



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ – ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΚΑΙ ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΩΝ ΕΡΕΥΝΩΝ/ΙΤΕ**

**«Εγκαθίδρυση μεθοδολογίας sandwich ELISA για τον
ποσοτικό προσδιορισμό των επιπέδων της γαλεκτίνης-1 σε
παθο – φυσιολογικά δείγματα ορού»**

**ΚΟΛΟΪ ΒΙΚΤΩΡΙΑ
ΤΕΧΝΟΛΟΓΟΣ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ**

**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
ΧΡΙΣΤΟΦΟΡΙΔΗΣ ΣΑΒΒΑΣ**
Καθηγητής Βιολογικής Χημείας,
Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων &
Ινστιτούτο Βιοϊατρικών Ερευνών/ΙΤΕ

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2022**

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε την περίοδο Σεπτέμβριος 2020 – Νοέμβριος 2021, στο Ινστιτούτο Βιοϊατρικών Ερευνών του Ιδρύματος Τεχνολογίας και Έρευνας (ΙΤΕ).

Η συμμετοχή μου στο μεταπτυχιακό πρόγραμμα «Μοριακή-Κυτταρική Βιολογία και Βιοτεχνολογία» μου προσέφερε γνώσεις τόσο σε θεωρητικό όσο και σε εργαστηριακό-τεχνικό επίπεδο. Επιπλέον, μου έδωσε την ευκαιρία να βελτιώσω τις δυνατότητες μου και να αναπτύξω καινούριες και μάλιστα σε ένα εργαστήριο, τον υπεύθυνο του οποίου προσέγγισα ως τόπο εκπόνησης της διατριβής μου. Τόσο κατά την έναρξη της παρούσας διατριβής, όσο και κατά τη διεξαγωγή της, δέχθηκα στήριξη από ανθρώπους στους οποίους θα ήθελα να αποδώσω θερμές ευχαριστίες.

Αναφέρομαι αρχικά, στον επιβλέπων καθηγητή μου, κ. Σάββα Χριστοφορίδη, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και που μου προσέφερε την ευκαιρία να αποτελώ μέλος της ερευνητικής του ομάδας. Επίσης, τον ευχαριστώ θερμά για την κατανόηση και την πολύτιμη καθοδήγηση του σε οποιοδήποτε ζήτημα προέκυψε στα πλαίσια εκπόνησης της παρούσας διατριβής. Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω να δώσω και στην Αλεξάνδρα Παπαφωτίκα, μέλος του εργαστηρίου, για την ουσιαστική βοήθεια της στο να με προετοιμάσει στην διεξαγωγή των πειραμάτων αλλά και στη πρόσχαρη διάθεση της να επιλύει τους προβληματισμούς μου. Δε θα μπορούσα να παραλείψω και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου, Δέσποινα Γκέκα, Ευαγγελία Γούλα και Παναγιώτη Λέντζαρη, δίπλα στους οποίους μάθαινα, καθώς και για το φιλικό περιβάλλον που δημιουργούσαν κάθε μέρα. Βαθιά ευγνωμοσύνη θα ήθελα να εκφράσω στη Μαρία Ζαφείρη και στον Λευτέρη Σινάνη με τους οποίους συμπορεύτηκα στο συγκεκριμένο μεταπτυχιακό για την ηθική υποστήριξη που μου παρείχαν καθ' όλη τη διάρκεια του προγράμματος.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω και τον Αγγειοχειρουργό Ιατρό, Δημήτρη Χατζή, που μας προσέφερε τα δείγματα, καθώς και για την πολύτιμη συνεργασία μας.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω και τα μέλη της πενταμελούς επιτροπής, τον κ. Ευστάθιο Φριλίγγο, την κα. Θωμαΐς Παπαμαρκάκη, τον κ. Ευάγγελο Κωλέττα και τον κ. Παναγιώτη Κούκλη για τις παρατηρήσεις τους ως προς την βελτίωση της παρούσας εργασίας.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου, Βασίλη και Βασιλική και την αδελφή μου Μαρινέλα, για την υπομονή τους κατά την διεκπεραίωση της παρούσας διατριβής, για την εμπιστοσύνη που μου δείχνουν και που πάντοτε με στηρίζουν στα βήματα και στους σκοπούς μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ.....	5
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	6
SUMMARY	8
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	10
1.1 Λεκτίνες.....	10
1.2 Οικογένεια γαλεκτινών.....	11
1.2.1 Ο ρόλος γλυκοζυλίωσης των γαλεκτινών.....	13
1.3 Γαλεκτίνη 1	14
1.3.1 Σύνθεση και έκκριση γαλεκτίνης 1.....	16
1.3.2 Ενδοκυττάρια και εξωκυττάρια δράση της γαλεκτίνης 1	17
1.4 Ο ρόλος της γαλεκτίνης 1 στον καρκίνο.....	19
1.4.1 Απόπτωση και ανοσοκαταστολή T-λεμφοκυττάρων	19
1.4.2 Αγγειογένεση	21
1.4.3 Μετάσταση	23
1.4.4 Φλεγμονή και θρόμβωση	23
1.5 Στόχευση της δράσης της γαλεκτίνης 1.....	25
1.6 Στόχος εργασίας.....	27
2. ΜΕΘΟΔΟΙ.....	29
2.1 Απομόνωση πολυκλωνικού αντισώματος αντι – γαλεκτίνης 1 από ορό κουνελιού.....	29
2.1.1 Παραγωγή πρωτεΐνης γαλεκτίνης 1, συνδεδεμένη με την τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST).....	29
2.1.2 Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων	29
2.1.3 Επαγωγή της παραγωγής των πρωτεϊνών με IPTG.....	30
2.1.5 Λύση των βακτηριακών εκχυλισμάτων με τεχνική άσκησης πίεσης (French Pressure).....	32

2.1.6 Απομόνωση πρωτεΐνης GST – γαλεκτίνης 1 σε στήλη με σφαιρίδια γλουταθειόνης.....	32
2.1.7 Απομόνωση αντισωμάτων αντι – γαλεκτίνης 1 από ορό κουνελιού στη στήλη γλουταθειόνης.....	33
2.2 Ποσοτικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης της γαλεκτίνης 1 με τη μέθοδο Bradford.....	36
2.3 Ηλεκτροφόρηση γαλεκτίνης 1 σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE) και ανοσοαποτύπωση πρωτεΐνης κατά Western.....	36
2.4 Έλεγχος της παρουσίας της γαλεκτίνης 1 σε δείγμα ορού πλάσματος ασθενών με δοκιμασία χρωματογραφίας συγγένειας πρωτεΐνης A.....	37
2.5 Εγκαθίδρυση μεθόδου sandwich-ELISA.....	38
2.6 Ποσοτικοποίηση και στατιστική ανάλυση.....	41
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	42
3.1 Έλεγχος της ευαισθησίας των καθαρισμένων αντισωμάτων αντι – γαλεκτίνης 1.....	42
3.2 Έλεγχος της παρουσίας της γαλεκτίνης 1 σε δείγμα φυσιολογικού ορού.....	43
3.3 Στάδια εγκαθίδρυσης της μεθόδου sandwich-ELISA.....	46
3.3.1 Έλεγχος διαλυμάτων παρεμπόδισης της μη ειδικής δέσμευσης. ..	47
3.3.2 Έλεγχος ευαισθησίας πρωτογενών αντισωμάτων αντί – γαλεκτίνης 1.....	50
3.3.3 Σύγκριση μεταξύ διαφορετικών αντισωμάτων έναντι της γαλεκτίνης 1.....	52
3.3.4 Όρια ανίχνευσης της μεθόδου.....	54
3.3.5 Δοκιμασία ανίχνευσης της γαλεκτίνης 1 σε δείγμα φυσιολογικού ορού.....	57
3.4 Ποσοτικός προσδιορισμός των επιπέδων της γαλεκτίνης 1 σε παθο – φυσιολογικά δείγματα ορού.....	59
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	62

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

- ADP** (adenosine diphosphate), διφωσφορική αδενοσίνη
- BSA** (bovine serum albumin), αλβουμίνη ορού βοός
- CRD** (carbohydrate binding domain), επικράτεια πρόσδεσης υδατανθράκων
- DMP** (dimethyl pimelimidate), διμέθυλο πιμελιμιδικό
- ECM** (extracellular matrix), εξωκυττάρια θεμέλια ουσία
- ELISA** (enzyme-linked immunosorbent assay), μέθοδος ενζυμικής ανοσοπροσρόφησης
- Fab** (fragment antigen binding), θραύσματα πρόσδεσης αντιγόνου
- Fc** (fragment crystallizable), κρυσταλλώσιμο θραύσμα
- GCNT** (glucosaminyl N-acetyl transferase), τρανσφεράση του N-ακετυλο-γλυκοζαμινύλιου
- GST** (glutathione S-transferase), S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης
- HNSCC** (head and neck squamous cell carcinoma), ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα κεφαλής και τραχήλου
- HUVEC** (human umbilical vein endothelial cells), ενδοθηλιακά κύτταρα από φλέβα ανθρώπινου ομφάλιου λώρου
- ICAM** (intercellular adhesion molecule), διακυτταρικό μόριο προσκόλλησης
- IPTG** (β -D-1-thiogalactopyranoside), Ισοπροπυλο β -D-1-θειογαλακτοπυρανοσίδιο
- MAPK** (mitogen-activated protein kinase), πρωτεϊνική κινάση ενεργοποιούμενη από μιτογόνα
- MMP** (matrix metalloproteinases), μεταλλοπρωτεϊνάσες εξωκυττάριας ουσίας
- OPD** (o-phenylenediamine), ο-φαινυλενοδιαμίνη
- PCR** (polymerase chain reaction), αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
- siRNA** (small interfering ribonucleic acid), μικρά παρεμβαλλόμενα ριβονουκλεϊκά οξέα
- SLA** (synthetic lactulose amines), συνθετικές αμίνες λακτουλόζης
- TDG** (thiodigalactoside), θειοδιγαλακτοσίδιο
- VCAM** (vascular cell adhesion molecule), μόριο προσκόλλησης των αγγειακών κυττάρων
- VEGF** (vascular endothelial growth factor), αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι γαλεκτίνες, συνιστούν μια οικογένεια λεκτινών, οι οποίες προσδένονται με υψηλή ειδικότητα σε μόρια β-γαλακτόζης, που εμπεριέχονται σε γλυκοπρωτεΐνες και γλυκολιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης, της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας και ενδοκυττάρων μορίων. Στον άνθρωπο έχουν ταυτοποιηθεί 12 μέλη της οικογένειας των γαλεκτινών, με την γαλεκτίνη 1, να αποτελεί το πιο καλά αναγνωρισμένο μέλος αυτής. Χαρακτηρίζεται ως μια πρωτότυπη ομοδιμερής πρωτεΐνη ~14,5 KDa, η οποία κατανέμεται ευρέως σε διάφορους ιστούς. Τα επίπεδα έκφρασής της, είναι χαμηλά σε φυσιολογικά κύτταρα, ενώ υπερεκφράζεται σε καρκινικά κύτταρα και σε ιστούς νεοπλασίας. Η υπερέκφραση της, έχει ως αποτέλεσμα την πρόσδεση της σε ένα σύνολο γλυκοζυλιωμένων υποδοχέων της κυτταρικής επιφάνειας και της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, γεγονός που την εμπλέκει σε σημαντικές βιολογικές διεργασίες που αφορούν τον καρκίνο, όπως είναι η κυτταρική προσκόλληση και ο πολλαπλασιασμός, η ανοσοαπόκριση και η απόπτωση, η αγγειογένεση και η μετάσταση, η φλεγμονή και η θρόμβωση.

Πρόσφατα, ερευνητικά μέλη του εργαστηρίου, ταυτοποίησαν τη γαλεκτίνη 1 ως ένα νέο μόριο που εντοπίζεται στα εξειδικευμένα οργανίδια των ενδοθηλιακών κυττάρων, τα επονομαζόμενα WPBs. Σκοπός της παρούσας μελέτης, ήταν η εγκαθίδρυση μεθοδολογίας sandwich-ELISA για τον ποσοτικό προσδιορισμό των επιπέδων της γαλεκτίνης 1 και την εφαρμογή της μεθόδου σε ένα σύνολο παθο – φυσιολογικών δειγμάτων ορού.

Ειδικότερα, επιβεβαιώθηκε η παρουσία της πρωτεΐνης σε δείγμα φυσιολογικού ορού, με τεχνική χρωματογραφίας συγγένειας μέσω συστήματος πρωτεΐνης A και με ανοσοαποτύπωση κατά Western, ενώ στη συνέχεια, ακολούθησε η πορεία ανάπτυξης της μεθόδου sandwich-ELISA. Για το σκοπό αυτό, καταρχάς διερευνήθηκε η καταλληλότητα των διαθέσιμων αντισωμάτων. Στο εργαστήριο, είχαν ήδη αναπτυχθεί πολυκλωνικά αντισώματα αντι – γαλεκτίνης 1 σε κουνέλια, των οποίων η ευαισθησία και η ειδικότητα ελέγχθηκε και επιβεβαιώθηκε στη παρούσα μελέτη. Έτσι, τα παραγόμενα αντισώματα αντι – γαλεκτίνης 1, αλλά και πρωτεΐνη γαλεκτίνης 1 σε καθαρή μορφή, μαζί με κατάλληλα δευτερογενή αντισώματα του εμπορίου, αποτέλεσαν τα μοριακά εργαλεία για την διερεύνηση των βέλτιστων συνθηκών ευαισθησίας και ειδικότητας της μεθόδου. Πράγματι, χρησιμοποιώντας πρότυπες

συγκεντρώσεις καθαρής γαλεκτίνης 1, ήμασταν σε θέση να εγκαθιδρύσουμε συνθήκες ευαισθησίας εντοπισμού της γαλεκτίνης 1 έως τα 2ng, γεγονός που μας επέτρεψε να προχωρήσουμε στον προσδιορισμό των επιπέδων της πρωτεΐνης σε δείγματα ορού αίματος.

Στη τελική δοκιμασία, εξετάστηκαν συνολικά 54 δείγματα, εκ των οποίων τα 9 προέρχονταν από ορό υγιών ατόμων και τα υπόλοιπα 45 από ορό ασθενών με καρκίνο οι οποίοι είχαν αναπτύξει φλεβικές θρομβώσεις, ως συνέπεια της καρκινοπάθειας τους. Από τα 45 δείγματα των ασθενών, τρεις ήταν εκείνοι που έφεραν αυξημένα ποσά γαλεκτίνης 1 (5,81 – 21,33 ng/ml).

Εν κατακλείδι, με τη νέα μέθοδο sandwich-ELISA, που αναπτύχθηκε στη παρούσα μελέτη, προέκυψε ευαισθησία που είναι παρόμοια με αυτή που εμφανίζεται σε άλλες μελέτες, γεγονός που συνηγορεί στην ικανοποιητική απόδοση της μεθοδολογίας. Επίσης, η μέθοδος επιτρέπει την ανίχνευση των επιπέδων της πρωτεΐνης σε δείγματα ορού, χωρίς να απαιτείται καθαρισμός του βιολογικού δείγματος. Μελλοντικές μελέτες ανίχνευσης της γαλεκτίνης 1 σε επαρκή αριθμό ασθενών, και η συσχέτιση με τα κλινικά τους χαρακτηριστικά, θα αναδείξουν τη διαγνωστική και προγνωστική αξία της μεθόδου στον καρκίνο και στις νόσους του αγγειακού συστήματος.

SUMMARY

Galectins constitute a family of animal lectins, that bind with high specificity to β -galactosides of glycoproteins and glycolipids that are present in the cell membrane, in the extracellular matrix and in intracellular molecules. In humans, 12 members of the galectin family have been identified, of which, galectin 1 is the most well-recognized member of this family. Galectin 1 is characterized as a prototypical homodimeric protein of ~14,5 KDa, that has a wide distribution in various tissues. Galectin 1 expression levels are low in normal cells, but it is overexpressed in tumor cells and neoplastic tissues. Its overexpression results in its binding to glycosylated receptors on the cell surface and on components of the extracellular matrix, having implications in important biological processes affected by cancer, such as cell adhesion and proliferation, immune response, apoptosis, angiogenesis, metastasis, inflammation and thrombosis.

Recently, our research team identified galectin 1 as a new molecule that is found inside the specialized organelles of the endothelial cells, the so-called Weibel Palade Bodies (WPBs). The aim of the present study was to establish a sandwich-ELISA methodology for the quantification of galectin 1, and to use this assay in quantifying the levels of galectin 1 in a set of patho – physiological serum samples.

At first, we confirmed the presence of galectin 1 in the serum sample of a healthy individual, by affinity chromatography, using protein A beads and Western blotting, prior to establishing the key steps of the sandwich-ELISA method. Then, the suitability of the available antibodies, to be used in ELISA, was investigated. Polyclonal anti – galectin 1 antibodies raised in rabbits had already been developed in the laboratory, whose sensitivity and specificity were tested and confirmed in the present study. Thus, these polyclonal anti – galectin 1 antibodies, together with monoclonal antibodies and the appropriate secondary commercial antibodies and purified galectin-1, were used as molecular tools to optimise the conditions of the assay. Indeed, by using a standard curve of purified galectin 1 protein concentrations, we were able to establish the conditions for detecting galectin-1 levels as low as 2ng, which allowed us to proceed to the quantification of protein's levels in serum samples.

We have assayed, in total, 54 serum samples, 9 of which were healthy individuals and 45 were cancer patients that had developed deep vein thrombosis, as a result of their cancer condition. Among the cancer patients, three individuals showed higher amounts of galectin 1 in their sera samples (5,81 – 21,33 ng/ml), as compared to healthy donors.

In conclusion, the new sandwich-ELISA method that was developed in the present study exhibits similar sensitivity to that observed in previous studies, which supports the suitability of the established protocol. Also, this method allows the detection of galectin 1 levels in crude serum samples. Future studies will be needed to detect galectin 1 levels in a sufficient number of patients, and to correlate these levels with the clinical characteristics of the patients, which will allow an assessment of the diagnostic and prognostic value of this assay in cancer and in vascular diseases.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Λεκτίνες

Προ 130 ετών περίπου, ανακαλύφθηκε μια πρωτεΐνη στα εκχυλίσματα σπόρων Ρικίνου του κοινού (*Ricinus communis*), η οποία ήταν σε θέση να συγκολλεί ζωικά ερυθρά αιμοσφαίρια¹. Μερικά χρόνια αργότερα, οι έρευνες των Morgan και Watkins, κατέδειξαν ότι τέτοιες πρωτεΐνες, που αρχικά θεωρήθηκε ότι υπήρχαν μόνο στα φυτά, δεσμεύονταν σε συγκεκριμένους υδατάνθρακες της επιφάνειας των αιμοσφαιρίων προκαλώντας αιμοσυγκόλληση². Έκτοτε, διαπιστώθηκε η παρουσία ενός σημαντικού αριθμού πρωτεϊνών με συγκολλητική ικανότητα, σε ένα ευρύ φάσμα φυτικών και ζωϊκών ιστών, οι οποίες είχαν την ικανότητα να συνδέονται εκλεκτικά και αναστρέψιμα με διάφορους υδατάνθρακες και ονομάστηκαν "λεκτίνες" από τη λατινική λέξη "legere", που σημαίνει "διαλέγω"³.

Σήμερα, είναι γνωστό ότι οι λεκτίνες είναι γλυκοπρωτεΐνες ευρέως διαδεδομένες στην φύση, οι οποίες συνδέονται ειδικά με μόρια υδατανθράκων ή υδατανθρακικές λειτουργικές ομάδες γλυκολιπιδίων και γλυκοπρωτεϊνών, οι οποίες υπάρχουν στις κυτταρικές επιφάνειες, στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία και ενδοκυττάρια. Η ακριβής λειτουργία και η βιολογική σημασία των λεκτινών, δεν έχει ακόμη πλήρως διευκρινισθεί. Ωστόσο, λόγω της δέσμευσής τους με ένα ευρύ φάσμα συγκεκριμένων χαρακτηριστικών ομάδων υδατανθράκων, θεωρείται ότι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε μια σειρά βιολογικών διεργασιών, όπως η ρύθμιση της κυτταρικής ανάπτυξης και της γλυκοπρωτεϊνικής σύνθεσης, η προσκόλληση των κυττάρων μεταξύ τους, η σηματοδότηση και η ανοσοαπόκριση³.

Οι λεκτίνες, εκφράζονται σε ένα σύνολο οργανισμών όπως είναι τα φυτά, οι μύκητες, τα μανιτάρια και τα βακτήρια, μέχρι τα ασπόνδυλα και τα θηλαστικά.

Στα θηλαστικά, διακρίνονται δύο κύριες οικογένειες λεκτινών:

- οι **λεκτίνες τύπου C**⁴, οι οποίες απαιτούν ιόντα Ca^{2+} , προκειμένου να δεσμευτούν σε υδατανθρακικές αλυσίδες γλυκοπρωτεϊνών και σε αυτήν την οικογένεια, ανήκουν οι πρωτεΐνες σελεκτίνες, κολλεκτίνες, και πενταζίνες⁴ και,
- οι **γαλεκτίνες**⁵, οι οποίες δεσμεύονται σε συγκεκριμένες υδατανθρακικές αλυσίδες με τρόπο ανεξάρτητο των ιόντων Ca^{2+} .

1.2 Οικογένεια γαλεκτινών

Οι γαλεκτίνες αναφέρθηκαν για πρώτη φορά το 1994 και χαρακτηρίζαν πρωτεΐνες που πληρούσαν δύο κριτήρια: ειδικότητα δέσμευσης σε γλυκοπρωτεΐνες και γλυκολιπίδια που φέρουν υδατανθρακικά μόρια β-γαλακτόζης (β -Gal) και σημαντική ομοιότητα, μεταξύ των μελών αυτής της οικογένειας, ως προς την αμινοξική αλληλουχία δέσμευσης των υδατανθράκων (CRD), έτσι όπως αυτή είχε ταυτοποιηθεί με κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ⁵.

Μέχρι σήμερα, έχουν ταυτοποιηθεί 15 μέλη της οικογένειας των γαλεκτινών, ωστόσο, μόνο τα γονίδια 12 γαλεκτινών έχουν βρεθεί στον άνθρωπο⁷. Κάποιες από αυτές είναι ειδικές για συγκεκριμένους ιστούς. Για παράδειγμα, η γαλεκτίνη 2, εκφράζεται εξ ολοκλήρου στον γαστρεντερικό σωλήνα, ενώ η γαλεκτίνη 7, στα κύτταρα του επιδερμικού ιστού⁷. Οι περισσότερες όμως γαλεκτίνες, κατανέμονται ευρέως στους ιστούς, ωστόσο, με ένα διακριτό μοτίβο έκφρασης που εξαρτάται από τον ιστό και την κατάσταση του κυττάρου. Για παράδειγμα, η γαλεκτίνη 1, εκφράζεται σε χαμηλά επίπεδα στα T-λεμφοκύτταρα και στα ενδοθηλιακά κύτταρα, ενώ υπερεκφράζεται όταν τα κύτταρα αυτά ενεργοποιούνται, όπως επίσης και η γαλεκτίνη 3, που υπερεκφράζεται σε ενεργοποιημένα μακροφάγα και ενδοθηλιακά κύτταρα^{7,8}.

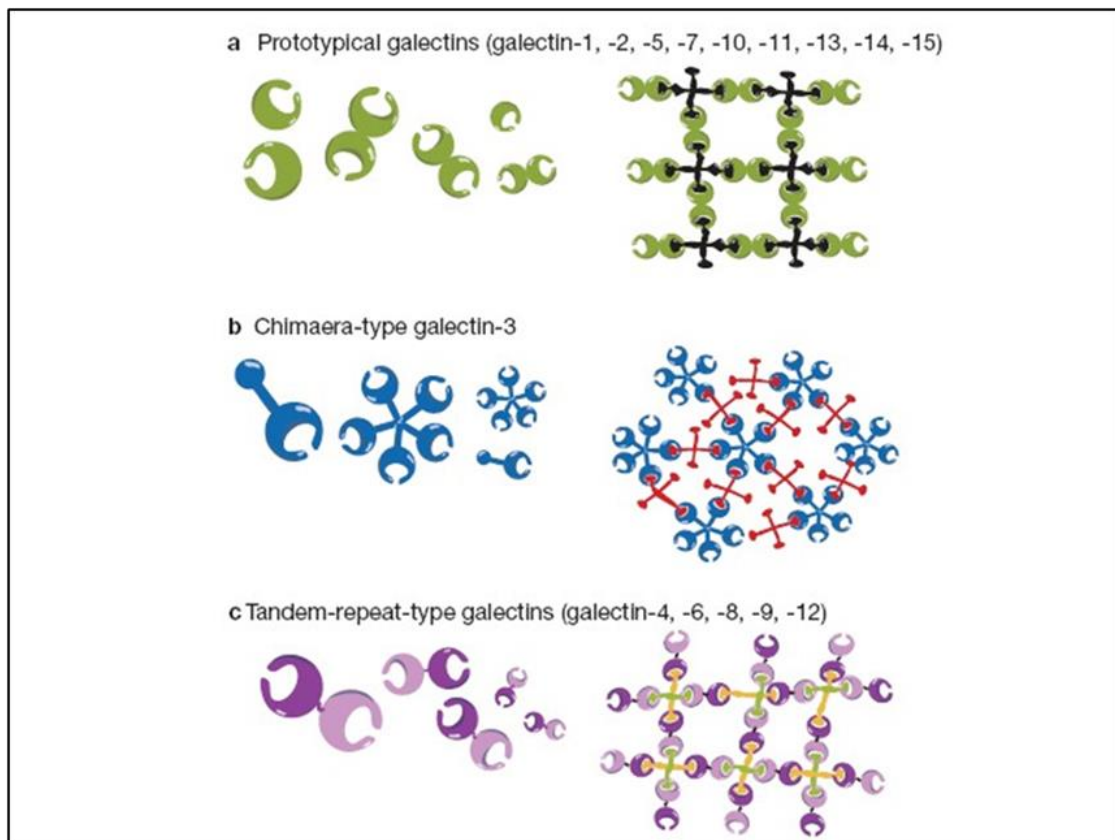
Όλες οι γαλεκτίνες, προσδένουν μονάδες N-ακετυλο-λακτοζαμίνης σε β-γαλακτόζες (Gal β -1-3/4-GluNAc), που εμπεριέχονται σε διάφορες γλυκοπρωτεΐνες, μέσω ενός πολυπεπτιδίου, το οποίο περιλαμβάνει μια εξελικτικά συντηρημένη αλληλουχία περίπου 130 αμινοξέων και είναι ομόλογη μεταξύ των διαφορετικών γαλεκτινών⁹. Η αμινοξική αυτή αλληλουχία, χαρακτηρίζεται ως περιοχή αναγνώρισης υδατανθράκων (CRD) και προσδίδει στις γαλεκτίνες την ιδιότητα τους ως λεκτίνες.

Με βάση τη δομή τους, οι γαλεκτίνες στον άνθρωπο διακρίνονται στους εξής τύπους^{9,10} (Εικόνα 1):

- Τον **πρωτότυπο** (γαλεκτίνες: 1, 2, 5, 7, 10, 11, 13, 14 και 15), τα μέλη του οποίου περιέχουν μια ενιαία CRD δυνάμενη να συνδυασθεί με άλλη, προκειμένου να σχηματίσει ομοδιμερή.
- Τον **χιμαιρικό**, με μοναδικό εκπρόσωπό του την γαλεκτίνη 3. Εκτός από μια CRD, αυτή η γαλεκτίνη περιέχει και μια αμινο-τελική περιοχή, μη χαρακτηριστική των πρωτεϊνών λεκτινών, που είναι πλούσια σε κατάλοιπα προλίνης, γλυκίνης και τυροσίνης, η οποία ομοιάζει με

κολλαγόνο και πιθανολογείται να συμβάλλει στην αυτό-συσσωμάτωση μορίων γαλεκτίνης 3, καθώς μπορεί να σχηματίσει ολιγομερή.

- Τον τύπο της **διαδοχικής επαναλήψεως** (γαλεκτίνες: 4, 6, 8, 9 και 12), στον οποίο τουλάχιστον δύο CRDs εμφανίζονται με διαφορετικές συγγένειες δεσμεύσεως υδατανθράκων και γεφυρώνονται μεταξύ τους μέσω μιας μικρής αλυσίδας αποτελούμενη μέχρι 70 αμινοξέων.



