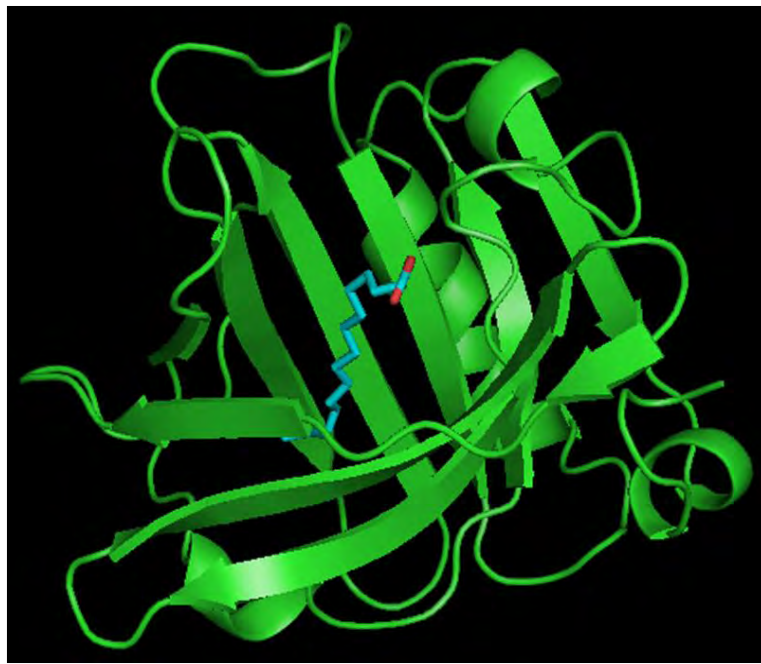




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Διπλωματική εργασία

“ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ ΛΙΠΑΡΩΝ ΟΞΕΩΝ
ΣΤΗ ΒΟΕΙΑ β-ΓΑΛΑΚΤΟΣΦΑΙΡΙΝΗ (bovine b-Lg)
ΜΕ ΘΕΡΜΙΔΟΜΕΤΡΙΑ ΙΣΟΘΕΡΜΗΣ ΤΙΤΛΟΔΟΤΗΣΗΣ”



ΜΑΡΙΑΝΝΑ ΣΤΥΛΙΑΝΟΥ

ΛΑΡΙΣΑ, 2014

**Θέμα: “Μελέτη της πρόσδεσης λιπαρών οξέων
στη βόεια β-γαλακτοσφαιρίνη (b-Lg) με τη μέθοδο ITC”**

**Subject: “Binding studies of fatty acids to bovine b-Lg
by ITC method”**

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

- **Δρ. κ. Γεώργιος Κοντοπίδης**

**Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας του τμήματος Κτηνιατρικής
του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας**

- **Δρ. κ. Δημήτριος Δ. Λεωνίδας**

**Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας
και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας**

- **Δρ. κ. Μαρία Κοντού**

**Επίκουρη Καθηγήτρια Πρωτεϊνικής Χημείας του τμήματος Βιοχημείας
και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας**

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	3
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	5
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	7
ABSTRACT.....	9
1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	11
2 ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	12
2.1 ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΓΑΛΑΚΤΟΣ.....	14
2.1.1 Καζεΐνες.....	14
2.1.2 Πρωτεΐνες του ορού του γάλακτος.....	15
2.2 β-ΓΑΛΑΚΤΟΣΦΑΙΡΙΝΗ (β-Lg).....	18
2.2.1 Λιποκαλίνες.....	21
2.2.2 Δομή β-γαλακτοσφαιρίνης.....	21
2.2.3 Κατάλοιπα και δευτεροταγείς δομές.....	22
2.2.4 Γενετικές παραλλαγές.....	23
2.2.5 Διμερές/Μονομερές.....	24
2.2.6 Προσδέτες και ενεργές θέσεις.....	24
2.2.7 Βιολογική λειτουργία.....	26
2.2.8 Χρήσεις / Εφαρμογή.....	27
2.2.8.1 Βιομηχανία Τροφίμων & Φαρμακοβιομηχανία.....	27
2.2.8.2 Αντιοξειδωτική φύση.....	27
2.3 ΛΙΠΑΡΑ ΟΞΕΑ ΩΣ ΠΡΟΣΔΕΤΕΣ ΤΗΣ β-Lg.....	28
2.4 ΘΕΡΜΙΔΟΜΕΤΡΙΑ ΙΣΟΘΕΡΜΗΣ ΤΙΤΛΟΔΟΤΗΣΗΣ (ISOTHERMAL TITRATION CALORIMETRY–ITC) – ΜΕΛΕΤΗ ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ ΛΙΠΑΡΩΝ ΟΞΕΩΝ ΣΤΗΝ β-Lg.....	30
2.4.1 Τι καθοδηγεί την πρόσδεση.....	30
2.4.2 Το πείραμα τιτλοδότησης.....	31
2.4.3 Αρχές της μεθόδου ITC.....	32
3 ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	35
4 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	36
4.1 ΥΛΙΚΑ.....	36
4.2 ΟΡΓΑΝΑ.....	37

4.3	ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΤΟΥ ΜΗΧΑΝΗΜΑΤΟΣ ΝΑΝΟ-ΙΤC: ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΤΙΤΛΟΔΟΤΗΣΗΣ ΜΟΝΟ ΜΕ dH ₂ O ΣΕ dH ₂ O.....	37
4.3.1	1 ^ο Πείραμα.....	38
4.3.2	2 ^ο Πείραμα.....	39
4.3.3	3 ^ο Πείραμα.....	42
4.3.4	4 ^ο Πείραμα.....	45
4.3.5	5 ^ο Πείραμα.....	46
4.3.6	6 ^ο Πείραμα.....	49
4.3.7	7 ^ο Πείραμα.....	52
4.4	ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΤΙΤΛΟΔΟΤΗΣΗΣ ΜΕ ΤΗ ΒΟΕΙΑ β-Lg ΚΑΙ ΤΑ ΣΥΝΘΕΤΙΚΑ ΚΟΡΕΣΜΕΝΑ ΛΙΠΑΡΑ ΟΞΕΑ: ΔΕΚΑΠΕΝΤΑΝΟΪΚΟ (PDA) ΟΞΥ & ΔΕΚΑΕΠΤΑΝΟΪΚΟ (HDA) ΟΞΥ.....	56
4.4.1	SDS-PAGE για τον προσδιορισμό καθαρότητας της β-Lg.....	56
4.4.2	Αυξανόμενη τιτλοδότηση της β-Lg 0,2 mM (Tris- HCl 50 mM + 10% EtOH) μέσα στο PDA (10%) 0,05 mM (Tris- HCl 50 mM + 10% EtOH)	57
4.4.3	Αυξανόμενη τιτλοδότηση της β-Lg 0,2 mM (Tris-HCl 50 mM + 10% EtOH) μέσα στο PDA(10%) 0,05 mM (Tris- HCl 50 mM + 10% EtOH).....	60
4.4.4	Αυξανόμενη τιτλοδότηση της β-Lg 0,2 mM (Tris- HCl 50 mM + 10% EtOH) μέσα στο HDA (10%) 0,05 mM (Tris- HCl 50 mM + 10% EtOH).....	63
4.4.5	Αυξανόμενη τιτλοδότηση της β-Lg 0,2 mM (Tris- HCl 50 mM + 10% EtOH) μέσα στο HDA (10%) 0,05 mM (Tris- HCl 50 mM + 10% EtOH).....	66
5	ΤΕΛΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	70
6	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	72

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Βιοχημείας του Τμήματος Κτηνιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου, Αναπληρωτή Καθηγητή Βιοχημείας του Τμήματος Κτηνιατρικής του Π.Θ., Δρ. κ. Γεώργιο Κοντοπίδη, ο οποίος αποδέχτηκε την αίτηση μου να εκπονήσω τη διπλωματική μου εργασία στο εργαστήριο Βιοχημείας του Κτηνιατρικού Τμήματος.

Επιπλέον, θα ήθελα να εκφράσω τις ιδιαίτερες ευχαριστίες μου στον Δρ. κ. Δημήτριο Δ. Λεωνίδα, Αναπληρωτή Καθηγητή Βιοχημείας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Π.Θ. και την Δρ. κ. Μαρία Κοντού, Επίκουρη Καθηγήτρια Πρωτεϊνικής Χημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Π.Θ για τη συνεργασία τους μαζί μου.

Δε θα μπορούσα να παραλείψω και θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα του Τμήματος Κτηνιατρικής του Π.Θ. κ. Μάγδα Ροβολή, η οποία μου προσέφερε την πολύτιμη βοήθειά της και μου έμαθε πολλά καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διπλωματικής μου εργασίας, παρά τις υποχρεώσεις της στο εργαστήριο. Η υπομονή και η βοήθειά της στο εργαστήριο ήταν σημαντικές.

Τέλος, ευχαριστώ όλα τα μέλη του εργαστηρίου Βιοχημείας της Κτηνιατρικής, καθώς και όσους βοήθησαν και συνέβαλαν άμεσα ή έμμεσα στη διεκπεραίωση αυτής της πτυχιακής εργασίας.

Εύχομαι σε όλους μια σταθερά ανοδική πορεία στον τομέα τους.

Στους γονείς μου, ως ελάχιστο δείγμα ευγνωμοσύνης & αγάπης

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η βόεια β-γαλακτοσφαιρίνη (bovine β-Lg), μία μη-γλυκοζυλιωμένη λιποκαλίνη, είναι η βασική πρωτεΐνη του ορού του γάλακτος πολλών θηλαστικών, συμπεριλαμβανομένων και των μηρυκαστικών. Η λειτουργικότητα της συγκεκριμένης πρωτεΐνης συνδέεται με την πρόσδεση, προστασία και μεταφορά υδρόφοβων μορίων. Μελέτες που πραγματοποιήθηκαν με διάφορες τεχνικές για την πρόσδεση υποστρωμάτων στην πρωτεΐνη β-γαλακτοσφαιρίνη έδειξαν ότι μπορεί να δεσμεύει στο λιπόφιλο κάλυκα της διάφορα υδρόφοβα υποστρώματα όπως λιπαρά οξέα, λιπίδια, ρετινοειδή, μικρά αλκάνια, αλειφατικές κετόνες και αρωματικές ενώσεις. Για τη μελέτη της πρόσδεσης επιλέχθηκε η μέθοδος ITC, επειδή η β-γαλακτοσφαιρίνη δεν είναι ένζυμο και δεν μπορεί να μετρηθεί η πρόσδεση με άλλο τρόπο όπως με φασματοφωτομετρικές και ενζυμικές μεθόδους, κατά τις οποίες παράγονται έγχρωμα προϊόντα. Γι' αυτό η μέθοδος ITC είναι η πιο ενδεδειγμένη για τη μελέτη πρόσδεσης χημικών ουσιών σε μη ενζυμικές πρωτεΐνες. Κρυσταλλογραφικές και άλλες φυσικοχημικές μελέτες καταδεικνύουν σαφώς την πρόσδεση λιπόφιλων ενώσεων στον κάλυκα της πρωτεΐνης. Στην παρούσα εργασία, έγινε μια προσπάθεια μελέτης της πρόσδεσης συνθετικών λιπαρών οξέων με τη βόεια β-Lg χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της Θερμιδομετρίας Ισόθερμης Τιτλοδότησης (Isothermal Titration Calorimetry- ITC) με σκοπό τη διερεύνηση της πρόσδεσης των συγκεκριμένων υδρόφοβων προσδετών με την υπό μελέτη πρωτεΐνη. Τα συνθετικά κορεσμένα λιπαρά οξέα που επιλέχθηκαν ως προσδέτες είναι τα εξής: δεκαπεντανοϊκό (pentadecanoic acid-C15:0) και δεκαεπτανοϊκό οξύ (heptadecanoic acid-C17:0). Επιλέχθηκαν τα συγκεκριμένα λιπαρά οξέα, επειδή: είναι συνθετικά και δεν έχει μελετηθεί μέχρι στιγμής η πρόσδεσή τους με την β-Lg, είναι χαμηλού μοριακού βάρους και παρουσιάζουν υψηλή διαλυτότητα σε σχέση με τα συνθετικά λιπαρά οξέα με περισσότερα άτομα άνθρακα στην αλυσίδα τους. Οι προσδέτες τείνουν να δεσμευτούν με τέτοιο τρόπο ώστε να μεγιστοποιήσουν την κάλυψη της υδροφοβικής επιφάνειάς τους στην κοιλότητα του λιποκάλυκα, αφήνοντας πολικές ή υδροφιλικές ομάδες εκτεθειμένες στο διαλύτη.

Η Θερμιδομετρία Ισόθερμης Τιτλοδότησης (ITC) είναι μια σημαντική μέθοδος για το χαρακτηρισμό μοριακών αλληλεπιδράσεων και για την κατανόηση της θερμοδυναμικής πρόσδεσης βιολογικών μορίων και βιολογικών συστημάτων. Η βασική αρχή λειτουργίας της μεθόδου του ITC αφορά τη μέτρηση της θερμότητας του σχηματισμού (ή διάσπασης) μη ομοιοπολικών δεσμών κι αυτή η πληροφορία χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό των θερμοδυναμικών παραμέτρων της πρόσδεσης μ' ένα άλλο. Το όργανο ITC που είχαμε στη διάθεσή μας για τη μελέτη της σύνδεσης της πρωτεΐνης με τα λιπαρά οξέα είναι ειδικά σχεδιασμένο για να μετράει τη σύνδεση του προσδέτη. Η αυξημένη ευαισθησία και τα πολύ χαμηλά όρια ανίχνευσης μεταβολής της θερμότητας στο υπό μελέτη σύστημα, επιτρέπουν ακριβείς θερμικές μετρήσεις σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις απ' ό,τι ήταν δυνατόν προηγουμένως. Συνεπώς, η μέθοδος ITC αποτελεί μια εξαιρετικά ακριβή και ευαίσθητη μέθοδο προσδιορισμού που μπορεί να δώσει ένα θερμοδυναμικό προφίλ της πρόσδεσης σ' ένα μόνο πείραμα. Η μελέτη των μοριακών αλληλεπιδράσεων της πρόσδεσης βιολογικών μορίων και βιολογικών συστημάτων με τη μέθοδο ITC μπορεί να έχει εφαρμογή σε πολλούς τομείς όπως στη Βιοχημεία και τη Βιοτεχνολογία, στη Φαρμακολογία για ορθολογιστικό σχεδιασμό φαρμάκων, στη Βιοφυσική, στη Νανοτεχνολογία, στα Βιοκαύσιμα και σ' άλλους κλάδους της επιστήμης

ABSTRACT

Bovine β -Lactoglobulin (β -Lg), a non-glycosylated lipocalin, is a major whey protein of many mammal species, including ruminants. Functionality of the specific protein is associated with the binding, and probable transportation of hydrophobic molecules. Binding studies conducted with various techniques, showed that the ligand binding site can accommodate various hydrophobic substrates such as fatty acids, lipids, retinoids, small alkanes, aliphatic ketones and aromatic compounds. The ITC technique was chosen because β -Lg isn't an enzyme and it isn't possible the binding to be measured with other technique, like spectrophotometric and enzymatic methods, in which coloured product is produced. For the above reasons, the ITC is the most appropriate method for binding study of chemical substances to non enzymatic proteins. Crystallographic and other physicochemical studies clearly demonstrate presence of the ligand in the hydrophobic calyx. In this work, we studied the binding of synthetic saturated fatty acids to the bovine β -Lg using the ITC (Isothermal Titration Calorimetry) method in order to elucidate its ability to make complexes with hydrophobic ligands. Synthetic saturated fatty acids, which have been chosen as ligands are: the pentadecanoic (PDA) and the heptadecanoic acid (HDA). The specific odd number carbon atoms fatty acids were selected because in order to investigate in non-natural fatty acid could also bind to the protein. They are also selected because their molecular weight is low and thus more soluble. Ligands tend to bind in such a way to maximize hydrophobic surface shielding in the lipocalyx cavity, leaving polar or hydrophilic groups exposed to solvent. Isothermal Titration Calorimetry (ITC) is an important method for the characterization of molecular interactions and for the understanding of binding thermodynamics of biological molecules and biological systems. The basic principle of ITC method relay in the heat measurement of noncovalent bond formation (or disruption). This information is used to determine the thermodynamic parameters of a molecule's binding to another. The Nano-ITC instrument, which was at our disposal for the binding study of fatty acids to the protein, is specifically designed to measure ligand binding and reaction kinetics. Increased sensitivity and lower detection

limits permit accurate thermal measurements at lower concentrations than previously possible. Therefore, ITC is the only assay method that can give a thermodynamic profile of the binding event in one experiment. Studying the molecular interactions of binding biological molecules and biological systems by ITC method may have applications in many sections like Biochemistry and Biotechnology, Pharmacology for rational drug design, Biophysics, Nanotechnology, Biofuels and other branches of science, which are activated in the most advanced research.

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το γάλα των μηρυκαστικών και συγκεκριμένα των βοοειδών παρουσιάζει μια πολύ πλούσια και ποικίλη σύσταση. Αποτελείται από πρωτεΐνες, υδατάνθρακες, λιπίδια, οργανικά οξέα, ανόργανα συστατικά στα οποία συμπεριλαμβάνονται και ιχνοστοιχεία, βιταμίνες, ένζυμα και νερό.^[1,2] Η μελέτη των πρωτεϊνών του γάλακτος παρουσιάζει ιδιαίτερο επιστημονικό ενδιαφέρον, καθώς κάποιες απ' αυτές είναι ικανές να δεσμεύουν μικρά οργανικά μόρια ή ιόντα και έτσι δρουν ως ειδικοί μεταφορείς. Κατά συνέπεια, οι πρωτεΐνες του γάλακτος χρησιμοποιούνται ευρύτατα στη φαρμακοβιομηχανία, στη βιομηχανία τροφίμων καθώς επίσης και στην κοσμητική βιομηχανία.



Εικόνα 1: Τρισδιάστατη απεικόνιση της τριτοταγούς δομής της β-γαλακτοσφαιρίνης (β-Lg), πρωτεΐνης του ορού του βόειου γάλακτος.^[3]

Στη συγκεκριμένη εργασία μελετούμε μία από τις πρωτεΐνες του ορού του γάλακτος, τη β-γαλακτοσφαιρίνη τόσο από δομική όσο και από λειτουργική πλευρά, την αλληλεπίδρασή της με συνθετικά κορεσμένα λιπαρά οξέα [δεκαπεντανοϊκό οξύ (PDA) και δεκαεπτανοϊκό οξύ (HDA)], την αντίδραση σύνδεσης των προαναφερθέντων προσδετών με τη συγκεκριμένη πρωτεΐνη καθώς και την κινητική αυτής της αντίδρασης, χρησιμοποιώντας μια εξαιρετικά

ακριβή μέθοδο προσδιορισμού, τη Θερμιδομετρία Ισόθερμης Τιτλοδότησης (Isothermal Titration Calorimetry, **ITC**).

2 ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Η περιεκτικότητα του βόειου γάλακτος σε πρωτεΐνες κυμαίνεται από 3,3 g/100 mL έως 3,9 g/100 mL με μέσο όρο ~ 3,5 g/100 mL. Οι πρωτεΐνες του βόειου γάλακτος διακρίνονται στο πρωτεϊνικό κλάσμα των καζεϊνών που συνιστά ~ 2,9% και στο κλάσμα των πρωτεϊνών του ορού του γάλακτος που αποτελεί 0,6%. Τα επιμέρους είδη των πρωτεϊνών, τα οποία απαρτίζουν τα δύο παραπάνω κύρια πρωτεϊνικά κλάσματα του γάλακτος, είναι τα εξής:^[4,5]

<u>Πρωτεΐνες βόειου γάλακτος</u>		
	g/L	% ολικών πρωτεϊνών
Ολικές πρωτεΐνες	33	100
Ολικές καζεΐνες	26	80
α_{s1}	10	34
α_{s2}	2,6	8
β	9,3	28
κ	3,3	10
Ολικές πρωτεΐνες ορού γάλακτος	6,3	20
α-γαλακταλβουμίνη	1,2	4
β-γαλακτοσφαιρίνη	3,2	10
αλβουμίνη	0,4	1,5
ανοσοσφαιρίνες	0,7	2
πρωτεόζη πεπτόνη	0,8	2,5

Πίνακας 1: Περιεκτικότητα πρωτεϊνών βόειου γάλακτος σε g/L και ποσοστό (%) του εκάστοτε είδους επί του συνόλου αυτών.^[3]



Εικόνα 2 : Διάγραμμα που απεικονίζει την εκατοστιαία αναλογία της β-γαλακτοσφαιρίνης επί του συνόλου των πρωτεϊνών του βόειου γάλακτος.^[3]



Εικόνα 3 : Διάγραμμα που απεικονίζει την εκατοστιαία αναλογία της β-γαλακτοσφαιρίνης επί του συνόλου των πρωτεϊνών του ορού του βόειου γάλακτος.^[3]

2.1 ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΓΑΛΑΚΤΟΣ

2.1.1 Καζεΐνες

Είναι το κλάσμα των φωσφοπρωτεϊνών που καθιζάνει ύστερα από οξίνιση σε pH 4,6 και σε θερμοκρασία 20⁰ C. Αποτελούν το 75-80% των πρωτεϊνών του γάλακτος (2,4-2,9 g %) και με βάση τη διάταξη (ομολογία) των αμινοξέων στο μόριο τους διακρίνονται σε α_{s1} -, α_{s2} -, β - και κ - καζεΐνες.

✚ **α_{s1} -καζεΐνη:** Αποτελεί το 1,2-1,5% των συστατικών του γάλακτος και με ηλεκτροφόρηση διαχωρίζεται σε πέντε γενετικές παραλλαγές: A, B, C, D και E. Η παραλλαγή B κυριαρχεί στο βόειο γάλα και έχει 199 αμινοξέα. Οι παραλλαγές B, A και C έχουν οκτώ φωσφορικές ομάδες, ενώ η D έχει εννιά.^[5,6]

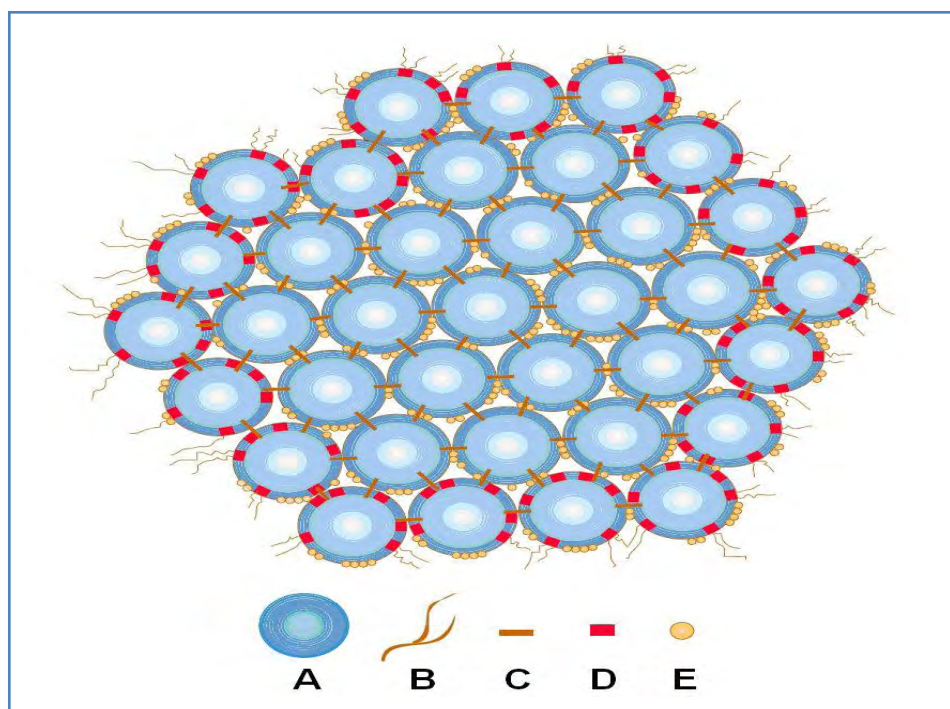
✚ **α_{s2} -καζεΐνη:** Αποτελεί το 0,3-0,4% των συστατικών του γάλακτος. Μ' αυτή ταυτίζονται και τα κλάσματα που χαρακτηρίζονταν μέχρι σήμερα ως α_{s3} -, α_{s4} - και α_{s6} -. Όλα τα κλάσματα έχουν την ίδια σειρά και αριθμό αμινοξέων (207), αλλά διαφέρουν ως προς τον αριθμό των φωσφορικών ομάδων, οι οποίες κυμαίνονται από 10 έως 13. Απαντά σε 4 γενετικές παραλλαγές, που χαρακτηρίζονται ως A, B, C και D. Η παραλλαγή D έχει 9 αμινοξέα λιγότερα.^[7] Οι A και D παρατηρούνται στις ευρωπαϊκές φυλές του *Bos taurus*, ενώ η C βρίσκεται μόνο στο γάλα του *Bos grunniens*.

✚ **κ -καζεΐνη:** Αποτελεί ποσοστό ~ 0,3 – 0,4% των συστατικών του γάλακτος και απαντά με μορφή πολυμερών κ -καζεϊνών που συνδέονται με διθειϊκούς δεσμούς. Με ηλεκτροφόρηση διαπιστώνονται δύο γενετικές παραλλαγές, A και B, με 159 αμινοξέα η καθεμία και $M_r \approx 19.000$.^[8] Το μόριο της περιέχει σχεδόν πάντοτε υδατάνθρακες και επομένως είναι γλυκοπρωτεΐνη. Η διάσπασή της με ρεννίνη γίνεται στη θέση 105-106 και παράγεται έτσι η παρα- κ -καζεΐνη (1-105) και ένα γλυκομακροπεπτίδιο (106-169).

✚ **β -καζεΐνη:** Αποτελεί το 0,9-1,1% των συστατικών του γάλακτος και απαντά σε πολλές γενετικές παραλλαγές (A^1 , A^2 , A^3 , C, D και E). Είναι η περισσότερο υδρόφοβη καζεΐνη. Οι καζεΐνες γ_1 , γ_2 και γ_3 που βρίσκονται στο ωπό γάλα, πρέπει να θεωρούνται ως τελικά πεπτίδια ενζυμικής διάσπασης

της β-καζεΐνης.^[9,10] Έτσι η γ₁-καζεΐνη είναι τμήμα της β-καζεΐνης από τη θέση 29 έως τη θέση 209, η γ₂-καζεΐνη από τη θέση 106 έως τη θέση 209 και η γ₃-καζεΐνη από τη θέση 108 έως τη θέση 209. Η διάσπαση της β-καζεΐνης γίνεται με την επίδραση της πλασμίνης, μιας πρωτεάσης που υπάρχει στο γάλα.^[11]

Οι προαναφερόμενες καζεΐνες απαντούν στο γάλα σε μορφή συμπλόκων, τα οποία καλούνται μικκύλια και βρίσκονται σε κολλοειδή διασπορά στην υδάτινη φάση.^[4]



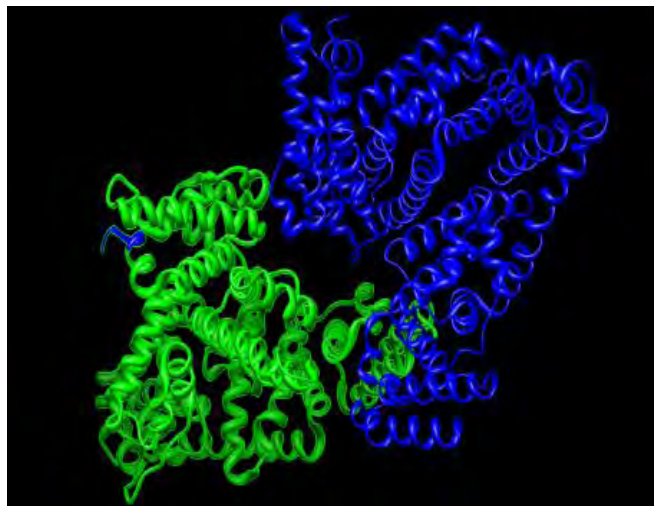
Εικόνα 4: Σχηματική απεικόνιση καζεϊνικού μικκυλίου. **A:** ένα υπομικκύλιο, **B:** προεξέχουσα αλυσίδα, **C:** Φωσφορικό ασβέστιο, **D:** κ-καζεΐνη, **E:** φωσφορικές ομάδες.^[12]

2.1.2 Πρωτεΐνες του ορού του γάλακτος

Οι κυριότερες πρωτεΐνες που απομένουν στον ορό του βόειου γάλακτος, μετά από την καθίζηση των καζεϊνών και συνιστούν το 20% των πρωτεϊνών του γάλακτος είναι οι εξής: **αλβουμίνη (BSA)**, **α-γαλακταλβουμίνη (α-La)**, **ανοσοσφαιρίνες (Igs)** και **β-γαλακτοσφαιρίνη (β-Lg)**.

