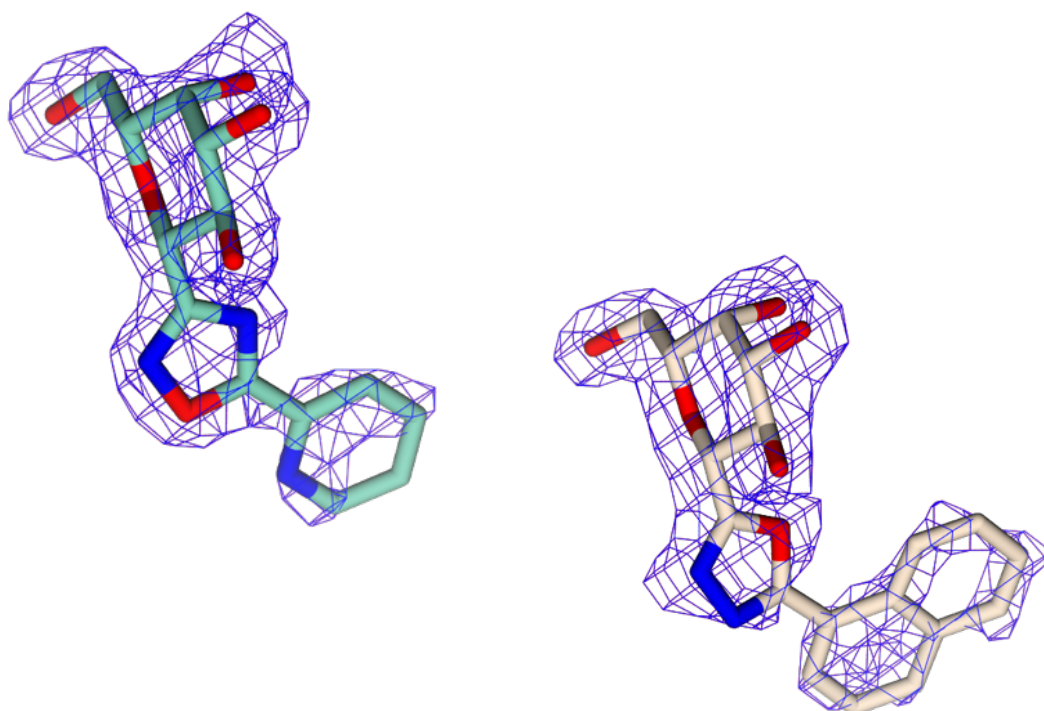


Διπλωματική Εργασία

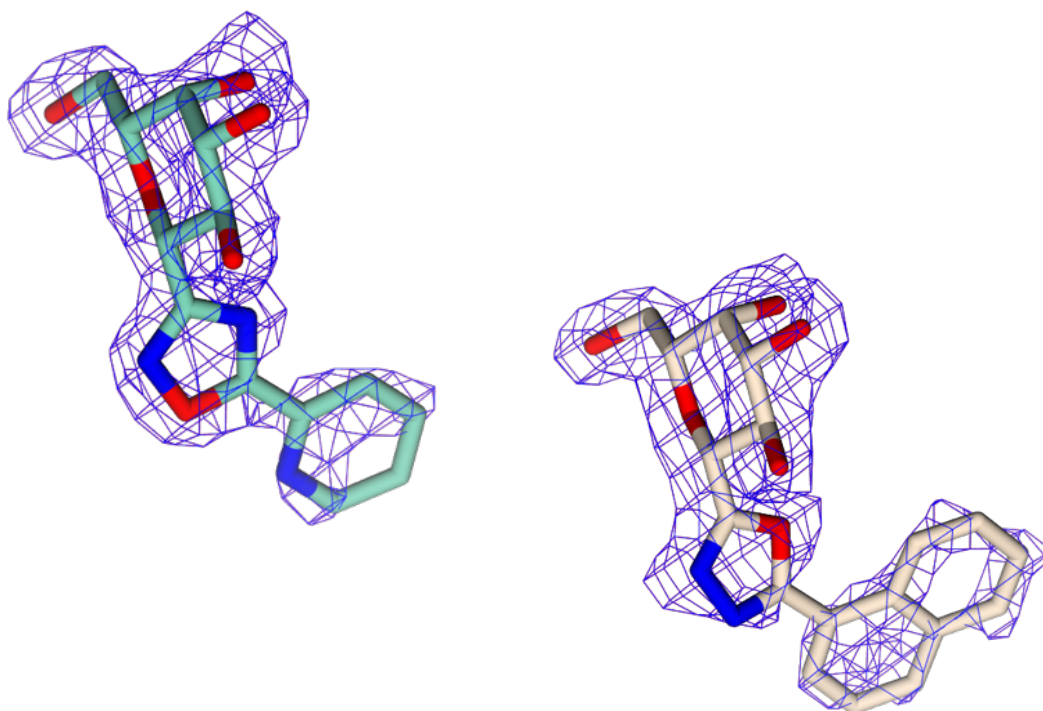
Κρυσταλλογραφική Μελέτη Αναστολέων της Γαλεκτίνης-3



Νεραντζής Γρηγόριος
Λάρισα, 2021

Diploma Thesis

X-Ray Crystallography study of Galectin-3 Inhibitors



Nerantzis Grigorios

Larissa, 2021

Θέμα διπλωματικής εργασίας

« Κρυσταλλογραφική μελέτη αναστολέων της Γαλεκτίνης-3 »

Diploma Thesis

“ X-Ray Crystallography Study of Galectin-3 Inhibitors ”

Ονοματεπώνυμο: Νεραντζής Ν. Γρηγόριος

Επιβλέπων Καθηγητής: Δημήτριος Δ. Λεωνίδας

Εργαστήριο: Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

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

Άννα-Μαρία Ψαρρά: Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Λάρισα, Ελλάδα

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

Περιεχόμενα

Πίνακας περιεχομένων

Περιεχόμενα.....	4
Ευχαριστίες	6
Περίληψη	7
Abstract	8
Κεφάλαιο 1 ^ο – Εισαγωγή	9
1.1. Εισαγωγή στις Λεκτίνες	9
1.1.1. Κατηγοριοποίηση.....	9
1.1.2. Ταξινόμηση και χαρακτηρισμός.....	10
1.1.3. Δομικά χαρακτηριστικά	11
1.1.4. Βιολογικές Ιδιότητες	12
1.2. Λεκτίνες τύπου S – Γαλεκτίνες	12
1.2.1. Γονιδιακή δομή της γαλεκτίνης-3	13
1.2.2. Πρωτεϊνική δομή της γαλεκτίνης-3.....	13
1.2.2.1. Αμινοτελική περιοχή	13
1.2.2.2. Περιοχή αναγνώρισης υδατανθράκων - CRD.....	14
1.2.2.3. Εξειδικευμένη πρόσδεση σακχάρων.....	14
1.2.3. Κυτταρική και ιστολογική κατανομή της γαλεκτίνης-3.....	15
1.2.4. Έκκριση της γαλεκτίνης-3.....	15
1.2.5. Ο Ρόλος της γαλεκτίνης-3 στην απόπτωση	16
1.2.6. Γαλεκτίνη-3 & Καρκίνος	16
1.3. Κρυσταλλογραφία	17
1.3.1. Κρυσταλλική δομή	17
1.3.2. Κρυστάλλωση πρωτεϊνών.....	18
1.3.3. Δομή του μηχανήματος παραγωγής ακτίνων Χ	19
1.3.4. Βελτιστοποίηση του μοριακού μοντέλου	20
Κεφάλαιο 2 ^ο – Σκοπός	21
Κεφάλαιο 3 ^ο – Υλικά και μέθοδοι	22

3.1. Αντιδραστήρια	22
3.2. Οργανολογία	23
3.3. Βακτηριακά στελέχη και πλασμίδια.....	23
3.4. Στήλες χρωματογραφίας.....	23
3.5. Αναλυτικές μέθοδοι.....	24
3.5.1. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών	24
3.5.2. Χρώση πηκτώματος.....	25
3.5.3. Μέθοδος Bradford – Ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών	26
3.5.4. Χημειοτακτικός μετασχηματισμός κυττάρων BL21	26
3.5.5. Επαγωγή με IPTG.....	27
3.5.6. Γρήγη χρωματογραφία - FPLC.....	27
3.5.6.1. Χρωματογραφία συγγένειας	27
3.5.6.1.1. Στήλη Lactosyl Sepharose 4CLB	28
3.5.6.1.2. Στήλη Superdex75.....	29
3.5.7. Νόμος Beer-Lambert	29
3.6. Παρασκευαστικές μέθοδοι.....	29
3.6.1. Καθαρισμός Γαλεκτίνης-3 από μετασχηματισμένα βακτηριακά κύτταρα	29
3.7. Κρυσταλλογραφία	32
3.7.1. Κρυστάλλωση Γαλεκτίνης-3	32
3.7.2. Εμβάπτιση (Soaking) προσδετών KISZ333 & KISZ340	32
3.7.3. Συλλογή και ανάλυση κρυσταλλογραφικών δεδομένων.....	33
3.7.4. Επεξεργασία και βελτιστοποίηση του δομικού μοντέλου	33
Κεφάλαιο 4^ο – Αποτελέσματα	35
4.1. Καθαρισμός και απομόνωση Γαλεκτίνης-3	35
4.2. Ανάλυση και μελέτη των κρυσταλλογραφικών δεδομένων	39
Κεφάλαιο 5^ο - Συζήτηση.....	46
Βιβλιογραφία	48

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας στο Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, υπό την επίβλεψη του καθηγητή Βιοχημείας Δρ. Δημητρίου Λεωνίδα, τον οποίο θα ήθελα να ευχαριστήσω που έκανε δεκτό το αίτημα μου να εκπονήσω την πτυχιακή μου εργασία στο εργαστήριο του. Η καθοδήγηση και επίβλεψη του διαδραμάτισαν καίριο ρόλο στην επίλυση του όποιου προβληματισμού δημιουργούνταν. Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω τους καθηγητές της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής μου Δρ. Άννα-Μαρία Ψαρρά και Δρ. Βασιλική Σκαμνάκη για την άριστη συνεργασία και τις πολύτιμες συμβουλές τους. Ευχαριστώ θερμά την υποψήφια διδάκτορα Αναστασία Τσαγκαράκου για την βοήθεια και την μεταδοτικότητα της καθ'όλη την διάρκεια της εργασίας μου, καθώς και για την προθυμία και υπομονή της στην καθοδήγηση μου σε κάθε στάδιο. Σημαντικό ρόλο στην δημιουργία ενός υγιούς και ευχάριστου εργασιακού περιβάλλοντος διαδραμάτισαν όλα τα μέλη του εργαστηρίου Δομικής και Λειτουργικής Βιοχημείας, πάντοτε πρόθυμοι να βοηθήσουν. Συγκεκριμένα ευχαριστώ τους υποψήφιους διδάκτορες Συμεών Κούλα και Όλγα Παπαϊωάννου.

Τέλος, δεν θα μπορούσα να κλείσω δίχως ευχαριστώντας την οικογένεια μου για την συνεχή και αδιάκοπη υποστήριξη τους καθ'όλη την διάρκεια και πορεία των σπουδών μου, χωρίς αυτούς δεν θα είχα καταφέρει να φέρω εις πέρας τον κύκλο σπουδών μου.

Περίληψη

Οι γαλεκτίνες είναι μία ολοένα και αυξανόμενη οικογένεια λεκτινών τύπου S με ικανότητα πρόσδεσης β γαλακτοζιτών. Ένα κοινό χαρακτηριστικό μεταξύ τους αποτελεί η ύπαρξη τουλάχιστον μίας περιοχής πρόσδεσης μορίων υδατανθράκων *CRD* (*Carbohydrate Recognition Domain*) που δομείται από 130-135 αμινοξικά κατάλοιπα με συγγένεια για β γαλακτοζίτες. Οι γαλεκτίνες είναι πρωτεΐνες του κυτοσολίου, ωστόσο υπάρχουν πολλά στοιχεία για την έκκρισή τους από αυτό μέσω μη κλασσικών μονοπατιών. Πιο συγκεκριμένα η Γαλεκτίνη-3 έχει εντοπιστεί σε ενεργοποιημένα μακροφάγα, ηωσινόφιλα, ουδετερόφιλα, κύτταρα των μαστικών αδένων, στο επιθήλιο του γαστρεντερικού συστήματος και της αναπνευστικής οδού, στα νεφρά καθώς και σε αισθητήριους νευρώνες, ενώ επιπλέον έχει παθολογική έκφραση σε καρκίνους του ανθρώπου όπως για παράδειγμα στο πάγκρεας και τον θυρεοειδή. Η Γαλεκτίνη-3, με μοριακό βάρος 31 kDa, είναι η μοναδική χειμερικού τύπου γαλεκτίνη της οικογένειας των γαλεκτινών. Μοναδικό χαρακτηριστικό της αποτελεί η ύπαρξη μιας εύκαμπτης και μακριάς περιοχής στο αμινοτελικό άκρο, που αποτελείται από επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες εννέα αμινοξέων, σε μία περιοχή 100 με 150 αμινοξέων, πλούσιες σε προλίνη, γλυκίνη, τυροσίνη, γλουταμίνη ενώ λείπουν φορτισμένα και μεγάλα υδρόφοβα κατάλοιπα. Το αμινοτελικό άκρο περιέχει σημεία φωσφορυλίωσης ενώ στο καρβοξυτελικό άκρο υπάρχει η περιοχή *CRD* που την ταυτοποιεί και ως γαλεκτίνη.

Στην εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε έκφραση, απομόνωση, καθαρισμός και κρυστάλλωση του *CRD* της γαλεκτίνης-3 και κρυσταλλογραφική μελέτη της σύνδεσης προσδετών. Η ανάλυση της πρόσδεσης των ενώσεων στην περιοχή *CRD* της γαλεκτίνης-3 προσέφερε πληροφορίες για τα επόμενα βήματα στον κατευθυνόμενο από τη δομή σχεδιασμό προσδετών.

Abstract

The galectins are a growing family of β -galactoside-binding type S lectins. A common characteristic of the galectins is the presence of at least one carbohydrate recognition domain (CRD) of about 130-135 amino acids with affinity for β -galactosides. Galectins are cytosolic proteins, however, there is abundant evidence for their secretion from the cytosol via nonclassical pathways. Galectin-3 has been detected in activated macrophages, eosinophils, neutrophils, mast cells, the epithelium of the gastrointestinal and respiratory tracts, the kidneys and some sensory neurons. Moreover, galectin-3 displays pathological expression in many tumors, e.g., human pancreas and thyroid carcinomas. Galectin-3 (MW 31 kDa) is the sole member of chimera-type family of galectins. Galectin-3 is so far unique in the family in having an extra-long and flexible N-terminal domain consisting of 100-150 amino acid residues made up of repetitive sequence of nine amino acid residues rich in proline, tyrosine, glutamine, and lacking charged or large side-chain hydrophobic residues. The N-terminal domain contains sites for phosphorylation (Ser 6, Ser 12) and other determinants important for the secretion of the lectin by a novel, nonclassical mechanism. The C-terminus is the carbohydrate recognition domain (CRD), consisting of about 135 amino acid residues; this is what defines the molecule as a galectin.

In this study, galectin-3 CRD was expressed, purified and crystallized to analyze by X-ray crystallography ligand binding. Structural analysis of ligand binding to galectin-3 CRD provided valuable information for future structure-based ligand design endeavours.

Κεφάλαιο 1^ο – Εισαγωγή

1.1. Εισαγωγή στις Λεκτίνες

Η πρώτη φορά που χρησιμοποιήθηκε ο όρος λεκτίνες (*Lectins*) ήταν από τους *Boyd* και *Shapleigh*, η οποία προερχόταν από την λατινική λέξη “*Lectus*”, για να διαφοροποιηθεί η οικογένεια αυτή των πρωτεϊνών με την επιλεκτικότητα τους να δεσμεύουν μόρια υδατανθράκων. Μετέπειτα ο όρος αυτός γενικεύτηκε για να περιλαμβάνει όλες τις πρωτεΐνες μη ανοσολογικής προέλευσης με ικανότητα πρόσδεσης υδατανθράκων. Οι λεκτίνες εντοπίζονται τόσο ζωικούς όσο και σε οργανισμούς χωρίς ανοσοποιητικό σύστημα όπως είναι τα φυτά και τα βακτήρια, είτε στο κυτταροδιάλυμα είτε προσδεσμεμένες σε κυτταρικές επιφάνειες. Η ικανότητα τους να προσδέονται με τις κυτταρικές επιφάνειες εξαρτάται από την παρουσία μονο- ή και ολίγο- σακχαριτών. Το 1980, οι λεκτίνες προσδιορίστηκαν ως (γλυκο-) πρωτεΐνες μη ανοσοποιητικής προελεύσεως, που παρουσιάζουν δύο ή και περισσότερα σημεία πρόσδεσης με ικανότητα αναστρέψιμης αλληλεπίδρασης με υδατάνθρακες, γλυκοσυζευγμένα μόρια και συγκολλημένα φυτικά και ζωικά κύτταρα. Από φυσιολογικής απόψεως οι λειτουργίες των λεκτινών βασίζονται στις γενικές τους ιδιότητες καθώς και στην διαφορική τοπολογία τους από ιστό σε ιστό. Ωστόσο, το βασικότερο και κυριότερο χαρακτηριστικό που διαμορφώνει την δράση των πρωτεϊνών αυτών αποτελούν τα εξειδικευμένα κέντρα αναγνώρισης και πρόσδεσης μορίων υδατανθράκων [1].

1.1.1. Κατηγοριοποίηση

Οι λεκτίνες των ζωικών οργανισμών χωρίζονται σε δύο κατηγορίες, σε αυτές που είναι διαλυτές είτε στο κυτταρόπλασμα είτε ενδοκυτταρικά και μπορούν να μετακινούνται ελεύθερα και να αλληλεπιδρούν με διαλυτά είτε με συνδεδεμένα σε μεμβράνες γλυκο-συζεύγματα και σε εκείνες που είναι προσδεσμεμένες σε κυτταρικές μεμβράνες έχοντας δομικό ρόλο ενώ παρουσιάζουν διαφορές τόσο στις ιδιότητες τους όσο και στην εξειδίκευση τους ως προς μόρια υδατανθράκων [2].

