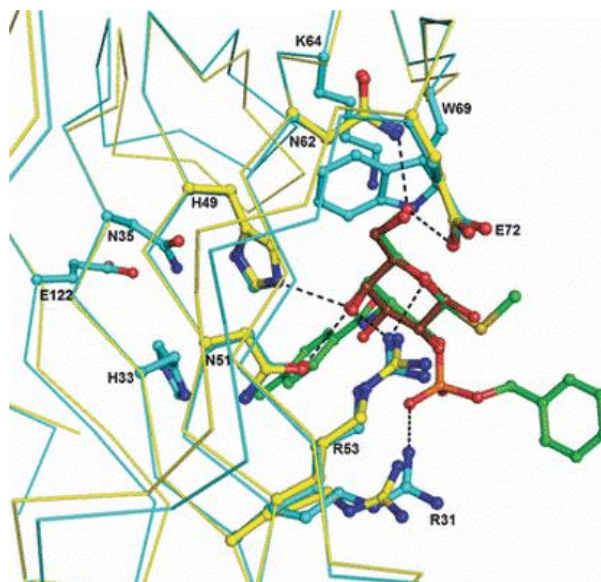


Εικόνα 6. Α) Η κρυσταλλική δομή της γαλεκτίνης -7 ως διμερές σε σύμπλοκο με τον αναστολέα TD139 (8). (Hsieh et al., 2016). Κωδικός PDB: 5H9Q. Β) Η κρυσταλλική δομή της TD139 με την γαλεκτίνη 7, σε υπέρθεση της με την αντίστοιχη δομή με την γαλεκτίνη -3, ανα-κάλυψε σημαντικά δεδομένα για τον μηχανισμό που διέπει την αναγνώριση β-γαλακτοζιτών στο μόριο της γαλεκτίνης -7. Οι θέσεις των καταλοίπων R144, A146 της γαλεκτίνης O3 καταλαμβάνονται από τα κατάλοιπα R31, H33 στην γαλεκτίνη -7 αντίστοιχα.

A



B



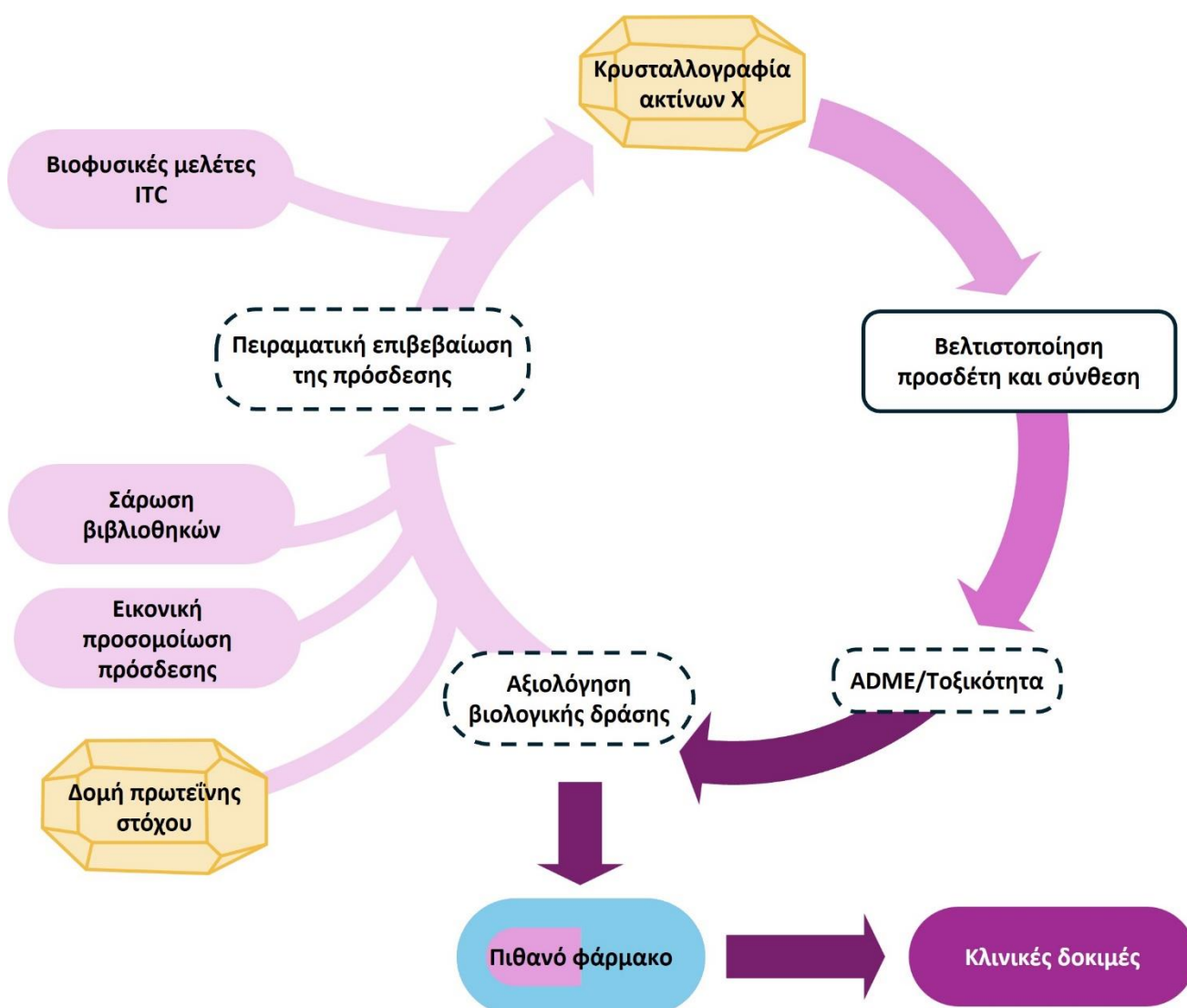
Εικόνα 7. Α) Η κρυσταλλική δομή της γαλεκτίνης -7 ως μονομερές σε σύμπλοκο με τον αναστολέα 2-O-benzylphosphate-galactoside (Εικόνα 5 Γ) (8), όπως προσδιορίστηκε από (Masuyer et al., 2012) Κωδικός PDB: 3ZXE. Β). Η κρυσταλλική δομή 2-O-benzylphosphategalactoside (πράσινο) με την γαλεκτίνη-7 (κυανό) σε υπέρθεση με αυτήν της γαλεκτίνης-7 με γαλακτόζη (κίτρινο). Η πρόσδεση του συγκεκριμένου αναστολέα διέπεται από τους μηχανισμούς σύνδεσης με τους φυσικούς προσδέτες της γαλεκτίνης-7 όπως φαίνεται, ενώ ο βενζολικός δακτύλιος βρίσκεται έξω από την κοιλότητα πρόσδεσης.

1.3 ΚΑΤΕΥΘΥΝΟΜΕΝΟΣ ΑΠΟ ΤΗΝ ΔΟΜΗ ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΦΑΡΜΑΚΩΝ (STRUCTURE BASED DRUG DESIGN)

1.3.1 Κύκλος διεργασιών του SBDD

Ο κατευθυνόμενος από την δομή σχεδιασμός φαρμάκων είναι μια προσέγγιση στην ανακάλυψη νέων φαρμάκων. Σε πρώτη φάση πρέπει να χαρακτηριστεί το μόριο στόχος, που στην πλειονότητα των περιπτώσεων είναι μια πρωτεΐνη και να προσδιοριστεί η τρισδιάστατη δομή της (κρυσταλλογραφία, NMR). Μετά τον προσδιορισμό της δομής, πραγματοποιείται η αναγνώριση και η βελτιστοποίηση πιθανών ενώσεων που μπορούν να δεσμευτούν στον στόχο. Οι ενώσεις αυτές προέρχονται από βάσεις

δεδομένων και εισάγονται στη θέση δέσμευσης του στόχου μέσω υπολογιστικών αλγορίθμων, οι οποίοι τις αξιολογούν και τις κατατάσσουν βάσει των αλληλεπιδράσεών τους με τον στόχο. Οι πιο υποσχόμενες ενώσεις υποβάλλονται σε βιοχημικές δοκιμές και μέσω μιας επαναληπτικής διαδικασίας, προσδιορίζεται η δομή του συμπλόκου στόχου-ένωσης και η ένωση βελτιστοποιείται για αυξημένη δραστηριότητα και εξειδίκευση. Τέτοιες βιοχημικές διαδικασίες είναι η μελέτη του συμπλόκου με κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ, θερμοδομετρία ισοθερμικής τιτλοδότησης και κυκλικό διχρωισμό. Αφού αξιολογηθούν για τις δυνατότητές τους, οι ενώσεις αυτές μπορεί να εισέλθουν σε κλινικές δοκιμές για να αξιολογηθεί η αποτελεσματικότητά τους και η ασφάλειά τους, πριν αναπτυχθούν ως εμπορικά



Εικόνα 8. Η κυκλική πορεία του κατευθυνόμενου από την δομή σχεδιασμού φαρμάκων για την εύρεση και την βελτιστοποίηση φαρμακευτικών ουσιών. Η εικόνα βασίστηκε στο άρθρο (Maneyraud & Mourey, 2020a).

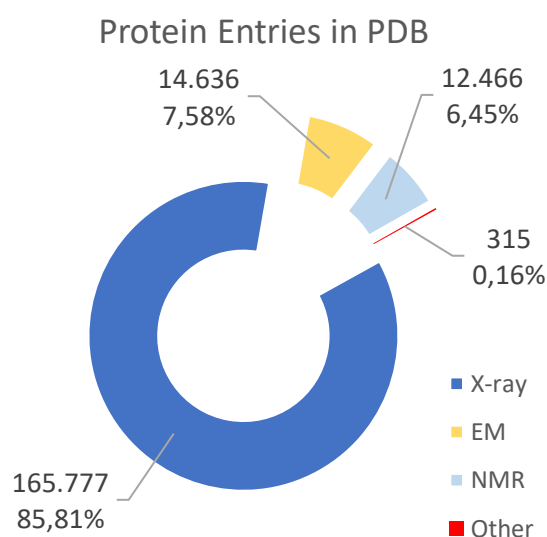
φάρμακα. Πρόκειται για μια επαναληπτική διαδικασία με πολλαπλούς κύκλους που εκτελούνται για να οδηγηθεί το βελτιστοποιημένο υποψήφιο φάρμακο σε κλινική δοκιμή. Η μέθοδος SBDD έχει εφαρμοστεί με επιτυχία στην ανάπτυξη φαρμάκων όπως οι αναστολείς της πρωτεάσης του HIV και το Zanamivir για τη γρίπη (Anderson, 2003; Van Montfort & Workman, 2017).

1.3.2 Κρυσταλλογραφία Ακτινών Χ

Η κρυσταλλογραφία ακτινών Χ αποτελεί μέχρι και σήμερα την πιο συχνή πειραματική μέθοδο για τον προσδιορισμό της τρισδιάστατης δομής βιομορίων, ειδικά πρωτεϊνών. Χαρακτηριστικά από το σύνολο των 193.194 πρωτεϊνικών δομών που έχουν καταχωρηθεί στην Protein Data Bank (PDB), το 86% έχουν προσδιοριστεί με την μέθοδο της κρυσταλλογραφίας ακτινών Χ. Συνοπτικά, η αρχή της μεθόδου είναι η έκθεση ενός πρωτεϊνικού κρυστάλλου σε ακτινοβολία Χ. Τα κρυσταλλικά επίπεδα περιθλούν με διαφορετικό τρόπο τις ακτίνες Χ δημιουργώντας μοτίβα περιθλάσεων για κάθε κρύσταλλο διαφορετικά, η ανάλυση των οποίων δίνει τις συντεταγμένες των ατόμων στον χώρο. Με αυτό τον τρόπο ανακαλύπτονται καινούργιες δομές, αναλύεται η σύνδεση προσδετών πάνω στη πρωτεΐνη σε δομικό επίπεδο. (Περισσότερα για την μέθοδο της κρυσταλλογραφίας στο κεφάλαιο 3.2.4). Η δομή της γαλεκτίνης-7, που αποτελεί το υποκείμενο της παρούσας εργασίας, είναι μια από τις χιλιάδες δομές πρωτεϊνών που ανακαλύφθηκε μέσω κρυσταλλογραφίας ακτινών Χ.

Η κρυσταλλογραφία αξιοποιείται και για την μελέτη της πρόσδεσης ενώσεων με πρωτεΐνες και αποτελεί ένα από τα βασικά στάδια για τον SBDD. Η κατανόηση της τρισδιάστατης δομής σημαντικών για τη θεραπεία στόχων έχει συμβάλει στην ανακάλυψη φαρμάκων, από τότε που οι πρώτες δομές πρωτεϊνών ανακαλύφθηκαν με τη χρήση ακτινογραφικής κρυσταλλογραφίας κατά τη διάρκεια των δεκαετιών του 1950 και 1960. Συγκεκριμένα για την πρόσδεση ενώσεων πάνω σε πρωτεΐνες, μπορούν να ληφθούν δεδομένα που αφορούν την αξιολόγηση του τρόπου πρόσδεσης της ένωσης πάνω στην πρωτεΐνη στόχο. Επίσης, βρίσκονται οι φυσικές αποστάσεις των μορίων του προσδέτη με τα μόρια της

πρωτεΐνης, καθώς και η χωροδιάταξη της ένωσης ή αν προκαλούνται δομικές προσαρμοστικές αλλαγές στην πρωτεΐνη στόχο. Η κρυσταλλογραφία ακτινών Χ επιλέγεται ως μέθοδος χάρη στην υψηλή ευκρίνεια που την χαρακτηρίζει, καθώς μπορεί να έχει υψηλή διακριτική ικανότητα έως 1,5 Å (όσο το μήκος ενός πεπτιδίου δεσμού). Με την κρυσταλλογραφία ακτινών Χ μπορούν να διακριθούν μόρια ύδατος και μετάλλων, πληροφορίες απαραίτητες για την κατανόηση της δράσης μιας πρωτεΐνης και για τον σχεδιασμό φαρμάκων (Maveyraud & Mourey, 2020a).



Εικόνα 9. Σε σύνολο 193.194 καταχωρήσεων οι 165.777 είναι κρυσταλλογραφίας ακτινών Χ. Τα δεδομένα είναι με βάση τα στοιχεία της PDB κατά τον Αύγουστο του 2024.

1.3.3 Θερμιδομετρία Ισοθερμικής Τιτλοδότησης (Isothermal Titration Calorimetry)

Η θερμιδομετρία Ισοθερμικής Τιτλοδότησης (ITC) είναι μια βασική μέθοδος για την μέτρηση θερμοδυναμικών γεγονότων σε ένα σύστημα. Η ITC μαζί με την DSC (Θερμιδομετρία Διαφορικής Σάρωσης) είναι οι μόνες πειραματικές μέθοδοι για τον άμεσο προσδιορισμό της μεταβολής της ενθαλπίας (ΔH) μιας θερμοδυναμικής αντίδρασης. Η μεταβολή της ενθαλπίας μιας αντίδρασης στις περισσότερες περιπτώσεις συνοδεύεται με μεταβολή της θερμοκρασίας του συστήματος η οποία είναι μετρήσιμη. Η ITC έχει πολλές εφαρμογές στην μελέτη

βιοχημικών αντιδράσεων, όπως είναι η αλληλεπίδραση πρωτεϊνών, η αλληλεπίδραση μιας χημικής ένωσης προσδέτη με πρωτεΐνη. Η δεύτερη περίπτωση είναι εξαιρετικά χρήσιμη στον κατευθυνόμενο από τη δομή σχεδιασμό φαρμάκων, καθώς δίνει ποιοτικές πληροφορίες για τον τρόπο σύνδεσης ενός προσδέτη, εν δυνάμει φαρμάκου, με την πρωτεΐνη στόχο. Η γνώση της θερμοδυναμικής της αντίδρασης, δηλαδή η μεταβολή της εντροπίας και της ενθαλπίας μπορεί να παρέχει σημαντικές πληροφορίες στη βελτιστοποίηση των ενώσεων (Jelesarov & Bosshard, 1999).

Το σύστημα σε μια τέτοια αντίδραση (πρωτεΐνης – προσδέτη) αποτελείται από την πρωτεΐνη στόχο, από την χημική ένωση-προσδέτη και από τον διαλύτη στον οποίο είναι διαλυμένα αυτά τα μόρια προκειμένου να μπορούν να αλληλοεπιδράσουν. Τα τρία μέρη αυτού του συστήματος αλληλεπιδρούν θερμοδυναμικά σε μικρό ή μεγαλύτερο βαθμό. Η αλληλεπίδραση αυτή έχει ως αποτέλεσμα την ανταλλαγή ενέργειας μεταξύ των μερών του συστήματος.

Στην κατάσταση αυτή είναι ορθό να αξιοποιηθεί για την κατανόηση του συστήματος η εξίσωση της ελεύθερης ενέργειας Gibbs. Με βάση την ελεύθερη ενέργεια Gibbs ευνοείται ο σχηματισμός συμπλόκου πρωτεΐνης - προσδέτη μόνο στην περίπτωση αρνητικής τιμής της ελεύθερης ενέργειας. Δηλαδή, η ελεύθερη ενέργεια του συμπλόκου πρέπει να είναι μικρότερη από την αρχική ελεύθερη ενέργεια του συστήματος καθώς αυτό υποδηλώνει ότι το σύστημα έφτασε σε κατάσταση ισορροπίας (η παράγωγος της ελεύθερης ενέργειας ως προς τον χρόνο μηδενίζεται) και επομένως ευνοείται θερμοδυναμικά. Το μέγεθος της τιμής της ελεύθερης ενέργειας υποδεικνύει και την θερμοδυναμική σταθερότητα του συμπλόκου. (Jelesarov & Bosshard, 1999). Με βάση αυτές τις θερμοδυναμικές ιδιότητες η μέθοδος αυτή είναι σε θέση να δώσει πληροφορίες για τη σταθερά K_D , τη στοιχειομετρία n , την αλλαγή της ενθαλπίας ΔH , την αλλαγή της ελεύθερης ενέργειας ΔG και την αλλαγή της εντροπίας ΔS . Τελικά, η στόχευση στην σύνθεση ενώσεων με άξονα την μικρότερη τιμή ελεύθερης ενέργειας, αποτελεί χρήσιμο εργαλείο κατά τον σχεδιασμό φαρμάκων.

1.3.3.1 Πλεονέκτημα & μειονεκτήματα χρήσης ITC

Το βασικότερο πλεονέκτημα της συγκεκριμένης μεθόδου είναι ότι δεν προϋποθέτει την τροποποίηση της πρωτεΐνης με την σήμανση με κάποια φθορίζουσα ουσία ή ραδιοϊσότοπο, όπως αντίστοιχες μέθοδοι. Δεν εμφανίζει περιορισμούς στο μέγεθος της πρωτεΐνης, δίνοντας την δυνατότητα για δοκιμές σε ευρύ φάσμα πρωτεϊνών. Σημαντική είναι και η μεγάλη επαναληψιμότητα της μεθόδου η οποία συνοδεύεται και με αντίστοιχη ακρίβεια με περιθώριο σφάλματος μικρότερο από 10%. Τέλος, εμφανίζει υψηλή ευαισθησία, με δυνατότητα μέτρησης συγγένειας στο εύρος των mM με 10-2 μ M.

Βασικό μειονέκτημα της μεθόδου είναι ότι η μέτρηση της διαφοράς θερμότητας δεν οφείλεται αποκλειστικά στην πρόσδεση αλλά στο συνολικό θερμικό γεγονός. Ακόμη είναι μια τεχνική που απαιτεί μεγάλες ποσότητες από πρωτεΐνη και προσδέτη, που ορισμένες φορές αποτελεί εμπόδιο σε πειράματα με ενώσεις και πρωτεΐνες που δεν μπορούν να πραχθούν σε μεγάλες ποσότητές, ενώ αυξάνει το κόστος του πειράματος σημαντικά (Du et al., 2016).

