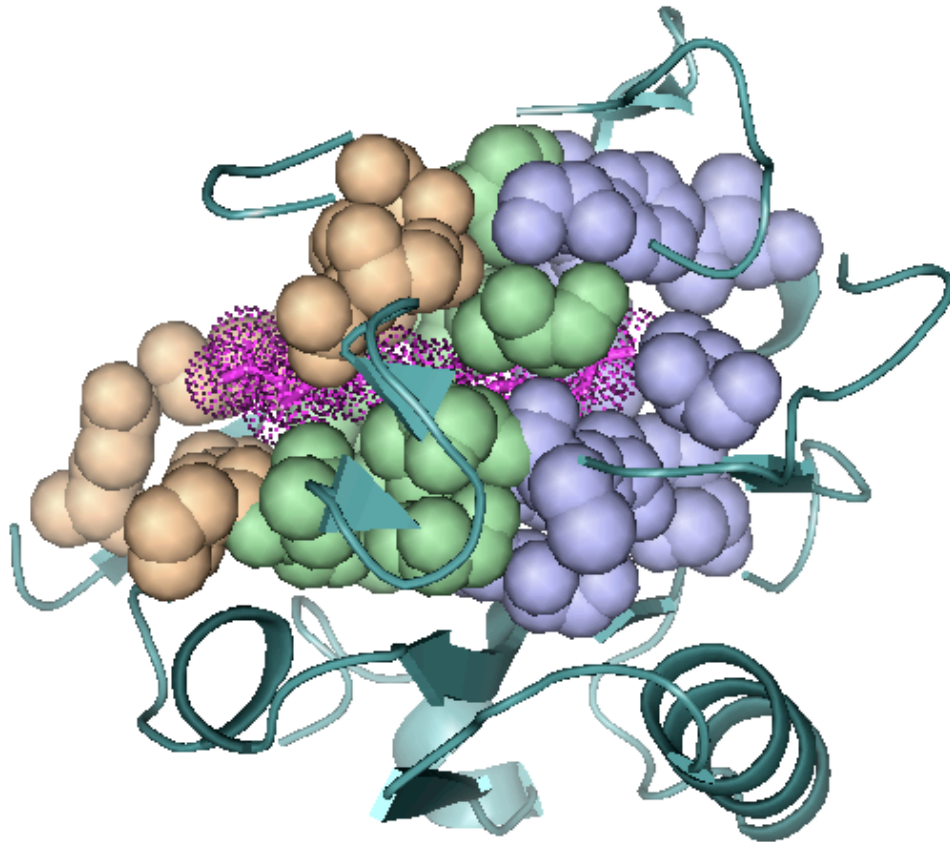


**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΓΕΝΙΚΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ**

**ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΚΑΙ ΔΟΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ β -ΛΑΚΤΟΣΦΑΙΡΙΝΗΣ ΤΩΝ
ΘΗΛΑΣΤΙΚΩΝ ΩΣ ΜΕΤΑΦΟΡΕΑ ΥΔΡΟΦΟΒΩΝ ΒΙΟΜΟΡΙΩΝ**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ



ΑΝΔΡΕΟΥ ΑΘΗΝΑ

ΑΘΗΝΑ, 2010

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΓΕΝΙΚΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΚΑΙ ΔΟΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ β -ΛΑΚΤΟΣΦΑΙΡΙΝΗΣ ΤΩΝ
ΘΗΛΑΣΤΙΚΩΝ ΩΣ ΜΕΤΑΦΟΡΕΑ ΥΔΡΟΦΟΒΩΝ ΒΙΟΜΟΡΙΩΝ**

ΑΝΔΡΕΟΥ ΑΘΗΝΑ

ΑΘΗΝΑ, 2010

**ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΚΑΙ ΔΟΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ β -ΛΑΚΤΟΣΦΑΙΡΙΝΗΣ ΤΩΝ
ΘΗΛΑΣΤΙΚΩΝ ΩΣ ΜΕΤΑΦΟΡΕΑ ΥΔΡΟΦΟΒΩΝ ΒΙΟΜΟΡΙΩΝ**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΑΝΔΡΕΟΥ ΑΘΗΝΑΣ

**ΜΕΛΗ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ
ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ κ. ΗΛΙΑΣ ΗΛΙΟΠΟΥΛΟΣ
ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ κ. ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ ΧΟΥΝΤΑΣ
ΕΠΙΚ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ κ. ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΜΠΕΘΑΝΗΣ (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ)**

Στους γονείς μου

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στα εργαστήρια Φυσικής και Γενετικής του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών στα πλαίσια των απαιτήσεων του μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών του Γενικού Τμήματος.

Ευχαριστώ το δάσκαλό μου καθηγητή κ. Ηλία Ηλιόπουλο για το θέμα της μελέτης μου, για την καθοδήγησή του στην επιστημονική προσέγγιση αλλά και σε όλα τα στάδια της εργασίας από το ερευνητικό μέρος και τον τρόπο διεξαγωγής των πειραμάτων έως τη διαμόρφωση του κειμένου, αφήνοντάς μου πάντα χώρο στην ανάπτυξη πρωτοβουλίας. Για τη διαρκή συμπαράσταση, την ενθάρρυνση και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε. Γιατί μεταλαμπαδεύει την αγάπη για έρευνα και για αναζήτηση γνώσης και για τον καθοριστικό του ρόλο στην πνευματική μου καλλιέργεια. Θεωρώ τον εαυτό μου τυχερό για την ευκαιρία της συνεργασίας μαζί του.

Ευχαριστώ τον επίκουρο καθηγητή κ. Κωνσταντίνο Μπεθάνη για τη συμπαράσταση, τη συνεχή ενθάρρυνση, την καθοδήγηση και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, αλλά και για τη βοήθειά του στην κρυσταλλογραφία, την προθυμία του για άμεση επίλυση οποιουδήποτε προβλήματος και αν παρουσιαζόταν και γιατί ήταν πάντα διαθέσιμος να προσφέρει τη βοήθειά του με ευχαρίστηση.

Ευχαριστώ τον καθηγητή κ. Αθανάσιο Χούντα Διευθυντή του εργαστηρίου Φυσικής για τη δυνατότητα που μου έδωσε να παρακολουθήσω το μεταπτυχιακό πρόγραμμα σπουδών, για τις καίριες διορθώσεις του επί του κειμένου, τις διευκρινίσεις του και για την ηρεμία που αποπνέει, που μου ήταν πολύτιμη.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή κ. Μιχαήλ Λουκά Διευθυντή του εργαστηρίου Γενετικής για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και την αμέριστη υποστήριξή του.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Ηλία Χριστοφορίδη για τη βοήθειά του στην τέχνη της κρυστάλλωσης αλλά και για το καλό κλίμα στο εργαστήριο Φυσικής· από το εργαστήριο Γενετικής την κ. Αίγλη Παπαθανασοπούλου για τη συμπαράσταση, αλλά και την πολύτιμη βοήθειά της και τον κ. Νίκο Παπανδρέου έναν άριστο επιστήμονα που πάντα πρόθυμα μου προσέφερε μια άμεση λύση σε ζητήματα βιοπληροφορικής.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλο το προσωπικό στο εργαστήριο Φυσικής για τη φιλική τους αντιμετώπιση, για τις ωραίες στιγμές στο εργαστήριο Γενετικής τη Βίλλυ Ανδρουτσοπούλου και τον επίκουρο καθηγητή κ. Νίκο Κοσμίδη όπως και για τη συμπαράστασή του και την κ. Δέσποινα Λουκά για την ακούραστη φροντίδα της.

Επιστημονική περιοχή	Scientific area
Γενετική	Genetics
Δομική Βιολογία	Structural Biology
Κρυσταλλογραφία ακτίνων -X	X-ray Crystallography

Λέξεις - κλειδιά	Keywords
β -λακτοσφαιρίνη	β -Lactoglobulin
Δέσμευση υποστρωμάτων	Ligand binding
Σύμπλοκα BLG	BLG complex
Κρυσταλλική δομή	Crystal structure
Κρυσταλλογραφία ακτίνων -X	X-ray Crystallography

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	I
SUMMARY	II
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1 Γάλα.....	1
1.1.1 Συστηματική κατάταξη θηλαστικών.....	2
1.1.2 Σύσταση γάλακτος.....	3
1.1.3 Πρωτεΐνες γάλακτος.....	4
1.1.4 Πρωτεΐνες ορού γάλακτος.....	5
1.2 Λιποκαλίνες.....	6
1.2.1 Δομή λιποκαλινών.....	7
1.2.2 Αλληλεπιδράσεις.....	8
1.2.2.1 Δημιουργία μακρομοριακών συμπλόκων (macromolecular complexation).....	8
1.2.2.2 Πρόσδεση σε υποδοχείς (receptor binding).....	9
1.2.2.3 Δέσμευση υποστρωμάτων (ligand binding).....	9
1.2.3 Λειτουργία.....	10
1.3 β-Λακτοσφαιρίνη.....	11
1.3.1 Κατανομή της β-λακτοσφαιρίνης στα θηλαστικά.....	11
1.3.2 Βιοσύνθεση της β-λακτοσφαιρίνης.....	13
1.3.3 Δομή της β-λακτοσφαιρίνης.....	13
1.3.3.1 Δομή των BLGs από άλλα είδη πλην της αγελάδας.....	17
1.3.4 Γενετική ποικιλότητα.....	18
1.3.5 Λειτουργία.....	21
1.3.6 Δέσμευση υποστρωμάτων.....	24
1.4 Στόχος της εργασίας.....	26
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	29
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	29
2.1 Κρυστάλλωση πρωτεϊνών.....	29
2.1.1 Κρυσταλλογένεση.....	29
2.1.2 Φάσεις κρυστάλλωσης.....	30
2.1.3 Παράγοντες που επηρεάζουν την κρυστάλλωση.....	32
2.1.3.1 Σχεδιασμός κρυστάλλωσης.....	33
2.1.4 Μέθοδοι κρυστάλλωσης.....	38
2.1.4.1 Διάχυση ατμών.....	38
2.1.4.2 Διάχυση μέσω επιφανείας.....	41
2.1.4.3 Διαπίδυση.....	42
2.1.4.4 Τεχνική ολικής ανάμιξης.....	42
2.2 Κρυσταλλογραφία.....	43
2.2.1 Κρυσταλλικά συστήματα.....	43
2.2.2 Περίθλαση ακτίνων-X.....	47
2.2.3 Διαδικασία προσδιορισμού κρυσταλλοδομής.....	49
2.2.4 Μωσαϊκότητα.....	50
2.2.5 Κρυογονική στην κρυσταλλογραφία πρωτεϊνών.....	50

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	53
2.3 Κρυστάλλωση β -λακτοσφαιρίνης.....	53
2.4 Κρυστάλλωση συμπλόκων β -λακτοσφαιρίνης.....	54
2.4.1 Εμβάπτιση.....	54
2.4.2 Συγκρυστάλλωση.....	54
2.5 Υποστρώματα β -λακτοσφαιρίνης.....	55
2.6 Γενετική μελέτη.....	57
2.6.1 Δεδομένα ακολουθιών.....	57
2.6.2 Εργαλεία ανάλυσης ακολουθιών.....	59
2.6.2.1 Ομόλογες ακολουθίες.....	59
2.6.2.2 Πολλαπλή ευθυγράμμιση ακολουθιών.....	59
2.6.2.3 Πρόγραμμα Gen Doc.....	60
2.7 Δομική μελέτη.....	61
2.7.1 Δεδομένα τρισδιάστατων δομών.....	61
2.7.2 Δομική στοιχίση.....	62
2.7.2.1 Πρόγραμμα δομικής σύγκρισης MATRAS.....	63
2.7.3 Πρόγραμμα απεικόνισης PyMOL.....	64
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	65
3.1 Κρυστάλλωση.....	65
3.2 Κρυσταλλογραφία.....	67
3.2.1 Αρχική επεξεργασία των δεδομένων.....	68
3.3 Γενετική και δομική μελέτη της θέσης δέσμευσης (binding site).....	70
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	83
4.1 Η β -λακτοσφαιρίνη.....	83
4.2 Γενετική ανάλυση των β -λακτοσφαιρινών.....	84
4.3 Δομική ανάλυση συμπλόκων της β -λακτοσφαιρίνης με υδρόφοβα υποστρώματα.....	90
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	93
6. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	103

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η β -λακτοσφαιρίνη (β -Lactoglobulin, BLG) είναι η βασική πρωτεΐνη του ορού του γάλακτος των μηρυκαστικών, ενώ υπάρχει στο γάλα και πολλών άλλων θηλαστικών, χωρίς όμως να βρίσκεται σε όλα τα είδη. Η β -λακτοσφαιρίνη είναι μία τυπική λιποκαλίνη που έχει μελετηθεί διεξοδικά τα τελευταία εβδομήντα χρόνια, με αποτέλεσμα την ύπαρξη μεγάλου όγκου βιβλιογραφίας για την αγελαδινή BLG. Θεωρείται ότι δεσμεύει, προστατεύει και μεταφέρει μικρά υδρόφοβα διατροφικά σημαντικά μόρια από τη μητέρα στο νεογνό. Ιδιαίτερα μελετημένη είναι η ικανότητά της να δεσμεύει ρετινόλη. Οι δομικές μελέτες δείχνουν ότι η δέσμευση μακράς αλύσου λιπαρών οξέων, ρετινοειδών και στεροειδών, στην κοιλότητα δέσμευσης εξαρτάται από τις συνθήκες του περιβάλλοντος της πρωτεΐνης (pH, συγκέντρωση, θερμοκρασία).

Η παρούσα εργασία προσπαθεί να συσχετίσει τη δομή και τη λειτουργία της πρωτεΐνης σε ένα συνδυασμό στερεοδομικής και γενετικής ανάλυσης, με επίκεντρο την κοιλότητα πρόσδεσης υδρόφοβων υποστρωμάτων. Η γενετική μελέτη αναδεικνύει την εξελικτική διαφοροποίηση του λιποκάλυκα, ενώ οι μελέτες πρόσδεσης αναδεικνύουν τις επιμέρους αλληλεπιδράσεις αμινοξέων και υποστρώματος. Σε ό,τι αφορά τη λειτουργικότητα της β -λακτοσφαιρίνης ως μεταφορέα υδρόφοβων μορίων τα ενδιαφέροντα αμινοξέα εντοπίζονται στην κοιλότητα δέσμευσης. Τα αμινοξικά κατάλοιπα που μετέχουν στην κοιλότητα δέσμευσης ανήκουν σε τρεις ζώνες. Η ζώνη I βρίσκεται εσωτερικά στο βάθος του κάλυκα, η ζώνη II ενδιάμεσα και η ζώνη III εξωτερικά.

Ο αλληλόμορφος BLGA χρησιμοποιείται για κρυστάλλωση και προσδιορισμό της τρισδιάστατης δομής σε συνθήκες pH 7,3. Τα πειράματα κρυστάλλωσης πραγματοποιήθηκαν με απώτερο στόχο τον προσδιορισμό της δομής με κρυσταλλογραφία ακτίνων-X. Η κρυστάλλωση της φυσικής πρωτεΐνης απέδωσε κρυστάλλους κατάλληλους για τον προσδιορισμό της δομής με κρυσταλλογραφία ακτίνων-X. Δεδομένα περίθλασης ακτίνων-X από σύγχροτρον, έδειξαν ότι ο κρύσταλλος της BLGA που παρήχθει σε pH 7,3, σκεδάζει στη διακριτική ικανότητα των 1,96Å. Ομάδα χώρου είναι η P3₂21, που ανήκει στο τριγωνικό κρυσταλλικό σύστημα. Οι διαστάσεις της μοναδιαίας κυψελίδας είναι a=b=53,16Å, c= 112,28Å α=β=90°, γ=120°. Η κρυσταλλογραφική μελέτη των αλληλομόρφων αλλά και της φυσικής πρωτεΐνης με διάφορα υποστρώματα οδηγεί στην κατανόηση της λειτουργίας αλλά και της συνάφειας υποστρωμάτων και β -λακτοσφαιρίνης.

“Genetics and structural studies of mammalian β -Lactoglobulin as a carrier of hydrophobic biomolecules”

SUMMARY

β -Lactoglobulin (BLG) is the major whey protein of ruminant species and is also present in the milk of many but not all mammal species. β -Lactoglobulin is a typical lipocalin that has been studied extensively over the past seventy years. There is a vast literature upon bovine milk BLG. It binds, protects and transports nutritionally important small hydrophobic molecules from the mother to the infant. It has been particularly studied for its ability to bind retinol. The available structural and binding studies lead to the conclusion that the ligand binding site can accommodate long-chain fatty acids, retinoids, and steroids, under various physiological conditions (pH, concentration, temperature).

The present study tries to correlate the structure and functionality of the protein using a combination of conformational and genetics analyses primarily for the hydrophobic ligand binding site. Genetic studies reveal the evolutionary differentiation of the binding cavity and binding studies reveal the interactions among cavity amino acids and ligands. Regarding the functionality of β -lactoglobulin as a carrier of hydrophobic molecules, important amino acid positions characterise the binding site. The amino acid residues forming the calyx of the protein are placed in three virtual rings (inside at the depth of the calyx, intermediate, and externally).

The allele BLGA is used for crystallisation and three-dimensional structure determination at pH 7.3. The crystallisation experiments were made with a view to determine the protein's structure using X-ray crystallography. Crystallisation trials of BLGA at pH 7.3 have produced crystals capable of diffracting X-rays at 1.96Å resolution on an X-ray synchrotron source. Crystals of native BLGA are of the trigonal form (space group P3₂21) (average unit cell a=b=53.16Å, c=112.28Å α = β =90°, γ =120°). Crystallographic analysis of alleles at the species level and also the native protein complex with various ligands may point to a possible physiological function and a further understanding of the functionality of this protein in mammals.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Γάλα

Σύμφωνα με τις διηγήσεις της ελληνικής μυθολογίας από τους αρχαίους συγγραφείς, ο Δίας, για να χαρίσει στο νεογέννητο γιο του Ηρακλή την αθανασία, έπρεπε να κατορθώσει να θηλάσει το μωρό μία θεά. Γι' αυτό μισομέθυσε την Ήρα και όταν εκείνη αποκοιμήθηκε, τοποθέτησε το βρέφος στο στήθος της. Ο Ηρακλής θήλασε αρκετά, μα η θεά αντιλήφθηκε την κατάσταση και καθώς σηκώθηκε απότομα και οργισμένα, ξέφυγε γάλα και τινάχτηκε μακριά. Από τις σταγόνες που έπεσαν στη γη, γεννήθηκαν τα κρίνα και από το γάλα που πήγε ψηλά στον ουρανό δημιουργήθηκε ο Γαλαξίας. Στην ελληνική μυθολογία – σύμφωνα με μία εκδοχή – βρίσκεται και η πρώτη αναφορά διατροφής με γάλα μηρυκαστικού· όταν το νεογέννητο Δία έκρυψε η μητέρα του (Ρέα) στα δύσβατα βουνά της Κρήτης, για να τον προφυλάξει από τον πατέρα του (Κρόνο) και τον έτρεφε με το γάλα της η κατσίκα Αμάλθεια.

Ο όρος γάλα αναφέρεται στο προϊόν βιολογικής έκκρισης του μαστικού αδένων θηλαστικών, που προορίζεται για τη διατροφή του νεογέννητου για το οποίο αποτελεί τη μοναδική τροφή μέχρι μία ορισμένη ηλικία. Για τον άνθρωπο όμως, το γάλα εξακολουθεί να αποτελεί μέρος της καθημερινής διαίτας του είτε αυτούσιο, είτε με τη μορφή γαλακτοκομικών προϊόντων (τυριά, βούτυρο, γιαούρτια) για όλη τη διάρκεια ζωής του.

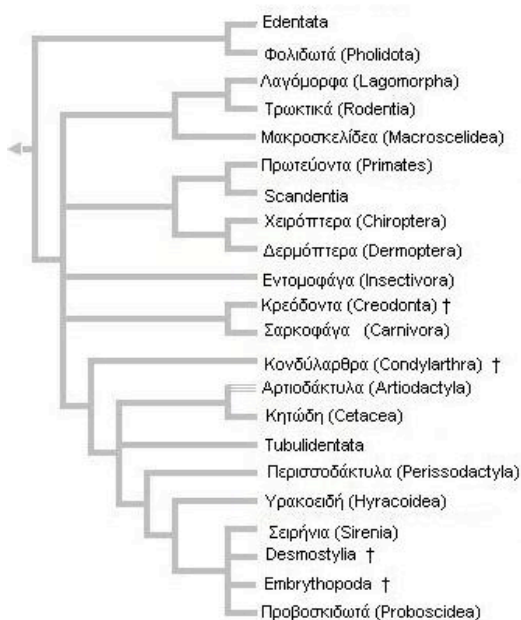
Η απ' ευθείας μεταφορά του γάλακτος από τους μαστούς στο πεπτικό σύστημα των νεογνών μέσω του θηλασμού, αποτελεί το μικρότερο κύκλωμα παραγωγής - κατανάλωσης που σημειώνεται στη φύση.

1.1.1 Συστηματική κατάταξη θηλαστικών

Τα θηλαστικά κατατάσσονται ως εξής:

- Επικράτεια Domain: **Ευκάρυα Eukaryota** Whittaker & Margulis, 1978
- Βασίλειο Kingdom: **Ζώα Animalia** Linnaeus, 1758
 - Υποβασίλειο Subkingdom: **Ευμετάζωα Bilateria** (Hatschek, 1888) Cavalier-Smith, 1983
 - Υπερσυννομοταξία Branch: **Δευτεροστόμια Deuterostomia** Grobben, 1908
 - Συννομοταξία Phylum: **Χορδωτά Chordata** Bateson, 1885
 - Υποσυννομοταξία Subphylum: **Σπονδυλωτά Vertebrata** Cuvier, 1812
 - Ανθυποσυννομοταξία Infraphylum: **Γναθοστόματα Gnathostomata** Auct. - Jawed
 - Ομοταξία Class: **Θηλαστικά Mammalia** C. Linnaeus, 1758

Στη συστηματική ταξινόμηση ακολουθεί η Τάξη (Order). (<http://zipcodezoo.com>, 2004-2009, the BayScience Foundation, Inc). Στα θηλαστικά περιλαμβάνει ενδεικτικά: Τάξη **Αρτιοδάκτυλα Artiodactyla** (-Μηρυκαστικά- Βοοειδή, Πρόβατα, Αίγες, Ελάφια, Καμήλες, Βίσσονες, Χοίροι κ.λ.π.). Τάξη **Περισοδάκτυλα Perissodactyla** (Ιπποί, Ζέβρες, Όνοι κ.λ.π.). Τάξη **Σαρκοφάγα Carnivora** (Γάτες, Σκύλοι, Λιοντάρια, Φώκιες



Σχήμα 1.1 Φυλογένεια των θηλαστικών (1995, <http://tolweb.org/Eutheria/15997>)

Θαλάσσιοι λέοντες, κ.λ.π.). Τάξη **Κητώδη Cetacea** (Δελφίνια, Φάλαινες, κ.λ.π.). Τάξη **Λαγόμορφα Lagomorpha** (Λαγοί, Κουνέλια κ.λ.π.). Τάξη **Τρωκτικά Rodentia** (Ποντικοί, Αρουραίοι, Κάστορες, Σκίουροι, κ.λ.π.). Τάξη **Πρωτεύοντα Primates** (Άνθρωπος, Γορίλας, Μπαμπούνος, Ουραγοτάγκος, Χιμπατζής κ.λ.π.) (McKenna και Bell, 2000). Στο **σχήμα 1.1** δίνεται ένα δενδρόγραμμα των θηλαστικών (Tree of Life Web Project, 1997. Eutheria Placental Mammals, The University of Arizona College of Agriculture and Life Sciences and The University of Arizona Library).

1.1.2 Σύσταση γάλακτος

Η σύνθεση του γάλακτος που λαμβάνεται από διάφορα είδη παρουσιάζει μεγάλες διαφοροποιήσεις (**Πίνακας 1.1**). Το γάλα είναι μείγμα διαφόρων οργανικών ουσιών και αποτελείται κυρίως από νερό, λίπος, πρωτεΐνες, υδατάνθρακες, ένζυμα, άλατα και βιταμίνες. Για παράδειγμα στο αγελαδινό γάλα ανά 100mL περιέχονται ενδεικτικά, ενέργεια 66kcal ή 275kJ, νερό 87,2g, πρωτεΐνες 3,4g, σάκχαρα (λακτόζη) 4,8g, χοληστερόλη 14mg, ασβέστιο 120 mg, λιπαρά 3,7g από τα οποία, κορεσμένα λιπαρά οξέα 2,5g, μονοακόρεστα λιπαρά οξέα 1,1g, πολυακόρεστα λιπαρά οξέα 0,1g.

Ένα από τα κύρια χαρακτηριστικά της θρεπτικής κατάστασης κατά τη νεογνική περίοδο στα θηλαστικά είναι το γεγονός ότι το γάλα αποτελεί για τον απόγονο τη μοναδική πηγή θρεπτικών συστατικών. Έτσι, σε τελεολογική βάση μπορεί να ειπωθεί για τη σύνθεση του γάλακτος κάθε είδους θηλαστικού, ότι αντιπροσωπεύει τη βέλτιστη σύνθεση των θρεπτικών συστατικών που απαιτούνται κατά τη νεογνική ηλικία του είδους αυτού. Για παράδειγμα το γάλα του ίππου και το γάλα του όνου έχουν τη χαμηλότερη περιεκτικότητα σε λιπαρά, ενώ το γάλα της φώκιας και των φαλαινών μπορεί να περιέχουν περισσότερο από 50% λιπαρά. Υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά δεν έχει μόνο το γάλα των υδρόβιων θηλαστικών. Το γάλα των χοίρων της Γουινέας για παράδειγμα έχει μέση περιεκτικότητα σε λιπαρά 46%. Θα πρέπει να αναφερθεί ότι η σύσταση του γάλακτος ποικίλλει ανάλογα με το χρόνο από τον τοκετό, ενώ σημειώνονται και εποχιακές διακυμάνσεις, πιθανώς σχετιζόμενες με διατροφικές συνήθειες του ζώου. (Hambraeus και Lønnerdal, 2003)

Πίνακας 1.1 Σύσταση του γάλακτος από διάφορα είδη θηλαστικών (Hambræus και Lønnerdal, 2003).

Είδος	Συγκέντρωση γάλακτος (g ανά 100mL)			Kcal	Ρυθμός ανάπτυξης (μέρες για διπλ/σμό βάρους γεννήσεως)
	Πρωτεΐνη	Λίπος	Λακτόζη		
Πρωτεύοντα					
Ανθρώπος	0,9	3,8	7,0	66	120-180
Μηρυκαστικά					
Αγελάδα	3,4	3,7	4,8	66	30
Αίγα	2,9	4,5	4,1	69	6
Καμήλα	3,7	4,2	4,1	69	
Τάρανδος	10,3	16,9	2,8	205	10
Τρωκτικά					
Αρουραίος	8,1	8,8	3,8	127	2
Περισοδάκτυλα					
Ίππος	1,9	1,3	6,9	47	13
Σαρκοφάγα					
Γάτα	10,6	10,8	3,7	154	4
Θαλάσσια σαρκοφάγα					
Φώκια	10,2	49,4	0,1	486	5
Λαγόμορφα					
Κουνέλι	10,3	15,2	1,8	185	4
Κητώδη					
Γαλάζια φάλαινα	10,9	42,3	1,3	430	10
Μαρσιποφόρα					
Καγκουρό	4-10	1-16	5-0	45-184	

1.1.3 Πρωτεΐνες γάλακτος

Υπαρξη πρωτεΐνης βρέθηκε στο γάλα που έχει αναλυθεί από όλα τα είδη μέχρι τώρα. Η συγκέντρωση κυμαίνεται μεταξύ λιγότερο από 1% έως περισσότερο από 10%. Η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη του γάλακτος του ανθρώπου είναι η χαμηλότερη (0,9 g ανά 100 mL), ενώ σε δείγματα γάλακτος που λαμβάνονται από γάτα, κουνέλι, τάρανδο, και γαλάζια φάλαινα, η περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη μπορεί να είναι υψηλότερη από 10% (Πίνακας 1.1). Υπάρχουν πολύ σημαντικές ποιοτικές και ποσοτικές διαφοροποιήσεις στην εμφάνιση πρωτεϊνών στο γάλα διαφόρων ειδών. Συνήθως οι πρωτεΐνες που υπάρχουν στο γάλα υποδιαιρούνται σε δύο μείζονες ομάδες, τις **καζεΐνες (casein)** και τις **πρωτεΐνες του ορού του γάλακτος ή τυρογάλακτος ή μη-καζεϊνικό άζωτο (whey ή serum proteins ή non- casein nitrogen)**. (Fox, 2003)

Στον **πίνακα 1.2** φαίνονται τέσσερις κύριες διαφορές ανάμεσα στο γάλα της αγελάδας και στο γάλα του ανθρώπου: Η ολική συγκέντρωση πρωτεΐνης, η αναλογία ολικού αζώτου και μη πρωτεϊνικού αζώτου, η σχέση αζώτου καζεΐνης με μη καζεϊνικό άζωτο και το προφίλ των πρωτεϊνών στο κλάσμα της καζεΐνης και στο κλάσμα των πρωτεϊνών του ορού του γάλακτος. Το αγελαδινό γάλα περιέχει περίπου 3,5% πρωτεΐνη, από την οποία η καζεΐνη αποτελεί περίπου το 80% και οι πρωτεΐνες ορού του γάλακτος το 20%. (Hambraeus και Lönnerdal, 2003)

Πίνακας 1.2 Πρωτεϊνική σύνθεση ανθρώπινου και αγελαδινού γάλακτος (Hambraeus και Lönnerdal, 2003).

Συστατικό	Γάλα ανθρώπου	Γάλα αγελάδας
Ολικό άζωτο (gL ⁻¹)	1,8	5,3
Μη-πρωτεϊνικό άζωτο (gL ⁻¹)	0,4	0,3
Καζεΐνη (gL⁻¹)	0,7	25
% εκτίμηση ως		
α _{s1} -+α _{s2} -καζεΐνη	–	54
β-καζεΐνη	>85	33
κ-καζεΐνη	<15	13
Πρωτεΐνες ορού γάλακτος (gL⁻¹)	5	6
% εκτίμηση ως		
α-λακταλβουμίνη	39	19
β-λακτοσφαρίνη	–	49
Ανοσοσφαιρίνες (ολικό)		11
Εκκριτική IgA	13	Ίχνη
IgG ₁	<2	
IgG ₂	<2	
Λυσοζύμη	3	Ίχνη
Αλβουμίνη του ορού	13	5

1.1.4 Πρωτεΐνες ορού γάλακτος

Οι πρωτεΐνες ορού γάλακτος αντιπροσωπεύουν τις πρωτεΐνες (που δεν ανήκουν στις καζεΐνες καθώς και κλάσματα των καζεϊνών) που παραμένουν διαλυτές μετά την κατακρήμνιση των καζεϊνών. Ωστόσο, σήμερα ο όρος πρωτεΐνη ορού γάλακτος πρέπει να χρησιμοποιείται μόνο υπό μία γενική έννοια για να περιγράψει πρωτεΐνες γάλακτος διαλυτές σε pH 4,6 και 20°C. Ένα από τα χαρακτηριστικά των πρωτεϊνών του ορού

γάλακτος είναι η σχετικά χαμηλή περιεκτικότητά τους, σε αρωματικά αμινοξέα και ιδίως της φαινυλαλανίνης και της τυροσίνης. Γάλα από είδη της τάξης των σαρκοφάγων θηλαστικών περιέχει μία σημαντική ποσότητα πρωτεϊνών του ορού γάλακτος ενώ το γάλα από είδη κυρίως τρωκτικών, περιέχει πολύ λιγότερη. (Fox, 2003). Το πρωτόγαλα εμφανίζεται πλούσιο σε πρωτεΐνες του ορού και εκτός από το στάδιο της γαλακτικής περιόδου, ένας ακόμη παράγοντας, που επηρεάζει σημαντικά την ποσότητα και τη σύσταση του κλάσματος των πρωτεϊνών του ορού, είναι η υγιεινή κατάσταση του μαστού (π.χ. ύπαρξη μαστίτιδας) (Ανυφαντάκης, 1994).

Στις πρωτεΐνες ορού γάλακτος υπάρχουν η β -Λακτοσφαιρίνη (β -Lactoglobulin) και η α -Λακταλβουμίνη (α -Lactalbumin), η αλβουμίνη του ορού (bovine serum albumin, BSA), Ανοσοσφαιρίνες (Immunoglobulins, Ig) (κυρίως IgG, IgM, IgA), ένζυμα όπως η λυσοζύμη, λιπάσες, πρωτεάσες, πρωτεόζες-πεπτόνες (protease-peptones, PP), πρωτεΐνες που δεσμεύουν σίδηρο (iron-binding proteins) (lactoferrin και transferrin), πρωτεΐνες που δεσμεύουν βιταμίνες, κ.ά. (Fox, 2003).

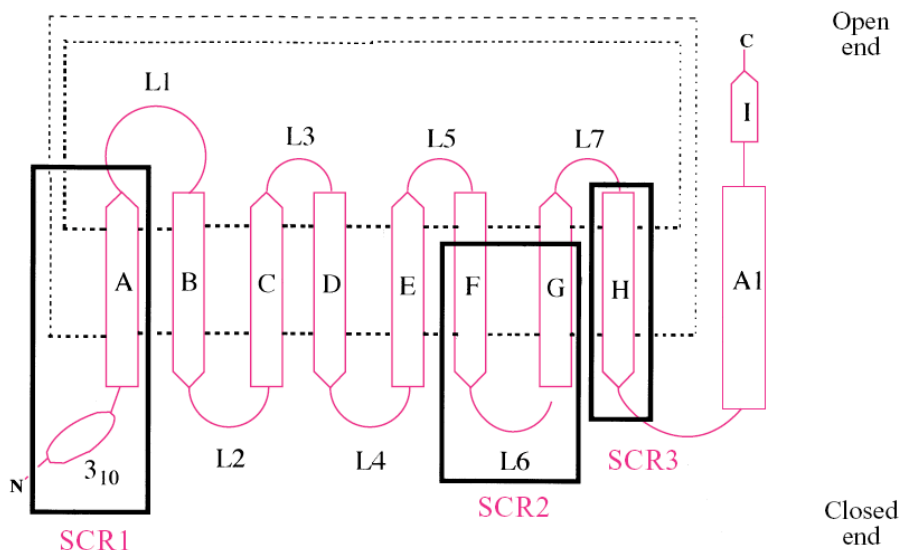
1.2 Λιποκαλίνες

Οι λιποκαλίνες (lipocalins) αποτελούν μία εκτεταμένη οικογένεια μικρών (160-180 αμινοξικά κατάλοιπα) εξωκυττάρων πρωτεϊνών, ευκαρυωτικών αλλά και προκαρυωτικών οργανισμών. Η ονομασία τους προέρχεται από τις ελληνικές λέξεις λίπος και κάλυκας λόγω του κοινού χαρακτηριστικού της οικογένειας των λιποκαλινών, που είναι η παρουσία ενός σταθερού κάλυκα μέσα στον οποίο εγκλείονται υδρόφοβα ή/και χημικά ευαίσθητα μόρια όπως βιταμίνες, στεροειδή και δευτερογενείς μεταβολίτες, για μεταφορά, αποθήκευση, προστασία ή δημιουργία ειδικών συνθηκών. Έχουν ένα ευρύ φάσμα λειτουργιών και περιλαμβάνουν πρωτεΐνες δέσμευσης γεύσης και οσμής, ένζυμα, γλυκοπρωτεΐνες σχετιζόμενες με ανοσοσφαιρίνες, φωτοδραστικές πρωτεΐνες, χρωμοφόρα κ.ά. (Eliopoulos, 1996).

1.2.1 Δομή λιποκαλινών

Στην έκδοση του ειδικά αφιερωμένου στις λιποκαλίνες τεύχους (1482) του επιστημονικού περιοδικού *Biochimica et Biophysica Acta* το 2000 οι Flower *et al.*, συνοψίζοντας γράφουν: Σε επίπεδο αμινοξικής ακολουθίας, οι λιποκαλίνες παρουσιάζουν χαμηλή ομολογία, μικρότερη του 20%. Υπάρχουν ωστόσο μικρά συντηρημένα αμινοξικά μοτίβα χρήσιμα για την ταυτοποίηση των μελών της οικογένειας. Στην ακολουθία των αποκαλούμενων *kernel lipocalins* υπάρχουν τρία χαρακτηριστικά μοτίβα, τα οποία αντιστοιχούν σε τρεις δομικά συντηρημένες περιοχές. Το πρώτο μοτίβο είναι κοινό για όλες τις λιποκαλίνες και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την κατάταξη μίας πρωτεΐνης στη συγκεκριμένη οικογένεια. Οι λιποκαλίνες στην αμινοξική ακολουθία των οποίων δεν εμφανίζονται και τα τρία μοτίβα ονομάζονται *outlier lipocalins*. Οι λιποκαλίνες που παρουσιάζουν εξαιρετική ομοιότητα μεταξύ τους όσον αφορά στα στοιχεία δευτεροταγούς δομής ονομάζονται *prototypic lipocalins*.

Αντίθετα με την πρωτοταγή δομή τους, η μελέτη της κρυσταλλικής δομής τους απέδειξε ότι οι λιποκαλίνες διαθέτουν ένα εξαιρετικά συντηρημένο δομικό μοτίβο (**Σχήμα 1.2**). Οκτώ αντιπαράλληλοι β -κλώνοι σχηματίζουν ένα β -βαρέλι ελλειψοειδούς διατομής. Μεταξύ των β -κλώνων Α έως Η παρεμβάλλονται 7 στροφές (AB, BC, CD, DE, EF, FG, GH) –που στο **σχήμα 1.2** χαρακτηρίζονται ως L1 έως L7 αντιστοίχως– οι οποίες είναι συνήθως μικρές συνδέσεις τύπου φουρκέτας (short β -hairpins), εκτός από την L1 (μεγάλη Ω στροφή). Το ένα άκρο του β -βαρελίου (στροφές L1, L3, L5 και L7) αποτελεί την είσοδο της εσωτερικής περιοχής πρόσδεσης (λιπόφιλος κάλυκας) και ονομάζεται ανοικτό άκρο (Open End). Το άλλο άκρο (στροφές L2, L4 και L6) καλύπτεται από τη συντηρημένη 3_{10} έλικα του αμινοτελικού άκρου της πολυπεπτιδικής αλυσίδας και ονομάζεται κλειστό άκρο (Closed End). Μεταξύ των β -κλώνων Η και Ι υπάρχει πάντα μία α -έλικα (A1), της οποίας το μήκος και η θέση ως προς τον άξονα του β -βαρελίου δεν είναι συντηρημένα. Ως εξωκυττάρια πρωτεΐνες, οι λιποκαλίνες διαθέτουν δισουλφιδικούς δεσμούς, οι οποίοι δεν φαίνεται να καθορίζουν την τριτοταγή δομή τους, αλλά συνεισφέρουν στη σταθερότητά τους στο εξωκυττάριο περιβάλλον.



Σχήμα 1.2. Τοπολογικό διάγραμμα όπου παρουσιάζονται οι β -κλώνοι (A-I), η αμινοτελική 3_{10} -έλικα, η καρβοξυτελική α -έλικα (A1) και οι στροφές (L1-L7). Ένα ζεύγος διάστικτων γραμμών συμβολίζει τους δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των β -κλώνων. Σημειώνονται επίσης τα τμήματα εκείνα που αποτελούν τις τρεις δομικά συντηρημένες περιοχές (Structurally Conserved Regions) SCR1, SCR2 και SCR3. (Flower, 1996)

1.2.2 Αλληλεπιδράσεις

1.2.2.1 Δημιουργία μακρομοριακών συμπλόκων (macromolecular complexation)

Οι λιποκαλίνες έχουν την ικανότητα να δημιουργούν σύμπλοκα (**Σχήμα 1.3.c**) με άλλες υδατοδιαλυτές πρωτεΐνες. Χαρακτηριστικά είναι τα παραδείγματα της RBP, η οποία δημιουργεί σύμπλοκο με την transthyretin στο πλάσμα και η apolipoprotein (apo) D που συνδέεται με την apoAII και την apoB-100.

Στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνών για τη δημιουργία των συμπλόκων συμμετέχουν οι στροφές του ανοικτού άκρου (Open End) των λιποκαλινών. Οι διαφορές στη σύσταση των αμινοξέων, στο μήκος και τη διαμόρφωση των στροφών παίζουν πρωτεύοντα ρόλο στην ισχυρή και επιλεκτική πρόσδεση διαφορετικών μακρομορίων. (Flower, 1996)

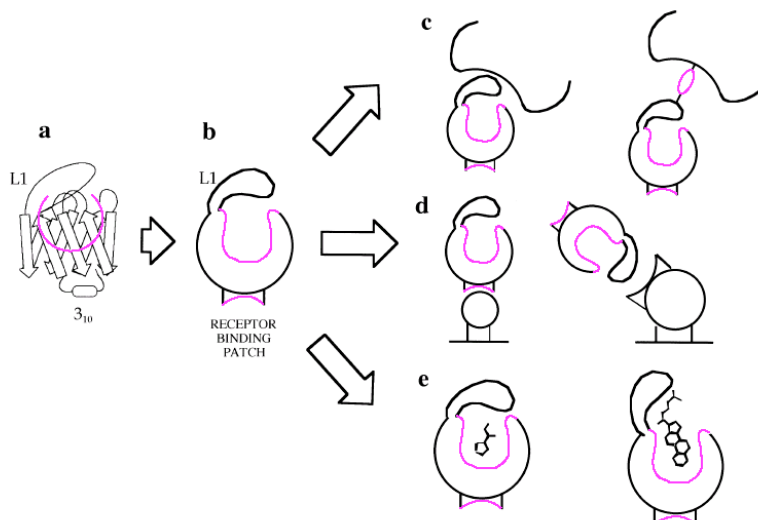
1.2.2.2 Πρόσδεση σε υποδοχείς (receptor binding)

Υπάρχουν πειραματικές ενδείξεις ότι οι λιποκαλίνες προσδένονται σε εξειδικευμένους επιφανειακούς κυτταρικούς υποδοχείς (**Σχήμα 1.3.d**) προκειμένου να μεταφέρουν το υπόστρωμά τους, ορισμένες φορές μέσω ενδοκύττωσης ολόκληρου του συμπλόκου. Εξειδικευμένοι υποδοχείς έχουν προταθεί για τις λιποκαλίνες: α_1 -microglobulin, insecticyanin, glycodelin, retinol-binding protein, α_1 -acid glycoprotein, β -lactoglobulin και odorant-binding protein. Αν και ο μηχανισμός πρόσδεσης στους μεμβρανικούς υποδοχείς δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως, φαίνεται ότι τα τμήματα της δομής των λιποκαλινών που συμμετέχουν σ' αυτόν διαφέρουν μεταξύ των μελών της οικογένειας. (Flower, 1996)

1.2.2.3 Δέσμευση υποστρωμάτων (ligand binding)

Οι λιποκαλίνες δεσμεύουν ένα μεγάλο αριθμό μικρών υδρόφοβων κυρίως υποστρωμάτων (**Σχήμα 1.3.e**). Ο λιπόφιλος κάλυκας έχει συνήθως σημαντικά μεγαλύτερο όγκο από τα πιθανά υποστρώματα, δεν υφίσταται σημαντικές αλλαγές στη διαμόρφωσή του κατά τη δέσμευση μικρών μορίων και στην ελεύθερη μορφή του καταλαμβάνεται από μόρια νερού.