1.1.2. Ταξινόμηση και χαρακτηρισμός

Ο διαχωρισμός των λεκτινών γίνεται σε 5 κύριες ομάδες ανάλογα με τα δομικά τους χαρακτηριστικά: Λεκτίνες τύπου *C*, Λεκτίνες τύπου *I*, Γαλεκτίνες (ή λεκτίνες τύπου *S*), πεντραξίνες και λεκτίνες τύπου *P*. Οι λεκτίνες τύπου *C* βασίζονται στην παρουσία ιόντων ασβεστίου (Ca^{2+}) για την πρόσδεση μορίων υδατανθράκων, και χαρακτηρίζονται από καλά συντηρημένες περιοχές αναγνώρισης υδατανθράκων. Οι λεκτίνες τύπου *I* έχουν μία περιοχή αναγνώρισης υδατανθράκων (*Carbohydrate recognition domain – CRD*) παρόμοια με αυτή των ανοσοσφαιρινών. Οι γαλεκτίνες ή λεκτίνες τύπου *S* είναι θειο-εξαρτώμενες και χαρακτηρίζονται από μία καλά συντηρημένη περιοχή αναγνώρισης υδατανθράκων (*CRD*) που είναι εξειδικευμένη για β-γαλακτοζίτες. Οι πεντραξίνες αποτελούνται από πολλές υπομονάδες που εμφανίζονται σε πενταμερή μορφή. Οι λεκτίνες τύπου *P* αποτελούνται από μία παρόμοια, αλλά όχι τόσο καλά χαρακτηρισμένη, περιοχή αναγνώρισης υδατανθράκων και παρουσιάζουν ειδικότητα προς γλυκοπρωτεΐνες που περιέχουν 6-φωσφορική μαννόζη [3].

Υπάρχουν ακόμα δύο ειδών ταξινομήσεις. Η πρώτη γίνεται σε τέσσερις ομάδες ανάλογα με την συγγένεια πρόσδεσης ως προς την γλυκόζη ή μαννόζη, την γαλακτόζη και την *N*-ακετυλ-*D*-γαλακτοζαμίνη, την *L*-φουκόζη και σιαλικά οξέα, ενώ η δεύτερη βασίζεται σε πρωτεΐνες που μοιάζουν με λεκτίνες και περιλαμβάνει τον διαχωρισμό σε *τύπου I & II*, που βασίζονται σε δομικές και εξελικτικές ομοιότητες στην αλληλουχία. Οι λεκτίνες που περιλαμβάνονται σε κάθε κατηγορία παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 1) [1].

Τύπου I	Τύπου II
<i>Beta prism lectins (B Type)</i>	<i>Annexins</i>
<i>Calcium dependent lectins (C Type)</i>	<i>Pentraxins</i>
<i>Ficolins (F Type)</i>	<i>Glycans on α-dextroglycan</i>
<i>Garlic and snow drop lectins (G Type)</i>	<i>CD11b/CD 18 (beta integrins, CR3)— fungal glucans & exposed GlcNAC residues on Glycoproteins</i>
<i>Hyaluronin bonding proteins (H Type)</i>	
<i>Immunoglobulin superfamily lectins (I Type)</i>	
<i>Jacob lectins (J Type)</i>	
<i>Legume seed lectins (L Type)</i>	

α-mannosidase related lectins
(M Type)

Nucleotide phosphohydrolases
(N Type)

Racin lectin (R Type)

Tachypleus tridentatus (T Type)

Wheat germ agglutinin (W Type)

Xanopus egg lectins (X Type)

Πίνακας 1: Ταξινόμηση λεκτινών

Τέλος ακόμα μία οικογένεια λεκτινών είναι αυτές που προσδένουν ραμνόζη (*Rhamnose-binding Lectin / RBL*), η διάκριση αυτή έγινε βασιζόμενη στην χαρακτηριστική τους ειδικότητα πρόσδεσης σακχάρων και στην δομή τους, η οποία αποτελείται από δύο έως τρεις ομόλογες και παράλληλα επαναλαμβανόμενες περιοχές *CRD* (*Carbohydrate recognition domain*) [4].

1.1.3. Δομικά χαρακτηριστικά

Η κατευθυνόμενη από την τρισδιάστατη δομή εξιδίκευση που παρουσιάζουν οι λεκτίνες προς τα μόρια υδατανθράκων αποτελεί ένδειξη για την παρουσία υψηλά συντηρημένου αμινοξικού προφίλ εντός αυτής της πρωτεϊνικής οικογένειας. Η συντήρηση αυτή γίνεται ακόμα πιο εμφανής σε περιοχές καταλοίπων τους που εμπλέκονται στην πρόσδεση με μόρια υδατανθράκων, καθώς λειτουργούν συντονιστικά ως προς απαραίτητα μεταλλικά ιόντα για την ορθή διάταξη των αμινοξικών καταλοίπων καθώς και την ακεραιότητα των υπομονάδων. Κυρίαρχο ρόλο, λοιπόν, στη σταθερότητα των λεκτινών φαίνεται να διαδραματίζουν οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των υπομονάδων. Η εξιδίκευση και η συγγένεια των κέντρων αλληλεπίδρασης επιτυγχάνεται σε μεγάλο βαθμό μέσω δεσμών υδρογόνου, *Van der Waals* και υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων με κατάλοιπα αρωματικών αμινοξέων που βρίσκονται τοπολογικά πιο κοντά στα υδρόφοβα τμήματα των μονοσακχαριτών. Το εύρος και ο αριθμός των κέντρων πρόσδεσης μπορεί να ποικίλει από δύο έως και δώδεκα ανάλογα με την φύση του μορίου και το στάδιο ολιγομερισμού του [2,5].

1.1.4. Βιολογικές Ιδιότητες

Οι λεκτίνες έχουν βρεθεί να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε πολλές διαφορετικές βιολογικές διαδικασίες. Στα φυτά εμπλέκονται σε ποικίλες διαδικασίες με την πιο σημαντική να είναι αυτή της άμυνας εναντίον των παθογόνων όταν εκκρίνονται ως δευτερογενής μεταβολίτες. Σε μικροβιακό επίπεδο λειτουργούν ως υποδοχείς σε κυτταρικές μεμβράνες ξενιστών οδηγώντας σε αλληλεπιδράσεις που προκαλούν μόλυνση στα κύτταρα του ξενιστή. Πολυδύναμες λεκτίνες είναι ικανές να προσδέσουν σάκχαρα που υπάρχουν στην κυτταρική επιφάνεια συγκεκριμένων κυτταρικών τύπων, π.χ. ερυθροκύτταρα, μέσω εξειδικευμένης αναγνώρισης ενός συγκεκριμένου σακχάρου, με αποτέλεσμα τη δημιουργία συσσωματωμάτων μεταξύ των κυττάρων, η ικανότητα τους αυτή χρησιμοποιείται για επιλεκτική συσσωμάτωση των ερυθροκυττάρων και χρησιμοποιείται στον προσδιορισμό των ομάδων αίματος. Τέλος σε ζωικούς οργανισμούς βοηθούν στην αδρανοποίηση παθογόνων, στην ρύθμιση των επιπέδων πρωτεϊνών του αίματος καθώς και στην σύνθεση γλυκοπρωτεϊνών. [1,5,6]

1.2. Λεκτίνες τύπου S – Γαλεκτίνες

Οι γαλεκτίνες ανακαλύφθηκαν βάση της ικανότητας τους να προσδέουν γαλακτοζίτες. Ο χαρακτηρισμός τους ως οικογένεια πρωτεϊνών έγινε με γνώμονα την συντηρημένη περιοχή πρόσδεσης β-γαλακτοζιτών που εντοπίζεται εντός της χαρακτηριστικής περιοχής αναγνώρισης μορίων υδατανθράκων CRD μήκους περίπου 130 αμινοξικών καταλοίπων [7].



Εικόνα 1: Τριτοταγής δομή της περιοχής CRD του καρβοξυτελικού άκρου της γαλεκτίνης-3

Συντίθενται ως πρωτεΐνες του κυτοσολίου και παραμένουν εκεί ή και στον πυρήνα και φτάνουν στους προσδέτες τους μόνο αφού εκκριθούν από το

κύτταρο μέσω ενός μη κλασσικού μηχανισμού που προσπερνάει το σύστημα *Golgi*. Οι γαλεκτίνες είναι μικρά διαλυτά μόρια που περιέχουν μία ή δύο περιοχές *CRD* αλλά κανέναν άλλο τύπου πρωτεϊνικής επικράτειας. Χωρίζονται σε «πρωτότυπες» που αποτελούνται από μία περιοχή *CRD* και σε χιμαιρικές που αποτελούνται από δύο περιοχές *CRD*, στην πρώτη κατηγορία εντάσσονται οι γαλεκτίνες 2, 7 και 10 ενώ στην δεύτερη οι 3, 4, 8, 9, 12. Τέλος, οι γαλεκτίνες, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε αρκετές παθολογικές καταστάσεις, συμπεριλαμβανομένου αυτοάνοσων νοσημάτων, αλλεργικών αντιδράσεων, φλεγμονών, επέκταση όγκων, αθηροσκλήρωση καθώς και διαβητικές επιπλοκές [10].

1.2.1. Γονιδιακή δομή της γαλεκτίνης-3

Η δομή του γονιδίου της γαλεκτίνης-3 συνάδει με την δόμηση των επικρατειών της πρωτεΐνης, αποτελείται από έξι (6) εξόνια και πέντε (5) ιντρόνια (ανθρώπινος χρωμοσωμικός τόπος 14q21-22). Το εξόνιο *I* κωδικοποιεί το μεγαλύτερο κομμάτι της 5' αμετάφραστης περιοχής του *mRNA*. Το εξόνιο *II* περιέχει το υπόλοιπο τμήμα της 5' αμετάφραστης περιοχής, την περιοχή έναρξης της μετάφρασης και τα πρώτα έξι αμινοξέα συμπεριλαμβανομένης της εναρκτήριας μεθειονίνης. Η επαναλαμβανόμενη αλληλουχία του αμινοτελικού άκρου του γονιδιακού προϊόντος κωδικοποιείται εντός του εξονίου *III*. Ενώ τα εξόνια *IV*, *V* και *VI* κωδικοποιούν των υπόλοιπο του καρβοξυτελικού μέρους της πρωτεΐνης [8].

1.2.2. Πρωτεϊνική δομή της γαλεκτίνης-3

Η γαλεκτίνη-3 είναι η μοναδική της οικογένειας που έχει ένα μακρύ και εύκαμπτο αμινοτελικό άκρο δομούμενο από επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες. Το αμινοτελικό άκρο περιλαμβάνει επιπλέον περιοχές φωσφορυλίωσης και άλλους καθοριστικούς παράγοντες για την έκκριση της. Το καρβοξυτελικό άκρο αποτελεί την καλά συντηρημένη περιοχή αναγνώρισης υδατανθράκων (*CRD*) [11].

1.2.2.1. Αμινοτελική περιοχή

Το αμινοτελικό άκρο της γαλεκτίνης-3 αποτελείται από 110-130 αμινοξικά κατάλοιπα και είναι υψηλά συντηρημένα μεταξύ διαφορετικών ειδών. Η εύκαμπτη αυτή περιοχή περιέχει πολλαπλές ομόλογες επαναλήψεις της

αλληλουχίας *Pro-Gly-Ala-Tyr-Pro-Gly* ακολουθούμενη από ακόμα τρία αμινοξέα, ενώ υστερεί σε φορτισμένες και μακριές πλευρικές αλυσίδες υδρόφοβων αμινοξικών καταλοίπων. Παρόλο που το αμινοτελικό άκρο δεν έχει ικανότητα πρόσδεσης μορίων υδατανθράκων είναι απαραίτητο για την πλήρη δραστηριότητα της γαλεκτίνης-3, ενώ επιπλέον μέσω του αμινοξικού καταλοίπου *Tyr102* και των γειτονικών του σε συνδυασμό με την περιοχή *CRD* συμμετέχει στην πρόσδεση υδατανθράκων. Εμπλέκεται, επίσης, και στην έκκριση της γαλεκτίνης-3 έξω από το κύτταρο, μέσω μίας μικρής, υψηλά συντηρημένης, περιοχής των πρώτων 12 αμινοξέων που προηγείται των ομόλογων επαναλήψεων. Πέρα από την έκκριση η μικρή αυτή περιοχή καθορίζει και την αντι-αποπτωτική σηματοδότηση μέσω φωσφορυλίωσης του συντηρημένου καταλοίπου *Ser6* [12].

1.2.2.2. Περιοχή αναγνώρισης υδατανθράκων - CRD

Το καρβοξυτελικό άκρο της γαλεκτίνης-3, η περιοχή πρόσδεσης υδατανθράκων (*CRD*), αποτελείται από 130 αμινοξέα που σχηματίζουν μία σφαιρική δομή και είναι υπεύθυνο για την λειτουργία της ως λεκτίνη. Το μοτίβο αναδίπλωσης της περιοχής *CRD* αποτελείται από δύο αντι-παράλληλα β-πτυχωτά φύλλα που δομούνται από 5 και 6 β-κλώνους, αντίστοιχα (**Εικόνα 1**) Εντός της περιοχής *CRD* περιέχεται η αμινοξική αλληλουχία *NWGR*, το συντηρημένο αυτό μοτίβο εντοπίζεται στην επικράτεια *BH1* της οικογένειας πρωτεϊνών *Bcl-2* και οφείλεται τόσο για τις αντι-αποπτωτικές ιδιότητες της *Bcl-2* όσο και της γαλεκτίνης-3. Τέλος, παρουσιάζει παρόμοια τρισδιάστατη δομή με αυτή του *CRD* της ομοδιμερούς γαλεκτίνης-1 και -2 με τις οποίες μοιράζεται 20-25% ομολογία [7].

1.2.2.3. Εξειδικευμένη πρόσδεση σακχάρων

Η γαλεκτίνη-3 παρουσιάζει μεγαλύτερη συγγένεια και επιλεκτικότητα ως προς την *N*-ακετυλ-λακτοζαμίνη, ενώ περιέχει ένα εκτεταμένο κέντρο πρόσδεσης ικανό να αλληλεπιδράσει με μεγαλύτερους ολιγοσακχαρίτες. Το αμινοξικό κατάλοιπο *Arg144* στην ανθρώπινη γαλεκτίνη-3, που λείπει από άλλες γαλεκτίνες, εμπλέκεται στην πρόσδεση μονάδων σακχάρων συνδεδεμένων με μία τελική λακτόζη με β δεσμό στο *O*-3.

Η αλληλεπίδραση της γαλεκτίνης-3 με κάποιον προσδέτη συνοδεύεται από αλλαγές στην διαμόρφωση και αναδιάταξη των βρόχων κοντά στο κέντρο πρόσδεσης. Επιπροσθέτως, η φωσφορυλίωση στη *Ser6* επηρεάζει σημαντικά

την πρόσδεση με μόρια σακχάρων ομοιάζοντας με διακόπτη που ρυθμίζει τις περαιτέρω βιολογικές δράσεις [10].

1.2.3. Κυτταρική και ιστολογική κατανομή της γαλεκτίνης-3

Η γαλεκτίνη-3 συναντάται σε ανιχνεύσιμα επίπεδα σε ενεργοποιημένα μακροφάγα, ηωσινόφιλα, ουδετερόφιλα, κύτταρα των μαστικών αδένων, στο επιθήλιο του γαστρεντερικού συστήματος και της αναπνευστικής οδού, στα νεφρά καθώς επίσης και σε κάποιους αισθητήριους νευρώνες, ενώ, παρουσιάζει παθολογική έκφραση σε αρκετούς όγκους, όπως για παράδειγμα σε καρκινώματα του παγκρέατος, εντέρου και του θηριώδους.

Σε κυτταρικό επίπεδο η γαλεκτίνη-3 εντοπίζεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα, ωστόσο έχει ανιχνευθεί στον πυρήνα, στη κυτταρική επιφάνεια καθώς και στο εξωκυτταρικό περιβάλλον. Στην ενεργή πυρηνική μεταφορά σημαντικό ρόλο έχει η περιοχή *NES (Nuclear export signal)* που είναι πλούσια σε προλίνη και εντοπίζεται στις θέσεις 241-249 εντός της περιοχής *CRD*. Ωστόσο σημαντικό ρόλο στη μετακίνηση αυτή καθώς και στην αντι-αποπτωτική δράση της γαλεκτίνης-3 διαδραματίζει και η φωσφορυλίωση στο αμινοτελικό άκρο στη Ser6 από την κινάση της καζεΐνης I [14].

Στον πυρήνα η γαλεκτίνη-3 εμπλέκεται στο μάτισμα των πρώιμων *mRNA* και στην γονιδιακή έκφραση καθώς και στην ρύθμιση της μεταγραφής μέσω διαφόρων μηχανισμών [13].

1.2.4. Έκκριση της γαλεκτίνης-3

Η γαλεκτίνη-3 συντίθεται σε ελεύθερα ριβοσώματα στο κυτταρόπλασμα ενώ δεν έχει καμία σηματοδοτική αλληλουχία για μετατόπιση προς το ενδοπλασματικό δίκτυο (*ER*). Η συγκεκριμένη λεκτίνη εκκρίνεται με ένα μηχανισμό εξωκύτωσης που είναι ανεξάρτητος από το κλασσικό μονοπάτι έκκρισης μέσω του ενδοπλασματικού δικτύου και του συστήματος *Golgi*. Σημαντικό ρόλο στην έκκριση έχει βρεθεί ότι διαδραματίζει μία αμινοξική αλληλουχία καταλοίπων του αμινοτελικού άκρου της γαλεκτίνης-3 που εντοπίζεται μεταξύ των θέσεων 89-96 και αποτελείται από *Tyr-Pro-Ser-Ala-Pro-Gly-Ala-Tyr*, ωστόσο αυτή η αλληλουχία από μόνη της δεν επαρκεί για να προκαλέσει άμεση έκκριση, υποδεικνύοντας ότι έχει λειτουργικό ρόλο σε

ευρύτερο συνδυαστικό πλαίσιο στην αμινοτελική περιοχή της πρωτεΐνης [10,15,16].