2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ – ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΜΕΛΕΤΗΣ

Ο καθοριστικός ρόλος της γαλεκτίνης-7 στον ανθρώπινο οργανισμό καθιστά την ερευνητική της μελέτης τόσο αναγκαία όσο και δελεαστική. Η βιοχημική της συμπεριφορά, όσον αφορά την πρόσδεση σε αυτή υδατανθράκων, μπορεί να δώσει μεγαλύτερο βάθος στις γνώσεις μας για την κατανόηση των μηχανισμών αναγνώρισης των β-γαλακτοζιτών από τις γαλεκτίνες. Υπό αυτό το πρίσμα το ενδιαφέρον για τη μελέτη της γαλεκτίνης-7 επικεντρώνεται γύρω από βιοχημικές μελέτες και δοκιμασίες που έχουν να κάνουν με την δομική αναγνώριση μικρομοριακών ενώσεων, εν δυνάμει φαρμακευτικών ουσιών. Αυτό διαμορφώνει το αντικείμενο μελέτης της παρούσας διπλωματικής εργασίας, που είναι βιοχημικές μελέτες πάνω στην γαλεκτίνη-7 με σκοπό την μελέτη πρόσδεσης ή μη μικρομοριακών ενώσεων-προσδετών για την εύρεση νέων ενώσεων οδηγών που να προσδέονται στην CRD της hGal7. Για τον σκοπό αυτό, στο πλαίσιο της διπλωματικής εργασίας μελετήθηκε η πρόσδεση 8 ενώσεων, ειδικά σχεδιασμένων για γαλεκτίνες και πιο συγκεκριμένα για τη γαλεκτίνη 7 μέσω των μεθόδων κρυσταλλογραφίας ακτίνων Χ και ITC. Η αξιοποίηση των δομικών και θερμοδυναμικών δεδομένων είναι σε θέση να αναδείξει τους μηχανισμούς που διέπουν την ειδική αλληλεπίδραση της γαλεκτίνης-7 με τους προσδέτες,

3. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

3.1 ΟΡΓΑΝΑ ΚΑΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

3.1.1 Οργανολογία

Πίνακας 1. Στον πίνακα αναγράφονται όλα τα όργανα, συσκευές, αναλώσιμα που χρησιμοποιήθηκαν κατά την εκπόνηση της εργασίας. Επίσης αναγράφεται η εμπορική ονομασία και η εταιρεία πώλησης

Όργανα-Υλικά	Επωνυμία	Εταιρεία
Θερμαντήρας ξηρής θέρμανσης	Thermoleader Dry Block Heat Bath	Thermo Scientific
Kit εξαγωγής DNA	NucleoSpin, Plasmid DNA	Macherey Nagel
Ανακινούμενος ψυχόμενος επωαστήρας	RM13,100.00	LabTech
Αναλυτικός ζυγός		KERN
Μεμβράνες διαπίδυσης με κατώφλι 10 kDa	Membrane dialysis tubing	Sigma
Πιάτα κρυστάλλωσης 96 θέσεων	SWISSCI MRC 2 Well	Jena Bioscience
Ρομποτικό σύστημα σάρωσης συνθηκών κρυστάλλωσης	OryxNano	Douglas Instruments
Φωτόμετρο Υπεριώδους	NanoDrop® ND-1000 UV	Thermo Scientific
Στερεοσκόπιο	OlympusTL2	Olympus
Στήλη μοριακής διήθησης	Superdex 75	GE HealthCare
Στήλη συγγένειας	Lactosyl Sepharose 4CLB	GE HealthCare
Συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρησης	Mini-PROTEAN tetra cell	Bio-Rad
Συσκευή μέτρησης pH	827 pH Lab	Metrohm
Συσκευή παραγωγής υπερήχων	VEVOR 3L	Witeg
Σύστημα ελέγχου FPLC	AKTA PURIFIER UPC900	GE Healthcare
Υδατόλουτρο	Wisebath	Witeg
Φασματοφωτόμετρο	UV-1600PC	VWR
Φίλτρα για φιλτράρισμα διαλυμάτων	Omni Pore	Merc Millipore
Φίλτρα συμπύκνωσης με κατώφλι 3 kDa	Amicon Ultra-4	Meck Millipore
Φίλτρα σύριγγας 0.45 µm	Sartorius	
Φυγόκεντρος	Eppendorf 5417R	Eppendorf
Φυγόκεντρος	CR-22N Himac,	HITACHI
Φυγόκεντρος 50 ml	Z36HK,	HermLe

3.1.2 Βακτηριακά στελέχη & πλασμίδια

Πίνακας 2. Το βακτηριακό στέλεχος και ο φορέας κλωνοποίησης που χρησιμοποιήθηκαν. Για τον φορέα κλωνοποίησης γίνεται εκτενέστερη αναφορά στο κεφάλαιο 3.3.1.2.

Ονομασία	Εταιρεία
E. coli BL-21 Gold (DE3)	Agilent Technologies
pET22	Merk Millipore

3.1.3 Λογισμικά

Πίνακας 3. Υπολογιστικά προγράμματα που χρησιμοποιήθηκαν

Λογισμικό	Λογισμικό
NanoAnalyze	Nano Instruments
CCP4i2	

3.1.4 Αντιδραστήρια

Πίνακας 4. Αναγράφονται τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και η εταιρεία παραγωγής

Χημική ονομασία αντιδραστηρίων	Χημική ονομασία αντιδραστηρίων
Acetic acid	SDS
Acrylamide	Serva
Ammonium Persulfate (APS)	Serva
Ampicillin	Serva
Bis-acrylamide	Serva
Benzonase® Nuclease	Merck
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
Ethanol Absolute	Sigma
Ethylenediaminetetraacetic (EDTA)	Panreac
Glycerol	Applichem
Glycine	Serva
Isopropyl b-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)	FluoroChem
Hydrochloric acid 37% (HCl)	Applichem
Lactose	Serva
Luria Bertani Broth (LB Broth)	Merck
Luria Bertani Agar (LB-Agar)	Fisher BioReagents
Marker electrophoresis	
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 (NaCl)	Scharleu
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	Serva
Sodium hydroxide	Merck
Polyethynol Glycol 4000 (PEG 4000)	Sigma
Polyethynol Glycol 4000 (PEG 8000)	Sigma
TEMED	Invitrogen
Tris hydrochloride (Tris-HCl)	Serva
β-Mercaptoethanol (β-Merc)	Sigma

3.2 ΑΡΧΗ ΤΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ

3.2.1 Συστήμα έκφρασης ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών

Καθοριστικό βήμα για την βιοχημική μελέτη μια πρωτεΐνης είναι η παραγωγή της τόσο με ποιοτικά κριτήρια (σωστά αναδιπλωμένη, μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, λειτουργική) όσο και ποσοτικά, δηλαδή μεγάλα ποσοστά έκφρασης της. Και οι δυο αυτές παράμετροι πρέπει να ληφθούν υπόψη, ώστε ένα πείραμα να στεφθεί επιτυχημένο. Πρόκληση αποτελεί, η δημιουργία έγκλειστών σωματίων, συσσωματώματα στα οποία παγιδεύονται μη ορθά αναδιπλωμένα μόρια πρωτεϊνών. Η πρόκληση έγκειται στο γεγονός, ότι μέσω της διαδικασίας συσσωμάτωσης οι πρωτεΐνες χάνουν την τριτοταγή τους δομή και κατ' επέκταση την λειτουργία, ενώ η επαναφορά τους στην σωστή διαμόρφωση είναι επισφαλής. Η επιλογή του κατάλληλου μέσου και τρόπου έκφρασης ποικίλει και είναι μια διαδικασία κόστους- οφέλους. Φανερώνεται δηλαδή η ανάγκη κατάλληλης επιλογής θρεπτικού υλικού, βακτηριακού στελέχους και επαγωγέα της έκφρασης καθώς και κατάλληλες συνθήκες έκφρασης (θερμοκρασία ανάπτυξης καλλιέργειας, θερμοκρασία επαγωγής). (Deshmukh et al., 2022).

3.2.1.1 Χημικός μετασχηματισμός

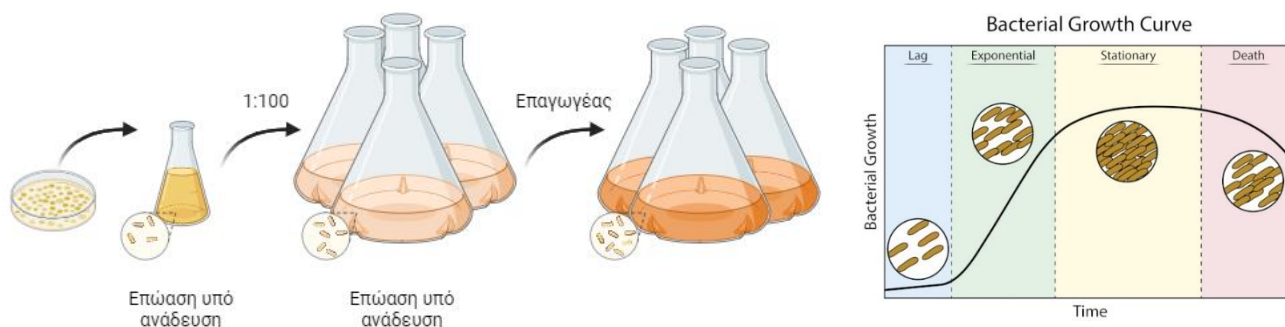
Η εισαγωγή εξωγενούς DNA σε βακτηριακά κύτταρα ονομάζεται μετασχηματισμός. Ο μετασχηματισμός βακτηρίων που γίνεται με χημική επεξεργασία, σε αντίθεση με τις μεθόδους βαλλιστικής με σωματίδια χρυσού και ηλεκτροδιάτρησης, είναι ο χημικός μετασχηματισμός. Κατά τον χημικό

μετασχηματισμό, δημιουργούνται δεκτικά κύτταρα (μπορούν να προσλάβουν εξωγενές DNA) ύστερα από κατεργασία με CaCl_2 . Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στη δημιουργία θερμικού σοκ με απότομες εναλλαγές τις θερμοκρασίας. Το εξωγενές DNA π.χ. ένα πλασμίδιο αρχικά προσκολλάται στη μεμβράνη λόγω του θετικού φορτίου του CaCl_2 , ενώ η βίαια εναλλαγή θερμοκρασίας καθιστά την μεμβράνη του κυττάρου ευάλωτη και παροδικά διαπερατή με αποτέλεσμα την είσοδο του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου στο βακτήριο. Στη συνέχεια αναπτύσσονται αποικίες σε καλλιέργεια και οι μετασχηματισμένοι κλώνοι επιλέγονται με προσθήκη αντιβιοτικού. (Ren et al., 2019)

3.2.1.2 Παραγωγή της πρωτεΐνης σε μεγάλη κλίμακα-επαγωγή της έκφρασης

Η υπερέκφραση της υπό μελέτη πρωτεΐνης είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την ύπαρξη διαθεσιμότητας της προκειμένου να μπορούν να γίνουν οι διάφορες μελέτες με αυτή. Αυτό πρακτικά σημαίνει ότι σε επίπεδο εργαστηρίου πρέπει να επιτευχθεί η μέγιστη δυνατή παραγωγή πρωτεΐνης. Επομένως πρέπει η μικρή μετασχηματισμένη αποικία που αποτελείται από λίγα κύτταρα που είναι σε θέση να παράγουν ικανοποιητική ποσότητα πρωτεΐνης, αφενός να πολλαπλασιαστούν και αφετέρου το καθένα από αυτά να παράγει την πρωτεΐνη στο μέγιστο δυνατό βαθμό.

Το πρώτο επιτυγχάνεται με τον κλιμακωτό τρόπο αύξησης του μεγέθους- όγκου της καλλιέργειας με τέτοιο τρόπο ώστε από μια αποικία να αυξηθεί το μέγεθος του συστήματός έκφρασης σε υγρές καλλιέργειες 4-6 λίτρων. Η δεύτερη συνθήκη επιτυγχάνεται με τον έλεγχο της αύξησης των βακτηρίων. Η



Εικόνα 10. . **Αριστερά)** Κλιμακωτή καλλιέργεια βακτηρίων από μια αποικία σε λίτρα, **Δεξιά)** Καμπύλη βακτηριακής αύξησης. Η βακτηριακή αύξηση διακρίνεται σε τέσσερις φάσεις: την φάση υστέρησης, την εκθετική φάση, την στατική φάση και την φάση θανάτου. Δημιουργήθηκε στο BioRender®

μέγιστη δυνατή παραγωγή πρωτεΐνης μπορεί να επιτευχθεί κατά το τέλος της εκθετικής φάσης ανάπτυξης των βακτηρίων, ακριβώς πριν η καλλιέργεια εισαχθεί στην στατική φάση ανάπτυξης. Η παρακολούθηση της οπτικής πυκνότητας της καλλιέργειας είναι αυτή που μπορεί να δώσει πληροφορίες σχετικά με την φάση ανάπτυξης.

Με το που εισέλθει στη φάση αυτή η καλλιέργεια, τότε μπορεί να γίνει η επαγωγή της έκφρασης. Στα περισσότερα συστήματα έκφρασης ο φορέας κλωνοποίησης φέρει οπερόνιο το οποίο έγκειται στον έλεγχο ενός επαγωγέα. Όταν δεν υπάρχει ο επαγωγέας τότε το οπερόνιο και το γονίδιο της πρωτεΐνης βρίσκεται υπό καταστολή και δεν εκφράζεται. Με την προσθήκη του επαγωγέα αίρεται η καταστολή, επιτυγχάνεται έτσι η υπερέκφραση του (Deshmukh et al., 2022).

3.2.2 Καθαρισμός και απομόνωση

Η απομόνωση και ο καθαρισμός μιας πρωτεΐνης είναι κομβικής σημασίας για την επιτυχή διεξαγωγή όλων των πειραμάτων. Το σύστημα έκφρασης που επιλέγεται κάθε φορά παράγει όλες τις πρωτεΐνες που παράγει και υπό φυσιολογικές συνθήκες. Αυτό πρακτικά σημαίνει ότι με την λύση των κυττάρων, βρίσκονται διαλυμένες πολλές χιλιάδες πρωτεΐνες συμπεριλαμβανομένης και της υπό ερευνάς πρωτεΐνης. Η πρωτεΐνη πρέπει να απομονωθεί επομένως και να καθαριστεί, ώστε το τελικό διάλυμα να αποτελείται αποκλειστικά από την πρωτεΐνη επιλογής. Για την απομόνωση των πρωτεϊνών χρησιμοποιείται η Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC), μεθοδολογία που επέτρεπε την επιτυχή απομόνωση χιλιάδων πρωτεϊνών.

Το πρώτο βήμα για τον καθαρισμό είναι η διάλυση των κυτταρικών μεμβρανών του συστήματος έκφρασης και η διαλυτοποίησή τους. Η λύση των κυττάρων γίνεται με την χρήση υπέρηχων. Στη συνέχεια ακολουθεί διαχωρισμός κλασμάτων με φυγοκέντρηση κατά την οποία απορρίπτεται το ίζημα (κυτταρικά οργανίδια, μεμβράνες) και συλλέγεται το υπερκείμενο λύμα (πρωτεΐνες).

Το δεύτερο βήμα είναι η διήθηση μέσω στήλης του λύματος. Η διήθηση αυτή γίνεται σε ειδικά διαμορφωμένες στήλες και ονομάζεται χρωματογραφία. Η χρωματογραφία έχει δύο φάσεις την στατική και

την κινητή. Ανάλογα με το είδος της κινητής φάσης η χρωματογραφία μπορεί να διακριθεί σε υγρή και αέρια. Η κινητή φάση είναι το πρωτεϊνικό λύμα, το οποίο διατρέχει την στατική φάση που είναι η στήλη. Η στατική φάση είναι κατά κανόνα ένα πορώδες ή κοκκώδες υλικό, τέτοιο που να επιτρέπει την ελεγχόμενη διέλευση μορίων. Ανάλογα την αλληλεπίδραση που έχει η κινητή φάση με τη σταθερή η οποία προκύπτει από τα βιοχημικά χαρακτηριστικά της πρωτεΐνης, ορίζονται τα διαφορετικά είδη χρωματογραφίας. Έτσι το πρωτεϊνικό διάλυμα διατρέχει την στήλη η οποία εν τέλει, ανάλογα το είδος της, διαχωρίζει τις πρωτεΐνες σε κλάσματα. Η κίνηση της κινητής φάσης στη FPLC γίνεται υπό πίεση και επομένως ταχύτερα από τον παλαιότερο τρόπο, που μόνο η βαρύτητα εξανάγκαζε σε κίνηση την κινητή φάση (Rodriguez et al., 2020).

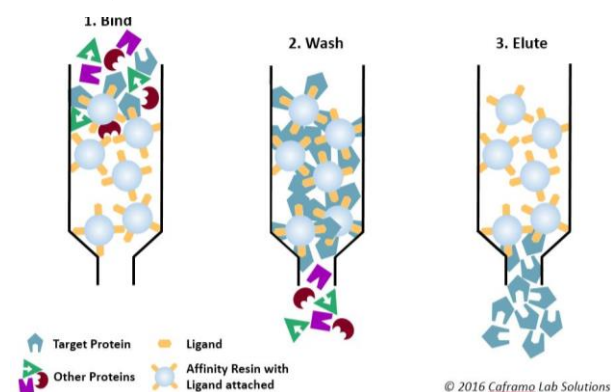
3.2.2.1 Χρωματογραφία συγγένειας

Η χρωματογραφία συγγένειας βασίζεται στη χημική συγγένεια ορισμένων πρωτεϊνών με κάποια άλλα μόρια και ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών γίνεται βάσει αυτής. Σε αυτή την περίπτωση χρωματογραφίας στο πορώδες υλικό της στατικής φάσης είναι προσαρτημένα τα μόρια του μορίου προσδέτη, ο οποίος εμφανίζει συγγένεια και δημιουργεί σύμπλοκα με μια συγκεκριμένη πρωτεΐνη. Όταν η κινητή φάση διαπερνά την στήλη, τότε τα μόρια που δεν εμφανίζουν συγγένεια με την στήλη, δηλαδή δεν δημιουργούν σύμπλοκα με τον προσδέτη, απορρίπτονται από την στήλη. Αντίθετα, μόρια με συγγένεια στον προσδέτη προσδένονται πάνω σε αυτή.

Σε πρώτη φάση κατά την προσθήκη του πρωτεϊνικού διαλύματος, απορρίπτονται αμέσως πρωτεΐνες που δεν εμφανίζουν καμία συγγένεια με την στήλη. Οι πρωτεΐνες αυτές συλλέγονται σε ένα κλάσμα που ονομάζεται Flow through. Ωστόσο, υπάρχουν πρωτεΐνες που δεν συνδέονται ειδικά με την στήλη, δεν αλληλεπιδρούν δηλαδή με τον προσδέτη, αλλά βρίσκονται προσδεδεμένες στην στήλη, άλλες αδύναμα και άλλες πιο σθεναρά, εξαιτίας μη ειδικών αλληλεπιδράσεων (ιοντικές, υδροφοβικές). Οι πρωτεΐνες αυτές απομακρύνονται με διαδοχικές πλύσεις της στήλης, συλλέγονται στο κλάσμα πλύσης (Wash). Το τελικό βήμα είναι η έκλουση των

πρωτεϊνών που προσδέθηκαν ειδικά στη στήλη και η συλλογή τους σε κλάσματα (Elution).

Η έκλουση διακρίνεται σε ειδική και σε μη ειδική. Στην ειδική σύνδεση, το διάλυμα έκλουσης διαταράσσει το σχηματισμένο σύμπλοκο είτε ανταγωνίζοντας τον προσδέτη είτε ανταγωνίζοντας την δεσμευμένη πρωτεΐνη. Σε κάθε περίπτωση απελευθερώνεται η πρωτεΐνη από την στήλη και τελικά συλλέγεται. Η έκλουση σε αυτή την περίπτωση εξαρτάται από την συγκέντρωση και τον όγκο του διαλύματος έκλουσης. Κατά την μη ειδική έκλουση, μεταβάλλονται οι συνθήκες του διαλύματος έκλουσης έτσι ώστε να τερματιστεί η σύνδεση της πρωτεΐνης στην στήλη. (Rodriguez et al., 2020; Urh et al., 2009)



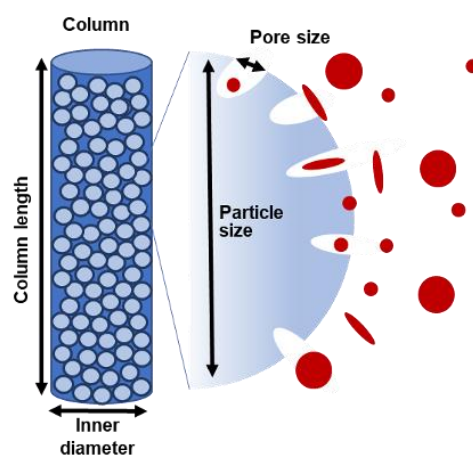
Εικόνα 11. . Γραφιστική απεικόνιση της χρωματογραφίας συγγένειας,

3.2.2.2 Χρωματογραφία μοριακής διήθησης

Η χρωματογραφία μοριακής διήθησης, γνωστή και ως χρωματογραφία πηκτής διήθησης, διαχωρίζει μόρια βάσει του μεγέθους τους. Η στατική φάση αποτελείται από πορώδεις σφαιρικούς κόκκους, μέσω των οποίων μπορούν να διεισδύσουν μικρότερα μόρια, ενώ τα μεγαλύτερα μόρια παρακάμπτουν τους πόρους και κινούνται ταχύτερα στη στήλη. Έτσι, τα μεγαλύτερα μόρια εκλύονται πρώτα, ενώ τα μικρότερα ακολουθούν αργότερα, καθώς έχουν καθυστερήσει από την είσοδό τους στους πόρους των κόκκων (Sepsey et al., 2014).

3.2.3 Ηλεκτροφόρηση υπό αποδιατακτικές συνθήκες

Η ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών υπό αποδιατακτικές συνθήκες είναι μια από τις κλασικότερες



Εικόνα 12. . Γραφιστική απεικόνιση της χρωματογραφίας μοριακής διήθησης Πηγή: uhlpcs.com

αναλυτικές δοκιμασίες στη βιοχημεία και αξιοποιείται για τον διαχωρισμό πρωτεϊνών με βάση το μοριακό μέγεθος. Η τεχνική είναι ευρέως γνωστή ως SDS-PAGE. Οι πρωτεΐνες κινούνται μέσω μιας γέλης-πήκτης, υπό την επίδραση ηλεκτρικού φορτίου. Οι αποδιατακτικές συνθήκες δημιουργούνται με την χρήση υψηλής θερμοκρασίας και απορρυπαντικού παράγοντα αναγωγικού SDS (sodium dodecyl sulfate). Το SDS παράλληλα προσδίδει σε όλες τις πρωτεΐνες αρνητικό φορτίο. Έτσι αλλοιώνεται η δομή των πρωτεϊνών και το φορτίο τους και μπορεί να επιτευχθεί ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών μόνο με βάση το μοριακό τους μέγεθος. Τα μεγαλύτερα μόρια διαπερνούν το πλέγμα της γέλης δυσκολότερα σε σύγκριση με τα μικρότερα. Εκεί έγκειται και η αναλυτική ιδιότητα της συγκεκριμένης μεθόδου.