Η αμινοξική σύσταση, το μέγεθος και το σχήμα του λιπόφιλου κάλυκα που σχηματίζεται από το β -βαρέλι και των τεσσάρων στροφών στην είσοδό του καθορίζουν τα χαρακτηριστικά της πρόσδεσης διαφορετικών υποστρωμάτων. Μερικές λιποκαλίνες δεσμεύουν μικρά υδρόφοβα μόρια βαθιά στον κάλυκά τους, απομονώνοντάς τα πλήρως από το διαλύτη (π.χ. MUP-φερομόνες), ενώ άλλες δεσμεύουν μεγαλύτερα και σχετικά υδρόφιλα μόρια σε περιοχές προσβάσιμες από το διαλύτη που δημιουργούνται κυρίως από τις στροφές (π.χ. BBP-Biliverdin IXc). Η επιλεκτικότητα της δέσμευσης διαφέρει μεταξύ των μελών της οικογένειας. Ορισμένες λιποκαλίνες παρουσιάζουν υψηλή εξειδίκευση προς συγκεκριμένα υποστρώματα (RBP - retinol, ApoD - progesterone και arachidonic acid, NGAL - Fe(III)-enterobactin), ενώ άλλες δεσμεύουν χωρίς επιλεκτικότητα ένα πλήθος μικρών μορίων (human Tlc - fatty acids, alcohols, phospholipids, glycolipids, cholesterol, retinol, arachidonic acid, lipid peroxidation products, microbial Fe(III)-siderophores και rifampin). (Flower, 1996)



Σχήμα 1.3. Σχηματικό διάγραμμα της δομής των λιποκαλινών και των αλληλεπιδράσεων που σχετίζονται με τις ιδιότητες μοριακής αναγνώρισης (Flower, 1996). **a:** Αναπαράσταση της τρισδιάστατης δομής των λιποκαλινών. Η θέση του λιπόφιλου κάλυκα συμβολίζεται μ' ένα ημικύκλιο. **b:** Απλοποιημένο διάγραμμα της δομής όπου διακρίνονται ο κάλυκας και ένα υποθετικό τμήμα που προσδένεται στους υποδοχείς (receptor binding patch). **c:** Δημιουργία συμπλόκων με υδατοδιαλυτά μακρομόρια. Διακρίνονται οι περιπτώσεις της μη ομοιοπολικής σύνδεσης (π.χ. RBP – transthyretin) και της ομοιοπολικής (π.χ. δισουλφιδικοί δεσμοί στο σύμπλοκο apoD – apolipoproteins) **d:** Πρόσδεση σε μεμβρανικούς υποδοχείς μέσω ενός επιφανειακού τμήματος της λιποκαλίνης (π.χ. Purpurin) ή των στrophών του ανοικτού άκρου (π.χ. RBP). **e:** Δέσμευση υποστρωμάτων στο βάθος του λιπόφιλου κάλυκα ή σε περιοχές περισσότερο εκτεθειμένες στο διαλύτη.

1.2.3 Λειτουργία

Αν και η λειτουργία των περισσότερων λιποκαλινών δεν είναι πλήρως χαρακτηρισμένη, υπάρχουν αυξανόμενες ενδείξεις ότι οι λιποκαλίνες συμμετέχουν σε ποικίλες βιολογικές διεργασίες όπως η ρύθμιση της κυτταρικής αύξησης και του μεταβολισμού (apolipoprotein D, purpurin, α_1 -microglobulin και neutrophil gelatinase-associated lipocalin), η ρύθμιση της ανοσολογικής απόκρισης (α_1 -microglobulin, glycodeilin, και γ chain of complement factor 8), η όσφρηση (odorant-binding protein), η ανάπτυξη των ιστών (lazarillo) και η συμπεριφορά των ζώων μέσω δράσης φερομονών (α_2 -urinary globulin, major urinary protein) (Åkerstrom *et al.*, 2000).

Δεν υπάρχει φυσιολογικός μηχανισμός για τη λειτουργική διαφοροποίηση των λιποκαλινών, όπως για παράδειγμα με τη δημιουργία διαφορετικών αντισωμάτων κατά την ανοσολογική απόκριση, που βελτιστοποιήθηκαν κατά την εξέλιξη προκειμένου

να επιτελέσουν εξειδικευμένες λειτουργίες. Είναι πιθανόν ότι υπάρχουν μόνο δέκα διαφορετικές λιποκαλίνες στον άνθρωπο με διακριτές λειτουργίες, που έχουν ορθόλογες πρωτεΐνες σε άλλα θηλαστικά ή σπονδυλωτά. Η RBP του ανθρώπου και του χοίρου για παράδειγμα διαφέρουν μόνο σε 12 αμινοξικά κατάλοιπα, που βρίσκονται μακριά από την περιοχή πρόσδεσης της ρετινόλης. (Flower, 1996)

1.3 β -Λακτοσφαιρίνη

Η β -λακτοσφαιρίνη (β -Lactoglobulin, συντομογραφία: β lg, εναλλακτικά ακρωνύμια: β -Lg, β Lac, BLG) (Åkerstrom *et al.*, 2000) είναι η βασική πρωτεΐνη του ορού του γάλακτος πολλών θηλαστικών. Είναι μία μη-γλυκοζυλιωμένη εξαιρετικά σταθερή λιποκαλίνη (kernel lipocalins prototypic).

Υπάρχουν ενδείξεις ότι η β -λακτοσφαιρίνη ευθύνεται εν μέρει για την αλλεργία των βρεφών στο αγελαδινό γάλα (Sawyer, 2003). Ο όρος αλλεργία στο γάλα αγελάδας αναφέρεται στις ανεπιθύμητες εκδηλώσεις που προκαλούνται με τη μεσολάβηση ανοσολογικών μηχανισμών έναντι των πρωτεϊνών του αγελαδινού γάλακτος.

1.3.1 Κατανομή της β -λακτοσφαιρίνης στα θηλαστικά

Η BLG είναι η βασική πρωτεΐνη του ορού του γάλακτος των περισσότερων θηλαστικών (έως περίπου 10% της ολικής πρωτεΐνης ή το 50% περίπου, των πρωτεϊνών ορού γάλακτος). Η BLG είναι η κύρια πρωτεΐνη του ορού γάλακτος των μηρυκαστικών. Στο αγελαδινό γάλα αντιπροσωπεύει περίπου το 50% των πρωτεϊνών του ορού γάλακτος. Επίσης, βρίσκεται στο γάλα μονογαστρικών ζώων χοίρος, ίππος, σκύλος, γάτα και σε μαρσιποφόρα, αλλά δεν έχει ανιχνευθεί στο γάλα ανθρώπου, τρωκτικών ή λαγόμορφων. Σε αυτά τα είδη, η α -λακταλβουμίνη είναι η κυρίαρχη πρωτεΐνη του ορού γάλακτος. Η β -λακτοσφαιρίνη δεν είναι απύσα από όλα τα πρωτεύοντα· υπάρχουν πρωτεύοντα που έχουν τη BLG στο γάλα τους, για παράδειγμα ο μακάκος και ο μπαμπούνος. Η αγελαδινή BLG είναι η πιο μελετημένη πρωτεΐνη γάλακτος (Hambling *et al.* 1992, Sawyer 2003). Στον **πίνακα 1.3** παρουσιάζεται η κατανομή της BLG στα θηλαστικά.

Πίνακας 1.3 Η παρουσία της β-λακτοσφαιρίνης στο γάλα διαφόρων ειδών (✓ προσδιορισμός της ύπαρξης της πρωτεΐνης, διασταυρωμένη αντιδραστικότητα, ✗ διαθέσιμες κάποιες πληροφορίες από την ακολουθία της πρωτεΐνης) (Sawyer, 2003).

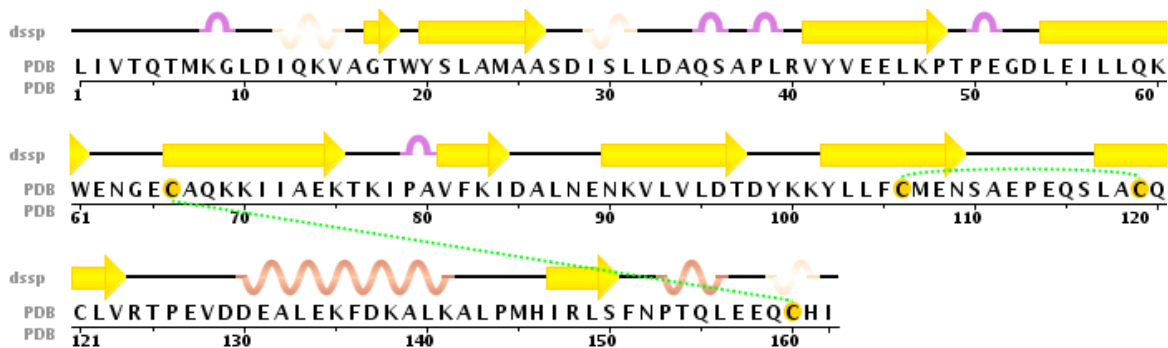
Είδος	Παρουσία της β-λακτοσφαιρίνης
Cow (<i>Bos taurus</i>)	✓✓
Oxen (<i>Bos javanicus</i>)	✓✓
Yak (<i>Bos grunniens</i>)	✓✓
Zebu (<i>Bos indicus</i>)	✓✓
Water buffalo (<i>Bubalus arnee</i>)	✓✓
Buffalo (<i>Bubalus bubalis</i>)	✓✓
Bison (<i>Bison bison</i>)	✓✓
Musk ox (<i>Ovibos moschatus</i>)	✓
Eland (<i>Taurotragus oryx</i>)	✓
Goat (<i>Capra hircus</i>)	✓✓
Sheep (<i>Ovis aries</i>)	✓✓
Mouflon (<i>Ovis ammon musimon</i>)	✓✓
Red deer (<i>Cervus elaphus</i> L.)	✓
European elk (<i>Alces alces</i> L.)	✓
Reindeer (<i>Rangifer tarandus</i> L.)	✓
White-tailed deer (<i>Odocoileus virginianus</i>)	✓
Fallow deer (<i>Dama dama</i>)	✓
Caribou (<i>Rangifer arcticus</i>)	✓
Giraffe (<i>Giraffa camelopardalis</i>)	✓
Okapi (<i>Okapia johnstoni</i>)	✓
Prong-horn antelope (<i>Antilocapra americana</i>)	✓
Camel (<i>Camelus dromedarius</i>)	
Llama (<i>Lama glama</i> L.)	
Peccary (<i>Pecari tajacu</i>)	✓
Pig (<i>Sus scrofa domestica</i>)	✓✓
Horse (<i>Equus caballus</i>)	✓✓
Zebra (<i>Equus quagga</i>)	✓
Rhinoceros (<i>Diceros bicornis</i>)	✓
Rhinoceros (<i>Rhinoceros unicornis</i>)	✓
Donkey (<i>Equus asinus</i>)	✓✓
Mouse (<i>Mus musculus</i>)	
Rat (<i>Rattus norvegicus</i>)	
Guinea-pig (<i>Cavia porcellus</i>)	
Dolphin (<i>Tursiops truncatus</i>)	✓✓
Manatee (<i>Trichechus manatus latirostris</i>)	✓✓
Dog (beagle) (<i>Canis familiaris</i>)	✓✓
Cat (<i>Felis catus</i>)	✓✓
Grey kangaroo (<i>Macropus giganteus</i>)	✓✓
Red kangaroo (<i>Macropus rufus</i>)	✓✓
Tammar wallaby (<i>Macropus eugenii</i>)	✓✓
Brush tail possum (<i>Trichosurus vulpecula</i>)	✓✓
Platypus (<i>Ornithorhynchus anatinus</i>)	✓✓
Northern fur seal (<i>Callorhinus ursinus</i>)	✓
Human (<i>Homo sapiens</i>)	
Rabbit (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	
Yellow baboon (<i>Papio hamadryas</i>)	✓✓
Macaque (<i>Macaca fascicularis</i>)	✓✓

1.3.2 Βιοσύνθεση της β -λακτοσφαιρίνης

Οι κύριες πρωτεΐνες του γάλακτος συμπεριλαμβανομένης της β -λακτοσφαιρίνης, βιοσυντίθεται εντός των εκκριτικών επιθηλιακών κυττάρων των μαστικών αδένων υπό τον έλεγχο της προλακτίνης. Η προ-BLG έχει 180 αμινοξέα μετά τη μετάφραση του mRNA που κωδικοποιεί τη BLG. Το πεπτιδίο οδηγός εμφανίζεται υψηλά συντηρημένο μεταξύ των ειδών και περιέχει πολλά κυρίως υδρόφοβα αμινοξέα. Μετά την αποκοπή του πεπτιδίου οδηγού, η ώριμη πρωτεΐνη μπορεί να υποβληθεί σε μετα-μεταφραστική τροποποίηση στο αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο, ακολουθούν η μεταφορά στο σύστημα Golgi και η ενσωμάτωση στα εκκριτικά κυστίδια και τέλος η έκκριση στον αυλό της αδενοκυψέλης, όπου συσσωρεύεται στο γάλα και απομακρύνεται με το θηλασμό. (Vilotte *et al.*, 2003)

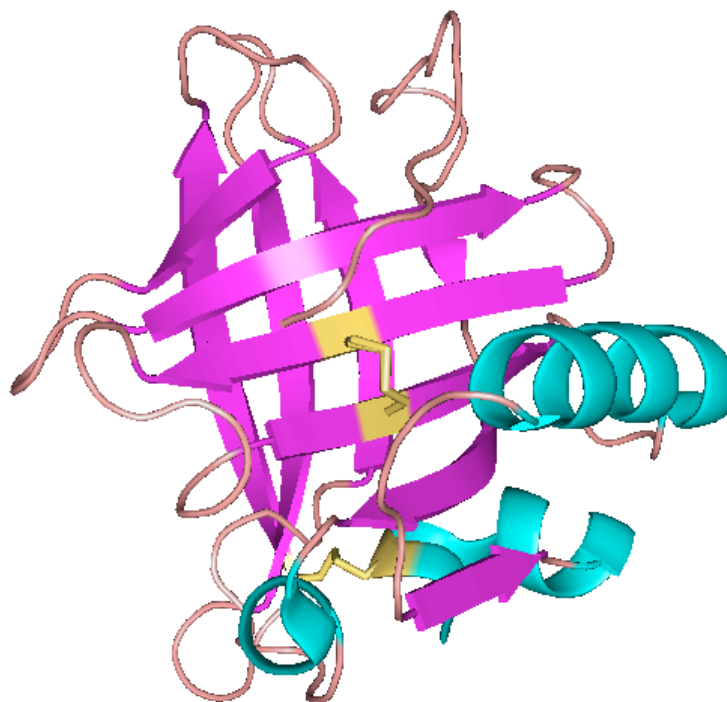
1.3.3 Δομή της β -λακτοσφαιρίνης

Η β -λακτοσφαιρίνη έχει 162 αμινοξικά κατάλοιπα (**σχήμα 1.4**), μοριακό βάρος ~18.000 Da, (μοριακό βάρος BLG A 18.363 Da), pI 5,3. Η δευτεροταγής δομή (**σχήμα 1.4**) της BLG αποτελείται από 15% α -έλικα, 50% β -πτυχωτή επιφάνεια και 15–20% στροφή (Creamer *et al.*, 1983). Η BLG έχει μία πολύ συμπαγή σφαιρική δομή. Κάθε μονομερές υπάρχει περίπου ως σφαίρα με διάμετρο περίπου 3,6 nm. Η δομή της (**εικόνα 1.1**) είναι άνω- και κάτω- β -πτυχωτή επιφάνεια ή βαρέλι. Κάθε διαδοχικός β -κλώνος προστίθεται δίπλα στον προηγούμενο κλώνο, έως ότου ο τελευταίος κλώνος να συνδεθεί μέσω δεσμών υδρογόνου με τον πρώτο κλώνο και να δημιουργηθεί το βαρέλι. Οι κλώνοι είναι αντιπαράλληλοι και όλες οι συνδέσεις είναι «φουρκέτες». Έχει δύο δισουλφιδικούς δεσμούς (C66-C160, C106-C119) και μία ελεύθερη αλλά μη εκτεθειμένη κυστεΐνη (C121). Ο ένατος β -κλώνος, αποτελεί το μεγαλύτερο μέρος της επιφάνειας διεπαφής στο σχηματισμό του διμερούς σε ουδέτερο pH. (Papiz *et al.* 1986, Bewley *et al.* 1997, Brownlow *et al.* 1997)



Σχήμα 1.4 Αμινοξική αλληλουχία και τοπολογία της αγελαδινής BLGB.

[β-κλώνος, α-έλικα, δισουλφιδικός δεσμός]



Εικόνα 1.1 Σχηματική αναπαράσταση της β-λακτοσφαιρίνης, με το πρόγραμμα απεικόνισης PyMOL (PDB ID: 1GX8) Η δομή είναι άνω- και κάτω- β-βαρέλι. Οι αντιπαράλληλοι β-κλώνοι συστρέφονται και καμπυλώνονται έτσι ώστε η δομή να μπορεί επίσης να θεωρηθεί ως δύο β-πτυχωτές επιφάνειες που πακετάρονται η μία απέναντι από την άλλη. (Οι δύο δισουλφιδικοί δεσμοί χρωματίζονται με κίτρινο)

Η τεταρτοταγής δομή της πρωτεΐνης ποικίλλει μεταξύ μονομερών, διμερών ή ολιγομερών εξαρτώμενη από το pH, τη θερμοκρασία και την ιοντική ισχύ, με αυτή του διμερούς να είναι η επικρατούσα μορφή υπό φυσιολογικές συνθήκες (Kumosiński και Timasheff 1966, McKenzie και Sawyer 1967, Gottschalk *et al.* 2003). Γεγονός, που πιθανώς είναι το αποτέλεσμα μίας ευαίσθητης ισορροπίας μεταξύ αλληλεπιδράσεων υδρόφοβων, ηλεκτροστατικών και δεσμών υδρογόνου (Sakurai *et al.* 2001, Sakurai και Goto 2002).

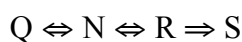
Τρισδιάστατες δομικές πληροφορίες για μία πρωτεΐνη μπορούν να συλλεγούν πειραματικά είτε με κρυσταλλογραφική μελέτη ακτίνων-X είτε με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR), ενώ αναπτύσσονται συνεχώς μέθοδοι πρόβλεψης δομής. Η κρυσταλλογραφία πρωτεϊνών αποτελεί μία ισχυρή τεχνική με την οποία έχει προσδιοριστεί η πλειοψηφία των πρωτεϊνικών δομών που είναι γνωστές ως σήμερα. (Sawyer *et al.*, 2002)

Παρόλο, που η β-λακτοσφαιρίνη ήταν μία από τις πρώτες πρωτεΐνες -από το 1968- που αποτέλεσε αντικείμενο κρυσταλλογραφικών μελετών με ακτίνες-X, η δομή της β-λακτοσφαιρίνης από το αγελαδινό γάλα καθορίστηκε κρυσταλλογραφικά το 1985 από τους Sawyer, Papiz, North και Eliopoulos. Οι επιτυχημένες κρυσταλλογραφικές μελέτες οδήγησαν σε κρυστάλλωση της BLG σε τρία διαφορετικά κρυσταλλικά πλέγματα X, Y και Z και δίνονται στον **πίνακα 1.4**. Κρυσταλλογραφικές μελέτες μπορούν να προσφέρουν πληροφορίες, απ' τους θερμικούς παράγοντες (όσο μεγαλύτερη είναι η τιμή, τόσο λιγότερο εντοπισμένο ή τόσο πιο θερμικά ταλαντούμενο είναι το άτομο), σχετικά με την κινητικότητα ή την ευκαμψία της κύριας και των πλευρικών πρωτεϊνικών αλυσίδων. Στη β-λακτοσφαιρίνη μερικά τμήματα της πολυπεπτιδικής αλυσίδας εμφανίζουν υψηλούς θερμικούς παράγοντες και η αντίστοιχη ηλεκτρονική πυκνότητα είναι λιγότερο καθορισμένη. (Sawyer, 2003)

Πίνακας 1.4 Οι κρυσταλλογραφικές μελέτες της β-λακτοσφαιρίνης (Sawyer, 2003).

Κωδικός	Μορφή	Ομάδα χώρου	a/Å	b/Å	c/Å	α	β	γ	pH	BLG	Αναφορά
X	Triclinic	P1	37.8	49.6	56.6	123.42°	97.28°	103.66°	6.5	AB	Brownlow <i>et al.</i> (1997)
Y	Ortho-rhombic	B22 ₁ 2	55.7	67.2	81.7	90°	90°	90°	7.6	A	Papiz <i>et al.</i> 1986
Y*	Ortho-rhombic	C222 ₁	55.5	82.1	66.8	90°	90°	90°	7.6	A,B,C	Bewley <i>et al.</i> (1997)
Z	Trigonal	P3 ₂ 21	54.4	54.4	113.2	90°	90°	120°	7.5	A,B,C	Monaco <i>et al.</i> (1987)
Z	Trigonal	P3 ₂ 21	54.0	54.0	112.7	90°	90°	120°	7.5	A,B	Brownlow <i>et al.</i> (1987)
Z	Trigonal	P3 ₂ 21	53.75	53.75	111.6	90°	90°	120°	6.2	A	Qin <i>et al.</i> (1998a)
Z	Trigonal	P3 ₂ 21	53.9	53.9	112.4	90°	90°	120°	7.1	A	Qin <i>et al.</i> (1998a)
Z	Trigonal	P3 ₂ 21	54.29	54.29	113.1	90°	90°	120°	8.0	A	Qin <i>et al.</i> (1998a)
Z	Trigonal	P3 ₂ 21	54.23	54.23	113.0	90°	90°	120°	7.1	B	Qin <i>et al.</i> (1999)

Φυσικοχημικές μετρήσεις στα τέλη της δεκαετίας του 1950 (Tanford και Nozaki 1959, Tanford *et al.* 1959) έδειξαν την παρουσία μίας καρβοξυλικής ομάδας ενός καταλοίπου με ανώμαλα υψηλή τιμή pK_a 7,3. Αργότερα δείχθηκε ότι η BLG υπόκειται σε τρεις εξαρτημένες από το pH στερεοδιατακτικές αλλαγές μεταξύ των καταστάσεων N, Q, R, S, που παρουσιάζονται συνοπτικά ως:



Μεταξύ pH 4 και 6 η BLG υφίσταται την αναστρέψιμη Q ⇌ N μετάβαση. Μεταξύ pH 6,5 και 7,8 παρατηρείται η δεύτερη αναστρέψιμη στερεοδιατακτική αλλαγή (N ⇌ R) συχνά ονομαζόμενη μετάβαση Tanford (Tanford transition). Η τρίτη μη αναστρέψιμη στερεοδιατακτική αλλαγή είναι αλκαλική αποδιάταξη της BLG. (Sawyer, 2003) Σε pH μικρότερο του 3,5 και μεγαλύτερο του 7,5 η BLG διαχωρίζεται σε μονομερή των ~18 kDa. Σε pH μεταξύ 5,5 και 7,5 η αγελαδινή BLG σχηματίζει διμερή μοριακού βάρους ~36 kDa. Σε pH μεταξύ 3,5 και 5,2 ειδικά σε pH 4,6 η BLG σχηματίζει οκταμερή μοριακού βάρους ~144 kDa. (Fox, 2003) Η ανάλυση της δομής με ακτίνες-X σε τιμές του pH πάνω και κάτω από αυτό της αποκαλούμενης μετάβασης Tanford (Tanford transition) προσδιόρισε ότι η EF στροφή (κατάλοιπα 85-89), επανατοποθετείται ανάλογα με τις μεταβολές του pH. Σε pH 6,2 η στροφή EF είναι κλειστή πάνω από την κορυφή

του βαρελίου, «θάβοντας» τη Glu89 (το καρβοξυλικό οξύ με την ανώμαλη pKa) στο εσωτερικό του κάλυκα. Σε pH 8,1, αυτή η στροφή είναι μακριά από το βαρέλι έτσι ώστε το «θαμμένο» γλουταμινικό οξύ, που προαναφέρθηκε, να βρίσκεται εκτεθειμένο. (Edwards *et al.*, 2009) Επίσης η κρυσταλλική μοριακή διευθέτηση (crystal packing) τροποποιείται ανάλογα με το pH. Είναι αξιοσημείωτο το χαρακτηριστικό των δομών σε χαμηλό pH, τόσο σε κρυσταλλογραφικές μελέτες όσο και σε μελέτες φασματοσκοπίας NMR, της επανατοποθέτησης της EF στροφής πάνω από την είσοδο του κάλυκα, έτσι ώστε αυτή να εμποδίζει την πρόσβαση υποστρωμάτων. (Sawyer, 2003)

Οι περισσότερες μελέτες της δομής της αγελαδινής BLG με χρήση φασματοσκοπίας NMR έχουν πραγματοποιηθεί σε τιμές του pH μεταξύ 2 και 3. Η μελέτη της δομής με τη χρήση φασματοσκοπίας NMR σε υδατικό διάλυμα παρουσιάστηκε από τους Kuwata *et al.* (1999) και από τους Uhrinová *et al.* (2000) και έχει μία γενική ομοιότητα με εκείνη που προσδιορίστηκε με κρυσταλλογραφική μελέτη ακτίνων-X σε pH 6,2 παρά το σημαντικά χαμηλότερο pH και την ταυτόχρονη αύξηση του επιφανειακού φορτίου της πρωτεΐνης. Η EF στροφή κλείνει πάνω από το ανοιχτό άκρο του β-βαρελίου και η πλευρική αλυσίδα της, το Glu89 «σύρτης» καθίσταται απρόσιτο στο διαλύτη όπως στις κρυσταλλοδομές. Η μεγαλύτερη διαφορά, σε σύγκριση με το πλέγμα Z της δομής των μελετών με ακτίνες-X σε pH 6,2 (Qin *et al.*, 1998a), είναι ότι οι τρεις-στροφές της α-έλικας υιοθετούν μία διαφορετική θέση σε σχέση με το β-βαρέλι (Uhrinová *et al.*, 2000), ενδεχομένως λόγω του pH που προκαλεί αύξηση θετικού φορτίου σε αυτό το μέρος της πρωτεϊνικής επιφάνειας. (Edwards *et al.*, 2009)

1.3.3.1 Δομή των BLGs από άλλα είδη πλην της αγελάδας

Η BLG του ίππου, που παρουσιάζει μέγιστη ομοιότητα 58% με την αγελαδινή BLG, έχει αποδειχθεί ότι είναι μονομερές σε ένα ευρύ φάσμα pH, ενώ η BLG του χοίρου, η οποία παρουσιάζει 63% ομοιότητα με την αγελαδινή BLG, είναι διμερές σε $\text{pH} < 5$ και μονομερές σε $\text{pH} \geq 5$ (σε αντίθεση με την αγελαδινή BLG). Σε pH 7, τόσο η BLG του ίππου όσο και η BLG του χοίρου είναι μονομερή. (Edwards *et al.*, 2009) Σε pH μεταξύ 5,5 και 7,5 η BLG του χοίρου και άλλων ειδών τα οποία δεν περιέχουν ελεύθερο

σουλφιδρίλιο δεν σχηματίζουν διμερή αν και πιθανά η απουσία της ομάδας του σουλφιδριλίου δεν σχετίζεται απευθείας με την αποτυχία διμερισμού (Fox, 2003).

Η μελέτη της κρυσταλλικής δομής BLG χοίρου (Hoedemaeker *et al.*, 2002), σε pH 3,2 έδειξε σαφώς δομή διμερούς που σχηματίζεται από εναλλαγή δομικών ενοτήτων των αμινοτελικών περιοχών, μία τεταρτοταγής δομή αρκετά διαφορετική από αυτή που παρατηρήθηκε για την αγελαδινή BLG. Η EF στροφή υιοθετεί τον κλειστό σχηματισμό πάνω από τον κάλυκα, όπως επίσης διαπιστώθηκε για την αγελαδινή BLG σε όξινο pH, σύμφωνα με την έννοια ότι η συγκεκριμένη στροφή λειτουργεί ως ένα καπάκι για τον κάλυκα. Ωστόσο, η πρωτεΐνη του χοίρου έχει πολύ λιγότερο σταθερή διαμόρφωση σε όξινο περιβάλλον απ' αυτήν της αγελαδινής πρωτεΐνης (Burova *et al.* 2002, Invernizzi *et al.* 2006), γεγονός που έχει οδηγήσει στην αμφισβήτηση του ρόλου της BLG ως μεταφορέα υδρόφοβων μορίων μέσω του όξινου περιβάλλοντος του εντέρου (Burova *et al.*, 2002).

Η δομή της BLG του τάρανδου σε pH 6,5 με διακριτικότητα 2,1 Å δημοσιεύθηκε από τους Oksanen *et al.* (2006). Τόσο το μονομερές της τριτοταγούς δομής όσο και το διμερές της τεταρτοταγούς δομής είναι πολύ παρόμοια με εκείνα της αγελαδινής BLG. Παρατηρείται σε pH 6,5 η στροφή EF να βρίσκεται στην κλειστή θέση. (Oksanen *et al.*, 2006)

1.3.4 Γενετική ποικιλότητα

Η πρωτεΐνη που απομονώθηκε από τον Palmer το 1934 από γάλα αγελάδας εμφάνιζε ετερογένεια κατά την ανάλυσή της με κάποιες φυσικοχημικές τεχνικές. Η αιτία ανακαλύφθηκε από τους Aschaffenburg και Drewry (1955) και ήταν η ύπαρξη δύο αλληλομόρφων, που ονομάστηκαν BLG A και BLG B. Η πρώτη αμινοξική ακολουθία της BLG αναφέρθηκε από τους Braunitzer, Liberatory και Kolde το 1972 και από τότε οι ακολουθίες των BLGs από πολλά μηρυκαστικά καθώς και από άλλα είδη έχουν καθοριστεί πλήρως (Sawyer, 2003). Στον **Πίνακα 1.5** παρουσιάζονται οι διαφορές των αλληλομόρφων της BLG των μηρυκαστικών σε σχέση με τον αλληλόμορφο BLG B της αγελάδας.

Οι πιο συχνά απαντώμενοι αλληλόμορφοι της αγελαδινής BLG είναι οι BLG A και BLG B. Η υποκατάσταση του ασπαρτικού οξέος στη θέση 64 και της βαλίνης στη θέση 118 του αλληλομόρφου A από τη γλυκίνη και την αλανίνη αντίστοιχα, αποτελούν τη διαφορά μεταξύ των αλληλομόρφων A και B. Υποκατάσταση της γλουταμίνης στη θέση 59 του αλληλομόρφου B από ιστιδίνη δίνει τον αλληλόμορφο C, ενώ το γλουταμινικό οξύ στη θέση 45 του B αντικαθίσταται από γλουταμίνη στον αλληλόμορφο D. Η διαφορά του αλληλομόρφου D_r που έχει προσδιοριστεί στην αυστραλιανή φυλή των βοοειδών Droughtmaster, είναι η γλυκοζυλιωμένη ασπαραγίνη στη θέση 28. Ο αλληλόμορφος E, που ανακαλύφθηκε στο γάλα του yak διαφέρει από τον B στη θέση 158 με την παρουσία μίας γλυκίνης, αντί του γλουταμινικού οξέος και αρχικά είχε ονομαστεί D_{yak}. Ο αλληλόμορφος E φαίνεται να προέρχεται από τον αλληλόμορφο B. Η πλήρης αλληλουχία των αμινοξέων της β-λακτοσφαιρίνης για τους αλληλομόρφους F και G, οι οποίοι περιορίζονται στις αγελάδες Bali δεν έχει ακόμη καθοριστεί πλήρως. Εντούτοις, έχει προταθεί για τους F και G ότι όπως στον E, έχουν γλυκίνη στη θέση 158 που αντικαθιστά το γλουταμινικό οξύ που υπάρχει στον αλληλόμορφο B. Ο G παρουσιάζει μία ακόμη διαφορά, έχει μεθειονίνη στη θέση 78 αντί της ισολευκίνης του B. Ενώ ο F διαφέρει επίσης συγκρινόμενος με τον αλληλόμορφο B στην ύπαρξη σερίνης αντί προλίνης στη θέση 50 και τυροσίνης αντί ασπαρτικού οξέος, είτε στη θέση 129 ή 130. Οι ακριβείς θέσεις των αμινοξικών αντικαταστάσεων των F και G, καθώς και του αλληλομόρφου H απομένουν να εξακριβωθούν με τον προσδιορισμό των πρωτοταγών δομών αυτών των αλληλομόρφων. Οι I και J διαφέρουν από τον B στη θέση 108 όπου η γλυκίνη αντικαθιστά το γλουταμινικό οξύ και στη θέση 126 όπου η λευκίνη αντικαθιστά την προλίνη, αντίστοιχα. Η διαφορά μεταξύ των B και W (βρέθηκε μόνο σε μία αγελάδα) οφείλεται στην αντικατάσταση της ισολευκίνης στη θέση 56 από λευκίνη. (Ng-Kwai-Hang και Grosclaude 2003, Farell *et al.* 2004)

Οι δύο κοινοί αλληλόμορφοι της β-λακτοσφαιρίνης BLGA και BLGB, είναι πιθανώς παγκοσμίως εξαπλωμένοι ως κοινοί αλληλόμορφοι των πληθυσμών των βοοειδών. Ο BLGB είναι κυρίαρχος αλληλόμορφος σε όλους τους πληθυσμούς της ινδικής φυλής Zebu καθώς και στο 75% περίπου των πληθυσμών βοοειδών της φυλής Taurine που έχουν έως τώρα ερευνηθεί. Ο αλληλόμορφος BLGB είναι ο επικρατέστερος για τα είδη *Bos taurus* και *Bos indicus*. (Ng-Kwai-Hang και Grosclaude, 2003)

Έχουν προσδιοριστεί πολλές ακολουθίες BLGs ειδών πλην μηρυκαστικών, οι οποίες αποκλίνουν σημαντικά τόσο από την αλληλουχία του αλληλομόρφου BLG B της αγελάδας όσο και μεταξύ τους. Πολλές επίσης από τις υποκαταστάσεις που παρατηρούνται δεν μπορεί να έχουν προκύψει από σημειακές μεταλλάξεις. Το γάλα των μηρυκαστικών περιέχει τη BLG από ένα μόνο γονίδιο, το γάλα από το σκύλο, το χοίρο, το δελφίνι, τη γάτα, τον ίππο και τον όνο περιέχει το προϊόν της έκφρασης δύο ή σε ορισμένες περιπτώσεις τριών (όπως ο σκύλος και η γάτα) διακριτών γονιδίων. Τα μαρσιποφόρα, τα μονοτρήματα και κάποια πρωτεύοντα θηλαστικά έχουν ένα γονίδιο. Τα βοοειδή έχουν και ένα ψευδογονίδιο. (Sawyer, 2003) Το γονίδιο/α και ψευδογονίδιο της BLG βρίσκονται στο χρωμόσωμα 11 στην αγελάδα και στην αίγα, στο 3 στο πρόβατο και στο 28 στον ίππο. Οι πρωτεϊνικές ακολουθίες των BLGs όλων των ειδών εμφανίζουν υψηλή συντήρηση της πρωτεΐνης κατά τη διάρκεια της εξέλιξης. (Vilotte *et al.*, 2003) Ο ένας αλληλόμορφος BLG της γάτας, του ίππου και του όνου φαίνεται να είναι πιο κοντινά σχετιζόμενοι με τα ψευδογονίδια της BLG που προσδιορίστηκαν στην αγελάδα και στην αίγα (Edwards *et al.*, 2009).

Δεν έχει αναφερθεί μέχρι στιγμής η ύπαρξη γενετικών πολυμορφισμών στην αίγα. Σε αντίθεση με την πλειοψηφία των BLGs ο αλληλόμορφος της αίγας περιέχει μία υποκατάσταση, η οποία δεν μπορεί να είναι το αποτέλεσμα μίας σημειακής μετάλλαξης, δηλαδή το ασπαρτικό οξύ στη θέση 130 του BLGB της αγελάδας γίνεται λυσίνη στη BLG της αίγας. (Sawyer, 2003)

Στο πρόβατο αναφέρονται τρεις αλληλόμορφοι A, B και C. Ο A με τον αλληλόμορφο B διαφέρουν στη θέση 20 (Tyr στον A, His στον αλληλόμορφο B). Ο αλληλόμορφος A είναι πιθανώς ο επικρατέστερος της β-λακτοσφαιρίνης των προβάτων. Ο C διαφέρει από τον A μόνο σε μία θέση (Gln για Arg στη θέση 148).

Στο χοίρο επίσης αναφέρονται τρεις αλληλόμορφοι A, B και C. Ο αλληλόμορφος A είναι κυρίαρχος στη φυλή Duroc και ο B στη φυλή Yorkshire, φαίνεται να διαφέρουν σε μία θέση Ala (B)/Val (A). Ο C διαφέρει από τον A, σε δύο θέσεις (Glu για Asp στη θέση 9 και His για Gln στη θέση 69). Κατά τρόπο ενδιαφέροντα ο αλληλόμορφος C εμφανίζει μια ποσοτική μεταβολή με περίπου τα δύο τρίτα των ετεροζυγωτών ζώων να παρουσιάζουν πολύ μειωμένο ποσό του C. (Ng-Kwai-Hang και Grosclaude, 2003)

Πίνακας 1.5 Οι διαφορές των αλληλομόρφων της BLG των μηρυκαστικών σε σχέση με τον αλληλόμορφο BLG B της αγελάδας (Sawyer, 2003).

Είδος	Variant	1	11	20	28	45	50	52	53	56	59	64	78	80	84	87	108	118	126	130	148	150	158	162
Cow	B	L	D	Y	D	E	P	G	D	I	Q	G	I	A	I	L	E	A	P	D	R	S	E	I
	A	L	D	Y	D	E	P	G	D	I	Q	D	I	A	I	L	E	V	P	D	R	S	E	I
	C	L	D	Y	D	E	P	G	D	I	H	G	I	A	I	L	E	A	P	D	R	S	E	I
	D	L	D	Y	D	Q	P	G	D	I	Q	G	I	A	I	L	E	A	P	D	R	S	E	I
	Dr	L	D	Y	N ^A	E	P	G	D	I	Q	G	I	A	I	L	E	A	P	D	R	S	E	I
	E	L	D	Y	D	E	P	G	D	I	Q	G	I	A	I	L	E	A	P	D	R	S	E	I
	F	L	D	Y	D	E	S	G	D	I	Q	G	I	A	I	L	E	A	P	D	R	S	E	I
	G	L	D	Y	D	E	P	G	D	I	Q	G	I	A	I	L	E	A	P	Y	R	S	G	I
	H	L	D	Y	D	E	P	D	D	I	Q	D	I	A	I	L	E	V	P	D	R	S	E	I
	I	L	D	Y	D	E	P	G	D	I	Q	G	I	A	I	L	G	A	P	D	R	S	E	I
	J	L	D	Y	D	E	P	G	D	I	Q	G	I	A	I	L	E	A	L	D	R	S	E	I
	K ^B	L	D	Y	D	E	P	G	D	I	Q	G	I	E	I	L	E	A	P	D	R	S	E	I
	W	L	D	Y	D	E	P	G	D	L	Q	G	I	A	I	L	E	A	P	D	R	S	E	I
	Bison	L	D	Y	D	E	P	G	N	I	Q	G	V	A	I	L	E	A	P	D	R	S	E	I
Yak	I	N	Y	D	E	P	G	D	I	Q	G	I	A	L	I	E	A	P	D	R	S	E	I	
Buffalo	I	D	Y	D	E	P	G	D	I	Q	G	I	A	I	L	E	A	P	D	R	S	E	V	
Sheep	A	I	D	Y	D	E	P	G	N	I	Q	D	I	A	I	L	E	A	P	D	R	S	E	
	B	I	D	H	D	E	P	G	N	I	Q	D	I	A	I	L	E	A	P	N	R	A	G	
	C	I	D	Y	D	E	P	G	N	I	Q	G	I	A	I	L	E	A	P	N	R	A	G	
Goat	I	D	Y	D	E	P	G	N	I	Q	G	I	A	I	L	E	A	P	N	Q	R	A	G	
	I	D	Y	D	E	P	G	N	I	Q	D	I	A	I	L	E	A	P	K	R	A	G		

1.3.5 Λειτουργία

Η β-λακτοσφαιρίνη περιέχει όλα τα 20 αμινοξέα γεγονός που την καθιστά πολύτιμη για τη θρεπτική της αξία (Hambraeus και Lönnerdal, 2003). Βιοενεργά πεπτιδία που προέρχονται από τη BLG βρίσκονται στο στάδιο εντατικών μελετών. Αποτελεί εξαιρετική πηγή τέτοιων πεπτιδίων για τα οποία οι μελέτες προτείνουν ένα ευρύ φάσμα βιολογικής δράσης, όπως αντιυπερτασική, αντιμικροβιακή, αντιοξειδωτική, αντικαρκινική και ανοσορρυθμιστική. Οι έρευνες των λειτουργικών και θρεπτικών χαρακτηριστικών της, αναφέρουν πιθανή χρήση της σε βιολειτουργικά τρόφιμα και για βιοχημικές εφαρμογές. (Pandya και Haenlein, 2009)

Παρά το μεγάλο αριθμό μελετών ο φυσιολογικός ρόλος της δεν είναι ακόμη πλήρως γνωστός. Διάφορα έχουν προταθεί για τη βιολογική λειτουργία αυτής της αινιγματικής πρωτεΐνης του γάλακτος (Sawyer, 2003). Αρχικά οι Farrell και Thompson (1971) πρότειναν ότι πιθανά παίζει ρυθμιστικό ρόλο στο μεταβολισμό του φωσφόρου στο μαστικό αδένα. Οι Papiz *et al.* (1986) πρότειναν ότι λειτουργεί ως μία μεταφορική πρωτεΐνη ρετινοειδών, όπως η βιταμίνη A, από τη μητέρα στο νεογνό, καθώς μπορεί να δεσμεύει τη ρετινόλη σε μία υδρόφοβη τσέπη, προστατεύοντάς την από την οξείδωση

και να τη μεταφέρει μέσω του στομάχου στο λεπτό έντερο, από όπου η ρετινόλη μπορεί να μεταφερθεί στην πρωτεΐνη δέσμησης ρετινόλης με την οποία η BLG έχει δομική ομοιότητα. Ενώ οι Pérez *et al.* (1989) πρότειναν έναν εξειδικευμένο ρόλο που συνδέεται με τη διευκόλυνση της πέψης του λίπους του γάλακτος κατά τη διάρκεια της νεογνικής περιόδου των μόσχων, διεγείροντας τη δράση της λιπάσης μέσα από την ικανότητα της BLG να δεσμεύει λιπαρά οξέα.