Μαζί με τις οροπρωτεΐνες του γάλακτος ταυτοποιείται ένα μικρό κλάσμα από πρωτεόζες και πεπτόνες, το οποίο αποδείχτηκε ότι προέρχεται, όπως και οι γ-καζεΐνες, από ενζυμική διάσπαση της β-καζεΐνης.

- **αλβουμίνη (BSA):** Έχει τις ίδιες φυσικές και ανοσογενετικές ιδιότητες με την αλβουμίνη του ορού του αίματος της αγελάδας. Αποτελεί το 0,01-0,04% των συστατικών του γάλακτος με $M_r \approx 66.000$ gr/mol και το μόριο της αποτελείται από 582 αμινοξέα.



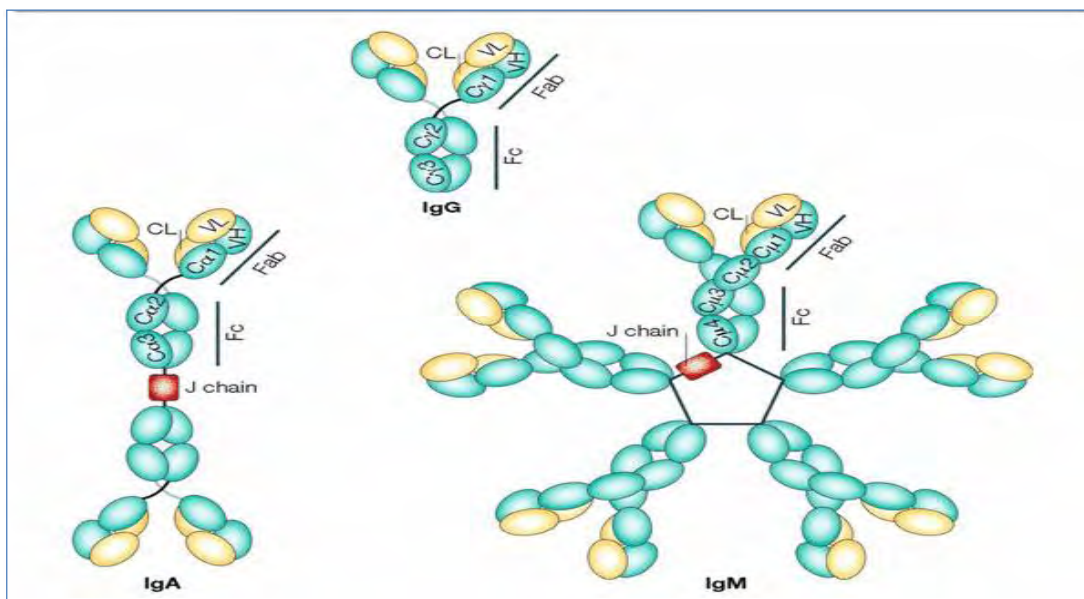
Εικόνα 5 : Τρισδιάστατη αναπαράσταση τριτοταγούς δομής της αλβουμίνης του ορού του βόειου γάλακτος.^[13]

- **α-γαλακταλβουμίνη (α-La):** Αποτελεί το 0,06-0,17% των συστατικών του γάλακτος και είναι απαραίτητη στη σύνθεση της λακτόζης σε συνδυασμό με το ένζυμο γαλακτοσυλ-τρανσφεράση. Απαντά σε τρεις γενετικές παραλλαγές: α- La- A, α- La- B και α- La- C. Στο γάλα του *Bos taurus* επικρατεί η α- La- B.^[14] Όλες οι γενετικές παραλλαγές έχουν 123 αμινοξέα και $M_r = 14.000$ gr/mol. Η σειρά των αμινοξέων και η διάταξη του μορίου στο χώρο μοιάζει μ' εκείνη της λυσοζύμης, χωρίς όμως να έχουν διαπιστωθεί κοινές ιδιότητες. Οι Hopper^[15] και Mac Kenzie (1973)^[15] διαπίστωσαν και δευτερεύουσες γαλακταλβουμίνες, οι οποίες περιέχουν και υδατανθρακικές ομάδες.



Εικόνα 6: Τριτοταγής δομή βόειας α-γαλακταλβουμίνης.^[3]

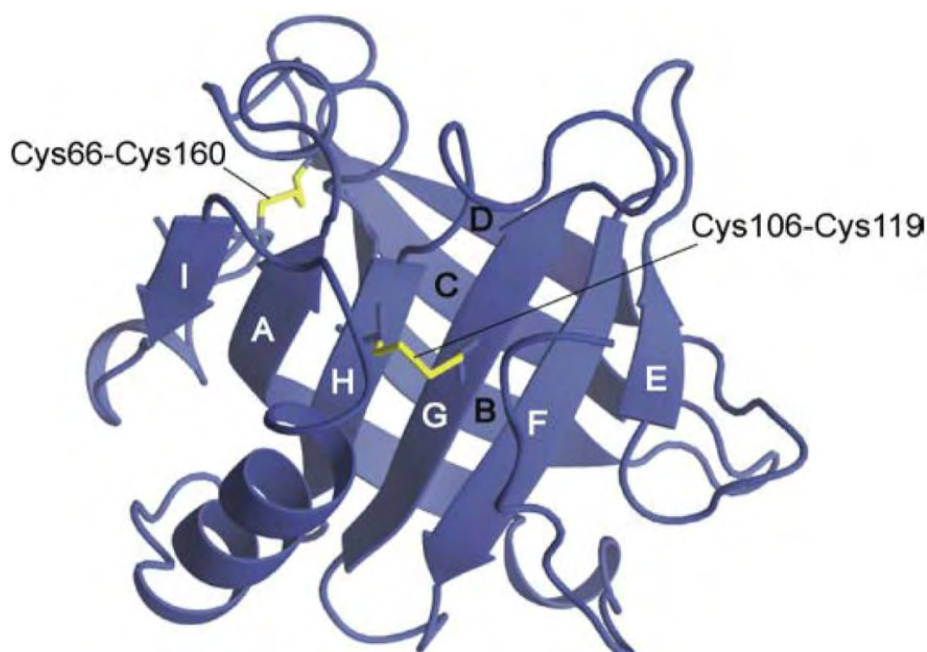
➤ **ανοσοσφαιρίνες (Igs):** IgG1, IgG2, IgA, IgM.



Εικόνα 7: Μοριακές δομές των ανοσοσφαιρινών IgG, IgA & IgM που περιλαμβάνονται στις πρωτεΐνες του ορού του βόειου γάλακτος.^[16]

2.2 β-ΓΑΛΑΚΤΟΣΦΑΙΡΙΝΗ (β-Lg)

Συνιστά την κύρια οροπρωτεΐνη (0,2-0,4% των συστατικών του γάλακτος) και απαντάται σε 7 γενετικές παραλλαγές, οι οποίες χαρακτηρίζονται ως A, B, C, D, E, F, G και Dr (Droughtmaster). Η ποικιλία β-Lg B απαντάται κυρίως στο γάλα των βοοειδών και έχει 162 αμινοξέα στο μόριο της. Τον ίδιο αριθμό αμινοξέων έχουν και οι άλλες παραλλαγές με ποιοτικές μόνο διαφορές ως προς τα αμινοξέα. Η παραλλαγή Dr έχει επιπλέον μια υδατανθρακική αλυσίδα στο πεπτίδιο που ορίζεται μεταξύ των θέσεων 15 και 40. Η υδατανθρακική αυτή αλυσίδα αποτελείται από N-ακετυλονευραμινικό οξύ, γλυκοζαμίνη, γαλακτοζαμίνη, μαννόζη και γαλακτόζη.^[17] Συνιστά το 10% του συνόλου των πρωτεϊνών του γάλακτος και το 50% των πρωτεϊνών του τυρογάλακτος. Φυσιολογικά, απαντάται ως διμερές με $M_{\text{subunit}} \approx 18.400 \text{ gr/mol}$. Κάθε μονομερές περιλαμβάνει 162 αμινοξικά κατάλοιπα, μ' ένα ελεύθερο κατάλοιπο Cys και 2 δισουλφιδικές γέφυρες.



Εικόνα 8: Δισουλφιδικές γέφυρες μεταξύ Cys106-Cys119 και Cys66-Cys160 στο μονομερές της β-Lg. [RCSB Protein Data Bank (PDB) coordinates 1BSY]^[18]

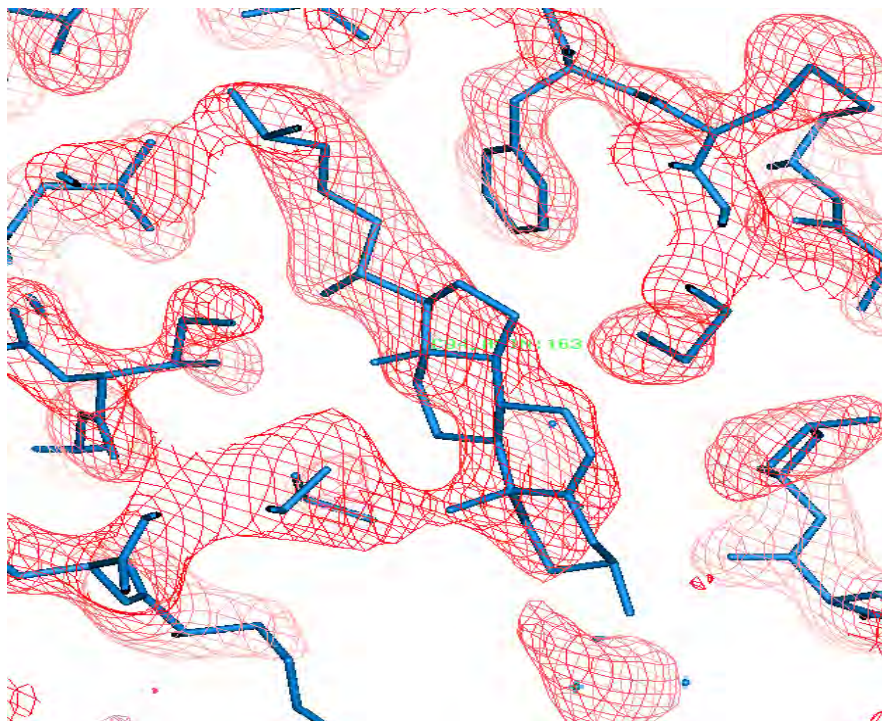
Αποτελεί μέλος της υπεροικογένειας των πρωτεϊνών που ονομάζονται λιποκαλίνες, με χαρακτηριστική δομή ενός β-βαρελίου με οκτώ

αντιπαράλληλους β-κλώνους.^[19] Οι συγκεκριμένες είναι φυσικοί φορείς για βιοδραστικές ενώσεις, καθώς αποτελούν πρωτεΐνες που δεσμεύουν υδρόφοβους προσδέτες^[20] (π.χ. βιταμίνες, λιπαρά οξέα, ρετινόλη) και έχουν ένα δυναμικό ρόλο στην πρόσδεση, προστασία και μεταφορά βιοδραστικών συστατικών σε λειτουργικά τρόφιμα, εξαιτίας της ικανότητάς τους να σχηματίζουν σύμπλοκα πρωτεΐνης – προσδέτη, πιθανόν προστατεύοντας τα συστατικά από την οξειδωση και αποικοδόμηση και επίσης παρέχοντας το μέσο της επαγόμενης από ερέθισμα απελευθέρωσης. Έτσι, δρα ως εξειδικευμένος μεταφορέας, όπως η οροπρωτεΐνη που προσδένει ρετινόλη (Retinol Binding Protein, RBP).^[20] Τέλος, εμπλέκεται στη ρύθμιση της ενζυμικής δραστηριότητας της προγαστρικής λιπάσης.^[21,22]

Η β-γαλακτοσφαιρίνη (β-Lg) συντίθεται στο μαστικό αδένα της αγελάδας, εκκρίνεται στο γάλα και απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1934.^[23] Προκαλεί μια αλλεργική αντίδραση στον άνθρωπο και αποτελεί μία από τις αιτίες της αλλεργίας στο αγελαδινό γάλα. Αποτελεί υποπροϊόν από την παραγωγή τυριού του βόειου γάλακτος και συνιστά το 50-65% των ξηρών στερεών των οροπρωτεϊνών ή το 10-12% των ολικών πρωτεϊνών του αγελαδινού γάλακτος. Εξαιτίας της αφθονίας της και της σχετικά εύκολης απομόνωσής της στη φυσική μορφή της, η β-γαλακτοσφαιρίνη χρησιμοποιείται ευρύτατα στη βιομηχανία για την αύξηση των πρωτεϊνικών περιεχομένων σε τρόφιμα και ποτά. Η βόεια β-Lg είναι μια εμπορικά σημαντική οροπρωτεΐνη του γάλακτος με μη απόλυτα σαφή βιολογική λειτουργία, αν και είναι προφανής η υψηλή διατροφική της αξία. Αυτή η πρωτεΐνη δεσμεύει μια ποικιλία προσδετών στον κεντρικό κάλυκά της. (Εικόνες 9,10).^[19,20,24,25] Η τρισδιάστατη δομή και η αμινοξική αλληλουχία της β-γαλακτοσφαιρίνης επιβεβαιώνουν ότι ανήκει στην οικογένεια των λιποκαλινών.^[20]



Εικόνα 9: Τρισδιάστατη απεικόνιση του συμπλόκου της λιποκαλίνης β-γαλακτοσφαιρίνης (β-Lg) με το παλμιτικό οξύ (PA). Στον κεντρικό κάλυκα της πρωτεΐνης καθίσταται ορατή η θέση σύνδεσης του προσδέτη (πλήρης ατόμων).
[RCSB Protein Data Bank (PDB) coordinates 1BSY-1GXA complex]^[19]



Εικόνα 10: Χάρτης ηλεκτρονικής πυκνότητας γύρω από τον εσωτερικό κάλυκα πρόσδεσης της βόειας β-Lg που σχηματίζει σύμπλοκο με τη χοληστερόλη.^[20]

2.2.1 Λιποκαλίνες

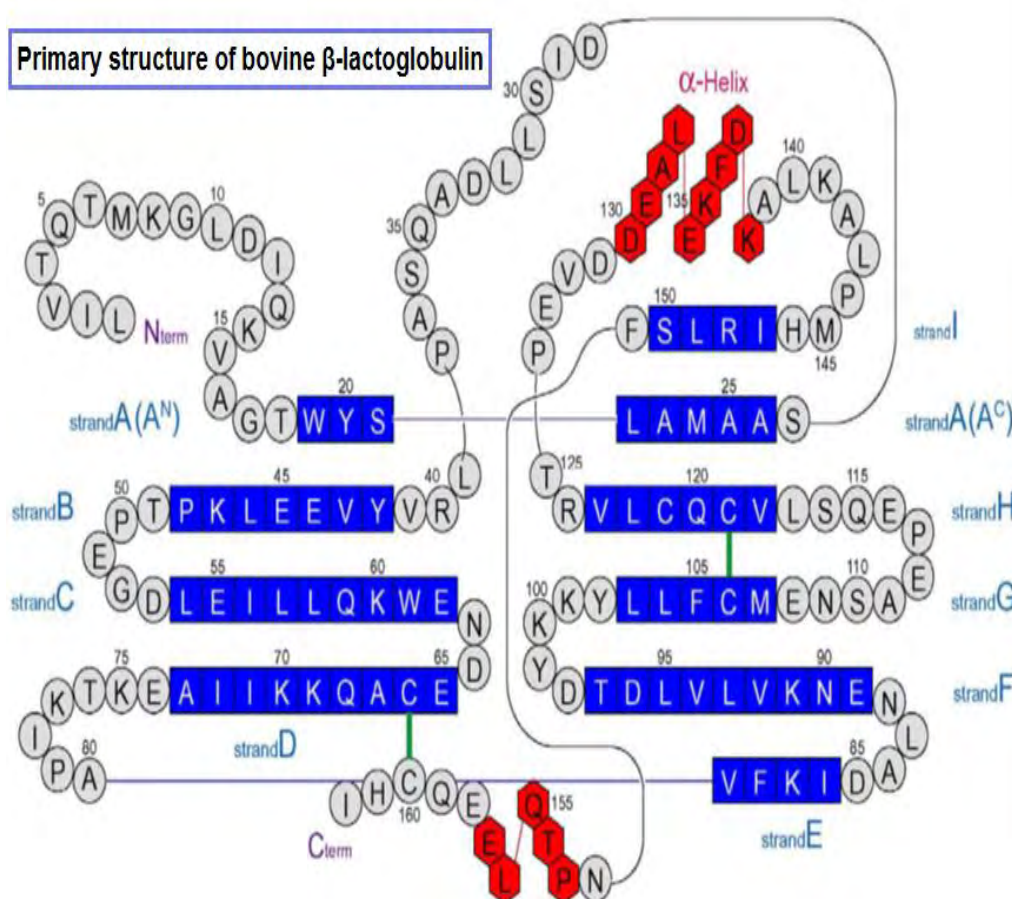
Η β-γαλακτοσφαιρίνη συγκαταλέγεται στην υπεροικογένεια των καλυσινών και στην οικογένεια των λιποκαλινών. Οι λιποκαλίνες είναι τυπικά μικρές (160-180 κατάλοιπα σε μήκος), εξωκυτταρικές πρωτεΐνες και είναι ικανές να προσδένουν μικρά υδροφοβικά μόρια (όπως η ρετινόλη), προσδένονται σε ειδικούς υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας και σχηματίζουν ομοιοπολικά και μη ομοιοπολικά σύμπλοκα με άλλα διαλυτά μακρομόρια. Οι πρωτεΐνες λιποκαλίνες έχουν επίσης ταξινομηθεί κυρίως ως πρωτεΐνες-μεταφορείς.^[26] Η οικογένεια των λιποκαλινών είναι μια μεγάλη και ποικίλη οικογένεια πρωτεϊνών με λειτουργίες που ποικίλουν από το καμουφλάζ εντόμων έως τη μεταφορά μικρών υδροφοβικών μορίων, με χαρακτηριστική την πρωτεΐνη του ορού του γάλακτος που προσδένει τη ρετινόλη.^[27] Οι μέχρι τώρα προσδιορισμένες κρυσταλλικές δομές αποκαλύπτουν ότι η τυπική λιποκαλίνη είναι ένα β-βαρέλι με οχτώ αντιπαράλληλους β-κλώνους διευθετημένους με τέτοιο τρόπο ώστε να σχηματίζουν έναν κωνικό κεντρικό κάλυκα ή κοιλότητα, όπου εντοπίζεται ο υδροφοβικός προσδέτης.^[28]

2.2.2 Δομή β-γαλακτοσφαιρίνης

Η β-Lg είναι μία μικρή πρωτεΐνη σφαιρίνη, διαλυτή σε αραιό διάλυμα άλατος^[20] παρουσιάζει σταθερότητα σε pH 2,^[19,29,30] με 162 αμινοξικά κατάλοιπα (MW ~18.400 Daltons) για κάθε μονομερές το οποίο αναδιπλώνεται σ' ένα 8-κλωνο, αντιπαράλληλο β-βαρέλι με μια α-έλικα τριών στροφών στην εξωτερική επιφάνεια και ένας ένατος β-κλώνος πλευρικά του πρώτου κλώνου. Οι δομές της τριγωνικής κρυσταλλικής μορφής της παραλλαγής A της βόειας β-γαλακτοσφαιρίνης σε pH 6.2, 7.1 και 8.2 έχουν προσδιοριστεί με μεθόδους περίθλασης ακτίνων Χ. Η πλευρική αλυσίδα του Glu του καταλοίπου 89 είναι κρυμμένη σε pH 6.2 και εκτίθεται σε pH 7.1 και 8.2. Αυτή η χωροδιαταξική αλλαγή, συμπεριλαμβανομένου της θηλιάς 84-90, παρέχει μια δομική βάση για μια ποικιλία pH-εξαρτώμενων χημικών, φυσικών και φασματοσκοπικών φαινομένων, συλλογικά γνωστά ως μετάπτωση Tanford.^[31,32,33,34]

2.2.3 Κατάλοιπα και δευτεροταγείς δομές

Η β-γαλακτοσφαιρίνη περιέχει δύο δισουλφιδικούς δεσμούς (Cys 66 – Cys 160 και Cys 106 – Cys 119) και μία ελεύθερη θειολ-ομάδα (Cys 121) (Εικόνα 11).



Εικόνα 11: Μία σχηματική αναπαράσταση της πρωτοταγούς δομής της β-Lg, η οποία αποτελείται από 162 αμινοξικά κατάλοιπα, συμπεριλαμβανομένων 5 καταλοίπων Cys. 2 δισουλφιδικές γέφυρες εντοπίζονται στα κατάλοιπα Cys-106 με Cys-119 και Cys-66 με Cys-160. Μία ελεύθερη Cys βρίσκεται στη θέση 121.^[35] Ο κωδικός της βόειας β-Lg στην protein data bank (pdb) είναι 1BEB.^[36] Κατάλοιπα που συγκροτούν την α-έλικα, το β-πτυχωτό φύλλο και το βρόγχο αναπαρίστανται με εξάγωνα σε κόκκινο, τετράγωνα σε μπλε και κύκλους σε γκρι, αντίστοιχα. Οι πράσινες γραμμές υποδεικνύουν τις θέσεις των δισουλφιδικών δεσμών. Όπως απεικονίζεται η β-Lg έχει 2 β-πτυχωτά φύλλα. Οι B–D κλώνοι και το μισό N-τελικό άκρο του A κλώνου (σημαίνεται ως A^N) αποτελούν το ένα β-φύλλο, ενώ οι E–H κλώνοι και το μισό του C-τελικού άκρου του A κλώνου (σημαίνεται ως A^C) αποτελούν το άλλο β-πτυχωτό φύλλο.^[35]

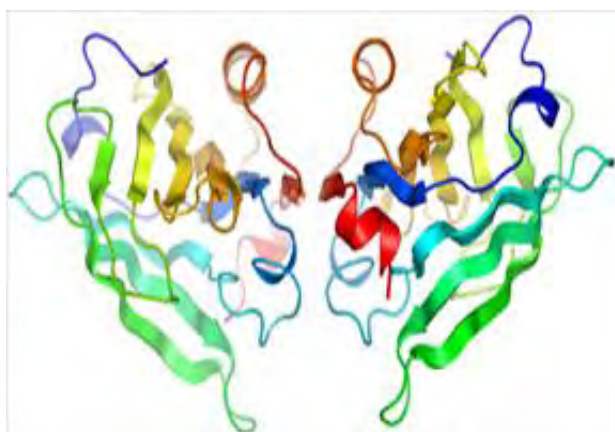
Δομές της β-Lg έχουν αναφερθεί από αρκετές ομάδες με κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ και μέθοδο NMR, οι οποίες αποδεικνύουν ότι πρόκειται κατά κύριο λόγο για πρωτεΐνη με δομή β-πτυχωτού φύλλου. Το β-βαρέλι ή όπως αποκαλείται κάλυκας, είναι κωνικό και δημιουργείται από δύο β-πτυχωτά φύλλα: οι Β–D κλώνοι και το Ν-τελικό μισό του Α κλώνου (δείχνεται ως AN) σχηματίζουν ένα β-πτυχωτό φύλλο καθώς και οι Ε–Η κλώνοι και το C-τελικό μισό του Α κλώνου (δείχνεται ως AC) σχηματίζουν το άλλο β-πτυχωτό φύλλο. Στην εξωτερική επιφάνεια του β-βαρελιού, μεταξύ των G και H κλώνων, εντοπίζεται η α-έλικα τριών στροφών. Οι βρόγχοι που συνδέουν τους β-κλώνους στο κλειστό άκρο του κάλυκα, οι BC, DE και FG είναι γενικά αρκετά μικροί, ενώ εκείνοι στο ανοιχτό άκρο, οι AB, CD, EF και GH είναι σημαντικά μεγαλύτεροι και περισσότερο εύκαμπτοι. Στον κάλυκα, υπάρχει μία μεγάλη κεντρική κοιλότητα, η οποία περιβάλλεται από υδροφοβικά κατάλοιπα και είναι προσιτή στο διαλύτη. Αυτή η κοιλότητα παρέχει την κύρια θέση σύνδεσης του προσδέτη (Εικόνα 9).^[37]

2.2.4 Γενετικές παραλλαγές

Γενετικά, η β-γαλακτοσφαιρίνη μπορεί να υπάρχει ως μία από τις αρκετές παραλλαγές, ανάμεσα στις οποίες οι παραλλαγές A και B είναι οι πιο άφθονες. Οι A και B παραλλαγές της πρωτεΐνης διαφέρουν η μία από την άλλη στα αμινοξικά κατάλοιπα στις θέσεις Asp64 (Gly64 στην παραλλαγή B) και Val118 (Ala118 στην παραλλαγή B). Αυτές οι διαφορές στην πρωτοταγή δομή καθιστούν τις δύο παραλλαγές ελαφρώς διαφορετικές όσον αφορά το ισοηλεκτρικό σημείο, τη διαλυτότητα, τις ιδιότητες αυτο-σύνδεσης, καθώς και την πίεση και τη θερμοκρασιακή σταθερότητα. Ωστόσο, τα δομικά χαρακτηριστικά των A και B παραλλαγών της βόειας β-Lg είναι ουσιαστικά όμοια. Στη φυσική της κατάσταση, η β-γαλακτοσφαιρίνη είναι κατά κύριο λόγο μία πρωτεΐνη με δομή β-πτυχωτού φύλλου που περιέχει εννιά β-κλώνους και τρεις α-έλικες. Ο πυρήνας της πρωτεΐνης σχηματίζεται από ένα πεπλατυσμένο β-βαρέλι (έναν κάλυκα) που συντίθεται από οκτώ αντιπαράλληλους β-κλώνους (Α έως Η).^[32]

2.2.5 Διμερές/Μονομερές

Σε φυσιολογικές συνθήκες, η πλειονότητα της βόειας β-γαλακτοσφαιρίνης σχηματίζει ένα διμερές (Εικόνα 12). Σε $\text{pH} < 3$, το διμερές διασπάται σε μονομερή τα οποία διατηρούν τη φυσική τους διαμόρφωση. Τα διμερή μόρια β-γαλακτοσφαιρίνης υπάρχουν στην ανοιχτή διαμόρφωση σε βασικό pH, ενώ υπάρχουν στην κλειστή διαμόρφωση σε όξινο pH, μετά από μετάπτωση Tanford που υφίστανται περίπου σε ουδέτερο pH.^[36]



Εικόνα 12: Το διμερές της β-Lg^[37]

