

Univerzitet u Beogradu
Hemijski fakultet

Simeon Minić

„Struktura, biološka aktivnost i interakcije sa proteinama fikocijanobilina i hromosomeptida C-fikocijanina iz cijanobakterije *Arthrospira platensis*“

Doktorska disertacija

Beograd, 2017

University of Belgrade
Faculty of Chemistry

Simeon Minić

**„Structure, biological activity and interactions with proteins of phycocyanobilin
and C-phycocyanin chromopeptides from cyanobacteria *Arthrospira platensis*“**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2017

Komisija za odbranu doktorske disertacije:

Mentori:

dr Tanja Ćirković Veličković, redovni profesor
Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Milan Nikolić, docent
Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Članovi Komisije:

dr Dragana Stanić-Vučinić, naučni savetnik
Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Miloš Milčić, vanredni profesor
Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Mihajlo B. Spasić, naučni savetnik
Institut za biološka istraživanja "Siniša Stanković", Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane:

Zahvalnica

Lista skraćenica i akronima

AA - akrilamid
AAPH - 2,2'-Azobis(2-amidinopropan) dihidrohlorid
ADP - adenzin difosfat
APC - alofikocijanin
APS - amonijum persulfat
AS - amonijum sulfat
ATR - atenuirana totalna refleksija
BPB - bromfenol plavo (od engl. bromophenol blue)
BR - bilirubin
BSA - albumin iz goveđeg seruma (od engl. Bovine Serum Albumin)
CBB - od engl. Coomassie Brilliant Blue
CD - cirkularni dihiroizam
CD25 - klaster diferencijacije 25 (od engl. cluster of differentiation)
CDK - ciklin-zavisna kinaza (od engl. cyclin-dependent kinase)
cGMP - ciklučni guanozin monofosfat
CID - kolizijom indukovana disocijacija (od engl. Collision-Induced Dissociation)
CL - umrežen (od engl. cross-linked)
COX - ciklooksigenaza (od engl. cyclooxygenase)
CXCL2 - hemokin (C-X-C motiv) ligand 2 (od engl. chemokine (C-X-C motif) ligand 2)
DCFH-DA - 2',7'-dihlorodihidrofluorescin diacetat (od engl. 2' 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate)
DEAE - dietilaminoetanol
DMH - dimetilhidrazin
DMSO - dimetil sulfoksid
DNK - deoksiribonukleinska kiselina
DTGS - deuterisani triglicin sulfat
EAE - eksperimentalni autoimuni encefalomijelitis
EPR - elektronska paramagnetna rezonancija
ERK - ekstracelularnim signalom regulisana kinaza
ESI - elektrosprej jonizacija (od engl. Electrospray Ionization)
FA - masna kiselina (od engl. fatty acid)
FDA - Agencija za hranu i lijekove (od engl. Food and Drug Administration)
Foxp3 - (od engl. forkhead box P3)
FT-IR - infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom
GAPDH - gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza (od engl. glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)
GIT - gastrointestinalni trakt

HER - receptor za humani epidermalni faktor rasta
HESI - elektrosprej jonizacija zagrijavanjem (od engl. Heated Electrospray Ionization)
HMOX - hem oksigenaza (heme oxygenase)
HPLC - tečna hromatografija visokih performansi (od engl. High Performance Liquid Chromatography)
HSA - albumin iz humanog seruma (od engl. Human Serum Albumin)
ICAM - unutarćelijski adhezioni molekul (od engl. Intercellular Adhesion Molecule)
Ig - imunoglobulin
IL - interleukin
iNOS - inducibilna azot-monoksid sintaza (od engl. Inducible Nitric Oxide Synthase)
ITC - izotermalna titraiona kalorimetrija (od engl. Isothermal Titration Calorimetry)
I κ B- α - inhibitor NF-kappaB kinaza alfa
JNK - c-Jun N-terminalna kinaza
LED - dioda koja emituje svjetlost (od engl. Light-Emitting Diode)
LPS - lipopolisaharid
LT - leukotrien
MALDI - matriksom potpomognuta jonizacija desorpcijom laserom (od engl. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization)
MDA - malondialdehid
MDR – rezistencija na više lijekova (od engl. multidrug resistance)
Me - metal
MEK - mitogenom-aktivirana proteinska kinaza
MRE - prosječni elepticitet po aminokiselinskom ostatku (od engl. Mean Residue Ellipticity)
MS - masena spektrometrija
MST - termoforeza na mikroskali (od engl. microscale thermophoresis)
MTT - 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid
NADPH - redukovani nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NAD - nikotinamid adenin dinukleotid
NF-kB - nuklearni faktor kapa lakog lanca koji stimulise aktivirane B ćelije (od engl. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cell)
NHS - N-Hidroksisukcinimid
ODC - ornitin-dekarboksilaza (od engl. Ornithine decarboxylase)
ORAC - od engl. Oxygen Radical Absorbance Capacity
PAA - poliakrilamid
PARP - NAD⁺ zavisna ADP-riboziltransferaza (od engl. poly ADP ribose polymerase)
PBS - fosfatom puferisan fiziološki ratsvor (od engl. Phosphate-Buffered Saline)
PC - fikocijanin
PCB - fikocijanobilin
PDT - fotodinamska terapija (od engl. photodynamic therapy)

PE - fikoeritrin
PGE - prostanglandin E
PMSF - fenilmetilsulfonil fluorid (od engl. phenylmethylsulfonyl fluoride)
PTEN - homolog fosfataze i tenzina deletiran na hromozomu 10 (od engl. phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10)
PZU - pufer za pripremu uzorka
RNK - ribonukleinska kiselina
ROS - reaktivne vrste kiseonika (od engl. Reactive Oxygen Species)
RP-HPLC - reverzno-fazna tečna hromatografija visokih performansi (od engl. Reverse phase High Performance Liquid Chromatography)
RT-PCR - reakcija lančanog umnožavanja, kojoj prethodi reverzna transkripcija (od engl. Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction)
SAD - Sjedinjene Američke Države
SDS PAGE - natrijum-dodecil sulfat poliakrilamidna gel elektroforeza (od engl. Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis)
SGF - simulirana želudačna tečnost (od engl. Simulated Gastric Fluid)
SOD - superoksid dismutaza
SPR - rezonancija površinskog plazmona (od engl. Surface Plasmon Resonance)
STAT - protein koji učestvuje u signalnoj transdukciji i aktivaciji transkripcije (od engl. Signal Transducer and Activator of Transcription)
SV - Stern-Volmer
TBT - tributilin
TCA - trihlorsirćetna kiselina (od engl. trichloroacetic acid)
TE - troloks ekvivalent
TEC - termoelektrično hlađenje (od engl. thermoelectric cooling)
TEMED - tetrametiletildiamin
TG - transglutaminaze
TGF- β -faktor transformacije rasta β (od engl. Transforming Growth Factor beta)
Tm - temperatura topljenja (od engl. melting temperature)
TNF- α - faktor nekroze tumora alfa
TPA - 12-O-tetradekanoil-forbol-13-acetat
TPCK - tozil fenilalanil hlorometil keton (od engl. Tosyl Phenylalanyl Chloromethyl Ketone)
UV/VIS - ultraljubičasta/vidljiva svjetlost (od engl. ultraviolet/visible)
VASP - fosfoprotein koji stimulira vazodilataciju (od engl. vasodilator-stimulated phosphoprotein)
VEGF - vaskularno endotelni faktor rasta (Vascular Endothelial Growth Factor)

Sažetak

Arthrospira (Spirulina), fotosintetska filamentozna cijanobakterija, koristi se u ishrani čovjeka od davnina. To je jedan od najbogatijih izvora proteina i esencijalnih amino kiselina, kao i izvanredan izvor vitamina, makro- i mikro-elemenata, esencijalnih masnih kiselina, pigmenata, glikolipida i polisaharida. C-fikocijanin (C-PC), najzastupljeniji protein u Spirulini, je u vodi rastvoran heterodimerni molekul koji se odlikuje intezivnom fluorescencijom. Njegova plava boja potiče od kovalentno vezane (tioetarskom vezom) tetrapiroalne hromofore fikocijanobilina. Jedan molekul PCB-a je vezan za α subjedinicu preko cisteinskog ostatka 84, dok β subjedinica vezuje dva molekula hromofore preko cisteinskih ostataka 82 i 153. Brojne studije su pokazale da C-PC ima značajne antioksidativne, anti-inflamatorne, imunomodulatorne i antikancerogene efekte. Štaviše, PCB *per se* ispoljava različite biološke aktivnosti koje mogu poboljšati zdravlje ljudi. U literaturi ne postoje podaci o strukturi i bioaktivnosti digestijom oslobođenih peptida sa vezanom hromoforom (hromopeptida), kao ni informacije o vezivanju PCB-a za humani (HSA) i goveđi (BSA) serum albumin, glavne proteine plazme i model sisteme za proučavanje protein-ligand interakcija.

Prvi dio ove doktorske disertacije imao je za zadatak ispitivanje digestibilnosti (C-PC-a) pepsinom, kao i određivanje strukture i ispitivanje bioaktivnih svojstava hromopeptida dobijenih nakon digestije C-PC-a, izolovanog i prečišćenog iz komercijalnog praha *Arthrospira platensis*. SDS-PAGE pod redukujućim uslovima je pokazala da se hromoprotein brzo digestuje pepsinom u simuliranoj želudačnoj tečnosti. HPLC analiza digesta je pokazala postojanje pet dominantnih hromopeptidnih frakcija. Struktura oslobođenih hromopeptida je određena primjenom tandemske masene spektrometrije i peptidi, sa varijacijom u veličini od 2 do 13 aminokiselinska ostatka, su identifikovani u obje subjedinice C-PC-a. Utvrđeno je da sve hromopeptidne frakcije ispoljavaju odličnu antioksidativnu (ORAC esej i test ukupne redukujuće moći) i Cu^{2+} -helirajuću aktivnost (studija gašenja fluorescencije), kao i značajne citotoksične efekte (MTT esej vijabilnosti) na ćelijskim linijama humanog cervikalnog adenokarcinoma i epitelnog kancera kolona. Zaključeno je da digestija pepsinom oslobađa biološki aktivne hromopeptide iz C-PC-a, čija je aktivnost u najvećoj mjeri zasnovana na njihovom antioksidativnom potencijalu.

U drugom dijelu ove disertacije, najpre je okarakterisano vezivanje (prethodno izolovanog) PCB-a za HSA, a zatim je ispitan uticaj liganda na stabilnost proteina. Metoda

molekulskog dokinga je ukazala na dva visoko-afinitetna vezivna džepa na HSA za molekul PCB-a. Predviđena vezivna mjesta su identična sa onima (subdomeni IB i IIA), identifikovanim za bilirubin, strukturni analog PCB-a. Rezultati dobijeni mjerenjima fluorescencije proteina i pigmenta, cirkularnog dihroizma (CD) i studijama kompeticije su potvrdili visoko-afinitetno (vezivna konstanta $2,2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ na 25°C), stereoselektivno vezivanje *M* konformera PCB-a za HSA, kao i njegovu kompeticiju sa bilirubinom, varfarinom (marker za IIA mjesto) i heminom (marker za IB mjesto). Ovi eksperimentalni rezultati ukazuju da se PCB vezuje za IB i IIA mjesta na molekulu HSA, sa afinitetom veoma sličnim bilirubinu. Podaci dobijeni spektrofotometrijskom titracijom su potvrdili stehiometriju vezivanja PCB-a za HSA ($n=2$). Dobijeni rezultati ukazuju da u uslovima visoke koncentracije bilirubina u plazmi, ili uzimanjem lijekova koji se vezuju za mjesta IB i/ili IIA, farmakokinetika PCB takođe može biti izmjenjena. Dalje je pokazano da vezivanje PCB za HSA dovodi do finih strukturnih promjena u proteinu i ligandu. Na osnovu mjerenja apsorbancije pigmenta je nađeno da PCB nakon vezivanja ima izduženiju konformaciju u odnosu na slobodnu formu. S druge strane, vezivanje liganda povećava temperaturnu (CD i fluorescentne krive topljenja) i proteolitičku stabilnost (studije digestije tripsinom), kao i sadržaj α -heliksa (rezultati dobijeni snimanjem CD i FT-IR spektara) proteina. Shodno tome, dobijeni rezultati ukazuju da bi vezivanje PCB za HSA *in vivo* moglo stabilizovati protein i povećati njegov poluživot u plazmi.

Treći dio ovog rada imao je za cilj da se prouči vezivanje PCB za BSA, ispita uticaj formiranja protein-ligand kompleksa na stabilnost oba intereagujuća partnera i, na kraju, uporedi vezivanje PCB za serum albumin čoveka i govečeta. Studija gašenja fluorescencije proteina i termoforeza na mikroskali je pokazala visoko afinitetno vezivanje ($K_a = 2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$) PCB za BSA. Studija molekulskog dokinga je ukazala na dva vezivna mjesta PCB na BSA: u međudomenskoj šupljini (između domena I i III) i subdomenu IB. I u ovom model sistemu je spektrofotometrijska titracija potvrdila stehiometriju vezivanja 2:1 u korist liganda, dok je CD spektroskopija ukazala na stereo-selektivno vezivanje *P* konformera pigmenta za protein. U kompleksu sa PCB-om i BSA ima veću temperaturnu stabilnost. Iako formiranje kompleksa djelimično maskira antioksidativnu aktivnost PCB-a i BSA, utvrđeni su uzajamni zaštitni efekti od oksidacije indukovane slobodnim radikalima. Pokazano je i da PCB u zasićujućim koncentracijama diskretno povećava otpornost proteina na digestiju pepsinom. Zaključeno je da

BSA može poslužiti kao pogodan sistem za isporuku PCB-a, koji se može iskoristiti za bojenje hrane ili kao bioaktivna komponenta. Navedeni rezultati ukazuju i na suptilne razlike između vezivanja PCB za HSA i BSA.

Uzevši sve navedeno u obzir, rezultati ove doktorske disertacije daju nove uvide u biodostupnost, distribuciju i bioaktivne karakteristike C-PC-a i/ili PCB-a i zato imaju kako fundamentalni, tako i mogući primjenjeni značaj u oblasti biohemije hrane.

Ključne riječi: C-fikocijanin, fikocijanobilin, hromopeptidi, humani serum albumin, goveđi serum albumin, protein-ligand interakcije, stabilnost proteina, spektrofluorimetrija, masena spektrometrija, antioksidativna aktivnost, antikancerogena aktivnost.

Naučna oblast: Hemija

Uža naučna oblast: Biohemija

Abstract

Arthrospira (Spirulina), photosynthetic, filamentous cyanobacteria, has been used as food for centuries. It is one of the the richest known natural source of proteins and essential amino acids, excellent source of vitamins, macro- and micro-elements, pigments, essential fatty acids, glycolipids, and polysaccharides. C-phycoyanin (C-PC), the most abundant protein of Spirulina, is highly fluorescent and water-soluble heterodimeric protein. Its blue color arises from covalently attached (*via* thioether bond) tetrapyrrole chromophore phycocyanobilin (PCB). One PCB molecule is attached to α -subunit via Cys 84, while β -subunit binds two molecules of PCB via cysteines 82 and 153. Numerous studies have shown C-PC exhibit significant antioxidative and free radical-scavenging properties, anti-inflammatory, immunomodulatory and anti-cancer effects. Furthermore, PCB itself exhibits various strong health-promoting activities. There are no literature data evaluating structure and bioactivities of peptides with bound chromophore (chromopeptides) released in C-PC digest, nor information on the PCB binding to HSA and BSA, major plasma proteins and model systems for studying protein-ligand interactions.

First part of this thesis examined the structures and bioactivities of chromopeptides obtained by pepsin digestion of C-PC, isolated from commercial *Arthrospira platensis* powder. SDS-PAGE under reducing conditions has shown that chromoprotein is rapidly digested by pepsin in simulated gastric fluid. HPLC analyses of digest revealed five major chromopeptide fractions. The structure of released chromopeptides was analyzed by high resolution tandem mass spectrometry and peptides varying in size from 2 to 13 amino acid residues were identified in both subunits of C-PC. It was shown that all chromopeptide fractions have excellent antioxidant (ORAC and reducing power test) and Cu^{2+} -chelating (fluorescence quenching study) activities, and show significant cytotoxic effect (MTT viability assay) on human cervical adenocarcinoma and epithelial colonic cancer cell lines. Therefore, obtained results demonstrate that digestion by pepsin releases biologically active chromopeptides from C-phycoyanin whose activity is mostly related to the antioxidative potency provided by chromophore.

In the second part, binding of PCB to HSA was studied, as well as effects of ligand binding on protein stability. Based on a computational approach (molecular docking), we demonstrated two putative high-affinity binding pockets on HSA for PCB chromophore. Predicted binding sites were identical to the two previously identified binding sites for structural

analog bilirubin (subdomains IB and IIA). Results obtained by protein and pigment fluorescence measurements, CD, and fluorescence competition experiments confirmed high affinity (binding constant of $2.2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ at 25°C), stereoselective binding of *M*-conformer of PCB to HSA, and its competition with bilirubin, warfarin (IIA site marker) and hemin (IB site marker) for binding to protein. Therefore, our experimental data confirm that PCB binds to IB and IIA binding site of HSA with an affinity similar to bilirubin. Spectrophotometric titration experiments also confirmed stoichiometry of PBC binding to HSA ($n=2$). These results suggest that in conditions characterized by an increased bilirubin plasma concentration, or intake of drugs binding to IB or IIA binding site, pharmacokinetics of PCB may also be changed. Furthermore, binding of PCB to HSA induces structural changes in the protein and in the ligand. UV-visible absorbance measurements indicate that bound PCB has more stretched conformation in comparison to free form. Experimental data have shown increase in thermal (CD and fluorescence melting curves data) and proteolytic stability (trypsin digestion study data), as well as the α -helical content (CD and FT-IR spectra data) of the protein upon ligand binding. Therefore, obtained results directly imply that binding of PCB to HSA may provide higher protein's stability and longevity in plasma.

Third part of this PhD thesis has dealt with binding of PCB to BSA and how it affects protein and ligand stability. Protein fluorescence quenching and microscale thermophoresis demonstrated high-affinity binding ($K_a = 2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ at 25°C). Spectroscopic titration with molecular docking analysis revealed two binding sites on BSA, at the inter-domain cleft (between domains I and III) and at the subdomain IB, while CD spectroscopy indicated the stereo-selective binding of *P* conformer of pigment to protein. In complex with PCB protein has increased thermal stability. Although complex formation partly masked antioxidant properties of PCB and BSA, mutual protecting effect against free radical-induced oxidation was found. According to here reported results BSA could serve as a suitable delivery system for PCB as food colorant and bioactive component. Our results also point to subtle differences between PCB binding for bovine vs. human serum albumin.

Taken together, these results give new insights into bioavailability, distribution and bioactive properties of C-PC and/or its PCB chromophore and have fundamental significance and applicative potential in the field of food biochemistry.

Keywords: C-phycoerythrin, phycoerythrin, chromopeptides, human serum albumin, bovine serum albumin, protein-ligand interactions, protein stability, fluorescence spectroscopy, mass spectrometry, antioxidant activity, anticancer activity.

Scientific field: Chemistry

Subfield: Biochemistry

Sadržaj

1. Uvod (predmet i cilj rada)	1
2. Opšti dio	3
2.1 C-Fikocijanin kao prirodni pigment algi: struktura, funkcija i stabilnost	3
2.1.1 Spirulina kao izvor prirodnih pigmenata	4
2.1.2 Fiziološke uloge fikobilinoproteina	5
2.1.3 Struktura C-fikocijanina	6
2.1.4 C-Fikocijanin: stabilnost i spektroskopske karakteristike	9
2.2. Potencijalne primjene C-PC-a i PCB-a	12
2.2.1 Benefiti C-fikocijanina i fikocijanobilina po zdravlje ljudi	12
2.2.1.1 C-fikocijanin i fikocijanobilin kao antioksidanti	12
2.2.1.2 Antikancerogeni efekti C-fikocijanina i fikocijanobilina	15
2.2.1.3 Antiinflamatorno i imunomodulatorno djelovanje C-fikocijanina	21
2.2.2 Upotreba fikocijanina i fikocijanobilina u industriji hrane	24
2.2.3 C-Fikocijanin kao fluorescentni obilježivač	25
2.3 Pristupi u proučavanju digestibilnosti proteina	26
2.3.1 Biodostupnost i digestibilnost C-fikocijanina	28
2.3.2 Bioaktivni peptidi	29
2.3.3 Masena spektrometrija kao tehnika za određivanje sekvence proteina i peptida	31
2.3.3.1 Sekvenciranje peptida tandemskom masenom spektrometrijom	32
2.4 Albumini iz humanog i goveđeg seruma	33
2.4.1 Vezivanje bilirubina za HSA	36
2.5 Metode za proučavanje protein-ligand interakcija	39
2.5.1 UV/VIS spektrofotometrija	39
2.5.2 CD spektroskopija	40
2.5.3 Spektrofluorimetrija	41
2.5.4 Termoforeza na mikroskali	45
2.5.6 Rezonancija površinskog plazmona	47
2.5.7 Ostale eksperimentalne tehnike	47

2.5.8 Molekulski doking	47
3. Eksperimentalni dio	49
3.1 Postupak za izolovanje fikocijanobilina iz Spiruline	49
3.2 Izolovanje i prečišćavanje C-PC-a iz Spiruline	51
3.2.1 Dobijanje sirovog ekstrakta i taloženje proteina amonijum-sulfatom	51
3.2.2 Jonoizmjenjivačka hromatografija	52
3.2.3 Gel filtracija	53
3.2.4 Provjera prečišćenosti C-fikocijanina UV/VIS spektrofotometrijom i SDS-PAGE-om	53
3.3 Pepsinska digestija prečišćenog C-fikocijanina: izolovanje hromopeptida, određivanje njihove sekvence masenom spektrometrijom i testiranje biološke aktivnosti	55
3.3.1 Pepsinska digestija prečišćenog C-fikocijanina	56
3.3.2 Ispitivanje kinetike digestije C-PC-a pomoću SDS-PAGE	56
3.3.3 Izolovanje hromopeptidnih frakcija iz pepsinskog digesta pomoću semipreparativnog HPLC-a	57
3.3.4 Određivanje aminokiselinske sekvence hromopeptida	58
3.3.5 Kvantifikacija hromopeptida	58
3.3.6 Ispitivanje antioksidativne aktivnosti hromopeptida	59
3.3.6.1 ORAC test	59
3.3.6.2 Test ukupne redukujuće moći	59
3.3.6.3 Određivanje konstante vezivanja Cu^{2+} jona za hromopeptide, C-PC i PCB	59
3.3.7 Test citotoksičnosti	60
3.3.8 Statistička analiza	61
3.4 Ispitivanje vezivanja PCB-a za HSA i BSA: Teorijski i eksperimentalni pristupi	61
3.4.1 Određivanje pK_a vrijednosti PCB-a teorijskim pristupom	61
3.4.2 Molekulski doking PCB-HSA i bilirubina-HSA sistema	62
3.4.3 Molekulski doking PCB-a za BSA	64
3.4.4 Snimanje fluorescentnih spektara	64
3.4.5 Određivanje konstante vezivanja PCB-a za BSA korišćenjem termoforeze na mikroskali	67
3.4.6 Određivanje stehiometrije vezivanja PCB-a za BSA i HSA upotrebom UV/ VIS spektrofotometrije	67

3.4.7 Snimanje CD spektara	68
3.4.8 Snimanje FT-IR spektara	68
3.5 Ispitivanje uticaja formiranja protein-ligand kompleksa na stabilizaciju intereagujućih partnera	69
3.5.1 Ispitivanje uticaja PCB-a na temperaturnu stabilnost HSA i BSA	70
3.5.1.1 CD mjerenja	70
3.5.1.2 Fluorescenta mjerenja	70
3.5.2 Tripsinska digestija HSA	70
3.5.3 Pepsinska digestija BSA	71
3.5.4 Praćenje oksidacije BSA i PCB-a	71
3.6 Ispitivanje uticaja formiranja kompleksa BSA-PCB na antioksidativnu aktivnost liganda	72
3.6.1 ORAC test	72
3.6.2 Test ukupne redukujuće moći	72
4. Rezultati	74
4.1 Pepsinska digestija C-fikocijanina oslobađa biološki aktivne hromopeptide	74
4.1.1 C-PC se brzo digestuje pepsinom	74
4.1.2 Identifikacija hromopeptida dobijenih pepsinskom digestijom	75
4.1.3 Antioksidativna aktivnost izolovanih hromopeptida	77
4.1.4 Citotoksičnost hromopeptida na kancerskim ćelijskim linijama	79
4.2 Fikocijanobilin se visokim afinitetom, uz kompeticiju sa bilirubinom, vezuje za HSA. Vezivanjem liganda struktura proteina postaje stabilnija.	80
4.2.1 Izračunavanje pKa vrijednosti fikocijanobilina	80
4.2.2 Studija dokinga je pokazala da se PCB i bilirubin visokim afinitetom za subdomene IB i IIA na HSA	81
4.2.3 PCB se vezuje za HSA i gasi njegovu fluorescenciju	84
4.2.4 Tip vezivanja PCB-a za HSA	85
4.2.5 Vezivanje PCB-a za HSA mjenja okruženje ostatka Trp-214	86
4.2.6 Vezivanje PCB-a za HSA dovodi do promjena u apsorpcionim, fluorescentnim i CD spektrima pigmenta	86
4.2.7 PCB kompetira sa bilirubinom i markerima specifičnim za mjestom za vezivanje za HSA	89
4.2.8 Konformacija HSA se mjenja nakon vezivanja PCB-a	91
4.2.9 Vezivanje PCB-a povećava temperaturnu stabilnost HSA	93

4.2.10 Otpornost HSA-PCB kompleksa na digestiju tripsinom	94
4.3 Fikocijanobilin se vezuju visokim afinitetom i za BSA, uz razlike u mjestu vezivanja. Vezivanje dovodi do stabilizacije i proteina i liganda.	95
4.3.1 PCB gasi sopstvenu fluorescenciju BSA	95
4.3.2 PCB mjenja termoforetsku pokretljivost BSA	97
4.3.3 Dodatak BSA mjenja apsorpcione i CD spektre PCB-a	98
4.3.4 Molekulski doking pokazuje dva vezivna mjesta za PCB na BSA-u	99
4.3.5 Vezivanje PCB-a povećava temperaturnu stabilnost BSA	100
4.3.6 Formiranje BSA-PCB kompleksa vodi ka uzajamnoj zaštiti proteina i pigmenta od oksidacije indukovane slobodnim radikalima	101
4.3.7 Vezivanje PCB-a dovodi do diskretnih promjena u digestivnoj stabilnosti BSA	103
4.3.9 Formiranje kompleksa BSA-PCB maskira antioksidativnu aktivnost BSA i PCB-a	104
5. Diskusija	105
5.1 Pepsinska digestija C-fikocijanina oslobađa biološki aktivne hromopeptide	105
5.2 Fikocijanobilin se visokim afinitetom vezuje za HSA i kompetira sa bilirubinom za vezivanje na proteinu. Formiranje protein-liganda kompleksa čini strukturu HSA stabilnijom.	109
5.3 Fikocijanobilin se vezuje visokim afinitetom za BSA. Proces vezivanja dovodi do stabilizacije proteina i liganda.	116
6. Zaključci	122
7. Literatura	124
8. Prilog	146

1. Uvod (predmet i cilj rada)

Arthrospira platensis (Spirulina) je fotosintetska, prokariotska, simbiotska modroz zelena alga (cijanobakterija po novoj klasifikaciji) spiralnog oblika, koja postoji na Zemlji oko 3,5 milijardi godina. Kao dijetetski suplement pokazuje niz benefita po zdravlje ljudi. Izuzetno je bogata proteinima, vitaminima, mineralima, esencijalnim masnim kiselinama, ali i prirodnim pigmentima (hlorofili, karotenoidi i fikobilini). U posljednje vrijeme, prirodnim pigmentima iz algi se posvećuje sve više pažnje, kako u stručnoj javnosti, tako i u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji, prevashodno zbog njihove snažne antioksidativne aktivnosti, ali i ostalih, ne manje značajnih, bioloških aktivnosti koje posjeduju. Jedan od najzastupljenijih prirodnih pigmenata u Spirulini je plavi protein C-fikocijanin (C-PC), koji ima ulogu fotoreceptora u procesu fotosinteze, pri čemu njegova boja potiče od tetrapiroalne hromofore fikocijanobilina (PCB). Posljednjih par decenija je iznjedrilo veliki broj studija o antikancerogenim, antiinflamatornim, imunomodulatorim, hepatoprotektivnim i neuroprotektivnim efektima C-PC-a, koje se mogu pripisati izuzetnim antioksidativnim aktivnostima ovog proteina. Uzevši u obzir da tetrapiroalna hromofora efikasno „hvata“ (engl. scavenge) mnoge slobodno-radikalske vrste, mnogi od gore pomenutih benefita C-fikocijanina se mogu pripisati djelovanju PCB-a. Nedavne studije su ubjedljivo pokazale da sam PCB ispoljava snažnu antikancersku, antiinflamatornu, ateroprotektivnu i nefroprotektivnu aktivnost.

Uzevši u obzir sve gore navedene benefite C-PC-a po zdravlje ljudi, nameće se par važnih pitanja za istraživače: kakva je sudbina C-PC-a u gastrointestinalnom traktu?; U kojoj mjeri je C-fikocijanin podložan proteolizi u želucu i tankom crijevu, tj. do kojih fragmenata/hromosomeptida (peptida za koje je kovalentno vezana fikocijanobilinska hromofora) biva razgrađen nakon oralnog unosa?; Da li ovi hromosomeptidi ispoljavaju neke od pomenutih aktivnosti C-PC-a i same hromofore? U literaturi nema podataka da je proučena biodostupnost i digestibilnost C-PC-a iz (komercijalnih preparata) Spiruline, kao ni podataka o biološkoj aktivnosti hromosomeptida. Shodno tome, prvi dio ove doktorske disertacije je imao za zadatak da se:

- Ispita digestibilnost C-fikocijanina pepsinom u simuliranoj želudačnoj tečnosti;
- Dizajnira HPLC (tečna hromatografija visokih performansi) metoda za izolovanje hromosomeptida iz digesta;

- Odredi sekvenca izolovanih hromopeptida primjenom tandemске masene spektrometrije;
- Ispita biološka aktivnost hromopeptida, utvrđivanjem njihovih antioksidativnih i citotoksičnih efekata na kancerskim ćelijama.

Albumini iz humanog (HSA) i goveđeg (BSA) seruma su glavni proteini plazme i važni transporteri, odnosno farmakokinetički regulatori sistemske biodostupnosti lijekova i prirodnih bioaktivnih molekula. S druge strane, ovi proteini predstavljaju model sisteme za proučavanje protein-ligand interakcija. Prema tome, vezivanje PCB-a za HSA može uticati na njegovu distribuciju u telu, a time i na njegove bioaktivne efekte. Uzevši u obzir da su njegova struktura i fizičko-hemijska svojstva veoma slična bilirubinu, koji se visokim afinitetom vezuje za albumine iz seruma, fikocijanobilin je dobar kandidat za vezivanje za HSA. BSA kao protein hrane može uticati na biodostupnost, stabilnost i bioaktivnost malih molekula prisutnih u hrani. Prema tome, specifične interakcije između BSA i fikocijanobilina mogle bi uticati kako na stabilnost i antioksidativne efekte kako PCB-a, tako i samog proteina. Shodno tome, ovaj dio doktorske disertacije je imao za zadatke da se:

- Koristeći različite spektroskopske tehnike, kao i metodu molekuskog modelovanja (dokinga), ispita, okarakteriše i uporedi vezivanje fikocijanobilina za HSA i BSA, u pogledu određivanja afiniteta, stehiometrije vezivanja i mjesta vezivanja liganda za ove proteine;
- Ispita uticaj PCB-a na termalnu i proteolitičku stabilnost HSA i BSA;
- Ispita efekte BSA na oksidativnu stabilnost PCB-a, kao i uticaj formiranja BSA-PCB kompleksa na antioksidativni kapacitet BSA i PCB-a.

2. Opšti dio

Ovo poglavlje sadrži teoretske osnove tematike kojom se bavi ova doktorska disertacija. Opisana je struktura, funkcija i stabilnost C-fikocijanina iz cijanobakterije *Arthrospira platensis*, kao i njegove primjene u medicini, industriji i nauci. Uzevši u obzir zadate ciljeve rada, jedan dio ovog poglavlja se bavi značajem i dobijanjem bioaktivnih peptida, kao i određivanjem njihove strukture. S obzirom da se veliki dio istraživanja u ovom radu bavi interakcijama PCB-a sa HSA i BSA, dati su osnovni podaci o strukturi i funkciji molekula ovih proteina, sa posebnim osvrtom na interakcije sa bilirubinom. Na kraju, dat je pregled odabranih metoda koje se najčešće koriste za karakterizaciju protein-ligand interakcija.

2.1 C-Fikocijanin kao prirodni pigment algi: struktura, funkcija i stabilnost

U posljednje vrijeme, morskim algama (cijanobakterijama) se pridaje sve veći značaj kao izvoru velikog broja bioaktivnih supstanci. Jedna od naročito interesantnih karakteristika algi jeste njihovo bogatstvo u prirodnim pigmentima. Pored fiziološke uloge u procesu fotosinteze i pigmentaciji organizma, pokazano je da prirodni pigmenti pokazuju niz benefita po zdravlje čovjeka. Pigmenti izolovani iz algi nalaze sve veću primjenu u prehrambenoj industriji, kozmetici i farmakologiji, kao izvanredan izvor vrijednih neživotinjskih pigmenata. Tri glavne grupe pigmenata kojima su morske alge izuzetno bogate su: hlorofili, karotenoidi i fikobilini (Pangestuti & Kim, 2011).

Fikocijanin je molekul intenzivno plave boje i pripada grupi fikobilinskih proteina koji sakupljaju svjetlost i prenose je ka reaktivnim centrima u procesu fotosinteze. Svi do sada ispitani fikobilinoproteini su holo-proteini koji se sastoje od apo-proteina i kovalentno vezanih tetrapirolnih hromofora, koje se nazivaju fikobilini. Tri najviše zastupljena fikobilinoproteina u morskim algama su: fikoeritrin (PE), sa fikoeritrobilinom kao hromoforom crvene boje, fikocijanin i alofikocijanin (APC), sa fikocijanobilinom, hromoforom plavo-ljubičaste boje, pri čemu je relativna zastupljenost fikocijanina u odnosu na alofikocijanin 9:1 (Romay, Gonzalez, Ledon, Ramirez, & Rimbau, 2003; Scheer & Zhao, 2008). Neki organizmi imaju fikobilinoproteine koji sadrže više od jednog tipa fikobilina. Fikocijanini koji nose samo jedan tip fikobilinske hromofore se nazivaju C-fikocijanini, i to je najuobičajniji i najzastupljeniji tip fikocijanina (Kuddus, Singh, Thomas, & Al-Hazimi, 2013; Scheer & Zhao, 2008).

2.1.1 *Spirulina* kao izvor prirodnih pigmenata

Arthrospira (*Spirulina*)¹ je fotosintetska, filamentozno nediferencirana, spiralna (helikoidna), višćelijska modro-zelena alga (cijanobakterija), čija su prirodna staništa slane vode visokog pH, prije svega u tropskim i subtropskim klimatskim područjima. Najrasprostranjenije, i zato (komercijalno) najkorišćenije, vrste *Spiruline* su *Arthrospira platensis* i *Arthrospira maxima*. U svijetu postoji veliki broj kompanija koje industrijski kultiviraju *Spirulinu*, koja se potom koristi kao dodatak hrani, sa godišnjom proizvodnjom od preko 10 000 tona, što *Spirulinu* čini najviše gajenom mikroalgom na svijetu (**Gershwin & Belay, 2007**).

Biohemijske analize *Spiruline* dokazale su njena izvanredna hranljiva svojstva, tako da se u literaturi naziva i "super hranom", ili "hranom budućnosti". *Spirulina* je jedan od najbogatijih poznatih prirodnih izvora proteina i esencijalnih amino kiselina, kao i odličan izvor vitamina (prije svega A i K, kao i vitamina iz B grupe), makro- i mikro- elemenata (kalcijum, kalijum, magnezijum, gvožđe, jod, selen, hrom, cink, mangan), esencijalnih masnih kiselina (uključujući γ -linolnu kiselinu), glikolipida, lipopolisaharida i sulfolipida. Takođe, ova alga je izuzetno bogata i u raznovrsnim pigmentima, kao što su hlorofili, β -karoteni, ksantofili i fikobilini (fikobilinski proteini) (**Gershwin & Belay, 2007**). Prije svega zahvaljujući obilju pigmenata, ekstrakti *Spiruline* dokazano pokazuju hipoholesterolemijsku, antiinflamatornu, antibakterijsku i antiviralnu, kao i antitrombotičku aktivnost. Dalje, pokazano je da biološki aktivne supstance iz *Spiruline* pomažu i u prevenciji katarakte, cerebralne ishemije, akutnog alergijskog rinitisa i vaskularne reaktivnosti. Mnogi od navedenih pozitivnih efekata na organizam čovjeka potiču od antioksidativnog dejstva alge kao cijeline, ili od njenih pojedinačnih sastojaka, kao što je fikocijanin (**Gershwin & Belay, 2007; Martinez-Galero, Perez-Pasten, Perez-Juarez, Fabila-Castillo, Gutierrez-Salmean, & Chamorro, 2016**).

U tabeli 1 data je lista sa količinom fiziološki najvažnijih supstanci koje sadrži komercijalni preparat *Spiruline* sa područja Havaja (Hawaiian *Spirulina*).

¹ Postoje zabune u vezi upotrebe naziva *Spirulina*. Rod *Spirulina* spp podrazumijeva vrste *Spirulina maxima* i *Spirulina platensis*. Ipak, cijanobakterije koje se koriste u ishrani, ne pripadaju rodu *Spirulina* spp, već bliskom rodu *Arthrospira* (oba roda pripadaju porodici *Oscillatoriaceae*). Međutim, ovaj termin se odomaćio u široj javnosti, pa se tako pod nazivom *Spirulina* podrazumijeva osušena biomasa cijanobakterija *Arthrospira platensis* i *Arthrospira maxima*, koja se koriste kao dodatak ishrani (**Mortensen, 2006**).

Tabela 1. Lista i količina (ili aktivnost) fiziološki važnih supstanci za organizam čovjeka, koje sadrži komercijalni preparat *Spirulina*-e sa područja Havaja (Hawaiian *Spirulina*, Nutrex, SAD).

Supstanca	Količina/aktivnost po porciji (3 g*)	% od preporučenog dnevnog unosa**	Supstanca	Količina/aktivnost po porciji (3 g*)	% od preporučenog dnevnog unosa**
Ukupni ugljeni hidrati	<1g	<1%	Hrom	50 µg	42%
Proteini	2 g	4%	Natrijum	35 mg	1-2%
Vitamin A (kao β-karoten)	11 250 IU	225%	Kalijum	60 mg	1-2%
Vitamin K	75 µg	94%	C-fikocijanin	240 mg	/
Vitamin B12	9 µg	150%	γ-linoleinska kiselina	32 mg	/
Gvožđe	7 mg	39%	Hlorofil a	30 mg	/
Magnezijum	15 mg	4%	Ukupni karotenoidi	15 mg	/
Mangan	0.4 mg	20%	Superoksid dismutaza	2500 U	/

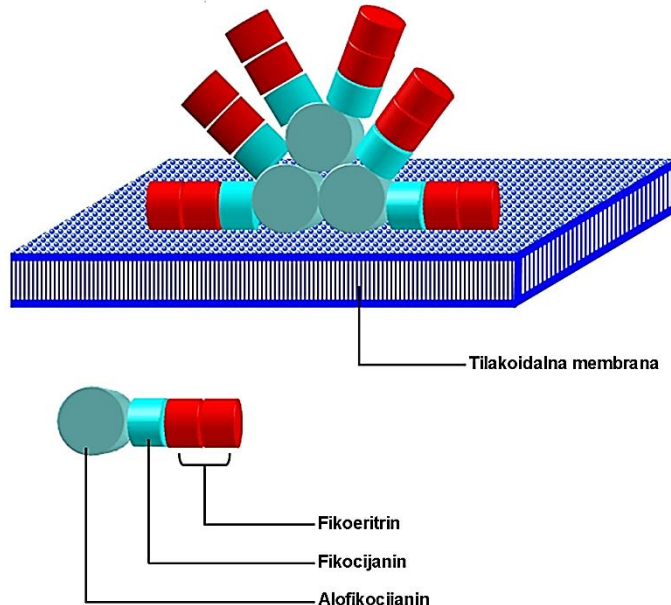
* preporučena dnevna doza preparata Spiruline u prahu

** Navedeni procenti su izračunati na osnovu preporučenih dnevnih unosa FDA; internet stranica: <https://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/GuidanceDocumentsRegulatoryInformation/LabelingNutrition/ucm064928.htm>

2.1.2 Fiziološke uloge fikobilinoproteina

U cijanobakterijama i rodofitama (crvene alge), fikobilinski proteini su deo fikobilizoma. To su ogromni supramolekulski agregati lokalizovani na spoljašnjoj površini tilakoidnih membrana i mogu se uočiti elektronskim mikroskopom. Fikobilizomi se sastoje od centralnog jezgra, koje čini APC sa C-PC i PE heksamerima naslaganim jedan na drugi, formirajući štapičaste produžetke (**slika 1**). Unutrašnji dio ovih štapova čine C-PC heksameri, a spoljašnji PE heksameri. Glavna biološka uloga fikobilinskih proteina je sakupljanje svjetlosti u procesu fotosinteze i njihovi apsorpcioni maksimumi su približno 540 nm (PE), 620 nm (C-PC) i 650 nm (APC). Apo-proteinski segmenti izdužuju (engl. stretches) hromoforu i time moduliraju njeno hemijsko okruženje, pri čemu sama struktura fikobilizoma doprinosi da se neke bilinske hromofore nađu na međusobno bliskom rastojanju. Upravo ove interakcije povećavaju apsorptivnost i dovode do razlika u apsorpcionim maksimumima pojedinačnih hromofora (**Eriksen, 2008**). Prenošenje energije se odvija od PE, preko C-PC do APC, i na kraju, završava u fotosintetskim reakcionim centrima, uz efikasnost procesa $\geq 95\%$ (**Padyana, Bhat,**

Madyastha, Rajashankar, & Ramakumar, 2001).



Slika 1. Shematski prikaz fikobilizoma iz cijanobakterija.
Preuzeto sa internet sajta: <http://cronodon.com/images/phycobilisome.jpg>

Fikobilinoproteini su najzastupljeniji proteini u modrozelenim i crvenim algama, ali nisu esencijalni za preživljavanje ćelija. U uslovima kada su ćelije izložene nedostatku azota oni mogu biti selektivno razgrađeni, što ukazuje imaju (sekundarnu) ulogu i kao izvori azota unutar ćelija (Romay, et al., 2003).

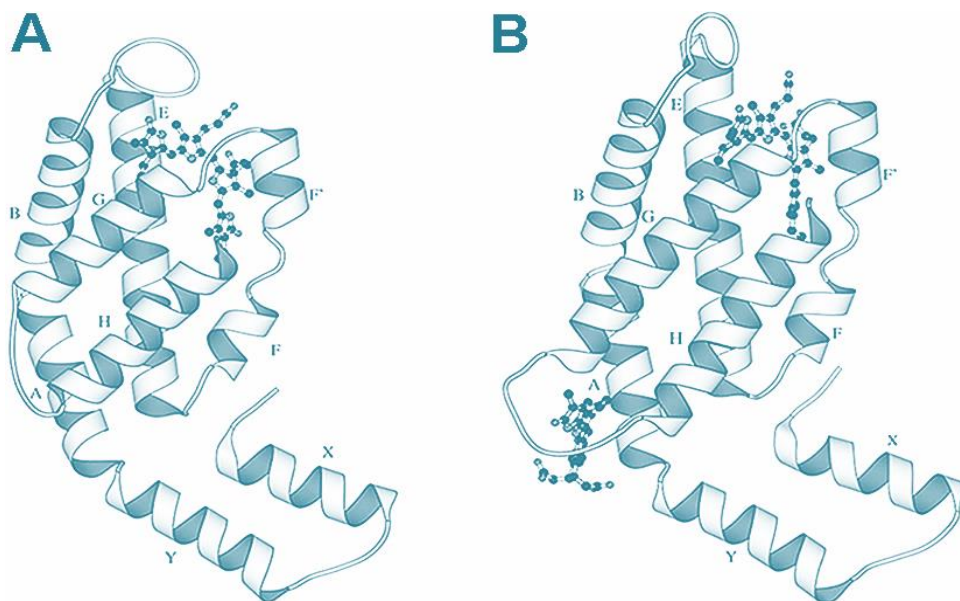
2.1.3 Struktura C-fikocijanina

Cijanobakterija *Arthrospira platensis* sadrži samo dva fikobilinoproteina: APC i C-PC. C-PC je glavna proteinska komponenta fikobilizoma (oko 90% ukupnih proteina), dok je APC minorna komponenta lokalizovana u jezgru fikobilizoma. C-PC se sastoji od α i β subjedinice (slika 2), koje imaju veliki afinitet jedna prema drugoj i formiraju $\alpha\beta$ monomere, koji se zatim (međusobno) agregiraju do trimera $(\alpha\beta)_3$ i potom heksamera $(\alpha\beta)_6$. Heksameri predstavljaju funkcionalnu jedinicu fikobilizoma. Molekulske mase α i β subjedinica redom iznose 17000 i 19500 Da. PCB je vezan za C-PC tioetarskom vezom, preko ostataka cisteina (slika 3): za α subjedinicu vezan je jedan molekul PCB-a (α -84), dok su za β subjedinicu vezana dva molekula PCB-a (β -82, β -153) (Padyana, et al., 2001; Pangestuti & Kim, 2011).

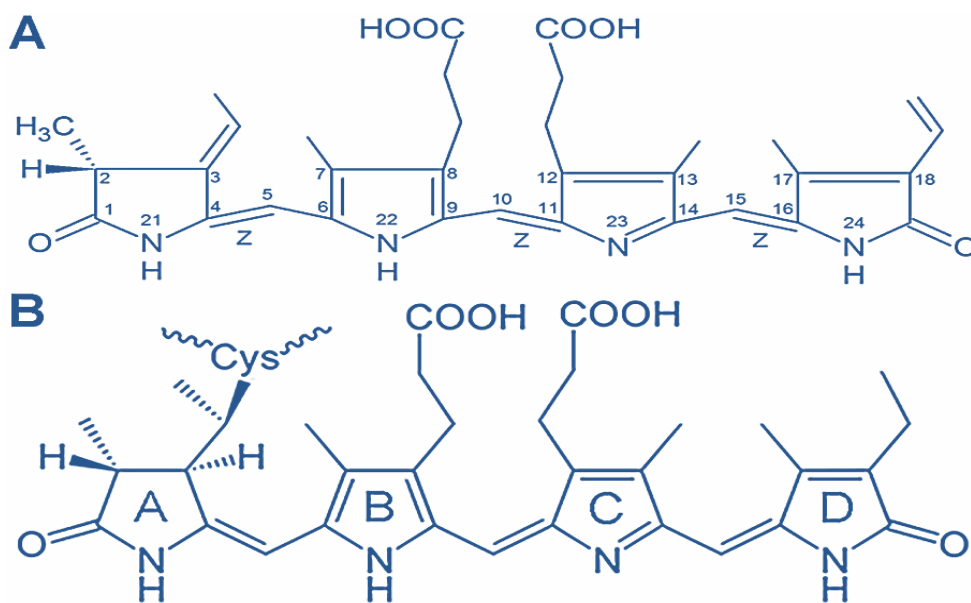
U sekundarnoj strukturi obje subjedinice dominiraju α -heliksi. U okviru

trodimenzionalnih struktura subjedinica uočava se dobro definisani domen sličan globinima, sa sedam heliksa (A, B, E, F, F9, G i H) koji su uvijeni slično kao u molekulu mioglobina (**slika 2**). Mjesta za vezivanje PCB-a za ostatke cisteina na pozicijama α -84 i β -84 odgovaraju vezujućim mjestima za hem u mioglobinu. Globinski domen je dopunjen sa dodatna dva heliksa (X i Y) na N-terminusu, koji grade strukturu ukosnice, stabilišući $\alpha\beta$ monomer (**Padyana, et al., 2001**).

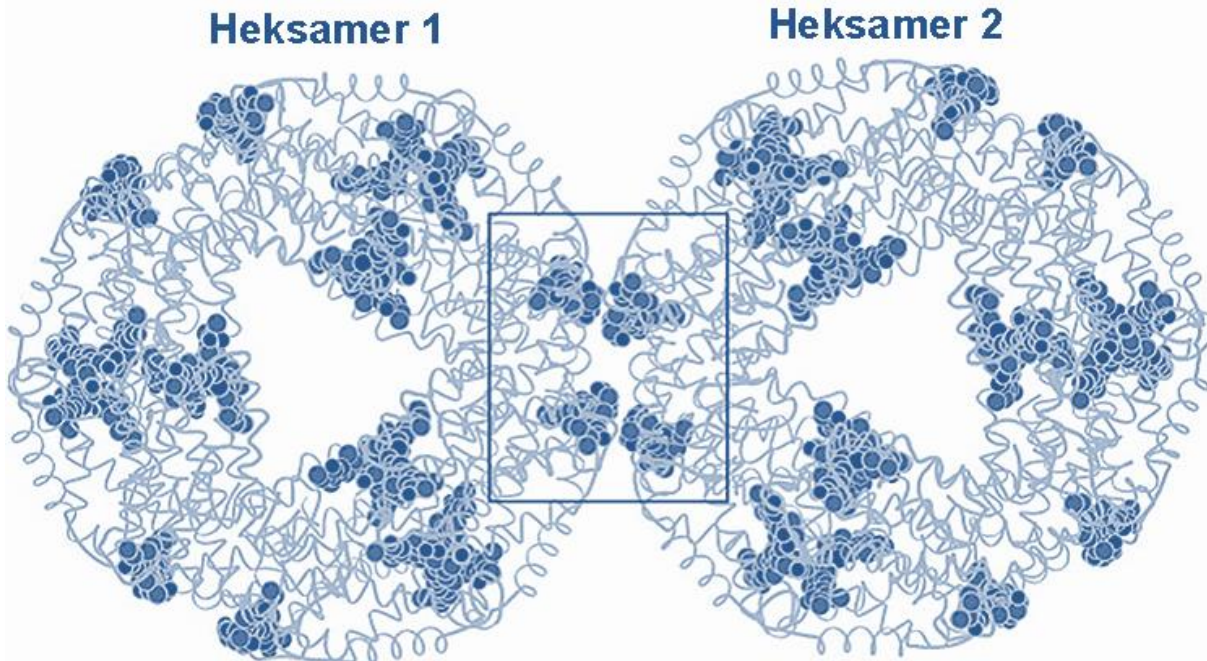
Neki aminokiselinski ostaci (uglavnom sa polarnim ili naelektrisanim bočnim lancima) koji se nalaze u blizini mjesta vezivanja PCB-a za protein su visoko konzervirani i kao takvi interaguju sa molekulom PCB-a, što omogućava pravilnu orijentaciju hromofore. Ovo za posledicu ima stabilizovanje apsorpcije svjetlosti i transfera prikupljene energije od strane svake hromofore. Jedan takav aminokiselinski ostatak je Thr-77 u β subjedinici, čiji amidni azot formira vodoničnu vezu sa kiseonikom iz PCB-a u položaju α -84. Zanimljivo, Asn- β 72 je metilovan na γ -N položaju: ova modifikacija je visoko konzervirana, karakteristična je za sve fikobilinoproteine i omogućuje efikasan transfer energije. Smatra se da ovaj ostatak omogućava krucijalni kontakt sa PCB-om u položaju β -84, interakcijama polarne prirode. Pretpostavlja se da Asn- β 72 dovodi do važnih promjena u elektronskoj gustini okruženja hromofore u položaju β -84 tokom formiranja heksamernih agregata, utičući na brzinu transfera energije tokom procesa fotosinteze. Takođe, brzina transfera energije zavisi i od udaljenosti i orijentacije hromofora. Kristalna struktura dva susjedna heksamera (**slika 4**) pokazuje da se molekuli PCB-a u položaju β -153 iz ovih heksamera nalaze međusobno veoma blizu i da su okrenuti jedan ka drugom. Uzevši sve ovo u obzir, smatra se da molekuli PCB-a u položaju β -153 imaju dodatnu ulogu u transferu energije u lateralnom pravcu između susjednih diskova C-PC-a (**Padyana, et al., 2001**).



Slika 2. Trakasta (engl. ribbon) prezentacija: (A) α subjednice C-PC i (B) β subjednice C-PC-a. Struktura PCB-a je shematski prikazana u vidu lopte i štapa (engl. ball and stick). Slika je preuzeta iz **Padyana et al. (2001)**.



Slika 3. Struktura PCB-a: (A) slobodna hromofora; (B) hromofora vezana za apoprotein tioetarskom vezom. Slika je preuzeta iz **Padyana et al. (2001)**.



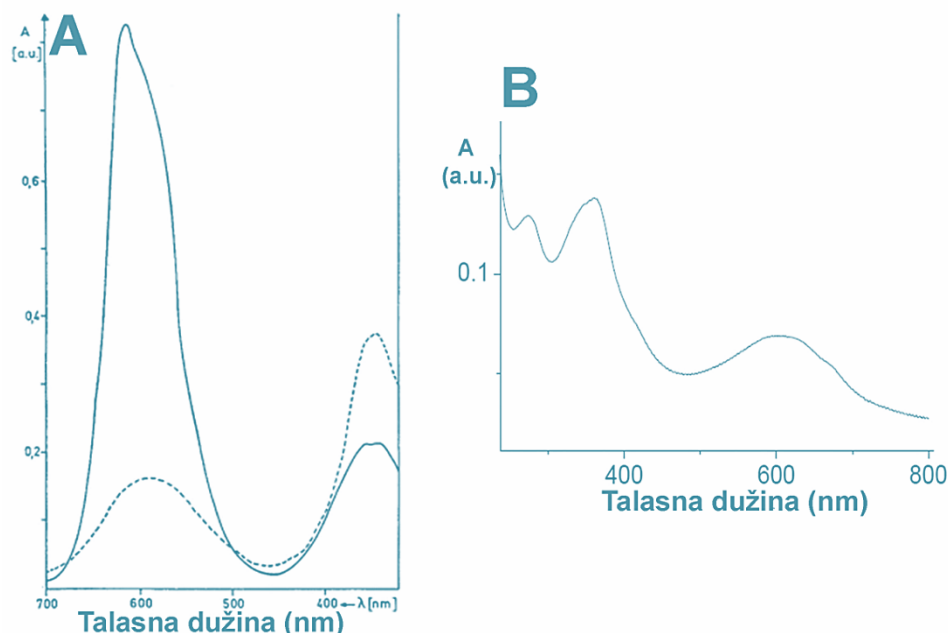
Slika 4. Shematski prikaz (kristalne) strukture dva susjedna heksamera C-PC-a. Molekuli hromofore su prikazani kao kalotni modeli plave boje. Pravougaonikom su uokvireni molekuli PCB-a u položaju β -153, koji se nalaze u regionu između dva susjedna heksamera. Slika je preuzeta iz **Padyana et al. (2001)**.

2.1.4 C-Fikocijanin: stabilnost i spektroskopske karakteristike

Apsorpcioni spektar nativnog C-PC-a (**slika 5A**) pokazuje izraženi maksimum na 620 nm i znatno manji na 360 nm; oba potiču od hromofore/PCB-a (**Slika 5B**). Nasuprot tome, VIS apsorpcioni maksimum alofikocijanina nalazi se na 652 nm. Spektar slobodne hromofore se razlikuje od spektra nativnog proteina (C-PC-a), u smislu inteziteta i oblika navedenih apsorpcionih traka (**slika 5B**). Osim apsorpcionog, C-PC ima i karakterističan fluorescentni spektar sa maksimumom emisije na oko 640 nm (**slika 6**) (**Sonani, Rastogi, Patel, & Madamwar, 2016**).

Hromofora je veoma osjetljivi indikator konformacionog stanja proteina, tako da je moguće jednostavno pratiti denaturaciju i renaturaciju C-PC-a, snimanjem VIS apsorpcionih spektara. Potpunom temperaturnom denaturacijom C-PC-a dolazi do pomjeranja apsorpcionog maksimuma sa 620 na 600 nm, pri čemu se intezitet trake smanjuje oko 4,5 puta. Intenzitet trake u bliskoj UV oblasti povećava se oko 2 puta, dok položaj apsorpcionog maksimuma ostaje na približno istoj poziciji (**slika 5A**). Takođe, denaturacijom proteina gubi se fina struktura obje

trake: u nativnom proteinu uzani pik na 620 nm se širi idući ka kraćim talasnim dužinama (asimetrični pik), dok se u okviru trake na 360 nm mogu uočiti dva maksimuma jednakog inteziteta na 360 i 347 nm (**slika 5A**), što se ne može detektovati kada je protein denaturisan. Takođe, denaturacijom proteina dolazi do gubitka njegove njegove intezivne fluorescencije (**Kupka & Scheer, 2008**).

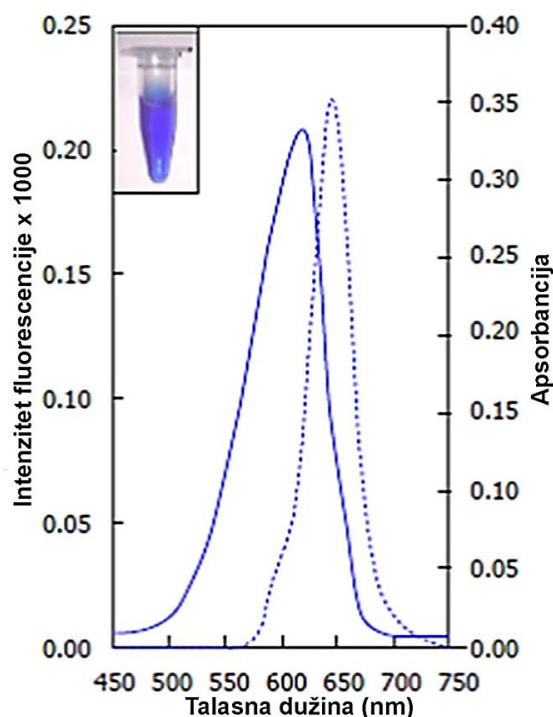


Slika 5. (A) Apsorpcioni spektar C-PC-a: punom linijom je prikazan vidljivi spektar nativnog, a isprekidanom linijom spektar denaturisanog proteina. Slika je preuzeta iz **Scheer & Kufer (1977)**; (B) apsorpcioni spektar PCB-a u vodi. Slika je preuzeta iz **Suresh, Mishra, Mishra, & Das (2009)**.

Kao i u drugim fikobilinskim proteinima, zbirni spektar C-PC-a čine različiti konformeri bilinske hromofore. Upravo uske apsorpcione trake i jaka fluorescenija u nativnim proteinima ukazuju na povećanu rigidnost i prisustvo malog broja konformera PCB-a. Hromofora se u nativnom proteinu nalazi u izduženoj, a u denaturisanom proteinu u cikličnoj konformaciji. Zanimljivo je istaći da se toplotna denaturacija C-PC-a odvija u dva koraka: prvi se odvija na temperaturi od 40°C, pri čemu se A_{620} nm smanjuje za oko 20% i gubi se fina struktura (asimetričnost) trake na ovoj talasnoj dužini, a drugi na temperaturama preko 50°C, kada dolazi do potpune denaturacije proteina. Ukoliko temperatura ne prelazi 50°C, moguće je protein (potpuno) renaturisati hlađenjem na 4°C. Postojanje dvostepene toplotne denaturacije C-PC-a sugeriše postojanje najmanje dvije populacije spektroskopski različitih hromofora, usled

različitih konformacionih stanja PCB-a i/ili proteinskog okruženja koje nije isto za svaki molekul hromofore. Takođe, moguće je i da prilikom delimične denaturacije C-PC-a dolazi do razvijanja samo dijela proteina u blizini jednog molekula PCB-a. Prisustvo spektroskopski različitih populacija hromofora u molekulu C-PC je pokazano i apsorpcionom spektroskopijom na niskim temperaturama: tako se na temperaturama ispod -100°C , uočavaju dvije trake sa maksimumima na 630 i 595 nm (Scheer & Kufer, 1977).

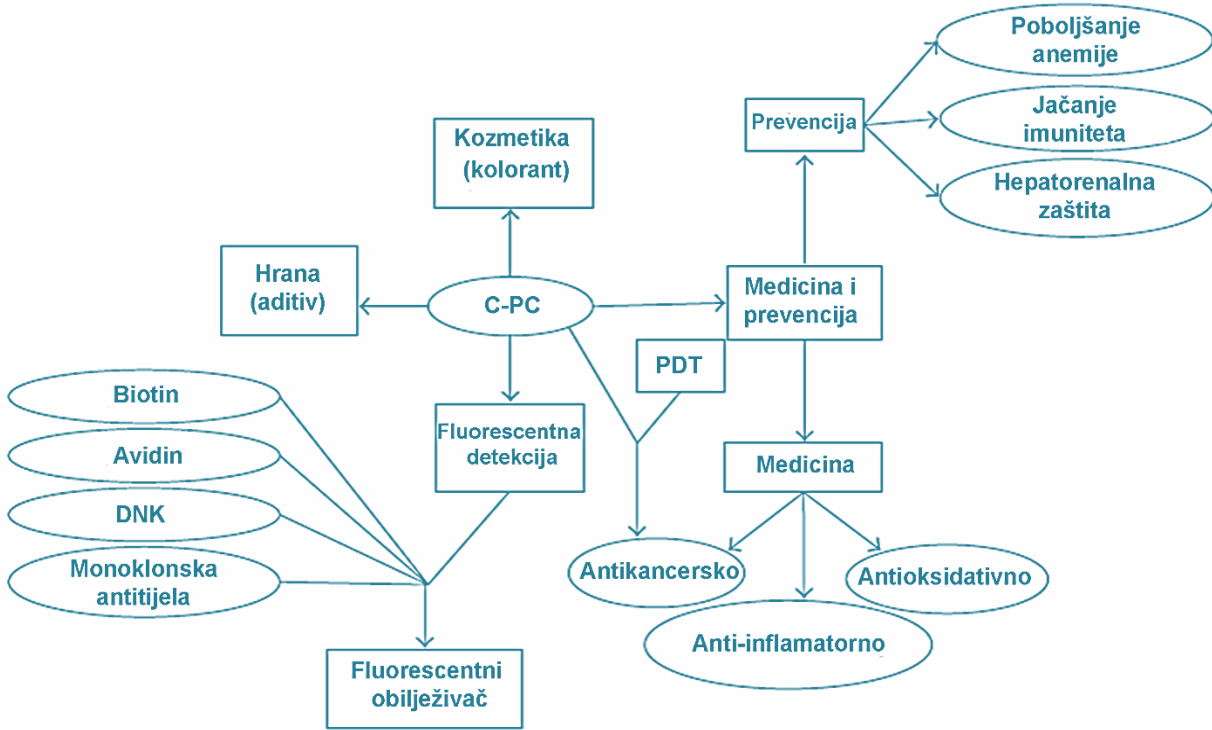
C-PC je protein stabilan u pH opsegu od 4 do 9. Izvan ovog opsega dolazi do denaturacije, uz smanjenje apsorpcije svjetlosti na 620 nm i pomjeranja apsorpcionog maksimuma ka kraćim talasnim dužinama na pH iznad 10. Takođe, izvan ovog opsega pH dolazi i do smanjivanja intenziteta fluorescencije (Yan, Zhu, Su, Zhang, Chen, Zhou, et al., 2010). pI vrijednost C-PC-a iznosi 4,3 (Gang, Zheng, Liu Fei, Li Chen, Fu-xin, & Nai-ju, 1999).



Slika 6. Apsorpcioni (puna linija) i emisijski fluorescentni spektri (isprekidana linija, pri ekscitaciji na 600 nm) C-PC-a. Slika je preuzeta iz **Sonani et al. (2016)**.

2.2. Moguće primjene C-fikocijanina i fikocijanobilina

C-PC i PCB imaju veliki potencijal za primjenu u različitim oblastima, od medicine, preko prehrambene i farmaceutske industrije, do upotrebe kao reagensa u istraživačke svrhe. U ovom poglavlju dat je prikaz najznačajnijih aspekata njihove primjene (**slika 7**).



Slika 7. Pregled mogućih i realizovanih primjena C-PC-a u medicini, industriji hrane i molekularnoj biotehnologiji. Slika je preuzeta iz **Liu, Huang, Zhang, Cai, & Cai (2016)**.

2.2.1 Benefiti C-fikocijanina i fikocijanobilina po zdravlje ljudi

2.2.1.1 C-fikocijanin i fikocijanobilin kao antioksidanti

Mnoga oboljenja su praćena i/ili izazvana oksidativnim stresom, koji se karakteriše prekomjernim nakupljanjem radikalskih vrsta porijeklom od molekulskog kiseonika (ROS). Glavna patofiziološka stanja i procesi u kojima su uključene ROS su: inflamacija, neurodegenerativna oboljenja, ateroskleroza, kancer i reperfuzione povrede. Uzimajući ovo u obzir, upotreba prirodnih ili sintetičkih antioksidanata trebalo bi da bude obećavajuća preventivna/terapeutska mjera. Bez sumnje je utvrđeno da je C-PC potentan antioksidant, koji ne samo da inhibira stvaranje reaktivnih kiseoničnih vrsta (vidjeti dalje), nego ih i efikasno inaktivira u različitim *in vitro* model sistemima (**Tabela 2**) (**Romay et al., 2003**).

Tabela 2 Antioksidativna aktivnost fikocijanina *in vitro* (Romay et al., 2003).

Reakcioni sistem	Ispoljeni efekat
Superoksid generisan sa hipoksantin-ksantin oksidazom	-
Alkoksil radikal generisan sa t-BOOH-fero sulfatom	+
Hidroksil radikal generisan sa H ₂ O ₂ -fero sulfatom (Fentonova reakcija)	+
Peroksil radikal generisan termolizom AAPH-a	+
Singletni kiseonik	+
Lipidna peroksidacija generisana sa Fe ²⁺ -vitaminom C i AAPH termolizom	+
Peroksi-nitrit generisan iz nitrita i H ₂ O ₂	+
Hipohlorit	+
Reaktivni kiseonik iz neutrofila stimulisanih sa opsonizovanim zimosanom	+

Skraćenice: AAPH, 2,2'-Azobis(2-amidinopropan) dihidrohlorid; t-BOOH, terc-butil hidroperoksid.

Hemijska struktura PCB-a je veoma slična onoj bilirubina, proizvoda razgradnje hema i molekula sa potentnim antioksidativnim i anti-inflamatornim aktivnostima. Bilirubin se apsorbuje u svakom regionu tankog ili debelog crijeva u nekonjugovanom obliku, što sugeriše da je hromofora (PCB) odgovorna za antioksidativne i anti-inflamatorne efekte nakon oralne administracije proteina. U prilog tome idu i zapažanja da je PCB odgovoran za inaktiviranje slobodnih radikala u velikom obimu, time i za antioksidativnu aktivnost fikocijanina, kao i same Spiruline, te da i denaturisani protein ispoljava snažnu antioksidativnu aktivnost. Bilirubin se smatra fiziološki veoma važnim antioksidantom, pošto inhibira oksidativna oštećenja serumskih proteina, konkretno, njihovih aromatičnih aminokiselinskih ostataka (Gershwin & Belay, 2007; Romay et al., 2003).

Unošenje hepatotoksičnih, nefrotoksičnih i neurotoksičnih supstanci u organizam čovjeka dovodi do generisanja slobodnih radikala, a ekstrakti Spiruline, kao i sam C-PC, prikuplja (skavendžuje) nastale reaktivne vrste. Kao što je već pomenuto, nesumnjivo je utvrđeno da C-PC ima sposobnost da inaktivira mnoge vrste slobodnih radikala (tabela 2) (Romay et al., 2003). Na osnovu dobijenih IC₅₀ vrijednosti (koncentracija ispitivane supstance koja dovodi do 50% inhibicije peroksidativnog oštećenja), C-PC se pokazao 16 puta efikasnijim antioksidansom u odnosu na troloks (često korišćen hidrosolubilni analog vitamina E) i oko 20 puta efikasnijim

nego vitamin C. Pokazano je i da je antioksidativna aktivnost PCB-a značajno veća od one koju ima α -tokoferol, kao i da C-PC štiti humane eritrocite od hemolize izazvane peroksil radikalima (**Benedetti, Benvenuti, Pagliarani, Francogli, Scoglio, & Canestrari, 2004; Gershwin & Belay, 2007**).