Οι μοριακές ιδιότητές της ιδιαίτερα η ανθεκτικότητά της σε οξύ και πεψίνη (Miranda και Pelissier 1983, McAlpine και Sawyer 1990, Guo *et al.* 1995) και η δέσμηση υποστρωμάτων οδηγούν στην υπόθεση ότι υπάρχουν άλλες πιο εξειδικευμένες λειτουργίες. Η β-λακτοσφαιρίνη βρέθηκε να δεσμεύει λιπαρά οξέα, κατά το διαχωρισμό της υπό ήπιες συνθήκες (Diaz de Villegas *et al.* 1987, Pérez *et al.* 1989) και η δέσμηση του υποστρώματος είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της σταθερότητας της πρωτεΐνης (Creamer 1995, Shimoyamada *et al.* 1996). Παρουσιάζει, όπως αναφέρθηκε, εντυπωσιακή ομοιότητα στην τριτοταγή δομή με την πρωτεΐνη δέσμησης ρετινόλης (retinol-binding protein) ή RBP. Η RBP συντίθεται στα κύτταρα του παρεγχύματος του ήπατος, δεσμεύει ένα μόριο ρετινόλης και εκκρίνεται στο πλάσμα, όπου δημιουργεί σύμπλοκο με την transthyretin. Η ρετινόλη προστατεύεται από την οξειδωση κατά τη μεταφορά της από το ήπαρ στους περιφερειακούς ιστούς από το σύμπλοκο RBP-transthyretin, το μέγεθος του οποίου αποτρέπει την απομάκρυνσή του μέσω των νεφρών. Η αναγνώριση της RBP από εξειδικευμένους μεμβρανικούς υποδοχείς και η απελευθέρωση της ρετινόλης συνεπάγονται την απώλεια της συνάφειας της RBP προς την transthyretin και την αποικοδόμησή της. Έτσι τίθεται το ερώτημα, αν θα μπορούσε να λειτουργήσει η BLG ως μία εξωκυτταρική πρωτεΐνη δέσμησης λιπαρών οξέων, με τον ίδιο τρόπο που λειτουργούν η RBP και η κυτταρική FABP (fatty acid binding protein, πρωτεΐνη πρόσδεσης λιπαρών οξέων). Αυτό φαίνεται μάλλον απίθανο δεδομένου ότι ούτε η πρωτεΐνη του χοίρου ούτε των ιπποειδών δεσμεύει λιπαρά οξέα παρόλο που η BLG όλων των ειδών δεσμεύει ρετινόλη. Οι Papiz *et al.* (1986) ανέφεραν ειδικούς υποδοχείς στο έντερο του νεογνού μόσχου προτείνοντας έναν πιθανό ρόλο στη μεταφορά ή πρόσληψη ρετινόλης. Οι Wang *et al.* (1997) επισημαίνουν ότι η βιταμίνη D₂ δεσμεύεται ισχυρότερα από τη ρετινόλη. Ίσως έτσι να γενικεύεται ο ρόλος της στη διευκόλυνση πρόσληψης βιταμινών. Επίσης έχει προταθεί μία γενική λειτουργία ως

ανασταλτικός παράγοντας, τροποποιητής ή ενισχυτής δράσης ενζύμων (Farrell και Thompson 1990, Pérez *et al.* 1992, 1995). Ωστόσο η έρευνα για τη λειτουργία της πρωτεΐνης στο νεογνό ενδέχεται να είναι απατηλή, διότι η BLG δεν είναι παρούσα στο γάλα όλων των ειδών. Το ερώτημα που προκύπτει είναι αν η πραγματική της λειτουργία συνδέεται με κάποια διαδικασία στη μητέρα. Αν και η BLG απουσιάζει από το ανθρώπινο γάλα, δύο άλλες εκκριτικές λιποκαλίνες παρουσιάζουν περιορισμένη ομοιότητα στην ακολουθία τους αλλά κοντινή δομική ομοιότητα με την αγελαδινή BLG. Η γλυκοδελίνη (glycodelin), μία γλυκοζυλιωμένη λιποκαλίνη που σχετίζεται πιο στενά εξελικτικά με τη β -λακτοσφαιρίνη και ειδικότερα μετά από φυλογενετική μελέτη προκύπτει ότι είναι πιο στενά συσχετισμένη με τη β -λακτοσφαιρίνη από το γάλα μπαμπούνου. Έχει προταθεί ότι η BLG προέκυψε από διπλασιασμό του γονιδίου της γλυκοδελίνης. Η γλυκοδελίνη είναι μία πρωτεΐνη που δεσμεύει ρετινόλη και εκφράζεται κατά το πρώτο τρίμηνο της ανθρώπινης κύησης στο ενδομήτριο ενώ η λειτουργία της παραμένει ασαφής. Η ρετινόλη είναι σημαντικός διαμορφωτής της διαφοροποίησης. Έτσι θα μπορούσε να υποτεθεί ότι η β -λακτοσφαιρίνη έχει εξελιχθεί από μία πρωτεΐνη του ενδομητρίου απαραίτητη στη μητέρα στην αρχή της εγκυμοσύνης, αλλά υπάρχει στην έκκριση του μαστού λόγω της θρεπτικής της αξίας. (Sawyer και Kontopidis 2000, Sawyer 2003, Kontopidis *et al.* 2004) Δομικές και λειτουργικές μελέτες δείχνουν ότι η tear lipocalin, η κύρια πρωτεΐνη στα δάκρυα, δεσμεύει ένα ευρύ φάσμα υδρόφοβων μορίων όπως η BLG (Glasgow *et al.*, 1995). Εμφανίζεται σημαντική η πίεση επιλογής για τη διατήρηση όχι μόνο της Glu89 σε όλες τις ακολουθίες των BLGs που βρέθηκαν μέχρι σήμερα, αλλά και η από το pH εξαρτώμενη διαμόρφωση διακόπτη για την EF στροφή όλων των BLGs (και μάλιστα και της tear lipocalin). Αυτή η διατήρηση δεν συνάδει με έναν αποκλειστικό θρεπτικό ρόλο της BLG, αν και η καταγωγή του γονιδίου της BLG από τη γλυκοδελίνη παραμένει μία ενδιαφέρουσα πιθανότητα. (Edwards *et al.*, 2009)

1.3.6 Δέσμευση υποστρωμάτων

Η BLG έχει την ικανότητα να δεσμεύει μεγάλο αριθμό μικρών μορίων αν και η θέση που δεσμεύεται το υπόστρωμα συνεχίζει να παράγει διαμάχες. Υπάρχουν στοιχεία για τρεις δυνητικά θέσεις δέσμευσης της BLG. Η κανονική θέση στο εσωτερικό του κάλυκα, αποτελεί την κύρια θέση δέσμευσης. Στην **εικόνα 1.2** φαίνεται η δέσμευση της ρετινόλης στο εσωτερικό του κάλυκα της BLG. Η θέση δέσμευσης μέσα στο βαρέλι της BLG απαρτίζεται από υδρόφοβα κατάλοιπα που παρέχουν ένα υδρόφοβο περιβάλλον για το υδρόφοβο τμήμα του μορίου της ρετινόλης. Το ένα άκρο του βαρελιού είναι ανοικτό στο διαλύτη, ενώ το άλλο άκρο είναι κλειστό εξαιτίας του στενού πακεταρίσματος των πλευρικών ομάδων. Ένα μόριο ρετινόλης, προσδένεται στο εσωτερικό του βαρελιού. Το υδρόφιλο άκρο της ρετινόλης (μία ουρά OH) βρίσκεται στο ανοικτό άκρο του βαρελιού. Το υδρόφοβο τμήμα του μορίου της ρετινόλης πακετάρεται στον πυρήνα του βαρελιού μαζί με υδρόφοβες πλευρικές ομάδες από τους β -κλώνους. Ακόμη αναφέρονται μία δεύτερη θέση που συμμετέχουν τα κατάλοιπα Tyr19, Tyr20, Tyr42, Glu44, Gln59, Gln68, Leu156, Glu157, Glu158 και His161 και μία τρίτη θέση με τη συμμετοχή των καταλοίπων Tyr102, Leu104 και Asp129 (Edwards *et al.*, 2009).



Εικόνα 1.2 Η δέσμευση της ρετινόλης στο εσωτερικό του κάλυκα της BLG. Η θέση δέσμευσης μέσα στο βαρέλι απαρτίζεται από υδρόφοβα κατάλοιπα. Ένα μόριο ρετινόλης (κίτρινο), προσδένεται στο εσωτερικό του βαρελιού, μεταξύ των δύο β -πτυχωτών επιφανειών, έτσι ώστε μόνο το υδρόφιλο τμήμα της να βρίσκεται στην επιφάνεια του μορίου, (η σχηματική αναπαράσταση της δομής είναι ίδια με αυτή της εικόνας 1.1).

Η BLG έχει με την RBP παρόμοια δομή, όπως αναφέρθηκε πιο πάνω. Ο υδρόφοβος χαρακτήρας του κάλυκα διατηρείται αν και η αντικατάσταση συγκεκριμένων καταλοίπων της RBP από μικρότερα υδρόφοβα κάνει τον κάλυκα της BLG βαθύτερο (Eliopoulos, 1996). Μεταξύ των αλληλομόρφων A και B της BLG η αλλαγή Val/Ala στη θέση 118 δεν προκαλεί καμία ανιχνεύσιμη τροποποίηση στην στερεοδιάταξη, αλλά έχει ως αποτελέσματα ο υδρόφοβος πυρήνας του αλληλομόρφου B να είναι λιγότερο συμπαγής και μπορεί να ευθύνεται για τη χαμηλότερη θερμική σταθερότητα του αλληλομόρφου B. Η αποσταθεροποίηση αυτή στον αλληλόμορφο B σε σχέση με τον A έχει εκτιμηθεί περίπου στα 5 kJ/mol που είναι μία τιμή που έχει βρεθεί και αλλού για την απώλεια των δύο ομάδων μεθυλίου (Qin *et al.* 1999, Sawyer 2003). Η BLG A χαρακτηρίζεται από μεγαλύτερη ευελιξία σε σχέση με τη BLG B (Dong *et al.*, 1996). Εφαρμόζοντας την τεχνική του κυκλικού διχρωισμού (circular dichroism, CD) οι Creamer *et al.* (2000) έδειξαν σαφώς για την αγελαδινή BLG ότι η δέσμευση ρετινόλης και λιπαρών οξέων (π.χ. παλμιτικό οξύ και *cis*-ραϊνarinic acid), είναι ανταγωνιστική. Οι Ragona *et al.* (2003) χρησιμοποιώντας ένα συνδυασμό ηλεκτροστατικών υπολογισμών, προσομοιώσεων ελλειψισμού και NMR μετρήσεων δείχνουν ότι η pH-εξαρτώμενη αλλαγή της EF στροφής που προκλήθηκε από την πρωτονίωση της Glu89 είναι κοινή για όλες τις BLGs και ότι η θέση δέσμευσης (του παλμιτικού οξέος) καθορίζεται από το άνοιγμα αυτής της στροφής. Ενώ σε προηγούμενη εργασία με ¹³C-σημασμένο παλμιτικό οξύ, είχαν δείξει ότι το υπόστρωμα επίσης, υφίσταται δομικές αλλαγές με την αύξηση του pH (Ragona *et al.*, 2000). Πρόσφατες μελέτες NMR που αφορούν τη δέσμευση του παλμιτικού οξέος, στο διμερές της αγελαδινής BLG με τη "φιλική" για NMR Ala34Cys μετάλλαξη, έδειξαν ότι παρόλο που μία σταθερή σύνδεση διαμορφώνεται από την πρωτεΐνη για το υπόστρωμα στο κάτω μέρος του κάλυκα, η αλληλεπίδραση στο ανοικτό άκρο (Open End) του κάλυκα είναι πιο δυναμική (Konuma *et al.*, 2007). Αυτές οι παρατηρήσεις συμπληρώνουν εκείνες των Ragona *et al.* (2003) καθώς και των κρυσταλλογραφικών μελετών με ακτίνες-X για τη δέσμευση λιπαρών οξέων (Qin *et al.* 1998b, Wu *et al.* 1999), που έδειξαν την καρβοξυλική ομάδα της κεφαλής να είναι σημαντικά λιγότερο καλά διατεταγμένη, από ό,τι η υδρόφοβη ουρά. Τα αποτελέσματα της μελέτης με τη μετάλλαξη Ala34Cys προτείνουν ότι είναι η πλαστικότητα του D-κλώνου και οι EF και GH στροφές που επιτρέπουν στη BLG να φιλοξενεί ένα τόσο ευρύ

φάσμα υποστρωμάτων (Konuma *et al.*, 2007). Με εξαίρεση τις αλλαγές στη διαμόρφωση των πλευρικών αλυσίδων των Phe105 και Met107, μελέτες ακτίνων-X και NMR δείχνουν ότι ο πυρήνας της δομής της λιποκαλίνης παραμένει αναλλοίωτος μετά τη δέσμευση του υποστρώματος. Κρυσταλλογραφικές μελέτες καταδεικνύουν σαφώς ότι τόσο τα λιπαρά οξέα όσο και η ρετινόλη (Sawyer *et al.* 1998, Qin *et al.* 1998b, Wu *et al.* 1999, Kontopidis *et al.* 2002, Loch *et al.* 2010) δεσμεύονται στον κάλυκα. Η διατήρηση της δομής της BLG και ιδίως της υδρόφοβης κοιλότητας, σε συνθήκες σχεδόν μηδενικής ιοντικής ισχύος στο ισοηλεκτρικό σημείο της πρωτεΐνης (pI 5,3) (Adams *et al.*, 2006) δείχνει ότι σε pH 7 η πρωτογενής και ενδεχομένως η μόνη θέση δέσμευσης είναι μέσα στον κάλυκα (Edwards *et al.*, 2009).

1.4 Στόχος της εργασίας

Η παρούσα εργασία προσπαθεί να συσχετίσει τη δομή και τη λειτουργία της πρωτεΐνης σε ένα συνδυασμό στερεοδομικής και γενετικής ανάλυσης, με επίκεντρο την κοιλότητα πρόσδεσης υδρόφοβων υποστρωμάτων.

Στη γενετική ανάλυση μελετούνται οι αμινοξικές ακολουθίες των BLGs από διάφορα είδη που έχουν προσδιοριστεί και οι οποίες αποκλίνουν σημαντικά τόσο από την αλληλουχία του αλληλομόρφου BLG B της αγελάδας όσο και μεταξύ τους.

Στη στερεοδομική ανάλυση μελέτες που πραγματοποιήθηκαν *in vitro* με διάφορες τεχνικές για τη δέσμευση υποστρωμάτων στην αγελαδινή πρωτεΐνη έδειξαν ότι μπορεί να δεσμεύει μία ποικιλία υποστρωμάτων, τα περισσότερα από τα οποία είναι μικρά υδρόφοβα μόρια όπως λιπαρά οξέα ή ρετινοειδή. Ο μοριακός μηχανισμός της δέσμευσης του υποστρώματος και της απελευθέρωσής του δεν έχουν πλήρως αποσαφηνιστεί (Ragona *et al.*, 2000). Συζήτηση γίνεται και για την ικανότητα δέσμευσης της BLG για διάφορες τιμές pH καθώς έχει προταθεί ότι η BLG δεν μπορεί να δεσμεύει λιπαρά οξέα σε χαμηλό pH (Frapin *et al.*, 1993) παρόλο που έχει αναφερθεί η δέσμευση σε pH 2, του 5-doxylstearic acid (ανάλογο λιπαρού οξέος) (Narayan και Berliner, 1997), ενώ έχει επιπλέον δειχθεί ότι το πόσο ισχυρή είναι η δέσμευση της ρετινόλης, εξαρτάται από το pH σε εύρος από 3 ως 8 (Dufour *et al.*, 1994).

Υπάρχουν, κρυσταλλογραφικές μελέτες υψηλής ποιότητας συμπλόκων της β -λακτοσφαιρίνης (Qin *et al.* 1998b, Wu *et al.* 1999, Kontopidis *et al.* 2002, Yang *et al.* 2008, Loch *et al.* 2010).

Σε δύο παλαιότερες μελέτες δέσμησης υποστρωμάτων με τεχνική φθορισμομετρίας, οι Frapin *et al.* (1993) αναφέρουν στη BLGB τη δέσμηση του αραχιδονικού οξέος με σταθερά σύνδεσης K_a $3,03 \cdot 10^6$ (M^{-1}), του αραχιδικού οξέος με K_a $2,5 \cdot 10^7$ (M^{-1}), του λινελαϊκού οξέος με σταθερά σύνδεσης K_a $5,26 \cdot 10^6$ (M^{-1}), του λινολενικού οξέος με τιμή K_a $5,88 \cdot 10^6$ (M^{-1}), του μυριστικού οξέος με K_a $3,03 \cdot 10^6$ (M^{-1}), του μυριστελαϊκού οξέος με K_a $6,25 \cdot 10^6$ (M^{-1}), του ελαϊκού οξέος με K_a $7,69 \cdot 10^6$ (M^{-1}), του στεατικού οξέος με K_a $8,3 \cdot 10^6$ (M^{-1}), του λαουρικού οξέος με K_a $1,43 \cdot 10^6$ (M^{-1}) και οι Wang *et al.* (1997) αναφέρουν στη BLGA τη δέσμηση της 7-δεϋδροχοληστερόλης με σταθερά σύνδεσης K_a $3,75 \cdot 10^7$ (M^{-1}) και της εργοστερόλης με K_a $1,6 \cdot 10^8$ (M^{-1}).

Στην παρούσα μελέτη ο αλληλόμορφος BLGA χρησιμοποιείται για κρυστάλλωση και προσδιορισμό της τρισδιάστατης δομής σε συνθήκες pH 7,3. Επίσης γίνεται μία προσπάθεια συμπλοκοποίησης σε διάφορες συνθήκες της β -λακτοσφαιρίνης με τα λιπαρά οξέα και στεροειδή, που αναφέρονται στην προηγούμενη παράγραφο, με σκοπό την κρυστάλλωση του συμπλόκου και τη δομική μελέτη της κύριας θέσης δέσμησης μέσω κρυσταλλογραφίας ακτίνων-X.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

- **ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

2.1 Κρυστάλλωση πρωτεϊνών

2.1.1 Κρυσταλλογένεση

Η λέξη κρυστάλλωση (crystallisation) προέρχεται από την ελληνική λέξη κρύσταλλος που σημαίνει διαυγής πάγος. Τα στάδια της κρυσταλλογένεσης είναι κοινά για όλα τα συστήματα και είναι τρία: Η δημιουργία πυρήνων κρυστάλλωσης, η ανάπτυξη των κρυστάλλων και η παύση της ανάπτυξης. Αυτό που κυρίως καθιστά διαφορετική την ανάπτυξη κρυστάλλων των βιολογικών μακρομορίων είναι ότι η κρυστάλλωσή τους, αποτελεί μια πολυπαραμετρική διαδικασία. Η δημιουργία των πυρήνων είναι η διαδικασία κατά την οποία τα μόρια ή μη κρυσταλλικά συσσωματώματα (διμερή, τριμερή κ.λ.π.), τα οποία είναι ελεύθερα στο διάλυμα, συνδυάζονται μεταξύ τους και σχηματίζουν ένα επαναλαμβανόμενο πλέγμα. Ωστόσο, η ανάπτυξη συσσωματωμάτων δε σημαίνει απαραίτητα και το μακροσκοπικό σχηματισμό κρυστάλλων. Για να γίνει αυτό τα αρχικά συσσωματώματα πρέπει να υπερβούν ένα συγκεκριμένο μέγεθος, το κρίσιμο μέγεθος το οποίο ορίζεται από το λόγο της επιφάνειας του συσσωματώματος προς τον όγκο του. Μόλις το κρίσιμο μέγεθος ξεπεραστεί τα συσσωματώματα γίνονται υπερκρίσιμοι πυρήνες που μπορούν να μεγαλώσουν περαιτέρω και να δώσουν κρυστάλλους κατάλληλους για κρυσταλλογραφική μελέτη.

Η ανάπτυξη των κρυστάλλων ξεκινά σε συγκεντρώσεις διαλύματος επαρκείς για να λάβει χώρα η δημιουργία πυρήνων και συνεχίζεται σε συγκεντρώσεις κατώτερες του ορίου αυτού. Η ταχύτητα ανάπτυξης καθορίζεται από το συνδυασμό της φύσης της κρυσταλλικής επιφάνειας που μεγαλώνει και την ταχύτητα διάχυσης. Προσθήκη μορίων σε τραχείες επιφάνειες απαιτεί λιγότερη ενέργεια απ' ό,τι επικάθεισή τους σε λείες. Υπάρχουν τριών ειδών επιφάνειες από τις οποίες ξεκινά η ανάπτυξη κρυστάλλων οι επίπεδες (flat faces), στις οποίες η ανάπτυξη των κρυστάλλων είναι πολύ αργή, οι κλιμακωτές (stepped faces), όπου οι ταχύτητες ανάπτυξης είναι ενδιάμεσες και οι ατελείς επιφάνειες (kinked faces) όπου η ταχύτητα ανάπτυξης του κρυστάλλου είναι μεγαλύτερη.

Η ανάπτυξη των πυρήνων εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από φαινόμενα μεταφοράς και ειδικά από τη διάχυση. Το τελικό αποτέλεσμα είναι εξαρτώμενο από την ταχύτητα προσέγγισης των μορίων πρωτεΐνης στην αναπτυσσόμενη επιφάνεια. Έχει αποδειχθεί πειραματικώς με τη χρήση υπεριώδους μικροσκοπίας ότι στις περιοχές γύρω από τους αναπτυσσόμενους κρυστάλλους, η συγκέντρωση της πρωτεΐνης είναι μικρότερη συγκριτικά με το υπόλοιπο διάλυμα. Η ταχύτητα διάχυσης της πρωτεΐνης προς και από αυτές τις περιοχές αποτελεί έναν ακόμη περιοριστικό παράγοντα της ανάπτυξης κρυστάλλων. Η ύπαρξη αυτών των περιοχών γύρω από τον κρύσταλλο προκαλεί βαθμίδα (gradient) πυκνότητας, η οποία με τη σειρά της (και υπό την επίδραση της βαρύτητας) ενισχύει τα ρεύματα μεταφοράς.

Η ανακοπή της ανάπτυξης του κρυστάλλου συμβαίνει για πολλούς διαφορετικούς λόγους. Ο πιο προφανής από αυτούς είναι η μείωση της συγκέντρωσης πρωτεΐνης μέχρι του σημείου αποκατάστασης της ισορροπίας μεταξύ κρυστάλλου και διαλύματος. Σε αυτήν την περίπτωση προσθήκη επιπλέον ποσότητας πρωτεΐνης μπορεί να οδηγήσει σε συνέχιση της ανάπτυξης του κρυστάλλου. Ωστόσο μερικοί κρύσταλλοι φθάνουν σε ένα ορισμένο μέγεθος πέραν του οποίου η ανάπτυξή τους δε μπορεί να συνεχιστεί, ανεξαρτήτως της συγκέντρωσης πρωτεΐνης, ως αποτέλεσμα είτε αθροιστικών φαινομένων παραμόρφωσης του πλέγματος (cumulative lattice strain effects), είτε δηλητηρίασης της επιφάνειας του κρυστάλλου από την ενσωμάτωση ξένων ή στρεβλωμένων μορίων προκαλώντας διαδοχικές ανωμαλίες που διακόπτουν το κρυσταλλικό πλέγμα. Περαιτέρω αύξηση του μεγέθους απαιτεί αφαίρεση της δηλητηριασμένης επιφάνειας με ελεγχόμενη διαλυτοποίηση του κρυστάλλου. (Ducruix *et al.* 1992, McPherson 1999).

2.1.2 Φάσεις κρυστάλλωσης

Στο **σχήμα 2.1** παρουσιάζεται η καμπύλη διαλυτότητας (solubility, S) της πρωτεΐνης που ορίζει τις φάσεις υποκορεσμού (undersaturation) και υπερκορεσμού (supersaturation) και καθορίζει την κατάσταση εξισορρόπησης μεταξύ κορεσμένης πρωτεΐνης και κρυσταλλωμένης πρωτεΐνης στο διάλυμα. Κάτω από την καμπύλη κορεσμού η πρωτεΐνη δεν πρόκειται ποτέ να κρυσταλλωθεί (υποκορεσμός), ενώ πάνω

από την καμπύλη διαλυτότητας η συγκέντρωση της πρωτεΐνης είναι υψηλότερη από την συγκέντρωση εξισορρόπησης για δεδομένη συγκέντρωση ηλεκτρολύτη (υπερκορεσμός). Η φάση υπερκορεσμού υποδιαιρείται σε τρεις ζώνες. Τη ζώνη κατακρήμνισης (precipitation), τη ζώνη πυρήνωσης (nucleation) και τη μετασταθερή (metastable) ζώνη. Στη ζώνη κατακρήμνισης η πρωτεΐνη μετατρέπεται σε άμορφη μάζα, η ζώνη πυρήνωσης είναι η περιοχή όπου δημιουργούνται πυρήνες κρυστάλλωσης και η περίσσεια πρωτεΐνης παίρνει κρυσταλλική μορφή. Κοντά στη ζώνη κατακρήμνισης βρίσκονται πλήθος μικροκρυστάλλων οι οποίοι μπορούν να εμπλακούν με το άμορφο ίζημα πρωτεΐνης. Η εύρεση της ζώνης πυρήνωσης αποτελεί πρωταρχικό σκοπό των πειραμάτων κρυστάλλωσης. Ένα υπερκορεσμένο διάλυμα πρωτεΐνης μπορεί να μη δημιουργεί πυρήνες κρυστάλλωσης για μακρύ χρονικό διάστημα, εκτός αν βοηθηθεί μηχανικά. Η μετασταθερή ζώνη είναι ιδανική για την αύξηση κρυστάλλων από πυρήνες κρυστάλλωσης που προϋπάρχουν χωρίς τη δημιουργία νέων. (Ducruix *et al.*, 1992)



Σχήμα 2.1 Διάγραμμα της καμπύλης διαλυτότητας της πρωτεΐνης.

Ενεργειακά η κρυστάλλωση πρωτεϊνών είναι μία διαδικασία κατά την οποία ένα μετασταθές υπερκορεσμένο διάλυμα φθάνει μία θερμοδυναμικά σταθερή κατάσταση, στην οποία η πρωτεΐνη βρίσκεται μεταξύ της στερεάς φάσης και του διαλύματος. Τα ελεύθερα μόρια της πρωτεΐνης στο διάλυμα σε κατάσταση υπερκορεσμού δεσμεύουν περισσότερη ενέργεια, από εκείνα που βρίσκονται σε κρυσταλλική κατάσταση. Η κρυστάλλωση μειώνει την ελεύθερη ενέργεια των μορίων πρωτεΐνης κατά 3-6kcal/mol σε σχέση με αυτήν που έχουν στο διάλυμα. Το σημείο εκκίνησης καθώς και ο χρόνος για την επίτευξη της ισορροπίας είναι κρίσιμα για το τελικό αποτέλεσμα που μπορεί να είναι ή άμορφο ή μικροκρυσταλλικό ίζημα ή μεγάλοι μονοκρύσταλλοι. (McPherson, 1999)

2.1.3 Παράγοντες που επηρεάζουν την κρυστάλλωση

Η δημιουργία πυρήνων κρυστάλλωσης και η ανάπτυξη των κρυστάλλων εξαρτάται από πολλές παραμέτρους όπως αναφέρονται στο βιβλίο των Ducquix και Giege (1992). Κατά τη διαδικασία ανάπτυξης των κρυστάλλων παίζουν ρόλο οι ακόλουθες παράμετροι:

1. Ενδογενείς φυσικοχημικές παράμετροι

- Υπερκορεσμός (συγκέντρωση πρωτεΐνης και παραγόντων κατακρήμνισης)
- Θερμοκρασία, pH (μεταβολές)
- Χρόνος (ρυθμοί εξισορρόπησης και αύξησης)
- Ιοντική ισχύς και καθαρότητα των χημικών (φύση των παραγόντων κατακρήμνισης, ρυθμιστικά διαλύματα, επιπρόσθετες χημικές ουσίες)
- Διάχυση και μεταφορά (πηκτώματα, μικροβαρύτητα)
- Όγκος και γεωμετρία του δείγματος και των πειραματικών συσκευών (επιφάνεια των συσκευών κρυστάλλωσης)
- Στερεά σωματίδια, αλληλεπιδράσεις με τα τοιχώματα και με τις διάμεσες επιφάνειες (ομοιογενής, ετερογενής πυρήνωση)
- Φαινόμενα εξαρτημένα από την πυκνότητα ή το ιξώδες (διαφορές μεταξύ κρυστάλλου και μητρικού υγρού)
- Πίεση, ηλεκτρικά και μαγνητικά πεδία
- Δονήσεις και ήχος (ακουστικά κύματα)
- Σειρά των γεγονότων, επαναληψιμότητα (ερευνητής ή ρομπότ)

2. Βιοχημικές και βιοφυσικές παράμετροι

- Ευαισθησία της δομής της πρωτεΐνης σε φυσικές παραμέτρους (θερμοκρασία, pH, ιοντική ισχύς, διαλύτες)
- Δέσμευση άλλων υποκαταστατών (υποστρώματα, συμπαραγόντες, μεταλλικά ιόντα, άλλα ιόντα)
- Ειδικές πρόσθετες ουσίες (ανταγωνιστικές ουσίες, μη ιοντικά απορρυπαντικά, πολυαμίνες)
- Ιδιότητες των πρωτεϊνών (οξειδωση, υδροφοβικότητα, υδροφιλικότητα)
- Γήρανση του δείγματος (οξειδοαναγωγικές μεταβολές, αποδιάταξη, αποικοδόμηση)

3. Βιολογικές παράμετροι

- Πολύ μικρές ποσότητες των περισσοτέρων πρωτεϊνών στη φύση
- Βιολογικές πηγές και φυσιολογική κατάσταση των οργανισμών ή των κυττάρων που περιέχουν τις πρωτεΐνες (θερμόφιλοι, ψυχρόφιλοι, αλλόφιλοι, μεσόφιλοι οργανισμοί, στατική ή αναπτυσσόμενη φάση κυττάρων)
- Βακτηριακές μολύνσεις

4. Καθαρότητα των μακρομορίων

- Μακρομοριακές επιμολύνσεις (με άλλα μακρομόρια ή άλλα μικρά μόρια)
- (Μικρο)ετερογένεια της ακολουθίας (κοψίματα από πρωτεάσες ή νουκλεάσες) -τα κλάσματα μακρομορίων μπορεί να κρυσταλλώνουν ευκολότερα- μερικές ή ετερογενείς μεταφραστικές τροποποιήσεις
- Δομική (μικρο)ετερογένεια (βαθμός και τρόπος πολυμερισμού συσσωματώματα, αποδιάταξη)

2.1.3.1 Σχεδιασμός κρυστάλλωσης

Για την κρυσταλλογραφική μελέτη μίας πρωτεΐνης απαιτούνται μεγάλοι και καλοσχηματισμένοι κρύσταλλοι, γι' αυτό αρχικά πρέπει να δημιουργηθούν πυρήνες κρυστάλλωσης και να αφεθούν για να μεγαλώσουν στη μετασταθερή ζώνη. Το διάλυμα της πρωτεΐνης πρέπει να περάσει από τη διαλυτή φάση στη ζώνη πυρήνωσης και να παραμείνει εκεί για σύντομο χρονικό διάστημα έτσι ώστε να μη δημιουργηθούν πολλοί πυρήνες κρυστάλλωσης που οδηγούν σε πολλούς και μικρότερου τελικού όγκου κρυστάλλους. (Η αύξηση του όγκου των κρυστάλλων σε διάλυμα με πολλούς πυρήνες κρυστάλλωσης οδηγεί σε επικαλύψεις κρυσταλλικών πλεγμάτων, άρα σε κακοσχηματισμένους κρυστάλλους). Στη συνέχεια, όταν το πρωτεϊνικό διάλυμα μεταπέσει στη μετασταθερή ζώνη, οι πυρήνες θα συνεχίσουν να μεγαλώνουν και θα δώσουν καλοσχηματισμένους κρυστάλλους. Όσο οι κρύσταλλοι μεγαλώνουν τόσο η συγκέντρωση της διαλυμένης πρωτεΐνης μειώνεται, με αποτέλεσμα η μετασταθερή ζώνη να μετατοπίζεται. Έτσι κυριότερο μέλημα στα πειράματα κρυστάλλωσης είναι η δημιουργία συνθηκών συνεχούς παρακολούθησης της μετασταθερής ζώνης.

Από τα παραπάνω στοιχεία προκύπτει ότι ο τρόπος ελάττωσης της διαλυτότητας της πρωτεΐνης στο διάλυμα πρέπει να είναι ελεγχόμενος και προς αυτήν την κατεύθυνση

προσανατολίζονται οι διάφορες μέθοδοι κρυστάλλωσης. Ταχεία ελάττωση της διαλυτότητας οδηγεί σε άμορφα ιζήματα, γι' αυτό η προσέγγιση του σημείου υπερκορεσμού γίνεται αργά, αλλάζοντας βαθμιαία παράγοντες όπως η συγκέντρωση, η ιοντική ισχύς, το pH, ή η διηλεκτρική σταθερά του πρωτεϊνικού διαλύματος. (Arakawa *et al.*, 1985)

Παρά τη θεωρητική γνώση των διαδικασιών κρυστάλλωσης, επειδή αυτή επηρεάζεται από μία πληθώρα παραμέτρων, η θεωρητική πρόβλεψη συνθηκών που οδηγούν σε επιτυχές πείραμα παραμένει αδύνατη και γι' αυτό η κρυστάλλωση θεωρείται κυρίως μία εμπειρική διαδικασία και αναφέρεται χαρακτηριστικά ως «τέχνη». Έτσι καθίσταται σημαντικός ο όσο το δυνατόν καλύτερος έλεγχος των συνθηκών της κρυστάλλωσης που συμβάλλουν στην επιτυχία του πειράματος. Η βελτιστοποίηση αυτών των συνθηκών προέρχεται συνήθως από τα αποτελέσματα προηγούμενων δοκιμών (McPherson 1995, McPherson 1999). Στις παραγράφους που ακολουθούν αναλύονται οι σημαντικότερες φυσικές και βιολογικές παράμετροι για έναν ορθολογικό σχεδιασμό των συνθηκών ανάπτυξης κρυστάλλων.

- Πρωτεΐνη:

Πολλές πρωτεΐνες έχουν κρυσταλλωθεί από διαλύματα που περιέχουν ένα έως εκατοντάδες mg/mL πρωτεΐνης. Ωστόσο για πειραματικές δοκιμές επιθυμητή συγκέντρωση είναι 10-20 mg/mL, εάν αυτό είναι δυνατόν. Η πρωτεΐνη πρέπει να είναι διαλυμένη σε κατάλληλο διαλύτη, που να επιτρέπει την κατακρήμνισή της σε κρυσταλλική μορφή. Ο διαλύτης συνήθως είναι υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα, ενώ μερικές φορές συνηθίζεται και η χρήση οργανικών διαλυτών σε μικρές συγκεντρώσεις. Η πρωτεΐνη πρέπει να είναι απαλλαγμένη προσμείξεων. Σύμφωνα με έναν εμπειρικό κανόνα για να κρυσταλλωθεί μία πρωτεΐνη θα πρέπει να είναι καθαρή πάνω από 97%. Η καθαρότητα του υπό κρυστάλλωση δείγματος είναι η σημαντικότερη παράμετρος. Παρουσία ξένων μορίων σε συγκέντρωση 1ppm σε ένα τυπικό προς κρυστάλλωση διάλυμα πρωτεΐνης συγκέντρωσης 10-20 mg/mL, σημαίνει την ύπαρξη $\sim 10^9$ μορίων επιμολυντών. Αν και εκ φύσεως η διαδικασία της κρυστάλλωσης αποκλείει τις ετερογένειες, η παρουσία τους σε υψηλές συγκεντρώσεις και ιδιαίτερα στους μικρούς όγκους διαλύματος, οδηγεί με βεβαιότητα στην επιμόλυνση του κρυσταλλικού πλέγματος, με αποτέλεσμα τη δημιουργία κακής ποιότητας κρυστάλλων. Για το λόγο

αυτό κατά τον καθαρισμό της πρωτεΐνης, συνιστάται η χρήση της τεχνικής υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC), με την οποία εξασφαλίζεται και η ομοιογένεια του τελικού διαλύματος. Η υψηλή καθαρότητα του δείγματος συμβάλλει και στη βελτίωση της επαναληψιμότητας της κρυστάλλωσης καθώς και στο όριο μέγιστης διακριτικής ικανότητας σκέδασης των κρυστάλλων. Η ποιότητα του διαλύματος της προς κρυστάλλωση πρωτεΐνης μπορεί να ελεγχθεί με τη μέθοδο της δυναμικής σκέδασης του φωτός (Dynamic Light Scattering), με διάφορες τεχνικές ηλεκτροφόρησης (αποδιατακτικής με δωδεκυλοσουλφονικό νάτριο (SDS), απλής (native), ισοηλεκτρικού σημείου), με φασματοσκοπία μάζας, με κυκλικό διχρωισμό (Circular Dichroism) κ.ά. (Ducruix *et al.* 1992, McPherson 1999).

- Ιοντική ισχύς:

Η προσθήκη ανοργάνων αλάτων είναι η πιο συνηθισμένη πρακτική για την απόκτηση κρυστάλλων. Η επίδραση που ασκούν τα ιόντα στις πρωτεΐνες, μπορεί να γίνει κατανοητή αν οι τελευταίες θεωρηθούν ιοντικές ενώσεις. Σύμφωνα με τη θεωρία Debye-Hückel για τα ιοντικά διαλύματα, αύξηση της ιοντικής ισχύος μειώνει την ενεργότητα των ιόντων στο διάλυμα και αυξάνει τη διαλυτότητα των ιοντικών ενώσεων. Απουσία αλάτων σε πρωτεϊνικά διαλύματα, τα μόρια πρωτεΐνης έχουν μικρότερη διαλυτότητα και επειδή τα αντίθετα φορτισμένα μέρη των μορίων έλκονται με δυνάμεις Coulomb οδηγούνται συχνά σε καταβύθισή τους. Το φαινόμενο αυτό καλείται εφραλάτωση (salting in effect). Το αντίθετο φαινόμενο καλείται εξαλάτωση (salting out effect) και μπορεί να θεωρηθεί ως το αποτέλεσμα του ανταγωνισμού μεταξύ των ιόντων του διαλύματος και των φορτισμένων ομάδων στην επιφάνεια των πρωτεϊνικών μορίων, για τα μόρια του νερού. Με την προσθήκη ανοργάνων ιόντων, οι φορτισμένες επιφανειακές ομάδες προστατεύονται και η διαλυτότητα των πρωτεϊνών αυξάνει. Στην περίπτωση όμως που η ιοντική ισχύς αυξηθεί σε μεγάλο βαθμό, τα πρωτεϊνικά μόρια ανταγωνίζονται τα ιόντα για μόρια διαλύτη, π.χ. μόρια ύδατος προκειμένου να διατηρήσουν τις σφαίρες ενυδάτωσής τους και κατά συνέπεια τη διαλυτότητά τους. Ο ανταγωνισμός αυτός οδηγεί συχνά τα μόρια των πρωτεϊνών σε αυτοοργάνωση έτσι ώστε να καλύψουν τις ηλεκτροστατικές τους ανάγκες, δίνοντας πολλές φορές πρωτεϊνικούς κρυστάλλους. Έχουν αναφερθεί περιπτώσεις όπου καταλυτικό ρόλο στην κρυστάλλωση είχε η παρουσία σε χαμηλές συγκεντρώσεις χαιτροπικών αλάτων. Στην κρυστάλλωση

πρωτεϊνών το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο ιοντικό άλας είναι το θειικό αμμώνιο, ακολουθούμενο από το φωσφορικό κάλιο. Άλλα χρήσιμα στην κρυστάλλωση πρωτεϊνών άλατα, είναι το θειικό λίθιο, τα χλωρίδια λιθίου και νατρίου, τα κιτρικά άλατα νατρίου και αμμωνίου κ.ά. (Ducruix *et al.* 1992, McPherson 1999)

- pH:

Το καθαρό φορτίο της πρωτεΐνης μπορεί να μεταβληθεί με τη μεταβολή των πρωτονίων, αλλάζοντας το pH ή με τη δέσμευση ιόντων σε πολικές ομάδες της πρωτεΐνης. Όσο μεγαλύτερο καθαρό φορτίο έχει η πρωτεΐνη τόσο πιο ευδιάλυτη είναι, ενώ όταν έχει καθαρό φορτίο μηδέν βρίσκεται στο σημείο ελάχιστης διαλυτότητας. Αυτό συμβαίνει όταν η πρωτεΐνη βρίσκεται στο ισοηλεκτρικό της σημείο (pI). Σε μερικές περιπτώσεις το ισοηλεκτρικό σημείο είναι η τιμή του pH στο οποίο αναπτύσσονται κρύσταλλοι και κατά συνέπεια η πρότερη γνώση του είναι επιβεβλημένη, ώστε να χρησιμοποιηθεί σε κάποιες από τις αρχικές συνθήκες.

Μετά την ποιότητα του προς κρυστάλλωση δείγματος, το pH είναι ο επόμενος σημαντικότερος παράγοντας για την κρυστάλλωση και απαιτεί τη χρήση κατάλληλων ρυθμιστικών διαλυμάτων. (Ducruix *et al.*, 1992). Η πλειονότητα των πρωτεϊνών κρυσταλλώνουν σε τιμές pH πλησίον του φυσιολογικού (~7,5) χωρίς ωστόσο να λείπουν οι εξαιρέσεις όπου η κρυστάλλωση επήλθε σε ακραίες τιμές. Η μορφολογία των κρυστάλλων συμπεριλαμβανομένων πολλών τύπων πολλαπλών κρυστάλλων, σχετίζεται με το pH γι' αυτό και αναφέρονται περιπτώσεις όπου η διερεύνηση του βέλτιστου pH έγινε με μεταβολές κατά 0,05 μονάδες. (McPherson, 1995).

- Θερμοκρασία:

Οι χαμηλές θερμοκρασίες τείνουν να ελαχιστοποιήσουν τα προβλήματα διάσπασης των πρωτεϊνών καθώς και την ανάπτυξη βακτηρίων. Η διαλυτότητα της πρωτεΐνης έχει άμεση εξάρτηση από τη θερμοκρασία, αλλά ποικίλλει σημαντικά από πρωτεΐνη σε πρωτεΐνη σε συνδυασμό με την ιοντική ισχύ, την παρουσία οργανικών διαλυτών και τις ειδικότερες πειραματικές συνθήκες. Ρυθμίζοντας τις συγκεντρώσεις κατακρημνιστών και πρωτεΐνης, τουλάχιστον σε θεωρητικό επίπεδο, η θερμοκρασία κρυστάλλωσης μπορεί να είναι είτε η σταθερή θερμοκρασία δωματίου (17-24°C) είτε οι 4 °C, παρόλο που η κινητική της κρυστάλλωσης αναμένεται να αλλάζει σε μεγάλο βαθμό. (Ducruix *et al.*, 1992).

- Πολυμερή:

Η χρήση υψηλού μοριακού βάρους γραμμικών πολυμερών στην κρυστάλλωση των πρωτεϊνών εισήχθει από τον Polson και τους συνεργάτες του το 1964, οι οποίοι δοκίμασαν μια σειρά πολυμερών, μεταξύ αυτών πολυαιθυλενογλυκόλες (PEG), δεξτράνη, πολυβυνυλοαλκοόλη και πυρολιδόνη. Οι PEG προτείνονται τόσο για τη δυνατότητα κατακρήμνισης της πρωτεΐνης όσο και για το χαμηλό τους κόστος. Όπως και τα άλατα οι PEG ανταγωνίζονται με τα μόρια των πρωτεϊνών για τα μόρια διαλύτη, οδηγώντας στην καταβύθιση των πρωτεϊνών. Ωστόσο, η παρουσία τους σε αντίθεση με την παρουσία των αλάτων, μειώνει τη διηλεκτρική σταθερά του διαλύματος δίνοντας τη δυνατότητα στα πρωτεϊνικά μόρια να αλληλεπιδρούν από μεγαλύτερες αποστάσεις. Ένα ακόμη πλεονέκτημα των PEG σε σχέση με τα άλατα είναι ότι η παρουσία τους δεν αλλάζει την ηλεκτρονική πυκνότητα του υδατικού διαλύματος και άρα δεν υποβαθμίζει την ποιότητα των κρυσταλλογραφικών δεδομένων, καθώς ο λόγος σήματος-θορύβου παραμένει αμετάβλητος.

- Οργανικοί–μη πολικοί διαλύτες:

Δεσμεύονται σε πολικές ομάδες της επιφάνειας της πρωτεΐνης, έτσι ώστε να γίνεται λιγότερο πολική ή αλληλεπιδρούν και δεσμεύουν μόρια ύδατος με αποτέλεσμα να τα εμποδίζουν να αλληλεπιδράσουν με τις πρωτεΐνες. Επίσης μειώνουν τη διηλεκτρική σταθερά του μέσου, ενισχύοντας τις αλληλεπιδράσεις Coulomb μεταξύ των πρωτεϊνικών μορίων (McPherson, 1999). Η χρήση τους ωστόσο πρέπει να είναι προσεκτική και πάντοτε σε χαμηλές συγκεντρώσεις, καθώς υπάρχει κίνδυνος αποσταθεροποίησης των πρωτεϊνικών μορίων (Aragawa *et al.*, 1985). Ο συχνότερα χρησιμοποιούμενος οργανικός διαλύτης είναι η 2-μεθυλο-2,4-πεντανοδιόλη (MPD) μία μικρή διαλκοόλη, της οποίας οι ιδιότητες βρίσκονται μεταξύ αυτών των οργανικών διαλυτών και των PEG μικρού μοριακού βάρους. Η δράση της οφείλεται σε συνδυασμό φαινομένων, όπως ο ανταγωνισμός για τα μόρια του διαλύτη, η ελάττωση της διηλεκτρικής σταθεράς και φαινόμενα όμοια με αυτά της δράσης απορρυπαντικών. Χρησιμοποιείται σε υψηλές συγκεντρώσεις και όπως και οι PEG δε μεταβάλλει την ηλεκτρονική πυκνότητα του κρυστάλλου. Άλλοι χρήσιμοι οργανικοί διαλύτες στην κρυστάλλωση πρωτεϊνών είναι η αιθανόλη, η αιθυλενογλυκόλη, η 1,3-προπανοδιόλη και η ισοπροπανόλη (McPherson, 1999).