Η πήκτη που χρησιμοποιείται αποτελείται από ένα πλέγμα πολυμερισμένων μορίων ακρυλαμίδης και διακρυλαμίδης. Η περιεκτικότητα των μορίων του πλέγματος σε ακρυλαμίδα ορίζει την διεισδυτικότητα της γέλης, με μεγαλύτερη περιεκτικότητα να σημαίνει συμπαγή γέλη, επομένως δύσκολη διέλευση για μεγάλα μόρια.

Παρασκευή πηκτής: Παρασκευάζεται ακρυλαμίδιο (συνήθως 10-15%) (συνήθως 4% ακρυλαμίδιο), που χύνεται ανάμεσα σε γυάλινες πλάκες με αποστάτες πάχους 0,75 mm ή 1,5 mm. Ο πολυμερισμός ξεκινά με την προσθήκη TEMED και APS, και διαρκεί από 15 λεπτά έως αρκετές ώρες. Με μια χτένα δημιουργούνται 10-15 για τη φόρτωση των δειγμάτων.

Προετοιμασία δειγμάτων: Οι πρωτεΐνες αναμειγνύονται με SDS και θερμαίνονται στους 95°C για 5 λεπτά για να αποδιαταχθούν. Η β-μερκαπτοαιθανολή δρα ως αναγωγικός παράγοντας. Γίνεται προσθήκη γλυκερόλης για την αύξηση της πυκνότητας του δείγματος (βοηθάει στη φόρτωση) και χρωστικής για την παρακολούθηση της πορείας της ηλεκτροφόρησης.

Ηλεκτροφόρηση: Η πηκτή τοποθετείται σε θάλαμο ηλεκτροφόρησης με ρυθμιστικό διάλυμα που λειτουργεί ως αγωγός του ηλεκτρικού πεδίου, και εφαρμόζεται τάση 100 V για 1-2 ώρες, επιτρέποντας τη μετακίνηση των πρωτεϊνών μέσω της πηκτής.

Χρώση πρωτεϊνών: Μετά την ηλεκτροφόρηση, η πηκτή χρωματίζεται με διάλυμα Coomassie blue για την οπτικοποίηση των πρωτεϊνών. (Roy et al., 2012)

3.2.4 Θερμιδομετρία Ισοθερμικής Τιτλοδότησης (ITC)

Η κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ είναι η μέθοδος που έδωσε φως στην απεικόνιση της αλληλεπίδρασης μικρομοριακών ενώσεων με πρωτεϊνικό μόριο. Παρόλο την μεγάλη συνεισφορά της στην κατανόηση των μηχανισμών της αλληλεπίδρασης και στην διαδικασία εύρεσης νέων φαρμάκων, οι εικόνες που λαμβάνονται με την χρήση κρυσταλλογραφίας ακτίνων Χ είναι στατικές, απεικόνισης της στιγμής μιας εκ των πολλών διαμορφώσεων που μπορεί να λαμβάνει η πρωτεΐνη (οι πρωτεΐνες είναι μόρια με πλαστικότητα και κινητικότητα). Επομένως οι πληροφορίες της κρυσταλλογραφίας ακτίνων Χ απαντούν στο ερώτημα πως αλληλοεπιδρούν τα δύο αυτά μέρη, αφήνοντας αναπάντητο το γιατί. Η απάντηση βρίσκεται στις ενεργειακές μεταβολές και στο θερμοδυναμικό προφίλ, που ερμηνεύουν αυτήν την αλληλεπίδραση. Η μέθοδος ITC, είναι σε θέση να προσδιορίσει θερμοδυναμικές σταθερές για την αντίδραση όπως είναι η μεταβολή ενθαλπίας, η σταθερά K, η μεταβολή της εντροπίας και η στοιχειομετρία μιας αντίδρασης (Krimmer & Klebe, 2015).

3.2.4.1 Βασικές θερμοδυναμικές έννοιες

Προκειμένου να κατανοηθεί η μεθοδολογία είναι απαραίτητο να γίνει αναφορά στις βασικές θερμοδυναμικές έννοιες.

Για ένα χημικό σύστημα σε ισορροπίας και σε συνθήκες πίεσης και θερμοκρασίας X (1 atm και 298 K=25°C) και συγκεντρώσεις αντιδρώντων 1 M, ισχύει η εξίσωση (1) $\Delta G = \text{ελεύθερη ενέργεια Gibbs}$, R=παγκόσμια σταθερά αερίων, T=θερμοκρασίας, K=σταθερά ισορροπίας.

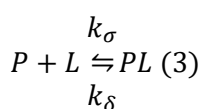
$$\Delta G^\circ = -RT \ln K \quad (1)$$

Από την εξίσωση (1) προκύπτει ότι η σταθερά ισορροπίας είναι αντιστρόφως ανάλογη με την μεταβολή της ενέργειας εναργείας. Η μεταβολή της ελεύθερης σε οποιαδήποτε συνθήκη, πέρα από τις πρότυπες, ορίζεται από την εξίσωση (2).

$$\Delta G = \Delta G^\circ + RT \ln Q \quad (2)$$

Στην εξίσωση αυτή το Q, είναι το κλάσμα $\frac{[P1][P2]}{[A1][A2]}$, όπου [Π] είναι η συγκέντρωση προϊόντων και [Α] η συγκέντρωση αντιδρώντων της χημικής αντίδρασης. Προκύπτει έτσι ότι όταν $Q = K$ μια αντίδραση πρόσδεσης βρίσκεται σε ισορροπία και $\Delta G = 0$.

Στη περίπτωση της χημικής αντίδρασης πρόσδεσης μιας μικρομοριακής ένωσης σε μια πρωτεΐνη η αντίδραση έχει ως εξής:



P=πρωτεΐνη, L=προσδέτης, PL=σύμπλοκο πρωτεΐνης-προσδέτη και k_σ η σταθερά της αντίδρασης προς τον σχηματισμό του συμπλόκου και k_δ η σταθερά της αντίδρασης διάσπασης του συμπλόκου με μονάδες $M^{-1} \cdot s^{-1}$ και s^{-1} αντίστοιχα. Σε κατάσταση ισορροπίας όσα μόρια προσδέτη προσδένονται στην πρωτεΐνη και σχηματίζουν σύμπλοκο, τόσα μόρια προσδέτη αποσυνδέονται. Επομένως η σταθερά ισορροπίας πρόσδεσης K_π είναι:

$$K_\pi = \frac{k_\sigma}{k_\delta} = \frac{[PL]}{[P][L]} = \frac{1}{Kd} \quad (4)$$

Και είναι αντίστροφη της σταθεράς αποδιάταξης K_D .

Η ΔG μπορεί επίσης να αναλυθεί στην ενθαλπική και εντροπική συνεισφορά της με την ακόλουθη θεμελιώδη εξίσωση:

$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ (5), ΔH = μεταβολή της ενθαλπίας και ΔS =μεταβολή της εντροπίας.

Η ενθαλπία αναφέρεται στην συνολική ενέργεια ενός θερμοδυναμικού συστήματος. Η μεταβολή της ενθαλπίας σε ότι αφορά το σύστημα πρόσδεσης πρωτεΐνης-προσδέτη είναι η ενεργειακή μεταβολή που επέρχεται στο σύστημα με την πρόσδεση εξαιτίας των νέων διαμοριακών δυνάμεων που αναπτύσσονται στην επιφάνεια διεπαφής (δεσμοί Wann der Walls, δεσμοί υδρογόνου, ιοντικές αλληλεπιδράσεις). Επίσης στην ενεργειακή μεταβολή, συνεισφέρουν οι αλλαγές στις διαμοριακές δυνάμεις της πρωτεΐνης με τον διαλύτη αλλά και του διαλύτη με αυτές του προσδέτη, οι οποίες ήταν διαφορετικές πριν και μετά την πρόσδεση. Η συνολική μεταβολή της ενθαλπίας της αντίδρασης είναι αποτέλεσμα της συνεισφοράς όλων αυτών των επί μέρους μεταβολών, και η μεταβολή αυτή μπορεί να είτε θετική είτε αρνητική. Η ΔH είναι αρνητική στις εξώθερμες (δηλαδή, σχηματισμός ενεργειακά ευνοϊκών μη-ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ ατόμων) και θετική στις ενδόθερμες (δηλαδή, διαταραχή των ενεργειακά ευνοϊκών μη-ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων) διεργασίες, αντίστοιχα.

Η εντροπία αποτελεί μέτρο της ομοιόμορφης κατανομής της θερμότητας σε ένα σύστημα. Σε μια άλλη έκφραση της εντροπίας, εντροπία μπορεί να χαρακτηριστεί ως μέτρο της αταξίας ενός συστήματος και των μερών του. Η μεταβολή της εντροπίας (ΔS) είναι μια συνολική θερμοδυναμική ιδιότητα ενός συστήματος, με τα θετικά και αρνητικά πρόσημά της να υποδηλώνουν τη συνολική αύξηση και μείωση της αταξίας του συστήματος.

$$\Delta S = \Delta S_{\text{solv}} + \Delta S_{\text{conf}} + \frac{\Delta S_r}{t} \quad (6)$$

ΔS_{solv} αντιπροσωπεύει τη μεταβολή της εντροπίας του διαλύτη. Η ΔS_{conf} αντιπροσωπεύει τη μεταβολή

της εντροπίας διαμόρφωσης, που οφείλεται στις αλλαγές στην ελευθερία διαμόρφωσης τόσο της πρωτεΐνης όσο και της ένωσης κατά την πρόσδεση. Το $\Delta S_r/t$ αντιπροσωπεύει την απώλεια ελευθερίας κινητικότητας της πρωτεΐνης και της ένωσης κατά το σχηματισμό του συμπλόκου. Προκειμένου να πραγματοποιηθεί η πρόσδεση, οι αντιδράσεις πρόσδεσης θα πρέπει να ξεπεράσουν τις εντροπικές ποινές. Εντροπικές ποινές είναι η αρνητική $\Delta S_r/t$ κατά τη σύνδεση, είτε μέσω μεγάλου κέρδους εντροπίας του διαλύτη (θετική ΔS_{solv}) είτε μέσω ευνοϊκών αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-ένωσης.

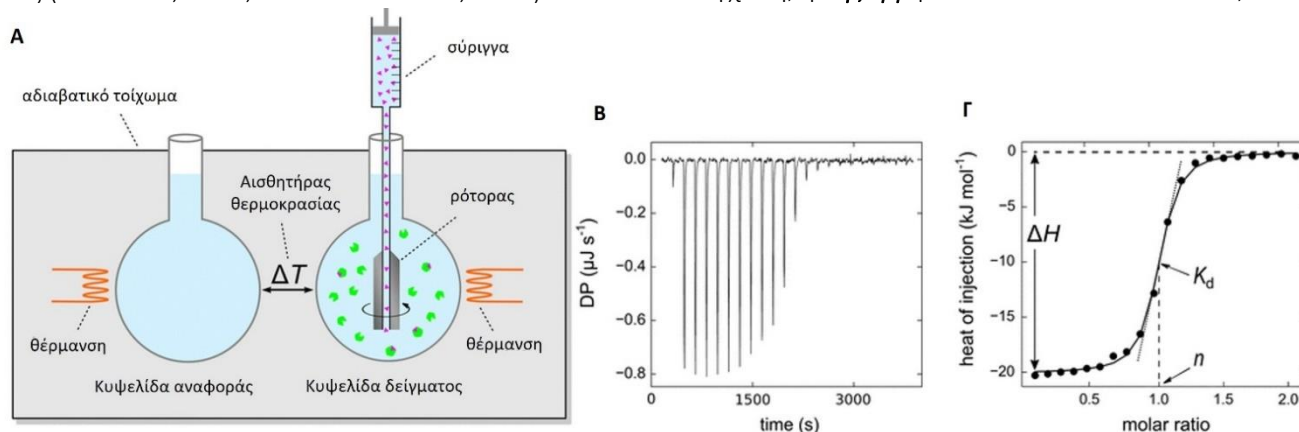
Σύμφωνα με τον δεύτερο νόμο της θερμοδυναμικής, για συστήματα που αντιδρούν σε σταθερή θερμοκρασία και πίεση, υπάρχει μια γενική φυσική τάση να επιτευχθεί ένα ελάχιστο της ελεύθερης ενέργειας Gibbs. Η διαφορά της ελεύθερης ενέργειας μεταξύ του συμπλόκου και της ελεύθερης πρωτεΐνης, δηλαδή η ελεύθερη ενέργεια πρόσδεσης, καθορίζει την σταθερότητα του συμπλόκου. Το αν και πόσο η μεταβολή αυτή θα είναι αρνητική (καθώς ευνοείται η ελάχιστη τιμή) εξαρτάται από παραμέτρους ΔH και ΔS , και με ποιον τρόπο συνεισφέρουν στην ΔG . Η συσχέτιση αυτών των θερμοδυναμικών παραμέτρων φαίνεται στην εξίσωση (5).

Για παράδειγμα, μια στενή πρόσδεση που είναι αποτέλεσμα πολλών μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων (Wann der Valls, δεσμοί υδρογόνου), έχει μεγάλη αρνητική τιμή στη συνιστώσα της ΔH . Αυτό συγχρόνως για την παράμετρο της εντροπίας σημαίνει αρνητική ΔS , ως αποτέλεσμα της μείωσης της κινητικότητας των μορίων (λόγω των μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων). Αυτό είναι το φαινόμενο της αντιστάθμισης της ενθαλπίας με την εντροπία που μπορεί να ισχύει και αντίστροφα. Επειδή η αντιστάθμιση ενθαλπίας-εντροπίας δεν οδηγεί σε δραματική μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας σύνδεσης, η διάκριση μεταξύ της συνιστώσας της εντροπίας και της συνιστώσας την ενθαλπίας στη συνεισφορά στην ελεύθερη ενέργεια πρόσδεσης είναι σημαντική στους τομείς του σχεδιασμού φαρμάκων. Η ιδανική στρατηγική βελτιστοποίησης είναι η μεγιστοποίηση της παραμέτρου ΔH και η

ελαχιστοποίηση της ΔS. (Du et al., 2016; Jelesarov & Bosshard, 1999)

3.2.4.2 Αρχή της μεθόδου ITC

Το πείραμα διεξάγεται σε σταθερή θερμοκρασία, με τιτλοδότηση του με τη χρήση σύριγγας διαλύματος L σε ένα διάλυμα P που είναι τοποθετημένο στην κυψελίδα του θερμιδομετρητή (Εικόνα 13). Μετά από κάθε προσθήκη μιας μικρής ποσότητας L, η θερμότητα που εκλύεται ή απορροφάται στη κυψελίδα μετρείται σε σχέση με ένα κύτταρο αναφοράς που είναι γεμάτο με ρυθμιστικό διάλυμα. Η μεταβολή της θερμότητας εκφράζεται ή ως ηλεκτρική ισχύς ($J s^{-1}$) που απαιτείται για τη διατήρηση μιας σταθερής μικρής διαφοράς θερμοκρασίας μεταξύ του κυττάρου δείγματος και του κυττάρου αναφοράς, τα οποία και τα δύο βρίσκονται σε αδιαβατικό περίβλημα. Τα περιεχόμενα του κυττάρου δείγματος αναδεύονται για να επιτευχθεί γρήγορη ανάμιξη των αντιδραστηρίων. Σε εμπορικά διαθέσιμα όργανα, οι όγκοι των κυττάρων δείγματος κυμαίνονται από 0,2–1,4 mL. Η ποσότητα του τιτλοδοτούμενου που απαιτείται ανά πείραμα εξαρτάται από το μέγεθος της μεταβολής της θερμότητας. 10–100 nmol πρωτεΐνης είναι συνήθεις ποσότητες. (Duff et al., 2011; Krimmer & Klebe, 2015)



Εικόνα 13. Α. Σε πρώτη φάση μέσω της σύριγγας εγχέεται ο προσδέτης και αμέσως ξεκινάει η αντίδραση με το διάλυμα πρωτεΐνης στην κυψελίδα. Παράλληλα υπάρχει η κυψελίδα αναφοράς, η οποία χρησιμεύει ως αναφορά για τη θερμοκρασία. Τα τοιχώματα είναι αδιαβατικά και επομένως δεν χάνεται θερμότητα, Η θερμοκρασία του συστήματος α μπορεί να μεταβληθεί μονάχα από τις θερμοδυναμικές μεταβολές που συνθέσαν λόγω της αντίδρασης. Μπορεί να αυξηθεί αν είναι εξώθερμη η αντίδραση, να μειωθεί αν είναι ενδόθερμη. Η διαφορά θερμότητας μεταξύ της κυψελίδας δείγματος και της κυψελίδας αναφοράς μπορεί να μετρηθεί μέσω της μέτρησης της διαφοράς θερμοκρασίας. Με το πέρας της κάθε έγχυσης - αντίδρασής (μετά από κάποια δευτερόλεπτα) μια ακόμη έγχυση πραγματοποιείται. Η θερμοκρασία μεταβάλλεται ξανά, μόνο που αυτή την φορά λιγότερο συγκριτικά με την προηγούμενη, καθώς τα σημεία πρόσδεσης της πρωτεΐνης έχουν μερικώς καταληφθεί. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται πολλές φορές μέχρι να υπάρχει διαφορά θερμότητας και επομένως οι συνολικές θέσεις πρόσδεσής των μορίων της πρωτεΐνης είναι κορεσμένες. Οι διαφορές αυτές καταγράφονται σε διάγραμμα ακατέργαστων δεδομένων όπως το Β, το οποίο μετασχηματίζεται μαθηματικά Γ, για την παρουσίαση των τελικών αποτελεσμάτων. (Krimmer & Klebe, 2015).

3.2.4.3 Υπολογισμοί για την εύρεση της K_D

Η Εικόνα 13 Β παρουσιάζει τα ακατέργαστα δεδομένα ενός πειράματος ITC. Τα πρωτογενή δεδομένα είναι η ηλεκτρική ισχύς που εφαρμόζεται στο κύτταρο δείγματος ως συνάρτηση του χρόνου και αποτελούνται από μια σειρά κορυφών που επιστρέφουν στη βασική γραμμή. Κάθε κορυφή αντιστοιχεί στη θερμότητα που εκλύεται με την προσθήκη μιας ποσότητας L στην κυψελίδα. Το ολοκλήρωμα του διαφορικού σήματος ισχύος σε σχέση με τον χρόνο (δηλαδή το εμβαδόν που περικλείεται από την κάθε κορυφή) δίνει τη φαινομενική μεταβολή της θερμότητας $\Delta q_{i,app}$, μεταξύ δύο διαδοχικών εγχύσεων προσδέτη (i-1 και i) $\Delta q_{i,app}$ είναι το εμβαδόν την εκάστοτε κορυφής του διαγράμματος.

$$\Delta q_i = \Delta q_{i-1} - \Delta q_i \quad (7)$$

Αν η σταθερά K (Εξίσωση 4) είναι μεγάλη και ο λόγος του L προς το M στην αρχή της τιτλοδότησης είναι χαμηλός, τότε ουσιαστικά όλη τα μόρια L είναι συνδεδεμένα με τον P. Αυτό εξηγεί το γεγονός ότι οι αρχικές κορυφές στην εικόνα 13 Β, είναι πανομοιότυπες. Καθώς αυξάνεται ο κορεσμός με κάθε έγχυση, η $\Delta q_{i,app}$ μειώνεται σταδιακά. Τελικά, όλες

οι θέσεις του P είναι κορεσμένες. Οι μικρές μεταβολές της θερμότητας που καταγράφονται μετά τον πλήρη κορεσμό οφείλονται στη θερμότητα λόγω αραίωσης του δείγματος από το διάλυμα $L \Delta q_i, dil$ ($dil=dilution$) και της μη ειδικές επιδράσεις $\Delta q_i, ns$ ($ns=non\ specific$), έτσι η διαφορά θερμότητας που οφείλεται αποκλειστικά στην πρόσδεση είναι η Δq_i . Να σημειωθεί ότι η επίσης ότι η $\Delta q_i, app$ είναι ανάλογη του όγκου της κυψελίδας και της συγκέντρωσης του προσδέτη. Με αυτά τα δεδομένα προκύπτουν οι μαθηματικές σχέσεις (8) και (9).

$$\Delta q_i = \Delta q_i, app - \Delta q_i, dil - \Delta q_i, ns = (8)$$

$$n \cdot [P]_{tot} \cdot V_{cell} \cdot \Delta H_{app} \cdot R \quad (9)$$

Όπου:

- $[P]_{tot}$ είναι η συνολική συγκέντρωση του P στη κυψελίδα
- Δq_i είναι η μεταβολή θερμότητας που προκαλείται από τον σχηματισμό του συμπλόκου PL.
- R είναι η ρίζα της δευτεροβάθμιας εξίσωσης που περιέχει την συνιστώσα του κορεσμού.
- Το V_{cell} είναι γνωστό και η ΔH_{app} είναι σταθερή σε συνθήκες σταθερής πίεσης, θερμοκρασίας και διαλυτή.