Εικόνα 1. Ταξινόμηση γαλεκτινών⁹ – (a) Πρωτότυπες γαλεκτίνες (γαλεκτίνες: 1, 2, 5, 7, 10, 11, 13, 14 και 15), αποτελούμενες από μια CRD οι οποίες σχηματίζουν ομοδιμερή. (b) Χιμαιρικός τύπος της γαλεκτίνης 3, αποτελούμενη από ασυνήθιστο για την ιδιότητα των λεκτινών, αμινοτελικό άκρο με κατάλοιπα προλίνης, γλυκίνης και τυροσίνης, συγχωνευμένο στη CRD και η οποία σχηματίζει πενταμερή κατά τη δέσμευση της σε υδατάνθρακες. (c) Γαλεκτίνες διαδοχικών επαναλήψεων (γαλεκτίνες: 4, 6, 8, 9 και 12), αποτελούμενες από δύο διακριτές CRD συνδεδεμένες μεταξύ τους με έναν συνδέτη και οι οποίες διαθέτουν δύο περιοχές δέσμευσης των υδατανθράκων τους.

Αν και οι περισσότερες γαλεκτίνες αναγνωρίζουν απλά μόρια β-γαλακτόζης, η συγγένεια δέσμευσης τους είναι σχετικά ασθενής¹¹. Κάποιες από τις γαλεκτίνες που διαθέτουν μια CRD (πρωτότυπες γαλεκτίνες) προβαίνουν σε σχηματισμό ομοδιμερών των υπομονάδων τους, προκειμένου να ενισχύσουν

την ειδικότητα με τους προσδέτες τους, όπως κάνουν οι γαλεκτίνες 1, 2, 11, 13, 14, 15, ενώ τα υπόλοιπα μέλη των πρωτότυπων γαλεκτινών (5, 7 και 10), λειτουργούν ιδανικά ως μονομερή. Οι γαλεκτίνες 4, 6, 8, 9 και 12 (γαλεκτίνες διαδοχικών επαναλήψεων), που διαθέτουν δύο διαφορετικές CRDs, με διαφορετικές θέσεις σύνδεσης υδατανθράκων, σχηματίζουν ετεροδιμερή, ενώ η γαλεκτίνη 3 (χιμαιρική γαλεκτίνη), σχηματίζει πενταμερή κατά την σύνδεση της σε ποικίλους υδατάνθρακες^{9,11} (Εικόνα 1).

Από την βιβλιογραφία, ο προσδιορισμός της αμινοξικής αλληλουχίας των CRDs των γαλεκτινών που έχουν ταυτοποιηθεί στον άνθρωπο, έχει καταδείξει ότι οι CRDs στα διάφορα μέλη αυτής της οικογένειας, παρουσιάζουν ομολογία μεταξύ τους σε ποσοστό που κυμαίνεται από 20% έως 50%. Αξιοσημείωτη εξαίρεση αποτελεί το καρβοξυ-τελικό άκρο της CRD της γαλεκτίνης 12, που είναι λιγότερο από 20% ταυτόσημη με τις CRDs όλων των υπολοίπων μελών. Ενώ, οι γαλεκτίνες 10, 13 και 14, που είναι ταυτόσημα ομόλογες μεταξύ τους σε ποσοστό πάνω από 50%, με τις γαλεκτίνες 1, 2 και 12 να είναι ομόλογες σε ποσοστό λιγότερο από 20%⁹.

1.2.1 Ο ρόλος γλυκοζυλίωσης των γαλεκτινών

Υδατάνθρακες υπάρχουν εκ φύσεως σε υποδοχείς της επιφάνειας των μεμβρανών όλων των κυττάρων αλλά και στα στελέχη της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (ECM) και η παρουσία ειδικών υδατανθρακικών ομάδων σε γλυκοπρωτεΐνες, πρωτεογλυκάνες και γλυκολιπίδια, εξυπηρετεί συγκεκριμένες βιολογικές λειτουργίες. Για παράδειγμα, η προσκόλληση των λευκοκυττάρων στο ενεργοποιημένο ενδοθήλιο, επιτυγχάνεται λόγω της αναγνώρισης συγκεκριμένων ολιγοσακχαριτών (sialyl Le^x) από τις πρωτεΐνες σελεκτίνες στην κυτταρική επιφάνεια¹². Επιπλέον, η υδατανθρακική σύνθεση της λαμινίνης στην ECM, επηρεάζει την κυτταρική προσκόλληση και την εξάπλωση των κυττάρων. Άλλωστε και η ανακάλυψη γενικότερα των λεκτινών, έγινε με βάση την υπόθεση ότι η παρουσία των υδατανθράκων στην κυτταρική επιφάνεια, ευνοεί την κυτταρική προσκόλληση⁵.

Παρομοίως, οι γαλεκτίνες όταν εξωκυττάρωνονται, κάνουντας χρήση την ιδιότητα τους ως λεκτίνες, προσδένουν με ειδικότητα σε υδατανθρακικά μόρια σε ένα σύνολο γλυκοζυλιωμένων πρωτεϊνών, επηρεάζοντας κυτταρικές λειτουργίες. Η συγγένεια σύνδεσης των διαφόρων μελών των γαλεκτινών,

διαφέρει ανάλογα με τη δομή των γλυκοσυνδετών και τις τροποποιήσεις των υπολειμμάτων γαλακτόζης, όπως η σιαλυλίωση, η φουκοζυλίωση και η σούλφωση¹³. Επομένως, οι γαλεκτίνες δεν έχουν συγκεκριμένους υποδοχείς, αλλά κάθε μέλος αυτής της οικογένειας, μπορεί να συνδεθεί με ένα σύνολο γλυκοπρωτεϊνών που περιέχουν τους κατάλληλους ολιγοσακχαρίτες, γεγονός που εξηγεί την επιλεκτική τους δράση και την κυτταρική τους κατανομή σε διαφορετικά είδη ιστών¹⁴.

Παρόλα αυτά, η παρουσία του δισακχαρίτη N-ακετυλο-λακτοζαμίνη, συνδεόμενος σε O- και N- γλυκάνες πρωτεϊνών, φαίνεται να αποτελεί την βασική προϋπόθεση για την αποκρυπτογράφηση του γλυκοκώδικα από όλα τα μέλη των γαλεκτινών και την επακόλουθη αναγνώριση των πιθανών προσδετών τους¹⁵. Αποτελεί έναν κοινό δισακχαρίτη που περιλαμβάνεται σε διάφορες κυτταρικές γλυκοπρωτεΐνες όπως είναι η λαμίνη, η ινωδονεκτίνη, οι ιντεγκρίνες, το κολλαγόνο, οι ορμόνες, οι ανοσοσφαιρίνες κ.α. Επιπλέον, αποτελεί βασικό παράγοντα για σηματοδοτήσεις που εξαρτώνται από γλυκοκώδικες, όπως στον καθορισμό των ομάδων αίματος.

Αυτή η εκλεκτικότητα των γαλεκτινών προς αναζήτηση των προσδετών τους, τους παρέχουν σημαντική δράση σε παθο – φυσιολογικές λειτουργίες, όπως στην κυτταρική σηματοδότηση, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, στην ανοσοαπόκριση, στον καρκίνο και την αγγειογένεση, τη διαφοροποίηση και την απόπτωση¹⁶.

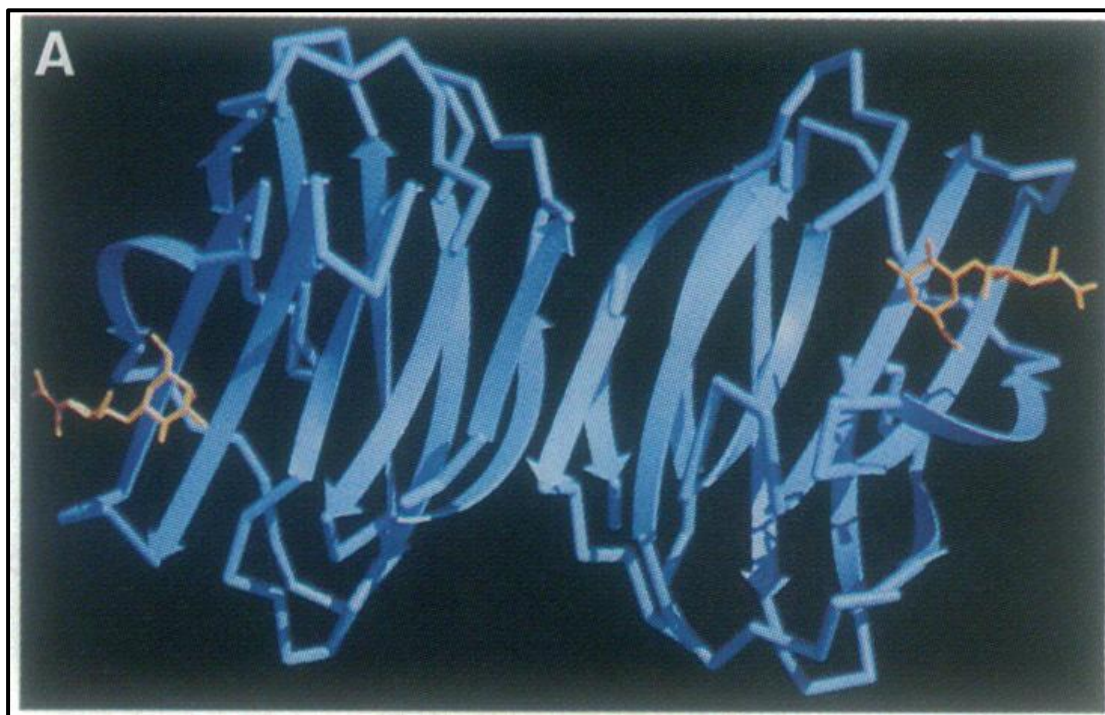
1.3 Γαλεκτίνη 1

Η γαλεκτίνη 1, το πιο αναγνωρισμένο και καλύτερα μελετημένο πρωτότυπο μέλος της οικογένειας των γαλεκτινών, κωδικοποιείται στον άνθρωπο από το γονίδιο LGALS1 το οποίο εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 22q12¹⁷. Στον άνθρωπο, κατανέμεται σε διάφορους ιστούς, όπως στον χονδρικό ιστό, στα στρωματικά κύτταρα του θύμου αδένου, στους λεμφαδένες, στα ενδοθηλιακά κύτταρα και στα κύτταρα του πλακούντα, ενώ, τα επίπεδα έκφρασης της, μεταβάλλονται ανάλογα τον ιστό και την κατάσταση του κυττάρου⁷. Εκλεκτικά, αναγνωρίζει γλυκοπρωτεΐνες και γλυκολιπίδια που περιέχουν μόρια N-ακετυλο-λακτοζαμίνης. Ωστόσο, έχει χαμηλή συγγένεια για μεμονωμένες μονάδες γαλακτοζαμίνης, ενώ η διάταξη δισακχαριτών

λακτοζαμίνης σε επαναλαμβανόμενες αλυσίδες (πολυλακτοζαμίνες), αυξάνουν τη συγγένεια σύνδεσης της¹⁸.

Η δομή της πρωτεΐνης, είναι ιδιαίτερα διατηρημένη μεταξύ των διαφορετικών ειδών οργανισμών, ενώ, η βιολογική της δράση είναι σημαντική, καθώς εμπλέκεται σε κυτταρικές διεργασίες με αλληλεπιδράσεις μεταξύ κυττάρων αλλά και κυττάρων με την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία, ευνοώντας τη κυτταρική προσκόλληση και την κυτταρική σηματοδότηση^{5,17}.

Η γαλεκτίνη 1, χαρακτηρίζεται ως μια μη ομοιοπολική διμερής πρωτεΐνη, ~14,5 KDa, αποτελούμενη από δύο όμοιες υπομονάδες, με κάθε υπομονάδα να φέρει μια περιοχή αναγνώρισης υδατανθράκων (CRD)¹⁷. Η διμερής γαλεκτίνη 1, αναδιπλώνεται ως β-πτυχωτό φύλλο με δύο αντιπαράλληλα β-φύλλα των πέντε και έξι κλώνων, αντίστοιχα. Η ακεραιότητα της διμερούς γαλεκτίνης 1, όταν εξωκυτταρώνεται, διατηρείται μέσω υδροφοβικών αλληλεπιδράσεων στη διεπαφή των μονομερών, έτσι ώστε οι δύο CRDs να βρίσκονται στα αντίθετα άκρα της δευτεροταγής δομής τους¹⁷ (Εικόνα 2).



Εικόνα 2. Κρυσταλλική δομή γαλεκτίνης I⁶ – Η αναδίπλωση της διμερούς γαλεκτίνης 1, πραγματοποιείται ως β-πτυχωτό φύλλο που αποτελείται από δύο αντιπαράλληλα β-φύλλα των πέντε και έξι κλώνων, αντίστοιχα. Τα αμινο-τελικά (N-termini) και καρβοξυ-τελικά (C-termini) άκρα κάθε μονομερούς, είναι τοποθετημένα στη διεπαφή της διμερούς πρωτεΐνης και οι CRDs τους βρίσκονται στα άκρα της δευτεροταγής δομής τους. Με χρώμα κίτρινο, αναπαριστώνται τα μόρια N-ακετυλο-λακτοζαμίνης, όπου προκύπτει η σύνδεση τους με γλυκοπρωτεΐνες.

Η διμερής μορφή της γαλεκτίνης 1, εντοπίζεται κατά κύριο λόγο, εκτός του κυττάρου, ενώ εντός του κυττάρου υπάρχει ως μονομερές. Κάθε μονομερές γαλεκτίνης 1, περιλαμβάνει 6 κατάλοιπα κυστεΐνης, υποδηλώνοντας ευαισθησία στην οξειδωση¹¹. Τα κατάλοιπα κυστεΐνης, πρέπει να βρίσκονται σε αναγωγικό περιβάλλον για να διατηρηθεί η ιδιότητα της γαλεκτίνης 1 ως λεκτίνη, δηλαδή για να μπορεί να προσδέσει σε υδατάνθρακες. Κατά τη διάρκεια της οξειδωσης, που λαμβάνει χώρα εκτός του κυττάρου, χάνει την ιδιότητα της, λόγω δημιουργίας δισουλφιδικών δεσμών στη δομή της, με αποτέλεσμα να μεταβάλλεται η διαμόρφωση της, γεγονός το οποίο την αποτρέπει να αναγνωρίζει τους προσδέτες της. Για τον λόγο αυτό, όταν η γαλεκτίνη 1 εξωκυτταρώνεται, προβαίνει σε σχηματισμό ομοδιμερών, για να αποτραπεί η οξειδωση της, να σταθεροποιηθεί η δομή της και να μπορεί να αλληλεπιδράσει με υψηλή συγγένεια με τους προσδέτες της¹⁹.

1.3.1 Σύνθεση και έκκριση γαλεκτίνης 1

Η γαλεκτίνη 1, εντοπίζεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα, αλλά μπορεί να βρεθεί και στην κυτταρική μεμβράνη και στον πυρήνα, όπως επίσης και να εξωκυτταρωθεί. Όπως και όλα τα υπόλοιπα μέλη των γαλεκτινών, έτσι και η γαλεκτίνη 1, δε διαθέτει κατάλληλη σηματοδοτική αλληλουχία εξωκυττάρωσης στο αμινοτελικό της άκρο (NH₂ terminal), ωστόσο, εκκρίνεται στον εξωκυττάριο χώρο, με τρόπο που παρακάμπτει το κλασσικό εκκριτικό μονοπάτι του ΕΔ/συμπλέγματος Golgi^{20,21} και φτάνει τους προσδέτες της προκειμένου να επιτελέσει την εξωκυτταρική της λειτουργία.

Η εξωκυττάρια μορφή της γαλεκτίνης 1, παρατηρείται με υψηλότερο μοριακό βάρος (~15 KDa), από την ενδοκυττάρια μορφή της (~14,5 KDa), που υποδηλώνει ότι η εκκρινόμενη γαλεκτίνη 1, υφίσταται περαιτέρω μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις πριν ή μετά την έκκριση της, που θεωρούνται ότι είναι απαιτούμενες για την επιτυχή εξωκυττάρωσή της²². Επιπλέον, πιστεύεται ότι ο μηχανισμός εξωκυττάρωσης της γαλεκτίνης 1, εξαρτάται από την αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης με τα μόρια β-γαλακτόζης των υποδοχέων της κυτταρικής επιφάνειας²³. Έτσι, φαίνεται να υπάρχει ένας μηχανισμός ποιοτικού

ελέγχου στην κυτταρική μεμβράνη, ώστε να αναγνωρίζεται η σωστά αναδιπλωμένη γαλεκτίνη 1 που πρόκειται να εξωκυτταρωθεί¹⁷.

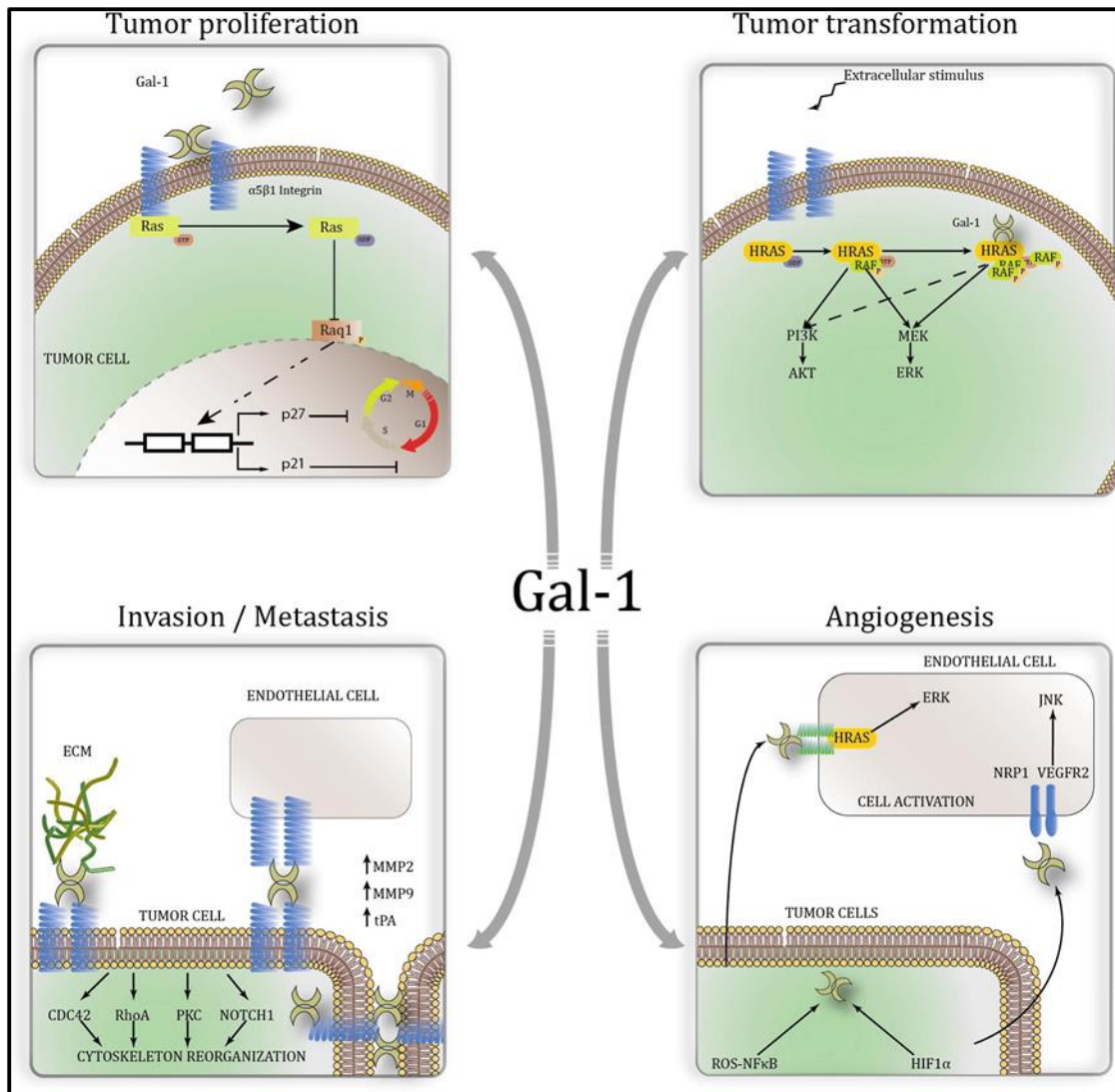
Τα επίπεδα έκφρασης της γαλεκτίνης 1 και ο εντοπισμός της, φαίνεται να επηρεάζονται κατά πολύ από τη κατάσταση του κυττάρου. Σε φυσιολογικά κύτταρα, η πρωτεΐνη, εντοπίζεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα, ενώ, η εκκρινόμενη εξωκυττάρια γαλεκτίνη 1, βρίσκεται σε χαμηλά επίπεδα έκφρασης. Ωστόσο, σε καρκινικά κύτταρα και σε ιστούς νεοπλασίας, φαίνεται η πρωτεΐνη να υπερεκφράζεται και, κατά συνέπεια, να εκκρίνονται αυξημένες ποσότητες αυτής²⁴. Η υπερέκφραση της, παρατηρείται να έχει συνέπειες στην πρόοδο του καρκίνου, όπου εμπλέκεται στην κυτταρική προσκόλληση¹⁷, στη μετάσταση²⁴, στην αγγειογένεση^{25,26,27}, στην απόπτωση²⁸, αλλά και στη θρόμβωση²⁹ και σε διαδικασίες με ανοσορυθμιστικό ρόλο προάγοντας προ- και αντι-φλεγμονώδεις αποκρίσεις¹⁷.

1.3.2 Ενδοκυττάρια και εξωκυττάρια δράση της γαλεκτίνης 1

Αν και όλα τα μέλη των γαλεκτινών, μόλις εξωκυτταρωθούν προσδένονται σε γλυκοπρωτεΐνες, με τρόπο που εξαρτάται από υδατανθρακικά μόρια, η γαλεκτίνη 1, έχει παρατηρηθεί να εμπλέκεται σε ενδοκυτταρικές λειτουργίες μέσω αλληλεπιδράσεων με πρωτεΐνες και με τρόπο που είναι ανεξάρτητος της δέσμευσης της σε υδατάνθρακες, λαμβάνοντας μέρος στην ενδοκυτταρική σηματοδότηση ως ρυθμιστής μεταγωγής σήματος¹⁷.

Η πιο σημαντική αλληλεπίδραση της ενδοκυττάριας γαλεκτίνης 1, είναι με την ενεργό μορφή της πρωτεΐνης H-Ras (H-Ras-GTP)¹⁶. Τα γονίδια των πρωτεϊνών Ras, εκφράζονται σε καταστάσεις καρκίνου και μεταλλάσσονται ραγδαία, γεγονός που τα διατηρεί συνεχώς σε μια ενεργή κατάσταση, προωθώντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Οι υπομονάδες των πρωτεϊνών Ras, βρίσκονται «αγκυροβολημένες» στην εσωτερική πλευρά της κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Έχει παρατηρηθεί ότι, η H-Ras-GTP προκαλεί τη «στρατολόγηση» της γαλεκτίνης 1 από το κυτοσόλιο στην κυτταρική μεμβράνη, όπου η γαλεκτίνη 1 φαίνεται να αλληλεπιδρά με τις λειτουργικές ομάδες φαρνεσυλίου της H-Ras-GTP. Αυτή η αλληλεπίδραση έχει ως αποτέλεσμα, την περαιτέρω σταθεροποίηση της δομής της H-Ras-GTP στη κυτταρική μεμβράνη, την παράταση της ενεργούς κατάστασης της και την

επακόλουθη ενεργοποίηση του μονοπατιού Ras-MEK-ERK, ενισχύοντας τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και τον νεοπλασματικό μετασχηματισμό τους^{16,17}.



Εικόνα 3. Βιολογική δράση της γαλεκτίνης 1 στον καρκίνο⁵⁰ – Παρατηρείται η γαλεκτίνη 1 να λαμβάνει μέρος σε διαδικασίες ανάπτυξης του καρκίνου. Ενδοκυττάρια, προσδένεται στην ενεργό μορφή της H-Ras (H-Ras-GTP), με αποτέλεσμα την επαγωγή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, την κυτταρική μεταμόρφωση και την αγγειογένεση. Ενώ, εξωκυττάρια, αλληλεπιδρά με στελέχη της ECM και με υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας λαμβάνοντας μέρος σε διακυτταρικές επικοινωνίες και στην προσκόλληση των κυττάρων στην ECM προωθώντας περαιτέρω τον καρκίνο.

Όπως έχει αναφερθεί, το μοτίβο γλυκοζυλίωσης των γαλεκτινών, αποτελεί βασικό παράγοντα εκλεκτικής αναγνώρισης προσδετών για την εξωκυττάρια δράση τους. Σε καρκινικά κύτταρα, όπου η γαλεκτίνη 1

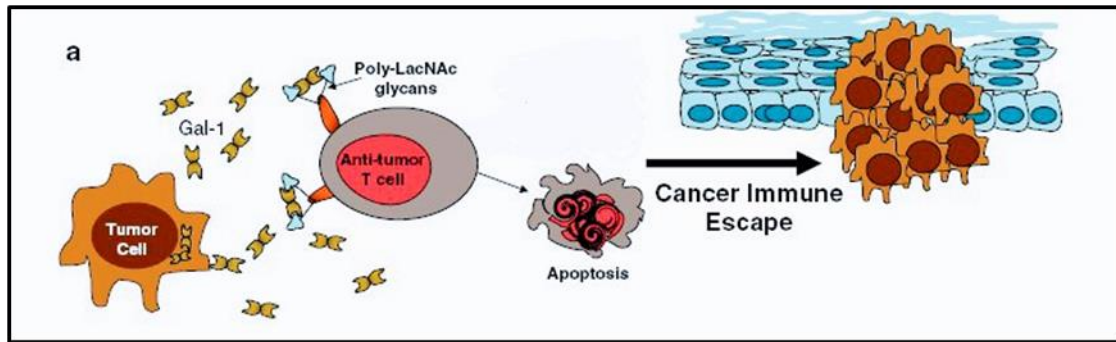
υπερεκφράζεται, η αλληλεπίδραση της είναι έντονη με τις γλυκοπρωτεΐνες της ECM, όπως είναι η λαμινίνη, η ινωδονεκτίνη, η θρομβοσπονδίνη, η βιτρονεκτίνη και η οστεοσπονδίνη αλλά και με τις ιντεγκρίνες της κυτταρικής μεμβράνης, καθώς όλες αυτές οι γλυκοπρωτεΐνες, είναι υψηλά γλυκοζυλιωμένες και με ισχυρή παρουσία N-ακετυλο-λακτοζαμινών^{17,30}, ενισχύοντας έτσι, την κυτταρική προσκόλληση και την πρόοδο του καρκίνου.

1.4 Ο ρόλος της γαλεκτίνης 1 στον καρκίνο

1.4.1 Απόπτωση και ανοσοκαταστολή T-λεμφοκυττάρων

Ένας από τους πιο σημαντικούς ρόλους της γαλεκτίνης 1, αναφορικά με τον καρκίνο, είναι ότι προάγει έναν ανοσοκατασταλτικό χαρακτήρα προ-ανάπτυξης του όγκου. Οι πρώτες έρευνες που έγιναν, κατέδειξαν ότι η γαλεκτίνη 1, ενεργοποιεί την απόπτωση των ενεργοποιημένων T-λεμφοκυττάρων³¹. Περαιτέρω έρευνες, αποκάλυψαν ότι υποδοχείς στην επιφάνεια των ενεργοποιημένων T-κυττάρων, όπως είναι οι CD2, CD3, CD7, CD29, CD43, CD45 και CD95³², ήταν βασικοί προσδέτες της εξωκυττάριας γαλεκτίνης 1. Υποδοχείς όπως ο CD7, ο CD43 και ο CD45, είναι υψηλά γλυκοζυλιωμένοι με O- και N- γλυκάνες, γεγονός που τους καθιστά ιδανικούς προσδέτες της γαλεκτίνης 1²⁸. Τα γλυκοζυλιωμένα αυτά μοτίβα, διαμορφώνονται από ένζυμα, όπως είναι οι γλυκοζυλ-τρανσφεράσες και οι γλυκοσιδάσες και αποκωδικοποιούνται από τη γαλεκτίνη 1, η οποία τα προσδένει με ειδικότητα και με αποτέλεσμα να επάγει μηχανισμούς απόπτωσης των T-κυττάρων (Εικόνα 4). Απουσία τέτοιων ενζύμων, όπως για παράδειγμα του ενζύμου GCNT-1, που απαιτείται για την δημιουργία O-συνδεδεμένων γλυκανών, παρατηρήθηκε να αναστέλλεται ο αποπτωτικός μηχανισμός από τη γαλεκτίνη 1, σε CD45⁺ T-κύτταρα²⁸.