- Τροποποίηση πρωτεϊνών:

Η χημική/βιοχημική τροποποίηση είναι ένας ακόμη παράγοντας που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να μεταβάλλει τις συνθήκες κρυστάλλωσης. Καθώς η κατανομή φορτίου στις επιφάνειες των πρωτεϊνικών μορίων αποτελεί κρίσιμο στοιχείο για την κρυστάλλωσή τους, η τροποποίησή τους είτε χημικά με προσθήκη υποκαταστατών, είτε βιοχημικά με δημιουργία μεταλλαγμένων μορφών είναι δυνατόν να αποδώσει κρυστάλλους ή να συνεισφέρει στην κρυστάλλωσή τους σε ενδεχομένως διαφορετική κρυσταλλογραφική συμμετρία (π.χ. ομάδα χώρου), δίνοντας δεδομένα σε υψηλότερη διακριτική ικανότητα. (McPherson, 1999).

- Απορρυπαντικά:

Η χρήση απορρυπαντικών ως πρόσθετων στη διαδικασία κρυστάλλωσης εφαρμόστηκε αρχικά στις απόπειρες κρυστάλλωσης μεμβρανικών πρωτεϊνών (Gros *et al.*, 1988). Η υδρόφοβη ουρά των απορρυπαντικών αλληλεπιδρά με το υδρόφοβο μέρος της πρωτεΐνης και στη συνέχεια διαλυτοποιεί όλο το μόριο μέσω της εκτεθειμένης υδρόφιλης κεφαλής του. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις χρησιμοποιούνται στην κρυστάλλωση πολλών μη μεμβρανικών πρωτεϊνών επιδρώντας στη διαλυτότητα της πρωτεΐνης ή τμήματος αυτής με αποτέλεσμα την ανάπτυξη διαφορετικών και συχνά καλύτερων κρυστάλλων. Η χρήση τους συνιστάται στις περιπτώσεις όπου αναπτύσσονται μη μεροεδρικός δίδυμοι κρύσταλλοι (Bergfors, 2009).

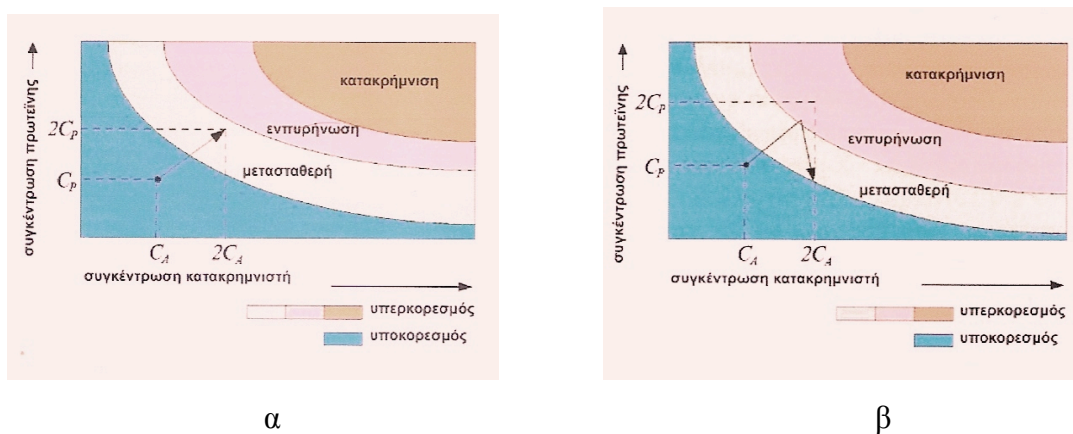
2.1.4 Μέθοδοι κρυστάλλωσης

Οι μέθοδοι με τις οποίες επιτυγχάνεται κρυστάλλωση πρωτεϊνικών μορίων είναι η διάχυση ατμών (vapor diffusion), η διάχυση μέσω επιφανείας (free interface diffusion), η διαπίδυση (dialysis) και η τεχνική ολικής ανάμιξης (batch) και όλες αποσκοπούν στον υπερχοροισμό του διαλύματος του μακρομορίου. (Ducruix *et al.*, 1992).

2.1.4.1 Διάχυση ατμών

Στην τεχνική της διάχυσης ατμών, το πρωτεϊνικό διάλυμα φέρεται σε υπέρκορη κατάσταση λόγω απομάκρυνσης διαλύτη μέσω διάχυσης ατμών. Κατά τη διαδικασία που ακολουθείται συνήθως μια σταγόνα διαλύματος πρωτεΐνης αναμειγνύεται σε αναλογία όγκου 1:1 με μια σταγόνα διαλύματος κατακρήμνισης. Μετά την ανάμειξη στη σταγόνα

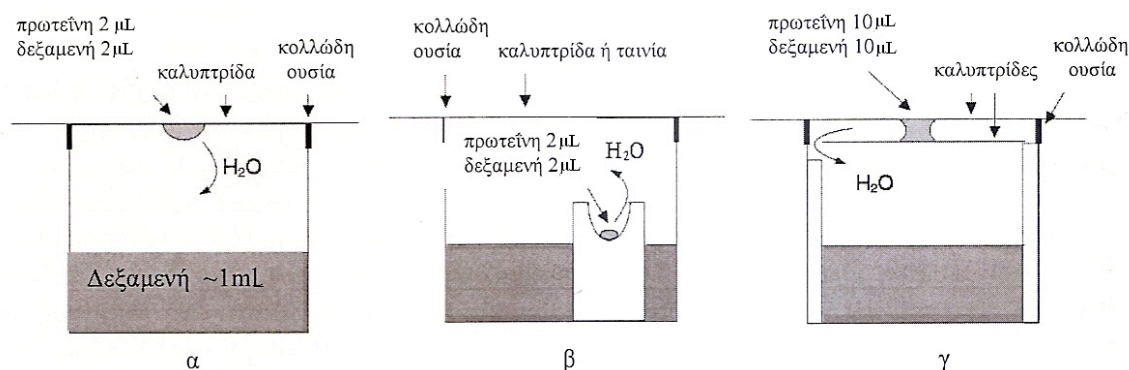
που δημιουργείται η πρωτεΐνη και ο κατακρημιστής έχουν αραιωθεί στο ήμισυ της αρχικής τους συγκέντρωσης. Η σταγόνα αυτή τοποθετείται πάνω από τη δεξαμενή που περιέχει το διάλυμα του κατακρημιστή, κλείνεται αεροστεγώς και αφήνεται προς εξισορρόπηση. Η διαφορά της συγκέντρωσης του κατακρημιστή μεταξύ σταγόνας και δεξαμενής θα ωθήσει τα μόρια διαλύτη της σταγόνας σε εξάτμιση, μέχρι του σημείου εξίσωσης των δύο συγκεντρώσεων. Η ταχύτητα εξισορρόπησης εξαρτάται από την ταχύτητα της διάχυσης ανάμεσα στα δύο διαλύματα. Λόγω φαινομένων μεταφοράς, τα οποία δημιουργούνται από την αυξημένη συγκέντρωση του κατακρημιστή στην άκρη της σταγόνας η ταχύτητα διάχυσης του ύδατος στο διάλυμα της σταγόνας είναι μεγαλύτερη από αυτή μεταξύ των δύο διαλυμάτων. Καθώς ο όγκος της σταγόνας μειώνεται, η συγκέντρωση της πρωτεΐνης αυξάνεται σταδιακά και περνάει από τη ζώνη διαλυτότητας στη μεσοσταθερή ζώνη και μετά στη ζώνη κατακρήμισης (υπερκορεσμός του διαλύματος). Αν οι συνθήκες είναι ευνοϊκές κατά το πέρασμα από τη μεσοσταθερή ζώνη μπορεί να σχηματισθούν πυρήνες κρυστάλλωσης (ζώνη πυρήνωσης) και κατόπιν να αναπτυχθούν σε κρυστάλλους (σχήμα 2.2).



Σχήμα 2.2 Η πορεία της κρυστάλλωσης σύμφωνα με τη μέθοδο της διάχυσης ατμών: **α)** κατά την εξισορρόπηση της τάσης ατμών συνήθως ύδωρ εξατμίζεται από τη σταγόνα και η συγκέντρωση της πρωτεΐνης και του κατακρημιστή αυξάνονται, **β)** η σταγόνα με το πρωτεϊνικό διάλυμα πρέπει να φτάσει βαθμιαία στον υπερκορεσμό, στη ζώνη πυρήνωσης για να αρχίσουν οι κρύσταλλοι να αυξάνονται και τότε η συγκέντρωση της πρωτεΐνης και πάλι μειώνεται.

Εφαρμόζονται κυρίως δύο διατάξεις ανάπτυξης πρωτεϊνικών κρυστάλλων που βασίζονται στην αρχή της διάχυσης ατμών, η τεχνική της κρεμάμενης σταγόνας (hanging drop) και της επικαθήμενης σταγόνας (sitting drop), ενώ λιγότερο εφαρμόζεται η τεχνική

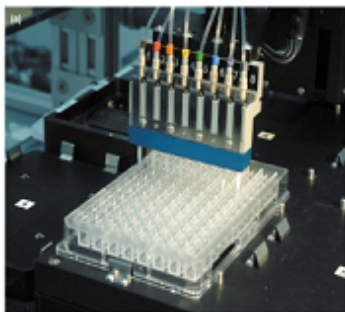
της εκατέρωθεν περιοριζόμενης σταγόνας (sandwich drop) (**σχήμα 2.3**). Οι αρχές κρυστάλλωσης είναι οι ίδιες στις τεχνικές, με διαφορές ως προς το χρόνο εξισορρόπησης, τον απαιτούμενο όγκο της σταγόνας και την ευκολία συλλογής των κρυστάλλων. Εφαρμόζοντας την τεχνική της επικαθήμενης σταγόνας μπορεί να ελαχιστοποιηθεί ο όγκος της σταγόνας άρα και η ποσότητα πρωτεΐνης καθώς και ο χρόνος εξισορρόπησης, ενώ με την τεχνική της κρεμάμενης σταγόνας η συλλογή των κρυστάλλων καθίσταται ευκολότερη.



Σχήμα 2.3 Σχηματική αναπαράσταση της μεθόδου διάχυσης ατμών όπως εφαρμόζεται με: **α)** την τεχνική της κρεμάμενης σταγόνας, κατά την οποία μικρή ποσότητα πρωτεϊνικού διαλύματος και διαλύματος κατακρημνιστή (σταγόνα κρυστάλλωσης) αφήνονται στο μέσο καλυπτρίδας (repel-coated). Η καλυπτρίδα τοποθετείται πάνω από τη δεξαμενή που περιέχει σχετικά μεγάλο όγκο (από 0,2 mL έως -συνήθως- 1 mL) διαλύματος κατακρημνιστή και το σύστημα κλείνεται αεροστεγώς, **β)** την τεχνική της επικαθήμενης σταγόνας, όπου η σταγόνα τοποθετείται πάνω σε μία γέφυρα που βρίσκεται εντός της δεξαμενής και **γ)** την τεχνική της εκατέρωθεν περιοριζόμενης σταγόνας, όπου η σταγόνα τοποθετείται ανάμεσα σε δύο καλυπτρίδες.

Η διάχυση ατμών αποτελεί την πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική κρυστάλλωσης πρωτεϊνών. Είναι ιδανική προκειμένου να ελεγχθεί ένα ευρύ φάσμα συνθηκών κρυστάλλωσης (screening) (**εικόνα 2.1**) με σχετικά μικρές ποσότητες πρωτεΐνης και καθιστά εφικτή τη μεγέθυνση υπό κλίμακα (scale-up), έτσι ώστε να ληφθούν κρύσταλλοι κατάλληλου μεγέθους για τη συλλογή κρυσταλλογραφικών δεδομένων. Μειονέκτημά της αποτελεί η μεγαλύτερη πιθανότητα να σχηματισθεί κάποια ατέλεια στο κρυσταλλικό πλέγμα, η οποία και αυξάνει αρκετά με την πρόοδο της

κρυστάλλωσης καθώς, αφενός η συγκέντρωση των προσμείξεων αυξάνει αφετέρου γίνονται απειλητικότερες λόγω του πολύ μικρού όγκου της σταγόνας.



Εικόνα 2.1 Πολλά πειράματα κρυστάλλωσης απαιτούνται για να εξετασθούν όλες οι παράμετροι και να εντοπισθούν οι λίγοι συνδυασμοί που ίσως δώσουν κρυστάλλους κατάλληλους για κρυσταλλογραφική μελέτη. Τα τελευταία χρόνια κατασκευάστηκαν ρομπότ κρυσταλλώσεων για να αυτοματοποιήσουν και να επισπεύσουν τη διαδικασία των πειραμάτων αυτών καθιστώντας δυνατή την πραγματοποίηση μεγάλου αριθμού πειραμάτων σε σύντομο χρόνο.

2.1.4.2 Διάχυση μέσω επιφανείας

Η τεχνική αυτή βασίζεται στην άμεση ενδοδιάχυση του διαλύματος κατακρημιστή στο πρωτεϊνικό διάλυμα μέσω της κοινής τους επιφάνειας με τη δημιουργία στοιβάδων, υψηλής συγκέντρωσης συνήθως στο διάλυμα του κατακρημιστή και χαμηλότερης συγκέντρωσης συνήθως στο διάλυμα πρωτεΐνης και παρουσιάζει αρκετές ομοιότητες με την τεχνική διαπίδυσης. Η εμφάνιση πυρήνων κρυστάλλωσης και τελικά η ανάπτυξη κρυστάλλων γίνεται στην ενδιάμεση περιοχή μεταξύ των δύο στοιβάδων, στην οποία τόσο η συγκέντρωση άλατος όσο και αυτή της πρωτεΐνης είναι στη μέγιστη τιμή τους. Τα δύο διαλύματα αναμειγνύονται αργά και στην κατάσταση ισορροπίας η συγκέντρωση του κατακρημιστή είναι αρκετά μεγάλη ώστε να προωθήσει την κρυστάλλωση. Λόγω της αλληλεπίδρασης μορίων κατακρημιστή και πρωτεΐνης δημιουργούνται περιοχές υπερκορεσμού προάγοντας την εμφάνιση πυρήνων κρυστάλλωσης και την ανάπτυξή τους σε κρυστάλλους κατάλληλους για συλλογή κρυσταλλογραφικών δεδομένων.

Σημαντικό μειονέκτημα της τεχνικής αποτελεί η απαίτηση μεγάλης ποσότητας πρωτεΐνης εξαιτίας της υψηλής αρχικής συγκέντρωσης των διαλυμάτων. Όμως τα

τελευταία χρόνια η απαιτούμενη ποσότητα πρωτεΐνης, έχει περιοριστεί με τη χρήση μικρορευστομηχανικών διατάξεων. Πλεονέκτημά της είναι η δυνατότητα ανάπτυξης κρυστάλλων μεγάλου μεγέθους και καλής ποιότητας.

2.1.4.3 Διαπίδυση

Η τεχνική αυτή είναι παρόμοια με την τεχνική διάχυσης μέσω επιφανείας με τη διαφορά ότι το διάλυμα της πρωτεΐνης εξισορροπείται με πυκνό διάλυμα κατακρημνιστού μέσω ημιπερατής μεμβράνης. Με τον τρόπο αυτό η διάχυση μορίων ύδατος (ωσμωτικά φαινόμενα) οδηγεί στον υπερκορεσμό του πρωτεϊνικού διαλύματος και στο σχηματισμό κρυστάλλων.

Η τεχνική αυτή πλεονεκτεί σε σχέση με την τεχνική διάχυσης μέσω επιφανείας διότι δεν χρειάζονται ιδιαίτερα μεγάλες ποσότητες πρωτεΐνης και το ίδιο διάλυμα πρωτεΐνης μπορεί να δοκιμαστεί σε περισσότερες από μια συνθήκες απλώς μεταφέροντας τη μεμβράνη σε διάφορα διαλύματα κατακρημνιστών. Επίσης μπορεί να ελεγχθεί ο ρυθμός διάχυσης μέσω του μεγέθους των πόρων της μεμβράνης.

2.1.4.4 Τεχνική ολικής ανάμιξης

Η τεχνική αυτή είναι η πιο παλιά και απλή τεχνική κρυστάλλωσης πρωτεϊνών. Συνίσταται στην άμεση ανάμειξη ακόρεστου πρωτεϊνικού διαλύματος υψηλής συγκέντρωσης με διάλυμα κατακρημνιστή επίσης σε υψηλή συγκέντρωση, με αποτέλεσμα τη μεταβολή της διαλυτότητας της πρωτεΐνης έτσι ώστε να προκύψει υπέρκορο διάλυμα πρωτεΐνης στη συγκεκριμένη συγκέντρωση κατακρημνιστή και να οδηγήσει σε κρυστάλλωση.

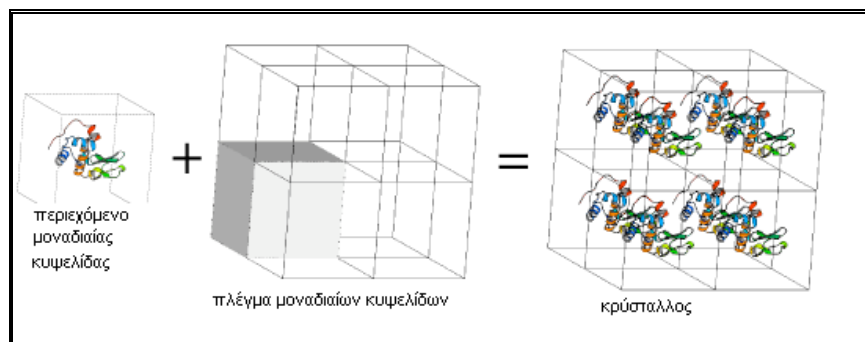
Πλεονεκτήματα της τεχνικής είναι η απλότητα αλλά και η επαναληψιμότητα της, ενώ οι κρύσταλλοι που προκύπτουν (με ποσότητες της τάξης των 0,3mL) είναι τυπικά μεγαλύτεροι και καλύτερης ποιότητας λόγω του ότι η πιθανότητα να επικαθίσει κάποια πρόσμειξη ή πρωτεολυόμενο τμήμα της πρωτεΐνης είναι μικρότερη σε σχέση με άλλες τεχνικές. Παλαιότερα, σημαντικό μειονέκτημα της τεχνικής ολικής ανάμιξης αποτελούσε η απαίτηση μεγάλης ποσότητας πρωτεΐνης. Τα τελευταία όμως χρόνια με την ανάμειξη των διαλυμάτων είτε σε τριχοειδείς σωληνίσκους είτε σε μικροσταγόνες καλυπτόμενες από στρώμα ελαίου (microbatch crystallization), χρησιμοποιούνται

ποσότητες ίδιας τάξης μεγέθους με αυτές της διάχυσης ατμών, αλλά τα αποτελέσματα δεν είναι αναλόγως επιτυχή. Κυριότερα μειονεκτήματα της τεχνικής ολικής ανάμειξης είναι το ότι δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε περιπτώσεις όπου είναι απαραίτητη αργή εξισορρόπηση και το ότι δεν επιτρέπει τον έλεγχο ευρέως φάσματος συνθηκών με μία σταγόνα, όπως συμβαίνει στις τεχνικές διαπίδυσης και διάχυσης ατμών. Για τους λόγους αυτούς η τεχνική δεν χρησιμοποιείται ευρέως.

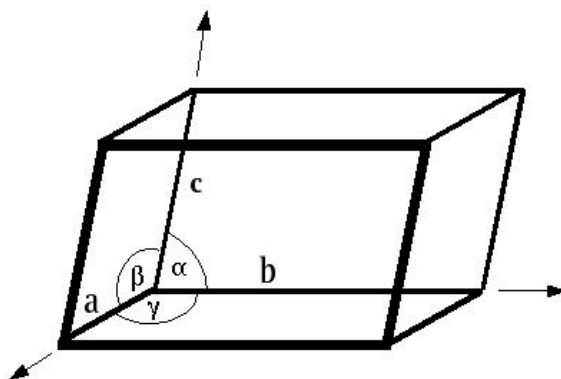
2.2 Κρυσταλλογραφία

2.2.1 Κρυσταλλικά συστήματα

Το πρώτο και καθοριστικό βήμα στον προσδιορισμό μίας πρωτεϊνικής δομής είναι η παραγωγή καλής ποιότητας κρυστάλλων. Οι κρύσταλλοι σχηματίζονται από την κανονική διεύθετη σε τρεις διαστάσεις ατόμων, ιόντων, μορίων ή μοριακών συμπλεγμάτων (**Σχήμα 2.4**). Η βασική δομική μονάδα ενός κρυστάλλου, η οποία επαναλαμβάνεται περιοδικά δημιουργώντας μία κανονική διάταξη, ονομάζεται μοναδιαία κυψελίδα (ή στοιχειώδης κυψελίδα unit cell). Οι ακμές της σημειώνονται με τα γράμματα a , b και c και δηλώνουν ότι κάθε σημείο επαναλαμβάνεται κατά μήκος του κάθε άξονα τόσο όσο ορίζει η αντίστοιχη τιμή των ακμών a , b και c . Οι γωνίες χαρακτηρίζονται με τα γράμματα α , β και γ με την α να είναι μεταξύ των ακμών b και c , τη β μεταξύ a και c και τη γ μεταξύ a και b (**Σχήμα 2.5**). Η επανάληψη του παραλληλεπίπεδου της μοναδιαίας κυψελίδας, προς όλους τους άξονες, παράγει το κρυσταλλικό πλέγμα. Κάθε μοναδιαία κυψελίδα στα κρυσταλλικά πλέγματα περιέχει συμμετρία. Το ελάχιστο τμήμα της μοναδιαίας κυψελίδας που περιέχει όλη την πληροφορία της κρυσταλλογραφικής συμμετρίας ονομάζεται ασύμμετρη κυψελίδα (asymmetric unit).



Σχήμα 2.4 Το κρυσταλλικό πλέγμα χτίζεται από τις μοναδιαίες κυψελίδες. Ο κρύσταλλος (crystal) είναι ένας συνδυασμός του κρυσταλλικού πλέγματος (crystal lattice) και του περιεχομένου της μοναδιαίας κυψελίδας (unit cell). (<http://xray0.princeton.edu/~phil/Facility/x101/x101.html>)



Σχήμα 2.5 Μοναδιαία κυψελίδα. Οι έξι παράμετροι (a , b , c , α , β , γ) επαρκούν για να καθορίσουν μονοσήμαντα το σχήμα της μοναδιαίας κυψελίδας και ως εκ τούτου, τη φυσική γεωμετρία του προτύπου περίθλασης. (<http://xray0.princeton.edu/~phil/Facility/x101/x101.html>)

Η περιοδικά επαναλαμβανόμενη ασύμμετρη μονάδα μπορεί να είναι ένα μόριο ή μία συνάθροιση μορίων. Η αντικατάσταση κάθε τέτοιας μονάδας από ένα σημείο οδηγεί σε ένα τρισδιάστατο πλέγμα, το κρυσταλλικό πλέγμα. Μέσα στο κρυσταλλικό πλέγμα ορίζεται η γεωμετρική σχέση μεταξύ των δομικών μονάδων και γίνεται εμφανής η συμμετρία της τρισδιάστατης διεύθετησής τους. Η κρυσταλλογραφική αυτή συμμετρία, αρχικά, σχετίζεται με το σχήμα της μοναδιαίας κυψελίδας. Το περιεχόμενο της μοναδιαίας κυψελίδας μπορεί να αναπαραχθεί από την εφαρμογή κατάλληλης ομάδας

πράξεων συμμετρίας (symmetry operations) σε μία μόνο ασύμμετρη μονάδα. Αυτή η ομάδα πράξεων συμμετρίας ορίζεται από την ομάδα συμμετρίας χώρου (space group) του κρυστάλλου.

Ο προσδιορισμός της σωστής συμμετρίας του πλέγματος αποτελεί βασική προϋπόθεση της κρυσταλλογραφικής μελέτης και συνοδεύει σε όλα τα στάδια τη διαδικασία προσδιορισμού της τρισδιάστατης μοριακής δομής. Η συμμετρία, επίσης, λόγω της επαναληψιμότητας ελαττώνει τόσο τον απαιτούμενο αριθμό των πειραματικών δεδομένων που πρέπει να συλλεγούν όσο και τον όγκο των υπολογισμών στη συνέχεια του προσδιορισμού. Οι μετασχηματισμοί οι οποίοι αφήνουν ένα σημείο του πλέγματος ακίνητο, ονομάζονται πράξεις συμμετρίας σημείου (point symmetry) και είναι ο κατοπτρισμός ως προς ένα επίπεδο, η περιστροφή ως προς ένα κέντρο και οι συνδυασμοί τους. Στην κρυσταλλογραφική συμμετρία περιλαμβάνονται 10 στοιχεία συμμετρίας (symmetry elements), ο συνδυασμός των οποίων δίνει τις 32 κρυσταλλικές τάξεις. Επειδή όμως το κρυσταλλικό πλέγμα χαρακτηρίζεται και από συμμετρία μετάθεσης (translation) ως προς τις τρεις διαστάσεις του χώρου, δημιουργούνται νέα στοιχεία συμμετρίας, οι άξονες ελικώσεως (screw axis) και τα επίπεδα ολίσθησης και έτσι μαθηματικά αποδεικνύεται ότι ο συνδυασμός εξωτερικών και εσωτερικών στοιχείων συμμετρίας δίνει ένα σύνολο από 230 ομάδες συμμετρίας χώρου. Υπάρχουν 14 είδη πλεγμάτων, τα πλέγματα Bravais, τα οποία κατανέμονται σε 7 Κρυσταλλικά Συστήματα: Τρικλινές, Μονοκλινές, Ορθορομβικό, Τριγωνικό, Εξαγωνικό, Τετραγωνικό, και Κυβικό (**πίνακας 2.1**) που προκύπτουν από τους δυνατούς συνδυασμούς των παραμέτρων των μοναδιαίων κυψελίδων. Ωστόσο τα βιολογικά μακρομόρια (πρωτεΐνες και νουκλεϊνικά οξέα) επειδή εμφανίζουν μόνο ένα οπτικό ισομερές, κρυσταλλώνονται σύμφωνα με 65 ομάδες συμμετρίας χώρου εξαιρώντας αυτές που έχουν κατοπτρική συμμετρία (**πίνακας 2.2**). Όταν η ασύμμετρη μονάδα περιέχει περισσότερα από ένα μόρια τότε αυτά εμφανίζουν μη κρυσταλλογραφική συμμετρία.

Η κρυσταλλική μορφολογία πολύ συχνά δίνει ενδείξεις για την εσωτερική κρυσταλλική συμμετρία και προσανατολισμό των κρυσταλλογραφικών αξόνων. Συστηματικές απουσίες ανακλάσεων, που δείχνουν την ύπαρξη των αξόνων στροφής, μπορεί να εκτιμηθούν από το τελικό σύνολο δεδομένων.

Τα δεδομένα μπορούν να υποστούν επεξεργασία σε μία κατώτερη ομάδα συμμετρίας χώρου και έπειτα να ελεγχθούν για πιθανά ισοδύναμα συμμετρίας υψηλότερης τάξεως.

Πίνακας 2.1 Τα κρυσταλλικά συστήματα συνοπτικά.

Κρυσταλλικό σύστημα	Πλέγμα/τα Bravais	Παράμετροι μοναδιαίας κυψελίδας
Τρικλινές	P	a, b, c, α , β , γ χωρίς περιορισμούς
Μονοκλινές	P, C	a, b, c, $\alpha=\gamma=90^\circ$, β χωρίς περιορισμούς
Ορθορομβικό	P, C, F, I	a, b, c, $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$
Τετραγωνικό	P, I	a=b, c, $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$
Τριγωνικό	P	a=b, c, $\alpha=\beta=90^\circ$, $\gamma=120^\circ$
	R (ρομβοεδρικό)	a=b=c, $\alpha=\beta=\gamma<120^\circ$
Εξαγωνικό	P	a= c, b, $\alpha=\gamma=90^\circ$, $\beta=120^\circ$
Κυβικό	P, F, I	a=b=c, $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$

Πίνακας 2.2 Οι χειρόμορφες (chiral) ομάδες χώρου όπου κρυσταλλώνονται τα βιολογικά μακρομόρια.

Τρικλινές	P1
Μονοκλινές	P2, P2 ₁ , C2
Ορθορομβικό	P222, P222 ₁ , P2 ₁ 2 ₁ 2, P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ , C222 ₁ , C222, F222, I222, I2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Τετραγωνικό	P4, P4 ₁ , P4 ₂ , P4 ₃ , I4, I4 ₁ , P422, P42 ₁ 2, P4 ₁ 22, P4 ₁ 2 ₁ 2, P4 ₂ 22, P4 ₂ 2 ₁ 2, P4 ₃ 22, P4 ₃ 2 ₁ 2, I422, I4 ₁ 22
Τριγωνικό	P3, P3 ₁ , P3 ₂ , R3, P312, P321, P3 ₁ 12, P3 ₁ 21, P3 ₂ 12, P3 ₂ 21, R32
Εξαγωνικό	P6, P6 ₁ , P6 ₅ , P6 ₂ , P6 ₄ , P6 ₃ , P622, P6 ₁ 22, P6 ₅ 22, P6 ₂ 22, P6 ₄ 22, P6 ₃ 22
Κυβικό	P23, F23, I23, P2 ₁ 3, I2 ₁ 3, P432, P4232, F432, F4 ₁ 32, I432, P4 ₃ 32, P4 ₁ 32, I4 ₁ 32

2.2.2 Περίθλαση ακτίνων -X

Όταν μια δέσμη ακτίνων-X προσπίπτει σε ένα άτομο οι ακτίνες σκεδάζονται από τα ηλεκτρόνια του ατόμου προς όλες τις κατευθύνσεις. Τα ηλεκτρόνια είναι τα σωματίδια του ατόμου που σκεδάζουν σημαντικά τις ακτίνες-X και κατανέμονται σε ατομικούς όγκους διαστάσεων συγκρίσιμων με τα μήκη κύματος των ακτίνων-X που χρησιμοποιούνται στη δομική ανάλυση. Η σκέδαση των ακτίνων-X με την ύλη συμβαίνει εξαιτίας δύο διαδικασιών: α) της σκέδασης Thomson και β) της σκέδασης Compton.

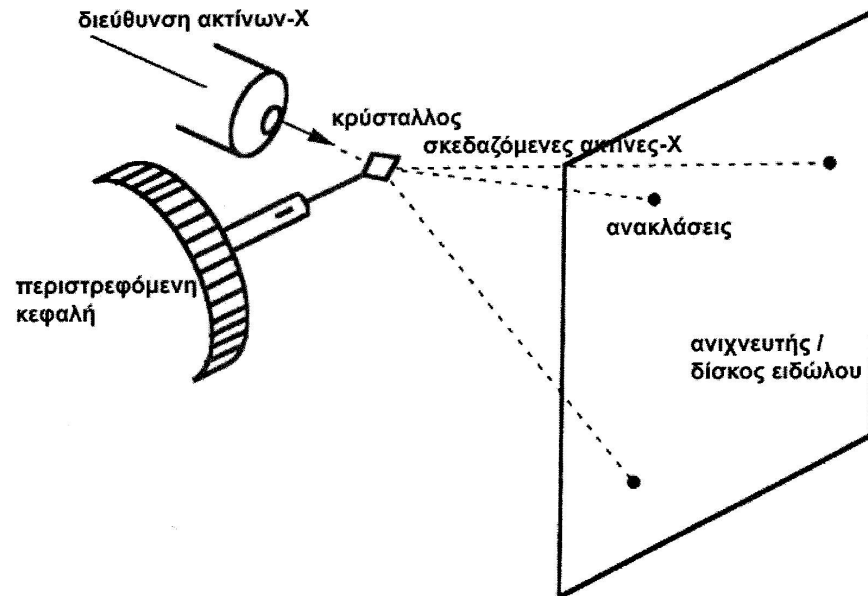
Η ταλάντωση που υφίσταται το ηλεκτρόνιο από τις ακτίνες- X έχει αποτέλεσμα την εκπομπή ακτινοβολίας ίδιου μήκους κύματος και φάσης, αλλά με μεταβολή της φάσης κατά $\Delta\phi=180^\circ$ (Thomson ή coherent scattering). Όταν μία δέσμη ακτίνων-X προσκρούει σε χαλαρά προσδεδεμένα ηλεκτρόνια υφίσταται παρεκτροπή από τη διεύθυνσή της με απώλεια ενέργειας και αλλαγή στο μήκος κύματος (Compton ή incoherent scattering). Μόνο η συμφασική σκέδαση Thomson δίνει ενισχυτική συμβολή των σκεδαζόμενων κυμάτων, ενώ η σκέδαση Compton αποτελεί ουσιαστικά θόρυβο.

Ένα πρωτεϊνικό μόριο αποτελεί έναν αδύναμο σκεδαστή των ακτίνων-X. Πολλά πρωτεϊνικά μόρια σε τυχαίες θέσεις (διάλυμα ή άμορφο στερεό) σκεδάζουν τις ακτίνες κατά τρόπο συνεχή, δηλαδή ακτινοβολία σκεδάζεται σε όλες τις διευθύνσεις (διαχέεται).

Ένας κρύσταλλος αποτελεί μία περιοδικά επαναλαμβανόμενη διευθέτηση μορίων στο χώρο. Η ιδιότητα αυτή κάνει τα μόρια να σκεδάζουν με όμοιο τρόπο τις ακτίνες έτσι ώστε σε ορισμένες διευθύνσεις η σκέδαση από όλα τα μόρια να συμβάλλει δημιουργικά και να προκύπτουν ισχυρές περιθλώμενες ακτίνες σε αυτές τις διευθύνσεις. Η ένταση αυτών των ακτίνων μπορεί να μετρηθεί και η διαδικασία αναφέρεται ως συλλογή δεδομένων περίθλασης. Οι περιθλώμενες δέσμες καταγράφονται σε έναν ανιχνευτή με τη μορφή σημειακών αμαυρώσεων (ανακλάσεις). Η διάταξη ενός τέτοιου πειράματος φαίνεται στο **σχήμα 2.6**.

Αν οι σκεδαζόμενες ακτίνες ανασυνδυαστούν προκύπτει εικόνα του αντικειμένου που προκάλεσε την περίθλαση, σε μεγέθυνση. Επειδή δεν υπάρχει όργανο (π.χ φακός) που να μπορεί να ανασυνδυάσει τις ανακλάσεις των ακτίνων-X, για το σκοπό αυτό χρησιμοποιείται ένα μαθηματικό εργαλείο που ονομάζεται σύνθεση Fourier. Στην εξίσωση αυτή κάθε σκεδαζόμενο κύμα -που αναφέρεται ως παράγοντας δομής-

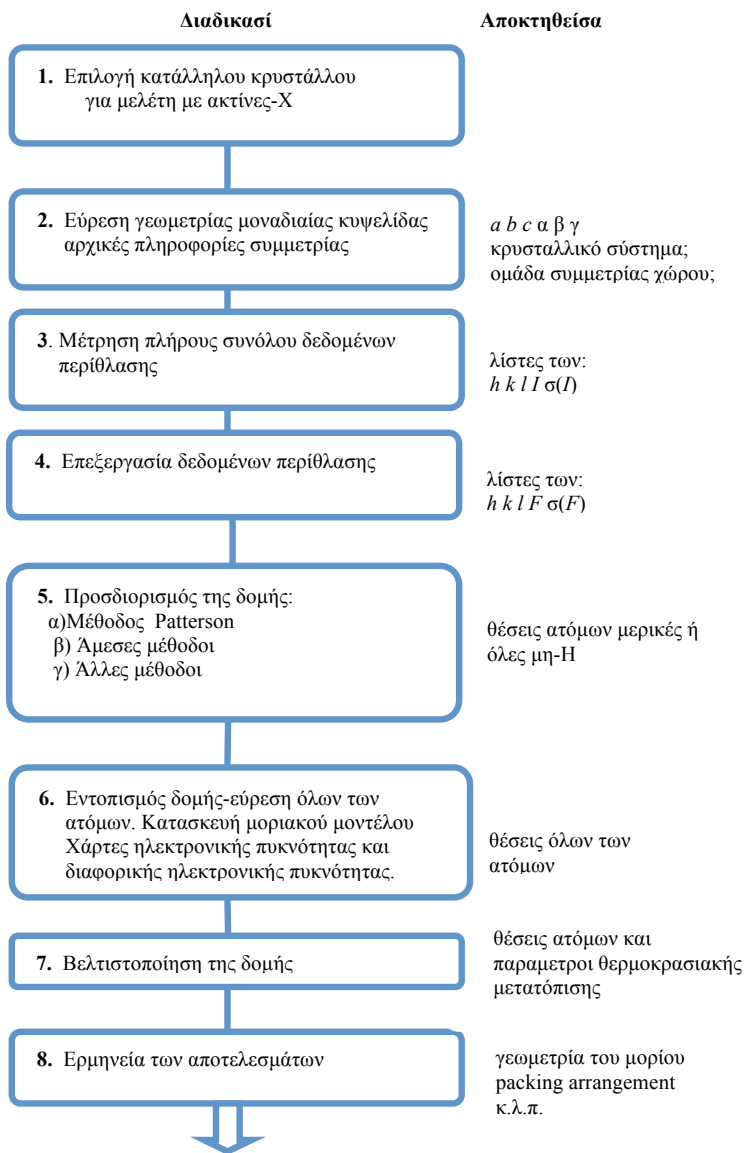
περιγράφεται από το πλάτος, τη διεύθυνση διάδοσης και τη φάση του. Το αποτέλεσμα της σύνθεσης Fourier είναι ο χάρτης ηλεκτρονικής πυκνότητας των μορίων στον κρύσταλλο.



Σχήμα 2.6 Τυπική διάταξη ενός πειράματος περίθλασης ακτίνων-X από κρύσταλλο.

2.2.3 Διαδικασία προσδιορισμού κρυσταλλοδομής

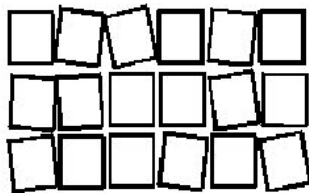
Στο **σχήμα 2.7** που ακολουθεί δίνεται ένα διάγραμμα ροής με τα βήματα για τον προσδιορισμό μίας κρυσταλλοδομής.



Σχήμα 2.7 Διάγραμμα ροής των βημάτων για τον προσδιορισμό μίας κρυσταλλοδομής (Clegg, 1998).

2.2.4 Μωσαϊκότητα

Στην πραγματικότητα, ένας μονοκρυστάλλος δεν σχηματίζεται ποτέ από μία τέλεια, απείρως περιοδική διάταξη μονάδων. Η περιοδικότητα αυτή είναι πεπερασμένη και εμφανίζει ατέλειες. Μπορεί να θεωρηθεί ότι ο κρύσταλλος αποτελείται από πλήθος μωσαϊκών ψηφίδων λίγων μοναδιαίων κυψελίδων. Οι ψηφίδες αυτές δεν είναι τέλεια διατεταγμένες αλλά εμφανίζουν μία σχετική γωνιακή απόκλιση μεταξύ τους (**σχήμα 2.8**). Γι' αυτό, η ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας δεν είναι σημειακή αλλά αντιστοιχεί σε συγκεκριμένο εύρος. Επίσης, το γεγονός ότι κάθε μικρή ψηφίδα αποτελείται από πεπερασμένο αριθμό επαναλαμβανόμενων μονάδων έχει ως αποτέλεσμα η σκεδαζόμενη ακτινοβολία από αυτή να φέρει ένα επιπλέον εύρος (λιγότερο από 0.01°). Αποτέλεσμα αυτών που αναφέρθηκαν είναι η παρατηρούμενη περίθλαση των ακτίνων-X σε μονοκρυστάλλο να μην εντοπίζεται σε έντονα σημεία του αντίστροφου χώρου αλλά να εκτείνεται σε μικρές περιοχές γύρω από αυτά τα σημεία.



Σχήμα 2.8 Υπερβολική σχηματική αναπαράσταση της μωσαϊκότητας.

2.2.5 Κρυογονική στην κρυσταλλογραφία πρωτεϊνών

Κατά τη συλλογή κρυσταλλογραφικών δεδομένων οι κρύσταλλοι υφίστανται εκτεταμένη καταστροφή λόγω ακτινοβολίας (radiation damage). Η καταστροφή αυτή οφείλεται στην αλληλεπίδραση μεταξύ των μορίων που σχηματίζουν τον κρύσταλλο και της δέσμης της ακτινοβολίας που προκαλεί ιονισμό. Οι αλλοιώσεις αυτές είναι δυνατό να πραγματοποιηθούν με δύο τρόπους. Με άμεση δράση όπου η ακτινοβολία προσβάλλει απευθείας τα μόρια στον κρύσταλλο (π.χ. καταστροφή μέρους της πολυπεπτιδικής αλυσίδας) και με έμμεση δράση κατά την οποία μπορεί να γίνει διάσπαση μορίων ύδατος προς ελεύθερες ρίζες H^\bullet και OH^\bullet . Η ταχεία διάχυση των ελευθέρων ριζών στο

κρυσταλλικό πλέγμα οδηγεί στην περαιτέρω καταστροφή του. Όμως σε πολύ χαμηλές θερμοκρασίες η πλειοψηφία των ελευθέρων ριζών που παράγονται χαρακτηρίζονται από πολύ βραδύ ρυθμό διάχυσης. Έτσι η κίνησή τους κατά μήκος του κρυσταλλικού πλέγματος είναι μειωμένη και η αποδόμησή του περιορίζεται σημαντικά. Χάρη στην ιδιότητα που έχουν οι κρύσταλλοι μακρομορίων να μπορούν να ψυχθούν διατηρώντας το κρυσταλλικό τους πλέγμα σχεδόν αναλλοίωτο, έχει γίνει κοινή πρακτική η συλλογή κρυσταλλογραφικών δεδομένων σε χαμηλή θερμοκρασία που προσεγγίζει τους 100 K. (Garman, 2003).

Υπό κανονικές συνθήκες θερμοκρασίας και πίεσης, το ύδωρ του κρυσταλλικού πλέγματος βιομορίων βρίσκεται σε υγρή μορφή. Όμως κατά την ψύξη ενός κρυστάλλου, τα μόρια μεταβαίνουν από την υγρή μορφή στη μορφή εξαγωνικού πάγου (μορφή I του πάγου), προκαλώντας αύξηση του όγκου κατά περίπου 9%, με καταστροφικές συνέπειες μηχανικής πίεσης. Για την αποφυγή τέτοιων συνεπειών από την ψύξη γίνεται χρήση ενώσεων με κρυστοπροστατευτικές ιδιότητες. Τα κρυστοπροστατευτικά μόρια περιέχουν ομάδες υδροξυλίων που δημιουργούν δεσμούς υδρογόνου με τα μόρια ύδατος και διαταράσσουν τη δομή του κρυσταλλικού εξαγωνικού πάγου με αποτέλεσμα τα μόρια του ύδατος να μεταβαίνουν στη μορφή II του πάγου, η οποία χαρακτηρίζεται από μία μετασταθή ισορροπία με τα μόρια του ύδατος να βρίσκονται διατεταγμένα με τυχαίο τρόπο στο κρυσταλλικό πλέγμα. Στη μορφή αυτή του πάγου, η ψύξη του κρυστάλλου δεν συνεπάγεται αύξηση του όγκου και εκτεταμένη καταστροφή του κρυσταλλικού πλέγματος, αν και το κρυσταλλικό πλέγμα μπορεί να διαταραχθεί, γεγονός που αντικατοπτρίζεται στην αύξηση της μωσαϊκότητάς του. Προβλήματα εξακολουθούν να εμφανίζονται κυρίως λόγω του σχηματισμού του πάγου γύρω από ή κοντά στον κρύσταλλο, που αντιμετωπίζεται με προσπάθεια μείωσης της υγρασίας γύρω από τον κρύσταλλο όπως με χρήση κλειστού χώρου, εντός του οποίου το επίπεδο της υγρασίας μπορεί να μειωθεί σε λιγότερο από 1%.