Αυτά τα στοιχεία είναι τα μετρήσιμα πειραματικά δεδομένα. Ο υπολογισμός των K, της στοιχειομετρίας των θέσεων σύνδεσης προκύπτουν από τον παράγοντα R της εξίσωσης (8). Το R είναι η τετραγωνική ρίζα της παρακάτω δευτεροβάθμιας εξίσωσης, η οποία υπολογίζει τον βαθμό κορεσμού:

$$Y_i^2 - Y_i + \frac{1}{nK_A[P]_{tot}} \left(\frac{[L]_{tot}}{n[P]_{tot}} \right) + \frac{[L]_{tot}}{n[P]_{tot}} \quad (10)$$

Όπου:

- Y_i είναι ο βαθμός κορεσμού.
- n είναι ο αριθμός των θέσεων δέσμευσης.
- K_A είναι η σταθερά σύνδεσης.
- $[P]_{tot}$ είναι η συνολική συγκέντρωση της πρωτεΐνης.
- $[L]_{tot}$ είναι η συνολική συγκέντρωση του προσδέτη

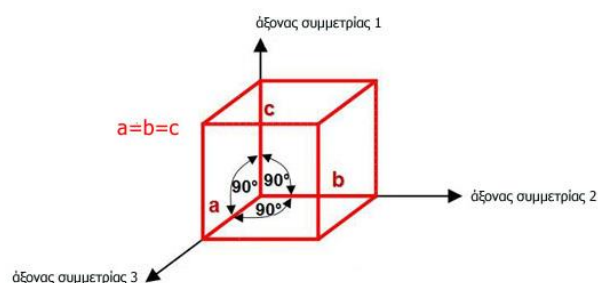
Τα ολοκληρωμένα δεδομένα μπορούν να απεικονιστούν με δύο τρόπους: ως σιγμοειδής καμπύλη (Εικόνα 13 Γ) ή ως υπερβολική καμπύλη κορεσμού. (Jelesarov & Bosshard, 1999).

3.2.5 Κρυσταλλογραφία ακτίνων X

3.2.5.1 Κρύσταλλος

Ο κρύσταλλος είναι μια φάση της στερεάς κατάστασης μια χημικής ένωσης. Το χαρακτηριστικό όλων των κρυστάλλων είναι η καθορισμένη συμμετρική δομή τους. Στη φύση υπάρχουν πολλές χημικές ενώσεις με την μορφή κρυστάλλων, κρυσταλλική ζάχαρη, αλάτι, διαμάντι. Σε κρυσταλλική μορφή συναντώνται και βιομόρια όπως είναι πρωτεΐνες και νουκλεϊκά οξέα.

Το βασικό χαρακτηριστικό των κρυστάλλων είναι η περιοδική διεύθυνση των ατόμων που αποτελούν τον κρύσταλλο σε τρεις διαστάσεις. Η διεύθυνση γίνεται με απλή μετάθεση, χωρίς δηλαδή την περιστροφή την επαναλαμβανόμενης ομάδας, στις τρεις διαστάσεις του χώρου. Η επαναλαμβανόμενη αυτή ομάδα, ονομάζεται στοιχειώδης κυψελίδα. Η στοιχειώδης κυψελίδα έχει σχήμα παραλληλόγραμμου, και είναι η ίδια σε διαστάσεις και σε γωνίες για τον εκάστοτε κρύσταλλο. Οι διαστάσεις της στοιχειώδους κυψελίδας, ορίζουν την συμμετρία του κρυστάλλου, καθώς ορίζουν τον τρόπο με τον οποίο θα διευθετούν τα μόρια του κρυστάλλου.



Εικόνα 14. Μια στοιχειώδη κυψελίδα σε κυβικό σχήμα με διαστάσεις a.b.c και ίσες γωνίες 90°

Πίνακας 5. Τα επτά κρυσταλλικά συστήματα και οι παράμετροί τους

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	$a \neq b \neq c$ 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 $\alpha \neq \beta \neq \gamma \neq 90^\circ$

Η στοιχειώδη κυψελίδα είναι ένα μαθηματικό χαρακτηριστικό του κρυστάλλου και δεν έχει να κάνει με την χημική σύσταση του κρυστάλλου. Σε μία στοιχειώδη κυψελίδα, δηλαδή μπορούν να βρισκονται περισσότερα από ένα μόρια της πρωτεΐνης. Προϋπόθεση είναι τα μόρια της στοιχειώδους κυψελίδας, να βρίσκονται στα όρια που ορίζουν οι διατάξεις της. Η στοιχειώδης κυψελίδα μπορεί να χωριστεί σε μια οντότητα η οποία δεν εμφανίζει καμία συμμετρία και ονομάζεται ασύμμετρη μονάδα (Γλυκός, 2015)(Evans, 2011).

3.2.5.2 Πρωτεϊνικός κρύσταλλος

Ένα πρωτεϊνικό διάλυμα κάτω από κατάλληλες και πολύ συγκεκριμένες συνθήκες μπορεί να κρυσταλλωθεί. Τα μόρια, δηλαδή, του διαλύματος να συνταχθούν ομοιόμορφα μεταξύ τους σε μια συμπαγή και ξεχωριστή δομή, τον πρωτεϊνικό κρύσταλλο. Η δημιουργία ενός πρωτεϊνικού κρυστάλλου, βασίζεται στην δημιουργία ενός υπέρκορου πρωτεϊνικού διαλύματος, δηλαδή ενός διαλύματος με συγκέντρωση πρωτεΐνης μεγαλύτερη της χωρητικότητας διάλυσης του διαλύτη. Σε αυτή την περίπτωση τα πρωτεϊνικά διαλύματα, πιθανότατα, θα κατακρημνιστούν, καθώς η περίσσεια των μορίων της αφού δεν μπορούν να διαλυθούν θα συσσωματωθούν ακανόνιστα. Στην περίπτωση που το υπέρκορο διάλυμα χειριστεί με τέτοιο τρόπο, ώστε να

απομακρυνθούν τα μόρια διαλύτη, επιτρέποντάς τα μόρια της πρωτεΐνης να δημιουργήσουν μια στερεή συντεταγμένη μάζα, τον κρύσταλλο. Κοντολογίς, η δημιουργία του κρυστάλλου γίνεται σε ένα στενό παράθυρο συνθηκών που ο αριθμός των μορίων της πρωτεΐνης θα είναι μεγαλύτερος από την δυνατότητα του διαλύτη να το διαλύσει, αλλά μικρότερος από τον αριθμό που θα τα κατακρημνίσει, προφανώς σε συνθήκες που η πρωτεΐνη δεν μετουσιώνεται.

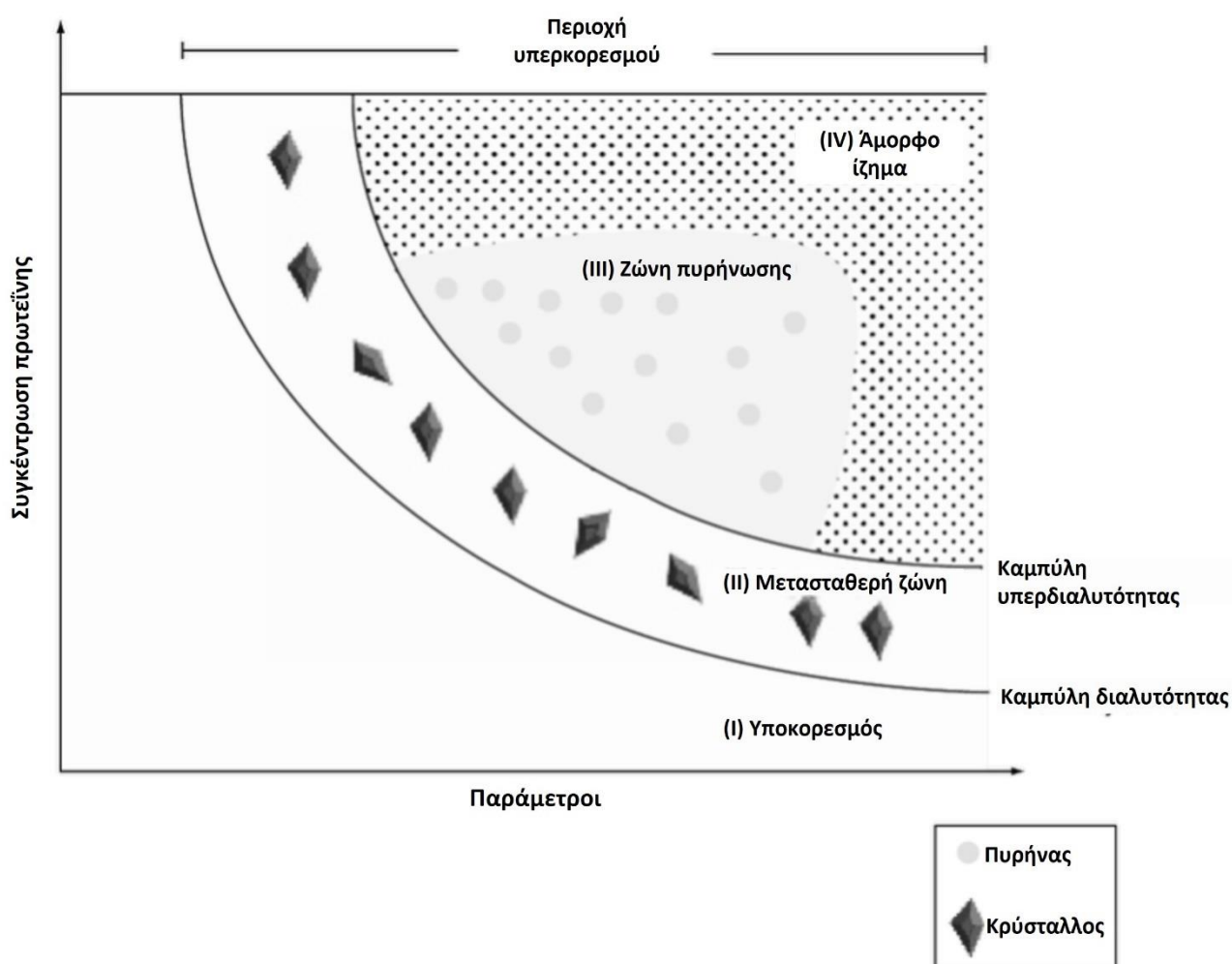
Η ανάπτυξη ενός πρωτεϊνικού κρυστάλλου εξαρτάται από τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης, την ιοντική ισχύ και το pH του ρυθμιστικού διαλύματος αλλά και από τη θερμοκρασία που θα αναπτυχθούν. Προκειμένου να επιτευχθεί η κρυστάλλωση χρησιμοποιούνται παράγοντες κρυσταλλώσεως και μόρια όπως η PEG και η γλυκερόλη. Στις κατάλληλες συνθήκες παράλληλη αύξηση της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης και της συγκέντρωσης των παραγόντων κρυστάλλωσης, οδηγούν στην μείωση των μορίων διαλυτού (νερού) στο περιβάλλον της πρωτεΐνης. Η αύξηση της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης με την ταυτόχρονη μείωση της συγκέντρωσης του διαλύτη, διαδικασία που ονομάζεται διάχυση ατμών, επιτυγχάνεται λόγω της τάσης ατμών μεταξύ της σταγόνας με την πρωτεΐνη και του βοθρίου με το διάλυμα κρυστάλλωσης. Την ποιότητα της κρυστάλλωσης καθορίζει η καθαρότητα του πρωτεϊνικού διαλύματος (>95%) καθώς και η δομική ομοιογένεια των πρωτεϊνικών μορίων του διαλύματος.

Όσον αφορά την κινητική της δημιουργίας των κρυστάλλων αυτή γίνεται σε δυο κρίσιμα βήματα: η πυρήνωση και η αύξηση του μεγέθους του κρυστάλλου, η μετασταθερή κατάσταση. Η πυρήνωση είναι το πλέον καθοριστικό βήμα, καθώς απαιτεί την δημιουργία του υπέρκορου διαλύματος το οποίο θα οδηγήσει τα πρώτα μόρια να διαταχθούν σε μορφή κρυσταλλικού πλέγματος, δημιουργώντας ένα πυρήνα. Δημιουργούνται οι πρώτοι υποτυπώδεις μικροί κρύσταλλοι, οι οποίοι δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε ένα πείραμα περίθλασης ακτίνων Χ. Ωστόσο, η δημιουργία ενός υπέρκορου διαλύματος θα οδηγήσει στο σχηματισμό πολλών πυρήνων,

κάτι το οποίο θα οδηγήσει σε δέσμευση των μορίων της πρωτεΐνης που υπάρχουν στο διάλυμα ώστε να δημιουργηθούν πολλοί μικροί κρύσταλλοι, αντί για ένα κρύσταλλο που μπορεί να αξιοποιηθεί στα πειράματα περίθλασης ακτίνων Χ. Η αποφυγή αυτό του φαινομένου, γίνεται με την επιλογή της κατάλληλης συνθήκης κρυστάλλωσης καθιστώντας την διαδικασία εύρεσης της συνθήκης κρυστάλλωσης απαιτητική διαδικασία. Παρόλο αυτά είναι απαραίτητο ένας κρύσταλλος να κρυσταλλώνεται μόνο σε μια συνθήκη ή μόνο με μια μεθοδολογία. (Γλυκός, 2015)(McPherson & Gavira, 2014)

3.2.5.3 Η πειραματική διάταξη

Μια πηγή ακτινοβολίας Χ εκπέμπει μια δέσμη παράλληλης και μονοχρωματικής ακτινοβολίας Χ προς τον υπό μελέτη κρύσταλλο. Ο κρύσταλλος είναι τοποθετημένος σε κατασκευή που ονομάζεται γωνιόμετρο, καθώς ορίζει κάθε φορά την γωνία περιστροφής, περιστρέφοντας τον κρύσταλλο. Στο τέλος της πειραματικής διάταξης βρίσκεται ένα ανιχνευτής, που συλλεγεί τα δεδομένα περίθλασης των ακτίνων. Μεταξύ του ανιχνευτή και του κρυστάλλου, παρεμβάλλεται ακίδα μόλυβδου (beamstop) που απορροφά την πλειονότητα της της εξερχόμενης από τον κρύσταλλο ακτινοβολία, βοηθώντας στην τελική ευκρίνεια των κρυσταλλογραφικών δεδομένων. (Γλυκός, 2015)



Εικόνα 15. Διάγραμμα φάσεων για την δημιουργία κρυστάλλου με βάση τις παραμέτρους και την συγκέντρωση της πρωτεΐνης. Το καθοριστικό θήμα είναι ο συνδιασμός συγκέντρωσης και των άλλων παραμέτρων να είναι τέτοιος που να οδηγήσουν τις πρωτεΐνες στη φάση της πυρήνωσης III. Μετά την φάση της πυρήνωσης οι συνθήκες πρέπει να μεταβληθούν προς την μετασταθερή φάση II για την δημιουργία μονοκρυστάλλων. Σε κάθε περίπτωση πρέπει να αποφευχθεί η κατακρήμνιση IV και η παραμονή της πρωτεΐνης σε συνθήκες διαλυτότητας I. Η εικόνα βασίστηκε στο άρθρο (Angkawinitwong et al., 2015).

3.2.5.4 Το κρυσταλλογραφικό πείραμα

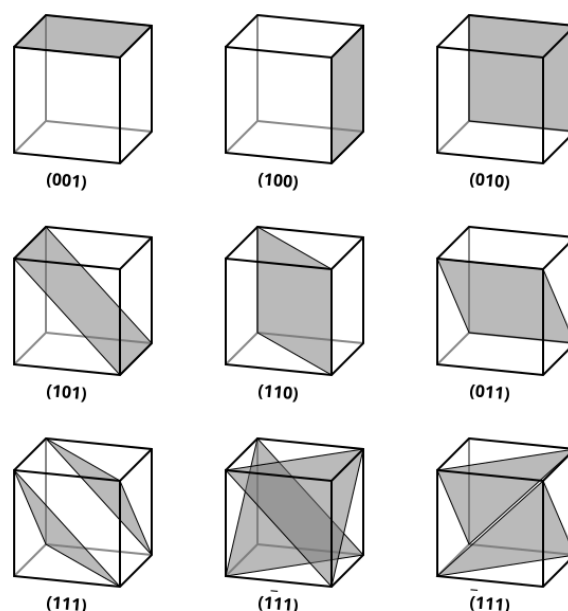
Σκοπός της κρυσταλλογραφίας Χ είναι η εύρεση της τρισδιάστατης δομής πρωτεϊνών σε ατομική διακριτικότητα. Η μέγιστη δυνατή διακριτικότητα που μπορεί να καταγραφεί το είδωλο ενός αντικειμένου εξαρτάται από το μήκος κύματος της ακτινοβολίας που χρησιμοποιήθηκε. Ένα άτομο υδρογόνου έχει διάμετρο $1,06 \text{ \AA}$ (10^{-10} m), συνεπώς η κατάλληλη ακτινοβολία είναι οι ακτίνες Χ με μήκος κύματος 10^{-11} m - 10^{-8} m . Η προσπίπτουσα ακτινοβολία Χ στον κρύσταλλο εξαναγκάζει τα ηλεκτρόνια (ως φορτισμένα σωματίδια με μικρό βάρος) της επιφάνειας κάθε πρωτεϊνικού μορίου σε ταλάντωση. Η εξαναγκασμένη ταλάντωση των ηλεκτρονίων, καθιστά τα ηλεκτρόνια ως δευτερογενή πομπό ακτινοβολίας, με τα ίδια χαρακτηριστικά της προσπίπτουσας. Η συμβολή των επιμέρους ακτινοβολιών από κάθε ταλαντούμενο ηλεκτρόνιο, δημιουργεί το κύμα ακτινοβολίας που θα εκπέμψει ο κρύσταλλος. Ο κρύσταλλος είναι κομβικής σημασίας για την επιτυχία του πειράματος, καθώς σταθεροποιεί την πρωτεΐνη σε μια θέση στο χώρο, δίνει την δυνατότητα περιστροφής για την συλλογή πολλών δεδομένων και λόγω της περιοδικότητάς του, ενισχύει το σήμα της εξερχόμενης ακτινοβολίας.

Τα κύματα που εξέρχονται από τον κρύσταλλο, ονομάζονται περιθλάσεις, καθώς περιθλώνται και καταγράφονται ως στίγματα πάνω σε ένα ανιχνευτή. Η θέση της ανάκλασης, δίνει πληροφορίες για την διεύθυνση διάδοσης του κύματος, ενώ η ένταση της αντιστοιχεί στο πλάτος του κύματος. Η δισδιάστατη απεικόνιση του ανακλάσεων, ονομάζεται περιθλασίγραμμα. Σε ένα πείραμα κρυσταλλογραφίας, καθώς επιδιώκεται η εύρεση τρισδιάστατης δομής, συλλέγονται χιλιάδες τέτοιες δισδιάστατες περιθλάσεις που συλλέχθηκαν καθώς ο κρύσταλλος περιστρέφεται. Έτσι από μια δισδιάστατη εικόνα μπορεί να δημιουργηθεί ένα τρισδιάστατο είδωλο. (Γλυκός, 2015) (Maveyraud & Mourey, 2020b; McPherson & Gavira, 2014)

3.2.5.5 Βασικές κρυσταλλογραφικές έννοιες

Δείκτες Miller

Όπως αναφέρθηκε η διεύθυνση του κύματος μπορεί προσδιοριστεί από την θέση της ανάκλασης στο περιθλασίγραμμα. Ο προσδιορισμός αυτός γίνεται με την απόδοση στη θέση αυτές χωρικών συντεταγμένων που ορίζεται από ένα σύστημα αναφοράς με άξονες a^* , b^* , c^* . Οι άξονες αυτοί για κάθε φάσμα περιθλάσεως ορίζουν ως συντεταγμένες ακέραιους αριθμούς οι είναι οι δείκτες Miller hkl (h για τον a^* , k για τον b^* , l για τον c^*). Ο κάθε δείκτης Miller, είναι σταθερός και αντιπροσωπευτικός για κάθε κρυσταλλογραφικό επίπεδο.



Εικόνα 16. Γραφική αναπαράσταση των δεικτών Miller. Τα σκιαγραφημένα επίπεδα ορίζουν ένα επίπεδο και μια διεύθυνση Miller hkl όπου κάθε αριθμός αντιστοιχεί σε μια τιμή των h, k, l αντίστοιχα.

Νόμος Bragg

Η διεύθυνση των περιθλώμενων από τον κρύσταλλο κυμάτων καθορίζεται από τις διαστάσεις της στοιχειώδους κυψελίδας και είναι το αποτέλεσμα συνεισφοράς όλων των ταλαντούμενων ηλεκτρονίων του κρυστάλλου. Η μαθητική έκφραση αυτής της φράσης περιγράφεται με τον νόμο του Bragg

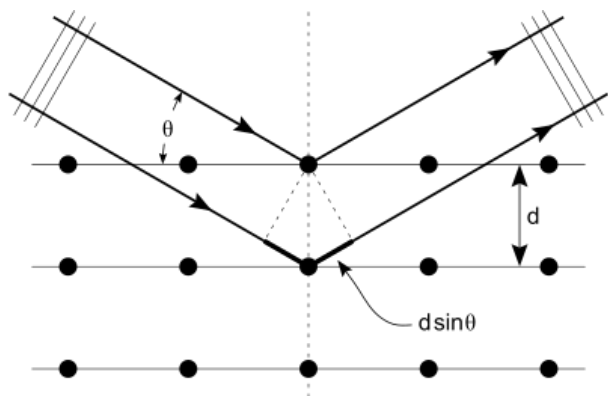
$$d \cdot \sin(2\theta) = n \cdot \lambda$$

Όπου

- d = η απόσταση μεταξύ δύο διαδοχικών κρυσταλλικών επιπέδων

- 2θ = η γωνία της προσπίπτουσας ακτινοβολίας
- n = οποιοσδήποτε ακέραιος αριθμός
- λ = το μήκος κύματος.