Ο μηχανισμός της απόπτωσης των T-κυττάρων που μεσολαβείται από την γαλεκτίνη 1, δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί, ωστόσο, σε μια έρευνα παρατηρείται η πρωτεΐνη να επάγει τον μεταγραφικό παράγοντα AP-1 και να απορρυθμίζει τη μιτοχονδριακή πρωτεΐνη Bcl-2, που θεωρείται γνωστός καταστολέας της απόπτωσης και σε άλλη έρευνα η γαλεκτίνη 1, να σηματοδοτεί το μονοπάτι των κινασών κυτταρικού στρες (JNK/c-Jun/AP-1)²⁸.



Εικόνα 4. Σχηματική αναπαράσταση της απόπτωσης των T-λεμφοκυττάρων³³ – Η εκκρινόμενη από τα καρκινικά κύτταρα γαλεκτίνη 1, επάγει την απόπτωση των T-λεμφοκυττάρων προσδένοντας σε γλυκοζυλιωμένους υποδοχείς αυτών, διευκολύνοντας την μετανάστευση των καρκινικών κυττάρων, τη διαφυγή τους από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος και την περαιτέρω ανάπτυξη του όγκου.

Εκτός της απόπτωσης, η γαλεκτίνη 1 εμπλέκεται και στην ανοσοκαταστολή καθώς ενεργοποιεί τα ρυθμιστικά (ή αλλιώς κατασταλτικά) T-κύτταρα (Treg), με αποτέλεσμα εκείνα να αδυνατούν να διακρίνουν τα φυσιολογικά από τα καρκινικά κύτταρα και να προκαλείται ανοσοαπόκριση έναντι κάθε κυττάρου³³. Επιπλέον, η πρόσδεση της γαλεκτίνης 1 στον υποδοχέα CTLA-4, που διατηρεί τους υπό-πληθυσμούς των T-κυττάρων (T-, B- και ρυθμιστικά T- κύτταρα) σε κατάσταση ηρεμίας, φαίνεται να διεγείρει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό τους³².

Σε αποσιωποίηση (knockdown) της έκφρασης της γαλεκτίνης 1 από καρκινικά κύτταρα, με siRNAs, αυξήθηκε ο βαθμός διήθησης των T λεμφοκυττάρων στους όγκους, γεγονός που οδήγησε σε μειωμένα ποσοστά ανάπτυξης όγκου³⁴. Έχει παρατηρηθεί επίσης, ότι κατά την αγγειογένεση που λαμβάνει χώρα σε μεταστάσεις, οι ανώμαλες αναδιατάξεις των αγγειακών δομών που προέκυπταν, συχνά οδηγούσαν σε αναστολή της διήθησης των T-κυττάρων εντός των όγκων. Επομένως, γίνεται κατανοητό ότι οι συνδυαστικές διεργασίες που επιτελούνται εντός του μικροπεριβάλλοντος του όγκου και η ισχυρή δράση της γαλεκτίνης 1 μέσα σε αυτό, δυσχεραίνουν την ανοσοαπόκριση, γεγονός που διευκολύνει τη διαφυγή των καρκινικών κυττάρων από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος.

1.4.2 Αγγειογένεση

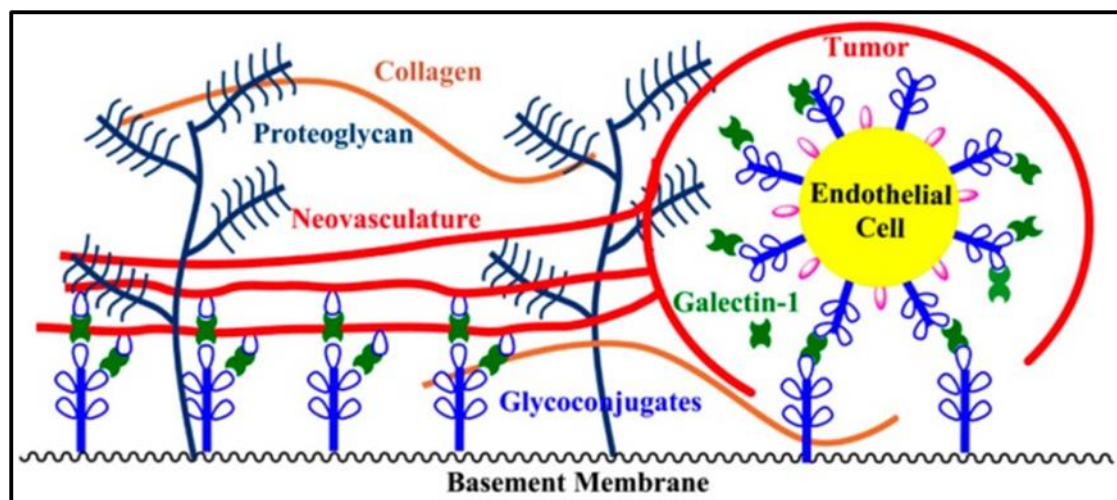
Παρόλο που η αγγειογένεση αποτελεί μια φυσιολογική διαδικασία που πραγματοποιείται κατά την εμβρυογένεση, σε επούλωση τραύματος ή κατά την ωορρηξία, στον καρκίνο χαρακτηρίζεται από τον σχηματισμό νέων αιμοφόρων αγγείων από ήδη προϋπάρχοντα, με απώτερο σκοπό τα καρκινικά κύτταρα να λάβουν τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά και οξυγόνο για την ανάπτυξη τους³⁵.

Η αγγειογένεση εκτελείται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα που φυσιολογικά επικαλύπτουν το εσωτερικό των αγγείων και όταν αυτά τα κύτταρα ενεργοποιηθούν λόγω διέγερσης τους από αυξητικούς παράγοντες, που εκκρίνονται από τα καρκινικά κύτταρα, όπως είναι ο VEGF, ξεκινά μια πολύπλοκη διαδικασία αποσταθεροποίησης της βασικής μεμβράνης των ενδοθηλιακών κυττάρων και της ECM, από πρωτεάσες που αποδομούν τα συστατικά τους, με αποτέλεσμα τον σχηματισμό νέων τριχοειδών αγγείων³⁵.

Ο ρόλος της γαλεκτίνης 1 στην αγγειογένεση, παρατηρείται να περιλαμβάνει την τόνωση της ανάπτυξης των ενδοθηλιακών κυττάρων αλλά και να παρέχει την κατάλληλη υποστήριξη στις νεοσχηματιζόμενες δομές των αιμοφόρων αγγείων³⁵ (Εικόνα 5). Στο μικροπεριβάλλον του όγκου, η παρουσία της γαλεκτίνης 1 είναι έντονη, με υψηλά επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης τόσο από τα ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα όσο και από τα καρκινικά κύτταρα³⁶. Η εκκρινόμενη από τα καρκινικά κύτταρα γαλεκτίνη 1, προσλαμβάνεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα ποντικού γαλεκτίνης 1^{-/-}, επάγοντας έτσι τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων και την μετανάστευση αυτών, μέσω της μοριακής σηματοδότησης H-Ras και την ενεργοποίηση του μονοπατιού των MAP κινασών²⁴. Τα ευρήματα αυτά, υποδηλώνουν την ισχυρή επίδραση που έχει η γαλεκτίνη 1 στην προώθηση της αγγειογένεσης, ενώ σε αποσιωπείωση των επιπέδων της γαλεκτίνης 1, σε καρκινικά κύτταρα, με siRNAs, οι ρυθμοί ανάπτυξης του όγκου ήταν σημαντικά μειωμένοι, όπως επίσης και η αγγειογένεση εντός των όγκων³⁴.

Επιπλέον, η γαλεκτίνη 1, προωθεί την αλληλεπίδραση μεταξύ ενδοθηλιακών κυττάρων και κυττάρων με την ECM. Η επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων, περιβάλλεται από σημαντικά ποσά μονάδων N-γλυκανών, ενώ τα γλυκοζυλιωμένα συστατικά της ECM (λαμινίνη, ινωδονεκτίνη

ιντεγκρίνες), όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, έχουν αποδειχθεί να είναι από τους βασικούς προσδέτες της γαλεκτίνης 1^{17,30}.



Εικόνα 5. Αναπαράσταση της αγγειογένεσης που μεσολαβείται από τη γαλεκτίνη 1³⁵ – Παρατηρείται η γαλεκτίνη 1 (πράσινο), να παρέχει φυσική υποστήριξη στην αγγειογένεση προσδένοντας σε γλυκοζυλιωμένους υποδοχείς (μπλε) των ενδοθηλιακών κυττάρων και της βασικής μεμβράνης με αποτέλεσμα να παρακινεί την προσκόλληση των κυττάρων και την επακόλουθη επέκταση των αιμοφόρων αγγείων.

Περαιτέρω μελέτες, κατέδειξαν την νευροπιλίνη-1 (NRP-1) ως ενδεχόμενη προσδέτης της γαλεκτίνης 1. Η νευροπιλίνη-1, αποτελεί έναν διαμεμβρανικό συν-υποδοχέα του VEGFR και είναι υψηλά γλυκοζυλιωμένη με N- και O- γλυκάνες, γεγονός το οποίο την κάνει ιδανικό στόχο δέσμησης για την γαλεκτίνη 1^{27,37}. Η δέσμηση της γαλεκτίνης 1 στη νευροπιλίνη-1, είχε ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του VEGFR, τον πολλαπλασιασμό, την μετανάστευση και την αγγειογένεση *in vivo*, σε κύτταρα HUVE, ακόμη και απουσία του βασικού υποδοχέα του, τον VEGF^{26,27,37}. Το αντίθετο παρατηρείται όταν τα ενδοθηλιακά κύτταρα στερούνται γαλεκτίνης 1. Παρεμβαίνοντας στην ενδογενή έκφραση της πρωτεΐνης με siRNAs, ή με αντινοσηματικά ολιγονουκλεοτίδια, αποδυναμώνεται ο πολλαπλασιασμός και η μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων^{24,25,27}.

Τα δεδομένα αυτά, αποδεικνύουν ότι η απουσία της ενδογενούς γαλεκτίνης 1 από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, μειώνει τον βαθμό ανάπτυξης της αγγειογένεσης, ενώ, παράλληλα με τον αγγειοδιεγερτικό χαρακτήρα της εξωγενούς γαλεκτίνης 1, είναι φανερό ότι τα ενδοθηλιακά κύτταρα απαιτούν την γαλεκτίνη 1 και για την σωστή εκτέλεση της διαδικασίας της αγγειογένεσης.

1.4.3 Μετάσταση

Ως μετάσταση, χαρακτηρίζεται η αποκόλληση καρκινικών κυττάρων από την αρχική τοποθεσία του όγκου και η διάδοση τους σε παρακείμενους ιστούς και όργανα μέσω των λεμφαδένων και των αιμοφόρων αγγείων. Είναι μια διαδικασία κατά την οποία τα ενδοθηλιακά κύτταρα, αλληλεπιδρούν συνεχώς με τα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα, μέσω των κυτταρικών μορίων προσκόλλησης (ιντεγκρίνες, σελεκτίνες, ICAM-1, VCAM-1)²⁸.

Η εκκρινόμενη από τα καρκινικά κύτταρα γαλεκτίνη 1, προσδένει στις γλυκοζυλιωμένες ιντεγκρίνες των κυτταρικών επιφανειών αλλά και στις γλυκοπρωτεΐνες της ECM, προωθώντας την προσκόλληση των καρκινικών κυττάρων στην ECM^{28,38}. Ύστερα, η πρωτεΐνη, ενισχύει την μετανάστευση και την εισβολή των καρκινικών κυττάρων με το να ανταγωνίζεται θέσεις πρόσδεσης σε κυτταρικούς υποδοχείς που εμπλέκονται σε αλληλεπιδράσεις κυττάρων-ECM, γεγονός που επιτρέπει στα καρκινικά κύτταρα να αποκολληθούν από το πρωτογενές σημείο του όγκου³⁸.

Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί η γαλεκτίνη 1, να παρακινεί την έκκριση πρωτεολυτικών ενζύμων, όπως των μεταλλοπρωτεϊνολυτικών (MMP) που αποδομούν βασικά στοιχεία της ECM, δρώντας ανταγωνιστικά, προκειμένου να προσδέσει σε υποδοχείς που εμπλέκονται στα σηματοδοτικά μονοπάτια έκκρισης των πρωτεολυτικών ενζύμων³⁹. Σε αποσιωποποίηση της γαλεκτίνης 1 από καρκινικά κύτταρα ορθού και μαστού, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της ανάπτυξης μεταστατικού όγκου στους πνεύμονες, όπως και μειωμένη αγγειογένεση, ενώ τα ποσοστά διήθησης των T-λεμφοκυττάρων εντός του όγκου είχαν επίσης αυξηθεί²⁸.

1.4.4 Φλεγμονή και θρόμβωση

Την τελευταία δεκαετία, η γαλεκτίνη 1, παρουσιάζεται και ως ρυθμιστής της λειτουργίας των αιμοπεταλίων, η παρουσία των οποίων αποτελεί κρίσιμο παράγοντα στην φλεγμονή, την αγγειακή αναδόμηση και την θρόμβωση⁴⁰.

Τα αιμοπετάλια, προέρχονται από τα μεγακαρυοκύτταρα του μυελού των οστών. Είναι υπεύθυνα για την διατήρηση της σωστής φυσιολογίας του αγγειακού συστήματος και η ενεργοποίησή τους σε σημεία ιστικής βλάβης

προκαλεί συσσώρευση αυτών, σχηματίζοντας θρόμβους για την παρεμπόδιση της εκροής του αίματος⁴¹. Ωστόσο, η ανεξέλεγκτη ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, μπορεί να οδηγήσει στον σχηματισμό αποφρακτικών θρόμβων που πολλές φορές καταλήγουν σε ισχαιμικά επεισόδια. Επομένως, η δράση τους είναι απαραίτητη όχι μόνο για την αιμόσταση, την επιδιόρθωση ιστών και την επούλωση τραυμάτων, αλλά και για την θρόμβωση, την αθηροσκλήρωση, τις χρόνιες φλεγμονές, τον καρκίνο και για την άμυνα του οργανισμού έναντι παθογόνων μικροοργανισμών⁴¹.

Τα αιμοπετάλια, κατά κύριο λόγο, ενεργοποιούνται από μόρια-αγωνιστές όπως είναι η θρομβίνη, το ADP και η σεροτονίνη, ή από πρωτεΐνες της ECM, όπως είναι το κολλαγόνο και ο παράγοντας von Willebrand. Η γαλεκτίνη 1, φαίνεται να αποτελεί μια νέα πρωτεΐνη ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων, που ενδεχομένως να μεσολαβεί μεταξύ φλεγμονής και θρόμβωσης^{29,40}.

Οι μελέτες των Pacienza et al., κατέδειξαν τον ενδεχόμενο τρόπο εμπλοκής της γαλεκτίνης 1 στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων⁴⁰. Η παρουσία της πρωτεΐνης, είχε ως αποτέλεσμα τη πρόσδεση της σε γλυκοζυλιωμένους κυτταρικούς υποδοχείς των αιμοπεταλίων, γεγονός που προκάλεσε την ενεργοποίησή τους. Επόμενες μελέτες, κατέδειξαν ότι πιθανός υποδοχέας της πρωτεΐνης, ήταν η ιντεγκρίνη αIIbβ3, η έκφραση της οποίας είναι απαραίτητη για την προσκόλληση των αιμοπεταλίων στην ECM⁴².

Η ικανότητα των αιμοπεταλίων να σχηματίζουν θρόμβους, εξαρτάται από την ικανότητα συνάθροισης τους. Στην μελέτη των Pacienza et al., τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια, εξέφρασαν στην κυτταρική τους επιφάνεια, την πρωτεΐνη P-selectin. Ο κύριος λόγος έκφρασης της P-selectin, εξυπηρετεί την προσκόλληση τους σε ενδοθηλιακά κύτταρα και λευκοκύτταρα. Τα τελευταία αυτά κύτταρα, εκφράζουν τον υποδοχέα της P-selectin και η διακυτταρική σύνδεση μεταξύ τους, προκαλεί συνάθροιση συμπλόκων αιμοπεταλίων-λευκοκυττάρων και αιμοπεταλίων-ενδοθηλιακών κυττάρων, που αποτελούν κρίσιμη προϋπόθεση για την πρόκληση φλεγμονής και θρόμβωσης⁴⁰. Παρόλο που στην ανωτέρα μελέτη, παρατηρήθηκε μόνο ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων μέσω της γαλεκτίνης 1, και δε παρατηρήθηκαν σύμπλοκα συνάθροισης, η παρουσία της P-selectin στην κυτταρική μεμβράνη, υποδηλώνει προδιάθεση προσκολλητικής ικανότητας.

Με βάση τα παραπάνω, είναι πιθανό, η έκθεση της γαλεκτίνης 1 στο ενεργοποιημένο ενδοθήλιο, που επέρχεται σε μια παθολογική κατάσταση, να ενθαρρύνει την ενεργοποίηση και προσκόλληση των αιμοπεταλίων, επεκτείνοντας τον σχηματισμό θρόμβων³⁶. Η θρόμβωση και η διάχυτη ενδοαγγειακή πήξη αποτελούν συχνές επιπλοκές που λαμβάνουν χώρα σε ασθενείς με καρκίνο. Η ανεξέλεγκτη πήξη του αίματος (προ-θρομβωτική κατάσταση), επισυμβαίνει λόγω της ικανότητας των καρκινικών κυττάρων να ενεργοποιούν τα αιμοπετάλια, επομένως και το σύστημα της πήξης. Δεδομένου των υψηλών επιπέδων έκφρασης της γαλεκτίνης 1 στο μικροπεριβάλλον του όγκου και της επαγόμενης από τη γαλεκτίνη 1 ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων, ενδεχομένως η πρωτεΐνη αυτή, να συμβάλλει στην παθογένεση της θρόμβωσης σε ασθενείς με καρκίνο.

1.5 Στόχευση της δράσης της γαλεκτίνης 1

Από τις παραπάνω ενότητες, γίνεται φανερό η σημασία των αλληλεπιδράσεων μεταξύ πρωτεϊνών-υδατανθράκων στην εξέλιξη και στην διάδοση του καρκίνου και επιπλέον, διακρίνεται ένας πολυδύναμος ρόλος της γαλεκτίνης 1 στον καρκίνο, κατά κύριο λόγο, μέσω της πολυσθενούς αλληλεπίδρασης της με ένα ευρύ φάσμα γλυκοζυλιωμένων υποδοχέων της κυτταρικής μεμβράνης και με συστατικά της ECM, καθ' όλη τη διάρκεια εξέλιξης του. Αυτά τα δεδομένα, παρουσιάζουν τη γαλεκτίνη 1 ως υποσχόμενο μόριο στόχευσης σε αντι-καρκινικές θεραπείες, ενώ, η ανάπτυξη μορίων-αναστολέων έναντι της δράσης της, είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν ως αντι-καρκινικοί και αντι-μεταστατικοί παράγοντες.

Οι πρώτες μελέτες ανάπτυξης μορίων-αναστολέων, στοχοποίησαν τις μονάδες N-ακετυλο-λακτοζαμίνης των CRDs των γαλεκτινών, αρχικά, με παράγωγα φυσικών ολιγοσακχαριτών όμοιων με των συνδεδετών τους. Ωστόσο, οι δισακχαρίτες αυτοί, καταλύονται ραγδαία από ένζυμα όπως είναι οι β-γαλακτοσιδάσες και απαιτούν υψηλές συγκεντρώσεις (τουλάχιστον 10mM), προκειμένου να αναστείλουν αποτελεσματικά τη CRD των γαλεκτινών²⁸. Επιπλέον, δεν παρουσιάζουν ειδικότητα μεταξύ των διαφόρων μελών των γαλεκτινών, καθώς ο συγκεκριμένος δισακχαρίτης είναι αναγνωρίσιμος από

όλα τα μέλη, με αποτέλεσμα να υπάρχει συχνά διασταυρωτή αντίδραση (cross reactivity)^{28,17}.

Η έρευνα, έχει στραφεί πλέον στην ανάπτυξη συνθετικών μορίων που θα παρεμποδίσουν αποτελεσματικά τη CRD των γαλεκτινών. Οι Rabinovich et al., συνέθεσαν πολυσθενή συστήματα διμερών αμιδίων λακτουλόζης (SLA) ως ικανά μόρια-αναστολείς, ειδικότερα των γαλεκτινών 1 και 3. Τα αποτελέσματα της έρευνας, με χρήση τεχνικών στερεάς φάσης, κατέδειξαν ότι οι συνθετικοί αναστολείς είχαν την δυνατότητα να μπλοκάρουν την πρόσδεση αυτών των μελών στην γλυκοπρωτεΐνη 90K, που έχει αποδειχθεί να αλληλεπιδρά με τα συγκεκριμένα μέλη. Επιπλέον, αναφορικά με την γαλεκτίνη 1, οι αναστολείς αυτοί, παρουσίασαν μια ρυθμιστική επίδραση σε στάδια του καρκίνου. Για παράδειγμα, οι τροποποιήσεις στον αριθμό των ατόμων άνθρακα στην σύνδεση των διμερών αμιδίων, ανέστειλαν την κυτταρική συσπείρωση και την αγγειογένεση που μεσολαβείται από την πρωτεΐνη, ενώ ενισχύθηκε και η απόπτωση των καρκινικών κυττάρων⁴³.

Το θειοδιγαλακτοσίδιο (TDG), αποτελεί έναν ακόμη αναστολέα της γαλεκτίνης 1 (και γενικά όλων των γαλεκτινών) και είναι ένας από τους πιο απλούς συνθετικούς δισακχαρίτες που είναι διαθέσιμοι στο εμπόριο. Η αποτελεσματικότητά του, αναφορικά με την αναστολή της γαλεκτίνης 1, έχει διερευνηθεί σε μελέτες καρκίνου και ανοσολογικής απόκρισης⁴⁴. Αν και η θεραπεία με TDG in vivo, έδειξε σημαντική αντι-καρκινική και αντι-μεταστατική επίδραση, απαιτούσε υψηλά ποσά χορήγησης (40-120mg/kg) και συχνές εγχύσεις (κάθε 2-3 μέρες) και αυτό, διότι είχε ραγδαία απέκκριση από την νεφρική οδό λόγω του μικρού MW της (358.36). Από χημικής άποψης, διαθέτει σουλφιδικούς δεσμούς έναντι δεσμούς οξυγόνου, γεγονός που το καθιστά ως έναν μη μεταβολίσιμο αναστολέα^{44,45}. Παρόλα αυτά, η συγγένεια σύνδεσης της με τη CRD της γαλεκτίνης 1, δεν ήταν αρκετά ισχυρή για να διατηρηθεί το σύμπλοκο μακροπρόθεσμα. Για τον λόγο αυτό, αναπτύχθηκαν παράγωγα του TDG, με τροποποιήσεις που περιλαμβάνουν προσθήκες αρωματικών αμιδίων σε κατάλοιπα αργινίνης, με αποτέλεσμα τα υποκατάστατα αυτά, να εμφανίζουν υψηλότερη συγγένεια για την CRD της γαλεκτίνης 1⁴⁵.

Η ανάπτυξη και η χρήση μορίων που αναστέλλουν την αγγειογένεση αποτελεί παράγοντα υψίστης σημασίας στην αντι-καρκινική θεραπεία. Γενικότερα, η έρευνα για τη μελέτη αναστολέων της αγγειογένεσης,

επικεντρώνεται κυρίως στον πολλαπλασιασμό και την μετανάστευση των ενδοθηλιακών κυττάρων, καθώς τα κύτταρα αυτά είναι πιο εύκολα προσβάσιμα, μέσω της κυκλοφορίας του αίματος, σε φαρμακολογικές ουσίες.

Το Anginex, είναι ένας αναστολέας της αγγειογένεσης που χαρακτηρίζεται ως ένα β-πεπτιδίο υψηλής υδροφοβικής σύστασης και ομοιάζει στις κυτοκίνες. Το Anginex, αναστέλλει την ανάπτυξη των ενεργοποιημένων ενδοθηλιακών κυττάρων, παρεμποδίζοντας την προσκόλληση και την μετανάστευση τους που οδηγούν στην αγγειογένεση. Επιπλέον, αναστέλλει τον σχηματισμό των νέων αιμοφόρων αγγείων *in vivo*, χωρίς να επηρεάζει τα ήδη προϋπάρχοντα αγγεία, υποδηλώνοντας την ειδικότητα στόχευσης του πεπτιδίου εντός του όγκου⁴⁶. Η δραστηριότητα αυτού του αναστολέα, έχει διερευνηθεί στην αγγειογένεση που μεσολαβείται από την γαλεκτίνη 1. Στην αντίστοιχη μελέτη, ο προσδεδεδμένος στην γαλεκτίνη 1 αναστολέας, μείωσε σημαντικά την ενεργό μορφή της H-Ras στην μεμβράνη των ενδοθηλιακών κυττάρων, γεγονός που ελαχιστοποίησε το σηματοδοτικό μονοπάτι των MAP κινασών στα ενδοθηλιακά κύτταρα²⁴. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα, την μείωση της προσκολλητικής και της μεταναστευτικής ιδιότητας των ενεργοποιημένων ενδοθηλιακών κυττάρων, την επαγωγή της απόπτωσης των καρκινικών κυττάρων και την αναστολή της αγγειογένεσης²⁴.

1.6 Στόχος εργασίας

Τα ενδοθηλιακά κύτταρα, που επενδύουν φυσιολογικά το αγγειακό σύστημα, παρέχουν ένα στενά ρυθμιζόμενο φραγμό που ρυθμίζει ένα σύνολο φυσιολογικών και παθολογικών διεργασιών, όπως είναι η αιμόσταση, η τόνωση των αγγείων, η θρόμβωση, η φλεγμονή, η αγγειογένεση και ο καρκίνος. Πολλά ενδοθηλιακά μόρια, που παίζουν σημαντικό ρόλο στις παραπάνω διεργασίες, αποθηκεύονται σε εξειδικευμένα οργανίδια των ενδοθηλιακών κυττάρων, τα επονομαζόμενα Weibel Palade Bodies (WPBs)⁴⁷. Μερικά από τα μόρια που εμπεριέχονται στα WPBs είναι, μεταξύ άλλων, ο παράγοντας von Willebrand, η ενδοθηλίνη, η αγγειοποιητίνη-2, η P-selectin, η ιντερλευκίνη-8 κ.α⁴⁸. Μετά από ενεργοποίηση των ενδοθηλιακών κυττάρων, τα WPBs μετακινούνται στην επιφάνεια του κυττάρου και συντήκονται με την κυτταροπλασματική μεμβράνη, απελευθερώνοντας έτσι στη κυκλοφορία του αίματος τα μόρια-φορτία που

εμπεριέχουν. Πρόσφατα, τα ερευνητικά μέλη του εργαστηρίου μας ταυτοποίησαν ένα νέο μόριο που εντοπίζεται στα WPBs, την γαλεκτίνη 1.