2.2.6 Προσδέτες και ενεργές θέσεις

Η πραγματική λειτουργία της β-Lg είναι άγνωστη, αλλά έχει προταθεί ότι εμπλέκεται στη μεταφορά ρετινόλης και/ή λιπαρών οξέων. Προσδένει ρετινόλη με υψηλότερη συγγένεια απ' ό,τι η RBP.^[38,39] Η β-Lg περιέχει δύο κατάλοιπα τρυπτοφάνης, την Trp 19 στον A κλώνο και την Trp 61 στον C κλώνο. Η πρώτη εντοπίζεται στον υδροφοβικό πυρήνα, ενώ η δεύτερη εκτίθεται στο διαλύτη στη φυσική δομή, κάνοντας αυτές χρήσιμους ανιχνευτές για παρακολούθηση χωροδιαταξικών αλλαγών, οι οποίες είναι ειδικές ως προς τη θέση^[38] κι ο φθορισμός τους μεταβάλλεται όταν προσδένεται η ρετινόλη.^[40] Η συγκρυσταλλωμένη β-Lg με παλμιτικό οξύ και η καθαρή δομή αποκαλύπτει ότι ο προσδέτης δεσμεύεται στην κεντρική κοιλότητα μ' έναν τρόπο όμοιο με την πρόσδεση της ρετινόλης στη σχετική λιποκαλίνη, την οροπρωτεΐνη που προσδένει ρετινόλη. Η καρβοξυλομάδα συνδέεται στη Lys-60 και στη Lys-69 στην είσοδο της κοιλότητας. Η υδροφοβική ουρά εκτείνεται σε μία σχεδόν πλήρως εκτεταμένη διαμόρφωση στο κέντρο της πρωτεΐνης.^[25]

Επιπροσθέτως, μελέτες στην ισορροπία μονομερούς-διμερούς και στη δραστικότητα της θειολ-ομάδας της Cys121, η οποία εντοπίζεται “θαμμένη” βαθιά μεταξύ της α- έλικας και του Η κλώνου, αποκάλυψαν άλλες σημαντικές ιδιότητες της β-Lg. Η σταθερότητα της δομής επίσης εξαρτάται σε τόσο μεγάλο βαθμό από την εξωτερική θηλιά κατά προσέγγιση στο κατάλοιπο 64 ή στον β κλώνο με την ελεύθερη θειολ-ομάδα.^[40] Η β-Lg έχει θέσεις πρόσδεσης για υδροφοβικούς (μη πολικούς) προσδέτες όπως τα λιπαρά οξέα (π.χ. οκτανοϊκό, δεκανοϊκό, λαυρικό, μυριστικό, παλμιτικό, βρωμοδεκανοϊκό, στεατικό, ολεϊκό, λινολεϊκό οξύ κ.α), τη βιταμίνη Α (ρετινόλη), τη βιταμίνη D₂ (εργοκαλσιφερόλη), τη βιταμίνη D₃ (χολεκαλσιφερόλη), το ρετινοϊκό οξύ, το μη ιονικό απορρυπαντικό DDM (n-Dodecyl-β-D-maltoside) καθώς και προσδέτες λακτόζης.^[41]

Η προσβασιμότητα στον κάλυκα είναι pH-εξαρτώμενη. Ανάλυση NMR και ακτίνων Χ έδειξε ότι η πρόσβαση διαμεσολαβείται από την ευκίνητη EF θηλιά. Όλες οι δομές με προσδέτες που δεσμεύονται στον κάλυκα εμφανίζουν μια ανοιχτή EF θηλιά, προτείνοντας ότι αυτή η θέση είναι προσβάσιμη σε ουδέτερο pH. Επιπλέον η χοληστερόλη και η βιταμίνη D₂ αποτελούν προσδέτες της βόειας β-Lg, καθώς συνδέονται η καθεμία ξεχωριστά στην κεντρική κοιλότητα πρόσδεσης της συγκεκριμένης πρωτεΐνης σε pH 7.3.^[20] Κανένας από τους δύο προσδέτες δεν είναι πλήρως ορατός στους χάρτες ηλεκτρονιακής πυκνότητας και οι λιγότερο καλά διατεταγμένες περιοχές είναι οι πολικές τελικές ομάδες στην είσοδο της θέσης πρόσδεσης.^[20]

Εκτός από τα οργανικά μόρια που αποτελούν προσδέτες της β-Lg, αποδείχτηκε μέσα από πειράματα ότι ακόμη και ιόντα μπορεί να παίζουν τον ίδιο ρόλο. Συγκεκριμένα, σ' ένα ξεχωριστό πείραμα που πραγματοποιήθηκε, ένα ιόν υδραργύρου (Hg²⁺) προσδέθηκε στην ελεύθερη Cys121 μ' έναν τρόπο που μετέδωσε μια μικρή δομική αλλαγή από το Asp137 διαμέσου της Arg148 στη διεπιφάνεια του διμερούς μορίου της β-Lg.^[20] Δεν είναι ξεκάθαρο εάν η γνωστή διάσταση που προκύπτει από την αντίδραση της β-Lg με το HgCl₂ απορρέει απ' αυτή τη διαταραχή.^[20] Η β-Lg, εκτός από την ικανότητά της να δεσμεύει μη πολικούς προσδέτες, μπορεί να συνδέει ακόμη και πολικούς (υδροφιλικούς) προσδέτες με χαρακτηριστικό παράδειγμα το σάκχαρο που επικρατεί στο γάλα, τη λακτόζη. Ενώ οι ακριβείς θέσεις δέσμησης των

υδροφοβικών προσδετών στον λιπόφιλο κάλυκα της β-Lg είναι γνωστές, οι θέσεις για υδροφιλικούς προσδέτες παραμένουν απροσδιόριστες.^[41] Μέσω της χρήσης του μοριακού ελλιμενισμού, αρχικά πραγματοποιήθηκε ανάλυση των θέσεων πρόσδεσης γνωστών λιπαρών οξέων με σκοπό να εξεταστούν προσεκτικά οι ατομιστικοί καθοριστικοί παράγοντές τους και έπειτα προβλέφθηκαν οι θέσεις αλληλεπίδρασης για τη λακτόζη με το μονομερές και το διμερές μόριο της β-Lg.^[41] Επικυρώθηκε η προσέγγιση έναντι των δομών της β-Lg που συγκρυσταλλώθηκαν με προσδέτες και αναφέρθηκε μια υπολογιστική οργάνωση με μειωμένο αριθμό εύκαμπτων καταλοίπων, τα οποία είναι ικανά ν' αναπαράγουν πειραματικά αποτελέσματα με υψηλή ακρίβεια.^[41] Τυφλοί ελλιμενισμοί με και χωρίς εύκαμπτες πλευρικές αλυσίδες στην β-Lg κατέδειξαν ότι: (1) 13 πειραματικά προσδιορισμένοι προσδέτες προσαρμόζονται στον κάλυκα, απαιτώντας ελάχιστη κίνηση μέχρι και 7 καταλοίπων από τα 23 που συγκροτούν αυτή τη θέση πρόσδεσης. (2) Η λακτόζη δεν προσδένεται στον κάλυκα παρά την στερεοδιαμορφωτική ευκαμψία, αλλά προσδένεται στη διεπιφάνεια του διμερούς και σε μία εναλλακτική θέση C. (3) Δεν εντοπίζονται προσβάσιμες λυσίνες κοντά στη θέση C. (4) Η λακτόζη σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου με κατάλοιπα και από τα δύο μονομερή, σταθεροποιώντας το διμερές μέσω μιας δομής που μοιάζει με δαγκάνα.^[41]

Συνολικά, αυτά τα αποτελέσματα βελτιώνουν την κατανόηση για τις θέσεις πρόσδεσης της β-Lg, ελαττώνοντας σημαντικά τα κατάλοιπα του κάλυκα που ελέγχουν τη σύνδεση του προσδέτη. Επιπλέον, τα αποτελέσματα δίνουν έμφαση στη σημασία της διεπιφάνειας του διμερούς ως μία ανεπαρκώς εξερευνημένη, βιολογικά σημαντική θέση πρόσδεσης ιδιαίτερης σημασίας για υδροφιλικούς προσδέτες. Επιπρόσθετα, οι αναλύσεις προτείνουν ότι η β-Lg είναι μία ισχυρή πρωτεΐνη σκαλωσιάς για πολλαπλή σύνδεση προσδετών, κατάλληλη για σχεδιασμό πρωτεϊνών καθώς προάγει την μοριακή κατανόηση των θέσεων δέσμευσης των προσδετών της σε σημείο που επιτρέπει τον επιδέξιο χειρισμό για τον έλεγχο της πρόσδεσης.^[41]

2.2.7 Βιολογική λειτουργία

Εκτός από προσδένουσα πρωτεΐνη, η β-Lg επίσης θεωρείται ότι έχει λειτουργία μεταφορέα ειδικά για διάφορους προσδέτες μέσω του πεπτικού

συστήματος, καθώς ο κάλυκας μπορεί να προστατεύει οποιονδήποτε προσδέτη εισχωρεί/δεσμεύεται στην κοιλότητα.^[20]

2.2.8 Χρήσεις / Εφαρμογή

2.2.8.1 Βιομηχανία Τροφίμων & Φαρμακοβιομηχανία

Η αλληλεπίδραση της β-γαλακτοσφαιρίνης με υδροφοβικά μόρια και με άλλες πρωτεΐνες, καθώς και η ευαισθησία της σε χημική, θερμική και βαρική αποδιάταξη, όλα με σκοπό την καθιέρωση σχέσεων ανάμεσα στη δομή, στις ιδιότητες και στη λειτουργικότητα καθώς και στη δυναμική χρήση της στη βιομηχανία τροφίμων και φαρμάκων.^[24] Η βιομηχανία τροφίμων έχει ευρέως αξιοποιήσει την β-Lg για να αυξήσει τη λειτουργικότητα (αισθητήρια, σύσταση, θρεπτική) σε εμπορικές τροφές και την εφαρμογή σε ποτά καθώς επίσης και ως οικονομική πηγή πρωτεΐνης για την αύξηση του συνολικού πρωτεϊνικού περιεχομένου του προϊόντος τους. Πρόσφατα, η φαρμακοβιομηχανία ερευνά και αναπτύσσει το σχεδιασμό φαρμάκων που χρησιμοποιούν την β-Lg ως φορέα στη μεταφορά αντιοξειδωτικών, φαρμάκων και βιταμινών στο έντερο.^[42]

2.2.8.2 Αντιοξειδωτική φύση

Στη γαλακτοβιομηχανία, το βόειο γάλα συχνά θερμαίνεται για παστερίωση (62,5°C για 30 min) και αποστείρωση. Αυτή η θερμική επεξεργασία μπορεί να επάγει οξειδωτικές απώλειες πρωτεϊνών, ακόρεστων λιπιδίων, βιταμινών, ενεργών ενζύμων και ανοσολογικών παραγόντων. Η σύνδεση των ελεύθερων θειολ-ομάδων της β-Lg με θέρμανση (100 °C για 2 min) ή η χημική τροποποίηση της β-Lg με καρβοξυμεθυλίωση για να μπλοκάρει τις θειολ-ομάδες, κατέληξε σε σημαντική απώλεια της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας. Τα δεδομένα προτείνουν ότι η Cys-121 παίζει ένα βασικό ρόλο στην αντιοξειδωτική φύση της β-Lg. Επειδή η β-Lg είναι εξαιρετικά ευαίσθητη στη θερμική αποδιάταξη, για να διατηρήσει την αντιοξειδωτική της φύση, τα γαλακτοκομικά προϊόντα που καταναλώνονται καθημερινά, δεν πρέπει να υπερθερμαίνονται με σκοπό να διατηρούν την αντιοξειδωτική της φύση.^[35]

Από τις οροπρωτεΐνες, η β-γαλακτοσφαιρίνη κατέχει το μεγαλύτερο ποσοστό, αποτελεί άφθονη πηγή αμινοξέων διακλαδισμένης αλυσίδας ειδικά της Leu, η

οποία παίζει ένα ρόλο-κλειδί στην έναρξη της μεταγραφής της πρωτεϊνοσύνθεσης που επιταχύνει την ανάκαμψη και την προσαρμογή στο στρες (άσκηση) καθώς επίσης και μια Cys με ελεύθερη θειολ-ομάδα, η οποία χρησιμοποιείται (απαιτείται) στο σώμα για να παράγει την αντιοξειδωτική γλουταθειόνη.^[43]

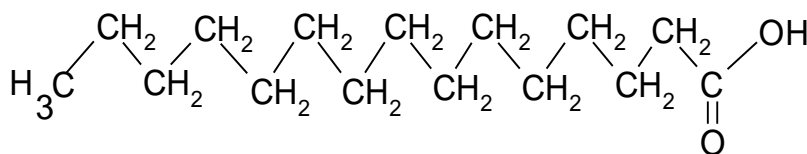
2.3 ΛΙΠΑΡΑ ΟΞΕΑ ΩΣ ΠΡΟΣΔΕΤΕΣ ΤΗΣ β-Lg

Η μεγαλύτερη και πιο πολύ μελετημένη ομάδα προσδετών της β-γαλακτοσφαιρίνης είναι αυτή των λιπαρών οξέων. Λιπαρά οξέα είναι τα αλειφατικά μονοκαρβονικά οξέα. Τα περισσότερα απ' αυτά έχουν άρτιο αριθμό ατόμων άνθρακα. Υπάρχουν τόσο κορεσμένα λιπαρά οξέα όσο και ακόρεστα με έναν ή περισσότερους διπλούς δεσμούς. Από τα κορεσμένα λιπαρά οξέα, τα πιο διαδεδομένα στη φύση είναι το παλμιτικό οξύ και το στεατικό οξύ, ενώ από τ' ακόρεστα τα λιπαρά οξέα παλμιτελαϊκό, ελαϊκό, λινελαϊκό και λινολενικό.^[44,45]

Οι Spector και Fletcher έδειξαν ότι η β-Lg προσδένει με την πιο υψηλή συγγένεια παλμιτικό, στεατικό και ακόρεστο ολεϊκό οξύ.^[21,46] Επίσης, η β-γαλακτοσφαιρίνη παρουσιάζει υψηλή συγγένεια για άλλα μακριάς αλυσίδας ακόρεστα cis λιπαρά οξέα, π.χ. λινολεϊκό και λινολενικό οξύ.^[47] Δείχτηκε ότι η συγγένεια με φυσικά ακόρεστα λιπαρά οξέα σε cis στερεοδιάταξη είναι υψηλότερη απ' ότι σε trans ισομερή.^[47] Οι πιο πολλές μελέτες έδειξαν ότι η β-Lg προσδένει μόρια ενός λιπαρού οξέος ανά μονομερές, αν και μερικές μελέτες υπέδειξαν μεγαλύτερο αριθμό προσδετών.^[47,48] Μεταξύ των προσδετών της β-Lg περιλαμβάνονται επίσης λιπαρά οξέα που έχουν ευεργετικές επιδράσεις στην ανθρώπινη υγεία όπως το cis-παριναρικό οξύ, το οποίο έχει δυναμική αντικαρκινική δραστηριότητα^[49] ή εικοσιδυοεξαενοϊκό οξύ (DHA) που χρησιμοποιείται στην πρόληψη και θεραπεία καρδιαγγειακών ασθενειών και δυσλειτουργίας του ανοσοποιητικού συστήματος.^[48] Άλλες μελέτες δείχνουν ότι η β-Lg μπορεί επίσης να προσδένει συζευγμένο λινολεϊκό οξύ (CLA) – μίγμα ισομερών θέσης και στερεοδιαμόρφωσης (cis, trans) δεκαοκταδιενοϊκού οξέος.^[50] Το σύμπλοκο β-Lg – CLA παρουσιάζει πολύ καλή σταθερότητα σε γαστρεντερικές συνθήκες in vitro και μπορεί

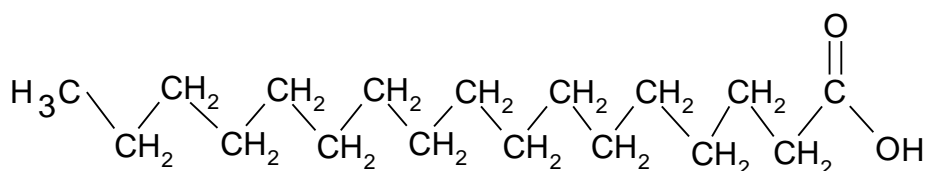
ενδεχομένως να χρησιμοποιηθεί ως φορέας του CLA για ενδοκυττάρια μεταφορά στη στοχευμένη θεραπεία του καρκίνου του εντέρου.^[51]

Πρόσφατα αποδείχτηκε ότι το σύμπλοκο β-Lg με το άλας νατρίου του ολεϊκού οξέος είναι υπεύθυνο για κυτταροτοξικότητα έναντι των ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων.^[52] Ακόμη βρέθηκε ότι το σύμπλοκο β-Lg με λινελαϊκό οξύ προστατεύει τα Caco-3 κύτταρα από τις κυτταροτοξικές επιδράσεις του λινελαϊκού και έχει προταθεί ότι η β-Lg μπορεί να δρα ως μοριακός μεταφορέας που μεταβάλλει την βιοπροσβασιμότητα του λινελαϊκού/λινολεϊκού οξέος.^[53] Στην παρούσα εργασία μελετώνται 2 συνθετικά λιπαρά οξέα, τα οποία δεν απαντώνται στη φύση αλλά είναι τεχνητά, το δεκαπεντανοϊκό οξύ [**Pentadecanoic acid, PDA**] & το δεκαεπτανοϊκό οξύ [**Heptadecanoic acid, HDA**] ως προσδέτες της βόειας β-Lg με τη μέθοδο ITC. Το PDA είναι σπάνιο στη φύση και εντοπίζεται σε ποσοστό του 1,2% στο λίπος του βόειου γάλακτος.^[54] Το HDA απαντάται ως ιχνοστοιχείο στο λίπος και στο λίπος του γάλακτος των μηρυκαστικών.^[55]



Pentadecanoic acid (C15), $C_{15}H_{30}O_2$

Εικόνα 13: Σκελετική δομή του συνθετικού κορεσμένου λιπαρού οξέος, δεκαπεντανοϊκού οξέος [**Pentadecanoic acid, PDA**].



Heptadecanoic acid (C17), $C_{17}H_{34}O_2$

Εικόνα 14: Σκελετική δομή του συνθετικού κορεσμένου λιπαρού οξέος, δεκαεπτανοϊκού οξέος [**Heptadecanoic acid, HDA**].

2.4 ΘΕΡΜΙΔΟΜΕΤΡΙΑ ΙΣΟΘΕΡΜΗΣ ΤΙΤΛΟΔΟΤΗΣΗΣ (ISOTHERMAL TITRATION CALORIMETRY–ITC) – ΜΕΛΕΤΗ ΠΡΟΣΔΕΣΗΣ ΛΙΠΑΡΩΝ ΟΞΕΩΝ ΣΤΗΝ β-Lg

Η Θερμιδομετρία Ισόθερμης Τιτλοδότησης (Isothermal Titration Calorimetry-ITC) αποτελεί μία σημαντική μέθοδο για το χαρακτηρισμό των μοριακών αλληλεπιδράσεων καθώς και για την κατανόηση της θερμοδυναμικής της πρόσδεσης βιολογικών μορίων και βιολογικών συστημάτων.^[56]

Αποτελεί τη μοναδική τεχνική που καθιστά δυνατή την απευθείας μέτρηση της ενεργητικής της πρόσδεσης βιολογικών διαδικασιών, περιλαμβάνοντας τη σύνδεση διαφόρων συμπλόκων όπως: (α) πρωτεΐνης – προσδέτη, (β) πρωτεΐνης – πρωτεΐνης, (γ) πρωτεΐνης – DNA, (δ) πρωτεΐνης – υδατάνθρακα, (ε) πρωτεΐνης – λιπιδίου και (στ) αντιγόνου – αντισώματος. Η τεχνική ITC προσδιορίζει με ακρίβεια σ' ένα και μόνο πείραμα τις εξής θερμοδυναμικές παραμέτρους πρόσδεσης: την ελεύθερη ενέργεια πρόσδεσης Gibbs (ΔG), τη σταθερά πρόσδεσης (K_b), τη στοιχειομετρία της αντίδρασης σύνδεσης (n), την ενθαλπία πρόσδεσης (ΔH), την εντροπία πρόσδεσης (ΔS) και τις μεταβολές θερμοχωρητικότητας (ΔC_p) σε σταθερή πίεση, οι οποίες συσχετίζονται με την πρόσδεση.^[56]

2.4.1 Τι καθοδηγεί την πρόσδεση

Κατά την αντίδραση πρόσδεσης καθενός ξεχωριστά από τα συνθετικά κορεσμένα λιπαρά οξέα PDA και HDA στην πρωτεΐνη β-Lg του ορού του βόειου γάλακτος, παρατηρείται μη ομοιοπολική αλληλεπίδραση των 2 μορίων μέσω υδροφοβικών ομάδων ή τμημάτων. Η εξειδίκευση προκύπτει από τη συμπληρωματικότητα του σχήματος και της πολικότητας, τη δημιουργία δεσμών υδρογόνου, τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις κ.λπ.

Η πρόσδεση έχει ενθαλπικές και εντροπικές συνιστώσες. Στις ενθαλπικές συνιστώσες περιλαμβάνονται αυξημένοι δεσμοί υδρογόνου, καλύτερες αλληλεπιδράσεις van der Waals, ηλεκτροστατική σύζευξη κ.λπ. Οι χωροδιαταξικές αλλαγές (συνήθως μη ευνοϊκές) και η απελευθέρωση διατεταγμένων μορίων H_2O , όταν αλληλεπιδρούν υδροφοβικές ομάδες (πολύ ευνοϊκή) εντάσσονται στις εντροπικές συνιστώσες. Τα δύο μόρια που αλληλεπιδρούν και προσδένονται μεταξύ τους πρέπει να έχουν μεγαλύτερη συγγένεια το ένα για το άλλο απ' ό,τι για το διαλύτη.^[56]

2.4.2 Το πείραμα τιτλοδότησης

Γενικά πραγματοποιείται τιτλοδότηση του προσδέτη (τιτλοδότη) μέσα στην πρωτεΐνη “υποδοχέα” (πρότυπο ή τιτλοδοτούμενο διάλυμα). Επειδή στην προκειμένη περίπτωση η πρωτεΐνη-“υποδοχέας” β-Lg που μελετάται είναι περισσότερο δυσδιάλυτη από τα εξεταζόμενα λιπαρά οξέα-προσδέτες PDA και HDA, στα πειράματα τιτλοδότησης που διεξήχθησαν η β-Lg αποτελούσε τον τιτλοδότη και τοποθετήθηκε στη σύριγγα, ενώ καθένα ξεχωριστά από τα PDA και HDA συνιστούσαν το τιτλοδοτούμενο διάλυμα και τοποθετήθηκαν στο κεντρικό κελί του μηχανήματος ITC. Η στοιχειομετρία (“n”, αριθμός προσδετών/μόριο πρωτεΐνης) προσδιορίζεται από το ενδιάμεσο σημείο. Η σταθερά πρόσδεσης (“K_a” ή “K_b”, πόσο ισχυρά δεσμεύεται ο προσδέτης) και η ενθαλπία της πρόσδεσης (ΔH) προσδιορίζονται από την εφαρμογή της καμπύλης. Η **Θερμιδομετρία Ισόθερμης Τιτλοδότησης** παρέχει την **πιο ακριβή μέτρηση της K_a**. Στην περίπτωση του Nano - ITC, πραγματοποιείται μέτρηση της **θερμότητας σχηματισμού (ή διάσπασης) του μη ομοιοπολικού δεσμού** κι αυτή η πληροφορία χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό των θερμοδυναμικών παραμέτρων της πρόσδεσης. Συνεπώς, καθίσταται δυνατή η λήψη του **θερμοδυναμικού προφίλ της πρόσδεσης** που συναποτελείται από τη **σταθερά πρόσδεσης (K_b)**, την **ενθαλπία πρόσδεσης (ΔH)**, τη **στοιχειομετρία (n)**, την **εντροπία πρόσδεσης (ΔS)**, την **ελεύθερη ενέργεια πρόσδεσης (ΔG)** και τη **θερμοχωρητικότητα σε σταθερή πίεση (ΔC_p)**.

Γι’ αυτό λοιπόν, η Θερμιδομετρία Ισόθερμης Τιτλοδότησης αποτελεί τη μοναδική τεχνική προσδιορισμού που μπορεί να δώσει όλες τις παραπάνω πληροφορίες σ’ ένα και μόνο πείραμα!^[56]

ΔG	Gibbs Ελεύθερη Ενέργεια Σχηματισμού Αυθόρμητες αντιδράσεις, ΔG<0
K_b	Σταθερά Πρόσδεσης Δείχνει πόσο ισχυρά δεσμεύεται ο προσδέτης
n	Στοιχειομετρία Αριθμός θέσεων πρόσδεσης / μόριο στόχου

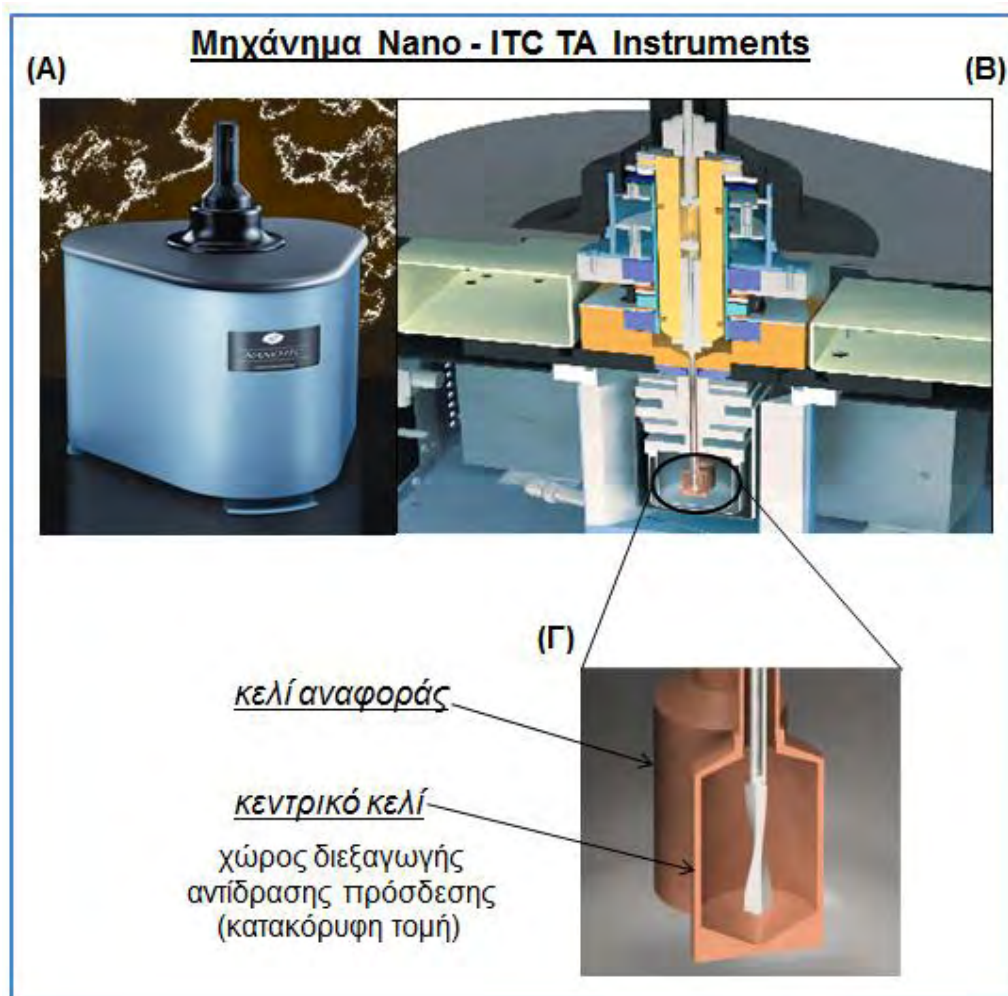
ΔH	Ενθαλπία Δείχνει το σχηματισμό συγκεκριμένων δεσμών υδρογόνου και τις αλληλεπιδράσεις van der Waals.
ΔS	Εντροπία Δείχνει το σχηματισμό υδροφοβικών ή μη ειδικών δεσμών.
ΔC_p	Θερμοχωρητικότητα Δείχνει χωροδιαταξικές αλλαγές που λαμβάνουν χώρα πάνω στην πρόσδεση.