Reaktivne vrste kiseonika dovode i do peroksidacije lipida, izazivajući oštećenja i destrukciju ćelijskih membrana. Pokazano je da C-PC značajno inhibira povećanje sadržaja lipidnih peroksida u mikrozmomima jetre pacova, nakon tretmana sa kompleksom Fe^{+2} -vitamin C, ili sa AAPH, inicijatorima nastajanja slobodnih radikala. S druge strane, utvrđeno je da fikocijanin u *in vivo* uslovima inhibira peroksidaciju lipida izazvanu ugljen-tetrahloridom, koja za posledicu ima oštećenje jetre, čime se djelimično objašnjava hepatoprotektivni efekat C-PC-a (**Vadiraja, Gaikwad, & Madyastha, 1998**).

Interesantni su i rezultati studije koja je pokazala da oralno unošenje C-PC-a kod pacova spriječava kaininskom kiselinom izazvano ponašanje slično epileptičnom napadu, kao i reakciju ćelija glije u hipokampusu, što ukazuje na mogući zaštitni efekat na neurone. Ovi nalazi sugerišu da bi preparat fikocijanina mogao da se (is)koristi i za tretiranje nekih formi epilepsije. Kaininska kiselina je ekscitotoksična supstanca koja dovodi do stvaranja reaktivnih vrsta, tako da se pretpostavlja da se zaštitni efekat zasniva na antioksidativnim svojstvima C-PC-a. Ista studija nagovještava primjenu C-PC-a i u tretiranju (neizlečivih) neurodegenerativnih oboljenja, kao što su Alchajmerova i Parkinsonova bolest (**Rimbaua, Camins, Romay, Gonzaalez, & Pallas, 1999**).

Jedna druga studija je detaljno proučila antioksidativnu aktivnost C-PC-a. Ispitana je sposobnost proteina da neutrališe hidroksil radikale: pokazano je da C-PC u prisustvu svjetlosti generiše hidroksil radikale, dok u mraku vrši njihovo uklanjanje. Utvrđeno je i da što je veća koncentracija C-PC-a u reakcionom sudu (počev od 35 $\mu\text{g/mL}$), to je manja sposobnost generisanja hidroskil radikala na svjetlosti. Pokazana je i pozitivna korelacija između količine denaturanata [urea i natrijum dodecil sulfata (SDS)] i antioksidativne aktivnosti C-PC-a. Dalje, povećavanjem pH vrijednosti rastvora fikocijanina, njegova antioksidativna aktivnost takođe raste, ali samo do pH 10, kada dolazi do denaturacije proteina. C-PC pokazuje značajno povećanje antioksidativne aktivnosti nakon tretmana sa tripsinom, što ukazuje da su peptidi nastali tripsinskom digestijom potentniji antioksidanti od samog proteina (**Zhou, Liu, Chen,**

Wang, Chen, Zhang, et al., 2005). Sve ovo sugerira da hromofora C-PC-a, PCB, ima presudnu ulogu u antioksidativnim svojstvima proteina.

2.2.1.2 Antikancerogeni efekti C-fikocijanina i fikocijanobilina

Antikancerogeno dejstvo C-PC-a iz Spiruline je pokazano na većem broju ćelijskih linija i u nekim životinjskim model sistemima. U ovom odeljku dat je sažeti prikaz o uticaju C-PC-a na većinu ispitivanih ćelijskih linija i životinjskih model sistema, kao i o predloženim mehanizmima djelovanja. Na kraju odeljka dat je shematski prikaz predloženih mehanizama antikancerogene aktivnosti C-PC-a (**slika 8**).

C-fikocijanin inhibira proliferaciju HeLa ćelija: elektronskom mikroskopijom su utvrđene morfološke promjene na ćelijama koje odgovaraju apoptozi, a elektroforezom molekula deoksiribonukleinske kiseline (DNK) na agaroznom gelu dobijen je za apoptozu karakterističan obrazac merdavanina. Dalje, tretman sa C-PC-om dovodi i do povećanog broja ćelija u sub G₀/G₁ fazi ćelijskog ciklusa, što takođe ukazuje da ovaj protein indukuje apoptozu. Imunohistohemijskim analizama je utvrđeno da C-PC povećava ekspresiju Fas i ICAM-1 (unutarćelijski adhezioni protein), a da smanjuje ekspresiju Bcl-2 (anti-apoptotski protein). Ćelije tretirane sa C-PC-om pokazuju povećanu aktivnost kaspaza, dok je imunoblot esej pokazao da C-PC dovodi do oslobađanja citohroma c u citoplazmu ćelije (**Li, Gao, Zhang, & Chu, 2006**).

Utvrđeno je da C-PC izaziva apoptozu i u ćelijskoj liniji hepatocelularnog karcinoma HepG2, koja je rezistentna na doksorubicin. C-PC inhibira proliferaciju ovih ćelija, dovodi do depolarizacije membrane mitohondrija, ali i povećava njihovu osjetljivost na doksorubicin. Takođe, C-PC izaziva oslobađanje citohroma c u citoplazmu, inhibira ekspresiju Bcl-2 i povećava ekspresiju Bax (pro-apoptotski protein). Takođe, povećana je ekspresija kaspaze 3, kao i razgradnju PARP-a (NAD⁺ zavisna ADP-riboziltransferaza), koji ima ulogu u repariranju molekula DNK u apoptozi, tokom koje dolazi do razgradnje PARP-a od strane kaspaza (**Roy, Arunasree, Reddy, Dheeraj, Reddy, & Reddanna, 2007**). C-PC inhibira ekspresiju MDR1 u ćelijskoj liniji humanog hepatocelularnog karcinoma. MDR1, poznat kao i P glikoprotein, je odgovoran za rezistenciju kancerskih ćelija na različite anti-tumorske lijekove (npr. doksorubicin). Eksperimenti su urađeni na HepG2 ćelijskoj liniji: najprije je pokazano, korišćenjem laserske skenirajuće konfokalne mikroskopije, da C-PC ulazi u HepG2 ćelije, kao i da C-PC povećava akumulaciju doksorubicina u ovim ćelijama; C-PC indukuje smanjenje

ekspimiranja MDR1 kako na transkripcionom, tako i na translacionom nivou; upotrebom fluorescentne boje DCFH-DA (2',7'-dihlorodihidrofluorescein diacetat) i protočne citometrije, pokazano je da C-PC smanjuje nastajanje reaktivnih kiseoničnih vrsta u ovim ćelijama. Takođe, protein dovodi i do smanjenja ekspimiranja COX-2 enzima, na transkripcionom i translacionom nivou, kao i smanjuje količinu produkta COX-2, prostanglandina E₂ (PGE₂ povećava ekspimiranje MDR1). Ćelije tretirane sa C-PC-om su pokazale smanjeni nivo NF-κB (nuklearni faktor kapa lakog lanca koji stimuliše aktivirane B ćelije) i AP-1 u jedru, koji su pozitivni regulatori ekspresije MDR1. C-PC smanjuje i nivo fosforilisanih formi Akt, JNK (c-Jun N-terminalna kinaza), ERK (ekstracelularnim signalom regulisana kinaza) i p38 proteina, koji su odgovorni za povećanu ekspresiju MDR1 (**Nishanth, Ramakrishna, Jyotsna, Roy, Reddy, Reddy, et al., 2010**).

Pokazano je da C-PC indukuje apoptozu i u AK-5 tumorskim ćelijama (tumorska linija histiocita pacova), tako što smanjuje ekspresiju Bcl-2 proteina i dovodi do nastajanja unutar ćelijskih reaktivnih vrsta kiseonika (ROS). C-PC dovodi i do smanjenja ekspresije ciklooksigenaze 2 (COX-2) (**Pardhasaradhi, Ali, Kumari, Reddanna, & Khar, 2003**).

Jedna od glavnih karakteristika kolorektalnog kancera je prekomjerna ekspresija ciklooksigenaze-2 (COX-2). Studija, urađena na pacovima kojima je pomoću dimetilhidrazina (DMH) indukovao kancer kolona, je pokazala da oralno unesen C-PC smanjuje ekspimiranje COX-2, čiji je sadržaj povišen kod ovog tipa kancera. Ispitivanja morfoloških karakteristika ćelija i elektroforetske studije molekula DNK su pokazale da C-PC indukuje apoptozu u ćelijama kancera kolona (**Saini, Vaiphei, & Sanyal, 2012**). Druga studija je pokazala da C-PC (zajedno sa antiinflamatornim lijekom piroksikamom) kod istog tipa kancera povećava nivo PTEN-a (homolog fosfataze i tenzina deletiran na hromozomu 10), koji kao tumor supresor inhibira PI3K/Akt signalni put. Inhibicija ovog signalnog puta kao krajnji cilj ima apoptozu kancerskih ćelija. U ovoj studiji pokazano je i da C-PC, zajedno sa piroksikamom, povećava broj apoptotskih ćelija, izaziva depolarizaciju mitohondrijalne membrane i povećava sadržaj ROS u ćeliji (**Saini & Sanyal, 2012**). U drugoj studiji, koja se takođe bavila DMH-om indukovanim kancerom kolona, je pokazano da C-PC i piroksikam smanjuju ekspimiranje ciklina i ciklin zavisnih kinaza (CDK), koja je povećana u ovom tipu kancera, a pripadnici ove familije kinaza su ključni za progres ćelijskog ciklusa. Takođe, pokazano je da C-PC i piroksikam inhibiraju

preživljavanje kancerskih ćelija tako što inhibiraju NF- κ B signalni put. Zanimljivo, doking studijom pokazano je da se PCB može vezivati za DNK vezivno mjesto NF- κ B (**Saini & Sanyal, 2015**). Angiogeneza predstavlja ključni proces u razvoju tumora i formiranju metastaza. Vaskularno endotelni faktor rasta je vodeći angiogeni faktor u razvoju kolorektalnog kancera. U studiji sličnoj prethodno navedenim (indukovanje kolorektalnog kancera kod pacova DMH-om), pokazano je da C-PC i piroksikam inhibiraju angiogenezu, tako što smanjuju eksprimiranje VEGF-A (vaskularno endotelni faktor rasta) proteina. Takođe, molekulska modelovanje je pokazalo da PCB interaguje sa receptorom za VEGF-A (**Saini & Sanyal, 2014**). Dobro je poznato da bakar stimuliše angiogenezu, tako što povećava eksprimiranje VEGF-a (**Xie & Kang, 2009**). Uzevši u obzir da studije ukazuju da C-PC može vezivati bakar zahvaljujući svojoj hromofori (**Puangploy, Oaew, & Surareungchai, 2015**), antiangiogeni efekti C-PC-a bi se mogli takođe zasnivati na sposobnosti vezivanja jona bakra.

Trostruki-negativni kancer dojke, koji podrazumjeva odsustvo receptora za estrogen i progesteron, kao i HER-2 (receptora za humani epidermalni faktor rasta), predstavlja veliki izazov za ljekare i naučnike, zato što je otporan na konvencionalnu endokrinu terapiju. Ipak, pokazano je da C-PC indukuje apoptozu u ovim ćelijama. Dalje je pokazano da C-PC smanjuje nivo informacione ribonukleinske kiseline (mRNK) ciklina E i ciklin-zavisne kinaze 2 (CDK-2), ali povećava nivo p21, koji ima ulogu inhibitora CDK-a i tumor supresora (**Ravi, Tentu, Baskar, Rohan Prasad, Raghavan, Jayaprakash, et al., 2015**).

Neke studije ukazuju da bi se C-PC mogao koristiti u kombinaciji sa drugim molekulima u cilju sinergističkog efekta prilikom tretmana kancerskih oboljenja. Tako je pokazano da istovremeno tretiranje kancerske ćelije pluća A549 sa C-PC-om i tretioninom (sve-*trans* retioninska kiselina) potentnije inhibira rast ovih ćelija, nego kada su upotrebljene pojedinačne supstance (**Li, Gao, Lv, Yang, & Yin, 2016**). Sličan fenomen je dobijen kada se C-PC unosi zajedno sa topotekanom, prilikom tretiranja kancerske ćelijske linije prostate LNCaP (**Gantar, Dhandayuthapani, & Rathinavelu, 2012**).

Pokazano je da C-PC indukuje apoptozu i u COLO 205 ćelijama (ćelije humanog karcinoma kolona). Za ovaj efekat izgleda da je zaslužna α subjedinica C-PC-a, pošto izaziva depolarizaciju mitohondrijalne membrane, aktiviranje kaspaza, oslobađanje citohroma c i povećano eksprimiranje Bax proteina (**Lu, Yu, & Li, 2011**). Utvrđeno je i da β subjedinica

fikocijanina (dobijena eksprimiranjem u *E. coli*) pokazuje antitumorsku aktivnost, u eksperimentima sa 686LN ćelijskom linijom (jednoslojni niskoprizmatični epitel). Naime, pokazana je inhibicija proliferacije ovih ćelija, indukcija aktivacije kaspaza 3 i 8. Na apoptozu ukazuje i povećan broj ćelija u sub G_0/G_1 fazi. Uočeno je (imunofluorescencijom) da se β subjednica C-PC-a akumulira na plazminoj membrani i da interaguje sa β tubulinom, što dovodi do depolarizacije mikrotubula i mikrofilamenata. Takođe, β subjednica interaguje i sa gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenazom (GAPDH), čija je nuklearna forma transkripcioni koaktivator potreban za ulazak ćelije u S fazu ćelijskog ciklusa. Imunoblot esej je pokazao da β subjednica smanjuje nivo GAPDH u jedru (**Wang, Liu, Gao, Carter, & Liu, 2007**).

Utvrđeno je da 12-O-tetradekanoil-forbol-13-acetat (TPA) izaziva tumor kože kod miševa, stimulišći ekspresiju i aktiviranje ornitin-dekarboksilaze (ODC), interleukina 6 (IL-6) i aktivaciju STAT-3 (proteina koji učestvuje u signalnoj transdukciji i aktivaciji transkripcije) i smanjujući ekspresiju transglutaminaze 2 (TG2), enzima koji stimuliše apoptozu. Studija urađena na miševima je pokazala da C-PC inhibira efekte TPA na ekspresiju gena za navedene proteine, na transkripcionom i translacionom nivou (**Gupta & Gupta, 2012**).

CD 59 je glikoprotein ukotvljen u plazminu membranu i služi kao inhibitor MAC kompleksa humanog komplementa, a osim toga ima i ulogu u aktivaciji T limfocita i regulaciji imunog odgovora. U jednoj studiji je utvrđeno da CD 59 pokazuje efekte na antitumorsku aktivnost C-PC-a. Prvo je urađena transfekcija rekombinatnog vektora (sa genom za CD 59) u HeLa ćelije: pokazano je da PC povećava ekspresiju CD 59 na površini HeLa ćelija. Takođe, utvrđeno je da C-PC ima veći antiproliferativni efekat na HeLa ćelijama u koje je ubačen gen za CD 59, u odnosu na ćelije u kojima nije izvršena transfekcija datog gena. C-PC dovodi i do povećane ekspresije Fas proteina (**Li, Zhang, Gao, & Chu, 2005**).

Studija urađena na lipopolisaharidom stimulisanom ćelijskoj liniji makrofaga RAW 264.7 je pokazala da C-PC izaziva apoptozu u ovim ćelijama. Zanimljivo je da C-PC u ovim ćelijama ne utiče na nivo COX-2 enzima, ali ipak smanjuje nivo PGE_2 (za čije nastajanje je potreban COX-2), što ukazuje da C-PC selektivno inhibira enzim, što je pokazano i u drugim studijama (**Reddy, Bhat, Kiranmai, Reddy, Reddanna, & Madyastha, 2000; Reddy, Subhashini, Mahipal, Bhat, Srinivas Reddy, Kiranmai, et al., 2003**).

Adenokarcinom pankreasa predstavlja jedno od najsmrtonosnijih malignih oboljenja.

Međutim, pokazano je da C-PC indukuje apoptozu i autofagiju u PANC-1 kancerskim ćelijskim linijama pankreasa. Štaviše, antikancerogeni efekti su dokazani i u *in vivo* uslovima (**Liao, Gao, Gao, Yang, Cheng, & Ou, 2016**).

Studija koja se bavila antikancerogenom aktivnošću C-PC-a prema kancerskim ćelijama jajnika (ćelijska linija SKOV-3) je dala opsežnu analizu promjena na nivou transkriptoma nakon dodatka C-PC-a. Pronađeno je da postoje značajne razlike u ekspresiji 2031 gena između kontrolnih i C-PC-om tretiranih ćelija, pri čemu je 1065 gena imalo povećanu ekspresiju, dok je 966 gena bilo inhibirano. Funkcije ovih gena podrazumjevaju skoro sve esencijalne procese za normalno funkcionisanje ćelije: metabolizam, ćelijski ciklus, diferencijaciju, apoptozu, funkcionisanje mitohondrija, ćelijsku signalizaciju, sintezu proteina, popravku DNK, funkcionisanje RNK (**Ying, Wang, Ji, Lin, Pan, Zhou, et al., 2016**). Najznačajne razlike su pronađene na nivou 18 metaboličkih puteva, među kojima su VEGF i p53 signalni putevi, prethodno pomenuti i u drugim model sistemima, gdje je korišćen C-PC kao antikancerogeni molekul.

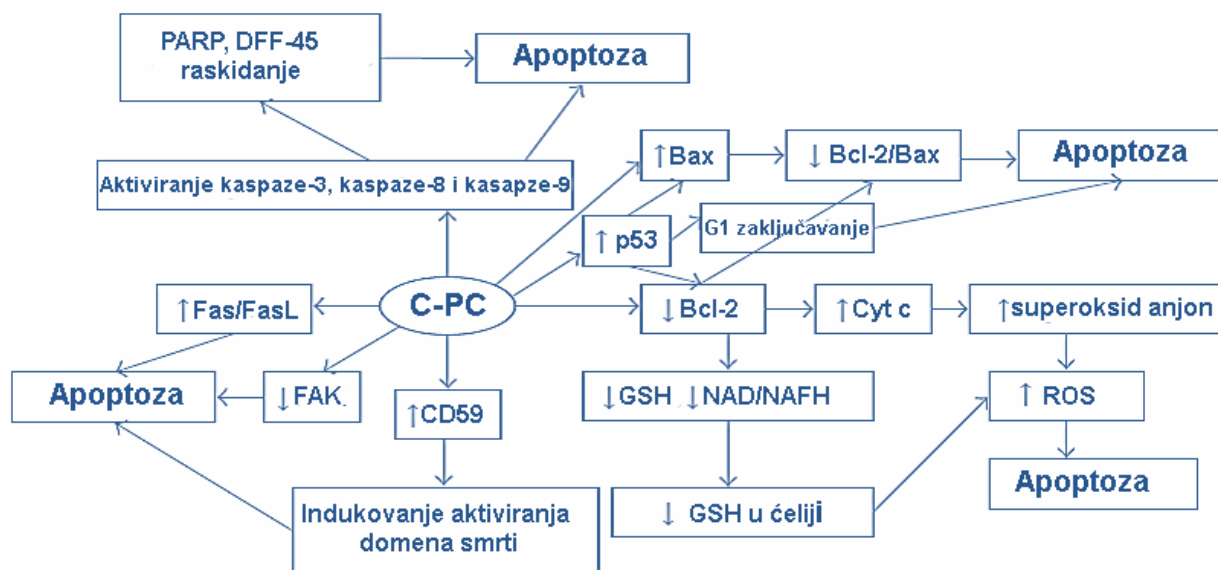
Veoma malo se zna o (direktnom) antikancerogenom djelovanju fikocijanobilina (PCB). Jedna studija, urađena na ćelijskoj liniji PaTu-8902 (ćelije adenokarcinoma pankreasa), pokazala je da PCB inhibira proliferaciju ovih ćelija, kao i da smanjuje proizvodnju slobodnih radikala u mitohondrijama i povećava redukovani glutation (**Konickova, Vankova, Vanikova, Vanova, Muchova, Subhanova, et al., 2014**). Ovdje bi trebalo napomenuti da bilirubin, strukturni analog PCB-a, indukuje apoptozu u većem broju kancerskih ćelijskih kultura (melanomi, kolorektalni kancer, kancer pankreasa, hepatocelularni kancer, kancer dojke). Pokazano je da bilirubin aktivira MEK (mitogenom-aktivirana proteinska kinaza)/ERK signalni put (povećana fosforilacija dovodi do aktiviranja ovih proteina), što za posledicu može imati povećanje nivoa p53, p27 i kaspaze-7, što kao krajnji rezultat ima apoptozu ćelije (eksperimenti urađeni na HRT-18 ćelijama, kancer kolona) (**Ollinger, Kogler, Troppmair, Hermann, Wurm, Drasche, et al., 2007**). Štaviše, utvrđeno je da bilirubin izaziva apoptozu u ćelijama kancera kolona (HCT15 monosloj) direktnom depolarizacijom mitohondrijalne membrane (**Keshavan, Schwemberger, Smith, Babcock, & Zucker, 2004**). Studija na ćelijskoj kulturi melanoma (B16F10) je pokazala da PC inhibira sintezu melanina u ovim ćelijama, tako što stimuliše fosforilaciju ERK i MEK, dok inhibira fosforilaciju p38 proteina (**Wu, Lin, Yang, Weng, & Tsai, 2011**). Uzevši u obzir

antikancerogeno djelovanje bilirubina i C-PC-a, te slične mehanizme njihovog djelovanja (depolarizacija mitohondrijalne membrane, aktivacija MEK/ERK signalnog puta), može se pretpostaviti da će PCB takođe imati antikancerogeno djelovanje.

Antikancersko djelovanje C-PC-a zasniva se i na fotosenzitivnosti samog molekula, odnosno njegove hromofore. Eksperimenti su pokazali da ukoliko se vodeni rastvor C-PC-a zasićen kiseonikom ozrači svjetlošću talasnih dužina većih od 470 nm, dolazi do formiranja reaktivnih vrsta kiseonika. Pretpostavlja se da fikocijanobilin (pod uticajem svjetlosti) može djelovati kao donor elektrona, a da kiseonik ima ulogu akceptora, pri čemu nastaju prvo superoksid anjon radikal (O_2^-), a potom vodonik peroksid (H_2O_2) i hidroksil radikal ($\cdot OH$). C-PC, stoga, nalazi primjenu u fotodinamskoj terapiji: prvo se lokalno aplikuje supstanca osjetljiva na svjetlost (u ovom slučaju fikocijanin) u ciljno tumorsko tkivo, a potom se ozračuje oboljelo površinsko tkivo odgovarajućim talasnim dužinama (**He, Hu, & Jiang, 1996**).

Studije urađene na miševima, u kojima su MCF-7 ćelije kancera dojke subkutano injektovane u životinje, pokazale su da se antitumorska aktivnost C-PC pojačava korišćenjem He-Ne lasera, talasne dužine 632,8 nm. U ovim eksperimentima je pokazano da imune ćelije uklanjaju kancerske ćelije, a da C-PC ima imunostimulatorni efekat (dolazi do proliferacije timocita i splenocita), koji je dodatno pojačan korišćenjem lasera. Upotreba istog tipa lasera pojačava ekspresiju pro-apoptotskog (Fas) proteina, koja je indukovana C-PC-om. Takođe, C-PC i na ovom model sistemu smanjuje ekspimiranje anti-apoptotskih proteina Bcl-2, NF-kB i p53. C-PC izgleda da aktivira kaspazu 9 (imunoblot esej), protein koji ima ključnu ulogu u apoptotskim signalnim putevima. C-PC izaziva i oslobađanje citohroma c u citoplazmu (imunofluorescentni esej) (**Li, Chu, Gao, & Li, 2010**). Eksperimenti urađeni na drugim kancerskim ćelijskim linijama (S180 i BGC-823) su takođe pokazali da bi se C-PC mogao koristiti u fotodinamskoj terapiji. Kad je C-PC je inkorporiran u liposome, i kao takav inkubiran sa ispitivanim ćelijama, pokazano je da ćelije mnogo brže preuzimaju C-PC unešen u vidu lipozoma, u poređenju sa vodenim rastvorom C-PC-a (**Guo, Huang, Zuo, Wang, & Hu, 2008**). Prema tome, fikocijanin izgleda da predstavlja odličan fotosenziterski molekul za efikasnu antitumorsku terapiju, uz ograničeno oštećenje okolnih, zdravih tkiva. Uzimajući u obzir da je fikocijanin potpuno prirodan i neškodljiv molekul, trebalo bi da u budućnosti posluži kao dobra zamjena za druge, prilično toksične fotosenzitajzere i/ili hemoterapeutske antikancerske lijekove.

Pored toga, fotodinamska terapija koja koristi C-PC bila bi jeftinija i zato ekonomski mnogo isplativija, a sam tretman bi bio mnogo jednostavniji i trajao bi znatno kraće (Li, et al., 2010).



Slika 8. Pregled mehanizama preko kojih C-PC ostvaruje antikancerogene efekte u različitim model sistemima. Slika je preuzeta iz Liu et al., 2016.

2.2.1.3 Antiinflamatorno i imunomodulatorno delovanje C-fikocijanina

Osim antikancerogenog, pokazano je da C-PC posjeduje i izraženo antiinflamatorno i imunomodulatorno dejstvo. Važan mehanizam kojim C-PC ispoljava svoje antiinflamatorno dejstvo je inhibicija COX-2 enzima, što za posledicu ima smanjenu sintezu PGE₂. Utvrđeno je da su PCB i redukovani C-PC slabi inhibitori COX-2 enzima (Reddy, et al., 2000). Studija na pacovima kod kojih je izazvana akutna inflamacija i hiperalgezija (povećana osetljivost na bol) ubrizgavanjem polisakarida λ-karagenana u šapicu, pokazala je da C-PC inhibira termalnu hiperalgeziiju. Takođe je dokumentovano da C-PC dovodi do smanjivanja nivoa COX-2 i PGE₂. Tretiranje C-PC-om, dovelo je i do smanjenog nivoa inducibilne azot-monoksid sintaze (iNOS) i nitrata, kao i do smanjenog ekspimiranja faktora nekroze tumora alfa (TNF-α) i inhibicije mijeloperoksidaze. Predloženi mehanizam koji dovodi do inhibicije hiperalgezije i antiinflamatornog djelovanja C-PC-a jeste inhibicija fosforilacije p38 proteina. Naime, pokazano je da λ-karagenan može dovesti do fosforilacije p38, koji zatim dovodi do indukcije TNF-α, iNOS i COX-2 (Shih, Cheng, Wong, Kuo, & Chou, 2009). S druge strane, u jednoj od gore navedenih studija (odjeljak 2.2.1.2; studija urađena na ćelijskoj kulturi melanoma), pokazano je

da C-PC dovodi do smanjenog nivoa fosforilisanog p38 proteina u ćeliji.

Studija na mast ćelijama pacova pokazala je da C-PC inhibira oslobađanje histamina koje je indukovano polimernim jedinjenjem 48/80. Takođe je pokazano da pre-tretman sa C-PC značajno smanjuje reakcije kože uzrokovane intradermalnim unošenjem histamina i jedinjenja 48/80. Kao moguće objašnjenje ovih efekata navodi se antioksidativno dejstvo C-PC-a **(Remirez, Ledon, & Gonzalez, 2002)**.

Za neka od primjećениh antiinflamatornih dejstava C-PC-a zaslužna je njegova hromofora PCB. Naime, pokazano je da se PCB, uz pomoć enzima bilveridin reduktaze, prevodi u fikocijanorubin, jedinjenje veoma slične strukture sa bilirubinom, koji je potentan inhibitor NADPH (redukovani nikotinamid adenin dinukleotid fosfat) oksidaze, enzima uključenog u brojna inflamatorna stanja. Prema tome, PCB bi mogao imati i direktno inhibitorno djelovanje na NADPH oksidazu, ispoljavajući direktnu antiinflamatornu aktivnost **(McCarty, 2007)**. Studija koja se bavila uticajem PCB-a na PC12 ćelije (nervne ćelije) je pokazala da PCB povećava vijabilnost ovih ćelija koje su prethodno podvrgute oksidativnom stresu tretiranjem glutamatom i vodonik-peroksidom. Ista studija je ispitala uticaj PCB-a na oksidativni i inflamatorni status pacova kod kojih je indukovani moždani udar. Stanje moždanog udara je praćeno inflamatornim odgovorom, što podrazumjeva infiltraciju ćelija imunog sistema i neuroinflamaciju, pri čemu citokini (IL-1 β , TNF- α), hemokini (CXCL2; hemokin (C-X-C motiv) ligand 2) i adhezioni molekuli (ICAM-1) u ovom procesu igraju ključnu ulogu. U stanju šoka nivo ovih molekula je povišen, a dodatak PCB-a smanjuje njihovu ekspresiju. Takođe, analiza MDA i SOD u serumu pacova pokazuje da PCB dovodi do smanjenja oksidativnog stresa kod ovih životinja, time što je nivo malondialdehida (MDA) smanjen, a aktivnost superoksid dismutaze (SOD) povećana nakon tretmana sa tetrapirolnom hromoforom **(Marin-Prida, Pavon-Fuentes, Llopiz-Arzuaga, Fernandez-Masso, Delgado-Roche, Mendoza-Mari, et al., 2013)**. Treba napomenuti i da C-PC može imati neuroprotektivni efekat. Studija koja se bavila neurotoksičnošću tributiltina (TBT), pokazala da C-PC dovodi do smanjenja oksidativnog stresa i inflamacije do kojih dolazi u moždanom tkivu pacova nakon tretmana sa TBT-om **(Mitra, Siddiqui, & Khandelwal, 2015)**.

Dijabetska nefropatija je glavni uzrok hronične bubrežne insuficijencije. Interesantno, pokazano je da pacijenti sa hiperbilirubinemijom imaju manju šansu da boluju od dijabetske nefropatije. Studija urađena na miševima sa dijabetesom je pokazala da oralno unošenje C-PC-a i

PCB-a dovodi do inhibicije oksidativnog stresa u bubrežima, smanjenja nivoa mRNA za pro-inflamatorne proteine (TNF- α), kao i do smanjene albuminurije, što ukazuje na potencijal C-PC-a i PCB-a u prevenciji dijabetske nefropatije. Takođe, pokazano je da kako bilirubin i biliverdin, tako i PCB dovodi do smanjenja NADPH-zavisne proizvodnje superoksid anjon radikala u bubrežnim mezangijalnim ćelijama, što u saglasnosti sa prethodnim studijama ukazuje da su navedeni tetrapiroli sposobni da inhibiraju NADPH oksidazu (**Zheng, Inoguchi, Sasaki, Maeda, McCarty, Fujii, et al., 2013**).

Hem oksigenaza 1 (HMOX1), osim što predstavlja enzim u metaboličkom putu razgradnje hema, ima važnu ulogu u sprečavanju aterogenih procesa, zahvaljujući svojim antioksidativnim, anti-inflamatornim, anti-apoptotskim i imunomodulatornim aktivnostima. Studija koja se bavila uticajem PCB-a na ćelijsku liniju humanog endotela (EA.hy926) je pokazala da ovaj pigment povećava ekspresiju HMOX1, što ukazuje na njegov potencijal u tretiranju ateroskleroze (**Strasky, Zemankova, Nemeckova, Rathouska, Wong, Muchova, et al., 2013**).

C-PC predstavlja i veoma potentan inhibitor agregacije humanih trombocita, koja je izazvana kolagenom i analogom tromboksana A2 (U46619). Pokazano je da kolagen povećava koncentraciju Ca^{2+} u trombocitima, što se ne događa u prisustvu C-PC-a. Takođe, pokazano je da C-PC inhibira kolagenom stimulisanu sintezu tromboksana B2, kao i povećava nivo cGMP-a u trombocitima. Povećanje cGMP-a dovodi do fosforilacije VASP-a (fosfoprotein koji stimuliše vazodilataciju), što za posledicu može imati inhibiciju aktivacije protein kinaza C, što dalje vodi ka inhibiciji fosforilacije p47 proteina i mobilizacije unutarćelijskog Ca^{2+} . S druge strane, primjenom EPR (elektronska paramagnetna rezonancija) spektroskopije je pokazano da C-PC inhibira formiranje hidroksil radikala u kolagenom aktiviranim trombocitima, što može smanjiti mobilizaciju Ca^{2+} i time inhibirati agregaciju trombocita (**Hsiao, Chou, Shen, Chou, Lin, & Sheu, 2005**).

Studija urađena na miševima, kod kojih je uz pomoć arahidonske kiseline izazvana inflamacija uha, pokazala je da oralno unešen C-PC smanjuje nivo leukotrijena B4, molekula uključenog u inflamatorni odgovor (neutrofilni hemotaktički medijator), kao i da smanjuje otok izazvan arahidonskom kiselinom. Kao moguće objašnjenje navedenih efekata C-PC-a navodi se njegovo antioksidativno dejstvo (**Romay, Ledon, & Gonzalez, 1999**).

Postoje indikacije da bi se C-PC mogao iskoristiti u tretiranju autoimunih oboljenja, s obzirom na uočenu aktivaciju regulatornih T ćelija. Rezultati eksperimenata na pacovima u kojima je izazvan eksperimentalni autoimuni encefalomijelitis (EAE) su pokazali da tretman C-PC-om dovodi do prevencije razvoja EAE. Takođe, mononuklearne ćelije, izolovane iz periferne krvi pacijenata oboljelih od multiple skleroze, a potom inkubirane sa C-PC-om, pokazale su fenotip karakterističan za T regulatorne ćelije. RT-PCR analiza (reakcija lančanog umnožavanja, kojoj prethodi reverzna transkripcija) je pokazala povećano eksprimiranje gena za faktor transformacije rasta β (TGF- β), IL-10, CD25 (α receptor interleukina 2, čija deficijencija dovodi do autoimunih oboljenja) i Foxp3 (transkripcioni faktor potreban za razvoj regulatornih T ćelija) (Penton-Rol, Martinez-Sanchez, Cervantes-Llanos, Lagumersindez-Denis, Acosta-Medina, Falcon-Cama, et al., 2011).

Kao što je već pomenuto, pokazano je da C-PC indukuje apoptozu u LPS stimulisanju ćelijskoj liniji makrofaga RAW 264.7. Međutim, druga studija ukazuje da na ovoj ćelijskoj liniji C-PC može pokazivati i antiinflamatorno delovanje, pošto protein inhibira produkciju nitrita, indukciju iNOS i formiranje TNF- α . Takođe, C-PC inhibira aktivaciju NF-kB, tako što sprečava degradaciju I κ B- α , koji je inhibitor NF-kB (Cherng, Cheng, Tarn, & Chou, 2007).

Poznato je i da C-PC može uticati na sintezu određenih klasa antitijela. Miševi su oralno imunizovani ovalbuminom koji je inkorporiran u biodegradabilne čestice. Kod miševa, kojima je C-PC davan tokom 6 nedelja, je došlo do značajnog povećanja nivoa antigen specifičnih imunoglobulina A (IgA) u intestinalnoj mukozi. Produžavanje unosa PC-a na 8 nedelja dovelo je i do smanjenja nivoa antigen specifičnih imunoglobulina E (IgE) i imunoglobulina G₁(IgG₁) u serumu životinja. Prema tome, može se reći da C-PC pokazuje inhibitorni efekat prema alergiji na dva načina: povećavanjem nivoa IgA sprečava se invazija alergena, dok se supresijom produkcije IgE i IgG₁ u sistemske imunosti minimizira prekomjeran odgovor na alergene (Nemoto-Kawamura, Hirahashi, Nagai, Yamada, Katoh, & Hayashi, 2004).

2.2.2 Upotreba fikocijanina i fikocijanobilina u industriji hrane

Poslednjih godina zapažena je povećana opreznost potrošača u vezi unošenja hrane i pića koji sadrže vještačke kolorante. Takođe, relevantne organizacije u Evropi i SAD-u (poput FDA; Agencije za hranu i lijekove), ukazuju na povezanost vještačkih koloranata sa kancerom i

alergijskim reakcijama. Shodno tome, industrija hrane sve više koristi prirodne kolorante. Za industriju pića i slatkiša posebno su interesantni plavi koloranti, a s obzirom da nisu česti u prirodi, pribjegava se korišćenju vještačkih sredstava za bojenje (**Martelli, Folli, Visai, Daglia, & Ferrari, 2014**). Uzevši u obzir da PC ima intezivnu plavu boju, time njegova upotreba u industriji kao sredstva za bojenje hrane, pića i kozmetičkih proizvoda dobija sve više na značaju, a imajući u vidu potencijalnu toksičnost sintetičkih koloranata. PC, kao prirodni kolorant, koristi se u bojenju žvakaćih guma, sladoleda (**slika 9**), mliječnih proizvoda, bezalkoholnih pića (npr. plavi Pepsi®), bombona, kao i kozmetičkih proizvoda. Štaviše FDA je dozvolila upotrebu C-PC-a kao prirodnog sredstva za bojenje hrane (**Gangl, Zedler, Rajakumar, Martinez, Riseley, Wlodarczyk, et al., 2015**). Ipak, upotreba bilo kog prirodnog koloranta, zahtjeva detaljno poznavanje stabilnosti boje prema toploti, svijetlosti i pH. PC se denaturiše na temperaturama preko 40°C, a takođe je osjetljiv i na svjetlost, pa je na taj način njegova primjena u industriji ograničena (**Pandey, Pandey, & Sharma, 2013**). Međutim, novije studije ukazuju da dodatak šećera ili meda može značajno povećati temperaturnu stabilnost PC-a, što za posledicu ima očuvanje njegove boje i čini ga pogodnijim za industrijsku upotrebu (**Martelli, Folli, Visai, Daglia, & Ferrari, 2014**). Takođe, inkorporiranje C-PC-a u nanovlakna može povećati njegovu temperaturnu stabilnost (**Braga, Figueira, Silveira, Morais, Costa, & Kalil, 2016**).



Slika 9. Upotreba fikocijanina za bojenje hrane. Preuzeto sa internet stranice: <http://www.nutritionaloutlook.com/food-beverage/coloring-spirulina-blue>

2.2.3 C-Fikocijanin kao fluorescentni obilježivač

Kada se fikobilizomi ekstrahuju puferom, dolazi do njihove dezintegracije i fikobiliproteini (PC) gube sposobnost transfera ekscitacione energije, odnosno postaju jako fluorescentni. U poređenju sa ostalim fluoroforama fikobiliproteini imaju visoki molarni

ekstinkcioni koeficijent i fluorescentni kvantni prinos, kao i veliki Stoksov pomjeraj (vidjeti odeljak 2.5.3). Sve ovo ukazuje na njihovu (potencijalnu) primjenu kao fluorescentnih obilježivača (**Kuddus, Singh, Thomas, & Al-Hazimi, 2013**).

Fikobiliproteini, konjugovani sa imunoglobulinima, proteinom A i avidinom se koriste kao fluorescentne probe i imaju široku primjenu u histohemiji, fluorescentnoj mikroskopiji, protočnoj citometriji i fluorescentnim imunosejima. Visoki molarni ekstinkcioni koeficijent je sa jedne strane rezultat velikog broja hromofora po kompleksu fikobiliproteina, a sa druge strane heksameri imaju veće ekstinkcione koeficijente u odnosu na monomere i trimere, zato što hromofora u heksamerima ima manju konformacionu slobodu. Ekstrakcijom PC-a puferima niske jonske sile dolazi do disocijacije heksamera na monomere, koji pokazuju slabiju fluorescenciju. Zbog toga je potrebno hemijskim umrežavanjem monomera PC-a formirati trimere, čiji će aporpcioni i emsioni spektri biti slični nativnim PC trimerima, osim što će ekstinkcioni koeficijenti biti veći kod umreženih trimera. Na taj način, umreženi proizvodi se koriste kao fluorescentni obilježivači. Takođe, hemijski stabilizovan C-PC, fuzionisan sa specifičnim domenima (poput streptavidina) se koristi kao biospecifična fluorescentna proba. Fluorescencija PC-a se može iskoristiti za *in vivo* praćenje rasta cijanobakterija i detekciju toksičnih cijanobakterija u pijaćoj vodi. Postoji i mogućnost bojenja eritrocita, leukocita, trombocita, čak i genomske DNK sa PC-om. Neke studije ukazuju i da bi PC mogao zamjeniti etidijum-bromid u bojenju DNK molekula (**Kuddus, et al., 2013**).

2.3 Pristupi u proučavanju digestibilnosti proteina

Ljudski organizam je razvio kompleksan sistem za varenje hrane, sa konačnim ciljem da "ekstrahovani" nutrijenti (izvori energije i gradivnih jedinica) putem sistemske cirkulacije budu dostupni svim tkivima i ćelijama. Nakon oralnog unošenja hrane prvo dolazi do njenog drobljenja i sijeckanja u ustima, gdje se miješa sa pljuvačkom. Zatim se (djelimično razložena) hrana procesuje u želucu, u promjenljivom periodu, na pH vrijednostima ispod 2. Potom dobijeni sadržaj ulazi u tanko crijevo, gdje se neutralizuje i dalje vari. Tokom svih ovih faza, hrana koja se obrađuje miješa se sa različitim enzimima (amilaze, proteaze i lipaze), dok se u tankom crijevu miješa i sa površinski aktivnim molekulima (žučne soli i fosfolipidi) (**Wickham, Faulks, & Mills, 2009**).

Uopšteno govoreći, sudbina nekog proteina u procesima digestije hrane proučava se na

dva načina: *in vivo*, korišćenjem životinjskih model sistema, gdje se kao mjera digestibilnosti uglavnom koristi balans azota, ili *in vitro*, korišćenjem proteaza (**Wickham, et al., 2009**).

Zlatni standard za proučavanje digestivnih procesa podrazumjeva korišćenje *in vivo* pristupa. Međutim, oni su problematični sa etičkog aspekta, veoma su skupi i tehnički su teški za realizaciju, uz dodatan problem reproduktivnosti. Prema tome, postoje jaki argumenti za razvoj i primjenu *in vitro* modela, koji pouzdano odslikavaju uslove i procese koji se dešavaju pod *in vivo* uslovima. *In vitro* digestioni modeli trebalo bi da budu koncipirani da omoguće proučavanje sve tri glavne faze u digestiji hrane: procesovanje u ustima, u želucu i u duodenumu. Za studije koje se bave proučavanjem digestibilnosti proteina, nisu od značaja enzimi koji djeluju u ustima, već samo oni u želucu i gornjem dijelu tankog crijeva. Ove dvije zone sistema organa za varenje se razlikuju prema sastavu enzima, pH sredine i prisutnim surfaktantima, i potrebno je da obje budu simulirane sekvencijalno, u cilju proučavanja postojanosti proteina i proteinskih fragmenata nastalih hidrolizom (**Wickham, et al., 2009**).

U literaturi postoje dva *in vitro* digestiona modela: statički i dinamički. Statički modeli (poznatiji i kao biohemijski modeli) se definišu kao sistemi u kojima se u toku procesa digestije ne uklanjaju njeni produkti i koji ne imitiraju fizičke/mehaničke procese koji se javljaju *in vivo*. Ovakav tip modela je naročito koristan za proučavanje procesa digestije u želucu, ali je manje primjenljiv za kompletne digestione studije. Zbog toga se statički modeli digestije uglavnom koriste za proučavanje digestibilnosti izolovanih i/ili prečišćenin nutrijenata, te su idealni za procjenu digestibilnosti izolovanih proteina, posebno proteina hrane koji imaju alergena svojstva. Peptidi koji stimulišu imuni odgovor obično imaju molekulsku masu veću od 3 kDa (ili 25 aminokiselinskih ostataka). Prema tome, veći stabilni proteinski fragmenti, ili intaktni proteini, imaju potencijal da pokrenu inicijalnu senzitivaciju, odnosno da djeluju kao alergeni. Iako se većina proteina hrane razgradi u imunološki neaktivne fragmente, veoma mali procenat (koji je imunološki važan) može izbjeći digestiju. Mnogi od statičkih modela su jednostavni i podrazumjevaju: usitnjavanje/homogenizaciju uzorka, zakišeljavanje sa hlorovodoničnom kiselinom, dodavanje pepsina (uz variranje vremena boravka u simuliranoj želudačnoj tečnosti), neutralizaciju sa natrijum-(hidrogen)karbonatom i, na kraju, dodavanje enzima pankreasa i žučnih soli, uz miješanje na 37°C. Za praćenje progressa digestije, obično se mjeri brzina smanjivanja (nestajanja) ili povećanja (nastajanja) neke komponente reakcione smješe

(Wickham, et al., 2009). Ipak, postojanje različitih statičkih digestivnih metoda često otežava poređenje dobijenih rezultata, zbog velike raznolikosti enzima u pogledu izvora iz kojeg se izoluju i njihove aktivnosti, pH vrijednosti digestivne smjese, koncentracije soli, vremena digestije, ali i ostalih relevantnih parametara. Uzevši ovo u obzir, grupa istraživačkih laboratorija je razvila harmonizovani, statički protokol za praćenje *in vitro* digestija, koji sadrži fiziološki relevantne parametre i zasnovan je na međunarodnom konsenzusu. Ovaj protokol se sastoji od tri faze, odnosno njegovom primjenom se oponaša varenje hrane u ustima, želucu i tankom crijevu *in vivo*. Međutim, kao i ostali statički protokoli, i harmonizovani protokol ima nedostatak, zato što zbog svoje uprošćenosti ne simulira realne fiziološki varijabilne odnose koncentracija enzima i supstrata, pH profile, tranzitno vrijeme i ukljanjanje digestovanih proizvoda u vremenu i prostoru. S druge strane, njegova jednostavnost ima prednosti u smislu uporedivosti i konzistentnosti rezultata (Minekus, Alvinger, Alvito, Ballance, Bohn, Bourlieu, et al., 2014). Prilikom proučavanja digestibilnosti proteina od analitičkih tehnika veoma mnogo se koristi klasična natrijum-dodecil sulfat poliakrilamidna gel elektroforeza (SDS-PAGE) (Thomas, Aalbers, Bannon, Bartels, Dearman, Esdaile, et al., 2004).

Za razliku od statičkih modela koji uzimaju u obzir samo biohemijske aspekte digestije, dinamički modeli obuhvataju i fizičko procesovanje hrane u gastrointestinalnom traktu. Takođe, dinamički modeli uzimaju u obzir i efekte kao što su: difuzija, formiranje koloidnih faza, raspodjela nutrijenata između faza i sl. Stoga, ovaj tip modela ima prednost u proučavanju procesa u kojima se fizičko stanje digesta mijenja sa vremenom, na primjer, ukoliko dolazi do promjene u viskoznosti i veličini čestica (Wickham, et al., 2009).

2.3.1 Biodostupnost i digestibilnost C-fikocijanina

U nama dostupnoj literaturi nema podataka o rezultatima studija u kojima je proučena biodostupnost i digestibilnost oralno unijetog C-fikocijanina iz cijanobakterije *Arthrospira-e*. Međutim, pokazano je da inkorporacija C-PC-a u vezikule koje se dobijaju od esencijalnih ulja biljke *Santolina insularis* i zasićenog fosfatidilholina, povećava njegovu usvojivost od strane humanih keratinocita i ćelija endotela. Ista studija je pokazala i da inkorporiran C-PC potentnije smanjuje otok (koji je eksperimentalnim putem izazvan kod miševa) nego slobodan protein, vjerovatno zato što vezikule podstiču usvojanje C-PC-a od strane ćelija endotela, što za posledicu ima njihovu zaštitu od oksidativnog stresa (Castangia, Manca, Caddeo, Bacchetta,

Pons, Demurtas, et al., 2016). I druge studije koje su se bavile enkapsulacijom C-PC-a u razne nosače sugerišu da ovaj pristup može biti koristan u pogledu veće biodostupnosti C-PC-a, a samim tim i njegovog djelotvornijeg efekta u tretiranju raznih patofizioloških stanja (**Castangia, et al., 2016; Figueira Fda, Gettens, Costa, de Moraes, Moraes, & Kalil, 2016**).

Zanimljivo, i sam C-PC utiče na biodostupnost nekih elemenata (selen) i jedinjenja (holesterol). Pokazano je da pacovi tretirani sa C-PC-om imaju niži holesterol u lipoproteinima plazme (**Nagaoka, Shimizu, Kaneko, Shibayama, Morikawa, Kanamaru, et al., 2005**), dok dodatak C-PC-a povećava usvojivost selena kod pacova (**Cases, Wysocka, Caporiccio, Jouy, Besancon, Szpunar, et al., 2002**).

2.3.2 Bioaktivni peptidi

S tradicionalnog aspekta, proteini hrane se smatraju izvorom esencijalnih aminokiselina, kao i metaboličke energije, što je neophodno za rast i neometano obavljanje fizioloških funkcija organizma. Poslednjih desetak godina iznjedrilo je veći broj studija koje su se bavile identifikacijom i karakterizacijom bioaktivnih peptida dobijenih digestijom proteina hrane. Bioaktivnim peptidama se smatraju specifični proteinski fragmenti koji nisu aktivni u okviru strukture roditeljskog proteina, ali nakon njihovog oslobađanja usled enzimske hidrolize, mogu ispoljiti razne fiziološke funkcije (**Sarmadi & Ismail, 2010**). Bioaktivni peptidi pokazuju niz benefita po zdravlje ljudi, kao što su antioksidativna, antikancerska, anti-inflamatorna, imunomodulatorna, antihipertenzivna aktivnost, kao i sposobnost da vezuju jone metala (**Chang, Ismail, Yanagita, Mohd Esa, & Baharuldin, 2015; Kim & Wijesekara, 2010**). Takođe, neki bioaktivni peptidi se odlikuju i multifunkcionalnošću, odnosno jedan peptid može imati više fiziološki značajnih funkcija (**Udenigwe & Aluko, 2012**). Bioaktivni peptidi obično sadrže od 3 do 20 aminokiselinskih ostataka, i njihova aktivnost zavisi kako od aminokiselinskog sastava, tako i od sekvence (**Sarmadi & Ismail, 2010**).

Bioaktivni peptidi se uglavnom dobijaju enzimskom hidrolizom ili mikrobnom fermentacijom proteina hrane. Izbor proteaza je važan, jer od njega zavisi sekvenca krajnjeg proizvoda, a time i njegova biološka aktivnost. Za svrhu hidrolize, koriste se enzimi izolovani iz biljaka i mikroorganizama ili digestivni enzimi, prisutni u gastrointestinalnom traktu (GIT), što je fiziološki relevantnije (**Sarmadi & Ismail, 2010; Udenigwe & Aluko, 2012**). Prilikom

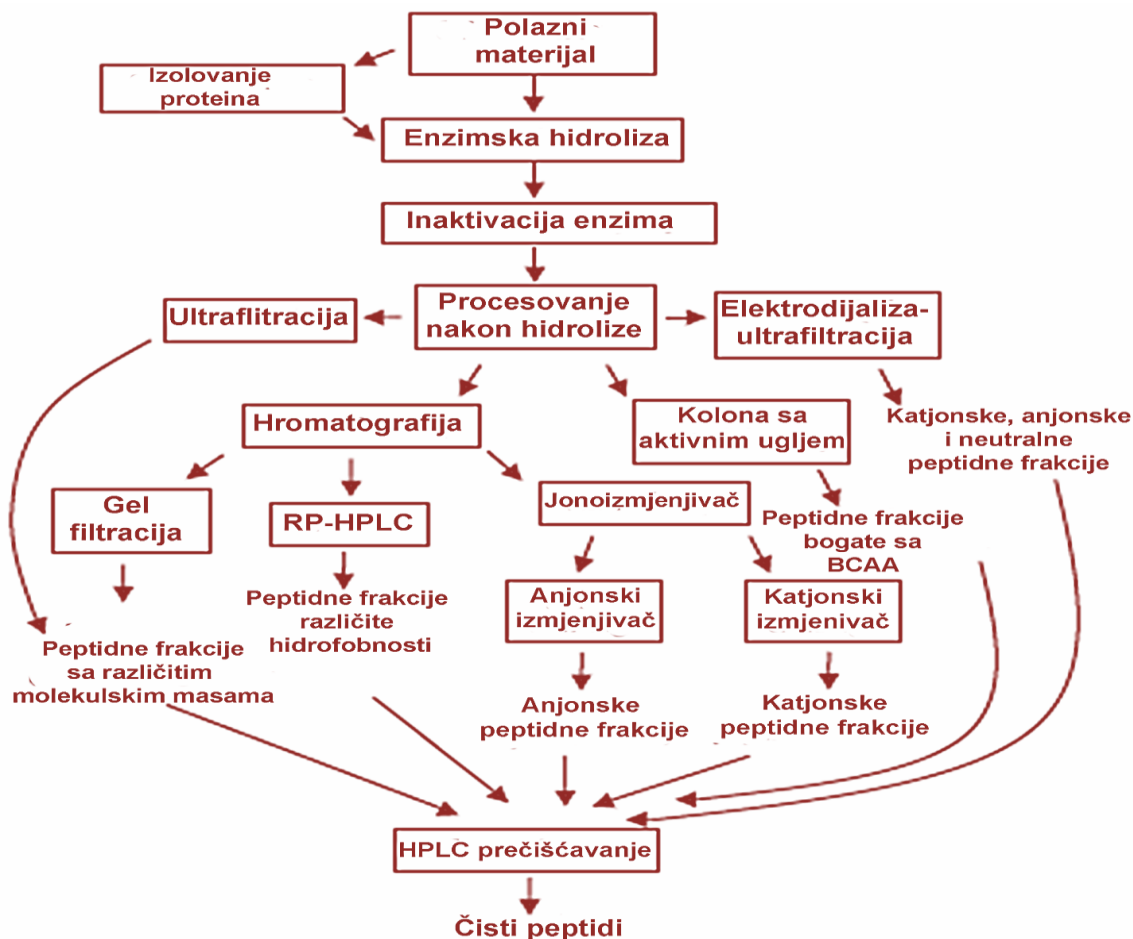
digestije proteina, treba voditi računa o vremenu reakcije, enzimskoj aktivnosti po jedinici supstrata, kao i pretretmanu proteina prije početka hidrolize. Na primjer, pokazano je da prethodna termalna denaturacija proteina, može povećati stepen hidrolize, vjerovatno tako što aktivna mjesta enzima imaju lakši pristup peptidnim vezama denaturisanih proteina (**Udenigwe & Aluko, 2012**).

Ono što je najveći izazov prilikom dobijanja bioaktivnih peptida jeste izolovati i prečistiti nastali peptid u visokom prinosu i sa potentnom bioaktivnošću. Nakon hidrolize, uglavnom se dobija smješa ogromnog broja peptida i prvi koraci u prečišćavanju podrazumjevaju njihovo frakcionisanje na osnovu razlika u molekulskoj masi, upotrebom gel filtracije ili ultrafiltracije. Takođe, za prečišćavanje peptida često se koristi HPLC, sa kolonama napunjenim hidrofobnim matriksima, pri čemu se peptidi razdvajaju na osnovu razlika u njihovoj hidrofobnosti. Ako se traži peptid kojim bi se tretiralo oboljenje za koje je poznato da bi molekuli sa jakim pozitivnim ili negativnim naelektrisanjem imali efekta, onda je jonoizmjenjivačka hromatografija metoda izbora. U skorije vrijeme pojavila se nova metoda poznata kao elektrodijaliza sa ultrafiltracijom, koja razdvaja peptide kako na osnovu mase, tako i po naelektrisanju. Shematski prikaz pristupa za dobijanje i prečišćavanje bioaktivnih peptida je prikazan na **slici 10 (Udenigwe & Aluko, 2012)**. Nakon prečišćavanja, potrebno je odrediti strukturu peptida upotrebom tandemске masene spektrometrije (MS-MS) i naravno, potom testirati biološku aktivnost peptida (**Fan, Bai, Zhu, Yang, & Zhang, 2014**).

Opisani tradicionalni pristupi dobijanja i prečišćavanja bioaktivnih peptida su zametni i prilično skupi. Dalje, ova strategija zanemaruje malo zastupljene biološki potentne peptide. Noviji pristupi za dobijanje peptida sa željenom bioaktivnošću podrazumjevaju i *in silico* pristup, što uključuje odabir odgovarajućih protein/enzim kombinacija, dobijanje peptida od interesa na osnovu *in silico* predviđanja hidrolize, kao i upotrebu modela za predviđanje kvantitativnog odnosa između strukture i bioaktivnosti (QSAR) (**Fan, Bai, Zhu, Yang, & Zhang, 2014**).

Ono što posebno treba uzeti u obzir prilikom dobijanja i proučavanja bioaktivnih peptida je njihova sudbina u GIT-u, gde su podložni digestiji, što predstavlja veliki problem za ispoljavanje njihovih bioaktivnih svojstava. Shodno tome, u cilju povećanja njihove stabilnosti, jedno od rešenja je njihova hemijska modifikacija ili uvođenje D-aminokiselina u strukturu peptida, kao i dobijanje cikličnih peptida. Drugi pristup rešavanja problema hemijske stabilnosti

peptida jeste njihova inkorporacija u polimere ili čestice poput dendrimera, lipozoma i mikrosfera na bazi polielektrolita (Fan, et al., 2014).



Slika 10. Shematski prikaz dobijanja, izolovanja i prečišćavanja bioaktivnih peptida. Slika je preuzeta iz Udenigwe & Aluko (2012).

Za razliku od „klasičnih“ bioaktivnih peptida čije su strukture i bioaktivnosti dobro proučeni, o bioaktivnim svojstvima peptida koji kovalentno vezuju hromofore (hromopeptidi) veoma malo se zna.

2.3.3 Masena spektrometrija kao tehnika za određivanje sekvence proteina i peptida

Masena spektrometrija (MS) je tehnika čiji počeci datiraju još od početka prošlog vijeka. MS zauzima posebno mjesto među analitičkim tehnikama pošto se zasniva na mjerenju mase molekula, što je suštinska karakteristika svakog molekula, pri čemu je osjetljivost mjerenja prilično visoka i stoga ima široku primjenu. Početkom osamdesetih i, u većem obimu,

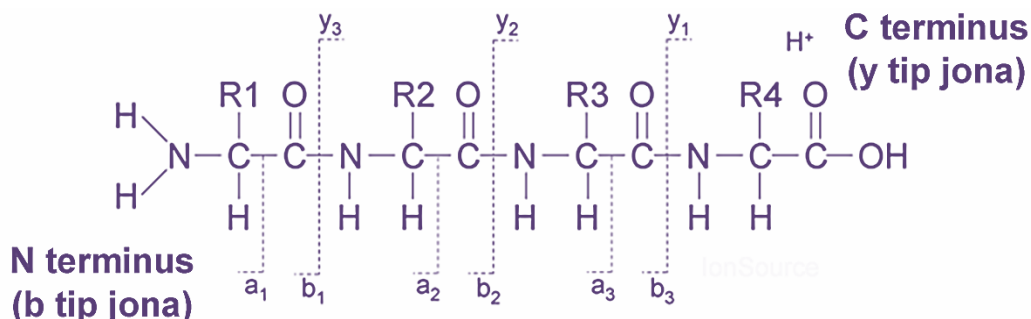
devedesetih godina XX vijeka, masena spektrometrija je postala važno oruđe za bionauke (prije svega za oblast proteomike). Makromolekuli su prilično veliki molekuli i zbog toga ih je teško prevesti u gasnu fazu i jonizovati, zbog čega je bilo potrebno mnogo vremena da se razviju metode jonizacije kao što su matriksom potpomognuta jonizacija desorpcijom laserom (MALDI) i elektrosprej jonizacija (ESI), koje su najviše zaslužne za uspjehe MS u oblasti bionauka. Dalje, veliki napredak je postignut na polju pripreme uzorka za analizu, što je esencijalno za cijelokupnu izvodljivost i osjetljivost MS-a. Razvoj softverskih algoritama, koji su omogućili poređenje masenih spektara dobijenih za određeni protein sa bazama podataka, učinio je da se MS razvije u tehniku za proučavanje proteomike na velikoj skali (**Mann, Hendrickson, & Pandey, 2001**). U poslednje vrijeme razvijeni su još bolji instrumenti i algoritmi za karakterizaciju proteina, što ukazuje na dalji trend razvoja MS-a bez znakova usporavanja.

2.3.3.1 Sekvenciranje peptida tandemskom masenom spektrometrijom

Sekvenca peptida može biti određena na osnovu rezultata dobijenih fragmentacijom peptida primjenom tandemske MS. U ovoj tehnici, peptidi iste molekulske mase se izdvajaju od ostatka peptidne smješe u prvom masenom spektrometru, a potom se fragmentišu kolizijom sa molekulima inertnog gasa, kao što su argon ili azot. Dobijeni fragmenti se razdvajaju u drugom dijelu tandemskog masenog spektrometra, pri čemu se dobija MS/MS spektar. Dobijeni MS/MS podaci se porede sa bazama podataka u cilju identifikacije željenog proteina, ali se može raditi i *de novo* sekvenciranje proteina. U savremenim MS instrumentima (koji se upotrebljavaju za sekvenciranje peptida) potrebni su višestruki sudari, kako bi se ciljani peptid fragmentisao, za razliku od visoko-energetske fragmentacije, gdje je dovoljan jedan sudar da bi se raskinula kovalentna veza (**Mann, et al., 2001**).

Kao što je prikazano na **slici 11**, nekoliko veza duž peptidne kičme se može raskinuti sudarima sa molekulima inertnog gasa. Najčešći tipovi jona koji se dobijaju ovom fragmentacijom su b i y joni, koji redom označavaju raskidanje amidne veze sa retencijom naelektrisanja na N ili C terminusu. Najveći broj eksperimenata u proteomici se izvodi korišćenjem tripsina za digestiju proteina, zbog čega se dobijaju peptidi koji imaju ostatke arginina ili lizina na C kraju peptida; u ovom slučaju dominira y tip jona. Za sekvenciranje peptida najviše se koristi ESI tip jonizacije. Dobijeni joni imaju naelektrisanje koje odgovara broju pozitivno naelektrisanih aminokiselina, plus naelektrisanje na N kraju peptida. Manji

peptidi, po pravilu, nose dvije ili tri jedinice pozitivnog naelektrisanja, dok su veći peptidi višestruko naelektrisani, tako da spektri dobijeni njihovom fragmentacijom takođe sadrže višestruko naelektrisane jonske vrste (**Mann, et al., 2001**).



Slika 11. Tipovi jona koji se dobijaju fragmentacijom peptida tandemskom MS. Preuzeto sa internet sajta: <http://www.ionsource.com/tutorial/DeNovo/nomenclature.htm>

2.4 Albumini iz humanog i govedeg seruma

Albumini iz seruma predstavljaju jedne od najpoznatijih i najbolje izučenih proteina, kao i najzastupljenije proteine u plazmi (sa koncentracijom od oko 700 μM). Raznolikost njihovih funkcija, od regulacije osmotskog pritiska, preko transporta brojnih endogenih i egzogenih liganada, do antioksidativnih i neuroprotektivnih efekata, privlačila je pažnju mnogih naučnika godinama unazad (**Fanali, di Masi, Trezza, Marino, Fasano, & Ascenzi, 2012**). Takođe, albumini su našli široku primjenu kako u medicini i biotehnologiji, tako i u fundamentalnim istraživanjima (**Peters, 1995**).

Albumin se sintetiše u hepatocitima jetre i izgrađen je samo od aminokiselinskih ostataka, bez prostetičnih grupa i ostataka monosaharida. Serum albumini su monomerni proteini, molekulske mase oko 66 kDa, pri čemu primarna struktura BSA i HSA sadrži 17 disulfidnih mostova, kao i jedan slobodan ostatak cisteina (Cys-34). U pogledu sekundarnih struktura α heliksi su dominantni, sa zastupljenošću od 67% (podatak dobijen na osnovu kristalnih struktura proteina) (**slika 12**). U okviru 3D strukture uočavaju se tri homologa domena (I, II i III), a svaki od njih sadrži dva subdomena (A i B), koji se redom sastoje od po šest i četiri α heliksa (**Bujacz, 2012; He & Carter, 1992**).

Izvanredan kapacitet HSA da vezuje različite ligande, čini ga važnim regulatorom farmakokinetičkih osobina lijekova, kao i model proteinom za proučavanje interakcija sa prirodnim bioaktivnim jedinjenjima. HSA je transporter mnogih fizioloških liganada i

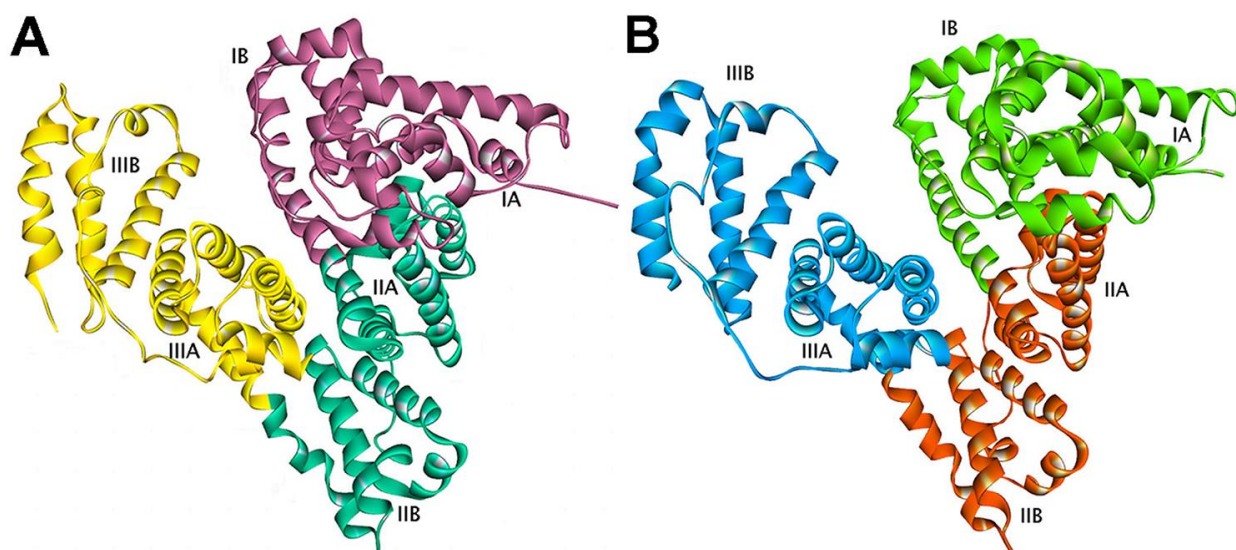
bioaktivnih jedinjenja, kao što su masne kiseline, vitamini, metaboliti i različiti lijekovi. Masne kiseline su primarni fiziološki ligandi albumina, pri čemu je identifikovano devet vezivnih mjesta za masne kiseline sa različitim afinitetima (**Fanali, et al., 2012**). Prisustvo Trp-214 ostatka u strukturi HSA daje ovom proteinu intenzivnu fluorescenciju, što omogućava ispitivanje vezivanja različitih liganada za HSA upotrebom fluorescentne spektroskopije. Vezivna mjesta za mnoge aromatične i heterociklične ligande su uglavnom locirana u okviru dva hidrofobna džepa u subdomenima IIA (Sudlow-ovo mjesto I) i IIIA (Sudlow-ovo mjesto II) (**Sudlow, Birkett, & Wade, 1975; Zsila, 2013**). Sudlow-ovo mjesto I je poznato i kao varfarin-azopropazonsko mjesto. Karakteristična odlika ovog mjesta je vezivanje voluminoznih heterocikličnih anjonskih liganada, pri čemu se njihovo negativno naelektrisanje lokalizuje u sredini molekula. Neki od lijekova koji se vezuju za ovo mjesto su varfarin, azopropazon i valproat (**Sudlow, et al., 1975**). Nedavne spektroskopske studije su pokazale fleksibilnost molekula HSA da primi kako anjonske, tako i neutralne molekule u Sudlow-ovom mjestu I (**Datta & Halder, 2014**). Mjesto II je poznato i kao indol-benzodiazepansko mjesto, a primjeri liganada koji se specifično vezuju za ovo mjesto su ibuprofen, flubirprofen i diazepam (**Sudlow, et al., 1975**). Takođe, postoje i molekuli, poput miristinske kiseline, koji se vezuju za oba mjesta na ovom proteinu (**Sudlow, et al., 1975; Ghuman, Zunszain, Petitpas, Bhattacharya, Otagiri, & Curry, 2005; Wybranowski, Cyrankiewicz, Ziomkowska, & Kruszewski, 2008**). Novije studije ukazuju da HSA ima i treće relevantno vezivno mjesto, a to je subdomen IB, pri čemu je tipičan primjer liganada za ovo vezivno mjesto hem (npr. **Zsila, 2013**).