Η κρυστοπροστασία (cryoprotection) παρέχει ένα μέσο για την αύξηση της διάρκειας ζωής ορισμένων κρυστάλλων βιομορίων, κατά τη διάρκεια της συλλογής των δεδομένων. Άλλα πλεονεκτήματά της είναι ότι επιτυγχάνεται συλλογή δεδομένων καλύτερης ποιότητας και σε υψηλότερη διακριτική ικανότητα, ότι γίνεται δυνατή η αποθήκευση των κρυστάλλων και η επαναχρησιμοποίησή τους καθώς επίσης και ότι

μπορεί να γίνει συλλογή δεδομένων από κρυστάλλους μικρότερου μεγέθους. Σημαντικά μειονεκτήματα αποτελούν η ανάγκη εξεύρεσης διαφορετικών συνθηκών κρυοπροστασίας για κάθε νέο κρύσταλλο και η ανάγκη εγκατάστασης κατάλληλου κρυοστάτη.

Γενικά, οι κρυοπροστατευτικές ενώσεις προστίθενται σε ποσοστό 10-30% επί του όγκου του πρωτεϊνικού διαλύματος. Συνήθως ο κρύσταλλος εμβαπτίζεται σε διάλυμα της συνθήκης κρυστάλλωσης στο οποίο έχει προστεθεί και η κατάλληλη ποσότητα κρυοπροστατευτικού. Η διαδικασία αυτή διαρκεί ελάχιστα δευτερόλεπτα και ο κρύσταλλος ψύχεται άμεσα, συνήθως σε ρεύμα υγρού αζώτου, καθώς η διατήρηση του κρυστάλλου στο τροποποιημένο μητρικό υγρό για μεγάλο χρονικό διάστημα μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την καταστροφή του. Η γλυκερόλη σε συγκέντρωση 20-30% κ.ό., είναι η κρυοπροστατευτική ένωση με την πιο ευρεία χρήση. Χρησιμοποιούνται επίσης σε μεγάλο βαθμό η 2-μεθυλο-2,4-πεντανοδιόλη (MPD), η αιθυλενογλυκόλη, μερικές φορές σε συνδυασμό με πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG) για την αύξηση της σταθερότητας των κρυστάλλων, η πολυαιθυλενογλυκόλη 400 (PEG400), αλκοόλες όπως η αιθανόλη, η μεθανόλη, η ισοπροπανόλη και διάφορα έλαια. (Garman 2003, Ducruix *et al.* 1992).

• ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.3 Κρυστάλλωση β -λακτοσφαιρίνης

Τα πειράματα κρυστάλλωσης της φυσικής β -λακτοσφαιρίνης (native β -lactoglobulin), πραγματοποιήθηκαν με τις τεχνικές της κρεμάμενης σταγόνας και της επικαθήμενης σταγόνας. Χρησιμοποιήθηκε η αγελαδινή β -λακτοσφαιρίνη A (L7880, Sigma) ως έχει, χωρίς περαιτέρω καθαρισμό. Το διάλυμα της πρωτεΐνης παρασκευάστηκε με διαλύτη 0,1M Tris pH 7,0 σε αρχική συγκέντρωση 20mg/mL. Ο όγκος του διαλύματος κατακρήμνισης στη δεξαμενή ήταν 1mL. Πριν τη διαδικασία έγινε γρήγορη φυγοκέντρηση του πρωτεϊνικού διαλύματος σε 14000rpm και λήψη του υπερκειμένου. Οι σταγόνες είχαν τελικό όγκο 8, 9, ή 10 μ L με αναλογία όγκου διαλύματος πρωτεΐνης προς όγκο διαλύματος κατακρήμνισης 1:1. Ακολούθησε προσεκτική εξέταση των σταγόνων. Χρησιμοποιήθηκαν δίσκοι δοκιμασιών κρυστάλλωσης (crystallization plates) 24 φρεατιδίων (Linbro Plate, Hampton Research Inc.), μικρογέφυρες (Micro-Bridges, Hampton Research Inc.) και καλυπτρίδες επικαλυμμένες με σιλικόνη (Hampton Research Inc.). Ως λιπαντικό για την εξασφάλιση της στεγανότητας εφαρμόστηκε σιλικόνη. Τα πειράματα έλαβαν χώρα σε θερμοκρασία 20°C και ακολούθως οι δίσκοι τοποθετήθηκαν για επώαση στους 18°C.

Χρησιμοποιήθηκαν τα άλατα $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ σε συγκέντρωση από 2,2 έως 2,8 M με βήμα ελέγχου 0,2 και Na-citrate 1,0 έως 1,5M με βήμα ελέγχου 0,1. Στον **πίνακα 2.3** που ακολουθεί δίνονται τα ρυθμιστικά διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν σε διάφορες τιμές pH. Η συγκέντρωση των ρυθμιστικών διαλυμάτων ήταν 0,1M HEPES ($\text{C}_8\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$, 4(-2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid, Fluka BioChemika) 0,1M Tris (2Amino-2-(hydroxymethyl)-propane-1,3diol, AppliChem) και 0,2M Tris·HCl ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3\cdot\text{HCl}$, Tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride, Fluka BioChemika).

Πίνακας 2.3 Τα ρυθμιστικά διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν.

Ρυθμιστικό διάλυμα	Εύρος pH
Tris	7,5-8,5
Tris·HCl	7,0-8,5
HEPES	7,0-8,0

2.4 Κρυστάλλωση συμπλόκων β-λακτοσφαιρίνης

Η παραγωγή κρυστάλλων συμπλόκων της β-λακτοσφαιρίνης με τις ενώσεις που δίνονται στον πίνακα 2.4, επιχειρήθηκε με τις τεχνικές της εμφάπτισης και της συγκρυστάλλωσης.

2.4.1 Εμφάπτιση

Η τεχνική της εμφάπτισης (soaking) αναφέρεται στη μεταφορά του κρυστάλλου σε διάλυμα της ένωσης ή στην προσθήκη διαλύματος της ένωσης στον κρύσταλλο. Η αρχική αξιολόγηση της πορείας βασίστηκε σε χρωματικές αλλαγές του κρυστάλλου ή/και μακροσκοπικές αλλαγές στις επιφάνειές του όπως εμφάνιση ραγισμάτων, κυρτώσεων, κατακερματισμού ή ολοκληρωτικής διάλυσής του. Παρασκευάστηκαν διαλύματα των ενώσεων σε αιθανόλη ή διαιθυλαιθέρα σε διάφορες συγκεντρώσεις.

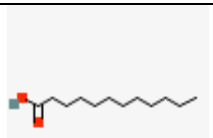
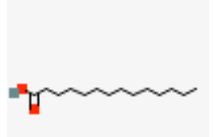
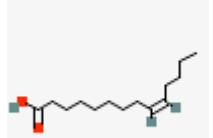
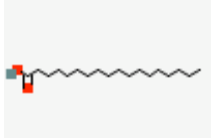
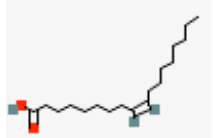
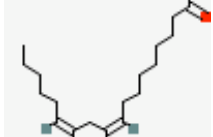
2.4.2 Συγκρυστάλλωση

Η τεχνική της συγκρυστάλλωσης (co-crystallisation) αναφέρεται στην εξαρχής προσθήκη της ένωσης ώστε οι κρύσταλλοι να σχηματιστούν παρουσία της. Το διάλυμα της πρωτεΐνης παρασκευάστηκε με διαλύτη 0,1M Tris pH 7,0 είτε 0,2M Tris pH 8,0 σε αρχική συγκέντρωση πρωτεΐνης 20mg/mL. Οι συνθήκες που δοκιμάστηκαν για το σχηματισμό συμπλόκου ήταν συγκέντρωση καταβυθιστή 1,0-1,5 M Na-citrate, ρυθμιστικό διάλυμα 0,1 M HEPES (pH 7,3), συγκέντρωση υποστρώματος 50 mM καθώς και 100 mM σε αιθανόλη προστέθηκε στο διάλυμα της πρωτεΐνης σε συγκέντρωση 2:1 ως προς την πρωτεΐνη και το μείγμα επώαστηκε για 2 ώρες στους 40 °C. Αναμίχθηκαν 8 μL διαλύματος συμπλόκου με 8μL διαλύματος κατακρήμνισης.

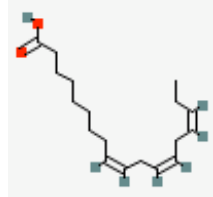
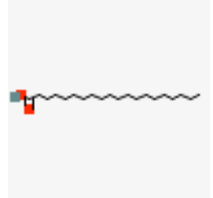
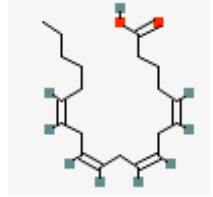
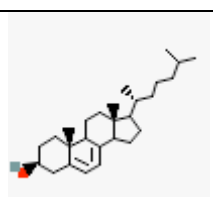
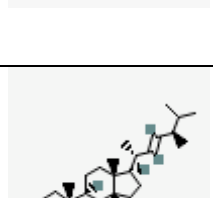
2.5 Υποστρώματα β-λακτοσφαιρίνης

Για τη μελέτη της πρόσδεσης υποστρωμάτων στη β-λακτοσφαιρίνη επελέγησαν ενώσεις (ή παράγωγα και ισομερή τους) που στο παρελθόν έχουν αναδειχθεί ότι προσδένονται σε αυτή. Οι ενώσεις αυτές δίνονται στον παρακάτω **πίνακα 2.4** ενώ περισσότερα στοιχεία παρατίθενται στο **Παράρτημα** (Bolton *et al.* 2008, Stryer 1994).

Πίνακας 2.4 Τα υποστρώματα της β-λακτοσφαιρίνης.

Υπόστρωμα Ligand	Ονομασία κατά IUPAC:	Μοριακός τύπος	Μοριακό βάρος [g/mol]	Σκελετική Δομή http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/	κωδικός Sigma
Λαουρικό οξύ Lauric acid	<i>n</i> -Δωδεκανικό οξύ dodecanoic acid	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	200,317760		W261408, Sigma
Μυριστικό οξύ Myristic acid	<i>n</i> -Δεκατετρανικό οξύ tetradecanoic acid	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	228,370920		M3128, Sigma,
Μυριστελαϊκό οξύ Myristoleic acid	<i>cis</i> Δ ⁹ Δεκατετρενικό οξύ (<i>Z</i>)-tetradec-9-enoic acid	C ₁₄ H ₂₆ O ₂	226,355040		M3525, Sigma
Στεατικό οξύ Stearic acid	<i>n</i> -Δεκαοκτανικό οξύ Octadecanoic acid	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	284,47724		85679, Fluka
Ελαϊκό οξύ Oleic acid	<i>cis</i> Δ ⁹ Δεκαοκτενικό οξύ (<i>Z</i>)-octadec-9-enoic acid	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	282,46136		O1008, Sigma
Λινελαϊκό οξύ Linoleic acid	<i>cis-cis</i> - Δ ⁹ , Δ ¹² Δεκαοκταδιενικό οξύ (9 <i>Z</i> ,12 <i>Z</i>)-octadeca- 9,12-dienoic acid	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	280,445480		L1376, Sigma

Συνέχεια πίνακα 2.4

Λινολενικό οξύ Linolenic acid	όλο <i>cis</i> - Δ^9 , Δ^{12} , Δ^{15} , Δεκαοκτατριενικό οξύ (9Z,12Z,15Z)-octadeca- 9,12,15-trienoic acid	$C_{18}H_{30}O_2$	278,429600		L2376, Sigma
Αραχιδικό οξύ Arachidic acid	<i>n</i> - Εικοσανικό οξύ icosanoic acid	$C_{20}H_{40}O_2$	312,530400		A3631, Sigma
Αραχιδονικό οξύ Arachidonic acid	όλο <i>cis</i> - Δ^5 , Δ^8 , Δ^{11} , Δ^{14} Δεκαοκτατριενικό οξύ (5Z,8Z,11Z,14Z)-icosa- 5,8,11,14-tetraenoic acid	$C_{20}H_{32}O_2$	304,466880		A9673, Sigma
7- δεϋδροχοληστερόλη 7- Dehydrocholesterol προβιταμίνη D ₃ Provitamin D ₃	(3S,9S,10R,13R,14R,17R)- 10,13-dimethyl-17-[(2R)-6- methylheptan-2-yl]- -2,3,4,9,11,12,14,15,16,17- decahydro-1H-cyclopenta[a] phenanthren-3-ol	$C_{27}H_{44}O$	384,637660		30800, Sigma
Εργοστερόλη Ergosterol προβιταμίνη D ₂ Provitamin D ₂	(3S,9S,10R,13R,14R,17R)- 17-[(E,2R,5R)-5,6- dimethylhept- 3-en-2-yl]-10,13-dimethyl- 2,3,4,9,11,12,14,15,16,17- decahydro-1H-cyclopenta[a] phenanthren-3-ol	$C_{28}H_{44}O$	396,648360		45480, Sigma,

2.6 Γενετική μελέτη

2.6.1 Δεδομένα ακολουθιών

Έγινε αναζήτηση αμινοξικών αλληλουχιών της β-λακτοσφαιρίνης, στις βάσεις δεδομένων Swiss-Prot (Bairoch *et al.*, 2000) (<http://www.expasy.ch/sprot/>) και στη βάση δεδομένων πρωτεϊνικών ακολουθιών του NCBI (National Center for Biotechnology Information) των ΗΠΑ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>).

Στη βάση δεδομένων πρωτεϊνικών ακολουθιών Swiss-Prot –που ιδρύθηκε το 1986 και στις μέρες μας συντηρείται από το Ελβετικό Ινστιτούτο Βιοπληροφορικής (Swiss Institute of Bioinformatics) σε συνεργασία με το Ευρωπαϊκό Ινστιτούτο Βιοπληροφορικής (European Bioinformatics Institute)– οι ακολουθίες υφίστανται επεξεργασία και σχολιασμό (annotation), ενώ περιέχονται και διάφορες χρήσιμες πληροφορίες και συμπληρωματικά στοιχεία εκτός από την πιστοποιημένη αμινοξική ακολουθία, όπως βιβλιογραφικές αναφορές, γενικά στοιχεία δευτεροταγούς δομής, σύνδεσμοι σε άλλες βάσεις δεδομένων σχετικές με κάθε εγγραφή, καθώς και σημειώσεις για τη βιολογική λειτουργία (αν είναι γνωστή).

Η βάση δεδομένων Protein του NCBI είναι μια συλλογή αμινοξικών ακολουθιών που δημιουργείται από διάφορες πηγές. Από τις μεταφράσεις νουκλεοτιδικών εγγραφών των α) GenBank στο NCBI, β) EMBL (European Molecular Biology Laboratory) και γ) DDBJ (DNA DataBank of Japan), μέλη του INSDC (International Nucleotide Sequence Databases Collaboration), καθώς επίσης και ακολουθίες που προέρχονται από την περιοχή που κωδικοποιείται των RefSeq (Reference Sequences), που περιέχονται στη NCBI και εγγραφές από τη βάση δεδομένων τρίτου μέρους σχολιασμού TPA (Third Party Annotation) της NCBI. Ακόμη περιλαμβάνει ακολουθίες πρωτεϊνών-μόνο από εξωτερικές (εκτός της NCBI) πηγές δεδομένων, PIR (Protein Information Resource), Swiss-Prot και PRF (Protein Research Foundation). Τέλος περιλαμβάνει και τις πρωτεϊνικές ακολουθίες όπως έχουν εξαχθεί από τις δομικές εγγραφές της PDB (Protein Data Bank).

Στον **πίνακα 2.5** που ακολουθεί παρατίθενται οι αλληλουχίες που επιλέχθηκαν να μελετηθούν. Δίνονται για κάθε μία από τις αλληλουχίες ο κωδικός καταχώρησης, καθώς και η ονομασία εισαγωγής στη βάση δεδομένων Swiss-Prot, ο οργανισμός από τον οποίο προέρχεται και ο αριθμός των αμινοξέων της.

Πίνακας 2.5 Οι αμινοξικές αλληλουχίες της βάσης δεδομένων Swiss-Prot της πρωτεΐνης β-λακτοσφαιρίνης από τα είδη θηλαστικών που αναλύθηκαν.

Κωδικός καταχώρησης	Ονομασία εισαγωγής	Είδος	Αριθμός Αμινοξέων
B5B0D4	B5B0D4_BOVIN	<i>Bos taurus</i> (Αγελάδα, Bovine)	178
P02754	LACB_BOVIN	<i>B. taurus</i> (Αγελάδα, Bovine)	178
Q0PNH9	Q0PNH9_BUBBU	<i>Bubalus bubalis</i> (Βουβάλι, Domestic water buffalo)	178
C3W955	C3W955_BUBBU	<i>B. bubalis</i> (Βουβάλι, Domestic water buffalo)	180
P02755	LACB_BUBBU	<i>B. bubalis</i> (Βουβάλι, Domestic water buffalo)	180
Q00P86	Q00P86_RANTA	<i>Rangifer tarandus tarandus</i> (Τάρανδος, Reindeer)	180
P67975	LACB_OVIMU	<i>Ovis orientalis musimon</i> (Μουφλόν ασιατικό, Mouflon)	162
P67976	LACB_SHEEP	<i>O. aries</i> (Πρόβατο, Sheep)	180
P02756	LACB_CAPHI	<i>Capra hircus</i> (Αίγα, Goat)	180
P02758	LACB1_HORSE	<i>Equus caballus</i> (Ίππος, Horse)	180
P07380	LACB2_HORSE	<i>E. caballus</i> (Ίππος, Horse)	181
P19647	LACB2_EQUAS	<i>E. asinus</i> (Όνος, Donkey)	163
D6QX31	D6QX31_EQUAS	<i>E. asinus</i> (Όνος, Donkey)	181
D6QX32	D6QX32_EQUAS	<i>E. asinus</i> (Όνος, Donkey)	181
P13613	LACB1_EQUAS	<i>E. asinus</i> (Όνος, Donkey)	162
P21664	LACB2_FELCA	<i>Felis catus</i> (Γάτα, Cat) (<i>Felis silvestris catus</i>)	163
P33688	LACB3_FELCA	<i>F. catus</i> (Γάτα, Cat) (<i>Felis silvestris catus</i>)	162
P33687	LACB1_FELCA	<i>F. catus</i> (Γάτα, Cat) (<i>Felis silvestris catus</i>)	162
P33685	LACB1_CANFA	<i>Canis familiaris</i> (Σκύλος, Dog) (<i>Canis lupus familiaris</i>)	161
P33686	LACB2_CANFA	<i>C. familiaris</i> (Σκύλος, Dog) (<i>Canis lupus familiaris</i>)	161
P04119	LACB_PIG	<i>Sus scrofa</i> (Χοίρος, Pig)	178
Q7M2T0	Q7M2T0_TURTR	<i>Tursiops truncatus</i> (Δελφίνι του ατλαντικού, Atlantic bottle-nosed dolphin) (<i>Delphinus truncatus</i>)	131 fragment
Q29614	LACB_MACEU	<i>Macropus eugenii</i> (Ουάλαμπι, Tammar wallaby)	174
P11944	LACB_MACGI	<i>M. giganteus</i> (Καγκουρό, Eastern gray kangaroo)	155
Q29146	LACB_TRIVU	<i>Trichosurus vulpecula</i> (Πόσουμ, Brush-tailed possum)	174
O77511	O77511_PAPCY	<i>Papio cynocephalus</i> (Κίτρινος Μπαμπούνος, Κυνοκέφαλος, Yellow baboon)	186

2.6.2 Εργαλεία ανάλυσης ακολουθιών

2.6.2.1 Ομόλογες ακολουθίες

Η αναζήτηση ομόλογων ακολουθιών έγινε με χρήση του προγράμματος BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul *et al.*, 1990) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

Ο αλγόριθμος BLAST χρησιμοποιείται για τη σύγκριση μίας ακολουθίας με ακολουθίες που περιέχονται σε μία βάση δεδομένων, έχει αρχικά αναπτυχθεί και διατηρείται από το NCBI (National Center for Biotechnology Information) αλλά λόγω του ότι διατίθεται ελεύθερα, υπάρχουν εκδόσεις του και σε άλλες αντίστοιχες βάσεις. Υπάρχουν πολλές παραλλαγές του προγράμματος (blastn, blastp, blastx, tblastn, tblastx, tblastn², BLAST2, MEGABLAST, PSI-BLAST, PHI-BLAST, RPS-BLAST κ.λ.π.), οι οποίες εκτελούν διαφορετικές εργασίες, π.χ. το blastp συγκρίνει μία αμινοξική ακολουθία με εκείνες που περιέχονται σε μία βάση δεδομένων πρωτεϊνικών ακολουθιών (σύγκριση πρωτεΐνης με πρωτεΐνες).

2.6.2.2 Πολλαπλή ευθυγράμμιση ακολουθιών

Η πολλαπλή στοίχιση αμινοξικών ακολουθιών αποτελεί ένα σημαντικό εργαλείο για τη μελέτη των πρωτεϊνών, καθώς παρέχει πληροφορίες σχετικά με μοτίβα (ομάδες) συντηρημένων καταλοίπων που θεωρούνται σημαντικά για τη σταθερότητα της δομής των πρωτεϊνών και τη λειτουργία τους. Οι ιεραρχικές μέθοδοι πολλαπλής στοίχισης, όπως το πρόγραμμα CLUSTALW που αναπτύχθηκε στο EBI (European Bioinformatics Institute), αποτελούν μία πρακτική προσέγγιση που δίνει ακριβή αποτελέσματα.

Βάσει των ανά δύο ευθυγραμμίσεων των υπό εξέταση ακολουθιών, το πρόγραμμα CLUSTALW υπολογίζει ένα μέτρο της ομοιότητάς τους (γενετική απόσταση) και χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Neighbor-Joining κατασκευάζει ένα δέντρο οδηγό (guide tree) τοποθετώντας πιο κοντά τις ακολουθίες με τη μεγαλύτερη ομοιότητα. Τα ζεύγη των πλησιέστερων ακολουθιών ευθυγραμμίζονται με τη χρήση δυναμικού προγραμματισμού και οι ευθυγραμμίσεις που προκύπτουν στοιχίζονται με άλλες

ευθυγραμμίσεις ή άλλες ακολουθίες σύμφωνα με το δέντρο-οδηγό και μέχρι να δημιουργηθεί η πλήρης πολλαπλή στοίχιση. Κενά που υπάρχουν σε μία ευθυγράμμιση διατηρούνται στις ευθυγραμμίσεις που ακολουθούν. Το CLUSTALW χρησιμοποιεί διαφορετικούς πίνακες υποκατάστασης βάσει της αναμενόμενης απόστασης των ακολουθιών και διαφορετικές ποινές για την εισαγωγή κενών βάσει της θέσης τους (η εισαγωγή ενός κενού δίπλα σε ένα συντηρημένο υδρόφοβο κατάλοιπο ή πολύ κοντά σε ένα άλλο κενό συνεπάγεται μεγαλύτερη ποινή) και επιτρέπει τη χρήση πληροφορίας σχετικά με τη δευτεροταγή δομή των πρωτεϊνών για την εισαγωγή των κενών. Δεδομένης της προσπάθειας ρύθμισης των παραμέτρων του CLUSTALW για ένα ευρύ φάσμα προβλημάτων πολλαπλής ευθυγράμμισης, τα αποτελέσματά του είναι κατά μέσο όρο συγκρίσιμα με εκείνα άλλων μεθόδων που επιχειρούν την εύρεση της μαθηματικά βέλτιστης στοίχισης.

Οι αλληλουχίες ευθυγραμμίστηκαν με τη χρήση του προγράμματος πολλαπλής ευθυγράμμισης CLUSTALW Multiple Sequence Alignment Program (Larkin *et al.*, 2007) (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/>), με τις προεπιλεγμένες παραμέτρους ποινή εμφάνισης κενού (gap open penalty): 10,0, ποινή επέκτασης κενού (protein gap extension penalty): 0,2 και πίνακας υποκαταστάσεων: Gonnet.

2.6.2.3 Πρόγραμμα GenDoc

Ακολούθησε η οπτικοποίηση της ευθυγράμμισης των αλληλουχιών, με χρήση του προγράμματος GenDoc (Nicholas *et al.*, 1997) (<http://www.nrbsc.org/gfx/genedoc>).

Το πρόγραμμα GenDoc δίνει τη δυνατότητα μορφοποίησης ευθυγραμμισμένων αμινοξικών αλληλουχιών, όπως έχουν προκύψει μετά τη χρήση προγραμμάτων ευθυγράμμισης. Μπορεί να γίνει οπτικοποίηση για παράδειγμα με χρωματισμό των καταλοίπων, βάση των φυσικοχημικών τους ιδιοτήτων.

2.7 Δομική μελέτη

2.7.1 Δεδομένα τρισδιάστατων δομών

Ανακτήθηκαν όλες οι δομές της β -λακτοσφαιρίνης και συμπλόκων της από τη βάση δεδομένων RCSB (Research Collaboratory for Structural Bioinformatics) PDB (Protein Data Bank) (Berman *et al.*, 2000) (<http://www.pdb.org>).

Η PDB αποτελεί τη μοναδική βάση δεδομένων παγκοσμίως όπου είναι κατατεθειμένες οι τρισδιάστατες δομές βιολογικών μακρομορίων. Ιδρύθηκε το 1971 στα BNL (Brookhaven National Laboratories) των ΗΠΑ και αρχικά περιελάμβανε 7 δομές μακρομορίων όπως αυτές προέκυψαν από κρυσταλλογραφικές μελέτες. Ο ρυθμός αύξησης των εγγραφών στη δεκαετία του '70 ήταν πολύ μικρός. Από το 1980 και μετά λόγω της τεχνολογικής εξέλιξης σε κάθε στάδιο του προσδιορισμού δομών ο ρυθμός προσθήκης δεδομένων στη βάση αυξήθηκε δραματικά. Πλέον περιλαμβάνονται και δομές όπως προκύπτουν με φασματοσκοπία Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR). Σήμερα (Οκτώβριος 2010), η PDB περιλαμβάνει 68840 δομές βιομορίων. Οι εγγραφές στη βάση εκτός από τις συντεταγμένες των ατόμων που απαρτίζουν τη δομή περιλαμβάνουν και επιπρόσθετα βοηθητικά στοιχεία όπως βιβλιογραφικές αναφορές, λεπτομέρειες για τον προσδιορισμό της δομής καθώς και άλλα στοιχεία που προκύπτουν από τη συγκεκριμένη δομή. Κάθε δομή προτού διατεθεί στο κοινό υφίσταται έλεγχο για την ορθότητά της με τη χρήση ειδικού λογισμικού. Στη συνέχεια εφόσον περάσει τις δοκιμές με επιτυχία αποκτά ένα χαρακτηριστικό κωδικό και προστίθεται στη βάση.

Στον **πίνακα 2.6** παρατίθενται οι δομές που επιλέχθηκαν να μελετηθούν. Δίνεται ο κωδικός καταχώρησης της δομής στη βάση δεδομένων PDB (PDB ID), ο οργανισμός από τον οποίο προέρχεται, το υπόστρωμα -αν υπάρχει- το pH, η υψηλότερη διακριτικότητα (resolution) των πειραματικών δεδομένων που οδήγησαν στον προσδιορισμό της τρισδιάστατης δομής σε Å και η βιβλιογραφική αναφορά.

Πίνακας 2.6 Οι δομές στη βάση δεδομένων RCSB PDB της β-λακτοσφαιρίνης και συμπλόκων της από τα είδη θηλαστικών που μελετήθηκαν.

PDB ID	Είδος	Υπόστρωμα	pH	Διακριτικότητα (Å)	Βιβλιογραφική Αναφορά
3NPO	<i>Bos taurus</i> (Αγελάδα, Bovine)		7,5	2.20	Loch <i>et al.</i> , 2010
3NQ3	<i>B. taurus</i> (Αγελάδα, Bovine)	Capric acid	7,5	1.90	Loch <i>et al.</i> , 2010
3NQ9	<i>B. taurus</i> (Αγελάδα, Bovine)	Caprylic acid	7,5	1.90	Loch <i>et al.</i> , 2010
2GJ5	<i>B. taurus</i> (Αγελάδα, Bovine)	Vitamin D3 (VD3)	7,5	2.40	Yang <i>et al.</i> , 2008
1GX8	<i>B. taurus</i> (Αγελάδα, Bovine)	Retinol (RTL)	7,3	2.40	Kontopidis <i>et al.</i> , 2002
1GX9	<i>B. taurus</i> (Αγελάδα, Bovine)	Retinoic acid (REA)	7,3	2.34	Kontopidis <i>et al.</i> , 2002
1GXA	<i>B. taurus</i> (Αγελάδα, Bovine)	Palmitic acid (PLM)	7,3	2.35	Kontopidis <i>et al.</i> , 2002
1B00	<i>B. taurus</i> (Αγελάδα, Bovine)	Palmitic acid (PLM)	7,5	2.50	Wu <i>et al.</i> , 1999
1BSO	<i>B. taurus</i> (Αγελάδα, Bovine)	12-bromododecanoic acid (BRC)	7,3	2.23	Qin <i>et al.</i> , 1998
1YUP	<i>Rangifer tarandus tarandus</i> (Τάρανδος, Reindeer)		6,0	2.10	Oksanen <i>et al.</i> , 2006
1EXS	<i>Sus scrofa</i> (Χοίρος, Pig)		3,2	2.39	Hoedemaeker <i>et al.</i> , 2002

2.7.2 Δομική στοίχιση

Οι αλγόριθμοι που χρησιμοποιήθηκαν αρχικά για τη σύγκριση πρωτεϊνικών δομών βασίζονταν στην *a priori* στοίχιση των αμινοξικών ακολουθιών των υπό σύγκριση τρισδιάστατων δομών ή περιορίζονταν σε δομές με μεγάλη αμινοξική ομοιότητα. Σήμερα, υπάρχουν αυτόματες μέθοδοι δομικής στοίχισης που χρησιμοποιούνται από διάφορα υπολογιστικά πακέτα προγραμμάτων και χρησιμοποιούν διαφορετικές αναπαραστάσεις της δομής, μέτρα δομικής ομοιότητας και αλγορίθμους βελτιστοποίησης και εφαρμόζονται για την αναζήτηση μιας δομής έναντι μιας βάσης δεδομένων ταξινόμησης πρωτεϊνικών δομών ή για τη σύγκριση δύο πρωτεϊνών.

Παρά την ύπαρξη διαφόρων κριτηρίων αξιολόγησης της υπέρθεσης δύο δομών A και B, η μέση τετραγωνική απόκλιση (Root Mean Square, RMS) παραμένει το κύριο μέτρο περιγραφής της δομικής ομοιότητας μεταξύ δύο πρωτεϊνών. Έχουν προταθεί δύο είδη RMS αποκλίσεων:

Η *cRMS* απόκλιση ορίζεται ως:

$$cRMS = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (\|x_i - y_i\|^2)}$$

όπου,

N είναι ο αριθμός των ατόμων που στοιχίζονται στις δύο δομές και x_i, y_i οι συντεταγμένες του ατόμου i στις δομές A και B, αντίστοιχα.

Η *dRMS* απόκλιση ορίζεται ως:

$$dRMS = \sqrt{\frac{1}{N(N-1)} \sum_{i=1}^{N-1} \sum_{j=i+1}^N (d_{ij}^A - d_{ij}^B)^2}$$

όπου,

d_{ij}^A και d_{ij}^B είναι οι αποστάσεις μεταξύ των ατόμων i και j στις δομές A και B αντίστοιχα.

2.7.2.1 Πρόγραμμα δομικής σύγκρισης MATRAS

Η δομική σύγκριση των κρυσταλλογραφικά προσδιορισμένων δομών της β -λακτοσφαιρίνης πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του προγράμματος MATRAS (Kawabata, 2003 και Kawabata *et al.*, 2000) (<http://biunit.naist.jp/matras/>).

Κατά τη σύγκριση τρισδιάστατων δομών με τη μέθοδο MATRAS, η τιμή της δομικής ομοιότητας (S , structure similarity score) προκύπτει βάσει ενός μοντέλου εξάρτησης Markov και βασίζεται στον ακόλουθο τύπο:

$$S(i, j) = \log \frac{P(i \rightarrow j)}{P(j)}$$

όπου,

i και j είναι οι καταστάσεις των συγκεκριμένων δομικών στοιχείων,

$P(j)$ είναι η πιθανότητα η κατάσταση j να εμφανίζεται τυχαία και

$P(i \rightarrow j)$ είναι η πιθανότητα η κατάσταση i να αλλάζει σε κατάσταση j κατά τη διάρκεια της εξέλιξης.

Ο ορισμός της τιμής δομικής ομοιότητας μοιάζει με αυτόν της υποκατάστασης αμινοξέων του μοντέλου Dayhoff. Η ευθυγράμμιση γίνεται με ιεραρχική μέθοδο πολλαπλής ευθυγράμμισης ευριστικού αλγορίθμου, κατά την οποία τα στοιχεία της δευτεροταγούς δομής (SSES, secondary structure elements) ευθυγραμμίζονται πρώτα και στη συνέχεια, ευθυγράμμιση βασισμένη σε ένα κατάλοιπο εκτελείται επαναληπτικά με χρήση της προηγούμενης ευθυγράμμισης.

2.7.3 Πρόγραμμα απεικόνισης PyMOL

Πραγματοποιήθηκε απεικόνιση των δομών με χρήση του προγράμματος PyMOL (<http://www.pymol.org>) (DeLano, 2008).

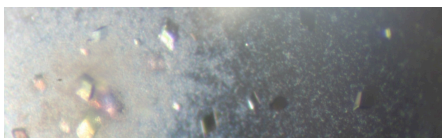
Το PyMOL αποτελεί ένα εργαλείο απεικόνισης για χρήση σε μελέτες δομικής βιολογίας το οποίο παράγει υψηλής ποιότητας τρισδιάστατες εικόνες μικρών μορίων και βιολογικών μακρομορίων.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Κρυστάλλωση

Οι συνθήκες στις οποίες μπορεί να επιτευχθεί η κρυστάλλωση της φυσικής β-λακτοσφαιρίνης (native β-lactoglobulin) είναι ήδη γνωστές από τη βιβλιογραφία. Οι συνθήκες κρυστάλλωσης που επιλέχθηκαν αρχικά οδήγησαν στον κατά προσέγγιση προσδιορισμό συνθηκών και ακολούθησαν δοκιμές για να εντοπιστούν οι βέλτιστες συνθήκες κρυστάλλωσης για το συγκεκριμένο πείραμα, τόσο για τη βελτίωση της ποιότητας όσο και της μορφολογίας των κρυστάλλων. Τα πειράματα κρυστάλλωσης έγιναν με τη μέθοδο της διάχυσης ατμών (vapor diffusion) και τις τεχνικές της κρεμάμενης σταγόνας (hanging drop) και της επικαθήμενης σταγόνας (sitting drop). Σε συνθήκες ανάπτυξης pH 7,3 με ρυθμιστικό διάλυμα 0,1M HEPES και συγκέντρωση καταβυθιστή 2,6M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ σε θερμοκρασία επώασης 18°C, κρύσταλλοι (**εικόνα 3.1**) εμφανίστηκαν την τρίτη ημέρα και έφθασαν στο τελικό τους μέγεθος (διαστάσεις περίπου 0,2mm x 0,2mm x 0,35mm), μετά την πάροδο σχεδόν δύο εβδομάδων. Είχαν σχήμα ρόμβου, χωρίς να παρουσιάζουν ατέλειες στις ακμές τους (**εικόνα 3.2**). Οι κρύσταλλοι που αναπτύχθηκαν σε αυτές τις συνθήκες ήταν απλοί μονοκρύσταλλοι και κατ' επέκταση κρύσταλλοι χρήσιμοι για κρυσταλλογραφική μελέτη τους με ακτίνες-X. Η παρατήρηση των κρυστάλλων που σχηματίστηκαν έγινε σε στερεομικροσκόπιο. Ο έλεγχος των αποτελεσμάτων των κρυσταλλώσεων έγινε στις 48 ώρες, 3 ημέρες, 5 ημέρες, 7 ημέρες, 10 ημέρες, 15 ημέρες και μετά ακολούθησε η παρατήρησή τους ανά εβδομάδα. Σε συνθήκες ανάπτυξης pH 7,7 με ρυθμιστικό διάλυμα 0,1M Tris και συγκέντρωση καταβυθιστή 2,5M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ σε θερμοκρασία επώασης 18°C, παρατηρήθηκε ο σχηματισμός περισσότερων πυρήνων κρυστάλλωσης (**εικόνα 3.3**).

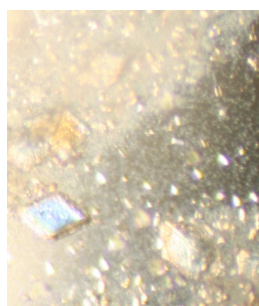
Τα πειράματα κρυστάλλωσης πραγματοποιήθηκαν με απώτερο στόχο τον προσδιορισμό της δομής με κρυσταλλογραφία ακτίνων-X.



Εικόνα 3.1 Κρύσταλλοι β -λακτοσφαιρίνης, (σε συνθήκες ανάπτυξης 2,6M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,1M HEPES, pH 7,3 με τη μέθοδο της κρεμάμενης σταγόνας, θερμοκρασία επώασης 18°C).



Εικόνα 3.2 Κρύσταλλος β -λακτοσφαιρίνης, φωτογραφία χωρίς χρήση πολωτή φωτός (συνθήκες ανάπτυξης 2,6M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,1M HEPES, pH 7,3 με τη μέθοδο της κρεμάμενης σταγόνας, σε θερμοκρασία επώασης 18°C, διαστάσεις κρυστάλλου 0,16mm x 0,16mm x 0,25mm).



Εικόνα 3.3 Κρύσταλλοι β -λακτοσφαιρίνης. Σχηματισμός πυρήνων κρυστάλλωσης (σε συνθήκες pH 7,7 με ρυθμιστικό διάλυμα 0,1M Tris και συγκέντρωση καταβυθιστή 2,5M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ σε θερμοκρασία επώασης 18°C).

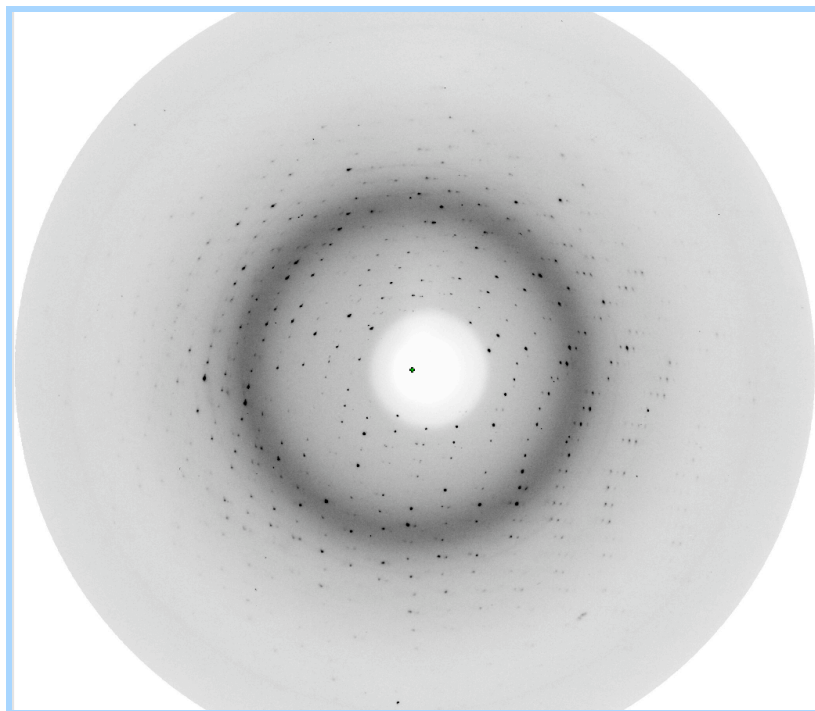
3.2 Κρυσταλλογραφία

Η συλλογή δεδομένων περίθλασης από κρυστάλλους της β -λακτοσφαιρίνης, πραγματοποιήθηκε από μέλη του εργαστηρίου Φυσικής στο σύγχροτρον (Synchrotron) DESY, Δακτύλιος DORIS III, του ινστιτούτου EMBL που βρίσκεται στο Αμβούργο της Γερμανίας, στη γραμμή ακτινοβολίας (beamline) X13, (μήκος κύματος προσπίπτουσας ακτινοβολίας $\lambda=0,8123\text{\AA}$) (Πίνακας 3.1).

Πίνακας 3.1 Χαρακτηριστικά της γραμμής ακτινοβολίας στο σύγχροτρον DESY.

Synchrotron DESY/EMBL/Αμβούργο Δακτύλιος DORIS III	
Γραμμή Ακτινοβολίας	X13
Μήκος Κύματος Προσπίπτουσας Ακτινοβολίας (λ)	0,81 \AA
Ανιχνευτής	Image plate MAR CCD 165mm

Τα δεδομένα καταγράφηκαν σε ανιχνευτή δίσκου ειδώλου (imaging plate) της MAR Research με διάμετρο 165mm. Η απόσταση του ανιχνευτή από τον κρύσταλλο ήταν 184 mm. Καταγράφηκαν 105 εικόνες περίθλασης (**εικόνα 3.4**), με υψηλότερη διακριτική ικανότητα 1,96 \AA (data, high resolution limit), που προήλθαν από συνολική περιστροφή του κρυστάλλου κατά 105° με βήμα 1°. Η συλλογή δεδομένων έγινε σε θερμοκρασία 100 K σε ρεύμα αζώτου. Ο κρύσταλλος είχε αναπτυχθεί σε pH 7,3 με ρυθμιστικό διάλυμα 0,1M HEPES 2,6M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, θερμοκρασία επώασης 18°C και είχε διαστάσεις περίπου 0,2mm x 0,2mm x 0,35mm.



Εικόνα 3.4 Πρότυπο περίθλασης κρυστάλλου β -λακτοσφαιρίνης, που μετρήθηκε στους 100K, στη γραμμή ακτινοβολίας X13 (DESY/EMBL/Αμβούργο).

3.2.1 Αρχική επεξεργασία των δεδομένων

Η ολοκλήρωση των μεγίστων περίθλασης και η αναγωγή τους σε κοινή κλίμακα έγινε με το πρόγραμμα MOSFLM. Είναι ένα πρόγραμμα για την επεξεργασία δεδομένων περίθλασης, από μια ευρεία ποικιλία σύγχρονων ανιχνευτών, π.χ. από Mar Research, Rigaku/MSD, ADSC, DIP κ.λπ.

Στον **πίνακα 3.2** παρουσιάζονται τα στατιστικά αποτελέσματα από την επεξεργασία των πειραματικών δεδομένων περίθλασης. Οι διαστάσεις της μοναδιαίας κυψελίδας είναι $a=b=53,16\text{\AA}$, $c=112,28\text{\AA}$ $\alpha=\beta=90^\circ$, $\gamma=120^\circ$. Πιθανή ομάδα χώρου είναι η $P3_221$, που ανήκει στο τριγωνικό κρυσταλλικό σύστημα. Δεν υπάρχουν συστηματικές απουσίες στο διάγραμμα περίθλασης στην ομάδα συμμετρίας χώρου (Hahn, 1983, International Tables for Crystallography, Vol A).

Οι δείκτες είναι καλοί και το R-merge είναι ικανοποιητικό. Υπολογίζεται, όμως, υψηλή τιμή της μωσαϊκότητας του κρυστάλλου (1,17). Η πληρότητα των δεδομένων στο σύνολο της παρατηρηθείσας διακριτικότητας είναι χαμηλή (78,5%), εξαιτίας του περιορισμένου αριθμού εικόνων περίθλασης που ελήφθησαν και επομένως τα δεδομένα δεν θεωρούνται ικανοποιητικά για τον πλήρη και ακριβή προσδιορισμό της τρισδιάστατης κρυσταλλικής δομής. Τα δεδομένα αυτά χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση της σκεδαστικής ικανότητας του κρυστάλλου και για προκαταρκτική μελέτη της δομής.