1.2.5. Ο Ρόλος της γαλεκτίνης-3 στην απόπτωση

Η γαλεκτίνη-3 περιέχει ένα μοτίβο 4 αμινοξέων, *Asn-Trp-Gly-Arg*, το οποίο είναι υψηλά συντηρημένο εντός της επικράτειας *BH1* της οικογένειας των πρωτεϊνών *Bcl-2* (αντιαποπτωτική πρωτεΐνη) που είναι κρίσιμο για την λειτουργικότητα της πρωτεΐνης *Bcl-2* στην αναστολή της απόπτωσης.

Ένας πιθανός μηχανισμός, λοιπόν, με τον οποίο η γαλεκτίνη-3 ρυθμίζει την απόπτωση είναι η μίμηση της πρωτεΐνης *Bcl-2*, μίας μιτοχονδριακής πρωτεΐνης που εντοπίζεται στις εξωτερικές μεμβράνες και ρυθμίζει την απόπτωση μπλοκάροντας την απελευθέρωση κυτοχρώματος C. Η αναστολή της νιτροεπαγώμενης απόπτωσης από τη γαλεκτίνη-3 σε κύτταρα *BT 549* περιλάμβανε προστασία της ακεραιότητας των μιτοχονδρίων, την αναστολή της απελευθέρωσης του κυτοχρώματος C και την ενεργοποίηση της κασπάσης. Συνεπώς, η ρύθμιση της απόπτωσης από την γαλεκτίνη-3 είναι άμεσα σχετιζόμενη με τα μιτοχόνδρια [17,18].

1.2.6. Γαλεκτίνη-3 & Καρκίνος

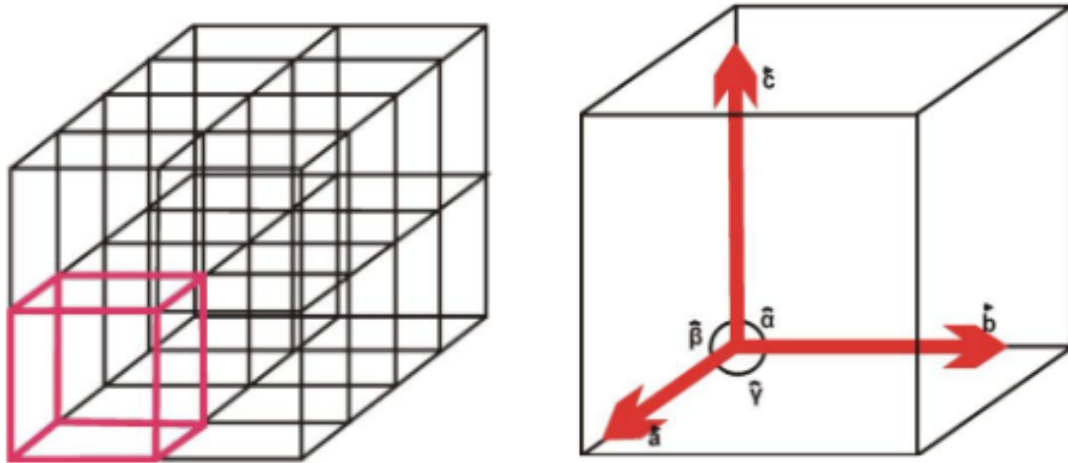
Η γαλεκτίνη-3 διαδραματίζει πολλαπλό ρόλο στην καρκινική παθογένεση, την διαφοροποίηση καθώς και στην εξάπλωση μεταστάσεων. Σε συγκεκριμένους καρκινικούς τύπους τόσο τα επίπεδα έκφρασης όσο και η ενδοκυτταρική της κατανομή παρουσιάζονται τροποποιημένα, ενώ η πυρηνική τοπολογία της συνδέεται με αντικαρκινικές επιδράσεις και η κυτταρική με την εξέλιξη νεοπλασμάτων. Σε καρκινώματα του θυροειδούς η έκφραση της γαλεκτίνης-3 εμφανίζει υπερέκφραση, ενώ το *mRNA* της εντοπίστηκε σε όλες τις κακοήθειες αλλοιώσεις ενώ απουσίαζε από τον υγιή ιστό [22]. Παρομοίως υπερέκφραση παρουσιάζεται σε επίπεδο πρωτεΐνης και *mRNA* και σε καρκινώματα του παγκρέατος, παρόλα αυτά δεν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων έκφρασης και του καρκινικού σταδίου [25]. Στο επίπεδο του ήπατος, τα φυσιολογικά κύτταρα δεν εκφράζουν γαλεκτίνη-3 παρόλα αυτά μπορεί να εντοπιστεί σε περιπτώσεις καρκινώματος. Συσχετισμός μεταξύ ιστορικού ηπατίτιδας B και έκφρασης της λεκτίνης οδήγησε στο συμπέρασμα ότι δεν επηρεάζεται η έκφραση της, παρόλα αυτά η μόλυνση με *HBV* μπορεί να λειτουργήσει ενεργοποιητικά ως προς έναν μηχανισμό *trans* ενεργοποίησης

του υποκινητή της γαλεκτίνης-3. [23]. Σε υγιή μαστικά κύτταρα εντοπίστηκαν υψηλά επίπεδα έκφρασης της γαλεκτίνης-3 ενώ αντιθέτως σε καρκινική κατάσταση παρουσίασαν πτώση, η οποία σχετίζεται με την παράλληλη αύξηση του ιστολογικού βαθμού και συνεπώς την απόκτηση μεταστατικής δυναμικής [27]. Σύγκριση των επιπέδων έκφρασης σε υγιή και καρκινικά κύτταρα του προστάτη έδειξε μειωμένη έκφραση στον καρκινικό φαινότυπο. Σε μελέτη δείγματος 145 ατόμων με καρκίνο του προστάτη εντοπίστηκε μετατόπιση της γαλεκτίνης-3 σε σύγκριση με τα φυσιολογικά, τα οποία παρουσιάζουν έκφραση της λεκτίνης και στον πυρήνα και στο κυτταρόπλασμα. Επιπλέον σε αρκετές περιπτώσεις υπήρχε έκφραση στο κυτταρόπλασμα και όχι στον πυρήνα, γεγονός που υποδηλώνει τόσο την πιθανή αντικαρκινική δράση εντός του πυρήνα αλλά και την υποβοήθηση του καρκινικού φαινοτύπου όταν υπάρχει στο κυτταρόπλασμα [24]. Τέλος στο νευρικό σύστημα υπάρχει επίσης συσχετισμός των επιπέδων έκφρασης της γαλεκτίνης-3 με καρκινικό φαινότυπο και πιο συγκεκριμένα με το γλοίωμα [26].

1.3. Κρυσταλλογραφία

1.3.1. Κρυσταλλική δομή

Κρύσταλλος ονομάζεται ένα στερεό με ομοιόμορφη χημική σύσταση το οποίο διαμορφώνεται από επίπεδες έδρες που σχηματίζουν επακριβώς προσδιορισμένες γωνίες, δομικές ομάδες των κρυστάλλων αποτελούν τα άτομα, τα ιόντα και οι ομάδες ιόντων. Τα άτομα σχηματίζουν συμμετρικά μοτίβα που επαναλαμβάνονται περιοδικά οικοδομώντας τον κρύσταλλο. Η μοναδιαία ή αλλιώς στοιχειώδης κυψελίδα αποτελεί το μικρότερο σχήμα που αποδίδει πλήρως τη συμμετρία της κρυσταλλικής δομής. Ο κρύσταλλος αναπτύσσεται και προς τις τρεις κατευθύνσεις με την στοίχιση ιόντων και μορίων γύρω από την μοναδιαία κυψελίδα. Κάθε κρυσταλλικό πλέγμα



Εικόνα 2: Κρυσταλλικό πλέγμα (Α), μοναδιαία κυψελίδα (Β)

χαρακτηρίζεται από: 1) τους κρυσταλλικούς άξονες που αναφέρονται στο σύστημα αξόνων x, y, z του πλέγματος και συμβολίζονται με τα διανύσματα a, b και c , 2) τις γωνίες α, β και γ των αξόνων του καθώς και 3) το γεωμετρικό σχήμα της στοιχειώδους κυψελίδας (Εικόνα 2) [28]

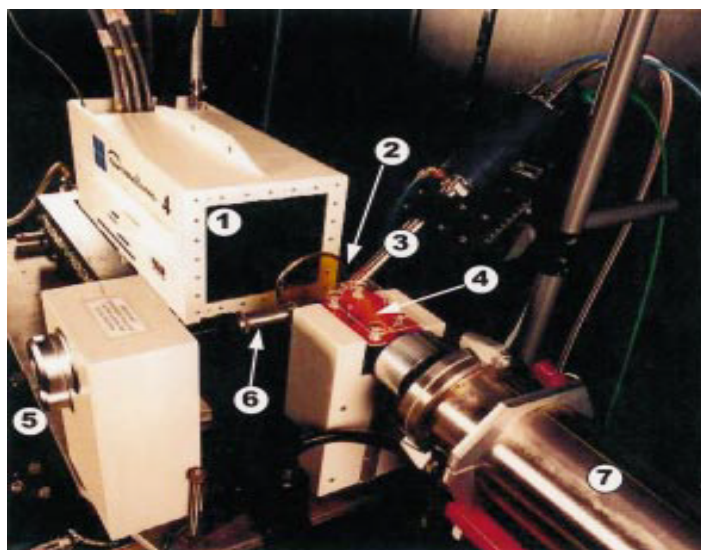
1.3.2. Κρυστάλλωση πρωτεϊνών

Για την επιτυχή εκτέλεση ενός πειράματος κρυσταλλογραφίας απαιτείται η ύπαρξη μίας αξιόπιστης πηγής της πρωτεΐνης καθώς και ενός πρωτόκολλου καθαρισμού που θα δώσει υψηλής καθαρότητας και ομογενές υλικό. Η αρχή της κρυστάλλωσης είτε αυτή αφορά μακρομόρια είτε άλατα είναι επαγωγή ενός διαλύματος υψηλής συγκέντρωσης δείγματος όπου υπό τις κατάλληλες συνθήκες θα εξαχθεί με αποτέλεσμα την ανάπτυξη κρυστάλλων. Οι μεταβλητές που λαμβάνονται υπόψη είναι: το pH , η θερμοκρασία, το ρυθμιστικό διάλυμα, η συγκέντρωση της πρωτεΐνης, η μέθοδος κρυστάλλωσης καθώς και η επιλογή του καταβυθιστικού παράγοντα και της συγκέντρωσής του. Τα πρώτα πειράματα αποτελούν δοκιμαστικά για τον επιτυχή προσδιορισμό όλων των παραπάνω πιθανών παραγόντων, στο βήμα αυτό χρήσιμο εργαλείο είναι έτοιμα πακέτα διαφορετικών συνδυασμών των παραπάνω παραγόντων όπου είτε σε θερμοκρασία δωματίου είτε στους $4^{\circ}C$ με την εφαρμογή κατάλληλων μεθόδων διάχυσης (*hanging drop vapour diffusion*, *sitting drop vapour diffusion* ή διάλυση) καλύπτεται μεγάλο εύρος συνθηκών. Από τις παραπάνω δοκιμές υπάρχει πιθανότητα να αναπτυχθούν κρύσταλλοι, ωστόσο πιο πιθανό στο στάδιο αυτό είναι να δούμε είτε κατακρήμνιση, είτε μικροκρυστάλλους ή πολύ λίγους και μικρούς κρυστάλλους είτε και τίποτα. Παρόλα αυτά η ύπαρξη είτε μικροκρυστάλλων

είτε λίγων και μικρών είναι ενθαρρυντική για την ικανότητα της πρωτεινης να κρυσταλλώνεται υπό τις κατάλληλες συνθήκες. Για την ανάλυση περιθλασης συνήθως απαιτείται μέγεθος κρυστάλλου τουλάχιστον $0,1\text{ mm}$ ώστε να υπάρχει επαρκής περιοχή να προσπίπτει η ακτίνα, τεχνικές που βοηθούν στην βελτίωση του μεγέθους του κρυστάλλου είναι: η αλλαγή της θερμοκρασίας, της συγκέντρωσης ή και το *seeding*. [29]

1.3.3. Δομή του μηχανήματος παραγωγής ακτινών X

Οι ακτίνες X παράγονται από επιταχυνόμενα ηλεκτρόνια που χτυπούν σε μία χάλκινη άνοδο όπου παράγεται ένα κυρίως μήκος κύματος. Αυτές πρέπει να είναι εστιασμένες και ευθυγραμμισμένες, με σχισμές διαμέτρου $0.1-0.3\text{ mm}$, σε μία ακτίνα για να εξασφαλιστεί ότι βρίσκονται όσο πιο παράλληλα και μακριά γίνεται. Ο κρύσταλλος τοποθετείται στην ακτίνα και ρυθμίζεται με το γωνιόμετρο ώστε να παραμείνει κεντραρισμένος καθώς ο βραχίονας



Εικόνα 3: Ανιχνευτής (1), Beamstop (2), Αγωγός αζώτου (3), ο βραχίονας που βρίσκεται ο κρύσταλλος (6), Γωνιόμετρο (5), Ακτίνα X (7)

περιστρέφεται. Τέλος υπάρχει και το beamstop, μεταξύ του κρυστάλλου και του ανιχνευτή, που τον προστατεύει από την ακτίνα (Εικόνα 3) [30].

1.3.4. Βελτιστοποίηση του μοριακού μοντέλου

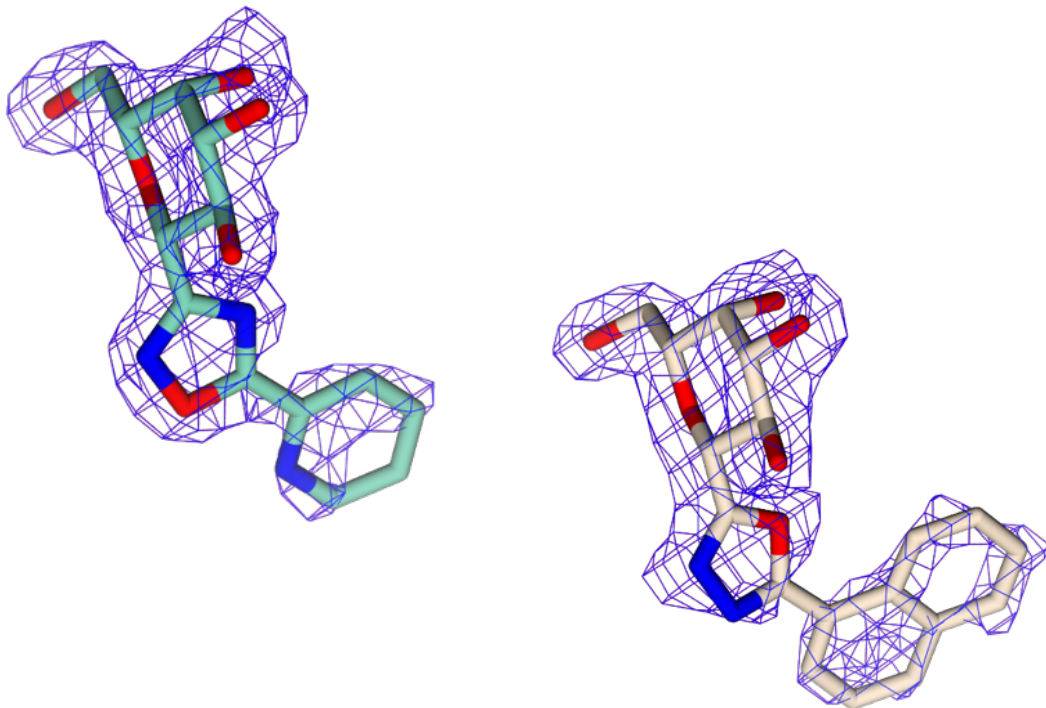
Η ποιότητα του χάρτη ηλεκτρονιακής πυκνότητας είναι άμεσα σχετιζόμενη με την ποιότητα του μοντέλου και των πειραματικών δεδομένων, βελτιστοποίηση των δεδομένων μπορεί να γίνει με την συλλογή καλύτερων δεδομένων περίθλασης. Συνεπώς, είναι δυνατή η βελτιστοποίηση του μοντέλου με βελτίωση της δομής, με σκοπό να ταιριάζει καλύτερα στην ηλεκτρονιακή πυκνότητα. Κριτήριο αξιολόγησης για το κατά πόσο το μοντέλο, που υπόκειται σε μικρές βελτιωτικές αλλαγές, συνάδει με τα δεδομένα είναι ο παράγοντας R , ο οποίος ορίζεται και ως:

$$R = \frac{\sum |F(S)_{obs}| - |F(S)_{calc}|}{\sum |F(S)_{obs}|}$$

Ο παράγοντας αξιοπιστίας R κυμαίνεται μεταξύ των τιμών 0,7 (70 %) και 0%, όπου στη πρώτη περίπτωση αναφερόμαστε σε ένα τυχαίο ταίριασμα ενώ στην δεύτερη στο ιδανικό. Ωστόσο, από ανάγκη για την ύπαρξη ενός παράγοντα που δεν θα προκαταβάλλεται από το ίδιο το μοντέλου προέκυψε το εξής: από το σύνολο των πειραματικών δεδομένων διαχωρίζεται το 10% και χρησιμοποιείται ως δείγμα ελέγχου. Η βελτιστοποίηση του μοντέλου συνεχίζεται με τα υπόλοιπα δεδομένα, ενώ ο παράγοντας R υπολογίζεται και για το σετ στο οποίο δουλεύουμε αλλά και για το σετ του δείγματος ελέγχου, ο δεύτερος παράγοντας αυτός ονομάζεται R_{free} . [31]

Κεφάλαιο 2^ο – Σκοπός

Η γαλεκτίνη-3 ρυθμίζει βασικές κυτταρικές λειτουργίες όπως αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κυττάρων, τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση. Επιπλέον εμπλέκεται και στην παθογένεση πολλών ασθενειών συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου, της ίνωσης και της χρόνιας φλεγμονής. Λόγω του λειτουργικού ρόλου της σε πολλές ασθένειες, η γαλεκτίνη-3 αναδεικνύεται ως ένας νέος διαγνωστικός, προγνωστικός βιοδείκτης και ως ένας νέος πολλά υποσχόμενος θεραπευτικός στόχος. Γι' αυτό τον λόγο έχει προκύψει μεγάλο ενδιαφέρον για την εύρεση εν δυνάμει αναστολέων που ανταγωνίζονται τους φυσικούς υποκαταστάτες της, καθώς πολλοί από τους ρόλους της σε ασθένειες απαιτούν την πρόσδεση γλυκοσυζευγμάτων. Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η κρυσταλλογραφική μελέτη της σύνδεσης δύο προσδετών της Γαλεκτίνης-3.