Πίνακας 2: Θερμοδυναμικοί παράγοντες αντίδρασης πρόσδεσης^[56]

Το μηχάνημα ITC μετράει απευθείας την ενθαλπία πρόσδεσης (ΔH) και τη σταθερά πρόσδεσης (K_b). Η συγγένεια πρόσδεσης επηρεάζεται από την ενθαλπία (ΔH) και την εντροπία (ΔS).^[56]

2.4.3 Αρχές της μεθόδου ITC

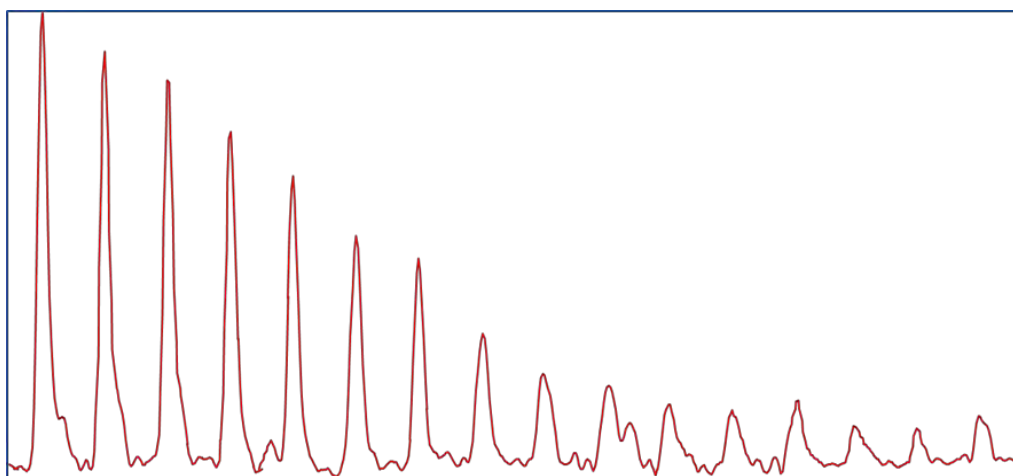
Οι αρχές στις οποίες βασίζεται η συγκεκριμένη τεχνική είναι οι εξής: (i) το όργανο που χρησιμοποιείται για τις μετρήσεις, αποτελεί ένα θερμιδόμετρο ροής θερμότητας που καθίσταται λειτουργικό σύμφωνα με την αρχή αντιστάθμισης της δυναμικής ενέργειας. Υπερευαίσθητα όργανα ITC όπως το Nano - ITC TA Instruments είναι ειδικά σχεδιασμένα να μετράνε τη σύνδεση του προσδέτη στην πρωτεΐνη και την κινητική της αντίδρασης (εικόνα 15).



Εικόνα 15: (A) Μηχάνημα Nano-ITC, (B) Εγκάρσια τομή μηχανήματος,
(Γ) Μεγέθυνση κελιών.^[56]

Εκτός από αυξημένη ευαισθησία, παρουσιάζουν χαμηλότερα όρια ανίχνευσης, τα οποία επιτρέπουν ακριβείς θερμικές μετρήσεις σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις απ' ό,τι ήταν δυνατόν προηγουμένως. (ii) Πραγματοποιείται μέτρηση του απαιτούμενου ποσού της ισχύος ($\mu\text{cal}/\text{sec}$) για τη διατήρηση μιας σταθερής θερμοκρασιακής διαφοράς μεταξύ του κελιού του δείγματος και του κελιού αναφοράς, τα οποία συνιστούν αναφορικά δύο από τα κύρια συστατικά μέρη του μηχανήματος ITC και θα αναλυθούν διεξοδικότερα παρακάτω. (iii) Αρχικά, το σύστημα ανατροφοδότησης εφαρμόζει συνεχώς μια μικρή ισχύ στο κελί του δείγματος, η οποία καθορίζει το επίπεδο της γραμμής αναφοράς. (iv) Κάθε ένεση από το διάλυμα της σύριγγας (προσδέτης) πυροδοτεί την αντίδραση πρόσδεσης, η οποία εξαρτάται από τη συγγένεια πρόσδεσης και τη συγκέντρωση των αντιδρώντων [μακρομόριο (**M**) & προσδέτης (**L**)] στο κελί

και σχηματίζεται ένα συγκεκριμένο ποσό του συμπλόκου μακρομορίου/προσδέτη (**ML**). (v) Ο σχηματισμός του συμπλόκου (ML) συνοδεύεται από απελευθέρωση (εξώθερμη αντίδραση) ή απορρόφηση (ενδόθερμη αντίδραση) θερμότητας, η οποία προκαλεί μια διαφορά στη θερμοκρασία μεταξύ των δύο κελιών. (vi) Το σύστημα ανατροφοδότησης είτε μειώνει είτε αυξάνει την εφαρμοζόμενη θερμική ισχύ για την αντιστάθμιση μιας τέτοιας θερμοκρασιακής ανισορροπίας. (vii) Μετά από κάθε ένεση, το σύστημα φτάνει στην εξισορρόπηση και η θερμοκρασιακή ισορροπία αποκαθίσταται. (viii) Συνεπώς, το καταγεγραμμένο σήμα δείχνει ένα πρότυπο τυπικής απόκλισης με τη μορφή μιας κορυφής. (ix) Με ολοκλήρωση της περιοχής κάτω από την κορυφή και θεωρώντας τη βασική γραμμή ως αναφορά, παρέχεται το ποσό της θερμότητας που σχετίζεται με την ένεση. (x) Καθώς το αντιδρών μόριο στο κελί γίνεται κορεσμένο, το θερμικό σήμα μειώνεται μέχρι μόνο τη θερμότητα υποβάθρου, εξαιτίας ενός μη συγκεκριμένου φαινομένου (π.χ. αραίωση προσδέτη, τριβή υγρών).^[56] (εικόνα 16)



Εικόνα 16: Διαγραμματική απεικόνιση του σήματος που λαμβάνεται από το μηχάνημα Nano - ITC.^[56]

3 ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Με την παρούσα εργασία γίνεται προσπάθεια μελέτης της πρόσδεσης συνθετικών κορεσμένων λιπαρών οξέων: δεκαπεντανοϊκού (PDA) και δεκαεπτανοϊκού (HDA) οξέος στη βόεια β-γαλακτοσφαιρίνη (bovine β-Lg) με τη Θερμιδομετρία Ισόθερμης Τιτλοδότησης (Isothermal Titration Calorimetry, ITC), με σκοπό το χαρακτηρισμό των μοριακών αλληλεπιδράσεων καθώς και την κατανόηση της θερμοδυναμικής της πρόσδεσης των προαναφερθέντων βιολογικών μορίων. Συνιστώντας μια παγκοσμίως εφαρμόσιμη μέθοδο, η Θερμιδομετρία Ισόθερμης Τιτλοδότησης έχει δύο βασικές εφαρμογές στις επιστήμες της ζωής. (α) Χρησιμοποιείται για τη μελέτη των αλληλεπιδράσεων πρόσδεσης μεταξύ πρωτεϊνών και φαρμάκων ή προσδετών και υποδοχέων καθώς και (β) για την ποσοτικοποίηση των ταχυτήτων της ενζυμικής κατάλυσης και της αναστολής του προϊόντος ή του φαρμάκου.

Γι' αυτό λοιπόν η μελέτη της πρόσδεσης συνθετικών μορίων στη β-Lg, πρωτεΐνη του ορού του βόειου γάλακτος με εξαιρετική αφθονία στη φύση, παρουσιάζει ιδιαίτερα σημαντικό ερευνητικό ενδιαφέρον στη Φαρμακολογία και συγκεκριμένα στον τομέα της Φαρμακογενωμικής, καθώς βοηθά στην ανακάλυψη νέων πρωτοποριακών τρόπων για τη βελτίωση του σχεδιασμού φαρμάκων που ήδη υπάρχουν, έτσι ώστε ν' αποκτήσουν περισσότερα πλεονεκτήματα (π.χ. μεγαλύτερη δραστικότητα, καλύτερη απορρόφηση από τον οργανισμό, λιγότερες παρενέργειες) ή νέων πιο προηγμένων φαρμάκων τελευταίας γενιάς. Η εξαιρετικής σημασίας μελέτη της πρόσδεσης συνθετικών λιπαρών οξέων, τα οποία δεν απαντώνται στη φύση μπορεί να μας δώσει πληροφορίες για τη χρήση της β-Lg ως ένα γενικότερο φορέα λιπόφιλων μορίων καθώς επίσης και για την αναγνώριση, πρόσδεση και μεταφορά φαρμάκων σε διάφορα σημεία του οργανισμού.

4 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

4.1 ΥΛΙΚΑ

- ✚ Protein: β -Lactoglobulin from bovine milk (by Sigma-Aldrich)
 $\geq 90\%$ (PAGE), lyophilized powder, M.W.= 18.400 g/mol

Synthetic saturated fatty acids: Ligands

- ✚ Pentadecanoic acid $\sim 99\%$ (capillary GC) (by Sigma-Aldrich)
Molecular form: $C_{15}H_{30}O_2$, M.W.= 242,40 g/mol
- ✚ Heptadecanoic acid $\geq 98\%$ (by Sigma-Aldrich)
Molecular form: $C_{17}H_{34}O_2$, M.W.= 270,45 g/mol
- ✚ Trizma® base Tris(hydroxymethyl)aminomethane (by Sigma-Aldrich)
Primary Standard and Buffer, $\geq 99.9\%$ (titration), crystalline
Molecular form: $NH_2C(CH_2OH)_3$, M.W.= 121,14 g/mol
- ✚ Buffer solution: Tris-HCl (100mM – pH 8)
- ✚ EtOH solution: Ethanol, absolute, 100% (by Sigma-Aldrich)
Molecular form: C_2H_5OH , M.W.= 46,07 g/mol
- ✚ MeOH solution: Methanol, $\geq 99,9\%$ (by Sigma-Aldrich)
Molecular form: CH_3OH , M.W.= 32,04 g/mol
- ✚ Filtered distilled water (f.dH₂O)
- ✚ Eppendorfs: 1,5 ml και 2 ml
- ✚ Αλουμινόχαρτο για ζύγιση
- ✚ Φίλτρα (0,4 μ m)

4.2 ΟΡΓΑΝΑ

- ✚ Μηχάνημα Nano-ITC TA Instruments
- ✚ Αναλυτικός ζυγός
- ✚ Αντλία κενού Buchner
- ✚ Αυτόματες πιπέτες
- ✚ Πεχάμετρο
- ✚ Συσκευή Vortex (χειροκίνητη & αυτόματη)
- ✚ Φυγόκεντρος

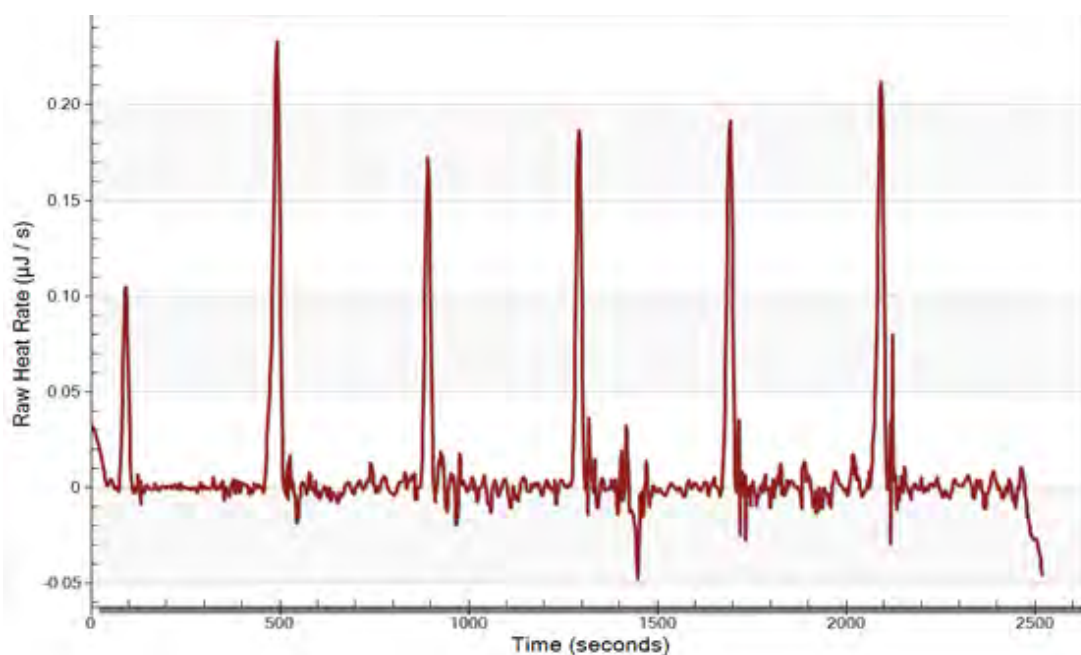
4.3 ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑΣ ΤΟΥ ΜΗΧΑΝΗΜΑΤΟΣ NANO-ITC: ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΤΙΤΛΟΔΟΤΗΣΗΣ ΜΟΝΟ ΜΕ dH₂O ΣΕ dH₂O

Αρχικά πραγματοποιήθηκαν πειράματα τιτλοδότησης, στα οποία χρησιμοποιήθηκε φιλτραρισμένο απεσταγμένο νερό (filtered dH₂O) τόσο ως τιτλοδότης μέσα στη σύριγγα, όσο και ως πρότυπο διάλυμα στο κεντρικό κελί και το κελί αναφοράς. Τα συγκεκριμένα πειράματα διεξήχθησαν με άμεσο σκοπό τη διαπίστωση της εξαιρετικά μεγάλης ευαισθησίας που διακρίνει το μηχάνημα Nano-ITC TA Instruments, το οποίο είχαμε στη διάθεσή μας στο εργαστήριο για την πραγματοποίηση των πειραμάτων. Αναφέρεται ότι στα διαγράμματα που έπονται, τα οποία ελήφθησαν κατά τη διεξαγωγή των παρακάτω πειραμάτων, κάθε κορυφή αντιστοιχεί σε μια απλή τιτλοδότηση του φιλτραρισμένου dH₂O μέσα σε φιλτραρισμένο dH₂O σε συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα και τα δεδομένα της τιτλοδότησης μετριοούνται σε μJ/sec.

4.3.1 1^ο Πείραμα

Πειραματική διαδικασία

Κατά το συγκεκριμένο πείραμα τιτλοδότησης τοποθετήθηκε 1,5 mL φιλτραρισμένου dH₂O στο κεντρικό κελί του μηχανήματος ITC, στη σύριγγα τοποθετήθηκαν 250 μL dH₂O και πραγματοποιήθηκαν 5 ενέσεις, 5 μL η καθεμία. Πριν την πραγματοποίηση των ενέσεων, το μηχάνημα έμεινε σε κατάσταση πειράματος 2 ώρες για να σταθεροποιηθεί και έπειτα πραγματοποιήθηκαν οι ενέσεις. Επίσης, στο κελί αναφοράς τοποθετήθηκε 1,5 mL φιλτραρισμένου dH₂O. Το χρονικό διάστημα μεταξύ των ενέσεων (injection interval) ορίστηκε στα 300 sec (5 min) και η θερμοκρασία ρυθμίστηκε στους 25° C στο μηχάνημα.



Εικόνα 17: Τιτλοδότηση φιλτραρισμένου απεσταγμένου νερού (filtered distilled H₂O) μέσα σε φιλτραρισμένο απεσταγμένο νερό.

Αποτελέσματα - Συζήτηση

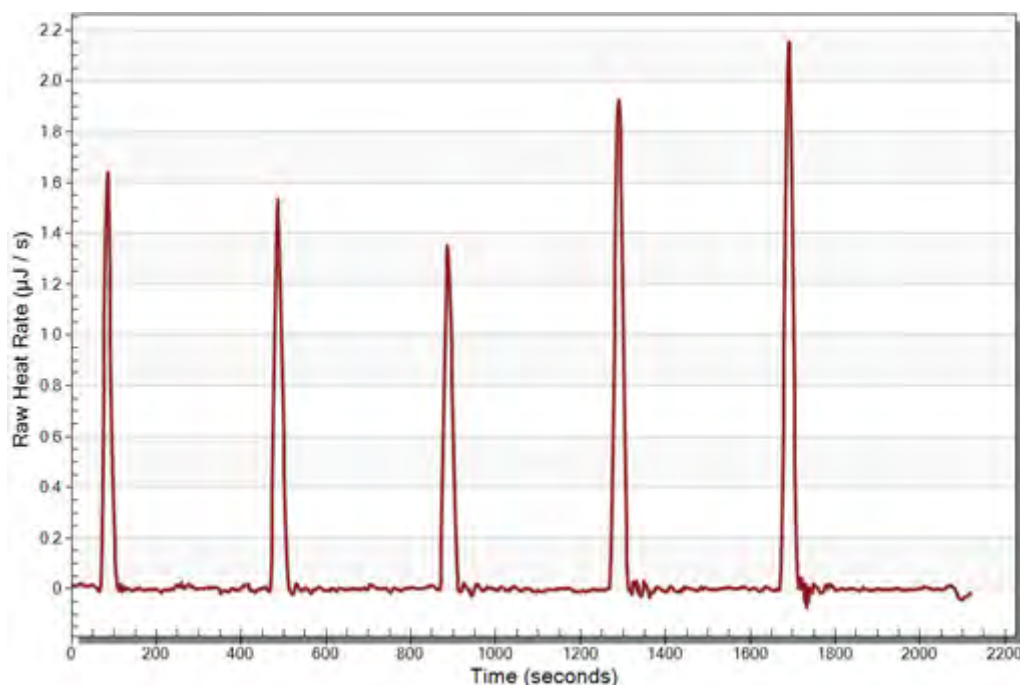
Κάθε κορυφή που απεικονίζεται στο διάγραμμα, αντιστοιχεί σε μια απλή τιτλοδότηση του φιλτραρισμένου dH₂O μέσα σε φιλτραρισμένο dH₂O κάθε 300 sec. Ο μέγιστος ρυθμός θερμότητας (max heat rate) που λήφθηκε από το συγκεκριμένο πείραμα είναι 4 μJ/ένεση και η αντίδραση είναι εξώθερμη.

Επομένως, σύμφωνα με το γράφημα και τις τιμές που προέκυψαν από το πείραμα, συμπεραίνεται ότι τα αποτελέσματα ήταν πολύ χαμηλά κάτι που αναμένεται για τη διάχυση νερού σε νερό.

4.3.2 2^ο Πείραμα

Πειραματική διαδικασία

1^η εκτέλεση: Σ' αυτό το πείραμα τιτλοδότησης τοποθετήθηκε 1,5 mL φιλτραρισμένου dH₂O στο κεντρικό κελί του μηχανήματος ITC, στη σύριγγα τοποθετήθηκαν 250 μL dH₂O και πραγματοποιήθηκαν 5 ενέσεις, 5 μL η καθεμία. Πριν την πραγματοποίηση των ενέσεων, το μηχάνημα έμεινε σε κατάσταση πειράματος 2 ώρες για να σταθεροποιηθεί και έπειτα πραγματοποιήθηκαν οι ενέσεις. Επισημαίνεται ότι χρησιμοποιήθηκε το ίδιο stock φιλτραρισμένου dH₂O με το 1^ο πείραμα. Επίσης, στο κελί αναφοράς τοποθετήθηκε 1,5 mL φιλτραρισμένου dH₂O. Το χρονικό διάστημα μεταξύ των ενέσεων (injection interval) ορίστηκε στα 300 sec (5 min) και η θερμοκρασία ρυθμίστηκε στους 25° C στο μηχάνημα.

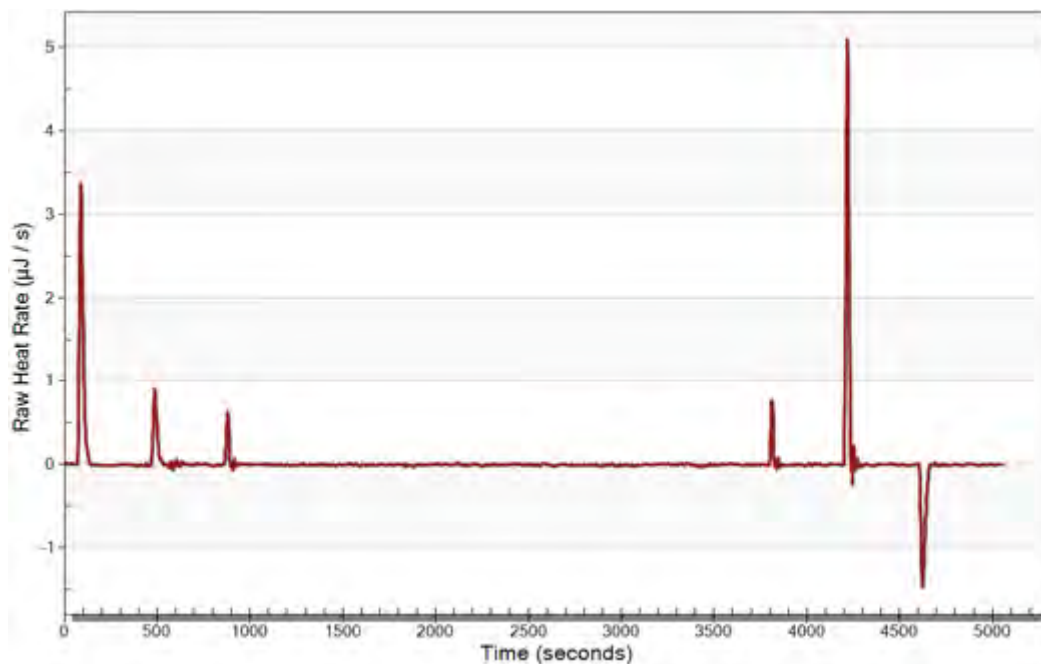


Εικόνα 18: Τιτλοδότηση φιλτραρισμένου απεσταγμένου νερού (filtered distilled H₂O) μέσα σε φιλτραρισμένο απεσταγμένο νερό.

Αποτελέσματα - Συζήτηση

Κάθε κορυφή που απεικονίζεται στο διάγραμμα, αντιστοιχεί σε μια απλή τιτλοδότηση του φιλτραρισμένου dH₂O μέσα σε φιλτραρισμένο dH₂O κάθε 300 sec. Ο μέγιστος ρυθμός θερμότητας (max heat rate) που λήφθηκε από το συγκεκριμένο πείραμα είναι 40 μJ/ένεση και η αντίδραση είναι εξώθερμη. Επομένως, σύμφωνα με το γράφημα και τις τιμές που προέκυψαν από το πείραμα, συμπεραίνεται ότι τα αποτελέσματα ήταν αρκετά υψηλά κάτι που δεν αναμένεται για τη διάχυση νερού σε νερό. Ενδεχομένως να υπήρχε κάτι μέσα στο κεντρικό κελί (π.χ. μικροσωματίδια σκόνης) που επέδρασε αρνητικά στα αποτελέσματα ή ίσως να συνέβαλε το γεγονός ότι χρησιμοποιήθηκε το ίδιο stock φιλτραρισμένου dH₂O του 1^{ου} πειράματος.

2^η εκτέλεση: Το φιλτραρισμένο dH₂O παρέμεινε το ίδιο στο κεντρικό κελί, όπως και στο κελί αναφοράς και στη σύριγγα καθώς το μηχάνημα δεν ανοίχτηκε και ρυθμίστηκε να γίνουν άλλες 5 ενέσεις, 5 μL η καθεμία. Μεταβλήθηκε μόνο το χρονικό διάστημα μεταξύ της 5^{ης} ένεσης της 1^{ης} εκτέλεσης και της 1^{ης} ένεσης της 2^{ης} εκτέλεσης, το οποίο έγινε 3600 sec (1h). Ακολούθως, ορίστηκε το χρονικό διάστημα των υπόλοιπων ενέσεων στα 300 sec (5 min). Η θερμοκρασία του πειράματος ρυθμίστηκε στους 25° C. Πριν την πραγματοποίηση των ενέσεων, το μηχάνημα έμεινε σε κατάσταση πειράματος 2 ώρες για να σταθεροποιηθεί και έπειτα πραγματοποιήθηκαν οι ενέσεις. Έπειτα μεσολάβησε ένα χρονικό διάστημα 1 ώρας μεταξύ της 5^{ης} και 6^{ης} ένεσης της 2^{ης} εκτέλεσης. Μετά ρυθμίστηκε να γίνουν ακόμη 5 ενέσεις, 5 μL η καθεμία, δίχως αντικατάσταση του φιλτραρισμένου dH₂O στο κεντρικό κελί, στο κελί αναφοράς και στη σύριγγα καθώς και πάλι το μηχάνημα δεν ανοίχτηκε. Οι ενέσεις 6^η έως και 10^η ρυθμίστηκαν να έχουν χρονικό διάστημα 300 sec/ένεση και η θερμοκρασία ρυθμίστηκε στους 25° C στο μηχάνημα. Πριν την πραγματοποίηση των ενέσεων, το μηχάνημα έμεινε σε κατάσταση πειράματος 2 ώρες για να σταθεροποιηθεί και έπειτα πραγματοποιήθηκαν οι ενέσεις.



Εικόνα 19: Τιτλοδότηση φιλτραρισμένου απεσταγμένου νερού (filtered distilled H₂O) μέσα σε φιλτραρισμένο απεσταγμένο νερό.