Interesantno, bez obzira što je monomer, HSA je podložan alosternoj regulaciji aktivnosti. Multidomenska organizacija njegove strukture je osnov za alosteriju kod ovog proteina. Razumijevanje alosterne regulacije HSA omogućili su rezultati kristalografskih analiza strukture proteina sa i bez liganada. Konformaciona adaptibilnost HSA utiče kako na njegovu strukturu, tako i na sposobnost vezivanja liganada na nivou cijelog molekula. Tako je pokazano da vezivanje masnih kiselina dovodi do konformacionih promjena u proteinu, što za fiziološku posledicu ima receptorom posredovanu endocitozu i isporuku masnih kiselina u hepatocite. Vezane masne kiseline utiču na vezivanje drugih liganada ne samo prostom kompeticijom, već i alosterijom. Pokazano je da ligandi koji se vezuju za subdomen IIA imaju veći afinitet za protein u konformaciji bez masnih kiselina, dok ligandi koji se vezuju za subdomen IB imaju veći

afinitet vezivanja kada protein ima vezane masne kiseline. Štaviše, veći broj studija je dokazao da su subdomeni IB i IIA alosterno kuplovani. Naime, hem-Fe(III) koji se vezuje za subdomen IB izaziva smanjenje afiniteta liganada koji se vezuju za subdomen IIA. Alosterna regulacija vezivanja liganda za HSA od značaja je i kod upotrebe lijekova. Vezivanje lijekova za proteine plazme utiče na njihovu biološku efikasnost, a isporuka lijekova ciljnim tkivima je modulirana njihovim reverzibilnim vezivanjem za komponente krvi. Na primjer, u nekim patofiziološkim stanjima kao što je hemolitička anemija, povećana koncentracija hem-Fe kompleksa u krvi, može dovesti do disocijacije lijekova sa HSA i posledično do trovanja. S druge strane, koncentracija hem-Fe kompleksa u plazmi može biti povećana nakon administracije lijekova (**Fanali, et al., 2012**). Shodno tome, visoka fleksibilnost proteina nakon vezivanja liganada, kao i izvanredni kapacitet da smjesti strukturno raznoliki skup liganada na različitim vezivnim mjestima, čini HSA proteinom sposobnim da promjeni konformaciju vezivnog mjesta (**Ascenzi, Bocedi, Notari, Fanali, Fesce, & Fasano, 2006**). Uzevši sve navedeno u obzir, od važnosti je razumijevanje kako se kod glavnog proteina plazme, koji vezuje brojne ligande na različitim vezivnim mjestima, mjenja konformacija i stabilnost nakon vezivanja određenog molekula za specifično vezivno mjesto. U nekoliko studija je zapaženo da vezivanje liganda za HSA vodi ka stabilizaciji njegove konformacije, uključujući i ligande iz hrane poput vitamina B12 (**Hou, Qi, Ouyang, Liao, Zhang, & Liu, 2008**), masnih kiselina (**Guizado, 2014**), lupeola (**Kallubai, Rachamalla, Yeggoni, & Subramanyam, 2015**) i floretina (**Barreca, Lagana, Toscano, Calandra, Kiselev, Lombardo, et al., 2017**).

Očekivano, BSA i HSA su strukturno slični proteini, sa homologijom od 76%. Ipak, BSA sadrži dva triptofanska ostatka, jedan u hidrofobnom džepu subdomena IIA (Trp-212), drugi na površini subdomena IB (Trp-134) (**Bujacz, 2012**), što mu daje veću fluorescenciju od HSA. Sa stanovišta protein-ligand interakcija, BSA je manje proučavan od HSA, pa tako za njega postoji daleko manji broj kristalnih struktura, kao i kristalnih struktura u kompleksima sa ligandima. Sa aspekta humane fiziologije uloga ova dva proteina je različita. Dok je HSA protein prisutan u humanoj plazmi, važan za distribuciju lijekova i raznih prirodnih bioaktivnih molekula u krvotoku, BSA kao protein hrane (nalazi se u govedini i kravljem mleku, koristi se kao aditiv zbog emulgirajućih osobina) (**Fuentes Aparicio, Sanchez Marcen, Perez Montero, Baeza, & de Barrio Fernandez, 2005; Ofori & Hsieh, 2012**) može da veže razne ligande koji se oralno

unose, i time utiče na njihovu biodostupnost, odnosno apsorpciju u gastro-intestinalnom traktu. Pokazano je i da BSA posjeduje alergena svojstva (**Voltolini, Spigno, Cioe, Cagnati, Bignardi, & Minale, 2013**). Dobro je poznato da alergenost proteina zavisi od osjetljivosti na digestiju u GIT-u (**Untersmayr & Jensen-Jarolim, 2008**). Vezivanje liganada može da utiče na fleksibilnost i stabilnost proteina, što mjenja njihovu sklonost ka digestiji i denaturaciji (**Celej, Montich, & Fidelio, 2003; Stojadinovic, Radosavljevic, Ognjenovic, Vesic, Prodic, Stanic-Vucinic, et al., 2013**). S druge strane, proteini hrane vezivanjem bioaktivnih molekula mogu promjeniti njihovu biodostupnost i bioaktivna svojstva kao što je antioksidativna aktivnost (**Jakobek, 2015**). Prema tome, proučavanje interakcija između proteina i bioaktivnih molekula iz hrane može dati vrijedne informacije u vezi njihove distribucije, stabilnosti i aktivnosti *in vivo*.



Slika 12. Modeli 3D struktura (A) HSA (PDB kod 1BM0; internet stranica: <http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=1bm0>) i (B) BSA (PDB kod 3V03; internet stranica: <http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=3V03>), sa označenim subdomenima.

2.4.1 Vezivanje bilirubina za HSA

Bilirubin, tetrapirolni molekul (**slika 13A**) veoma slične strukture kao PCB, predstavlja proizvod metabolizma hema. Osim što pri povišenim koncentracijama može izazvati ozbiljna patološka stanja (**Petersen, Ha, Harohalli, Feix, & Bhagavan, 2000**), dokazana je i antikancerska i antioksidativna aktivnost ovog molekula (**Jansen & Daiber, 2012; Keshavan, Schwemberger, Smith, Babcock, & Zucker, 2004**). Biosintetska forma bilirubina (4Z, 15Z-bilirubina IX α) lipofilna i nerastvorna u vodi na neutralnom pH, transportuje se kroz krv pomoću

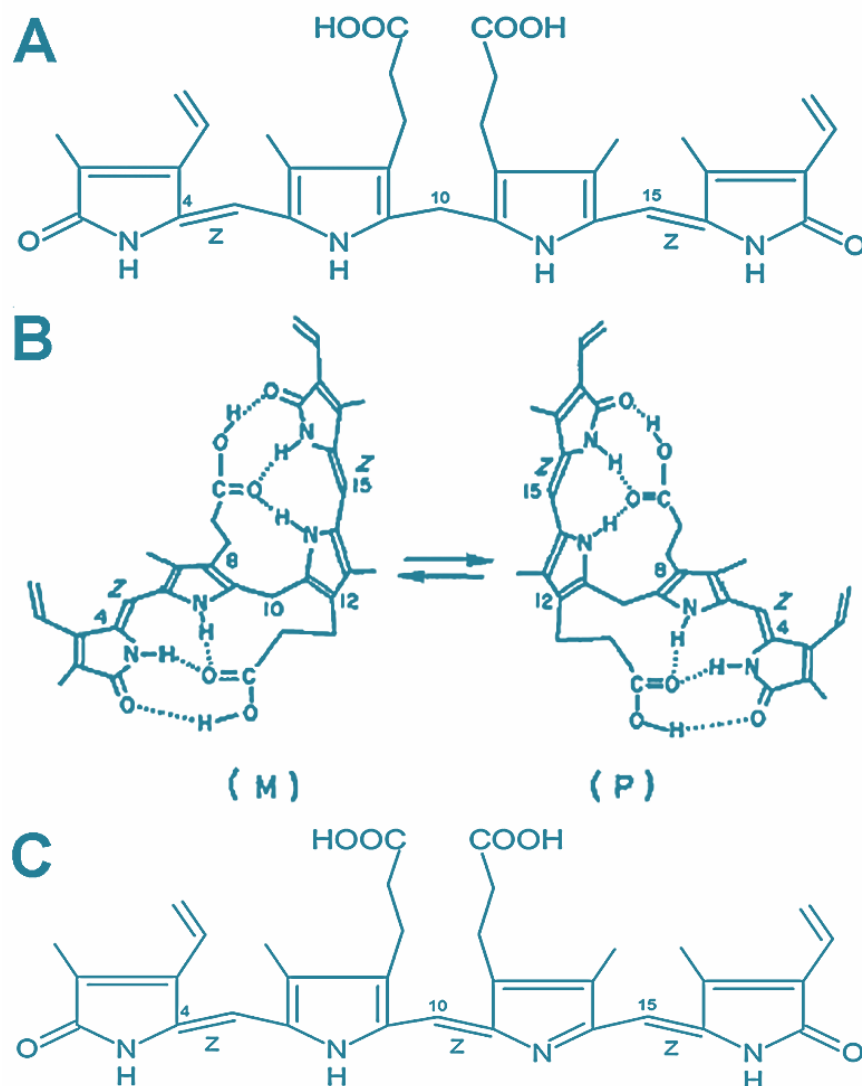
albumina iz seruma do jetre gdje se transformiše do hidrofilnijeg glukuronida. Bilirubin je normalno prisutan u plazmi u niskim koncentracijama (5-17 μM), ali kada je konjugacija bilirubina deficitarna, nekonjugovani pigment se akumulira u cirkulaciji i ekstravaskularnim tkivima. Prema tome, HSA djeluje kao fiziološki pufer za bilirubin i sprječava njegov transfer iz krvi ka tkivima, i time onemogućava razvoj encefalopatije, ozbiljnog patofiziološkog stanja (**Petersen, et al., 2000**). Rezultati dobijeni CD (cirkularni dichroizam) studijama pokazuju da je vezivanje bilirubina za HSA enantioselektivno, pošto se *P* konformer dominantno vezuje za protein (**slika 13B**). Biliverdin IX α (**slika 13C**), biološki prekursor bilirubina, dominantno se vezuje za HSA kao *M* konformer (**Trull, Ibars, & Lightner, 1992**).

Biosintetska forma bilirubina se vezuje visokim afinitetom (konstanta vezivanja je od 10^7 do 10^8 M^{-1} , zavisno od literature) za jedno mjesto na HSA (**Kumagai, Ando, Miyatake, Greimel, Kobayashi, Hirabayashi, et al., 2013; Minomo, Ishima, Kragh-Hansen, Chuang, Uchida, Taguchi, et al., 2011**). Takođe, postoji još jedno ili dva sekundarna mjesta sa najmanje deset puta nižim afinitetima (**Jacobsen, 1977; Petersen, et al., 2000**). Bilirubin je molekul podložan fotoizomerizaciji. Konverzija 4Z, 15Z-bilirubina fotosenzitizacijom dovodi do formiranja geometrijskog izomera koji ima niži afinitet za HSA, ali veću rastvorljivost u vodi, što omogućava lakše izlučivanje (**Maisels & McDonagh, 2008**).

Uprkos mnogobrojnim istraživanjima, ne postoji saglasnost oko lokalizacije primarnog visoko-afinitetnog vezivnog mjesta za bilirubin na albuminu. Kristalografska studija je locirala vezivno mjesto za fotoizomer bilirubina 4Z, 15E-bilirubin u okviru subdomena IB. Međutim, u ovom mjestu izomer bilirubina zauzima *M* konformaciju (**slika 13B**), što je u suprotnosti sa rezultatima CD mjerenja, gdje je nađeno da se 4Z, 15Z-bilirubin vezuje za HSA kao *P* konformer (**Zunzain, Ghuman, McDonagh, & Curry, 2008**). U skladu s tim, rezultati većeg broja studija ukazuju da je hidrofobni džep subdomena IIA primarno visoko-afinitetno mjesto za bilirubin (**Goncharova, Orlov, & Urbanova, 2013; Petersen, et al., 2000**).

Pristup mutiranja HSA kako bi se odredio ključni aminokiselinski ostatak za vezivanje bilirubina u subdomenu IIA nije bio uspješan. On se zasnivao na pretpostavci da se dianjonska forma bilirubina vezuje za HSA, ali mutacije K195M, K199M, F211V, W214L, R218M, R222M, H242V, R257M u subdomenu IIA nisu dramatičnije uticale na afinitet bilirubina za HSA (**Petersen, et al., 2000**). Shodno tome, predviđeno je da je vezivanje bilirubina za protein

dinamično. Višestruki obrazac vezivanja se može pripisati formiranju fleksibilnog bilirubin-HSA kompleksa, pri čemu ne postoji samo jedan način vezivanja, već se dešavaju višestruke interakcije između bilirubina i HSA. Druga studija koja se bazirala na HSA mutantima eksprimiranim na fagu (od engl. phage display) pokazala je da je afinitet bilirubina za domen I (ostaci od 1 do 186) značajno manji nego za domen II. Takođe, bilirubin vezan za domen I, ima neobičnu *M* konformaciju koja je različita od *P* konformacije u kojoj se bilirubin nalazi kada je vezan za domen II, kao i za intaktni molekul HSA (Minomo, et al., 2011).



Slika 13. (A) Strukturna formula molekula bilirubina; (B) *M* i *P* konformeri bilirubina. Isprekidanom linijom su prikazane vodonične veze između funkcionalnih grupa (Lighnter, Wijekoon, & Zhang, 1988); (C) Strukturna formula biliverdina.

Dodatna kontradikcija vezana za bilirubin je i njegovo naelektrisanje na fiziološkom pH. Najnovije studije su pokazale, uprkos eksperimentalnim podacima koji sugerišu da karboksilne grupe u molekulu imaju niže pK_a vrijednosti, da je bilirubin neutralan ispod pH 8, odnosno na fiziološkim pH vrijednostima između 7,2-7,4 (**Mukerjee & Ostrow, 2010**). Molekul se nalazi u konformaciji žlebnjaka (engl. ridge tile) koju odlikuju jake vodonične veze (**slika 13B**), što sprječava jonizaciju karboksilnih grupa bilirubina i smanjuje rastvorljivost u vodenim rastvorima. Sličnih podataka za PCB nema. Slično biliverdinu, PCB ne može da zauzme konformaciju žlebnjaka koju posjeduje bilirubin, zbog prisustva dvostruke veze između C_{10} i C_{11} atoma PCB-a, koja sprječava rotaciju, što za posledicu ima različite spektralne karakteristike intenzivno plavog pigmenta (**Boiadjiev & Lightner, 1999**).

2.5 Metode za proučavanje protein-ligand interakcija

Mnogobrojne esencijalne funkcije koje proteini obavljaju se upravo zasnivaju na nekovalentnim, reverzibilnim interakcijama sa malim molekulima, nukleinskim kiselinama i drugim proteinima. Shodno tome, detaljna termodinamička i kinetička karakterizacija protein-ligand interakcija je od suštinskog značaja za razumijevanje biohemijskih procesa. Postoje brojne standardne tehnike za karakterizaciju interakcija, a pojavljuju se i nove. Za proučavanje protein-ligand interakcija može biti iskorišćena svaka tehnika kod koje je promjena jačine signala proporcionalna formiranom protein-ligand kompleksu. U ovom pregledu je sažeto dat prikaz odabranih, u biohemiji najčešće korišćenih i opšteprihvaćenih metoda za proučavanje protein-ligand interakcija.

2.5.1 UV/VIS spektrofotometrija

UV/VIS spektrofotometrija, predstavlja jednostavnu i neizostavnu tehniku u proteinskoj biohemiji. Proteini apsorbuju u UV/VIS regionu zahvaljujući: peptidnoj vezi koja apsorbuje na 220 nm i aromatičnim aminokiselinskim ostacima (fenilalanin, tirozin i triptofan) koji apsorbuju između 250 i 300 nm. Proteini koji vezuju koenzime i prostetične grupe mogu pokazivati apsorbciju i u vidljivoj oblasti. Ove hromofore su osjetljive na promjene u okruženju proteina i konformacione promjene što omogućava praćenje vezivanja liganada za proteine. Tako se prisustvo hema u hem-vezujućim proteinima koristi za karakterizaciju vezivanja liganada za proteine poput hemoglobina i mioglobina (**Nienhaus, 2005**). S druge strane, i praćenje apsorbcije liganada koji apsorbuju u vidljivoj oblasti može biti iskorišćeno za detekciju

vezivanja. Tako je vezivanje bilirubina za HSA praćeno crvenim pomjerajem od 26 nm u spektru bilirubina (od 440 do 466 nm), što je iskorišćeno za određivanje broja vezivnih mjesta za bilirubin na ovom proteinu (**Hrkal & Klementova, 1984**). Ipak, za većinu protein-ligand sistema, uz UV/VIS spektrofotometriju su potrebne i druge metode kako bi se vezivanje detaljnije okarakterisalo.

2.5.2 CD spektroskopija

Jedna od ključnih karakteristika bioloških (makro)molekula jeste hirlnost, koja podrazumjeva geometrijsku karakteristiku rigidnog objekta koji se ne može preklopiti sa svojim likom u ogledalu. Prema tome, takav objekat (u hemiji molekul) je asimetričan. Cirkularni dihroizam (CD) predstavlja razliku u apsorpciji desno i lijevo cirkularno polarizovane svjetlosti. CD spektroskopija je jednostavna tehnika koja na nedestruktivan način može dati strukturne informacije vezane za asimetriju molekula (**Williams & Daviter, 2013**)

CD signali pojavie se ukoliko dolazi do apsorpcije zraćenja, i tako se spektralne trake (pikovi) lako mogu pripisati različitim strukturnim karakteristikama molekula. U CD spektroskopiji proteina, slično kao kod UV/VIS spektrofotometrije, hromofore od interesa podrazumjevaju peptidnu vezu (apsorpcija ispod 240 nm), aromatićne aminokiselinske ostatke (između 260 i 320 nm) i disulfidne veze (slaba apsorpcija oko 260nm). Kada se snima na talasnim dužinama ispod 250 nm, onda se radi o dalekim-UV spektrima (engl. far-UV), dok pri talasnim dužinama iznad 250 nm imamo bliske-UV/VIS spektre (engl. near-UV). Cirkularni dihroizam peptidnih veza ima veliki značaj za određivanje sekundarnih struktura proteina, zato što će različite sekundarne strukture imati različiti intenzitet, položaj pikova i oblik traka u CD spektrima. Postoje brojni algoritmi za procijenu sekundarnih struktura u proteinima, ali se za tu svrhu mogu iskoristiti i neke jednostavne matematićke formule (**Kelly, Jess, & Price, 2005**). Praćenjem sekundarnih struktura, može se ispitivati uticaj vezivanja liganda na konfromaciju proteina (**Greenfield, 2006b**). Takođe, na osnovu promjene signala u dalekim-UV CD spektrima može se odrediti temperaturna stabilnost proteina, a time i uticaj liganada na otpornost proteina prema temperaturnoj denaturaciji (**Greenfield, 2006a**).

Kao što je pomenuto, signali u spektralnom regionu između 260 i 320 nm uglavnom potieću od aromatićnih aminokiselinskih ostataka. Triptofan pokazuje pik na oko 290 nm, tirozin

između 275 i 282 nm, dok fenilalanin ima slab, ali oštar pik između 255 i 270 nm. Oblik i intenziteti signala u bliskom-UV CD spektru proteina zavise kako od broja aromatičnih aminokiselinskih ostataka, tako i od njihove mobilnosti, njihovog mikro-okruženja (u smislu polarnosti) i njihovog rasporeda u prostoru. Iako bliski-UV CD spektri ne mogu dati detaljne informacije o strukturi proteina, oni predstavljaju "otisak" prsta tercijarne strukture proteina i mogu ukazivati na konformacione promjene proteina. Takođe, bliski-UV CD spektri su osjetljiviji od dalekih-UV CD spektara na promjene izazvane vezivanjem liganada (**Kelly, et al., 2005**).

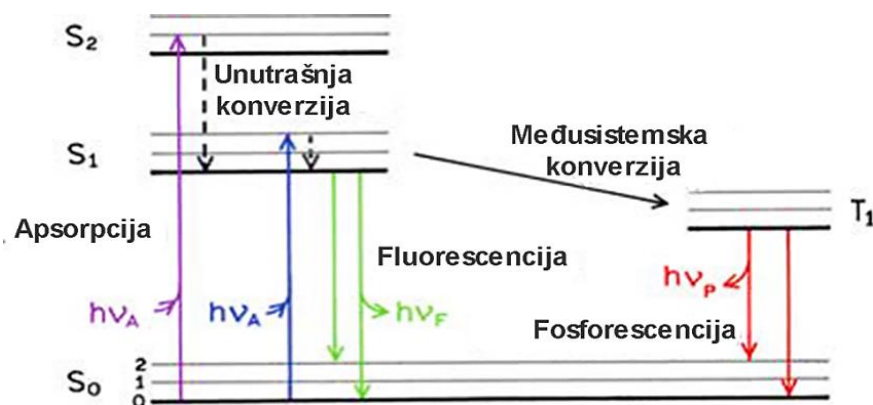
Jedan od zanimljivijih aspekata primjene CD spektroskopije u proučavanju protein-ligand interakcija je indukovanje optičke aktivnosti kod liganda nakon vezivanja za protein. Do ove pojave dolazi usled vezivanja ahiralnog liganda u asimetrično (hiralno) okruženje proteina, što za posledicu ima indukovani cirkularni dihiroizam (**Williams & Daviter, 2013**). Eklatantan primjer ovog fenomena jeste vezivanje bilirubina i biliverdina za HSA. Oba tetrapirola u rastvoru postoje kao smješa *P* i *M* konformera, ali predominantno vezivanje jednog konformera za protein dovodi do indukovanja Kotonovog efekta, odnosno pojave dva pika u CD spektrima, jednog sa pozitivnim, a drugog sa negativnim predznakom (**Blauer & Wagniere, 1975**).

2.5.3 Spektrofluorimetrija

Spektrofluorimetrija predstavlja jednu od najčešće korišćenih i najpogodnijih metoda za karakterizaciju protein-ligand interakcija. Visoka osjetljivost, kao i jednostavnost su glavni razlozi široke upotrebe ove tehnike kako za proučavanje interakcija, tako i u drugim oblastima nauke, tehnologije i medicine. Fluorimetrija je oko sto puta osjetljivija od spektrofotometrije, a nizak (pozadinski) šum daje dodatnu prednost prilikom karakterizacije protein-ligand interakcija (**Williams & Daviter, 2013**).

Sam fenomen fluorescencije zasniva se na elektronskim prelazima do kojih dolazi usled ekscitacije (pomoću svjetlosti) elektrona u molekulima sa konjugovanim vezama. Nakon ekscitacije, elektroni prelaze na više energetske nivoe, a prilikom vraćanja na osnovni nivo (S_0), može doći do emisije svjetlosti. Ako elektron u ekscitovanom stanju ima suprotan spin od onog u osnovnom nivou (singlet stanje), onda je prelaz sa višeg na osnovni energetski nivo dozvoljen i dolazi do brzog emitovanja fotona (obično je brzina emisije 10^8 s^{-1}), odnosno do fluorescencije.

Svaki elektronski energetski nivo podrazumjeva postojenje više vibracionih nivoa. Prilikom ekscitacije fluorofore na viši elektronski energetski nivo (S_1 ili S_2), fluorofora može biti ekcitovana na više vibracione nivoe S_1 ili S_2 elektronskih energetskih nivoa. Međutim, tada brzo dolazi do relaksacije na najniži vibracioni nivo S_1 nivoa (unutrašnja konverzija). Prilikom prelaska na osnovni energetski elektronski nivo, koji takođe ima više vibracionih stanja, obično dolazi do prelaska na viša vibraciona stanja ovog nivoa (**slika 14**), posle čega sistem brzo dostiže temperaturnu ravnotežu. Upravo su ovi prelazi u okviru vibracionih stanja istog elektronskog nivoa razlog zašto je energija ekscitacije veća od energije emisije, odnosno talasna dužina emisije je veća od talasne dužine ekscitacije, pri čemu se razlika između ove dvije talasne dužine zove Stoksov pomjeraj. Pored fluorescencije, koja podrazumjeva dozvoljene prelaze, može doći i do fosforescencije, gdje dolazi do značajno sporije emisije. Naime, ako se fluorofora u pobuđenom stanju podvrgne konverziji spina iz singletnog u tripletno stanje (elektron u pobuđenom stanju ima istu orijentaciju spina kao elektron u osnovnom stanju), prelaz na osnovni nivo je zabranjen, što za posledicu ima da je konstanta brzine emisije kod fosforescencije manja nekoliko redova veličine u poređenju sa fluorescencijom (**slika 14**) (**Lakowicz, 2006**).



Slika 14. Shematski prikaz procesa koji se odvijaju tokom procesa fluorescencije i fosforescencije. Preuzeto iz **Lakowicz (2006)**.

Kada se govori o fluorescenciji, neophodno je pomenuti dva veoma važna parametra: kvantni prinos i životni vijek fluorescencije (engl. fluorescence lifetime). Životni vijek fluorescencije je vrijeme koje fluorofora provede u ekscitovanom stanju i ono u prosjeku iznosi oko 10 ns. Proces fluorescencije je u konkurenciji sa neradijativnim procesima i od odnosa ove dvije pojave zavisi kvantni prinos. Prema tome, fluorescentni kvantni prinos predstavlja odnos

broja emitovanih i apsorbovanih fotona i može biti između 0 i 1, a zavisi od brojnih faktora, poput lokalnog okruženja i tipa rastvarača (**Lakowicz, 2006; Williams & Daviter, 2013**).

Prilikom karakterizacije vezivanja liganada za proteine, spektrofluorimetrija se često koristi u kontekstu praćenja fluorescencije proteina. Za razliku od ostalih biomakromolekula, proteini pokazuju fluorescenciju koja može biti iskorišćena za ispitivanje interakcija, i to zahvaljujući aromatičnim aminokiselinskim ostacima (**Lakowicz, 2006**). Fluorescencija triptofana dominira u odnosu na ostale dvije aromatične aminokiseline, zbog većeg apsorpcionog koeficijenta, većeg kvantnog prinosa, kao i efikasnog mehanizma transfera energije od tirozina i fenilalanina do triptofana. Fenilalanin ima najmanji kvantni prinos i ekscituje se na najnižim talasnim dužinama, te je njegova fluorescencija zanemarljiva, pošto se protein obično ekscituje na 280 nm, pri čemu se pobuđuju tirozinski i triptofanski ostaci. Na talasnim dužinama većim od 295 nm, samo triptofanski ostaci apsorbuju, pa se selektivno ekscitovanje ovih ostataka može postići korišćenjem talasnih dužina između 295 i 305 nm (**Lakowicz, 2006; Williams & Daviter, 2013**). Korisno svojstvo fluorescencije proteina predstavlja činjenica da su emisione karakteristike ostataka triptofana veoma osjetljive na promjene u okruženju, odnosno promjene u emisionom spektru triptofana se često javljaju kao posledica konformacionih promjena, asocijacije subjedinica, vezivanja supstrata ili denaturacije proteina. Za razliku od triptofana, emisijski maksimum tirozina nije osjetljiv na promjenu lokalnog okruženja. Triptofan je kompleksna fluorofora zbog njegovih složenih spektralnih karakteristika, koje su posledica prisustva dva ekscitovana stanja skoro jednakih energija: 1L_a and 1L_b . Elektronski prelazi pokazuju karakteristične apsorpcione i emisione spektre, kao i različitu osjetljivost na polarnost rastvarača (**Lakowicz, 2006**). Ono što spektroskopiju triptofana čini dodatno zanimljivom jeste postojanje najmanje dva životna vijeka fluorescencije. Ovaj fenomen se objašnjava time da strukturna heterogenost (odnosno prisustvo različitih rotacionih izomera oko $C\alpha-C\beta$ veze) u osnovnom stanju triptofana postoji na dužoj vremenskoj skali (interkonverzija između izomera duže traje) u poređenju sa životnim vijekom ekscitovanog stanja, što uzrokuje postojanje različitih vremena fluorescencije. U nekim proteinima je uočeno i treće vrijeme fluorescencije, a smatra se da je ono posledica interakcija triptofanskih ostataka sa okolinom (**Ghisaidoobe & Chung, 2014**).

Prilikom proučavanja protein-ligand interakcija, fenomen gašenja fluorescencije (engl.

fluorescence quenching) se često koristi za određivanje vezivnih konstanti, kao i lokalizacije fluorofore u strukturi makromolekula. Jednostavnost, nedestruktivnost i mala količina uzorka čine ovaj pristup veoma popularnim. Gašenje fluorescencije podrazumjeva bilo koji proces koji dovodi do smanjenja intenziteta fluorescencije u uzorku, a različiti mehanizmi mogu dovesti do ove pojave. Do gašenja fluorescencije triptofanskih ostataka u proteinima može doći usled transfera protona ili elektrona, transfera energije, konformacione promjene i intramolekulske reakcije. Navedeni mehanizmi se mogu klasifikovati kao dinamičko (gašenje nastalo usled sudara fluorofore u ekscitovanom stanju sa drugim molekulom) i statičko gašenje (gašenje nastalo usled formiranja nefluorescentnog kompleksa) fluorescencije (**Ghisaidoobe & Chung, 2014**). Statičko gašenje je mnogo bitnije sa aspekta proučavanja protein-ligand interakcija, pošto ono ukazuje na nastajanje protein-ligand kompleksa. Dinamičko i statičko gašenje se mogu razlikovati na osnovu različite zavisnosti konstante gašenja od temperature. Sa povećanjem temperature raste broj sudara, pa bi usled toga trebalo da konstanta gašenja raste ako je u pitanju dinamičko gašenje fluorescencije. S druge strane, u slučaju statičkog mehanizma, konstanta gašenja bi trebalo da opada sa povećanjem temperature. Međutim, određivanje života fluorescencije je pouzdaniji metod za razlikovanje statičkog od dinamičkog gašenja. Kod statičkog gašenja nema promjene u životu fluorescencije, dok kod dinamičkog gašenja životni vijek fluorescencije zavisi od odnosa intenziteta emisije prije i posle gašenja. Dodatni kriterijum u razlikovanju navedena dva mehanizma gašenja fluorescencije zasnovao bi se na analizi apsorpcionih spektara protein-ligand smjese. Pošto dinamičko gašenje podrazumjeva samo promjene na nivou ekscitovanog stanja, u slučaju ovog mehanizma ne bi trebalo da dođe do promjena u UV/VIS spektru fluorofore. Ipak, ako je mehanizam statički, formiranje kompleksa u nepobuđenom stanju bi moglo dovesti do promjena u UV/VIS spektru fluorofore (**Lakowicz, 2006**). Važno je napomenuti da bi prilikom ispitivanja vezivanja liganda praćenjem gašenja fluorescencije proteina obavezno trebalo voditi računa o apsorpciji samog liganda na ekscitovanoj i emitovanoj talasnoj dužini. Naime, ako ligand na ovim talasnim dužina značajno apsorbuje svjetlost, onda se dešava prividno gašenje fluorescencije, koje ne potiče od formiranja kompleksa, već od re-apsorpcije ekscitovanog i emitovanog zračenja, odnosno dolazi do fenomena unutrašnjeg filtra. U ovakvim slučajevima potrebno je izvršiti korekciju unutrašnjeg filtra, i time dobiti konstante gašenja koje potiču samo od formiranja protein-ligand kompleksa.

Osim praćenja fluorescencije proteina, u nekim studijama vezivanje je okarakterisano i praćenjem fluorescencije liganda. Ovaj pristup, ako podrazumjeva emisiju liganda u VIS regionu, može biti prilično koristan, pošto brojni ligandi mogu da apsorbuju i emituju svjetlost u UV regionu, što ometa određivanje parametara vezivanja klasičnom metodom gašenja fluorescencije proteina. Jedan od detaljno izučavanih sistema korišćenjem ovog pristupa jeste HSA-bilirubin kompleks. Naime, bilirubin i HSA ne pokazuju emisiju u vidljivoj oblasti kada se ekscituju na oko 460 nm, ali njihov kompleks ispoljava značajnu fluorescenciju na oko 520 nm (**Hrkal & Klementova, 1984**). Sličan fenomen je uočen i kod β -laktoglobulin-resveratrol kompleksa, gdje protein indukuje jaču emisiju resveratrola, koja je praćena plavim pomjeranjem emisionog maksimuma (ka nižim talasnim dužinama), što ukazuju da se vezivanjem za β -laktoglobulin, resveratrol premješta iz hidrofилne, vodene sredine, u hidrofobno okruženje proteina (**Liang, Tajmir-Riahi, & Subirade, 2008**). Ono što daje dodatnu prednost ovom pristupu jeste mogućnost elegantnog ispitivanja lokalizacije vezivnog mjesta liganda na proteinu. Naime, smanjivanjem proteinom indukovane fluorescencije liganda, dodatkom markera specifičnih za neko mjesto, može se odrediti za koje vezivno mjesto na proteinu se vezuje ispitivani ligand.

2.5.4 Termoforeza na mikroskali

Termoforeza na mikroskali (MST) predstavlja relativno novu metodu za kvantifikaciju biomolekularnih interakcija. Lakoća izvođenja eksperimenta, mala potrošnja uzorka, brza analiza, mogućnost ispitivanja vezivanja molekula bilo koje veličine, čini ovu metodu sve popularnijom kako u fundamentalnim istraživanjima, tako i u farmaceutskoj industriji za razvoj novih lijekova. Dodatnu prednost MST-a predstavlja činjenica da eksperimenti mogu biti izvedeni kako u puferima, tako i u kompleksnim biološkim tečnostima poput plazme i ćelijskih lizata (**Jerabek-Willemsen, Wienken, Braun, Baaske, & Duhr, 2011**).

Metoda se zasniva na kretanju fluorescentnih molekula u mikroskopskom temperaturnom gradijentu koji je generisan IR laserom. Fluorescencija ispitivanog molekula se mjeri kako prije procesa termoforeze, tako i tokom samog procesa. Uključivanjem IR lasera dolazi prvo do naglog opadanja fluorescencije, usled brzog zagrijavanja i ova faza se zove T-skok. Nakon toga dolazi do termoforeze, odnosno molekuli se kreću od mjesta više temperature ka regionima sa nižom temperaturom (pozitivna termoforeza), što vodi do postepenog opadanja fluorescencije.

Na kraju, isključivanjem IR lasera, dolazi do inverznog T skoka i povratne difuzije, što povećava fluorescenciju. Sam proces termoforeze zavisi od Soretovog koeficijenta, koji je funkcija veličine, naelektrisanja i solvatacione entropije molekula. Ako protein vezuje ligand, velika je vjerovatnoća da će neki od ovih parametara biti različit kod protein-ligand kompleksa u poređenju sa slobodnim proteinom. Na taj način, razlika u pokretljivosti u temperaturnom gradijentu na osnovu izmjerene fluorescencije se koristi za kvantifikaciju vezivanja liganda za proteine. Da bi se detektovala emisija u vidljivoj oblasti, potrebno je protein kovalentno obilježiti odgovarajućim fluoroforima. S druge strane, novija tehnička rješenja omogućila su mjerenje sopstvene fluorescenciju proteina u MST uređajima, što olakšava samu analizu, s obzirom da nisu potrebna dodatna obilježavanja (**Jerabek-Willemsen, André, Wanner, Roth, Duhr, Baaske, et al., 2014**).

2.5.5 Izotermalna titraciona mikrokalorimetrija

Izotermalna titraciona mikrokalorimetrija (ITC) predstavlja korisnu metodu za karakterizaciju protein-ligand interakcija, pošto se osim informacije o afinitetu i stehiometriji mogu dobiti i termodinamički parametri, poput promjene entalpije i entropije. Prilikom vezivanja liganda za protein, toplota se ili oslobađa ili apsorbuje. Zahvaljujući tome, ITC je jedina tehnika koja mjeri promjene toplote nastalu usled vezivanja liganda, i na taj način daje detaljnu informaciju o termodinamičkim parametrima protein-ligand sistema. Prema tome, osnovna prednost kalorimetrije jeste njena univerzalnost, odnosno ne zahtijeva prisustvo hromofora ili drugih obilježivača. Takođe, određivanjem termodinamičkih parametara dobijaju se značajne informacije koje mogu biti korisne u farmaceutskoj industriji, npr. prilikom dizajna novih lijekova (**Williams & Daviter, 2013**).

Kako i što samo ime kaže, u ITC eksperimentu rastvor proteina se titruje štok rastvorom liganda, mada je i suprotna varijanta izvodljiva. Promjena toplote do koje dolazi injektovanjem uzorka je proporcionalna površini ispod pika na termogramu. Na početku titracije je promjena toplote najveća, a pri kraju, usled zasićenja proteina ligandom, intenzitet signala je na nivou bazne linije. Crtanjem zavisnosti promjene toplote za svaki dodatak liganda od protein/ligand molarnog odnosa dobija se kriva vezivanja, na osnovu koje se mogu odrediti konstanta vezivanja, broj vezivnih mjesta, kao i promjena entalpije (**Williams & Daviter, 2013**).

2.5.6 Rezonancija površinskog plazmona

Rezonancija površinskog plazmona (SPR) predstavlja važnu metodu za karakterizaciju protein-ligand interakcija, sa primjenom kako u osnovnim istraživanjima, tako i u razvoju novih lijekova. Za razliku od prethodno pomenutih metoda, kod SPR-a jedan od interagujućih partnera se imobilizuje na čip, dok rastvor liganda prolazi preko čipa. Vezivanje liganda za imobilizovani molekul na površini senzora se detektuje na osnovu promjene u indeksu refrakcije. Prednost ove metode jeste u tome što se osim afiniteta mogu utvrditi i kinetički parametri, poput konstanti brzina asocijacije i disocijacije liganda za protein (McDonnell, 2001).

2.5.7 Ostale eksperimentalne tehnike

U prethodnim odeljcima dat je pregled tehnika koje se rutinski koriste za proučavanje protein-ligand interakcija. Tehnike poput nuklearne magnetne rezonancije, kristalografije X-zracima i masene spektrometrije, iako komplikovanije, omogućavaju dublji uvid i pružaju detaljnije informacije u pogledu karakterizacije protein-ligand sistema.

2.5.8 Molekulski doking

Molekulski doking je mnogo korišćena, relativno brza i ekonomična računarska metoda za *in silico* predviđanje afiniteta i načina vezivanja (engl. binding mode) molekula. Protein-ligand doking je grana molekuskog dokinga, koja nastoji da predvidi strukturu kompleksa koji nastaje vezivanjem liganda za protein, koristeći poznate 3D strukture proteina i liganda. Doking je važan prilikom dizajna novih lijekova, pošto omogućava efikasnu pretragu (engl. screening) velikih biblioteka molekula u cilju pronalaženja kandidata za lijekove željenih svojstava. Protein-ligand doking je u poslednjih 20 godina postala važna oblast istraživanja, što je za posledicu imalo razvoj brojnih softverskih paketa za doking (Du, Li, Xia, Ai, Liang, Sang, et al., 2016).

Metode dokinga protein-ligand sistema sadrže dvije osnovne komponente: algoritam za pretraživanje i funkciju bodovanja (engl. scoring function). Prva podrazumjeva pretraživanje različitih konformacija i orijentacija liganda u kojima se vezuje za ciljani protein, dok je druga komponenta odgovorna za procjenu afiniteta vezivanja, kao i identifikovanje vezivnog mjesta i načina vezivanja liganda za protein (Du, et al., 2016).

Konformacija i orijentacija liganda (engl. binding pose) su od najvećeg značaja u procesu dokinga. Fleksibilnost sistema je glavni izazov prilikom traženja pravilne konformacije i

orijentacije liganda. Broj stepena slobode prilikom pretraživanja konformacija je glavni aspekt koji određuje efikasnost procesa dokinga. U realnim biološkim sistemima, osim liganda i proteina imamo i molekule rastvarača. Ipak, zbog velikog broja stepeni slobode povezanih sa molekulima rastvarača, oni se obično ne uzimaju u razmatranje. Međutim, i kada se u obzir uzmu samo protein i ligand, sistem i dalje ima veliki broj stepeni slobode, koji se računarski teško tretiraju, pa su zbog toga potrebne dodatne aproksimacije. Postoje različiti stepeni aproksimacije. Osnovna je aproksimacija rigidnog tijela, koja je bila popularna u ranim fazama razvoja molekulskog dokinga, a podrazumjeva da su i ligand i protein rigidni. Danas se mnogo više koristi pristup u kome je protein rigidan, a ligand fleksibilan. Idealno bi ipak bilo uzeti u obzir i fleksibilnost proteina, a neki pomaci i na ovom polju su napravljeni (**Sousa, Fernandes, & Ramos, 2006**).

3. Eksperimentalni dio

3.1 Izolovanje fikocijanobilina iz Spiruline

Dolje navedeni protokol predstavlja našu modifikaciju postojećih postupaka za izolovanje PCB-a. Kao polazni materijal koristili smo komercijalni preparat Spiruline u prahu, sa područja Havaja (Nutrex, SAD).

Dan prvi:

- 10 g praha Spiruline je suspendovano u 150 mL 20 mM fosfatnog pufera (pH=7,0);
- dobijena suspenzija je miješana na magnetnoj miješalici 2-3 sata, na sobnoj temperaturi;
- smješa je centrifugovana na 5000 obrtaja/minuti, 30 minuta na 10°C;
- supernatant je pažljivo odvojen i iz njega su istaloženi proteini (fikocijanini) dodatkom 20-20 g trihlorsirćetne kiseline (TCA), u manjim porcijama i uz miješanje sadržaja na magnetnoj miješalici;
- dobijena suspenzija je ostavljena preko noći na +4°C (frižider).

Dan drugi:

- suspenzija je iscentrifugovana na 5000 obrtaja/minuti, 30 minuta na sobnoj temperaturi;
- supernatant je odbačen, talog je kratko prosušen fenom i premješten u vajele od 50 mL je pomoću špatule;
- ekstrakcija zaostalih pigmenata i uklanjanje TCA započeta je dodatkom 15 mL n-heksana (po vajli), uz miješanje/ intezivno vorteksovanje dobijene smješe, pri čemu sadržaj postaje ljepljiv;
- u talog je dalje, uz miješanje i intezivno vorteksovanje, dodat metanol (2 puta sa po 10 mL);
- dobijena metanolno-heksanska suspenzija je iscentrifugovana (5000 obrtaja/minuti, 10 minuta na sobnoj temperaturi): supernatant braonkaste boje je odbačen, a talog proteina je ponovo tretiran (ispiran) sa heksanom i metanolom, na gore opisani način;
- nakon centrifugovanja pod navednim uslovima, supernatant (svijetlije braonkasto-zelene boje) je odbačen i postupak "depigmentacije" sirovog proteinskog preparata je ponavljan, sve dok supernatant nakon centrifugovanja nije bio praktično bezbojan, a talog proteina postao praškast;

- u avan sa talogom proteina dodato je, uz miješanje staklenim stapićem, 3 puta po 15 mL dietil etra, u cilju udaljavanja evt. zaostale TCA: suspenzija je izcentrifugovana na 5000 obrtaja/minuti, tokom 5 minuta na sobnoj temperaturi. Supernatant je odbačen, talog je vraćen u avan i kompletan postupak ispiranja TCA je ponovljen još jedan put;
- dobijeni (laki) talog je kratko prosušen fenom, prebačen je u eksikator i ostavljen u njemu na sobnoj temperaturi i tamnom mjestu preko noći.

Dan treći:

- proteinski talog (tirkizno-plave boje) je izvađen iz eksikatora i izmjerena mu je masa (oko 2,0 g);
- u balon sa okruglim dnom dodato je oko 2 g proteina i 150 mL metanola (HPLC čistoće);
- balon je zastićen od svjetlosti Alu-folijom i sadržaj je podvrgnut metanolizi, uz refluks, u trajanju od približno 3-3,5 sata;
- ohlađena suspenzija je profiltrirana na običnom filter papiru (2 puta);
- dobijeni filtrat PCB-a, plavo-zelene boje, takođe zaštićen od svetlosti, je uparen do suva na rotacionom vakuum uparivaču;
- u balon sa preparatom hromofore dodato je 3-4 mL metanola (HPLC čistoće) ili dimetil sulfoksida (DMSO), uz pažljivo miješanje, kako bi se sav PCB dispergovao na zidovima balona rastvorio, a potom je rastvor kvantitativno prebačen u tamnu bočicu;
- snimljen je UV/VIS spektar alikvota dobijenog preparata, nakon njegovog razblaživanja (oko 50 puta) se smješom: metanolom / HCl = 19 / 1 (v:v);
- izračunata je koncentracija (štok) rastvora PCB-a, na osnovu apsorpcionog koeficijenta čiste hromofore: $a=37900 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ na 680 nm (spektrofotometar: NanoDrop 2000c, ThermoScientific, SAD) (**slikaP0A**);
- uzet je alikvot za snimanje masenog spektra supstance (LTQ Orbitrap XL, Thermo Fisher Scientific Inc., SAD) (**slikaP6A**), a ostatak je do upotrebe čuvan u frižideru na +4°C;
- navedenim postupkom, iz 10 g polaznog materijala dobija se oko 2,8 mg preparata PCB-a.

3.2 Izolovanje i prečišćavanje C-fikocijanina iz Spiruline

C-PC je izolovan i prečišćen modifikacijom postojeće procedure (Zhang & Chen, 1999). Kao polazni materijal korišćen je komercijalni preparat Spiruline u prahu sa područja Havaja (*Arthrospira platensis*, Nutrex, SAD). U postupku prečišćavanja korišćene su dvije standardne hromatografske metode: jonoizmjenjivačka hromatografija (razdvajanje proteina na osnovu razlika u naelektrisanju) i gel filtracija (razdvaja komponenti smješe na osnovu razlika u molekulskoj masi). Provjera čistoće je urađena uz pomoć klasične SDS-PAGE, kao i na osnovu UV/VIS spektrofotometrije. Hromatogrami i elektroforegrami dobijeni nakon prečišćavanja C-PC-a su dati u prilogu (slike P0B-P0E).

DEAE-Sepharose® CL-6B i Sephadex G-100 su nabavljeni od kompanije Sigma Aldrich (Njemačka). Sva mjerenja apsorbancija, kao i snimanje UV/VIS apsorpcionih spektara, kako u ovom, tako i u ostalim protokolima (osim u testovima ukupne redukujuće moći i citotoksičnosti), su urađena na NanoDrop 2000c spektrofotometru (Thermo Scientific, SAD), korišćenjem kvarcne kivete sa optičkim putem od 1cm.

3.2.1 Dobijanje sirovog ekstrakta i taloženje proteina amonijum-sulfatom

Odmjereno je na analitičkoj vagi 5,00 g polaznog materijala, koji je suspendovan, u odgovarajućem staklenom sudu obavijenom Alu-folijom, u 75 mL 100 mM natrijum-fosfatnog pufera pH=6,8, sa 1 mM NaN₃ (konzervans). Ekstrakcija suve biomase je urađena tokom 2 časa na sobnoj temperaturi, uz stalno mješanje suspenzije na magnetnoj mješalici. Dobijena smješa je potom iscentrifugovana (30 minuta, 10000 x g, 10°C). Dobijeni talog tamnije zelene boje (hlorofil, drugi pigmenti i ostali ćelijski materijal slabo rastvoran u vodi) je odbačen, a supernatant, intenzivno plavo-ljubičaste boje, je pažljivo odvojen u čisti sud.

U supernant (70 mL) je dodat fino sprášeni amonijum-sulfat (AS; 7,7 g), tako da zasićenje soli bude 20%. AS je dodavan u malim porcijama, tokom pola sata uz konstantno mješanje, a nakon dodatka poslednje porcije dobijena suspenzija je ostavljena na magnetnoj mješalici još pola sata, nakon čega je sadržaj prebačen u frižider (4°C). Nakon centrifugovanja (30 minuta, 10 000 x g, 10°C) ohlađene (tokom 2 sata) smješe, talog je odbačen, a supernatant, koji sadrži C-PC i APC, je sačuvan za dalji rad. U ovaj supernatant (75 mL) je, na opisani način, ukupno dodato još 13,5 g AS, tako da finalno zasićenje soli bude 50%. Nakon novog

centrifugovanja, pod gore navedenim uslovima, sirovi proteinski talog intenzivno plave boje je sačuvan, a supernatant (svijetlo) zelene boje je odbačen. Talog je resuspendovan u 50 mL destilovane vode i, nakon rastvaranja, sadržaj je iscentrifugiran (30 minuta, 10000 g, 10°C).

Intenzivno plavo-ljubičasto obojeni supernatant (sirovi rastvor fikocijanina) je (kvantitativno) prebačen u crijevo za dijalizu (prečnik 1,6 cm, cut-off 10 kDa, Sigma Aldrich, Njemačka). Rastvor je izdijalizovan u posudi od 2,5 L naspram destilovane vode u toku 24 časa, uz dvije izmjene vode. Potom je dobijeni rastvor proteina skoncentrovan ultrafiltracijom (Amicon, Millipore; Amicon YM-5 membrana, cut-off 5 kDa, ćelija zapremine 50 mL pod pritiskom azota). Ultrafiltracija je rađena do trenutka kada je zapremina rastvora proteina u ćeliji bila približno 5 mL. Ovaj rastvor je korišćen u daljem radu (Poglavlje 3.3) i do upotrebe je čuvan u zamrzivaču na -20°C.

3.2.2 Jonoizmjenjivačka hromatografija

Nakon ultrafiltracije, sirovi rastvor C-PC-a (dobijen nakon što je prethodno odleđen skoncentrovan rastvor izcentrifugiran 15 minuta, na 13000 obrtaja/minuti, sobna temperatura i, potom, dobijeni supernatant je pažljivo odvojen) je razdvajan jonoizmjenjivačkom hromatografijom pod normalnim pritiskom. Korišćena je kolona dimenzija: 13 x 2,2 cm (ukupna zapremina 49 mL), napunjena suspenzijom DEAE-Sepharose CL-6B (GE Healthcare, Švedska). Kolona je ekvilibrisana sa oko 10 zapremina 40 mM natrijum-fosfatnog pufera pH 6,8, koji je sadržao 1 mM NaN₃. Na ekvilibrisanu kolonu je nanošeno 10 mL rastvora C-PC-a, koncentracije 10 mg/mL (jednačina 1; odeljak 3.2.4). Nevezani proteini su eluirani sa jednom zapreminom kolone (oko 50 mL) pufera za ekvibraciju, nakon čega je urađena elucija za matriks vezanih fikocijanina linearnim gradijentom jonske sile (0-0,5 M NaCl) sa šest zapremine kolone. Protok je sve vrijeme održavan na oko 1 mL/min, a zapremina svake frakcije (za sakupljanje eluata korišćen je frakcioni kolektor) na oko 4 mL. Nakon hromatografije, urađena je provjera prečišćenosti C-PC-a u svakoj plavo obojenoj frakciji UV/VIS spektrofotometrijom i SDS-PAGE (vidjeti dalje). Za dalji rad su korišćene samo frakcije u kojima je odnos apsorbancija A₆₂₀/A₂₈₀ bio veći od 3.

3.2.3 Gel filtracija

Proteinske frakcije koje su nakon jonoizmenjivačke hromatografije pokazale zadovoljavajući stepen čistoće (vidjeti gore) spojene su i skoncentrovane ultrafiltracijom (odjeljak 5.1.1). Gel filtracija je urađena na koloni dimenzija 50 x 1,4 cm (ukupna zapremina 77 mL), napunjenoj Sephadex-om G-100 (GE Healthcare, Švedska). Kolona je ekvilibrisana sa 3 zapremine 50 mM natrijum-fosfatnog pufera pH=7,0, koji je sadržao 150 mM NaCl i 1 mM NaN₃. Na kolonu je nanošeno oko 1 mL rastvora C-PC-a (20 mg/mL) (jednačina 1; odeljak 3.2.4), iz supernatanta dobijenog nakon centrifugiranja ultrafiltracijom skoncentrovanih frakcija tokom 15 minuta, na 13000 obrtaja/minuti (sobna temperatura). Protok je podešen na 0,1 mL/min, a zapremina (pomoću frakcionog kolektora) sakupljenih frakcija bila je (oko) 1 mL.

Dobijene frakcije C-PC-a koje su pokazale zadovoljavajući stepen čistoće ($A_{620}/A_{280} > 4$) su spojene i skoncentrovane korišćenjem Amicon centrikona (Millipore, cut-off membrana 10 kDa, zapremina vaje 50 mL). Koncentrovanje je urađeno centrifugovanjem (30 minuta, 4000 obrtaja/minuti), nakon čega je u vaju sa skoncentrovanim rastvorom proteina dodato 15 mL Mili-Q vode i postupak koncentrovanja je ponovljen, na naveden način. Ovim se postiže rasoljavanje uzorka proteina, pošto prisutna so (iz elucionog pufera) može ometati prečišćavanje hromopeptida nakon pepsinske digestije C-PC-a (vidjeti dalje).

3.2.4 Provjera prečišćenosti C-fikocijanina UV/VIS spektrometrijom i SDS-PAGE

Stepen čistoće C-PC-a u frakcijama dobijenim nakon jonoizmjenjivačke hromatografije i gel filtracije je procijenjen mjerenjem apsorbanaci na 280 i 620 nm (NanoDrop 2000c spektrofotometar, ThermoScientific, SAD) i izračunavanjem odnosa A_{620}/A_{280} . Ako je rastvor proteina bio suviše koncentrovan (apsorbance na navedenim talasnim dužinama veće od 2), pravljena su razblaženja sa odgovarajućim puferom (40 mM fosfat, pH 6,8 kod jonoizmjenjivačke hromatografije i 50 mM fosfat sa 150 mM NaCl, pH 7,0 kod gel filtracije) u kome je protein rastvaran. Koncentracija C-PC-a u ispitivanim frakcijama/uzorcima je određena prema formuli (Bennett & Bogorad, 1973):

$$C - PC \left(\frac{mg}{mL} \right) = (A_{620} - 0.474 \times A_{653}) / 5.34 \quad (1)$$

Kako bi se utvrdila prečišćenost/homogenost izolovanih preparata C-fikocijanina

iskorišćena je klasična SDS-PAGE metoda (**Laemmli, 1970**). Elektroforeza je urađena na vertikalnom Hoefer Mighty SmallTM SE245 sistemu (Hoefer Scientific Instruments Inc., SAD). Koncentracija akriamida (AA) u gelu za razdvajanje je bila 14%, a 4% u gelu za koncentrovanje. U tabelama 3 i 4 dat je spisak potrebnih supstanci, zajedno sa zapreminama rastvora ovih supstanci koje su korišćene za pripremu gelova:

Tabela 3. Zapremine rastvora potrebnih za pravljenje 14% AA gela za razdvajanje (SDS-PAGE)

Rastvor	Zapremina
30% monomerni rastvor AA, 2,7 % bisakrilamida	4,6 mL
4X pufer gela za razdvajanje (1,5 M Tris, pH 8,8)	2,5 mL
ddH ₂ O	2,8 mL
TEMED (tetrametilatilendiamin)	3,3 µL
10% SDS	0,1 mL
10% APS (amonijum-persulfat)	0,05 mL

Tabela 4. Zapremine rastvora potrebnih za pravljenje 4% AA gela za koncentrovanje (SDS-PAGE)

Rastvor	Zapremina
30% monomerni rastvor AA, 2,7 % bisakrilamid	0,44 mL
4X pufer za koncentrovanje (0,5 M Tris, pH 6,8)	0,83 mL
ddH ₂ O	2,03 mL
TEMED (tetrametilatilendiamin)	1,7 µL
10% SDS	33 µL
10% APS (amonijum-persulfat)	16,7 µL

Gel za razdvajanje se priprema u vakuum boci (50 mL) dodavanjem rastvora monomera, pufera gela za razdvajanje, destilovane vode i tetrametiletildiamina (TEMED) u zapreminama navedenim u tabeli 3. Boca sa rastvorom se zatvori gumenim zapašaćem i rastvor se dezaeriše oko 10 minuta na vodenoj vakuum pumpi, uz povremeno mućkanje. Nakon dezaeracije dodaje se rastvor APS-a i SDS-a. Dobijeni rastvor se dobro promiješa i odmah nalije u već pripremljeni sendvič staklenih ploča, razdvojenih 0,75 mm "spejserima". Gel za razdvajanje se lagano nadsloji rastvorom n-butanola zasićenog vodom. Dok traje reakcija polimerizacije (oko 30 minuta na sobnoj temperaturi) pripremi se, na istovetan način, gel za nadslojavanje (**tabela 4**). Nakon nanošenja gornjeg gela (pre toga se ispere vodom n-butanol) umeće se češalj za formiranje "bunarčića" za uzorke i ostavi se da gel polimerizuje (oko 30 minuta).

Koncentrovani pufer za pripremu uzoraka (5 x PZU) sadrži sledeće komponente: 300 mM

Tris, pH=6,8; 10% SDS; 50% glicerol; 25% β -merkaptoetanol i 0,05% bromfenol plavo (BPB). Uzorci za elektroforetsku analizu su pripremani dodavanjem (u odgovarajuću ependorf kivetu) 5 μ L PZU u 20 μ L probe, a zatim su zagrijavani najmanje 5 minuta na 95°C (u termobloku). Pufer za elektroforezu (0,5 L; pH 8,3) sadržao je 25 mM Tris (1,5 g), 192 mM glicin (7,2 g) i 0,1% SDS (5 mL 10% rastvora).

U „bunarčiče“ u gelu je nanošeno po 20 μ L uzoraka (koncentracije proteina oko 1 mg/ml), odnosno 5 μ L (prethodno skuvanih) proteinskih markera (Thermo Fisher Scientific, SAD). Tokom trajanja elektroforeze (oko 90 minuta), dok su se uzorci koncentrovali, napon na ispravljaču je podešen na 80 V, a nakon njihovog ulaska u gel za razdvajanje on je povećan na 180 V, uz konstantnu jačinu struje od najviše 25 mA (po ploči). Elektroforeza je trajala dok marker boja BPB nije došla do 0,5 cm od kraja gela. Nakon završetka elektroforeze, za fiksiranje proteina u gelu (oko 20 minuta) je korišćen rastvor 35% metanola i 10% sirćetne kiseline (v/v) u vodi. Potom je gel prebačen u rastvor boje Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBB R-250; 0,125% Coomassie Blue R-250, 50% metanol, 10% sirćetna kiselina) na oko 25 minuta. Obezbojavanje gelova je urađeno najprije rastvorom fiksira (10 minuta), a zatim, preko noći, sa 7% sirćetnom kiselinom. Obezbojeni gelovi su skenirani ili fotografisani i proteinske trake su vizuelno analizirane.

3.3 Pepsinska digestija prečišćenog C-fikocijanina: izolovanje hromopeptida, određivanje njihove sekvence masenom spektrometrijom i testiranje biološke aktivnosti

Nakon što je protein (C-PC) prečišćen, urađena je njegova pepsinska digestija. Potom su iz smješe izolovani hromopeptidi (peptidi koji za sebe imaju kovalentno vezanu hromoforu, PCB) uz pomoć HPLC-a. Zatim je određena sekvenca hromopeptida masenom spektrometrijom. Na kraju je ispitana antioksidativna, metal-helirajuća i citotoksična aktivnost hromopeptida.

Pepsin, izolovan iz želuca mukoze svinje (2546 U/mg), MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid; $\geq 98\%$), AAPH ($\geq 97\%$), fluorescein ($\geq 95\%$), Troloks ($\geq 97\%$) i mravlja kiselina ($\geq 98\%$) su nabavljeni od kompanije Sigma Aldrich (Njemačka). Reagensi za elektroforezu su nabavljeni od kompanije Serva Electrophoresis (Njemačka). Acetonitril za HPLC je nabavljen od kompanije J.T. Baker (SAD). Redukujuća moć i citotoksičnost hromopeptida su izmjereni na LKB čitaču mirkotitar pločica (LKB, Italija). Svi rezultati koji se

zasnivaju na mjerenju fluorescencije, kako u ovom, tako i u narednim poglavljima, dobijeni su upotrebom FluoroMax®-4 spektrofluorimetra (HORIBA Scientific, Japan), pod termostatiranim uslovima, korišćenjem kvarcne kivete sa optičkim putem od 1 cm (Hellma Analytics, Njemačka).

3.3.1 Pepsinska digestija prečišćenog C-fikocijanina

Pepsinska digestija C-PC-a je izvedena u simuliranoj želudačnoj tečnosti (SGF). 80 μ L C-PC-a (5 mg/mL) je dodato u 760 μ L SGF-a (84 mM HCl i 35 mM NaCl, pH 1,2), koja je sadržala 1 jedinicu pepsina po mikrogramu proteina. Smješa je inkubirana na 37°C uz stalno mješanje i alikvoti od 60 μ L su uzimani na: 0.5 min, 5 min, 30 min, 1 h, 2 h, 5 h i 24 h nakon početka inkubacije. Reakcija u svakom alikvotu je zaustavljena dodatkom 20 μ L 300 mM NaHCO₃, pH 11,0. Alikvoti u nultom vremenu su pripremani tako što je pepsin inhibiran sa NaHCO₃ prije dodatka C-PC-a. Nakon toga je urađena SDS-PAGE digesta pod redukujućim uslovima i gelovi su obojeni pomoću CBB R-250 boje. U cilju identifikacije strukture hromopeptida i procijene njihove biološke aktivnosti, digestione smješe su pripremane na većoj skali. Postupak je bio identičan kao prethodno opisani, osim što su koncentracije C-PC-a i pepsina bile 10 puta veće, dok je digestija trajala 24 časa.

3.3.2 Ispitivanje kinetike digestije C-PC-a pomoću SDS-PAGE

Alikvoti nakon (različitog vremena) pepsinske digestije su podvrgnuti SDS-PAGE (Laemmli, 1970). Elektroforeza je urađena na vertikalnom sistemu firme Biostep (Njemačka). Koncentracija AA u gelu za razdvajanje je bila 16%, a u gelu za koncentrovanje 4%. U tabelama 5 i 6 dat je spisak i zapremina potrebnih supstanci i rastvora za pravljanje ovih gelova.

Tabela 5. Zapremine rastvora potrebnih za pravljenje 16% i 14% PAA gela za razdvajanje (SDS-PAGE)

Rastvor	16% AA Zapremina	14% AA Zapremina
30% monomerni rastvor AA, 2,7 % bisakrilamid	8 mL	7 mL
4x pufer za razdvajanje (1,5 M Tris, pH 8,8)	3,75 mL	3,75
ddH ₂ O	3 mL	4 mL
TEMED (tetrametiltilendiamin)	7,5 μ L	7,5 μ L
10% SDS	0,15 mL	0,15 mL
10% APS (amonijum persulfat)	75 μ L	75 μ L

Tabela 6. Zapremine rastvora potrebnih za pravljenje 4% AA gela za koncentrovanje (SDS-PAGE)

Rastvor	Zapremina
30% monomerni rastvor AA, 2,7 % bisakrilamid	0,67 mL
4x pufer za koncentrovanje (0,5 M Tris, pH 6,8)	1,25 mL
ddH ₂ O	3 mL
TEMED (tetrametililendiamin)	2,5 µL
10% SDS	50 µL
10% APS (amonijum-persulfat)	25 µL

Gelovi su pripremani na način opisan u odeljku 3.2.4. U „bunarčiče“ je nanošeno po 40 µL uzorka (prethodno treniranih sa PZU i skuvanim 5 minuta na 95°C), odnosno 5 µL proteinskih markera. Tokom trajanja elektroforeze (oko 2 sata), napon u gelu je podešen na 80 V tokom koncentrovanja uzoraka, odnosno na 180 V tokom razdvajanja proteina u uzorcima, uz maksimalnu jačinu struje od 60 mA. Postupak fiksiranja, bojenja i obezbojavanja gelova bio je identičan onom opisanom u odeljku 3.2.4.

3.3.3 Izolovanje hromopeptidnih frakcija iz pepsinskog digesta semipreparativnom HPLC

Razdvajanje hromopeptidnih frakcija iz pepsinskog digesta C-PC-a je urađeno na HPLC Agilent 1260 sistemu (Agilent, SAD) na sobnoj temperaturi. Hromopeptidi su izolovani korišćenjem semi-preparativne Zorbax Eclipse XDB C-18 kolone (9,4 mm x 250 mm, 5 µm veličina čestica, Agilent, SAD), povezane sa HPLC sistemom. Eluiranje peptida i pepsina je urađeno gradijent elucijom prema sledećem redosledu: 100% rastvarač A (0,1% mravlja kiselina u Mili-Q vodi) - jedna zapremina kolone; gradijent od 100% rastvarača A do 20% rastvarača B (0,1% mravlja kiselina u acetonitrilu) - jedna zapremina kolone; gradijent od 80% rastvarača A do 40% rastvarača B - 12 zapremina kolone; gradijent od 60% rastvarača A do 100% rastvarača B - tri zapremine kolone. Brzina protoka je bila 3 mL/min sa istovremenom detekcijom na 215, 280 i 615 nm. Svaka hromopeptidna frakcija (koja je apsorbivala na 615 nm) je sakupljena, rastvarač je uparen, a talog je rastvoren u 0,25-0,5 mL 20% DMSO-a. Dobijeni štokovi su korišćeni za određivanje sekvence hromopeptida tandemskom masenom spektrometrijom i za procenjivanje njihovih bioloških aktivnosti, ali i za određivanje čistoće izolovanih hromopeptida rehromatografijom. Rehromatografija svake frakcije je urađena pod analitičkim uslovima. Za tu svrhu korišćena je analitička Zorbax Eclipse C-18 kolona (4,6 mm x 100 mm, 3,5 µm veličina čestica, Agilent, SAD), povezana sa HPLC sistemom. 200 µL 10 µM

hromopeptida u vodi (za određivanje koncentracije hromopeptida vidjeti odeljak 3.3.6) je nanijeto na kolonu. Eluiranje je urađeno sa manje strmim gradijentima u odnosu na hromatografiju cijelokupnog pepsinog digesta, kako bi se postigla bolja rezolucija. Uslovi za gradijent eluiranje su dati ispod odgovarajućih rehromatograma (**slike P10-P14**). Brzina protoka je bila 1 mL/min sa istovremenom detekcijom na 215, 280 i 615 nm. Relativna čistoća hromopeptidnih frakciju u odnosu na ostale peptide (odsustvo pika na 615 nm) je procijenjena na osnovu apsorbanije na 215 nm.

3.3.4 Određivanje aminokiselinske sekvence hromopeptida

Hromopeptidi, razdvojeni semi-preparativnim HPLC-om, analizirani su visokorezolativnom tandemskom masenom spektrometrijom pomoću LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific Inc., SAD) masenog spektrometra. Urađena je direktna injekcija uzorka (3 μ M hromopeptidi ili PCB u 80% rastvoru acetonitrila koji je sadržao 0,1% mravlju kiselinu), brzinom od 10 μ L u minuti. Jonizacija je urađena u pozitivnom modu, a kao tip jonizacije korišćen je HESI (elektrosprej jonizacija zagrijavanjem). HESI parametri su bili sledeći: temperatura kapilare 275 °C, napon izvora 4 kV, napon kapilare 5 V, napon sočiva 70 V, protok gasa u omotaču i spoljnom ulazu 12 i 3 (u arbitrarnim jedinicama), redom. Snimanje je trajalo 5 minuta po uzorku. MS spektri su snimljeni u m/z opsegu između 100 i 2000. Jonizovani peptidi su fragmentisani upotrebom CID-a (kolizijom indukovana disocijacija), u cilju dobijanja MS2 i MS3 spektara. Fragmentacija je urađena pomoću helijuma, pri čemu je normalizovana koliziona energija bila 35%, dok su roditeljski joni aktivirani za 30 ms. ESI-MS, ESI-MS2 i ESI-MS3 spektri su analizirani pomoću Xcalibur programa (verzija 2.1; Thermo Fisher Scientific Inc., SAD). Aminokiselinska sekvenca hromopeptida je određena ručnim *de novo* pristupom uz upotrebu "NIST Mass and Fragment Calculator" programa (verzija 1.3) za računanje mase fragmenata koji mogu nastati od zadate peptidne sekvence (sekvence koja se unosi u program; <http://www.nist.gov/mml/bmd/bioanalytical/massfragcalc.cfm>)

3.3.5 Kvantifikacija hromopeptida

Hromopeptidi su kvantifikovani fluorimetrijski, koristeći cijelokupni pepsinski digest C-PC-a kao standard, a uzevši u obzir da je koncentracija hromofore u digestu poznata. Standardna prava (**slika P0F**) je dobijena pripremanjem serije razblaženja digesta (između 0,1 i 1,1 μ M

koncentracije hromofore) u 20 mM natrijum-fosfatnom puferu, pH 7.4. Emisija standarda i uzoraka (rastvori hromopeptida u istom puferu) je izmjerena na 638 nm, dok je ekscitaciona talasna dužina bila 578 nm. Širina proreza je bila 5 nm.