Πίνακας 3.2 Στατιστικά αποτελέσματα της επεξεργασίας των δεδομένων περίθλασης με το πρόγραμμα MOSFLM

Πειραματικά δεδομένα			
	Συνολικά	Εσωτερικός φλοιός	Εξωτερικός φλοιός
Όριο χαμηλής διακριτικότητας:	29,04	29,04	2,06
Όριο υψηλής διακριτικότητας:	1,96	6,19	1,96
Συντελεστής Συγχώνευσης (Rmerge)	0,062	0,036	0,425
Rmerge in top intensity bin	0,033	-	-
Rmeas (within I+/I-)	0,072	0,043	0,499
Rmeas (all I+ & I-)	0,074	0,054	0,496
Rrim (within I+/I-)	0,036	0,024	0,255
Rrim (all I+ & I-)	0,029	0,024	0,201
Fractional partial bias	-0,025	-0,026	-0,129
Συνολικός αριθμός ανακλάσεων	62442	2386	4047
Αριθμός ανεξαρτήτων ανακλάσεων	10926	478	844
Mean(I)/sd(I)	11,1	19,2	3,3
Πληρότητα %	78,5	93,2	43,1
Πολλαπλότητα	5,7	5,0	4,8
Διαστάσεις μοναδιαίας κυψελίδας:	a=53,16 Å b=53,16 Å c=112,28 Å	α= 90,00° β= 90,00° γ=120,00°	
Ομάδα συμμετρίας χώρου:	P3 ₂ 21		
Μωσαϊκότητα:	1,17		
Minimum and maximum SD correction factors: Partial	0,76 911,14		
Μέγιστη Διακριτικότητα:	1,96 Å		

3.3 Γενετική και δομική μελέτη της θέσης δέσμευσης (binding site)

Η πολλαπλή στοίχιση των αμινοξικών ακολουθιών, με τη χρήση του προγράμματος CLUSTALW παρουσιάζεται στον **πίνακα 3.3**, η οπτικοποίηση της ευθυγράμμισης των αλληλουχιών έγινε με χρήση του προγράμματος GenDoc. Η αρίθμηση των αμινοξικών καταλοίπων που ακολουθεί αντιστοιχεί στη θέση τους στην πρωτεϊνική ακολουθία μετά την αποκοπή του πεπτιδίου οδηγού, όπως έχει παρουσιαστεί στο σχήμα 1.4 και η ονομασία τους δίνεται για τον αλληλόμορφο Β της αγελαδινής BLG. Τα αμινοξέα δίνονται με διαφορετικό χρώμα γραμματοσειράς ως ακολούθως: με κόκκινο, τα όξινα αμινοξέα (E ή Glu, D ή Asp) τα οποία είναι αρνητικά φορτισμένα, με μπλε τα βασικά αμινοξέα (K ή Lys, R ή Arg, H ή His) τα οποία είναι θετικά φορτισμένα, με πράσινο τα πολικά αμινοξέα (N ή Asn, Q ή Gln, S ή Ser, T ή Thr, Y ή Tyr), με μαύρο όλα τα υπόλοιπα μη πολικά αμινοξέα (A ή Ala, V ή Val, L ή Leu, I ή Ile, P ή Pro, F ή Phe, M ή Met, W ή Trp, G ή Gly, C ή Cys).

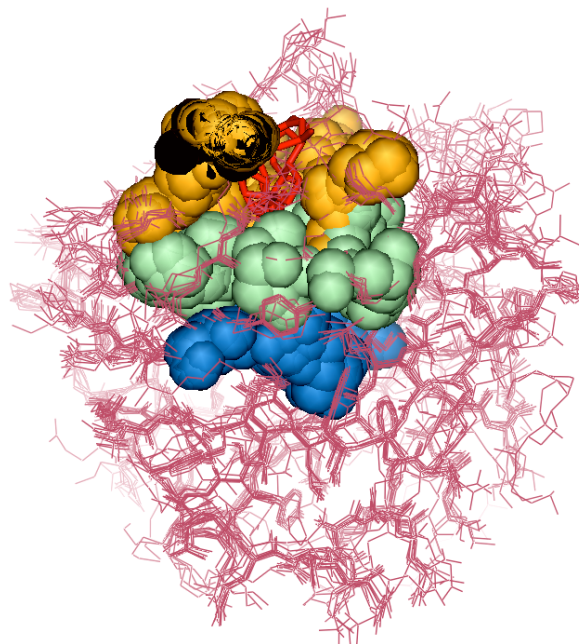
Η δομική σύγκριση των κρυσταλλογραφικά προσδιορισμένων δομών της β-λακτοσφαιρίνης πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του προγράμματος MATRAS. Αναγνωρίστηκαν τα αμινοξικά κατάλοιπα της β-λακτοσφαιρίνης της περιοχής της κύριας θέσης δέσμευσης, στον κάλυκα. Η δομική υπέρθεση των μονομερών κρυσταλλικών δομών της β-λακτοσφαιρίνης που επιλέχθησαν να μελετηθούν δίνεται στην **εικόνα 3.5** καθώς και στην **εικόνα 3.6** στις οποίες αποκαλύπτονται τα αμινοξικά κατάλοιπα που μετέχουν στην κοιλότητα δέσμευσης.

Τα αμινοξικά κατάλοιπα ανήκουν σε τρεις ζώνες. Η ζώνη I εσωτερικά στο βάθος του κάλυκα χρωματίζεται με γαλάζιο, η ζώνη II ενδιάμεσα με πράσινο και η ζώνη III εξωτερικά με πορτοκαλί. Με κόκκινο χρωματίζονται τα υποστρώματα. Στην **εικόνα 3.7** δίνεται ένα χωροπληρωτικό μοντέλο της β-λακτοσφαιρίνης που παρουσιάζεται η κοιλότητα δέσμευσης. Οι τρεις ζώνες του κάλυκα υποδεικνύονται στον **πίνακα 3.3** με διαφορετικό χρώμα στο φόντο, γαλάζιο για τη βαθύτερη ζώνη I, πράσινο για την ενδιάμεση ζώνη II και πορτοκαλί για την εξωτερική ζώνη III.

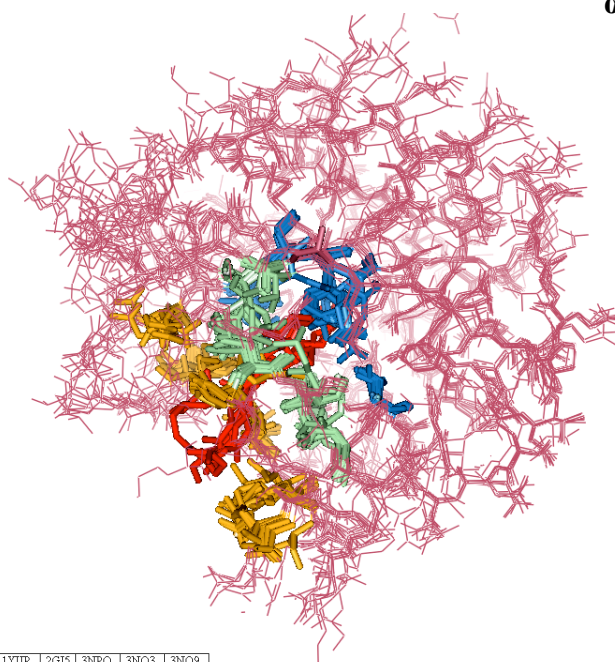
Πίνακας 3.3 Πολλαπλή ευθυγράμμιση των αλληλουχιών, με χρήση του προγράμματος CLUSTALW.

F02754	<i>Bos taurus</i>	L I V T Q T M K G L D I Q K V A G T W Y S L A M A A S D I S L L D A Q S A P L R V Y V E	44
B5B0D4	<i>Bos taurus</i>	L I V T Q T M K G L D I Q K V A G T W Y S L A M A A S D I S L L D A Q S A P L R V Y V E	44
Q0FNH9	<i>Bubalus bubalis</i>	I I V T Q T M K G L D I Q K V A G T W Y S L A M A A S D I S L L D A Q S A P L R V Y V E	44
C3W955	<i>Bubalus bubalis</i>	I I V T Q T M K G L D I Q K V A G T W Y S L A M A A S D I S L L D A Q S A P L R V Y V E	44
F02755	<i>Bubalus bubalis</i>	I I V T Q T M K G L D I Q K V A G T W Y S L A M A A S D I S L L D A Q S A P L R V Y V E	44
Q00P86	<i>Rangifer tarandus tarandus</i>	I I V T Q T M K D L D V Q K V A G T W Y S L A M A A S D I S L L D A Q S A P L R V Y V E	44
F67975	<i>Ovis orientalis musimon</i>	I I V T Q T M K G L D I Q K V A G T W H S L A M A A S D I S L L D A Q S A P L R V Y V E	44
F67976	<i>Ovis aries</i>	I I V T Q T M K G L D I Q K V A G T W H S L A M A A S D I S L L D A Q S A P L R V Y V E	44
F02756	<i>Capra hircus</i>	I I V T Q T M K G L D I Q K V A G T W Y S L A M A A S D I S L L D A Q S A P L R V Y V E	44
F02758	<i>Equus caballus</i>	T N I P Q T M Q D L D L Q E V A G K W H S V A M A A S D I S L L D S E S A P L R V Y V E	44
F07380	<i>Equus caballus</i>	T D I P Q T M Q D L D L Q E V A G R W H S V A M V A S D I S L L D S E S V P L R V Y V E	44
F13613	<i>Equus asinus</i>	T N I P Q T M Q D L D L Q E V A G K W H S V A M A A S D I S L L D S E E A P L R V Y I E	44
D6QX31	<i>Equus asinus</i>	T D I P Q T M Q D L D L Q E V A G R W H S V A M V A S D I S L L D S E S A P L R V Y V E	44
F19647	<i>Equus asinus</i>	T D I P Q T M Q D L D L Q E V A G R W H S V A M V A S D I S L L D S E S A P L R V Y V E	44
D6QX32	<i>Equus asinus</i>	T D I P Q T M Q D L D L Q E V A G R W H S V A M V A S D I S L L D S E S A P L R V Y V E	44
E21664	<i>Felis catus</i>	A T L P P T M E D L D L Q K V A G T W H S M A M A A S D I S L L D S E T A P L R V Y I Q	44
F33688	<i>Felis catus</i>	A T V P L T M D G L D L Q K V A G T W H S M A M A A S D I S L L D S E Y A P L R V Y V Q	44
F33687	<i>Felis catus</i>	A T V P L T M D G L D L Q K V A G M W H S M A M A A S D I S L L D S E T A P L R V Y V Q	44
F33685	<i>Canis familiaris</i>	I V P R T M E D L D L Q K V A G T W H S M A M A A S D I S L L D S E T A P L R V Y I Q	44
F33686	<i>Canis familiaris</i>	I V I P R T M E D L D L Q K V A G T W H S M A M A A S D I S L L D S E T A P L R V Y I Q	44
F04119	<i>Sus scrofa</i>	V E V T P I M T E L D T Q K V A G T W H T V A M A V S D V S L L D A K S S P L K A Y V E	44
Q7M2T0	<i>Tursiops truncatus</i>	V S V I R T M E D L D I Q R V A G T W H S V A M A A S D I S L L D T E E A P L R V N V E	44
Q29614	<i>Macropus eugenii</i>	V E N I R S K N D L G V E K F V G S W Y L R E A A K T - - - - M E F S I P L F D M D I K	40
F11944	<i>Macropus giganteus</i>	V E N I R S K N D L G V E K F V G S W Y L R E A A K T - - - - M E F S I P L F D M D I K	40
Q29146	<i>Trichosurus vulpecula</i>	I E N I H S K E E L V E K K L I G P W Y R V E E A K A - - - - M E F S I P L F D M N I K	40
O77511	<i>Papio cynocephalus</i>	I N S P Q T M Q D V E L P K L A G T W H S M A M A A S D F S L L E T K E A P L R I Y I S	44

F02754	<i>Bos taurus</i>	E L K P T P E G D L E I L L Q K W - - - - - - - - E N G E C A Q K K I I A E K T K I P A	80
B5B0D4	<i>Bos taurus</i>	E L K P T P E G D L E I L L Q K W - - - - - - - - E N D E C A Q K K I I A E K T K I P A	80
Q0FNH9	<i>Bubalus bubalis</i>	E L K P T P E G D L E I L L Q K W - - - - - - - - E N G E C A Q K K I I A E K T K I P A	80
C3W955	<i>Bubalus bubalis</i>	E L K P T P E G D L E I L L Q K W - - - - - - - - E N G E C A Q K K I I A E K T K I P A	80
F02755	<i>Bubalus bubalis</i>	E L K P T P E G D L E I L L Q K W - - - - - - - - E N G E C A Q K K I I A E K T K I P A	80
Q00P86	<i>Rangifer tarandus tarandus</i>	E L K P T P G G D L E I L L Q K W - - - - - - - - E N G K C A Q K K I I A E K T E I P A	80
F67975	<i>Ovis orientalis musimon</i>	E L K P T P E G N L E I L L Q K W - - - - - - - - E N G E C A Q K K I I A E K T K I P A	80
F67976	<i>Ovis aries</i>	E L K P T P E G N L E I L L Q K W - - - - - - - - E N G E C A Q K K I I A E K T K I P A	80
F02756	<i>Capra hircus</i>	E L K P T P E G N L E I L L Q K W - - - - - - - - E N G E C A Q K K I I A E K T K I P A	80
F02758	<i>Equus caballus</i>	K L R P T P E D N L E I I L R E G - - - - - - - - E N K G C A E K K I F A E K T E S P A	80
F07380	<i>Equus caballus</i>	E L R P T P E G N L E I I L R E G - - - - - - - - A N H A C V E R N I V A Q K T E D P A	80
F13613	<i>Equus asinus</i>	K L R P T P E D N L E I I L R E G - - - - - - - - E N K G C A E K K I F A E K T E S P A	80
D6QX31	<i>Equus asinus</i>	E L R P T P E G N L E I I L R E G - - - - - - - - A N H V C V E R N I V A Q K T E D P A	80
F19647	<i>Equus asinus</i>	E L R P T P E G N L E I I L R E G - - - - - - - - A N H V C V E R N I V A Q K T E D P A	80
D6QX32	<i>Equus asinus</i>	E L R P T P E G N L E I I L R E G - - - - - - - - A N H V C V E R N I V A Q K T E D P A	80
E21664	<i>Felis catus</i>	E L R P T P R D N L E I I L R K R - - - - - - - - E N H A C I E G N I M A Q R T E D P A	80
F33688	<i>Felis catus</i>	E L R P T P R D N L E I I L R K W - - - - - - - - E Q K R C V Q K K I L A Q K T E L P A	80
F33687	<i>Felis catus</i>	E L R P T P R D N L E I I L R K W - - - - - - - - E D N R C V E K K V L A E K T E C A A	80
F33685	<i>Canis familiaris</i>	E L R P T P Q D N L E I V L R K W - - - - - - - - E D G R C A E Q K V L A E K T E V P A	80
F33686	<i>Canis familiaris</i>	E L R P T P Q D N L E I V L R K W - - - - - - - - E D N R C V E K K V F A E K T E L A A	80
F04119	<i>Sus scrofa</i>	G L K P T P E G D L E I L L Q K R - - - - - - - - E N D K C A Q E V L L A K K T D I P A	80
Q7M2T0	<i>Tursiops truncatus</i>	E L R P T P Q G D L E I F L Q K - E K T E I P A	67
Q29614	<i>Macropus eugenii</i>	E V N L T P E G N L E L V L L E K - - - - - - - - - - A D R C V E K K L L L K K T Q K P T	75
F11944	<i>Macropus giganteus</i>	E V N L T P E G N L E L V L L E K - - - - - - - - - - T D R C V E K K L L L K K T K K P T	75
Q29146	<i>Trichosurus vulpecula</i>	E V N R T P E G N L E I V L E Q - - - - - - - - - - T D S C V E K K F L L K K T E K P A	75
O77511	<i>Papio cynocephalus</i>	S L Q P T P E G N L E I V L R R W S Q K Q S P F R D S N Q C I E E K I A E K T E N P I	88



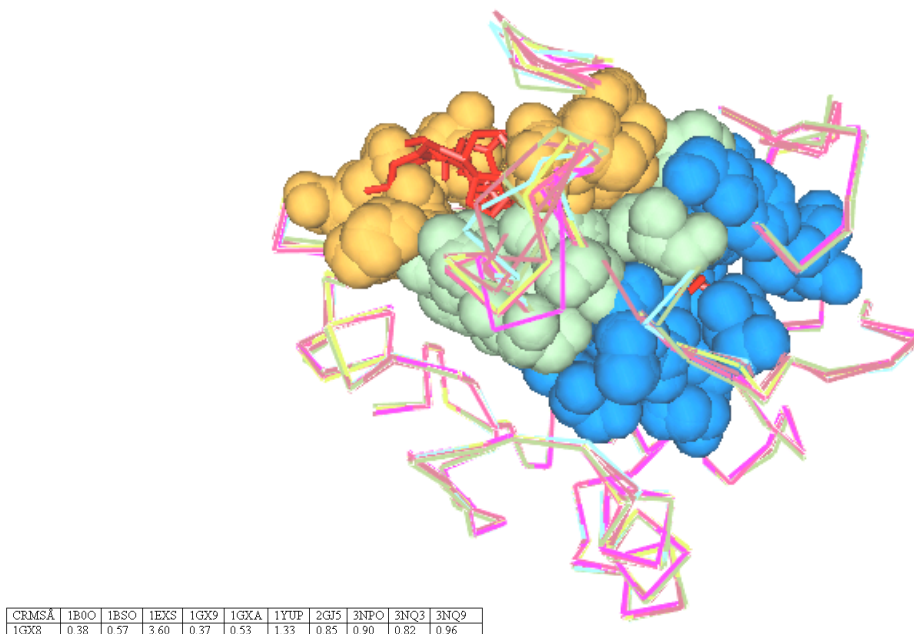
α)



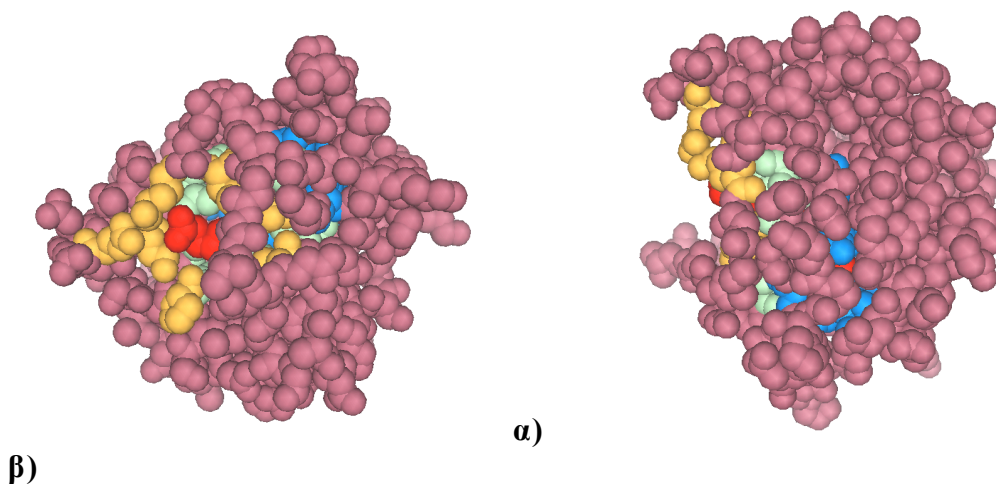
β)

DMMSA	1B00	1BSO	1EXS	1GX9	1GXA	1YUF	2GIS	3NPO	3NQ3	3NQ9
1GX8	0.38	0.58	2.85	0.46	0.53	1.38	0.98	1.02	0.84	1.03

Εικόνα 3.5 Δομική υπέρθεση των μονομερών κρυσταλλικών δομών της β -λακτοσφαιρίνης. Φαίνονται οι τρεις ζώνες στην κοιλότητα δέσμευσης, ζώνη I: εσωτερικά στο βάθος του κάλυκα (γαλάζιο), ζώνη II: ενδιάμεσα (πράσινο) και ζώνη III: εξωτερικά (πορτοκαλί). Στην όψη **α)** τα αμινοξικά κατάλοιπα φαίνονται ως σφαίρες ενώ στην όψη **β)** τα αμινοξικά κατάλοιπα φαίνονται ως ράβδοι. Με κόκκινο χρωματίζονται τα υποστρώματα. Η γραφική απεικόνιση έγινε με χρήση του προγράμματος PyMOL.



Εικόνα 3.6 Δομική υπέρθεση των μονομερών κρυσταλλικών δομών της β -λακτοσφαιρίνης. Παρουσιάζεται όψη της κοιλότητας δέσμευσης. Η ζώνη I εσωτερικά στο βάθος του κάλυκα χρωματίζεται με γαλάζιο, η ζώνη II ενδιάμεσα με πράσινο και η ζώνη III εξωτερικά με πορτοκαλί. Με κόκκινο χρωματίζονται τα υποστρώματα. Η γραφική απεικόνιση έγινε με χρήση του προγράμματος PyMOL.



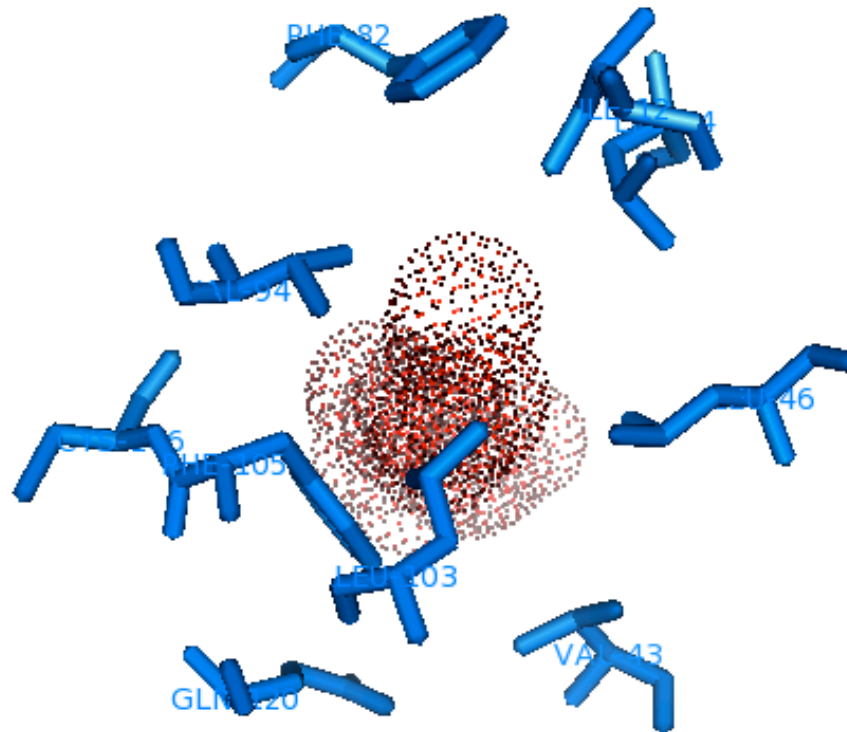
Εικόνα 3.7 Χωροπληρωτικό μοντέλο της β -λακτοσφαιρίνης όπου παρουσιάζεται η κοιλότητα δέσμευσης. Στις δύο όψεις α) και β) διακρίνονται η ζώνη I εσωτερικά στο βάθος του κάλυκα (γαλάζιο), η ζώνη II ενδιάμεσα (πράσινο) και η ζώνη III εξωτερικά (πορτοκαλί). Με κόκκινο χρωματίζονται τα υποστρώματα. Η γραφική απεικόνιση έγινε με χρήση του προγράμματος PyMOL.

Τη ζώνη I (**εικόνα 3.8**) αποτελούν τα αμινοξικά κατάλοιπα ισολευκίνη στη θέση 12, βαλίνη στη θέση 43, λευκίνη στη θέση 46, λευκίνη στη θέση 54, φαινυλαλανίνη στη θέση 82, βαλίνη στη θέση 94, λευκίνη στη θέση 103, φαινυλαλανίνη στη θέση 105, κυστεΐνη στη θέση 106 και γλουταμίνη στη θέση 120 (I12, V43, L46, L54, F82, V94, L103, F105, C106 και Q120), τη ζώνη II (**εικόνα 3.9**) αποτελούν τα αμινοξικά κατάλοιπα λευκίνη στη θέση 39, βαλίνη στη θέση 41, ισολευκίνη στη θέση 56, λευκίνη στη θέση 58, αλανίνη στη θέση 73, βαλίνη στη θέση 92, μεθειονίνη στη θέση 107, αλανίνη στη θέση 118 (L39, V41, I56, L58, A73, V92, M107, A118) και τέλος στη ζώνη III (**εικόνα 3.10**) εξωτερικά βρίσκονται τα αμινοξικά κατάλοιπα προλίνη στη θέση 38, λυσίνη στη θέση 60, γλουταμινικό οξύ στη θέση 62, λυσίνη στη θέση 69, ισολευκίνη στη θέση 71, ισολευκίνη στη θέση 84, ασπαραγίνη στη θέση 90 (P38, K60, E62, K69, I71, I84, N90). Τη ζώνη I αποτελούν υδρόφοβα κατάλοιπα και ένα πολικό, η ζώνη II αποτελείται από υδρόφοβα κατάλοιπα, και στη ζώνη III υπάρχουν δύο θετικά φορτισμένα, ένα αρνητικά φορτισμένο, ένα πολικό και τρία υδρόφοβα αμινοξικά κατάλοιπα (**εικόνα 3.11**). Τα παραπάνω συνοψίζονται στον **πίνακα 3.4**

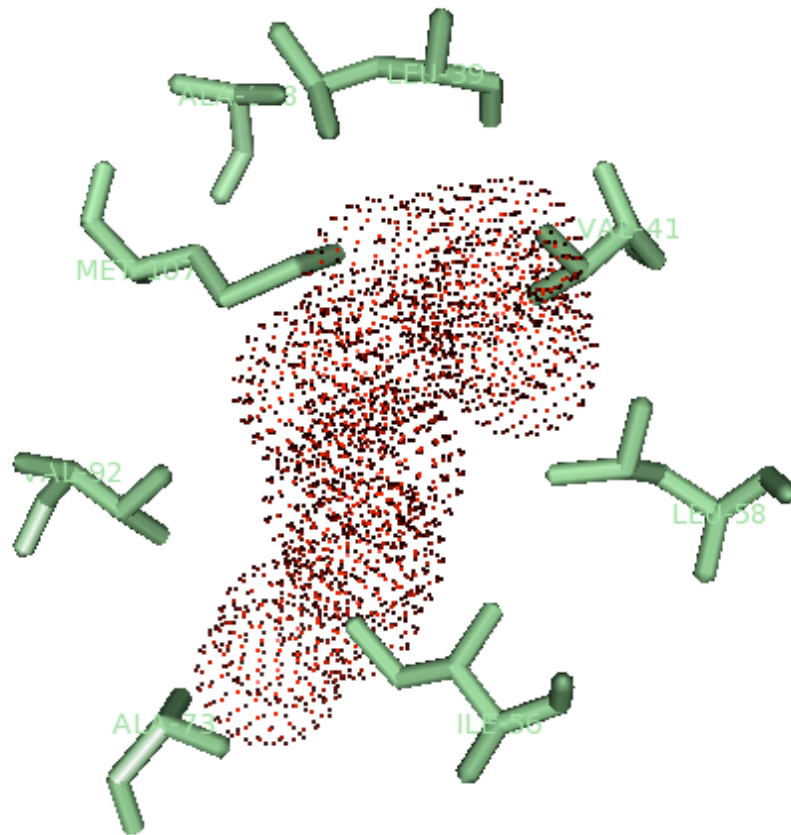
Πίνακας 3.4 Οι τρεις ζώνες που δημιουργούν την κοιλότητα δέσμευσης, (δίνονται τα αμινοξικά κατάλοιπα στον αλληλόμορφο BLG B της αγελάδας).

Θέσεις των αμινοξέων και τα αμινοξικά κατάλοιπα										
Ζώνη I	12	43	46	54	82	94	103	105	106	120
BLGB	I	V	L	L	F	V	L	F	C	Q
Ζώνη II	39	41	56	58	73	92	107	118		
BLGB	L	V	I	L	A	V	M	A		
Ζώνη III	38	60	62	69	71	84	90			
BLGB	P	K	E	K	I	I	N			

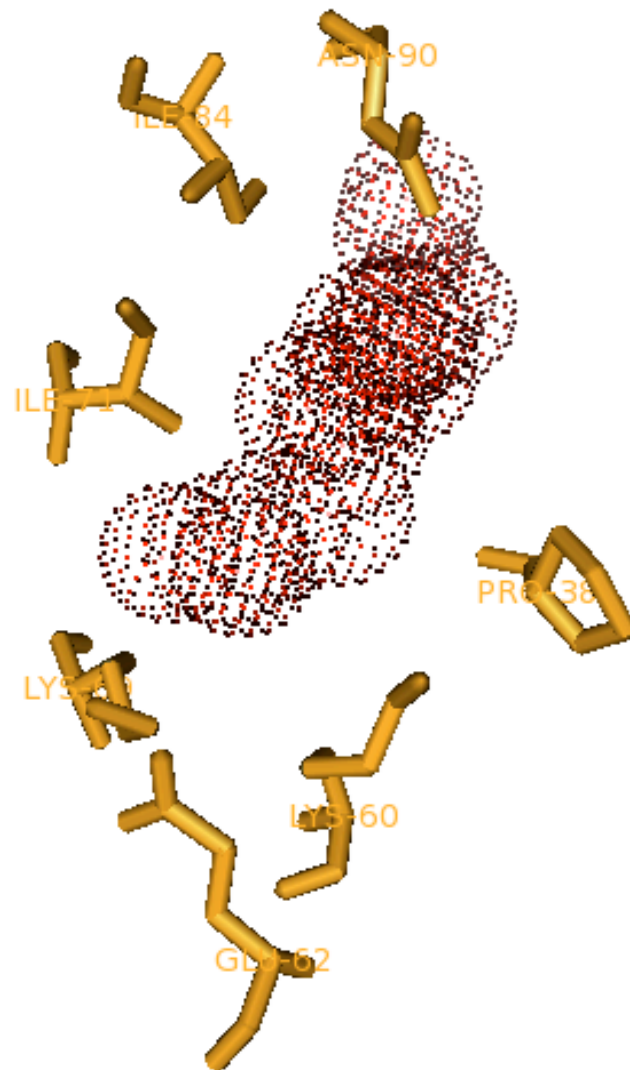
Η ισολευκίνη στη θέση 12 (I12) βρίσκεται στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης και συμμετέχει στο σχηματισμό του πυθμένα του κάλυκα, η προλίνη στη θέση 38 και η λευκίνη στη θέση 39 (P38 και L39) βρίσκονται στη στροφή AB, που σχηματίζεται μεταξύ του β -κλώνου A και του β -κλώνου B. Η βαλίνη στη θέση 41, η βαλίνη στη θέση 43 και η λευκίνη στη θέση 46 (αμινοξικά κατάλοιπα V41, V43 και L46) βρίσκονται στο β -κλώνο B. Η λευκίνη στη θέση 54, η ισολευκίνη στη θέση 56, η λευκίνη στη θέση 58, η λυσίνη στη θέση 60 και το γλουταμινικό οξύ στη θέση 62 (αμινοξικά κατάλοιπα L54, I56, L58, K60 και E62) βρίσκονται στο β -κλώνο C. Η λυσίνη στη θέση 69, η ισολευκίνη στη θέση 71 και η αλανίνη στη θέση 73 (αμινοξικά κατάλοιπα K69, I71 και A73) βρίσκονται στο β -κλώνο D. Η φαινυλαλανίνη στη θέση 82 και η ισολευκίνη στη θέση 84 (αμινοξικά κατάλοιπα F82 και I84) βρίσκονται στο β -κλώνο E. Η ασπαραγίνη στη θέση 90, η βαλίνη στη θέση 92 και η βαλίνη στη θέση 94, (αμινοξικά κατάλοιπα N90, V92 και V94) βρίσκονται στο β -κλώνο F. Η λευκίνη στη θέση 103, η φαινυλαλανίνη στη θέση 105, η κυστεΐνη στη θέση 106 και η μεθειονίνη στη θέση 107 (αμινοξικά κατάλοιπα L103, F105, C106 και M107) βρίσκονται στο β -κλώνο G. Η αλανίνη στη θέση 118 και η γλουταμίνη στη θέση 120 (αμινοξικά κατάλοιπα A118 και Q120) βρίσκονται στο β -κλώνο H. Στην **εικόνα 3.12** παρουσιάζονται τα αμινοξικά κατάλοιπα της κοιλότητας δέσμησης στα στοιχεία της δευτεροταγούς δομής της β -λακτοσφαιρίνης.



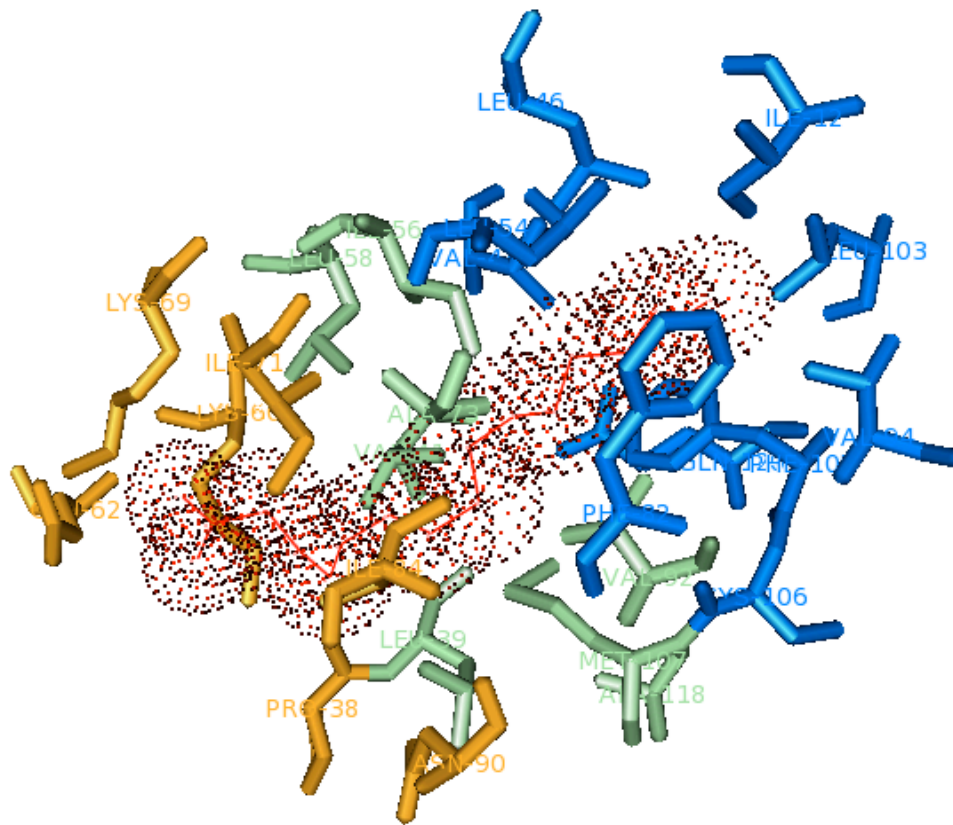
Εικόνα 3.8 Λεπτομέρεια από τη θέση δέσμευσης της β -λακτοσφαιρίνης, όπου παρουσιάζεται η ζώνη I η οποία βρίσκεται εσωτερικά στο βάθος του κάλυκα. Τα αμινοξέα που απαρτίζουν τη ζώνη I είναι τα I12, V43, L46, L54, F82, V94, L103, F105, C106 και Q120. Με κόκκινο χρωματίζεται το υπόστρωμα (παλμιτικό οξύ). Η γραφική απεικόνιση έγινε με χρήση του προγράμματος PyMOL.



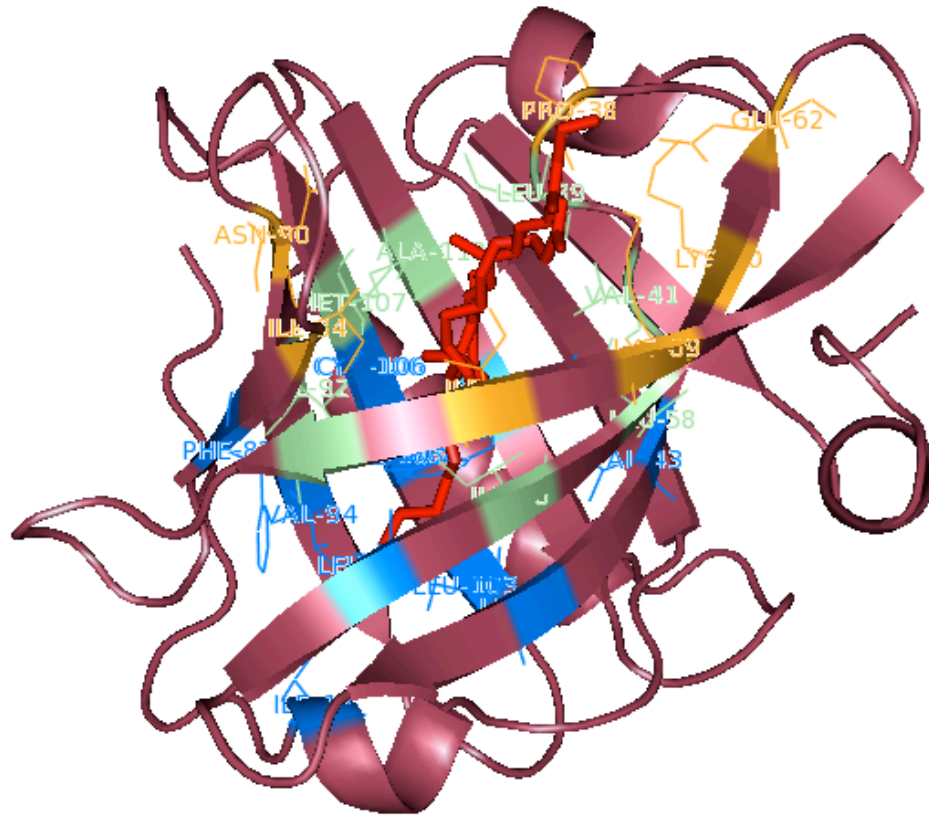
Εικόνα 3.9 Λεπτομέρεια από τη θέση δέσμευσης της β -λακτοσφαιρίνης. Η ζώνη II στο μέσο του κάλυκα. Τα αμινοξέα που απαρτίζουν τη ζώνη II είναι τα L39, V41, I56, L58, A73, V92, M107, A118. Με κόκκινο χρωματίζεται το υπόστρωμα (παλμιτικό οξύ). Η γραφική απεικόνιση έγινε με χρήση του προγράμματος PyMOL.



Εικόνα 3.10 Λεπτομέρεια από τη θέση δέσμευσης της β -λακτοσφαιρίνης. Η ζώνη III στο άνοιγμα του κάλυκα. Τα αμινοξέα που απαρτίζουν τη ζώνη III είναι τα P38, K60, E62, K69, I71, I84 και N90. Με κόκκινο χρωματίζεται το υπόστρωμα (παλμιτικό οξύ). Η γραφική απεικόνιση έγινε με χρήση του προγράμματος PyMOL.



Εικόνα 3.11 Τα αμινοξέα που απαρτίζουν τη θέση δέσμευσης της β -λακτοσφαιρίνης. Στη ζώνη I εσωτερικά στο βάθος του κάλυκα χρωματίζονται με γαλάζιο, στη ζώνη II ενδιάμεσα με πράσινο και στη ζώνη III εξωτερικά με πορτοκαλί. Με κόκκινο χρωματίζεται το υπόστρωμα (παλμιτικό οξύ). Η γραφική απεικόνιση έγινε με χρήση του προγράμματος PyMOL.



Εικόνα 3.12 Τα αμινοξικά κατάλοιπα της κοιλότητας δέσμευσης στα στοιχεία της δευτεροταγούς δομής της β -λακτοσφαιρίνης. Η ζώνη I εσωτερικά στο βάθος του κάλυκα (γαλάζιο), η ζώνη II ενδιάμεσα (πράσινο) και η ζώνη III εξωτερικά (πορτοκαλί). Με κόκκινο χρωματίζονται τα υποστρώματα. Η γραφική απεικόνιση έγινε με χρήση του προγράμματος PyMOL.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 Η β -λακτοσφαιρίνη

Η β -λακτοσφαιρίνη (β -Lactoglobulin, BLG) είναι η βασική πρωτεΐνη του ορού του γάλακτος πολλών θηλαστικών η οποία έχει μελετηθεί διεξοδικά τα τελευταία εβδομήντα χρόνια. Αποτελεί μία μη-γλυκοζυλιωμένη εξαιρετικά σταθερή λιποκαλίνη, που δεσμεύει στο λιπόφιλο κάλυκά της διάφορα υδρόφοβα υποστρώματα όπως λιπαρά οξέα, λιπίδια, μικρά αλκάνια, αλειφατικές κετόνες και αρωματικές ενώσεις. Η *in vitro* δέσμευση ενός μορίου στις μελέτες που αφορούν την πρόσδεση υποστρωμάτων ενδέχεται να αντικατοπτρίζει τη γενικότερη συνάφεια της β -λακτοσφαιρίνης προς μικρά υδρόφοβα μόρια και να μην έχει κάποια φυσιολογική σημασία.

Απομονώνεται εύκολα σε μεγάλες ποσότητες από το αγελαδινό γάλα, με αποτέλεσμα να έχει μελετηθεί πολύ καλά με πλήθος φυσικών και βιοχημικών τεχνικών. Παρόλο όμως το μεγάλο αριθμό μελετών με αντικείμενο τη BLG, η βιολογική της λειτουργία παραμένει ασαφής. Ιδιαίτερα μελετημένη είναι η ικανότητά της να δεσμεύει ρετινόλη. Θεωρείται ότι δεσμεύει, προστατεύει και μεταφέρει μικρά υδρόφοβα διατροφικά σημαντικά μόρια από τη μητέρα στο νεογνό.

Οι κρυσταλλογραφικές μελέτες που έχουν γίνει στη β -λακτοσφαιρίνη και σε σύμπλοκά της έχουν δώσει πολύτιμες πληροφορίες για την τρισδιάστατη δομή της.

Συγκριτικές αναλύσεις της τρισδιάστατης δομής των πρωτεϊνών λαμβάνουν χώρα για την πρόβλεψη της λειτουργίας των πρωτεϊνών και την κατανόηση των εξελικτικών τους σχέσεων. Σε ό,τι αφορά τη λειτουργικότητα της β -λακτοσφαιρίνης ως μεταφορέα υδρόφοβων μορίων τα ενδιαφέροντα αμινοξέα εντοπίζονται στην κοιλότητα δέσμευσης. Παρόλο που έχει γίνει λόγος για περισσότερες της μίας περιοχής δέσμευσης υποστρώματος στη β -λακτοσφαιρίνη, η παρούσα μελέτη αναφέρεται στην κύρια ή κεντρική θέση δέσμευσης, η οποία βρίσκεται στην κεντρική κοιλότητα που σχηματίζεται από τους οκτώ αντιπαράλληλους β -κλώνους.

4.2 Γενετική Ανάλυση των β -λακτοσφαιρινών

Οι θέσεις των αντικαταστάσεων των αμινοξέων, των ακολουθιών της β -λακτοσφαιρίνης μεταξύ των ειδών που αναλύθηκαν στην παρούσα μελέτη και στοχεύουν κυρίως τη σταθερότητα της πρωτεΐνης καθώς και την επιλεκτικότητα πρόσδεσης υποστρωμάτων στην κύρια κοιλότητα της β -λακτοσφαιρίνης, αναλύονται παρακάτω.

Η θέση 12 ανήκει στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης και συμμετέχει στο σχηματισμό του πυθμένα του κάλυκα. Στη BLGB της αγελάδας στη θέση 12 υπάρχει ισολευκίνη. Η I12 ανήκει στα αμινοξικά κατάλοιπα που απαρτίζουν την εσωτερική ζώνη στο βάθος του κάλυκα, ζώνη I. Από την πολλαπλή ευθυγράμμιση των αλληλουχιών (πίνακας 3.3) προκύπτει ότι η αντικατάσταση της ισολευκίνης, με βαλίνη εμφανίζεται στις BLGs, στον τάρανδο και στα είδη καγκουρό, ουάλαμπι και πόσσοιμ, ενώ η αντικατάσταση με λευκίνη εμφανίζεται στις BLGs στα ιπποειδή (ίππος και όνος), στον μπαμπούινο, στο σκύλο και σε δύο αλληλομόρφους της β -λακτοσφαιρίνης της γάτας. Η ισολευκίνη, η λευκίνη και η βαλίνη είναι υδρόφοβα αμινοξέα. Όμως στην πρωτεΐνη του χοίρου εμφανίζεται η αντικατάσταση της ισολευκίνης με τη θρεονίνη, το οποίο είναι πολικό αμινοξύ.