Αποτελέσματα - Συζήτηση

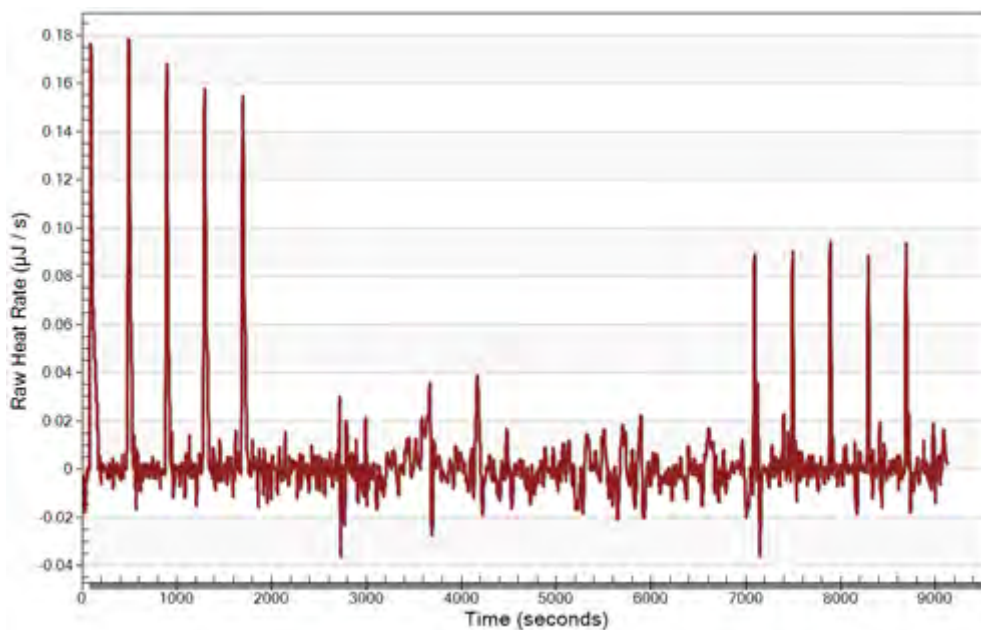
Κάθε κορυφή που απεικονίζεται στο διάγραμμα, αντιστοιχεί σε μια απλή τιτλοδότηση του φιλτραρισμένου dH₂O μέσα σε φιλτραρισμένο dH₂O στα συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα που προαναφέρθηκαν στην πειραματική διαδικασία της 2^{ης} εκτέλεσης. Ο μέγιστος ρυθμός θερμότητας (max heat rate) που λήφθηκε από το συγκεκριμένο πείραμα είναι 40 µJ/ένεση και η αντίδραση είναι εξώθερμη. Επομένως, σύμφωνα με το γράφημα και τις τιμές που προέκυψαν από το πείραμα, συμπεραίνεται ότι τα αποτελέσματα ήταν αρκετά υψηλά, κάτι που δεν αναμένεται για τη διάχυση νερού σε νερό. Λαμβάνοντας υπόψιν την 1^η και τη 2^η εκτέλεση του 2^{ου} πειράματος συνάγεται το συμπέρασμα ότι πιθανότατα για τα αποτελέσματα που ελήφθησαν, ευθύνονται μικροσωματίδια σκόνης (βρώμικο κελί) που εντοπίστηκαν στο κεντρικό κελί όπου πραγματοποιήθηκε η αντίδραση πρόσδεσης και όχι το ίδιο stock φιλτραρισμένου νερού του 1^{ου} πειράματος, παρότι μετά το πέρας κάθε πειράματος πραγματοποιούνταν λεπτομερής και εξονυχιστικός καθαρισμός του μηχανήματος και των εξαρτημάτων του.

Για άλλη μία φορά επιβεβαιώνεται η πολύ υψηλή ευαισθησία του μηχανήματος ITC, καθώς ακόμη και το απειροελάχιστο σωματίδιο σκόνης που τυχόν εντοπίζεται στο εσωτερικό του κεντρικού κελιού μπορεί να “δώσει” σήμα και να αλλοιώσει τα αποτελέσματα του πειράματος.

4.3.3 3^ο Πείραμα

Πειραματική διαδικασία

1^η εκτέλεση: Στο συγκεκριμένο πείραμα τιτλοδότησης τοποθετήθηκε 1,5 mL φιλτραρισμένου dH₂O στο κεντρικό κελί, στη σύριγγα τοποθετήθηκαν 250 μL dH₂O και πραγματοποιήθηκαν αρχικά 5 ενέσεις, 5 μL η καθεμία. Πριν την πραγματοποίηση των ενέσεων, το μηχάνημα έμεινε σε κατάσταση πειράματος 2 ώρες για να σταθεροποιηθεί και έπειτα πραγματοποιήθηκαν οι ενέσεις. Επισημαίνεται ότι χρησιμοποιήθηκε το ίδιο stock φιλτραρισμένου dH₂O με το 1^ο πείραμα. Στο κελί αναφοράς τοποθετήθηκε 1,5 mL απ’ αυτό το stock φιλτραρισμένου dH₂O. Το χρονικό διάστημα (injection interval) μεταξύ των ενέσεων 1^η - 5^η ορίστηκε στα 300 sec/ένεση (5 min) και η θερμοκρασία ρυθμίστηκε στους 25^ο C στο μηχάνημα. Αφέθηκε ένα χρονικό διάστημα (injection interval) 3600 sec (1h) μεταξύ 5^{ης} και 6^{ης} ένεσης χωρίς ν’ ανοίξει το μηχάνημα και έπειτα επιλέχθηκαν να γίνουν άλλες 5 ενέσεις (6^η -10^η), 5μL η καθεμία. Από την 6^η έως και τη 10^η ένεση, ρυθμίστηκε το χρονικό διάστημα μεταξύ κάθε ένεσης στα 300 sec (5 min) και η θερμοκρασία του πειράματος στους 25^ο C. Πριν την πραγματοποίηση των τελευταίων 5 ενέσεων, το μηχάνημα έμεινε σε κατάσταση πειράματος 2 ώρες για να σταθεροποιηθεί και έπειτα πραγματοποιήθηκαν οι ενέσεις.



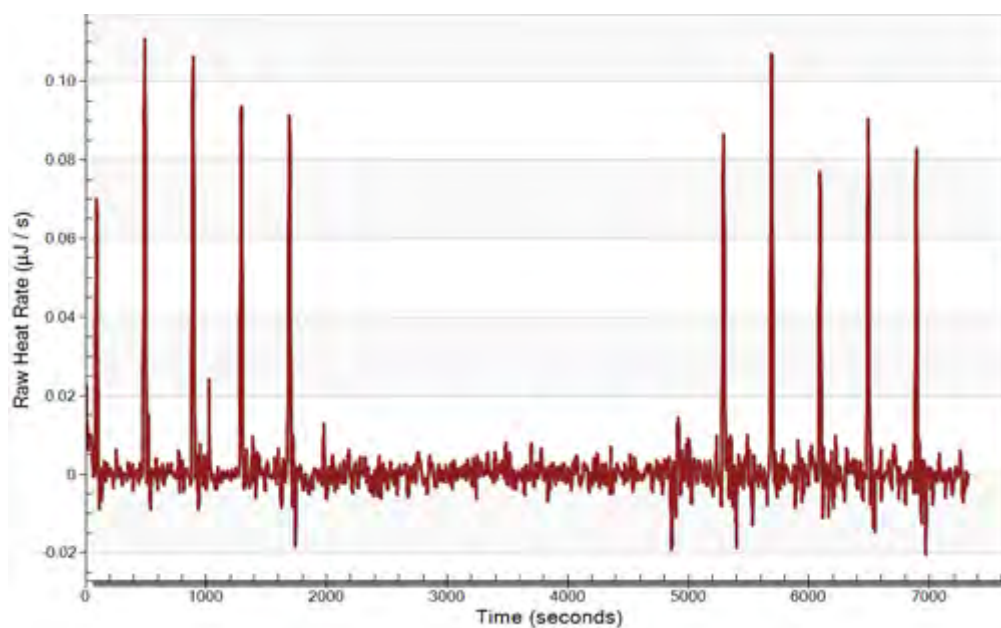
Εικόνα 20: Τιτλοδότηση φιλτραρισμένου απεσταγμένου νερού (filtered distilled H₂O) μέσα σε φιλτραρισμένο απεσταγμένο νερό.

Αποτελέσματα - Συζήτηση

Κάθε κορυφή που απεικονίζεται στο διάγραμμα, αντιστοιχεί σε μια απλή τιτλοδότηση του φιλτραρισμένου dH₂O μέσα σε φιλτραρισμένο dH₂O σε χρονικό διάστημα 300 sec/ένεση από 1^η -5^η ένεση, 3600 sec (1h) μεταξύ 5^{ης} και 6^{ης} ένεσης και 300 sec/ένεση από 6^η -10^η ένεση. Ο μέγιστος ρυθμός θερμότητας (max heat rate) που λήφθηκε από το συγκεκριμένο πείραμα είναι 3 µJ/ένεση και η αντίδραση είναι εξώθερμη. Επομένως, σύμφωνα με το γράφημα και τις τιμές που προέκυψαν από το πείραμα, συμπεραίνεται ότι τα αποτελέσματα ήταν εξαιρετικά καλά και αναμενόμενα για τη διάχυση νερού σε νερό. Στην προκειμένη περίπτωση το γεγονός ότι χρησιμοποιήθηκε για το συγκεκριμένο πείραμα το ίδιο stock φιλτραρισμένου dH₂O του 1^{ου} πειράματος, δε φαίνεται να επηρέασε αρνητικά τα αποτελέσματα όπως επιβεβαιώθηκε και στο 2^ο πείραμα.

2^η εκτέλεση: Ανοίχτηκε για λίγο το buret του μηχανήματος αλλά δεν αντικαταστάθηκε το φιλτραρισμένο dH₂O ούτε στο κεντρικό κελί, ούτε στο κελί αναφοράς ούτε και στη σύριγγα. Μετά τοποθετήθηκε και πάλι το buret στο

μηχάνημα και ρυθμίστηκε να γίνουν 5 ενέσεις, 5 μL η καθεμία. Ορίστηκε το χρονικό διάστημα των ενέσεων $1^{\text{η}}$ - $5^{\text{η}}$ στα 300 sec/ένεση (5 min) και η θερμοκρασία ρυθμίστηκε στους 25°C στο μηχάνημα. Πριν την πραγματοποίηση των ενέσεων, το μηχάνημα έμεινε σε κατάσταση πειράματος 2 ώρες για να σταθεροποιηθεί και έπειτα πραγματοποιήθηκαν οι ενέσεις. Μετά την πραγματοποίηση των 5 πρώτων ενέσεων, το buret δεν ανοίχτηκε ξανά και ρυθμίστηκε να γίνουν άλλες 5 ενέσεις, 5 μL η καθεμία, εφόσον μεσολάβησε ένα χρονικό διάστημα 30 min μεταξύ της $5^{\text{ης}}$ και $6^{\text{ης}}$ ένεσης. Από την $6^{\text{η}}$ έως και τη $10^{\text{η}}$ ένεση το χρονικό διάστημα ανά ένεση ρυθμίστηκε στα 300 sec (5 min) και η θερμοκρασία στους 25°C στο μηχάνημα. Πριν την πραγματοποίηση των ενέσεων $6^{\text{η}}$ - $10^{\text{η}}$, το μηχάνημα έμεινε σε κατάσταση πειράματος 2 ώρες για να σταθεροποιηθεί και έπειτα πραγματοποιήθηκαν οι ενέσεις.



Εικόνα 21: Τιτλοδότηση φιλτραρισμένου απεσταγμένου νερού (filtered distilled H_2O) μέσα σε φιλτραρισμένο απεσταγμένο νερό.

Αποτελέσματα - Συζήτηση

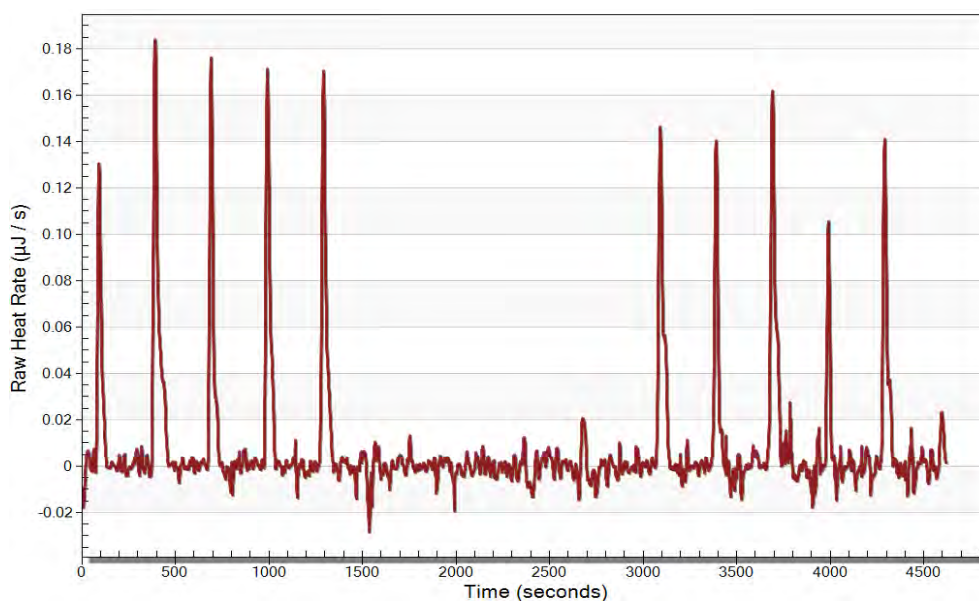
Κάθε κορυφή που απεικονίζεται στο διάγραμμα, αντιστοιχεί σε μια απλή τιτλοδότηση του φιλτραρισμένου dH_2O μέσα σε φιλτραρισμένο dH_2O σε χρονικό διάστημα 300 sec/ένεση από $1^{\text{η}}$ - $5^{\text{η}}$ ένεση, 1800 sec (30 min) μεταξύ

5^{ης} και 6^{ης} ένεσης και 300 sec/ένεση από 6^η -10^η ένεση. Ο μέγιστος ρυθμός θερμότητας (max heat rate) που λήφθηκε από το συγκεκριμένο πείραμα είναι 2 μJ/ένεση και η αντίδραση είναι εξώθερμη. Επομένως, σύμφωνα με το γράφημα και τις τιμές που προέκυψαν από το πείραμα, συμπεραίνεται ότι τα αποτελέσματα ήταν πολύ χαμηλά κάτι που αναμένεται για τη διάχυση νερού σε νερό. Συνεπώς, το άνοιγμα του buret δεν επέδρασε αρνητικά στα αποτελέσματα.

4.3.4 4^ο Πείραμα

Πειραματική διαδικασία

Κατά το συγκεκριμένο πείραμα τιτλοδότησης τοποθετήθηκε 1,5 mL φιλτραρισμένου dH₂O στο κεντρικό κελί από το stock νερού του 1^{ου} πειράματος, στη σύριγγα τοποθετήθηκαν 250 μL dH₂O και πραγματοποιήθηκαν 5 ενέσεις, 5 μL η καθεμία. Επίσης, στο κελί αναφοράς τοποθετήθηκε 1,5 mL φιλτραρισμένου dH₂O απ' το ίδιο stock. Το χρονικό διάστημα ανά ένεση ορίστηκε στα 300 sec για τις ενέσεις 1^η – 5^η και η θερμοκρασία ρυθμίστηκε στους 25°C στο μηχάνημα. Πριν την πραγματοποίηση των ενέσεων 1^η - 5^η, το μηχάνημα έμεινε σε κατάσταση πειράματος 2 ώρες για να σταθεροποιηθεί και έπειτα πραγματοποιήθηκαν οι ενέσεις. Έπειτα μεσολάβησε ένα χρονικό διάστημα 1 ώρας μεταξύ 5^{ης} και 6^{ης} ένεσης, χωρίς να ανοιχτεί το μηχάνημα και ακολούθως ρυθμίστηκε να γίνουν άλλες 5 ενέσεις, 5 μL η καθεμία. Στις ενέσεις 6^η - 10^η, ορίστηκε το χρονικό διάστημα ανά ένεση στα 300 sec και η θερμοκρασία ρυθμίστηκε στους 25° C στο μηχάνημα. Πριν την πραγματοποίηση των ενέσεων 6^η - 10^η, το μηχάνημα έμεινε σε κατάσταση πειράματος 2 ώρες για να σταθεροποιηθεί και έπειτα πραγματοποιήθηκαν οι ενέσεις.



Εικόνα 22: Τιτλοδότηση φιλτραρισμένου απεσταγμένου νερού (filtered distilled H₂O) μέσα σε φιλτραρισμένο απεσταγμένο νερό.

Αποτελέσματα - Συζήτηση

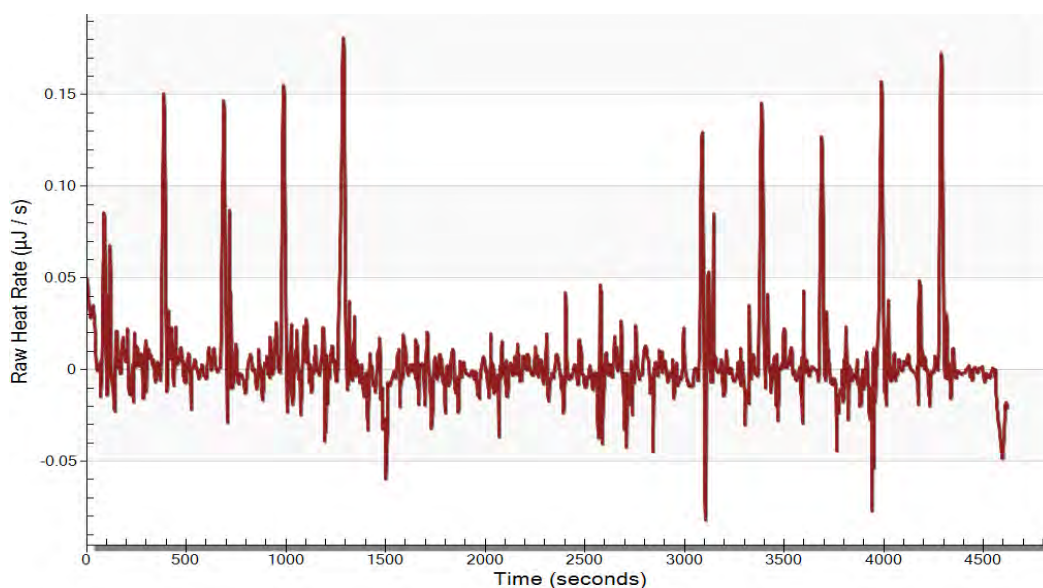
Κάθε κορυφή που απεικονίζεται στο διάγραμμα, αντιστοιχεί σε μια απλή τιτλοδότηση του φιλτραρισμένου dH₂O μέσα σε φιλτραρισμένο dH₂O σε χρονικό διάστημα 300 sec/ένεση από 1^η - 5^η ένεση, 3600 sec (1h) μεταξύ 5^{ης} και 6^{ης} ένεσης και 300 sec/ένεση από 6^η -10^η ένεση. Ο μέγιστος ρυθμός θερμότητας (max heat rate) που λήφθηκε από το συγκεκριμένο πείραμα είναι 4 μJ/ένεση και η αντίδραση είναι εξώθερμη. Επομένως, σύμφωνα με το γράφημα και τις τιμές που προέκυψαν από το πείραμα, συμπεραίνεται ότι τα αποτελέσματα ήταν πολύ χαμηλά κάτι που αναμένεται για τη διάχυση νερού σε νερό. Το γεγονός ότι χρησιμοποιήθηκε το stock φιλτραρισμένου dH₂O από το 1^ο πείραμα δεν επέδρασε αρνητικά στα αποτελέσματα.

4.3.5 5^ο Πείραμα

Πειραματική διαδικασία

1^η εκτέλεση: Στο συγκεκριμένο πείραμα τιτλοδότησης επισημαίνεται ότι χρησιμοποιήθηκε φρέσκο φιλτραρισμένο dH₂O στο κεντρικό κελί, στο κελί αναφοράς και στη σύριγγα. Τοποθετήθηκε λοιπόν 1,5 mL φρέσκου

φιλτραρισμένου dH₂O στο κεντρικό κελί, στη σύριγγα τοποθετήθηκαν 250 μL φρέσκου φιλτραρισμένου dH₂O και αρχικά πραγματοποιήθηκαν 5 ενέσεις, 5 μL η καθεμία. Επίσης, στο κελί αναφοράς προστέθηκε 1,5 mL φρέσκου φιλτραρισμένου dH₂O. Το χρονικό διάστημα (injection interval) μεταξύ των ενέσεων 1^η - 5^η ορίστηκε στα 300 sec/ένεση (5 min) και η θερμοκρασία ρυθμίστηκε στους 25°C στο μηχάνημα. Πριν την πραγματοποίηση των ενέσεων 1^η – 5^η, το μηχάνημα έμεινε σε κατάσταση πειράματος 2 ώρες για να σταθεροποιηθεί και έπειτα πραγματοποιήθηκαν οι ενέσεις. Αφέθηκε ένα χρονικό διάστημα (injection interval) 1800 sec (30min) μεταξύ 5^{ης} και 6^{ης} ένεσης χωρίς ν' ανοίξει το μηχάνημα και έπειτα πραγματοποιήθηκαν άλλες 5 ενέσεις (6^η -10^η), 5μL η καθεμία. Από την 6^η έως και τη 10^η ένεση, ορίστηκε το χρονικό διάστημα μεταξύ κάθε ένεσης στα 300 sec (5 min) και η θερμοκρασία ρυθμίστηκε στους 25°C στο μηχάνημα. Πριν την πραγματοποίηση των ενέσεων 6^η – 10^η, το μηχάνημα έμεινε σε κατάσταση πειράματος 2 ώρες για να σταθεροποιηθεί και έπειτα πραγματοποιήθηκαν οι ενέσεις.

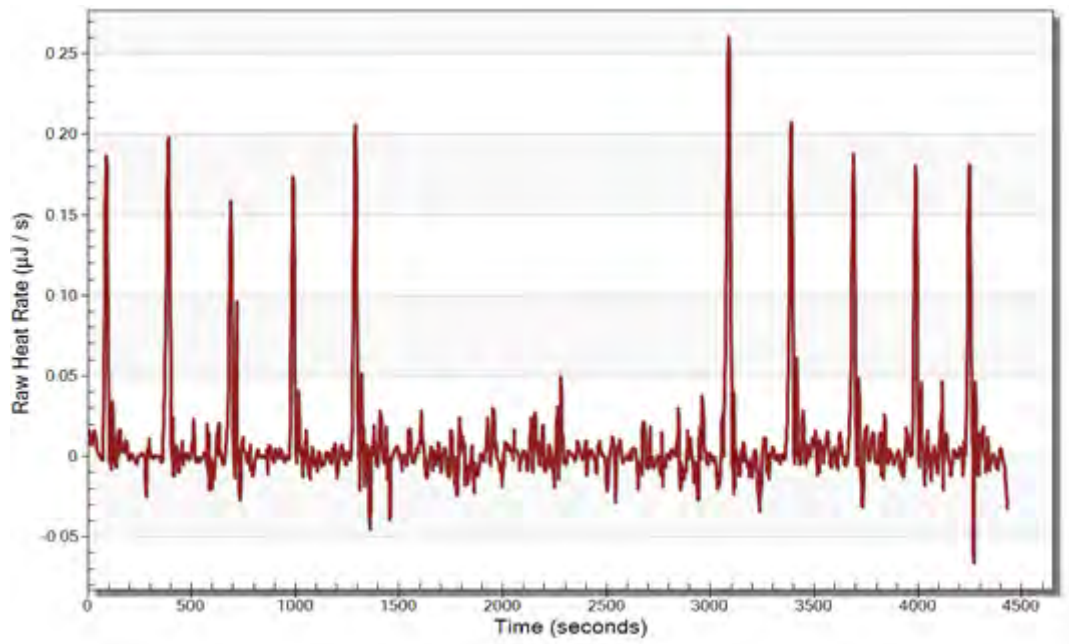


Εικόνα 23: Τιτλοδότηση φιλτραρισμένου απεσταγμένου νερού (filtered distilled H₂O) μέσα σε φιλτραρισμένο απεσταγμένο νερό.

Αποτελέσματα - Συζήτηση

Κάθε κορυφή που απεικονίζεται στο διάγραμμα, αντιστοιχεί σε μια απλή τιτλοδότηση του φιλτραρισμένου dH₂O μέσα σε φιλτραρισμένο dH₂O σε χρονικό διάστημα 300 sec/ένεση από 1^η -5^η ένεση, 1800 sec (30 min) μεταξύ 5^{ης} και 6^{ης} ένεσης και 300 sec/ένεση από 6^η -10^η ένεση. Ο μέγιστος ρυθμός θερμότητας (max heat rate) που λήφθηκε από το συγκεκριμένο πείραμα είναι 2 μJ/ένεση και η αντίδραση είναι εξώθερμη. Επομένως, σύμφωνα με το γράφημα και τις τιμές που προέκυψαν από το πείραμα, συμπεραίνεται ότι τα αποτελέσματα ήταν πολύ χαμηλά κάτι που αναμένεται για τη διάχυση νερού σε νερό. Στην προκειμένη περίπτωση το γεγονός ότι χρησιμοποιήθηκε για το συγκεκριμένο πείραμα φρέσκο φιλτραρισμένο dH₂O, δε φαίνεται να διαφοροποίησε τα αποτελέσματα σε σύγκριση μ' αυτά που ελήφθησαν όταν χρησιμοποιήθηκε το ίδιο stock φιλτραρισμένου dH₂O μ' αυτό του 1^{ου} πειράματος.

2^η εκτέλεση: Ανοίχτηκε το buret του μηχανήματος και αντικαταστάθηκε το φιλτραρισμένο dH₂O στο κεντρικό κελί, όχι όμως στο κελί αναφοράς ούτε και στη σύριγγα. Μετά τοποθετήθηκε και πάλι το buret στο μηχάνημα και ρυθμίστηκε να γίνουν 5 ενέσεις, 5 μL η καθεμία. Ορίστηκε το χρονικό διάστημα των ενέσεων 1^η - 5^η στα 300 sec/ένεση (5 min) και η θερμοκρασία ρυθμίστηκε στους 25°C στο μηχάνημα. Πριν την πραγματοποίηση των ενέσεων 1^η – 5^η, το μηχάνημα έμεινε σε κατάσταση πειράματος 2 ώρες για να σταθεροποιηθεί και έπειτα πραγματοποιήθηκαν οι ενέσεις. Αφότου έγιναν οι 5 πρώτες ενέσεις, το buret δεν ανοίχτηκε ξανά και ρυθμίστηκε να γίνουν άλλες 5 ενέσεις, 5 μL η καθεμία, εφόσον μεσολάβησε ένα χρονικό διάστημα 30 min μεταξύ της 5^{ης} και 6^{ης} ένεσης. Από την 6^η έως και τη 10^η ένεση, το χρονικό διάστημα ανά ένεση ορίστηκε στα 300 sec (5 min) και η θερμοκρασία ρυθμίστηκε στους 25°C στο μηχάνημα. Πριν την πραγματοποίηση των ενέσεων 6^η – 10^η, το μηχάνημα έμεινε σε κατάσταση πειράματος 2 ώρες για να σταθεροποιηθεί και έπειτα πραγματοποιήθηκαν οι ενέσεις.



Εικόνα 24: Τιτλοδότηση φιλτραρισμένου απεσταγμένου νερού (filtered distilled H₂O) μέσα σε φιλτραρισμένο απεσταγμένο νερό.

Αποτελέσματα - Συζήτηση

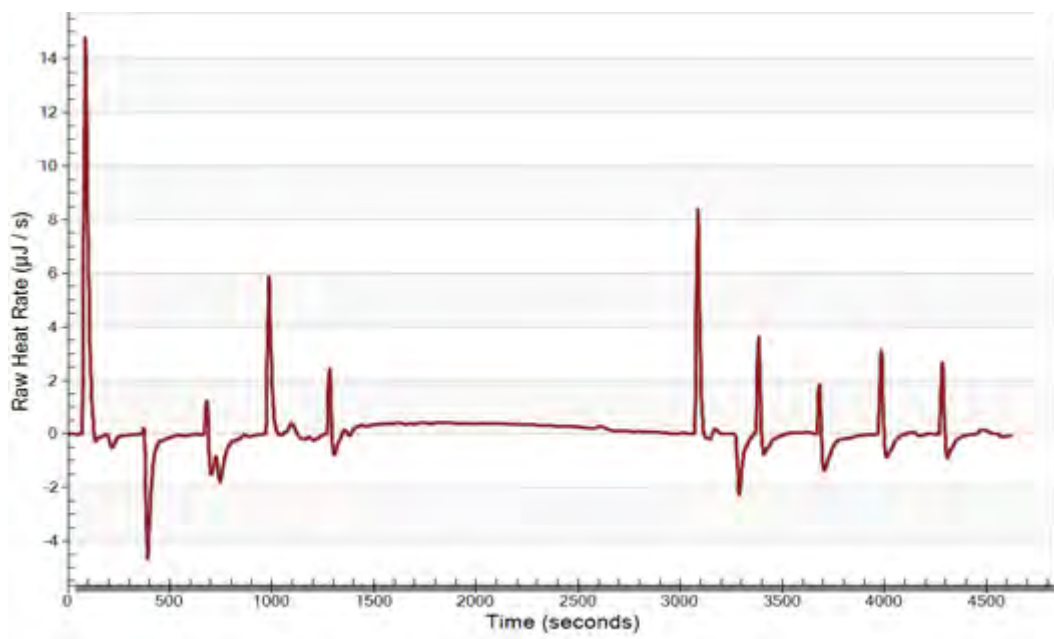
Κάθε κορυφή που απεικονίζεται στο διάγραμμα, αντιστοιχεί σε μια απλή τιτλοδότηση του φιλτραρισμένου dH₂O μέσα σε φιλτραρισμένο dH₂O σε χρονικό διάστημα 300 sec/ένεση από 1^η - 5^η ένεση, 1800 sec (30 min) μεταξύ 5^{ης} και 6^{ης} ένεσης και 300 sec/ένεση από 6^η -10^η ένεση. Ο μέγιστος ρυθμός θερμότητας (max heat rate) που λήφθηκε από το συγκεκριμένο πείραμα είναι 5 μJ/ένεση και η αντίδραση είναι εξώθερμη. Επομένως, σύμφωνα με το γράφημα και τις τιμές που προέκυψαν από το πείραμα, συμπεραίνεται ότι τα αποτελέσματα ήταν πολύ χαμηλά κάτι που αναμένεται για τη διάχυση νερού σε νερό. Συνεπώς, το άνοιγμα του buret του μηχανήματος και η αντικατάσταση του νερού από το κεντρικό κελί δεν επηρέασε αρνητικά τα αποτελέσματα. Ούτε η χρήση φρέσκου σ' αυτό το πείραμα ούτε μη φρέσκου φιλτραρισμένου dH₂O στα προηγούμενα πειράματα συνέβαλε στη μεταβολή των αποτελεσμάτων.