Όπως διαφάνηκε από τις προηγούμενες ενότητες, υπάρχει σημαντική συσχέτιση της γαλεκτίνης 1 με την παθο – φυσιολογία πολύ βασικών νόσων, όπως είναι ο καρκίνος και η θρόμβωση. Ωστόσο, δεν είναι ακόμη σαφές αν η γαλεκτίνη 1, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ένας δείκτης διάγνωσης ή/και πρόγνωσης στις ασθένειες αυτές. Έτσι, στην παρούσα μελέτη, θέσαμε ως στόχους, πρώτον, την εγκαθίδρυση μεθοδολογίας sandwich-ELISA για τον ποσοτικό προσδιορισμό των επιπέδων της γαλεκτίνης 1, και δεύτερον, την μέτρηση των επιπέδων της, εφαρμόζοντας τη μεθοδολογία σε ένα σύνολο παθο – φυσιολογικών δειγμάτων ορού αίματος. Τα παθολογικά δείγματα, αφορούσαν ασθενείς με καρκίνο (διαφόρων τύπων καρκίνου και σε διάφορα στάδια της νόσου), των οποίων κοινό γνώρισμα ήταν ότι είχαν αναπτύξει φλεβικές θρομβώσεις, ως επίπτωση της καρκινοπάθειας τους. Σε μελλοντικό χρόνο, και σε συνεργασία με κλινικούς συνεργάτες, αναμένεται να συσχετιστούν τα επίπεδα της πρωτεΐνης γαλεκτίνης 1 με την κρισιμότητα ανάπτυξης θρομβώσεων στις διάφορες καρκινοπάθειες.

2. ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Απομόνωση πολυκλωνικού αντισώματος αντι – γαλεκτίνης 1 από ορό κουνελιού

Πολυκλωνικά αντισώματα έναντι της γαλεκτίνης 1 έχουν παραχθεί σε κουνέλια από ερευνητικά μέλη του εργαστηρίου σε προηγούμενη μελέτη. Για την απομόνωση και τελικά τον καθαρισμό των αντισωμάτων αντι – γαλεκτίνης 1 από τον ορό ανοσοποιημένου κουνελιού, πραγματοποιήθηκε:

- έκφραση και παραγωγή πρωτεΐνης γαλεκτίνης 1 συνδεδεμένη με τη μοριακή ετικέτα GST σε βακτηριακά κύτταρα,
- απομόνωση της GST – γαλεκτίνης 1 με χρωματογραφία συγγένειας,
- καθαρισμός των αντισωμάτων αντι – γαλεκτίνης 1 από τον ορό του κουνελιού, με χρήση της στήλης χρωματογραφίας συγγένειας, και
- έλεγχος της εξειδίκευσης και της ευαισθησίας των αντισωμάτων αντι – γαλεκτίνης 1 καθαρής μορφής με ανοσοαποτύπωση κατά Western.

2.1.1 Παραγωγή πρωτεΐνης γαλεκτίνης 1, συνδεδεμένη με την τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST)

Για την ετερόλογη έκφραση της γαλεκτίνης 1 σε βακτήρια, η γαλεκτίνη 1, εκφράστηκε συνδεδεμένη με τη μοριακή ετικέτα GST. Η cDNA αλληλουχία της γαλεκτίνης 1 (*LGALS*), είχε ήδη υποκλωνοποιηθεί στον πλασμιδιακό φορέα pGEX-6P-1, ο οποίος φέρει την μοριακή ετικέτα GST, ώστε, η παραγόμενη πρωτεΐνη γαλεκτίνη 1, να διαθέτει στο αμινοτελικό της άκρο (N-terminal) τη συγκεκριμένη μοριακή ετικέτα.

Για την υπερέκφραση της GST – γαλεκτίνης 1, χρησιμοποιήθηκε το βακτηριακό στέλεχος BL21(DE3) και η επαγωγή των κυττάρων έγινε με προσθήκη 0,2 mM IPTG. Πέραν της GST – γαλεκτίνης 1, έγινε έκφραση και παραγωγή της πρωτεΐνης GST, για να χρησιμοποιηθεί στο πρωτόκολλο καθαρισμού των αντισωμάτων αντι – γαλεκτίνης 1 (Ενότητα 2.1.7).

2.1.2 Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων

Τα βακτηριακά κύτταρα BL21(DE3), προκειμένου να προσλάβουν τον πλασμιδιακό φορέα pGEX-6P-1, που φέρει το γονίδιο της GST – γαλεκτίνης 1, υφίστανται την παρακάτω επεξεργασία:

1. Βακτηριακά κύτταρα BL21(DE3), από τους -80°C που είναι ο χώρος αποθήκευσης τους, μεταφέρονται και διατηρούνται σε πάγο μέχρις ότου ξεπαγώσουν (περίπου 15 λεπτά).
2. Σε 100μl διαλύματος βακτηρίων, προστίθενται 100ng διαλύματος πλασμιδιακού φορέα pGEX-6P-1 – γαλεκτίνη 1 και σε άλλα 100μl διαλύματος βακτηρίων, προστίθεται 1μg διαλύματος πλασμιδιακού φορέα pGEX-6P-1 – GST.
3. Ακολουθούν επωάσεις των μετασχηματισμένων βακτηριακών κυττάρων με εναλλαγή θερμοκρασιών, δηλαδή μέσω «θερμικού σοκ»:
 - Επώαση στον πάγο για 30 λεπτά.
 - Επώαση σε θερμοκρασία 42°C μέσα στο υδατόλουτρο για 1 λεπτό.
 - Επώαση στον πάγο για 2 λεπτά.
4. Ακολουθεί προσθήκη 200μl θρεπτικού υλικού Luria Broth [1% NaCl, 1% Tryptone, 0,5% Yeast Extract] (απουσία αντιβιοτικών) σε κάθε δείγμα και επώαση 1 ώρας, υπό ήπια ανάδευση, σε θερμοκρασία 37°C.
5. Γίνεται διαμοιρασμός κάθε δείγματος σε δύο τρυβλία Petri που εμπεριέχουν θρεπτικό υλικό LB με προσθήκη των αντιβιοτικών χλωραμφενικόλη (25mg/ml) και αμπικιλίνη (100μg/ml).
6. Τα τρυβλία, αφήνονται για ολονύκτια επώαση, τοποθετημένα ανάποδα, σε σκοτεινό περιβάλλον και σε θερμοκρασία 37°C, για να επιτευχθεί ο πολλαπλασιασμός των μετασχηματισμένων βακτηριακών κυττάρων.

2.1.3 Επαγωγή της παραγωγής των πρωτεϊνών με IPTG

Ο πολλαπλασιασμός των βακτηριακών κυττάρων, πραγματοποιείται σε υγρή καλλιέργεια όγκου 2 Lt. Η συνέχεια της διαδικασίας λαμβάνει χώρα ως εξής:

7. Συλλέγεται μονή αποικία από το τρυβλίο και η αποικία μεταφέρεται σε 3mL LB, παρουσία των αντιβιοτικών αμπικιλίνης (100μg/mL) και χλωραμφενικόλης (25μg/ml), σε σωληνάρια falcon των 50ml. Πραγματοποιείται επώαση υπό ανάδευση για περίπου 4 ώρες, σε θερμοκρασία 37°C.

8. Μετά το πέρας επώασης των 4 ωρών, παράγεται μια δεύτερη καλλιέργεια όγκου 20mL LB, παρουσία των αντιβιοτικών αμπικιλίνης (100μg/ml) και χλωραμφενικόλης (25μg/ml) σε κωνική φιάλη των 100ml. Γίνεται μεταφορά 500μl από την πρώτη, προ-καλλιέργεια, στην αντίστοιχη κωνική φιάλη των 20ml LB και επωάζεται ολονυκτίως υπό ανάδευση σε θερμοκρασία 37°C.
9. Γίνεται μεταφορά 10ml από τη δεύτερη προ-καλλιέργεια κάθε δείγματος, στην αντίστοιχη κωνική φιάλη και ακολουθεί επώαση υπό ανάδευση, σε θερμοκρασία 37°C.
10. Ανά διαστήματα, κατά τη διάρκεια της ανάδευσης, λαμβάνεται δείγμα 1ml από κάθε αναπτυσσόμενη βακτηριακή καλλιέργεια κάθε κωνικής φιάλης και μετράται η απορρόφηση της στα 600nm μέσω φωτόμετρου. Ως τυφλό δείγμα, χρησιμοποιείται καθαρό θρεπτικό υλικό (LB).
11. Όταν η απορρόφηση κάθε καλλιέργειας φτάσει $OD_{600nm} = 0,4-0,6$, τότε τα βακτήρια θα έχουν αναπτυχθεί επαρκώς για να γίνει επαγωγή της παραγωγής των πρωτεϊνών με προσθήκη 200μl IPTG 1M σε κάθε φιάλη (1Lt). Οι φιάλες αφήνονται για ολονύκτια επώαση σε θερμοκρασία 20°C.

2.1.4 Απομόνωση βακτηριακών κυττάρων και επαναιώρηση αυτών σε ρυθμιστικό διάλυμα Lysis Buffer

Στο στάδιο αυτό, θα πραγματοποιηθεί επαναιώρηση των βακτηριακών κυττάρων σε κατάλληλο διάλυμα λύσης [Lysis Buffer: 50mM Tris pH=7,5, 100mM NaCl, 1mM PMSF, 1μM Leupeptin, 1μg/ml Aprotinin, 0,7μg/ml Pepstatin, 5μg/ml RNAase, 5μg/ml DNAase] έτσι ώστε να απομονωθούν τα βακτηριακά εκχυλίσματα τα οποία περιέχουν τις υπό στόχου πρωτεΐνες.

Για την συνέχεια της διαδικασίας:

12. Κάθε βακτηριακή καλλιέργεια φυγοκεντρείται στις 6000rpm για 10 λεπτά και σε θερμοκρασία 4°C.
13. Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης, το υπερκείμενο από κάθε βακτηριακή καλλιέργεια απορρίπτεται και το ίζημα που αποτελεί το βακτηριακό εκχύλισμα με τις πρωτεΐνες-στόχους, διατηρείται σε πάγο.
14. Γίνεται επαναιώρηση του ιζήματος και διαλυτοποίηση αυτού, με τη χρήση 50ml ρυθμιστικού διαλύματος λύσης.

2.1.5 Λύση των βακτηριακών εκχυλισμάτων με τεχνική άσκησης πίεσης (French Pressure)

Για τη λύση των βακτηριακών εκχυλισμάτων, ακολουθείται μια τεχνική που θα εξυπηρετήσει τη διάσπαση τους και τελικά την ομογενοποίηση τους, που ονομάζεται «κυτταρική γαλλική πρέσα» (με χρήση της συσκευής French Pressure, εταιρείας SIMINCO, 1000 PSI).

Η συνέχεια της διαδικασίας, περιλαμβάνει την φυγοκέντρηση των διασπώμενων πλέον κυττάρων, στις 15000rpm για 1 ώρα και σε θερμοκρασία 4°C. Η φυγόκεντρος που χρησιμοποιήθηκε ήταν η Sorvall RC6+, με κωδικό κεφαλής SS-34 της εταιρείας Thermo Fisher Scientific. Η φυγοκέντρηση αυτή, εξυπηρετεί τον περαιτέρω διαχωρισμό των πρωτεϊνικών συστατικών από τις βακτηριακές προσμίξεις. Τέλος, το υπερκείμενο που αποτελεί πλέον το βακτηριακό εκχύλισμα με τις πρωτεΐνες-στόχους, απομονώνεται και διατηρείται σε πάγο.

2.1.6 Απομόνωση πρωτεΐνης GST – γαλεκτίνης 1 σε στήλη με σφαιρίδια γλουταθειόνης

Ο διαχωρισμός της πρωτεΐνης GST – γαλεκτίνη 1, από τις υπόλοιπες βακτηριακές προσμίξεις του εκχυλίσματος, έγινε με τεχνική χρωματογραφίας συγγένειας μέσω στήλης σφαιριδίων γλουταθειόνης. Το βακτηριακό εκχύλισμα, επωάζεται μέσα στη στήλη, ώστε να δεσμευτεί στα σφαιρίδια γλουταθειόνης (Sepharose 4Beads της εταιρείας GE Healthcare) η πρωτεΐνη GST – γαλεκτίνη 1 και με αυτόν τον τρόπο να διαχωριστεί από τις υπόλοιπες πρωτεΐνες του εκχυλίσματος. Η έκλουση της πρωτεΐνης GST – γαλεκτίνη 1, γίνεται με τη χρήση διαλύματος ανηγμένης γλουταθειόνης, προκειμένου να σπάσει ο δεσμός μεταξύ της GST και της γλουταθειόνης.

Συγκεκριμένα, η διαδικασία λαμβάνει χώρα ως εξής:

1. Προετοιμάζεται η στήλη με εισαγωγή 200μl σφαιριδίων γλουταθειόνης που είναι αναλογικός με τη ποσότητα της βακτηριακής καλλιέργειας που παράχθηκε (παράχθηκαν 2Lt βακτηριακής καλλιέργειας πρωτεΐνης GST – γαλεκτίνη 1).
2. Μετά την εισαγωγή των σφαιριδίων, στη στήλη γίνονται τα εξής πλυσίματα:

- 1 φορά, με 2ml διαλύματος πλύσης 1x PBS και
 - 2 φορές, από 2ml κάθε φορά, με διάλυμα πλύσης 50mM Tris pH 7,5, 100mM NaCl
3. Το υπερκείμενο της πρωτεΐνης GST – γαλεκτίνης 1, που προέκυψε από την φυγοκέντρηση και διατηρήθηκε σε πάγο, αναμιγνύεται στη στήλη των σφαιριδίων γλουταθειόνης και ακολουθεί επώαση υπό ανάδευση για 1 ώρα και 30 λεπτά σε θερμοκρασία 4°C.

Κατά τη διάρκεια της επώασης, αναμένεται η σύνδεση της πρωτεΐνης GST – γαλεκτίνη 1, επάνω στα σφαιρίδια γλουταθειόνης, ενώ το απορρέον δείγμα (flow through sample) που θα εξέλθει κάτω από την στήλη, θα αποτελεί ότι δεν έχει προσδεθεί στη γλουταθειόνη. Το απορρέον δείγμα, συλλέγεται και αποθηκεύεται σε θερμοκρασία -20°C, σε περίπτωση που χρειαστεί να επαναληφθεί η διαδικασία.

4. Η στήλη ξεπλένεται 6 φορές, από 3ml κάθε φορά, με διάλυμα πλύσης 50 mM Tris pH 8,5, 150mM NaCl. Οι πλύσεις γίνονται σε θερμοκρασία 4°C.
5. Στο τελευταίο πλύσιμο, απομονώνεται έκλουσμα με λήψη κατάλληλου όγκου σφαιριδίων (~15-20μl) από τη στήλη και προσθήκη διπλάσιου όγκου διαλύματος έκλουσης ανηγμένης γλουταθειόνης (~30-40μl). Ακολουθεί φωτομέτρηση της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης που υπολογίζεται με τη μέθοδο Bradford.

Με βάση την παραπάνω διαδικασία, σε δεύτερη στήλη, πραγματοποιήθηκε απομόνωση και της GST πρωτεΐνης από το αντίστοιχο βακτηριακό της εκχύλισμα.

2.1.7 Απομόνωση αντισωμάτων αντι – γαλεκτίνης 1 από ορό κουνελιού στη στήλη γλουταθειόνης

Επειδή η πρωτεΐνη που χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή των αντισωμάτων ήταν η γαλεκτίνη 1 συζευγμένη με την GST, στον ορό του κουνελιού αναμένεται να υπάρχουν αντισώματα και για το τμήμα της GST πρωτεΐνης. Προκειμένου, να αφαιρεθούν τα αντισώματα που αναγνωρίζουν το πρόσδεμα GST, έπρεπε αρχικά, ο ορός να εισαχθεί σε στήλη με δεσμευμένη τη GST πρωτεΐνη επάνω στα σφαιρίδια γλουταθειόνης. Έτσι, το απορρέον

δείγμα που θα εξαχθεί κάτω από τη στήλη της GST, θα είναι εκείνο το δείγμα που θα εμπεριέχει τα αντισώματα αντι – γαλεκτίνης 1.

Ο πλήρης καθαρισμός των αντισωμάτων αντι – γαλεκτίνης 1, θα επιτευχθεί όταν το συλλεχθέν απορρέον δείγμα από τη στήλη της GST, σε δεύτερο στάδιο, επωαστεί στη στήλη όπου είναι δεσμευμένη στα σφαιρίδια γλουταθειόνης η πρωτεΐνη GST – γαλεκτίνη 1.

Πιο συγκεκριμένα, η διαδικασία λαμβάνει χώρα ως εξής:

1. Σε στήλη γλουταθειόνης – GST (2mg GST σε όγκο 200μl σφαιριδίων), προστίθενται 2ml ορού κουνελιού. Η στήλη, αφήνεται για επώαση υπό ανάδευση περίπου 3 ώρες και σε θερμοκρασία 4°C.

2. Σε δεύτερη στήλη, με δεσμευμένη τη GST – γαλεκτίνη 1 (1,5mg GST – γαλεκτίνη 1 σε όγκο 200μl σφαιριδίων) γίνονται οι εξής πλύσεις:

- 1 φορά, με 2ml διαλύματος πλύσης 1x PBS, 0,1mM EDTA και
- 4 φορές, από 1ml κάθε φορά, με διάλυμα πλύσης 0,2M Borate – NaOH pH=8,6.

Η στήλη της GST – γαλεκτίνης 1, επεξεργάζεται ως εξής:

2.I. Προστίθενται 300μl 20mM DMP (διαλυμένο σε ρυθμιστικό διάλυμα 0,2M Triethanolamine pH=8,3) και η στήλη αφήνεται για επώαση με ήπια ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά.

Το DMP⁵¹ (πιμελιμιδικό διμεθύλιο), είναι ένα χημικό μόριο (ημιδοεστέρας), που λειτουργεί ως παράγοντας σύζευξης ενώνοντας με ομοιοπολικό δεσμό πρωτεΐνες επάνω στα σφαιρίδια της στήλης.

2.II. Η στήλη της GST – γαλεκτίνης 1, ξεπλένεται 2 φορές, από 4ml κάθε φορά, με διάλυμα πλύσης 0,2M Ethanolamine–HCl, pH 8,2.

2.III. Γίνεται προσθήκη 3ml από διάλυμα 0,2M Ethanolamine-HCl pH 8,2 και η στήλη επωάζεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα.

2.IV. Ακολουθούν οι εξής πλύσεις:

- 4 πλύσεις, από 2ml τη φορά, με διάλυμα 0,2M Tris HCl pH 7,5, 1,5M NaCl
- 2 πλύσεις, από 1ml τη φορά, με διάλυμα 0,1M Tris Glycine-HCl pH 2,5 και
- 4 πλύσεις από 2ml τη φορά, με διάλυμα 1x PBS

3. Το απορρέον δείγμα αντιορού που συλλέχθηκε από τη στήλη της GST πρωτεΐνης, προστίθεται τώρα στη στήλη της GST – γαλεκτίνης 1 και επωάζεται υπό ανάδευση ολονυκτίως σε θερμοκρασία 4°C. Στο τέλος της επώασης, επανασυλλέγεται το δείγμα που θα εξαχθεί από τη στήλη και αποθηκεύεται στους -20°C, σε περίπτωση επανάληψης της διαδικασίας.

4. Ακολουθούν πλύσεις της στήλης σε θερμοκρασία 4°C ως εξής:

➤ 7 πλύσεις, από 2ml τη φορά, με διάλυμα 0,2M Tris-HCl pH 7,5, 1,5M NaCl

➤ 1 πλύση από 5ml, με διάλυμα 2mM Tris-HCl pH 7,5, 150mM NaCl

9. Στην τελευταία πλύση, γίνεται έκλουση με διάλυμα 0,1M γλυκίνης pH=2,5 και συλλέγονται 10 εκλούσματα όγκου 100μl το καθένα. Σε αυτά τα 10 εκλούσματα, προστέθηκε όγκος διαλύματος Tris-HCl pH=8,8 (~15μl) για να εξισορροπηθεί το pH από 2,5 σε 7,5.

Η έκλουση της στήλης με διάλυμα 0,1M γλυκίνης pH=2,5, εξυπηρετεί την αποδέσμευση των αντισωμάτων αντι – γαλεκτίνης 1 από την πρωτεΐνη γαλεκτίνη 1, η οποία θα παραμείνει ομοιοπολικά συνδεδεμένη επάνω στα σφαιρίδια γλουταθειόνης, ενώ τα αντισώματα της θα απελευθερωθούν κάνοντας δυνατή τη συλλογή τους σε καθαρή μορφή.

10. Από το κάθε έκλουσμα, λαμβάνεται όγκος ~15μl, για φωτομέτρηση με τη μέθοδο Bradford και τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των λαμβανόμενων αντισωμάτων αντι – γαλεκτίνης 1. Τα εκλούσματα που συλλέχθηκαν, ενώθηκαν σε ένα δείγμα και έγινε διαπίδυση έναντι διαλύματος 1x PBS με ολονύκτια επώαση.

11. Την επόμενη ημέρα, το δείγμα με τα αντισώματα αντι – γαλεκτίνης 1 φυγοκεντρήθηκε, μετρήθηκε ξανά η συγκέντρωσή τους, προστέθηκε NaN_3 (0,02%) και φυλάχθηκε στους -80°C.

Ο έλεγχος της ποιότητας των αντισωμάτων αντι – γαλεκτίνης 1, πραγματοποιήθηκε με ανοσοαποτύπωση κατά Western.

2.2 Ποσοτικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης της γαλεκτίνης 1 με τη μέθοδο Bradford

Για την εκτίμηση της συγκέντρωσης της γαλεκτίνης 1, χρησιμοποιήθηκε η φασματοφωτομετρική μέθοδος Bradford. Προετοιμάστηκε το διάλυμα χρωστικής (όγκου 1ml), που περιελάμβανε 800μl ddH₂O και 200μl χρωστική Bradford (Bio-Rad) και προστέθηκε όγκος δείγματος (~5μl). Ακολούθησε ανάδευση και φωτομέτρηση στα 595nm. Ως τυφλό δείγμα, χρησιμοποιήθηκε διάλυμα χρωστικής (800μl ddH₂O και 200μl Bradford), ώστε να φωτομετρηθεί και να αφαιρεθεί η τιμή απορρόφησης του από τα υπόλοιπα δείγματα (θόρυβος απορρόφησης). Η εκτίμηση της συγκέντρωσης έγινε συγκρίνοντας την απορρόφηση του εξεταζόμενου δείγματος στα 595nm με μια πρότυπη καμπύλη που συσχετίζει τη συγκέντρωση γνωστών, αυξανόμενων συγκεντρώσεων της πρωτεΐνης αλβουμίνης ορού βοός (BSA) με την απορρόφηση τους στα 595nm. Η εξίσωση που χρησιμοποιήθηκε για τη πρότυπη καμπύλη στη παρούσα εργασία έχει τον τύπο: $y=0,0671x + 0,0562$.

2.3 Ηλεκτροφόρηση γαλεκτίνης 1 σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE) και ανοσοαποτύπωση πρωτεΐνης κατά Western

Για την ταυτοποίηση της γαλεκτίνης 1 σε ένα δείγμα, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE) και μεταφορά της πρωτεΐνης σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (GE Healthcare Life Sciences). Για τον έλεγχο της μεταφοράς, η μεμβράνη βάφτηκε με τη χρωστική Ponceau S (Serva) για 30 δευτερόλεπτα και πλύθηκε με ddH₂O. Ο πρωτεϊνικός μάρτυρας που χρησιμοποιήθηκε είναι ο BlueStar Prestained Protein Marker (MWP03, Nippon Genetics).

Η μεμβράνη επώαστηκε υπό ανάδευση για 1 ώρα, σε θερμοκρασία δωματίου, με διάλυμα δέσμησης [blocking buffer: 5% w/v σκόνη γάλακτος σε διάλυμα 1x PBS, 0,1% Tween20]. Ακολούθησε επώαση της μεμβράνης με πρωτογενές αντίσωμα έναντι της γαλεκτίνης 1 σε διάλυμα 1x PBS – 0,1% Tween20. Η μεμβράνη ξεπλύθηκε 4 φορές, κάθε 5 λεπτά, με διάλυμα 1x PBS – 0,1% Tween20 και επώαστηκε σε διάλυμα δέσμησης με δευτερογενές αντίσωμα συζευγμένο με ραφανιδική υπεροξειδάση (α-rabbit HRP, Jackson Immunoresearch) για 1 ώρα, υπό ανάδευση και σε θερμοκρασία δωματίου. Η

μεμβράνη ξεπλύθηκε 4 φορές, κάθε 5 λεπτά, με διάλυμα 1x PBS, 0,1% Tween20. Τέλος, μετά τις πλύσεις, η μεμβράνη επωάστηκε για 5 λεπτά με αντιδραστήριο χημειοφωταύγειας ECL (Roche Diagnostics GmbH). Η εμφάνιση του σήματος έγινε σε συσκευή προσδιορισμού χημειοφωταύγειας (Azure biosystems 600).

2.4 Έλεγχος της παρουσίας της γαλεκτίνης 1 σε δείγμα ορού πλάσματος ασθενών με δοκιμασία χρωματογραφίας συγγένειας πρωτεΐνης A

Για τον έλεγχο της παρουσίας της γαλεκτίνης 1 σε δείγμα ορού πλάσματος ασθενών, πραγματοποιήθηκε τεχνική χρωματογραφίας συγγένειας μέσω στήλης με σφαιρίδια πρωτεΐνης A (Sepharose 4Beads της εταιρείας GE Healthcare).

Με βάση την τεχνική αυτή, η πρωτεΐνη A βρίσκεται ακινητοποιημένη στο υπόστρωμα της, την σεφαρόζη, μέσα σε στήλη. Η στήλη επωάζεται με ορό κουνελιού αντι – γαλεκτίνης 1, όπου αναμένεται η σύνδεση των αντισωμάτων με την πρωτεΐνη A. Ύστερα, ακολουθεί επώαση με δείγμα φυσιολογικού ορού (υγιής δότης), ενώ με διάλυμα γλυκίνης, θα γίνει αποδέσμευση του αντισώματος από το αντιγόνο και τα λαμβανόμενα εκλούσματα (καθώς και τα δείγματα των σφαιριδίων) θα είναι δυνατό να ελεγχθούν για την παρουσία ή όχι της γαλεκτίνης 1 στο εξεταζόμενο δείγμα.

Συγκεκριμένα, η διαδικασία λαμβάνει χώρα ως εξής:

1. Σε σωληνάριο erpendorf, γίνεται προσθήκη 50μl σφαιριδίων πρωτεΐνης A και ακολουθούν 3 πλύσεις των σφαιριδίων με 500μl διαλύματος 1x PBS.
2. Το δείγμα επωάζεται υπό ανάδευση για 1 ώρα και 30 λεπτά σε θερμοκρασία 4°C με προσθήκη 500μl ορού κουνελιού αντι – γαλεκτίνης 1.
3. Ακολουθούν 5 πλύσεις του δείγματος, από 500μl διαλύματος 1x PBS κάθε φορά.

Παράλληλα με τη προετοιμασία του παραπάνω δείγματος, προετοιμάστηκε και ένα δεύτερο δείγμα χωρίς να ακολουθηθεί το βήμα 2, δηλαδή, χωρίς προσθήκη ορού κουνελιού αντι – γαλεκτίνης 1. Σε αυτό το

δείγμα, η στήλη θα επωαστεί μόνο με δείγμα ορού πλάσματος υγιούς δότη. Η συνέχεια της διαδικασίας και για τα δύο δείγματα γίνεται ως εξής:

4. Το 1^ο δείγμα (που προέκυψε μετά την επώαση του ορού αντι – γαλεκτίνης 1 με τα σφαιρίδια) και το 2^ο δείγμα (που εμπεριέχει μόνο τα σφαιρίδια πρωτεΐνης A), επωάζονται υπό ανάδευση για 1 ώρα και 30 λεπτά σε θερμοκρασία 4°C, με προσθήκη 500μl φυσιολογικού ορού για κάθε δείγμα.

5. Μετά την επώαση των δύο δειγμάτων, ακολουθεί η φυγοκέντρωση τους για 1 λεπτό στις 14000rpm και σε θερμοκρασία 4°C. Τα υπερκείμενα των δειγμάτων, μετά την φυγοκέντρωση, συλλέγονται και αποθηκεύονται στο ψυγείο σε θερμοκρασία -20°C, σε περίπτωση επανάληψης της διαδικασίας.

6. Τα δύο δείγματα με τα σφαιρίδια, ξεπλένονται ως εξής:

- 4 φορές, με 500μl τη φορά, με διάλυμα 1x PBS
- 1 φορά, με προσθήκη 200μl ddH₂O σε κάθε δείγμα.

7. Μετά τις πλύσεις, ακολουθεί το στάδιο της έκλουσης με προσθήκη ~30-40μl διαλύματος 0,1M Tris γλυκίνης, HCl pH=2,5 σε κάθε δείγμα και ήπια ανάδευση. Τα δείγματα, αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά, μέχρις ότου δράσει το διάλυμα έκλουσης της γλυκίνης.