Η θέση 38 βρίσκεται στη στροφή AB (η οποία σχηματίζεται μεταξύ του β -κλώνου A και του β -κλώνου B) και είναι μέρος της εξωτερικής ζώνης του κάλυκα, ζώνη III. Στη θέση 38 στη BLGB της αγελάδας βρίσκεται η προλίνη. Η P38 εμφανίζεται υψηλά συντηρημένη, διαφοροποίηση από την BLGB της αγελάδας παρουσιάζεται στις BLGs του καγκουρό, του ουάλαμπι και του πόσσοιμ, στις οποίες η προλίνη αντικαθίσταται από τη λευκίνη.

Η θέση 39 βρίσκεται στη στροφή AB και αποτελεί μέρος της ζώνης II στην κοιλότητα της BLG. Στη θέση 39 στον αλληλόμορφο BLGB της αγελάδας βρίσκεται η λευκίνη. Η L39 εμφανίζεται υψηλά συντηρημένη. Διαφέρουν οι BLGs του καγκουρό, του ουάλαμπι και του πόσσοιμ όπου εμφανίζουν αντικατάσταση της λευκίνης από τη φαινυλαλανίνη.

Στη θέση 41, που βρίσκεται στην αρχή του β -κλώνου B και αποτελεί τμήμα της ζώνης II, βρίσκεται η βαλίνη. Εμφανίζεται υψηλά συντηρημένη. Η αντικατάσταση της βαλίνης στη θέση 41 με την αλανίνη υπάρχει στο χοίρο, με την ισολευκίνη υπάρχει στον μπαμπούνο, ενώ στις BLGs των ειδών καγκουρό, ουάλαμπι και πόσσοιμ στη θέση 41 η βαλίνη αντικαθίσταται από τη μεθειονίνη.

Η θέση 43 βρίσκεται στο β -κλώνο B και ανήκει στα αμινοξικά κατάλοιπα που απαρτίζουν την εσωτερική ζώνη στο βάθος του κάλυκα, ζώνη I. Στη θέση 43 στη BLGB της αγελάδας βρίσκεται η βαλίνη. Στον έναν αλληλόμορφο του ίππου και στον έναν αλληλόμορφο του όνου καθώς και στις BLGs στα είδη καγκουρό, ουάλαμπι, πόσσοιμ, μπαμπούνου και σκύλου η βαλίνη αντικαθίσταται από την ισολευκίνη.

Η θέση 46, που βρίσκεται στο β -κλώνο B αποτελεί τμήμα της ζώνης I. Στη BLGB της αγελάδας υπάρχει λευκίνη. Η L46 εμφανίζεται υψηλά συντηρημένη. Στις BLGs στα είδη καγκουρό, ουάλαμπι και πόσσοιμ εμφανίζεται η αντικατάσταση της λευκίνης από τη βαλίνη.

Η λευκίνη στη θέση 54 βρίσκεται στην αρχή του β -κλώνου C και ανήκει στα αμινοξικά κατάλοιπα που απαρτίζουν την εσωτερική ζώνη στο βάθος του κάλυκα, ζώνη I. Η L54 εμφανίζεται απόλυτα συντηρημένη.

Υψηλά συντηρημένη στη θέση 56, που βρίσκεται στο β -κλώνο C και αποτελεί τμήμα της ζώνης II, είναι η ισολευκίνη. Η αντικατάσταση της ισολευκίνης με λευκίνη εμφανίζεται στα παλαιότερα εξελικτικά είδη καγκουρό, ουάλαμπι και πόσσοιμ και δημιουργεί μια διαφορετική χωροθέτηση του κάλυκα.

Υψηλά συντηρημένη στη θέση 58, που βρίσκεται στο β -κλώνο C, υπάρχει η λευκίνη. Ανήκει στα αμινοξικά κατάλοιπα, που απαρτίζουν την ζώνη II του κάλυκα. Η L58 στην πρωτεΐνη του πόσσοιμ αντικαθίσταται από βαλίνη.

Στη θέση 60 υπάρχει η λυσίνη και βρίσκεται στο τέλος του β -κλώνου C. Ανήκει στην εξωτερική ζώνη του κάλυκα, ζώνη III. Η αντικατάσταση της λυσίνης ενός θετικά φορτισμένου αμινοξέος με γλουταμινικό οξύ, που είναι αρνητικά φορτισμένο, υπάρχει στις BLGs των ιπποειδών (ίππος, όνος) και των ειδών καγκουρό, ουάλαμπι και πόσσοιμ. Στην πρωτεΐνη του μπαμπούνου η λυσίνη αντικαθίσταται από την αργινίνη η οποία είναι επίσης θετικά φορτισμένο αμινοξύ.

Στη θέση 62, που βρίσκεται στο τέλος του β -κλώνου C και ανήκει στην εξωτερική ζώνη III, του κάλυκα, υπάρχει γλουταμινικό οξύ (το οποίο έχει αρνητικό ηλεκτρικό φορτίο). Στη θέση του, στα ιπποειδή ο ένας αλληλόμορφος του ίππου και τρεις αλληλόμορφοι του όνου, εμφανίζουν την αλανίνη. Πρόκειται για αντικατάσταση του όξινου αμινοξέος γλουταμινικού οξέος με ένα αμινοξύ το οποίο δεν φέρει ηλεκτρικό φορτίο. Στον μπαμπούνο αντικαθίσταται από το επίσης αρνητικά φορτισμένο ασπαρτικό οξύ.

Στη θέση 69, που βρίσκεται στο β -κλώνο D και ανήκει στην εξωτερική ζώνη III, υπάρχει η λυσίνη (ένα θετικά φορτισμένο αμινοξύ). Στον έναν αλληλόμορφο του ίππου και στους τρεις αλληλομόρφους του όνου η λυσίνη αντικαθίσταται από την αργινίνη, η οποία είναι επίσης θετικά φορτισμένη. Σε έναν αλληλόμορφο στη γάτα η λυσίνη αντικαθίσταται από τη γλυκίνη, που είναι μη πολικό αμινοξύ, σε έναν αλληλόμορφο στο σκύλο από τη γλουταμίνη, που είναι πολικό αμινοξύ, ενώ στο χοίρο και στον μπαμπούνο από το γλουταμινικό οξύ, που είναι αρνητικά φορτισμένο αμινοξύ.

Στη θέση 71 στο β -κλώνο D, που ανήκει στην εξωτερική ζώνη III, απαντάται η ισολευκίνη (που είναι ένα υδρόφοβο αμινοξύ). Στις BLGs εμφανίζονται αντικαταστάσεις τις ισολευκίνης με τα επίσης υδρόφοβα αμινοξέα βαλίνη, λευκίνη και φαινυλαλανίνη ως ακολούθως: η λευκίνη εμφανίζεται στα είδη ουάλαμπι, καγκουρό και χοίρου, η φαινυλαλανίνη στο πόσσομ και η βαλίνη στους αλληλομόρφους στο σκύλο καθώς και σε έναν αλληλόμορφο στη γάτα.

Στη θέση 73, που βρίσκεται στο β -κλώνο D και ανήκει στη ζώνη II, εμφανίζεται υψηλά συντηρημένη η αλανίνη. Στις BLGs των ειδών καγκουρό, ουάλαμπι και πόσσομ αντικαθίσταται από τη λευκίνη. Στην κοιλότητα δέσμησης καταλαμβάνει περισσότερο χώρο η ογκώδης αλειφατική πλευρική αλυσίδα της λευκίνης σε σύγκριση με αυτή της αλανίνης.

Η φαινυλαλανίνη στη θέση 82, που βρίσκεται στο β -κλώνο E, είναι απόλυτα συντηρημένη και αποτελεί μέρος της ζώνης I.

Στη θέση 84, που βρίσκεται στο β -κλώνο E και ανήκει στη ζώνη III, υπάρχει η ισολευκίνη. Αντικαθίσταται από βαλίνη σε έναν αλληλόμορφο του ίππου, στους τρεις αλληλομόρφους του όνου, καθώς και σε έναν αλληλόμορφο της γάτας.

Στη θέση 90 στο β -κλώνο F στην εξωτερική ζώνη του κάλυκα υπάρχει η ασπαραγίνη, η οποία είναι πολικό αμινοξύ. Η ασπαραγίνη αντικαθίσταται από το επίσης πολικό αμινοξύ, σερίνη, στην πρωτεΐνη των ειδών καγκουρό, ουάλαμπι και πόσσουμ. Σε έναν αλληλόμορφο της γάτας εμφανίζεται η λυσίνη (ένα αμινοξύ που είναι θετικά φορτισμένο). Ενώ στα ιπποειδή τόσο στο είδος του ίππου όσο και στο ούνο, η ασπαραγίνη αντικαθίσταται από φορτισμένο αμινοξύ, είτε θετικά είτε αρνητικά. Συγκεκριμένα, ένας αλληλόμορφος του ίππου και οι τρεις αλληλόμορφοι του όνου, έχουν αργινίνη, η οποία είναι φορτισμένη θετικά. Ενώ ο άλλος αλληλόμορφος του ίππου και ο εναπομείναντας αλληλόμορφος του όνου, έχουν το ασπαρτικό οξύ, που είναι ένα αμινοξύ αρνητικά φορτισμένο.

Στη θέση 92, που είναι στο β -κλώνο F και βρίσκεται στη ζώνη II, υπάρχει βαλίνη. Αντικαταστάσεις δίνουν την εμφάνιση φαινυλαλανίνης, ισολευκίνης ή λευκίνης. Στα οποία η πλευρική αλυσίδα είναι πιο ογκώδης από αυτήν της βαλίνης. Ισολευκίνη υπάρχει στον μπαμπούνο, στο σκύλο, σε έναν αλληλόμορφο της γάτας, στον ένα αλληλόμορφο του ίππου και στους τρεις αλληλομόρφους του όνου. Η βαλίνη αντικαθίσταται με φαινυλαλανίνη στα ουάλαμπι και καγκουρό, ενώ η αντικατάστασή της με λευκίνη, εμφανίζεται στο πόσσουμ.

Στη θέση 94 στο β -κλώνο F στο βάθος του κάλυκα (ζώνη I) απαντάται η βαλίνη. Η αντικατάσταση με αλανίνη εμφανίζεται σε έναν αλληλόμορφο του ίππου και σε έναν αλληλόμορφο του όνου, ενώ με λευκίνη στο σκύλο, στο χοίρο και στον μπαμπούνο.

Στη θέση 103, που βρίσκεται στο β -κλώνο G στο βάθος του κάλυκα (ζώνη I) υπάρχει η λευκίνη. Η αντικατάστασή της με την ισολευκίνη εμφανίζεται στο πόσσουμ, με τη μεθειονίνη εμφανίζεται σε έναν αλληλόμορφο του ίππου και στους τρεις αλληλομόρφους του όνου και με τη φαινυλαλανίνη στα ουάλαμπι και καγκουρό.

Στη θέση 105 στο β -κλώνο G στο βάθος του κάλυκα (ζώνη I) υπάρχει φαινυλαλανίνη. Στο πόσσουμ αντικαθίσταται με γλυκίνη. Η αντικατάστασή της με λευκίνη εμφανίζεται σε έναν αλληλόμορφο του ίππου καθώς και σε έναν αλληλόμορφο του όνου και στις BLGs του μπαμπούνου και του χοίρου.

Στη θέση 106, που βρίσκεται στο β -κλώνο G, υπάρχει απόλυτα συντηρημένη η κυστεΐνη· η οποία μετέχει στον ένα δισουλφιδικό δεσμό και ανήκει στα αμινοξικά κατάλοιπα που απαρτίζουν την εσωτερική ζώνη στο βάθος του κάλυκα (ζώνη I).

Στη θέση 107, που βρίσκεται στο β -κλώνο G και είναι μέρος της ζώνης II, υπάρχει η μεθειονίνη. Η αντικατάστασή της με βαλίνη εμφανίζεται στον έναν αλληλόμορφο του ίππου και στους τρεις αλληλομόρφους του όνου. Η αντικατάσταση της μεθειονίνης με λευκίνη εμφανίζεται στις BLGs των ειδών ουάλαμπι, καγκουρό, πόσσουμ και μπαμπούνου καθώς και σε δύο αλληλομόρφους της γάτας. Η αντικατάσταση της μεθειονίνης με ένα όξινο αμινοξύ το γλουταμινικό οξύ (το οποίο έχει αρνητικό ηλεκτρικό φορτίο) εμφανίζεται σε έναν αλληλόμορφο του σκύλου.

Στη θέση 118, που βρίσκεται στο β -κλώνο H και ανήκει στην ομάδα των αμινοξέων της ζώνης II, υπάρχει η αλανίνη (που είναι υδρόφοβο αμινοξύ). Η αντικατάστασή της από τη βαλίνη εμφανίζεται στον αλληλόμορφο BLGA της αγελάδας, σε δύο αλληλομόρφους στη γάτα, καθώς και στις BLGs στο χοίρο και στα ιπποειδή (ίππος και όνος). Η αντικατάσταση της αλανίνης από την προλίνη εμφανίζεται σε έναν αλληλόμορφο του βουβαλιού, ενώ από τη μεθειονίνη στους αλληλομόρφους του σκύλου και στον έναν αλληλόμορφο της γάτας. Εκτός από τις παραπάνω αντικαταστάσεις όλες με επίσης υδρόφοβα αμινοξέα απαντάται στην πρωτεΐνη του δελφινιού η αντικατάσταση της βαλίνης από τη θρεονίνη, που είναι πολικό αμινοξύ.

Στη θέση 120, που βρίσκεται στο β -κλώνο H στο βάθος του κάλυκα (ζώνη I), υπάρχει η γλουταμίνη ένα πολικό αμινοξύ. Αντικαθίσταται από τη σερίνη (η οποία είναι επίσης πολικό αμινοξύ) σε έναν αλληλόμορφο στο βουβάλι· και από την αλανίνη (που είναι μη πολικό αμινοξύ), στις BLGs των ουάλαμπι, καγκουρό και πόσσουμ.

Οι αντικαταστάσεις των αμινοξικών καταλοίπων συνοψίζονται στον **πίνακα 4.1**, όπως παρατηρούνται σε σχέση με την αγελαδινή BLGB.

Πίνακας 4.1 Οι αντικαταστάσεις των αμινοξέων που απαντώνται στις BLGs των ειδών των θηλαστικών σε σύγκριση με την αγελαδινή BLGB.

Θέσεις των αμινοξέων και τα αμινοξικά κατάλοιπα										
Ζώνη I	12	43	46	54	82	94	103	105	106	120
BLGB	I	V	L	L	F	V	L	F	C	Q
BLGs	L, V, T	I	V			A, L	M, F, I	L, G		S, A
Ζώνη II	39	41	56	58	73	92	107	118		
BLGB	L	V	I	L	A	V	M	A		
BLGs	F	A, I, M	L	V	L	I, L, F	V, L, E	V, P, M, T		
Ζώνη III	38	60	62	69	71	84	90			
BLGB	P	K	E	K	I	I	N			
BLGs	L	R, E	D, A	R, E, Q, G	L, V, F	V	D, R, K, S			

Από τη γενετική ανάλυση των β-λακτοσφαιρινών προκύπτουν σημαντικά συμπεράσματα για τη λειτουργικότητα και τη διαφοροποίηση της λειτουργικότητας μεταξύ των ειδών θηλαστικών.

Ειδικότερα η σταθερότητα της πρωτεΐνης του χοίρου είναι χαμηλότερη από εκείνη της αγελάδας. Η κύρια διαφορά στην κοιλότητα πρόσδεσης μεταξύ των δύο είναι η αντικατάσταση της φαινυλαλανίνης 105 της αγελαδινής BLG με λευκίνη στην πρωτεΐνη του χοίρου. Αυτό αναδεικνύει ότι η παρουσία των αρωματικών καταλοίπων μπορεί να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στην αύξηση της σταθερότητας της αγελαδινής πρωτεΐνης όπως έχουν επισημάνει οι D'Alfonso *et al.* (2004). Τα δύο αμινοξικά κατάλοιπα λυσίνης K60 και K69, που βρίσκονται στην εξωτερική περιφέρεια της κοιλότητας ενδέχεται να διαδραματίζουν ένα σημαντικό ρόλο στην επιλογή του υποστρώματος.

Η μη μετρήσιμη συνάφεια της BLG του χοίρου για λιπαρά οξέα μπορεί να οφείλεται στην ύπαρξη αντικατάστασης της K69 με ένα γλουταμινικό οξύ, αλλαγή από

θετικού φορτίου βασικό κατάλοιπο σε αρνητικού φορτίου όξινο όπως έχει προταθεί και αναφέρεται από τους Qin *et al.* (1998b). Σε άλλες BLG μη-μηρυκαστικών ζώων, που αναφέρεται ότι δεν δεσμεύουν λιπαρά οξέα, όπως για τον ίππο και τον όνο, ένα βασικό αμινοξύ (K ή R) συντηρείται στη θέση 69, αλλά υπάρχει αντικατάσταση της K60 με ένα όξινο γλουταμινικό. Φαίνεται ότι η παρουσία μίας καρβοξυλομάδας στη θέση 60 ή 69, μπορεί να παρεμποδίζει τη δέσμευση λιπαρών οξέων. (Qin *et al.*, 1998b). Μεταξύ των αλληλομόρφων A και B της BLG η αντικατάσταση V/A στη θέση 118 στο β-κλώνο H, δημιουργεί ένα κενό από την αλλαγή της ογκώδους ισοπροπυλικής ομάδας με τη μικρότερη μεθυλική ομάδα· το κοίλωμα που δημιουργείται έχει αποτέλεσμα μία λιγότερο ευνοϊκή θέση δέσμευσης (Qin *et al.*, 1999).

Η κρυσταλλογραφική ανάλυση των αλληλομόρφων αλλά και της φυσικής πρωτεΐνης με διάφορα υποστρώματα οδηγεί στην κατανόηση της λειτουργίας αλλά και της συνάφειας υποστρωμάτων και β-λακτοσφαιρίνης με απώτερο στόχο αυτόν της κατανόησης της χρησιμότητάς της στα θηλαστικά.

Η γενετική μελέτη αναδεικνύει την εξελικτική διαφοροποίηση του λιποκάλυκα, ενώ οι μελέτες πρόσδεσης αναδεικνύουν τις επιμέρους αλληλεπιδράσεις αμινοξέων και υποστρώματος. Ο μελλοντικός προσδιορισμός των κρυσταλλοδομών των συμπλόκων που έχουν επιλεγεί αποτελεί σημαντικό βήμα στη λεπτομερή χαρτογράφηση της σημαντικότητας των διαφόρων αμινοξικών θέσεων στο λιποκάλυκα. Μαζί με τη γενετική συσχέτιση προσφέρουν μία σημαντική απεικόνιση της συσχέτισης δομής – δράσης της β-λακτοσφαιρίνης.

4.3 Δομική ανάλυση συμπλόκων της β-λακτοσφαιρίνης με υδρόφοβα υποστρώματα.

Οι *in vitro* μελέτες συμπλόκων της BLG οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η δέσμευση του υποστρώματος στην κεντρική κοιλότητα γίνεται με τρόπο παρόμοιο με τη δέσμευση της ρετινόλης, στη λιποκαλίνη του ορού RBP (retinol-binding protein). Στη μελέτη με υπόστρωμα το παλμιτικό οξύ (Wu *et al.*, 1999) η καρβοξυλική ομάδα του παλμιτικού οξέος βρίσκεται στην είσοδο της κοιλότητας και τα αμινοξέα που

συμμετέχουν στη θέση δέσμευσης είναι η K60 και η K69 ενώ η υδρόφοβη ουρά βρίσκεται σε μία σχεδόν εκτεταμένη διαμόρφωση στο κέντρο της κοιλότητας της πρωτεΐνης. Η M107 αλλάζει θέση στην παρουσία ή απουσία του παλμιτικού οξέος. Η κεντρική υδρόφοβη κοιλότητα μπορεί να χωρέσει και μεγαλύτερου μήκους λιπαρά οξέα.

Από τη μοριακή προτυποποίηση αλλά και τις υπάρχουσες κρυσταλλογραφικές μελέτες είναι φανερό η τάση των υποστρωμάτων να καλύψουν την υδρόφοβη επιφάνειά τους στην κοιλότητα του λιποκάλυκα αφήνοντας εκτεθειμένες στο διαλύτη τυχόν πολικές ή υδρόφοβες ομάδες. Οι δύο διακριτές περιοχές των λιπιδίων βρίσκονται τοποθετημένες ως εξής στην κοιλότητα δέσμευσης· η υδρόφιλη πολική κεφαλή τοποθετείται στο άνοιγμα της κοιλότητας και η υδρόφοβη μακριά υδρογονανθρακική αλυσίδα στο εσωτερικό. Στα στεροειδή, προβιταμίνη D₂ και προβιταμίνη D₃ το πολικό τους τμήμα (-OH) τοποθετείται στο άνοιγμα της κοιλότητας.

Οι προσπάθειες διάχυσης των υδρόφοβων υποστρωμάτων σε σχηματισμένους κρυστάλλους της φυσικής πρωτεΐνης οδηγούν στη δημιουργία ρηγμάτων σε αυτούς, που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι πιθανότατα κατά τη συμπλοκοποίηση γίνονται κάποιες στερεοδιατακτικές αλλαγές. Η διερεύνηση συνθηκών συγκρυστάλλωσης με τα παραπάνω υποστρώματα συνεχίζεται.

Για τον προσδιορισμό της συσχέτισης υποστρωμάτων και πρωτεΐνης προτείνεται η κρυσταλλογραφική μελέτη των αλληλομόρφων διαφόρων ειδών της BLG και συμπλόκων τους σε διαφορετικές συνθήκες.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Ανυφαντάκης, Ε.Μ. (1994). Χημεία και ανάλυση του γάλακτος. Εκδόσεις Σταμούλη
Αθήνα-Πειραιάς. σ.124.
- Adams, J. J., Anderson, B. F., Norris, G. E., Creamer, L. K. and Jameson, G. B. (2006).
Structure of bovine β -lactoglobulin (variant A) at very low ionic strength.
Journal of Structural Biology, **154**, 246 – 54.
- Åkerstrom, B., Flower, D. R. and Salier, J.-P. (2000). Lipocalins: unity in diversity.
Biochimica et Biophysica Acta, **1482**, 1-8.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. and Lipman, D.J. (1990). Basic local
alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, **215** (3), 403-10.
- Arakawa T, Timasheff, S.N. (1985). Theory of protein solubility. *Methods in
Enzymology*, **114**, 49-77.
- Aschaffenburg, R. and Drewry, J. (1955). Occurrence of different β -Lactoglobulins in
cow's milk. *Nature*, **176**, 218-9.
- Bairoch, A. and Apweiler, R. (2000). The SWISS-PROT protein sequence database and
its supplement. TrEMBL in 2000. *Nucleic Acids Research*, **28**, 45–8.
- Bergfors, T. (2009). Protein Crystallization: Second Edition. International University
Line, La Jolla, California.
- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H.,
Shindyalov, I.N. and Bourne, P.E. (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic
Acids Research*, **28**, 235-42.
- Bewley, M. C., Qin, B. Y., Jameson, G. B., Sawyer, L., and Baker, E. N. (1997).
Bovine β -lactoglobulin and its variants: a three-dimensional structural
perspective. In *Milk Protein Polymorphism*, IDF Special Issue 9702, Brussels:
International Dairy Federation. pp. 100–9.

- Bolton, E., Wang, Y., Thiessen, P.A., Bryant, S.H. (2008). PubChem: Integrated Platform of Small Molecules and Biological Activities. Chapter 12 In *Annual Reports in Computational Chemistry*, Volume 4, American Chemical Society, Washington, DC.
- Braunitzer, G., Chen, R., Schrank, B. and Strangi, A. (1972). Automatische Sequenzanalyse eines Proteins (β -Lactoglobulin AB). *Hoppe-Seyler's Z. Physiol.Chem.*, **353**, 832-4.
- Brownlow, S., Cabral, J. H. M., Cooper, R., Flower, D. R., Yewdall, S. J., Polikarpov, I., North, A. C. and Sawyer, L. (1997). Bovine β -lactoglobulin at 1.8 Å resolution – still an enigmatic lipocalin. *Structure (London)*, **5**, 481 – 95.
- Burova, T. V., Grinberg, N. V., Visschers, R. W., Grinberg, V. Y. and de Kruif, C. G. (2002). Thermodynamic stability of porcine β -lactoglobulin - a structural relevance. *European Journal of Biochemistry*, **269**, 3958 – 68.
- Clegg, W. (1998). Crystal structure determination. Oxford science publications, Oxford University Press Inc., New York. p27.
- Creamer, L. K. (1995). Effect of sodium dodecyl-sulfate and palmitic acid on the equilibrium unfolding of bovine β -lactoglobulin. *Biochemistry*, **34**, 7170 - 6.
- Creamer, L. K., Parry, D. A. D. and Malcolm, G. N. (1983). Secondary structure of bovine β -lactoglobulin B. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **227**, 98 – 105.
- D'Alfonso, L., Collini, M., Ragona, L., Ugolini, R., Baldini, G. and Molinari, H. (2004). Porcine β -lactoglobulin chemical unfolding: identification of a non-native α -helical intermediate. *Proteins: Structure Function and Bioinformatics*, **58**, 70 – 9.
- DeLano, Warren Lyford (2008). The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.1, DeLano Scientific LLC. Schrödinger.
- Diaz de Villegas, M.C., Oria, R., Sala, F.J. and Calvo, M. (1987). Lipid binding by β -lactoglobulin of cow milk. *Milchwissenschaft*, **42**, 357-8.

- Dong, A., Matsuura, J., Allison, S.D., Chrisman, E., Manning, M.C. and Carpenter, J.F. (1996). Infrared and circular-dichroism spectroscopic characterization of structural differences between β -Lactoglobulin-A and β -Lactoglobulin-B. *Biochemistry*, **35**, 1450-7.
- Ducruix, A. and Giége, R. (1992). Crystallization of Nucleic Acids and Proteins. A Practical Approach. IRL Press UK, Oxford-New York.
- Dufour, E., Genot, C. and Haertlé, T. (1994). β -Lactoglobulin binding properties during its folding changes studied by fluorescence spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1205**, 105 – 12.
- Edwards, P. B., Creamer, L. K. and Jameson, G. B. (2009). Structure and stability of whey proteins. In *Milk Proteins: From Expression to Food* (A. Thompson, M. Boland, H. Singh, Eds) Academic Press Elsevier Inc. pp. 163-76.
- Eliopoulos, E. (1996). Molecular Recognition: The Lipocalins. In *Crystallography of Supramolecular Compounds*. (G.Tsoucaris, J.L.Atwood and J. Lipkowski Eds.) Kluwer Acad. Publ., Netherlands. pp. 415-27.
- Farrell, H. M. Jr. and Thompson, M. P. (1971). Biological significance of milk protein polymorphism. *Journal of Dairy Science*, **54**, 1219-28.
- Farrell, H. M. Jr. and Thompson, M. P. (1990). β -Lactoglobulin and α -lactalbumin as potential modulators of mammary cellular-activity - a Ca^{2+} -responsive model system using acid phosphoprotein phosphatases. *Protoplasma*, **159**, 157-67.
- Farrell, H. M. Jr., Jimenez-Flores, R., Bleck, G. T., Brown, E. M., Butler, J. E., Creamer, L. K., Hicks, C. L., Hollar, C. M., Ng-Kwai-Hang, K. F., and Swaisgood, H. E. (2004). Nomenclature of the Proteins of Cows' Milk-Sixth Revision. *Journal of Dairy Science* **87**, 1641–74.
- Flower, D. R. (1996). The lipocalin protein family: structure and function. *Biochemical Journal*, **318**, 1-14.
- Flower, D. R., Anthony C.T. N., Clare E. S. (2000). The lipocalin protein family: structural and sequence overview. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1482**, 9-24.
- Fox, P. F. (2003). Milk proteins: general and historical aspects. In *Advanced dairy chemistry*, Volume 1, *Proteins*, 3rd edn, Part A (P.F. Fox, P.L.H. McSweeney Eds.) Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York pp.1-48.

- Frapin, D., Dufour, E. and Haertli, T. (1993). Probing the fatty acid binding site of β -lactoglobulins. *Journal of Protein Chemistry*, **12**, 443 – 9.
- Garman, E. (2003). “Cool” crystals: macromolecular cryocrystallography and radiation damage. *Current Opinion in Structural Biology*, **13**, 545-51.
- Glasgow, B. J., Abduragimov, A. R., Farahbakhsh, Z. T., Faull, K. F. and Hubbell, W. L. (1995). Tear lipocalins bind a broad array of lipid ligands. *Current Eye Research*, **14**, 363 – 72.
- Gottschalk, M., Nilsson, H., Roos, H. and Halle, B. (2003). Protein self-association in solution: the bovine β -lactoglobulin dimer and octamer. *Protein Science*, **12**, 2404 – 11.
- Gros P., Groendijk H., Drenth J., Hol W.G.J. (1988). Experiments in membrane protein crystallization. *Journal of Crystal Growth* **90**, 193-200.
- Guo, M. R., Fox, P. F., Flynn, A. and Kindstedt, P. S. (1995). Susceptibility of β -lactoglobulin and sodium caseinate to proteolysis by pepsin and trypsin. *Journal of Dairy Science*, **78**, 2336-44.
- Hambling, S. G., McAlpine, A. S. and Sawyer, L. (1992). β -Lactoglobulin. In *Advanced Dairy Chemistry*, Volume 1, *Proteins*, 2nd edn (P. F. Fox , ed.) Barking, Essex : Elsevier Applied Science. pp. 141 – 90.
- Hambraeus, L. and Lönnerdal, B. (2003). Nutritional aspects of milk. In *Advanced dairy chemistry*, Volume 1, *Proteins*, 3rd edn, Part B (P.F. Fox, P.L.H. McSweeney Eds.) Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York pp. 605-45.
- Hoedemaeker, F. J., Visschers, R. W., Alting , A. C., de Kruif, K. G., Kuil, M. E. and Abrahams, J. P. (2002). A novel pH-dependent dimerization motif in β -lactoglobulin from pig (*Sus scrofa*). *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, **D58**, 480 – 6.
- Invernizzi, G., Samalikova, M., Brocca, S., Lotti, M., Molinari, H. and Grandori, R. (2006). Comparison of bovine and porcine β -lactoglobulin: a mass spectrometric analysis. *Journal of Mass Spectrometry* , **41**, 717 – 27.
- Kawabata, T. (2003). MATRAS: a program for protein 3D structure comparison. *Nucleic Acids Research*, **31**, 3367-9.

- Kawabata, T. and Nishikawa, K. (2000). Protein tertiary structure comparison using the Markov transition model of evolution. *Proteins*, **41**, 108 - 22.
- Kontopidis, G., Holt, C. and Sawyer, L. (2002). The Ligand-binding Site of Bovine β -Lactoglobulin: Evidence for a Function? *Journal of Molecular Biology*, **318**, 1043–55.
- Kontopidis, G., Holt, C. and Sawyer, L. (2004). Invited Review: β -Lactoglobulin: Binding Properties, Structure, and Function. *Journal of Dairy Science* **87**, 785–96.
- Konuma, T., Sakurai, K. and Goto, Y. (2007). Promiscuous binding of ligands by β -lactoglobulin involves hydrophobic interactions and plasticity. *Journal of Molecular Biology*, **368**, 209 – 18.
- Kumosinski, T. F. and Timasheff, S. N. (1966). Molecular interactions in β -lactoglobulin. X. The stoichiometry of the β -lactoglobulin mixed tetramerization. *Journal of the American Chemical Society*, **88**, 5635 – 42.
- Kuwata, K., Hoshino, M., Forge, V., Era, S., Batt, C. A. and Goto, Y. (1999). Solution structure and dynamics of bovine β -lactoglobulin A. *Protein Science*, **8**, 2541 – 5.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J., Higgins, D.G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, **23**, 2947-8.
- Loch, J., Polit, A., Gorecki, A., Bonarek, P., Kurpiewska, K., Dziedzicka-Wasylewska, M., Lewinski, K. (2010). Two modes of fatty acid binding to bovine beta-lactoglobulin - crystallographic and spectroscopic studies. *Journal of Molecular Recognition* accepted DOI:10.1002/jmr.1084 (IF 2.776).
- McAipine, A.S. and Sawyer, L. (1990). β -Lactoglobulin: a protein drug carrier? *Biochemical Society Transactions*, **18**, 879.
- McKenna, M. C., Bell, S. K. (2000). Classification of Mammals. Columbia University Press. New York, Chichester, West Sussex. U.S.A
- McKenzie, H. A. and Sawyer, W. H. (1967). Effect of pH on β -lactoglobulins. *Nature (London)*, **214**, 1101 – 4.

- McPherson A., 1999. Crystallization of Biological Macromolecules. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY.
- McPherson A., Malkin A. J., Kuznetsov Y.G., 1995. The science of macromolecular crystallization. *Structure*, **3**, 759-68.
- Miranda, G. and Pelissier, J.-P. (1983). Kinetic studies of *in vivo* digestion of bovine unheated skim-milk proteins in rat stomach. *Journal of Dairy Research*, **50**, 27-36.
- Monaco, H.L., Zanotti, G., Spadon, P., Bolognesi, M., Sawyer, L. and Eliopoulos, E. E. (1987). Crystal structure of the trigonal form of bovine β -lactoglobulin and of its complex with retinol at 2.5 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, **197**, 695 – 706.
- Narayan, M., Berliner, L.J. (1997). Fatty acids and retinoids bind independently and simultaneously to beta-lactoglobulin. *Biochemistry*, **36** (7), 1906–1911.
- Ng-Kwai-Hang, K.E. and Grosclaude, F. (2003). Genetic polymorphism of milk proteins. In *Advanced dairy chemistry*, Volume 1, *Proteins*, 3rd edn, Part B (P.F. Fox, P.L.H. McSweeney Eds.) Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York pp. 739-816.
- Nicholas, K.B., Nicholas, H.B. Jr., Deerfield, D.W. II. (1997). GeneDoc: Analysis and visualization of genetic variation. *EMBnewnews*, **4**,14.
- Oksanen, E., Jaakola, V. P., Tolonen, T., Valkonen, K., Aakerstroem, B., Kalkkinen, N., Virtanen, V. and Goldman, A. (2006). Reindeer β -lactoglobulin crystal structure with pseudo-body-centered noncrystallographic symmetry. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, **D62**, 1369 – 74.
- Palmer, A. H. (1934). The preparation of a crystalline globulin from the albumin fraction of cow's milk. *Journal of Biological Chemistry*, **104**, 359-72.
- Pandya, A. J. and Haenlein, G. F. W. (2009). Bioactive Components in Buffalo Milk. In *Bioactive Components in Milk and Dairy Products* (Young W Park ed), Wiley-Blackwell, Oxford, UK. pp 105-57.

- Papiz, M. Z., Sawyer, L., Eliopoulos, E. E., North, A. C. T., Findlay, J. B. C., Sivaprasadarao, R., Jones, T. A., Newcomer, M. E. and Kraulis, P. J. (1986). The structure of β -lactoglobulin and its similarity to plasma retinol-binding protein. *Nature (London)*, **324**, 383 – 5.
- Pérez, M.D. and Calvo, M. (1995). Interaction of β -lactoglobulin with retinol and fatty acids and its role as a possible biological function for this protein: a review. *Journal of Dairy Science*, **78**, 978-88.
- Pérez, M.D., Devillegas, C.D., Sanchez, L., Aranda, P., Ena, J.M. and Calvo, M. (1989). Interaction of fatty-acids with β -lactoglobulin - and albumin from ruminant milk. *Journal of Biochemistry*, **106**, 1094-7.
- Pérez, M.D., Sanchez, L., Aranda, P., Ena, J.M., Oria, R. and Calvo, M. (1992). Effect of β -lactoglobulin on the activity of pregastric lipase - a possible role for this protein in ruminant milk. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1123**, 151-5.
- Qin, B. Y., Bewley, M. C., Creamer, L. K., Baker, H. M., Baker, E. N. and Jameson, G. B. (1998a). Structural basis of the Tanford transition of bovine β -lactoglobulin. *Biochemistry*, **37**, 14014 – 23.
- Qin, B. Y., Creamer, L. K., Baker, E. N. and Jameson, G. B. (1998b). 12-Bromododecanoic acid binds inside the calyx of bovine β -lactoglobulin. *FEBS Letters*, **438**, 272 – 8 .
- Qin, B. Y., Bewley, M. C., Creamer, L. K., Baker, E. N. and Jameson, G. B. (1999). Functional implications of structural differences between variants A and B of bovine β -lactoglobulin. *Protein Science*, **8**, 75 – 83.
- Ragona, L., Fogolari, F., Catalano, M., Ugolini, R., Zetta, L. and Molinari, H. (2003). EF loop conformational change triggers ligand binding in β -lactoglobulins. *Journal of Biological Chemistry*, **278**, 38840 – 6.
- Ragona, L., Fogolari, F., Zetta, L., Perez, D. M., Puyol, P., de Kruif, K. G., Lohr, F., Ruterjans, H. and Molinari, H. (2000). Bovine β -lactoglobulin: interaction studies with palmitic acid. *Protein Science*, **9**, 1347 – 56.
- Sakurai, K. and Goto, Y. (2002). Manipulating monomer–dimer equilibrium of bovine β -lactoglobulin by amino acid substitution. *Journal of Biological Chemistry*, **277**, 25735 – 40.

- Sakurai, K., Oobatake, M. and Goto, Y. (2001). Salt-dependent monomer–dimer equilibrium of bovine β -lactoglobulin at pH 3. *Protein Science*, **10**, 2325 – 35.
- Sawyer, L. (2003). β -Lactoglobulin. In *Advanced dairy chemistry*, Volume 1, *Proteins*, 3rd edn, Part A (P.F. Fox, P.L.H. McSweeney Eds.) Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York pp.319-86.
- Sawyer, L. and Kontopidis, G. (2000). The core lipocalin, bovine β -lactoglobulin. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1482**, 136–48.
- Sawyer, L., Brownlow, S., Polikarpov, I. and Wu, S-Y. (1998). β -Lactoglobulin: structural studies, biological clues. *International Dairy Journal*, **8**, 65 – 72.
- Sawyer, L., Papiz, M.Z., North, A.C.T. and Eliopoulos, E.E. (1985). The structure and function of bovine beta-lactoglobulin. *Biochemical Society Transactions*, **13**, 265-6.
- Shimoyamada, M., Yoshimura, H., Tomida, K. and Watanabe, K. (1996). Stabilities of bovine β -lactoglobulin/retinol or retinoic acid complexes against tryptic hydrolysis, heating and light-induced oxidation. *Food Science and Technology (Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie)*, **29**, 763-6.
- Stryer, L. (1994). Βιοχημεία. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο. Τόμος πρώτος σσ. 497-498, Τόμος δεύτερος σσ. 619-21.
- Tanford, C. and Nozaki, Y. (1959). Physico-chemical comparison of β -lactoglobulins A and B. *Journal of Biological Chemistry*, **234**, 2874 – 7.
- Tanford, C., Bunville, L. G. and Nozaki, Y. (1959). Reversible transformation of β -lactoglobulin at pH 7.5. *Journal of the American Chemical Society*, **81**, 4032 – 6.
- Uhrínová, S., Smith, M. H., Jameson, G. B., Uhrvn, D., Sawyer, L. and Barlow, P. N. (2000). Structural changes accompanying pH-induced dissociation of the β -lactoglobulin dimer. *Biochemistry*, **39**, 3565 – 74.
- Vilotte, J.L., Whitelaw, C.B.A., Ollivier-Bousquet, M. and Shennan, D.B. (2003). Biosynthesis of milk proteins. In *Advanced dairy chemistry*, Volume 1, *Proteins*, 3rd edn, Part B (P.F. Fox, P.L.H. McSweeney Eds.) Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York pp. 699-718.

- Wang, Q. W. Q., Alien, J. C. and Swaisgood, H. E. (1997). Binding of vitamin D and cholesterol to β -lactoglobulin. *Journal of Dairy Science*, **80**, 1054-9.
- Wang, Q. W. Q., Alien, J. C. and Swaisgood, H. E. (1998). Protein concentration dependence of palmitate binding to β -lactoglobulin. *Journal of Dairy Science*, **81**, 76-81.
- Wu, S. Y., Perez, M. D., Puyol, P. and Sawyer, L. (1999). β -Lactoglobulin binds palmitate within its central cavity. *Journal of Biological Chemistry*, **274**, 170 – 4.
- Yang, M. C., Guan, H. H., Liu, M. Y., Lin, Y. H., Yang, J. M., Chen, W. L., Chen, C. J. and Mao, S. J. T. (2008). Crystal structure of a secondary vitamin D₃ binding site of milk β -lactoglobulin. *Proteins*, **71**, 1197–210.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Τα λιπαρά οξέα αποτελούν μία τάξη ενώσεων οι οποίες περιέχουν μία μακριά αλυσίδα υδρογονανθράκων και μία τελική καρβοξυλική ομάδα. Τα λιπαρά οξέα έχουν τρεις κύριους φυσιολογικούς ρόλους. Πρώτον, είναι οι δομικοί λίθοι των φωσφολιπιδίων και των γλυκολιπιδίων. Αυτές οι αμφιπαθείς ενώσεις είναι σημαντικά συστατικά των βιολογικών μεμβρανών. Δεύτερον, τα παράγωγα των λιπαρών οξέων χρησιμεύουν ως ορμόνες και ως ενδοκυτταρικοί αγγελιοφόροι. Τρίτον, τα λιπαρά οξέα είναι καύσιμα μόρια. Αποθηκεύονται στη μορφή τριακυλογλυκερολών, οι οποίες είναι μη φορτισμένοι εστέρες της γλυκερόλης. Οι τριακυλογλυκερόλες καλούνται επίσης και ουδέτερα λίπη ή τριγλυκερίδια. Τα θηλαστικά δεν είναι σε θέση να μετατρέψουν τα λιπαρά οξέα σε γλυκόζη, γιατί στερούνται μιας πορείας καθαρής παραγωγής οξαλοξικού, πυροσταφυλικού ή άλλων γλυκονεογενετικών ενδιάμεσων από το ακετυλο-CoA.

Τα λιπαρά οξέα που απαντώνται σε βιολογικά συστήματα συνήθως περιέχουν έναν άρτιο αριθμό ατόμων άνθρακα, κυρίως μεταξύ 12 και 24. Η υδρογονανθρακική αλυσίδα είναι χωρίς διακλαδώσεις, σε όλα τα λιπαρά οξέα. Η αλειφατική αλυσίδα είναι δυνατόν να είναι κορεσμένη ή να περιέχει έναν ή περισσότερους διπλούς δεσμούς. Η διαμόρφωση του διπλού δεσμού στα περισσότερα των ακόρεστων λιπαρών οξέων είναι *cis*. Οι διπλοί δεσμοί των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων χωρίζονται από μία τουλάχιστον μεθυλενική ομάδα. Τα λιπαρά οξέα ιοντίζονται στο φυσιολογικό pH και άρα είναι πιο σωστή η αναφορά σε αυτά όπως στα καρβοξυλικά ανιόντα, για παράδειγμα παλμιτικό ή δεκαεξανικό. Στον **πίνακα 1** παρουσιάζονται μερικά από τα λιπαρά οξέα που απαντώνται στα ζώα και χρησιμοποιήθηκαν ως υποστρώματα.

Οι ιδιότητες των λιπαρών οξέων και των λιπιδίων που παράγονται από αυτά εξαρτώνται από το μήκος της αλυσίδας και το βαθμό ακορεστότητάς της. Τα ακόρεστα λιπαρά οξέα έχουν χαμηλότερο σημείο τήξης από τα αντίστοιχα κορεσμένα με αλυσίδα ίδιου μήκους. Για παράδειγμα, το σημείο τήξης του στεατικού οξέος είναι 69,6°C, ενώ του ελαϊκού οξέος (το οποίο περιέχει ένα διπλό δεσμό *cis*) είναι 13,4 °C. Τα σημεία τήξης των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων της σειράς C₁₈ είναι ακόμη πιο χαμηλά. Το μήκος της αλυσίδας επίσης επηρεάζει το σημείο τήξης. Για παράδειγμα, το σημείο τήξης του παλμιτικού οξέος (C₁₆) είναι κατά 6,5

βαθμούς χαμηλότερο από αυτό του στεατικού οξέος (C₁₈). Η βραχεία αλυσίδα και η ακορεστότητα αυξάνουν τη ρευστότητα των λιπαρών οξέων και των παραγώγων τους.