Αυτή είναι συνθήκη για την συμβολή (θετική ή αρνητική) όλων των κυμάτων που σε μία διεύθυνση hkl και ορίζει την διεύθυνση διάδοσης του κύματος. Τα χαρακτηριστικά του κύματος, πλάτος και φάση ορίζονται από την σύσταση του κρυστάλλου και την δομή της πρωτεΐνης.



Εικόνα 17. Ο νόμος του Bragg. Κάθε κρυσταλλικό επίπεδο είναι οι διαδοχικές τελείες της ίδιας ευθείας.

Ο παράγοντας δομής

Ο παράγοντας δομής αποτελεί το διανυσματικό μέγεθος που περιγράφει όλες τις ιδιότητες του κάθε περιθλώμενου από τον κρύσταλλο κύματος. Ο παράγοντας δομής περιγράφει με πληρότητα το κύμα περίθλασης τόσο στο πλάτος όσο και στη φάση που βρίσκεται σε μια συγκεκριμένη διεύθυνση hkl (το μήκος είναι ίσο με αυτό της προσπίπτουσας ακτινοβολίας). Η εύρεση του παράγοντα δομής είναι αυτή που θα οδηγήσει στην τελική επίλυση της δομής του κρυστάλλου.

Προσδιορισμός της φάσης

Ο προσδιορισμός της φάσης είναι απαραίτητος για την πλήρη ανασύσταση των κυμάτων και τον προσδιορισμό του ειδώλου. Ο άμεσος πειραματικός προσδιορισμός της φάσης δεν είναι δυνατός με την χρήση της υπάρχουσας τεχνολογίας, καθώς δεν υπάρχουν πειραματικές διατάξεις που μπορούν να ανιχνεύσουν τον ταχύ ρυθμό αλλαγής των φάσεων σε τέτοια μήκη κύματος. Για τον προσδιορισμό της φάσης χρησιμοποιούνται έμμεσες μεθοδολογίες,

που διαφέρουν ανάλογα με τις απαιτήσεις του εκάστοτε πειράματος

Μοριακή αντικατάσταση: Σε περιπτώσεις που υπάρχουν ενδείξεις για μεγάλο βαθμό ομοιότητας της υπό μελέτη πρωτεΐνης με μια προ-υπάρχουσα γνωστή δομή, μπορούν να γίνουν προσεγγίσεις για την εύρεση της φάσης και βάση αυτών βελτιστοποίηση.

Ισόμορφη αντικατάσταση με βαρέα μέταλλα: Η φάση υπολογίζεται έμμεσα με τον προσδιορισμό βαρέων μετάλλων που έχουν προστεθεί στην πρωτεΐνη. Η εύρεση της φάσης ενός βαρέου μετάλλου είναι κατά πολύ ευκολότερη διαδικασία

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. (Γλυκός, 2015).

Σύνθεση Fourier

Με βάση τα χαρακτηριστικά του κύματος που περιθλάται, μπορεί να υπολογιστεί το είδωλο του μορίου του κρυστάλλου. Ένας πρωτεϊνικός κρύσταλλος αποτελεί μία περιοδική συνάρτηση, η οποία μπορεί να αναλυθεί σε απλά κύματα όταν ο κρύσταλλος εκτεθεί σε ακτίνες-Χ. Μέσω της σύνθεσης Fourier, τα δεδομένα του περιθλασιγράμματος μπορούν να οδηγήσουν στην ανασύσταση του ειδώλου της πρωτεΐνης. Ο πομπός των κυμάτων είναι τα ταλαντούμενα ηλεκτρόνια επομένως η σύνθεση Fourier δείχνει την κατανομή της πυκνότητας των ηλεκτρονίων ως συνάρτηση της θέσης x,y,z εντός στη στοιχειώδη κυψελίδα (συνάρτηση ηλεκτρονικής πυκνότητας $\rho(x,y,z)$). Ένας παράγοντας δομής F_{hkl} περιγράφεται ως το άθροισμα των ηλεκτρονικών πυκνοτήτων στον όγκο της στοιχειώδους κυψελίδας (Γλυκός, 2015).

3.3.1.3 Μετασχηματισμός *E.Coli BL21Gold* με το γονίδιο της γαλεκτίνης -7

Το γονίδιο που έχει κλωνοποιηθεί πρέπει να εκφραστεί σε ένα σύστημα έκφρασης. Για τον σκοπό αυτό επιλέχθηκε το βακτηριακό στέλεχος BL21Gold *E.Coli*, που από τη βιβλιογραφία φαίνεται ότι εκφράζει επιτυχώς τη γαλεκτίνη-7. Για την εισαγωγή του πλασμιδίου στα βακτήρια (μετασχηματισμός), ακολουθήθηκε χημικός μετασχηματισμός. Ο μετασχηματισμός των βακτηρίων έγινε σε δεκτικά κύτταρα BL21Gold, υστέρα από κατεργασία με 0,1 M CaCl_2 . Το πλασμίδιο επωάζεται μαζί το βακτήριο, σε αναλογία 1-2 ng ανά 1 μL βακτηριακού διαλύματος (1 μL πλασμίδιο σε 100 μL βακτηριακών κυττάρων), στον πάγο για 30 λεπτά. Αμέσως μετά ακολουθεί επώαση για 45 δευτερόλεπτα σε 42 °C και άμεση επαναφορά στον πάγο για 2 λεπτά. Ακολουθεί η προσθήκη 900 μL θρεπτικού υλικού SOC και επώαση των βακτηρίων στους 37° C υπό ανάδευση σε 210 rpm για 1 ώρα, έτσι ώστε τα μετασχηματισμένα βακτήρια να αναπτυχθούν.

Με το πέρας της επώασης, επιστρώνονται 75 μL βακτηρίων, σε τριβλίο με στερεό αποστειρωμένο θρεπτικό LB άγαρ. Στο LB άγαρ, έχει προστεθεί αμπικιλίνη (Amp) σε συγκέντρωση 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Κατά αυτόν τρόπο γίνεται η επιλογή από τα μη μετασχηματισμένα βακτήρια, καθώς αυτά δεν αναπτύσσονται λόγω έλλειψης του πλασμιδίου που φέρει ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη. Το τριβλίο Petri μπαίνει σε επωαστικό θάλαμο στους 37° C για 16 ώρες, όπου και σχηματίζονται διακριτές ορατές αποικίες.

3.3.1.4 Παραγωγή και υπερέκφραση της γαλεκτίνης -7

Στο επόμενο στάδιο μια αποικία εμβολιάστηκε σε αποστειρωμένο θρεπτικό υγρό (LB) όγκου 100 mL και επωάστηκε στους 37°C υπό ανάδευση 210 rpm, για 16 ώρες με προσθήκη αντιβιοτικού για την αποφυγή επιμολύνσεων. Στη συνέχεια εμβολιάζονται 10 mL καλλιέργειας σε 1 LT (1:100) αποστειρωμένου θρεπτικού LB. Συνολικά δημιουργούνται 4 L υγρής καλλιέργειας που αναπτύσσονται στους 37°C, 210 rpm παρουσία του αντιβιοτικού Amp σε συγκέντρωση 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Η ανάπτυξη των βακτηρίων είναι υπό παρακολούθηση μέχρι να φτάσει η οπτική πυκνότητα στα 600 nm σε τιμές 0,6-0,7. Στο σημείο αυτό γίνεται άμεσα τερματισμός της ανάπτυξης μέσω επώασής τους στον πάγο. Μετά την

επαγωγή γίνεται προσθήκη IPTG 0,5 mM και επώαση της καλλιέργειας στους 18°C, 210 rpm για 16 ώρες. Ακολούθησε συλλογή των βακτηριακών κυττάρων (pellet) μέσω φυγοκέντρησης στους 4 °C, 6000 rpm, 15 λεπτά.

3.3.1.1 Παρασκευή ρυθμιστικών διαλυμάτων

Παρασκευάστηκαν τρία ρυθμιστικά διαλύματα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν σε διαφορετικά σημεία κατά την πειραματική διαδικασία. Και τα τρία ρυθμιστικά διαλύματα είναι υδατοδιαλυτά, έχουν φιλτραριστεί με αποστειρωμένα διηθητικά φίλτρα 0,45 μm . Τέλος σε όλα τα διαλύματα έχει γίνει απαέρωση με χρήση του SonicBath για 1 ώρα.

Πίνακας 6. Χημική σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος Buffer A

MEPBS/Buffer A, pH=7,4	
Χημική ένωση	Τελική συγκέντρωση
EDTA	2 mM
NaCl	137 mM
KCl	2,7 mM
Na_2HPO_4	10 mM
KH_2PO_4	1,8 mM
b-mercaptoethanol	4 mM

Πίνακας 7. Χημική σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος Buffer B

MEPBS/Buffer A, pH=7,4	
Χημική ένωση	Τελική συγκέντρωση
EDTA	2 mM
NaCl	137 mM
KCl	2,7 mM
Na_2HPO_4	10 mM
KH_2PO_4	1,8 mM
b-mercaptoethanol	4 mM
Lactose	150 mM

Πίνακας 8. Χημική σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος Dialysis.

Dialysis Buffer, pH=8	
Χημική ένωση	Τελική συγκέντρωση
TrisHCl	50 mM
NaCl	0,3 M

3.3.2 Καθαρισμός και απομόνωση της γαλεκτίνης-7

3.3.2.1 Λύση κυττάρων

Η λύση των βακτηρίων που συλλέχθηκαν ως ίζημα, γίνεται σε 40 ml ρυθμιστικού διαλύματος ΜΕΡΒS pH=7,4 παρουσία αναστολέα πρωτεασών. Η λύση έγινε με την χρήση υπερήχων σε 70% ένταση, 5 κύκλους (κύκλος: 30 sec υπέρηχοι-30 sec παύση) στους 4^ο C. Ακολούθησε προσθήκη *Benzonase[®] Nuclease* (αποικοδομεί νουκλεϊκά οξέα) για 10 λεπτά στον πάγο υπό τακτή ανακίνηση (2 min). Για τον διαχωρισμό του πρωτεϊνικού κλάσματος που είναι διαλυτό, το λύμα φυγοκεντρείται σε 18.000 rpm, 45 λεπτά στους 4^ο C. Το υπερκείμενο συλλέγεται και φιλτράρεται με φίλτρο 0,45 μm.

3.3.2.2 Χρωματογραφία συγγένειας λακτόζης

Χρησιμοποιήθηκε η στήλη Lactose Sepharose 6B με όγκο στήλης 80 mL, που είχε παρασκευαστεί από μέλος τους εργαστηρίου ΔΛΒ. Η χρωματογραφία πραγματοποιήθηκε μέσω του συστήματος AKTA-FPLC της GE HealthCare Technologies. Η χρωματογραφία βασίστηκε στην συγγένεια που παρουσιάζει η γαλεκτίνη-7 με β-γαλακτόζιτες, όπως η λακτόζη. Η στατική φάση της στήλης έχει μόρια λακτόζης, ενώ η έκλουση της στήλης γίνεται με προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος με υψηλή συγκέντρωση λακτόζης, τέτοια που ανταγωνίζεται την πρόσδεση της γαλεκτίνης-7 στην στήλη.

Σε πρώτη φάση η στήλη εξισορροπήθηκε με το διάλυμα Buffer A για 4 όγκους στήλης. Το πρωτεϊνικό λύμα προστέθηκε στη στήλη με ροή 0,4 mL/min και έγινε συλλογή κλασμάτων των 4 mL (Flow through). Η πλύση της στήλης έγινε με Buffer A σε ροή 1 mL/min και συλλογή κλασμάτων ανά 4 mL (Wash). Η έκλουση της στήλης έγινε με Buffer B (περιέχει υψηλή συγκέντρωση λακτόζης) και ροή 1 mL/min με ταυτόχρονη συλλογή κλασμάτων των 4 mL (Elution). Η παρακολούθηση της πορείας της χρωματογραφίας έγινε μέσω του χρωματογραφήματος, ενώ έγινε επαλήθευση και επιβεβαίωση των κλασμάτων που περιέχουν την πρωτεΐνη με ηλεκτροφόρηση υπό αποδιατακτικές συνθήκες σε πηκτή πολύ-ακρυλαμίδης (SDS-PAGE).

3.3.2.3 Χρωματογραφία μοριακής διήθησης

Τα κλάσματα που έφεραν την πρωτεΐνη συλλέχθηκαν και υποβλήθηκαν σε εκτεταμένη διαπίδυση. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε μεμβράνη διαπίδυσης με πόρους που αποτρέπουν πρωτεΐνες μεγαλύτερες από 3 kDa. Χρησιμοποιήθηκε το διάλυμα διαπίδυσης Dialysis Buffer. Τέλος, ακολούθησε συμπύκνωση του διαλύματος με φίλτρα συμπύκνωσης 3 kDa σε φυγόκεντρο σε 4.000 rpm, 15 λεπτά, 9^ο C σε τελικό όγκο 3 mL.

Για την χρωματογραφία μοριακής διήθησης χρησιμοποιήθηκε η στήλη Superdex 75 με το σύστημα AKTA-FPLC της GE HealthCare Technologies. Έγινε εξισορρόπηση της στήλης με το Dialysis Buffer με έναν όγκο στήλης. Προστέθηκε στην στήλη το δείγμα με ροή 0,4 mL/min και συλλέχθηκαν κλάσματα των 4 mL. Η παρακολούθηση της πορείας της χρωματογραφίας έγινε μέσω του χρωματογραφήματος, ενώ έγινε επαλήθευση και επιβεβαίωση των κλασμάτων που περιέχουν την πρωτεΐνη με ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτικές συνθήκες σε πηκτή πολύ-ακρυλαμίδης (SDS-PAGE). Τέλος ακολούθησε συμπύκνωση του διαλύματος με φίλτρα συμπύκνωσης 3 kDa σε φυγόκεντρο στα 4.000 rpm, 15 λεπτά, 9^οC σε τελική συγκέντρωση 10 mg/mL που μετρήθηκε με την χρήση Nanodrop[®]. Η γαλεκτίνη-7 αποθηκεύτηκε στους -80^ο C για μετέπειτα χρήση αυτής τόσο σε κινητικά θερμοδυναμικά όσο και κρυσταλλογραφικά πειράματα.

3.3.3 Ηλεκτροφόρηση γαλεκτίνης-7 υπό αποδιατακτικές συνθήκες

3.3.3.1 Προετοιμασία πηκτής 15% ακρυλαμίδης

Για τον διαχωρισμό της πρωτεΐνης κατά την ηλεκτροφόρηση, επιλέχθηκε πηκτή ακρυλαμίδης 15%. Η πηκτή αυτή είναι συμπαγής με πόρους μικρής διαμέτρου. Η επιλογή αυτή έχει να κάνει με το μικρό μοριακό μέγεθος της γαλεκτίνης-7 που είναι 15 kDa (Πίνακας 9). Η πηκτή αποτελείται από το Running (15 %) μέρος, στο οποίο γίνεται ο διαχωρισμός και από το Stacking (5%) οπότε στοιβάζονται αρχικά όλες οι πρωτεΐνες. Η προετοιμασία της πηκτής έγινε με βάση το πρωτόκολλο στο Πίνακα 10. (Dumut et al., 2022). Δημιουργήθηκαν πηκτές πάχους 1mm με 15 θέσεις φόρτωσης.

Πίνακας 9. Επιλογή διαχωριστικής πηκτής ανάλογα με το μέγεθος της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος.

Μοριακό Βάρος (kDa)	Περιεκτικότητα (%)
15-460	8
10-250	10
5-75	15

Πίνακας 10. Πρωτόκολλο προετοιμασίας πηκτής 15% running + stacking 5%, όπως επεξεργάστηκε από τον Harlow (1999).

	Running	Stacking
Όγκος πηκτής Αντιδραστήρια	10 ml	5 ml
νερό	2.3 ml	3.4 ml
30% acrylamide mix	5.0 ml	830 µl
1.5 M Tris, pH 8.8	2.5 ml	-
1.5 M Tris, pH 6.8	-	630 µl
10% SDS	100 µl	50 µl
10% APS	100 µl	50 µl
TEMED	4 µl	5 µl

3.3.3.2 Προετοιμασία δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση

Στα δείγματα προστίθεται διάλυμα φόρτωσης με που περιέχει SDS, β-μερκαπτοαιθανόλη, γλυκερόλη και τη χρωστική μπλε της βρωμοθυμόλης, ενώ ακολουθήσε θέρμανση στους 95°C για 5 λεπτά.

3.3.3.3 Ηλεκτροφόρηση

Για την ηλεκτροφόρηση παρασκευάστηκε διάλυμα Tris-Glycine-SDS ((28 mM Tris, 192 mM γλυκίνη και 0,1% SDS). Η τάση ρυθμίστηκε στα 120 V και η ηλεκτροφόρηση διήρκεσε περίπου 1 ώρα.

3.3.3.4 Χρώση πηκτής

Η πηκτή θερμαίνεται σε διάλυμα οξικού οξέος 10% v/v για 1 λεπτό, αφαιρείται το οξικό και προστίθεται διάλυμα χρώσης Coomassie Blue, με επαναλαμβανόμενη θέρμανση και ανάδευση για 15 λεπτά. Στη συνέχεια, το διάλυμα χρώσης αφαιρείται, προστίθεται οξικό οξύ με σκοπό τον αποχρωματισμό και την παρατήρηση των ζωνών σε σύγκριση με μάρτυρα γνωστών μοριακών βαρών.

3.3.4 Κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ στην γαλεκτίνη-7

3.3.4.1 Ανάπτυξη κρυστάλλων γαλεκτίνης -7

Για την γαλεκτίνη-7 έχουν καθοριστεί, από προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας, οι συνθήκες κρυστάλλωσης. Χρησιμοποιήθηκαν δύο συνθήκες κρυστάλλωσης, οι οποίες προσδιορίστηκαν στην διδακτορική διατριβή της Δρ. Α. Τσαγκαράκου. Οι κρύσταλλοι αναπτύχθηκαν σε θερμοκρασία 16° C και σε συγκέντρωση πρωτεΐνης 10 mg/mL, σε χρονικό διάστημα δύο ημερών.

Η παραγωγή των κρυστάλλων, όσον αφορά την 1η συνθήκη, έγινε με την χρήση ρομποτικού συστήματος OryxNano (Douglas Instruments), σε αναλογία πρωτεΐνης- διαλύματος κρυστάλλωσης 1:1. Για τη δεύτερη συνθήκη, οι κρύσταλλοι παράχθηκαν με τη μέθοδο της καθήμενης σταγόνας χωρίς χρήση ρομποτικού συστήματος σε αναλογία πρωτεΐνης-διαλύματος κρυστάλλωσης 1:1. (Πίνακας 11).

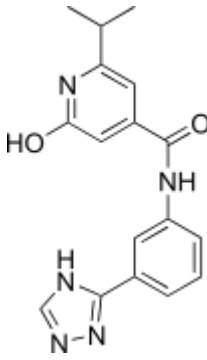
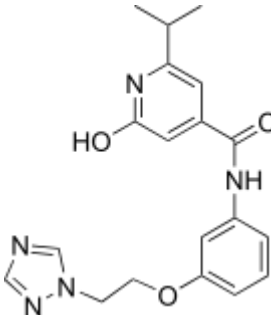
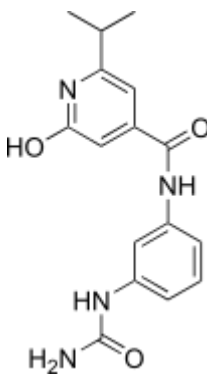
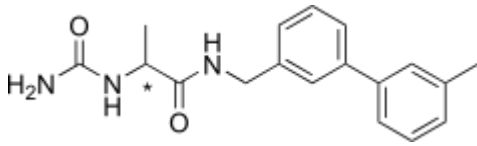
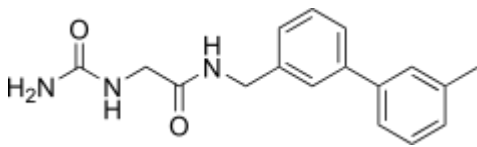
Πίνακας 11. Χημική σύσταση διαλυμάτων κρυστάλλωσης.

	1 ^ο διάλυμα κρυστάλλωσης	2 ^ο διάλυμα κρυστάλλωσης
TrisHCl pH=8	0,1 M	0,1 M
NaCl	0,1 M	0,1 M
PEG 4.000	15 % v/v	-
PEG 8.000	-	20 % v/v
Glycerol	15%	15%

3.3.4.2 Εμβάπτιση κρυστάλλων γαλεκτίνης -7 σε διαλύματα ανταγωνιστών

Στη συνέχεια έγινε εμβάπτιση κρυστάλλων στα διαλύματα πέντε χημικών ενώσεων **Z1591235794**, **Z1030818894**, **Z1591058552**, **Z1031700144**, **Z1591015696** (Πίνακας 11). Οι ενώσεις αυτές δημιουργήθηκαν και συντέθηκαν από την σάρωση βάσεων δεδομένων και υπολογιστικές δοκιμασίες στη γαλεκτίνη-7, από την ερευνητική ομάδα του Δρ. Roland Pieters, Τμήμα Χημικής Βιολογίας & Ανακάλυψης Φαρμάκων, Πανεπιστήμιο Ουτρέχτης. Επιπλέον, οι πέντε ενώσεις είναι διαλυτές, σε υψηλές συγκεντρώσεις, στον οργανικό διαλύτη DMSO και έχουν προσδιορισμένες K_D της τάξης 2-5 mM. Οι κρύσταλλοι της γαλεκτίνης-7 εμβάπτιστηκαν σε διαλύματα των ενώσεων αυτών στο διάλυμα κρυστάλλωσης που περιείχε 2 % (v/v) DMSO σε τελική συγκέντρωση 5 mM.