8. Απομονώνονται δύο εκλούσματα από τα αντίστοιχα δείγματα των σφαιριδίων, με μεταφορά όγκου ~30μl από κάθε δείγμα.

9. Στα δείγματα των σφαιριδίων και στα εκλούσματα τους, προστίθενται ~30μl 1x Sample Buffer και βράζονται για 5 λεπτά προκειμένου να πραγματοποιηθεί ανοσοαποτύπωση κατά Western για τον χαρακτηρισμό των δειγμάτων.

2.5 Εγκαθίδρυση μεθόδου sandwich-ELISA

Η ELISA αποτελεί μια ανοσοενζυμική μέθοδο ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης βιολογικών μορίων που βρίσκονται σε ένα δείγμα. Η τεχνική αυτή, παρουσιάζει υψηλή ευαισθησία και αξιοπιστία, καθώς βασίζεται στη χρήση αντισωμάτων ως παράγοντες μοριακής αναγνώρισης, προκειμένου να επιτευχθεί βιο-ειδική δέσμευση και ανίχνευση των αντιγόνων τους.

Η ELISA τύπου sandwich, έχει την μεγαλύτερη ευαισθησία συγκριτικά με της υπόλοιπες παραλλαγές της τεχνικής αλλά και συγκριτικά με τις βιοχημικές μεθόδους, καθώς μπορεί να ανιχνεύει πολύ χαμηλές ποσότητες (έως και pg) του προς ανίχνευση αντιγόνου⁵². Φέρει μειωμένη ανάγκη για προετοιμασία του δείγματος και εξυπηρετεί την ανάλυση σε μεγάλο αριθμό δειγμάτων. Τα στάδια της είναι απλά, ενώ δεν απαιτείται σημαντικός χρόνος πραγματοποίησης της.

Συγκεκριμένα, η μέθοδος της sandwich-ELISA έλαβε χώρα ως εξής:

1. Η επιφάνεια πιάτου ELISA 96-φρεατίων (Nunc 96-well plates, Thermo Fisher Scientific), καλύπτεται σε όγκο 100μl ανά φρεάτιο με πολυκλωνικό αντίσωμα αντι – γαλεκτίνης 1 από ορό κουνελιού, αραιωμένο 1:100 σε διάλυμα κάλυψης [coating buffer: 50mM NaHCO₃ και 0,2M Na₂CO₃ pH=9,5]. Το πιάτο αφήνεται για ολονύκτια επώαση υπό ανάδευση σε θερμοκρασία 4°C.

2. Την επόμενη ημέρα, το πιάτο πλένεται 3 φορές, από 200μl τη φορά, με διάλυμα πλύσης [wash buffer: 0,05% Tween20 σε διάλυμα 1x PBS].

3. Στα φρεάτια του πιάτου, προστίθενται 200μl διάλυμα δέσμησης [blocking buffer: 10mg/ml BSA, 1x PBS, 0,05% Tween20] και το πιάτο, επωάζεται υπό ανάδευση για 1 ώρα, σε θερμοκρασία δωματίου.

4. Μετά την επώαση, απορρίπτεται το διάλυμα δέσμησης και αμέσως, ακολουθεί προσθήκη των υπό εξέταση δειγμάτων ορού. Προκειμένου να εξεταστεί όγκος 500μl από κάθε δείγμα και επειδή τα φρεάτια έχουν μέγιστη χωρητικότητα όγκου 200μl, γινόταν προσθήκη 100μl δείγματος κάθε φορά, επώαση υπό ανάδευση για 15 λεπτά, αφαίρεση του όγκου μετά το πέρας των 15 λεπτών και προσθήκη νέου όγκου 100μl από το ίδιο δείγμα, μέχρις ότου καταναλωθεί ο όγκος των 500μl για κάθε δείγμα (η διάρκεια των 15λεπτων επωάσεων ήταν περίπου 2 ώρες και 15 λεπτά).

5. Το πιάτο ξεπλένεται 6 φορές, με 200μl τη φορά, με διάλυμα πλύσης.

6. Ακολουθεί προσθήκη μονοκλωνικού αντισώματος αντι – γαλεκτίνης 1 από ορό ποντικού. Χρησιμοποιήθηκαν δύο μονοκλωνικά αντισώματα αντί γαλεκτίνης 1 του εμπορίου: (α) εταιρείας Proteintech και (β) εταιρείας Thermo Fisher Scientific. Το μονοκλωνικό αντίσωμα αντι – γαλεκτίνης 1, προστίθεται σε όγκο 100μl ανά πηγαδάκι, αραιωμένο 1:500 σε διάλυμα

δέσμευσης. Το πιάτο, αφήνεται για επώαση 1 ώρας υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου.

7. Το πιάτο, ξεπλένεται 6 φορές, με 200ml τη φορά, με διάλυμα πλύσης.

8. Γίνεται προσθήκη όγκου 100ml ανά φρεάτιο, με δευτερογενές αντίσωμα έναντι αντισωμάτων του ποντικού, συζευγμένο με ραφανιδική υπεροξειδάση (amouse-HRP, Jackson Immunoresearch), αραιωμένο 1:200 σε διάλυμα δέσμευσης. Το πιάτο, αφήνεται για επώαση υπό ανάδευση για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

9. Το πιάτο, ξεπλένεται 6 φορές, με 200ml τη φορά, με διάλυμα πλύσης.

10. Μετά τις πλύσεις, πραγματοποιείται αντίδραση υπεροξειδάσης, με προσθήκη 200ml ανά πηγαδάκι υποστρώματος OPD σε διάλυμα κιτρικού οξέος και διβασικού φωσφορικού νατρίου. Η αντίδραση διαρκούσε ~10 λεπτά και το αποτέλεσμα της διαπιστωνόταν με αλλαγή του χρώματος των δειγμάτων.

[Παρασκευάζεται το διάλυμα του OPD ως εξής **(A)**: 2,1gr κιτρικό οξύ (citric acid) σε 100ml ddH₂O. **(B)**: 2,87gr διβασικό φωσφορικό νάτριο (Na₂HPO₄) σε 100ml ddH₂O. Για 25ml διαλύματος υποστρώματος OPD προστίθενται: 6,075ml από το **(A)**, 6,425ml από το **(B)** και 12,5ml ddH₂O. Στα 25ml διαλύματος υποστρώματος, ζυγίζονται και προστίθενται 0,01gr αντιδραστήριου OPD. Λίγο πριν την χρήση του υποστρώματος OPD, στο διάλυμα προστίθενται 10ml H₂O₂ 30%].

11. Ο τερματισμός της αντίδρασης, πραγματοποιείται με προσθήκη 50ml 1M H₂SO₄ σε κάθε φρεάτιο. Η διακοπή της αντίδρασης, διαπιστώνεται και πάλι με αλλαγή του χρώματος των δειγμάτων (σε πιο έντονη απόχρωση, λόγω αλλαγής του pH), σηματοδοτώντας την απενεργοποίηση της δράσης της υπεροξειδάσης.

12. Ακολουθεί φωτομέτρηση στα 492nm, αλλά και στα 630nm για την αφαίρεση του θορύβου, το οποίο αντιστοιχεί στο μέγιστο απορρόφησης του χρωμογόνου προϊόντος. Η φωτομέτρηση πραγματοποιήθηκε στη συσκευή Tecan Infinite F50.

Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης, αλλά και για τον έλεγχο της ευαισθησίας της μεθόδου, χρησιμοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις γνωστών συγκεντρώσεων της πρωτεΐνης γαλεκτίνης 1 σε καθαρή μορφή. Επιπλέον, όλα τα υπό εξέταση δείγματα, μετρήθηκαν 3 φορές.

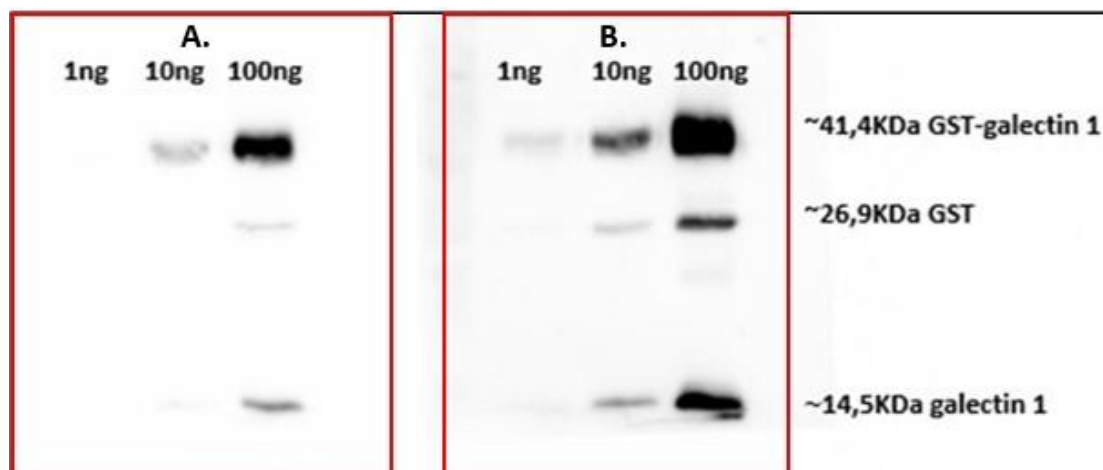
2.6 Ποσοτικοποίηση και στατιστική ανάλυση

Τα γραφήματα της παρούσας εργασίας, αντιπροσωπεύουν δεδομένα που προκύπτουν από 3 επαναλήψεις κάθε δείγματος. Υπολογίσθηκε ο μέσος όρος των τριπλών επαναλήψεων για κάθε δείγμα και αφαιρέθηκε ο μέσος όρος των τιμών της οπτικής πυκνότητας του αρνητικού δείγματος με συγκέντρωση γαλεκτίνης 1 σε 0 ng/ml. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε μέσω t-test. Τα γραφήματα που παρουσιάζονται, όπως και η στατιστική ανάλυση, πραγματοποιήθηκαν με το λογισμικό πρόγραμμα GraphPad Prism.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Έλεγχος της ευαισθησίας των καθαρισμένων αντισωμάτων έναντι της GST - γαλεκτίνης 1

Μετά τη διαδικασία της απομόνωσης και του καθαρισμού των αντισωμάτων GST – γαλεκτίνης 1 (Ενότητα 2.1.7), από τον ορό του κουνελιού (όπου παράχθηκαν σε προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου⁴⁹), προσδιορίστηκε η συγκέντρωσή τους, η οποία βρέθηκε 0,2 μg/μl. Η ευαισθησία των συγκεκριμένων αντισωμάτων, ελέγχθηκε με ανοσοαποτύπωση κατά Western (Εικόνα 6), ηλεκτροφορώντας διπλά δείγματα πρωτεΐνης GST – γαλεκτίνης 1 (1ng, 10ng, 100ng). Για την ανοσοαποτύπωση, χρησιμοποιήθηκαν ως πρωτογενή αντισώματα ανίχνευσης (1:1000), στη μια μεμβράνη των δειγμάτων, το αντίσωμα GST - γαλεκτίνης 1 σε καθαρή μορφή (Εικόνα 6, μεμβράνη A) και στην άλλη μεμβράνη, ο ορός του κουνελιού έναντι της GST - γαλεκτίνης 1 (crude serum) (Εικόνα 6, μεμβράνη B), προκειμένου να γίνει η σύγκριση ευαισθησίας μεταξύ τους. Για την ανίχνευση και για τις δύο μεμβράνες, χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα έναντι αντισωμάτων κουνελιού, συζευγμένο με ραφανιδική υπεροξειδάση (1:5000).



Εικόνα 6. Έλεγχος της ευαισθησίας των αντισωμάτων GST – γαλεκτίνης 1 καθαρής μορφής (μεμβράνη A) σε σύγκριση με τον ορό του κουνελιού έναντι της GST - γαλεκτίνης 1 (μεμβράνη B) – Ηλεκτροφορήθηκαν διπλά δείγματα πρωτεΐνης GST – γαλεκτίνης 1 (1ng, 10ng, 100ng). Η μεμβράνη A, επώαστηκε με το αντίσωμα GST - γαλεκτίνης 1 σε καθαρή μορφή (1:1000), με την ανίχνευση της GST – γαλεκτίνης 1 (MB ~41,4KDa) να παρατηρείται στα 100ng και ελάχιστα στα 10ng. Η μεμβράνη B, επώαστηκε με τον ορό κουνελιού (crude serum) έναντι της GST - γαλεκτίνης 1 (1:1000), με την ανίχνευση της πρωτεΐνης να παρατηρείται εντονότερα

στα 100ng και στα 10ng. Για την ανίχνευση, χρησιμοποιήθηκαν δευτερογενή αντισώματα έναντι αντισωμάτων κουνελιού, συζευγμένα με ραφανιδική υπεροξειδάση (1:5000).

Με βάση την Εικόνα 6, παρατηρώντας την μεμβράνη Α, όπου ως πρωτογενές αντίσωμα, χρησιμοποιήθηκε το καθαρό αντίσωμα GST - γαλεκτίνης 1, φαίνεται η πρωτεΐνη GST – γαλεκτίνη 1, να ανιχνεύεται επαρκώς στα 100ng, ελάχιστα στα 10ng και καθόλου στο 1ng. Από την άλλη, παρατηρώντας την μεμβράνη Β, μετά από χρήση του ορού του κουνελιού έναντι της GST - γαλεκτίνης 1, φαίνεται ότι αυτό το αντίσωμα, είναι πιο ευαίσθητο στην ανίχνευση της πρωτεΐνης, καθώς το σήμα της είναι εντονότερο στα 100ng αλλά και στα 10ng αυτής, ενώ δεν εμφανίζεται σήμα της πρωτεΐνης στο 1ng.

Η σύγκριση, έγινε με βάση τις συγκεκριμένες αραιώσεις των αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτό το πείραμα. Ωστόσο, μπορούμε να πούμε ότι, για τα δείγματα της μεμβράνης Α (όπου έγινε χρήση του καθαρού αντισώματος έναντι της GST - γαλεκτίνης 1), εάν είχαμε προβεί σε χαμηλότερες αραιώσεις των αντισωμάτων, τότε, τα καθαρά αντισώματα έναντι της GST - γαλεκτίνης 1, θα παρουσίαζαν εξίσου ικανή ευαισθησία (ή και υψηλότερη), με τα αντισώματα έναντι της GST - γαλεκτίνης 1 του κουνελιού (μεμβράνη Β).

Με βάση τα παραπάνω, επιβεβαιώνεται αρχικά, ότι τα παραγόμενα στο εργαστήριο αντισώματα αντι – γαλεκτίνης 1, εμφανίζουν ευαισθησία σε επίπεδο μερικών ng ως προς την αναγνώριση της GST – γαλεκτίνης 1, και δεύτερον, η διαδικασία του καθαρισμού που πραγματοποιήθηκε ήταν επιτυχής.

Τέλος, σημειώνεται ότι, η παρουσία ζωνών πρωτεϊνών GST (MB ~26,9KDa) και γαλεκτίνης 1 (MB~14,5KDa), οφείλεται στο ότι οι συγκεκριμένες πρωτεΐνες, αποτελούν προϊόντα πρωτεολυτικής σχάσης της GST – γαλεκτίνης 1.

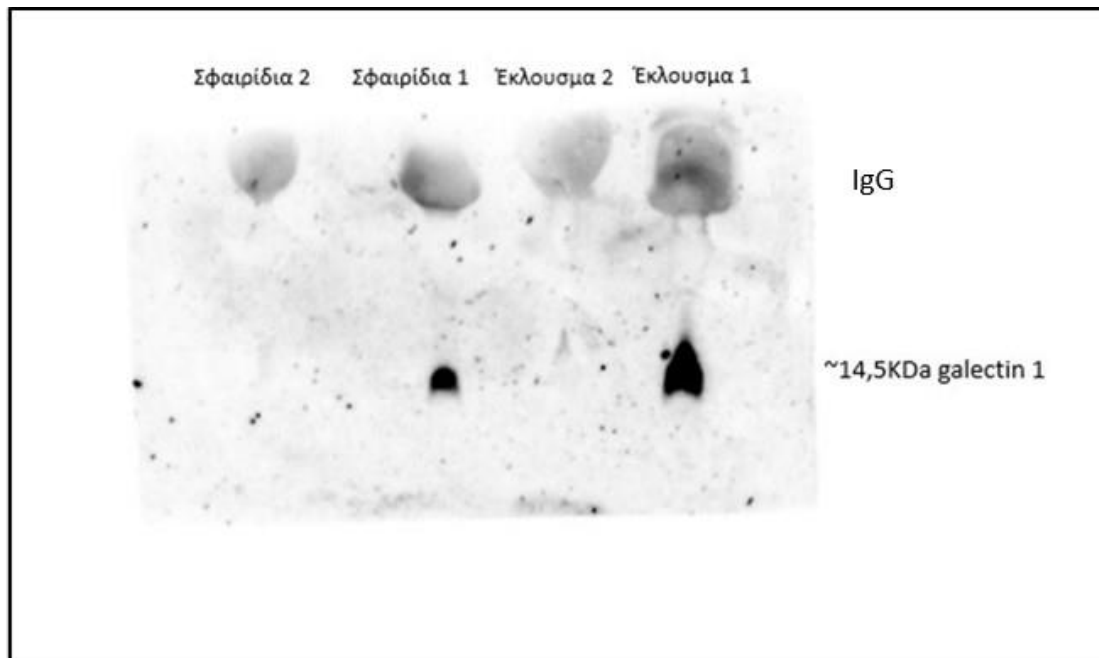
3.2 Έλεγχος της παρουσίας της γαλεκτίνης 1 σε δείγμα φυσιολογικού ορού

Πριν την εγκαθίδρυση της μεθόδου ποσοτικοποίησης της γαλεκτίνης 1 σε δείγματα ορού ασθενών, ελέγξαμε, αν πράγματι, υπάρχει η γαλεκτίνη 1 σε δείγματα ασθενών, όπως υποστηρίζεται από την βιβλιογραφία^{53,54}.

Για τον έλεγχο της παρουσίας της γαλεκτίνης 1 στον ορό, πραγματοποιήθηκε η τεχνική της χρωματογραφίας συγγένειας σε σήλη με

σφαιρίδια πρωτεΐνης A (Ενότητα 2.4). Ως εξεταζόμενο δείγμα, χρησιμοποιήθηκε ορός υγιούς δότη (φυσιολογικός ορός). Ως αντίσωμα, χρησιμοποιήθηκε ο ορός κουνελιού αντι – γαλεκτίνης 1. Έτσι, με τη δοκιμασία αυτή, ελέγχθηκε αφενός η παρουσία της γαλεκτίνης 1 στον φυσιολογικό ορό, και αφετέρου, η ειδικότητα των παραγόμενων αντισωμάτων αντι – γαλεκτίνης 1 στο βιολογικό δείγμα.

Για την δοκιμασία, προετοιμάστηκαν δύο δείγματα σφαιριδίων πρωτεΐνης A (Σφαιρίδια 1, και Σφαιρίδια 2), όπου το πρώτο, επώαστηκε, αρχικά, με τον ορό κουνελιού αντι – γαλεκτίνης 1 και ύστερα, με ποσότητα φυσιολογικού ορού στο οποίο επρόκειτο να διερευνηθεί η παρουσία της πρωτεΐνης. Το δεύτερο δείγμα των σφαιριδίων (αρνητικός μάρτυρας), επώαστηκε με φυσιολογικό ορό του ίδιου δότη, χωρίς να προηγηθεί επώαση με τον ορό κουνελιού αντι – γαλεκτίνης 1. Τα εκλούσματα τους, καθώς επίσης και τα εναπομείναντα δείγματα των σφαιριδίων, ηλεκτροφορήθηκαν με ανοσοαποτύπωση κατά Western, προκειμένου να επαληθευθεί η παρουσία της πρωτεΐνης εντός του βιολογικού δείγματος. Τα αποτελέσματα από την εμφάνιση, παρουσιάζονται στην Εικόνα 8.



Εικόνα 8. Έλεγχος της παρουσίας της γαλεκτίνης 1 σε δείγμα φυσιολογικού ορού, μετά από δοκιμασία χρωματογραφίας συγγένειας μέσω πρωτεΐνης A – Ανοσοαποτύπωση κατά Western: Για την ανίχνευση της πρωτεΐνης, χρησιμοποιήθηκε πρωτογενές μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού αντι – γαλεκτίνης και ως δευτερογενές το μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι αντισωμάτων ποντικού, συζευγμένο με ραφανιδική υπεροξειδάση. Η παρουσία της γαλεκτίνης 1

(MB~14,5KDa), παρατηρείται στο έκλουσμα όπου στα σφαιρίδια πρωτεΐνης A, προηγήθηκε επώαση με τον ορό κουνελιού αντι – γαλεκτίνης 1 και με δείγμα φυσιολογικού ορού (Έκλουσμα 1, Σφαιρίδια 1). Αντιθέτως, στο έκλουσμα των σφαιριδίων όπου δεν προηγήθηκε επώαση με αντίσωμα αντι – γαλεκτίνης 1, δε παρατηρείται δέσμευση της πρωτεΐνης (Έκλουσμα 2, Σφαιρίδια 2). Σε όλα τα δείγματα, παρατηρείται σήμα, ενδεχομένως, παρουσίας των ανθρώπινων IgG αντισωμάτων του ορού του δότη, που να οφείλεται σε μη ειδική προσκόλληση αυτών, επάνω στα σφαιρίδια της πρωτεΐνης A.

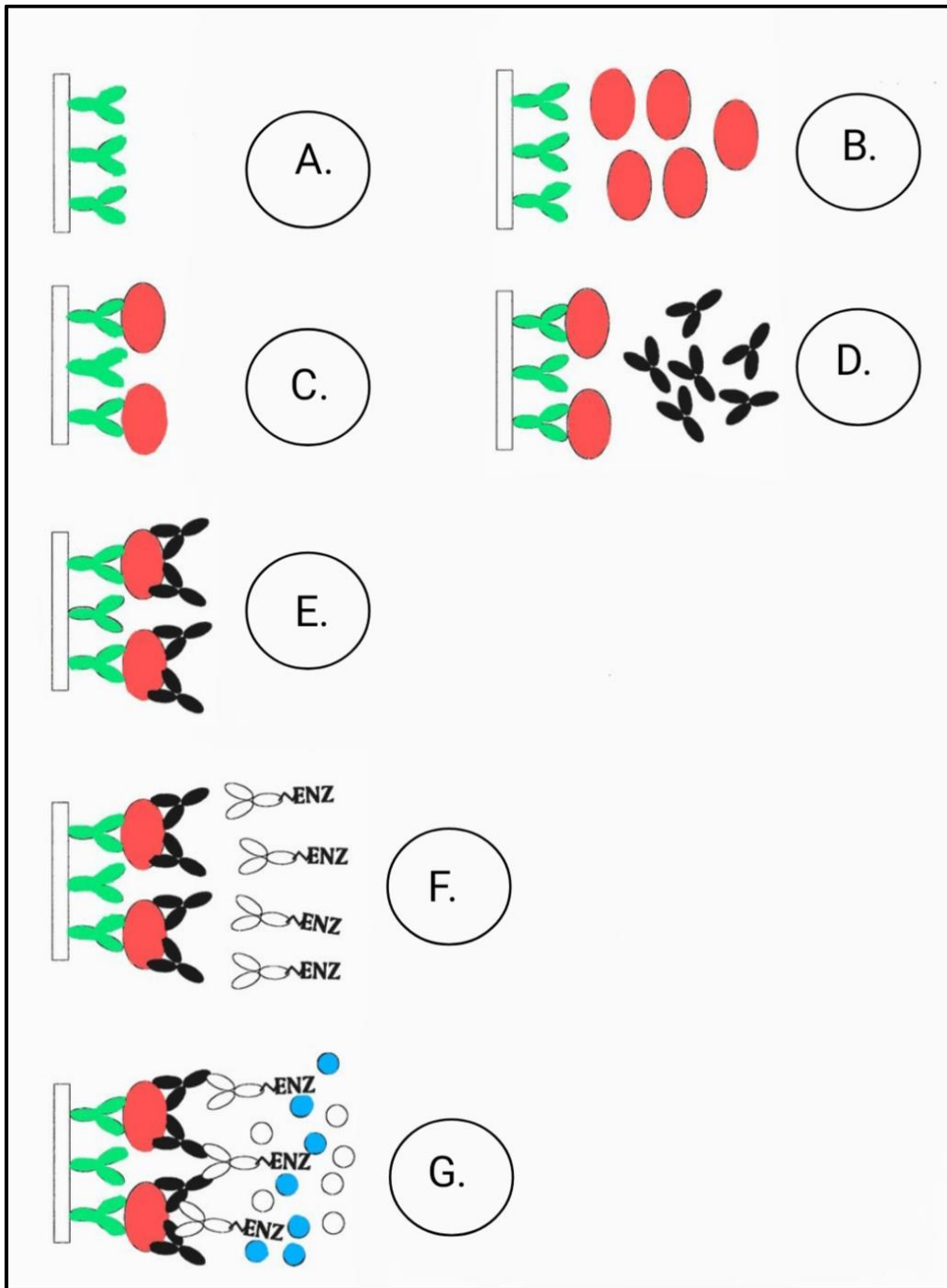
Όπως παρατηρείται στην Εικόνα 8, η γαλεκτίνη 1 (MB ~14,5KDa), ανιχνεύεται στο έκλουσμα όπου ο ορός του δότη, είχε επωαστεί με τα σφαιρίδια πρωτεΐνης A στα οποία είχαν συνδεθεί τα αντισώματα έναντι της γαλεκτίνης 1 (Σφαιρίδια 1, Έκλουσμα 1). Σημειώνεται ακόμη, πως, η παρουσία της πρωτεΐνης στο δείγμα ‘Σφαιρίδια 1’, οφείλεται στην μερική έκλυση του δείγματος, με αποτέλεσμα να έχει παραμείνει ποσότητα πρωτεΐνης επάνω στα σφαιρίδια. Αντιθέτως, όπως ήταν αναμενόμενο, στο δεύτερο δείγμα, που αποτελούσε τον αρνητικό μάρτυρα της δοκιμασίας, όπου δεν προηγήθηκε επώαση των σφαιριδίων με τα αντισώματα αντι – γαλεκτίνης 1, η πρωτεΐνη, δεν δεσμεύτηκε στα σφαιρίδια και δεν εμφανίζεται στην μεμβράνη της ανοσοαποτύπωσης (Σφαιρίδια 2, Έκλουσμα 2).

Και στα δύο δείγματα των σφαιριδίων και κατ’ επέκταση και στα εκλούσματα τους (Εικόνα 8), παρατηρείται σήμα, ενδεχομένως, παρουσίας ανθρώπινων IgG αντισωμάτων (φυσιολογικά, μεταξύ άλλων συστατικών, εμπεριέχονται στον ορό), που να οφείλεται σε μη ειδική προσκόλληση των αντισωμάτων αυτών, επάνω στα σφαιρίδια της πρωτεΐνης A, λόγω της συγγένειας που παρουσιάζει η πρωτεΐνη A για την βαριά αλυσίδα των αντισωμάτων.

Από την παραπάνω δοκιμασία ελέγχου της παρουσίας της γαλεκτίνης 1 σε φυσιολογικό ορό δότη, τα συμπεράσματα που προκύπτουν είναι ότι, πρώτον, επιβεβαιώνεται η παρουσία της γαλεκτίνης 1 στο βιολογικό δείγμα φυσιολογικού δότη, και δεύτερον, τα παραγόμενα αντισώματα αντι – γαλεκτίνης 1, παρουσιάζουν την ειδικότητα και την ευαισθησία που απαιτείται για την ανίχνευση της πρωτεΐνης και μπορούν να αξιοποιηθούν στη πορεία ανάπτυξης της μεθόδου.