4.3.6 6^ο Πείραμα

Πειραματική διαδικασία

1^η εκτέλεση: Στο συγκεκριμένο πείραμα τιτλοδότησης επισημαίνεται ότι χρησιμοποιήθηκε φρέσκο φιλτραρισμένο dH₂O στο κεντρικό κελί, στο κελί

αναφοράς και στη σύριγγα. Τοποθετήθηκε λοιπόν 1,5 mL φρέσκου φιλτραρισμένου dH₂O στο κεντρικό κελί, στη σύριγγα τοποθετήθηκαν 250 μL φρέσκου φιλτραρισμένου dH₂O και αρχικά πραγματοποιήθηκαν 5 ενέσεις, 5 μL η καθεμία. Στο κελί αναφοράς τοποθετήθηκε 1,5 mL φρέσκου φιλτραρισμένου dH₂O. Το χρονικό διάστημα (injection interval) μεταξύ των ενέσεων 1^η - 5^η ορίστηκε στα 300 sec/ένεση (5 min) και η θερμοκρασία ρυθμίστηκε στους 25°C στο μηχάνημα. Πριν την πραγματοποίηση των ενέσεων 1^η – 5^η, το μηχάνημα έμεινε σε κατάσταση πειράματος 2 ώρες για να σταθεροποιηθεί και έπειτα πραγματοποιήθηκαν οι ενέσεις. Αφέθηκε ένα χρονικό διάστημα (injection interval) 1800 sec (30min) μεταξύ 5^{ης} και 6^{ης} ένεσης χωρίς ν' ανοίξει το μηχάνημα και έπειτα ρυθμίστηκε να γίνουν άλλες 5 ενέσεις (6^η -10^η), 5μL η καθεμία. Από την 6^η έως και τη 10^η ένεση, ορίστηκε το χρονικό διάστημα μεταξύ κάθε ένεσης στα 300 sec (5 min) και η θερμοκρασία ρυθμίστηκε στους 25°C στο μηχάνημα. Πριν την πραγματοποίηση των ενέσεων 6^η – 10^η, το μηχάνημα έμεινε σε κατάσταση πειράματος 2 ώρες για να σταθεροποιηθεί και έπειτα πραγματοποιήθηκαν οι ενέσεις.

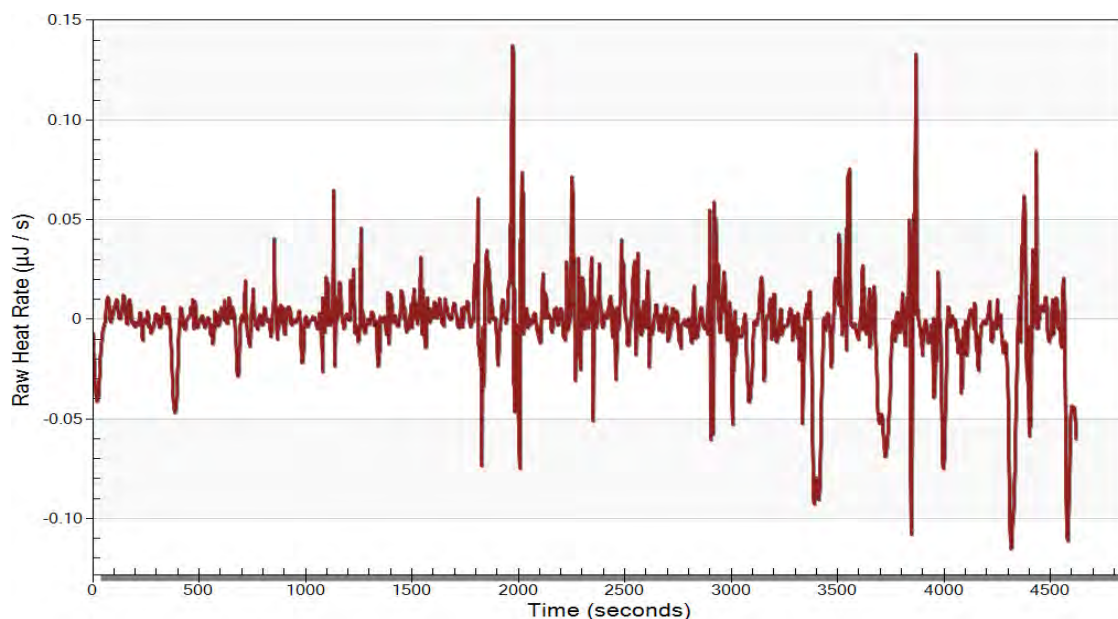


Εικόνα 25: Τιτλοδότηση φιλτραρισμένου απεσταγμένου νερού (filtered distilled H₂O) μέσα σε φιλτραρισμένο απεσταγμένο νερό.

Αποτελέσματα - Συζήτηση

Κάθε κορυφή που απεικονίζεται στο διάγραμμα, αντιστοιχεί σε μια απλή τιτλοδότηση του φιλτραρισμένου dH₂O μέσα σε φιλτραρισμένο dH₂O σε χρονικό διάστημα 300 sec/ένεση από 1^η -5^η ένεση, 1800 sec (30 min) μεταξύ 5^{ης} και 6^{ης} ένεσης και 300 sec/ένεση από 6^η -10^η ένεση. Ο μέγιστος ρυθμός θερμότητας (max heat rate) που λήφθηκε από το συγκεκριμένο πείραμα είναι 353,5 μJ/ένεση και η αντίδραση είναι εξώθερμη. Επομένως, σύμφωνα με το γράφημα και τις τιμές που προέκυψαν από το πείραμα, συμπεραίνεται ότι τα αποτελέσματα δεν ήταν καλά, πιθανότατα εξαιτίας βρώμικου κελιού.

2^η εκτέλεση: Ανοίχτηκε το buret του μηχανήματος και αντικαταστάθηκε το φιλτραρισμένο dH₂O στη σύριγγα, ενώ στο κεντρικό κελί και στο κελί αναφοράς παρέμεινε το ίδιο μ' αυτό της 1^{ης} εκτέλεσης του 6^{ου} πειράματος. Μετά τοποθετήθηκε και πάλι το buret στο μηχάνημα και ρυθμίστηκε να γίνουν 5 ενέσεις, 5 μL η καθεμία. Ορίστηκε το χρονικό διάστημα μεταξύ των ενέσεων 1^η - 5^η στα 300 sec/ένεση (5 min) και η θερμοκρασία ρυθμίστηκε στους 25° C στο μηχάνημα. Πριν την πραγματοποίηση των ενέσεων 1^η – 5^η, το μηχάνημα έμεινε σε κατάσταση πειράματος 2 ώρες για να σταθεροποιηθεί και έπειτα πραγματοποιήθηκαν οι ενέσεις. Αφότου έγιναν οι 5 πρώτες ενέσεις, το buret δεν ανοίχτηκε ξανά και ρυθμίστηκε να γίνουν άλλες 5 ενέσεις, 5 μL η καθεμία, εφόσον μεσολάβησε ένα χρονικό διάστημα 1800 sec (30 min) μεταξύ της 5^{ης} και 6^{ης} ένεσης. Από την 6^η έως και τη 10^η ένεση, το χρονικό διάστημα ανά ένεση ορίστηκε στα 300 sec (5 min) και η θερμοκρασία ρυθμίστηκε στους 25° C στο μηχάνημα. Πριν την πραγματοποίηση των ενέσεων 6^η – 10^η, το μηχάνημα έμεινε σε κατάσταση πειράματος 2 ώρες για να σταθεροποιηθεί και έπειτα πραγματοποιήθηκαν οι ενέσεις.



Εικόνα 26: Τιτλοδότηση φιλτραρισμένου απεσταγμένου νερού (filtered distilled H₂O) μέσα σε φιλτραρισμένο απεσταγμένο νερό.

Αποτελέσματα - Συζήτηση

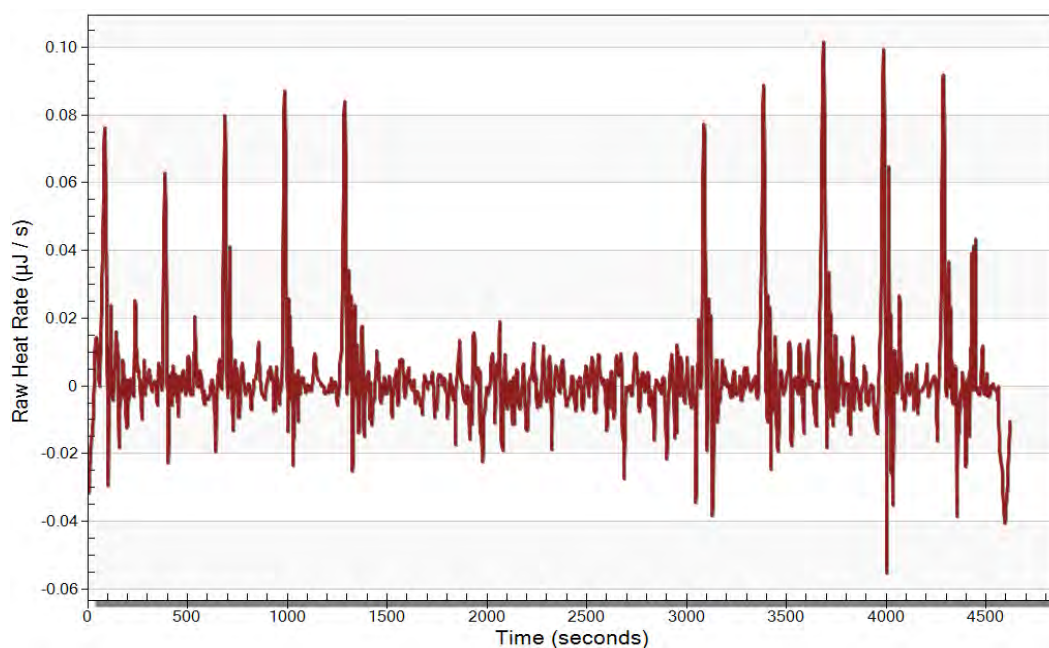
Κάθε κορυφή που απεικονίζεται στο διάγραμμα, αντιστοιχεί σε μια απλή τιτλοδότηση του φιλτραρισμένου dH₂O μέσα σε φιλτραρισμένο dH₂O σε χρονικό διάστημα 300 sec/ένεση από 1^η - 5^η ένεση, 1800 sec (30 min) μεταξύ 5^{ης} και 6^{ης} ένεσης και 300 sec/ένεση από 6^η -10^η ένεση. Ο μέγιστος ρυθμός θερμότητας (max heat rate) που λήφθηκε από το συγκεκριμένο πείραμα είναι 2 μJ/ένεση και η αντίδραση είναι εξώθερμη. Επομένως, σύμφωνα με το γράφημα και τις τιμές που προέκυψαν από το πείραμα, συμπεραίνεται ότι τα αποτελέσματα ήταν πολύ χαμηλά κάτι που αναμένεται για τη διάχυση νερού σε νερό. Συνεπώς, το άνοιγμα του buret του μηχανήματος και η αντικατάσταση του νερού μόνο από τη σύριγγα επηρέασε θετικά τα αποτελέσματα.

4.3.7 7^ο Πείραμα

Πειραματική διαδικασία

1^η εκτέλεση: Στο συγκεκριμένο πείραμα τιτλοδότησης επισημαίνεται ότι χρησιμοποιήθηκε φρέσκο φιλτραρισμένο dH₂O στο κεντρικό κελί, στο κελί αναφοράς και στη σύριγγα. Τοποθετήθηκε λοιπόν 1,5 mL φρέσκου

φιλτραρισμένου dH₂O στο κεντρικό κελί, στη σύριγγα τοποθετήθηκαν 250 μL φρέσκου φιλτραρισμένου dH₂O και αρχικά πραγματοποιήθηκαν 5 ενέσεις, 5 μL η καθεμία. Στο κελί αναφοράς τοποθετήθηκε 1,5 mL φρέσκου φιλτραρισμένου dH₂O. Το χρονικό διάστημα (injection interval) μεταξύ των ενέσεων 1^η - 5^η ορίστηκε στα 300 sec/ένεση (5 min) και η θερμοκρασία ρυθμίστηκε στους 25°C στο μηχάνημα. Πριν την πραγματοποίηση των ενέσεων 1^η – 5^η, το μηχάνημα έμεινε σε κατάσταση πειράματος 2 ώρες για να σταθεροποιηθεί και έπειτα πραγματοποιήθηκαν οι ενέσεις. Αφέθηκε ένα χρονικό διάστημα (injection interval) 1800 sec (30min) μεταξύ 5^{ης} και 6^{ης} ένεσης χωρίς ν' ανοίξει το μηχάνημα και έπειτα ρυθμίστηκε να γίνουν άλλες 5 ενέσεις (6^η -10^η), 5μL η καθεμία. Από την 6^η έως και τη 10^η ένεση, ορίστηκε το χρονικό διάστημα μεταξύ κάθε ένεσης στα 300 sec (5 min) και η θερμοκρασία ρυθμίστηκε στους 25°C στο μηχάνημα. Πριν την πραγματοποίηση των ενέσεων 6^η – 10^η, το μηχάνημα έμεινε σε κατάσταση πειράματος 2 ώρες για να σταθεροποιηθεί και έπειτα πραγματοποιήθηκαν οι ενέσεις.



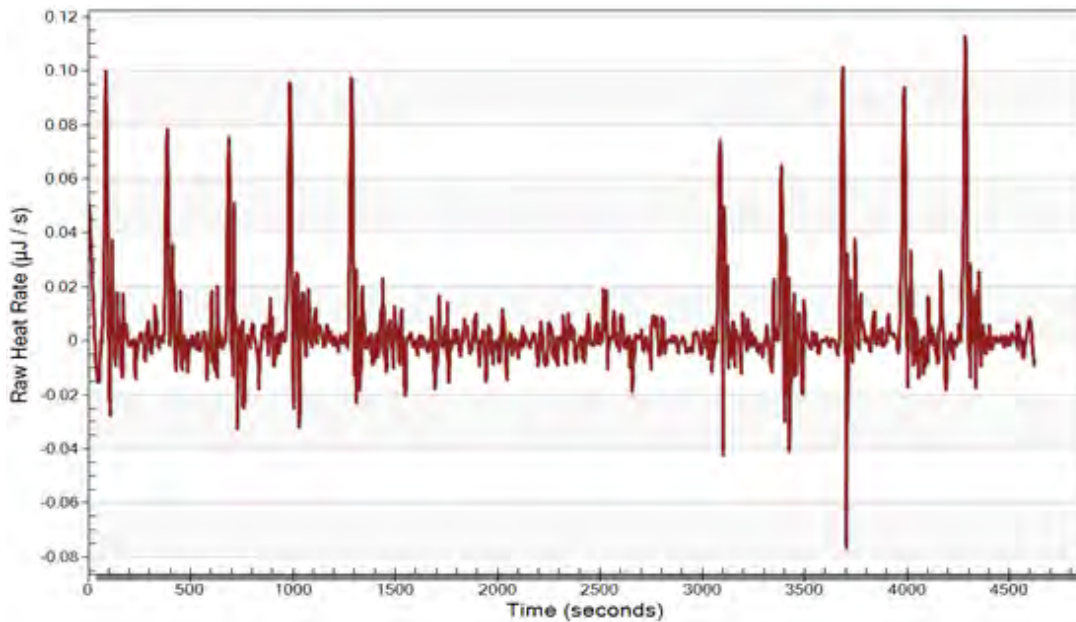
Εικόνα 27: Τιτλοδότηση φιλτραρισμένου απεσταγμένου νερού (filtered distilled H₂O) μέσα σε φιλτραρισμένο απεσταγμένο νερό.

Αποτελέσματα - Συζήτηση

Κάθε κορυφή που απεικονίζεται στο διάγραμμα, αντιστοιχεί σε μια απλή τιτλοδότηση του φιλτραρισμένου dH₂O μέσα σε φιλτραρισμένο dH₂O σε χρονικό διάστημα 300 sec/ένεση από 1^η -5^η ένεση, 1800 sec (30 min) μεταξύ

5^{ης} και 6^{ης} ένεσης και 300 sec/ένεση από 6^η -10^η ένεση. Ο μέγιστος ρυθμός θερμότητας (max heat rate) που λήφθηκε από το συγκεκριμένο πείραμα είναι 2 μJ/ένεση και η αντίδραση είναι εξώθερμη. Επομένως, σύμφωνα με το γράφημα και τις τιμές που προέκυψαν από το πείραμα, συμπεραίνεται ότι τα αποτελέσματα ήταν πολύ χαμηλά κάτι που αναμένεται για τη διάχυση νερού σε νερό.

2^η εκτέλεση: Ανοίχτηκε το buret του μηχανήματος και αντικαταστάθηκε το φιλτραρισμένο dH₂O στη σύριγγα, ενώ στο κεντρικό κελί και στο κελί αναφοράς παρέμεινε το ίδιο μ' αυτό της 1^{ης} εκτέλεσης του 7^{ου} πειράματος. Μετά τοποθετήθηκε και πάλι το buret στο μηχάνημα και ρυθμίστηκε να γίνουν αρχικά 5 ενέσεις, 5 μL η καθεμία. Ορίστηκε το χρονικό διάστημα μεταξύ των ενέσεων 1^η - 5^η στα 300 sec/ένεση (5 min) και η θερμοκρασία ρυθμίστηκε στους 25°C στο μηχάνημα. Πριν την πραγματοποίηση των ενέσεων 1^η – 5^η, το μηχάνημα έμεινε σε κατάσταση πειράματος 2 ώρες για να σταθεροποιηθεί και έπειτα πραγματοποιήθηκαν οι ενέσεις. Αφότου έγιναν οι 5 πρώτες ενέσεις, το buret δεν ανοίχτηκε ξανά και ρυθμίστηκε να γίνουν άλλες 5 ενέσεις, 5 μL η καθεμία, εφόσον μεσολάβησε ένα χρονικό διάστημα 1800 sec (30 min) μεταξύ της 5^{ης} και 6^{ης} ένεσης. Από την 6^η έως και τη 10^η ένεση, το χρονικό διάστημα ανά ένεση ορίστηκε στα 300 sec (5 min) και η θερμοκρασία ρυθμίστηκε στους 25°C στο μηχάνημα. Πριν την πραγματοποίηση των ενέσεων 6^η – 10^η, το μηχάνημα έμεινε σε κατάσταση πειράματος 2 ώρες για να σταθεροποιηθεί και έπειτα πραγματοποιήθηκαν οι ενέσεις.



Εικόνα 28: Τιτλοδότηση φιλτραρισμένου απεσταγμένου νερού (filtered distilled H₂O) μέσα σε φιλτραρισμένο απεσταγμένο νερό.

Αποτελέσματα - Συζήτηση

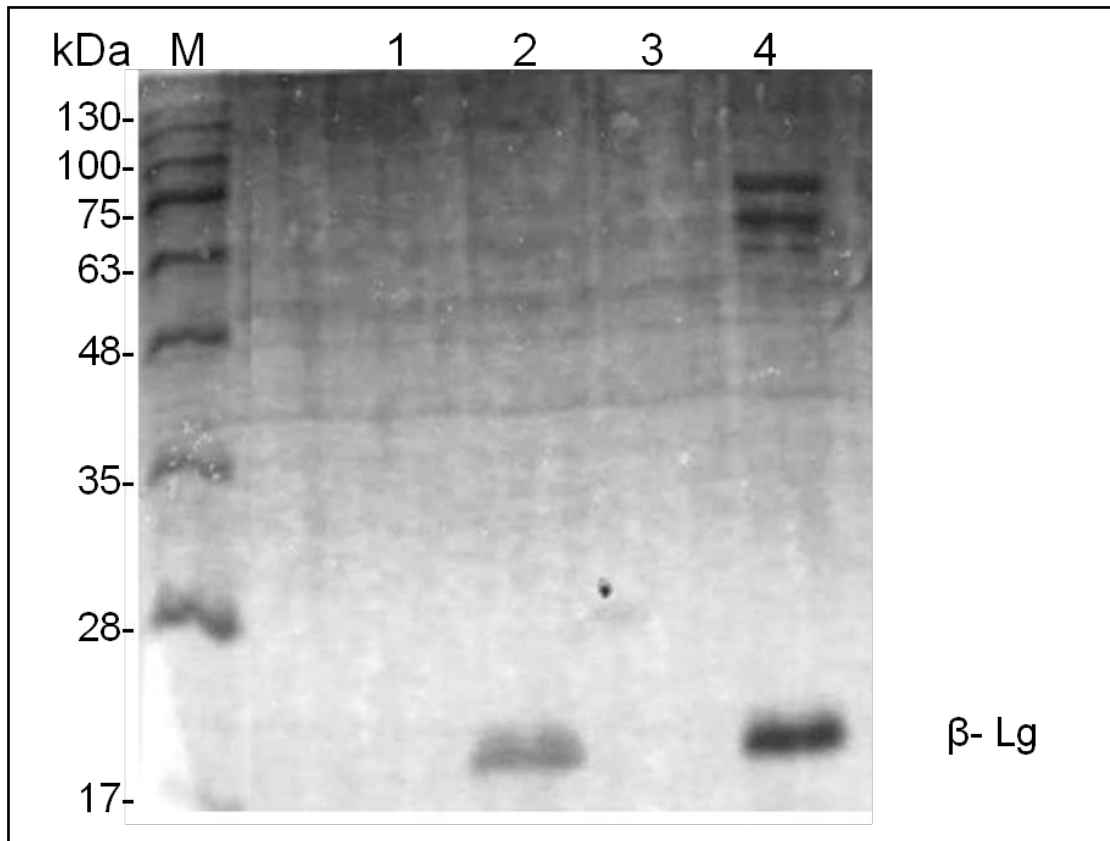
Κάθε κορυφή που απεικονίζεται στο διάγραμμα, αντιστοιχεί σε μια απλή τιτλοδότηση του φιλτραρισμένου dH₂O μέσα σε φιλτραρισμένο dH₂O σε χρονικό διάστημα 300 sec/ένεση από 1^η - 5^η ένεση, 1800 sec (30 min) μεταξύ 5^{ης} και 6^{ης} ένεσης και 300 sec/ένεση από 6^η -10^η ένεση. Ο μέγιστος ρυθμός θερμότητας (max heat rate) που λήφθηκε από το συγκεκριμένο πείραμα είναι 2 µJ/ένεση και η αντίδραση είναι εξώθερμη. Επομένως, σύμφωνα με το γράφημα και τις τιμές που προέκυψαν από το πείραμα, συμπεραίνεται ότι τα αποτελέσματα ήταν πολύ χαμηλά όπως και στην 1^η εκτέλεση του 7^{ου} πειράματος, κάτι που αναμένεται για τη διάχυση νερού σε νερό. Συνεπώς, το άνοιγμα του buret του μηχανήματος και η αντικατάσταση του φιλτραρισμένου dH₂O μόνο από τη σύριγγα δεν επηρέασε τα αποτελέσματα.

4.4 ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΤΙΤΛΟΔΟΤΗΣΗΣ ΜΕ ΤΗ ΒΟΕΙΑ β-Lg ΚΑΙ ΤΑ ΣΥΝΘΕΤΙΚΑ ΚΟΡΕΣΜΕΝΑ ΛΙΠΑΡΑ ΟΞΕΑ: ΔΕΚΑΠΕΝΤΑΝΟΪΚΟ (PDA) ΟΞΥ & ΔΕΚΑΕΠΤΑΝΟΪΚΟ (HDA) ΟΞΥ

Για τη μελέτη της αντίδρασης πρόσδεσης των συνθετικών κορεσμένων λιπαρών οξέων: δεκαπεντανοϊκού (PDA) και δεκαεπτανοϊκού (HDA) οξέος (προσδέτες) στην πρωτεΐνη του ορού του βόειου γάλακτος, τη β-γαλακτοσφαιρίνη, πραγματοποιήθηκαν πειράματα τιτλοδότησης της συγκεκριμένης πρωτεΐνης στα προαναφερόμενα λιπαρά οξέα. Αν και γενικά σε πειράματα τιτλοδότησης, τιτλοδοτείται ο προσδέτης (τιτλοδότης) μέσα στην πρωτεΐνη “υποδοχέα” (πρότυπο διάλυμα), στα συγκεκριμένα πειράματα χρησιμοποιήθηκε ως τιτλοδότης η βόεια β-γαλακτοσφαιρίνη και ως πρότυπο το διάλυμα του δεκαπεντανοϊκού και του δεκαεπτανοϊκού οξέος σε ξεχωριστά πειράματα. Συνεπώς το διάλυμα της β-Lg, τοποθετήθηκε στη σύριγγα και τιτλοδοτήθηκε μέσα στο τιτλοδοτούμενο διάλυμα του PDA ή του HDA, το οποίο τοποθετήθηκε στο κεντρικό κελί του μηχανήματος Nano-ITC. Ο λόγος για τον οποίο τα διαλύματα πρωτεΐνης και λιπαρών οξέων τοποθετήθηκαν αντίστροφα απ’ ό τι συνηθίζεται σ’ ένα κλασικό πείραμα τιτλοδότησης είναι ο εξής: η β-γαλακτοσφαιρίνη είναι περισσότερο δυσδιάλυτη από το δεκαπεντανοϊκό και το δεκαεπτανοϊκό οξύ και γι’ αυτό τοποθετήθηκε στη σύριγγα, ενώ τα λιπαρά οξέα ως περισσότερο διαλυτά στο κεντρικό κελί, όπου και πραγματοποιήθηκε η αντίδραση πρόσδεσης.

4.4.1 SDS-PAGE για τον προσδιορισμό καθαρότητας της β-Lg

Για τον προσδιορισμό της καθαρότητας του πρωτεϊνικού δείγματος της βόειας β-Lg που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης με χρήση SDS [*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrilamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)*], η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη ηλεκτροφορητική μέθοδος πρωτεϊνών. Αποτελεί την πιο αξιόπιστη μέθοδο για το διαχωρισμό και την ανάλυση πρωτεϊνικών δειγμάτων.