3.3.6 Ispitivanje antioksidativne aktivnosti hromopeptida

3.3.6.1 ORAC test

Spektrofluorimetrijski ORAC (od engl. Oxygen Radical Absorbance Capacity) esej je urađen po referenci Ou i saradnika sa određenim modifikacijama (**Ou, Hampsch-Woodill, & Prior, 2001**). Štok rastvor fluoresceina (5 μM) i AAPH (153 mM) je napravljen u 75 mM fosfatnom puferu, pH 7.4. Koncentracija hromopeptida i PCB-a je bila 5 μM , a koncentracije digesta (izražena kao μM hromofore) i Troloksa su redom bile 0,75 i 10 μM . Ekscitacione i emisione talasne dužine su redom bile 485 i 511 nm, dok su slitovi podešeni na 2 nm. 1485 μL pufera (75 mM fosfat, pH 7,4), je pomiješano sa 15 μL fluoresceina i 250 μL uzorka, a zatim je dobijena smiješa inkubirana 5 minuta. Nakon inkubiranja, reakcija je inicirana dodatkom 250 μL rastvora AAPH-a. Emisija je potom mjerena svakih 30 sekundi u toku 30 minuta na 37°C.

Relativna ORAC vrijednost je izračunata pomoću jednačine 2 i izražena kao Troloks ekvivalenti:

$$\text{ORAC vrijednost} = \frac{\text{PIK}_{\text{uzorak}} - \text{PIK}_{\text{pufer}}}{\text{PIK}_{\text{troloks}} - \text{PIK}_{\text{pufer}}} \times \frac{\text{C}_{\text{troloks}}}{\text{C}_{\text{uzorak}}} \quad (2)$$

Gdje PIK predstavlja površinu ispod krive, a C koncentracije u μM .

3.3.6.2 Test ukupne redukujuće moći

Redukujuća moć je određena po referenci Oyaizu i saradnika (**Oyaizu, 1986**). 20 μL uzorka ili Troloks-a, u opsegu koncentracija od 50 do 400 μM , je dodato u smješu koja je sadržala 50 μL 0,2 M fosfatnog pufera, pH 6,6 i 50 μL 1% kalijum-fericijanida. Nakon inkubiranja na 50°C u toku 20 minuta, 25 μL trihlorsirćetne kiseline je dodato u reakcionu smješu. Zatim je 100 μL svake reakcione smješe pomiješano sa 100 μL vode i 12 μL 0,1% FeCl_3 . Nakon 10 minuta, izmjerena je apsorbanacija na 670 nm. Konstruisani su grafici zavisnosti apsorbanacija na 670 nm od koncentracije. Redukujuća moć, izražena kao troloks ekvivalenti, je izračunata dijeljenjem nagiba krive uzorka sa nagibom krive troloksa.

3.3.6.3 Određivanje konstante vezivanja Cu^{2+} jona za hromopeptide, C-PC i PCB

Metal-helirajuća aktivnost hromopeptida, PCB-a i C-PC-a je testirana fluorescentnom

spektroskopijom u 20 mM fosfatnom puferu, pH 7,4. Slitovi su podešeni na 5 nm, ekscitaciona talasna dužina je bila 578 nm, dok je emisija mjerena na 638 nm. Koncentracija hromofore u analiziranim uzorcima je bila konstantna (1 μ M), dok je koncentracija CuCl₂, FeSO₄ i FeCl₃ varirala od 0,5 do 6 μ M. Konstante vezivanja su određene pomoću jednačine (**Hornshaw, McDermott, Candy, & Lakey, 1995**):

$$K_d[Me] = \frac{F_0 - F}{F - F_i} \quad (3)$$

Gdje F₀, F i F_i predstavljaju intenzitet emisije hromopeptida, C-PC ili PCB na 638 nm, u odsustvu katjona metala (Me), sa dodatkom Me i u prisustvu velike koncentracije Me (20 μ M), redom.

3.3.7 Test citotoksičnosti

Ćelijske linije humanog cervikalnog adenokarcinoma (HeLa) i humanog karcinoma epitela kolona (Caco-2) su gajene kao što je prethodno opisano (**Krstic, Stojadinovic, Smiljanic, Stanic-Vucinic, & Cirkovic Velickovic, 2015; Stojadinovic, Pieters, Smit, & Velickovic, 2014**).

Citotoksičnost svake hromopeptidne frakcije na navedene ćelijske linije je procijenjivana pomoću MTT testa vijabilnosti. MTT se zasniva na sposobnosti živih ćelija da prevedu žuti tetrazol (zahvaljujući NAD(P)H-zavisnim oksidoreduktazama) u vodi nerastvoran, ljubičasti formazan (**Mosmann, 1983**). Ćelije su inkubirane sa medijumom na pločicama sa 96 bunara pri gustini od 10 000 ćelija po bunaru i ostavljene su preko noći kako bi se omogućilo prijanjanje za podlogu. Sledećeg dana ćelije su inkubirane sa medijumom, uz dodatak rastvoriva hromopeptida (90 μ M), naredna 24 časa. Pošto su hromopeptidi bili rastvoreni u DMSO-u, rastvor DMSO-a u medijumu je dodat ćelijama u kontrolnim bunarima, tako da finalna koncentracija bude 2%. Nakon 24 časa, 20 μ L 5 mg/mL rastvora MTT-a u PBS-u je dodato u svaki bunar i dobijena smješa je inkubirana u narednih 1 h na 37 °C. Medijum je pažljivo uklonjen i 200 μ L DMSO je dodato u cilju rastvaranja nastalih kristala formazana. Nakon toga izmjerena je apsorbancija na 540 nm. Rezultati su izraženi kao procenat vijabilnosti, pri čemu su netretirane ćelije posmatrane kao 100% vijabilnosti.

3.3.8 Statistička analiza

U cilju procijene citotoksičnosti i antioksidativne aktivnosti hromopeptida, urađena je analiza varijansi (ANOVA) dobijenih rezultata, dok su srednje vrijednosti upoređene upotrebom Turkey testa. Odnosi između varijabli su procijenjivani pomoću Pearson-ovog koeficijenta korelacije. U svim statističkim analizama, razlike su smatrane značajnim ako je $p < 0.05$.

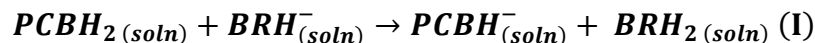
3.4 Ispitivanje vezivanja PCB-a za HSA i BSA: Teorijski i eksperimentalni pristupi

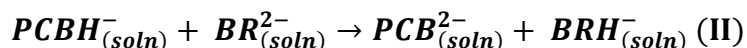
Vezivanje PCB-a za BSA i HSA je okarakterisano kompjuterskim proračunima, korišćenjem metode molekuskog dokinga, kao i eksperimentalnim pristupom, upotrebom različitih spektroskopskih tehnika.

Prilikom karakterizacije vezivanja PCB-a za HSA svi eksperimenti su urađeni u 20 mM Tris puferu, pH 7,4, dok je u slučaju BSA-PCB sistema korišćen 20 mM Tris pufer, pH 7,2. HSA ($\geq 97\%$), BSA ($\geq 99\%$), bilirubin ($\geq 98\%$), varfarin ($\geq 98\%$) i hemin ($\geq 98\%$) su nabavljeni od kompanije Sigma Aldrich (Njemačka) i korišćeni su bez daljeg prečišćavanja. Reagensi za MST bili su velikodušan poklon od firme NanoTemper (Njemačka). PCB je izolovan kao što je opisano u poglavlju 3.1, i rastvaran je u metanolu ili DMSO-u. Proteini su rastvoreni u 20 mM Tris puferu (pH 7,4 za HSA i pH 7,2 za BSA). Koncentracije HSA i BSA su određene na osnovu ekstinkcionog koeficijenta od $35\,700\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (na 280 nm) za HSA i $43\,824\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (na 279 nm) za BSA. Štok rastvori bilirubina, hemina i varfarina su napravljeni u DMSO-u, tako da koncentracija bude 4 mM. U svim eksperimentima koncentracija metanola ili DMSO-a u finalnim protein-ligand smješama nije prelazila 1%. Svi eksperimenti u kojima je iskorišćen princip cirkularnog dihiroizma, kako u ovom, tako i u narednim poglavljima, su urađeni na Jasco J-815 spektropolarimetru (Jasco, Japan), pod konstantnom strujom azota.

3.4.1 Određivanje pKa vrijednosti PCB-a teorijskim pristupom

pKa vrijednosti PCB-a su procijenjene korišćenjem pristupa izodezmične reakcije (engl. isodesmic reaction) (Sastre, Casasnovas, Muñoz, & Frau, 2012), odnosno, računanjem slobodne energije reakcije izmjene protona u vodenom rastvoru (reakcione sheme I i II), pri čemu je bilirubin uzet kao referentni molekul:





Strukture neutralnog PCB-a (u najstabilnijoj Z,Z,Z, sin, sin, sin konformaciji) i bilirubina (u fiziološkoj 4Z, 15Z konformaciji žlebnjaka), kao i odgovarajućih anjona, su potpuno optimizovane sa B3LYP teorijskom metodom, upotrebom standardnog 6-311++G(d,p) baznog seta i okarakterisane kao energetska minimum odsustvom imaginarnih frekvencija. Efekat rastvarača je uzet u obzir u svim geometrijskim optimizacijama i izračunavanjima energije, korišćenjem SMD modela (Marenich, Cramer, & Truhlar, 2009). Sva kvantna hemijska izračunavanja su urađena sa Gaussian09 programom (Frisch, Trucks, Schlegel, Scuseria, Robb, Cheeseman, et al., 2009).

3.4.2 Molekulski doking PCB-HSA i bilirubina-HSA sistema

Molekulsko modelovanje PCB/bilirubin-HSA kompleksa je urađeno upotrebom 3D kristalne strukture HSA (<http://www.rcsb.org>; PDB kod: 1BM0) koja je preuzeta iz Proteinske banke podataka (Sugio, Kashima, Mochizuki, Noda, & Kobayashi, 1999). Svi molekuli vode su uklonjeni iz strukture proteina. Pošto su podaci za atome vodonika nedostajali, status protonovanja svakog aminokiselinskog ostatka koji je podložan titraciji je procijenjen sa konačnom razlikom Poisson-Boltzmann-og kontinuuma elektrostatičkog modela primjenjenog u H++ 3.0 programu (Anandakrishnan, Aguilar, & Onufriev, 2012). Nedostajući aminokiselinski ostaci sa N- i C-terminusa su dodati i cijelokupna proteinska struktura je optimizovana u CHARMM programu (verzija c35b1) korišćenjem CHARMM22 proteinskog polja sile (Brooks, Bruccoleri, Olafson, States, Swaminathan, & Karplus, 1983). Optimizacija strukture HSA je izvedena sa 2000 optimizujućih koraka (1000 puta sa algoritmom opadajućeg gradijenta, praćen hiljadu puta sa Njutn-Rafsonovim algoritmom). Optimizovane strukture neutralnih liganada i odgovarajućih anjona su uzete na osnovu pKa proračuna, opisanog u prethodnom odeljku. Optimizovane strukture proteina i liganada su dalje podvrgnute AutoDockTools (verzija 1.5.6. Sep_17_14) programu za pripremu dokinga (Sanner, 1999). Protein je održavan rigidan, sve tri dvostruke veze PCB-a su takođe držane rigidnim u Z konfiguraciji, dok su jednostruke veze egzocikličnih metinskih mostova bile podložne rotaciji. Slično, dvostruke veze bilirubina u položajima 4 i 15 su držane u Z konfiguraciji, dok su sve jednostruke veze imale mogućnost rotacije. Kutija dimenzija 28 x 28 x 28°Å je korišćena za

akomodiranje liganada tokom procesa dokinga. Kako bi se pokrila cijelokupna zapremina proteina, kutija se kretala preko pravougaonog matriksa koji je sadržao protein, sa rastojanjem između tačaka od 8°Å, tako da je dobijeno 1188 rezultata dokinga za svaki ligand. Studija dokinga je urađena u AutoDockVina programu (verzija 1.1.2) (Trott & Olson, 2010). U cilju povećanja vjerovatnoće pronalaženja minimuma tokom dokinga, parametar iscrpnosti u AutoDockVina program je podešen na 100. Iz svakog rezultata dokinga, 9 vezivnih modova sa najvećim skorovima je čuvano u cilju dalje analize.

Tabela 7. PDB kodovi i lokacija vezivnih mjesta za miristinsku kiselinu i druge ligande za izabrane kristalne strukture HSA

PDB kod	Naziv liganda	Vezivno mjesto liganda	Vezivno mjesto miristinske kiseline
1HA2	S-Varfarin	IIA	FA1, FA2, FA3, FA4, FA5, FA6
1HK1	L-Tiroksin	IIA IIIA IIIB	-
1O9X	Hemin	IB	FA2, FA3, FA4, FA5, FA6, FA7
2BXB	Oksifenbutazon	IIA	-
2BXD	R-Varfarin	IIA	-
2BXF	Diazepam	IIIA	-
2BXI	Azapropazon	IB IIA	FA2, FA3, FA4, FA5, FA6
2BXK	Indometacin, Azapropazon	IIA	FA1, FA2, FA3, FA4, FA5, FA6
2VUE	4Z,15E-Bilirubin-IX-alfa	IB	-
2VUF	Fuzidinska kiselina	IB IIIB	-
2XVU	Danzil-L-asparagin	IIA IIIA	-
3CX9	Lizofosfatidiletanolamin	IIA	FA2, FA3, FA4, FA5, FA6
4L9K	Kamptotecin	IB	-
4L9Q	Tenipozid	IB	-
4LA0	R- Bikalutamid	IB	-
1E7G	-	-	FA1, FA2x2, FA3, FA4, FA5, FA6, FA7

Oznake vezivnih mjesta su preuzete iz reference (Ghuman, et al., 2005)

Analiza rezultata sa PDB internet sajta identifikovala je sedam vezivnih mjesta za masne kiseline (FA1-FA7), 6 mjesta za druge ligande (IB, IIA, IIA-IIB, IIIA, IIIB i međudomensko vezivno mjesto) i dva vezivna mjesta za lijekove (Sudlow-ovo mjesto I i II) na molekulu HSA. (Ghuman, et al., 2005). Podgrupa od 16 kristalnih struktura HSA od ukupno 96 struktura u PDB bazi podataka (<http://www.rcsb.org>) je izabrana na osnovu kristalografskih podataka, tipa liganada i njihovih vezivnih mjesta, u cilju dalje analize (tabela 7). Koristeći navedene kristalne strukture, ispitan je uticaj konformacionih promjena u proteinu, indukovanih vezivanjem raznih liganada, na afinitet PCB-a prema HSA. U ovoj simulaciji, koordinate za sve kristalografski pronađene ligande i masne kiseline su izbrisane iz kristalnih struktura i studije dokinga su sprovedene na čistom proteinu (bez liganada) koristeći monoanjonsku formu PCB-a.

Kako bi ispitao uticaj vezanih masnih kiselina ili drugih liganada na vezivanje PCB-a za HSA, urađena je finalna studija dokinga na 6 izabranih kristalnih struktura sa miristinskom kiselinom, kao i na 14 struktura sa drugim vezanim ligandima.

3.4.3 Molekulski doking PCB-a za BSA

Doking BSA-PCB sistema, u cilju određivanja lokacije vezivnih mjesta, je urađen na isti način kao u što je opisano u odeljku 3.4.2. Kristalna struktura BSA je preuzeta sa internet sajta Proteinske baze podataka (<http://www.rcsb.org>; PDB kod: 3v03). Svi molekuli vode, acetatni joni i joni kalcijuma su uklonjeni iz strukture proteina. Uzevši u obzir da je PCB na fiziološkom pH monoanjon (vidjeti poglavlje 4.2), analiza dokinga je urađena sa ovom formom PCB-a.

3.4.4 Snimanje fluorescentnih spektara

Vezivanje PCB-a za HSA i BSA je praćeno gašenjem sopstvene fluorescencije navedenih proteina. Talasna dužina ekscitacije je bila 280 nm (ekscitacija tirozinskih i triptofanskih ostataka), a emisioni spektri su snimani u opsegu od 290 do 400 nm. Širina proreza emisionog i ekscitacionog monohromatora je bila 5 nm.

Koncentracije HSA i BSA su bile konstante (0,375 μM i 0,25 μM , redom), koncentracija PCB-a je varirala od 0,2 do 1,5 μM kod gašenja fluorescencije HSA, dok je u slučaju BSA opseg koncentracija PCB-a bio od 0,05 do 0,8 μM . Odgovarajuće slijepe probe, koje su podrazumjevale odgovarajuće koncentracije PCB-a u puferu, su oduzete u cilju korekcije pozadinske fluorescencije. Uzevši u obzir da PCB apsorbuje svjetlost koja odgovara

ekscitacionim i emisionim talasnim dužinama proteina, odnosno prisutan je fenomen unutrašnjeg filtera, urađena je korekcija fluorescentnih intenziteta za apsorpciju ekcitative i reapsorpciju emitovane svjetlosti, prema jednačini:

$$F_c = F_0 10^{(A_{em}+A_{ex})/2} \quad (4)$$

Gdje su F_0 i F_c izmjerena i korigovana fluorescencija, redom, dok su A_{ex} i A_{em} redom apsorpcije PCB-a na ekscitacionoj i emisionoj talasnoj dužini.

U cilju određivanja tipa gašenja fluorescencije, Stern-Volmer-ove (SV) konstante su izračunate na različitim temperaturama prema jednačini:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{sv} [Q] \quad (5)$$

Gdje su F_0 i F emisioni intenziteti proteina sa i bez prisutva liganda na 340 nm, k_q je konstanta brzine gašenja fluorescencije biomolekula, dok je τ_0 je životni vijek ekscitovanog stanja biomolekula i tipično iznosi 10^{-8} s, Q je koncentrija PCB-a, dok je K_{sv} SV konstanta gašenja. K_{sv} je izračunata na osnovu nagiba SV dijagrama.

Određivanje konstante vezivanja je urađeno korišćenjem sledeće jednačine (**Bi, Ding, Tian, Song, Zhou, Liu, et al., 2004**):

$$\log \frac{F_0 - F}{F} = -n \log \frac{1}{[L] - [P] \frac{F_0 - F}{F_0}} + n \log K_a \quad (6)$$

Gdje su P i L , redom, ukupne koncentracije proteina i liganda. K_a predstavlja konstantu vezivanja, dok je n broj vezivnih mjesta.

Sinhroni fluorescentni spektri proteina (HSA i BSA) sa i bez PCB-a (korišćen je isti opseg koncentracija liganda kao i za snimanje osnovnih fluorescentnih spektara) su snimani tako da razlika između ekcitative i emisione duzine bude 15 nm u slučaju praćenja tirozinskih aminokiselinskih ostataka, dok je razlika od 60 nm korišćena za praćenje triptofanskih ostataka. Širina proreza emisionog i ekscitacionog monohromatora je bila 5 nm.

Termodinamički parametri vezivanja PCB-a za HSA, su određeni pomoću jednačina:

$$\ln K_a = -\frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} \quad (7)$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (8)$$

Gdje je K_a konstanta vezivanja, R je univerzalna gasna konstanta (8,314 J/(mol*K)), ΔG predstavlja Gibsovu slobodnu energiju, dok su ΔH i ΔS promjene entalpije i entropije, redom. Vrijednost ΔH i ΔS su dobijene konstrukcijom grafika zavisnosti $\ln K_a$ od $1/T$.

Povećanje fluorescencije PCB-a (1 μM) dodatkom HSA (od 1 do 2 μM) je praćeno snimanjem emisionog spektra u opsegu od 470 do 650 nm, dok je talasna dužina ekscitacije bila 460 nm.

Istiskivanje bilirubina iz HSA-bilirubin kompleksa PCB-om je praćeno snimanjem sinhronih fluorescentnih spektara u opsegu od 490-650 nm, pri čemu je $\Delta\lambda$ iznosila 56 nm. Širina proreza emisionog i ekscitacionog monohromatora je bila 5 nm. Ekvimolarna smješa HSA i bilirubina (4 μM) je titrovana PCB-om, tako da je molarni odnos PCB-a naspram HSA-bilirubin kompleksu bio od 0 do 2,5. S druge strane, istiskivanje PCB-a iz HSA-PCB kompleksa je takođe dokazivano snimanjem sinhronih fluorescentnih spektara u opsegu od 590-750 nm, dok je $\Delta\lambda$ bila 87 nm. Ekvimolarna smješa HSA i PCB-a (2 μM) je titrovana sa bilirubinom, pri čemu je molarni odnos bilirubina naspram HSA-PCB kompleksu varirao između 0 i 2,5.

Vezivanje PCB-a i bilirubina za varfarinsko vezivno mjesto na HSA-u (subdomen IIA) je dokazano titrovanjem ekvimolarnih smješa HSA i PCB-a, kao i HSA i bilirubina (2 μM) varfarinom u opsegu molskih odnosa varfarina prema HSA-PCB/bilirubin kompleksima od 0 do 10. Fluorescentni spektri su snimani u opsegu od 480-585 nm, dok je ekscitaciona talasna dužina bila 460 nm. Širina proreza emisionog i ekscitacionog monohromatora je bila 5 nm. Takođe, ekvimolarna smješa HSA i varfarina (0,25 μM) je titrovana PCB-om ili bilirubinom, tako da njihov molarni odnos naspram varfarin-HSA kompleksu varira od 0 do 2. U ovom slučaju, snimani su sinhroni fluorescentni spektri u opsegu od 365 do 410 nm, dok je $\Delta\lambda$ iznosila 64 nm.

U cilju potvrde vezivanja PCB-a i bilirubina za subdomen IB na HSA, ekvimolarne smješe HSA i PCB, kao i HSA-a i bilirubina (2 μM) su titrovane heminom, tako da molarni odnos hemina prema HSA-PCB/bilirubin kompleksu varira od 0 do 2,5. Fluorescentni spektri su snimani u opsegu od 480 do 585 nm, dok je talasna dužina ekscitacije bila 460 nm. Širina proreza emisionog i ekscitacionog monohromatora je bila 5 nm.

Još jedna potvrda vezivanja PCB-a za subdomene IB i IIA dobijena je titrovanjem HSA PCB-om u prisustvu markera za pomenuta vezivna mjesta (varfarina i hemina). 0,5 μM HSA, koji je preinkubiran sa 0,5 μM heminom ili varfarinom, titrovan je sa rastvorom PCB-a do

molarnog odnosa 4:1 u korist PCB-a. Takođe, 0,5 μM HSA je titrovan pojedinačnim rastvorima varfarina i hemina, tako da molarni odnos ligand/protein varira od 0 do 4. Svi navedeni eksperimenti su urađeni na 25°C, a konstante vezivanja su određene kao što je prethodno opisano, pomoću jednačine 6.

3.4.5 Određivanje konstante vezivanja PCB-a za BSA korišćenjem termoforeze na mikroskali

Afinitet PCB-a za BSA je dodatno određen upotrebom termoforeze na mikroskali. Mjerenja su izvedena na Monolith NT.115 uređaju (NanoTemper, Njemačka). Kako bi se detektovao fluorescentni signal, lizinski ostaci u proteinu su kovalentno obilježeni sa NT-547 bojom po principu N-hidroksisukcinimid (NHS) kuplovanja, koristeći Monolith™ NT.115 GREEN-NHS komplet za fluorescentno obilježavanje proteina po upustvima proizvođača (NanoTemper, Njemačka). Protein i boja su rastvoreni u puferu za obilježavanje (dobijen od NanoTemper-a) i DMSO-u, redom. Koncentracija boje je bila 435 μM , dok je koncentracija proteina bila 20 μM . Nakon toga, rastvor boje je dodat rastvoru proteina tako da molarna koncentracija boje bude tri puta veća od koncentracije proteina. Dobijena smješa je inkubirana pola sata u mraku. Nakon inkubiranja, protein je od viška nevezane boje prečišćen korišćenjem kompleta za prečišćavanje prema upustu proizvođača (NanoTemper, Njemačka). PCB je serijski razblažen u opsegu od pet redova veličine (između 2×10^5 i 6 nM) u 20 mM Tris puferu, pH 7,2, koji je sadržao 0,05% Tween-20. Prečišćeni protein je pomiješan u odnosu 1:1 sa razblaženjima pigmenta (finalna koncentracija proteina je bila oko 1,5 μM). Zatim su uzorci nanošeni u Premijum Monolith NT.115 kapilare, koje su nakon toga postavljene u instrument. LED (dioda koja emituje svjetlost) i MST snaga su podešeni na 20 i 40%, redom, dok je zeleni LED filter korišćen tokom mjerenja. Nakon snimanja, dobijeni podaci su prikazani kao zavisnost relativne fluorescencije od logaritma koncentracija PCB-a. Konstanta disocijacije (K_d) je određena korišćenjem softverskog paketa proizvođača instrumenta (verzija 1.5.41, NanoTemper).

3.4.6 Određivanje stehiometrije vezivanja PCB-a za BSA i HSA upotrebom UV/ VIS spektrofotometrije

UV/VIS apsorpcioni spektri 20 μM PCB-a u odsustvu i prisustvu HSA (10, 20 i 30 μM) i BSA (10, 20 i 40 μM) su snimljeni u opsegu od 300 do 750 nm, u kvarcnoj kivetici, na sobnoj temperaturi, koristeći NanoDrop 2000c spektrofotometar.

U cilju određivanja stehiometrije vezivanja, 20 μM PCB (20 mM Tris, pH 7,2 i 7,4 za BSA i HSA, redom) je titrovan 1 mM rastvorom HSA ili BSA, tako da molarni odnos proteina naspram liganda varira od 0 do 1,5. Zatim je crtan grafik zavisnosti promjene apsorbancije na 365 nm u odnosu na kontrolu (PCB bez proteina) od molarnog odnosa. Broj vezivnih mjesta PCB-a za proteine je dobijen na osnovu recipročne vrijednosti protein/ligand molarnog odnosa u tački presjeka početnog linearnog dijela krive i platoa.

3.4.7 Snimanje CD spektara

CD spektri u bliskoj UV i vidljivoj oblasti su snimljeni u opsegu od 250 do 700 nm u kvarcnoj kivetu sa optičkim putem od 1 cm. Snimani su spektri kako čistog PCB-a, tako i protein-PCB kompleksa. Broj akumulacija je podešen na 2, dok je brzina snimanja bila 100 nm/min. U slučaju karakterizacije HSA-PCB sistema, koncentracija liganda i proteina je bila 18 μM , dok je kod BSA-PCB sistema koncentracija BSA bila 10 μM , a PCB-a 10, 20 i 30 μM . Takođe, snimljeni su i spektri čistih proteina u ekvivalentnim koncentracijama.

CD spektri u dalekoj UV oblasti su snimani u opsegu od 180 do 260 nm. Broj akumulacija je podešen na 3, dok je brzina snimanja bila 50 nm/min. Snimani su spektri kako čistog HSA (18 μM), tako i proteina u prisustvu PCB-a u ekvimolarnom odnosu. Prosječni elepticitet po aminokiselinskom ostatku (MRE) je izračunat prema jednačini (Matei & Hillebrand, 2010).

$$MRE = \frac{\theta}{10rl[HSA]} \quad (9)$$

Gdje je θ elipticitet u mdeg jedinici na 209 nm, r je broj aminokiselinskih ostataka (585), l je dužina optičkog puta u cm (0.01), dok je [HSA] molarna koncentracija proteina. Procenat α heliksa u slobodnom proteinu, kao i u kompleksu sa PCB-om je izračunat na osnovu MRE vrijednosti na 209 nm koristeći sledeću jednačinu (Matei & Hillebrand, 2010).

$$\% \alpha - helix = \frac{-MRE_{209nm} - 4000}{33000 - 4000} \times 100 \quad (10)$$

3.4.8 Snimanje FT-IR spektara

FT-IR (infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom) spektri su snimljeni na Nicolet 6700 FT-IR spektrometru (Thermo, SAD), koji je opremljen sa dodatkom za atenuiranu totalnu refleksiju (ATR), DTGS TEC (deuterisani triglicin sulfat sa termoelektričnim

hlađenjem) detektorom i XT-KBr cijepačem zraka (engl. beam splitter). Spektri su snimani pomoću ATR metode sa rezolucijom 2 cm^{-1} , dok je broj snimanja bio 64. Infracrveni spektri proteina ($18\ \mu\text{M}$) i protein-PCB ekvimolarnog kompleksa ($18\ \mu\text{M}$ oba) su snimani u opsegu $1700\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$. Odgovarajući spektri pufera i slobodnog liganda su snimljeni i oduzeti od (redom) spektara čistog proteina i protein-PCB kompleksa.

Sekundarne strukture proteina su određene na osnovu oblika amidne I trake, koja je locirana u regionu $1650\text{-}1660\text{ cm}^{-1}$. Sopstvena Fourier-eva dekonvolucija i drugi izvod su primjenjeni u opsegu $1700\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$, u cilju procijene broja, pozicije i površina traka koje predstavljaju pojedinačne sekundarne strukture. Pikovi koji odgovaraju β -pločicama ($1615\text{-}1637\text{ cm}^{-1}$), neuređenim strukturama ($1638\text{-}1648\text{ cm}^{-1}$), α -heliksi ($1649\text{-}1660\text{ cm}^{-1}$), β -zavijutku ($1660\text{-}1680\text{ cm}^{-1}$) i β -antiparalelnoj pločici ($1680\text{-}1692\text{ cm}^{-1}$) su fitovani i površina je određena pomoću Gausove funkcije (Cheng, Liu, Bao, & Zou, 2011). Zatim je površina ispod pikova, koji odgovaraju određenim sekundarnim strukturama, podijeljena sa ukupnom površinom kako bi se dobila procentna zastupljenost sekundarnih struktura. Proces fitovanja krivih je urađen uz pomoć PeakFit 4.12 softvera (SeaSolve software Inc., SAD), u cilju dobijanja optimalnih Gausovih pikova koji fituju u originalni proteinski spektar.

3.5 Ispitivanje uticaja formiranja protein-ligand kompleksa na stabilizaciju intereagujućih partnera

Efekti PCB-a na stabilnost HSA i BSA su praćeni određivanjem temperaturne stabilnosti ovih proteina, kao i testiranjem njihove otpornosti prema digestiji proteazama u prisustvu i odsustvu liganda. S druge strane, ispitan je uticaj BSA na oksidativnu stabilnost pigmenta UV/VIS spektrofotometrijom, dok je uticaj PCB-a na oksidativnu stabilnost BSA analizirana fluorimetrijski. U navedenim eksperimentima korišćeni su isti puferi kao u poglavlju 3.4, osim kod ispitivanja otpornosti albumina na proteolitičku degradaciju (vidjeti dalje). Tozil fenilalanil hlorometil keton (TPCK; $\geq 97\%$), fenilmetilsulfonil fluorid (PMSF; $\geq 99\%$), svinjski tripsin (1800 U/mg) i pepsin (2800 U/mg) su nabavljeni od firme Sigma Aldrich (Njemačka) i korišćeni su bez daljeg prečišćavanja. Štok rastvori TPCK-a i PMSF-a su pripremljeni u etanolu, pri čemu su koncentracije štok rastvora bile 1 mM i 40 mM , redom.

3.5.1 Ispitivanje uticaja PCB-a na temperaturnu stabilnost HSA i BSA

Za ispitivanje efekata PCB-a na temperaturnu stabilnost proteina, korišćene su CD i fluorescentna spektroskopija.

3.5.1.1 CD mjerenja

Praćenje temperaturne denaturacije HSA je urađeno u temperaturnom opsegu 37-87°C, pri čemu je brzina povećanja temperature bila 4°C/min između 37 i 61°C i 2°C/min za interval 61-87°C. Ekvilibraciono vrijeme za svaku temperaturu je podešeno na 1 minut. Elipticitet je mjeren na 222 nm. Koncentracija HSA i PCB je bila 0,5 µM, dok je dužina optičkog puta bila 1 cm.

Praćenje temperaturne denaturacije BSA je urađeno u temperaturnom opsegu 37-93°C, pri čemu je brzina povećanja temperature bila 2°C/min u cijelom opsegu temperatura. Ekvilibraciono vrijeme za svaku temperaturu je podešeno na 1 min. Elipticitet je mjeren na 222 nm. Koncentracija BSA je bila 0,5 µM, dok je koncentracija PCB-a varirala od 0 do 1 µM. Dužina optičkog puta je bila 1 cm.

Rezultati su izraženi kao zavisnost procenta inicijalnog elipticiteta (na 37°C) od temperature. Dobijeni rezultati su fitovani pomoću sigmoidne funkcije korišćenjem Origin softvera (SAD). Inflekciona tačka na grafiku je uzeta kao tačka topljenja (T_m) proteina (**Dong, Kendrick, Kreilgard, Matsuura, Manning, & Carpenter, 1997**).

3.5.1.2 Fluorescenta mjerenja

Temperaturna zavisnost fluorescencije proteina je proučena u opsegu 38-78°C, pri čemu je brzina povećanja temperature bila 2°C/minuti, dok je vrijeme ekvibracije za svaku temperaturu podešeno na 1 minut. Koncentracija HSA i PCB je bila 0,5 µM. Ekscitacione i emisione talasne dužine su bile 280 i 340 nm, redom. Širine proreza oba monohromatora su podešene na 5 nm, a dužina optičkog puta je bila 1 cm.

3.5.2 Tripsinska digestija HSA

Tripsinska digestija HSA u prisustvu i odsustvu PCB-a je proučena u 50 mM Tris puferu, pH 8,0 na 37°C. PCB (štok rastvor u metanolu) je dodat rastvoru proteina tako da smješa bude ekvimolarna (3,8 µM). Ekvivalentna zapremina metanola je dodata u kontrolni uzorak (HSA bez PCB-a). Oba uzorka su pre-inkubirana sa 10 µM TPCK (u finalnoj koncentraciji), kako bi se

inhibirala aktivnost himotripsina. Digestija je počela dodatkom rastvora tripsina u 1 mM HCl (1 mg/ml), pri čemu je maseni odnos HSA/tripsin podešen na 25 (72 U tripsina po mg HSA). Alikvoti od 60 µL su uzimani nakon 0,5, 2, 5, 10, 30 i 60 minuta nakon inicijacije inkubacije. Reakcija je zaustavljena sa 1 mM PMSF-om (u finalnoj koncentraciji). SDS-PAGE digesta pod redukujućim uslovima je izvedena na 14% PAA gelu (**tabela 5**), a gelovi su obojeni pomoću CBB R-250 (kao što je opisano u odeljku 3.3.2). Gelovi su skenirani i intenziteti traka su kvantifikovani denzitometrijski, upotrebom ImageJ softvera (<https://imagej.nih.gov/ij/>), pri čemu je intenziteta trake koja potiče od HSA (na 66 kDa) bez tripsina uzeta kao 100%. Zavisnost digestije HSA od vremena je fitovana pomoću eksponencijalnog modela u Origin softveru (SAD), pomoću jednačine:

$$I = a + b \times e^{-kt} \quad (11)$$

Gdje I i t predstavljaju relativni intenzitet trake i vrijeme, redom, dok je k konstanta brzine digestije. Konstanta brzine, kao i parametri a i b , su određeni fitovanjem, i nakon toga I je zamijenjeno sa 0,5, u cilju izračunavanja poluživota proteina.

3.5.3 Pepsinska digestija BSA

Pepsinska digestija je urađena u SGF-u (100 mM HCl, 35 mM NaCl; pH 3) na 37°C, uz dodatak pepsina (130 U po miligramu BSA). Koncentracija BSA je bila 30 µM, dok je koncentracija PCB-a varirala od 0 do 60 µM. Alikvoti su uzimani nakon 2, 5, 15, 30 minuta, 1 h, 2 h i 4 h od početka inkubacije. Digestija je zaustavljena dodatkom NaHCO₃ (finalna koncentracija je bila 100 mM). Alikvot u nultom vremenu je pripremljen tako što je pepsin u SGF-u inhibiran sa NaHCO₃ prije dodatka proteina. SDS-PAGE pod redukujućim uslovima je urađena na 16% PAA gelu (**tabela 5**), pri čemu je u bunare nanošeno 10 µL uzorka (priprema gelova i elektroforetska analiza su identični kao u odeljku 3.3.2). Gelovi su obojeni CBB R-250 bojom (kao u odeljku 3.3.2), i nakon toga skenirani. Trake na položaju 66 kDa su kvantifikovane denzitometrijom, korišćenjem ImageJ softvera (<https://imagej.nih.gov/ij/>), pri čemu je intenzitet trake BSA u nultom vremenu uzet kao 100%.

3.5.4 Praćenje oksidacije BSA i PCB-a

Oksidacija BSA, izazvana dodatkom AAPH, je praćena na osnovu sopstvene fluorescencije proteina. Rastvor BSA (1 µM) sa i bez PCB-a (1 i 2 µM) ili Troloksa (2 µM) je

pre-inkubiran na 37°C u toku 15 minuta. Reakcija je započeta dodatkom štok rastvora AAPH (500 mM), pri čemu je finalna koncentracija oksidansa bila 25 mM. Ekscitaciona i emisiona talasna dužina je bila 280 i 340 nm, redom, dok je širina proreza podešena na 5 nm. Opadanje fluorescencije je praćeno u toku 30 minuta. Zaštitni efekat PCB-a je izračunat po formuli:

$$ZE (a. u) = PIK_{BSA-PCB} - PIK_{slobodanBSA} \quad (12)$$

Gdje ZE predstavlja zaštitni efekat PCB-a, dok PIK označava površinu ispod krive za navedene izorke.

Oksidacija PCB-a, izazvana dodatkom AAPH, je praćena mjerenjem njegove apsorpcije tokom vremena (vidjeti dalje). Rastvor PCB-a (50 µM) u odsustvu i prisustvu BSA (25, 50 i 250 µM) je pre-inkubiran na 37°C tokom 5 minuta. Reakcija je inicirana dodatkom štok rastvora AAPH (0,5 M), pri čemu je finalna koncentracija bila 28 mM. Reakcione smješe su inkubirane na 37 °C. UV/VIS apsorpcioni spektri su snimljeni u opsegu 300 – 750 nm nakon 10 i 30 minuta od početka reakcije. Takođe, snimljeni su i spektri uzoraka bez prisustva AAPH.

U cilju praćenja promjena apsorpcija na 620 i 560 nm u toku vremena, pripremljeni su uzorci istih koncentracija BSA, PCB-a i AAPH-a, kao što je prethodno opisano. Apсорbancije su mjerene na svakih 20 sekundi u toku 30 minuta na 37°C.

3.6 Ispitivanje uticaja formiranja kompleksa BSA-PCB na antioksidativnu aktivnost liganda

U cilju ispitivanja uticaja formiranja BSA-PCB kompleksa na antioksidativnu aktivnost pigmenta, antioksidativne aktivnosti slobodnog PCB-a, slobodnog proteina, kao i BSA-PCB kompleksa, su određene pomoću dva antioksidativna eseja: ORAC testa i testa ukupne redukujuće moći.

3.6.1 ORAC test

Prilikom ispitivanja uticaja formiranja kompleksa na ORAC aktivnost PCB-a i BSA, određene su aktivnosti kako slobodnog BSA (2 µM) i PCB-a (2 i 4 µM), tako i BSA-PCB kompleksa (2 µM BSA-2 µM PCB i 2 µM BSA-4 µM PCB). Postupak za ORAC test je opisan u odeljku 3.3.6.1.

3.6.2 Test ukupne redukujuće moći

Prilikom ispitivanja uticaja formiranja kompleksa na redukujuću moć PCB-a i BSA,

određene su aktivnosti slobodnog BSA (200 μM) i PCB-a (200 i 400 μM), kao i BSA-PCB kompleksa (200 μM BSA-200 μM PCB i 200 μM BSA-400 μM PCB). Postupak je bio isti kao prethodno opisani (odjeljak 3.3.6.2), osim što su nakon dodatka TCA uzorci iscentrifugirani 15 minuta na 10000 g (sobna temperatura), a nakon toga u daljem radu je korišćen supernatant.

Efekat maskiranja je kod oba testa kvantifikovan upotrebom sledeće jednačine:

$$ME (\%) = 100\% - \left(100x \frac{AK_{BSA-PCB}}{AK_{BSA} + AC_{PCB}} \right) \% \quad (13)$$

Gdje je ME maskirajući efekat, dok $AK_{BSA-PCB}$, AK_{BSA} i AK_{PCB} predstavljaju antioksidativni kapacitet BSA-PCB kompleksa, slobodnog BSA i slobodnog PCB-a, redom.

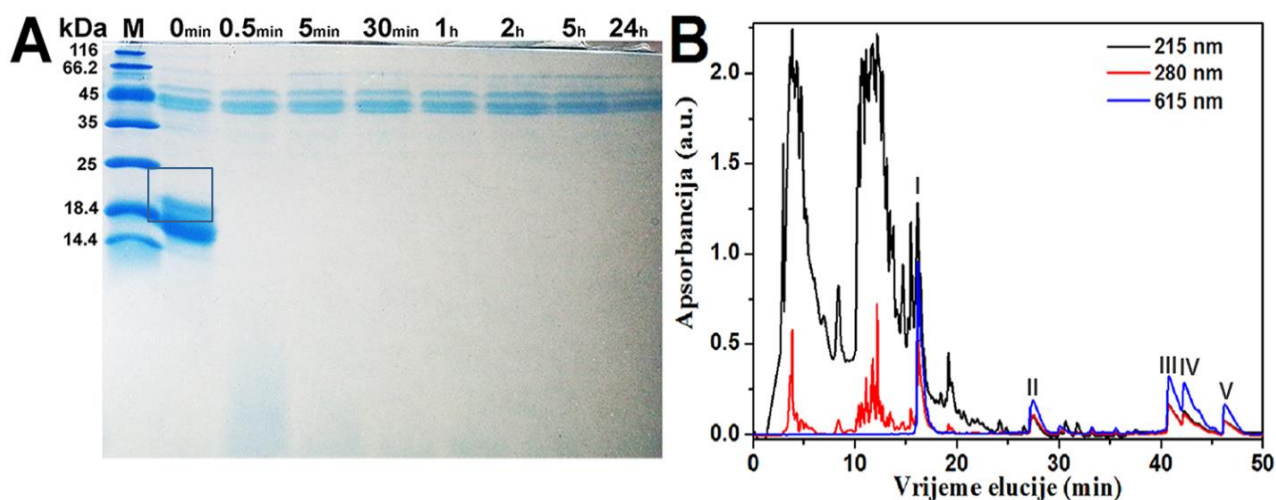
4. Rezultati

4.1 Pepsinska digestija C-fikocijanina oslobađa biološki aktivne hromopeptide

U ovom poglavlju prikazani su rezultati ispitivanja digestibilnosti C-PC-a u simuliranoj želudačnoj tečnosti, izolovanja nastalih hromopeptida, određivanja njihove strukture i biološke aktivnosti hromopeptida.

4.1.1 C-PC se brzo digestuje pepsinom

Digestibilnost C-PC-a je analizirana pomoću redukujuće SDS-PAGE nakon pepsinske digestije u simuliranim želudačnim uslovima (pH 1,2) (**slika 15A**). Rezultati pokazuju da pepsin brzo (već nakon 0,5 minuta) oslobađa male peptide, vidljive kao razmaz na dnu 16% PAA gela, koji se postepeno smanjuje sa povećanjem vremena digestije i na kraju nestaje, što ukazuje da je C-PC veoma podložan pepsinskoj digestiji pod primjenjenim uslovima.



Slika 15. (A) SDS-PAGE elektroforegram (redukujuću uslovi, 16% PAA gel) vremenski zavisne pepsinske digestije C-PC-a (1U/ μ g proteina). Pravougaonikom su uokvirene α (17 kDa) i β subjedinica (19 kDa) C-PC-a. Traka na oko 40 kDa potiče od pepsina. M i vremena 0-24 h označavaju markere i vremena digestije, redom. Za uslove rada vidjeti odeljak 3.3.2; (B) RP-HPLC (C-18 kolona) hromatogram hromopeptida (frakcije I-V) dobijenih pepsinskom digestijom C-PC-a nakon 24 h (za uslove rada vidjeti odeljak 3.3.3).

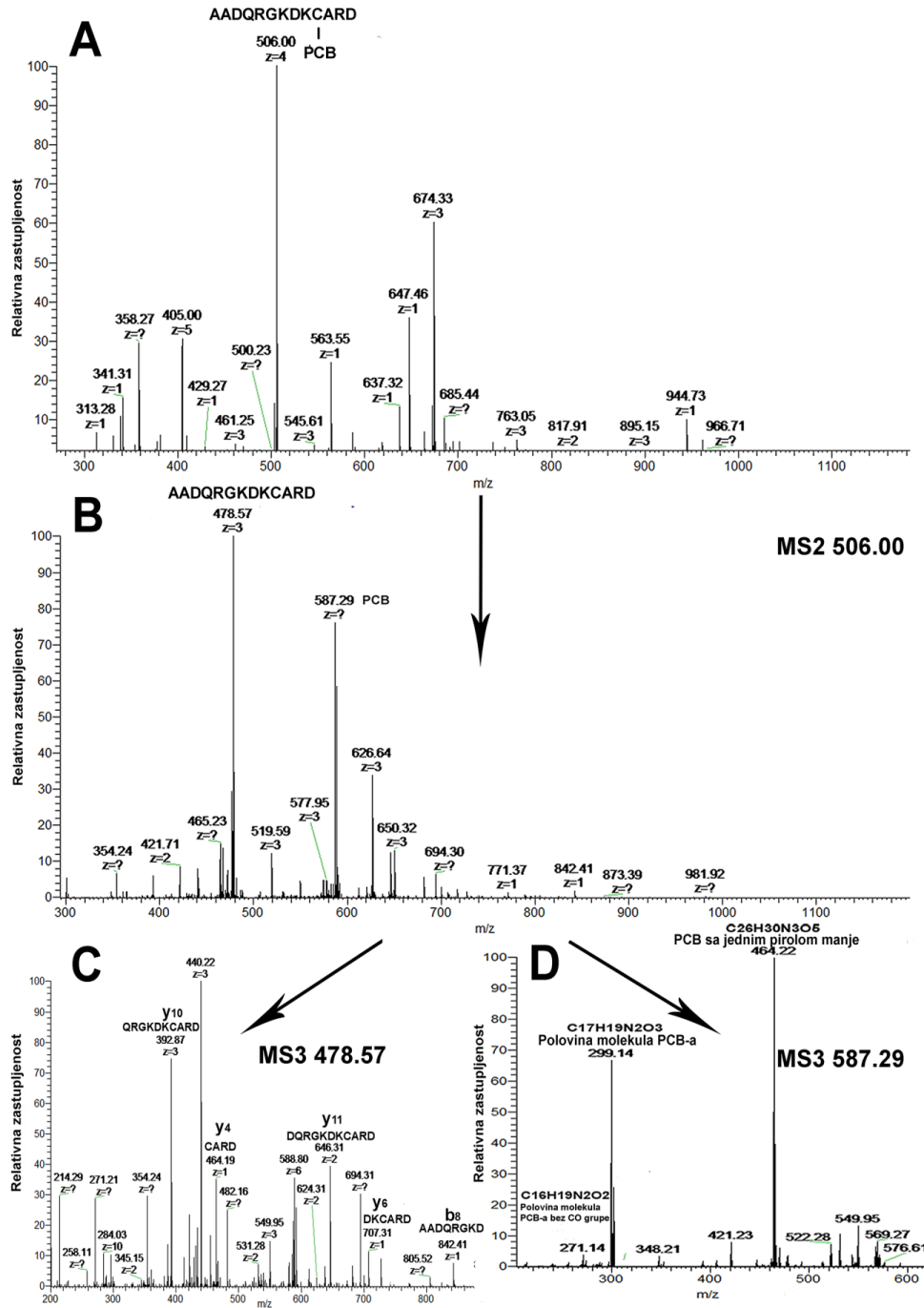
Nakon 24 časovne digestije C-PC-a, dobijeni peptidi su izolovani korišćenjem semi-preparativnog HPLC-a. Izolovano je pet dominantnih frakcija peptida koje su pokazale značajnu apsorbciju na 615 nm, što ukazuje da sadrže hromoforu (I-V) (**slika 15B**). Uočava se dobro slaganje između oblika pikova na 615 nm (apsorpcija hromofore), 280 nm (apsorpcija hromofore i aromatičnih aminokiselina), i 215 nm (apsorpcija hromofore i peptidne veze). Rehromatografija

izolovanih frakcija je pokazala da je relativna čistoća hromopeptida u frakcijama II-V između 91 i 98%, dok je hromopeptid u frakciji I imao 72% čistoće (**slike P10-P14**).

4.1.2 Identifikacija hromopeptida dobijenih pepsinskom digestijom

Hromopeptidi, razdvojeni pomoću HPLC-a, sekvencirani su tandemskom masenom spektrometrijom. Sekvence hromopeptida su određene pomoću MS spektara hromopeptidnih frakcija (**slike 16A, P1A-P5A; tabele P1A-P5A**), na osnovu njihovih izračunatih molekulskih masa (**tabela 8**), poznatih sekvenci α (UniProtKB-P72509) i β (UniProtKB-P72508) subjedinica C-PC-a (**slika 17**) i mjesta vezivanja PCB-a. Potvrda sekvenci je dobijena analizom MS2 i MS3 spektara roditeljskih jona, kao i MS i MS2 spektara čistog PBC-a. MS spektar PCB-a pokazuje dominantni jon na m/z poziciji od 587,29; u MS2 spectru PCB-a najzastupljeniji joni se nalaze na m/z odnosima 464,22 i 299,14 i generisani su CID fragmentacijom PBC-a (**slike P6A i P6B; tabele P6A i P6B**); MS3 spektar dobijen fragmentacijom jona sa m/z odnosom 299,14 daje dominantni jon sa m/z odnosom 271,14 (**slika S6C**). Slično ostalim bilinima, jon sa m/z odnosom 464,22 je posledica gubitka jednog od dva terminalna pirolova prstena, dok je jon na m/z položaju 299,14 rezultat raskidanja C-C veze između centralnog ugljenika i jednog od dva unutrašnja pirolova prstena. Jon sa m/z odnosom 271,14 ($z=1$) odgovara strukturi produkta sa m/z odnosom 299,14 koja je dodatno izgubila CO (ugljen-monoksid) (**Quinn, Nguyen, Wach, & Wood, 2012**).

CID raskida tioetarsku vezu između hromofore i peptida, tako da se joni koji predstavljaju PCB i peptide bez hromofore javljaju u MS2 spektrima hromopeptida (**slike 16B, P1B-P5B; tabele P1B-P5B**). Dalja fragmentacija jona sa m/z odnosom 587,29, davala je jone na m/z položajima: 464,22, 299,14 i 271,14 u odgovarajućim MS3 spektrima (**slike 16D, P1D-P5D; tabele P1D-P5D**). Navedeni joni su bili potvrda da je roditeljski jon hromopeptid i samo joni čijom su fragmentacijom dobijani joni koju su poticali od hromofore su dalje analizirani. Fragmentacijom peptidnih jona bez hromofore u MS2 spektrima, dobijani su MS3 spektri sa serijama y i b jona, čija je struktura potvrđivala sekvencu hromopeptida (**Slike 16C, P1C-P5C; tabela P1C-P5C**).



Slika 16 (A) MS spektar frakcije I, nakon 24 h digestije C-PC-a pepsinom. Pikovi sa m/z odnosom 405,00, 506,00 i 474,33 potiču od AADQRGKDKCARD hromopeptida; (B) MS2 spektar molekuskog jona sa m/z odnosom 506,00 (z=4); (C) Fragmentacija jona sa m/z odnosom 478,57 (z=3), koji predstavlja AADDRGKDKCARD sekvencu bez PCB-a. Podaci su dobijeni nakon snimanja MS3 spektra ovog jona (MS2 506,00; MS3 478,57); (D) Fragmentacija jona sa m/z odnosom 587,29 (z=1), koji potiče od PCB-a. Podaci su dobijeni nakon snimanja MS3 spektra ovog jona (MS2 506,00, MS3 587,29). Za uslove rada vidjeti odeljak 3.3.4.

Opisanim postupkom, identifikovano je ukupno šest hromopeptida iz pepsinskog digesta C-PC-a (frakcija II je sadržala dva hromopeptida), koji su varirali u veličini od 2 do 13 aminokiselinskih ostataka (**tabela 8**). U frakciji četiri identifikovana su dva dodatna hromopeptida koja potiču od tragova alofikocijanina, proteina sa sličnom sekvencom i istom hromoforom kao C-PC (**Brejc, Ficner, Huber, & Steinbacher, 1995**). Hromopeptid iz najzastupljenije frakcije I potiče od α subjedinice C-PC-a, dok ostali hromopeptidi nastaju digestijom β subjedinice C-PC-a, ili α subjedinice alofikocijanina (**slika 17, tabela 8**).

Tabela 8. Aminokiselinske sekvence hromopeptida (izolovanih nakon 24 h pepsinske digestije), određene pomoću tandemске MS. ^a Hromopeptidne sekvence koje potiču od tragova APC-a.

Frakcija	Sekvenca hromopeptida	Eksperimentalna masa	Teorijska masa	Δ mase	Relativna zastupljenost
I	AADQRGKDKCARD	2019.9491	2018.9632	0.9859	100
II	AACLRD	1233.5841	1233.5852	-0.0011	100
II	CLRD	1091.5099	1091.5110	-0.0011	61
III	CSAL	978.4531	978.4521	0.0009	100
IV	AACL	962.4609	962.4571	0.0038	100
IV	ATCL ^a	992.4699	992.4677	0.0022	50
IV	TATCL ^a	1093.5181	1093.5154	0.0027	32
V	CL	820.3820	820.3829	-0.0010	100

α subjedinica

MKTPLTEAVSIADSQGRFLSSTEIQVAFGRFRQAKAGLEAAKALTSKADSLISGAAQA
 VYNKFPYTTQMGPNY/AADQRGKDKCARD/IGYYLRMVTYCLIAGGTGPMDEYLIA
 GIDEINRTFELSPSWYIEALKYIKANHGLSGDAATEANSYLDYAINALS

β subjedinica

MFDAFTKVVVSQADTRGEMLSTAQIDALSQMVAESNKRLDAVNRTSNASTIVSNAAR
 SLFAEQQLIAPGGXAYTSRRM/AA/CL/RD/MEIILRYVTYAVFAGDASVLEDRLNGL
 RETYLALGTPGSSVAVGVGKMKEAALAIVNDPAGITPGD/CSAL/ASEIASYFDRACA
 AVS

Slika 17. Aminokiselinska sekvenca α i β subjedinica C-PC-a sa sekvencama hromopeptida (crveno), dobijenih nakon pepsinske digestije.

4.1.3 Antioksidativna aktivnost izolovanih hromopeptida

ORAC test se zasniva na sposobnosti antioksidanta da inhibira degradaciju fluorescentnog molekula koja nastaje oksidativnim dijelovanjem peroksil radikala, nastalih raspadanjem vodenih rastvora AAPH (inicijator). ORAC vrijednost, kao mjera antioksidativnog

kapaciteta, se obično izražava pomoću Troloks ekvivalenata (TE). Kao što je prikazano na **slici 18A** i u **tabeli 9**, hromopeptidi efikasno “hvataju” slobodne radikale sa aktivnostima između 8,2 i 13,2 puta većim od Troloksa, u vodi rastvornog analoga vitamina E. PCB ima aktivnost uporedivu sa pojedinačnim frakcijama hromopeptida (8,4 TE), dok cijelokupni digesti pokazuju značajno veću ORAC vrijednost (26,4 TE) u poređenju sa pojedinačnim frakcijama hromopeptida i samom hromoforom.

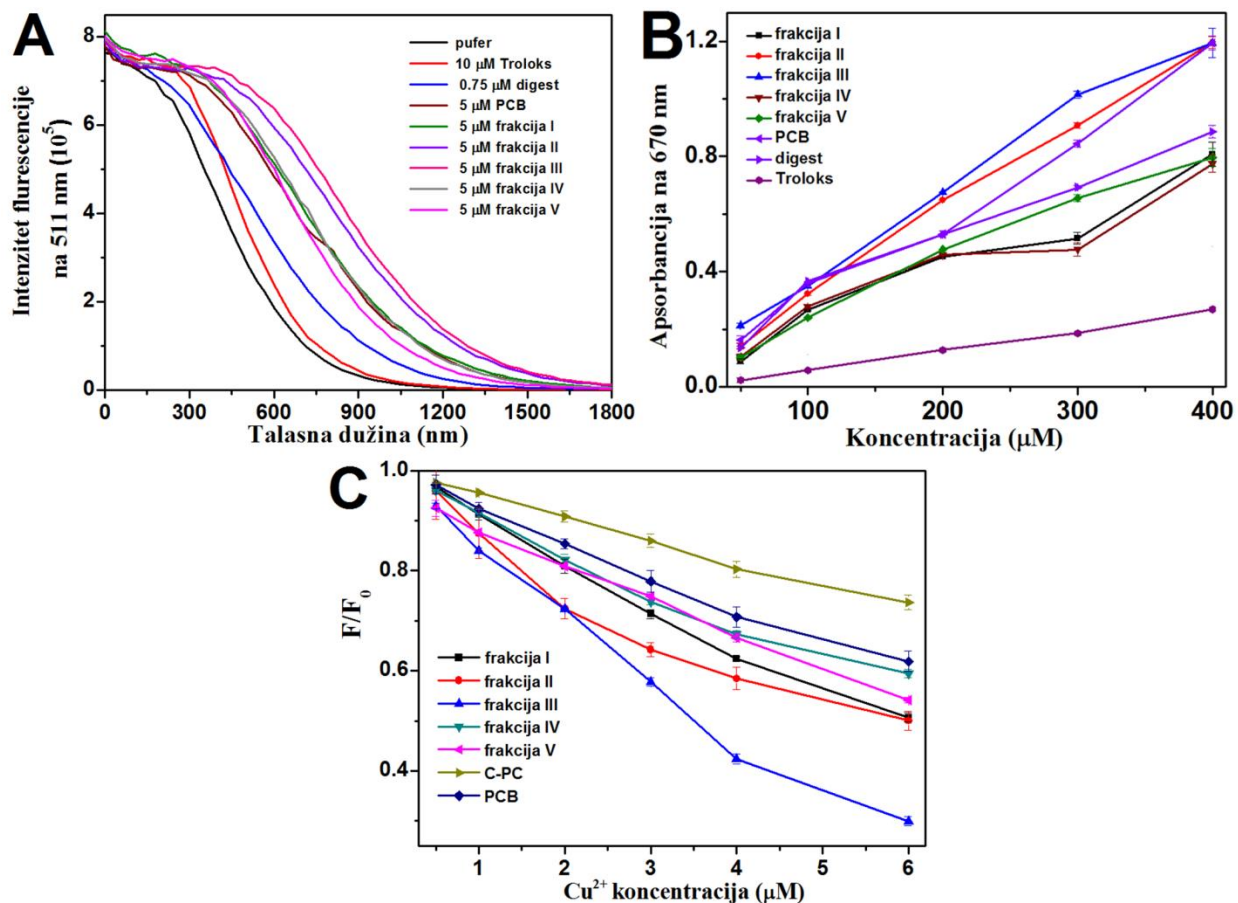
Tabela 9. Rezultati ORAC testa i testova redukujuće moći i vezivanja Cu^{2+} za pojedinačne frakcije hromopeptida, C-PC, PCB i cijelokupni digest, u poređenju sa Troloksom kao pozitivnom kontrolom. Rezultati označeni različitim slovima su statistički značajno različiti ($p < 0,05$). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija.

Uzorak	ORAC test TE ($\mu\text{M}/\mu\text{M}$ hromofore)	Redujuća moć TE ($\mu\text{M}/\mu\text{M}$ hromofore)	Konstanta vezivanja Cu^{2+} jona ($K_a 10^6 (\text{M}^{-1})$)
Frakcija I	9.4 \pm 0.9 ^a	3.0 \pm 0.2 ^a	0.60 \pm 0.03 ^c
Frakcija II	12.0 \pm 1.3 ^a	4.7 \pm 0.3 ^b	0.62 \pm 0.04 ^c
Frakcija III	13.2 \pm 1.1 ^a	4.7 \pm 0.3 ^b	1.04 \pm 0.05 ^d
Frakcija IV	9.1 \pm 1.0 ^a	2.7 \pm 0.1 ^a	0.46 \pm 0.02 ^{b,c}
Frakcija V	8.2 \pm 0.9 ^a	3.2 \pm 0.2 ^a	0.49 \pm 0.02 ^{b,c}
Cijelokupni digest	25.4 \pm 2.8 ^b	3.2 \pm 0.3 ^a	/
PCB	8.4 \pm 0.7 ^a	4.5 \pm 0.4 ^b	0.42 \pm 0.03 ^b
C-PC	/	/	0.24 \pm 0.02 ^a

U testu ukupne redukujuće moći, antioksidant redukuje Fe^{3+} -fericijanid kompleks u Fe^{2+} jone, pri čemu je povećanje apsorbancije reakcione smješe direktno proporcionalno redukujućoj moći ispitivane supstance. Hromopeptidi pokazuju značajnu i dozno zavisnu redukujuću moć u ovom testu, i to od 2,7 do 4,7 veću od Troloksa kao standarda, pri čemu su frakcije II i III najaktivnije (**slika 18B**; **tabela 9**). PCB takođe pokazuje značajnu redukujuću moć (4,5 TE), dok aktivnost cijelokupnog C-PC digesta (3,2 TE) odgovara prosječnoj aktivnosti svih hromopeptidnih frakcija (3,2 TE).

Promjene u fluorescenciji tetrapirrolne hromofore su iskorišćene za praćenje vezivanja fiziološki značajnih redoks aktivnih metalnih jona za hromopeptide, C-PC i PCB. Za razliku od $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ jona, koji nisu gasili fluorescenciju hromopeptida, ni pri koncentraciji od 60 μM (rezultati nisu prikazani), Cu^{2+} joni su efikasno gasili fluorescenciju hromopeptida (**slika 18C**),

što ukazuje da dolazi do vezivanja Cu^{2+} jona za hromopeptide. Zaista, izračunate konstante vezivanja variraju od $0,5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ (frakcija V) do $1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ (frakcija III) (tabela 9). Štaviše, Cu^{2+} joni su gasili i fluorescenciju C-PC-a i PCB-a, ali je konstanta vezivanja za C-PC ($0,24 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$) značajno manja u poređenju sa svim hromopeptidnim frakcijama, dok frakcije I, II i III imaju značajno veće konstante vezivanja Cu^{2+} jona nego PCB ($0,42 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$) (tabela 9).



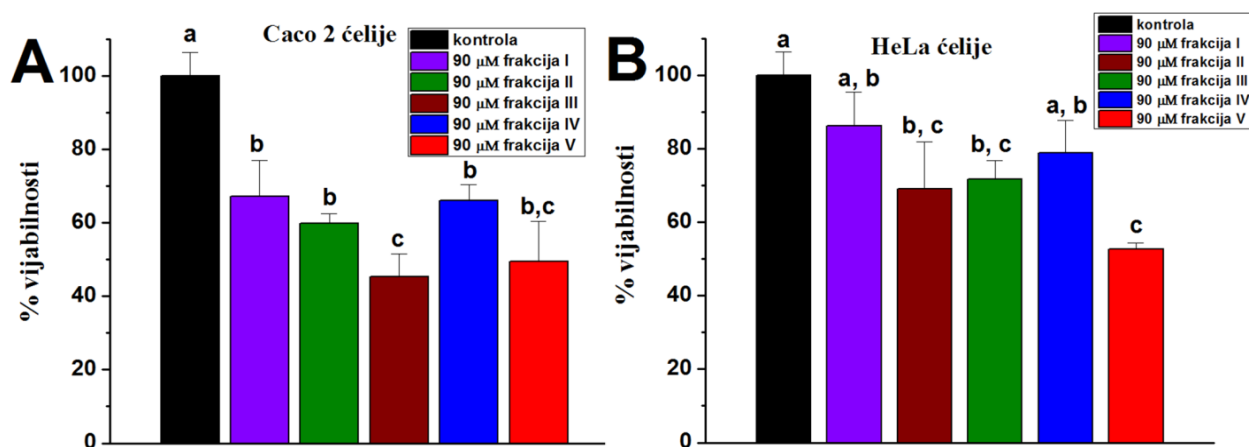
Slika 18. Rezultati ORAC testa (A), testa redukujuće moći (B) pokazane od strane hromopeptida, PCB-a i digesta C-PC-a u poređenju sa Troloksom kao pozitivnom kontrolom. Slika C prikazuje gašenje fluorescencije hromofore (emisiona i ekscitaciona talasna dužina 638 i 578 nm, redom) u hromopeptidima, C-PC-u i PCB-u u prisustvu Cu^{2+} jona. F_0 i F predstavljaju fluorescencije hromofore u odsustvu i prisustvu različitih koncentracija Cu^{2+} (0,5, 1, 2, 3, 4 i 6 μM, redom). Koncentracija hromofore je bila 1 μM. Na slikama B i C, rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (n=3). Za uslove rada vidjeti odeljak 3.3.6.

4.1.4 Citotoksičnost hromopeptida na kancerskim ćelijskim linijama

U ovoj studiji ispitana je citotoksičnost izolovanih hromopeptida na Caco-2 i HeLa kancerskim ćelijskim linijama. Uopšte uzevši, hromopeptidi su pokazali veću citotoksičnost na

Caco-2 nego na HeLa ćelijskoj liniji (**slika 19**). Svih pet hromopeptidnih frakcija (90 μM) su značajno smanjile ($p < 0,05$) vijabilnost Caco-2 ćelija (**slika 19A**), dok su frakcije II, III i V bile značajno citotoksične ($p < 0,05$) na HeLa ćelijama (**slika 19B**). Najveću citotoksičnost na Caco-2 ćelijama je ispoljila frakcija III (smanjenje vijabilnosti na $45 \pm 6\%$), dok je frakcija V najviše smanjila vijabilnost HeLa ćelija ($52 \pm 2\%$).

Interesantno, postoji dobra korelacija između citotoksične aktivnosti hromopeptida na Caco-2 ćelijama i ORAC vrijednosti ($R=0,93$; **slika P7**), redukjuće moći ($R=0,88$; **slika P8**) i helirajuće aktivnosti prema jonima bakra ($R=0,93$; **slika P9**).



Slika 19. Citotoksični efekti hromopeptida (90 μM) na Caco-2 (A) i HeLa (B) ćelijskim linijama nakon 24 h inkubacije. Podaci označeni različitim slovima su statistički značajno različiti ($p < 0,05$). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija ($n=3$). Za uslove rada vidjeti odeljak 3.3.8.

4.2 Fikocijanobilin se visokim afinitetom, uz kompeticiju sa bilirubinom, vezuje za HSA. Vezivanjem liganda struktura proteina postaje stabilnija.

U ovom poglavlju prikazani su rezultati karakterizacije vezivanja PCB-a za HSA, kao i rezultati koji ukazuju na kompeticiju u vezivanju sa bilirubinom i markerima specifičnim za vezivna mjesta na proteinu. Takođe, dati su rezultati o stabilizaciji proteina tetrapirolnim pigmentom.