Πίνακας 12. Οι χημικές ενώσεις που δοκιμάστηκαν με την μέθοδο της εμβάπτισης κρυστάλλων για την μελέτη της πρόσδεσης τους στην γαλεκτίνη -7. Η αρίθμηση γίνεται χάρη ευκολίας και σύντημησης. Επιπλέον αναγράφονται οι σταθερές πρόσδεσης K_D που ήταν ήδη προσδιορισμένες

Αρίθμηση	Αναστολέας	Χημική δομή	Σταθερά K_D
(1)	Z1591235794		$4.9 \pm 0.5 \text{ mM}$
(2)	Z1591058552		2.639 mM
(3)	Z1591015696		2.077 mM
(4)	Z1030818894		$2.7 \pm 0.2 \text{ mM}$
(5)	Z1031700144		4.760 mM

3.3.4.3 Συγκρυστάλλωση γαλεκτίνης 7 με ανταγωνιστές

Για τις ίδιες χημικές ενώσεις πραγματοποιήθηκε και συγκρυστάλλωση. Το διάλυμά κάθε χημικής ένωσης προστέθηκε παράλληλα με τα αντιδραστήρια του διαλύματος κρυστάλλωσης. Το διάλυμα κρυστάλλωσης βασίζεται σε αυτό της 2^{ης} συνθήκης (Πίνακας 10) με την προσθήκη κάθε φορά την ένωσης σε τελική συγκέντρωση 1 mM για τις ενώσεις 1, 2, 3, 4 και 5 mM για την 5 του Πίνακα 12. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το ρομποτικό σύστημα *OryxNano* (*Douglas Instruments*), σε αναλογία πρωτεΐνης-διάλυμα κρυστάλλωσης 1:1.

3.3.4.4 Συλλογή κρυσταλλογραφικών δεδομένων με την χρήση ακτίνων Χ

Οι κρύσταλλοι που δημιουργήθηκαν με την μέθοδο της εμβάπτισης εκτέθηκαν σε ακτινοβολία Χ στις εγκαταστάσεις συγχροτρονικής ακτινοβολίας EMBL-Hamburg, Γερμανίας, στο σταθμό P13 με ανιχνευτή EIGER 16M. Η συλλογή των κρυσταλλογραφικών δεδομένων πραγματοποιείται με εκροή υγρού αζώτου, σε θερμοκρασία των 100 K η οποία αποτρέπει την αλλοίωση του κρυστάλλου και των κρυσταλλογραφικών δεδομένων. Ο κάθε κρύσταλλος των γαλεκτίνων λαμβάνεται με τη χρήση βρόχου, εμβάπτιζεται σε κρυοπροστατευτικό διάλυμα και τοποθετείται στο γωνιόμετρο. Για την αντοχή της γαλεκτίνης-7 στην χαμηλή θερμοκρασία χρησιμοποιήθηκε κρυοπροστατευτικό διάλυμα 30% (v/v) γλυκερόλη, 0,1 M Tris-HCl, pH 8,0, 0,1 M NaCl, 15% (w/v) PEG 4000.

3.3.4.5 Υπολογιστική επεξεργασία και ανάλυση των κρυσταλλογραφικών δεδομένων

Η επεξεργασία των δεδομένων περίθλασης κρυστάλλων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του προγράμματος XDS. Η συγχώνευση των εντάσεων των περιθλάσεων έγινε μέσω του Aimless. Για τον προσδιορισμό των φάσεων στα σύμπλοκα της γαλεκτίνης-7, εφαρμόστηκε η μέθοδος μοριακής αντικατάστασης με το Phaser, χρησιμοποιώντας ως μοντέλο την δομή (PDB ID: 1BKZ).

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε βελτιστοποίηση των συντεταγμένων των ατόμων στον χώρο (xyz) με το πρόγραμμα REFMAC, με τη χρήση 10 κύκλων βελτιστοποίησης. Ακολούθησε η ανάλυση των χαρτών 2Fobs-Fcalc, με στόχο την ανίχνευση θετικών

ηλεκτρονιακών πυκνοτήτων στη θέση πρόσδεσης των γαλεκτίνων (CBS). Η παρουσία θετικών ηλεκτρονιακών πυκνοτήτων υποδηλώνει την πρόσδεση της ένωσης στη συγκεκριμένη περιοχή πρόσδεσης.

Μέσω του προγράμματος Coot, προστέθηκαν οι χάρτες ηλεκτρονιακής πυκνότητας στο μοντέλο, ενώ πραγματοποιήθηκε γενική αναπροσαρμογή του μοντέλου, συμπεριλαμβανομένων της μετακίνησης των πλευρικών αλυσίδων ορισμένων καταλοίπων, της προσθήκης εναλλακτικών διαμορφώσεων των πλευρικών αλυσίδων κάποιων καταλοίπων, καθώς και της προσθήκης ή διαγραφής μορίων ύδατος. (Emsley et al., 2010; Winn et al., 2011)

Μετά από αυτό, το μοντέλο βελτιστοποιήθηκε περαιτέρω μέσω του προγράμματος REFMAC και οι αλλαγές αξιολογήθηκαν με βάση το ταίριασμα στους νέους χάρτες ηλεκτρονιακής πυκνότητας, τη γεωμετρία, τους τελεστές B και το διάγραμμα Ramachandran. Τέλος, η δομή βελτιστοποιήθηκε με το REFMAC. (Kovalevskiy et al., 2018).

3.3.5 Υπολογισμός σταθεράς πρόσδεσης για τις ενώσεις LL70, LL62 και LL65 μέσω Θερμιδομετρία Ισοθερμικής Τιτλοδότησης

Τα πειράματα θερμιδομετρίας ισοθερμικής τιτλοδότησης πραγματοποιήθηκαν στις εγκαταστάσεις του εργαστηρίου Βιοχημείας του τμήματος Κτηνιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, στην Καρδίτσα υπό την επίβλεψη του καθηγητή Γ. Κοντοπίδη. Το συγκεκριμένο εργαστήριο διαθέτει το μηχάνημα *Nano-ITC* (TA Instruments), στο οποίο πραγματοποιήθηκαν οι μελέτες σύνδεσης με σκοπό τον προσδιορισμό της σταθεράς σύνδεσης των ενώσεων LL70, LL65, LL92 στην γαλεκτίνη-7. Οι ενώσεις αυτές είναι υδατοδιαλυτές και ειδικά σχεδιασμένες μέσω υπολογιστικών προγραμμάτων, ώστε να προσδένουν σε διάφορες γαλεκτίνες.

Η ανάλυση η επεξεργασία και η παρουσίαση των δεδομένων έγινε με το πρόγραμμα NanoAnalyze της ίδιας εταιρείας. Επειδή η γαλεκτίνη-7 έχει μια περιοχή πρόσδεσης CRD χρησιμοποιήθηκε το Independent Model κατά την ανάλυση. (Τσαγκαράκου, 2023)

3.3.5.1 Μελέτες ITC γαλεκτίνης-7 και LL70

Ο όγκος της κυψελίδας που περιείχε διάλυμα της γαλεκτίνης-7 20 μM ήταν 1038 μL , ο όγκος της σύριγγας έγχυσης 250 μL , η θερμοκρασία ρυθμισμένη στους 20 $^{\circ}\text{C}$ και όλη η διαδικασία πραγματοποιήθηκε υπό συνεχή ανάδευση 170-200 *rpm*. Η τιτλοδότηση πραγματοποιήθηκε με 17 εγχύσεις των 14,97 μL κάθε 300 δευτερόλεπτα. Η συγκέντρωση του διαλύματος έγχυσης στην σύριγγα ήταν 0,5 mM.

3.3.5.2 Μελέτες ITC γαλεκτίνης-7 και LL62

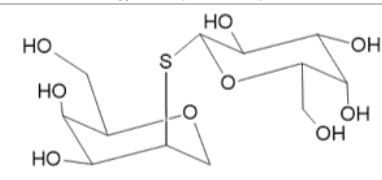
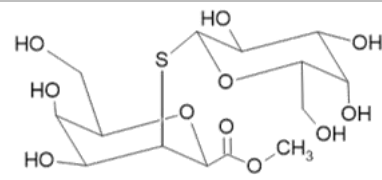
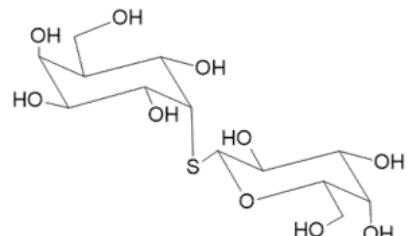
Ο όγκος της κυψελίδας που περιείχε διάλυμα της γαλεκτίνης-7 20 μM ήταν 950 μL , ο όγκος της σύριγγας έγχυσης 250 μL , η θερμοκρασία ρυθμισμένη στους 20 $^{\circ}\text{C}$ και όλη η διαδικασία

πραγματοποιήθηκε υπό συνεχή ανάδευση 200 *rpm*. Η τιτλοδότηση πραγματοποιήθηκε με 15 εγχύσεις των 15,86 μL κάθε 300 δευτερόλεπτα. Η συγκέντρωση του διαλύματος έγχυσης στην σύριγγα ήταν 0,5 mM.

3.3.5.3 Μελέτες ITC γαλεκτίνης-7 και LL62

Ο όγκος της κυψελίδας που περιείχε διάλυμα της γαλεκτίνης-7 20 μM ήταν 950 μL , ο όγκος της σύριγγας έγχυσης 250 μL , η θερμοκρασία ρυθμισμένη στους 20 $^{\circ}\text{C}$ και όλη η διαδικασία πραγματοποιήθηκε υπό συνεχή ανάδευση 200 *rpm*. Η τιτλοδότηση πραγματοποιήθηκε με 21 εγχύσεις των 9,88 μL κάθε 300 δευτερόλεπτα. Η συγκέντρωση του διαλύματος έγχυσης στην σύριγγα ήταν 0,5 mM.

Πίνακας 13. Οι ενώσεις που δοκιμάστηκαν για την πρόσδεση τους στην γαλεκτίνη-7 με ITC

Όνομα	Χημικός τύπος
(6) LL70	
(7) LL62	
(8) LL65	

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Χημικός μετασχηματισμός

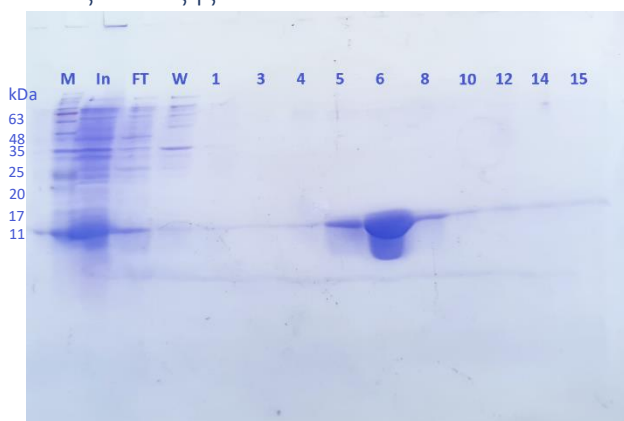
Στην Εικόνα 19, διακρίνονται αποικίες E.Coli BL21 Gold. Στο τρυβλίο προστέθηκε στερεό θρεπτικό υλικό LB άγαρ και ποσότητα αντιβιοτικού αμπικιλίνης και επιστρώθηκαν με μετασχηματισμένα βακτήρια. Οι αποικίες που αναπτυχθήκαν παρουσία αμπικιλίνης είναι οι μετασχηματισμένες με τον φορέα που φέρει το πλασμίδιο της γαλεκτίνης 7.



Εικόνα 19. Αποικίες E. Coli βακτηρίων που περιέχουν το πλασμίδιο με το γονίδιο της γαλεκτίνης -7. Το θρεπτικό υλικό είναι LB άγαρ και περιέχει αμπικιλίνη.

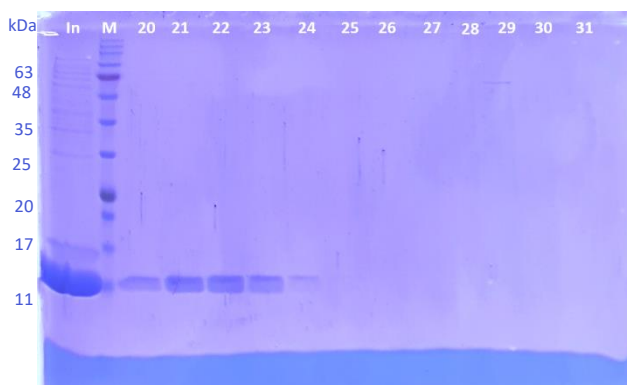
4.2 Καθαρισμός & απομόνωση γαλεκτίνης 7

4.2.1 Αποτελέσματα χρωματογραφίας συγγένειας λακτόζης



Εικόνα 20. Ηλεκτροφόρηση σε γέλη πολυακρυλαμίδης 15%, σε κλάσματα στήλης συγγένειας λακτόζης. M=Marker, In=Input, FT=Flow Through. Στα κλάσματα 5-8 έχει εκλουστεί η γαλεκτίνη -7.

4.2.2 Αποτελέσματα χρωματογραφίας συγγένειας μοριακής διήθησης



Εικόνα 21. Ηλεκτροφόρηση σε γέλη πολυακρυλαμίδης 15%, σε κλάσματα στήλης μοριακής διήθησης. M=Marker, In=Input. Στα κλάσματα 20-24 έχει εκλουστεί η γαλεκτίνη -7.

4.3 Κρυστάλλωση γαλεκτίνης-7

4.3.1 Κρύσταλλοι γαλεκτίνης-7

Η κρυστάλλωση της γαλεκτίνης 7 έγινε όπως αναφέρεται στο εδάφιο 3.3.4.1. Λήφθηκαν επιτυχώς κρύσταλλοι και στις δύο χαρακτηρισμένες συνθήκες που δοκιμάστηκαν. Η πλειοψηφία των κρυστάλλων λήφθηκαν με την 2^η συνθήκη 0,1 M Tris-HCl, pH 8,0, 0,1 M NaCl, 20% (w/v) PEG 8000 και 15% (v/v) γλυκερόλη σε 10 mg/ml συγκέντρωση γαλεκτίνης στους 16^o C, τόσο με την χρήση ρομποτικού συστήματός όσο και χωρίς (Πίνακας 11). Για την παρατήρηση των κρυστάλλων χρησιμοποιήθηκε στερεοσκόπιο, από το οποίο και προήλθαν οι παρακάτω εικόνες.

4.3.2 Συγκρυστάλλωση γαλεκτίνης-7 με αναστολείς

Η συγκρυστάλλωση της γαλεκτίνης-7 με τους αναστολείς **Z1591235794**, **Z1030818894**, **Z1591058552**, **Z1031700144**, **Z1591015696**, πραγματοποιήθηκε με επιτυχία καθότι δημιουργήθηκαν ποιοτικοί κρύσταλλοι γαλεκτίνης-7 σε όλους τους αναστολείς σε κάθε επανάληψη. Οι κρύσταλλοι αυτοί παρατηρήθηκαν με στερεοσκόπιο, και παρουσιάζουν την μορφολογία ενός κλασσικού κρυστάλλου γαλεκτίνης. Ωστόσο δεν είναι επιβεβαιωμένο αν είναι κρύσταλλοι των συμπλόκων γαλεκτίνης-αναστολέα, καθότι δεν έχουν εκτεθεί σε ακτινοβολία X, μέχρι την στιγμή συγγραφής της διπλωματικής.

Πίνακας 13. Στον πίνακα διακρίνονται οι διάφοροι κρύσταλλοι της γαλεκτίνης -7 που συλλέχθηκαν κατά την εκπόνηση της διπλωματικής. Οι κρύσταλλοι παρουσιάζονται ανάλογα με την μέθοδο που δημιουργήθηκαν είτε μέσω ρομποτικού συστήματος, είτε μέσω καθημένης σταγόνας και με βάση την συνθήκη κρυστάλλωσης που πάρθηκαν. Το 15% PEGG 4.000 αναφέρεται στην 1^η συνθήκη (Πίνακας 8) και το 20% PEG 8.000 στην 2^η αντίστοιχα.. Επίσης Native χαρακτηρίζονται οι φυσικοί κρύσταλλοι γαλεκτίνης -7 που μετέπειτα αξιοποιήθηκαν στην εμβάπτιση με αναστολείς. Με (+) παρουσιάζονται οι περιπτώσεις συγκρυστάλλωσης, για κάθε αναστολέα.

		Ρομποτικό σύστημα	Καθήμενη σταγόνα
15% PEG 4.0000	Native		
20 % PEG 8.000	Native		
	(+) Z1591235794		
	(+) Z1030818894		
	(+) Z1591015696		
	(+) Z1031700144		

4.4 Αποτελέσματα κρυσταλλογραφίας ακτίνων Χ των κρυστάλλων γαλεκτίνης-7

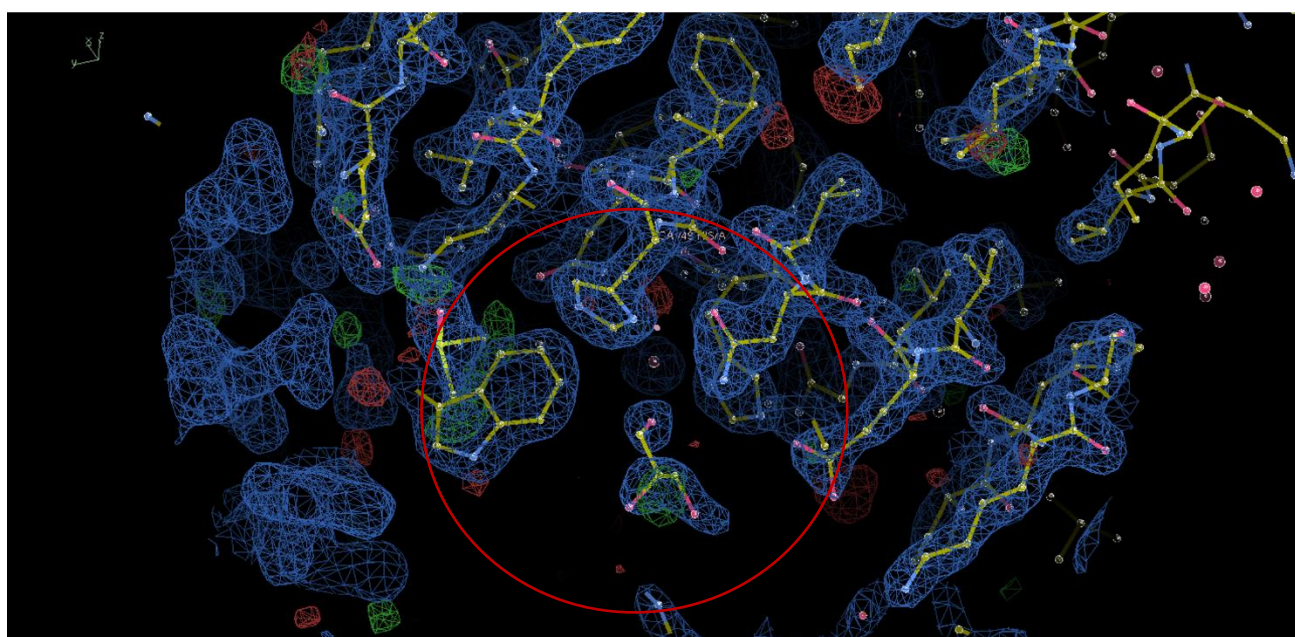
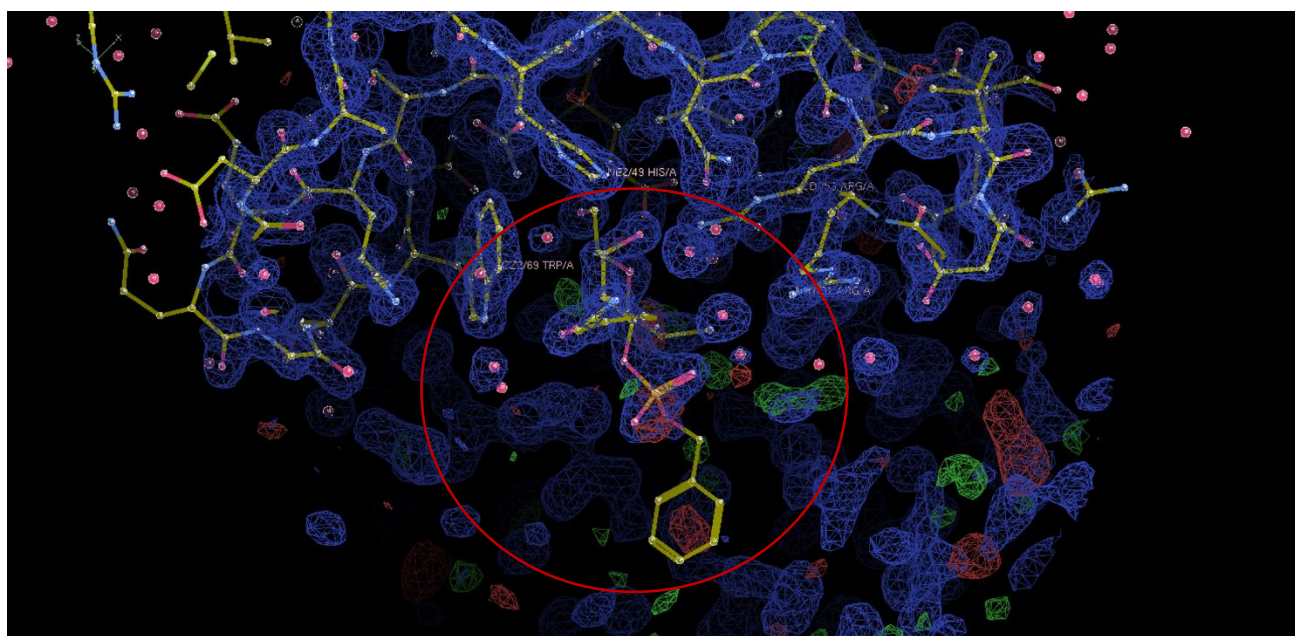
Οι κρύσταλλοι γαλεκτίνης-7 εμβαπτίστηκαν σε διαλύματα πέντε αναστολέων. Σε ταχεία εμβάπτιση που έγινε σε συγκέντρωση αναστολέα 40 mM, διαλυμένους σε 100% περιεκτικότητα σε DMSO, οι κρύσταλλοι της γαλεκτίνης-7 αποσταθεροποιούνται. Έτσι έγινε η εμβάπτιση σε 2 % (v/v) DMSO και συγκέντρωση 5 mM, όπως αναγράφεται στο εδάφιο 3.3.4.3. Ο χρόνος που οι κρύσταλλοι διατηρήθηκαν παρέμειναν εμβαπτισμένοι στον αναστολέα ήταν περίπου 30 ώρες. Κάθε κρύσταλλος λαμβάνεται με την χρήση βρόχου και εμβαπτίζεται σε κρυοπροστατευτικό διάλυμα 30% (v/v) γλυκερόλης. Από τους 5 διαφορετικούς κρυστάλλους μόνο οι 2 ήταν σε θέση να δώσουν ποιοτικά δεδομένα, καθιστώντας δυνατή την ανάλυση τους. Έτσι αναλύθηκαν

μόνο οι κρύσταλλοι με τις ενώσεις Z1031700144 και Z1591235794.