Κεφάλαιο 3^ο – Υλικά και μέθοδοι

3.1. Αντιδραστήρια

Αντιδραστήριο	Εταιρία
<i>Acetic Acid (CH₃COOH)</i>	<i>Sds</i>
<i>Ammonium Persulfate (APS)</i>	<i>Serva</i>
<i>Acrylamide</i>	<i>Serva</i>
<i>Bradford protein assay 5x</i>	<i>BioRad</i>
<i>Bromophenol blue</i>	<i>Research Organics</i>
<i>Coomasie Brilliant Blue R-250</i>	<i>Fluka</i>
<i>Dimethyl sulfoxide (DMSO)</i>	<i>Panreac</i>
<i>Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)</i>	<i>Panreac</i>
<i>Glycerol</i>	<i>Applichem</i>
<i>Glycine (C₂H₅NO₂)</i>	<i>Serva</i>
<i>Kanamycin</i>	<i>Serva</i>
<i>KH₂PO₄</i>	<i>Merck</i>
<i>LB Agar</i>	<i>Serva</i>
<i>LB Broth</i>	<i>Serva</i>
<i>Magnesium Chloride anhydrous (MgCl₂)</i>	<i>Alfa Aesar</i>
<i>Na₂HPO₄</i>	<i>Merck</i>
<i>NaCl</i>	<i>Scharleu</i>
<i>PEG8000</i>	<i>Sigma</i>
<i>Potassium chloride (KCl)</i>	<i>Merck</i>
<i>SDS</i>	<i>Serva</i>
<i>TEMED</i>	<i>Invitrogen</i>
<i>Tris Ultra Pure</i>	<i>Applichem</i>
<i>β-Mercaptoethanol</i>	<i>Sigma</i>

3.2. Οργανολογία

Όργανο	Εταιρία
ΆΚΤΑ purifier (FPLC system)	GE Healthcare Life Sciences
Αυτόματες πιπέτες	Gilson
Κάθετη συσκευή ηλεκτροφόρησης (mini gel)	BioRad
Μετρητής pH	Metrohm
Φυγόκεντροι	Centrifuge 5814R, Eppendorf Z36HK, HermLe CR-22N Himac, HITACHI
Φασματοφωτόμετρο	VWR
Σύστημα περίθλασης ακτινών Χ	Microstar Bruker Rotating Anode
Ανιχνευτής ακτινών Χ	marXperts GmbH
Σύστημα ψύξης αζώτου	Oxford Cryosystems
Στερεοσκόπιο	OlympusTL2
Φίλτρα με πόρους 0,45 μM	Sartorius System
Φίλτρα συμπύκνωσης vivaspin 10000 cut-off	Sartorius System

3.3. Βακτηριακά στελέχη και πλασμίδια

Κύτταρα	<i>E. coli</i> BL-21 Gold (DE3)	Agilent Technologies
Πλασμίδια	<i>Pet28</i>	

3.4. Στήλες χρωματογραφίας

Στήλες συγγένειας	<i>Lactosyl Sepharose 4CLB</i>	GE Healthcare Life Sciences
Στήλες μοριακής διήθησης	<i>Superdex75</i>	GE Healthcare Life Sciences

3.5. Αναλυτικές μέθοδοι

3.5.1. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών

Η ηλεκτροφόρηση αποτελεί την μετακίνηση φορτισμένων σωματιδίων, συμπεριλαμβανομένων μεγάλων μορίων όπως π.χ. πρωτεϊνών ή DNA, σε ένα ρευστό μέσο υπό την άσκηση ηλεκτρικού πεδίου. Η κινητήριος δύναμη στα φορτισμένα μόρια είναι προϊόν του φορτίου και του ηλεκτρικού πεδίου κατά μήκος του ηλεκτρώματος διαχωρισμού. Η ευρύτερα χρησιμοποιούμενη μέθοδος είναι η ηλεκτροφόρηση υπό αποδιατακτικές συνθήκες (*SDS-PAGE*), όπου η πρωτεΐνες μετακινούνται δια μέσω πόρων στο πήκτωμα που σχηματίζονται μεταξύ πολυμερών ακρυλαμίδης.

Το σημείο “κλειδί” της ηλεκτροφόρησης είναι το πήκτωμα. Αυτό καθορίζει κυρίως την ταχύτητα μετακίνησης των πρωτεϊνών εκτός από το φορτίο τους και τις σταθεροποιεί στη συγκεκριμένη θέση μέχρι το τέλος της ηλεκτροφόρησης, ώστε να οπτικοποιηθεί στη συνέχεια με χρώση του ηλεκτρώματος. Για την ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών χρησιμοποιείται κυρίως πολυακρυλαμίδα. Η ηλεκτική πολυακρυλαμίδου προτιμάται διότι μπορούμε να καθορίσουμε το μέγεθος των πόρων, για τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών, και καθορίζεται επίσης από τις συνθήκες πολυμερισμού αλλάζοντας τη συγκέντρωση του μονομερούς, η αντίδραση πολυμερισμού είναι εύκολη, τα ηλεκτρώματα πολυακρυλαμίδης είναι υδρόφιλα και ηλεκτρικά ουδέτερα τη στιγμή που παρασκευάζονται. Το πήκτωμα σχηματίζεται με αντίδραση συμπολυμερισμού ακρυλαμίδου και N,N'-μεθυλενο-δισ-ακρυλαμίδου (αντιδραστήριο διασταύρωσης). Το αποτέλεσμα είναι ο σχηματισμός μακρών αλυσίδων ακρυλαμίδου που συνδέονται με εγκάρσιες γέφυρες μορίων δισ-ακρυλαμίδου, δημιουργώντας ηλεκτρώματα με μέγεθος πόρων που εξαρτώνται από την αναλογία των δύο μορίων αλλά και από την ολική συγκέντρωσή. Έτσι αύξηση της συγκέντρωσης του ακρυλαμίδου, οδηγεί στη μείωση του μεγέθους των πόρων και το αντίστροφο. Η συγκέντρωση του ακρυλαμίδου που θα χρησιμοποιηθεί τελικά, εξαρτάται από το μοριακό βάρος των πρωτεϊνών που θέλουμε να διαχωρίσουμε.

Ο πολυμερισμός γίνεται παρουσία μίας ουσίας που παρέχει ελεύθερες ρίζες (απαρχητής) όπως π.χ. το υπερθειικό αμμώνιο (*APS*), και ενός καταλύτη, όπως είναι η N,N,N',N'-τετραμεθυλο-αιθυλενοδιαμίνη (*TEMED*), που καταλύει το σχηματισμό ελεύθερων ριζών. Οι ελεύθερες ρίζες καταλύουν την αντίδραση πολυμερισμού και έτσι η όλη αντίδραση πολυμερισμού πρέπει να γίνεται απουσία O₂, αφού αυτό μπορεί να δεσμεύει της ελεύθερες ρίζες και ως εκ τούτου να σταματήσει τη δημιουργία της ηλεκτικής.

Με την ηλεκτροφόρηση *SDS-PAGE* γίνεται διαχωρισμός των πρωτεϊνών με βάση τη διαφορετική μοριακή μάζα τους. Στο μίγμα των πρωτεϊνών προστίθεται *SDS* (δωδεκάκυκλο-θειικό νάτριο) το οποίο συνδέεται στις πρωτεΐνες μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων, με αποτέλεσμα να καταστρέφονται οι μη ομοιοπολικοί δεσμοί των πρωτεϊνών. Σε ένα εφαρμοσμένο ηλεκτρικό πεδίο οι πρωτεΐνες, οι οποίες είναι πια αρνητικά φορτισμένες λόγω και του *SDS*, κινούνται προς την άνοδο με διαφορετικούς ρυθμούς ανάλογα με το μοριακό τους βάρος. Το σύστημα αποτελείται από το πήκτωμα επιστοιβαξης (*stacking gel*) που έχει *pH* 6.8 (*Tris-HCl*, *pH* 6.8) και από το πήκτωμα διαχωρισμού το *separating gel* με *pH* 8.8 (*Tris-Glycine*, *pH* 8.8). Πρέπει να επισημανθεί ότι η γλυκίνη μπορεί να είναι θετικά, ουδέτερα ή αρνητικά φορτισμένη, ανάλογα με το *pH*. Όταν η ισχύς είναι ενεργοποιημένη, τα αρνητικά φορτισμένα ιόντα γλυκίνης στο ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροδίων *pH* 8.8 αναγκάζονται να εισέλθουν στο πήκτωμα, όπου το *pH* είναι 6,8. Σε αυτό το περιβάλλον, η γλυκίνη μεταβαίνει κυρίως στην ουδέτερα φορτισμένη κατάσταση. Αυτή η απώλεια φορτίου τους αναγκάζει να μετακινούνται πολύ αργά στο ηλεκτρικό πεδίο. Τα ιόντα *Cl* (από το *Tris-HCl*), από την άλλη, κινούνται πολύ πιο γρήγορα στο ηλεκτρικό πεδίο και σχηματίζουν ένα μέτωπο ιόντων που μεταναστεύει μπροστά από τη γλυκίνη. Ο διαχωρισμός του *Cl* από το ιόν *Tris* (που κινείται τώρα προς την άνοδο) δημιουργεί μια στενή ζώνη που τραβάει τη γλυκίνη πίσω από αυτό, με αποτέλεσμα δύο στενά διαχωρισμένα μέτωπα μεταναστευτικών ιόντων, τα οποία είναι το εξαιρετικά κινητικό μέτωπο *Cl*, ακολουθούμενο από το πιο αργό, κυρίως ουδέτερο μέτωπο γλυκίνης. Όλες οι πρωτεΐνες στο δείγμα πηκτώματος έχουν ηλεκτροφορητική κινητικότητα που είναι ενδιάμεση της κινητικότητας της γλυκίνης και του *Cl*, και έτσι οι πρωτεΐνες συμπυκνώνονται στη στενή ζώνη μεταξύ του *Cl* και γλυκίνης. Αυτό συνεχίζεται μέχρι να φτάσουν στο σημείο του πηκτώματος, όπου το *pH* είναι 8,8. Σε αυτό το *pH* τα μόρια γλυκίνης είναι ως επί το πλείστον αρνητικά φορτισμένα και μπορούν να μεταναστεύσουν πολύ γρηγορότερα από τις πρωτεΐνες. Έτσι, το μέτωπο γλυκίνης επιταχύνει αφήνοντας πίσω του τις πρωτεΐνες. Το αποτέλεσμα είναι ότι οι πρωτεΐνες βρίσκονται σε μία πολύ στενή ζώνη ανάμεσα στο πήκτωμα επιστοιβαξης και στο πήκτωμα διαχωρισμού και δεδομένου ότι η πηκτή διαχωρισμού έχει αυξημένη συγκέντρωση ακρυλαμιδίου, η οποία επιβραδύνει την κίνηση των πρωτεϊνών ανάλογα με το μέγεθός τους, αρχίζει ο διαχωρισμός [32].

3.5.2. Χρώση πηκτώματος

Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα τοποθετείται σε 10 % v/v διάλυμα οξικού οξέος μέχρι βρασμού σε φούρνο μικροκυμάτων για περίπου 1 λεπτό. Ακολουθεί απόρριψη του οξικού οξέος, προσθήκη διαλύματος χρώσης

(0.1 % *Coomassie Blue R250*, 10 % οξικό οξύ και 50 % μεθανόλη), τοποθέτηση του πηκτώματος πάλι στο φούρνο μικροκυμάτων μέχρι βρασμού και ανάδευση για 10 λεπτά. Μετά το πέρας των 10 λεπτών αποχύνεται η χρωστική και προστίθεται διάλυμα οξικού οξέος 10 % v/v. Ακολουθεί ξανά βράσιμο σε φούρνο μικροκυμάτων για 1 λεπτό και το συγκεκριμένο βήμα επαναλαμβάνεται έως ότου αποχρωματιστεί εντελώς.

3.5.3. Μέθοδος Bradford – Ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών

Από τις πιο διαδεδομένες και ευρέως χρησιμοποιούμενες μεθόδους ποσοτικοποίησης πρωτεϊνών είναι η μέθοδος *Bradford*. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στο εύρος των απορροφήσεων της και την πρόσδεση της χρωστικής *Coomassie Blue G250* στα κατάλοιπα λυσίνη και αργινίνη. Υπό όξινες συνθήκες, η χρωστική αυτή αντιδρά με τα αμινοξέα των πρωτεϊνών, έχοντας ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός σταθερού χρωμοφόρου συμπλόκου πρωτεΐνης-χρωστικής, το οποίο σταθεροποιεί την μπλε ανιονική μορφή της χρωστικής *Commassie*. Το σύμπλοκο αυτό εμφανίζει μέγιστη απορρόφηση σε μήκος κύματος 595 nm. Η αύξηση της οπτικής απορρόφησης είναι ενδεικτική της περιεκτικότητας του δείγματος σε πρωτεΐνη/νες [33].

3.5.4. Χημειοτακτικός μετασχηματισμός κυττάρων BL21

Ο βακτηριακός μετασχηματισμός αναφέρεται στην διαδικασία κατά την οποία συμβαίνει οριζόντια μεταφορά ξένου γενετικού υλικού από το περιβάλλον προς τα βακτήρια. Το εάν κάποιο βακτήριο είναι ικανό για οριζόντια μεταφορά εξαρτάται από την ικανότητα του να προσλαμβάνει ελεύθερο, εξωκυτταρικό γενετικό υλικό. Οι παράγοντες που ρυθμίζουν τη φυσική αυτή ικανότητα ποικίλουν. Όταν το *DNA* βρεθεί στο κυτταρόπλασμα είτε μπορεί να αποικοδομηθεί από νουκλεάσες, αν διαφέρει αρκετά από το γενετικό υλικό του ξενιστή, είτε να ενσωματωθεί στο χρωμοσωμικό *DNA*, αν μοιάζει, είτε να συνυπάρχει ως πλασμίδιο.

Το φαινόμενο του φυσικού μετασχηματισμού κατέστησε τους βακτηριακούς πληθυσμούς ικανούς να ανταπεξέλθουν σε διακυμάνσεις της δυναμικής του πληθυσμού τους καθώς και στην διατήρηση των επιπέδων τους υπό αντίξοες περιβαλλοντικές αλλαγές. Σε τέτοιες καταστάσεις περιβαλλοντικής πίεσης κάποια βακτήρια απελευθερώνουν αυθόρμητα γενετικό υλικό στο περιβάλλον το οποίο μπορεί να προσληφθεί από ικανά κύτταρα, τα κύτταρα αυτά ανταποκρίνονται στις περιβαλλοντικές αλλαγές και ελέγχουν τα επίπεδα

πρόσληψης αυτού του γενετικού υλικού μέσω της διαδικασίας του φυσικού μετασχηματισμού.

Δεν είναι όλα τα βακτήρια ικανά να προσλάβουν εξωγενές γενετικό υλικό από το περιβάλλον τους. Ο χημικός μετασχηματισμός περιλαμβάνει την ψύξη των κυττάρων υπό την παρουσία χλωριούχου ασβεστίου ώστε να γίνουν προσβάσιμα, επώαση με το γενετικό υλικό και τοποθέτηση στους 42°C για έως και 120'' που προκαλεί την εισαγωγή του γενετικού υλικού στο κύτταρο [34].

3.5.5. Επαγωγή με IPTG

Το *IPTG* ή αλλιώς ισοπρόπυλ β-D-1 θειογαλακτοπυρανοζίδιο είναι ένας χημικός παράγοντας που μιμείται την αλλολακτόζη, η οποία αφαιρώντας έναν καταστολέα του οπερονίου της λακτόζης ενεργοποιεί την γονιδιακή του έκφραση. Η αλλολακτόζη είναι ένα ισομερές που σχηματίζεται όταν η λακτόζη εισέρχεται στα κύτταρα και δρα ως επαγωγός της μεταγραφής των γονιδίων του οπερονίου της λακτόζης [35].

3.5.6. Γρήγη χρωματογραφία - FPLC

Ο όρος χρωματογραφία, προέρχεται από τις λέξεις «χρώμα» και «γράφειν». Αρχικά, το 1903 αναπτύχθηκε από τον *Mikhail Tswett*, ο οποίος πέτυχε ένα χρωματικό διαχωρισμό φυτικών χρωστικών με τη χρήση στήλης. Οι βασικές αρχές της χρωματογραφίας, από τότε, παραμένουν ίδιες αν και η τεχνική αυτή έχει εξελιχθεί τόσο για τον διαχωρισμό μιγμάτων στα συστατικά τους όσο και για την ταυτοποίηση των συστατικών που τα αποτελούν [36].

3.5.6.1. Χρωματογραφία συγγένειας

Η χρωματογραφία συγγένειας αξιοποιεί το φαινόμενο βιο-αναγνώρισης υψηλής εξειδίκευσης και αποτελεί κατάλληλο μέσο για τον καθαρισμό βιομορίων. Το αδιάλυτο υλικό της μήτρας της στήλης διαθέτει ικανότητες προσρόφησης, λόγω ομοιοπολικών συνδέσεων του προσδέτη, ο οποίος εμφανίζει συγγένεια ως προς το βιομόριο στόχο και συνδέεται με αυτό.

Έτσι, όταν ένα δείγμα πρωτεϊνών, στο οποίο περιέχεται και η υπό μελέτη πρωτεΐνη, περάσει μέσα από μια στήλη συγγένειας που έχει έναν ακινητοποιημένο προσδέτη, τότε οι πρωτεΐνες που δεν έχουν κάποια συγγένεια θα περάσουν από τη στήλη χωρίς να προσδεθούν (*flowthrough*),

ενώ οι πρωτεΐνες που εμφανίζουν κάποια συγγένεια θα παραμείνουν στη στήλη. Η πρωτεΐνη στόχος, η οποία έχει συνδεθεί με τον ακινητοποιημένο προσδέτη της στήλης, θα απομακρυνθεί από αυτόν μέσω κάποιων αλλαγών στις πειραματικές συνθήκες, όπως για παράδειγμα αλλαγή του pH και της ιοντικής ισχύος του διαλύματος και της θερμοκρασίας ή μέσω της προσθήκης κάποιου ανταγωνιστικού προσδέτη για το υλικό της στήλης. Καθ' όλη τη διάρκεια του καθαρισμού, υπάρχει συνδεδεμένο φωτόμετρο υπεριώδους ακτινοβολίας, το οποίο μετράει, σε μήκος κύματος 280 nm, την απορρόφηση του διαλύματος που εξέρχεται από τη στήλη. Το αποτέλεσμα της διαδικασίας καταγράφεται με τη μορφή ενός γραφήματος (χρωματογράφημα).