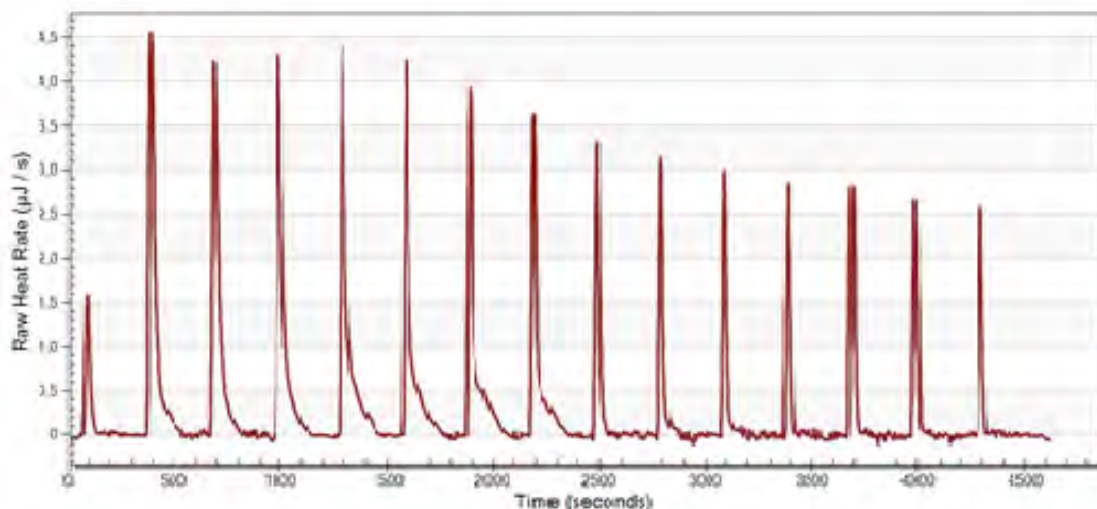
Εικόνα 29: Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης με χρήση SDS (SDS-PAGE) για το διαχωρισμό της β -Lg από τις υπόλοιπες πρωτεΐνες του ορού του βόειου γάλακτος.

4.4.2 Αυξανόμενη τιτλοδότηση της β -Lg 0,2 mM (Tris- HCl 50 mM + 10% EtOH) μέσα στο PDA (10%) 0,05 mM (Tris- HCl 50 mM + 10% EtOH)

Πειραματική διαδικασία

Στο συγκεκριμένο πείραμα αυξανόμενης τιτλοδότησης τοποθετήθηκε 1,5 mL PDA (10%) 0,05 mM στο κεντρικό κελί του μηχανήματος ITC, στη σύριγγα τοποθετήθηκαν 250 μ L β -Lg 0,2 mM και ρυθμίστηκε να γίνουν 15 ενέσεις, όπου 1^η ένεση: 5 μ L και 2^η – 15^η ένεση: 15 μ L. Στο κελί αναφοράς τοποθετήθηκε 1,5 mL φιλτραρισμένου dH₂O. Το χρονικό διάστημα ορίστηκε στα 300sec/ένεση (5 min) και η θερμοκρασία ρυθμίστηκε στους 25°C στο μηχάνημα. Πριν την πραγματοποίηση των ενέσεων, το μηχάνημα έμεινε σε

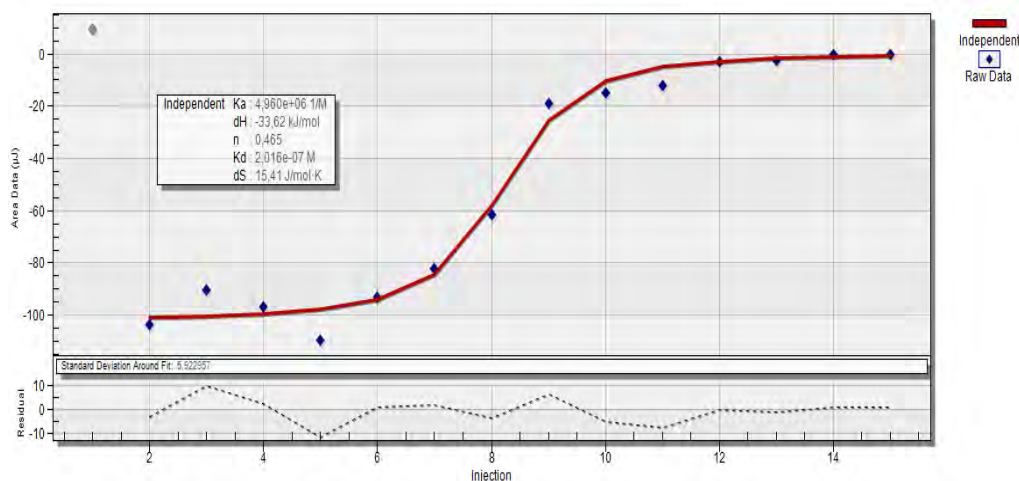
κατάσταση πειράματος 2 ώρες για να σταθεροποιηθεί και έπειτα πραγματοποιήθηκαν οι ενέσεις.



Εικόνα 30: Αυξανόμενη τιτλοδότηση της β -Lg 0,2 mM στο PDA (10%) 0,05 mM

Αποτελέσματα - Συζήτηση

Κάθε κορυφή που απεικονίζεται στο διάγραμμα, αντιστοιχεί σε μια απλή τιτλοδότηση του διαλύματος β -Lg 0,2 mM μέσα σε διάλυμα PDA (10%) 0,05 mM σε συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα (300 sec/ένεση). Τα δεδομένα της τιτλοδότησης μετριοούνται σε $\mu\text{J}/\text{sec}$. Ο μέγιστος ρυθμός θερμότητας (max heat rate) που λήφθηκε από το συγκεκριμένο πείραμα είναι 175,9 $\mu\text{J}/\text{ένεση}$ και η αντίδραση είναι εξώθερμη. Επομένως, σύμφωνα με το γράφημα και τις τιμές που προέκυψαν από το πείραμα, συμπεραίνεται ότι τα αποτελέσματα ήταν πολύ υψηλά, κάτι που δεν αναμένεται για τη διάχυση του διαλύματος της β -Lg 0,2 mM μέσα στο διάλυμα PDA (10%) 0,05 mM, πιθανότατα εξαιτίας βρώμικου κελιού ή/και κακοταιριάσματος (mismatch) με EtOH. Κακοταίριασμα με EtOH σημαίνει πώς το συγκεκριμένο διάλυμα της β -Lg παρασκευάστηκε με EtOH διαφορετικής συγκέντρωσης (100%), από τη συγκέντρωση της EtOH (10%) που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή του συγκεκριμένου διαλύματος του PDA.



Εικόνα 31: Ανάλυση πρόσδεσης του PDA (10%) στην β-Lg χρησιμοποιώντας τη μέθοδο ITC αυξανόμενων ενέσεων.

Η περιοχή κάτω από κάθε κορυφή ολοκληρώνεται και εφαρμόζει σ' ένα μοντέλο μιας θέσης ανεξάρτητης πρόσδεσης για να προσδιορίσουμε τη σταθερά σύνδεσης (K_a), την ενθαλπία (ΔH), τη στοιχειομετρία (n), τη σταθερά αποδέσμευσης (K_d) και την εντροπία (ΔS). Η θερμότητα αραίωσης αφαιρέθηκε από την ολοκληρωμένη περιοχή της κορυφής. Από τη σύνδεση του συνθετικού κορεσμένου λιπαρού οξέος PDA (10%) 0,05 mM στην πρωτεΐνη του ορού του βόειου γάλακτος β-Lg 0,2 mM προέκυψαν τα εξής αποτελέσματα, τα οποία αποτελούν το θερμοδυναμικό προφίλ της συγκεκριμένης αντίδρασης πρόσδεσης: $K_a = 4,960e+06$ 1/M, $dH = -33,62$ kJ/mol, $n = 0,465$, $K_d = 2,016e-07$ M και $dS = 15,41$ J/mol·K

	K_a [M^{-1}] $\times 10^6$	n	dH (kJ/mol)	K_d [M] $\times 10^{-7}$	dS (J/mol·K)
PDA	$4,960 \times 10^6$	0,465	-33,62	$2,016 \times 10^{-7}$	15,41

Πίνακας 3: Ιδιότητες πρόσδεσης (προσδιορισμός της σταθεράς σύνδεσης- K_a , της στοιχειομετρίας- n , της ενθαλπίας- ΔH , της σταθεράς αποδέσμευσης- K_d και της εντροπίας- ΔS) του PDA με την β-Lg όπως αυτές προσδιορίστηκαν με την μέθοδο ITC.

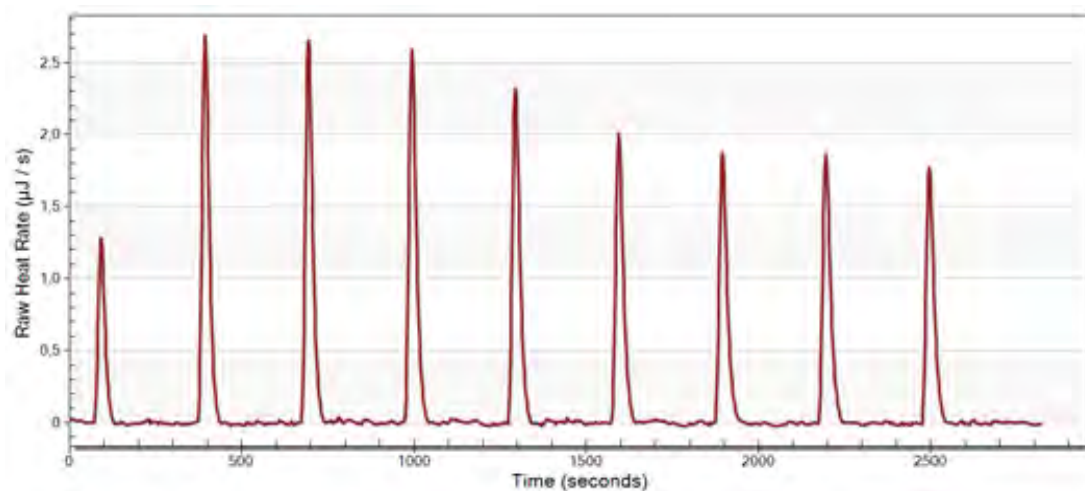
Η σταθερά πρόσδεσης K_a δείχνει πόσο ισχυρά δεσμεύεται το PDA στη β-Lg. Η ενθαλπία πρόσδεσης dH δείχνει το σχηματισμό συγκεκριμένων δεσμών υδρογόνου και τις αλληλεπιδράσεις van der Waals. Η στοιχειομετρία n αποδίδει τον αριθμό των θέσεων πρόσδεσης / μόριο στόχου. Η σταθερά

αποδέσμευσης K_d πόσο εύκολα δίσταται το σύμπλοκο PDA – β -Lg. Η εντροπία dS δείχνει το σχηματισμό υδροφοβικών ή μη ειδικών δεσμών. Οι θερμοδυναμικοί παράγοντες που επηρεάζουν τη συγγένεια πρόσδεσης είναι η ενθαλπία dH και η εντροπία dS . Ένα αρνητικό dH θεωρείται ότι είναι ένα ευνοϊκό γεγονός και οφείλεται στο σχηματισμό δεσμών υδρογόνου και αλληλεπιδράσεων van der Waals. Η μεταβολή της ενθαλπίας εξαρτάται από την ισχύ των αλληλεπιδράσεων β -Lg – PDA που σχετίζεται με το διαλύτη. Ένα θετικό dS θεωρείται ότι είναι ένα ευνοϊκό γεγονός και οφείλεται στο κρύψιμο των υδροφοβικών ομάδων και στην απελευθέρωση ύδατος. Η αντιστάθμιση ενθαλπίας - εντροπίας παίζει ρόλο στη συγγένεια πρόσδεσης. Η ενθαλπία dH και η εντροπία dS ίσως δρουν σε συνέργεια ή σε αντίθεση κατά τη διάρκεια της πρόσδεσης. Στην προκειμένη περίπτωση, οι dH και dS δρουν σε αντίθεση, γιατί η dH είναι αρνητική και η dS είναι θετική. Η ελεύθερη ενέργεια είναι $\Delta G \leq 0$ για μια αυθόρμητη διαδικασία και προσδιορίζεται από τις dH και dS . Όσο πιο αρνητική η ΔG , τόσο μεγαλύτερη η συγγένεια πρόσδεσης.

4.4.3 Αυξανόμενη τιτλοδότηση της β -Lg 0,2 mM (Tris-HCl 50 mM + 10% EtOH) μέσα στο PDA(10%) 0,05 mM (Tris- HCl 50 mM + 10% EtOH)

Πειραματική διαδικασία

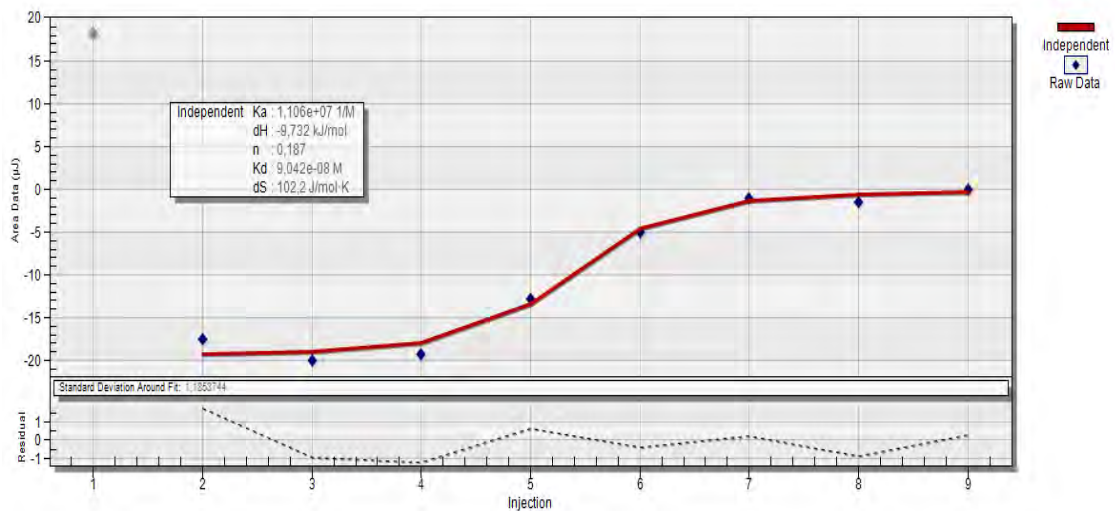
Στο συγκεκριμένο πείραμα αυξανόμενης τιτλοδότησης τοποθετήθηκε 1,5 mL PDA (10%) 0,05 mM στο κεντρικό κελί του μηχανήματος ITC, στη σύριγγα τοποθετήθηκαν 100 μ L β -Lg 0,2 mM και ρυθμίστηκε να γίνουν 9 ενέσεις, όπου 1^η ένεση: 5 μ L και 2^η – 9^η ένεση: 10 μ L. Στο κελί αναφοράς τοποθετήθηκε 1,5 mL φρέσκου φιλτραρισμένου dH_2O . Το χρονικό διάστημα ορίστηκε στα 300sec/ένεση (5 min) και η θερμοκρασία ρυθμίστηκε στους 25°C στο μηχάνημα. Πριν την πραγματοποίηση των ενέσεων, το μηχάνημα έμεινε σε κατάσταση πειράματος 2 ώρες για να σταθεροποιηθεί και έπειτα πραγματοποιήθηκαν οι ενέσεις.



Εικόνα 32: Αυξανόμενη τιτλοδότηση της β-Lg 0,2 mM στο PDA (10%) 0,05 mM

Αποτελέσματα - Συζήτηση

Κάθε κορυφή που απεικονίζεται στο διάγραμμα, αντιστοιχεί σε μια απλή τιτλοδότηση του διαλύματος β-Lg 0,2 mM μέσα σε διάλυμα PDA (10%) 0,05 mM σε συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα (300 sec/ένεση). Τα δεδομένα της τιτλοδότησης μετριοούνται σε μJ/sec. Ο μέγιστος ρυθμός θερμότητας (max heat rate) που λήφθηκε από το συγκεκριμένο πείραμα είναι 69,46 μJ/ένεση και η αντίδραση είναι εξώθερμη. Επομένως, σύμφωνα με το γράφημα και τις τιμές που προέκυψαν από το πείραμα, συμπεραίνεται ότι τα αποτελέσματα ήταν πολύ υψηλά, κάτι που δεν αναμένεται για τη διάχυση του διαλύματος της β-Lg 0,2 mM μέσα στο διάλυμα PDA (10%) 0,05 mM, πιθανότατα εξαιτίας βρώμικου κελιού ή/και κακοταιριάσματος (mismatch) με EtOH.



Εικόνα 33: Ανάλυση πρόσδεσης του PDA (10%) στην β-Lg χρησιμοποιώντας τη μέθοδο ITC αυξανόμενων ενέσεων.

Η περιοχή κάτω από κάθε κορυφή ολοκληρώνεται και εφαρμόζει σ' ένα μοντέλο μιας θέσης ανεξάρτητης πρόσδεσης για να προσδιορίσουμε τη σταθερά σύνδεσης (K_a), την ενθαλπία (ΔH), τη στοιχειομετρία (n), τη σταθερά αποδέσμευσης (K_d) και την εντροπία (ΔS). Η θερμότητα αραίωσης αφαιρέθηκε από την ολοκληρωμένη περιοχή της κορυφής. Από τη σύνδεση του συνθετικού κορεσμένου λιπαρού οξέος PDA (10%) 0,05 mM στην πρωτεΐνη του ορού του βόειου γάλακτος β-Lg 0,2 mM προέκυψαν τα εξής αποτελέσματα, τα οποία αποτελούν το θερμοδυναμικό προφίλ της συγκεκριμένης αντίδρασης πρόσδεσης: $K_a = 1,106e+07$ 1/M, $dH = -9,732$ kJ/mol, $n = 0,187$, $K_d = 9,042e-08$ M και $dS = 102,2$ J/mol·K

	K_a [M^{-1}] $\times 10^6$	n	dH (kJ/mol)	K_d [M] $\times 10^{-7}$	dS (J/mol·K)
PDA	$11,06 \times 10^6$	0,187	-9,732	$0,9042 \times 10^{-7}$	102,2

Πίνακας 4: Ιδιότητες πρόσδεσης (προσδιορισμός της σταθεράς σύνδεσης- K_a , της στοιχειομετρίας- n , της ενθαλπίας- ΔH , της σταθεράς αποδέσμευσης- K_d και της εντροπίας- ΔS) του PDA με την β-Lg όπως αυτές προσδιορίστηκαν με την μέθοδο ITC.

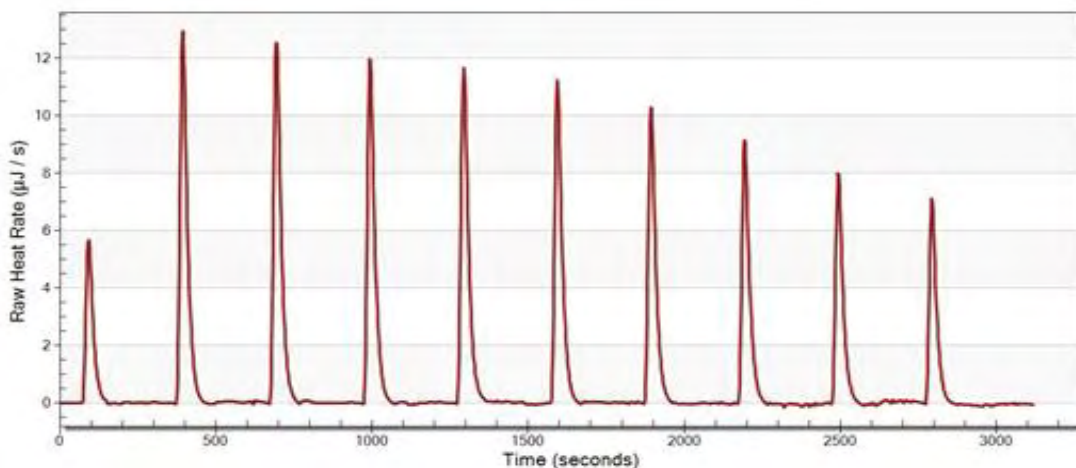
Η σταθερά πρόσδεσης K_a δείχνει πόσο ισχυρά δεσμεύεται το PDA στη β-Lg. Η ενθαλπία πρόσδεσης dH δείχνει το σχηματισμό συγκεκριμένων δεσμών

υδρογόνου και τις αλληλεπιδράσεις van der Waals. Η στοιχειομετρία η αποδίδει τον αριθμό των θέσεων πρόσδεσης / μόριο στόχου. Η σταθερά αποδέσμευσης K_d δείχνει πόσο εύκολα δίσταται το σύμπλοκο PDA – β -Lg. Η εντροπία dS δείχνει το σχηματισμό υδροφοβικών ή μη ειδικών δεσμών. Οι θερμοδυναμικοί παράγοντες που επηρεάζουν τη συγγένεια πρόσδεσης είναι η ενθαλπία dH και η εντροπία dS . Ένα αρνητικό dH θεωρείται ότι είναι ένα ευνοϊκό γεγονός και οφείλεται στο σχηματισμό δεσμών υδρογόνου και αλληλεπιδράσεων van der Waals. Η μεταβολή της ενθαλπίας εξαρτάται από την ισχύ των αλληλεπιδράσεων β -Lg – PDA που σχετίζεται με το διαλύτη. Ένα θετικό dS θεωρείται ότι είναι ένα ευνοϊκό γεγονός και οφείλεται στο κρύψιμο των υδροφοβικών ομάδων και στην απελευθέρωση ύδατος. Η αντιστάθμιση ενθαλπίας - εντροπίας παίζει ρόλο στη συγγένεια πρόσδεσης. Η ενθαλπία dH και η εντροπία dS ίσως δρουν σε συνέργεια ή σε αντίθεση κατά τη διάρκεια της πρόσδεσης. Στην προκειμένη περίπτωση, οι dH και dS δρουν σε αντίθεση, γιατί η dH είναι αρνητική και η dS είναι θετική. Η ελεύθερη ενέργεια είναι $\Delta G \leq 0$ για μια αυθόρμητη διαδικασία και προσδιορίζεται από τις dH και dS . Όσο πιο αρνητική η ΔG , τόσο μεγαλύτερη η συγγένεια πρόσδεσης.

4.4.4 Αυξανόμενη τιτλοδότηση της β -Lg 0,2 mM (Tris- HCl 50 mM + 10% EtOH) μέσα στο HDA (10%) 0,05 mM (Tris- HCl 50 mM + 10% EtOH)

Πειραματική διαδικασία

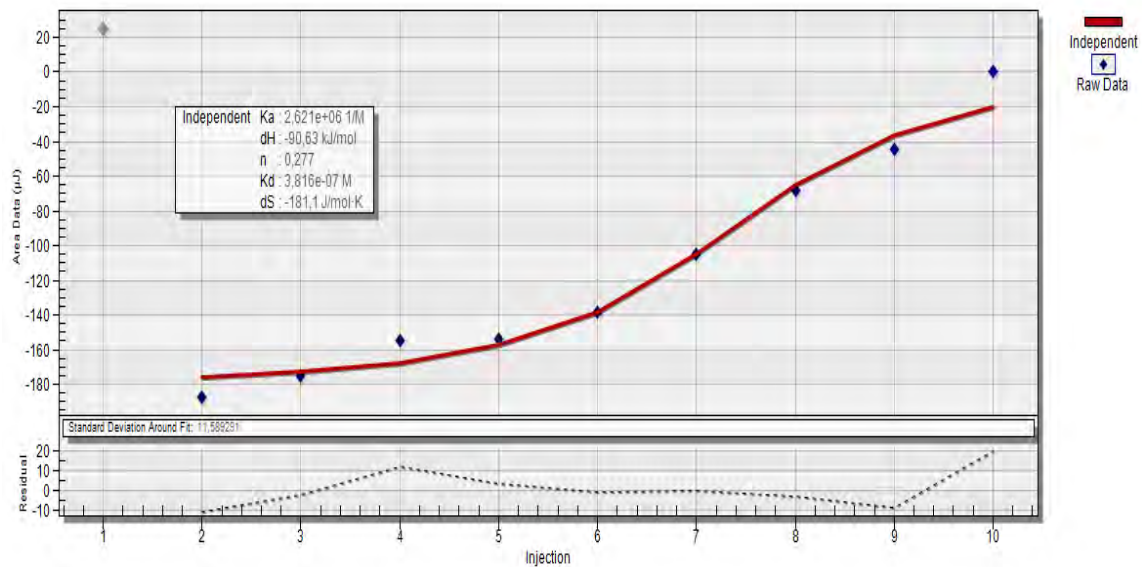
Στο συγκεκριμένο πείραμα αυξανόμενης τιτλοδότησης τοποθετήθηκε 1,5 mL HDA(10%) 0,05 mM στο κεντρικό κελί του μηχανήματος ITC, στη σύριγγα τοποθετήθηκαν 100 μ L β -Lg 0,2 mM και ρυθμίστηκε να γίνουν 10 ενέσεις, όπου 1^η ένεση: 5 μ L και 2^η – 10^η ένεση: 10 μ L. Στο κελί αναφοράς τοποθετήθηκε 1,5 mL φρέσκου φιλτραρισμένου dH₂O. Το χρονικό διάστημα ορίστηκε στα 300sec/ένεση (5 min) και η θερμοκρασία ρυθμίστηκε στους 25°C στο μηχάνημα. Πριν την πραγματοποίηση των ενέσεων, το μηχάνημα έμεινε σε κατάσταση πειράματος 2 ώρες για να σταθεροποιηθεί και έπειτα πραγματοποιήθηκαν οι ενέσεις.



Εικόνα 34: Αυξανόμενη τιτλοδότηση της β-Lg 0,2 mM στο HDA (10%) 0,05 mM

Αποτελέσματα - Συζήτηση

Κάθε κορυφή που απεικονίζεται στο διάγραμμα, αντιστοιχεί σε μια απλή τιτλοδότηση του διαλύματος β-Lg 0,2 mM μέσα σε διάλυμα HDA (10%) 0,05 mM σε συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα (300 sec/ένεση). Τα δεδομένα της τιτλοδότησης μετριοούνται σε $\mu\text{J}/\text{sec}$. Ο μέγιστος ρυθμός θερμότητας (max heat rate) που λήφθηκε από το συγκεκριμένο πείραμα είναι 396 $\mu\text{J}/\text{ένεση}$ και η αντίδραση είναι εξώθερμη. Επομένως, σύμφωνα με το γράφημα και τις τιμές που προέκυψαν από το πείραμα, η 1^η ένεση δεν ήταν τόσο καλή πιθανότητα εξαιτίας κακοταιριάσματος (mismatch) με EtOH, ενώ οι υπόλοιπες ενέσεις (2^η-10^η) ήταν καλές για το HDA.



Εικόνα 35: Ανάλυση πρόσδεσης του HDA (10%) στην β-Lg χρησιμοποιώντας τη μέθοδο ITC αυξανόμενων ενέσεων.