Τα λιπαρά οξέα επιμηκύνονται και καθίστανται ακόρεστα από ενζυμικά συστήματα στη μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου. Η ακορεστότητα απαιτεί NADH και O₂ και φέρεται εις πέρας από ένα σύμπλοκο που αποτελείται από μία φλαβοπρωτεΐνη, ένα κυτόχρωμα και μία πρωτεΐνη με μη αιμικό σίδηρο. Τα ακόρεστα λιπαρά οξέα στα θηλαστικά παράγονται είτε από το παλμιτελαϊκό (16:1), ελαϊκό (18:1) ή από το λινολενικό (18:3). Ο αριθμός των ατόμων του άνθρακα από το ω-άκρο ενός παραγώγου ακόρεστου λιπαρού οξέος προς τον πλησιέστερο διπλό δεσμό πιστοποιεί τον πρόδρομο του. Τα θηλαστικά δεν έχουν τα ένζυμα που εισάγουν διπλούς δεσμούς σε άτομα άνθρακα πέρα από τον C-9 της αλυσίδας λιπαρών οξέων. Επομένως τα θηλαστικά δεν είναι σε θέση να συνθέσουν λινελαϊκό και λινολενικό. Τα οξέα λινελαϊκό και λινολενικό είναι τα δύο απαραίτητα λιπαρά οξέα. Ο όρος «απαραίτητα» αναφέρεται στο γεγονός ότι πρέπει να περιέχονται στη δίαιτα, γιατί απαιτούνται από τον οργανισμό και δεν μπορούν να συντεθούν ενδογενώς. Τα λινελαϊκό και λινολενικό τα οποία λαμβάνονται διατητικά, είναι τα σημεία αφετηρίας για τη σύνθεση μίας ποικιλίας και άλλων ακόρεστων λιπαρών οξέων.

Πίνακας 1. Μερικά από τα λιπαρά οξέα που απαντώνται στα ζώα και χρησιμοποιήθηκαν ως υποστρώματα.

Κοινό όνομα	Χημικός τύπος	Αριθμός ανθράκων	Αριθμός διπλών δεσμών	Σημείο τήξης (°C)
Λαουρικό	CH ₃ (CH ₂) ₁₀ COO ⁻	12	0	44
Μυριστικό	CH ₃ (CH ₂) ₁₂ COO ⁻	14	0	58
Στεατικό	CH ₃ (CH ₂) ₁₆ COO ⁻	18	0	72
Αραχιδικό	CH ₃ (CH ₂) ₁₈ COO ⁻	20	0	77
Ελαϊκό	CH ₃ (CH ₂) ₇ CH=CH(CH ₂) ₇ COO ⁻	18	1	13,4
Λινελαϊκό	CH ₃ (CH ₂) ₄ (CH=CHCH ₂) ₂ (CH ₂) ₆ COO ⁻	18	2	-5
Λινολενικό	CH ₃ CH ₂ (CH=CHCH ₂) ₃ (CH ₂) ₆ COO ⁻	18	3	-11,3
Αραχιδονικό	CH ₃ (CH ₂) ₄ (CH=CHCH ₂) ₄ (CH ₂) ₂ COO ⁻	20	4	-49,5

Λινελαϊκό οξύ. Το Z,Z-στερεοϊσομερές του απαντάται με τη μορφή γλυκεριδίου σε πολλά φυτικά έλαια, στα οποία προσδίδει σε μεγάλο βαθμό ξηραϊνόμενο χαρακτήρα. Έτσι, περιέχεται σε σημαντικές αναλογίες σε πολλά ημι-ξηραϊνόμενα έλαια, όπως είναι το βαμβακέλαιο, το καλαμποκέλαιο, το έλαιο που εξάγεται από τους σπόρους των σταφυλιών, το ηλιέλαιο, το σογιέλαιο κ.ά., των οποίων είναι δυνατό να συνιστά μέχρι και το 70% των λιπαρών τους οξέων. Είναι άχρωμο έως υποκίτρινο υγρό, ειδικού βάρους 0,9 που στερεοποιείται στους -5°C, αδιάλυτο στο νερό, διαλυτό στους περισσότερους οργανικούς διαλύτες. Χρησιμοποιείται στη σαπωνοποιία, στη φαρμακευτική και στη βιομηχανία τροφίμων. Το μίγμα λινελαϊκού και λινολενικού οξέος αναφέρεται συχνά και ως βιταμίνη F.

Το λινολενικό οξύ απαντάται με τη μορφή γλυκεριδίου στα περισσότερα από τα ξηραϊνόμενα έλαια, όπως π.χ. στο λινέλαιο και το κανναβέλαιο, των οποίων αντιπροσωπεύει περισσότερο από το 50% του συνόλου των λιπαρών οξέων τους. Αποτελεί επίσης συστατικό ορισμένων εδώδιμων ελαίων όπως είναι το έλαιο καρυδιών, το σογιέλαιο κ.ά., στα οποία αποτελεί το 6%-15% των λιπαρών οξέων τους. Είναι άχρωμο υγρό, ειδικού βάρους 0,92 που στερεοποιείται στους -11°C, αδιάλυτο στο νερό, διαλυτό στους περισσότερους οργανικούς διαλύτες. Χρησιμοποιείται στη φαρμακευτική και ως συστατικό ξηραϊνόμενων ελαίων.

Το αραχιδονικό οξύ ανήκει στην κατηγορία των απαραίτητων λιπαρών οξέων (και αυτό εντάσσεται στη βιταμίνη F). Τα τριγλυκερίδια του ελαίου της ρέγγας και των άλλων ιχθυελαίων είναι πλούσια σε αραχιδονικό οξύ. Είναι επίσης συστατικό των φωσφολιποειδών των περισσότερων ζωικών οργάνων (συκώτι, εγκέφαλος, αδένες κ.λ.π.) καθώς και του ζωικού αποθηκευμένου λίπους, αλλά δεν υπάρχει στα φυτικά λίπη και έλαια. Πρόδρομος βιοσύνθεσης του αραχιδονικού οξέος είναι το γ-λινολενικό οξύ (3,6,9-δεκαοκτατριενικό) που αρχικά επιμηκύνεται προς ομο-γ-λινολενικό (5,8,11-εικοσιτριενικό) και αυτό μετά αφυδρογονώνεται στη θέση 14 προς αραχιδονικό οξύ. Το αραχιδονικό οξύ είναι η πηγή πολλών πολύ δραστικών μηνυματοφόρων μορίων, όπως οι ορμόνες προσταγλαδίνες αποτελώντας πρόδρομο ένωση για τη βιοσύνθεσή τους.

Το αραχιδικό οξύ (ονομάζεται επίσης αραχικό και αραχινικό οξύ) αποτελεί συστατικό πολλών φυτικών λιπών και ελαίων αλλά σε μικρή αναλογία σε σχέση με άλλα λιπαρά οξέα. Άσπρα κρυσταλλικά φυλλίδια, διαλυτά στον αιθέρα, λίγο διαλυτά στην αιθυλική αλκοόλη και αδιάλυτα στο νερό. Έχει ειδικό βάρος 0,824 και σημείο ζέσης 205 °C (σε πίεση 1mmHg). Παρασκευάζεται από το αραχιδέλαιο που είναι το έλαιο των σπερμάτων της αραχίδας, στα οποία

απαντάται με τη μορφή γλυκεριδίου και χρησιμοποιείται, στην παραγωγή σαπουνιών, κηρών, πλαστικών, στη βιοχημική έρευνα και σε οργανικές συνθέσεις.

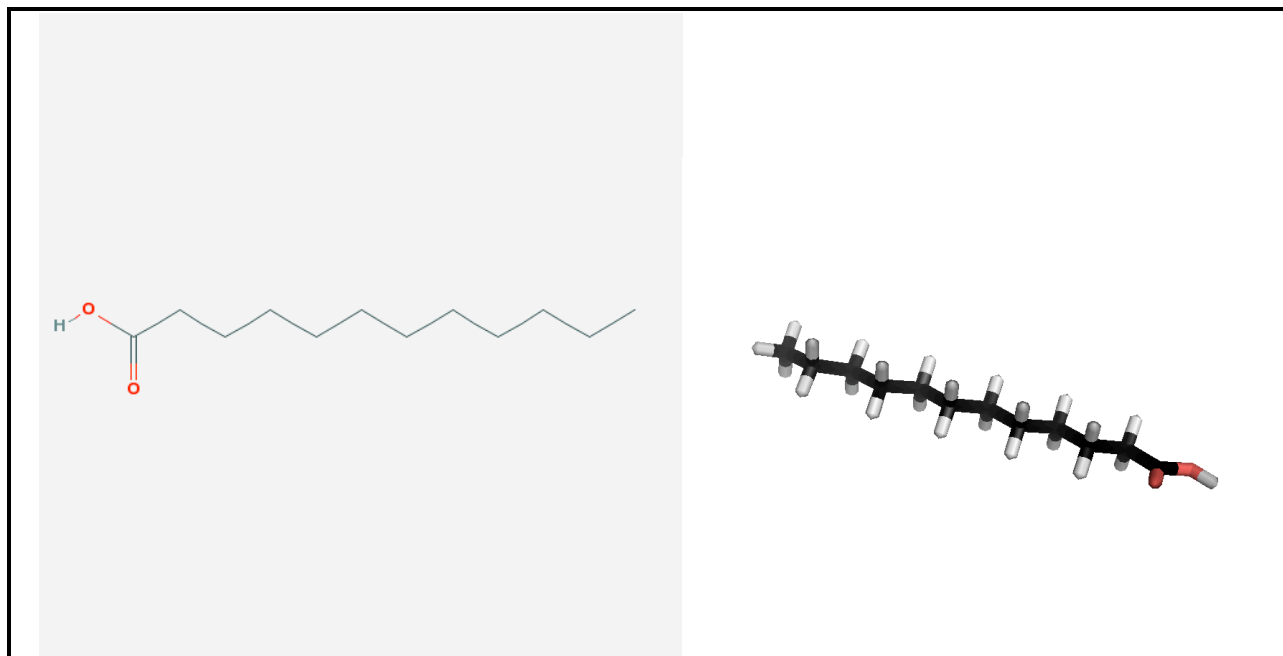
Το μυριστικό οξύ αποτελεί συστατικό του μουσκατίου βουτύρου (75%) με τη μορφή γλυκεριδίου του και του κητείου σπέρματος. Είναι λευκό, κρυσταλλικό στερεό, αδιάλυτο στο νερό, διαλυτό στην αιθυλική αλκοόλη και στον αιθέρα. Χρησιμοποιείται στην αρωματοποιία και στη σαπωνοποιία.

Το μυριστελαϊκό οξύ είναι ένα ωμέγα-5 λιπαρό οξύ. Δεν είναι κοινό στη φύση. Μία από τις κύριες πηγές αυτού του λιπαρού οξέος είναι το έλαιο των σπόρων των φυτών της οικογένειας Myristicaceae στο οποίο αποτελεί πάνω από το 30% σε ορισμένα είδη. Ο κητυλεστέρας του μυριστελαϊκού οξέος έχει βιολογικές ιδιότητες, δρα ως αντιφλεγμονώδες, ως αναλγητικό, καθώς και ως ρυθμιστής του ανοσοποιητικού συστήματος.

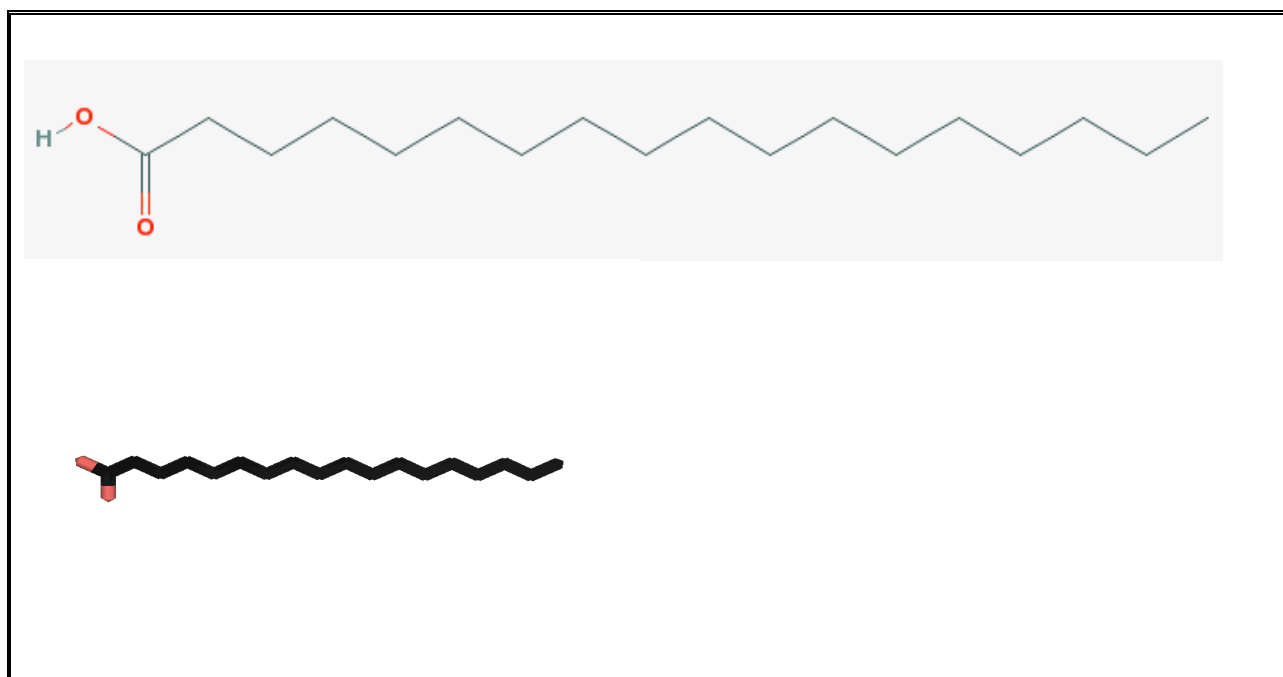
Το ελαϊκό οξύ απαντάται με τη μορφή γλυκεριδίων του, κυρίως σε φυτικά έλαια, όπως είναι π.χ. το ελαιόλαδο, αλλά και σε ζωικά λίπη, από όπου και εξάγεται. Συγκεκριμένα στο ελαιόλαδο, στο αμυγδαλέλαιο και στο αραχιδέλαιο αφρικανικής προέλευσης περιέχεται σε αναλογία της τάξης του 60%. Μικρότερη είναι η περιεκτικότητά του σε άλλα φυτικά έλαια - όπως π.χ. στο φοινικέλαιο- και στα ζωικά λίπη, που κυμαίνεται μεταξύ 25-50%. Παράγεται με υδρόλυση των γλυκεριδίων του. Οι πρώτες ύλες στις οποίες αυτά περιέχονται υποβάλλονται σε κλασμάτωση με ψύξη, οπότε διαχωρίζονται τα γλυκερίδια με υψηλά σχετικά σημεία πήξης (οι στεατίνες) από τα ελαιώδη γλυκερίδια με χαμηλότερα σημεία πήξης (οι ελαΐνες). Ακολουθεί απόσταξη για τον περαιτέρω καθαρισμό του ελαϊκού οξέος που παράγεται με τον παραπάνω τρόπο. Το καθαρό ελαϊκό οξύ είναι άχρωμο ελαιώδες υγρό με ειδικό βάρος 0,895. Όταν ψύχεται κρυσταλλώνεται, ενώ το στερεό ελαϊκό οξύ τήκεται στους 14 °C και έχει σημείο ζέσης 255 °C (σε πίεση 32mmHg). Είναι αδιάλυτο στο νερό, ενώ διαλύεται σε όλους σχεδόν τους οργανικούς διαλύτες, όπως π.χ. αιθυλική αλκοόλη, αιθέρας, χλωροφόρμιο και βενζόλιο. Είναι εύλεκτο, αλλά δεν είναι τοξικό. Αντιδρά με το υδρογόνο, το οποίο ανορθώνει το διπλό δεσμό του μορίου του, μετατρέποντάς το σε στεατικό οξύ-ένας τρόπος παρασκευής στεατικού οξέος-. Χρησιμοποιείται στη σαπωνοποιία, για την παρασκευή καλλυντικών, αλοιφών, λιπαντικών, στυλβωτικών υλικών, σε επικαλύψεις επιφανειών, στη μεταλλουργία κατά τον εμπλουτισμό με επίπλευση των μεταλλευμάτων, σε πρόσθετα τροφίμων, καθώς και σε οργανικές συνθέσεις.

Το στεατικό οξύ απαντάται με τη μορφή γλυκεριδίων (εστέρων του με την γλυκερίνη), από κοινού με το παλμιτικό οξύ και το ελαϊκό οξύ, στα ζωικά λίπη και στα υδρογονωμένα φυτικά έλαια. Το βούτυρο του κακάο περιέχει στεατικό οξύ σε αναλογία μεγαλύτερη από 30%. Τα ζωικά λίπη (π.χ. λαρδί, ξίγγια) περιέχουν 20%-30% στεατικό οξύ, ενώ στα φυτικά λίπη και έλαια, εφόσον δεν έχουν υποβληθεί σε υδρογόνωση, η περιεκτικότητά του είναι γενικά μικρότερη από 6%. Το χημικώς καθαρό στεατικό οξύ είναι λευκό, κηρώδες, κρυσταλλικό στερεό, έχει ειδικό βάρος 0,84. Τήκεται στους 69,6 °C και αποστάζει υπό ελαττωμένη πίεση 1 mmHg στους 183,6 °C. Έχει ασθενή οσμή και γεύση ζωικού λίπους. Είναι αδιάλυτο στο νερό, ενώ διαλύεται στην αιθυλική αλκοόλη, στον αιθέρα, στο χλωροφόρμιο, στο βενζόλιο, στον τετραχλωράνθρακα και στον διθειάνθρακα. Χρησιμοποιείται για την παρασκευή κεριών, καλλυντικών και αφρών ξυρίσματος, λιπαντικών, φαρμακευτικών προϊόντων, υλικών επικαλύψεων, σαπουνιών κ.λ.π.

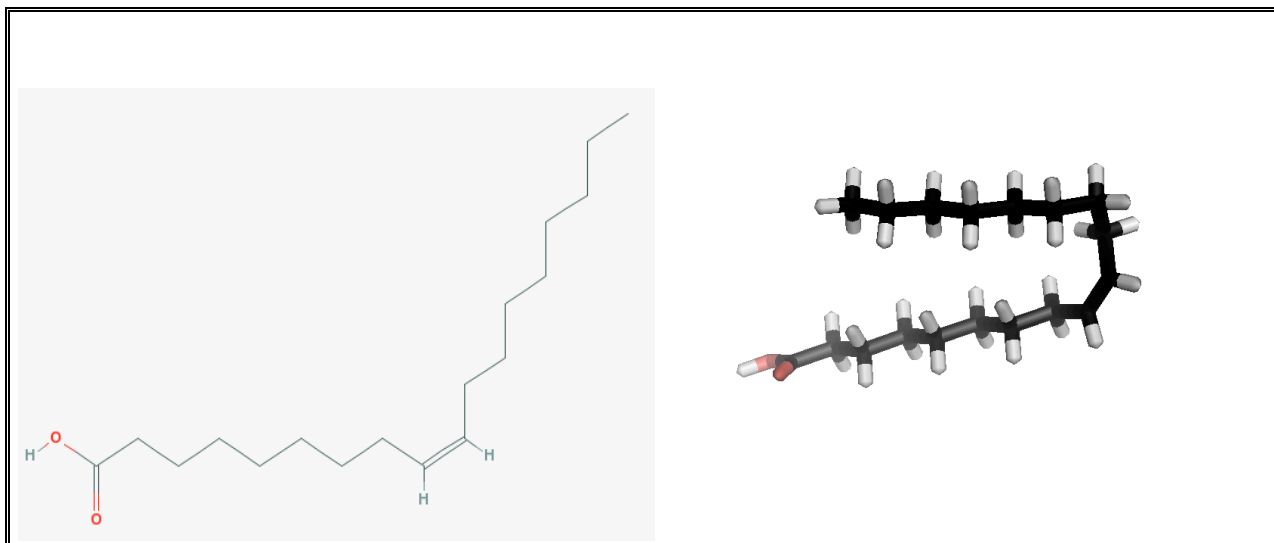
Το λαουρικό οξύ απαντάται με τη μορφή τριγλυκεριδίου του στους καρπούς της δάφνης, στο κοκόλιπος, καθώς και στο κήτειο λίπος με τη μορφή εστέρα του με την κητυλική αλκοόλη. Είναι άχρωμο κρυσταλλικό -βελονόμορφο- στερεό, που τήκεται στους 43 °C και ζέει υπό πίεση 100mmHg στους 225 °C. Είναι αδιάλυτο στο νερό, ευδιάλυτο στην αιθυλική αλκοόλη και στον αιθέρα. Χρησιμοποιείται στη βιομηχανία καλλυντικών, στη σαπωνοποιία, για την παρασκευή ρητινών και εντομοκτόνων, ως μέσο διαβροχής και ως πρώτη ύλη σε οργανικές συνθέσεις.



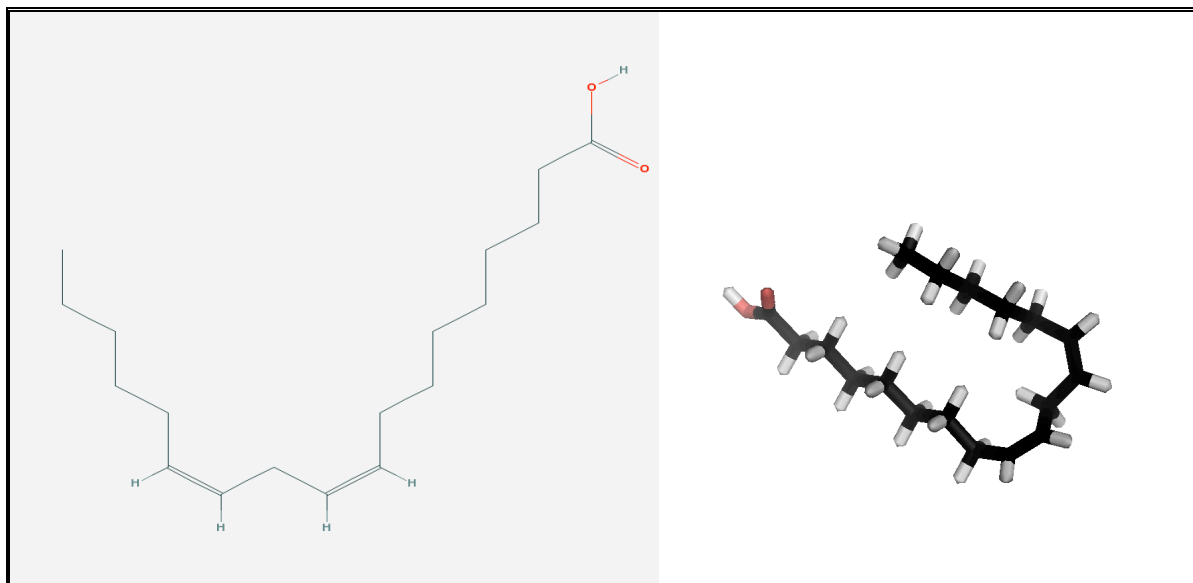
Lauric acid



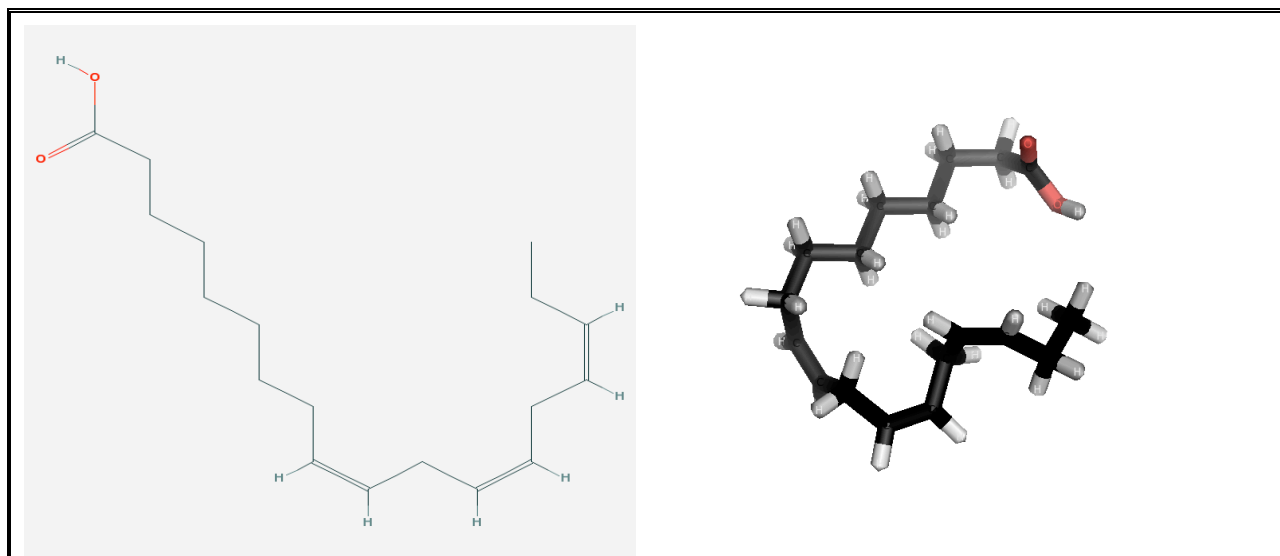
Stearic acid



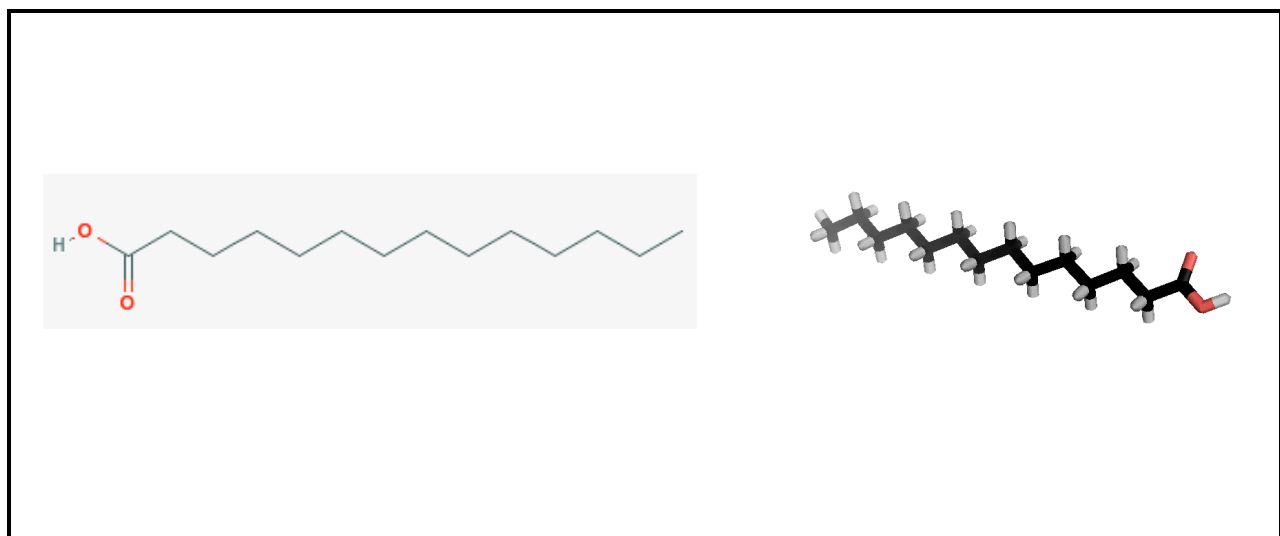
Oleic acid



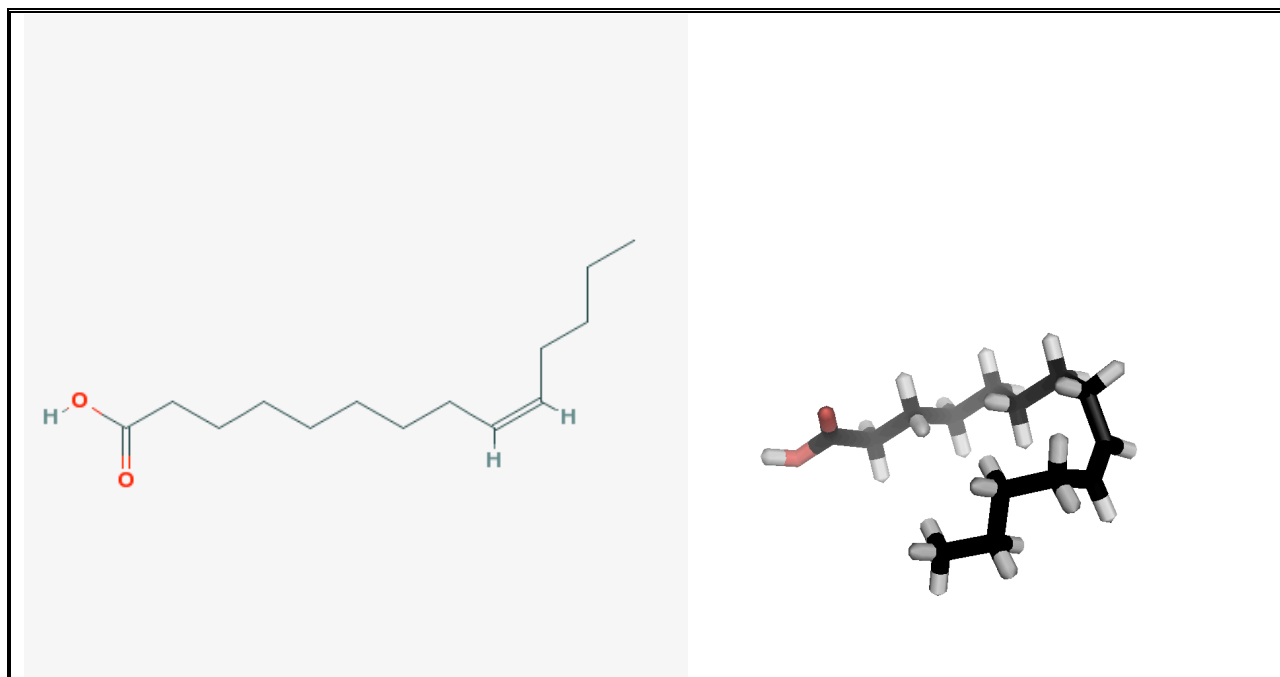
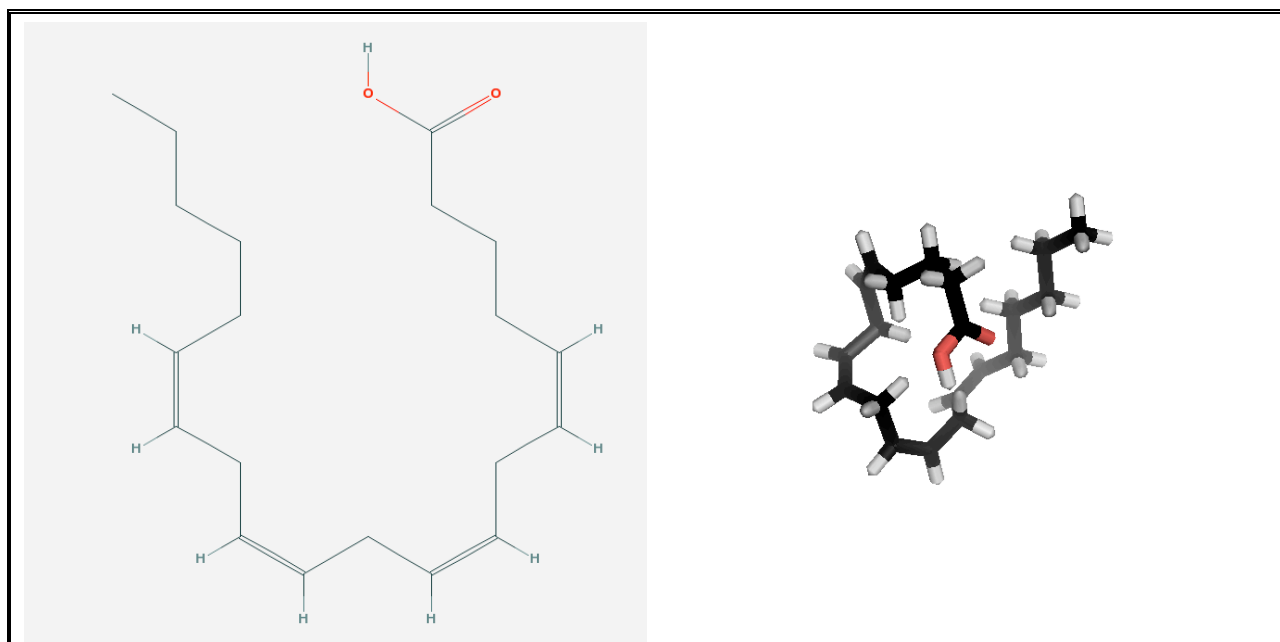
Linoleic acid

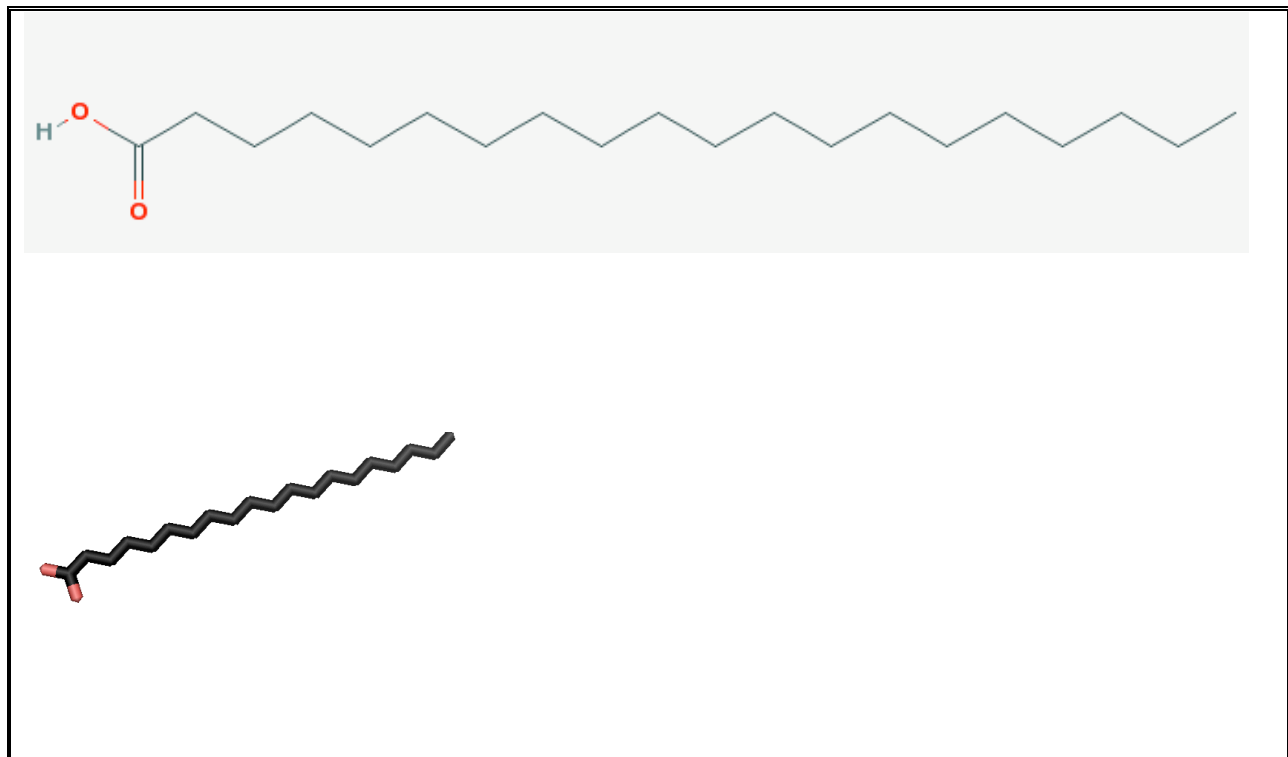


Linolenic acid



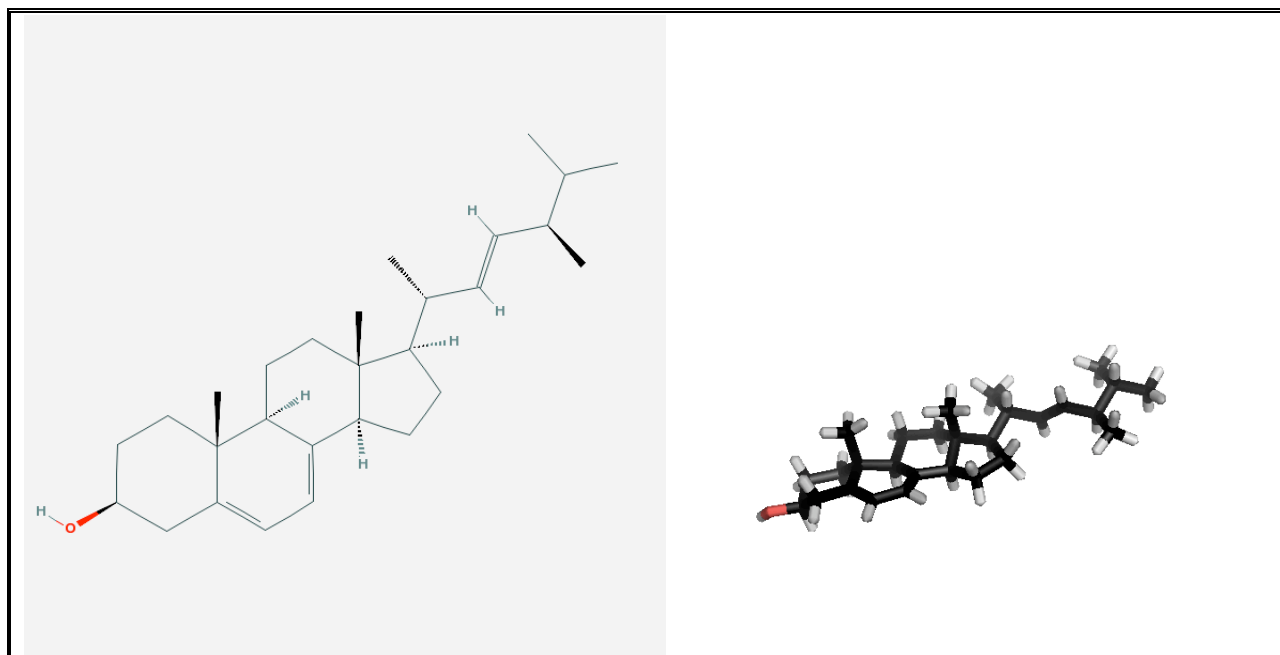
Myristic acid

**Myristoleic acid****Arachidonic Acid**

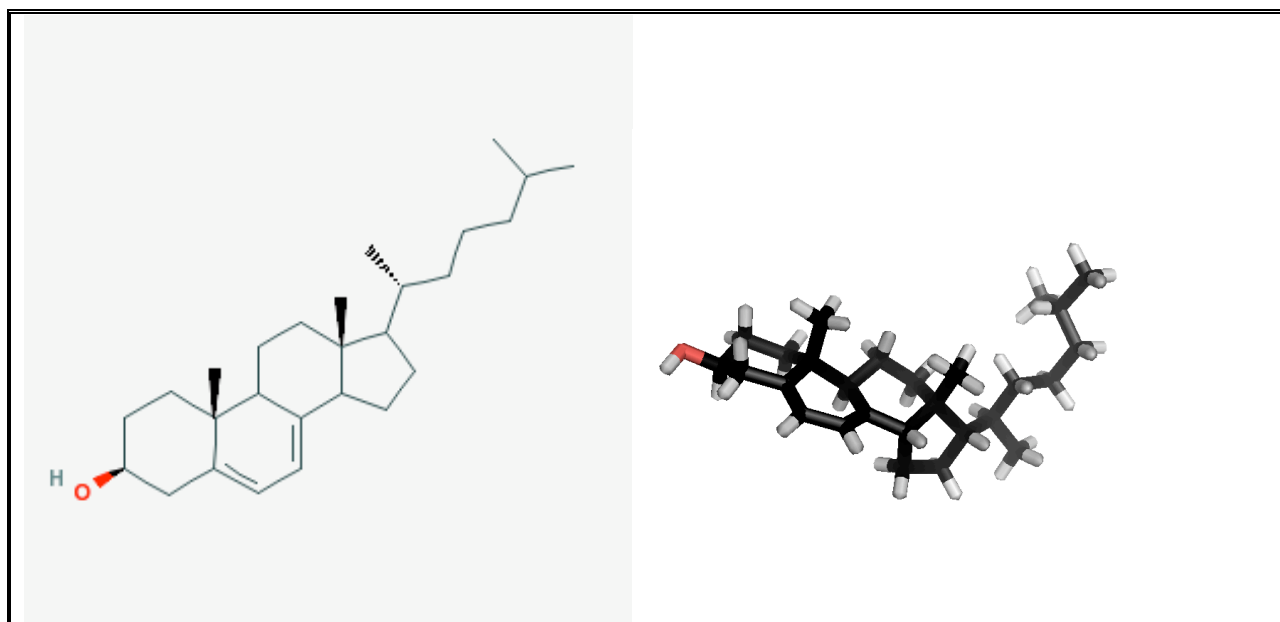


Arachidic Acid

Η βιταμίνη D παίζει σπουδαίο ρόλο στον έλεγχο του μεταβολισμού του ασβεστίου και του φωσφόρου. Πρόδρομο της βιταμίνης D είναι η χοληστερόλη. Η **7-δεϋδροχοληστερόλη** (7-Dehydrocholesterol, προβιταμίνη D₃) φωτολύεται με υπεριώδες φως προς προβιταμίνη D₃, η οποία αυθόρμητα ισομεριώνεται προς βιταμίνη D₃. Η βιταμίνη D₃ (χολοασβεστιοφερόλη) μετατρέπεται στη δραστική ορμόνη ασβεστιοτριόλη (1,25-δεϋδροξυχολοασβεστιοφερόλη), με αντιδράσεις υδροξυλίωσης που λαμβάνουν χώρα στο ήπαρ και τους νεφρούς. Η βιταμίνη D₂ (εργοασβεστιοφερόλη) μπορεί να συντεθεί με έναν παρόμοιο τρόπο αρχίζοντας από την **εργοστερόλη** (Ergosterol, ergosta-5,7,22-trien-3β-ol, προβιταμίνη D₂), μια φυτική στερόλη. Η βιταμίνη D₂ διαφέρει από την D₃ στο ότι έχει ένα διπλό δεσμό μεταξύ C-22 και C-23 και μία C-24 μεθυλομάδα. Η έλλειψη της βιταμίνης D στην παιδική ηλικία προκαλεί ραχίτιδα -περιγράφηκε από τον Daniel Webster το 1645- η οποία χαρακτηρίζεται από ανεπαρκή ασβεστοποίηση του χόνδρου και των οστών. Τα έλαια από ήπαρ ψαριού έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε βιταμίνη D και έτσι το ηπατέλαιο βακαλάου (κοινώς μουρουνέλαιο) χρησιμοποιήθηκε επί χρόνια ως πλούσια πηγή της βιταμίνης. Σήμερα οι πλέον σοβαρές διαιτητικές πηγές της βιταμίνης D είναι τα ενισχυμένα μ'αυτή τρόφιμα. Στις Ηνωμένες Πολιτείες το γάλα είναι ενισχυμένο σε επίπεδο 400 (IU) διεθνών μονάδων (10μg) ανά 250mL.



Ergosterol Provitamin D2



7-Dehydrocholesterol Provitamin D3

Acknowledgment

"The EMBL X13 beamline at the DORIS storage ring, DESY, Hamburg"

"The research leading to these results has received funding from the European Community's Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) under grant agreement n.°226716."