Η διαδικασία καθαρισμού ενός δείγματος πρωτεϊνών με την τεχνική της χρωματογραφίας συγγένειας αποτελείται από τα εξής βήματα:

I **Εξισορρόπηση:** Το υλικό της στήλης εξισορροπείται με το διάλυμα πρόσδεσης της πρωτεΐνης. Η απορρόφηση που εμφανίζεται στο UV, 280 nm, οφείλεται στα συστατικά του διαλύματος πρόσδεσης.

II **Εισαγωγή δείγματος:** Το πρωτεϊνικό δείγμα εισέρχεται στη στήλη, υπό πειραματικές συνθήκες που ευνοούν την ειδική, αλλά αντιστρεπτή, σύνδεση της πρωτεΐνης στόχου στον προσδέτη της στήλης με τον οποίο εμφανίζει υψηλή συγγένεια. Οι πρωτεΐνες του δείγματος, που δεν εμφανίζουν συγγένεια ως προς τον προσδέτη της στήλης, απομακρύνονται με αποτέλεσμα η απορρόφηση του UV να αυξάνεται (*Flowthrough*).

III **Έκπλυση:** Αμέσως μετά της εισαγωγή του δείγματος, ακολουθεί έκπλυση της στήλης, με το διάλυμα έκπλυσης, με στόχο την απομάκρυνση των μη ειδικά προσδεδεμένων πρωτεϊνών και να παραμείνουν μόνο η/οι πρωτεΐνη/ες που εμφανίζει/ζουν υψηλή συγγένεια για τον ακινητοποιημένο προσδέτη. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση και την σταθεροποίηση της απορρόφησης του UV.

IV **Έκλουση:** Η έκλουση πραγματοποιείται με το διάλυμα έκλουσης. Κατά το στάδιο αυτό η/οι πρωτεΐνη/νες που έχουν μείνει συνδεδεμένες στο υλικό της στήλης απομακρύνονται [36].

3.5.6.1.1. Στήλη Lactosyl Sepharose 4CLB

Ένας διαδομένος τρόπος καθαρισμού της γαλεκτίνης-3 βασίζεται στην ικανότητά της ως λεκτίνη τύπου S να προσδένει λακτόζη. Η πρωτεΐνη στόχος δεσμεύεται στα ακινητοποιημένα σφαιρίδια λακτόζης - σεφαρόζης λόγω συγγένειας, ενώ οι υπόλοιπες πρωτεΐνες που δεν εμφανίζουν συγγένεια ως προς αυτή απομακρύνονται από την στήλη. Τέλος η έκλουση της πρωτεΐνης

επιτυγχάνεται με την προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος που περιέχει υψηλή συγκέντρωση λακτόζης [37].

3.5.6.1.2. Στήλη Superdex75

Στην συνέχεια για περαιτέρω καθαρισμό χρησιμοποιείται η στήλη *Superdex75*, όπου το *Superdex* αντιπροσωπεύει το είδος του πηκτώματος και το 75 το εύρος μοριακών βαρών που εξυπηρετεί η στήλη. Οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται με βάση το μέγεθος τους καθώς περνάνε από ένα πήκτωμα. Το πήκτωμα αυτό δομείται από σφαιρίδια που έχουν πόρους συγκεκριμένου μεγέθους. Ο διαχωρισμός συμβαίνει καθώς οι πρωτεΐνες εισέρχονται ή όχι στους πόρους των σφαιριδίων του πηκτώματος. Οι μικρές πρωτεΐνες καθυστερούν καθώς εισέρχονται στους πόρους, ενώ οι μεγάλες όχι και εκλούνται πιο γρήγορα. Συνεπώς ο διαχωρισμός πραγματοποιείται με βάση το μέγεθος των πρωτεϊνών [38].

3.5.7. Νόμος Beer-Lambert

Ο νόμος *Beer-Lambert* συσχετίζει την ένταση μίας δέσμης ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας με την απόσταση που θα διανύσει αυτό στο μέσο απορρόφησης καθώς και την συγκέντρωση αυτού.

$A = \epsilon * b * c$, όπου A η απορρόφηση, ϵ ο συντελεστής μοριακής απορρόφησης, b το πάχος της κυψελίδας και c η συγκέντρωση.

Μέσω της φωτομέτρησης ενός δείγματος στα 280 *nm* μπορεί να υπολογισθεί η τελική συγκέντρωση της πρωτεΐνης στόχου [39].

3.6. Παρασκευαστικές μέθοδοι

3.6.1. Καθαρισμός Γαλεκτίνης-3 από μετασχηματισμένα βακτηριακά κύτταρα

Το γονίδιο της περιοχής αναγνώρισης υδατανθράκων *CRD* της γαλεκτίνης-3 βρίσκεται κλωνοποιημένο σε φορέα έκφρασης *pET-28a* που περιέχει τον υποκινητή και το οπερόνιο της λακτόζης καθώς και γονίδιο ανθεκτικότητας για канаμυκίνη.

Αρχικά πραγματοποιήθηκε χημειοτακτικός μετασχηματισμός (εδάφιο 2.3.4.) βακτηρίων *E. Coli* στελέχους *BL21*. Ακολούθησε επίστρωση της υγρής καλλιέργειας των μετασχηματισμένων κυττάρων σε τρυβλία, με θρεπτικό μέσο *LB Agar*, στα οποία προστέθηκε και αντιβιοτικό καναμυκίνη σε τελική συγκέντρωση 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$, και εν συνεχεία επώαστηκαν στους 37°C για περίπου 16 ώρες. Με το πέρας της επώασης έγινε επιλογή αποικιών από το τρυβλίο και εμβολιασμός κάθε μοναδιαίας αποικίας σε 50 mL *LB Broth* το οποίο περιείχε αντιβιοτικό σε τελική συγκέντρωση 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ και η καλλιέργεια επώαστηκε για 16 ώρες, σε θερμοκρασία 37°C υπό ανακίνηση στα 210 *rpm*. Στη συνέχεια, 10 mL της υγρής καλλιέργειας μεταφέρθηκαν σε αποστειρωμένη φλάσκα με θρεπτικό μέσο *LB Broth* (όγκου 1L), αναλογία 1:100, που περιείχε τις ίδιες συγκεντρώσεις αντιβιοτικού. Η ανάπτυξη των βακτηριακών κυττάρων πραγματοποιήθηκε σε ανακινούμενο επωαστήρα (210 *rpm*) στους 37°C, έως ότου η οπτική απορρόφηση σε μήκος κύματος 600 *nm* φτάσει 0,5-0,6. Μόλις φτάσουν στην επιθυμητή απορρόφηση, προστίθενται ο παράγοντας επαγωγής της υπερέκφρασης *IPTG* (εδάφιο 2.3.5.), σε τελική συγκέντρωση 0,4 *mM*. Η υπερέκφραση έλαβε χώρα σε επωαστήρα σε θερμοκρασία 37°C για 3 ώρες υπό ανακίνηση σε 210 *rpm*. Με το τέλος της υπερέκφρασης οι υγρές καλλιέργειες φυγοκεντρώνται σε 5000 *rpm* στους 4°C για 40 λεπτά. Στην συνέχεια το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και το ίζημα διαλυτοποιήθηκε σε διάλυμα που περιείχε 2 *mM* *EDTA*, 137 *mM* *NaCl*, 2,7 *mM*, 10 *mM* *Na₂HPO₄*, 1,8 *mM* *KH₂PO₄* και 4 *mM* *βMerk pH 7,4*. Στην συνέχεια, ακολουθεί λύση των κυττάρων με υπερήχους σε πάγο (*amplitude 70%*, 30 δευτερόλεπτα εφαρμογή υπερήχων/30 δευτερόλεπτα παύση, 5 κύκλοι). Τέλος, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση για 30 λεπτά, στους 4°C σε 15.000 *rpm* και το υπερκείμενο φιλτράρεται με αποστειρωμένο φίλτρο.

Ο καθαρισμός της γαλεκτίνης-3 γίνεται σε 3 βήματα με χρήση του συστήματος *ΆΚΤΑ-FPLC*. Όλα τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν φιλτραρισμένα και απαρωμένα.

Βήμα 1^ο: Στήλη συγγένειας *Lactosyl Sepharose 4CLB*

Εξισορρόπηση: Η στήλη εξισορροπείται με εφαρμογή του διαλύματος A (2 *mM* *EDTA*, 137 *mM* *NaCl*, 2,7 *mM* *KCl*, 10 *mM* *Na₂HPO₄*, 1,8 *mM* *KH₂PO₄* και 4 *mM* *βMerk*), με ροή 0,5 *mL/min*. Η εισαγωγή του δείγματος στη στήλη γίνεται με ροή 0,5 *mL/min* και συλλέχθηκαν κλάσματα όγκου 5 *mL* (*flow through*).

Έκπλυση: Η έκπλυση της στήλης έγινε με εφαρμογή του διαλύματος A και συλλέχθηκαν κλάσματα όγκου 5 *mL* (*Wash*).

Έκλουση: Η πρωτεΐνη εκλούστηκε από την στήλη με εφαρμογή του διαλύματος Β (2 mM EDTA , 137 mM NaCl , $2,7\text{ mM KCl}$, $10\text{ mM Na}_2\text{HPO}_4$, $1,8\text{ mM KH}_2\text{PO}_4$ και 4 mM βMerk , 150 mM Lactose) και συλλέχθηκαν κλάσματα των 5 mL .

Στην συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ανάλυση των κλασμάτων σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου υπό αποδιατακτικές συνθήκες (*SDS-PAGE*) (εδάφιο 2.3.1). Η ολική συγκέντρωση πρωτεϊνών προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Bradford (εδάφιο 2.3.3).

Βήμα 2°: Συμπύκνωση

Το προϊόν της στήλης *Lactosyl Sepharose 4 CLB* συμπυκνώθηκε με φίλτρο συμπύκνωσης με κατώφλι 10 kDa . Ακολουθούν διαδοχικές φυγοκεντρίσεις στα 4000 με 4500 rcf σε θερμοκρασία 4°C για 15 λεπτά κάθε φορά. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται έως ότου το δείγμα φτάσει σε τελικό όγκο μερικών μL .

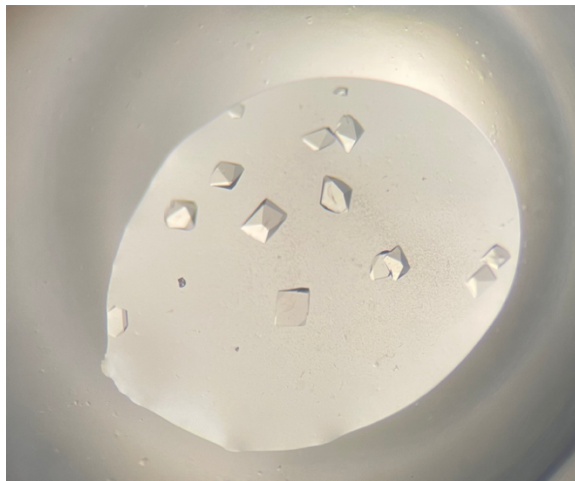
Βήμα 3°: Στήλη μοριακής διήθησης Superdex75

Η στήλη εξισορροπείται με εφαρμογή διαλύματος $10\text{ mM Tris-HCl pH } 7,5$ με ροή $0,5\text{ mL/min}$. Η εισαγωγή του δείγματος γίνεται με ροή $0,7\text{ mL/min}$ και συλλέχθηκαν κλάσματα όγκου 5 mL .

Στην συνέχεια, το προϊόν της στήλης συμπυκνώθηκε έως ότου φτάσουμε στην επιθυμητή συγκέντρωση, ακολούθησε είτε φωτομετρικός (στα 280 nm , εδάφιο 2.3.7.) είτε μέθοδος *Bradford* (εδάφιο 2.3.3.) για τον προσδιορισμό της τελικής συγκέντρωσης. Τέλος η απομονωμένη και καθαρισμένη πρωτεΐνη αποθηκεύεται με *flash freeze* (εμβάπτιση) σε παγωμένη αιθανόλη στους -80°C .

3.7. Κρυσταλλογραφία

3.7.1. Κρυστάλλωση Γαλεκτίνης-3

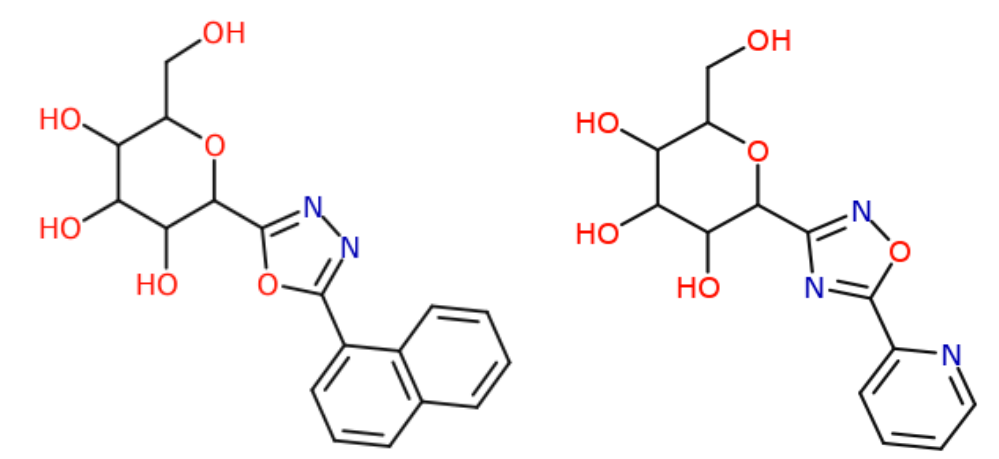


Η κρυστάλλωση της γαλεκτίνης-3 επιτεύχθηκε με τη διαδικασία διάχυσης ατμών (καθήμενη σταγόνα), σε θερμοκρασία 16°C. Η συγκέντρωση του ενζύμου που χρησιμοποιήθηκε ήταν 30 mg/mL και η συνθήκη κρυστάλλωσης περιείχε 0,1 M Tris pH 8.5, 0,2M MgCl₂, 35% PEG8000. Οι κρύσταλλοι σχηματίστηκαν μετά από 48 ώρες.

Εικόνα 4: Κρύσταλλοι Γαλεκτίνης-3.

3.7.2. Εμβάπτιση (Soaking) προσδετών KISZ333 & KISZ340

Στη παρούσα εργασία οι ενώσεις KISZ333 και KISZ340 (Εικόνα 5) μελετήθηκαν για την ικανότητα τους να προσδένονται στο κέντρο CRD της γαλεκτίνης-3.



Εικόνα 5: Μοριακή δομή των προσδετών KISZ333 και KISZ340

Οι ενώσεις είναι διαλυμένες σε DMSO σε τελική συγκέντρωση 200 mM. Η εμβάπτιση των κρυστάλλων πραγματοποιήθηκε με την προσθήκη της κάθε ένωσης σε ρυθμιστικό διάλυμα (0,1 M Tris-HCl pH 8.5, 0,2M MgCl₂, 35% PEG8000), παρουσία 12% DMSO.

3.7.3. Συλλογή και ανάλυση κρυσταλλογραφικών δεδομένων

Οι κρύσταλλοι που έχουν προηγουμένως επωασθεί σε διάλυμα των προσδετών λαμβάνονται με τη χρήση ενός βρόχου, εμβαπτίζονται σε κρυσταλλοπροστατευτικό διάλυμα 20% (v/v) γλυκερόλης και τοποθετούνται στο γωνιόμετρο. Η ρύθμιση της θέσης του κρυστάλλου, στο γωνιόμετρο, ανά 90° ώστε να βρίσκεται πάντα στο επίκεντρο της δέσμης είναι απαραίτητη. Η έκθεση του κρυστάλλου της πρωτεΐνης σε ακτίνες-Χ, έχει ως αποτέλεσμα την αλληλεπίδραση των ηλεκτρονίων των ατόμων της πρωτεΐνης με την ακτινοβολία Χ και την απελευθέρωση δευτερογενούς ακτινοβολίας. Η ένταση της περιθλώμενης ακτινοβολίας μετρήθηκε από ειδικούς ανιχνευτές και συλλέχθηκαν τα περιθλασιγράμματα τα οποία και αποτελούν τα πειραματικά δεδομένα. Ακολουθώντας από τα περιθλασιγράμματα μετρήθηκε η ένταση των αμαυρώσεων, οι οποίες σταθμίστηκαν και συγχωνεύτηκαν με κατάλληλα λογισμικά, ώστε να υπολογιστεί η ηλεκτρονική πυκνότητα της τρισδιάστατης κρυσταλλικής δομής του συμπλόκου πρωτεΐνης-αναστολέα.

Οι βασικοί παράμετροι της συλλογής δεδομένων περίθλασης είναι:

- η θερμοκρασία, 100K
- ο χρόνος έκθεσης (t), 120 δευτερόλεπτα
- η απόσταση του ανιχνευτή από τον κρύσταλλο, 156 mm
- και η γωνία περιστροφής $\Delta\phi$ ανά εικόνα, 1°.