4.2.1 Izračunavanje pK_a vrijednosti fikocijanobilina

Kako bi se utvrdilo u kom se jonizacionom stanju nalazi PCB na fiziološkom pH, određene su pK_a vrijednosti obe karboksilne grupe hromofore. Za tu svrhu je korišćen kvantno-hemijski proračun, koji je pronašao da su pK_a vrijednosti PCB-a različite od onih za bilirubin ($pK_{a1}=8,1$ i $pK_{a2}=8,4$). Prva pK_a vrijednost PCB-a je niska i iznosi 2,4, dok je druga, sa

vrijednošću od 9,6, viša od pK_a vrijednosti karboksilnih grupa bilirubina. Prema tome, na fiziološkim pH vrijednostima PCB se nalazi u monoanjonskom obliku (**slika 20**).

4.2.2 Studija dokinga je pokazala da se PCB i bilirubin visokim afinitetom vezuju za subdomene IB i IIA na HSA

Urađeno je šest različitih studija dokinga, kako sa potpuno protonovanim formama molekula PCB-a i bilirubina, tako i sa njihovim (fiziološkim) mono- i dianjon formama (**slika 20**). Analiza rezultata dokinga predviđela je dva potentna mjesta vezivanja PCB-a (u subdomenima IB i IIA) za HSA (**slika 21A**), koja se poklapaju sa mjestima koja su prethodno opisana za bilirubin (**slika 21B**). Procijenjene vezivne energije su malo veće za vezivanje bilirubina u poređenju sa vezivanjem PCB-a. Takođe, može se uočiti da su skoro identične energije dobijene za anjonsku formu bilirubina, dok su anjonske forme PCB-a malo više favorizovane (**tabela 10**).



Slika 20. Konformacije neutralne, monoanjonske i dianjonske forme PCB-a

Tabela 10. Najbolji doking skorovi (vezivne energije u kcal mol⁻¹) za HSA-PCB i HSA-bilirubin interakcije.

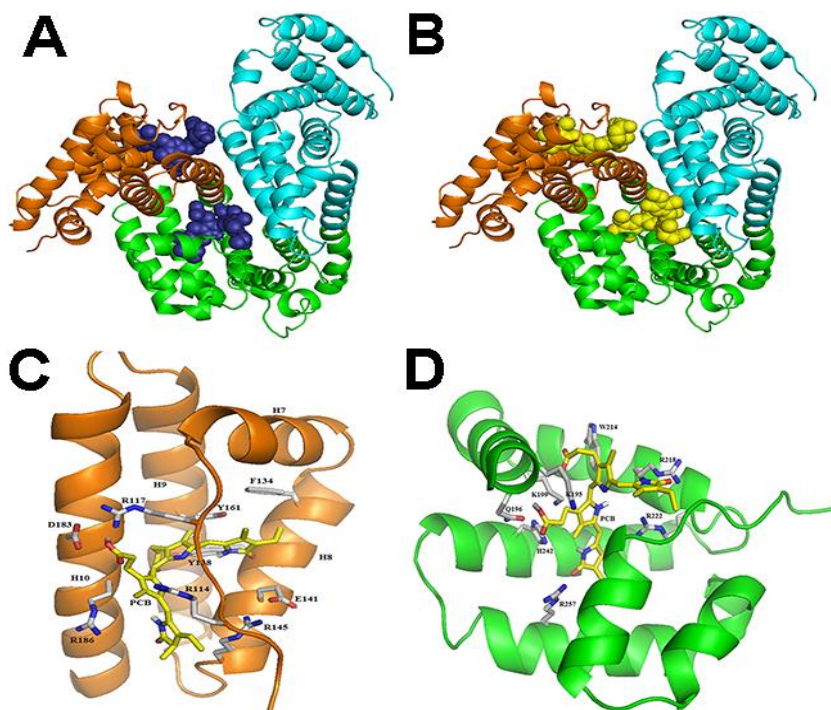
Subdomen	PCB forma			Bilirubinska forma		
	neutralna	monoanjonska	dianjonska	neutralna	monoanjonska	Dianjonska
IB	10.8	10.9	11.3	11.1	11.1	11.3
IIA	10.7	10.8	11.1	11.0	11.1	11.2

Vezivno mjesto PCB-a u subdomenu IB se sastoji od ostataka aminokiselina u heliksima H8, H9 i H10, kao i petlje (ostaci 110-117) koja spaja subdomene IB i IA. Vezivno mjesto ima oblik slova L, pri čemu PCB struktura koja ima najveću vezivnu energiju zauzima *M* konformaciju (**slike 21C i 26**). Unutrašnjost vezivnog mjesta je uglavnom hidrofobna, sa ostacima Leu-115, Pro-118, Met-123, Ile-142, Phe-157 i Leu-182. Postoje i tri pozitivno

naelektrisana ostatka na ulazu u vezivno mjesto: Arg-114, Arg-117 i Arg-186. Studija dokinga ukazuje da su ostaci Arg-114 i Arg-117 uključeni u formiranje sonih mostova/vodoničnih veza sa propionskim grupama PCB-a, dok Arg-186 vjerovatnije formira vodoničnu vezu sa laktamskim prstenom karbonilnog kiseonika. Ostale polarne grupe ostataka Tyr-138, Glu-141, Arg-145, Tyr-161 i Asp-183, mogu biti uključene u formiranje vodoničnih veza sa ligandom. Interesantno je napomenuti da aromatični prstenovi ostataka Phe-134 i Tyr-138 mogu ostvariti steking interakcije sa pirollovim prstenovima PCB-a (**slika 21C**). Opisano vezivno mjesto se poklapa sa vezivnim mjestom za 4Z,15E-bilirubin-IX α , koje je utvrđeno snimanjem kristalne strukture HSA sa ovim molekulom (**slika 22**) (**Zunzain, et al., 2008**). FA1 vezivno mjesto za miristinsku kiselinu i predviđeno vezivno mjesto za PCB (subdomen IB) dijele uglavnom iste aminokiselinske ostatke koji ovičavaju šupljinu subdomena IB (PDB kod 1BJ5) (**Curry, Mandelkow, Brick, & Franks, 1998**). Prisustvo miristinske kiseline u FA1 vezivnom mjestu spiječava vezivanje PCB-a za mjesto IB, dok njeno prisustvo u ostalim FA vezivnim mjestima ne utiče na vezivanje PCB-a za ovo mjesto (**tabela P8**). IB vezivno mjesto nije dovoljno veliko da smjesti istovremeno PCB i miristinsku kiselinu, što dovodi do istiskivanja liganda ka međudomenskoj šupljini proteina (**slika P15A**). Vezivanje ostalih liganda (kao što su hemin, 4Z,15E bilirubin IX α , fusidinska kiselina), koji se vezuju za IB mjesto, takođe spiječava vezivanje PCB-a (**tabela P9**).

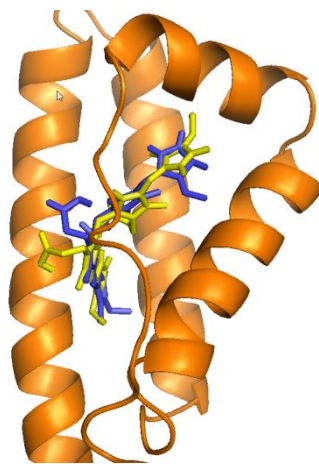
Drugo visoko-afinitetno vezivno mjesto se nalazi u hidrofobnom džepu koga formiraju heliksi H1-H5 u subdomenu IIA (**slika 21D**). Ovo udubljenje čine bočni lanci sledećih ostataka aminokiselina: Phe-211, Trp-214, Leu-219, Phe-223 (iz H1 heliksa), Val-235, Leu-238 (iz H2 heliksa), Leu-260 i Ile-264 (iz H3 heliksa) and Ile-290, Ala-291 (iz H5 heliksa). Slično prvom vezivnom mjestu, ovo mjesto je L oblika, pri čemu je PCB takođe vezan kao *M* konformer (**slike 21D i 26**). Obje jako polarne ili anjonske propionske grupe PCB-a su orjentisane ka gornjem dijelu heliksa H10 (ostaci od 194 do 206) iz subdomena IB. Lys-195 i Lys-199 ostaci (iz heliksa H10) su najvjerovatnije pozitivno naelektrisani. His-242 je uključen u formiranje sonih mostova/vodoničnih veza sa propionskim grupama liganda. Drugi naelektrisani ostaci, nađeni u vezivnom mjestu (Arg-218, Arg-222 i Arg-257), su uključeni u vodonično vezivanje sa karbonilnom ili NH grupom laktamskog prstena. Zasnvano na našim analizama dokinga, postoji potencijal za steking interakcije između Trp-214 i jednog od pirollovih prstenova PCB-a (**slika 21D**). Mada je vezivna enegrija i pozicija PCB-a u IIA vezivnom mjestu donekle izmjenjena

prisustvom miristinske kiseline u FA7 mjestu (subdomen IIA), simulacija dokinga predviđa da je ovo najvjerojatnije mjesto vezivanja tetrapirolnog liganda i kada je miristinska kiselina vezana za ovo mjesto (**slika P15B**). Prisustvo miristinske kiseline u ostalim mjestima na proteinu ne utiče za vezivanje PCB-a za subdomen IIA (**tabela P8**), dok vezivanje drugih (odabranih) liganada koji zauzimaju IIA mjesto različito utiče na vezivanje PCB-a. Za najveći broj struktura, postojanje liganda u IIA vezivnom mjestu, uključujući *R* i *S* varfarin, sprječava doking PCB-a (**tabela P9**). U slučaju nekih liganada (azapropazon, indometakin ili lizofosfatidiletanolamin) postoji dovoljno prostora da se smjesti i PCB, i, prema tome, vezivanje liganda nije spriječeno (**tabela P9; slika P16**). Posebno su interesantni rezultati dokinga PCB-a za kristalnu strukturu HSA sa dva liganda (indometakin i azapropazon, PDB kod 2BXK), gdje je PCB udokovan u istu šupljinu u kojoj se nalaze pomenuti ligandi (**slika P16A**).



Slika 21. Molekulsko modelovanje vezivanja PCB-a/bilirubina za HSA. Domeni u trakastom modelu proteina HSA (PDB kod: 1BM0) su u sledećim bojama: I, narandžast; II, zelen; III, tirkizno plav. Strukturni modeli označavaju dva (potencijalna) vezivna mjesta za monoanjonske forme PCB-a (**A**) i bilirubina (**B**) za HSA: vezani PCB i bilirubin su redom prikazani u ljubičastom i žutom modelu ispunjenih sfera; Najbolje rezultati dokinga PCB-HSA sistema: u subdomenu IB (**C**) i subdomenu IIA (**D**). PCB je prikazan kao štapičasti model. Prikazana je sekundarna struktura proteina, dok su relevantni aminokiselinski ostaci obilježeni skraćenicama. Atomi vodonika su izostavljeni zbog jasnoće prikaza. Slike su dobijene pomoću PyMOL (<http://www.pymol.org/>) softvera.

Dobro je poznato da vezivanje različitih liganada dovodi do konformacionih promjena u HSA (**Fanali, et al., 2012.**). Zato je ispitan uticaj različitih konformacija HSA na vezivanje PCB-a, korišćenjem 16 kristalnih struktura HSA u kompleksu sa različitim ligandima, pri čemu su prije studije dokinga PCB-a koordinate za te ligande izbrisane. Dva predložena vezivna mjesta PCB-a (subdomeni IB i IIA) su najvjerovatnija vezivna mjesta bez obzira na konformaciju proteina, mada procijenjene vezivne energije zavise od konformacije proteina i pozicije aminokiselinskih bočnih lanaca; za IB mjesto vezivne energije su između 8,4 i 10,8 kcal/mol, dok su za IIA mjesto one iznosi između 8,5 i 10,5 kcal/mol (**Tabela P7**).

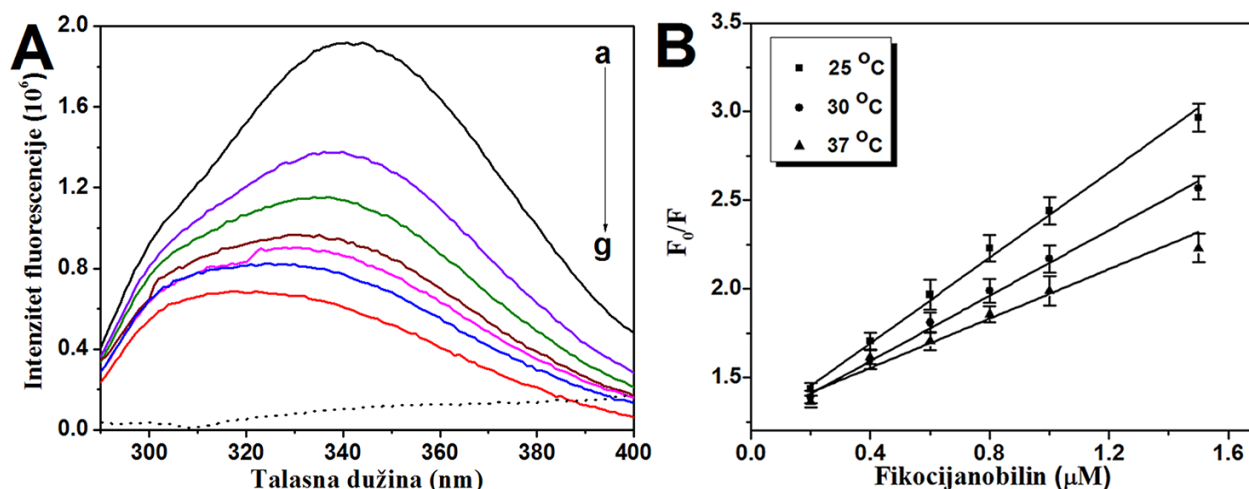


Slika 22. Preklapanje udokovanog PCB-a (ljubičasto) i 4Z,15E-bilirubin-IX α (žuto) vezanog u kristalnoj strukturi HSA (PDB kod 2VUE).

4.2.3 PCB se vezuje za HSA i gasi njegovu fluorescenciju

Gašenje sopstvene fluorescencije HSA, koja uglavnom potiče od Trp-214 u subdomenu IIA, je uobičajeni pristup za proučavanje vezivanja liganada za HSA (npr. **Sulkowska, 2002**). HSA posjeduje samo jedan ostatak triptofana, dok je broj tirozinskih ostataka 18 (**He & Carter, 1992**). Nakon ekscitacije proteina na 280 nm, dolazi do snažne emisije sa maksimumom na 340 nm. Dodatkom PCB-a dolazi do opadanja intenziteta emisionog pika HSA proporcionalno količini dodatog liganda (**slika 23A**). Takođe, povećanje koncentracije PCB-a dovodi i do uočljivog plavog pomjeraja emisionog maksimuma (**slika 23A**). **Slika 23B** predstavlja Stern-Volmerove (SV) dijagrame za gašenje fluorescencije HSA od strane PCB-a na tri različite temperature. Može se vidjeti da konstanta gašenja (nagib prave) opada sa povećanjem temperature (**tabela 11**), i da je vrijednost k_q veća od konstante brzine difuzije biomolekula ($2 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), što ukazuje da je u pitanju statički tip gašenja fluorescencije (**Li & Wang, 2015**),

odnosno dolazi do formiranja protein-ligand kompleksa. U prilog ovoj tvrdnji idu i spektroskopske promjene opisane u odeljku 4.2.6. Na osnovu jednačine 6 (na strani 65) izračunata je konstanta vezivanja PCB-a za HSA i ona iznosi $2,2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ (na 25°C), što predstavlja relativno visok afinitet vezivanja u poređenju sa drugim ligandima koji se vezuju za ovaj protein (**tabela 11**; **slika P17**).



Slika 23. (A) Emisioni spektri (ekscitacija na 280 nm) HSA ($0,375 \mu\text{M}$) u prisustvu različitih koncentracija PCB-a (0, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1,0 i $1,5 \mu\text{M}$, za krive od **a** do **g**, redom). Isprekidana linija predstavlja emisioni spektar $1,5 \mu\text{M}$ PCB-a; (B) SV dijagrami gašenja fluorescencije HSA PCB-om na različitim temperaturama. Za uslove rada vidjeti odeljak 3.4.4.

Tabela 11. SV konstante gašenja (K_{sv}), bimolekularne konstante gašenja (k_q) i konstante vezivanja (K_a) za HSA-PCB sistem na različitim temperaturama.

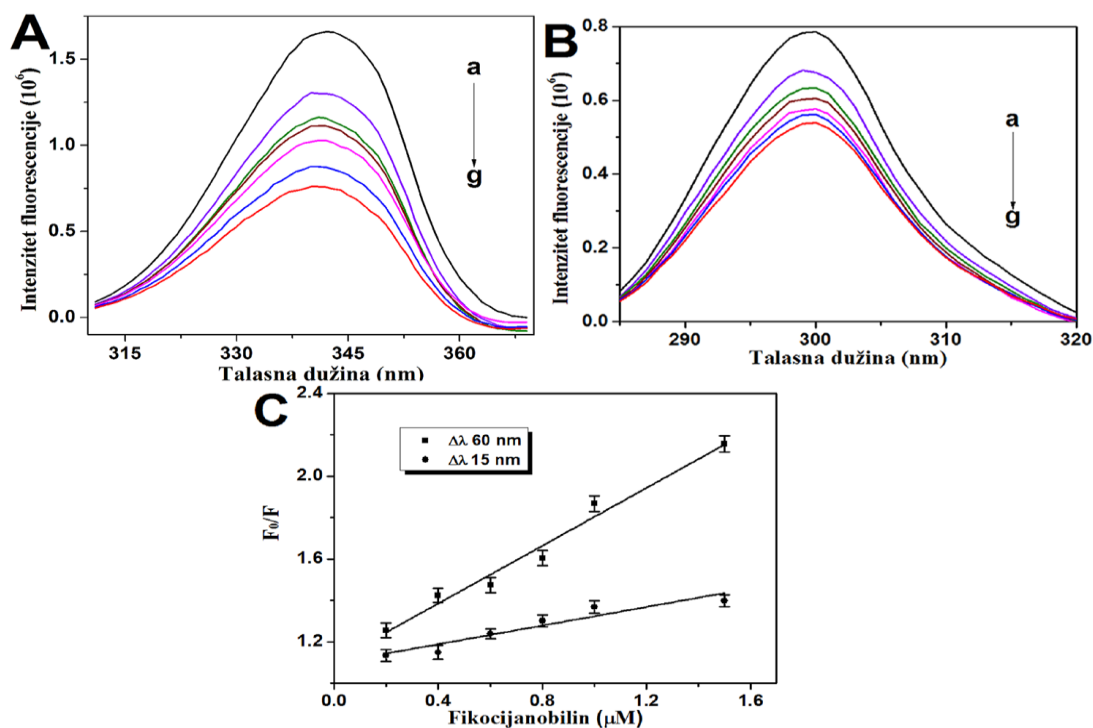
t ($^\circ\text{C}$)	Jednačina (5)			Jednačina (6)	
	$K_{sv} (\text{M}^{-1}) \times 10^6$	$k_q (\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}) \times 10^{14}$	S.D.	$K_a (\text{M}^{-1}) \times 10^6$	S.D.
25	1,23	1,23	0,012	2,24	0,022
30	0,92	0,92	0,007	1,80	0,018
37	0,69	0,69	0,009	1,23	0,021

4.2.4 Tip vezivanja PCB-a za HSA

U cilju potvrde načina vezivanja PCB-a za HSA, izračunati su termodinamički parametri: promjena entalpije (ΔH) i promjena entropije (ΔS) interakcija. Temperaturna zavisnost HSA-PCB vezivne konstante je proučena na tri različite temperature (25 , 30 i 37°C), a na osnovu grafika zavisnosti $\ln K_a$ od $1/T$ (**slika P18**) određene su ΔH ($39,2 \text{ kJmol}^{-1}$) i ΔS ($-9,7 \text{ Jmol}^{-1}\text{K}^{-1}$).

4.2.5 Vezivanje PCB-a za HSA mijenja okruženje ostatka Trp-214

Sinhrona fluorescentna spektroskopija pruža informacije o molekularnom okruženju fluorofora. Kada je $\Delta\lambda$ između ekscitacione i emisione talasne dužine podešena na 15 nm dobijaju se informacije o okruženju tirozinskih ostataka, dok razlika od 60 nm ukazuje na okruženje triptofanskih ostataka (Miller, 1979). Za razliku od ostataka tirozina (slika 24B), kod Trp-214 ostatka može se uočiti mali plavi pomjeraj (od 343 na 340 nm) u maksimumu emisione talasne dužine (slika 24A). Takođe, sa SV dijagrama gašenja sinhronne fluorescencije se može uočiti da je nagib prave kod gašenja fluorescencije Trp-214 ostatka veći u odnosu na nagib prave za gašenje tirozinskih ostataka (slika 24C), čime se potvrđuje da smanjenje fluorescencije nakon vezivanja PCB-a uglavnom potiče od gašenja Trp-214 emisije (Zhang, Zhuang, Tong, & Liu, 2013).



Slika 24. Sinhroni fluorescent spektri HSA (0,375 μM) sa (A) $\Delta\lambda$ 60 nm (Trp) i sa (B) $\Delta\lambda$ 15 nm (Tyr) u prisustvu rastućih koncentracija PCB-a (0-1,5 μM za krive od a do g, redom; (C) SV dijagrami gašenja sinhronne fluorescencije HSA sa PCB-om: $\Delta\lambda$ 60 nm za Trp i $\Delta\lambda$ 15 nm za Tyr. Za uslove rada vidjeti odeljak 3.4.4.

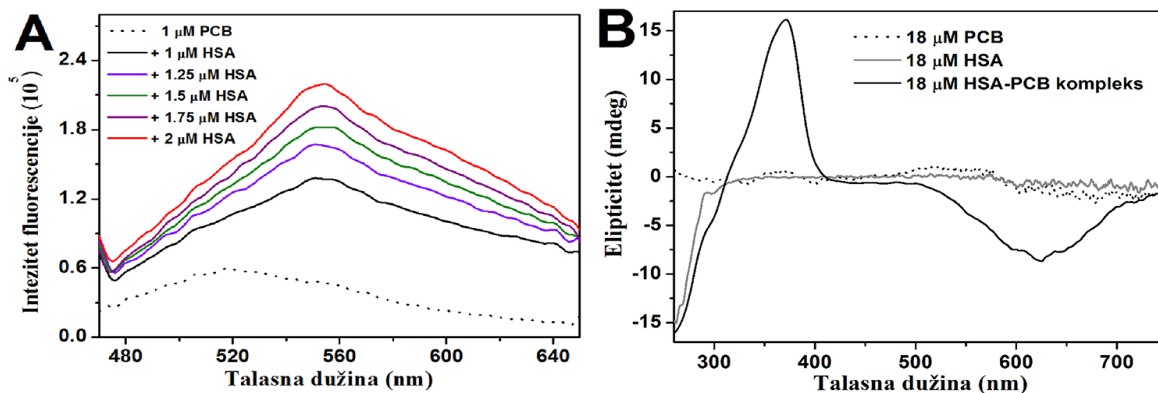
4.2.6 Vezivanje PCB-a za HSA dovodi do promjena u apsorpcionim, fluorescentnim i CD spektrima pigmenta

PCB je hromofora koja ima karakterističan UV/VIS, CD i fluorescentan spektar. Poznato je da vezivanje bilirubina za HSA dovodi do značajnog povećanja fluorescencije bilirubina (koja

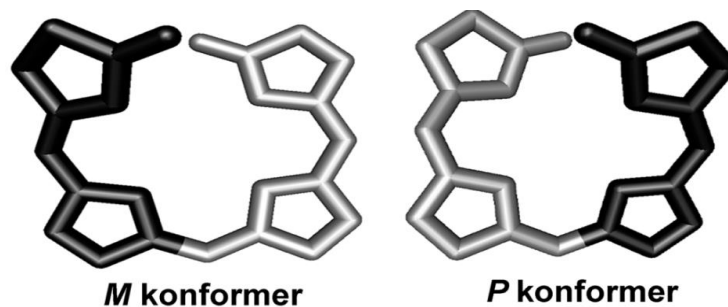
je prilično mala kada je bilirubin slobodan), pri čemu dolazi do crvenog pomjeraja emisionog maksimuma (Hrkal & Klementova, 1984; Khan, Muzammil, & Tayyab, 2000). Na slici 25A su prikazani fluorescentni spektri PCB-a pri ekscitaciji od 460 nm. Nakon dodatka HSA, dolazi do povećanja fluorescencije PCB-a pri čemu se emisijski maksimum pomjera ka većim talasnim dužinama (od 518 nm na 541 nm).

PCB se u vodenom rastvoru uglavnom nalazi u *ZZZ* konformaciji, koja je ciklična i helikoidna, pri čemu se desnogiri (*P*) i lijevogiri (*M*) konformeri nalaze u ravnoteži (slika 26) (Tu, Yao, Li, & Liu, 2009), tako da na pH 7,4 PCB ne pokazuje optičku aktivnost. Međutim, dodatak HSA indukuje pozitivan pik na 370 nm i negativan na 620 nm u CD spektru PCB-a, pri čemu se ovaj fenomen naziva negativni Kotonov efekat (slika 25B).

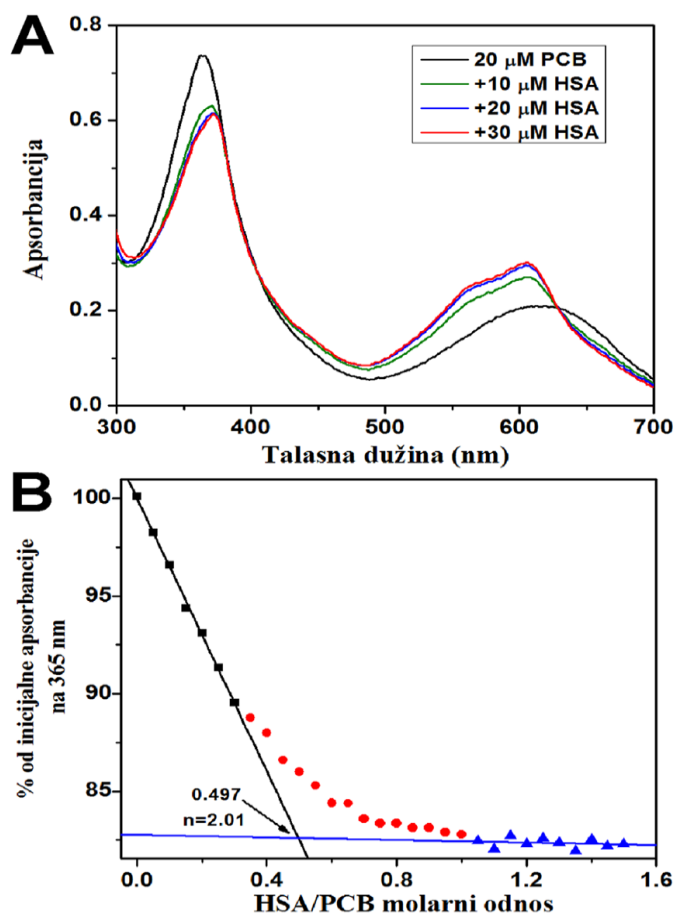
UV/VIS spektar čistog PCB-a u 20 mM Tris puferu, pH 7,4 pokazuje dva karakteristična apsorpciona maksimuma na 362 i 610 nm (slika 27A). Dodatak HSA dovodi do pomjeranja apsorpcionog maksimuma na 362 nm ka većim talasnim dužinama (na 368 nm) sa opadanjem apsorpcije, kao i do povećanja intenziteta apsorpcije u VIS spektru, koje je praćeno plavim pomjeranjem na 605 nm. Ove promjene ukazuju da se konformacija hromofore mijenja nakon dodatka proteina. Sposobnost proteina da smanji apsorpciju liganda na 365 nm je iskorišćena za određivanje stehiometrije vezivanja PCB-a za HSA. Na slici 27B se može uočiti dvofazni profil, dobijen nakon spektrofotometrijske titracije PCB-a sa proteinom. Pri nižim HSA/PCB molarnim odnosima smanjivanje apsorpcije pigmenta ima linearnu zavisnost, dok se pri višim koncentracijama HSA (1-1,5) dostiže plato. Ove dvije prave se sjeku na HSA/PCB odnosu 0,497, što daje 2,01 mola PCB-a po molu proteina, ukazujući na stehiometriju vezivanja 2:1.



Slika 25. (A) Efekti dodatka HSA na emisione spektre 1 μM PCB-a (ekscitacija na 460 nm). Za uslove vidjeti odeljak 3.4.4; (B) CD spektri (u bliskoj-UV i vidljivoj oblasti) PCB-a u prisustvu i odsustvu HSA. Za uslove rada vidjeti odeljak 3.4.7.



Slika 26. Shematski prikaz helikoidalnih konformacija (*M* i *P*) PCB-a. Crnom bojom je označen dio molekula koji je iznad ravni papira. Supstituenti prstenova su izostavljeni u cilju jednostavnijeg prikaza.



Slika 27. (A) Efekat dodatka HSA na UV/VIS apsorpcione spektre 20 μM PCB-a; (B) Određivanje stehiometrije vezivanja HSA-PCB kompleksa, praćenjem opadanja apsorbancije PCB-a na 365 nm. Broj vezivnih mjesta je određen na osnovu recipročne vrijednosti molarnog odnosa HSA/PCB na presjeku prave koja prolazi kroz početni dio krive (crna boja) sa pravom koja prolazi kroz plato (plava boja). Za uslove rada vidjeti odeljak 3.4.6.

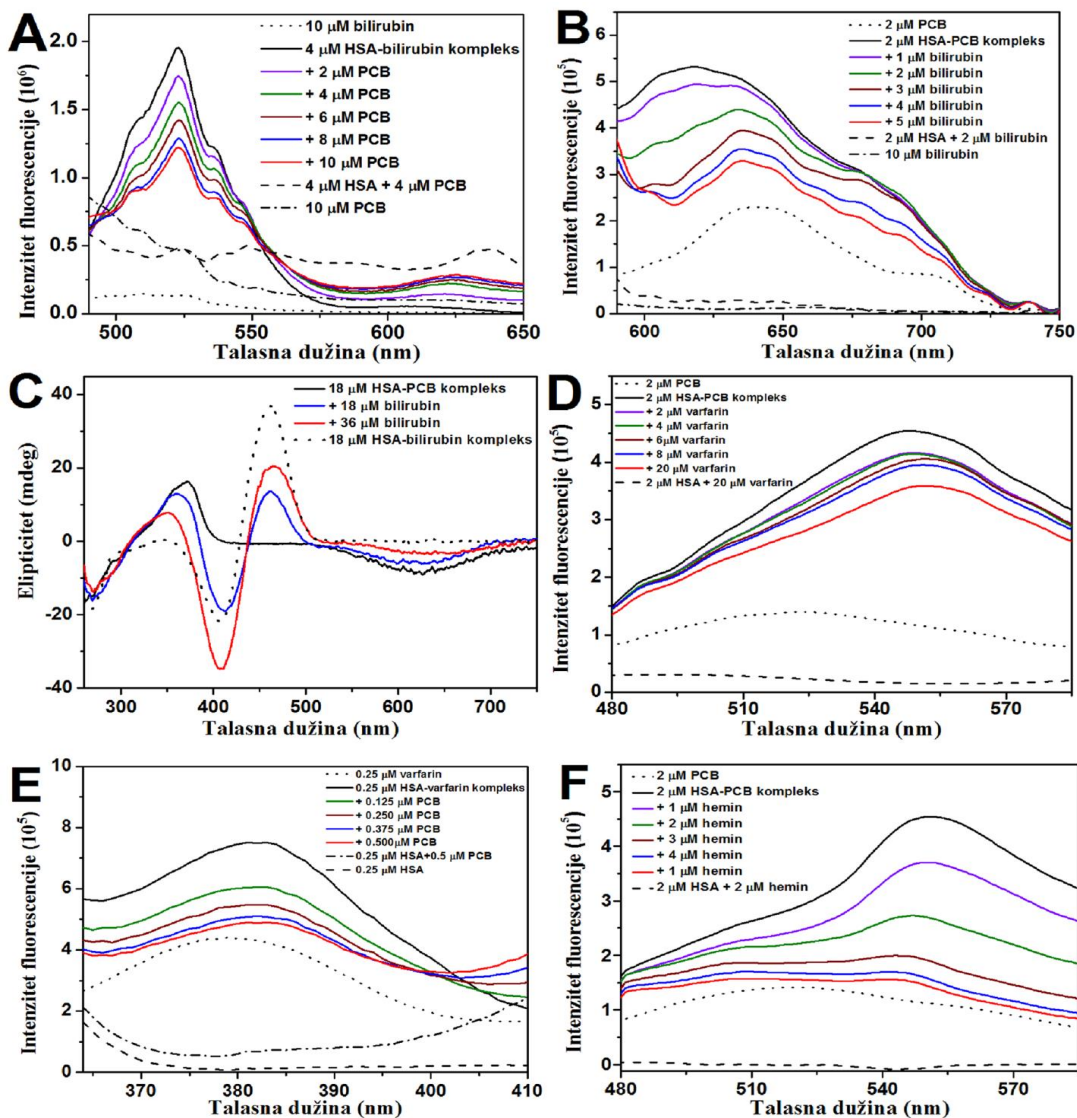
4.2.7 PCB kompetira sa bilirubinom i markerima specifičnim za mjesto za vezivanje za HSA

Uzevši u obzir sličnost u strukturi, rezultate studije dokinga, kao i eksperimentalno određene konstante afiniteta PCB-a za HSA, urađena je dodatna studija u cilju potvrđivanja identičnosti vezivnih mjesta za PCB i bilirubin na HSA. U ovim eksperimentima ispitane su spektralne promjene HSA-bilirubin kompleksa nakon dodatka PCB-a i obratno. Ekscitacija HSA-bilirubin i HSA-PCB kompleksa na 460 nm indukuje izražene emisione maksimume na relativno bliskim talasnim dužinama: 516 nm za HSA-bilirubin sistem i 547 nm za HSA-PCB sistem (**Slike 25A i P19**). Zbog toga su snimani sinhroni fluorescentni spektri sa $\Delta\lambda$ 56 i $\Delta\lambda$ 87 nm za praćenje emisije HSA-bilirubin i HSA-PCB kompleksa, redom. Kada je $\Delta\lambda$ 56 nm, bilirubin u kompleksu sa HSA pokazuje pik na 523 nm, dok slobodan bilirubin pri ovim uslovima ima zanemarljivu emisiju (**slika 28A**). Nakon dodatka PCB-a, intenzitet pika se značajno smanjuje, što sugeriše povećanje koncentracije slobodnog bilirubina u rastvoru, usled njegovog istiskivanja PCB-om sa vezivnih mjesta na proteinu. Kada je $\Delta\lambda$ 87 nm, emisijski maksimum HSA-PCB kompleksa se javlja na 618 nm. Na ovoj talasnoj dužini HSA-PCB kompleks ima značajno veću emisiju u odnosu na slobodan PCB (**slika 28B**). Nakon dodatka bilirubina smanjuje se intenzitet ovog pika, što sugeriše da se koncentracija slobodnog PCB-a povećava, zato što bilirubin istiskuje PCB sa njegovih vezivnih mjesta na proteinu.

Bilirubin u kompleksu sa HSA ispoljava optičku aktivnost, sa pozitivnim i negativnim pikom na 460 i 410 nm, redom (**Goncharova, et al., 2013**). Sa **slike 28C** se može vidjeti da dodatkom bilirubina u rastvor koji sadrži HSA-PCB kompleks dolazi do smanjenja apsolutnih vrednosti elipticiteta na 370 i 620 nm. Uzevši u obzir da oba ova pika potiču od PCB-a vezanog za HSA (**slika 28C**) i da slobodan PCB ne posjeduje optičku aktivnost, dobijeni rezultati pokazuju da bilirubin istiskuje PCB iz kompleksa sa proteinom.

U cilju eksperimentalne potvrde predloženih vezivnih mjesta za PCB na molekulu HSA, urađene su studije kompeticije sa markerima specifičnim za subdomen IB (hemin) i subdomen IIA (varfarin). Nakon dodatka varfarina (vezivna konstanta varfarina za HSA iznosi $3.8 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ na 25°C) HSA-PCB kompleksu u molskom odnosu 1:1, dolazi do malog opadanja intenziteta emisijonog maksimuma, pri čemu desetostruki višak varfarina prouzrokuje samo malo dodatno opadanje intenziteta ovog pika (**slika 28D**). Nasuprot ovome, PCB efikasno istiskuje varfarin iz

HSA-varfarin ekvimolarnog kompleksa (slika 28E). Koristeći isti eksperimentalni dizajn, slični rezultati su dobijeni u slučaju kompeticije varfarina sa bilirubinom za HSA i obratno (slike P19 i P20). Prema tome, bilirubin i PCB efikasno istiskuju varfarin sa njegovog vezivnog mjesta na HSA (subdomen IIA), dok je istiskivanje PCB-a i bilirubina varfarinom značajno manje.



Slika 28. (A) Gašenje fluorescencije HSA-bilirubin kompleksa (4 μM oba) PCB-om, upotrebom sinhronne fluorescentne spektroskopije, $\Delta\lambda$ 56 nm; (B) Gašenje fluorescencije HSA-PCB kompleksa (2 μM oba) bilirubinom, upotrebom sinhronne fluorescentne spektroskopije, $\Delta\lambda$ 87 nm; (C) Smanjenje elipticiteta HSA-PCB kompleksa (18 μM oba) dodatkom bilirubina; (D) Gašenje fluorescencije HSA-PCB kompleksa (2 μM oba) varfarinom. Talasna dužina ekscitacije je bila 460 nm; (E) Gašenje fluorescencije HSA-varfarin kompleksa (0,25 μM oba) PCB-om, upotrebom sinhronne fluorescentne spektroskopije, $\Delta\lambda$ 64 nm; (F) Gašenje fluorescencije HSA-PCB kompleksa (2 μM oba) heminom. Talasna dužina ekscitacije je 460 nm. Za uslove rada vidjeti odeljak 3.4.4.

Tirovanje ekvimolarne smješe HSA-PCB heminom (vezivna konstanta hemina za HSA je $0,9 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ na 25°C) dovodi do snažnog gašenja fluorescencije koja potiče od HSA-PCB kompleksa (**slika 28F**). Sličan rezultat se uočava dodatkom hemina u ekvimolarnu smještu HSA i bilirubina (**slika P21**), što ukazuje da hemin istiskuje bilirubin i PCB sa vezivnog mjesta na proteinu (subdomen IB).

U cilju kvantitativnog ispitivanja efekata markera specifičnih za mjesto na vezivanje PCB-a za HSA, izračunate su vezivne konstante PCB-a u prisustvu hemina i varfarina pomoću jednačine 6, i potom su dobijene vrednosti upoređene sa literaturnim vrijednostima. Vezivna konstanta PCB-a ($2,2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$) se samo malo smanjuje u prisustvu varfarina ($1,6 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$) ili hemina ($2,0 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$). Međutim, u prisustvu oba markera vezivna konstanta pigmenta se značajno smanjuje ($0,9 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$).

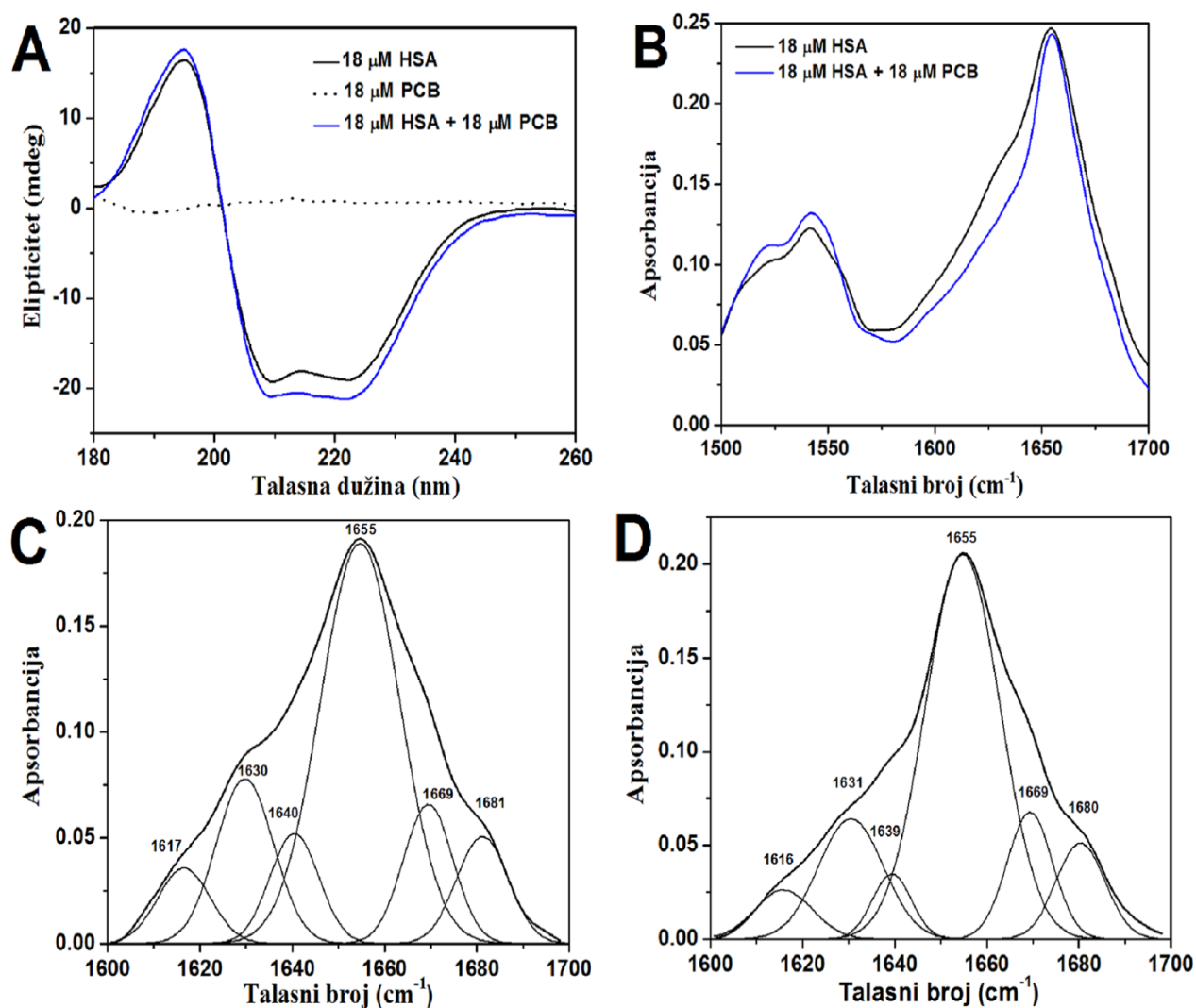
4.2.8 Konformacija HSA se mijenja nakon vezivanja PCB-a

CD spektar HSA pokazuje dvije negativne trake u dalekoj UV oblasti: na 208 i 222 nm, što je karakteristično za protein bogat α -heliskima. Kao što je prikazano na **slici 29A**, sam PCB ne pokazuje optičku aktivnost u ovom regionu. Dodatak PCB-a rastvoru proteina dovodi do povećanja negativnog elipticiteta, bez značajnih pomjeraja pikova i oblika spektra proteina (**slika 29A**). Procenat α -heliksa u proteinu je povećan sa $49,3 \pm 1,7\%$, na $54,5 \pm 2,4\%$ nakon vezivanja PCB-a u molarnom odnosu PCB/HSA 1:1.

Dodatni rezultat u prilog uticaju PCB-a na strukturu HSA je dobijen pomoću FT-IR spektroskopije. Infracrveni spektri proteina pokazuju veći broj amidnih traka koje predstavljaju različite vibracije u okviru peptidne kičme. Amidna traka I se javlja u regionu između 1660 i 1700 cm^{-1} i potiče uglavnom od valencionih C=O vibracija, dok se amidna traka II javlja u regionu 1550 – 1500 cm^{-1} i potiče od valencionih C-N vibracija spregnutih sa deformacionim N-H vibracijama. Amidna traka I je osjetljivija na promjene u sekundarnoj strukturi proteina u odnosu na amidnu traku II (**Bakkialakshmi & Barani, 2013**), što je čini pogodnijom za ispitivanje uticaja vezivanja liganada na sekundarnu strukturu proteina.

Dodatkom PCB-a u rastvor HSA, pomjeranje pika amidnih traka I i II je zanemarljivo, ali dolazi do sužavanja amidne trake I, što ukazuje da vezivanje PCB-a mijenja sekundarnu strukturu proteina (**slika 29B**). Kvantitativa analiza sekundarnih struktura HSA u prisustvu i

odsustvu liganda je data na **slici 29 (C i D)**. Prema ovoj studiji, slobodan HSA je sadržao $50,4 \pm 2,1\%$ α -heliksa, $29,8 \pm 1,3\%$ β -pločica i $11,0 \pm 0,5\%$ β -zavijutaka. Nakon dodatka PCB-a u rastvor proteina, sadržaj α -heliksa ee povećao na $55,2 \pm 1,8\%$, što je u saglasnosti sa rezultatima dobijenih CD spektroskopijom. Sadržaj ukupnih β -pločica i β -zavijutaka praktično je ostao nepromijenjen, dok se sadržaj neuređenih struktura smanjio sa $8,8 \pm 1,3\%$ na $4,8 \pm 0,7\%$ (**tabela 12**). Ovo sugerise da je nakon vezivanja PCB-a HSA stabilizovan usled povećanog sadržaja α -heliksa na račun neuređenih struktura.



Slika 29. (A) CD spektri (daleka UV oblast) HSA u odsustvu i prisustvu PCB-a. Za uslove rada vidjeti odeljak 3.4.7; (B) FT-IR spektri HSA i HSA-PCB kompleksa. Za uslove rada vidjeti odeljak 3.4.8; Ufitovana amidna traka I (1700–1600 cm⁻¹) sa udjelom sekundarnih struktura u HSA (C) i HSA-PCB kompleksu (D).

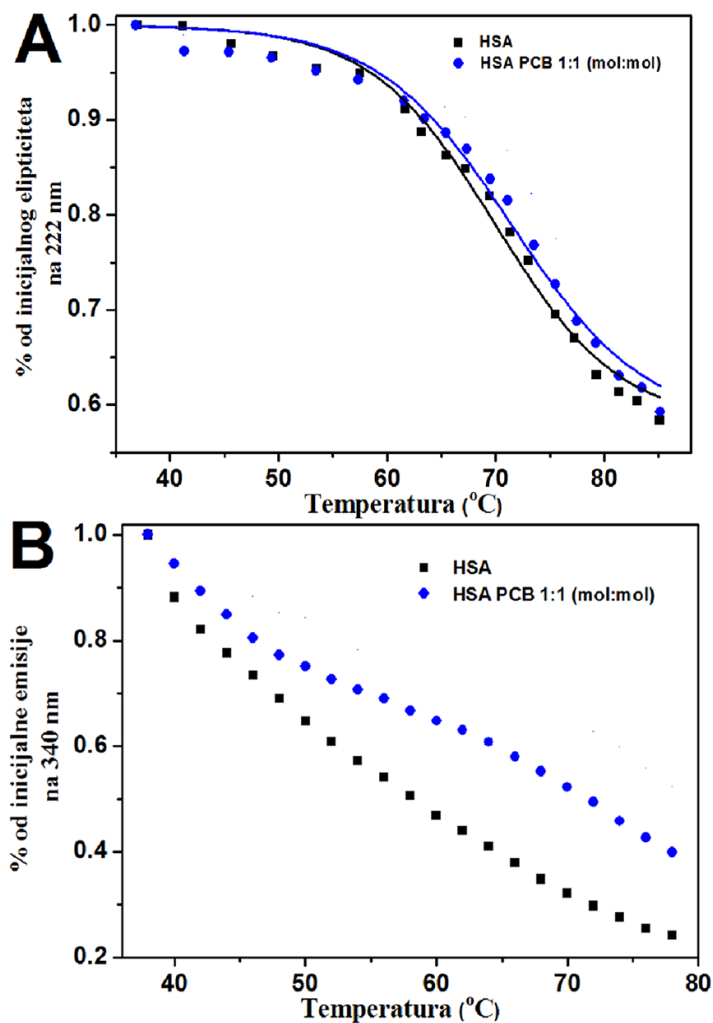
Tabela 12. Sadržaj sekundarnih struktura u HSA u prisustvu i odsustvu PCB-a, dobijen upotrebom FT-IR spektroskopije.

Tip sekundarne strukture	HSA	HSA-PCB kompleks (1:1; mol:mol)
α -heliksi (%)	50,4 \pm 2,1	55,2 \pm 1,8
β -pločice (%)	21,1 \pm 1,3	20,1 \pm 1,5
Neuređene strukture (%)	8,8 \pm 1,3	4,8 \pm 0,7
β -zavijutci (%)	11,0 \pm 0,5	11,0 \pm 0,6
β -antiparalelne pločice (%)	8,7 \pm 0,8	8,9 \pm 0,9

4.2.9 Vezivanje PCB-a povećava temperaturnu stabilnost HSA

U cilju proučavanja uticaja vezivanja PCB-a na temperaturnu stabilnost HSA, praćena je temperaturna denaturacija proteina mjerenjem elipticiteta na 222 nm. Povećanje temperature dovodi do smanjenja intenziteta negativne trake na ovoj talasnoj dužini, kao posledice gubitka α -heliksa (**slika 30A**). Kriva topljenja za HSA-PCB sistem ima sličan oblik kao kriva topljenja za HSA, ali može se uočiti da PCB indukuje diskretnu inhibiciju temperaturne denaturacije proteina. Zaista, T_m vrijednosti, dobijene sigmoidnim fitovanjem krivih topljenja, pokazuju da HSA-PCB kompleks ima veću temperaturnu stabilnost ($T_m=71.4^\circ\text{C}$) u poređenju sa HSA ($T_m=70^\circ\text{C}$).

Temperaturna denaturacija HSA je praćena i smanjivanjem fluorescencije ostatka Trp-214 u subdomenu IIA (**He & Carter, 1992**) (**slika 30B**). Međutim, za razliku od CD mjerenja, značajno opadanje fluorescencije proteina počinje na nižim temperaturama (40°C). Prema tome, izgleda da gubitak fluorescencije na nižim temperaturama nije posledica konformacionih promjena u proteinu, već da dolazi do temperaturnog gašenja fluorescencije (**Yamamoto, Fukui, Hori, & Matsui, 2006**). Ipak, uočljive su razlike u krivama topljenja između slobodnog HSA i HSA-PCB kompleksa, posebno na temperaturama iznad 60°C . Prisustvo PCB-a inhibira opadanje fluorescencije na višim temperaturama, što sugeriše njegov stabilizujući efekat na strukturu HSA.



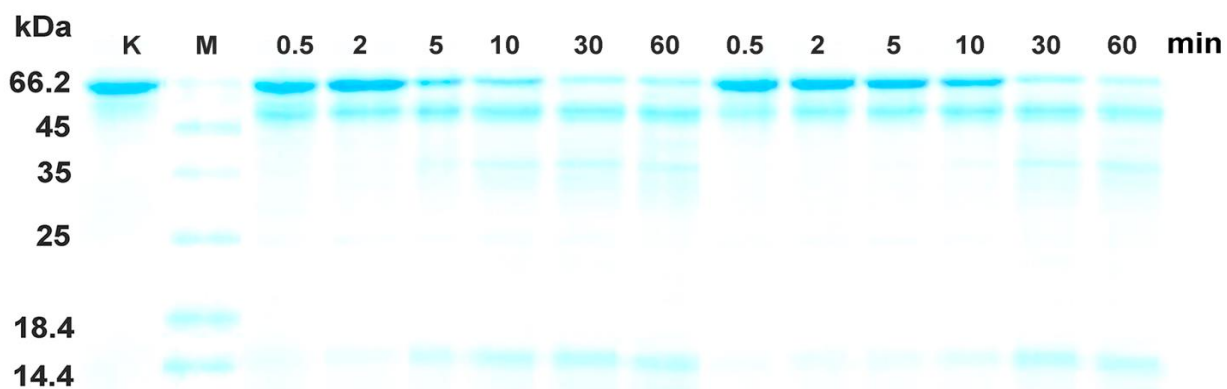
Slika 30. Efekat PCB-a na temperaturnu stabilnost HSA. (A) Temperaturna zavisnost elipticiteta HSA (0,5 μ M) na 222 nm u prisustvu i odsustvu 0,5 μ M PCB; (B) Temperaturna zavisnost fluorescencije HSA (1 μ M) na 340 nm u prisustvu i odsustvu 1 μ M PCB-a (λ_{ex} =280 nm). Za uslove rada vidjeti odeljak 3.5.1.

4.2.10 Otpornost HSA-PCB kompleksa na digestiju tripsinom

Fleksibilnost domena proteina utiće na njihovu digestiju, pri čemu fleksibilne petlje na proteinu mogu bolje da se smjeste u supstrat-vezujuća/katalitička mjesta na proteazama. Povećanje sadržaja α -heliksa i termalna stabilizacija HSA pri vezivanju PCB-a ukazuju na rigidniju konformaciju HSA-PCB kompleksa u odnosu na HSA, pa se stoga može očekivati da vezivanje liganda takođe utiće na proteolitičku degradaciju proteina.

Digestibilnost HSA u prisustvu i odsustvu PCB-a je analizirana pomoću SDS-PAGE nakon tripsinske digestije proteina. Rezultati su pokazali da tripsin nakon 10 minuta digestuje

veći dio slobodnog HSA (traka na 66 kDa), pri čemu se dobijaju relativno veliki fragmenti. U drugu ruku, HSA-PCB kompleks se digestuje sporije, i veći peptidi, otporni na digestiju, sa molekulskim masama 35 i 14 kDa se javljaju kasnije u toku digestije (**slika 31**). Fitovanjem denzitometrijski dobijenog intenziteta trake koja potiče od intaktnog HSA u eksponencijalnu krivu (**slika P22**), procijenjeni poluživot HSA iznosi 4,9 minuta, dok vezani PCB produžava poluživot proteina na 13,9 minuta.



Slika 31. SDS-PAGE elektroforegram (redukujući uslovi, 14% PAA gel) nakon tripsinske digestije 3,8 μM HSA u prisustvu i odsustvu 3,8 μM PCB-a. Linija K: HSA bez tripsina; Linija M: markeri; linije 1-6 odgovaraju digestionim vremenima HSA nakon 0,5, 2, 5, 10, 30 i 60 minuta bez PCB-a, redom, dok linije 7-12 predstavljaju digestiona vremena HSA nakon 0,5, 2, 5, 10, 30 i 60 minuta sa PCB-om, redom. Za uslove rada vidjeti odeljak 3.5.2.

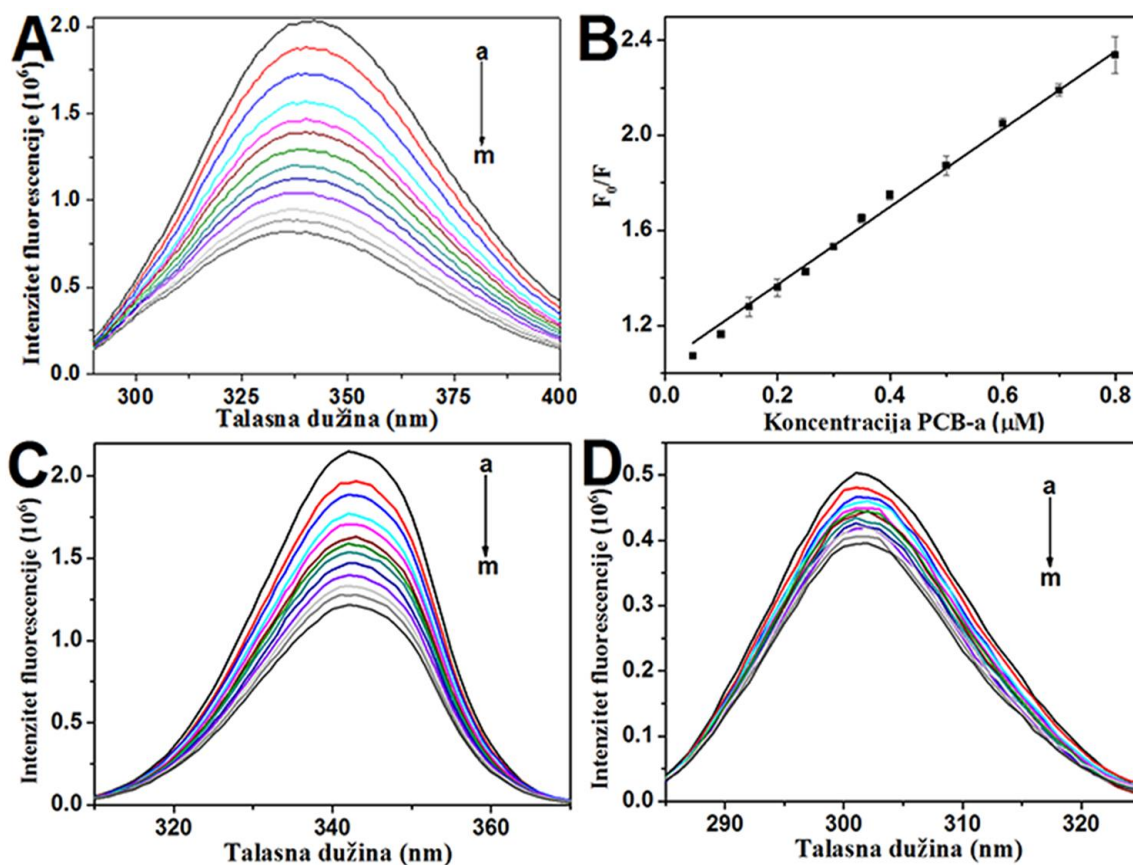
4.3 Fikocijanobilin se vezuje visokim afinitetom i za BSA, uz razlike u mestu vezivanja. Vezivanje dovodi do stabilizacije i proteina i liganda.

U ovom poglavlju dat je sažeti prikaz rezultata o karakterizaciji vezivanja PCB-a za BSA. Drugi dio teksta bavi se rezultatima ispitivanja uticaja formiranja kompleksa na stabilnost i proteina i liganda, kao i na antioksidativnu aktivnost PCB-a.

4.3.1 PCB gasi sopstvenu fluorescenciju BSA

Prisustvo dva triptofanska ostatka (Trp-134 i Trp-212) ima za posledicu intenzivnu fluorescenciju BSA nakon ekscitacije na 280 nm. Dodatak PCB-a dovodi do dozno zavisnog opadanja fluorescencije proteina, koje je praćeno plavim pomjeranjem emisionog maksimuma od 342 do 335 nm (**slika 32A**). **Slika 32B** pokazuje SV dijagram za gašenje fluorescencije proteina usled dodatka PCB-a. Dobijeni nagib prave predstavlja konstantu gašenja koja iznosi $1,7 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, dok je bimolekularna konstanta brzine gašenja $1,7 \times 10^{14} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, što je oko četiri reda veličine veće nego brzina difuzije biomolekula ($10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Prema tome, dobijeni rezultati

ukazuju da PCB gasi fluorescenciju proteina statičkim mehanizmom (Li & Wang, 2015). Formiranje statičkog kompleksa je potom dokazano i drugim spektroskopskim metodama (odjeljak 4.3.3). Izračunata konstanta vezivanja iznosi $2,3 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ (na 25°C), što ukazuje na visok afinitet vezivanja PCB-a za BSA (slika P23).



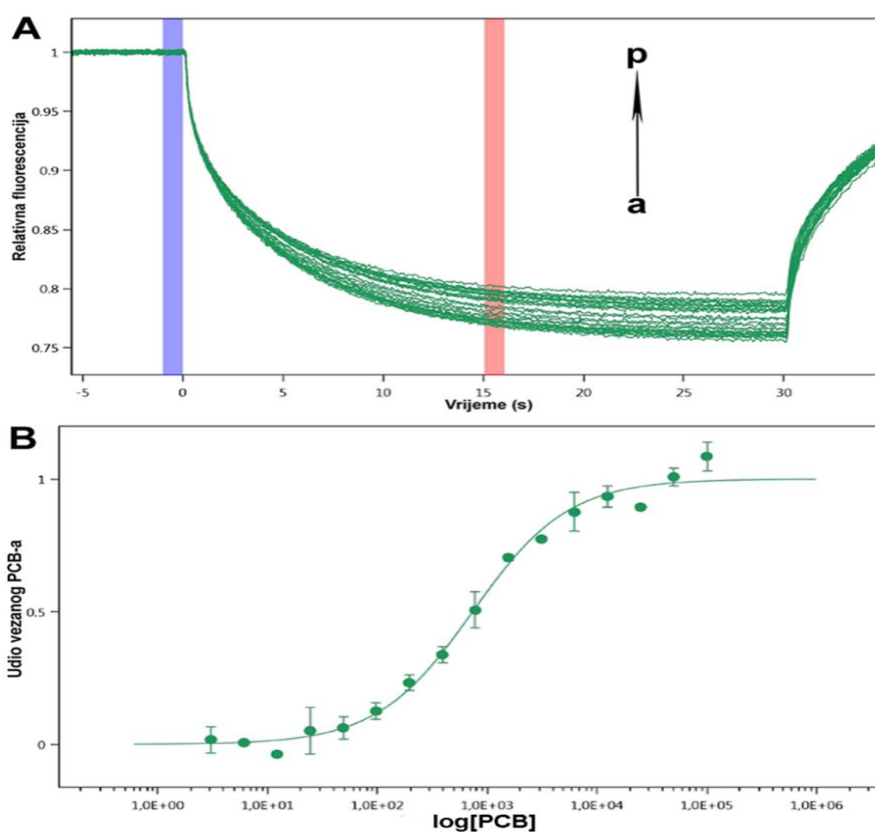
Slika 32. (A) Emisioni spektri (ekscitacija na 280 nm) BSA ($0,25 \mu\text{M}$) u prisustvu različitih koncentracija PCB-a (0, 0,05, 0,1, 0,15, 0,2, 0,25, 0,3, 0,35, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7 i $0,8 \mu\text{M}$, za krive od **a** do **m**, redom); (B) SV dijagrami za gašenje fluorescencije BSA po dodatku PCB-a. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija ($n=3$); Sinhroni fluorescentni spektri BSA ($0,25 \mu\text{M}$) sa (C) $\Delta\lambda=60 \text{ nm}$ (Trp) i sa (D) $\Delta\lambda=15 \text{ nm}$ (Tyr), u prisustvu rastuće koncentracije PCB-a ($0-0,8 \mu\text{M}$) za krive od **a** do **m**, redom. Za uslove rada vidjeti odeljak 3.4.4.

Slično kao i kod HSA-PCB sistema, razdvajanje triptofanske od tirozinske emisije kod BSA je postignuto snimanjem sinhronih spektara. Sa **slika 32C i 32D** je jasno uočljivo da vezivanje liganda indukuje veći stepen gašenja emisije koja potiče od triptofanskih ostataka, u poređenju sa opadanjem fluorescencije koja potiče od tirozinskih ostataka. U oba slučaja nije uočeno plavo pomjeranje emisionih maksimuma. Prema tome, plavi pomjeraj uočen u osnovnim fluorescentnim spektrima (**slika 32A**) nastaje usled preferencijalnog gašenja emisije koja potiče

od ostataka triptofana, pri čemu tirozinski ostaci daju veći relativni doprinos fluorescenciji proteina nakon vezivanja liganda.

4.3.2 PCB mjenja termoforetsku pokretljivost BSA

Afinitet PCB-a za BSA je dodatno određen pomoću termoforeze na mikrosali. Kao što se može vidjeti sa **slike 33A**, fluorescentno obilježeni protein se kreće od regiona sa višom temperaturom do spoljašnjeg, hladnijeg regiona, dok se ne dostigne ravnotežno stanje (do 30 sekundi). Dodatak PCB-a dovodi do smanjenja termoforetske mobilnosti proteina, a time i do povećanja normalizovane fluorescencije obilježenog proteina. Na osnovu krive vezivanja (**slika 33B**), izračunata konstanta disocijacije (K_d) iznosi 0,738 μM , tako da je konstanta vezivanja $1,4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ ($K_a = 1/ K_d$), vrijednost slična onoj dobijenoj u testu gašenja fluorescencije proteina.



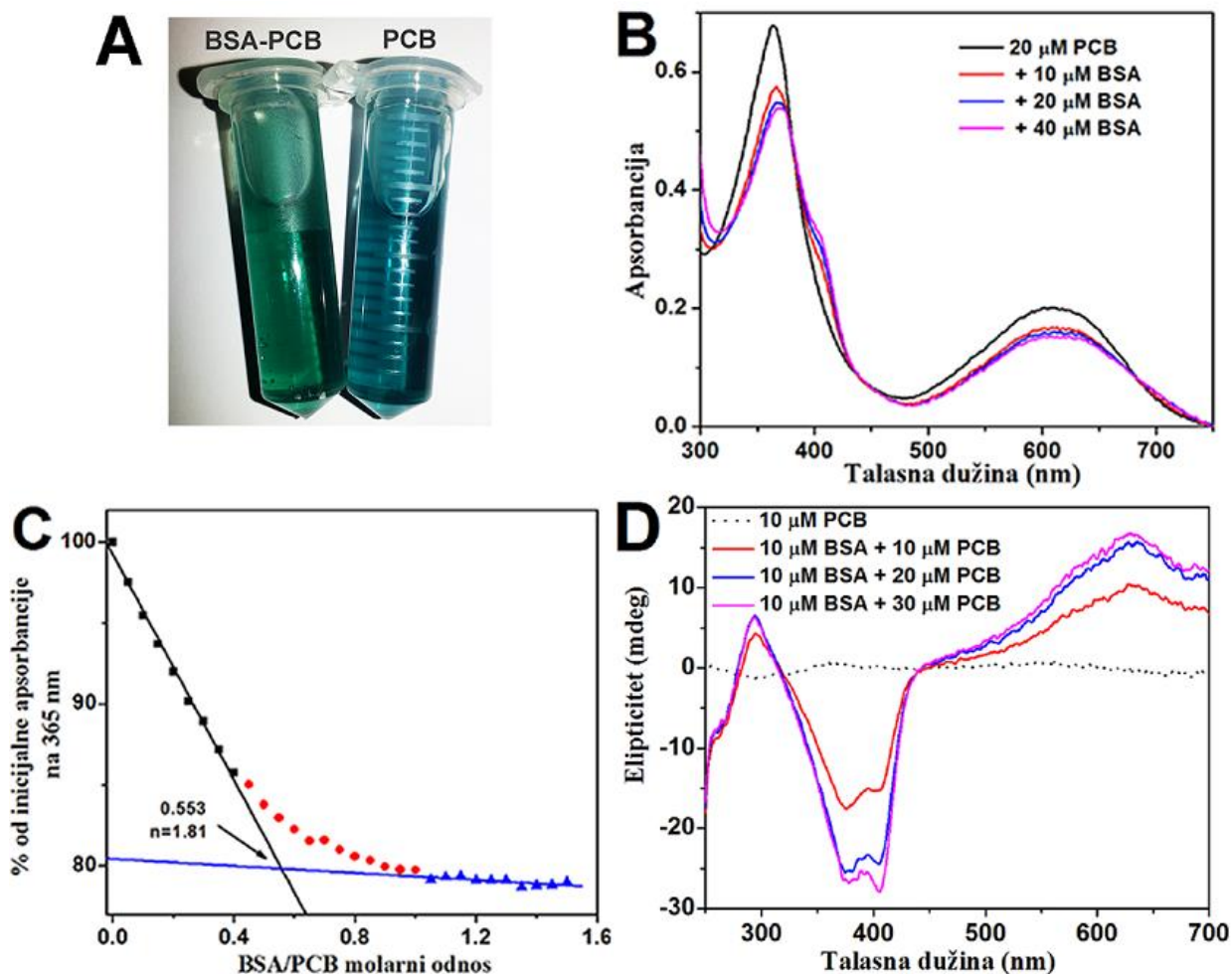
Slika 33. (A) Zavisnost relativne emisije fluorescentno obilježenog BSA (1,5 μM) od vremena u toku procesa termoforeze, za različite koncentracije PCB-a (od 3 to 10^5 nM, za krive od **a** do **p**, redom); (B) MST kriva vezivanja PCB-a za BSA. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija ($n=3$). Za uslove rada vidjeti odeljak 3.4.5.