Η περιοχή κάτω από κάθε κορυφή ολοκληρώνεται και εφαρμόζει σ' ένα μοντέλο μιας θέσης ανεξάρτητης πρόσδεσης για να προσδιορίσουμε τη σταθερά σύνδεσης (K_a), την ενθαλπία (ΔH), τη στοιχειομετρία (n), τη σταθερά αποδέσμευσης (K_d) και την εντροπία (ΔS). Η θερμότητα αραίωσης αφαιρέθηκε από την ολοκληρωμένη περιοχή της κορυφής. Από τη σύνδεση του συνθετικού κορεσμένου λιπαρού οξέος HDA (10%) 0,05 mM στην πρωτεΐνη του ορού του βόειου γάλακτος β-Lg 0,2 mM προέκυψαν τα εξής αποτελέσματα, τα οποία αποτελούν το θερμοδυναμικό προφίλ της συγκεκριμένης αντίδρασης πρόσδεσης: $K_a = 2,621e+06$ 1/M, $dH = -90,63$ kJ/mol, $n = 0,277$, $K_d = 3,816e-07$ M και $dS = -181,1$ J/mol·K

	K_a [M^{-1}] $\times 10^6$	n	dH (kJ/mol)	K_d [M] $\times 10^{-7}$	dS (J/mol·K)
HDA	$2,621 \times 10^6$	0,277	-90,63	$3,816 \times 10^{-7}$	-181,1

Πίνακας 5: Ιδιότητες πρόσδεσης (προσδιορισμός της σταθεράς σύνδεσης- K_a , της στοιχειομετρίας- n , της ενθαλπίας- ΔH , της σταθεράς αποδέσμευσης- K_d και της εντροπίας- ΔS) του HDA με την β-Lg όπως αυτές προσδιορίστηκαν με την μέθοδο ITC.

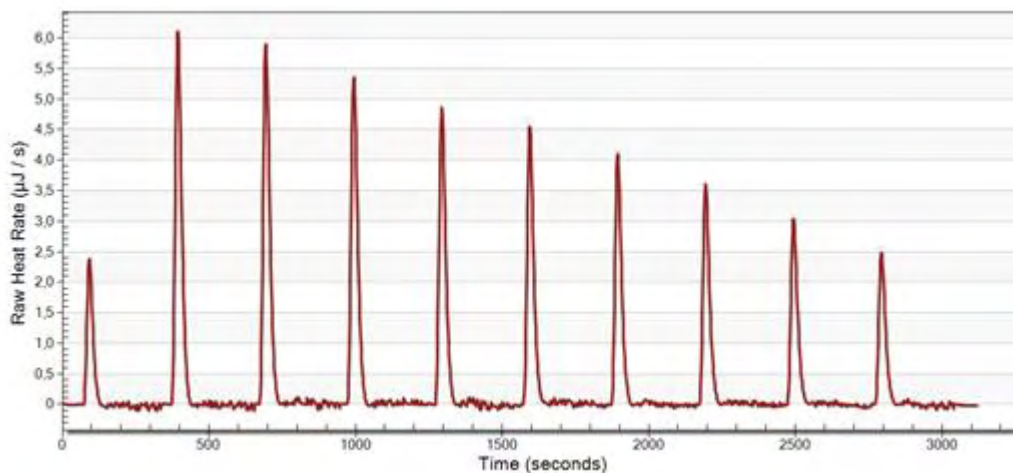
Η σταθερά πρόσδεσης K_a δείχνει πόσο ισχυρά δεσμεύεται το HDA στη β -Lg. Η ενθαλπία πρόσδεσης dH δείχνει το σχηματισμό συγκεκριμένων δεσμών υδρογόνου και τις αλληλεπιδράσεις van der Waals. Η στοιχειομετρία n αποδίδει τον αριθμό των θέσεων πρόσδεσης / μόριο στόχου. Η σταθερά αποδέσμευσης K_d δείχνει πόσο εύκολα διίσταται το σύμπλοκο HDA – β -Lg. Η εντροπία dS δείχνει το σχηματισμό υδροφοβικών ή μη ειδικών δεσμών. Οι θερμοδυναμικοί παράγοντες που επηρεάζουν τη συγγένεια πρόσδεσης είναι η ενθαλπία dH και η εντροπία dS . Ένα αρνητικό dH θεωρείται ότι είναι ένα ευνοϊκό γεγονός και οφείλεται στο σχηματισμό δεσμών υδρογόνου και αλληλεπιδράσεων van der Waals. Η μεταβολή της ενθαλπίας εξαρτάται από την ισχύ των αλληλεπιδράσεων β -Lg – HDA που σχετίζεται με το διαλύτη. Ένα αρνητικό dS είναι ένα μη ευνοϊκό γεγονός και οφείλεται σε απώλεια στερεοδιαταξικών βαθμών ελευθερίας ως αποτέλεσμα της πρόσδεσης. Η αντιστάθμιση ενθαλπίας - εντροπίας παίζει ρόλο στη συγγένεια πρόσδεσης. Η ενθαλπία dH και η εντροπία dS ίσως δρουν σε συνέργεια ή σε αντίθεση κατά τη διάρκεια της πρόσδεσης. Στην προκειμένη περίπτωση, οι dH και dS δρουν σε συνέργεια γιατί είναι και οι δύο αρνητικές. Η ελεύθερη ενέργεια είναι $\Delta G \leq 0$ για μια αυθόρμητη διαδικασία και προσδιορίζεται από τις dH και dS . Όσο πιο αρνητική η ΔG , τόσο μεγαλύτερη η συγγένεια πρόσδεσης.

4.4.5 Αυξανόμενη τιτλοδότηση της β -Lg 0,2 mM (Tris- HCl 50 mM + 10% EtOH) μέσα στο HDA (10%) 0,05 mM (Tris- HCl 50 mM + 10% EtOH).

Πειραματική διαδικασία

Στο συγκεκριμένο πείραμα αυξανόμενης τιτλοδότησης τοποθετήθηκε 1,5 mL HDA(10%) 0,05 mM στο κεντρικό κελί του μηχανήματος ITC, στη σύριγγα τοποθετήθηκαν 100 μ L β -Lg 0,2 mM και ρυθμίστηκε να γίνουν 10 ενέσεις, όπου 1^η ένεση: 5 μ L και 2^η – 10^η ένεση: 10 μ L. Στο κελί αναφοράς τοποθετήθηκε 1,5 mL φρέσκου φιλτραρισμένου dH_2O . Το χρονικό διάστημα ορίστηκε στα 300 sec/ένεση (5 min) και η θερμοκρασία ρυθμίστηκε στους 25°C στο μηχάνημα. Πριν την πραγματοποίηση των ενέσεων, το μηχάνημα έμεινε σε

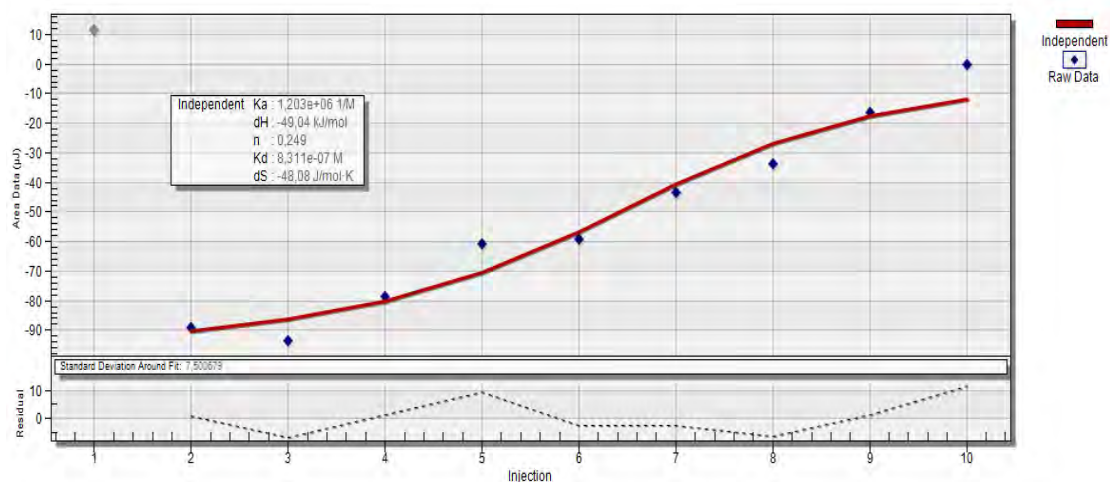
κατάσταση πειράματος 2 ώρες για να σταθεροποιηθεί και έπειτα πραγματοποιήθηκαν οι ενέσεις.



Εικόνα 36: Αυξανόμενη τιτλοδότηση της β-Lg 0,2 mM στο HDA (10%) 0,05 mM

Αποτελέσματα - Συζήτηση

Κάθε κορυφή που απεικονίζεται στο διάγραμμα, αντιστοιχεί σε μια απλή τιτλοδότηση του διαλύματος β-Lg 0,2 mM μέσα σε διάλυμα HDA (10%) 0,05 mM σε συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα (300 sec/ένεση). Τα δεδομένα της τιτλοδότησης μετριοούνται σε μJ/sec. Ο μέγιστος ρυθμός θερμότητας (max heat rate) που λήφθηκε από το συγκεκριμένο πείραμα είναι 168,7 μJ/ένεση και η αντίδραση είναι εξώθερμη. Επομένως, σύμφωνα με το γράφημα και τις τιμές που προέκυψαν από το πείραμα, τα αποτελέσματα ήταν εξαιρετικά καλά για το HDA.



Εικόνα 37: Ανάλυση πρόσδεσης του HDA (10%) στην β-Lg χρησιμοποιώντας τη μέθοδο ITC αυξανόμενων ενέσεων.

Η περιοχή κάτω από κάθε κορυφή ολοκληρώνεται και εφαρμόζει σ' ένα μοντέλο μιας θέσης ανεξάρτητης πρόσδεσης για να προσδιορίσουμε τη σταθερά σύνδεσης (K_a), την ενθαλπία (ΔH), τη στοιχειομετρία (n), τη σταθερά αποδέσμευσης (K_d) και την εντροπία (ΔS). Η θερμότητα αραίωσης αφαιρέθηκε από την ολοκληρωμένη περιοχή της κορυφής. Από τη σύνδεση του συνθετικού κορεσμένου λιπαρού οξέος HDA (10%) 0,05 mM στην πρωτεΐνη του ορού του βόειου γάλακτος β-Lg 0,2 mM προέκυψαν τα εξής αποτελέσματα, τα οποία αποτελούν το θερμοδυναμικό προφίλ της συγκεκριμένης αντίδρασης πρόσδεσης: $K_a = 1,203e+06$ 1/M, $dH = -49,04$ kJ/mol, $n = 0,249$, $K_d = 8,311e-07$ M και $dS = -48,08$ J/mol·K

	K_a [M^{-1}] $\times 10^6$	n	dH (kJ/mol)	K_d [M] $\times 10^{-7}$	dS (J/mol·K)
HDA	$1,203 \times 10^6$	0,249	-49,04	$8,311 \times 10^{-7}$	-48,08

Πίνακας 6: Ιδιότητες πρόσδεσης (προσδιορισμός της σταθεράς σύνδεσης- K_a , της στοιχειομετρίας- n , της ενθαλπίας- ΔH , της σταθεράς αποδέσμευσης- K_d και της εντροπίας- ΔS) του HDA με την β-Lg όπως αυτές προσδιορίστηκαν με την μέθοδο ITC.

Η σταθερά πρόσδεσης K_a δείχνει πόσο ισχυρά δεσμεύεται το HDA στη β-Lg. Η ενθαλπία πρόσδεσης dH δείχνει το σχηματισμό συγκεκριμένων δεσμών υδρογόνου και τις αλληλεπιδράσεις van der Waals. Η στοιχειομετρία n

αποδίδει τον αριθμό των θέσεων πρόσδεσης / μόριο στόχου. Η σταθερά αποδέσμευσης K_d δείχνει πόσο εύκολα δίσταται το σύμπλοκο HDA – β -Lg. Η εντροπία dS δείχνει το σχηματισμό υδροφοβικών ή μη ειδικών δεσμών. Οι θερμοδυναμικοί παράγοντες που επηρεάζουν τη συγγένεια πρόσδεσης είναι η ενθαλπία dH και η εντροπία dS . Ένα αρνητικό dH θεωρείται ότι είναι ένα ευνοϊκό γεγονός και οφείλεται στο σχηματισμό δεσμών υδρογόνου και αλληλεπιδράσεων van der Waals. Η μεταβολή της ενθαλπίας εξαρτάται από την ισχύ των αλληλεπιδράσεων β -Lg – HDA που σχετίζεται με το διαλύτη. Ένα αρνητικό dS είναι ένα μη ευνοϊκό γεγονός και οφείλεται σε απώλεια στερεοδιαταξικών βαθμών ελευθερίας ως αποτέλεσμα της πρόσδεσης. Η αντιστάθμιση ενθαλπίας - εντροπίας παίζει ρόλο στη συγγένεια πρόσδεσης. Η ενθαλπία dH και η εντροπία dS ίσως δρουν σε συνέργεια ή σε αντίθεση κατά τη διάρκεια της πρόσδεσης. Στην προκειμένη περίπτωση, οι dH και dS δρουν σε συνέργεια γιατί είναι και οι δύο αρνητικές. Η ελεύθερη ενέργεια είναι $\Delta G \leq 0$ για μια αυθόρμητη διαδικασία και προσδιορίζεται από τις dH και dS . Όσο πιο αρνητική η ΔG , τόσο μεγαλύτερη η συγγένεια πρόσδεσης.

5 ΤΕΛΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από τα πειράματα τιτλοδότησης που διεξήχθησαν, στα οποία χρησιμοποιήθηκε φιλτραρισμένο dH_2O τόσο ως τιτλοδότης όσο και ως τιτλοδοτούμενο διάλυμα, ελέγχθηκε η εξαιρετικά υψηλή ευαισθησία του μηχανήματος ITC καθώς και τα χαμηλότερα όρια ανίχνευσης που παρουσιάζει και διαπιστώθηκε ότι πραγματοποιεί ακριβείς θερμικές μετρήσεις σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις. Ακολούθως, πραγματοποιήθηκαν πειράματα αυξανόμενης τιτλοδότησης διαλύματος της πρωτεΐνης του ορού του βόειου γάλακτος, β -γαλακτοσφαιρίνης (β -Lg) μέσα σε διάλυμα συνθετικού κορεσμένου λιπαρού οξέος δεκαπεντανοϊκού (PDA) και δεκαεπτανοϊκού (HDA) οξέος σε ξεχωριστά πειράματα. Ο σκοπός των συγκεκριμένων πειραμάτων ήταν η μελέτη της αντίδρασης πρόσδεσης μιας πρωτεΐνης, η οποία συναντάται σε αφθονία στο γάλα των βοοειδών και διακρίνεται από ιδιαίτερα υψηλό επιστημονικό ενδιαφέρον, με συνθετικά κορεσμένα λιπαρά οξέα, που δεν απαντώνται στη φύση, με τη μέθοδο προσδιορισμού της Θερμιδομετρίας Ισόθερμης Τιτλοδότησης (Isothermal Titration Calorimetry, ITC).

Σ' αυτά τα πειράματα αναλύθηκε η πρόσδεση των δύο προαναφερθέντων λιπαρών οξέων ξεχωριστά στην πρωτεΐνη β -Lg με τη μέθοδο ITC αυξανόμενων ενέσεων και προέκυψε το θερμοδυναμικό προφίλ της εκάστοτε αντίδρασης πρόσδεσης που περιελάμβανε τους θερμοδυναμικούς παράγοντες: dH , K_a , n , K_d και dS . Από τις τιμές των θερμοδυναμικών παραγόντων των αντιδράσεων πρόσδεσης που ελήφθησαν από τα πειράματα, καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι το δεκαπεντανοϊκό (PDA) οξύ προσδέεται πιο ισχυρά στην β -Lg, όπως αποδεικνύεται από τις υψηλότερες τιμές της σταθεράς πρόσδεσης K_a για το PDA, σε σύγκριση με το δεκαεπτανοϊκό (HDA) οξύ. Από τη συγκεκριμένη μελέτη πρόσδεσης συμπεραίνεται ότι η συγκεκριμένη πρωτεΐνη σύμφωνα με τα δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά που τη διακρίνουν, καθώς και λόγω της εξαιρετικά υψηλής αφθονίας της στη φύση, μπορεί να χρησιμοποιηθεί στον ερευνητικό τομέα της Φαρμακολογίας και πιο συγκεκριμένα στη Φαρμακογενωμική, καθώς βοηθά στην ανακάλυψη νέων πρωτοποριακών τρόπων για τη

βελτίωση του σχεδιασμού φαρμάκων που ήδη υπάρχουν, έτσι ώστε ν' αποκτήσουν περισσότερα πλεονεκτήματα (π.χ. μεγαλύτερη δραστικότητα, καλύτερη απορρόφηση από τον οργανισμό, λιγότερες παρενέργειες) ή νέων πιο προηγμένων φαρμάκων τελευταίας γενιάς. Αυτή η εξαιρετικής σημασίας μελέτη πρόσδεσης είναι ικανή να δώσει πληροφορίες για τη χρήση της συγκεκριμένης πρωτεΐνης ως ένα γενικότερο φορέα λιπόφιλων μορίων καθώς επίσης και για την αναγνώριση, πρόσδεση και μεταφορά φαρμάκων, αντιοξειδωτικών και βιταμινών στο έντερο και σε οποιοδήποτε άλλο σημείο του οργανισμού απαιτείται μέσω της κυκλοφορίας του αίματος. Η ευρεία αξιοποίηση της β-Lg από την βιομηχανία τροφίμων έχει ως στόχο την αύξηση της λειτουργικότητας (σύσταση, αισθητήρια, θρεπτική) εμπορικών τροφών, την αύξηση του συνολικού πρωτεϊνικού περιεχομένου τροφίμων μ' αυτή την οικονομική πηγή πρωτεΐνης και την εφαρμογή της σε ποτά. Εν κατακλείδι, η μελέτη των μοριακών αλληλεπιδράσεων της πρόσδεσης λιπαρών οξέων στην β-Lg με τη μέθοδο ITC μπορεί να έχει εφαρμογή σε πολλούς άλλους τομείς της επιστήμης όπως στη Βιοχημεία και τη Βιοτεχνολογία, στη Βιοφυσική, στη Νανοτεχνολογία και στα Βιοκαύσιμα, οι οποίοι δραστηριοποιούνται εξίσου σε προηγμένη έρευνα.

6 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- H.-D. Belitz, W. Grosch, P. Schieberle, Χημεία Τροφίμων, 3^η Έκδοση, Εκδόσεις Τζιόλα.^[1]
- Alan H. Varnam and Jane P. Sutherland, Γάλα & προϊόντα γάλακτος. Τεχνολογία - Χημεία & Μικροβιολογία, Εκδόσεις Ίων.^[2]
- http://fst123.fst.ucdavis.edu/~garysmith/FST_201.html^[3]
- Α.Ι. Μαντή, Υγιεινή και τεχνολογία του γάλακτος και των προϊόντων του, 7^η έκδοση, Εκδόσεις Αδελφών Κυριακίδη.^[4]
- Eigel, W. N., Butler, J. E., Ernstrom, C. A., Farell, H. M., Harwalker, Jr., V.R., Jenness, R. and Whitney, R. McL, 1984. Nomenclature of proteins of cow's milk: Five revision. J. Dairy Sci. 67: 1599.^[5]
- Mercier, J.C., F. Grosclaude, et B. Ribadeau – Dumas. 1971. Structure primaire de la caseine α_{s1} bovine. Eur. J. Biochem. 23:41.^[6]
- Brignon, G., B. Ribadeau-Dumas, J.C. Mercier, J.P. Pelisier and B.C. Das. 1977. Complete amino acid sequence of bovine α_{s2} - casein. FEBS Lett. 76: 277.^[7]
- Mercier, J.C., G. Brignon, et B. Ribadeau – Dumas. 1973. Structure primaire de la caseine κ -B bovine. Sequence complete. Eur. J. Biochem. 35: 222.^[8]
- Ribadeau – Dumas, B., G. Brignon, F. Grosclaude, et J. Mercier. 1972. Structure primaire de la casein β -bovine. Eur. J. Biochem. 25: 505.^[9]
- Grosclaude, F., M. F. Mahe et B. Ribadeau – Dumas, 1973. Structure primaire de la caseine α_{s1} et de la caseine β bovine. Eur. J. Biochem. 40: 323.^[10]
- Eigel, W.N. 1977. Formation of γ_1 - A, γ_2 - A² and γ_3 - A caseins by in vitro proteolysis of β -casein A² with bovine plasmin. Int. J. Biochem. 8:187.^[11]
- <http://www.food-info.net/gr/protein/milk.htm>^[12]

- <http://bismar.blogspot.gr/2012/11/how-does-bovine-serum-albumin-protein.html>^[13]
- Brew, K., F.G. Kastelliko, T.C. Vanaman, and R.L. Hill, 1970. The complete amino acid sequences of bovine α -lactalbumin. *J. Biochem.* 245: 4370.^[14]
- Hopper, K. E., and H.A. McKenzie, 1973. Minor components of bovine α -lactalbumin A and B. *Biochem. Biophys. Acta.* 295: 352.^[15]
- http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4614-4714-6_9#page-1^[16]
- Bell, K., H.A. Mc Kenzie, W.H. Murphy, and D.C. Show, 1970: β -lactoglobulin (Droughtmaster) A unique protein variant. *Bioch. Biophys. Acta.* 214: 427.^[17]
- <http://www.rcsb.org/pdb>^[18]
- Kontopidis, G., Holt, C., & Sawyer, L. (2002). The ligand-binding site of bovine β -lactoglobulin: Evidence for a function? *Journal of Molecular Biology*, 318, 1043-1055.^[19]
- Kontopidis, G., Holt, C., & Sawyer, L. (2004). Invited Review: β -Lactoglobulin: Binding Properties, Structure and Function. *Journal of Dairy Science*, 87, 785-796.^[20]
- Loch, J. I., Bonarek, P., Polit, A., Ries, D., Dziedzicka-Wasylewska, M., Lewinski, K. (2013). Binding of 18-carbon unsaturated fatty acids to bovine β -lactoglobulin-Structural and thermodynamic studies. *International Journal of Biological Macromolecules*, 57,226-231.^[21]
- M.D. Perez, L. Sanchez, P. Aranda, J. M. Ena, R. Oria, M. Calvo, *Biochimica et Biophysica Acta* 1123 (1992),151-155.^[22]
- <http://www.jbc.org/content/104/2/359.citation>^[23]
- <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958694698000211>^[24]
- Wu S.Y., Perez M.D., Puyol P., Sawyer L. beta-lactoglobulin binds palmitate within its central cavity. *J Biol Chem.*1999 Jan 1, 274(1):170-4.^[25]

- Flower D.R., North A.C., Sansom C.E. The lipocalin protein family: structural and sequence overview. *Biochim Biophys Acta*. 2000 Oct 18, 1482(1-2):9-24.^[26]
- <http://www.biochemj.org/bj/318/bj3180001.htm>^[27]
- Newcomer M.E., Jones T.A., Aqvist J., Sundelin J., Eriksson U., Rask L., Peterson P.A. The three-dimensional structure of retinol-binding protein. *EMBO J*. 1984 Jul, 3(7):1451-4.^[28]
- Hambling, S.G., McAlpine, A.S. & Sawyer, L.(1992). β - Lactoglobulin. In *Advanced Dairy Chemistry I* (Fox, P F., ed.), 2nd edit., pp. 140-191, Elsevier, Amsterdam.^[29]
- Sawyer, L. & Kontopidis, G. (2000). The core lipocalin - β -lactoglobulin. *Biochim. Biophys. Acta*, 1482, 136-148.^[30]
- Qin B.Y., Bewley M.C., Creamer L.K., Baker H.M., Baker E.N., Jameson G.B. Structural basis of the Tanford transition of bovine beta-lactoglobulin. *Biochemistry*. 1998 Oct 6, 37(40):14014-23.^[31]
- Taulier N., Chalikian T.V. Characterization of pH-induced transitions of beta-lactoglobulin: ultrasonic, densimetric, and spectroscopic studies. *J Mol Biol*. 2001 Dec 7, 314(4):873-89.^[32]
- Sakurai K., Goto Y. Dynamics and mechanism of the Tanford transition of bovine beta-lactoglobulin studied using heteronuclear NMR spectroscopy. *J Mol Biol*. 2006 Feb 17, 356(2):483-96.^[33]
- Oliveira K.M., Valente-Mesquita V.L., Botelho M.M., Sawyer L., Ferreira S.T., Polikarpov I. Crystal structures of bovine beta-lactoglobulin in the orthorhombic space group C222(1). Structural differences between genetic variants A and B and features of the Tanford transition. *Eur J Biochem*. 2001 Jan, 268(2):477-83.^[34]
- Liu H.C., Chen W.L., Mao S.J. Antioxidant nature of bovine milk beta-lactoglobulin. *J Dairy Sci*. 2007 Feb, 90(2):547-55.^[35]

- Vijayalakshmi L., Krishna R., Sankaranarayanan R., Vijayan M. An asymmetric dimer of beta-lactoglobulin in a low humidity crystal form- Structural changes that accompany partial dehydration and protein action. *Proteins*. 2007 Oct 11, 71(1):241-249. ^[36]
- biol1020-2012-2.blogspot.gr/2012/10/hypoallergenic-milk_11.html ^[37]
- Sakurai K., Konuma T., Yagi M., Goto Y. Structural dynamics and folding of beta-lactoglobulin probed by heteronuclear NMR. *Biochim Biophys Acta*. 2009 Jun, 1790(6):527-37. ^[38]
- http://proteopedia.org/wiki/index.php/Sandbox_Reserved_779 ^[39]
- Brownlow S., Morais Cabral J.H., Cooper R., Flower D.R., Yewdall S.J., Polikarpov I., North A.C., Sawyer L. Bovine beta-lactoglobulin at 1.8 Å resolution - still an enigmatic lipocalin. *Structure*. 1997 Apr 15, 5(4):481-95. ^[40]
- Dominguez-Ramirez L., Del Moral-Ramirez E., Cortes-Hernandez P., Garcia-Garibay M., Jimenez-Guzman J. beta-Lactoglobulin's Conformational Requirements for Ligand Binding at the Calyx and the Dimer Interphase: a Flexible Docking Study. *PLoS One*. 2013 Nov 8, 8(11):e79530. ^[41]
- <http://www.faqs.org/patents/app/20110038942> ^[42]
- <http://www.kettlercise.com/members-area/supplements/whey-protein.html> ^[43]
- Jeremy M. Berg, John L. Tymoczko, Lubert Stryer (2013), *Βιοχημεία, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο.* ^[44]
- Ι. Γ. Γεωργιάτσου (2001), *Εισαγωγή στη Βιοχημεία, 5^η Έκδοση, Εκδόσεις Γιαχούδη-Γιαπούλη, Θεσ/νίκη.* ^[45]
- A. A. Spector, J. E. Fletcher (1970), *Lipids* 5, 403-411. ^[46]
- D. Frapin, E. Dufour, T.J. Haertle (1993), *Protein Chemistry* 12, 443-449. ^[47]
- P. Zimet, Y.D. Livney (2009), *Food Hydrocolloids* 23, 1120-1126. ^[48]

- F. Zsila, P.T. Szabó, Z. Bikádi, M. Simonyi, *FEBS Letters* 520 (2002) 81-87.^[49]
- T. Considine, H.A. Patel, H. Singh, L.K. Creamer, *Food Chemistry* 102 (2007) 1270-1280.^[50]
- H.R. Jiang, N. Liu, *Journal of Dairy Science* 9 (2010) 3931-3939.^[51]
- K. Liskova, M.A.E. Auty, V. Chaurin, S. Min, K.H. Mok, N. O'Brien, A.L. Kelly, A. Brodkorb, *European Journal of Lipid Science and Technology* 113 (2011) 1207-1218.^[52]
- S. Le Maux, L. Giblin, T. Croguennec, S. Bouhallab, A. Brodkorb, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60 (2012) 9476-9483.^[53]
- Rolf Jost "Milk and Dairy Products" *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Wiley-VCH, Weinheim, 2002.^[54]
- R. P. Hansen, F. B. Shorland and N. June Cooke (1957). "Occurrence in Butterfat of n-Heptadecanoic Acid (Margaric Acid)". *Nature* 179 (98): 98.^[55]
- TA INSTRUMENTS *Microcalorimetry-Compendium_vol.1_Master* (2008).^[56]