3.7.4. Επεξεργασία και βελτιστοποίηση του δομικού μοντέλου

Η επεξεργασία των κρυσταλλογραφικών δεδομένων πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα *imosflm*. Η συγχώνευση των περιθλάσεων έγινε μέσω του προγράμματος *AIMLESS*. Ο προσδιορισμός των φάσεων έγινε μέσω του προγράμματος *REFMAC* χρησιμοποιώντας την γνωστή δομή της περιοχής *CRD* της γαλεκτίνης-3 χωρίς προσδέτες [40-41]. Η βελτιστοποίηση των συντεταγμένων των ατόμων του μορίου στον χώρο αλλά και των παραγόντων θερμικής κίνησης έγινε επίσης με το πρόγραμμα *REFMAC*. Η μελέτη των χαρτών *2Fobs-Fcalc* έδειξε την ύπαρξη θετικής ηλεκτρονικής πυκνότητας κάτι το οποίο σημαίνει την πρόσδεση των αναστολέων στην γαλεκτίνη-3. Η κατασκευή της τρισδιάστατης δομής των προσδετών έγινε με το πρόγραμμα *AceDRG*. Στη συνέχεια ακολουθήσε η προσθήκη των προσδετών στους χάρτες ηλεκτρονικής πυκνότητας αλλά και η επεξεργασία του μοντέλου κάνοντας χρήση του προγράμματος *Coot* [42,43]. Ακολούθησε διαδοχική

βελτιστοποίηση και προσαρμογή του μοντέλου που προέκυψε, συμπεριλαμβανομένων και των προσδετών, στους νέους χάρτες ηλεκτρονιακής πυκνότητας που υπολογίστηκαν, σύμφωνα με τη στερεοχημεία που υπαγορεύεται από την πρωτεϊνική δομή (μήκη δεσμών, γωνίες, δίεδρες γωνίες, κ.ά.) με το πακέτο προγραμμάτων *CCP4* [45]. Η εγκυρότητα της πορείας βελτιστοποίησης ελέγχθηκε χρησιμοποιώντας τον διαδικτυακό διακομιστή *PDB REDO*. Οι δομές των συμπλόκων γαλεκτίνης-3 - προσδέτη χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό δεσμών υδρογόνου και αλληλεπιδράσεων *Van der Waals* με τα αμινοξικά κατάλοιπα της περιοχής *CRD*. Χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα *CONTACT* του *CCP4* με όριο απόστασης 3.35 Å για τους δεσμούς υδρογόνου και 4.0 Å για τις αλληλεπιδράσεις *van der Waals*. Τέλος, χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα γραφικών *CCP4 Molecular Graphics* για την απεικόνιση της τρισδιάστατης δομής [46].

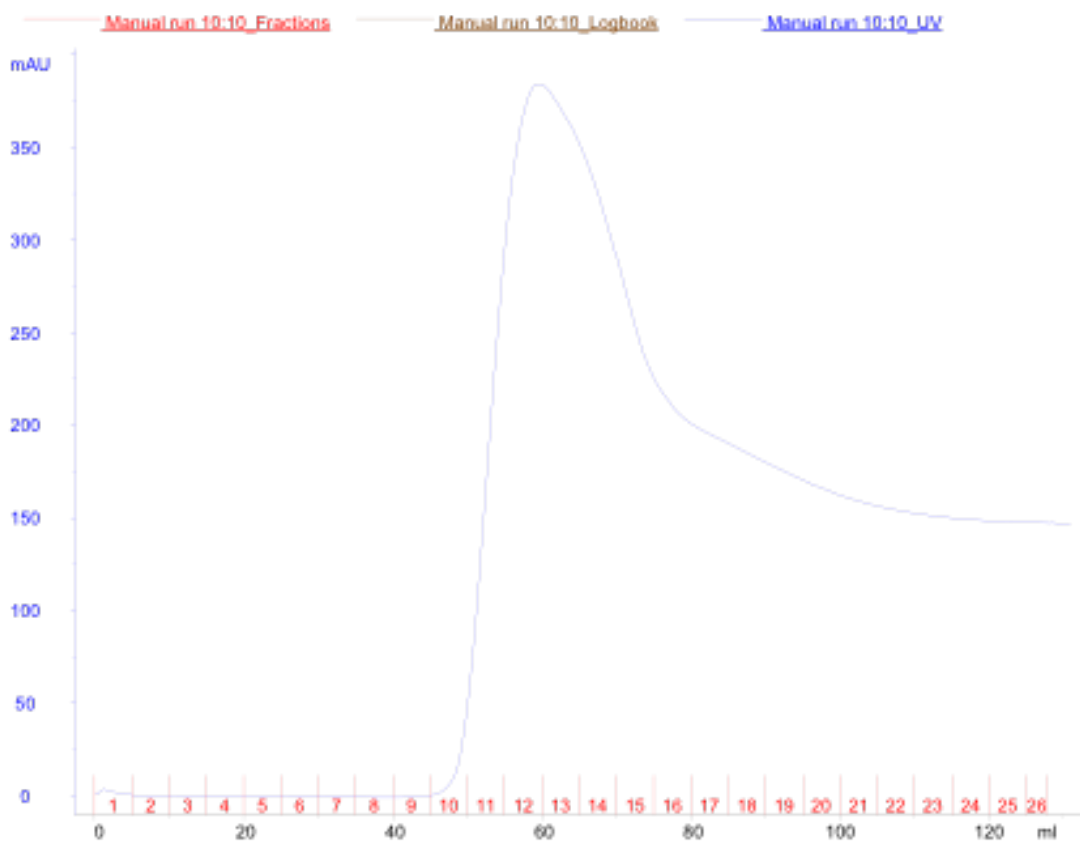
Κεφάλαιο 4^ο – Αποτελέσματα

4.1. Καθαρισμός και απομόνωση Γαλεκτίνης-3

Στα χρωματογραφήματα που παρουσιάζονται παρακάτω, ο άξονας xχ' αναφέρεται στον όγκο (σε *mL*) καθώς και στην αρίθμηση των κλασμάτων, ενώ στον άξονα γγ' αναφέρεται η απορρόφηση στο UV (*mAU-280nm*) του δείγματος καθώς εξέρχεται από τη στήλη.

Στάδιο 1^ο : Χρωματογραφία συγγένειας (Στήλη *Lactosyl Sepharose 4CLB*)

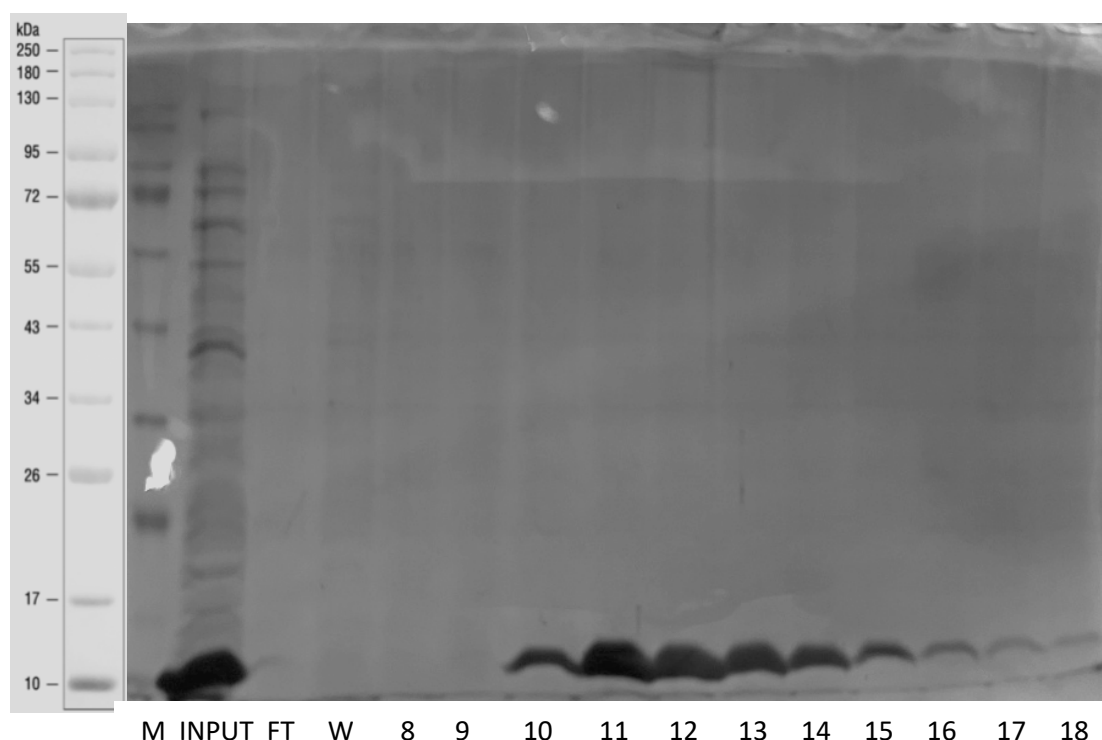
Το πρώτο στάδιο καθαρισμού της γαλεκτίνης-3 ξεκινά από τη διέλευση του πρωτεϊνικού δείγματος στη στήλη χρωματογραφίας *Lactosyl Sepharose 4CLB* που φέρει ως ακινητοποιημένο προσδέτη λακτόζη (εδάφιο 2.3.6.1.1.).



Εικόνα 6: Χρωματογράφημα του πρώτου βήματος καθαρισμού της γαλεκτίνης-3. Τα κλάσματα 10 έως 26 περιέχουν το έκλουσμα των συνδεδεμένων στη στήλη πρωτεϊνών

Ακολουθεί η έκπλυση της στήλης, με στόχο την απομάκρυνση των μη ειδικά προσδεμένων πρωτεϊνών. Στην συνέχεια, η έκλουση των προσδεμένων στην στήλη πρωτεϊνών γίνεται με χρήση 100 % του διαλύματος που αναφέρεται στο εδάφιο 2.4.1., και συλλέγονται κλάσματα όγκου 5 mL. Η έκλουση της πρωτεΐνης έγινε στα κλάσματα 10-26 σύμφωνα με την τιμή της απορρόφησης σε μήκος κύματος 280 nm, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 6**.

Στην συνέχεια τα κλάσματα αναλύθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 10% υπό αποδιατακτικές συνθήκες για να ελεγχθεί η καθαρότητα των δειγμάτων (*SDS-PAGE*) (**Εικόνα 7**).



Εικόνα 7: Ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμιδίου (10%) υπό αποδιατακτικές συνθήκες για να ελεγχθεί η καθαρότητα των δειγμάτων. Από τον διάδρομο 1 έως και τον 15 έχουμε κατά αντιστοιχία M(Μάρτυρας), INPUT, Flowthrough, Wash και τα κλάσματα 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 και 18.

Στάδιο 2^ο : Χρωματογραφία μοριακής διήθησης (Στήλη *Superdex75*)

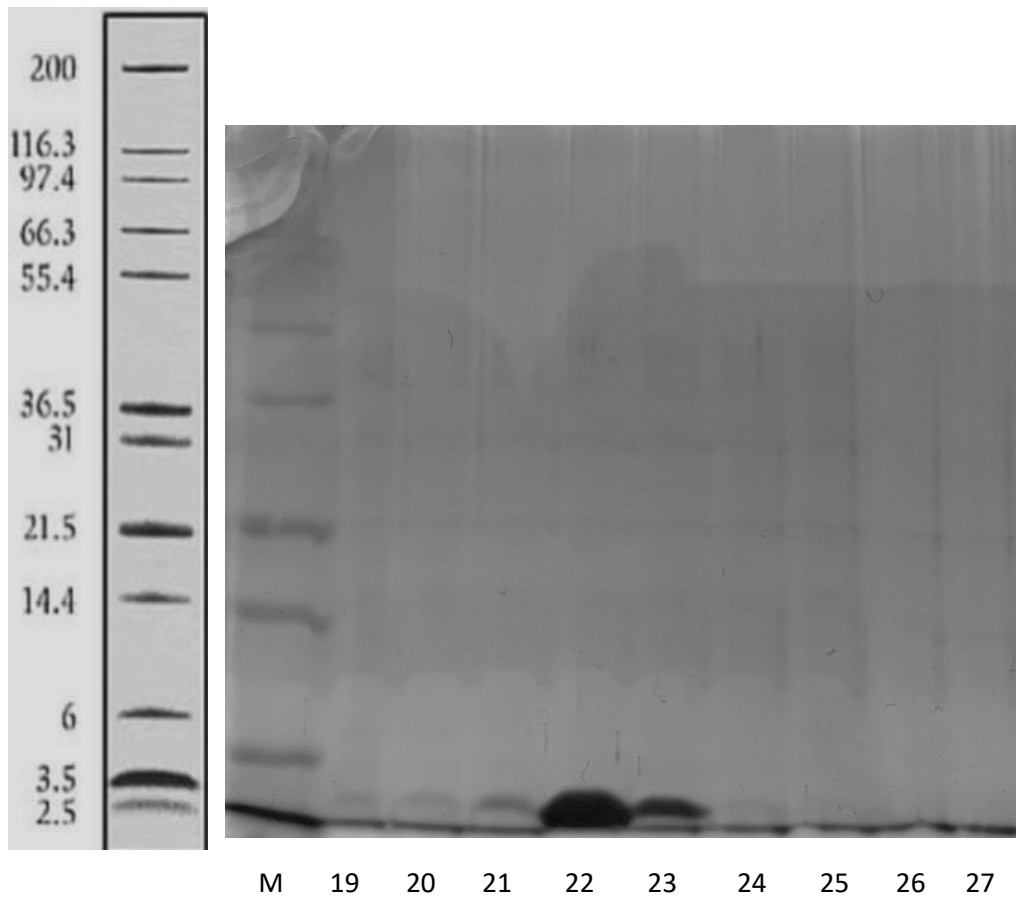
Στο δεύτερο στάδιο καθαρισμού της γαλεκτίνης-3 και αφού έχει προηγηθεί συμπύκνωση το δείγμα περνάει από την στήλη μοριακής διήθησης *Superdex75* όπου μέσω διέλευσης από πόρους σφαιριδίων θα διαχωριστούν με βάση το μέγεθός τους (εδάφιο 2.3.6.1.2.)

Η έκλυση των πρωτεϊνών γίνεται με χρήση του διαλύματος 10mM Tris-HCl $\text{pH } 7,5$ (εδάφιο 2.4.1.) και συλλέγονται κλάσματα όγκου 5 mL . Η έκλυση της πρωτεΐνης έγινε στα κλάσματα 22 και 23 σύμφωνα με την τιμή της απορρόφησης σε μήκος κύματος 280 nm , όπως φαίνεται και στην **Εικόνα 8**.



Εικόνα 8: Χρωματογράφημα μοριακής διήθησης της γαλεκτίνης-3 σε στήλη Superdex75. Η επιθυμητή πρωτεΐνη εκλύεται στα κλάσματα 22 και 23.

Στην συνέχεια τα κλάσματα αναλύθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (12%) υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS-PAGE) για να ελεγχθεί σε ποια κλάσματα βρίσκεται η πρωτεΐνη καθώς και η καθαρότητά της. (**Εικόνα 9**).



Εικόνα 9: Ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμίδιου (12%) υπό αποδιατακτικές συνθήκες για να ελεγχθεί η καθαρότητα των δειγμάτων.

Τέλος αφού προηγήθηκε συμπύκνωση ακολουθεί φωτομέτρηση στα 280 nm με εφαρμογή του νόμου *Beer-Lambert* (εδάφιο 2.3.7.) $A = \epsilon * b * c$. Η απόδοση της απομόνωσης ήταν 50 mg/mL.

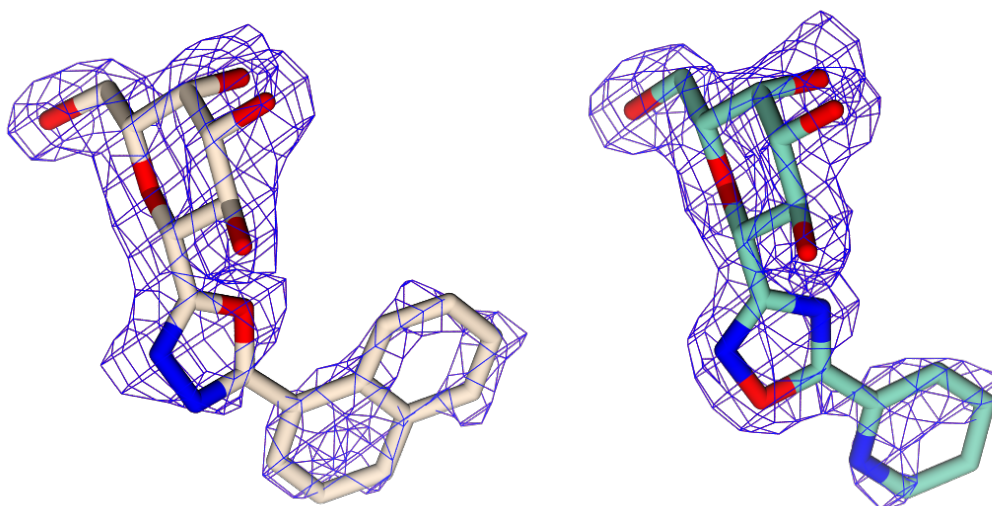
4.2. Ανάλυση και μελέτη των κρυσταλλογραφικών δεδομένων

Τα στατιστικά από τα δεδομένα περίθλασης που προέκυψαν από την ανάλυση με το πρόγραμμα *AIMLESS* του *CCP4* παρουσιάζονται στον **Πίνακας 2**.