3.3 Στάδια εγκαθίδρυσης της μεθόδου sandwich-ELISA

Στην παρακάτω εικόνα, παρουσιάζονται τα βήματα της μεθόδου sandwich-ELISA:



Εικόνα 9. Σχηματική παράσταση και περιγραφή της μεθόδου sandwich-ELISA – A. Στην επιφάνεια του πιάτου ELISA, καθιλώνεται το πολυκλωνικό αντίσωμα αντι – γαλεκτίνης 1 κουνελιού (1^ο αντίσωμα, χρώμα πράσινο). Ακολουθεί επώαση με το υπό εξέταση δείγμα από ορό πλάσματος. B. και C. Αναμένεται η γαλεκτίνη 1 (χρώμα κόκκινο), εφόσον υπάρχει εντός του εξεταζόμενου δείγματος, να συνδεθεί στο 1^ο αντίσωμα. D. Επώαση με το μονοκλωνικό αντίσωμα αντι – γαλεκτίνης 1 ποντικού (2^ο αντίσωμα, χρώμα μαύρο). E. Σύνδεση 2^ο αντισώματος στη

γαλεκτίνη 1, η οποία παγιδύεται μεταξύ δύο πρωτογενών αντισωμάτων (τύπου «σάντουιτς»). **F.** Επώαση με δευτερογενές αντίσωμα έναντι αντισωμάτων του ποντικού, συζευγμένο με ένζυμο (χρησιμοποιήθηκε ραφανιδική υπεροξειδάση). **G.** Προσθήκη υποστρώματος (χρησιμοποιήθηκε OPD). Με μπλε, αναπαριστώνται τα μόρια του υποστρώματος του OPD που αντέδρασαν με το ένζυμο, δίνοντας χρωμογόνο προϊόν στο δείγμα και με χρώμα άσπρο, όσα μόρια δεν αντέδρασαν. **H.** Διακόπτεται η αντίδραση του υποστρώματος με κατάλληλο διάλυμα (H_2O_2) και η δοκιμασία ολοκληρώνεται με φωτομέτρηση του δείγματος.

Για την εύρεση των βέλτιστων συνθηκών της μεθοδολογίας sandwich-ELISA, πραγματοποιήθηκαν τα παρακάτω πειραματικά βήματα ελέγχου:

- Διερευνήθηκαν διαλύματα παρεμπόδισης της μη ειδικής δέσμησης των αντισωμάτων, με σκοπό την εύρεση της βέλτιστης αναλογίας ειδικού σήματος/θορύβου.
- Διερευνήθηκαν οι βέλτιστοι συνδυασμοί συγκέντρωσης των πρωτογενών αντισωμάτων (1^ο και 2^ο αντίσωμα), με σκοπό την αύξηση της ευαισθησίας και ειδικότητας της μεθόδου.
- Ελέγχθηκαν, με στόχο την εύρεση του βέλτιστου συνδυασμού αντισωμάτων, δύο δεύτερα μονοκλωνικά αντισώματα αντι – γαλεκτίνης 1 (του εμπορίου), τα οποία συνδυάστηκαν με το πρώτο πολυκλωνικό αντίσωμα αντι – γαλεκτίνης 1 το οποίο έχει παρασκευαστεί στο εργαστήριο.
- Επιβεβαιώθηκε η ανίχνευση της γαλεκτίνης 1 εντός δείγματος φυσιολογικού ορού, χωρίς να απαιτείται καθαρισμός του.

Έτσι, τα βήματα αυτά, θα μας επέτρεπαν σαν τελικό στόχο, να εφαρμόσουμε τη μέθοδο σε ένα σύνολο παθο – φυσιολογικών δειγμάτων ορού, για την ποσοτικοποίηση των επιπέδων της γαλεκτίνης 1 σε αυτά.

3.3.1 Έλεγχος διαλυμάτων παρεμπόδισης της μη ειδικής δέσμησης.

Για να αποφευχθεί η μη ειδική δέσμηση πρωτεϊνών και αντισωμάτων με την πλαστική επιφάνεια του πιάτου, αλλά και η μη ειδική δέσμηση μεταξύ πρωτεΐνης – αντισώματος, χρησιμοποιήσαμε κατάλληλα ρυθμιστικά διαλύματα που περιέχουν απορρυπαντικά (όπως το Tween 20), και πρωτεΐνες (όπως η BSA και η ζελατίνη), που ανταγωνίζονται τη παθητική προσκόλληση στην

επιφάνεια του πιάτου, χωρίς ωστόσο, να εμπλέκονται στην ειδική διασύνδεση αντιγόνου-αντισώματος.

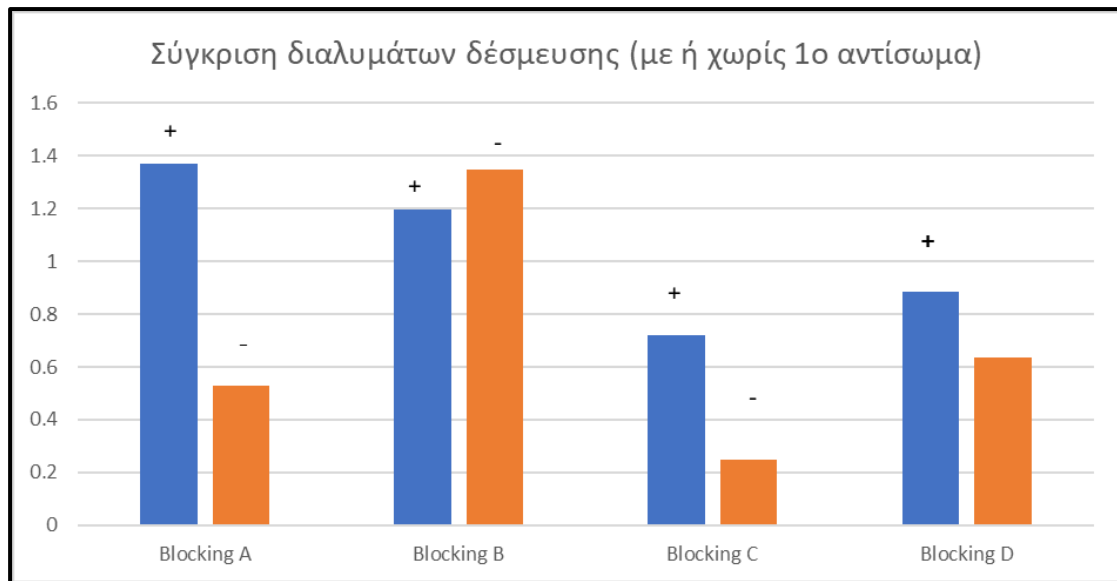
Σε αυτήν την ενότητα, εξετάστηκε η αποτελεσματικότητα των δύο βασικών πρωτεϊνών δέσμευσης, της ζελατίνης (2%) και της BSA (10mg/ml). Οι πρωτεΐνες αυτές, διερευνήθηκαν στη δοκιμασία sandwich-ELISA σε δυο συνθήκες (τεσσάρων παραμέτρων) (Πίνακας 1):

1. παρουσίας και απουσίας 1^{ου} αντισώματος
2. παρουσίας και απουσίας απορρυπαντικού Tween 20

Η πρώτη συνθήκη, θα μας επέτρεπε να ελέγξουμε την μη ειδική δέσμευση μορίων στην επιφάνεια του πιάτου ή/και στο 1^ο αντίσωμα. Ενώ, η δεύτερη συνθήκη, θα φανέρωνε τον βαθμό αποτελεσματικότητας της παγίδευσης των μη ειδικών μορίων παρουσία του απορρυπαντικού Tween 20. Στον Πίνακα 1, παρατίθενται οι συνδυασμοί των διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν και στην Εικόνα 10 τα αποτελέσματα αυτών των συνδυασμών.

Blocking A	Blocking B	Blocking C	Blocking D
1x PBS	1x PBS	1x PBS	1x PBS
2% gelatin	2% gelatin	10mg/ml BSA	10mg/ml BSA
0,05% Tween20	–	0,05% Tween20	–

Πίνακας 1. Πίνακας των διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την παρεμπόδιση της μη ειδικής δέσμευσης (blocking reagents). – **Blocking A και B:** Βασικό αντιδραστήριο των διαλυμάτων A και B, είναι η πρωτεΐνη ζελατίνη (2mg/ml), παρουσίας απορρυπαντικού Tween 20 (Blocking A) και απουσίας απορρυπαντικού Tween 20 (Blocking B). **Blocking C και D:** Βασικό αντιδραστήριο των διαλυμάτων C και D, είναι η πρωτεΐνη BSA, παρουσίας απορρυπαντικού Tween 20 (Blocking C) και απουσίας αυτού (Blocking D).



Εικόνα 10. Σύγκριση διαλυμάτων παρεμπόδισης της μη ειδικής δέσμευσης με ή χωρίς 1^ο αντίσωμα – Μετά από την χρήση των διαλυμάτων δέσμευσης, παρουσιάζονται οι τιμές απορρόφησης, παρουσία 1^{ου} αντισώματος (ένδειξη +, μπλε μπάρες), και οι τιμές απορρόφησης απουσία 1^{ου} αντισώματος, ως μη ειδικό σήμα (ένδειξη -, πορτοκαλί μπάρες).

Σημειώνεται ότι, στη δοκιμασία αυτή, δε χρησιμοποιήθηκαν δείγματα πρωτεΐνης γαλεκτίνης 1, παρά μόνο, ακολουθήθηκαν τα βήματα των επωάσεων των πρωτογενών και δευτερογενών αντισωμάτων.

Από τα αποτελέσματα του γραφήματος της Εικόνας 10, συγκρίνοντας (για τα διαφορετικά διαλύματα) τη διαφορά μεταξύ θετικού σήματος (παρουσία 1^{ου} αντισώματος) και αρνητικού σήματος (απουσία του 1^{ου} αντισώματος στην επιφάνεια του πιάτου ELISA), προκύπτει αρχικά ότι τα διαλύματα που περιέχουν απορρυπαντικό (Tween 20) εμφανίζουν υψηλότερη ικανότητα παρεμπόδισης της μη ειδικής δέσμευσης (Blocking A και C). Συγκρίνοντας μεταξύ τους τα διαλύματα A και C, παρατηρούμε ότι το διάλυμα A, που περιείχε ως βασικό αντιδραστήριο τη ζελατίνη, δίνει υψηλότερες τιμές απορρόφησης (τόσο για το θετικό, όσο και για το αρνητικό δείγμα) σε σχέση με το διάλυμα C.

Πράγματι, στις ακόλουθες επαναλήψεις της δοκιμασίας, συγκρίνοντας τον θόρυβο της μεθόδου στα δύο διαφορετικά διαλύματα (A και C), παρατηρήθηκαν υψηλότερες τιμές απορρόφησης στο διάλυμα της ζελατίνης (Εικόνα 11).

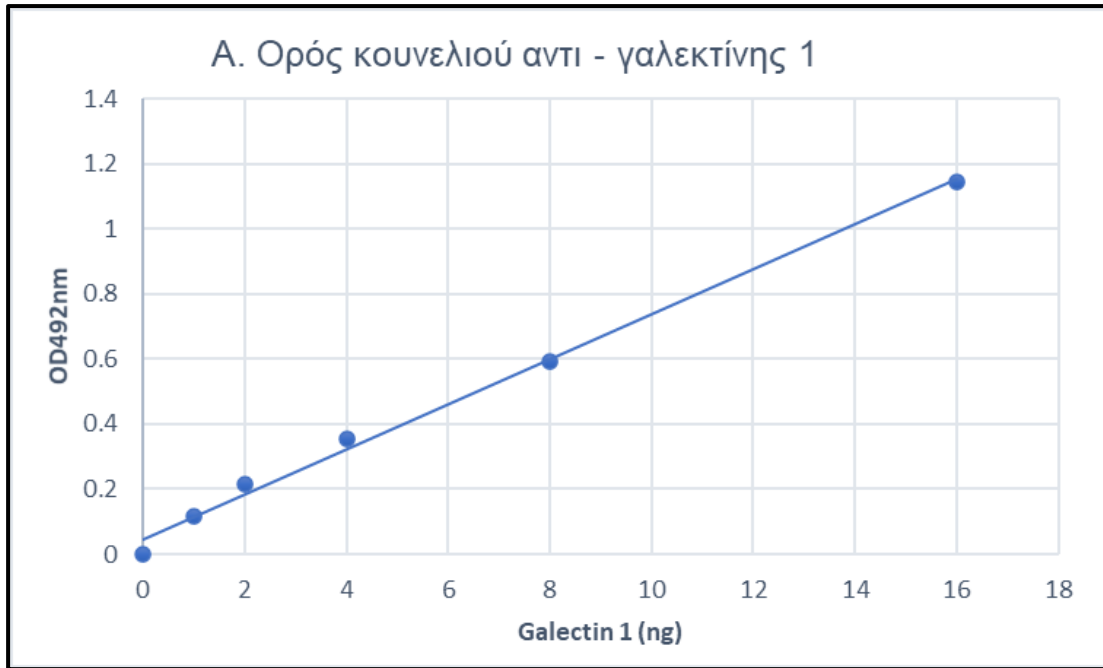
Τιμές απορροφήσεων σε δείγμα 0ng γαλεκτίνης 1 (σε διάλυμα δέσμευσης ζελατίνης – Tween 20)	Τιμές απορροφήσεων σε δείγμα 0ng γαλεκτίνης 1 (σε διάλυμα δέσμευσης BSA – Tween 20)
0.8179	0.2906
0.9665	0.2156
0.9301	0.2428
0.8163	0.321
0.8415	0.2239
0.7978	0.3624
0.6986	0.321

Εικόνα 11. Διαφορές απορροφήσεων σε δείγμα 0ng γαλεκτίνης 1, μετά από χρήση διαλύματος δέσμευσης με ζελατίνη – Tween 20 (πρώτη στήλη) και διαλύματος δέσμευσης με BSA – Tween 20 (δεύτερη στήλη).

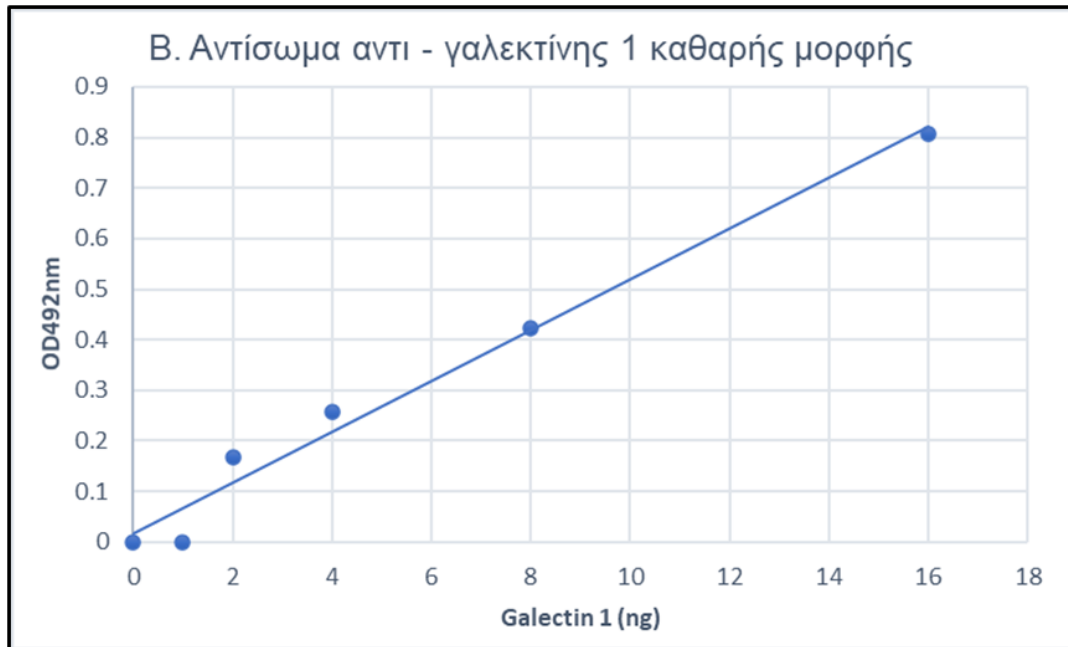
Για τον λόγο αυτό, η πρωτεΐνη BSA, χρησιμοποιήθηκε ως βασικό αντιδραστήριο στο διάλυμα δέσμευσης για τα υπόλοιπα πειράματα της μεθόδου.

3.3.2 Έλεγχος ευαισθησίας πρωτογενών αντισωμάτων αντί – γαλεκτίνης 1

Προκειμένου να διερευνηθεί η ευαισθησία των παραγόμενων αντισωμάτων αντι – γαλεκτίνης 1, πραγματοποιήθηκε sandwich-ELISA (όπως περιγράφεται στην Εικόνα 9), με δύο σειρές τιτλοποίησης, όπου χρησιμοποιήθηκαν ως πρωτογενή αντισώματα, στη πρώτη σειρά ο ορός του κουνελιού αντι – γαλεκτίνης 1 και στη δεύτερη σειρά το αντίσωμα αντι – γαλεκτίνης 1 καθαρής μορφής, με την ιδανική αραίωση και για τα δύο αντισώματα να είναι 1:100. Σε κάθε περίπτωση, χρησιμοποιήθηκαν διαδοχικά αυξανόμενες συγκεντρώσεις καθαρής γαλεκτίνης 1 (0ng, 1ng, 10ng, 50ng). Σε επόμενες επαναλήψεις του πειράματος, σταδιακά, χρησιμοποιήθηκαν χαμηλότερες συγκεντρώσεις γαλεκτίνης 1, μέχρις ότου εντοπιστούν τα χαμηλότερα όρια ανίχνευσης της μεθόδου. Τα αποτελέσματα από τη σύγκριση της ευαισθησίας των δύο αντισωμάτων παρουσιάζονται στις Εικόνες 12 και 13, μέσα από τις καμπύλες αναφοράς τους.



Εικόνα 12. Καμπύλη αναφοράς για τον έλεγχο της ευαισθησίας των αντισωμάτων αντι – γαλεκτίνης 1 από ορό κουνελιού (1^ο αντίσωμα 1:100). Οι κουκίδες αντιστοιχούν σε ποσότητα καθαρής γαλεκτίνης 1: 0ng, 1ng, 2ng, 4ng, 8ng και 16ng. Ως 2^ο αντίσωμα, χρησιμοποιήθηκε το μονοκλωνικό αντίσωμα αντι – γαλεκτίνης 1 ποντικού (1:500) και για την ανίχνευση, χρησιμοποιήθηκε δευτερογενές αντίσωμα έναντι αντισωμάτων ποντικού (1:200).



Εικόνα 13. Καμπύλη αναφοράς για τον έλεγχο της ευαισθησίας των καθαρισμένων αντισωμάτων αντι – γαλεκτίνης 1 (1^ο αντίσωμα 1:100) – Οι κουκίδες αντιστοιχούν σε ποσότητα καθαρής γαλεκτίνης 1: 0ng, 1ng, 2ng, 4ng, 8ng και 16ng. Οι συνθήκες των αντισωμάτων, είναι οι ίδιες που χρησιμοποιήθηκαν και στην Εικόνα 12.

Όπως φαίνεται και στις δύο αυτές εικόνες, η ευαισθησία της μεθόδου ως προς την ανίχνευση της καθαρής γαλεκτίνης 1, έφτανε τα 1-2ng, με την γραμμικότητα της καμπύλης αναφοράς να είναι πολύ ικανοποιητική. Εφόσον δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο αντισωμάτων, ως πρωτογενές αντίσωμα, για τη συνέχεια των πειραμάτων, επιλέχθηκε ο ορός του κουνελιού αντι – γαλεκτίνης 1, και όχι τα καθαρισμένα αντισώματα, για λόγους οικονομίας χρόνου και αντισώματος.

3.3.3 Σύγκριση μεταξύ διαφορετικών αντισωμάτων έναντι της γαλεκτίνης 1

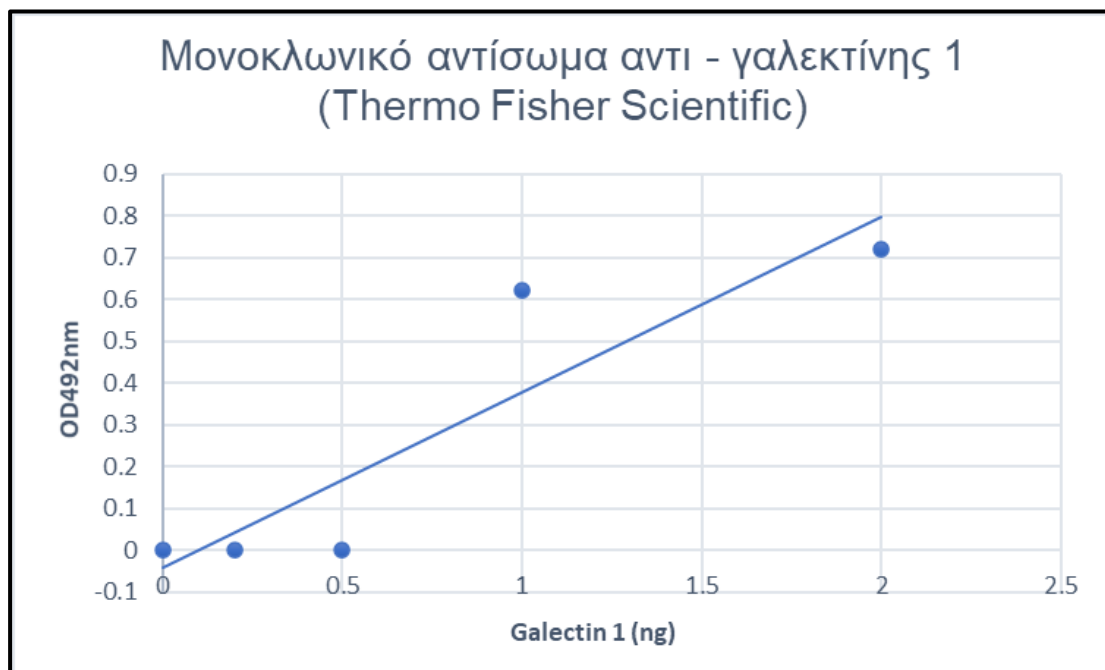
Η τεχνική της sandwich-ELISA, απαιτεί τη χρήση δυο πρωτογενών αντισωμάτων (ενός 1^{ου} και ενός 2^{ου}), όπου το 1^ο θα «παγιδεύσει» την πρωτεΐνη στην πλαστική επιφάνεια των πιάτων ELISA, ενώ, το 2^ο, θα δεσμευθεί σε άλλους επιτόπους της πρωτεΐνης και θα επιτρέψει την ποσοτικοποίηση της, με συμπληρωματική χρήση κατάλληλου δευτερογενούς αντισώματος. Το «ταίριασμα» μεταξύ του 1^{ου} και του 2^{ου} αντισώματος, πρέπει να είναι τέτοιο ώστε να μην αλληλοεπικαλύπτονται οι θέσεις του ενός με του άλλου, προκειμένου να μην αναγνωρίσουν τους ίδιους επιτόπους της υπό ανάλυσης πρωτεΐνης. Αυτό, επιτυγχάνεται⁵²:

- με χρήση δυο μονοκλωνικών αντισωμάτων (με την προϋπόθεση ότι θα αναγνωρίζουν διαφορετικούς επιτόπους στην πρωτεΐνη),
- με χρήση δύο πολυκλωνικών αντισωμάτων (που θα αναγνωρίζουν διαφορετικούς επιτόπους στην ίδια πρωτεΐνη), ή
- με έναν συνδυασμό πολυκλωνικού αντισώματος με μονοκλωνικό αντίσωμα, όπου το μονοκλωνικό θα πρέπει να αναγνωρίζει ξεχωριστό επίτοπο σε σχέση με τα πολυκλωνικά.

Τα αντισώματα που παράχθηκαν στο εργαστήριο μας, έναντι της γαλεκτίνης 1, είναι πολυκλωνικά κουνελιού και χρησιμοποιήθηκαν ως 1^ο αντίσωμα (για την «παγίδευση» της γαλεκτίνης 1 στο πιάτο). Το 2^ο αντίσωμα, κατά κανόνα, παράγεται σε είδος διαφορετικό από το 1^ο, για να αποφευχθεί η διασταυρωτή αντίδραση (cross reactivity).

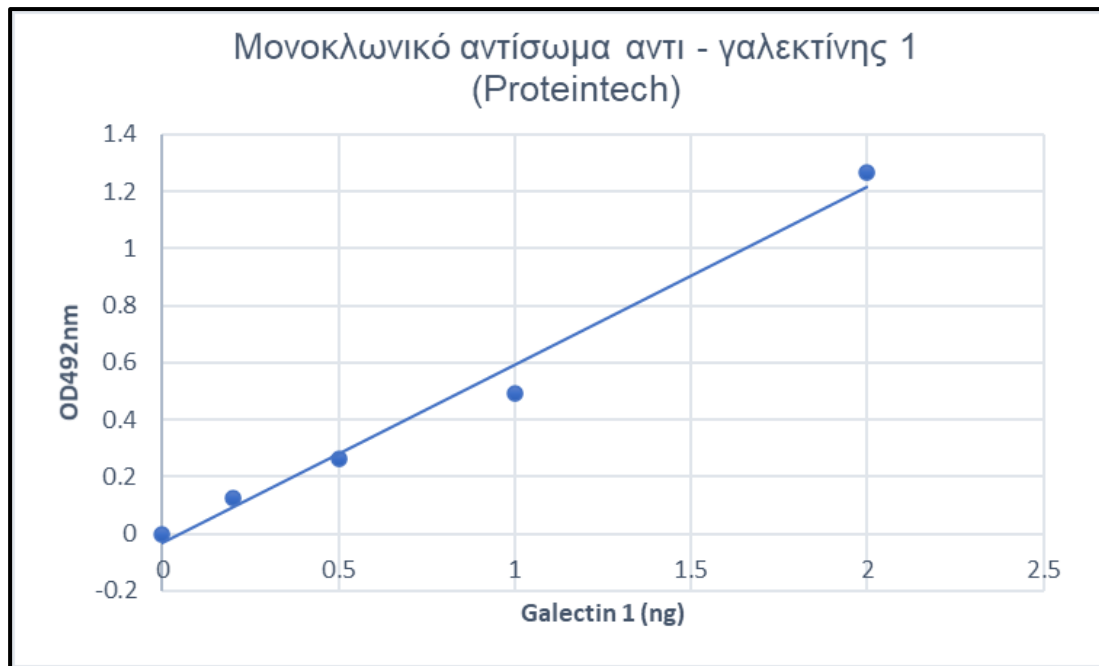
Αρχικά, δοκιμάσαμε μονοκλωνικό αντίσωμα αντι – γαλεκτίνης 1 παραγόμενο σε ορό ποντικού (εταιρείας Thermo Fisher Scientific). Χρησιμοποιήθηκαν συγκεντρώσεις καθαρής γαλεκτίνης 1, από 0,2 έως 2ng

(0ng, 0,2ng, 0,5ng, 1ng και 2ng). Ωστόσο, δε παρουσίασε καλή γραμμικότητα στις χαμηλές συγκεντρώσεις της καθαρής γαλεκτίνης 1 (<1ng) (Εικόνα 14).



Εικόνα 14. Ευαισθησία του μονοκλωνικού αντισώματος αντι - γαλεκτίνης 1 ποντικού (Thermo Fisher Scientific), που χρησιμοποιήθηκε ως 2^ο αντίσωμα. - Ως 1^ο αντίσωμα, χρησιμοποιήθηκε ορός κουνελιού αντι - γαλεκτίνης 1 (1:100). Οι κοκίδες αντιστοιχούν σε ποσότητες καθαρής γαλεκτίνης 1: 0ng, 0,2ng, 0,5ng, 1ng, και 2ng. Ως 2^ο αντίσωμα, χρησιμοποιήθηκε το μονοκλωνικό αντίσωμα αντι - γαλεκτίνης 1 ποντικού της Thermo Fisher Scientific (1:500). Για την ανίχνευση, χρησιμοποιήθηκε δευτερογενές αντίσωμα έναντι αντισωμάτων ποντικού σε αραιώση (1:200).

Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε έτερο μονοκλωνικό αντίσωμα αντι - γαλεκτίνης 1, επίσης παραγόμενο σε ορό ποντικού (εταιρείας Proteintech). Η ιδανική αραιώση για το συγκεκριμένο μονοκλωνικό αντίσωμα αντι - γαλεκτίνης 1, ήταν 1:500 και το αποτέλεσμα της ευαισθησίας και της γραμμικότητας αυτού του αντισώματος, παρουσιάζεται στην Εικόνα 15, μέσω της καμπύλης αναφοράς του.