4.3.3 Dodatak BSA mijenja apsorpcione i CD spektre PCB-a

Na primjeru formiranja HSA-PCB kompleksa je pokazano da su UV/VIS spektrofotometrija i CD spektroskopija pigmenta elegantne metode za detekciju vezivanja PCB-a za protein. Vezivanje PCB-a za BSA to dodatno potvrđuje. Štaviše, formiranje protein-ligand kompleksa je uočljivo i golim okom: slobodan PCB u Tris puferu na pH 7,2 ima plavu boju, dok dodatak (u ovom slučaju ekvimolarne količine) proteina dovodi do promjene boje liganda u zelenu (**slika 34A**). UV/VIS spektrofotometrija također pokazuje da BSA indukuje crvene pomjeraje u bliskim-UV i VIS spektrima liganda, od 364 do 369 nm i od 602 do 606 nm, redom (**slika 34B**). Može se uočiti i da dodatak BSA dovodi do smanjenja apsorpcije PCB-a u cijelokupnom spektru, sa izuzetkom pika ("ramena") koji se pojavljuje na 405 nm (**slika 34B**). Uzevši u obzir da hemijske vrste žute boje intenzivno apsorbuju upravo na 405 nm, pojava pika ("ramena") na 405 nm, kao i crveni pomjeraj VIS pika, su zaslužni za promjenu boje liganda iz plave u zelenu nakon dodatka proteina.

Određivanje broja vezivnih mjesta na osnovu smanjenja apsorpcije PCB-a na 365 nm, koja je primjenjena kod HSA-PCB sistema, iskorišćena je i za određivanje stehiometrije vezivanja PCB-a za BSA. I ovdje je nakon spektrofotometrijske titracije liganda proteinom, dobijen dvofazni profil (**slika 34C**). Pri nižim BSA/PCB odnosima, opadanje apsorpcije pigmenta ima linearnu zavisnost, dok se pri višim koncentracijama BSA dobija plato. Ove dvije prave se sijeku pri BSA/PCB odnosu 0,55, što daje 1,81 mol PCB-a po molu BSA, ukazujući na stehiometriju vezivanja od 2:1.

PCB ne pokazuje optičku aktivnost u Tris puferu na pH 7.2. Dodatkom BSA dolazi do pojave negativnog pika na 376 nm, dok se pozitivni pik javlja na 630 nm u bliskim-UV/VIS CD spektrima (**slika 34D**). Takođe, uočava se i pojava pika ("ramena") na 405 nm. Da se primjetiti da pri PCB:BSA molarnim odnosima većem od 2:1 nema značajnijeg povećanja signala, što potvrđuje stehiometriju vezivanja 2 (PCB) na prema 1 (BSA). Štaviše, povećanje koncentracije PCB-a u smješi dovodi do smanjenja odnosa između intenziteta elipticiteta na 376 i 405 nm, sugerisući da dva vezivna mjesta imaju različite hiro-optičke karakteristike (**slika 34D**).



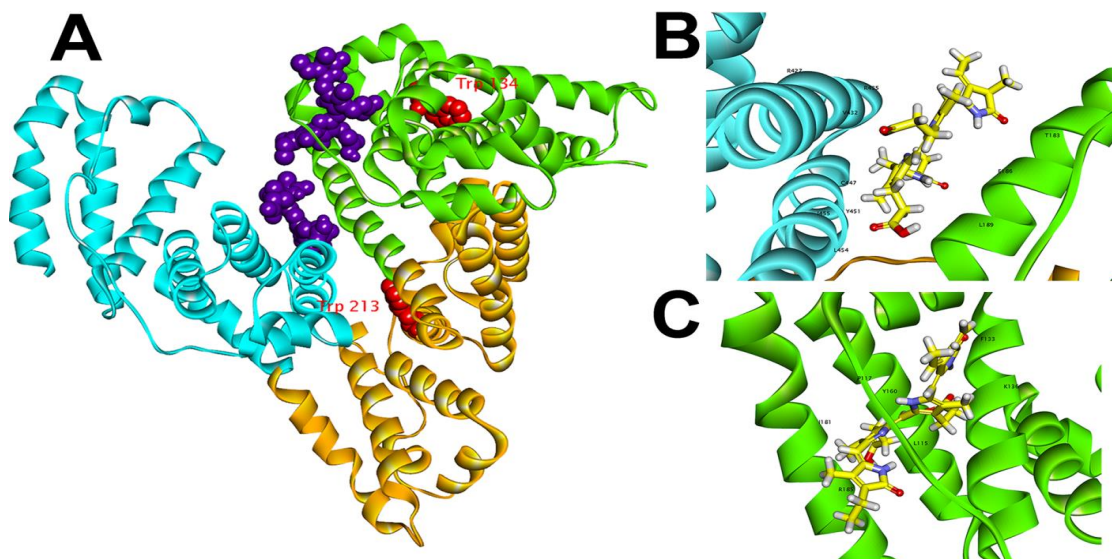
Slika 34. (A) Promjena boje rastvora PCB-a nakon dodatka BSA (150 μM oba); (B) Efekat dodatka BSA na UV/VIS apsorpcione spektre 20 μM PCB-a; (C) Određivanje stehiometrije vezivanja BSA-PCB kompleksa, praćenjem opadanja apsorpcije PCB-a na 365 nm. Broj vezivnih mjesta je određen na osnovu recipročne vrijednosti molarnog odnosa BSA/PCB na presjeku prave koja prolazi kroz početni dio krive (crna boja) sa pravom koja prolazi kroz plato (plava boja). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija ($n=3$). Za uslove rada vidjeti odeljak 3.4.6; (D) Bliski-UV/VIS CD spektri BSA-PCB kompleksa pri konstantnoj koncentraciji BSA i različitim koncentracijama PCB-a. Za uslove rada vidjeti odeljak 3.4.7.

4.3.4 Molekulski doking pokazuje dva vezivna mjesta za PCB na BSA-u

Molekulski doking je urađen u cilju predviđanja lokacije vezivnih mjesta PCB-a na BSA. Pronađena su dva visoko-afinitetna vezivna mjesta na proteinu (**slika 35A**). Prvo je smješteno između domena I i III (međudomenska šupljina; engl. cleft) sa skorom vezivanja od -9.7 kcal/mol (**slika 35B**). Nekoliko polarnih i naelektrisanih aminokiselinskih ostataka (Thr-183, Glu-186, Arg-427, Arg-435) su uključeni u formiranje sonih mostova/vodoničnih veza sa

propionskim, pirolskim i laktamskim grupama PCB-a, dok je Tyr-451 uključen u π - π steking interakcije. Ostaci uključeni u anjon/katjon- π elektrostatičke interakcije (Arg-435 i Glu-186) mogu omogućiti dodatnu stabilizaciju BSA-PCB kompleksa (**slike P24A i P25A**).

Drugo vezivno mjesto za PCB na BSA se nalazi u subdomenu IB, sa vezivnim skorom od -9.6 kcal/mol (**slika 35C**). Vodonične veze i soni mostovi se obrazuju između peptidne veze Leu-114 i laktamskog prstena, Lys-136 i laktamskog prstena, kao i Tyr-160 i propionske grupe PCB-a (**slike P24B i P25B**).



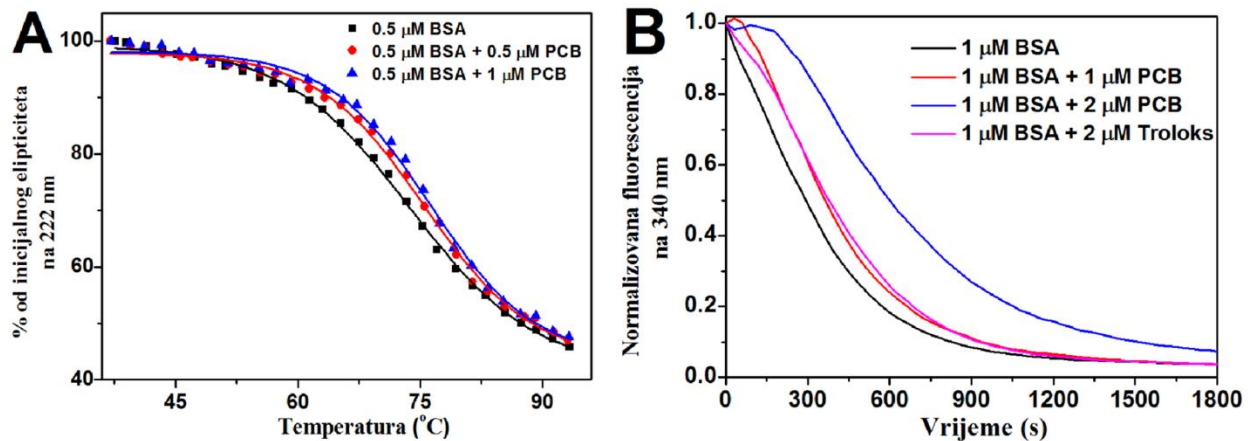
Slika 35. Molekulski doking BSA-PCB sistema. (A) Domeni u trakastom modelu molekula BSA (PDB kod 3v03) su označeni bojama na sledeći način: I, zeleni; II, narandžasti; III, tirkizno plavi. Vezani PCB i triptofanski ostaci su prikazani pomoću modela ispunjenih sfera u ljubičastoj i crvenoj boji, redom; Najbolji rezultati za udokovani PCB u međudomenskoj šupljini; (B) i subdomenu IB (C). Prikazana je sekundarna struktura proteina i aminokiselinski ostaci važni za interakcije sa ligandom su obilježeni. Ligand je prikazan kao štapićasti model.

4.3.5 Vezivanje PCB-a povećava temperaturnu stabilnost BSA

Uticaj PCB-a na temperaturnu stabilnost BSA je praćen mjerenjem smanjenja elipticiteta na 222 nm. Dobljene krive topljenja su prikazane na **slici 36A**. Iako BSA ima sličnu krivu topljenja kao oba BSA-PCB kompleksa (molarni odnos protein: ligand = 1:1 i 1:2), može se uočiti da PCB pokazuje inhibitorni efekat na denaturaciju proteina, posebno iznad 60°C. Dobljene T_m vrijednosti ukazuju na temperaturnu stabilizaciju BSA nakon vezivanja PCB-a: T_m vrijednost za BSA je iznosila 73,7°C, za BSA-PCB 1:1 molarni kompleks T_m je bila 75,7°C, dok je kod BSA-PCB 1:2 molarnog kompleksa T_m bila najviša, 76,2°C.

4.3.6 Formiranje BSA-PCB kompleksa vodi ka uzajamnoj zaštiti proteina i pigmenta od oksidacije indukovane slobodnim radikalima

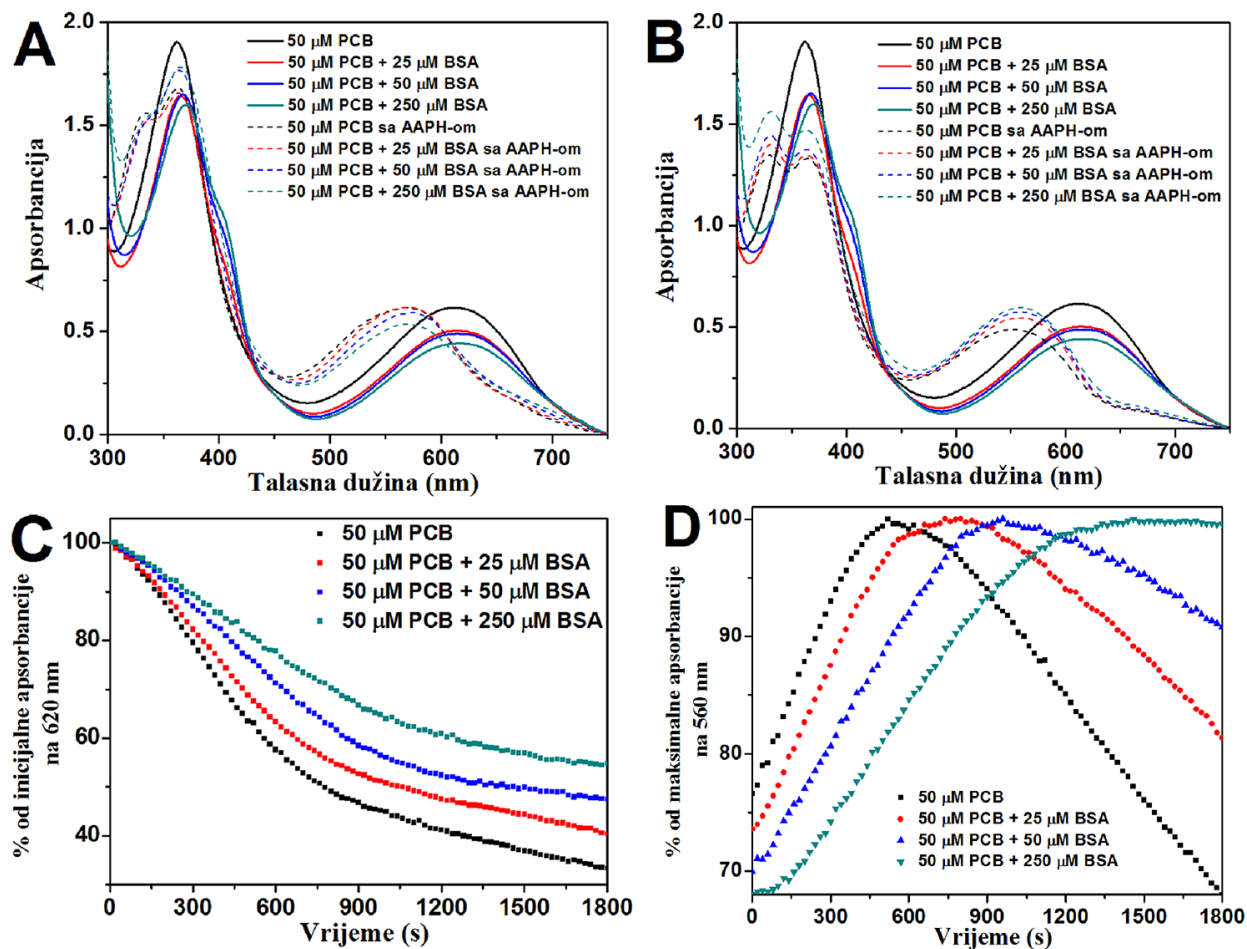
Oksidativne modifikacije BSA, indukovane generisanjem (prije svega) peroksid radikala, koristeći AAPH kao inicijator, su praćene mjerenjem sopstvene fluorescencije proteina u zavisnosti od vremena. Fluorescencija BSA eksponencijalno opada nakon dodatka AAPH (**slika 36B**). U prisustvu PCB-a ili standardnog antioksidanta Troloksa, opadanje fluorescencije proteina je sporije, i može se uočiti inicijalna, lag faza (**slika 36B**), što ukazuje na njihov zaštitni efekat od oksidacije proteina. Interesantno, PCB je pokazao veći zaštitni efekat od iste koncentracije Troloksa (**slika 36B**). U prisustvu 1 μM BSA, izračunata aktivnost 1 μM PCB-a iznosi 79,4 a.u., dok 2 μM PCB ima 4,2 puta veću aktivnost (330,8 a.u.), što sugerise da zavisnost aktivnosti od koncentracije hromofore nije proporcionalna.



Slika 36. Efekti formiranja BSA-PCB kompleksa na temperaturnu i oksidativnu stabilnost proteina. (A) Krive BSA u prisustvu i odsustvu PCB-a, dobijene mjerenjem elipticiteta na 222 nm. Za uslove rada vidjeti odeljak 3.5.1; (B) AAPH-indukovano opadanje sopstvene fluorescencije BSA (ekcitacija 280 nm) u prisustvu i odsustvu PCB-a i Troloksa. Za uslove rada vidjeti odeljak 3.5.4.

S druge strane, oksidacija PCB-a je takođe indukovana dodatkom AAPH-a, kako bi se procijenilo da li vezivanje za BSA može inhibirati ovaj proces. PCB kada je oksidovan pokazuje smanjenje apsorpcionih maksimuma na 620 i 360 nm, koje je praćeno plavim pomjeranjem sa pojavom novih pikova na 560 i 330 nm. Pri višim koncentracijama oksidanta (125 μM), ne uočavaju se dalje promjene apsorpcionih maksimuma, već pikovi na 560 i 330 nm skoro potpuno nestaju i PCB kompletno gubi boju (**Bhat & Madyastha, 2001**). Kao što se može vidjeti na slici **37A**, 10 minuta nakon dodatka AAPH, za razliku od slobodnog liganda, apsorpcioni maksimum BSA-PCB kompleksa na 560 nm ima veću vrijednost u odnosu na odgovarajući maksimum bez

dotatka AAPH na 620 nm. Nakon 30 minuta od početka oksidacije (**slika 37B**), u BSA-PCB kompleksu maksimum na 560 nm je očuvan, dok u slučaju nevezanog PCB-a dolazi do njegovog smanjenja, što ukazuje da BSA štiti vezani PCB od dalje oksidacije.



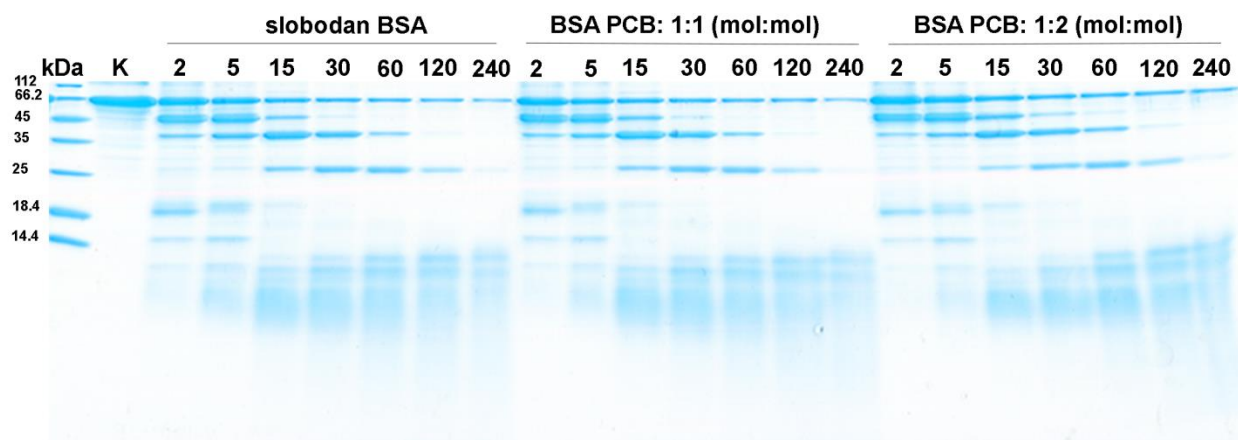
Slika 37. Efekti formiranja BSA-PCB kompleksa na stabilnost liganda. UV/VIS spektri PCB-a sa i bez BSA, prije (**A** i **B**, puna linija), 10 minuta (**A**, isprekidana linija) i 30 minuta (**B**, isprekidana linija) nakon dodatka AAPH-a (28 mM finalno); Praćenje oksidativne degradacije PCB-a, sa i bez dodatka BSA, izražena kao zavisnost procenta početne apsorbancije na 620 nm (**C**) i maksimalne apsorbancije na 560 nm (**D**) od vremena. Za uslove rada vidjeti odeljak 3.5.4.

Kako bi se dobio bolji uvid u zaštitni efekat BSA na PCB, praćen je procenat od inicijalne apsorbancije na 620 nm u toku vremena, nakon dodatka AAPH (**slika 37C**). Očigledno je da prisustvo BSA usporava opadanje apsorbancije na 620, ukazujući da prisustvo proteina odlaže oksidaciju pigmenta. Slika **37D** jasno pokazuje da se nakon dodatka AAPH u uzorku slobodnog PCB-a pik na 560 nm pojavljuje, dostiže maksimalan intezitet nakon 500 s, a zatim

dolazi do njegovog opadanja usled dalje oksidacije. Prisustvo BSA odlaže opadanje apsorbancije na 560 nm, koje u slučaju BSA:PCB molarnog odnosa 1:2 počinje tek nakon 750 s, a kada je taj odnos 1:1, početak opadanja apsorbancije je odložen na 950 s. Navedeni rezultati sugerišu da BSA i PCB štite jedan drugog od oksidacije indukovane djelovanjem slobodnih radikala.

4.3.7 Vezivanje PCB-a dovodi do diskretnih promjena u digestivnoj stabilnosti BSA

Digestivna stabilnost BSA u prisustvu i odsustvu PCB-a je ispitana pomoću SDS-PAGE, nakon tretmana pepsinom u SGF uslovima. BSA i BSA-PCB kompleks u molarnom odnosu 1:1 imaju slične obrasce digestije (**slika 38**), i, prema tome, veoma slične krive degradacije proteina nakon kvantifikovanja trake BSA na 66,2 kDa (**slika P27**). BSA-PCB kompleks pri molarnom odnosu 1:2 ima nešto drugačiji obrazac digestije u poređenju sa slobodnim proteinom. Naime, razmazi na gelu, koji predstavljaju peptide ispod 14,4 kDa, mogu biti uočeni kod slobodnog BSA već nakon 2 minuta od početka digestije, dok je kod BSA-PCB kompleksa sa molarnim odnosom 1:2 pojava razmaza odložena na 5 min. Samim tim, opadanje intenziteta trake na 66,2 kDa je inhibirano u poređenju sa uzorcima BSA i BSA-PCB kompleksa sa molarnim odnosom 1:1 (**slike 38 i P27**). Pored toga, veliki fragment na 45 kDa je manje sklon pepsinskoj digestiji u uzorcima koji sadrže BSA i PCB u molarnom odnosu 1:2 (**slika 38**). Može se zaključiti da PCB pri vezivanju za oba vezujuća mjesta dovodi do blage stabilizacije proteina od pepsinske digestije.

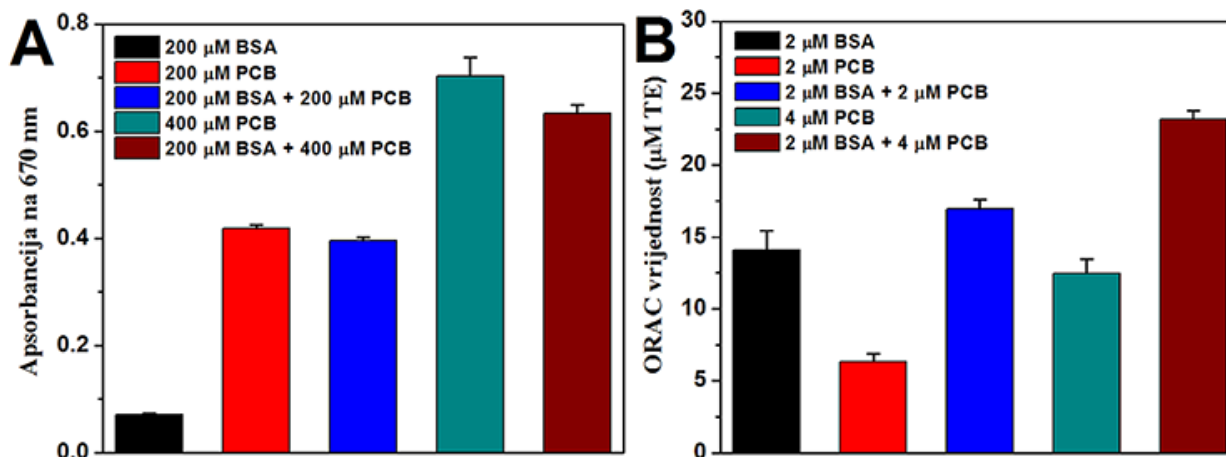


Slika 38. SDS-PAGE elektroforegram (redukujući uslovi, 16% PAA) dobijen nakon pepsinske digestije 30 μ M BSA u prisustvu i odsustvu 30 i 60 μ M PCB-a. Linija K označava kontrolu nultog vremena. Linije 2, 5, 15, 30, 60, 120 i 240 predstavljaju vrijeme digestije u minutima. Date su (skroz lijevo) i pozicije proteinskih markera na gelu. Za uslove rada vidjeti odeljak 3.5.3.

4.3.9 Formiranje kompleksa BSA-PCB maskira antioksidativnu aktivnost BSA i PCB-a

Rezultati ispitivanja ukupne redukujuće moći pokazuju da je BSA pokazao značajno manju aktivnost u poređenju sa ekvivalentnom koncentracijom PCB-a, dok BSA-PCB kompleksi imaju manju redukujuću moć nego zbir redukujućih moći slobodnog PCB i BSA (slika 39A), što ukazuje da formiranje kompleksa dovodi do maskiranja njihovih antioksidativnih aktivnosti. U ovom testu, izračunate ME vrijednosti za BSA-PCB komplekse za molarne odnose 1:1 i 1:2 su bile 19% i 18%, redom.

Suprotno testu redukujuće moći, BSA ima veću aktivnost od PCB-a u ORAC eseju. S druge strane, slično testu redukujuće moći, zbir aktivnosti slobodnog BSA i slobodnog PCB-a je veći od aktivnosti BSA-PCB kompleksa (slika 39B). Prema tome, i u ORAC testu je uočen efekat maskiranja antioksidativne aktivnosti usled formiranja kompleksa. Izračunate ME vrijednosti za BSA-PCB komplekse sa molarnim odnosima 1:1 i 1:2 su bile 17% i 13%, redom.



Slika 39. Efekti formiranja BSA-PCB kompleksa na antioksidativnu aktivnost PCB-a. (A) Redukujuća moć BSA, PCB-a i BSA-PCB kompleksa. Za uslove rada vidjeti odeljak 3.6.1; (B) ORAC vrijednosti BSA, PCB-a i BSA-PCB kompleksa. Za uslove rada vidjeti odeljak 3.6.2; Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (n=3).

5. Diskusija

5.1 Pepsinska digestija C-fikocijanina oslobađa biološki aktivne hromopeptide

C-fikocijanin, plavi fluorescentni fikobilinoprotein cijanobakterija, privlači sve veću pažnju naučne javnosti, prije svega zbog svoje izražene (*in vitro*) antioksidativne, antiinflamatorne, imunomodulatorne i antikancerogene aktivnosti. Međutim, njegova *in vivo* djelotvornost nakon oralnog unosa nije detaljno proučena. Takođe, u literaturi nema podataka o njegovoj digestibilnosti i usvojivosti (biodostupnosti) u GIT-u. Stoga smo, u okviru ove doktorske disertacije, najprije ispitali *in vitro* digestibilnost C-PC-a, korišćenjem statičkog biohemijskog modela, naročito korisnog za proučavanje procesa digestije u želucu.

U ovoj *in vitro* studiji ispitana je digestibilnost C-fikocijanina pepsinom u uslovima koji simuliraju želudačnu tečnost. Rezultati SDS-PAGE su pokazali da se C-PC brzo i lako digestuje do fragmenata malih molekularnih masa (već nakon 0,5 minuta) koji postepeno iščezavaju sa povećanjem vremena digestije. Ovo ukazuje da je C-PC veoma podložan pepsinskoj digestiji pod primjenjenim uslovima, pri čemu je dobijeni rezultat u saglasnosti sa činjenicom da je C-PC nestabilan ispod pH 4, odnosno da nakon razvijanja na kiselim pH vrijednostima protein postaje potpuno dostupan enzimu (Yan, et al., 2010).

Nakon pepsinske digestije izolovani su hromopeptidi HPLC metodom. HPLC hromatogram je pokazao prisustvo pet intezivnih pikova (frakcija) koji su poticali od hromopeptida. U cilju ispitivanja čistoće dobijenih frakcija urađena je njihova rehromatografija, koja je pokazala da izolovani hromopeptidi imaju visok stepen čistoće.

Na osnovu MS, MS2 i MS3 spektara hromopeptidnih frakcija i izolovane hromofore, manuelnim *de novo* pristupom su određene aminokiselinske sekvence hromopeptida. Identifikovano je ukupno šest hromopeptida iz pepsinskog digesta C-PC-a (frakcija II je sadržala dva hromopeptida), koji su varirali u veličini od 2 do 13 aminokiselinskih ostataka. U frakciji IV identifikovana su dva dodatna hromopeptida koja potiču od tragova alofikocijanina, proteina sa sličnom sekvencom i istom hromoforom kao C-PC (Brejc, et al., 1995). Hromopeptid iz najzastupljenije frakcije I potiče od α subjedinice C-PC-a, dok ostali peptidi nastaju digestijom β subjedinice C-PC-a, ili α subjedinice alofikocijanina. Ovi rezultati su u saglasnosti sa elektroforetskom analizom digesta, potvrđujući da pepsin efikasno siječe C-PC na veoma male

(hromo)peptide. Mala veličina hromopeptida je rezultat široke specifičnosti pepsina, i, prema tome, postoje brojna mjesta u sekvenci C-PC-a koja su podložna raskidanju peptidne veze. Kod β subjediniice pepsin katalizuje raskidanje peptidne veze nakon Met-79, Ala-81 i Leu-83, pri čemu se dobijaju kratki hromopeptidi (AACLRD, CLRD, AACL i CL). Suprotno ovome, u α subjediniici na homolognim pozicijama pepsin ne djeluje, zato što rijetko katalizuje raskidanje peptidne veze kada je lizin u P1 poziciji (Lys-81 i Lys-83) i P3 poziciji (sa Ala-85 u P1) (**Hamuro, Coales, Molnar, Tuske, & Morrow, 2008**), što ima za posledicu nastajanje jednog dužeg hromopeptida sa sekvencom AADQRGKDKCARD. Uopšteno gledano, bioaktivni peptidi obično sadrže između 3 i 20 aminokiselinskih ostataka (**Kim & Wijesekara, 2010**). Prema tome, mala veličina dobijenih hromopeptida sugerise njihovu potencijalnu bioaktivnost.

Antioksidativna aktivnost peptida dobijenih enzimskom digestijom dobija sve više pažnje istraživača poslednjih godina (**Samaranayaka & Li-Chan, 2011; Stocker, McDonagh, Glazer, & Ames, 1990**). S druge strane, odlično je poznato da PCB, kao i ostali tetrapiroli, ispoljava potentni antioksidativni kapacitet (**Benedetti, Benvenuti, Scoglio, & Canestrari, 2010; Stocker, et al., 1990**). Ipak, postoji malo literaturnih podataka o antioksidativnoj aktivnosti peptida sa kovalentno vezanim tetrapirolnim hromoforama. Shodno tome, u cilju procijene antioksidativne aktivnosti hromopeptida, urađena su tri *in vitro* eksperimenta.

ORAC test je pokazao da hromopeptidi i PCB imaju značajno veću aktivnost od Troloksa, standardnog antioksidansa i u vodi rastvornog analoga vitamin E. Ipak, zbog prisustva drugih peptida i samog pepsina, cijelokupni digest pokazuje oko 2,5 puta veću ORAC vrijednost u poređenju sa hromopeptidima i samom hromoforom. U prosjeku, hromopeptidi doprinose ukupnoj masi digesta (svi peptidi iz C-PC-a i pepsin) sa 3,5%, dok je taj doprinos u ORAC vrijednostima oko 40%. Prema tome, hromofora je uglavnom zaslužna za aktivnost "hvatanja" slobodnih radikala od strane digestovanog C-PC-a. Tyr, Trp, Cys, Met i His su najpotentniji aminokiselinski ostaci u proteinu u smislu "hvatanja" slobodnih radikala u ORAC testu, što se može pripisati njihovoj sposobnosti doniranja elektrona ili atoma vodonika (**Zheng, Zhao, Dong, Su, & Zhao, 2016**). Identifikovani hromopeptidi ne sadrže pomenuti aminokiselinske ostatke (osim cisteina, čija je sulfhidrilna grupa uključena u formiranje tioetarske veze sa PCB-om) i njihova antioksidativna aktivnost gotovo potpuno potiče od hromofore. U cijelokupnom digestu, osim hromofore, šesnaest Tyr, jedan Trp, tri Cys (sa slobodnom sulfhidrilnom grupom),

jedan His i deset Met ostataka doprinose antioksidativnoj aktivnosti u ORAC eseju digesta, tako da se ukupno dobija veća ORAC vrijednost digesta u poređenju sa hromopeptidnim frakcijama.

Slično ORAC testu, hromopeptidi pokazuju značajnu i dozno zavisnu aktivnost u testu ukupne redukujuće moći, koja je veća od one Troloksa. PCB takođe pokazuje značajnu redukujuću moć, dok aktivnost cijelokupnog C-PC digesta (3,2 TE) odgovara prosječnoj aktivnosti svih hromopeptidnih frakcija (3,2 TE). Prema tome, može se reći da i u ovom eseju redukujući kapacitet uglavnom potiče od hromofore. Od svih aminokiselinskih ostataka, samo Cys pokazuje značajnu redukujuću moć (**Zheng, Zhao, Dong, Su, & Zhao, 2016**). Nasuprot ORAC eseju, u cijelokupnom digestu samo tri Cys ostatka i hromofora doprinose redukujućoj moći, što za posledicu ima sličnu TE vrijednost u poređenju sa hromopeptidnim frakcijama. Dobro je poznato da tetrapiroli, uključujući PCB, pokazuju potentnu antioksidativnu aktivnost *in vitro* (**Benedetti, Benvenuti, Scoglio, & Canestrari, 2010; Stocker, et al., 1990**). Međutim, nema literaturnih podataka o antioksidativnoj aktivnosti peptida sa kovalentno vezanim tetrapirolnim hromoforama. U poređenju sa ostalim peptidima manje molekulske mase koji su dobijeni pepsinskom digestijom proteina hrane, hromopeptidi iz C-PC-a pokazuju značajno veće ORAC vrijednosti (**Chen & Li, 2012; Davalos, Miguel, Bartolome, & Lopez-Fandino, 2004; Hernandez-Ledesma, Davalos, Bartolome, & Amigo, 2005; Pérez-Vega, Olivera-Castillo, Gómez-Ruiz, & Hernández-Ledesma, 2013; Tsopmo, Romanowski, Banda, Lavoie, Jossen, & Friel, 2011; You, Udenigwe, Aluko, & Wu, 2010**), kao i kapacitet redukujuće moći (**Carrasco-Castilla, Hernandez-Alvarez, Jimenez-Martinez, Jacinto-Hernandez, Alaiz, Giron-Calle, et al., 2012; Kou, Gao, Xue, Zhang, Wang, & Wang, 2013; Memarpoor-Yazdi, Mahaki, & Zare-Zardini, 2013**).

Heliranje bakra može spriječiti *in vivo* oksidativna oštećenja, kao što je LDL oksidacija (**Burkitt, 2001; Megias, Pedroche, Yust, Giron-Calle, Alaiz, Millan, et al., 2007**). S druge strane, peptidi koj vezuju bakar, dobijeni nakon gastro-intestinalne digestije, mogu olakšati apsorpciju bakra (**Megías, Pedroche, Yust, Girón-Calle, Alaiz, Millán, et al., 2008**). Fluorescentne osobine tetrapiroalne hromofore su iskorišćene za praćenje vezivanja redoks aktivnih metalnih jona, kako za hromopeptide, tako i za PCB i C-PC. Za razliku od $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ jona, Cu^{2+} joni su efikasno gasili fluorescenciju hromopeptida. Izračunate konstante vezivanja su bile u opsegu od $0,5\text{-}1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$. Dobijene konstante su umjereno veće u odnosu na N-terminalne

peptide priona koji specifično vezuju Cu^{2+} jone (**Hornshaw, McDermott, Candy, & Lakey, 1995**). Međutim, konstante vezivanja Cu^{2+} jona za C-PC su manje u poređenju sa hromopeptidima i PCB-om, što ukazuje da je hromofora glavni kontributor za vezivanje Cu^{2+} jona. Veći afinitet Cu^{2+} jona za PCB nego za C-PC može biti objašnjen činjenicom da PCB u nativnom proteinu zauzima izduženu konformaciju, dok se denaturacijom (u ovom slučaju digestijom) konformacija mijenja u ciklično-helikoidalnu koja je sklonija vezivanju Cu^{2+} jona (**Suresh, et al., 2009**). Nemogućnost Fe^{2+} i Fe^{3+} jona da gase fluorescenciju hromopeptida i PCB-a, sugerira da hromopeptidi selektivno heliraju Cu^{2+} jone. Shodno tome, hromopeptidi dobijeni digestijom C-PC-a mogu biti korisni u prevenciji pro-oksidativnih efekata bakra, ali i u povećanju njegove biodostupnosti u GIT-u. Uzevši u obzir da je bakar uključen u promovisanje angiogeneze (**Xie & Kang, 2009**), i da C-PC ispoljava *in vivo* antikancerogene efekte inhibiranjem istog procesa (**Saini & Sanyal, 2014**), sposobnost tetrapirrolne hromofore da veže jone bakra implicira jedan od mehanizma antikancerogenog dejstva C-PC-a *in vivo*. Povišena koncentracija bakra u kancerskim tkivima, kao i obećavajući rezultati studija o antikancerogenim aktivnostima helatora bakra, ukazuju da i sami hromopeptidi mogu ispoljiti antikancerogene aktivnosti u *in vivo* uslovima (**Santini, Pellei, Gandin, Porchia, Tisato, & Marzano, 2014**).

Citotoksičnost hromopeptida je ispitana na Caco-2 i HeLa kancerskim ćelijskim linijama, pri čemu je ona pri koncentracijama od 90 μM bila značajna za sve hromopeptidne frakcije u slučaju Caco-2 ćelija, dok su samo frakcije II, III i V bile značajno citotoksične na HeLa ćelijama pri istim koncentracijama. Dobijeni rezultati su uporedivi sa citotoksičnošću PCB-a na kancerskim ćelijskim linijama pankreasa, gdje je korišćena slična koncentracija i isto vrijeme inkubacije (24 sata) (**Konickova, et al., 2014**). Uzevši u obzir da dnevna doza oralno unijete Spiruline može ići i do 30 g (**Sotiroudis & Sotiroudis, 2013**), kao i da zastupljenost fikocijanina varira između 15% i 25% u suvoj masi Spiruline, pomenute koncentracije hromopeptida u krvi mogu biti dostignute. Štaviše, koncentracija hromopeptida u GIT-u može biti i veća, što sugerira da kancerske ćelije u GIT-u mogu biti podvrgnute ćelijskoj smrti djelovanjem hromopeptida dobijenih proteolizom C-PC-a gastro-intestinalnim proteazama. U literaturi postoji velika raznolikost doza C-PC-a potrebnih za indukovanje ćelijske smrti, zavisno od tipa kancerskih ćelijskih linija koje su korišćene za procijenjivanje citotoksičnosti (**Li, Gao, Zhang, & Chu, 2006; Roy, Arunasree, Reddy, Dheeraj, Reddy, & Reddanna, 2007**). C-PC je pokazao

značajnu inhibiciju rasta HeLa ćelija u značajno nižim koncentracijama (Li, et al., 2006) u poređenju sa koncentracijama hromopeptida koje su bile potrebne za indukovanje ćelijske smrti u našoj studiji, što ukazuje da je i apo-proteinski dio C-PC-a važan za antikancersku aktivnost proteina. S druge strane, peptidi niskih molekulskih masa, dobijeni iz raznih izvora hrane, pokazuju značajnu citotoksičnu aktivnost pri različitim koncentracijama, od nekoliko μM (Hsu, Li-Chan, & Jao, 2011), do nekoliko mM (You, Zhao, Liu, & Regenstein, 2011), što ukazuje da izolovani hromopeptidi imaju umjerenu citotoksičnu aktivnost u poređenju sa drugim bioaktivnim peptidima niskih molekulskih masa, dobijenih enzimskom hidrolizom proteina hrane. Interesantno, postoji dobra korelacija između citotoksične aktivnosti hromopeptida na Caco-2 ćelijama i ORAC vrijednosti, redukujuće moći i helirajuće aktivnosti jona bakra. Shodno tome, može se reći da hromopeptidi sa višom antioksidativnom aktivnošću imaju i izraženiji citotoksični efekat. Ovo sugeriše da hromopeptidi smanjuju vijabilnost ćelija tako što narušavaju ravnotežu sadržaja slobodnih radikala koja je specifična za kancerske ćelije. Suprotno normalnim ćelijama, mnogi tipovi kancerskih ćelija proizvode veće količine reaktivnih vrsta: antikancerska aktivnost PCB-a na kancerskim ćelijskim linijama pankreasa se zasniva na njegovoj sposobnosti da inhibira proizvodnju slobodnih radikala u mitohondrijama, kao i poboljšanju redoks stanja glutaciona (Konickova, et al., 2014).

5.2 Fikocijanobilin se visokim afinitetom vezuje za HSA i kompetira sa bilirubinom za vezivanje na proteinu. Formiranje protein-liganda kompleksa čini strukturu HSA stabilnijom.

U ovoj studiji, korišćenjem teorijskog i eksperimentalnog pristupa, okarakterisano je vezivanje PCB-a za HSA. Pokazano je visoko-afinitetno vezivanje liganda za protein sa stehiometrijom vezivanja 2:1. Eksperimenti zasnovani na kompeticiji, kako sa markerima koji se specifično vezuju za odgovarajuća mjesta na HSA, tako i sa bilirubinom, kao i studija molekuskog dokinga, su pokazali vezivanje PCB-a za subdomene IB i IIA molekula HSA. Na kraju, pokazano je da PCB, vezan za glavni transportni protein plazme, dovodi do stabilizacije njegove strukture i doprinosi njegovoj zaštiti od proteolitičke degradacije.

Postoji dosta kontroverzi u literaturi oko jonizacionog stanja bilirubina u fiziološkim uslovima (Mukerjee & Ostrow, 2010). Nema sličnih eksperimentalnih i teorijskih podataka za PCB, ali uzevši u obzir značajne razlike u konformaciji između PCB-a i bilirubina u vodenim

rastvorima, može se očekivati da pK_a vrijednosti PCB-a neće biti slične onima za bilirubin. Naši rezultati su potvrdili visoke pK_a vrijednosti za bilirubin ($pK_{a1}=8.1$ i $pK_{a2}=8.4$), koje su nedavno određene u drugoj studiji (**Mukerjee & Ostrow, 2010**). Jasno je da konformacija žlebnjaka koju zauzima bilirubin predstavlja prepreku za jonizaciju njegovih karboksilnih grupa. Nasuprot bilirubinu, PCB je najstabilniji u helikoidalnoj konformaciji, što omogućava lakše jonizovanje prve karboksilne grupe. Naši proračuni su pokazali da je pK_{a1} PCB-a (2,4) dosta niža od one bilirubina. S druge strane, formiranje vodoničnih veza između jonizovane i protonovane grupe (**slika 20**) otežava jonizaciju druge karboksilne grupe i njena vrijednost je 9,6. Prema tome, u vodenim rastvorima na fiziološkim pH vrijednostima (7,2-7,4), PCB zauzima najkompaktniju i najstabilniju konformaciju kada je u monoanjonskoj formi, u kojoj jedan vodonikov atom premoštava dvije karboksilne grupe (**slika 20**).

Studija dokinga je predvidjela dva potentna mjesta vezivanja PCB-a (u subdomenima IB i IIA) za HSA, koja se poklapaju sa mjestima koja su prethodno opisana za bilirubin. Vezivne energije PCB-a za subdomene IB i IIA su gotovo identične, dok bilirubin ima malo veće vezivne energije od PCB-a za pomenuta vezivna mjesta. Vezivno mjesto IB ima oblik latiničnog slova L, pri čemu je PCB u njemu vezan kao *M* konformer. Za ovo mjesto se vezuje i 4Z,15E bilirubin IX α izomer, što je utvrđeno kristalografskom analizom, pri čemu postoji značajna sličnost u aminokiselinskim ostacima koji učestvuju u vezivanju pomenutog izomera bilirubina i PCB-a (**Zunszain, et al., 2008**). Slično prvom vezivnom mjestu, i drugo vezivno mjesto je L oblika, pri čemu je PCB takođe vezan kao *M* konformer. Opisani rezultati dokinga PCB-a za subdomen IIA potpuno odgovaraju predviđenoj strukturi vezivnog mjesta za bilirubin za ovaj subdomen na molekulu HSA (**Goncharova, et al., 2013**).

Kao što je već spomenuto (poglavlje 2.4), masne kiseline utiču na vezivanje drugih liganada, kako prostom kompeticijom, tako i alosternom regulacijom. U ovoj studiji je pokazano da FA1 vezivno mjesto za miristinску kiselinu i predviđeno vezivno mjesto za PCB (IB) dijele uglavnom iste aminokiselinske ostatke koji ovičavaju šupljinu subdomena IB (PDB kod 1BJ5) (**Curry, et al., 1998**). Prisustvo miristinške kiseline u FA1 vezivnom mjestu sprječava vezivanje PCB-a za mjesto IB, dok njeno prisustvo u ostalim FA vezivnim mjestima ne utiče na vezivanje PCB-a. IB vezivno mjesto nije dovoljno veliko da istovremeno smjesti PCB i miristinску kiselinu, što dovodi do istiskivanja liganda ka međudomenskoj šupljini proteina. Vezivanje

ostalnih liganda (kao što su hemin, 4Z,15E bilirubin IX α , fusidinska kiselina), koji zauzimaju IB mjesto, spriječava vezivanje PCB-a. S druge strane, iako je vezivna enegrija i pozicija PCB-a u IIA vezivnom mjestu donekle izmjenjena prisustvom miristinske kiseline u FA7 mjestu (subdomen IIA), simulacija dokinga predviđa da je ovo najvjerojatnije mjesto vezivanja PCB-a. Međutim, za najveći broj struktura, postojanje liganda u IIA vezivnom mjestu, uključujući *R* i *S* varfarin, spriječava doking PCB-a. U slučaju nekih liganada (azapropazon, indometakin ili lizofosfatidiletanolamin), postoji dovoljno prostora da se smjesti i PCB, i, prema tome, vezivanje liganda nije spriječeno. Posebno su interesantni rezultati dokinga PCB-a za kristalnu strukturu HSA sa dva liganda (indometakin i azapropazon), gdje je PCB udokovan u istu šupljinu u kojoj se nalaze pomenuti ligandi, što potvrđuje koliko je veliko i prilagodljivo vezivno mjesto IIA na HSA-u (**Petersen, et al., 2000**)

Dobro je poznato da vezivanje različitih liganada dovodi do konformacionih promjena u HSA. Ispitan je i uticaj različitih HSA konformacija na vezivanje PCB-a, korišćenjem 16 kristalnih struktura HSA. Dva predložena vezivna mjesta PCB-a (IB i IIA) su najvjerojatnija bez obzira na konformaciju proteina, mada procijenjene vezivne energije zavise i od konformacije proteina i pozicije aminokiselinskih bočnih lanaca.

Intenzivno gašenje sopstvene fluorescencije HSA usled dodatka PCB-a ukazuje na visok afinitet vezivanja liganda za protein. Dobijena konstanta vezivanja od $2,2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ (na 25°C), je među većima u poređenju sa ostalim egzogenim ligandima (**Varshney, Sen, Ahmad, Rehan, Subbarao, & Khan, 2010**), i uporediva je sa bilirubinom ($5,0 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ na 25°C) (**Lamola, Eisinger, Blumberg, Patel, & Flores, 1979**), pod uslovom da se koristi ista metoda za određivanje afiniteta vezivanja.

Za razliku od intenziteta gašenja fluorescencije proteina, koji ukazuje na afinitet vezivanja liganda, pomjeraji emisionog maksimuma mogu da ukažu na promjenu okruženja proteinskih fluorofora. Plavi pomjeraj emisionog maksimuma HSA, usled titrovanja PCB-om, ukazuje da su fluorofore u proteinu smještene u hidrofobnijem okruženju nakon dodatka pigmenta (**Chi & Liu, 2011**), ali se može i objasniti time što se uglavnom gasi fluorescencija Trp-214 ostatka od strane PCB-a, tako da samo tirozinski ostaci doprinose fluorescenciji HSA-PCB kompleksa. Štaviše, sinhrona fluorescentna spektroskopija ukazuje da se polarnost u blizini Trp-214 ostatka smanjila, dok se mikrokruženje tirozinskih ostataka nije značajno promjenilo

tokom procesa vezivanja. Takođe, veće konstante gašenja Trp-214 ostatka od ostataka tirozina, dobijene na osnovu sinhronih spektara, ukazuju da smanjenje fluorescencije proteina nakon vezivanja PCB-a uglavnom potiče od gašenja Trp-214 emisije (**Zhang, et al., 2013**). Prema tome, PCB efikasno gasi fluorescenciju koja potiče od ostatka Trp-214 i ovaj se ostatak nalazi u hidrofobnijem okruženju nakon vezivanja PCB-a. Ovaj efekat prevashodno potiče od π -steking interakcija između Trp-214 ostatka i PCB-a, kao što je objašnjeno u studiji dokinga.

Velika negativna promjena entalpije i mnogo manja, ali takođe negativna promjena entropije prilikom vezivanja PCB-a za HSA, sugerišu da je formiranje kompleksa entalpijski vođeno, dok vodonične veze imaju značajan doprinos u vezivanju (**Ross & Subramanian, 1981**). Sličan tip vezivanja je prethodno pokazan za bilirubin-HSA sistem, pri čemu dolazi i do smanjenja vezivne konstante sa povećanjem koncentracije soli, što ukazuje da su vodonične veze i elektrostatičke interakcije glavni faktor u vezivanju bilirubina za primarno mjesto na proteinu (**Jacobsen, 1977**). Brojne vodonične veze predviđene studijom molekuskog dokinga u oba vezivna mjesta identifikovana u ovoj studiji, su u saglasnosti sa eksperimentalno određenim termodinamičkim parametrima.

U vodenim rastvorima PCB zauzima monoanjonsku helikoidalnu konformaciju, pri čemu je prva karboksilna grupa jonizovana. Rotacija oko egzocikličnih jednostrukih veza metinskih prstenova, kao i jonizaciono stanje ostataka propionske kiseline u PCB-u, produkuju različite konformere sa spektroskopski različitim karakteristikama (**Goller, Strehlow, & Hermann, 2001**), što je iskorišćeno u ovom radu za analizu konformacije liganda vezanog za HSA. PCB ima značajnu konformacionu fleksibilnost, ali je ciklična SSS konformacija najstabilnija (**Tu, et al., 2009**). Vezivanje PCB-a za HSA dovodi do konformacionih promjena u apsorpcionom spektru liganda, sa plavim pomjerajem i povećanjem intenziteta VIS pika, kao i sa crvenim pomjerajem i opadanjem intenziteta UV pika. Ovo ukazuje da PCB vezan za HSA ima drugačiju, malo izduženiju konformaciju u poređenju sa njegovom slobodnom formom, što je u saglasnosti za teorijskim proračunima za protonovane izdužene PCB konformere (**Goller, et al., 2005**). Štaviše, hromofora u nativnom C-PC-u ima izduženu konformaciju i intezivnu apsorbciju u vidljivom regionu, dok denaturacijom proteina hromofora mjenja konformaciju u cikličnu, sa opadanjem apsorbcije u ovom dijelu spektra (**Scheer & Kufer, 1977**). Prema tome, navedena zapažanja, odnosno analogija sa C-PC-om, dodatno ukazuju na promjenu konformacije PCB-a

nakon vezivanja za HSA. Crveni pomjeraj sa opadanjem intenziteta pika bilirubina na 440 nm je uočen i nakon vezivanja bilirubina za HSA (**Lou & Birdi, 1973**).

UV/VIS spektrofotometrijska titracija je jasno pokazala da je stehiometrija vezivanja PCB za HSA 2:1, što je u saglasnosti sa studijom molekuskog dokinga.

Osim UV/VIS apsorpcionih spektara, PCB ima karakteristične i CD i fluorescentne spektre. Poznato je da vezivanje bilirubina za HSA dovodi do značajnog povećanja fluorescencije bilirubina (koja je zanemarljivo mala kada je bilirubin slobodan), pri čemu dolazi do crvenog pomjeraja emisionog maksimuma (**Hrkal & Klementova, 1984; Khan, Muzammil, & Tayyab, 2000**). Do slične pojave dolazi i kod HSA-PCB sistema, gdje intezivno povećanje fluorescencije PCB-a, kao i crveni pomjeraj usled dodatka HSA, ukazuju da se okruženje i konformacija liganda promjenila. Uzevši u obzir da nativni C-PC ima značajno veću fluorescenciju nego denaturisani protein (**Murphy & O'Carra, 1970**), veća emisija pigmenta usled dodatka HSA dodatno ukazuje da je konformacija PCB-a vezanog za HSA izduženija u odnosu na slobodnu formu liganda.

Slobodan PCB ne pokazuje optičku aktivnost zato što je prisutan kao smješa *P* (desnogiri) i *M* (lijevogiri) konformera koji se nalaze u ravnoteži (**Tu, et al., 2009**). HSA indukuje optičku aktivnost PCB-a, što dovodi do negativnog Kotonovog efekta u CD spektrima HSA-PCB kompleksa, kao posledica pomjeranja ravnoteže između *P* i *M* konformera, usled preferencijalnog vezivanja jednog konformera liganda za protein. Slično našim rezultatima za PCB, posledica vezivanja *M* konformera bilirubina (u slučaju zasićenja rastvora proteina hloroformom) i biliverdina za HSA jeste negativan Kotonov efekat (**Minomo, et al., 2011; Pu, McDonagh, & Lightner, 1993; Trull, Ibars, & Lightner, 1992**). Desnogiri *P* konformer biliverdina pokazuje negativni pik na 380 nm, dok je pozitivni maksimum na 650 nm (**Ahlfors, 1981**). Prema tome, naši rezultati dokazuju vezivanje *M* konformera PCB-a za protein, pri čemu su dobijeni podaci u saglasnosti sa predviđanjima na osnovu molekuskog dokinga. Zanimljivo, redukcija biliverdina pomoću NaBH₄ koji je nekovalentno vezan za HSA, dovodi do *in situ* inverzije lijevogiog (*M* konformer) biliverdina u desnogiri (*P* konformer) bilirubina. Prema tome, vezivno mjesto za bilirubin/biliverdin/PCB na HSA je dovoljno fleksibilno za inverziju *M* konformacije biliverdina u *P* konformaciju bilirubina (**Trull, Ibars, & Lightner, 1992**).

Studija dokinga, kao i slične konstante vezivanja PCB-a i bilirubina za HSA, ukazuju da

dodatak jednog liganda u smješu koja sadrži kompleks proteina sa drugim ligandom može izazvati istiskivanje prethodno vezanog liganda. Snimanjem sinhronih fluorescentnih spektara HSA-PCB i HSA-bilirubin kompleksa nedvosmisleno je pokazano da navedeni ligandi mogu da istisnu jedan drugog sa vezivnih mjesta na proteinu. Sličan rezultat je dala i CD spektroskopija, gdje je takođe pokazano da bilirubin može da istisne PCB iz kompleksa sa proteinom. Prema tome, dobijeni rezultati su u saglasnosti sa činjenicom da bilirubin i PCB imaju ista vezivna mjesta i slične afinitete vezivanja za HSA, što omogućava njihovo međusobno istiskivanje sa proteina.

Ligandi koji se specifično vezuju za poznata mjesta na HSA se uobičajeno koriste kao kompetitori, kako bi se odredilo vezivno mjesto testirane supstance. Studije zasnovane na kristalografiji X-zracima nedvosmisleno su pokazale da je varfarin marker specifičan za subdomen IIA (**Petitpas, Bhattacharya, Twine, East, & Curry, 2001**), dok se hemin specifično vezuje za subdomen IB (**Dockal, Carter, & Ruker, 1999**). Studija kompeticije zasnovana na gašenju fluorescencije HSA-PCB i HSA-varfarin kompleksa je pokazala da varfarin slabo istiskuje PCB iz HSA-PCB ekvimolarnog kompleksa, dok je istiskivanje varfarina PCB-om značajno intezivnije. Slični rezultati su dobijeni i u slučaju kompeticije varfarina sa bilirubinom za HSA i obratno. Dobijeni rezultati mogu biti objašnjeni činjenicom da varfarin ima znatno manju konstantu vezivanja za HSA (oko $3,8 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$) u poređenju sa bilirubinom ($5,0 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ na 25°C) i PCB-om ($2,2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ na 25°C). Sličnim eksperimentalnim pristupom je pokazano da hemin snažno istiskuje PCB i bilirubin iz HSA-PCB/bilirubin kompleksa, što ukazuje da se ovi ligandi ne vezuju samo za subdomen IIA, već i za subdomen IB. Takođe, pokazano je da je vezivna konstanta PCB-a za HSA ($2,2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ na 25°C) diskretno smanjena u prisustvu varfarina ($1,6 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$) ili hemina ($2,0 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$). Međutim, u prisustvu oba markera konstanta vezivanja PCB-a se značajno smanjuje ($0,9 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$). Ovi rezultati ukazuju da se u prisustvu varfarina PCB vezuje za subdomen IB, ali kompeticija sa varfarinom u IIA subdomenu ima za posledicu diskretno smanjivanje konstante vezivanja. Slično tome, prisustvo hemina ostavlja slobodno vezivno mjesto u subdomenu IIA, ali zauzeti subdomen IB rezultuje u malom smanjenju konstante vezivanja. Kada su oba markera prisutna, PCB kompetira za oba visoko-afinitetna mjesta na proteinu, što prouzrokuje značajno smanjenje konstante vezivanja. Dalje, iako se varfarin vezuje za HSA značajno manjim afinitetom nego hemin ($0,9 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$), on je

efikasniji u smanjivanju vezivne konstante PCB-a za HSA u poređenju sa heminom, što ukazuje da je afinitet PCB-a za subdomen IIA nešto veći od afiniteta za subdomen IB.

U ranijim studijama je pokazano da biliverdin, koji je strukturno sličan PCB-u, takođe kompetira sa bilirubinom, ali samo za visoko-afinitetno mjesto na HSA (Ahlfors, 1981). Dalje, dodatak kompetirajućeg liganda (lijek specifičan za visoko-afinitetno mjesto) HSA-bilirubin kompleksu dovodi do redistribucije bilirubina između drugih vezivnih mjesta, što vodi ka manje efikasnoj kompeticiji za vezivanje za protein (Goncharova, et al., 2013). Uopšte uzevši, rezultati eksperimenata zasnovanih na kompeticijama dodatno ukazuju na identičnost vezivnih mjesta PCB-a i bilirubina na HSA, kao i na sklonost PCB-a da se efikasno “takmiči” za vezivanje za glavni transportni protein krvne plazme.

CD i FT-IR mjerenja su pokazala da vezivanje PCB-a dovodi do manje konformacione promjene u HSA, koja je praćena povećanjem sadržaja α -heliksa. Prethodno je pokazano da vezivanje odgovarajućih liganada, kao što su vitamin B-12 (Hou, et al., 2008) i virstatin (Chatterjee, Pal, Dey, Chatterjee, & Chakrabarti, 2012), može izazvati konformacione promjene u HSA sa pratećim povećanjem procenta α -heliksa i strukturnom stabilizacijom proteina. Ovaj fenomen je prilično izražen kod protein-ligand sistema sa visokim afinitetima vezivanja liganda. Tako, vezivanje biotina za streptavidin indukuje nestanak trake koja potiče od neuređenih struktura u FT-IR spektrima (Chatterjee, et al., 2012).

CD i fluorescentne krive topljenja HSA u prisustvu i odsustvu PCB-a potvrđuju da vezivanje PCB-a dovodi do povećane temperaturne stabilnosti proteina. Povećanje tačke topljenja HSA je uočeno i kod nekoliko drugih liganada koji se vezuju za mjesto IIA, kao što su varfarin (Lohner, Sen, Pranker, Esser, & Perrin, 1994), virstatin (Chatterjee, et al., 2012) i hipurinska kiselina (Zaidi, Ajmal, Rabbani, Ahmad, & Khan, 2013). Prethodne studije su došle do zaključka da temperaturna stabilnost HSA, indukovana vezivanjem liganada, korelira sa smanjenjem fleksibilnosti proteina, odnosno uređenija struktura proteina indukuje veću stabilnost (Celej, et al., 2003). Prema tome, vezivanje PCB za HSA povećava rigidnost i, tako, temperaturnu stabilnost proteina.

Studija digestibilnosti tripsinom je pokazala da je HSA-PCB kompleks otporniji na proteolizu u poređenju sa slobodnim proteinom. Ovo je u saglasnosti sa prethodnim dokazima da vezivanje nekih liganada za HSA, kao što su anjonske azo boje (Markus, McClintock, &

Castellani, 1967) i bilirubin (Sjodin, Hansson, & Sjöholm, 1977), dovodi do smanjenja osjetljivosti proteina na hidrolizu tripsinom. Povećana kompaktnost i smanjena fleksibilnost HSA, izazvana vezivanjem PCB-a, štiti protein od proteolitičke degradacije, pošto je osjetljivost na proteolizu određena kako dostupnošću peptidnih veza, tako i pokretljivošću proteinskih segmenata koji sadrže ove veze. Značajna posledica uočenog fenomena može biti da PCB, kada je vezan za glavni transportni protein, može produžiti poluživot proteina u plazmi, tako što ga čini otpornijim na dejstvo proteaza.

5.3 Fikocijanobilin se vezuje visokim afinitetom za BSA. Proces vezivanja dovodi do stabilizacije proteina i liganda.

Studija koja se bavila proučavanjem vezivanja PCB-a za BSA je pokazala da se PCB stereoselektivno vezuje za protein sa visokim afinitetom i stehiometrijom vezivanja 2:1 (mol/mol). Vezivanje PCB-a čini BSA stabilnijim na temperaturnu denaturaciju i oksidativna oštećenja, dok je pri zasićujućim koncentracijama liganda BSA-PCB kompleks otporniji na digestiju pepsinom nego slobodan protein. Molekul PCB-a je otporniji i na oksidativna oštećenja kada je u kompleksu sa proteinom. S druge strane, formiranje BSA-PCB kompleksa dovodi do maskiranja antioksidativne aktivnosti proteina i tetrapirolnog pigmenta.

Značajno gašenje sopstvene fluorescencije BSA usled dodatka PCB-a ukazuje na jake interakcije između proteina i pigmenta. Dobijena konstanta vezivanja ($2,3 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$) slična je konstanti određenoj za HSA-PCB sistem ($2,2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$). Afinitet vezivanja strukturnog analoga bilirubina ($5,0 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$) za BSA je takođe uporediv (Chen, Song, He, & Yan, 2007) sa vezivnom konstantom za BSA-PCB kompleks. Fluorescencija BSA uglavnom potiče od dva triptofanska ostatka u subdomenima IB (Trp-134) i IIA (Trp-212), i u nekoj mjeri od mnogobrojnih ostataka tirozina u strukturi proteina (Bujacz, 2012). Sinhroni spektri BSA-PCB kompleksa nisu mogli detektovati pomjeranje emisionih maksimuma Trp i Tyr ostataka, što ukazuje da vezivanje liganda ne mjenja konformaciju mikroregiona ovih ostataka. Sličan rezultat je dobijen i za vezivanje biliverdina za BSA (Wei, Li, Dong, Shuang, Liu, & Huie, 2006). Jako statičko gašenje ukupne fluorescencije BSA, zajedno za većim doprinosom Trp ostataka u ovom procesu, ukazuju da se ligand vezuje u blizini Trp ostataka na proteinu. Zaista, naša studija dokinga je pokazala da se jedno od dva visoko-afinitetna vezivna mjesta za PCB na molekulu

BSA nalazi u subdomenu IB, u blizini Trp-134 ostatka. Dodatni rezultati o afinitetu vezivanja PCB-a za BSA su dobijeni pomoću MST eksperimenta. Izračunata konstanta vezivanja je bila nešto niža ($1,4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$) u poređenju sa metodom gašenja fluorescencije BSA, vjerovatno zbog obilježavanja Lys ostataka proteina prilikom pripreme uzoraka za analizu, što utiče na vezivanje liganda.

Slično kao kod HSA-PCB sistema, vezivanje PCB-a za BSA indukuje optičku aktivnost pigmenta. Ipak, u ovom slučaju dolazi do pozitivnog Kotonovog efekta, što ukazuje da se *P*, a ne *M* konformer vezuje za protein. Ove razlike nisu iznenađujuće, uzevši u obzir da literaturni podaci ukazuju da se bilirubin vezuje za HSA kao *P* konformer, a za BSA kao *M* konformer (**Goncharova, et al., 2013**). Iako BSA i HSA imaju 76% homologije u aminokiselinskoj sekvenci, kao i slične tercijarne strukture i vezivna mjesta (**Bujacz, 2012**), njihove hiro-optičke karakteristike se razlikuju. Poređenje bliskih-UV/VIS CD spektara BSA-PCB kompleksa pri različitim koncentracijama PCB-a je pokazalo da je zasićenje visoko-afinitetnih vezivnih mjesta dostignuto nakon dodatka dva mola liganda po molu proteina, ukazujući na protein:ligand stehiometriju vezivanja 1:2. Diskretne razlike u obliku CD spektara BSA između uzoraka sa jednim ili dva mola PCB-a po molu proteina ukazuju na ne-ekvivalentnost ova dva vezivna mjesta.

Dodatak BSA u rastvor PCB-a dovodi do očiglednih promjena u boji rezultujuće smješe, što potvrđuje formiranje protein-ligand kompleksa i razlike u apsorpcionim spektrima pigmenta prije i nakon dodatka proteina. Poznato je da promjene u spektrima PCB-a mogu biti izazvane promjenama u njegovoj konformaciji, protonovanju karboksilnih grupa ili polarnosti rastvarača (**Goller, et al., 2005; Homoelle & Beck, 1997**). Kao što je već pomenuto, vezivanje PCB-a za HSA je praćeno plavim pomjerajem apsorpcionog maksimuma u vidljivoj oblasti, ali i povećanjem njegove fluorescencije nakon vezivanja za protein, što ukazuje da PCB kada je vezan za HSA ima izduženiju konformaciju. Crveni pomjeraji bliskog-UV i VIS pika PCB-a nakon dodatka BSA, bez povećanja fluorescencije pigmenta (rezultati nisu prikazani), ne ukazuju na sličan zaključak. Protonovanje pirolovog azota dovodi do crvenih pomjeraja u spektru hromofore, što je pokazano kako *in silico* (**Goller, et al., 2005**), tako i eksperimentalno, nakon dodatka kiseline rastvoru PCB-a (**Dietzek, Maksimenka, Hermann, Kiefer, Popp, & Schmitt, 2004**). S druge strane, promjene u pK_a vrijednostima u jonizabilnim grupama proteina

ili liganda se mogu desiti usled procesa vezivanja (**Hortner, Ritschel, Stengl, Kramer, Schweizer, Wagner, et al., 2007; Onufriev & Alexov, 2013**). Izgleda da vezivanje PCB-a za BSA, kroz promjene mikrookruženja liganda, mijenja kiselo-bazna svojstva liganda, što pomjera pK_a pirolovog azota ka višoj vrijednosti, a to vodi ka promjeni boje dobijenog rastvora. Uprava za hranu i lijekove Sjedinjenih Američkih Država (FDA) je odobrila upotrebu C-PC-a iz Spiruline kao sredstvo za bojenje hrane (**Gangl, et al., 2015**). Uzevši u obzir da se PCB u nekim zemljama već koristi kao prirodna boja za hranu (**Mortensen, 2006**), naši rezultati ukazuju da će hrana koja istovremeno sadrži pigment i BSA, biti drugačije obojena u poređenju sa proizvodima bez BSA.