	<i>KISZ333</i>	<i>KISZ340</i>
Ευκρίνεια (Å)	41,79 – 1,95	36,21 – 1,95
Αριθμός μοναδικών ανακλάσεων	9264	10776
Αριθμός μετρήσεων	67367	81195
Πολλαπλότητα	7.3	7,5
<i>Rmerge</i>	0,057	0,016
<i>CC (1/2)</i>	0,997	1.000
Πληρότητα (%)	100	100

Πίνακας 2: Κρυσταλλογραφικά δεδομένα από το *AIMLESS*

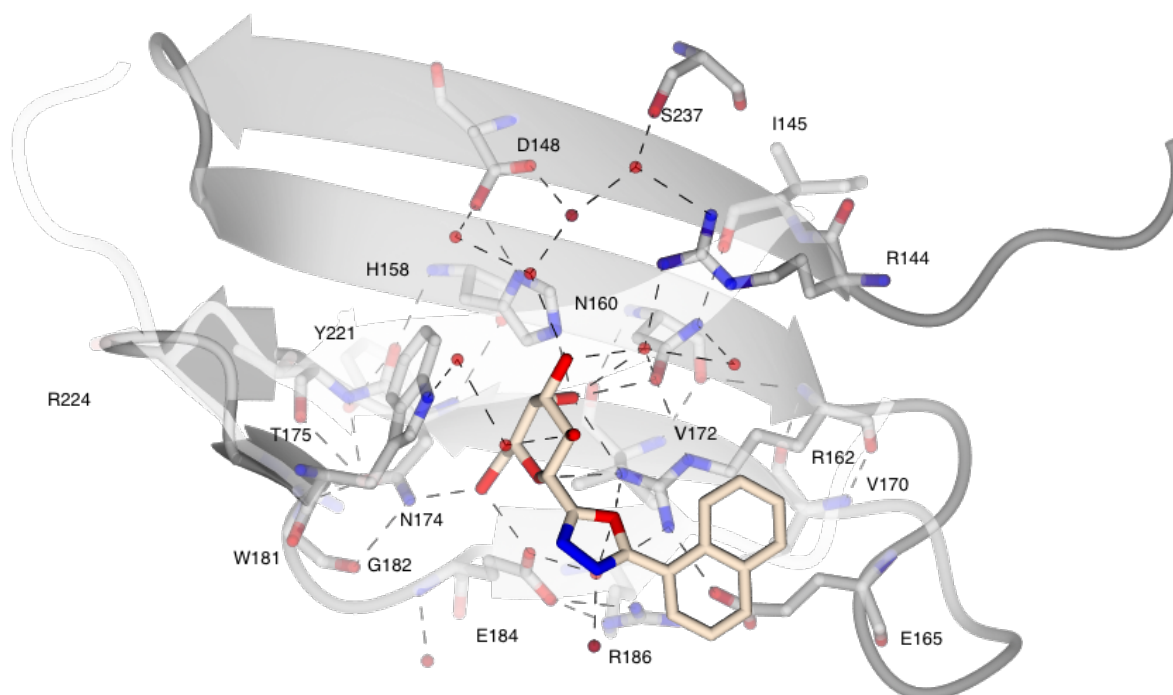
Η ανάλυση των δεδομένων έδειξε την ύπαρξη θετικής ηλεκτρονιακής πυκνότητας στην περιοχή *CRD* της γαλεκτίνης-3. Η ενσωμάτωση του κάθε αναστολέα χωριστά στη πυκνότητα και η διαδοχικές βελτιώσεις της δομής έδειξαν πως φαίνεται να υπάρχει πιθανότητα πρόσδεσης με τα άτομα τους να ταιριάζουν στους χάρτες ηλεκτρονιακής πυκνότητας.



Εικόνα 10: Απεικόνιση των προσδετών ενσωματωμένων στην ηλεκτρονιακή πυκνότητα

Επόμενο βήμα της ανάλυσης ήταν ο προσδιορισμός των αλληλεπιδράσεων που κάνουν οι προσδέτες *KISZ333* και *KISZ340* με την περιοχή πρόσδεσης. Τόσο οι δεσμοί υδρογόνου όσο και οι αλληλεπιδράσεις *Van der Waals*, για τον *KISZ333*, παρουσιάζονται στον **Πίνακας 3** ενώ παρακάτω ακολουθεί μία

γραφική απεικόνιση του πρότυπου σύνδεσης και των αλληλεπιδράσεων (Εικόνα 11).



Εικόνα 11: Απεικόνιση του προτύπου πρόσδεσης του KISZ333 στην καρβοξυτελική περιοχή της γαλεκτίνης-3. Η γαλεκτίνη-3 εμφανίζεται με γκρι, ο προσδέτης με μπλε, τα μόρια νερού ως κόκκινες κουκίδες ενώ οι δεσμοί υδρογόνου αναπαρίστανται με διακεκομμένες γραμμές.

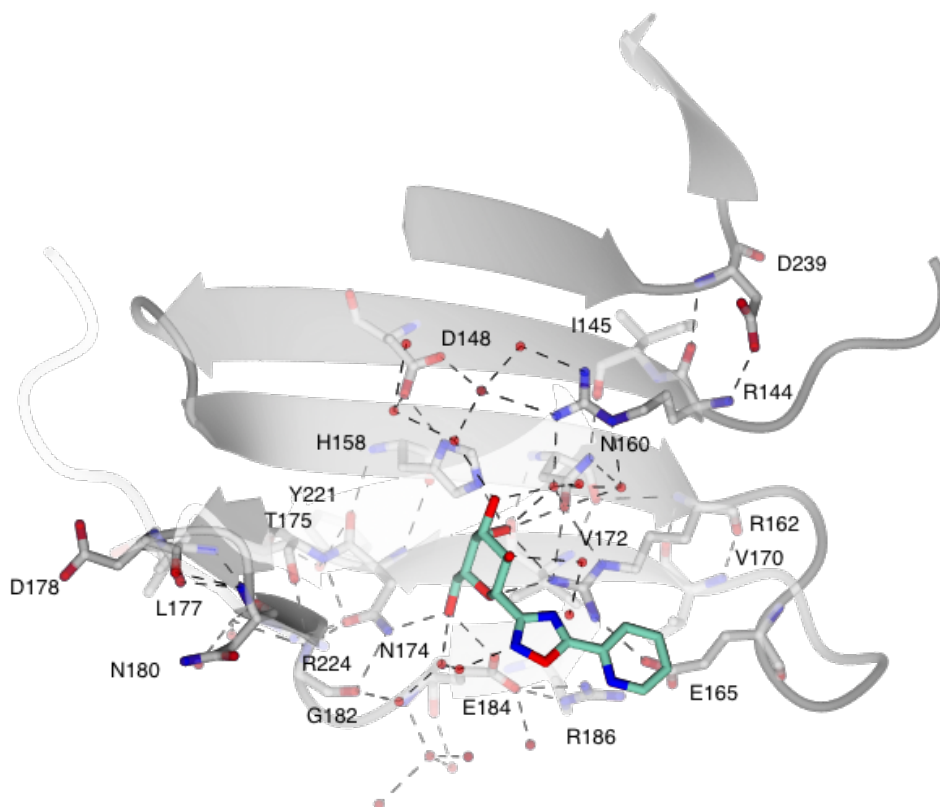
Άτομα KISZ333	Πρωτεϊνικά κατάλοιπα	
	Δεσμοί υδρογόνου (~3.35 Å)	Van der Waals (~4.0 Å)
O1	Arg 162 (NH2) 3.03 Å ^o	Glu 184 (OE2) , Water-8
O2	Asn 174 (ND2) 2.77 Å ^o Glu 184 (OE2) 2.61 Å ^o	Glu 184 (CG) , Asn 174 (CB) , Asn 174 (CG), Glu 184 (CD) , Water-166
O3	Arg 162 (NH2) 2.95 Å ^o His 158 (NE2) 2.71 Å ^o Asn 160 (OD1) 3.13 Å ^o Water-9 2.98 Å ^o	His 158 (CE1) , His 158 (CD2)
O4	Water-9 2.92 Å ^o Water-17 2.99 Å ^o	
O5	Water-170 2.84 Å ^o	
O6	Arg 162 (NH2) 3.20 Å ^o Water-8 2.96 Å ^o	Arg 162 (NH1) , Arg 162 (CZ)
C1		Trp 181 (CG) , Trp 181 (CD1) , Trp 181 (NE1), Trp 181 (CE2) , Trp 181 (CD2) , Trp 181 (NH2)
C2		His 158 (NE2) , Trp 181 (NE1) , His 158 (CD2), Trp 181 (CE2) , Trp 181 (CZ2),Arg 162 (NH2) , Water-9

C3	Trp 181 (NE1), Water-9
C4	Arg 162 (NH2), Water-170
C5	Arg 162 (NH2), Water-170
C6	Asn 174 (CB), Asn 174 (ND2), Glu 184 (OE2), His 158 (CD2), Arg 162 (NH2)
C7	Arg 162 (NH2), Water-8
C8	Water-8, Water-7
C9	Arg 162 (NH1), Water-7, Water-8
C10	Water-7, Water-8
C11	
C12	Glu 165 (CG), Water-108
C13	Glu 165 (CG)
C14	Arg 162 (NH1)
C15	Glu 165 (CB), Glu 165 (CG), Water-108
C16	Water-99, Arg 162 (CD), Water-99
C17	Water-99, Arg 162 (NH1), Arg 162 (CD), Arg 162 (NE), Arg 162 (CZ), Water-65
C18	Arg 162 (NH1), Arg 162 (NE), Arg 162 (CZ)
N1	Water-7, Water-8
N2	Water-8
Σύνολο	12
	66

Πίνακας 3: Αλληλεπιδράσεις του προσδέτη KISZ333 με τα πρωτεϊνικά κατάλοιπα της γαλεκτίνης-3

Παρατηρείται ότι όλοι οι δεσμοί υδρογόνου που πραγματοποιεί ο KISZ333 με το κέντρο CRD συσσωρεύονται στον δακτύλιο ο οποίος είναι ίδιος με αυτόν της λακτόζης. Πιο συγκεκριμένα σημαντικό ρόλο στην πρόσδεση του αναστολέα φαίνεται να έχουν τα κατάλοιπα *Arg 162*, *Asn 174*, *Glu 184*, *His 158*, *Asn 160*. Επιπλέον το μόρια νερού με τα οποία τα O3, 4, 5 και 6 δημιουργούν δεσμούς υδρογόνου λειτουργούν σαν γέφυρες αλληλεπιδράσεων με ακόμα περισσότερα κατάλοιπα της πρωτεΐνης. Τέλος, κατά την πρόσδεση του ο KISZ333 δημιουργεί 66 αλληλεπιδράσεις *Van der Waals* με αμινοξικά κατάλοιπα του κέντρου CRD.

Αντίστοιχα για τον αναστολέα KISZ340 οι δεσμοί υδρογόνου και *Van der Waals* παρουσιάζονται στον **Πίνακας 4**, ενώ ακολουθεί και γραφική απεικόνιση του πρότυπου σύνδεσης του και των αλληλεπιδράσεων (**Εικόνα 12**).



Εικόνα 12: Απεικόνιση του προτύπου πρόσδεσης του KISZ340 στην καρβοξυτελική περιοχή της γαλεκτίνης-3. Η γαλεκτίνη-3 εμφανίζεται με γκρι, ο προσδέτης με πράσινο, τα μόρια νερού ως κόκκινες κουκίδες ενώ οι δεσμοί υδρογόνου αναπαρίστανται με διακεκομμένες γραμμές.

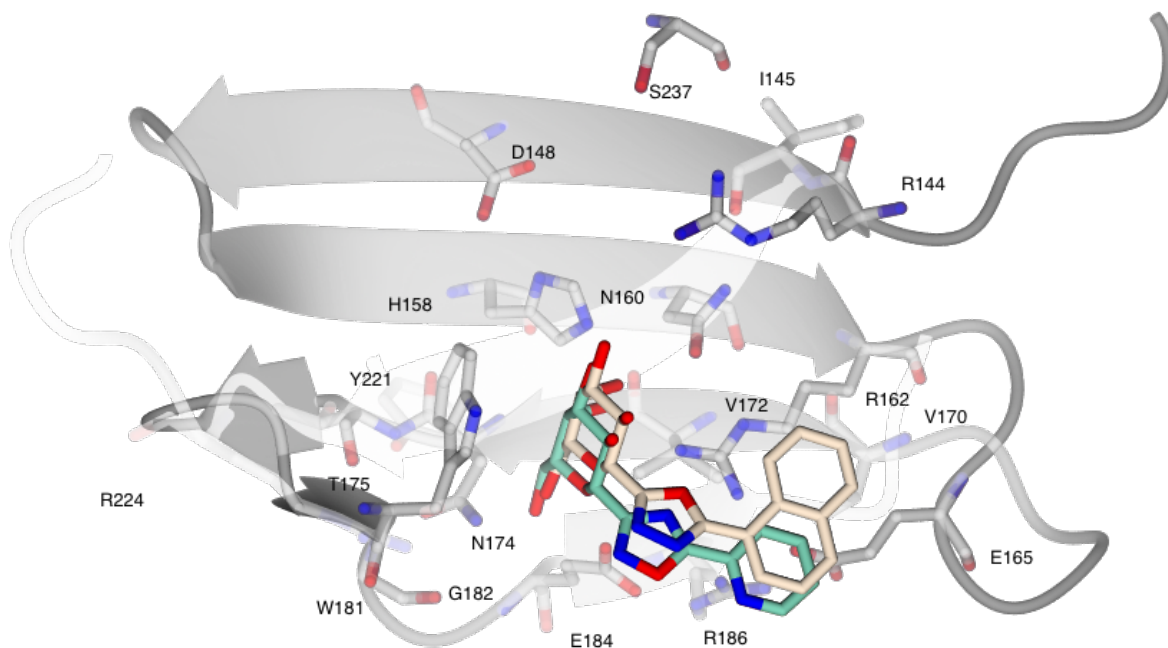
Άτομα KISZ340	Πρωτεϊνικά κατάλοιπα	
	Δεσμοί υδρογόνου (~3.35 Å)	Van der Waals (~4.0 Å)
O1	Arg 162 (NH2) 3.07	Glu 184 (OE2), Water-20
O2	Asn 174 (ND2) 2.88 Glu 184 (OE2) 2.64 Water-20 3.24	Glu 184 (CG), Asn 174 (CB), Asn 174 (CG), Glu 184 (CG), Glu 184 (CD)
O3	His 158 (NE2) 2.73 Asn 160 (OD1) 3.08 Arg 162 (NH2) 2.88 Water-3 2.82	His 158 (CE1), His 158 (CD2), Asn 160 (CG)
O4	Water-3 2.85 Water-18 2.91	Water-1
O5	Water-2 3.01	Water-240
O6		Water-240, Water-248
C1		Trp 181 (CG), Trp 181 (NE1), Trp 181 (CE2), Trp 181 (CD2), Arg 162 (NH2), Water-20
C2		His 158 (NE2)

		Trp 181 (NE1), His 158 (CE1), His 158 (CD2), Trp 181 (CE2), Trp 181 (CZ2), Arg 162 (NH2), Water-3
C3		Trp 181 (NE1), Trp 181 (CE2), Water-18, Water-132, Water-3
C4		Arg 162 (NH2), Water-2, Water-3
C5		Arg 162 (NH2), Water-20, Water-248
C6		Asn 174 (CB), Asn 174 (ND2), Glu 184 (OE2), His 158 (CD2), Trp 181 (CD2), Trp 181 (CE3), Arg 162 (NH2)
C7		Arg 162 (NH2), Water-20 ,Water-2, Water-240, Water-248
C8		Water-240, Water-2
C9		Arg 162 (NH1), Water-240
C10		Arg 162 (NH1), Water-2
C11		Arg 162 (NH1),Glu 165 (OE2), Water-136, Water-226
C12		Water-227, Water-226
C13		Water 227
N1		Arg 162 (NH1), Arg 162 (CZ), Arg 162 (NH2), Water-2, Water-240
N2	Water-248 2.47	Water-20, Water-240
N3		Water-21
Σύνολο	12	73

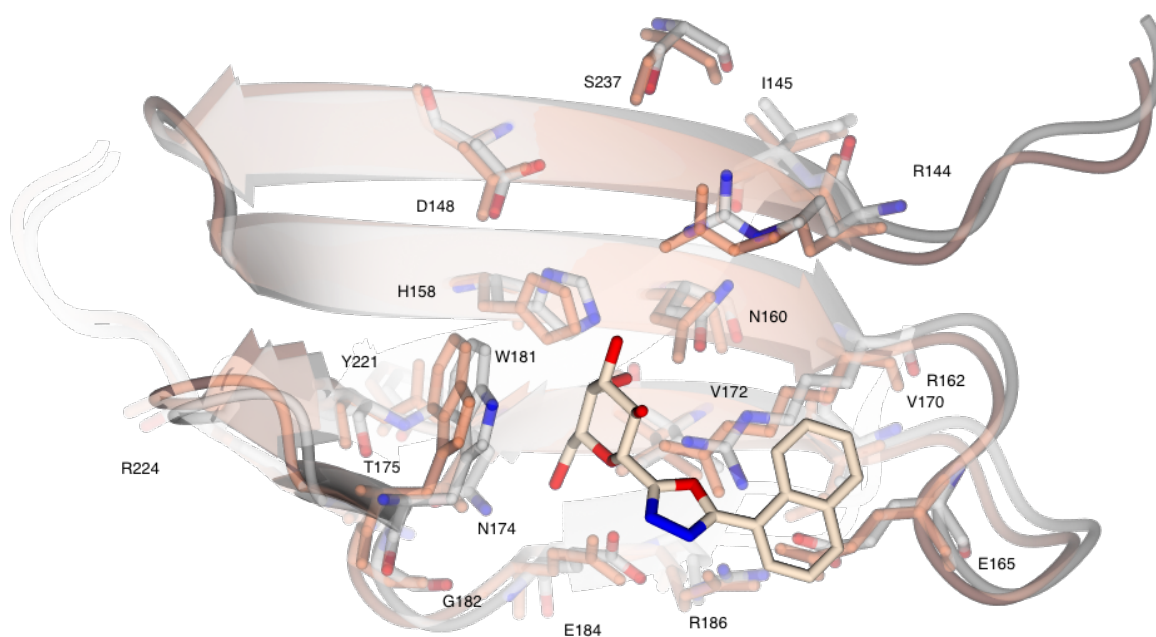
Πίνακας 4: Αλληλεπιδράσεις του προσδέτη KISZ340 με πρωτεϊνικά κατάλοιπα της γαλεκτίνης-3.

Παρατηρείται ότι παρόμοια με την KISZ333 και η KISZ340 η πλειοψηφία των αλληλεπιδράσεων με δεσμούς υδρογόνου συσσωρεύονται στον ίδιο δακτύλιο. Ωστόσο, στην περίπτωση αυτή παρατηρούμε σχηματισμό δεσμού υδρογόνου μεταξύ του N2 και του μορίου νερού 248. Όπως και στην περίπτωση του KISZ333, έτσι και σε αυτή του KISZ340 σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν τα αμινοξικά κατάλοιπα *Arg 162*, *Asn 174*, *Glu 184*, *His 158* και *Asn 160* και τα μόρια νερού 2,3,18,20,248 τα οποία μεσολαβούν σε επιπλέον αλληλεπιδράσεις με ακόμα περισσότερα κατάλοιπα του κέντρου CRD. Τέλος κατά την πρόσδεση της η KISZ340 δημιουργεί 73 αλληλεπιδράσεις *Van der Waals*.