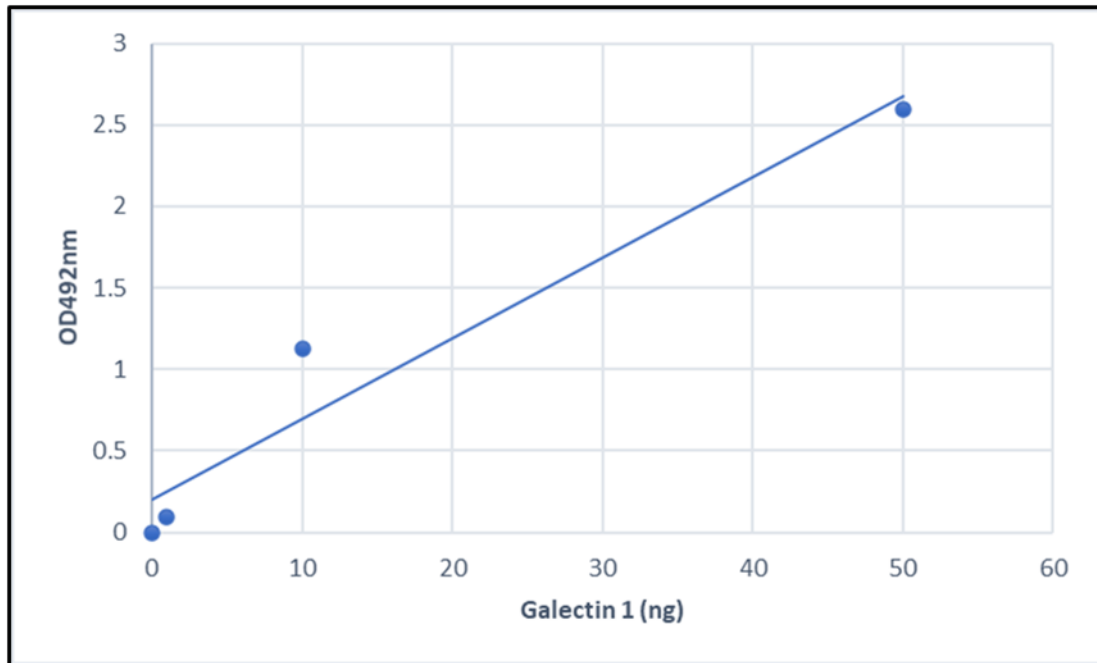
Εικόνα 15. Ευαισθησία του μονοκλωνικού αντισώματος αντι – γαλεκτίνης 1 ποντικού (Proteintech), που χρησιμοποιήθηκε ως 2^ο αντίσωμα. – Ως 1^ο αντίσωμα, χρησιμοποιήθηκε ορός κουνελιού αντι – γαλεκτίνης 1 (1:100). Οι κουκίδες αντιστοιχούν σε ποσότητες καθαρής γαλεκτίνης 1: 0ng, 0,2ng, 0,5ng, 1ng, και 2ng. Ως 2^ο αντίσωμα, χρησιμοποιήθηκε το μονοκλωνικό αντίσωμα αντι – γαλεκτίνης 1 ποντικού της Proteintech (1:500). Ως δευτερογενές, χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα έναντι αντισωμάτων ποντικού σε αραιώση (1:200).

Με βάση την Εικόνα 15, το μονοκλωνικό αντίσωμα αντι – γαλεκτίνης-1 της Proteintech, ανταποκρίθηκε καλύτερα ως 2^ο αντίσωμα σε πολύ χαμηλότερα όρια ανίχνευσης της καθαρής γαλεκτίνης 1 (0-2 ng), και επιλέχθηκε για τα επόμενα πειράματα της μελέτης αυτής.

3.3.4 Όρια ανίχνευσης της μεθόδου

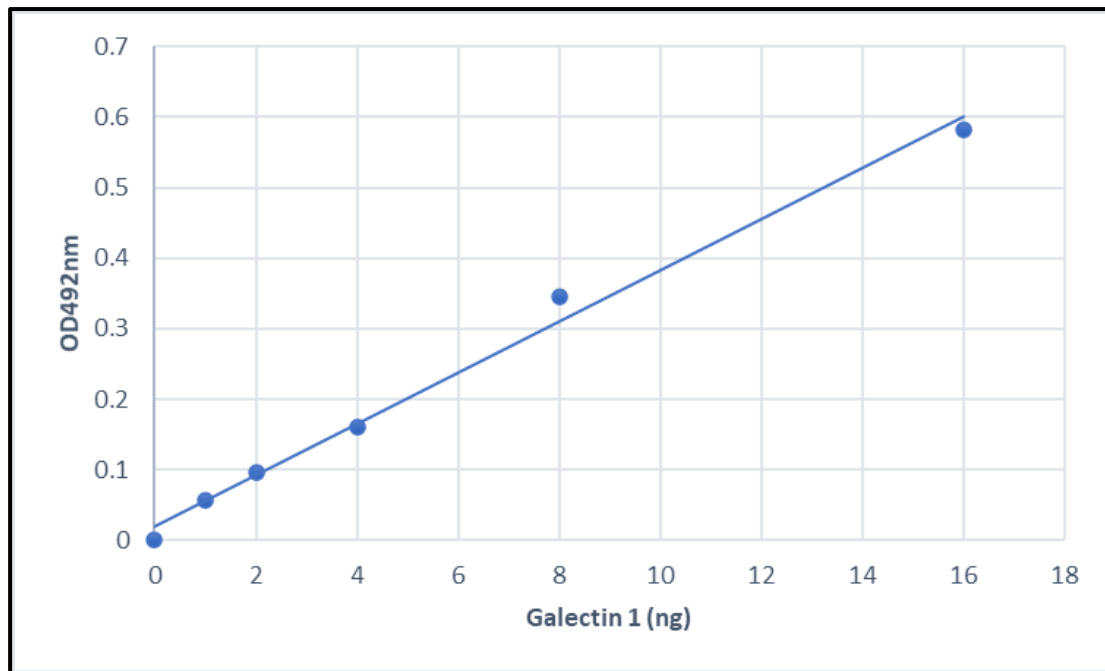
Η ενότητα αυτή, παρουσιάζει την ευαισθησία της τεχνικής sandwich-ELISA, όπου χρησιμοποιήθηκαν συγκεντρώσεις καθαρής πρωτεΐνης γαλεκτίνης 1, που βαθμιαία ελαττώνονταν για να καθοριστούν τα χαμηλότερα όρια ανίχνευσης της μεθόδου.

Αρχικά, ξεκινήσαμε σε συγκεντρώσεις καθαρής γαλεκτίνης 1, από 1 έως 50ng (0ng, 1ng, 10ng και 50ng) (Εικόνα 16).



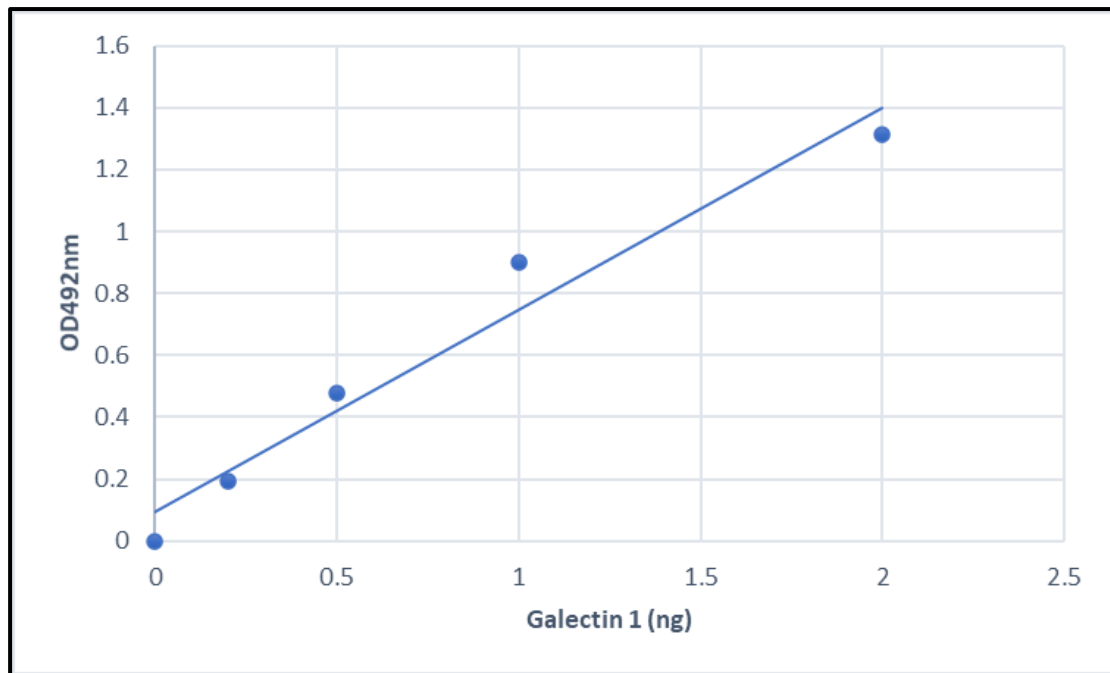
Εικόνα 16. Εναισθησία μεθόδου (από 0 έως 50ng καθαρής γαλεκτίνης 1) – Χρησιμοποιήθηκε ως 1^ο, το πολυκλωνικό αντίσωμα αντι – γαλεκτίνης 1 από ορό κουνελιού (1:100). Οι κουκίδες αντιστοιχούν σε ποσότητες καθαρής γαλεκτίνης 1: 0ng, 1ng, 10ng και 50ng. Ως 2^ο αντίσωμα, χρησιμοποιήθηκε μονοκλωνικό αντίσωμα αντι – γαλεκτίνης 1 από ορό ποντικού (1:500) και για την ανίχνευση, ως δευτερογενές, χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα έναντι αντισωμάτων ποντικού, συζευγμένο με ραφανιδική υπεροξειδάση (1:200). Παρατηρούνται οι υψηλές απορροφήσεις της καθαρής γαλεκτίνης 1, στις συγκεκριμένες συγκεντρώσεις της.

Με βάση τις καμπύλες αναφοράς που λαμβάναμε σε κάθε δοκιμασία, στοχεύαμε σε περαιτέρω μείωση των συγκεντρώσεων της καθαρής γαλεκτίνης 1, με μέγιστη τιμή αυτή τη φορά, τα 16ng καθαρής γαλεκτίνης 1 (0ng, 1ng, 2ng, 4ng, 8ng και 16ng).



Εικόνα 17. Ευαισθησία μεθόδου (από 0 έως 16ng καθαρής γαλεκτίνης 1) – Χρησιμοποιήθηκε ως 1^ο, το πολυκλωνικό αντίσωμα αντι – γαλεκτίνης 1 από ορό κουνελιού (1:100). Οι κουκίδες αντιστοιχούν σε ποσότητες καθαρής γαλεκτίνης 1: 0ng, 1ng, 2ng, 4ng, 8ng και 16ng. Ως 2^ο αντίσωμα, χρησιμοποιήθηκε μονοκλωνικό αντίσωμα αντι – γαλεκτίνης 1 από ορό ποντικού (1:500) και για την ανίχνευση, χρησιμοποιήθηκε δευτερογενές αντίσωμα έναντι αντισωμάτων ποντικού, συζευγμένο με ραφανιδική υπεροξειδάση (1:200).

Χαμηλώνοντας περαιτέρω τις συγκεντρώσεις της καθαρής γαλεκτίνης 1 με τιμή έως τα 2ng (0ng, 0,2ng, 0,5ng, 1ng και 2ng) για τον καθορισμό του ελάχιστου ορίου ανίχνευσης της καθαρής πρωτεΐνης, παρατηρήθηκε ικανή απόδοση ευαισθησίας στις αντίστοιχες τιμές αυτών των συγκεντρώσεων (Εικόνα 18).



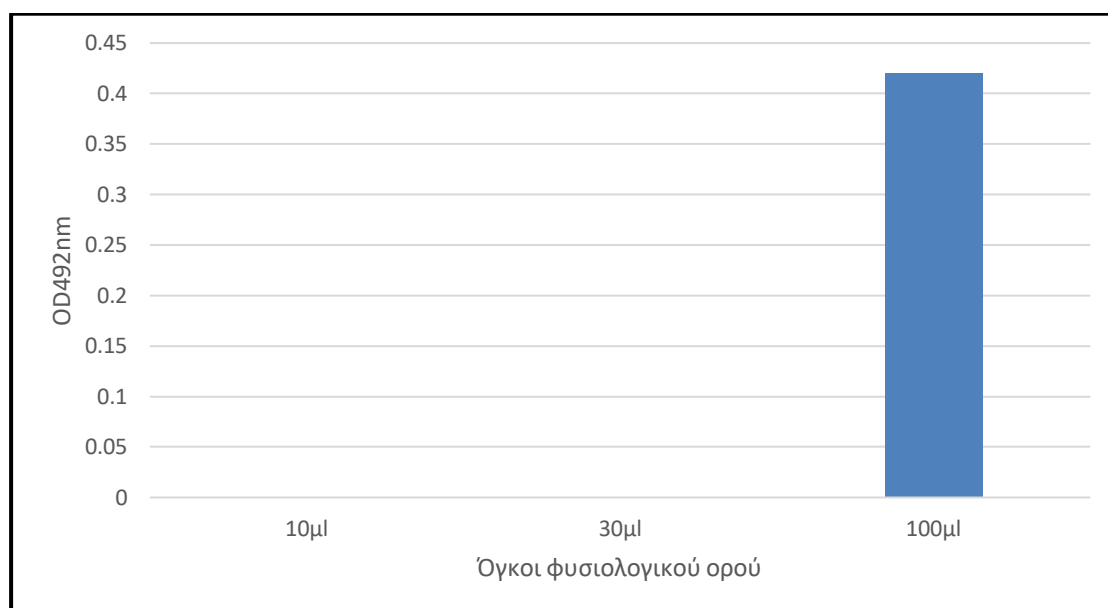
Εικόνα 18. Ευαισθησία μεθόδου (από 0ng έως 2ng καθαρής γαλεκτίνης 1) – Χρησιμοποιήθηκε ως 1^ο, το πολυκλωνικό αντίσωμα αντι – γαλεκτίνης 1 από ορό κουνελιού (1:100). Οι κουκίδες αντιστοιχούν σε ποσότητες καθαρής γαλεκτίνης 1: 0ng, 0,2ng, 0,5ng, 1ng και 2ng. Ως 2^ο αντίσωμα, χρησιμοποιήθηκε μονοκλωνικό αντίσωμα αντι – γαλεκτίνης 1 από ορό ποντικού (1:500) και για την ανίχνευση, χρησιμοποιήθηκε δευτερογενές αντίσωμα έναντι αντισωμάτων ποντικού, συζευγμένο με ραφανιδική υπεροξειδάση (1:200).

Με βάση τα παραπάνω, τα όρια ανίχνευσης της καθαρής γαλεκτίνης 1, έφταναν υψηλή ευαισθησία που συνέφεραν απόλυτα τους σκοπούς της παρούσας μελέτης αλλά και την ίδια την μέθοδο. Επειδή οι αρχικές δοκιμές της μεθόδου αφορούσαν καθαρή πρωτεΐνη γαλεκτίνη 1, και λαμβάνοντας υπόψιν ότι η τελική δοκιμασία της μεθόδου θα πραγματοποιηθεί σε δείγματα από ορού υγιών δοτών και ασθενών, ιδανική καμπύλη αναφοράς για την σωστή έκβαση των πειραμάτων αποτέλεσαν οι συγκεντρώσεις των 0-16ng (Εικόνα 17).

3.3.5 Δοκιμασία ανίχνευσης της γαλεκτίνης 1 σε δείγμα φυσιολογικού ορού

Σκοπός αυτής της ενότητα ήταν να εξεταστεί κατά πόσο θα ήταν δυνατή η ανίχνευση της γαλεκτίνης 1 σε βιολογικό δείγμα ορού, αλλά και ποιος είναι ο ελάχιστος όγκος δείγματος ορού που απαιτείται για την ανίχνευση.

Για το σκοπό αυτό ελέγχθηκαν οι ποσότητες δείγματος ορού 10μl, 30μl και 100μl, που προέρχονταν από τον ίδιο δότη και τα αποτελέσματα από τη δοκιμασία, παρουσιάζονται στην Εικόνα 19.



Εικόνα 19. Επιβεβαίωση ανίχνευσης της γαλεκτίνης 1 σε όγκους δείγματος φυσιολογικού ορού (ίδιου δότη) – Σε πιάτο ELISA, καθηλώθηκε ως 1^ο αντίσωμα, το πολυκλωνικό αντίσωμα αντι – γαλεκτίνης 1 από τον ορό κουνελιού (1:100). Ακολούθησε επώαση με τους όγκους του δείγματος φυσιολογικού ορού (10μl, 30μl και 100μl) και ύστερα, επώαση με το 2^ο μονοκλωνικό αντίσωμα αντι – γαλεκτίνης 1 από ορό ποντικού (1:500). Για την ανίχνευση, χρησιμοποιήθηκε δευτερογενές αντίσωμα έναντι των αντισωμάτων του ποντικού συζευγμένο με ραφανιδική υπεροξειδάση (1:200). Παρατηρείται ότι, σε όγκο 100μl δείγματος φυσιολογικού ορού λαμβάνεται απορρόφηση ανίχνευσης της πρωτεΐνης ($OD_{492} \approx 0.4$).

Με βάση το γράφημα στην Εικόνα 19, με τη μέθοδο της sandwich-ELISA, επιβεβαιώνεται η ανίχνευση της πρωτεΐνης, η οποία παρατηρείται στα 100μl δείγματος φυσιολογικού ορού, καθώς λαμβάνεται σχετική απορρόφηση ($OD_{492} \approx 0.4$). Ο όγκος αυτός, αποτελεί τον ελάχιστο απαιτούμενο όγκο, προκειμένου να είναι μετρήσιμη η γαλεκτίνη 1 και χωρίς να χρειαστεί καθαρισμός του βιολογικού δείγματος, υποδηλώνοντας την ευκολία της μεθόδου στη διαχείριση των βιολογικών δειγμάτων.

3.4 Ποσοτικός προσδιορισμός των επιπέδων της γαλεκτίνης 1 σε παθο – φυσιολογικά δείγματα ορού

Η μέθοδος sandwich-ELISA, εφαρμόστηκε σε σύνολο 54 δειγμάτων, εκ των οποίων, τα 9 ήταν δείγματα από ορό πλάσματος υγιών δοτών και τα υπόλοιπα 45 δείγματα, ήταν από ασθενείς με διάφορες καρκινοπάθειες και οι οποίοι εισήχθησαν στο χειρουργείο μετά από ανάπτυξη φλεβικών θρομβώσεων. Ο στόχος μας στην ενότητα αυτή ήταν ο ποσοτικός προσδιορισμός των επιπέδων της γαλεκτίνης 1 στα δείγματα των ασθενών, και σε μελλοντική φάση ο συσχετισμός των αυξημένων επιπέδων γαλεκτίνης-1 με την βαρύτητα και την πρόγνωση της νόσου.

Η δοκιμασία, έλαβε χώρα όπως περιγράφεται στην Ενότητα 2.5, όπου κάθε εξεταζόμενο δείγμα ορού χρησιμοποιήθηκε σε όγκο 500μl και το κάθε δείγμα μετρήθηκε 3 φορές. Τα αποτελέσματα των δειγμάτων, μοιράστηκαν σε 3 γραφήματα (Εικόνα 20, 21 και 22) και κάθε γράφημα φέρει 3 δείγματα από ορό υγιών ατόμων (C) και 15 δείγματα από ορό ασθενών με καρκίνο και παράλληλη παρουσία φλεβικών θρομβώσεων (SD).

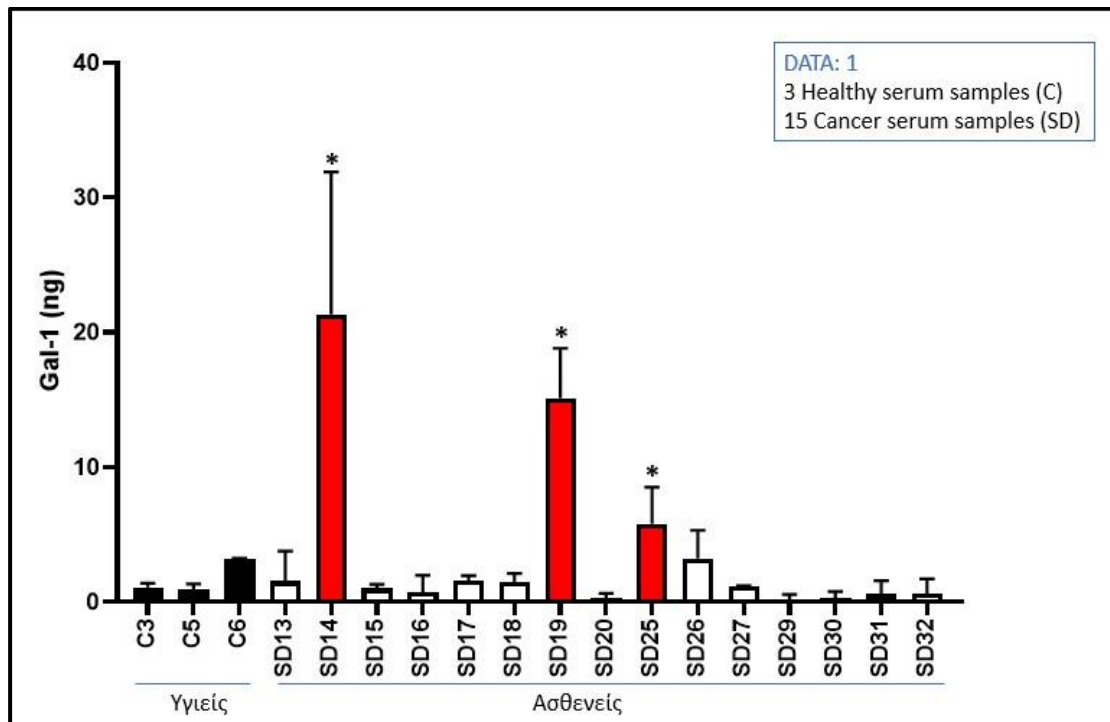
Αναφορικά με τα 45 δείγματα των ασθενών, τρία ήταν αυτά που έφεραν υψηλά ποσά γαλεκτίνης 1 στον ορό τους (Εικόνα 20). Συγκεκριμένα, οι τιμές της γαλεκτίνης 1 που λήφθηκαν για αυτούς τους τρεις ασθενείς ήταν οι εξής:

- SD14: 21,33ng/ml
- SD19: 15,13ng/ml
- SD25: 5,81ng/ml

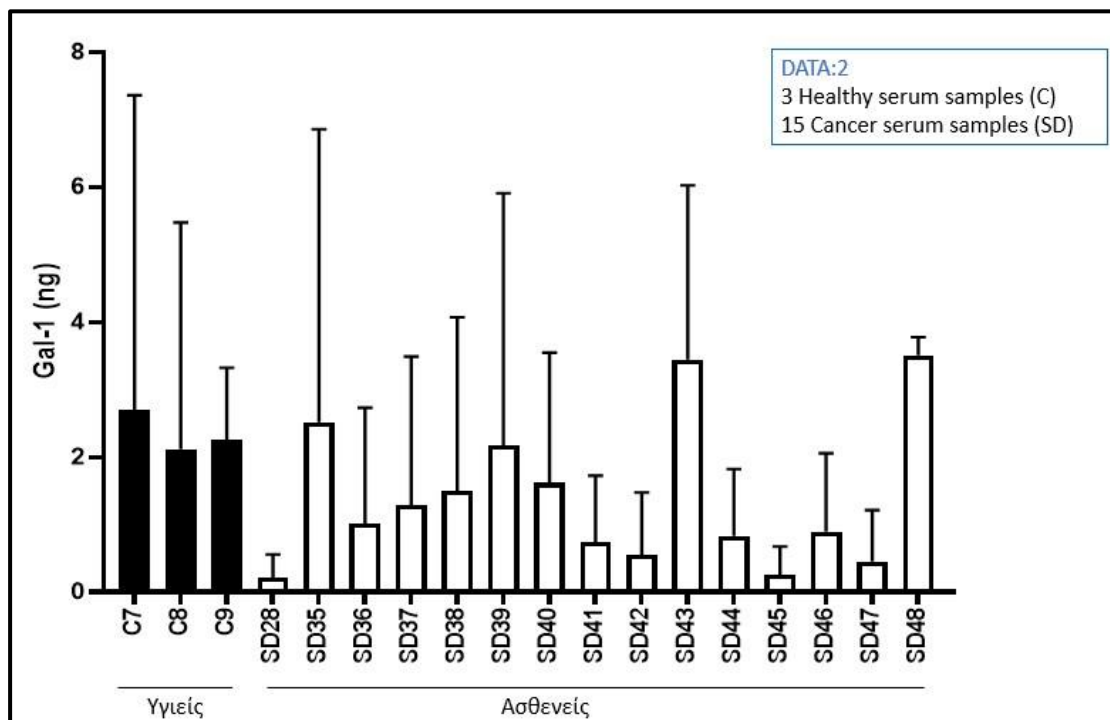
Αξίζει να αναφερθεί ότι, οι παραπάνω τιμές της γαλεκτίνης 1, είναι σε συμφωνία με άλλες μελέτες ποσοτικοποίησης των επιπέδων της πρωτεΐνης σε ασθενείς^{53,54}, γεγονός που υποδηλώνει την αξιοπιστία της μεθόδου, όσον αφορά την μέτρηση δειγμάτων ορού. Ωστόσο, επειδή ο αριθμός των δειγμάτων που παρουσίασαν αυξημένα επίπεδα γαλεκτίνης 1, είναι μικρός (μόνο τρία), με τα υπόλοιπα 42 δείγματα να μην έχουν στατιστικά σημαντική διαφορά από τους υγιείς, δεν είναι δυνατό, στη φάση αυτή, να βγουν ασφαλή συμπεράσματα ως προς την κλινική αξιολόγηση των αποτελεσμάτων μας.

Στο πείραμα της Εικόνας 21, υπάρχει μεγάλο εύρος σφάλματος σε πολλά από τα δείγματα, που πιθανότατα να οφείλεται σε αλλοίωση των δειγμάτων, λόγω μεγάλου χρονικού διαστήματος παραμονής στο εργαστήριο, ή σε τυπικό πειραματικό σφάλμα της δοκιμασίας, με τα αποτελέσματα του, να

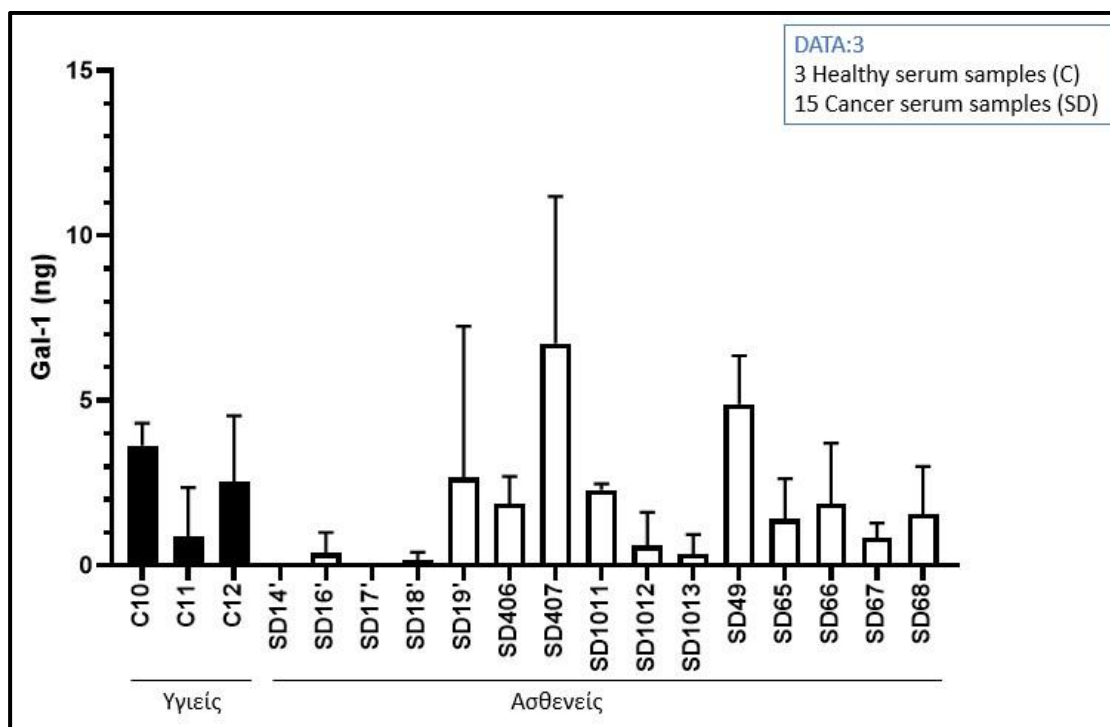
μην μπορούν να αξιολογηθούν σωστά. Δυστυχώς, λόγω του περιορισμένου όγκου δείγματος ασθενών, δεν ήταν δυνατή η επανάληψη της μεθόδου στα δείγματα αυτά, ώστε να προκύψουν τιμές με μικρότερες διακυμάνσεις.