Rezultati spektrofotometrijske titracije ubedljivo sugerišu vezivanje približno dva mola PCB-a po molu BSA. Studija dokinga je potvrdila dva vezivna mjesta na proteinu za monoanjonski oblik PCB-a, sa veoma sličnim skorovima dokinga: jedno u međudomenskoj šupljini, a drugo u subdomenu IB. Kao što je već pomenuto, HSA takođe vezuje dva molekula PCB-a, ali je jedno vezivno mjesto, umjesto u međudomenskoj šupljini, locirano u subdomenu IIA. Ova razlika nije iznenađujuća. Studija zasnovana na procijeni promjena u indukovanom CD-u pronašla je razlike u vezivanju polifenola (-)-epigalokatehin galata za BSA i HSA (**Nozaki, Hori, Kimura, Ito, & Hatano, 2009**). Fine razlike između 3D struktura HSA i BSA su vjerovatan razlog djelimične razlike u lokaciji vezivanja tetrapirolnog liganda. U kristalnim strukturama HSA (PDB kodovi: 1BM0, 4K2C, 4LB9, 5IJF, 3JRY) distanca između Lys-519 (domen III) i Asp-187 (domen I) ostataka je suviše kratka (0,49-1,28 nm) da bi se PCB smjestio u međudomenskoj šupljini, pošto je Lys-519 ostatak okrenut ka šupljini (**slika P26A**). Odgovarajuća distanca u molekulu BSA (PDB kodovi: 3V03, 4JK4, 4F5S, 4OR0) između Lys-520 (domen III) i Glu-186 (domen I) ostataka je nekoliko puta veća (1,92-2,40 nm), pri čemu je Lys-520 orijentisan u suprotnom smjeru (u poređenju sa HSA), i, prema tome, PCB ima mogućnost da se veže dublje u šupljinu (**slika P26B**). Vezivno mjesto za PCB u subdomenu IB je veoma slično vezivnom mjestu za 1-hidroksipiren, tipični policiklični metabolit ugljovodonika sa četiri aromatična prstena (**Zhanga, Weixiao Chen, Tang, Zhang, Chen, Ying Duan, et al., 2016**), dok je vezivno mjesto u međudomenskoj šupljini slično vezivnom mjestu Sudan IV azo boje, koja takođe ima četiri aromatična prstena (**Lu, Zhao, Zhao, Zhang, Zhang, Geng, et al., 2011**).

BSA, slično kao HSA, je protein stabilan na promjene u temperaturi. Krive topljenja dobijene CD spektroskopijom su pokazale da je BSA stabilizovan dodatkom PCB-a. Prethodne studije su pokazale da ligandi iz hrane, kao što su masne kiseline (**Gumpen, Hegg, & Martens, 1979**) ili saponini (**Ikedo, Shimoyamada, & Watanabe, 1996**), mogu nedvosmisleno povećati temperaturnu stabilnost BSA. Analogno HSA-PCB sistemu, vezivanje PCB vjerovatno povećava kompaktnost "pakovanja" BSA, što povećava temperaturnu stabilnost proteina.

Oksidacija aminokiselinskih ostataka slobodnim radikalima dovodi do gubitka aktivnosti i funkcije proteina. Jedan od načina praćenja oksidacije proteina je mjerenje opadanja fluorescencije koja potiče od ostataka triptofana (**Fuentes-Lemus, Dorta, Escobar, Aspée, Pino, Abasq, et al., 2016**). Značajna antioksidativna aktivnost PCB-a je pokazana u različitim model sistemima, kako u našoj, tako i u drugim studijama (**Hirata, Tanaka, Ooike, Tsunomura, & Sakaguchi, 2000**). U ovom dijelu doktorske disertacije je pokazano da PCB efikasno inhibira oksidaciju BSA, što potvrđuje njegovu sposobnost da direktno štiti protein od oksidativnog stresa. Oksidativne modifikacije serum albumina su odgovorne za njihove izmjenjene biološke karakteristike, uključujući antioksidativnu aktivnost *per se* i sposobnost vezivanja liganada (**Oettl & Stauber, 2007**). U BSA-PCB kompleksu sa molarnim odnosom 1:2, aktivnost PCB je više nego dva puta veća (4,2 puta) nego aktivnost BSA-PCB kompleksa sa molarnim odnosom 1:1, što sugeriše neproporcionalnu zavisnost između koncentracije i aktivnosti. Rastojanje između Trp-134 i PCB-a u subdomenu IB (0,63 nm) je kraće u poređenju sa rastojanjem kada je ligand vezan u međudomenskoj šupljini (2,13 nm). Prema tome, kada je molarni odnos BSA:PCB 1:2 drugo vezivno mjesto je zauzeto, i vezivanje PCB u blizini Trp ostatka potentnije štiti ovaj ostatak od oksidacije, u poređenju kada je samo prvo vezivno mjesto zauzeto. Ovo ukazuje i da se PCB prevashodno vezuje za vezivno mjesto u međudomenskoj šupljini, dok vezivanje za subdomen IB, zbog blizine liganda Trp ostatku, efikasnije štiti protein od oksidativnih oštećenja.

Dalje je pokazano da je zaštita od oksidacije izazvane slobodnim radikalima uzajamna, odnosno da BSA takođe štiti i vezani PCB. Shodno tome, rezultati u vezi zaštite vezanog PCB-a za protein imaju značaj s obzirom na njegove bioaktivne efekte i potencijalnu primjenu u industriji hrane kao koloranta. Pokazano je i da BSA može značajno štiti vezani bilirubin od degradacije izazvane hidroksil radikalima (**Adhikari & Gopinathan, 1996**). Vezivanje β -

karotena za BSA efikasno štiti ligand od foto-oksidacije, a za to je zaslužno rasipanje ekscitacione energije u proteinskom matriksu (**Chang, Cheng, Han, Zhang, & Skibsted, 2016**). Uzevši u obzir da je PCB, slično karotenoidima, konjugovani sistem, može se očekivati da BSA takođe štiti PCB od foto-oskidacije. Uzajamna zaštita interagujućih partnera, PCB-a i BSA, od napada slobodno-radikalnim reaktivnim vrstama sa odlaganjem oksidativne degradacije, može biti objašnjeno činjenicom da interagujuće redoks aktivne vrste, kao što su PCB i reaktivni aminokiselinski ostaci u proteinu, mogu jedni drugima međusobno prenositi elektrone i/ili atome vodonika, što rezultuje u međusobnoj regeneraciji.

S druge strane, uočeno je da su redukujuća moć i ORAC vrijednosti BSA-PCB kompleksa do 20% manje nego što je prosti zbir individualnih aktivnosti proteina i liganda. Dobro je poznato da vezivanje antioksidanata za proteine hrane, uključujući BSA, može maskirati njihov antioksidativni kapacitet (**Arts, Haenen, Voss, & Bast, 2001; Stojadinovic, et al., 2013**), a time i *in vivo* aktivnost (**Serafini, Ghiselli, & Ferro-Luzzi, 1996**). Ipak, efekat maskiranja ne bi trebalo posmatrati kao smanjenje antioksidativnog potencijala obje interagujuće vrste, s obzirom da će proteoliza BSA tokom digestije osloboditi PCB sa punim antioksidativnim kapacitetom. Antioksidativna aktivnost antioksidanata poput kvarcetina opada tokom vremena zbog njegove degradacije, dok je početna aktivnost antioksidanta nano-enkapsuliranog u BSA manja zbog efekta maskiranja proteinskog matriksa. Tokom vremena, aktivnost na ovaj način inkorporiranih antioksidanata se povećava, zbog zaštitnog efekta proteina (**Antonio, Khalil, & Mainardes, 2016**).

Pepsinska digestija je pokazala da je BSA-PCB kompleks sa molarnim odnosom 1:2 malo otporniji na proteolizu u poređenju sa slobodnim proteinom. Takođe, degradacioni fragment BSA (oko 45 kDa) je takođe manje podložan daljoj pepsinskoj digestiji u smješi koja sadrži BSA-PCB kompleks u molarnom odnosu 1:2, sugerišući da je i "okrnjeni" BSA sposoban da veže PCB. Treba napomenuti da PCB indukuje povećanu kompaktnost i smanjenu fleksibilnost molekula HSA, što ga štiti od tripsinske proteolize pokazane u prvom dijelu ove doktorske disertacije. Pored toga, pokazano je da vezivanje saponina za BSA, smanjuje osjetljivost proteina na digestiju α -himotripsinom (**Ikedo, et al., 1996**). Takođe, vezivanje liganada za proteine hrane (poput β -laktoglobulina) odlaže pepsinsku digestiju u simuliranim želudačnim uslovima, dok je nađena negativna korelacija između afiniteta vezivanja i sklonosti

proteina ka digestiji (**Stojadinovic, et al., 2013**). Shodno tome, visoko-afinitetno vezivanje PCB-a za BSA u zasićujućim koncentracijama, vjerovatno povećanjem rigidnosti proteina, čini BSA manje sklonim na pepsinsku digestiju.

6. Zaključci

Pepsinskom digestijom C-PC-a se dobijaju mali hromopeptidi sa odličnom antioksidativnom aktivnošću i značajnim citotoksičnim efektom. Tetrapirolna hromofora PCB se sa visokim afinitetom vezuje za glavne proteine plazme (HSA i BSA), pri čemu vezivanje vodi ka stabilizaciji proteina.

U ovoj disertaciji je pokazano da je C-PC izuzetno podložan digestiji pepsinom u simuliranim želudačnim uslovima. Hromopeptidne frakcije, dobijene pepsinskom digestijom C-PC-a, sadrže hromopeptide veličine od 2 do 13 ostataka aminokiselina. Izolovani hromopeptidi pokazuju potentnu antioksidativnu aktivnost, pri čemu je tetrapirolna hromofora najodgovornija za pomenute efekte. Takođe, ispoljavaju i značajnu citotoksičnu aktivnost na kancerskim ćelijama, koja je u korelaciji sa njihovim antioksidativom efektom. Sposobnost da relativno visokim afinitetom vezuju jone bakra sugeriše mogući antikancerski mehanizam hromopeptida *in vivo*. Navedeni rezultati ukazuju da hromopeptidi oslobođeni pepsinskom digestijom C-PC-a mogu značajno da poboljšaju zdravlje ljudi, prevashodno zahvaljujući povećanju ukupnog antioksidativnog kapaciteta organizma.

PCB, bioaktivna tetrapirolna hromofora se vezuje visokim afinitetom za glavni protein plazme, HSA. Studija zasnovana na molekulskom dokingu je pokazala da se PCB vezuje za dva visoko-afinitetna vezivna mjesta na HSA, u subdomenima IB i IIA, sa sličnim vezivnim energijama. Ova vezivna mjesta su identična sa prethodno utvrđenim visoko-afinitetnim vezivnim mjestima za bilirubin. Spektrofotometrijska titracija je potvrdila stehiometriju vezivanja 2:1, dok CD mjerenja sugerišu da se PCB enantio-selektivno vezuje za protein kao *M* konformer. UV/VIS i fluorescentni spektri ukazuju da PCB vezan za HSA ima izduženiju konformaciju u poređenju sa slobodnom formom. Rezultati eksperimentalne studije kompeticije sa bilirubinom i markerima specifičnim za mjesto na HSA su pokazali da PCB kompetira sa bilirubinom, heminom i varfarinom prilikom vezivanja za protein. Dobijeni rezultati ukazuju da u stanjima povećane koncentracije bilirubina u plazmi, ili upotrebom lijekova koji se specifično vezuju za subdomene IB i/ili IIA, farmakokinetika PCB-a može biti promjenjena.

Vezivanje PCB-a dovodi do suptilnih promjena u konformaciji HSA, uz povećanje sadržaja α -heliksa u proteinu. Pokazano je i da vezana hromofora dovodi do povećanja

temperaturne stabilnosti proteina i njegove manje podložnosti prema tripsinskoj digestiji. Prema tome, vezivanje PCB-a za HSA može povećati stabilnost i dugovječnost proteina u plazmi. Dobijeni rezultati pružaju i značajne informacije u vezi transporta i distribucije PCB-a *in vivo*, što može biti od značaja za razumijevanja njegovih mnogobrojnih benefita po zdravlje čovjeka.

Slično kao kod HSA, PCB se vezuje visokim afinitetom za BSA i sa stehiometrijom vezivanja od 2:1. Za razliku od HSA, molekularni doking je pokazao da je BSA u mogućnosti da smjesti tetrapirolni ligand u međudomensku šupljinu, dok je subdomen IB zajednička lokacija vezivnih mjesta oba proteina. Takođe, dok HSA vezuje *M* konformer liganda, CD spektroskopija je pokazala preferencijalno vezivanje *P* konformera za BSA. Drugi dio ove studije je bio posvećen proučavanju uticaja vezivanja hromofore na stabilnost i aktivnosti proteina i liganda. BSA u kompleksu sa PCB-om je otporniji na temperaturnu denaturaciju nego slobodan protein, dok formiranje kompleksa djelimično maskira antioksidativnu aktivnost i PCB-a i BSA. U kompleksu protein i ligand pokazuju uzajamno zaštitni efekat od oksidacije indukovane slobodnim radikalima, koji se ispoljava u odlaganju oksidativne degradacije oba molekula. Dodatno, BSA "zasićen" PCB-om je manje podložan pepsinskoj digestiji u simuliranoj želudačnoj tečnosti.

Isporuka i zaštita osjetljivih redoks (bio)aktivnih molekula predstavlja važan izazov. Mada su mnogi biodegradabilni materijali dizajnirani, BSA se i dalje mnogo koristi za isporuku lijekova, zbog njegovog jednostavnog izolovanja i prečišćavanja, velike zastupljenosti, niske cijene, kao i sposobnosti da veže brojne i (hemijski) raznorodne ligande, kao i opšte prihvaćenosti u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji. Slično ostalim osjetljivim bioaktivnim ligandima, kao što su polifenoli (**Kumar, Meena, & Rajamani, 2016**), dalja istraživanja bi mogla razviti metode za enkapsulaciju PCB-a u nanočestice koje su zasnovane na BSA, u cilju poboljšanja stabilnosti i zaštite pigmenta tokom dužeg stajanja. Zbog visokog afiniteta vezivanja PCB-a za BSA, pigment enkapsuliran u matriks proteina mogao bi biti iskorišćen za fortifikaciju hrane u cilju dobijanja obojenih i bioaktivnih prehrambenih proizvoda.

Uzevši sve navedeno u obzir, rezultati ove doktorske disertacije daju novi uvid u fiziološki značaj i efekte oralnog unosa C-fikocijanina, glavnog proteina Spiruline, mikroalge sa izvanrednim nutritivnim vrijednostima.

7. Literatura

- Adhikari, S., & Gopinathan, C. (1996). Oxidation reactions of a bovine serum albumin-bilirubin complex. A pulse radiolysis study. *International Journal of Radiation Biology*, 69(1), 89-98.
- Ahlfors, C. E. (1981). Competitive interaction of biliverdin and bilirubin only at the primary bilirubin binding site on human albumin. *Analytical Biochemistry*, 110(2), 295-307.
- Anandakrishnan, R., Aguilar, B., & Onufriev, A. V. (2012). H++ 3.0: automating pK prediction and the preparation of biomolecular structures for atomistic molecular modeling and simulations. *Nucleic Acids Research*, 40(Web Server issue), W537-541.
- Antonio, E., Khalil, N. M., & Mainardes, R. M. (2016). Bovine Serum Albumin Nanoparticles Containing Quercetin: Characterization and Antioxidant Activity. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 16(2), 1346-1353.
- Arts, M. J., Haenen, G. R., Voss, H. P., & Bast, A. (2001). Masking of antioxidant capacity by the interaction of flavonoids with protein. *Food and Chemical Toxicology*, 39(8), 787-791.
- Ascenzi, P., Bocedi, A., Notari, S., Fanali, G., Fesce, R., & Fasano, M. (2006). Allosteric modulation of drug binding to human serum albumin. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 6(4), 483-489.
- Bakkialakshmi, S., & Barani, V. (2013). FTIR study on the interaction of quercetin and amantadine with egg albumin. *International Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 3(3), 559-564.
- Barreca, D., Lagana, G., Toscano, G., Calandra, P., Kiselev, M. A., Lombardo, D., & Bellocco, E. (2017). The interaction and binding of flavonoids to human serum albumin modify its conformation, stability and resistance against aggregation and oxidative injuries. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1861(1 Pt B), 3531-3539.
- Benedetti, S., Benvenuti, F., Pagliarani, S., Francogli, S., Scoglio, S., & Canestrari, F. (2004). Antioxidant properties of a novel phycocyanin extract from the blue-green alga *Aphanizomenon flos-aquae*. *Life Sciences*, 75(19), 2353-2362.
- Benedetti, S., Benvenuti, F., Scoglio, S., & Canestrari, F. (2010). Oxygen radical absorbance

- capacity of phycocyanin and phycocyanobilin from the food supplement *Aphanizomenon flos-aquae*. *Journal of Medicinal Food*, 13(1), 223-227.
- Bennett, A., & Bogorad, L. (1973). Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. *The Journal of Cell Biology*, 58(2), 419-435.
- Bhat, V. B., & Madyastha, K. M. (2001). Scavenging of peroxynitrite by phycocyanin and phycocyanobilin from *Spirulina platensis*: protection against oxidative damage to DNA. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 285(2), 262-266.
- Bia, S., Dinga, L., Tiana, Y., Songa, D., Zhoua, X., Liua, X., & Zhanga, H. (2004). Investigation of the interaction between flavonoids and human serum albumin. *Journal of Molecular Structure*, 703, 37-45.
- Blauer, G., & Wagniere, G. (1975). Conformation of Bilirubin and Biliverdin in Their Complexes with Serum Albumin. *Journal of the American Chemical Society*, 97(7), 1949-1954.
- Boiadjiev, S. E., & Lightner, D. A. (1999). Intramolecular hydrogen bonding and its influence on conformation. Circular dichroism of chiral bilirubin analogs. *Tetrahedron: Asymmetry*, 10, 2535–2550.
- Braga, A. R. C., Figueira, F. d. S., Silveira, J. T. d., Morais, M. G. d., Costa, J. A. V., & Kalil, S. J. (2016). Improvement of Thermal Stability of C-Phycocyanin by Nanofiber and Preservative Agents. *Journal of Food Processing and Preservation*, 40(6), 1264-1269.
- Brejč, K. a., Ficner, R., Huber, R., & Steinbacher, S. (1995). Isolation, Crystallization, Crystal Structure Analysis and Refinement of Allophycocyanin from the Cyanobacterium *Spirulina platensis* at 0.23 Å Resolution. *Journal of Molecular Biology*, 249, 424-440.
- Brooks, B. R., Bruccoleri, R. E., Olafson, B. D., States, D. J., Swaminathan, S., & Karplus, M. (1983). CHARMM: A Program for Macromolecular Energy, Minimization, and Dynamics Calculations. *Journal of Computational Chemistry*, 4(2), 187-217.
- Bujacz, A. (2012). Structures of bovine, equine and leporine serum albumin. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 68(Pt 10), 1278-1289.
- Burkitt, M. J. (2001). A critical overview of the chemistry of copper-dependent low density lipoprotein oxidation: roles of lipid hydroperoxides, alpha-tocopherol, thiols, and ceruloplasmin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 394(1), 117-135.

- Carrasco-Castilla, J., Hernandez-Alvarez, A. J., Jimenez-Martinez, C., Jacinto-Hernandez, C., Alaiz, M., Giron-Calle, J., Vioque, J., & Davila-Ortiz, G. (2012). Antioxidant and metal chelating activities of peptide fractions from phaseolin and bean protein hydrolysates. *Food Chemistry*, *135*(3), 1789-1795.
- Cases, J., Wysocka, I. A., Caporiccio, B., Jouy, N., Besancon, P., Szpunar, J., & Rouanet, J. M. (2002). Assessment of selenium bioavailability from high-selenium spirulina subfractions in selenium-deficient rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*(13), 3867-3873.
- Castangia, I., Manca, M. L., Caddeo, C., Bacchetta, G., Pons, R., Demurtas, D., Diez-Sales, O., Fadda, A. M., & Manconi, M. (2016). Santosomes as natural and efficient carriers for the improvement of phycocyanin reepithelising ability in vitro and in vivo. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, *103*, 149-158.
- Castangia, I., Manca, M. L., Catalan-Latorre, A., Maccioni, A. M., Fadda, A. M., & Manconi, M. (2016). Phycocyanin-encapsulating hyalurosomes as carrier for skin delivery and protection from oxidative stress damage. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, *27*(4), 75.
- Celej, M. S., Montich, G. G., & Fidelio, G. D. (2003). Protein stability induced by ligand binding correlates with changes in protein flexibility. *Protein Science*, *12*(7), 1496-1506.
- Chang, H. T., Cheng, H., Han, R. M., Zhang, J. P., & Skibsted, L. H. (2016). Binding to Bovine Serum Albumin Protects beta-Carotene against Oxidative Degradation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *64*(29), 5951-5957.
- Chang, S. K., Ismail, A., Yanagita, T., Mohd Esa, N., & Baharuldin, M. T. H. (2015). Antioxidant peptides purified and identified from the oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) kernel protein hydrolysate. *Journal of Functional Foods*, *14*, 63-75.
- Chatterjee, T., Pal, A., Dey, S., Chatterjee, B. K., & Chakrabarti, P. (2012). Interaction of virstatin with human serum albumin: spectroscopic analysis and molecular modeling. *PLoS One*, *7*(5), e37468.
- Chen, J., Song, G., He, Y., & Yan, Q. (2007). Spectroscopic analysis of the interaction between bilirubin and bovine serum albumin. *Microchimica Acta*, *159*(1-2), 79-85.
- Chen, M., & Li, B. (2012). The effect of molecular weights on the survivability of casein-derived

- antioxidant peptides after the simulated gastrointestinal digestion. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 16, 341-348.
- Cheng, H., Liu, H., Bao, W., & Zou, G. (2011). Studies on the interaction between docetaxel and human hemoglobin by spectroscopic analysis and molecular docking. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 105(2), 126-132.
- Cherng, S. C., Cheng, S. N., Tarn, A., & Chou, T. C. (2007). Anti-inflammatory activity of c-phycocyanin in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Life Science*, 81(19-20), 1431-1435.
- Chi, Z., & Liu, R. (2011). Phenotypic characterization of the binding of tetracycline to human serum albumin. *Biomacromolecules*, 12(1), 203-209.
- Curry, S., Mandelkow, H., Brick, P., & Franks, N. (1998). Crystal structure of human serum albumin complexed with fatty acid reveals an asymmetric distribution of binding sites. *Nature Structural Biology*, 5(9), 827-835.
- Datta, S., & Halder, M. (2014). Detailed scrutiny of the anion receptor pocket in subdomain IIA of serum proteins toward individual response to specific ligands: HSA-pocket resembles flexible biological slide-wrench unlike BSA. *The Journal of Physical Chemistry B*, 118(23), 6071-6085.
- Davalos, A., Miguel, M., Bartolome, B., & Lopez-Fandino, R. (2004). Antioxidant activity of peptides derived from egg white proteins by enzymatic hydrolysis. *Journal of Food Protection*, 67(9), 1939-1944.
- Dietzek, B., Maksimenka, R., Hermann, G., Kiefer, W., Popp, J., & Schmitt, M. (2004). The excited-state dynamics of phycocyanobilin in dependence on the excitation wavelength. *Chemphyschem*, 5(8), 1171-1177.
- Dockal, M., Carter, D. C., & Ruker, F. (1999). The three recombinant domains of human serum albumin. Structural characterization and ligand binding properties. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(41), 29303-29310.
- Dong, A., Kendrick, B., Kreilgard, L., Matsuura, J., Manning, M. C., & Carpenter, J. F. (1997). Spectroscopic study of secondary structure and thermal denaturation of recombinant human factor XIII in aqueous solution. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 347(2), 213-220.

- Du, X., Li, Y., Xia, Y. L., Ai, S. M., Liang, J., Sang, P., Ji, X. L., & Liu, S. Q. (2016). Insights into Protein-Ligand Interactions: Mechanisms, Models, and Methods. *International Journal of Molecular Sciences*, *17*(2).
- Eriksen, N. T. (2008). Production of phycocyanin - a pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *80*(1), 1-14.
- Fan, X., Bai, L., Zhu, L., Yang, L., & Zhang, X. (2014). Marine algae-derived bioactive peptides for human nutrition and health. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *62*(38), 9211-9222.
- Fanali, G., di Masi, A., Trezza, V., Marino, M., Fasano, M., & Ascenzi, P. (2012). Human serum albumin: from bench to bedside. *Molecular Aspects of Medicine*, *33*(3), 209-290.
- Figueira Fda, S., Gettens, J. G., Costa, J. A., de Morais, M. G., Moraes, C. C., & Kalil, S. J. (2016). Production of Nanofibers Containing the Bioactive Compound C-Phycocyanin. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, *16*(1), 944-949.
- Frisch, M. J., Trucks, G. W., Schlegel, H. B., Scuseria, G. E., Robb, M. A., Cheeseman, J. R., Scalmani, G., Barone, V., Mennucci, B., Petersson, G. A., Nakatsuji, H., Caricato, M., Li, X., Hratchian, H. P., Izmaylov, A. F., Bloino, J., Zheng, G., Sonnenberg, J. L., Hada, M., Ehara, M., Toyota, K., Fukuda, R., Hasegawa, J., Ishida, M., Nakajima, T., Honda, Y., Kitao, O., Nakai, H., Vreven, T., Montgomery Jr., J. A., Peralta, J. E., Ogliaro, F., Bearpark, M. J., Heyd, J., Brothers, E. N., Kudin, K. N., Staroverov, V. N., Kobayashi, R., Normand, J., Raghavachari, K., Rendell, A. P., Burant, J. C., Iyengar, S. S., Tomasi, J., Cossi, M., Rega, N., Millam, N. J., Klene, M., Knox, J. E., Cross, J. B., Bakken, V., Adamo, C., Jaramillo, J., Gomperts, R., Stratmann, R. E., Yazyev, O., Austin, A. J., Cammi, R., Pomelli, C., Ochterski, J. W., Martin, R. L., Morokuma, K., Zakrzewski, V. G., Voth, G. A., Salvador, P., Dannenberg, J. J., Dapprich, S., Daniels, A. D., Farkas, Ö., Foresman, J. B., Ortiz, J. V., Cioslowski, J., & Fox, D. J. (2009). Gaussian 09. In). Wallingford, CT, USA: Gaussian, Inc.
- Fuentes-Lemus, E., Dorta, E., Escobar, E., Aspée, A., Pino, E., Abasq, M. L., Speisky, H., Silva, E., Lissi, E., Davies, M. J., & López-Alarcón, C. (2016). Oxidation of free, peptide and protein tryptophan residues mediated by AAPH-derived free radicals: role of alkoxyl and

- peroxyl radicals. *RSC Advances*, 6(63), 57948-57955.
- Fuentes Aparicio, V., Sanchez Marcen, I., Perez Montero, A., Baeza, M. L., & de Barrio Fernandez, M. (2005). Allergy to mammal's meat in adult life: immunologic and follow-up study. *Journal of Investigational Allergology & Clinical Immunology*, 15(3), 228-231.
- Gang, Y., Zheng, L., Liu Fei, Li Chen, Fu-xin, D., & Nai-ju, Y. (1999). Isolation and Characterization of C-phycoyanin from *Spirulina Platensis*. *Chemical Research in Chinese Universities*, 15(1), 35-38.
- Gangl, D., Zedler, J. A., Rajakumar, P. D., Martinez, E. M., Riseley, A., Wlodarczyk, A., Purton, S., Sakuragi, Y., Howe, C. J., Jensen, P. E., & Robinson, C. (2015). Biotechnological exploitation of microalgae. *Journal of Experimental Botany*, 66(22), 6975-6990.
- Gantar, M., Dhandayuthapani, S., & Rathinavelu, A. (2012). Phycocyanin induces apoptosis and enhances the effect of topotecan on prostate cell line LNCaP. *Journal of Medicinal Food*, 15(12), 1091-1095.
- Gershwin, M. E., & Belay, A. (2007). *Spirulina in Human Nutrition and Health*: CRC press.
- Ghisaidoobe, A. B., & Chung, S. J. (2014). Intrinsic tryptophan fluorescence in the detection and analysis of proteins: a focus on Forster resonance energy transfer techniques. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(12), 22518-22538.
- Ghuman, J., Zunszain, P. A., Petitpas, I., Bhattacharya, A. A., Otagiri, M., & Curry, S. (2005). Structural basis of the drug-binding specificity of human serum albumin. *Journal of Molecular Biology*, 353(1), 38-52.
- Goller, A. H., Strehlow, D., & Hermann, G. (2001). Conformational flexibility of phycocyanobilin: an AM1 semiempirical study. *Chemphyschem*, 2(11), 665-671.
- Goller, A. H., Strehlow, D., & Hermann, G. (2005). The excited-state chemistry of phycocyanobilin: a semiempirical study. *Chemphyschem*, 6(7), 1259-1268.
- Goncharova, I., Orlov, S., & Urbanova, M. (2013a). The location of the high- and low-affinity bilirubin-binding sites on serum albumin: ligand-competition analysis investigated by circular dichroism. *Biophysical Chemistry*, 180-181, 55-65.
- Greenfield, N. J. (2006a). Using circular dichroism collected as a function of temperature to determine the thermodynamics of protein unfolding and binding interactions. *Nature Protocols*, 1(6), 2527-2535.

- Greenfield, N. J. (2006b). Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nature Protocols*, 1(6), 2876-2890.
- Guizado, T. R. (2014). Analysis of the structure and dynamics of human serum albumin. *Journal of Molecular Modeling*, 20(10), 2450.
- Gumpen, S., Hegg, P. O., & Martens, H. (1979). Thermal stability of fatty acid-serum albumin complexes studied by differential scanning calorimetry. *Biochimica et Biophysica Acta*, 574(2), 189-196.
- Guo, R. Y., Huang, B., Zuo, M. M., Wang, Y. Z., & Hu, L. (2008). Preparation of phycocyanin subunits liposomes and the photodynamic experiment on cancer cells. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 43(10), 1060-1065.
- Gupta, N. K., & Gupta, K. P. (2012). Effects of C-Phycocyanin on the representative genes of tumor development in mouse skin exposed to 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 34(3), 941-948.
- Hamuro, Y., Coales, S. J., Molnar, K. S., Tuske, S. J., & Morrow, J. A. (2008). Specificity of immobilized porcine pepsin in H/D exchange compatible conditions. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 22(7), 1041-1046.
- He, J.-A., Hu, Y.-Z., & Jiang, L.-J. (1996). Photochemistry of Phycobiliproteins: First Observation of Reactive Oxygen Species Generated from Phycobiliproteins on Photosensitization. *Journal of American Chemical Society*, 118, 8957-8958.
- He, X. M., & Carter, D. C. (1992). Atomic structure and chemistry of human serum albumin. *Nature*, 358(6383), 209-215.
- Hernandez-Ledesma, B., Davalos, A., Bartolome, B., & Amigo, L. (2005). Preparation of antioxidant enzymatic hydrolysates from alpha-lactalbumin and beta-lactoglobulin. Identification of active peptides by HPLC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(3), 588-593.
- Hirata, T., Tanaka, M., Ooike, M., Tsunomura, T., & Sakaguchi, M. (2000). Antioxidant activities of phycocyanobilin prepared from *Spirulina platensis*. *Journal of Applied Phycology*, 12, 435-439.
- Homoelle, B. J., & Beck, W. F. (1997). Solvent accessibility of the phycocyanobilin chromophore in the alpha subunit of C-phycocyanin: implications for a molecular

- mechanism for inertial protein-matrix solvation dynamics. *Biochemistry*, 36(42), 12970-12975.
- Hornshaw, M. P., McDermott, J. R., Candy, J. M., & Lakey, J. H. (1995). Copper binding to the N-terminal tandem repeat region of mammalian and avian prion protein: structural studies using synthetic peptides. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 214(3), 993-999.
- Hortner, S. R., Ritschel, T., Stengl, B., Kramer, C., Schweizer, W. B., Wagner, B., Kansy, M., Klebe, G., & Diederich, F. (2007). Potent inhibitors of tRNA-guanine transglycosylase, an enzyme linked to the pathogenicity of the Shigella bacterium: charge-assisted hydrogen bonding. *Angewandte Chemie International Edition*, 46(43), 8266-8269.
- Hou, H. N., Qi, Z. D., Ouyang, Y. W., Liao, F. L., Zhang, Y., & Liu, Y. (2008). Studies on interaction between Vitamin B12 and human serum albumin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 47(1), 134-139.
- Hrkal, Z., & Klementova, S. (1984). Bilirubin and haeme binding to human serum albumin studied by spectroscopy methods. *International Journal of Biochemistry*, 16(7), 799-804.
- Hsiao, G., Chou, P. H., Shen, M. Y., Chou, D. S., Lin, C. H., & Sheu, J. R. (2005). C-phycocyanin, a very potent and novel platelet aggregation inhibitor from *Spirulina platensis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(20), 7734-7740.
- Hsu, K.-C., Li-Chan, E. C. Y., & Jao, C.-L. (2011). Antiproliferative activity of peptides prepared from enzymatic hydrolysates of tuna dark muscle on human breast cancer cell line MCF-7. *Food Chemistry*, 126(2), 617-622.
- Ikedo, S., Shimoyamada, M., & Watanabe, K. (1996). Interaction between Bovine Serum Albumin and Saponin As Studied by Heat Stability and Protease Digestion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 792-795.
- Jacobsen, J. (1977). Studies of the affinity of human serum albumin for binding of bilirubin at different temperatures and ionic strength. *International journal of peptide and protein research*, 9(3), 235-239.
- Jakobek, L. (2015). Interactions of polyphenols with carbohydrates, lipids and proteins. *Food Chemistry*, 175, 556-567.
- Jansen, T., & Daiber, A. (2012). Direct Antioxidant Properties of Bilirubin and Biliverdin. Is

- there a Role for Biliverdin Reductase? *Frontiers in Pharmacology*, 3, 30.
- Jerabek-Willemsen, M., André, T., Wanner, R., Roth, H. M., Duhr, S., Baaske, P., & Breitsprecher, D. (2014). MicroScale Thermophoresis: Interaction analysis and beyond. *Journal of Molecular Structure*, 1077, 101-113.
- Jerabek-Willemsen, M., Wienken, C. J., Braun, D., Baaske, P., & Duhr, S. (2011). Molecular interaction studies using microscale thermophoresis. *Assay and Drug Development Technologies*, 9(4), 342-353.
- Kallubai, M., Rachamalla, A., Yeggoni, D. P., & Subramanyam, R. (2015). Comparative binding mechanism of lupeol compounds with plasma proteins and its pharmacological importance. *Molecular BioSystems*, 11(4), 1172-1183.
- Kelly, S. M., Jess, T. J., & Price, N. C. (2005). How to study proteins by circular dichroism. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1751(2), 119-139.
- Keshavan, P., Schwemberger, S. J., Smith, D. L., Babcock, G. F., & Zucker, S. D. (2004). Unconjugated bilirubin induces apoptosis in colon cancer cells by triggering mitochondrial depolarization. *International Journal of Cancer*, 112(3), 433-445.
- Khan, M. M., Muzammil, S., & Tayyab, S. (2000). Role of salt bridge(s) in the binding and photoconversion of bilirubin bound to high affinity site on human serum albumin. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1479(1-2), 103-113.
- Kim, S.-K., & Wijesekara, I. (2010). Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: A review. *Journal of Functional Foods*, 2(1), 1-9.
- Konickova, R., Vankova, K., Vanikova, J., Vanova, K., Muchova, L., Subhanova, I., Zadinova, M., Zelenka, J., Dvorak, A., Kolar, M., Strnad, H., Rimpelova, S., Ruml, T., R, J. W., & Vitek, L. (2014). Anti-cancer effects of blue-green alga *Spirulina platensis*, a natural source of bilirubin-like tetrapyrrolic compounds. *Annals of Hepatology*, 13(2), 273-283.
- Kou, X., Gao, J., Xue, Z., Zhang, Z., Wang, H., & Wang, X. (2013). Purification and identification of antioxidant peptides from chickpea (*Cicer arietinum* L.) albumin hydrolysates. *LWT - Food Science and Technology*, 50(2), 591-598.
- Krstic, M., Stojadinovic, M., Smiljanic, K., Stanic-Vucinic, D., & Cirkovic Velickovic, T. (2015). The anti-cancer activity of green tea, coffee and cocoa extracts on human cervical adenocarcinoma HeLa cells depends on both pro-oxidant and anti-proliferative activities

- of polyphenols. *RSC Advances*, 5(5), 3260-3268.
- Kuddus, M., Singh, P., Thomas, G., & Al-Hazimi, A. (2013). Recent developments in production and biotechnological applications of C-phycoyanin. *BioMed Research International*, 2013, 742859.
- Kumagai, A., Ando, R., Miyatake, H., Greimel, P., Kobayashi, T., Hirabayashi, Y., Shimogori, T., & Miyawaki, A. (2013). A bilirubin-inducible fluorescent protein from eel muscle. *Cell*, 153(7), 1602-1611.
- Kumar, S., Meena, R., & Rajamani, P. (2016). Fabrication of BSA-Green Tea Polyphenols-Chitosan Nanoparticles and Their Role in Radioprotection: A Molecular and Biochemical Approach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(30), 6024-6034.
- Kupka, M., & Scheer, H. (2008). Unfolding of C-phycoyanin followed by loss of non-covalent chromophore-protein interactions 1. Equilibrium experiments. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1777(1), 94-103.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685.
- Lakowicz, J. R. (2006). *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. New York: Springer.
- Lamola, A. A., Eisinger, J., Blumberg, W. E., Patel, S. C., & Flores, J. (1979). Fluorometric study of the partition of bilirubin among blood components: basis for rapid microassays of bilirubin and bilirubin binding capacity in whole blood. *Analytical Biochemistry*, 100(1), 25-42.
- Li, B., Chu, X., Gao, M., & Li, W. (2010). Apoptotic mechanism of MCF-7 breast cells in vivo and in vitro induced by photodynamic therapy with C-phycoyanin. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica (Shanghai)*, 42(1), 80-89.
- Li, B., Gao, M. H., Lv, C. Y., Yang, P., & Yin, Q. F. (2016). Study of the synergistic effects of all-transretinoic acid and C-phycoyanin on the growth and apoptosis of A549 cells. *European Journal of Cancer Prevention*, 25(2), 97-101.
- Li, B., Gao, M. H., Zhang, X. C., & Chu, X. M. (2006). Molecular immune mechanism of C-phycoyanin from *Spirulina platensis* induces apoptosis in HeLa cells in vitro. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 43(Pt 3), 155-164.
- Li, B., Zhang, X., Gao, M., & Chu, X. (2005). Effects of CD59 on antitumoral activities of

- phycocyanin from *Spirulina platensis*. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 59(10), 551-560.
- Li, X., & Wang, S. (2015). Study on the interaction of (+)-catechin with human serum albumin using isothermal titration calorimetry and spectroscopic techniques. *New Journal of Chemistry*, 39(1), 386-395.
- Liang, L., Tajmir-Riahi, H. A., & Subirade, M. (2008). Interaction of beta-lactoglobulin with resveratrol and its biological implications. *Biomacromolecules*, 9(1), 50-56.
- Liao, G., Gao, B., Gao, Y., Yang, X., Cheng, X., & Ou, Y. (2016). Phycocyanin Inhibits Tumorigenic Potential of Pancreatic Cancer Cells: Role of Apoptosis and Autophagy. *Scientific Reports*, 6, 34564.
- Lighnter, D. A., Wijekoon, W. M., & Zhang, M. H. (1988). Understanding bilirubin conformation and binding. Circular dichroism of human serum albumin complexes with bilirubin and its esters. *The Journal of Biological Chemistry*, 263(32), 16669-16676.
- Liu, Q., Huang, Y., Zhang, R., Cai, T., & Cai, Y. (2016). Medical Application of *Spirulina platensis* Derived C-Phycocyanin. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2016, 7803846.
- Lohner, K., Sen, A. C., Pranker, R., Esser, A. F., & Perrin, J. H. (1994). Effects of drug-binding on the thermal denaturation of human serum albumin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 12(12), 1501-1505.
- Lou, J., & Birdi, K. S. (1973). Interaction of bilirubin with human serum albumin and cationic detergents. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 28(9), 511-513.
- Lu, D., Zhao, X., Zhao, Y., Zhang, B., Zhang, B., Geng, M., & Liu, R. (2011). Binding of Sudan II and Sudan IV to bovine serum albumin: comparison studies. *Food and Chemical Toxicology*, 49(12), 3158-3164.
- Lu, W., Yu, P., & Li, J. (2011). Induction of apoptosis in human colon carcinoma COLO 205 cells by the recombinant alpha subunit of C-phycocyanin. *Biotechnology Letters*, 33(3), 637-644.
- Maisels, M. J., & McDonagh, A. F. (2008). Phototherapy for neonatal jaundice. *The New England Journal of Medicine*, 358(9), 920-928.
- Mann, M., Hendrickson, R. C., & Pandey, A. (2001). Analysis of proteins and proteomes by

- mass spectrometry. *Annual Review of Biochemistry*, 70, 437-473.
- Marenich, A. V., Cramer, C. J., & Truhlar, D. G. (2009). Universal solvation model based on solute electron density and on a continuum model of the solvent defined by the bulk dielectric constant and atomic surface tensions. *The Journal of Physical Chemistry B*, 113(18), 6378-6396.
- Marin-Prida, J., Pavon-Fuentes, N., Llopiz-Arzuaga, A., Fernandez-Masso, J. R., Delgado-Roche, L., Mendoza-Mari, Y., Santana, S. P., Cruz-Ramirez, A., Valenzuela-Silva, C., Nazabal-Galvez, M., Cintado-Benitez, A., Pardo-Andreu, G. L., Polentarutti, N., Riva, F., Penton-Arias, E., & Penton-Rol, G. (2013). Phycocyanobilin promotes PC12 cell survival and modulates immune and inflammatory genes and oxidative stress markers in acute cerebral hypoperfusion in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 272(1), 49-60.
- Markus, G., McClintock, D. K., & Castellani, B. A. (1967). Ligand-stabilized conformations in serum albumin. *The Journal of Biological Chemistry*, 242(19), 4402-4408.
- Martelli, G., Folli, C., Visai, L., Daglia, M., & Ferrari, D. (2014). Thermal stability improvement of blue colorant C-Phycocyanin from *Spirulina platensis* for food industry applications. *Process Biochemistry*, 49(1), 154-159.
- Martinez-Galero, E., Perez-Pasten, R., Perez-Juarez, A., Fabila-Castillo, L., Gutierrez-Salmean, G., & Chamorro, G. (2016). Preclinical antitoxic properties of *Spirulina* (Arthrospira). *Pharmaceutical Biology*, 54(8), 1345-1353.
- Matei, I., & Hillebrand, M. (2010). Interaction of kaempferol with human serum albumin: a fluorescence and circular dichroism study. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 51(3), 768-773.
- McCarty, M. F. (2007). Clinical potential of *Spirulina* as a source of phycocyanobilin. *Journal of Medicinal Food*, 10(4), 566-570.
- McDonnell, J. M. (2001). Surface plasmon resonance: towards an understanding of the mechanisms of biological molecular recognition. *Current Opinion in Chemical Biology*, 5(5), 572-577.
- Megias, C., Pedroche, J., Yust, M. M., Giron-Calle, J., Alaiz, M., Millan, F., & Vioque, J. (2007). Affinity purification of copper-chelating peptides from sunflower protein hydrolysates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(16), 6509-6514.

- Megías, C., Pedroche, J., Yust, M. M., Girón-Calle, J., Alaiz, M., Millán, F., & Vioque, J. (2008). Production of copper-chelating peptides after hydrolysis of sunflower proteins with pepsin and pancreatin. *LWT - Food Science and Technology*, *41*(10), 1973-1977.
- Memarpour-Yazdi, M., Mahaki, H., & Zare-Zardini, H. (2013). Antioxidant activity of protein hydrolysates and purified peptides from *Zizyphus jujuba* fruits. *Journal of Functional Foods*, *5*(1), 62-70.
- Miller, J. N. (1979). Recent advances in molecular luminescence analysis. *Proceedings of the Analytical Division of the Chemical Society*, *16*, 203–208.
- Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carriere, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Egger, L., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., Macierzanka, A., Mackie, A., Marze, S., McClements, D. J., Menard, O., Recio, I., Santos, C. N., Singh, R. P., Vegarud, G. E., Wickham, M. S., Weitschies, W., & Brodkorb, A. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food - an international consensus. *Food & Function*, *5*(6), 1113-1124.
- Minomo, A., Ishima, Y., Kragh-Hansen, U., Chuang, V. T., Uchida, M., Taguchi, K., Watanabe, H., Maruyama, T., Morioka, H., & Otagiri, M. (2011). Biological characteristics of two lysines on human serum albumin in the high-affinity binding of 4Z,15Z-bilirubin-IX α revealed by phage display. *The FEBS Journal*, *278*(21), 4100-4111.
- Mitra, S., Siddiqui, W. A., & Khandelwal, S. (2015). C-Phycocyanin protects against acute tributyltin chloride neurotoxicity by modulating glial cell activity along with its antioxidant and anti-inflammatory property: A comparative efficacy evaluation with N-acetyl cysteine in adult rat brain. *Chemico-Biological Interactions*, *238*, 138-150.
- Mortensen, A. (2006). Carotenoids and other pigments as natural colorants. *Pure and Applied Chemistry*, *78*(8), 1477–1491.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, *65*(1-2), 55-63.
- Mukerjee, P., & Ostrow, J. D. (2010). Review: Bilirubin pKa studies: new models and theories indicate high pKa values in water, dimethylformamide and DMSO. *BMC Biochemistry*, *11*, 15.

- Murphy, R. F., & O'Carra, P. (1970). Reversible denaturation of C-phycoerythrin. *Biochimica et Biophysica Acta*, 214(2), 371-373.
- Nagaoka, S., Shimizu, K., Kaneko, H., Shibayama, F., Morikawa, K., Kanamaru, Y., Otsuka, A., Hirahashi, T., & Kato, T. (2005). A novel protein C-phycoerythrin plays a crucial role in the hypocholesterolemic action of *Spirulina platensis* concentrate in rats. *Journal of Nutrition*, 135(10), 2425-2430.
- Nemoto-Kawamura, C., Hirahashi, T., Nagai, T., Yamada, H., Katoh, T., & Hayashi, O. (2004). Phycocyanin enhances secretory IgA antibody response and suppresses allergic IgE antibody response in mice immunized with antigen-entrapped biodegradable microparticles. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology (Tokyo)*, 50(2), 129-136.
- Nienhaus, G. U. (2005). *Protein-Ligand Interactions Methods and Applications*. New Jersey: Humana Press.
- Nishanth, R. P., Ramakrishna, B. S., Jyotsna, R. G., Roy, K. R., Reddy, G. V., Reddy, P. K., & Reddanna, P. (2010). C-Phycocyanin inhibits MDR1 through reactive oxygen species and cyclooxygenase-2 mediated pathways in human hepatocellular carcinoma cell line. *European Journal of Pharmacology*, 649(1-3), 74-83.
- Nozaki, A., Hori, M., Kimura, T., Ito, H., & Hatano, T. (2009). Interaction of polyphenols with proteins: binding of (-)-epigallocatechin gallate to serum albumin, estimated by induced circular dichroism. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin (Tokyo)*, 57(2), 224-228.
- Oettl, K., & Stauber, R. E. (2007). Physiological and pathological changes in the redox state of human serum albumin critically influence its binding properties. *British Journal of Pharmacology*, 151(5), 580-590.
- Ofori, J. A., & Hsieh, Y.-H. P. (2012). The Use of Blood and Derived Products as Food Additives In Y. El-Samragy (Ed.), *Food Additive*. Rijeka: InTech Europe.
- Ollinger, R., Kogler, P., Troppmair, J., Hermann, M., Wurm, M., Drasche, A., Konigsrainer, I., Amberger, A., Weiss, H., Ofner, D., Bach, F. H., & Margreiter, R. (2007). Bilirubin inhibits tumor cell growth via activation of ERK. *Cell Cycle*, 6(24), 3078-3085.
- Onufriev, A. V., & Alexov, E. (2013). Protonation and pK changes in protein-ligand binding. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 46(2), 181-209.
- Ou, B., Hampsch-Woodill, M., & Prior, R. L. (2001). Development and validation of an

- improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(10), 4619-4626.
- Oyaizu, M. (1986). Studies on product of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition*, 44, 307-315.
- Padyana, A. K., Bhat, V. B., Madyastha, K. M., Rajashankar, K. R., & Ramakumar, S. (2001). Crystal structure of a light-harvesting protein C-phycocyanin from *Spirulina platensis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 282(4), 893-898.
- Pandey, V. D., Pandey, A., & Sharma, V. (2013). Biotechnological applications of cyanobacterial phycobiliproteins. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 2(9), 89-97.
- Pangestuti, R., & Kim, S. K. (2011). Biological activities and health benefit effects of natural pigments derived from marine algae. *Journal of Functional Foods*, 3(4), 255-266.
- Pardhasaradhi, B. V., Ali, A. M., Kumari, A. L., Reddanna, P., & Khar, A. (2003). Phycocyanin-mediated apoptosis in AK-5 tumor cells involves down-regulation of Bcl-2 and generation of ROS. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2(11), 1165-1170.
- Penton-Rol, G., Martinez-Sanchez, G., Cervantes-Llanos, M., Lagumersindez-Denis, N., Acosta-Medina, E. F., Falcon-Cama, V., Alonso-Ramirez, R., Valenzuela-Silva, C., Rodriguez-Jimenez, E., Llopiz-Arzuaga, A., Marin-Prida, J., Lopez-Saura, P. A., Guillen-Nieto, G. E., & Penton-Arias, E. (2011). C-Phycocyanin ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis and induces regulatory T cells. *International Immunopharmacology*, 11(1), 29-38.
- Pérez-Vega, J. A., Olivera-Castillo, L., Gómez-Ruiz, J. Á., & Hernández-Ledesma, B. (2013). Release of multifunctional peptides by gastrointestinal digestion of sea cucumber (*Isostichopus badionotus*). *Journal of Functional Foods*, 5(2), 869-877.
- Peters, T. (1995). *All about Albumin*: Academic Press.
- Petersen, C. E., Ha, C. E., Harohalli, K., Feix, J. B., & Bhagavan, N. V. (2000). A dynamic model for bilirubin binding to human serum albumin. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(28), 20985-20995.
- Petitpas, I., Bhattacharya, A. A., Twine, S., East, M., & Curry, S. (2001). Crystal structure analysis of warfarin binding to human serum albumin: anatomy of drug site I. *The*

- Journal of Biological Chemistry*, 276(25), 22804-22809.
- Pu, Y.-M., McDonagh, A. F., & Lightner, D. (1993). Inversion of Circular Dichroism with a Drop of Chloroform. Unusual Chiroptical Properties of Aqueous Bilirubin-Albumin Solutions. *Journal of American Chemical Society*, 115 (2), 377-380
- Puangploy, P., Oaew, S., & Surareungchai, W. (2015). Development of Fluorescent Phycocyanin-Cu²⁺ Chemosensor for Detection of Homocysteine. *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics*, 5(4), 241-248.
- Quinn, K. D., Nguyen, N. Q., Wach, M. M., & Wood, T. D. (2012). Tandem mass spectrometry of bilin tetrapyrroles by electrospray ionization and collision-induced dissociation. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 26(16), 1767-1775.
- Ravi, M., Tentu, S., Baskar, G., Rohan Prasad, S., Raghavan, S., Jayaprakash, P., Jeyakanthan, J., Rayala, S. K., & Venkatraman, G. (2015). Molecular mechanism of anti-cancer activity of phycocyanin in triple-negative breast cancer cells. *BMC Cancer*, 15, 768.
- Reddy, C. M., Bhat, V. B., Kiranmai, G., Reddy, M. N., Reddanna, P., & Madyastha, K. M. (2000). Selective inhibition of cyclooxygenase-2 by C-phycocyanin, a biliprotein from *Spirulina platensis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 277(3), 599-603.
- Reddy, M. C., Subhashini, J., Mahipal, S. V., Bhat, V. B., Srinivas Reddy, P., Kiranmai, G., Madyastha, K. M., & Reddanna, P. (2003). C-Phycocyanin, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, induces apoptosis in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 304(2), 385-392.
- Remirez, D., Ledon, N., & Gonzalez, R. (2002). Role of histamine in the inhibitory effects of phycocyanin in experimental models of allergic inflammatory response. *Mediators of Inflammation*, 11(2), 81-85.
- Rimbau, V., Antoni Camins, Cheyla Romay, Gonzaaalez, R., & Pallas, M. (1999). Protective effects of C-phycocyanin against kainic acid-induced neuronal damage in rat hippocampus. *Neuroscience Letters*, 276, 75-78.
- Romay, C., Gonzalez, R., Ledon, N., Remirez, D., & Rimbau, V. (2003). C-phycocyanin: a biliprotein with antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective effects. *Current Protein and Peptide Science*, 4(3), 207-216.

- Romay, C., Ledon, N., & Gonzalez, R. (1999). Phycocyanin extract reduces leukotriene B4 levels in arachidonic acid-induced mouse-ear inflammation test. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 51(5), 641-642.
- Ross, P. D., & Subramanian, S. (1981). Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability. *Biochemistry*, 20(11), 3096-3102.
- Roy, K. R., Arunasree, K. M., Reddy, N. P., Dheeraj, B., Reddy, G. V., & Reddanna, P. (2007). Alteration of mitochondrial membrane potential by *Spirulina platensis* C-phycocyanin induces apoptosis in the doxorubicinresistant human hepatocellular-carcinoma cell line HepG2. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 47(Pt 3), 159-167.
- Saini, M. K., & Sanyal, S. N. (2012). PTEN regulates apoptotic cell death through PI3-K/Akt/GSK3beta signaling pathway in DMH induced early colon carcinogenesis in rat. *Experimental and Molecular Pathology*, 93(1), 135-146.
- Saini, M. K., & Sanyal, S. N. (2014). Targeting angiogenic pathway for chemoprevention of experimental colon cancer using C-phycocyanin as cyclooxygenase-2 inhibitor. *Biochemistry and Cell Biology*, 92(3), 206-218.
- Saini, M. K., & Sanyal, S. N. (2015). Cell cycle regulation and apoptotic cell death in experimental colon carcinogenesis: intervening with cyclooxygenase-2 inhibitors. *Nutrition and Cancer*, 67(4), 620-636.
- Saini, M. K., Vaiphei, K., & Sanyal, S. N. (2012). Chemoprevention of DMH-induced rat colon carcinoma initiation by combination administration of piroxicam and C-phycocyanin. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 361(1-2), 217-228.
- Samaranayaka, A. G. P., & Li-Chan, E. C. Y. (2011). Food-derived peptidic antioxidants: A review of their production, assessment, and potential applications. *Journal of Functional Foods*, 3(4), 229-254.
- Sanner, M. F. (1999). Python: a programming language for software integration and development. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 17(1), 57-61.
- Santini, C., Pellei, M., Gandin, V., Porchia, M., Tisato, F., & Marzano, C. (2014). Advances in copper complexes as anticancer agents. *Chemical Reviews*, 114(1), 815-862.
- Sarmadi, B. H., & Ismail, A. (2010). Antioxidative peptides from food proteins: a review. *Peptides*, 31(10), 1949-1956.

- Sastre, S., Casasnovas, R., Muñoz, F., & Frau, J. (2012). Isodesmic reaction for pK a calculations of common organic molecules. *Theoretical Chemistry Accounts*, 132(2), 1-8.
- Scheer, H., & Kufer, W. (1977). Conformational Studies on C-Phycocyanin from *Spirulina platensis*. *Zeitschrift für Naturforschung*, 32c, 513-519.
- Scheer, H., & Zhao, K. H. (2008). Biliprotein maturation: the chromophore attachment. *Molecular Microbiology*, 68(2), 263-276.
- Serafini, M., Ghiselli, A., & Ferro-Luzzi, A. (1996). In vivo antioxidant effect of green and black tea in man. *European Journal of Clinical Nutrition*, 50(1), 28-32.
- Shih, C. M., Cheng, S. N., Wong, C. S., Kuo, Y. L., & Chou, T. C. (2009). Antiinflammatory and antihyperalgesic activity of C-phycocyanin. *Anesthesia & Analgesia*, 108(4), 1303-1310.
- Sjodin, T., Hansson, R., & Sjöholm, I. (1977). Isolation and identification of a trypsin-resistant fragment of human serum albumin with bilirubin- and drug-binding properties. *Biochimica et Biophysica Acta*, 494(1), 61-75.
- Sonani, R. R., Rastogi, R. P., Patel, R., & Madamwar, D. (2016). Recent advances in production, purification and applications of phycobiliproteins. *World Journal of Biological Chemistry*, 7(1), 100-109.
- Sotiroudis, T., & Sotiroudis, G. (2013). Health aspects of *Spirulina* (*Arthrospira*) microalga food supplement. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 78(3), 395-405.
- Sousa, S. F., Fernandes, P. A., & Ramos, M. J. (2006). Protein-ligand docking: current status and future challenges. *Proteins*, 65(1), 15-26.
- Stocker, R., McDonagh, A. F., Glazer, A. N., & Ames, B. N. (1990). Antioxidant activities of bile pigments: biliverdin and bilirubin. *Methods in Enzymology*, 186, 301-309.
- Stojadinovic, M., Pieters, R., Smit, J., & Velickovic, T. C. (2014). Cross-linking of beta-lactoglobulin enhances allergic sensitization through changes in cellular uptake and processing. *Toxicological Sciences*, 140(1), 224-235.
- Stojadinovic, M., Radosavljevic, J., Ognjenovic, J., Vesic, J., Prodic, I., Stanic-Vucinic, D., & Cirkovic Velickovic, T. (2013). Binding affinity between dietary polyphenols and beta-lactoglobulin negatively correlates with the protein susceptibility to digestion and total antioxidant activity of complexes formed. *Food Chemistry*, 136(3-4), 1263-1271.

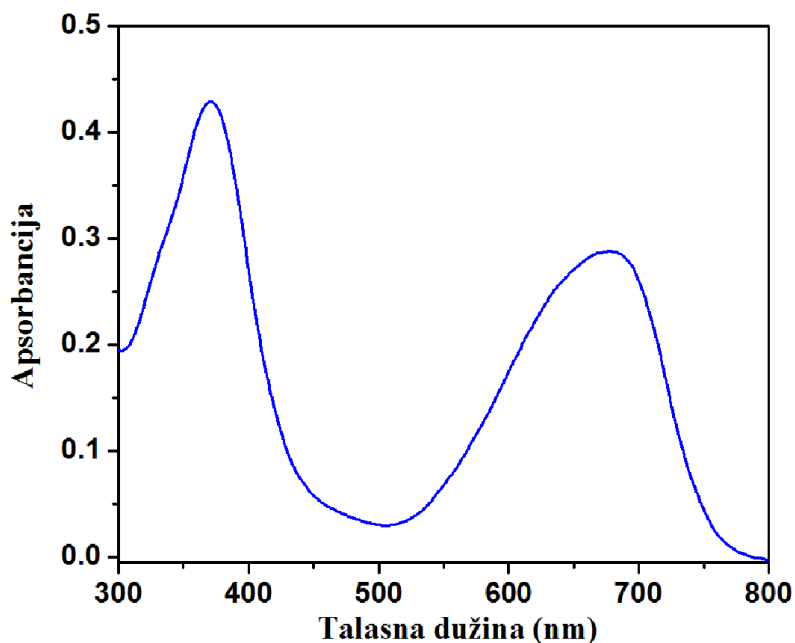
- Strasky, Z., Zemankova, L., Nemeckova, I., Rathouska, J., Wong, R. J., Muchova, L., Subhanova, I., Vanikova, J., Vanova, K., Vitek, L., & Nachtigal, P. (2013). Spirulina platensis and phycocyanobilin activate atheroprotective heme oxygenase-1: a possible implication for atherogenesis. *Food & Function*, 4(11), 1586-1594.
- Sudlow, G., Birkett, D. J., & Wade, D. N. (1975). The characterization of two specific drug binding sites on human serum albumin. *Molecular Pharmacology*, 11(6), 824-832.
- Sugio, S., Kashima, A., Mochizuki, S., Noda, M., & Kobayashi, K. (1999). Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution. *Protein Engineering*, 12(6), 439-446.
- Sułkowska, A. (2002). Interaction of drugs with bovine and human serum albumin. *Journal of Molecular Structure*, 614(1-3), 227-232.
- Suresh, M., Mishra, S. K., Mishra, S., & Das, A. (2009). The detection of Hg²⁺ by cyanobacteria in aqueous media. *Chemical Communications*, 2009(18), 2496-2498.
- Thomas, K., Aalbers, M., Bannon, G. A., Bartels, M., Dearman, R. J., Esdaile, D. J., Fu, T. J., Glatt, C. M., Hadfield, N., Hatzos, C., Hefle, S. L., Heylings, J. R., Goodman, R. E., Henry, B., Herouet, C., Holsapple, M., Ladics, G. S., Landry, T. D., MacIntosh, S. C., Rice, E. A., Privalle, L. S., Steiner, H. Y., Teshima, R., Van Ree, R., Woolhiser, M., & Zawodny, J. (2004). A multi-laboratory evaluation of a common in vitro pepsin digestion assay protocol used in assessing the safety of novel proteins. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 39(2), 87-98.
- Trott, O., & Olson, A. J. (2010). AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*, 31(2), 455-461.
- Trull, F. R., Ibars, O., & Lightner, D. A. (1992). Conformation inversion of bilirubin formed by reduction of the biliverdin-human serum albumin complex: evidence from circular dichroism. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 298(2), 710-714.
- Tsopmo, A., Romanowski, A., Banda, L., Lavoie, J. C., Jenssen, H., & Friel, J. K. (2011). Novel anti-oxidative peptides from enzymatic digestion of human milk. *Food Chemistry*, 126(3), 1138-1143.
- Tu, P.H., Yao, Y.H., Li, Y.L., & Liu, B. (2009). Conformational flexibility of phycocyanobilin: Monte-Carlo and DFT study. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, 894(1-3), 9-13.

- Udenigwe, C. C., & Aluko, R. E. (2012). Food protein-derived bioactive peptides: production, processing, and potential health benefits. *Journal of Food Science*, 77(1), R11-24.
- Untersmayr, E., & Jensen-Jarolim, E. (2008). The role of protein digestibility and antacids on food allergy outcomes. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 121(6), 1301-1308.
- Vadiraja, B. B., Gaikwad, N. W., & Madyastha, K. M. (1998). Hepatoprotective effect of C-phycocyanin: protection for carbon tetrachloride and R-(+)-pulegone-mediated hepatotoxicity in rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 249(2), 428-431.
- Varshney, A., Sen, P., Ahmad, E., Rehan, M., Subbarao, N., & Khan, R. H. (2010). Ligand binding strategies of human serum albumin: how can the cargo be utilized? *Chirality*, 22(1), 77-87.
- Voltolini, S., Spigno, F., Cioe, A., Cagnati, P., Bignardi, D., & Minale, P. (2013). Bovine Serum Albumin: a double allergy risk. *European Annals of Allergy and Clinical Immunology*, 45(4), 144-147.
- Wang, H., Liu, Y., Gao, X., Carter, C. L., & Liu, Z. R. (2007). The recombinant beta subunit of C-phycocyanin inhibits cell proliferation and induces apoptosis. *Cancer Letters*, 247(1), 150-158.
- Wei, Y. L., Li, J. Q., Dong, C., Shuang, S. M., Liu, D. S., & Huie, C. W. (2006). Investigation of the association behaviors between biliverdin and bovine serum albumin by fluorescence spectroscopy. *Talanta*, 70(2), 377-382.
- Wickham, M., Faulks, R., & Mills, C. (2009). In vitro digestion methods for assessing the effect of food structure on allergen breakdown. *Molecular Nutrition & Food Research*, 53(8), 952-958.
- Williams, M. A., & Daviter, T. (2013). *Protein-Ligand Interactions Methods and Applications*. New York: Springer.
- Wu, L.C., Lin, Y.Y., Yang, S.Y., Weng, Y.T., & Tsai, Y.T. (2011). Antimelanogenic effect of c-phycocyanin through modulation of tyrosinase expression by upregulation of ERK and downregulation of p38 MAPK signaling pathways. *Journal of Biomedical Science*, 18(74).
- Wybranowski, T., Cyrankiewicz, M., Ziomkowska, B., & Kruszewski, S. (2008). The HSA affinity of warfarin and flurbiprofen determined by fluorescence anisotropy

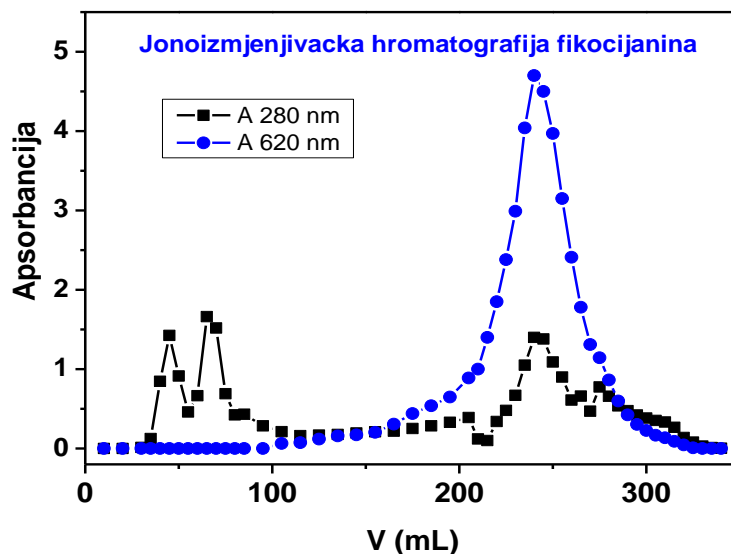
- measurements of camptothecin. *Biosystems*, 94(3), 258-262.
- Xie, H., & Kang, Y. J. (2009). Role of copper in angiogenesis and its medicinal implications. *Current Medicinal Chemistry*, 16(10), 1304-1314.
- Yamamoto, T., Fukui, N., Hori, A., & Matsui, V. (2006). Circular dichroism and fluorescence spectroscopy studies of the effect of cyclodextrins on the thermal stability of chicken egg white lysozyme in aqueous solution. *Journal of Molecular Structure*, 782, 60-66.
- Yan, S.-G., Zhu, L.-P., Su, H.-N., Zhang, X.-Y., Chen, X.-L., Zhou, B.-C., & Zhang, Y.-Z. (2010). Single-step chromatography for simultaneous purification of C-phycoerythrin and allophycoerythrin with high purity and recovery from *Spirulina (Arthrospira) platensis*. *Journal of Applied Phycology*, 23(1), 1-6.
- Ying, J., Wang, J., Ji, H., Lin, C., Pan, R., Zhou, L., Song, Y., Zhang, E., Ren, P., Chen, J., Liu, Q., Xu, T., Yi, H., Li, J., Bao, Q., Hu, Y., & Li, P. (2016). Transcriptome analysis of phycoerythrin inhibitory effects on SKOV-3 cell proliferation. *Gene*, 585(1), 58-64.
- You, L., Zhao, M., Liu, R. H., & Regenstein, J. M. (2011). Antioxidant and antiproliferative activities of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) peptides prepared by papain digestion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(14), 7948-7953.
- You, S.-J., Udenigwe, C. C., Aluko, R. E., & Wu, J. (2010). Multifunctional peptides from egg white lysozyme. *Food Research International*, 43(3), 848-855.
- Zaidi, N., Ajmal, M. R., Rabbani, G., Ahmad, E., & Khan, R. H. (2013). A comprehensive insight into binding of hippuric acid to human serum albumin: a study to uncover its impaired elimination through hemodialysis. *PLoS One*, 8(8), e71422.
- Zhang, J., Zhuang, S., Tong, C., & Liu, W. (2013). Probing the molecular interaction of triazole fungicides with human serum albumin by multispectroscopic techniques and molecular modeling. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(30), 7203-7211.
- Zhang, Y.-M., & Chen, F. (1999). A simple method for efficient separation and purification of c-phycoerythrin and allophycoerythrin from *Spirulina platensis*. *Biotechnology Techniques*, 13, 601-603.
- Zhanga, J., Weixiao Chen, Tang, B., Zhang, W., Chen, L., Ying Duan, Zhu, Y., Zhu, Y., & Zhanga, Y. (2016). Interactions of 1-hydroxypyrene with bovine serum albumin: Insights from multi-spectroscopy, docking and molecular dynamics simulation methods. *RSC*

- Advances*, 6, 23622-23633.
- Zheng, J., Inoguchi, T., Sasaki, S., Maeda, Y., McCarty, M. F., Fujii, M., Ikeda, N., Kobayashi, K., Sonoda, N., & Takayanagi, R. (2013). Phycocyanin and phycocyanobilin from *Spirulina platensis* protect against diabetic nephropathy by inhibiting oxidative stress. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 304(2), R110-120.
- Zheng, L., Zhao, Y., Dong, H., Su, G., & Zhao, M. (2016). Structure–activity relationship of antioxidant dipeptides: Dominant role of Tyr, Trp, Cys and Met residues. *Journal of Functional Foods*, 21, 485-496.
- Zhou, Z. P., Liu, L.-N., Chen, X.-L., Wang, J. X., Chen, M., Zhang, Y. Z., & Zhou, B. C. (2005). Factors that effect antioxidant activity of C-phycocyanin from *Spirulina Platensis*. *Journal of Food Biochemistry*, 29, 313-322.
- Zsila, F. (2013). Subdomain IB is the third major drug binding region of human serum albumin: toward the three-sites model. *Molecular Pharmaceutics*, 10(5), 1668-1682.
- Zunszain, P. A., Ghuman, J., McDonagh, A. F., & Curry, S. (2008). Crystallographic analysis of human serum albumin complexed with 4Z,15E-bilirubin-IXalpha. *Journal of Molecular Biology*, 381(2), 394-406.