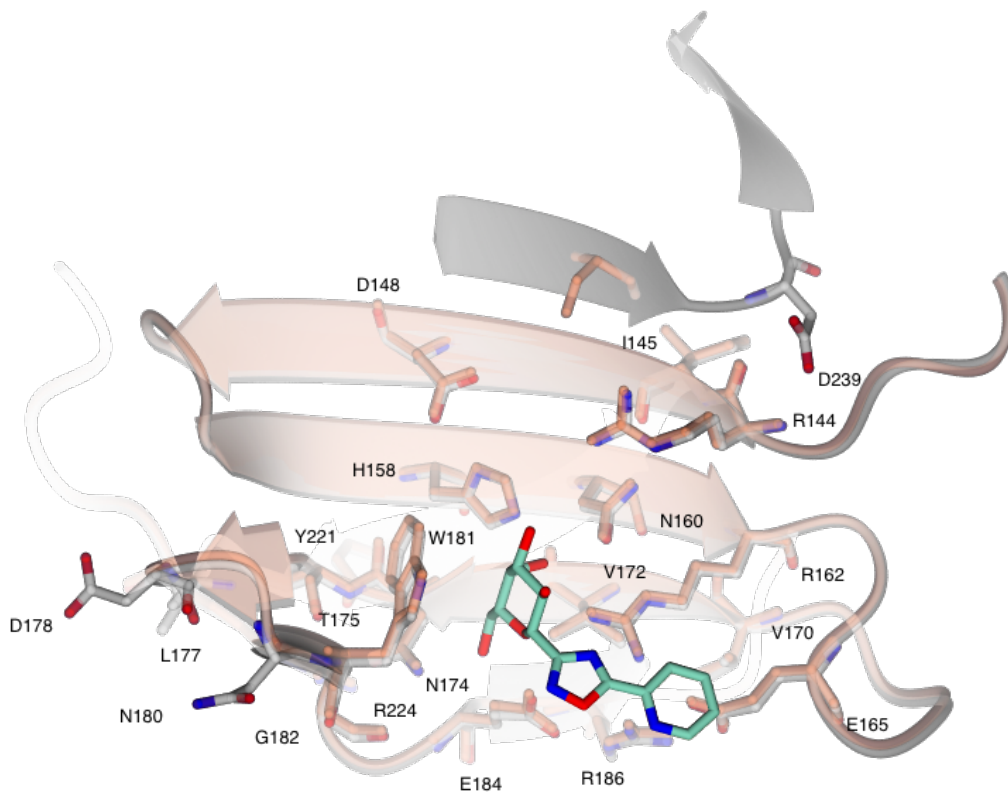
Η ομοιότητα των προτύπων πρόσδεσης των δύο προσδετών γίνεται ακόμα πιο φανερή με την υπέρθεση των δύο δομών (**Εικόνα 13**). Η σύνδεση των προσδετών δεν εμφανίζει δομικές διαφορές στα κατάλοιπα των αμινοξέων που δημιουργούν δεσμούς υδρογόνου καθώς και αλληλεπιδράσεις *Van der Waals*. Ενώ στις εικόνες **14** και **15** φαίνονται οι δομές των προσδετών σε υπέρθεση στη δομή της γαλεκτίνης-3 χωρίς προσδέτη.



Εικόνα 13: Υπέρθεση της δομής με τον προσδέτη KISZ333 στην αντίστοιχη δομή του KISZ340. Με γκρι φαίνονται τα αμινοξέα, με μπλε ο KISZ333 και με πράσινο ο KISZ340.



Εικόνα 14: Υπέρθεση μεταξύ της ελεύθερης δομής της γαλεκτίνης-3, εμφανίζεται με πορτοκαλί, και της δομής της γαλεκτίνης-3, φαίνεται με γκρι, και του προσδέτη KISZ333, με μπλε.



Εικόνα 15: Υπέρθεση μεταξύ της ελεύθερης δομής της γαλεκτίνης-3, εμφανίζεται με πορτοκαλί, και της δομής της γαλεκτίνης-3, φαίνεται με γκρι, και του KISZ340, με πράσινο.

Κεφάλαιο 5^ο - Συζήτηση

Δομικές και βιοχημικές μελέτες έχουν αναδείξει τη γαλεκτίνη-3 ως μία δομικά και λειτουργικά μοναδική γαλεκτίνη. Οι ποικίλες βιολογικές λειτουργίες που διαδραματίζει έχουν αποδοθεί κυρίως στη καλά συντηρημένη περιοχή αναγνώρισης και πρόσδεσης υδατανθράκων *CRD* που εντοπίζεται στο καρβοξυτελικό της άκρο που αποτελείται από 130 αμινοξικά κατάλοιπα και είναι υπεύθυνο για τη δράση λεκτίνης. Εξίσου σημαντικά δεδομένα παρέχονται πλέον και για τον ρόλο της εύκαμπτης αμινοτελικής περιοχής, καθώς και αυτή εμφανίζει υψηλά επίπεδα συντήρησης, με μήκος από 110 έως 130 αμινοξικά κατάλοιπα. Δομείται από ομόλογες επαναλήψεις και περιοχές φωσφορυλίωσης και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη απόδοση της πλήρους λειτουργικότητας της λεκτίνης και στη πρόσδεση υδατανθράκων σε συνδυασμό με την περιοχή *CRD* [7].

Στην παρούσα εργασία έγιναν κρυσταλλογραφικές μελέτες ως προς την δομή και τον τρόπο πρόσδεσης δύο ενώσεων, *KISZ333* και *KISZ340*. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε χημικός μετασχηματισμός βακτηρίων με το επιθυμητό πλασμίδιο, ακολούθησε έκφραση, παραγωγή της επιθυμητής πρωτεΐνης, απομόνωση και καθαρισμός με σύστημα υγρής χρωματογραφίας *FPLC* με τις κατάλληλες στήλες συγγένειας και μοριακής διήθησης (εδάφια 2.5.4. – 2.5.6.1.2.). Ακολούθως, και αφού προσδιορίστηκε η απόδοση του καθαρισμού, πραγματοποιήθηκε κρυστάλλωση της γαλεκτίνης-3 υπό κατάλληλες συνθήκες με τη μέθοδο της καθημένης σταγόνας. Αφού η πρωτεΐνη κρυσταλλώθηκε, ακολούθησε εμβάπτιση (*soaking*) με τους υπό μελέτη προσδέτες *KISZ333* και *KISZ340* (εδάφια 2.7.1., 2.7.2.). Μετά από έλεγχο για την ύπαρξη της κατάλληλης μορφολογίας του κρυστάλλου, αυτός τοποθετήθηκε στο μηχάνημα παραγωγής ακτινών X και έπειτα από κατάλληλες ρυθμίσεις συλλέχθηκαν τα κρυσταλλογραφικά δεδομένα. Και οι δύο προσδέτες συνδέονται στο κέντρο πρόσδεσης. Η ανάλυση των δεδομένων έδειξε ότι οι αλληλεπιδράσεις του κέντρου *CRD* της καρβοξυτελικής περιοχής είναι παρόμοιες και στις δύο ενώσεις δημιουργώντας ένα δίκτυο αλληλεπιδράσεων με τα κατάλοιπα του κέντρου *CRD* το οποίο γεφυρώνεται και από μόρια ύδατος. Και οι δύο αναστολείς σχηματίζουν περίπου τις ίδιες αλληλεπιδράσεις *Van der Waals*. Κατάλοιπα του κέντρου *CRD* που φαίνονται συντηρημένα και παίζουν σημαντικό ρόλο στην πρόσδεση και την δημιουργία αλληλεπιδράσεων με το κέντρο *CRD* είναι τα: *Arg144*, *His158*, *Asn160*, *Arg162*, *Glu165*, *Asn174*, *Trp181* και *Glu184* (εδάφια 2.7.3., 2.7.4., 3.2.)

Η δέσμευση των αναστολέων στο κέντρο πρόσδεσης CRD του καρβοξυτελικού άκρου θέση δεν προκάλεσε κάποια σημαντικά δομική αλλαγή επί του συνόλου της πρωτεϊνικής δομής όπως φαίνεται και στην υπέρθεση των δομών σε προηγούμενο εδάφιο (**Εικόνα 14** και **Εικόνα 15**). Η πρόσδεση των ενώσεων στην περιοχή πρόσδεσης υδατανθράκων σχετίζεται με αύξηση της εντροπίας της διαμόρφωσης της πρωτεΐνης χωρίς σημαντικές αλλαγές στη δομική αρχιτεκτονική της.

Συνοψίζοντας, τα αποτελέσματα των δομικών μελετών αναδεικνύουν ότι οι ενώσεις *KISZ333* και *KISZ340* αποτελούν υποσχόμενους προσδέτες για την γαλεκτίνη-3. Απώτερος στόχος είναι οι μελέτες πρόσδεσης των ενώσεων αυτών. Η περιοχή πρόσδεσης υδατανθράκων της γαλεκτίνης-3 περιέχει ένα κατάλοιπο τρυπτοφάνης (*Trp181*), το οποίο εκπέμπει ενδογενή φθορισμό και μπορεί να μετρηθεί μέσω φασματοσκοπίας φθορισμού. Η κατανόηση του τρόπου πρόσδεσης των ενώσεων αυτών, καθώς και η σταθερά σύνδεσης, μπορεί να αποτελέσει σημαντικό βήμα για τον κατευθυνόμενο από τη δομή σχεδιασμό εν δυνάμει προσδετών που θα συνδέονται ακόμα πιο ισχυρά στο κέντρο πρόσδεσης *CRD*.

Βιβλιογραφία

1. Kumar, K. K., Chandra, K. L. P., Sumanthi, J., Reddy, G. S., Shekar, P. C., & Reddy, B. V. R. (2012). Biological role of lectins: A review. *Journal of orofacial sciences*, 4(1), 20.
2. Chettri, D., Boro, M., Sarkar, L., & Verma, A. K. (2021). Lectins: Biological Significance to Biotechnological Application. *Carbohydrate Research*, 108367.
3. Gabius, H. J. (1997). Animal lectins. *European journal of biochemistry*, 243, 543.
4. Watanabe, Y., Shiina, N., Shinozaki, F., Yokoyama, H., Kominami, J., Nakamura-Tsuruta, S., ... & Muramoto, K. (2008). Isolation and characterization of l-rhamnose-binding lectin, which binds to microsporidian *Glugea plecoglossi*, from ayu (*Plecoglossus altivelis*) eggs. *Developmental & Comparative Immunology*, 32(5), 487-499
5. A.F. Santos, M.D.C. Da Silva, T.H. Napoleao, P.M.G. Paiva, M.D.S. Correia, L.C.B. B. Coelho, (2014) Lectins: Function, structure, biological properties and potential applications, *Curr. Top. Pept. Protein Res.*
6. S.K. Lam, T.B. Ng, (2011), Lectins: production and practical applications, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 89 (1), 45–55
7. Domic, J., Dabelic, S., & Flögel, M. (2006). Galectin-3: an open-ended story. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1760(4), 616-635.
8. Kadrofske, M. M., Openo, K. P., & Wang, J. L. (1998). The HumanLGALS3 (Galectin-3) Gene: Determination of the Gene Structure and Functional Characterization of the Promoter. *Archives of biochemistry and biophysics*, 349(1), 7-20.
9. Nakahara, S., Oka, N. & Raz, A. (2005), On the role of galectin-3 in cancer apoptosis. *Apoptosis* 10, 267–275
10. Krześlak, A., & Lipińska, A. (2004). Galectin-3 as a multifunctional protein. *Cell Mol Biol Lett*, 9(2), 305-28
11. Seetharaman, J., Kanigsberg, A., Slaaby, R., Leffler, H., Barondes, S. H., & Rini, J. M. (1998). X-ray crystal structure of the human galectin-3 carbohydrate recognition domain at 2.1-Å resolution. *Journal of Biological Chemistry*, 273(21), 13047-13052

12. E.A. Barboni, S. Bawumia, K. Henrick, R.C. Hughes, (2000), Molecular modeling and mutagenesis studies of the N-terminal domains of galectin-3: evidence for participation with the C-terminal carbohydrate recognition domain in oligosaccharide binding, *Glycobiology* 10, 1201–1208
13. Dagher, S. F., Wang, J. L. and Patterson, R. J. (1995). Identification of galectin-3 as a factor in pre-mRNA splicing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 1213-1217.
14. Tsay, Y. G., Lin, N. Y., Voss, P. G., Patterson, R. J. and Wang, J. L. (1999). Export of galectin-3 from nuclei of digitonin-permeabilized mouse 3T3 fibroblasts. *Exp. Cell Res.* 252, 250-261.
15. Nickel, W. (2003), The mystery of nonclassical protein secretion. A current view on cargo proteins and potential export routes. *Eur. J. Biochem.* 270, 2109–2119.
16. Mehul, B. and Hughes, R.C. (1997), Plasma membrane targeting, vesicular budding and release of galectin 3 from the cytoplasm of mammalian cells during secretion. *J. Cell Sci.* 110, 1169–1178.
17. Akahani, S., Nangia-Makker, P., Inohara, H., Kim, H.-R.C. and Raz, A. (1997), Galectin-3: a novel antiapoptotic molecule with a functional BH1 (NWGR) domain of Bcl-2 family. *Cancer Res.* 57, 5272–5276.
18. Yang, R.-Y., Hsu, D.K. and Liu, F.-T. (1996), Expression of galectin-3 modulates T-cell growth and apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 6737– 6742
19. Yu, F., Finley, R.L., Jr., Raz, A. and Kim, H.-R.C. (2002), Galectin-3 translocates to the perinuclear membranes and inhibits cytochrome c release from the mitochondria. A role for synexin in galectin-3 translocation. *J. Biol. Chem.* 277, 15819-15827.
20. Kim, H.-R.C., Lin, H.-M., Biliran, H. and Raz, A. (1999), Cell cycle arrest and inhibition of anoikis by galectin-3 in human breast epithelial cells. *Cancer Res.* 59, 4148-4154.
21. Lin, H.-M., Moon, B.-K., Yu, F. and Kim, H.-R.C. (2000), Galectin-3 mediates genistein--induced G2/M arrest and inhibits apoptosis. *Carcinogenesis* 21, 1941–1945
22. I. Paron, A. Scaloni, A. Pines, A. Bachi, F.-T. Liu, C. Puppini, M. Pandolfi, L. Ledda, C. Di Loreto, G. Damante, G. Tell, (2003), Nuclear localization of Galectin-3 in transformed thyroid cells: a role in transcriptional regulation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 302, 545–553

23. Hsu, D.K., Dowling, C.A., Jeng, K.-C.G., Chen, J.-T., Yang, R.-Y. and Liu, F.-T. (1999), Galectin-3 expression is induced in cirrhotic liver and hepatocellular carcinoma. *Int. J. Cancer* 81, 519–526
24. F.A. van den Brule, D. Waltregny, F.-T. Liu, V. Castronovo, (2000) Alteration of the cytoplasmic/nuclear expression pattern of galectin-3 correlates with prostate carcinoma progression, *Int. J. Cancer* 89, 361–367
25. Berberat, P.O., Friess, H., Wang, L., Zhu, Z., Bley, T., Frigeri, L., Zimmermann, A., and Büchler, M.W. (2001), Comparative analysis of galectins in primary tumors and tumor metastasis in human pancreatic cancer. *J. Histochem. Cytochem.* 49, 539–549
26. Bresalier, R.S., Yan, P.-S., Byrd, J.C., Lotan, R. and Raz, A. (1997), Expression of the endogenous galactose-binding protein galectin-3 correlates with the malignant potential of tumors in the central nervous system. *Cancer* 80, 776–787.
27. Castronovo, V., Van Den Brule, F.A., Jackers, P., Cluse, N., Liu, F.T., Gillet, C. and Sobel, M.E. (1996), Decreased expression of galectin-3 is associated with progression of human breast cancer. *J. Pathol.* 179, 43–48.
28. Κλούρα, Ν. “Βασική Ανόργανη Χημεία”. Αθήνα: Τραυλός, 1999.
29. Manzoni, F., Saraboji, K., Sprenger, J., Kumar, R., Noresson, A. L., Nilsson, U. J., & Logan, D. T. (2016). perdeuteration, crystallization, data collection and comparison of five neutron diffraction data sets of complexes of human galectin-3C. *Acta Crystallographica Section D: Structural Biology*, 72(11), 1194-1202.
30. Smyth, M. S., & Martin, J. H. J. (2000). x Ray crystallography. *Molecular Pathology*, 53(1), 8.
31. Van Holde KE, Johnson WC, Ho PS. Principles of physical biochemistry. 2nd ed. Upper Saddle River, N.J.: Pearson/Prentice Hall; 2006
32. Gallagher, S.R. (2012), SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE). *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*, 6: 7.3.1-7.3.28
33. Bradford MM. (1976), A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*. 72:248-54
34. Johnston, C., Martin, B., Fichant, G. *et al.*, (2014), Bacterial transformation: distribution, shared mechanisms and divergent control. *Nat Rev Microbiol* 12, 181–196

35. Bell, C. E., & Lewis, M. (2000). A closer view of the conformation of the Lac repressor bound to operator. *Nature structural biology*, 7(3), 209–214.
36. Ettre LS, Sakodynskii KI, Tswett, M.S. (1993), And the Discovery of Chromatography Early Work (1899-1903). *Chromatographia*, 35:223-31
37. Hage, D. S., Anguizola, J. A., Bi, C., Li, R., Matsuda, R., Papastavros, E., ... & Zheng, X. (2012). Pharmaceutical and biomedical applications of affinity chromatography: recent trends and developments. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 69, 93-105.
38. Duong-Ly, K. C., & Gabelli, S. B. (2014). Gel filtration chromatography (size exclusion chromatography) of proteins. *Methods in enzymology*, 541, 105-114.
39. Swinehart, D. F. (1962). *The Beer-Lambert Law*. *Journal of Chemical Education*, 39(7), 333.
40. Murshudov GN, Vagin AA, Dodson EJ. (1997), Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*,53:240-55.
41. Marshall William, Bangert K. Stephen, Κλινική Χημεία, 3^η Ελληνική έκδοση, Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης, 2011
42. Emsley P, Cowtan K. (2004), Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 60:2126-32.
43. Emsley P, Lohkamp B, Scott WG, Cowtan K. (2010), Features and development of Coot. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 66:486-501
44. Murshudov GN, Skubak P, Lebedev AA, Pannu NS, Steiner RA, Nicholls RA, et al. (2011), REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 67:355-67
45. COLLABORATIVE COMPUTATIONAL PROJECT N. (1994), The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 50:760-3.
46. McNicholas S, Potterton E, Wilson KS, Noble ME. (2011), Presenting your structures: the CCP4mg molecular-graphics software. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 67:386-94