Εικόνα 20. Αποτελέσματα από τη μέτρηση 18 δειγμάτων με τη μέθοδο sandwich-ELISA. – Οι μαύρες μπάρες (τρεις), αποτελούν δείγματα ορού υγιών dotών. Οι υπόλοιπες 15 μπάρες, αποτελούν δείγματα ορού ασθενών. Παρατηρείται ότι σε σύνολο 15 ασθενών, οι 3 εμφάνισαν υψηλά επίπεδα γαλεκτίνης 1 (κόκκινες μπάρες).



Εικόνα 21. Αποτελέσματα από τη μέτρηση 18 δειγμάτων με τη μέθοδο sandwich ELISA. – Οι μαύρες μπάρες (τρεις), αποτελούν δείγματα ορού υγιών δοτών. Οι άσπρες μπάρες (δεκαπέντε), αποτελούν δείγματα ορού ασθενών. Παρατηρείται μεγάλο εύρος σφάλματος.



Εικόνα 22. Αποτελέσματα από τη μέτρηση 18 δειγμάτων με τη μέθοδο sandwich-ELISA. – Οι μαύρες μπάρες (τρεις), αποτελούν δείγματα ορού υγιών δοτών. Οι άσπρες μπάρες (δεκαπέντε), αποτελούν δείγματα ορού ασθενών. Σε αυτούς τους ασθενείς, κανείς τους δεν εμφάνισε αυξημένα ποσά γαλεκτίνης 1.

Συμπερασματικά, η μέθοδος της sandwich ELISA που εγκαθιδρύθηκε στη παρούσα μελέτη έχει την ευαισθησία που απαιτείται ώστε να ανιχνεύει τα επίπεδα της γαλεκτίνης 1 σε δείγματα ασθενών, γεγονός που αναμένεται να επιτρέψει στο μέλλον τη διερεύνηση της διαγνωστικής και προγνωστικής σημασίας της μεθόδου σε ασθενείς με καρκίνο ή/και καρδιαγγειακά νοσήματα. Επιπλέον, θα ήταν σημαντικό η μέθοδος να εφαρμοστεί σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων, τόσο για την επιβεβαίωση της αύξησης των επιπέδων της γαλεκτίνης σε δείγματα ασθενών, όσο και για να προκύψουν σαφή συμπεράσματα σχετικά με τη διαγνωστική και προγνωστική αξία των επιπέδων της πρωτεΐνης αυτής, στις θρομβώσεις που παρατηρούνται σε συγκεκριμένες καρκινοπάθειες.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας, ήταν η εγκαθίδρυση μεθοδολογίας sandwich-ELISA, που θα αποσκοπούσε στον ποσοτικό προσδιορισμό των επιπέδων της γαλεκτίνης 1, σε ένα σύνολο παθο – φυσιολογικών δειγμάτων από ορό πλάσματος. Τα παθολογικά δείγματα αφορούσαν ασθενείς με καρκίνο (διαφορετικών τύπων καρκίνου και σε διαφορετικά στάδια ύπαρξης του), των οποίων κοινό γνώρισμα ήταν ότι είχαν αναπτύξει φλεβικές θρομβώσεις, ως συνέπεια της καρκινοπάθειας.

Πολυκλωνικά αντισώματα αντι – γαλεκτίνης 1, που αναπτύχθηκαν σε κουνέλια σε προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου, καθώς και καθαρή πρωτεΐνη γαλεκτίνη 1, αποτέλεσαν τα βασικά μοριακά εργαλεία εγκαθίδρυσης της μεθόδου. Ειδικότερα, στη παρούσα εργασία, επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη της γαλεκτίνης 1 σε δείγματα ορού, με τεχνική χρωματογραφίας συγγένειας μέσω συστήματος πρωτεΐνης A, χρησιμοποιώντας ως εξεταζόμενο δείγμα, ορό υγιούς δότη και ελέγχοντας παράλληλα την ειδικότητα των παραγόμενων πολυκλωνικών αντισωμάτων αντι – γαλεκτίνης 1, με τα οποία και έγινε εφικτή η ανίχνευση της πρωτεΐνης.

Σε επόμενο στάδιο και για να μπορέσουμε να προσδιορίσουμε ποσοτικά τα επίπεδα της γαλεκτίνης 1 στον ορό των ασθενών με τη μέθοδο της sandwich-ELISA, προβήκαμε σε συγκεκριμένες δοκιμασίες, με στόχο την εύρεση και την επιλογή των βέλτιστων συνθηκών πραγματοποίησης της. Για τον περιορισμό της μη ειδικής σύνδεσης, τόσο επάνω στο 1^ο αντίσωμα της μεθόδου, όσο και στην επιφάνεια των πιάτων ELISA (όταν δεν προηγείται επώαση με πρωτογενές αντίσωμα), παρατηρήθηκε πως, ενώ και τα δυο βασικά αντιδραστήρια (BSA και ζελατίνη), παρουσία απορρυπαντικού (Tween 20), είναι αποτελεσματικά στην παρεμπόδιση της μη ειδικής δέσμευσης, η προσθήκη διαλύματος BSA, επέφερε χαμηλότερες τιμές θορύβου, σε σύγκριση με διάλυμα δέσμευσης που εμπειρείχε τη ζελατίνη, και για τον λόγο αυτόν, χρησιμοποιήθηκε η BSA για τις δοκιμασίες της μεθόδου.

Βασικό κριτήριο για την επίτευξη της βέλτιστης απόδοσης της μεθόδου, ήταν η επιλογή των αντισωμάτων που θα χρησιμοποιηθούν. Η ευαισθησία των παραγόμενων πολυκλωνικών αντισωμάτων αντι – γαλεκτίνης 1, δοκιμάστηκε τόσο από τον ορό του κουνελιού όσο και σε καθαρή μορφή. Παρόλο που η διαδικασία απομόνωσης και καθαρισμού των πολυκλωνικών αντισωμάτων αντι

– γαλεκτίνης 1, που πραγματοποιήθηκε στη παρούσα μελέτη, ήταν επιτυχής, τα καθαρισμένα αντισώματα, φανέρωσαν σχεδόν παρόμοια ευαισθησία με τα αντισώματα αντι – γαλεκτίνης 1 του κουνελιού. Εφόσον, η διαφορά μεταξύ τους δεν ήταν σημαντική, η πορεία ανάπτυξης της μεθόδου, συνεχίστηκε χρησιμοποιώντας ως πρωτογενές αντίσωμα, τον ορό κουνελιού αντι – γαλεκτίνης 1, και όχι τα καθαρισμένα αντισώματα, για λόγους εξοικονόμησης χρόνου αλλά και κατανάλωσης αντισώματος.

Όπως αναφέρθηκε, το 1^ο αντίσωμα της τεχνικής, είναι πολυκλωνικό έναντι της γαλεκτίνης 1. Η επιλογή ενός μονοκλωνικού αντισώματος έναντι της συγκεκριμένης πρωτεΐνης, ως 2^ο αντίσωμα, θα εξυπηρετούσε την απόλυτη εξειδίκευση αναγνώρισης του αντιγόνου για το οποίο παράχθηκε και θα μείωνε την μη ειδική αναγνώριση με πρωτεΐνες παρόμοιας συγγένειας. Για τον σκοπό αυτόν, ελέγχθηκαν, με στόχο την εύρεση του βέλτιστου συνδυασμού αντισωμάτων, δύο δεύτερα μονοκλωνικά αντισώματα αντι – γαλεκτίνης 1 (του εμπορίου), με το ένα από τα δύο, να φέρνει σημαντική ευαισθησία.

Σε κάθε δοκιμασία, χρησιμοποιήθηκαν διαδοχικά αυξανόμενες συγκεντρώσεις καθαρής γαλεκτίνης 1, όπως επίσης και για τον εντοπισμό των χαμηλότερων ορίων της μεθόδου, όπου παρατηρήθηκε απόδοση ευαισθησίας σε τιμές που έφταναν έως και τα 2ng. Έτσι, τα όρια ανίχνευσης της τεχνικής, παρείχαν υψηλή ευαισθησία, που συνέφεραν απόλυτα τους σκοπούς της παρούσας μελέτης αλλά και την ίδια την μέθοδο.

Από τη βιβλιογραφία, έχει καταδειχθεί η παρουσία της γαλεκτίνης 1 στην κυκλοφορία του αίματος και έχει παρατηρηθεί να μετράται, συνήθως, στις χαμηλότερες τιμές της τάξης των ng. Έτσι, θελήσαμε να επιβεβαιώσουμε την ανίχνευση της πρωτεΐνης εντός του ορού, προκειμένου να είναι δυνατή η μέτρηση της με τη μέθοδο της sandwich-ELISA. Η δοκιμασία αυτή, έδειξε ότι, όγκος δείγματος φυσιολογικού ορού 100μl, αποτελεί τη βάση για την ανίχνευση της πρωτεΐνης, υποδηλώνοντας και την ευκολία της μεθόδου να χρησιμοποιείται βιολογικό δείγμα, χωρίς να απαιτείται καθαρισμός του.

Η μέθοδος, εφαρμόστηκε σε σύνολο 54 δειγμάτων ορού πλάσματος, εκ των οποίων τα 9 ήταν δείγματα ορού υγιών ατόμων και τα υπόλοιπα 45, ήταν δείγματα ασθενών με καρκίνο και με παράλληλη εμφάνιση φλεβικών θρομβώσεων. Επιτεύχθηκε ο ποσοτικός προσδιορισμός της γαλεκτίνης 1, στα 45 δείγματα των ασθενών, από τα οποία τρία ήταν αυτά που έφεραν υψηλά

επίπεδα γαλεκτίνης 1. Συγκεκριμένα, οι τιμές της γαλεκτίνης 1 είχαν στατιστικά σημαντική διαφορά από την ομάδα των υγιών δοτών, με τιμές από 5,81 έως 21,33 ng/ml. Σε αυτούς τους τρεις ασθενείς, επιδιώχθηκε να συσχετιστούν τα ιατρικά ιστορικά τους (τύπος και στάδιο καρκίνου, υποκείμενα νοσήματα κ.α.) με τον βαθμό ανάπτυξης θρομβώσεων, που όμως δε μπορέσαμε να βγάλουμε σαφή συμπεράσματα, λόγω του μικρού αριθμού δειγμάτων που συμπεριλήφθηκαν στη παρούσα μελέτη.

Αξίζει να αναφερθεί ότι έχουν πραγματοποιηθεί ανάλογες έρευνες ποσοτικοποίησης των επιπέδων της γαλεκτίνης 1 στον ορό ασθενών με συγκεκριμένους τύπους καρκίνων. Σε μελέτη 90 ασθενών με καρκίνο του θυρεοειδούς, τα επίπεδα της γαλεκτίνης 1, είχαν στατιστικά σημαντική διαφορά από την ομάδα των υγιών ατόμων (σε σύνολο 20 υγιών δοτών), με τιμές από 3,2 έως 50 ng/ml⁵³. Επίσης, σε δεύτερη μελέτη, σε σύνολο 102 ασθενών με ακανθοκυτταρικό καρκίνωμα κεφαλής και τραχήλου (HNSCC), τα επίπεδα της γαλεκτίνης 1, είχαν στατιστικά σημαντική διαφορά από την ομάδα των υγιών ατόμων (σε σύνολο 38 υγιών δοτών), σε τιμές από 13,5 – 30,8 ng/ml, με το εύρος γραμμικότητας και των δύο προαναφερθέντων μελετών, να κυμαίνεται από 5 έως 160 ng/ml^{53,54}.

Συγκρίνοντας την παρούσα εργασία με τις παραπάνω μελέτες, παρατηρούμε παρόμοια ευαισθησία της μεθόδου. Επιπλέον, τα επίπεδα της γαλεκτίνης 1 που ανιχνεύσαμε, βρίσκονται σε συμφωνία με το εύρος των επιπέδων της γαλεκτίνης 1 των ανωτέρω μελετών. Ωστόσο, επειδή στη παρούσα μελέτη συμπεριλήφθηκαν μόνο 45 δείγματα ασθενών, δεν είναι δυνατό, στη φάση αυτή, να βγουν ασφαλή συμπεράσματα ως προς την κλινική αξιολόγηση των αποτελεσμάτων μας. Σε κάθε περίπτωση, πρέπει να ληφθεί υπόψιν και η ομάδα των ασθενών που συμπεριλαμβάνονται σε μια έρευνα, καθώς οι προηγούμενες μελέτες εξέτασαν τα επίπεδα της γαλεκτίνης 1 σε συγκεκριμένους τύπους καρκίνου, ενώ εμείς θελήσαμε να διερευνήσουμε τα επίπεδα της γαλεκτίνης 1 σε ένα σύνολο διαφορετικών τύπων καρκίνου και συνδυαστικά με τον βαθμό ανάπτυξης φλεβικών θρομβώσεων.

Άλλες μελέτες παρουσιάζουν ιδιαίτερα αυξημένα επίπεδα γαλεκτίνης 1, σε πολύ μεγαλύτερο αριθμό ασθενών (>100), στον καρκίνο των ωοθηκών (30 – 950 ng/ml)⁵⁵ και του παχέος εντέρου (3,13 – 100 ng/ml)⁵⁶, ενώ η πρωτεΐνη,

εμφανίζεται και ως ισχυρός δείκτης στον καρκίνο του μαστού, χωρίς ωστόσο να έχουν διευκρινιστεί τα επίπεδα της πρωτεΐνης στους ασθενείς αυτούς⁵⁷.

Συμπερασματικά, θα ήταν ωφέλιμο η δοκιμασία που εγκαθιδρύσαμε να συνεχιστεί σε μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων, αφενός για να προκύψουν ασφαλή συμπεράσματα των αποτελεσμάτων της παρούσας μελέτης και αφετέρου, να επιτραπεί στο μέλλον, η διερεύνηση της διαγνωστικής και προγνωστικής σημασίας της μεθόδου σε ασθενείς με καρκίνο ή/και καρδιαγγειακά νοσήματα.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Stillmark H. (1888). About ricin, a poisonous ferment [i.e., enzyme] from the seeds of *Ricinus communis* L. and some other Euphorbiaceae. M.D. thesis, University of Dorpat (Dorpat, Estonia)
2. Morgan W. T. & Watkins W. M. (1953). The inhibition of the haemagglutinins in plant seeds by human blood group substances and simple sugars. *British journal of experimental pathology*, 34(1), 94–103
3. Brooks S. A. (2017). Lectin Histochemistry: Historical Perspectives, State of the Art, and the Future. *Histochemistry of Single Molecules*, 1560(6), 93–107
4. David C Kilpatrick. (2002). Animal lectins: a historical introduction and overview. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1572(2–3), 187-197
5. Leffler H, Carlsson S, Hedlund M, Qian Y, Poirier F. (2002). Introduction to galectins. *Glycoconj J*, 19(7-9), 433-40
6. Liao DI., Kapadia G., Ahmed H., Vasta GR., & Herzberg O. (1994). Structure of S-lectin, a developmentally regulated vertebrate beta-galactoside-binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(4), 1428–1432
7. Brinchmann MF., Patel DM. & Iversen MH. (2018). The role of galectins as modulators of metabolism and inflammation. *Mediators of Inflammation*, 1-11
8. Thijssen VL., Hulsmans S., & Griffioen AW. (2008). The galectin profile of the endothelium: altered expression and localization in activated and tumor endothelial cells. *The American journal of pathology*, 172(2), 545–553
9. Yang RY, Rabinovich GA., Liu FT. (2008). Galectins: structure, function and therapeutic potential. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 10, e17
10. Cooper DN. (2002). Galectinomics: finding themes in complexity. *Biochim Biophys Acta*, 1572(2-3), 209-31
11. Hirabayashi J., Hashidate T., Arata Y., Nishi N., Nakamura T., Hirashima M., Urashima T., Oka T., Futai M., Muller WE., Yagi F., Kasai K. (2002). Oligosaccharide specificity of galectins: a search by frontal affinity chromatography. *Biochim Biophys Acta*. 1572(2-3), 232-54
12. Kamala DP, Susan LC, Shahina W. (2002). Selectins: critical mediators of leukocyte recruitment, *Seminars in Immunology*, 14(2) 73-81

13. Nio-Kobayashi J. (2017). Tissue- and cell-specific localization of galectins, β -galactose-binding animal lectins, and their potential functions in health and disease. *Anat Sci Int*, 92(1) 25-36
14. Johannes L, Jacob R, Leffler H. (2018). Galectins at a glance. *J Cell Sci*. 131(9)
15. Hirabayashi J, Kasai K. (1995). Galectins: decoder of glyco-code. *Seikagaku*, 67(12), 1366-87
16. Paz A., Haklai R., Elad-Sfadia G., Ballan E., Kloog Y. (2001). Galectin-1 binds oncogenic H-Ras to mediate Ras membrane anchorage and cell transformation, *Oncogene*, 20, 7486–7493
17. Camby I., Le Mercier M., Le Franc F., Kiss R. (2006). Galectin-1: a small protein with major functions, *Glycobiology*, 16(11), 137–157
18. Ahmad N., Gabius HJ, Sabesan S., Oscarson S, Brewer CF. (2004). Thermodynamic binding studies of bivalent oligosaccharides to galectin-1, galectin-3, and the carbohydrate recognition domain of galectin-3, *Glycobiology*, 14(9), 817–825
19. Cho M., Cummings RD. (1995). Galectin-1, a beta-galactoside-binding lectin in Chinese hamster ovary cells. I. Physical and chemical characterization, *J. Biol. Chem*, 270, 5198–5206
20. Hughes RC. (1999). Secretion of the galectin family of mammalian carbohydrate-binding proteins, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1473(1), 172-185
21. Nickel W. (2003). The mystery of non-classical protein secretion. *European Journal of Biochemistry*. 270(10), 2109-2119
22. Satelli A, Rao PS, Gupta PK, Lockman PR, Srivenugopal KS, Rao US. (2008). Varied expression and localization of multiple galectins in different cancer cell lines. *Oncol. Rep*, 19, 587–94
23. Seelenmeyer C, Wegehangel S, Tews I, Künzler M, Aebi M, Nickel W. (2005). Cell surface counter receptors are essential components of the unconventional export machinery of galectin-1. *J. Cell Biol*, 171, 373–81.
24. Thijssen VL, Heusschen R, Caers J, Griffioen AW. (2015). Galectin expression in cancer diagnosis and prognosis: A systematic review. *Biochim Biophys Acta*, 1855(2), 235-47

24. Thijssen VL, Barkan B, Shoji H, Aries IM, Mathieu V, Deltour L, Hackeng TM, Kiss R, Kloog Y, Poirier F, et al. (2010). Tumor cells secrete galectin-1 to enhance endothelial cell activity. *Cancer Res*, 70, 6216–6224
25. Thijssen VL, Postel R, Brandwijk RJ, Dings RP, Nesmelova I, Satijn S, Verhofstad N, Nakabeppu Y, Baum LG, et al. (2006). Galectin-1 is essential in tumor angiogenesis and is a target for antiangiogenesis therapy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103, 15975–15980
26. D’Haene N, Sauvage S, Maris C, Adanja I, Le Mercier M, Decaestecker C, Baum L, Salmon I. (2013). VEGFR1 and VEGFR2 involvement in extracellular galectin-1- and galectin-3-induced angiogenesis. *PLoS ONE*, 8, e67029
27. Hsieh SH, Ying NW, Wu MH, et al. (2008). Galectin-1, a novel ligand of neuropilin-1, activates VEGFR-2 signalling and modulates the migration of vascular endothelial cells. *Oncogene*, 27, 3746–53
28. Ito K, Stannard K, Gabutero E, Clark AM, Neo SY, Onturk S, Blanchard H, Ralph SJ. (2012). Galectin-1 as a potent target for cancer therapy: role in the tumor microenvironment. *Cancer Metastasis Rev*, 31(3-4), 763-78
29. Diaz JA, Ramacciotti E, Wakefield TW. (2010). Do galectins play a role in venous thrombosis? a review. *Thromb Res*, 125(5), 373-6
30. Elola MT, Chiesa ME, Alberti AF, Mordoh J, Fink NE. (2005). Galectin-1 receptors in different cell types. *J Biomed Sci.*, 12(1), 13-29
31. N.L. Perillo, K.E. Pace, J.J. Seilhamer, L.G. Baum. (1995). Apoptosis of T cells mediated by galectin-1, *Nature*, 378, 736–739
32. Grigorian A., Torossian S., Demetriou M. (2009). T-cell growth, cell surface organization, and the galectin-glycoprotein lattice. *Immunology Reviews*, 230(1), 232–246
33. Cedeno-Laurent F. & Dimitroff CJ. (2012). Galectin-1 research in T cell immunity: past, present and future. *Clinical immunology (Orlando, Fla.)*, 142(2), 107–116
34. Banh, A., Zhang, J., Cao, H., Bouley, D. M., Kwok, S., Kong, C., et al. (2011). Tumor Galectin-1 mediates tumor growth and metastasis through regulation of T-cell apoptosis. *Cancer Research*, 71(13), 4423–4431
35. Cousin JM, Cloninger MJ. (2016). The Role of Galectin-1 in Cancer Progression, and Synthetic Multivalent Systems for the Study of Galectin-1. *Int J Mol Sci.*, 17(9), 1566

- 36.** Thijssen VL, Hulsmans S, Griffioen AW. (2008). The galectin profile of the endothelium: Altered expression and localization in activated and tumor endothelial cells. *Am J Pathol.*, 172, 545–553
- 37.** Croci DO, Cerliani JP, Dalotto-Moreno T, Méndez-Huergo SP, Mascanfroni ID, Dergan-Dylon S, Toscano MA, Caramelo JJ, García-Vallejo JJ, et al. (2014). Glycosylation-dependent lectin-receptor interactions preserve angiogenesis in anti-VEGF refractory tumors. *Cell*, 156, 744–758.
- 38.** Elola MT, Wolfenstein-Todel C, Troncoso MF, Vasta GR, Rabinovich GA. (2007). Galectins: matricellular glycan-binding proteins linking cell adhesion, migration, and survival. *Cell Mol Life Sci.*, 64(13), 1679-700
- 39.** Wu MH, Hong TM, Cheng HW, Pan SH, Liang YR, Hong HC, Chiang WF, Wong TY, Shieh DB, Shiau AL, et al. (2009). Galectin-1-mediated tumor invasion and metastasis, up-regulated matrix metalloproteinase expression, and reorganized actin cytoskeletons. *Mol. Cancer Res.*, 7, 311–318
- 40.** Pacienza N, Pozner RG, Bianco GA, D'Atri LP, Croci DO, Negrotto S, Malaver E, Gómez RM, Rabinovich GA, Schattner M. (2008). The immunoregulatory glycan-binding protein galectin-1 triggers human platelet activation. *FASEB J.*, 22(4), 1113-23
- 41.** Schattner M. (2014). Platelets and galectins. *Annals of translational medicine*, 2(9), 85
- 42.** Romaniuk MA, Croci DO, Lapponi MJ, Tribulatti MV, Negrotto S, Poirier F, Campetella O, Rabinovich GA, Schattner M. (2012). Binding of galectin-1 to $\alpha\text{IIb}\beta_3$ integrin triggers "outside-in" signals, stimulates platelet activation, and controls primary hemostasis. *FASEB J.*, (7), 2788-98
- 43.** Rabinovich GA, Cumashi A, Bianco GA, Ciavardelli D, Iurisci I, D'Egidio M, Piccolo E, Tinari N, Nifantiev N, Iacobelli S. (2005). Synthetic lactulose amines: novel class of anticancer agents that induce tumor-cell apoptosis and inhibit galectin-mediated homotypic cell aggregation and endothelial cell morphogenesis. *Glycobiology*, 16(3), 210-20
- 44.** Ito K, Scott SA, Cutler S, Dong LF, Neuzil J, Blanchard H, Ralph SJ. (2011). Thiodigalactoside inhibits murine cancers by concurrently blocking effects of galectin-1 on immune dysregulation, angiogenesis and protection against oxidative stress. *Angiogenesis*. 14, 293–307
- 45.** Cumpstey, I., Salomonsson, E., Sundin, A., Leffler, H., & Nilsson, U. J. (2007). Studies of arginine-arene interactions through synthesis and evaluation of a series of galectin-binding aromatic lactose esters. *Chembiochem*, 8(12), 1389–1398

- 46.** Wang JB, Wang MD, Li EX, Dong DF. (2012). Advances and prospects of anginex as a promising anti-angiogenesis and anti-tumor agent. *Peptides*, 38(2), 457-62
- 47.** Ewald R. Weibel, George E. Palade. (1964). New cytoplasmic components in arterial endothelia . *J Cell Biol*, 23 (1), 101–112
- 48.** Valentijn KM., Sadler JE., Valentijn JA., Voorberg J., & Eikenboom J. (2011). Functional architecture of Weibel-Palade bodies. *Blood*, 117(19), 5033–5043
- 49.** Ευαγγελία Γούλα (Διδακτορική διατριβή). (2019). Χωροχρονική οργάνωση και μηχανισμοί επικοινωνίας μεταξύ ενδοκυττάρωσης και ρυθμιζόμενης έκκρισης κατά τη σηματοδότηση του VEGFR2 στα ενδοθηλιακά κύτταρα
- 50.** Astorgues-Xerri L., Riveiro ME., Tijeras-Raballand A., Serova M., Neuzillet C., Albert S., Raymond E., Faivre S. (2014). Unravelling galectin-1 as a novel therapeutic target for cancer, *Cancer Treatment Reviews*, 40(2), 307-319,
- 51.** DeCaprio J, Kohl TO. Cross-Linking Antibodies to Beads Using Dimethyl Pimelimidate (DMP). (2019), *Cold Spring Harb Protoc.*, 2019(2)
- 52.** John R. Crowther. *The ELISA Guidebook 2nd Edition. Methods in Molecular Biology*, Springer Protocols (2009)
- 53.** Saussez S, Glinoe D, Chantrain G, Pattou F, Carnaille B, André S, Gabius HJ, Laurent G. Serum galectin-1 and galectin-3 levels in benign and malignant nodular thyroid disease. (2008)., *Thyroid.*, 18(7), 705-12
- 54.** Saussez S, Lorfèvre F, Lequeux T, Laurent G, Chantrain G, Vertongen F, Toubeau G, Decaestecker C, Kiss R. (2008). The determination of the levels of circulating galectin-1 and -3 in HNSCC patients could be used to monitor tumor progression and/or responses to therapy, *Oral Oncology*, 44(1), 86-93
- 55.** Chen L., Yao Y., Sun L., Zhou J., Liu J., Wang J., Li J., & Tang J. (2015). Clinical implication of the serum galectin-1 expression in epithelial ovarian cancer patients. *Journal of ovarian research*, 8(78)
- 56.** Watanabe M, Takemasa I, Kaneko N, Yokoyama Y, Matsuo E, Iwasa S, Mori M, Matsuura N, Monden M, Nishimura O. (2011). Clinical significance of circulating galectins as colorectal cancer markers. *Oncol Rep.*, 25(5), 1217-26

57. Carlsson MC, Cederfur C, Schaar V, Balog CI, Lepur A, Touret F, Salomonsson E, Deelder AM, Fernö M, Olsson H, Wuhrer M, Leffler H. (2011). Galectin-1-binding glycoforms of haptoglobin with altered intracellular trafficking and increase in metastatic breast cancer patients. PLoS One. 6(10), e26560