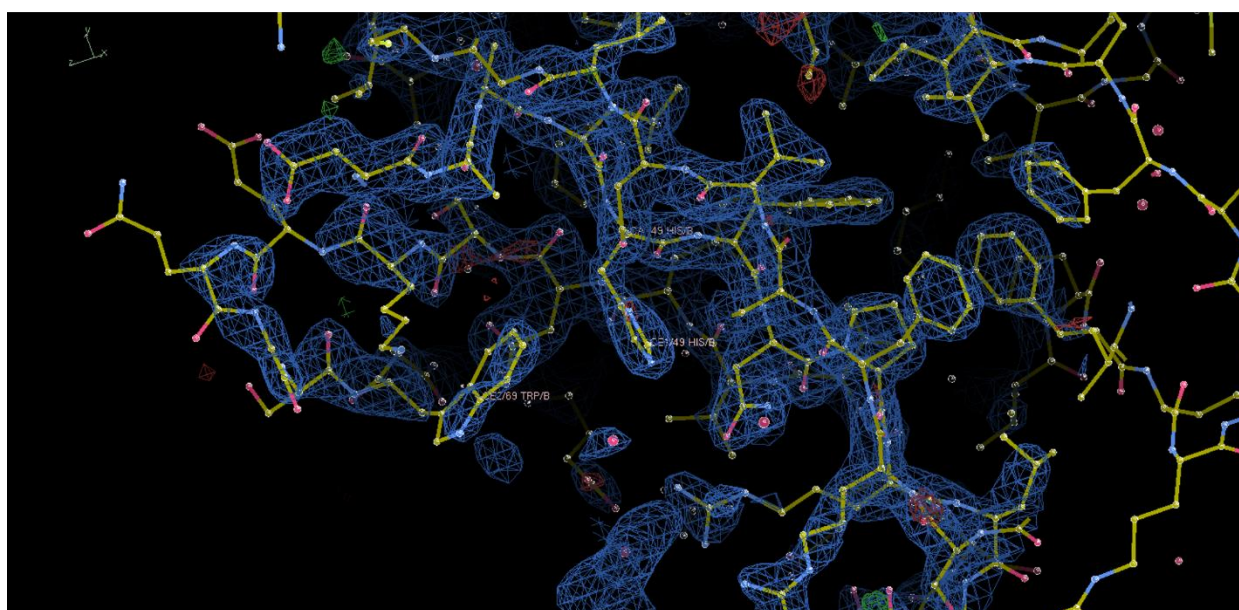
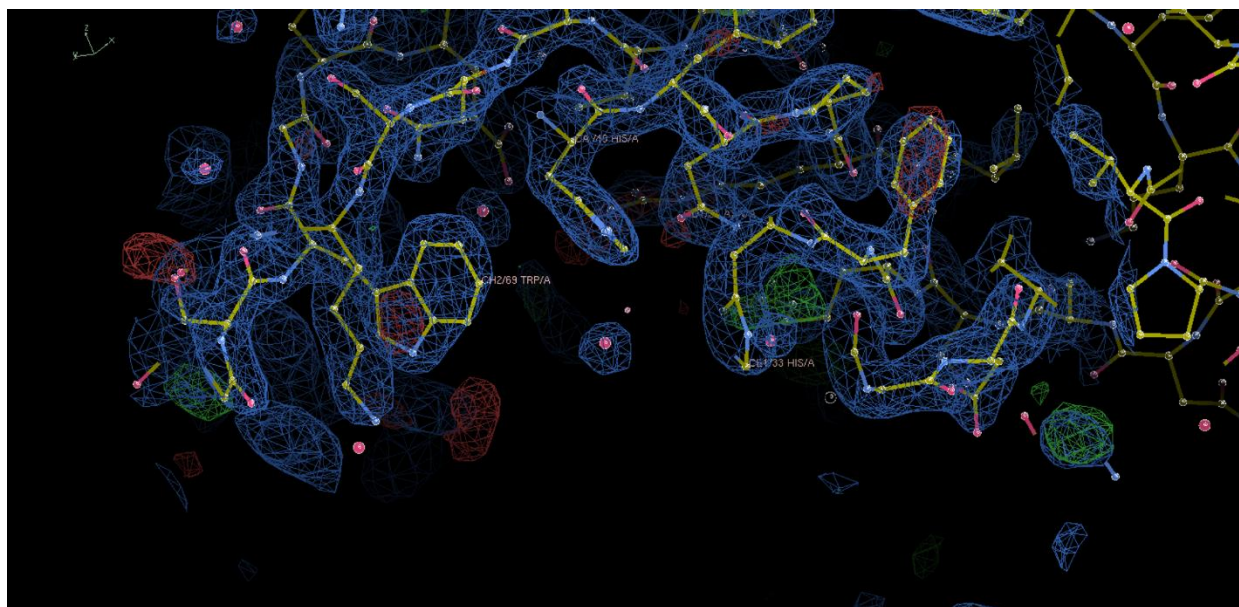
Η γαλεκτίνη-7 όπως είναι γνωστό από την βιβλιογραφία (Leonidas et al., 1998), κρυσταλλώθηκε ως διμερές και αποτελείται από δύο πανομοιότυπες μονάδες την Α και την Β. Η επίλυση της δομής τους δεν απέδειξε την σύνδεση του αναστολέα πάνω στη γαλεκτίνη-7 για κανένα από τους δύο αναστολείς, είτε στην υπομονάδα Α είτε στην υπομονάδα Β. Πιο συγκεκριμένα δεν υπήρχε ηλεκτρονική πυκνότητα που να αντιστοιχεί στην δομή των αναστολέων, όπως φαίνεται και στις Εικόνες 22 και 23. (Evans & Murshudov, 2013; Murshudov et al., 2011).

Πίνακας 14. Οι παράμετροι της επεξεργασίας των δεδομένων περίθλασης και της διαδικασίας της βελτιστοποίησης και επίλυσης της δομής για τους δύο κρυστάλλους που εμβαπτίστηκαν στις ενώσεις Z1031700144, Z1591235794. Οι τιμές στην παρένθεση αφορούν την εξωτερική στοιβάδα ευκρίνειας.

Σύμπλοκο	Z1031700144	Z1591235794
Ομάδα συμμετρίας χώρου	P 1 2 ₁ 1	P 1 2 ₁ 1
Διαστάσεις στοιχειώδους κυψελίδας (Å)	a: 32.448 , b: 54.454 , c: 71.073	a: 32.183 , b: 53.974 , c: 71.221
Γωνίες στοιχειώδους κυψελίδας	α: 90.00°, β: 91.14°, γ: 90.00°	α: 90.00°, β: 91.24°, γ: 90.00°
Ευκρίνεια (Å)	1.90	2.13
Μοναδικές ανακλάσεις	19656 (1939)	13641 (1269)
Πληρότητα (%)	99.91	98.84
B Wilson (Å ²)	24.76	34.21
Ανακλάσεις για βελτιστοποίηση	19649 (1939)	13636 (1269)
Ανακλάσεις για Rfree	952 (90)	673 (63)
R (%)	0.2264 (0.3577)	0.2149 (0.3126)
Rfree (%)	0.2636 (0.3620)	0.2671 (0.2545)
r.m.s.d. σε μήκη δεσμών (Å)	0.026	0.033
r.m.s.d. σε γωνίες δεσμών (ο)	1.46	1.97
Ramachandran favored (%)	97.35	96.95
Ramachandran allowed (%)	3.05	3.05
Ramachandran outliers (%)	0.00	0.00
Rotamer outliers (%)	2.63	2.63
Μέση τιμή B	35.58	39.13
Άτομα πρωτεΐνης	35.48	39.06
Μόρια διαλύτη	58.75	83.91
Άτομα ένωσης	38.30	38.30



Εικόνα 22.**Επάνω** η ηλεκτρονική πυκνότητα της γαλεκτίνης-7 στην CRD της υπομονάδας A και ενός αναστολέα galactose-benzylphosphate όπως κατατέθηκαν στην PDB: 3ZXE. Με τον κόκκινο κύκλο υποδεικνύεται ο αναστολέας, όπως ταιριάζει με την ηλεκτρονική πυκνότητα. **Κάτω** η ηλεκτρονική πυκνότητα της CRD της γαλεκτίνης -7 για τον κρύσταλλο που εμβαπτίστηκε με τον αναστολέα **Z1031700144**. Στην αντίστοιχη περιοχή δεν υπάρχει ηλεκτρονική πυκνότητα που να αντιστοιχεί στον προσδέτη. Αντί αυτού βρίσκεται ένα μόριο γλυκερόλης. Το μόριο της γλυκερόλης ήταν συστατικό του διαλύματος κρυστάλλωσης.

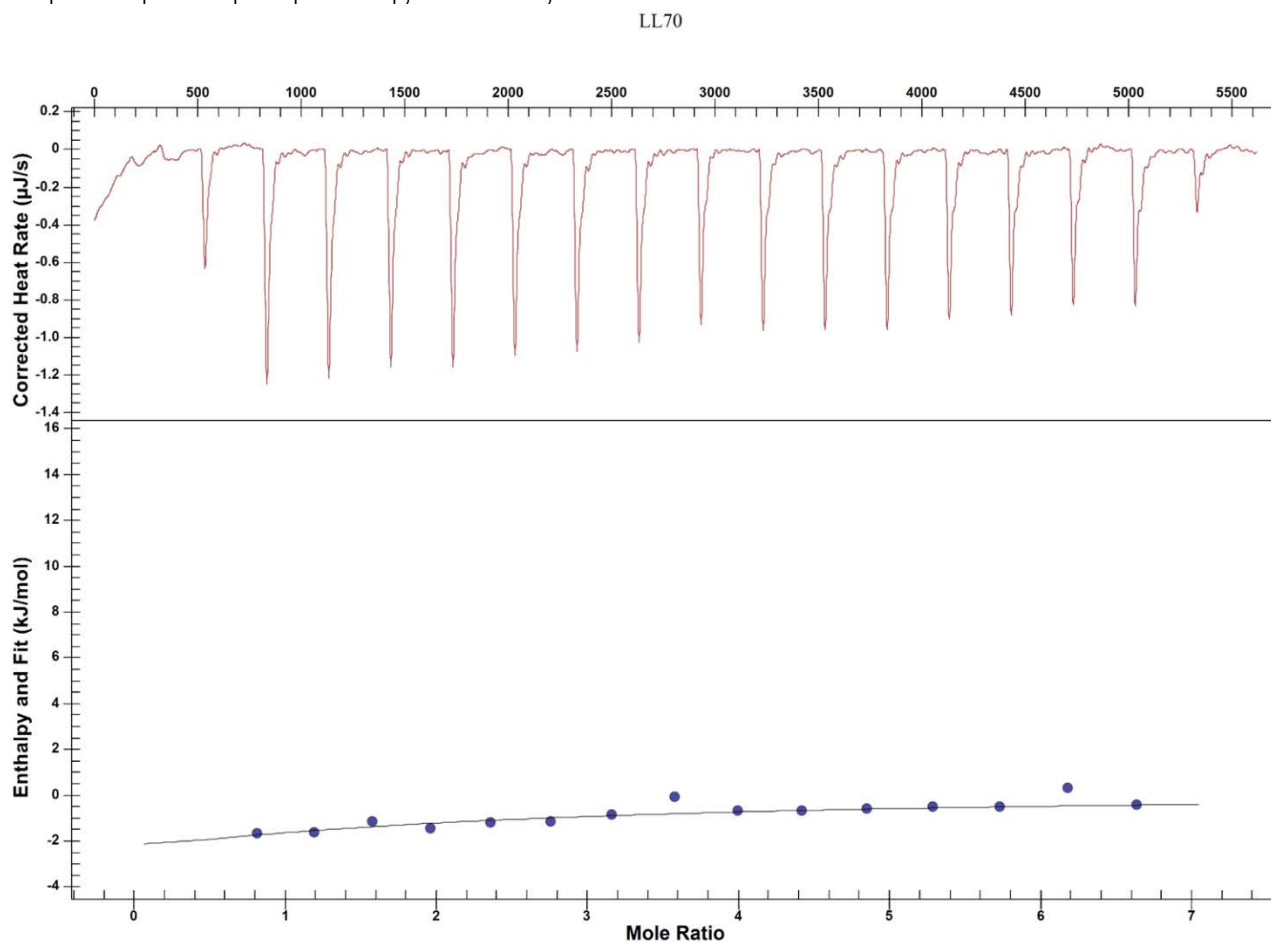


Εικόνα 23. **Επάνω**, η ηλεκτρονική πυκνότητα της CRD της γαλεκτίνης -7 της **υπομονάδας A** για τον κρύσταλλο που εμβαπτίστηκε με τον αναστολέα **Z1591235794**. Στην αντίστοιχη περιοχή δεν υπάρχει ηλεκτρονική πυκνότητα που να αντιστοιχεί στην δομή του προσδέτη. Αντί αυτού βρίσκεται ένα μόριο νερού. Τα κρυσταλλογραφικά δεδομένα δείχνουν να μην υπάρχει σύνδεση του αναστολέα με την γαλεκτίνη -7. **Κάτω**, η ηλεκτρονική πυκνότητα της CRD της γαλεκτίνης -7 της **υπομονάδας B** για τον κρύσταλλο που εμβαπτίστηκε με τον αναστολέα **Z1591235794**. Στην αντίστοιχη περιοχή δεν υπάρχει ηλεκτρονική πυκνότητα που να αντιστοιχεί στην δομή του προσδέτη. Αντί αυτού βρίσκεται ένα μόριο νερού. Τα κρυσταλλογραφικά δεδομένα δείχνουν να μην υπάρχει σύνδεση του αναστολέα με την γαλεκτίνη -7. Οι δύο εικόνες ηλεκτρονικής πυκνότητας μπορούν να συγκριθούν με την Εικόνα 22 και την δομή με τον αναστολέα.

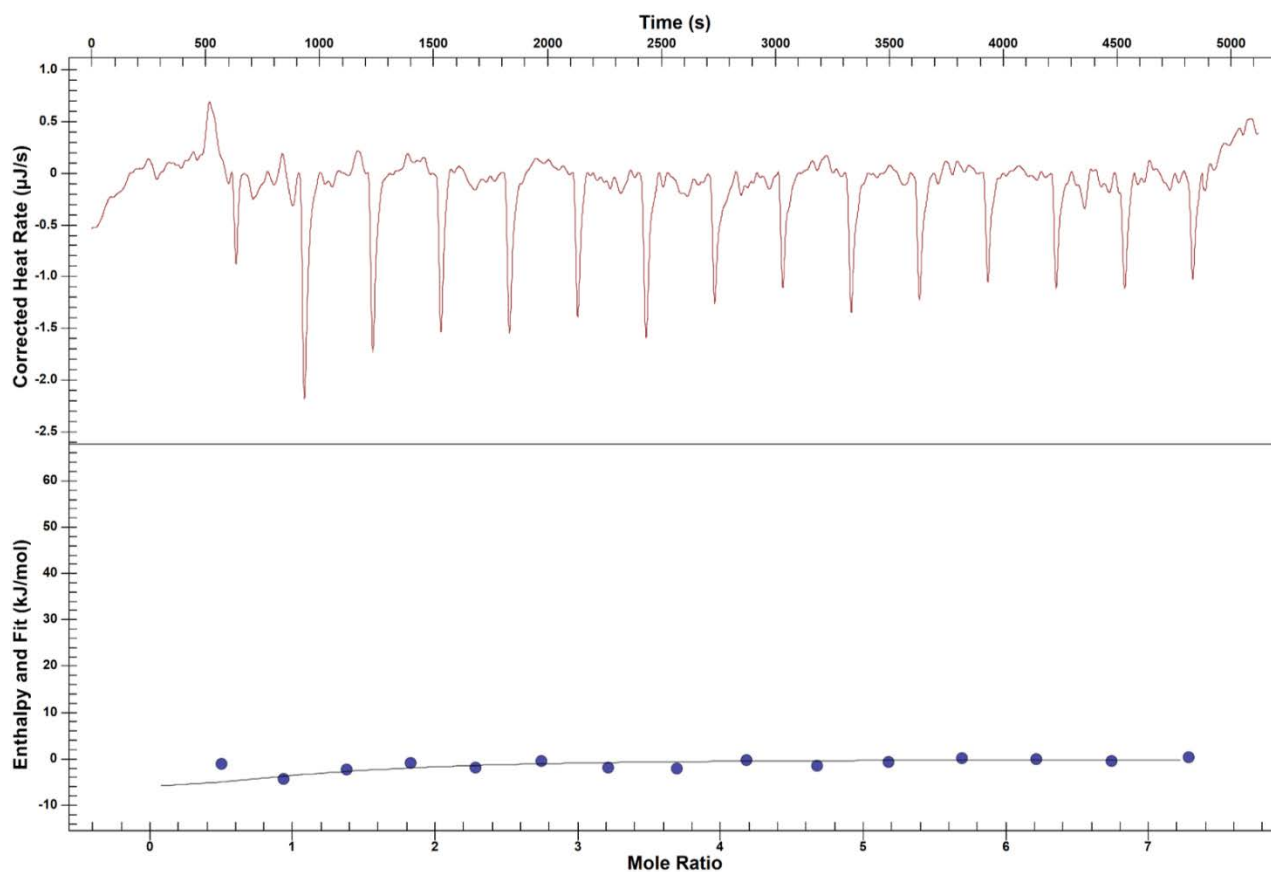
4.5 Αποτελέσματα πειραμάτων ITC

Η γαλεκτίνη-7 ως μονομερές στο διάλυμα, έχει μία περιοχή CRD. Για το σκοπό αυτό κατά την ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το Independent model του NanoAnalyze. Τα πειράματα ITC έγιναν για να μελετηθεί το αν οι προσδέτες LL-65, LL 62 και LL-70 προσδένονται στην γαλεκτίνη-7 και να προσδιοριστεί η σταθερά πρόσδεσης. Και στους δύο

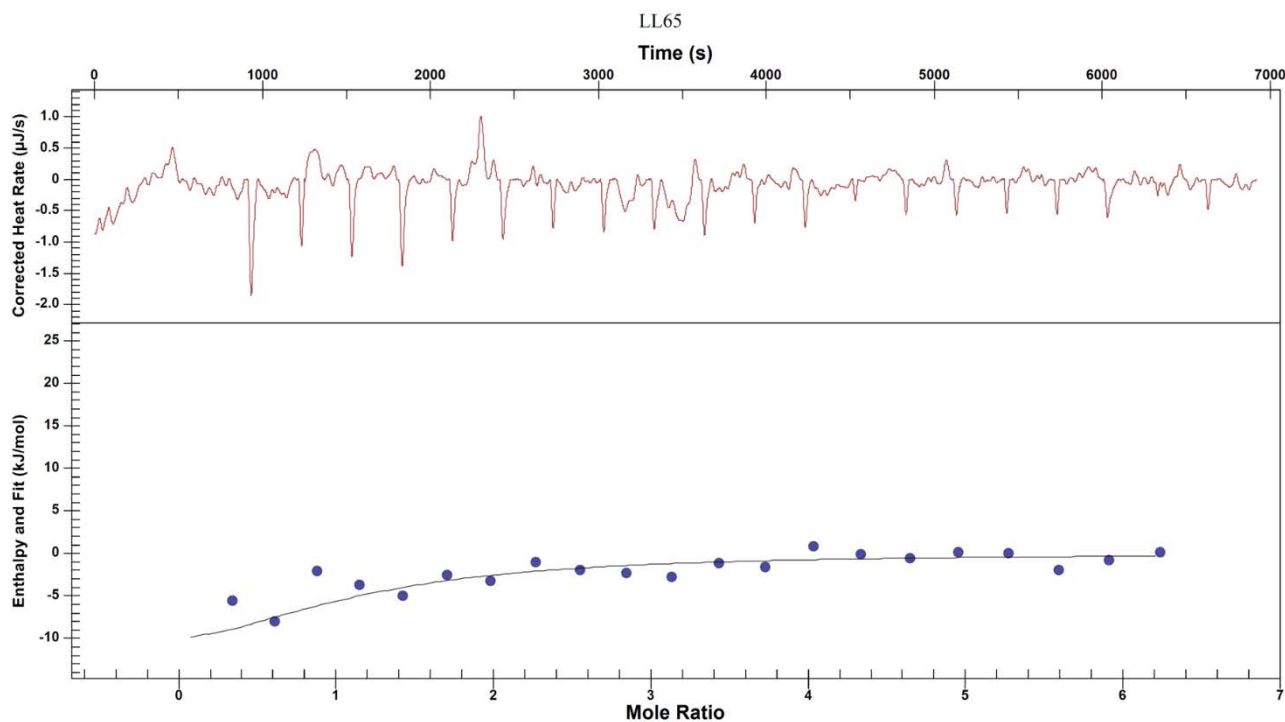
ανταγωνιστές που διευρύνθηκαν για την πρόσδεση τους στη γαλεκτίνη-7 μέσω ITC δεν παρατηρήθηκε (Εικόνα 24, Εικόνα 25, Εικόνα 26) κάποιο θερμικό γεγονός κατά την προσθήκη τους, επομένως συμπεραίνουμε ότι δεν προσδένονται στην γαλεκτίνη-7 και δεν υπάρχει αλληλεπίδραση.



Εικόνα 24. Αποτελέσματα ITC γαλεκτίνης -7 LL-70 σε. **Πάνω)** βρίσκονται τα πειραματικά σημεία μεταβολής της ενέργειας σε μέτρηση του ρυθμού μεταβολής της θερμότητας προς τον χρόνο. **Κάτω)** Καμπύλη ITC. Δεν παρατηρείται κανένα θερμικό γεγονός και καμία μεταβολή συνεπώς δεν υπάρχει αλληλεπίδραση.



Εικόνα 25. Αποτελέσματα ITC γαλεκτίνης -7 LL-62 σε. **Πάνω**) βρίσκονται τα πειραματικά σημεία μεταβολής της ενέργειας σε μέτρηση του ρυθμού μεταβολής της θερμότητας προς χρόνο. **Κάτω**) Καμπύλη ITC. Δεν παρατηρείται κανένα θερμικό γεγονός και καμία μεταβολή συνεπώς δεν υπάρχει αλληλεπίδραση.



Εικόνα 26. Αποτελέσματα ITC γαλεκτίνης -7 LL-65 σε. **Πάνω**) βρίσκονται τα πειραματικά σημεία μεταβολής της ενέργειας σε μέτρηση του ρυθμού μεταβολής της θερμότητας προς τον χρόνο. **Κάτω**) Καμπύλη ITC. Δεν παρατηρείται κανένα θερμικό γεγονός και καμία μεταβολή συνεπώς δεν υπάρχει αλληλεπίδραση.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Η παρούσα διπλωματική εργασία ασχολήθηκε με την κατανόηση της σύνδεσης β-γαλακτοζιτών στην γαλεκτίνη-7 μέσω μιας προσέγγισης κατευθυνόμενου από την δομή σχεδιασμό φαρμάκων. Μελετήθηκαν για την πρόσδεση τους στην CRD της γαλεκτίνης-7 οι ενώσεις Z1591235794, Z1030818894, Z1591058552, Z1031700144, Z1591015696 με την μέθοδο της κρυσταλλογραφίας ακτίνων-Χ. Επίσης, πραγματοποιήθηκαν θερμοδυναμικές μελέτες πρόσδεσης των ενώσεων LL70, LL72, LL65 με σκοπό την εύρεση της σταθεράς K_D , με τη χρήση της μεθόδου ITC.

Από τις μελέτες θερμιδομετρίας των ενώσεων LL70, LL72, LL65 για την πρόσδεση τους στη γαλεκτίνη-7, βρέθηκε ότι καμία από τις τρεις ενώσεις δεν προσδένεται στην γαλεκτίνη-7, καθώς δεν καταγράφηκε κάποιο θερμικό γεγονός για τις τρεις ενώσεις. Η τρεις ενώσεις που δοκιμάστηκαν, σε δομικό επίπεδο έχουν σκελετό δισακχαρίτη με κύριους υποκατάστατες πολικές ομάδες OH. Οι πολικές ομάδες OH είναι σε θέση να δημιουργήσουν δεσμούς υδρογόνου με τα κατάλοιπα της CRD, γεγονός που προδιαθέτει για δημιουργία συμπλόκου. Ωστόσο, ο σχηματισμός δεσμών υδρογόνου μεταξύ των OH των ανταγωνιστών και της γαλεκτίνης-7 προκειμένου να ευνοείται, πρέπει να οδηγεί σε μικρότερη ελεύθερη ενέργεια από ότι οι δεσμοί της γαλεκτίνης-7 με τα μόρια νερού του διαλύτη και από τις αλληλεπιδράσεις του διαλύτη με την ένωση. Ο μεγάλος αριθμός πολικών ομάδων, ενδεχομένως να δημιουργεί μια σφαίρα ενυδάτωσης γύρω από τις ενώσεις των ανταγωνιστών και να μην ευνοεί έτσι την αλληλεπίδραση τους με την γαλεκτίνη-7. Σε αυτή την βάση, είναι ορθό να συντεθούν ενώσεις με υποκατάστατες που θα δημιουργούν μικρότερες αλληλεπιδράσεις με τον διαλύτη ή να δημιουργούν αλληλεπιδράσεις με την γαλεκτίνη-7 που να τις υπερνικούν.

Όσον αφορά τις κρυσταλλογραφικές δοκιμασίες, δεν παρατηρήθηκε πρόσδεση κανενός από τους δύο ανταγωνιστές που ήταν δυνατή η ανάλυση και επεξεργασία των κρυσταλλογραφικών δεδομένων.

Η ανάλυση των κρυσταλλογραφικών δεδομένων έδειξε ότι δεν υπάρχει (Sepsey et al., 2014) ηλεκτρονιακή πυκνότητα στην CRD που αντιστοιχεί στην δομή του εκάστοτε ανταγωνιστή. Το γεγονός αυτό δεν σημαίνει απαραίτητα ότι αυτές οι πέντε χημικές ενώσεις δεν συνδέονται με την γαλεκτίνη-7. Οι σταθερές K_D των συγκεκριμένων ανταγωνιστών έχουν προσδιοριστεί από τον Roland Pieters και κυμαίνονται της τάξεως των 1-5 mM.

Η φύση της πειραματικής διαδικασίας έθετε περιορισμούς στην εμβάπτιση των κρυστάλλων στο διάλυμα του κάθε ανταγωνιστή. Πιο συγκεκριμένα η ποσότητα των ανταγωνιστών σε αναλογία με τα μόρια της πρωτεΐνης στον κρύσταλλο ήταν μικρή. Οι ενώσεις των ανταγωνιστών ήταν διαλυμένες στον οργανικό διαλύτη DMSO, όπου η υψηλή συγκέντρωση του ήταν απαγορευτική λόγω της διάλυσης της κρυσταλλικής δομής. Αυτό διαμορφώνει μια συνθήκη στην οποία προκειμένου να διατηρηθεί ακέραιη η κρυσταλλική δομή, πρέπει να μειωθεί η συγκέντρωση του διαλύματος σε σημείο που το DMSO δεν θα αποτελεί ανασταλτικό παράγοντα για την επιτυχία του πειράματος.

Δημιουργείται, επομένως, η ανάγκη να παρακαμφθεί το πρόβλημα της εμβάπτισης κρυστάλλων σε διαλύτη DMSO. Η μέθοδος της συγκρυστάλλωσης, μπορεί να παρακάμψει αυτό το εμπόδιο, καθώς είναι ελπιδοφόρο το γεγονός ότι δημιουργήθηκαν κρύσταλλοι γαλεκτίνης-7 και με τους πέντε ανταγωνιστές. Επόμενο βήμα είναι η ανάλυση των κρυσταλλογραφικών δεδομένων αυτών των κρυστάλλων, που μπορεί να αναδείξει πολύτιμες πληροφορίες για την σύνδεση προσδετών στην γαλεκτίνη-7.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Advedissian, T., Deshayes, F., & Viguier, M. (2017). Galectin-7 in epithelial homeostasis and carcinomas. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 18, Issue 12). <https://doi.org/10.3390/ijms18122760>
2. Advedissian, T., Proux-Gillardeaux, V., Nkosi, R., Peyret, G., Nguyen, T., Poirier, F., Viguier, M., & Deshayes, F. (2017). E-cadherin dynamics is regulated by galectin-7 at epithelial cell surface. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17332-y>
3. Anderson, A. C. (2003). The process of structure-based drug design. In *Chemistry and Biology* (Vol. 10, Issue 9). <https://doi.org/10.1016/j.chem-biol.2003.09.002>
4. Angkawinitwong, U., Sharma, G., Khaw, P. T., Brocchini, S., & Williams, G. R. (2015). Solid-state protein formulations. In *Therapeutic Delivery* (Vol. 6, Issue 1). <https://doi.org/10.4155/tde.14.98>
5. Bernerd, F., Sarasin, A., & Magnaldo, T. (1999). Galectin-7 overexpression is associated with the apoptotic process in UVB-induced sunburn keratinocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(20). <https://doi.org/10.1073/pnas.96.20.11329>
6. Beulaja Manikandan, S., Manikandan, R., Arumugam, M., & Mullainadhan, P. (2020). An overview on human serum lectins. In *Heliyon* (Vol. 6, Issue 8). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04623>
7. Cumpstey, I., Carlsson, S., Leffler, H., & Nilsson, U. J. (2005). 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. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 3(10). <https://doi.org/10.1039/b502354h>
8. Demers, M., Magnaldo, T., & St-Pierre, Y. (2005). A novel function for galectin-7: Promoting tumorigenesis by up-regulating MMP-9 gene expression. *Cancer Research*, 65(12). <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-0134>
9. Demers, M., Rose, A. A. N., Grosset, A. A., Biron-Pain, K., Gaboury, L., Siegel, P. M., & St-Pierre, Y. (2010). Overexpression of galectin-7, a myoepithelial cell marker, enhances spontaneous metastasis of breast cancer cells. *American Journal of Pathology*, 176(6). <https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.090876>
10. Deshmukh, S., Kulkarni, R., & Bose, K. (2022). Transformation and Protein Expression. In *Textbook on Cloning, Expression and Purification of Recombinant Proteins*. https://doi.org/10.1007/978-981-16-4987-5_4
11. 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. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 17, Issue 2). <https://doi.org/10.3390/ijms17020144>
12. Duff, M. R., Grubbs, J., & Howell, E. E. (2011). Isothermal titration calorimetry for measuring macromolecule–ligand affinity. *Journal of Visualized Experiments*, 55. <https://doi.org/10.3791/2796>
13. Dumut, D. C., Garić, D., Centorame, A., & Radzioch, D. (2022). The gradient-like separation and reduced running time with Tris-Tricine-HEPES buffer for SDS-PAGE. *Analytical Biochemistry*, 653. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2022.114789>
14. Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G., & Cowtan, K. (2010). Features and development of Coot. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 66(4).

- <https://doi.org/10.1107/S0907444910007493>
15. Evans, P. R. (2011). An introduction to data reduction: Space-group determination, scaling and intensity statistics. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 67(4). <https://doi.org/10.1107/S090744491003982X>
 16. Evans, P. R., & Murshudov, G. N. (2013). How good are my data and what is the resolution? *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 69(7). <https://doi.org/10.1107/S090744491300061>
 17. Gabius, H. J. (2018). The sugar code: Why glycans are so important. In *BioSystems* (Vol. 164). <https://doi.org/10.1016/j.biosystems.2017.07.003>
 18. 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. (2022). What is the Sugar Code? In *ChemBioChem* (Vol. 23, Issue 13). <https://doi.org/10.1002/cbic.202100327>
 19. Gendronneau, G., Sanii, S., Dang, T., Deshayes, F., Delacour, D., Pichard, E., Advédissian, T., Sidhu, S. S., Viguier, M., Magnaldo, T., & Poirier, F. (2015). Overexpression of galectin-7 in mouse epidermis leads to loss of cell junctions and defective skin repair. *PLoS ONE*, 10(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119031>
 20. Gendronneau, G., Sidhu, S. S., Delacour, D., Dang, T., Calonne, C., Houzelstein, D., Magnaldo, T., & Poirier, F. (2008). Galectin-7 in the control of epidermal homeostasis after injury. *Molecular Biology of the Cell*, 19(12). <https://doi.org/10.1091/mbc.E08-02-0166>
 21. Goldstein, I. J., & Hayes, C. E. (1978). The Lectins: Carbohydrate-Binding Proteins of Plants and Animals. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 35(C). [https://doi.org/10.1016/S0065-2318\(08\)60220-6](https://doi.org/10.1016/S0065-2318(08)60220-6)
 22. 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. (2016). Dual thio-digalactoside-binding modes of human galectins as the structural basis for the design of potent and selective inhibitors. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep29457>
 23. Jelesarov, I., & Bosshard, H. R. (1999). Isothermal titration calorimetry and differential scanning calorimetry as complementary tools to investigate the energetics of biomolecular recognition. In *Journal of Molecular Recognition* (Vol. 12, Issue 1). [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1352\(199901/02\)12:1<3::AID-JMR441>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1352(199901/02)12:1<3::AID-JMR441>3.0.CO;2-6)
 24. Johannes, L., Jacob, R., & Leffler, H. (2018). Galectins at a glance. *Journal of Cell Science*, 131(9). <https://doi.org/10.1242/jcs.208884>
 25. Kaminker, J. D., & Timoshenko, A. V. (2021). Expression, regulation, and functions of the galectin-16 gene in human cells and tissues. *Biomolecules*, 11(12). <https://doi.org/10.3390/biom11121909>
 26. Kovalevskiy, O., Nicholls, R. A., Long, F., Carlon, A., & Murshudov, G. N. (2018). Overview of refinement procedures within REFMAC 5: Utilizing data from different sources. *Acta Crystallographica Section D: Structural Biology*, 74. <https://doi.org/10.1107/S2059798318000979>
 27. Krimmer, S. G., & Klebe, G. (2015). Thermodynamics of protein-ligand interactions as a reference for computational analysis: How to assess accuracy, reliability and relevance of experimental data. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 29(9). <https://doi.org/10.1007/s10822-015-9867-y>

28. Labrie, M., Vladioiu, M., Leclerc, B. G., Grosset, A. A., Gaboury, L., Stagg, J., & St-Pierre, Y. (2015). A mutation in the carbohydrate recognition domain drives a phenotypic switch in the role of galectin-7 in prostate cancer. *PLoS ONE*, 10(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131307>
29. Leonidas, D. D., Vatzaki, E. H., Vorum, H., Celis, J. E., Madsen, P., & Acharya, K. R. (1998). Structural basis for the recognition of carbohydrates by human galectin-7. *Biochemistry*, 37(40). <https://doi.org/10.1021/bi981056x>
30. 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. (2020). Binding of a Soluble meso-Tetraarylporphyrin to Human Galectin-7 Induces Oligomerization and Modulates Its Pro-Apoptotic Activity. *Biochemistry*, 59(48). <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.0c00736>
31. Masuyer, G., Jabeen, T., Öberg, C. T., Leffler, H., Nilsson, U. J., & Acharya, K. R. (2012). Inhibition mechanism of human galectin-7 by a novel galactose- benzylphosphate inhibitor. *FEBS Journal*, 279(2). <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08414.x>
32. Maveyraud, L., & Mourey, L. (2020a). Protein X-ray crystallography and drug discovery. In *Molecules* (Vol. 25, Issue 5). <https://doi.org/10.3390/molecules25051030>
33. Maveyraud, L., & Mourey, L. (2020b). Protein X-ray crystallography and drug discovery. In *Molecules* (Vol. 25, Issue 5). <https://doi.org/10.3390/molecules25051030>
34. McPherson, A., & Gavira, J. A. (2014). Introduction to protein crystallization. In *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications* (Vol. 70, Issue 1). <https://doi.org/10.1107/S2053230X13033141>
35. Moisan, S., Demers, M., Mercier, J., Magnaldo, T., Potworowski, E. F., & St-Pierre, Y. (2003). Upregulation of galectin-7 in murine lymphoma cells is associated with progression toward an aggressive phenotype. *Leukemia*, 17(4). <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2402870>
36. Murshudov, G. N., Skubák, P., Lebedev, A. A., Pannu, N. S., Steiner, R. A., Nicholls, R. A., Winn, M. D., Long, F., & Vagin, A. A. (2011). REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 67(4). <https://doi.org/10.1107/S0907444911001314>
37. Raposo, C. D., Canelas, A. B., & Barros, M. T. (2021). Human lectins, their carbohydrate affinities and where to find them. *Biomolecules*, 11(2). <https://doi.org/10.3390/biom11020188>
38. 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. In *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 103, Issues 23–24). <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10173-x>
39. Rodriguez, E. L., Poddar, S., Iftexhar, S., Suh, K., Woolfork, A. G., Ovbude, S., Pekarek, A., Walters, M., Lott, S., & Hage, D. S. (2020). Affinity chromatography: A review of trends and developments over the past 50 years. In *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* (Vol. 1157). <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2020.122332>
40. Roy, V. K., Kumar, N. S., & Gurusubramanian, G. (2012). Proteins – Structure, Properties and Their Separation by SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Science Vision*, 12(4).

41. Salameh, B. A., Sundin, A., Leffler, H., & Nilsson, U. J. (2006). Thioureido N-acetyllactosamine derivatives as potent galectin-7 and 9N inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 14(4). <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2005.09.050>
42. Sepsey, A., Bacskay, I., & Felinger, A. (2014). Molecular theory of size exclusion chromatography for wide pore size distributions. *Journal of Chromatography A*, 1331. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.01.017>
43. Sewgobind, N. V., Albers, S., & Pieters, R. J. (2021). Functions and inhibition of galectin-7, an emerging target in cellular pathophysiology. In *Biomolecules* (Vol. 11, Issue 11). <https://doi.org/10.3390/biom11111720>
44. St-Pierre, Y., Biron-Pain, K., Campion, C., Lavoie, G., Bouchard, F., & Couillard, J. (2009). Potential directions for drug development against galectin-7 in cancer. In *Expert Opinion on Drug Discovery* (Vol. 4, Issue 6). <https://doi.org/10.1517/17460440902926399>
45. Urh, M., Simpson, D., & Zhao, K. (2009). Chapter 26 Affinity Chromatography. General Methods. In *Methods in Enzymology* (Vol. 463, Issue C). [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)63026-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)63026-3)
46. Van Montfort, R. L. M., & Workman, P. (2017). Structure-based drug design: Aiming for a perfect fit. In *Essays in Biochemistry* (Vol. 61, Issue 5). <https://doi.org/10.1042/EBC20170052>
47. Winn, M. D., Ballard, C. C., Cowtan, K. D., Dodson, E. J., Emsley, P., Evans, P. R., Keegan, R. M., Krissinel, E. B., Leslie, A. G. W., McCoy, A., McNicholas, S. J., Murshudov, G. N., Pannu, N. S., Potterton, E. A., Powell, H. R., Read, R. J., Vagin, A., & Wilson, K. S. (2011). Overview of the CCP4 suite and current developments. In *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* (Vol. 67, Issue 4). <https://doi.org/10.1107/S0907444910045749>
48. Yamaguchi, T., Hiromasa, K., Kabashima-Kubo, R., Yoshioka, M., & Nakamura, M. (2013). Galectin-7, induced by cis-urocanic acid and ultraviolet B irradiation, down-modulates cytokine production by T lymphocytes. In *Experimental Dermatology* (Vol. 22, Issue 12). <https://doi.org/10.1111/exd.12268>
49. Yang, R. Y., Rabinovich, G. A., & Liu, F. T. (2008). Galectins: Structure, function and therapeutic potential. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 10(17). <https://doi.org/10.1017/S1462399408000719>
50. Zhu, X., Ding, M., Yu, M. L., Feng, M. X., Tan, L. J., & Zhao, F. K. (2010). Identification of galectin-7 as a potential biomarker for esophageal squamous cell carcinoma by proteomic analysis. *BMC Cancer*, 10. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-10-290>
51. JEREMY M. BERG, J. L. (2021). ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ. ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΕΣ ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΚΡΗΤΗΣ.
52. Γλυκός, Ν. (2015). : Μία μη μαθηματική εισαγωγή στην κρυσταλλογραφία πρωτεϊνών. ΣΥΝΔΕΣΜΟΣ ΕΛΛΗΝΙΚΩΝ ΑΚΑΔΗΜΑΪΚΩΝ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΩΝ.
53. Τσαγκαράκου, Α. (2023, Δεκέμβριος). Η ΔΟΜΙΚΗ ΒΑΣΗ ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗΣ ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΩΝ ΑΠΟ ΑΝΘΡΩΠΙΝΕΣ ΓΑΛΕΚΤΙΝΕΣ. Διδακτορική Διατριβή.