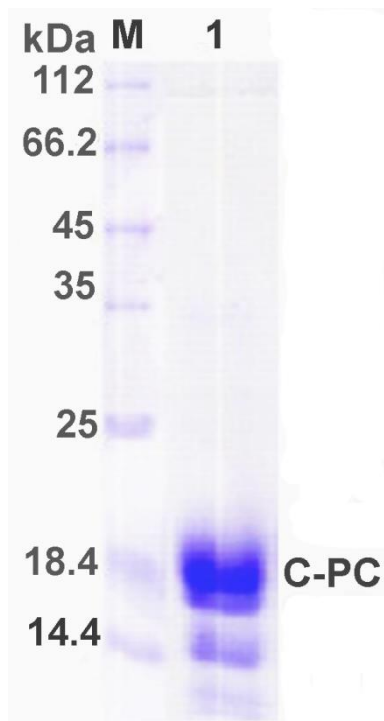
8. Prilog



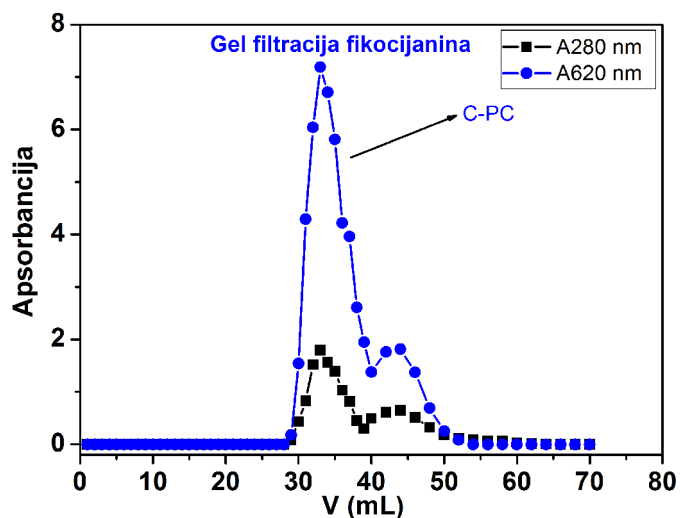
Slika P0A. Apsorpcioni spektar izolovanog preparata PCB-a u smiješi metanol:HCl (19:1; v:v).



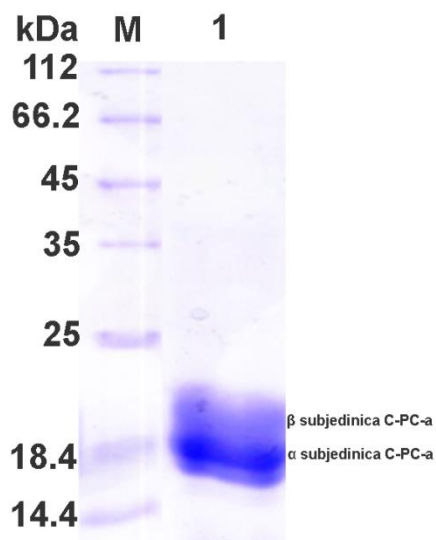
Slika P0B. Hromatografski profil nakon jonoizmjenjivačke hromatografije sirove C-PC frakcije na koloni DEAE-Sepharose CL-6B. Uslovi rada: kolona 13 x 2.2 cm je ekvilibrisana sa 40 mM natrijum-fosfatnim puferom, pH 6.8, koji je sadržao 1 mM NaN_3 . Protok je sve vrijeme održavan na 1 mL/min, zapremina sakupljenih frakcija je bila 4 mL. Na ekvilibrisanu kolonu je nanošeno 10 mL rastvora proteina, koncentracije 10 mg/mL. Nevezani proteini su eluirani sa kolone za jednom zapreminom kolone, tj. 50 mL pufera za ekvilibraciju. Nakon toga je urađena elucija za matriks vezanih fikocijanina linearnim gradijentom jonske sile (0-0.5 M NaCl) sa šest zapreminom kolone.



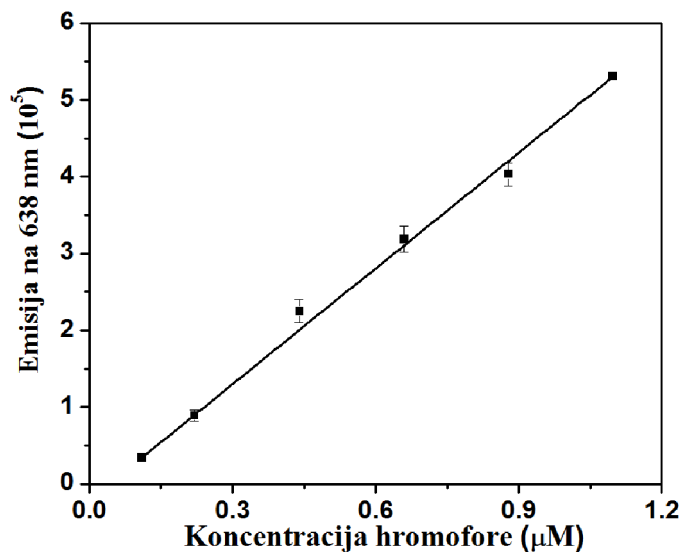
Slika P0C. Elektroforegram frakcije C-PC-a nakon jonoizmjenjivačke hromatografije, dobijen pomoću SDS-PAGE (14% PAA gel): 1 - frakcija; M - proteinski markeri. Za eksperimentalne detalje vidjeti odeljak 3.2.4.



Slika P0D. Hromatografski profil nakon gel filtracije rastvora C-PC-a na Sephadex G-100 koloni. Uslovi rada: kolona dimenzija 70 x 1.4 cm, ekvilibrisana i eluirana 50 mM natrijum-fosfatnim puferom pH=7.0, koji je sadržao 150 mM NaCl i 1 mM NaN₃; protok 0.1 mL/min, zapremina sakupljenih frakcija 1 mL. Na kolonu je nanošeno 1 mL (20 mg/mL) rastvora proteina.



Slika POE. Primjer elektroforegrama (SDS-PAGE; 14% PAA gel) prečišćene frakcije nakon gel filtracije. 1-frakcija sa $V_e=32$ mL (slika S0D); 2-proteinski markeri. Dvije trake u koloni 1 potiču od dvije subjedinice C-PC-a: na osnovu položaja markera od 18 kDa, sa slike se vidi da α subjedinica ima malo manju, a β subjedinica malo veću masu od 18 kDa, što je u skladu sa literaturnim podacima, prema kojima masa α subjedinice iznosi oko 17 kDa, dok je masa β subjedinice oko 19 kDa. Za eksperimentalne detalje vidjeti odeljak 3.2.4.



SlikaPOF. Standardna prava za određivanje koncentracije hromopeptida (ekscitacija na 578 nm). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija ($n=3$).

Tabela P1A. MS spektar frakcije I, nakon 24-časovne digestije C-PC-a pepsinom. PCB je vezan za cisteinski ostatak peptida. * Deamidacija glutaminskog ostatka (0.98476).

m/z	z	Eksperimentalna masa	Teorijska masa	Δ mase	Sekvenca
505.9951	4	2019.9491	2018.9632	0.9859*	AADQRGKDKCARD-PCB
674.3265	3	2019.9734	2018.9632	1.0102*	AADQRGKDKCARD-PCB
404.9977	5	2019.9494	2018.9632	0.9861*	AADQRGKDKCARD-PCB
587.2895	1	586.2817	586.2791	0.0026	PCB

Tabela P1B. Fragmnetacija (MS2 spektar) molekuskog jona sa m/z odnosom 506.00 (z=4) iz MS spektra frakcije I. * Deamidacija glutaminskog ostatka (0.98476).

m/z	z	Eksperimentalna masa	Teorijska masa	Δ mase	Sekvenca
478.5677	3	1432.6796	1432.6841	-0.0045	AADQRGKDKCARD
650.6492	3	1948.9241	1947.9256	0.9985*	ADQRGKDKCARD-PCB
626.9698	3	1877.88591	1876.8885	0.9974*	DQRGKDKCARD-PCB
519.5899	3	1555.74621	1555.7856	-0.0394	AADQRGKDKC-PCB
587.2854	1	586.2776	586.279136	-0.0016	PCB
646.3108	2	1290.6216	1290.5990	0.0226	DQRGKDKCARD

Tabela P1C. Fragmentacija (MS3 spektar) jona sa m/z odnosom 487.57 (z=3) iz MS2 spektra jona sa m/z odnosom 506.00 (z=4) i AADQRGKDKCARD sekvencom bez PCB-a (MS2 506.00, MS3 478.57).

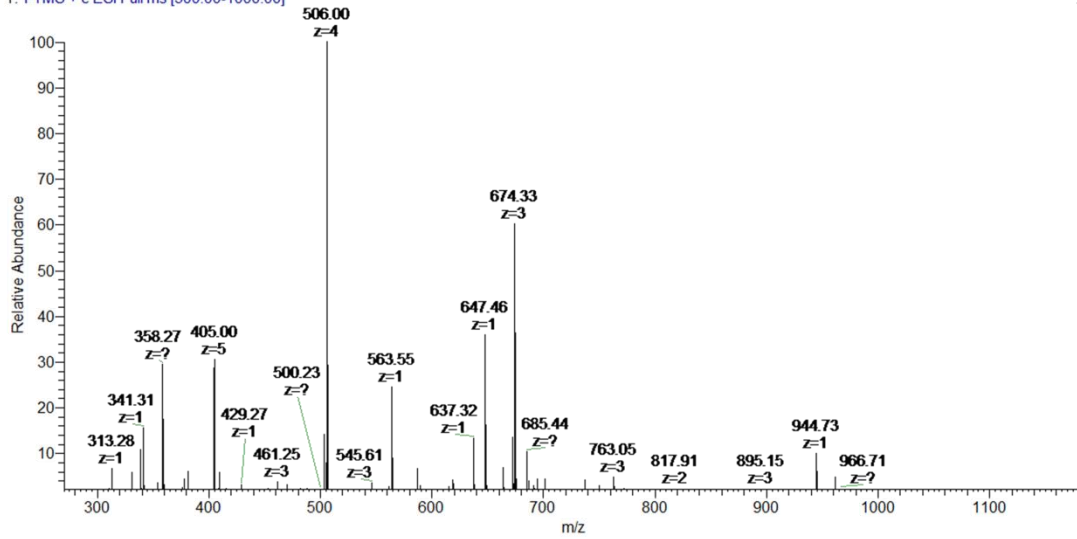
m/z	z	Eksperimentalna masa	Teorijska masa	Δ mase	Tip jona
143.081	1	142.0732	142.0737	-0.0005	B2 1+
258.1076	1	257.0998	257.1006	-0.0008	B3 1+
386.1915	1	385.1837	385.1592	0.0245	B4 1+
542.2661	1	541.2583	541.2603	-0.0020	B5 1+
599.2872	1	598.2794	598.2818	-0.0024	B6 1+
727.382	1	726.3742	726.3768	-0.0026	B7 1+
842.4087	1	841.4009	841.4037	-0.0028	B8 1+
364.1946	2	726.3735	726.3761	-0.0026	B7 2+
421.7078	2	841.3999	841.4031	-0.0032	B8 2+
485.7549	2	969.4941	969.4981	-0.0040	B9 2+
537.2594	2	1072.503	1072.507	-0.0042	B10 2+
434.2212	3	1299.6401	1299.6449	-0.0048	B12 3+
707.3116	1	706.3038	706.3063	-0.0025	Y6 1+
592.2849	1	591.2771	591.2794	-0.0023	Y5 1+
464.1905	1	463.1827	463.1844	-0.0017	Y4 1+
361.1817	1	360.1739	360.1752	-0.0013	Y3 1+
681.8283	2	1361.641	1361.646	-0.0050	Y12 2+
646.3099	2	1290.604	1290.609	-0.0046	Y11 2+
588.7965	2	1175.577	1175.582	-0.0044	Y10 2+
524.7675	2	1047.519	1047.523	-0.0040	Y9 2+
446.7172	2	891.4187	891.4221	-0.0034	Y8 2+
418.2066	2	834.3975	834.4007	-0.0032	Y7 2+
354.1594	2	706.3031	706.3057	-0.0026	Y6 2+
296.6461	2	591.2765	591.2787	-0.0022	Y5 2+
454.8878	3	1361.64	1361.645	-0.0054	Y12 3+
431.2090	3	1290.604	1290.608	-0.0048	Y11 3+
392.8667	3	1175.577	1175.581	-0.0048	Y10 3+

Tabela P1D. Fragmentacija (MS3 spektar) jona sa m/z odnosom 587.29 (z=1) iz MS2 spektra jona sa m/z odnosom 506.00 (z=4) (MS2 506.00, MS3 587.29).

m/z	z	Eksperimentalna masa	Teorijska masa	Δ mase	Struktura
464.2160	1	464.2160	464.2185	-0.0025	$C_{26}H_{30}N_3O_5$ (PCB sa jednim pirolom manje)
299.1379	1	299.1379	299.1396	-0.0017	$C_{17}H_{19}N_2O_3$ (polovina molekula PCB-a)
271.1435	1	271.1435	271.1447	0.0012	$C_{16}H_{19}N_2O_2$ (polovina molekula PCB-a bez CO grupe)

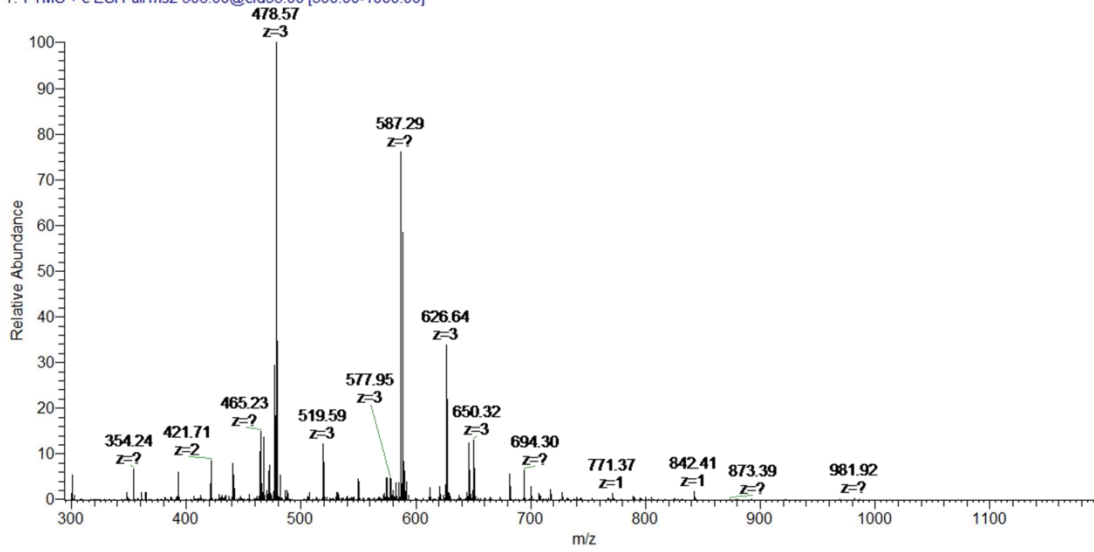
OB3465 #97-100 RT: 1.41-1.46 AV: 4 NL: 2.11E7
T: FTMS + c ESI Full ms [300.00-1000.00]

A

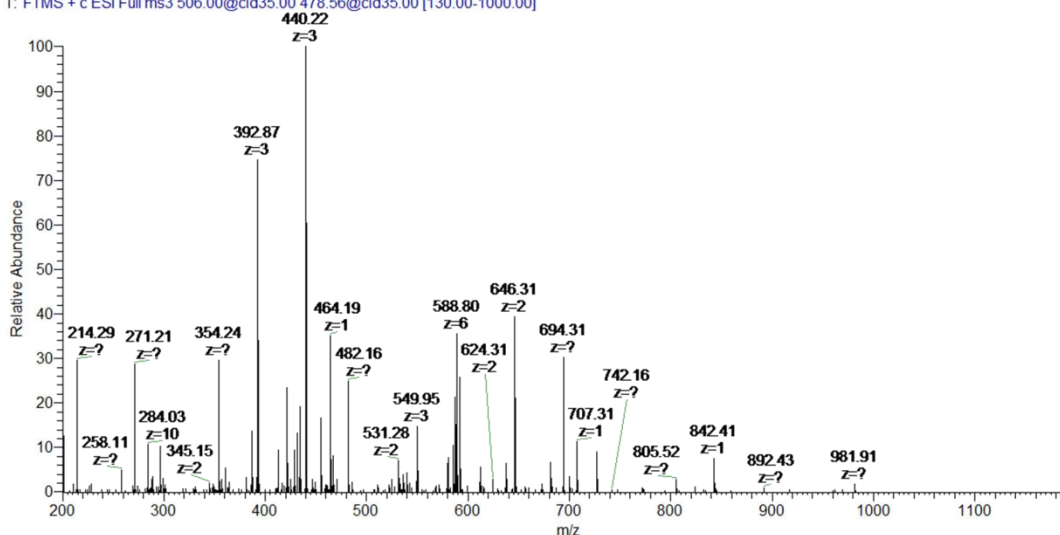


OB3465 #167 RT: 2.51 AV: 1 NL: 5.12E6
T: FTMS + c ESI Full ms2 506.00@cid35.00 [300.00-1000.00]

B

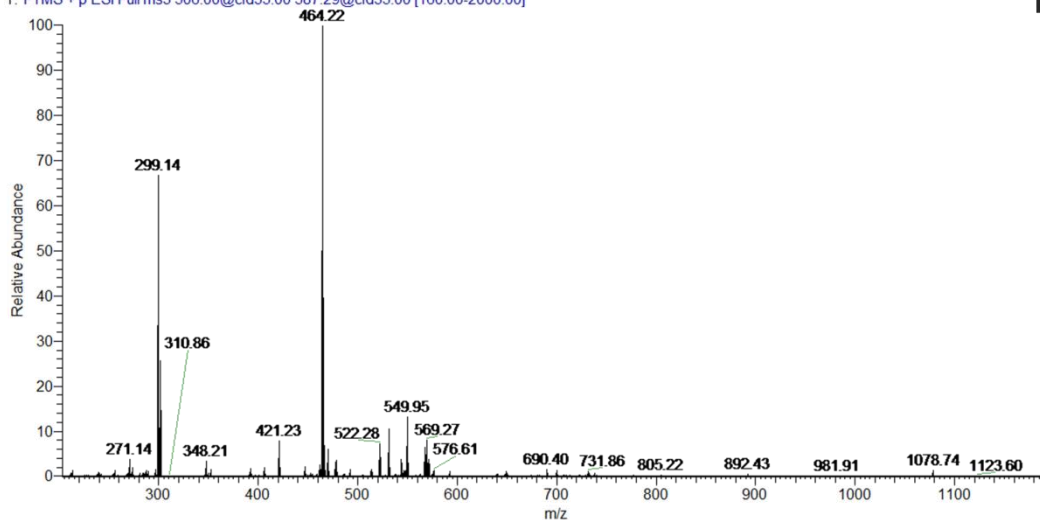


OB3465 #282 RT: 3.98 AV: 1 NL: 1.18E6
T: FTMS + c ESI Full ms3 506.00@cid35.00 478.56@cid35.00 [130.00-1000.00]



C

OB03437 #1-67 RT: 0.01-0.81 AV: 67 NL: 7.95E6
T: FTMS + p ESI Full ms3 506.00@cid35.00 587.29@cid35.00 [160.00-2000.00]



D

Slika P1. (A) MS spektar frakcije I, nakon 24-časovne digestije C-PC-a pepsinom. Pikovi sa m/z odnosima 405.00, 506.00 i 473.33 potiču od AADQRGKDKCARD hromopeptida; (B) MS2 spektar molekuskog jona sa m/z odnosom 506.00 (z=4) iz MS spektra frakcije I; (C) MS3 spektar molekuskog jona sa m/z odnosom 478.57 (z=3) iz MS2 spektra jona sa m/z odnosom 506.00 (z=4), koji predstavlja AADQRGKDKCARD sekvencu bez PCB-a; (D) Fragmentacija (MS3 spektar) jona sa m/z odnosom 587.29 (z=1) iz MS2 spektra jona sa m/z odnosom 506.00 (z=4), koji predstavlja PCB.

Tabela P2A. MS spektar frakcije II, nakon 24-časovne digestije C-PC-a pepsinom. PCB je vezan za cisteinski ostatak peptida.

m/z	z	Eksperimentalna masa	Teorijska masa	Δ mase	Sekvenca
412.2027	3	1233.5846	1233.5852	-0.0006	AACLRD-PCB
617.7999	2	1233.5841	1233.5852	-0.0011	AACLRD-PCB
546.7628	2	1091.5099	1091.511036	-0.0011	CLRD-PCB
587.2869	1	586.2791	586.2791	0.0000	PCB

Tabela P2B. Fragmentacija (MS2 spektar) molekuskog jona sa m/z odnosom 617.80 (z=2) iz MS spektra frakcije II, koji predstavlja AACLRD-PCB.

m/z	z	Eksperimentalna masa	Teorijska masa	Δ mase	Sekvenca
648.3123	1	647.30447	647.3061	-0.0016	AACLRD
587.2855	1	586.2778	586.2791	-0.0015	PCB
464.2175	1	463.2175	464.2185	-0.0010	C ₂₆ H ₃₀ N ₃ O ₅ (PCB sa jednim pirolom manje)
299.13	1	298.1387	299.1396	-0.0009	C ₁₇ H ₁₉ N ₂ O ₃ (polovina molekula PCB-a)

Tabela P2C. Fragmentacija (MS3 spektar) jona sa m/z odnosom 648.31 (z=1) iz MS2 spektra jona sa m/z odnosom 617.80 (z=2), koji predstavlja AACLRD sekvencu bez PCB-a (MS2 617.80, MS3 648.31).

m/z	z	Eksperimentalna masa	Teorijska masa	Δ mase	Tip jona
246.0896	1	245.0818	245.0829	-0.0011	b3 1+
359.1733	1	358.1655	358.167	-0.0015	b4 1+
515.2737	1	514.2659	514.2681	-0.0022	b5 1+
577.2739	1	576.2661	576.2685	-0.0024	y5 1+
506.2372	1	505.2294	505.2313	-0.0019	y4 1+
403.2283	1	402.2205	402.2222	-0.0017	y3 1+
290.1447	1	289.1369	289.1381	-0.0012	y2 1+

Tabela P2D. Fragmentacija (MS3 spektar) jona sa m/z odnosom 587.29 (z=1) iz MS2 spektra jona sa m/z odnosom 617.80 (z=2), koji predstavlja PCB (MS2 617.80, MS3 587.29).

m/z	z	Eksperimentalna masa	Teorijska masa	Δ mase	Struktura
464.2162	1	464.2162	464.2185	-0.0023	C ₂₆ H ₃₀ N ₃ O ₅ (PCB sa jednim pirolom manje)
299.1381	1	299.1381	299.1396	-0.0015	C ₁₇ H ₁₉ N ₂ O ₃ (polovina molekula PCB-a)
271.1433	1	271.1433	271.1447	-0.0014	C ₁₆ H ₁₉ N ₂ O ₂ (polovina molekula PCB-a bez CO grupe)

Tabela P2E. Fragmentacija (MS2 spektra) molekuskog jona sa m/z odnosom 546.76 (z=2) iz MS spektra frakcije II, koji predstavlja CLRD-PCB.

m/z	z	Eksperimentalna masa	Teorijska masa	Δ mase	Sekvenca
506.2383	1	505.2305	505.2319	-0.0014	CLRD
587.2853	1	586.2775	586.2791	-0.0017	PCB

Tabela P2F. Fragmentacija (MS3 spektra) jona sa m/z odnosom 506.23 (z=1) iz MS2 spektra jona sa m/z odnosom 546.76, koji predstavlja CLRD sekvencu bez PCB-a (MS2 546.76, MS3 506.23).

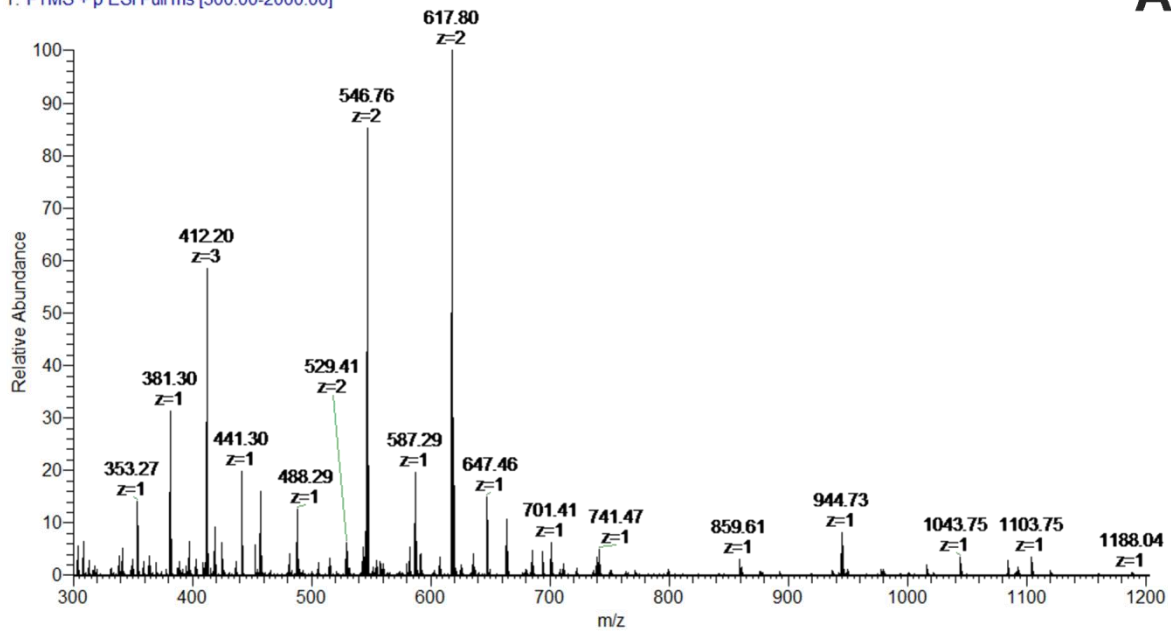
m/z	z	Eksperimentalna masa	Teorijska masa	Δ mase	Tip jona
217.0997	1	216.0919	216.0927	-0.0008	b2 1+
373.2001	1	372.1923	372.1938	-0.0015	b3 1+
403.2283	1	402.2205	402.2222	-0.0017	y3 1+
290.1448	1	289.137	289.1381	-0.0011	Y2 1+

Tabela P2G. Fragmentacija (MS3 spektar) jona sa m/z odnosom 587.29 (z=1) iz MS2 spektra jona sa m/z odnosom 546.76 (z=2), koji predstavlja PCB (MS2 546.76, MS3 587.29).

m/z	z	Eksperimentalna masa	Teorijska masa	Δ mase	Struktura
464.2159	1	464.2159	464.2185	-0.0026	$C_{26}H_{30}N_3O_5$ (PCB sa jednim pirolom manje)
299.1379	1	299.1379	299.1396	-0.0017	$C_{17}H_{19}N_2O_3$ (polovina molekula PCB-a)
271.1432	1	271.1432	271.1447	-0.0015	$C_{16}H_{19}N_2O_2$ (polovina molekula PCB-a bez CO grupe)

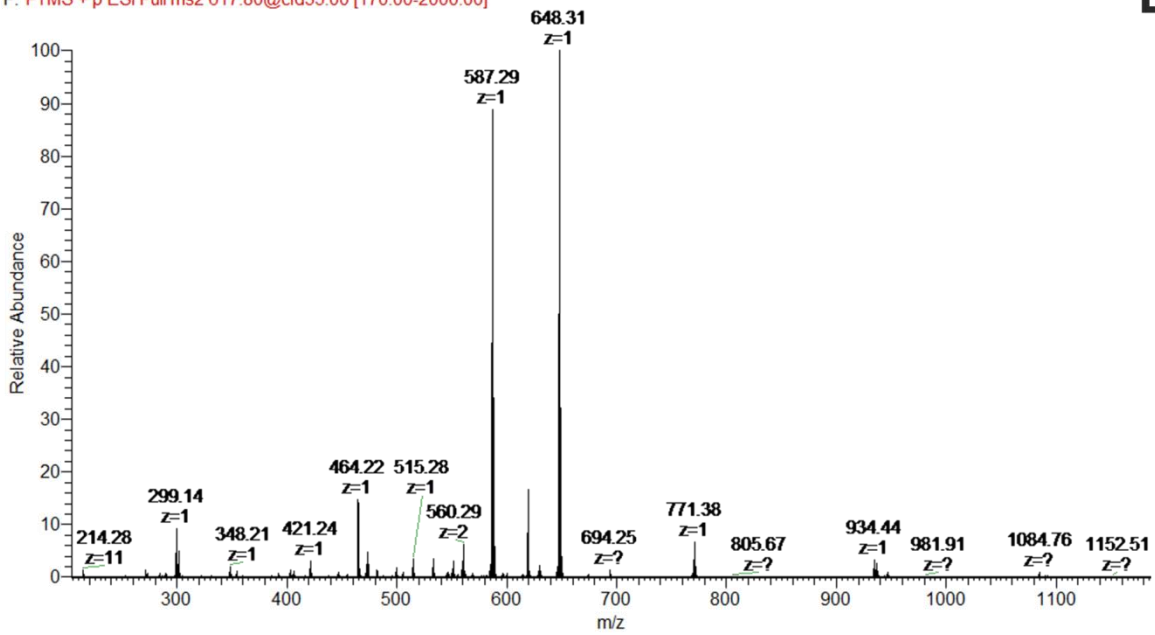
OB3473 #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 1.90E7
T: FTMS + p ESI Full ms [300.00-2000.00]

A



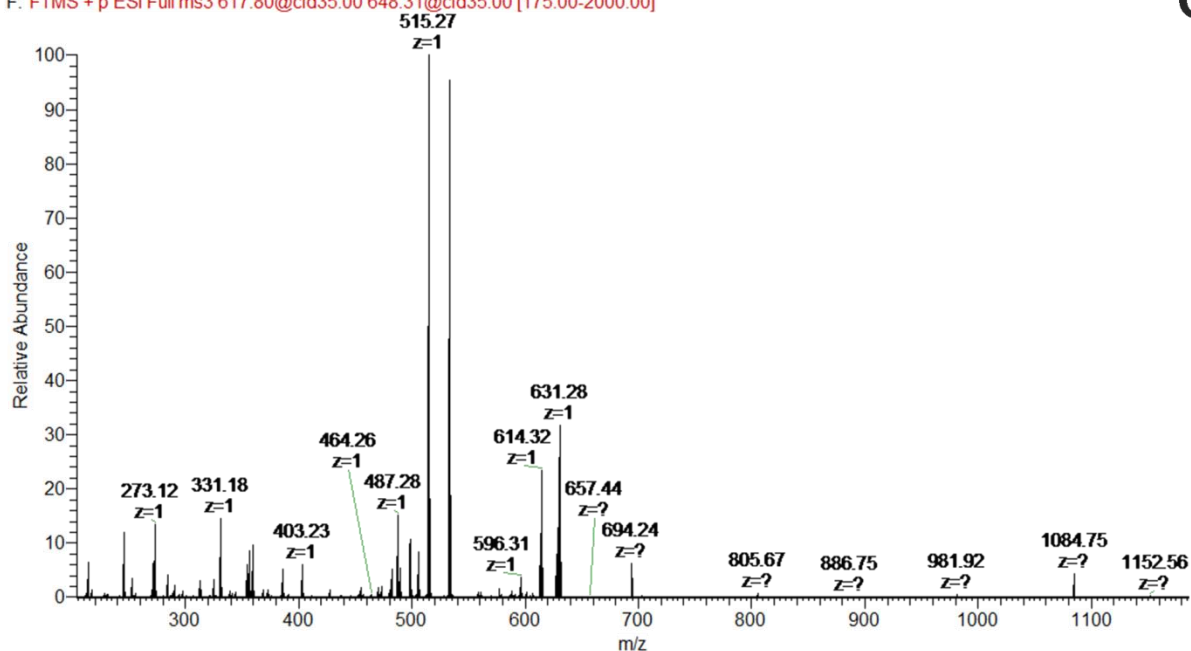
OB3474 #497-700 RT: 8.83-9.44 AV: 37 NL: 7.91E6
F: FTMS + p ESI Full ms2 617.80@cid35.00 [170.00-2000.00]

B



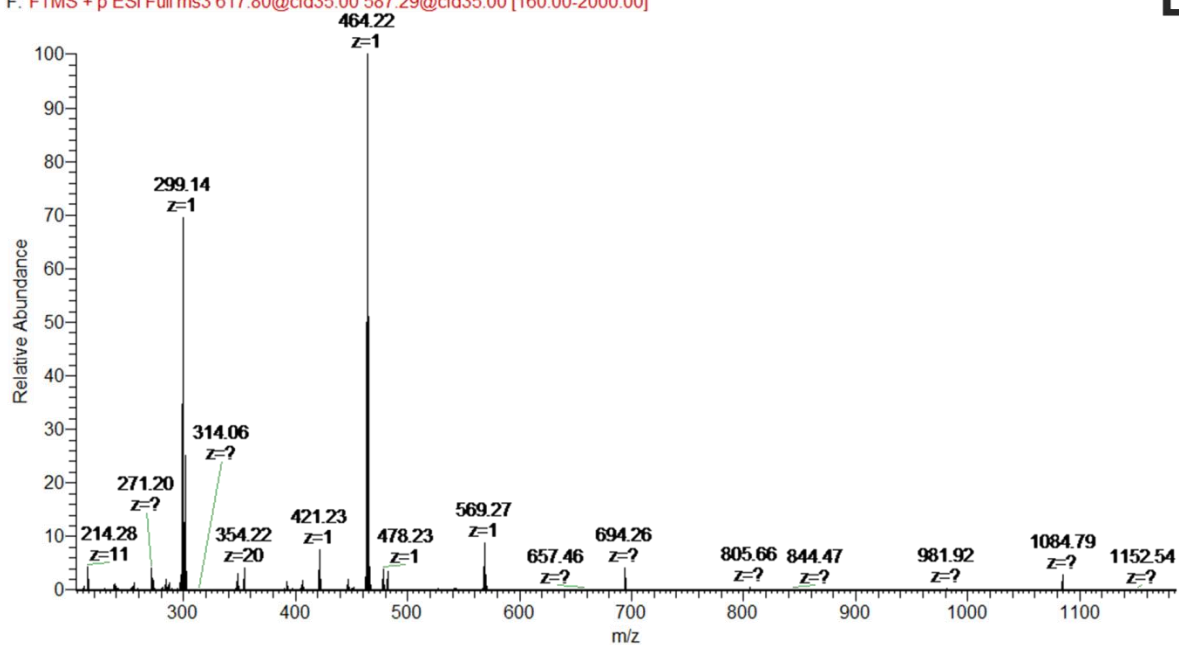
OB3474 #489-700 RT: 9.97-10.55 AV: 32 NL: 1.62E6
F: FTMS + p ESI Full ms3 617.80@cid35.00 648.31@cid35.00 [175.00-2000.00]

C



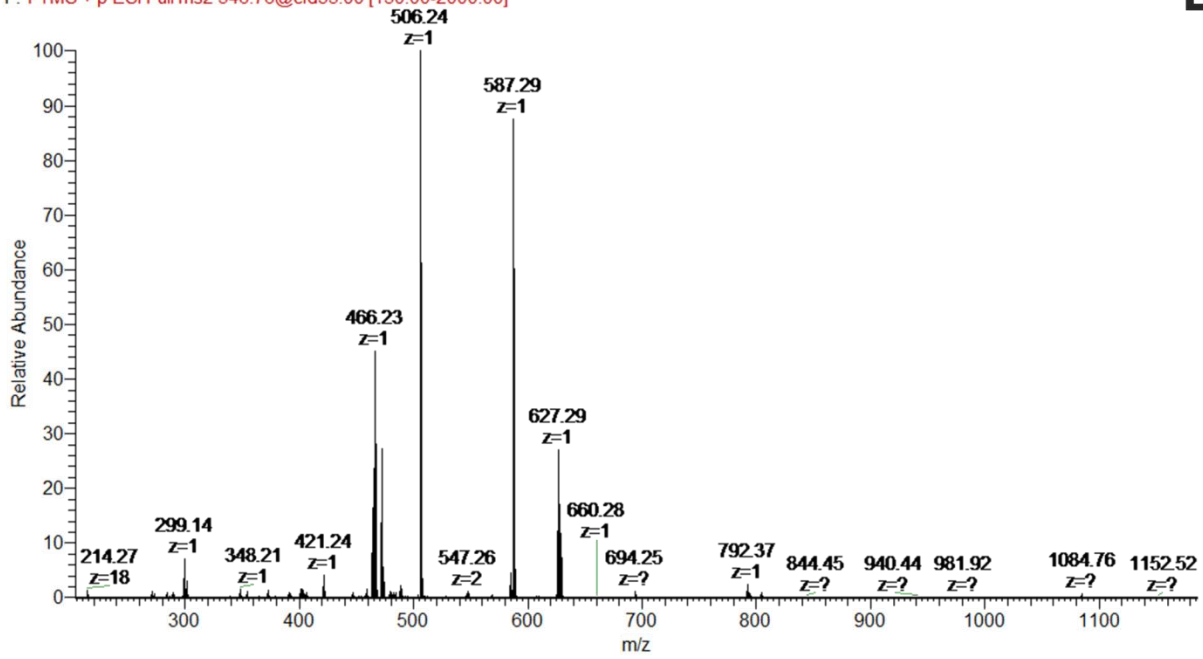
OB3474 #518-700 RT: 9.46-9.94 AV: 27 NL: 3.31E6
F: FTMS + p ESI Full ms3 617.80@cid35.00 587.29@cid35.00 [160.00-2000.00]

D



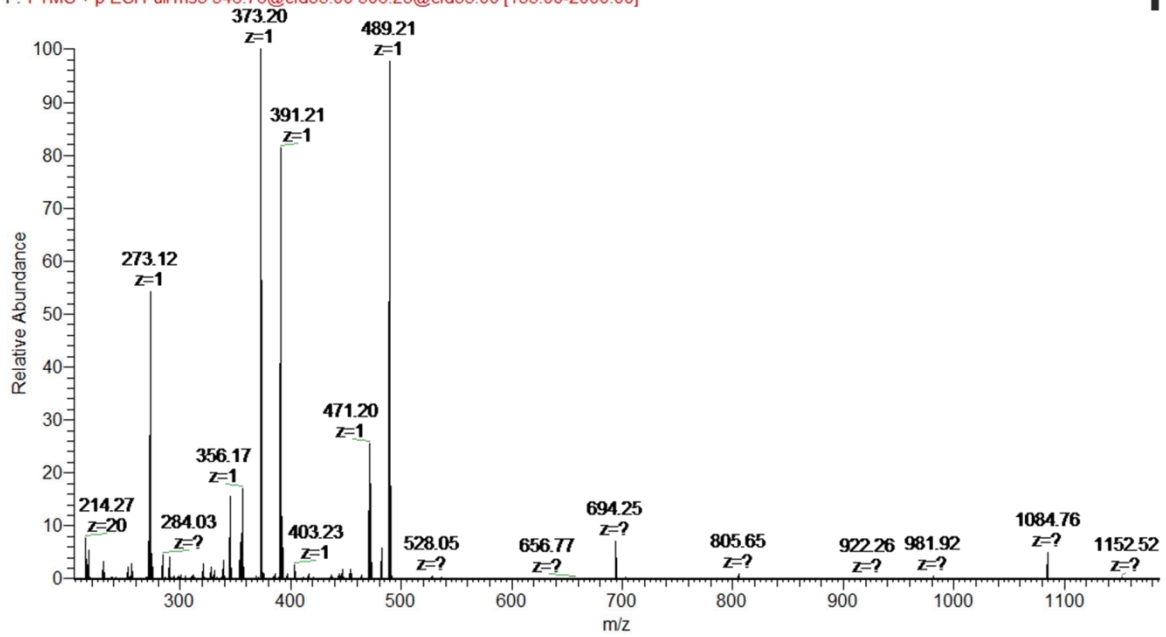
OB3474 #206-680 RT: 4.79-6.06 AV: 76 NL: 6.97E6
F: FTMS + p ESI Full ms2 546.76@cid35.00 [150.00-2000.00]

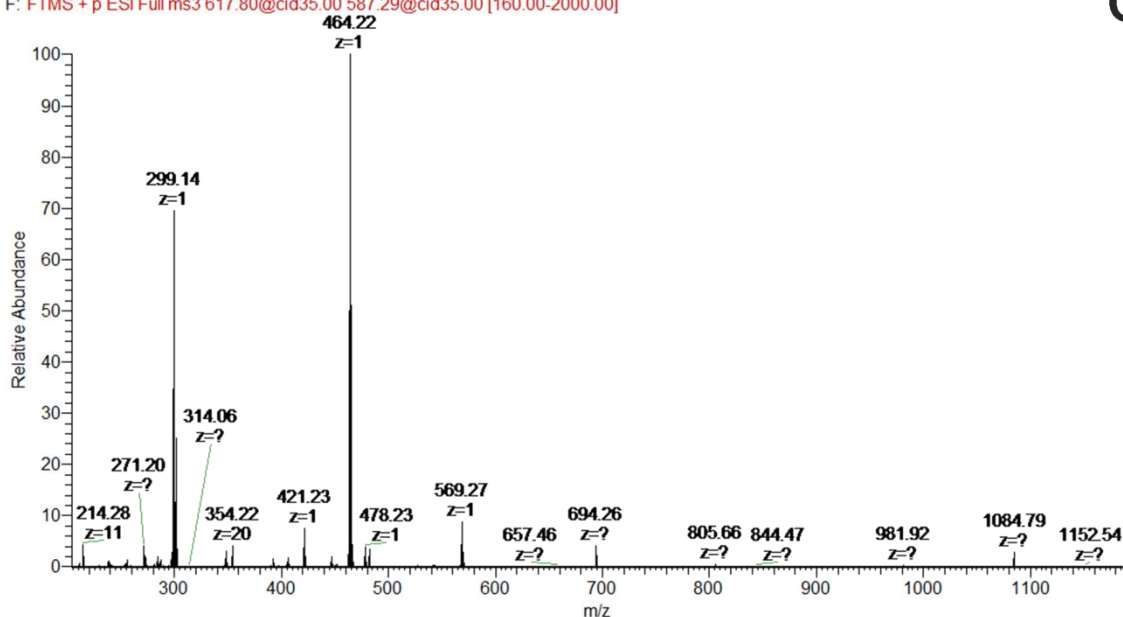
E



OB3474 #334-700 RT: 6.08-7.78 AV: 92 NL: 1.46E6
F: FTMS + p ESI Full ms3 546.76@cid35.00 506.23@cid35.00 [135.00-2000.00]

F





Slika P2. (A) MS spektar frakcije II, nakon 24-časovne digestije C-PC-a pepsinom. Pikovi sa m/z odnosom 412.2 ($z=3$) i 617.80 ($z=2$) potiču od AACLRD hromopeptida, dok pik sa m/z odnosom 546.76 ($z=2$) predstavlja CLRD hromopeptid; (B) MS2 spektar molekuskog jona sa m/z odnosom 617.80 ($z=2$) iz MS spektra frakcije II; (C) Fragmentacija (MS3 spektar) jona sa m/z odnosom 648.31 ($z=1$) iz MS2 spektra jona sa m/z odnosom 617.80 ($z=2$), koji predstavlja AACLRD sekvencu bez PCB-a; (D) Fragmentacija (MS3 spektar) jona sa m/z odnosom 587.29 ($z=1$) iz MS2 spektra jona sa m/z odnosom 617.80 ($z=2$) koji predstavlja PCB; (E) MS2 spektar molekuskog jona sa m/z odnosom 546.76 ($z=2$) iz MS spektra frakcije II; (F) Fragmentacija (MS3 spektar) jona sa m/z odnosom 506.23 ($z=1$) iz MS2 spektra jona sa m/z odnosom 546.76 ($z=2$), koji predstavlja CLRD sekvencu bez PCB-a; (G) Fragmentacija (MS3 spektar) jona sa m/z odnosom 587.29 ($z=1$) iz MS2 spektra jona sa m/z odnosom 546.76 ($z=2$), koji predstavlja PCB.

Tabela P3A. MS spektar frakcije III nakon 24-časovne digestije C-PC-a pepsinom. PCB je vezan za cisteinski ostatak peptida.

m/z	z	Eksperimentalna masa	Teorijska masa	Δ mase	Sekvenca
979.4609	1	978.4531	978.4521	0.0009	CSAL-PCB
490.2352	2	978.4517	978.4521	-0.0004	CSAL-PCB
587.2866	1	586.2788	586.2791	-0.0004	PCB

Tabela P3B. Fragmentacija (MS2 spektar) molekuskog jona sa m/z odnosom 490.23 (z=2) iz MS spektra frakcije III.

m/z	z	Eksperimentalna masa	Teorijska masa	Δ mase	Sekvenca
393.1797	1	392.1719	392.1730	-0.0011	CSAL
375.1693	1	374.1615	374.1624	-0.0010	CSAL dehidratisan
848.3638	1	847.3560	847.3569	-0.0009	CSA-PCB
244.0747	1	243.0669	243.0672	-0.0003	CSA dehidratisan
777.3270	1	776.3192	776.3198	-0.0006	CS-PCB
587.2853	1	586.2775	586.2791	-0.0017	PCB

Tabela P3C. Fragmentacija (MS3 spektar) jona sa m/z odnosom 393.18 (z=1) iz MS2 spektra jona sa m/z odnosom 90.23 (z=2). Ovaj jon predstavlja CSAL sekvencu bez PCB-a (MS2 490.23 MS3 393.18).

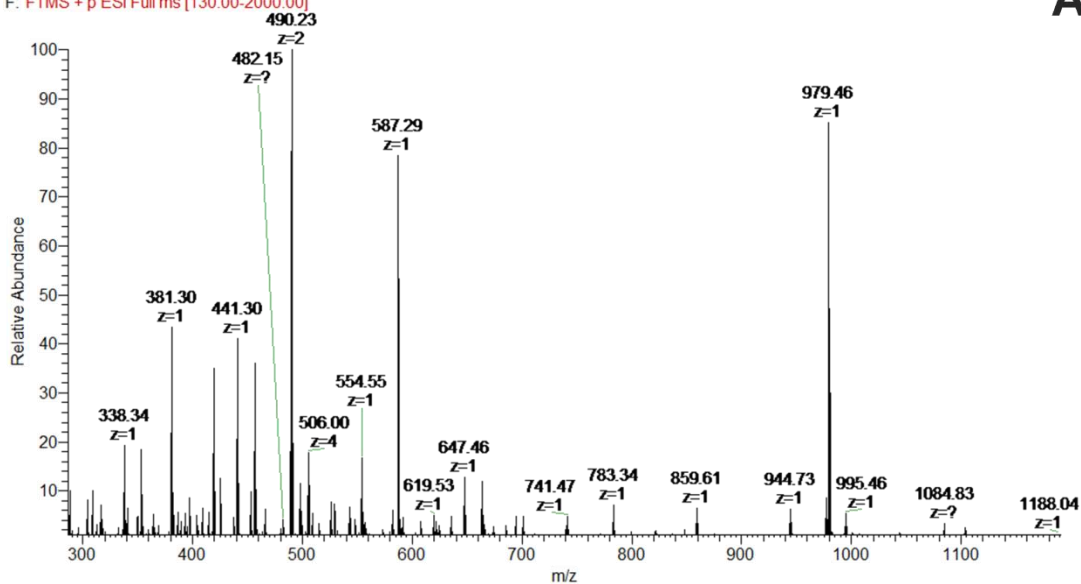
m/z	z	Eksperimentalna masa	Teorijska masa	Δ mase	Tip jona
191.0478	1	190.04	190.0407	-0.0007	b2 1+
262.0848	1	261.077	261.0778	-0.0008	b3 1+
290.1701	1	289.1623	289.1632	-0.0009	y13 1+
203.1384	1	202.1306	202.1312	-0.0006	y2 1+
132.1014	1	131.0936	131.0941	-0.0005	y1 1+

Tabela P3D. Fragmentacija (MS3 spektar) jona sa m/z odnosom 587.29 iz MS2 spektra jona sa m/z odnosom 490.23 (z=2). Ovaj jon predstavlja PCB (MS2 490.23, MS3 587.29).

m/z	z	Eksperimentalna masa	Teorijska masa	Δ mase	Struktura
464.2163	1	464.2163	464.2185	-0.0022	C ₂₆ H ₃₀ N ₃ O ₅ (PCB sa jednim pirolom manje)
299.1381	1	299.1381	299.1396	-0.0015	C ₁₇ H ₁₉ N ₂ O ₃ (polovina molekula PCB-a)
271.1433	1	271.1433	271.1447	-0.0014	C ₁₆ H ₁₉ N ₂ O ₂ (polovina molekula PCB-a bez CO grupe)

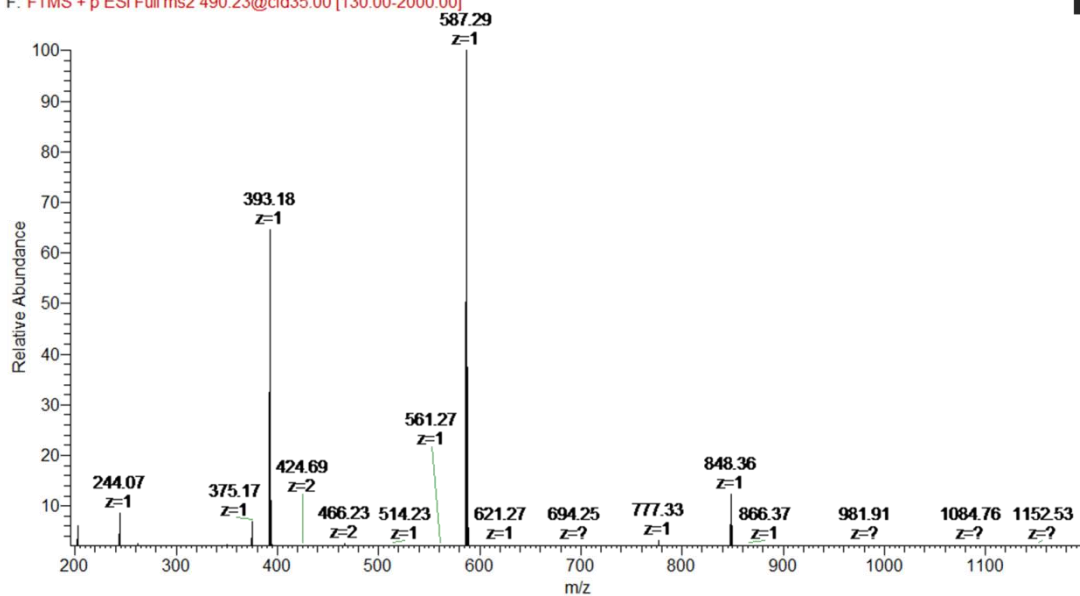
OB3476 #1-154 RT: 0.00-0.70 AV: 49 NL: 1.08E7
F: FTMS + p ESI Full ms [130.00-2000.00]

A



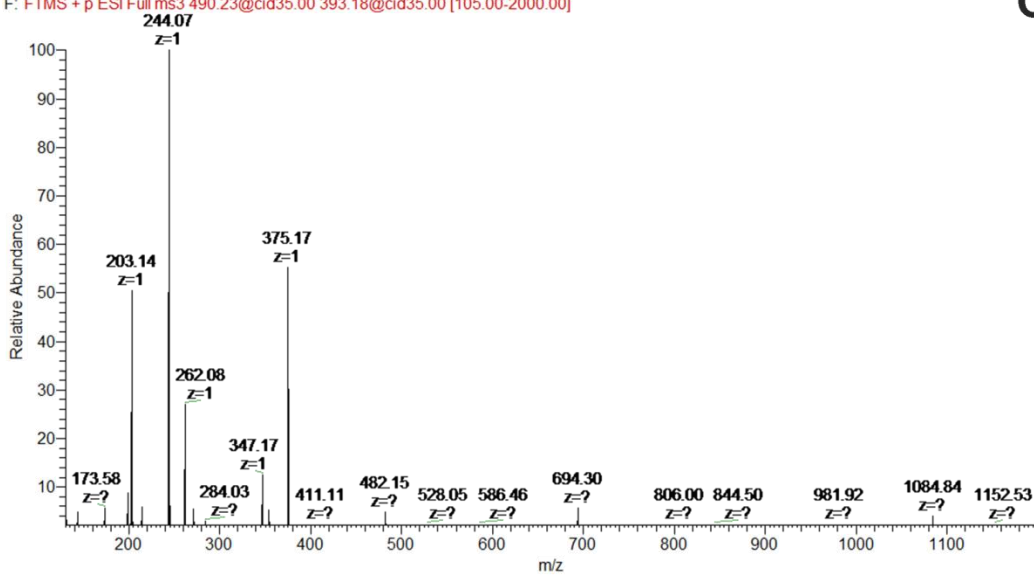
OB3476 #1-511 RT: 0.72-1.24 AV: 32 NL: 7.74E6
F: FTMS + p ESI Full ms2 490.23@cid35.00 [130.00-2000.00]

B



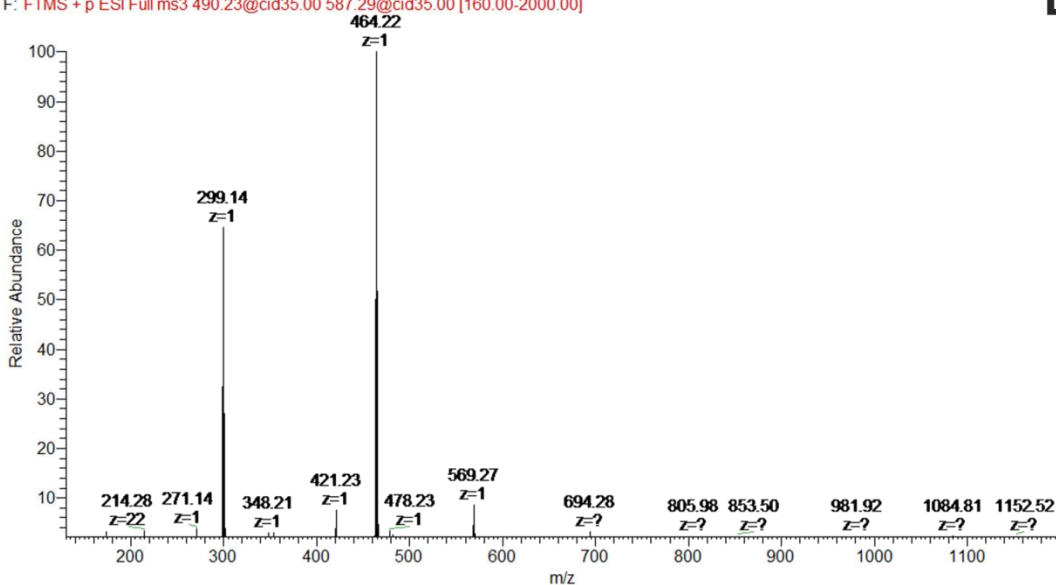
OB3476 #55-271 RT: 1.26-2.32 AV: 57 NL: 2.06E6
 F: FTMS + p ESI Full.ms3 490.23@cid35.00 393.18@cid35.00 [105.00-2000.00]

C



OB3476 #85-459 RT: 2.34-2.89 AV: 30 NL: 3.27E6
 F: FTMS + p ESI Full.ms3 490.23@cid35.00 587.29@cid35.00 [160.00-2000.00]

D



Slika P3. (A) MS spektar frakcije III, nakon 24-časovne digestije C-PC-a pepsinom. Pik sa m/z odnosom 490.23 ($z=2$) i 979.46 ($z=1$) potiče od CSAL hromopeptida: (B) MS2 spektar molekuskog jona sa m/z odnosom 490.23 ($z=2$) iz MS spektra frakcije III; (C) Fragmentacija (MS3 spektar) jona sa m/z odnosom 393.18 ($z=1$) iz MS2 spektra jona 490.23 ($z=2$), koji predstavlja CSAL sekvencu bez PCB-a; (D) Fragmentacija (MS3 spektar) jona sa m/z odnosom 587.29 ($z=1$) iz MS2 spektra jona 490.23 ($z=2$), koji predstavlja PCB.

TableP4A. MS spektar frakcije IV, nakon 24-časovne digestije C-PC-a pepsinom. PCB je vezan za cisteinski ostatak peptida.

m/z	z	Eksperimentalna masa	Teorijska masa	Δ mase	Sekvenca
482.2383	2	962.4609	962.4571	0.0038	AACL-PCB
963.4694	1	962.4616	962.4571	0.0044	AACL-PCB
497.2428	2	992.4699	992.4677	0.0022	ATCL-PCB
993.48	1	992.4722	992.4677	0.0044	ATCL-PCB
547.7669	2	1093.5181	1093.5154	0.0027	TATCL-PCB
1094.5282	1	1093.5204	1093.5154	0.0049	TATCL-PCB
587.2886	1	586.28077	586.2791	0.0016	PCB

TabelaP4B. Fragmentacija (MS2 spektar) molekuskog jona sa m/z odnosom 482.24 (z=2) iz MS spektra frakcije IV.

m/z	z	Eksperimentalna masa	Teorijska masa	Δ mase	Sekvenca
377.1845	1	376.1767	376.178	-0.0013	AACL
892.4259	1	891.4181	891.4195	-0.0014	ACL-PCB
416.6876	2	831.3595	831.3620	0.0025	AAC-PCB
832.3681	1	831.3603	831.3620	-0.0017	AAC-PCB
821.3919	1	820.3809	820.3824	-0.0015	CL-PCB
235.1106	1	234.1028	234.1033	-0.0005	CL
587.2850	1	586.2772	586.2791	-0.0020	PCB

Tabela P4C. Fragmentacija (MS3 spektra) jona sa m/z odnosom 377.18 (z=1) iz MS2 spektra jona sa m/z odnosom 482.24 (z=2), koji predstavlja AACL sekvencu bez PCB-a (MS2 482.24, MS3 377.18).

m/z	z	Eksperimentalna masa	Teorijska masa	Δ mase	Tip jona
246.0898	1	245.082	245.0829	-0.0009	b3 1+
235.1103	1	234.1025	234.1033	-0.0008	y2 1+

TabelaP4D. Fragmentacija (MS3 spektra) jona sa m/z odnosom 587.29 iz MS2 spektra jona sa m/z odnosom 482.24 (z=2), koji predstavlja PCB (MS2 482.24, MS3 587.29).

m/z	z	Eksperimentalna masa	Teorijska masa	Δ mase	Struktura
464.2160	1	464.2160	464.2185	-0.0025	C ₂₆ H ₃₀ N ₃ O ₅ (PCB sa jednim pirolom manje)
299.1380	1	299.1380	299.1396	-0.0016	C ₁₇ H ₁₉ N ₂ O ₃ (polovina molekula PCB-a)
271.2304	1	271.2304	271.1447	0.0857	C ₁₆ H ₁₉ N ₂ O ₂ (polovina molekula PCB-a bez CO grupe)

Tabela P4E. Fragmentacija (MS2 spektar) molekuskog jona sa m/z odnosom 497.24 (z=2) iz MS spektra frakcije IV.

m/z	z	Eksperimentalna masa	Teorijska masa	Δ mase	Sekvenca
407.1951	1	406.1873	406.1886	-0.0013	ATCL
488.2347	2	974.4537	974.4572	-0.0034	ATCL-PCB dehidratisan
862.3792	1	861.3714	861.3726	-0.0012	ATC-PCB
821.3889	1	820.3811	820.3824	-0.0013	CL-PCB
235.1106	1	234.1028	234.1033	-0.0005	CL
587.2852	1	586.2774	586.2791	-0.0018	PCB
461.7217	2	921.4434	921.4301	0.0133	TCL-PCB

Tabela P4F. Fragmentacija (MS3 spektar) jona sa m/z odnosom 407.20 (z=1) iz MS2 spektra jona m/z odnosom 497.24 (z=2), koji predstavlja ATCL sekvencu bez PCB-a (MS2 497.24, MS3 407.20).

m/z	z	Eksperimentalna masa	Teorijska masa	Δ mase	Tip jona
173.0915	1	172.0837	172.0843	-0.0006	b2 1+
235.1104	1	234.1026	234.1033	-0.0007	y2 1+

Tabela P4G. Fragmentacija (MS3 spektar) jona sa m/z odnosom 587.29 (z=1) iz MS2 spektra jona sa m/z odnosom 497.24 (z=2), koji predstavlja PCB (MS2 497.24, MS3 587.29).

m/z	z	Eksperimentalna masa	Teorijska masa	Δ mase	Struktura
464.2163	1	464.2163	464.2185	-0.0022	$C_{26}H_{30}N_3O_5$ (PCB sa jednim pirolom manje)
299.1381	1	299.1381	299.1396	-0.0015	$C_{17}H_{19}N_2O_3$ (polovina molekula PCB-a)
271.1826	1	271.1826	271.1447	0.0379	$C_{16}H_{19}N_2O_2$ (polovina molekula PCB-a bez CO grupe)

Tabela P4H. Fragmentacija (MS2 spektar) molekuskog jona sa m/z odnosom 547.77 (z=2) iz MS spektra frakcije IV.

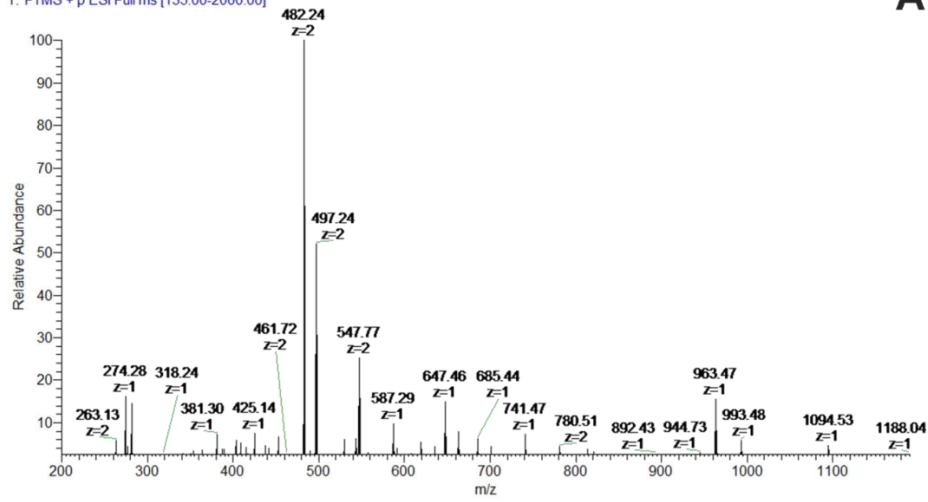
m/z	z	Eksperimentalna masa	Teorijska masa	Δ mase	Sekvenca
538.7582	2	1075.5007	1075.5049	-0.0041	TATCL-PCB dehidratisan
490.2319	1	489.2241	489.2257	-0.0017	TATCL dehidratisan
922.436	1	921.4282	921.4301	-0.0019	TCL-PCB
452.7163	2	903.4169	903.4195	-0.0026	TCL-PCB dehidratisan
821.3886	1	820.3808	820.3824	-0.0016	CL-PCB
587.2850	1	586.2772	586.2791	-0.0020	PCB
461.7215	2	921.4430	921.4301	0.0129	TCL-PCB
497.2399	2	992.4798	992.4677	0.0121	ATCL-PCB
508.2322	1	507.2322	507.2250	0.0072	TATCL

Tabela P4I. Fragmentacija (MS spektar) jona sa m/z odnosom 508.23 (z=1) iz MS2 spektra jona sa m/z odnosom 547.77 (z=2), koji predstavlja TATCL sekvencu bez PCB-a (MS2 547.76, MS3 508.23).

m/z	z	Eksperimentalna masa	Teorijska masa	Δ mase	Tip jona
173.113	1	172.1052	172.0843	0.0209	b2 1+
274.1396	1	273.1318	273.1319	-0.0001	b3 1+
377.1479	1	376.1401	376.1411	-0.001	b4 1+
336.1578	1	335.1500	335.151	-0.001	y3 1+

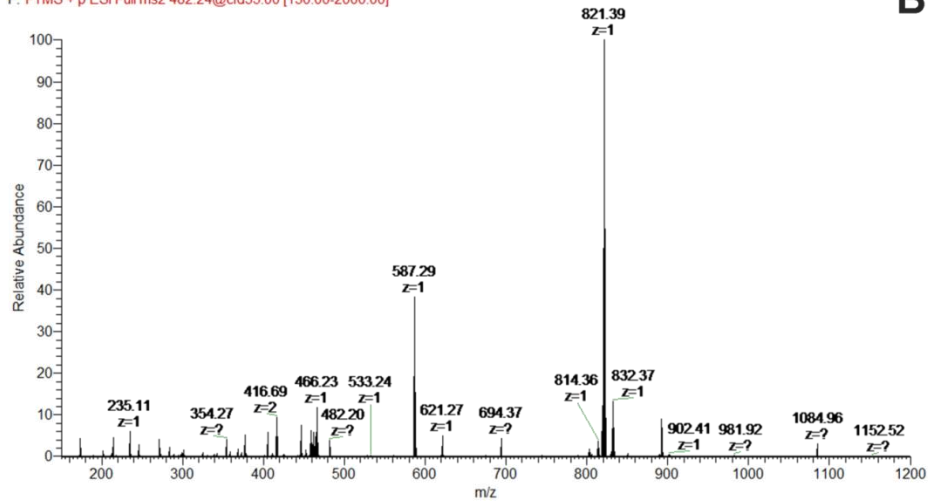
OB03438 #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 5.22E7
T: FTMS + p ESI Full ms [135.00-2000.00]

A



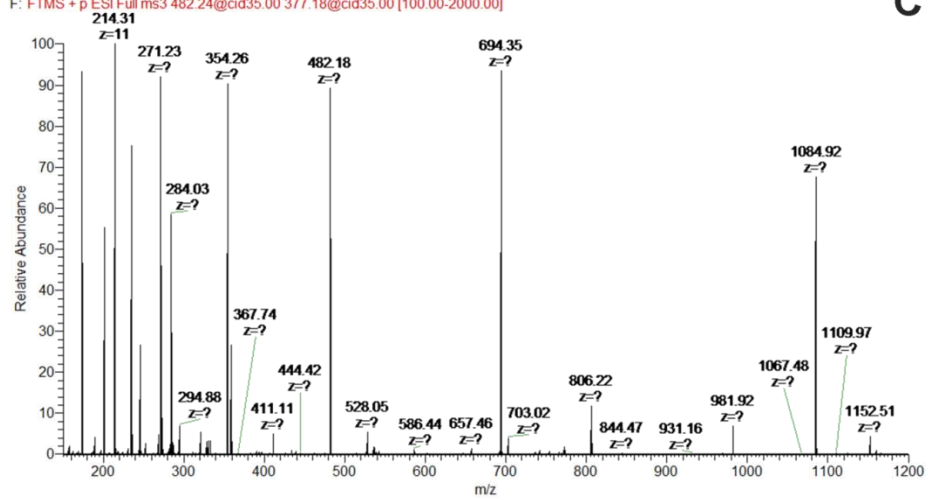
OB3479 #129-368 RT: 2.35-3.15 AV: 48 NL: 2.68E6
F: FTMS + p ESI Full ms2 482.24@cid35.00 [130.00-2000.00]

B



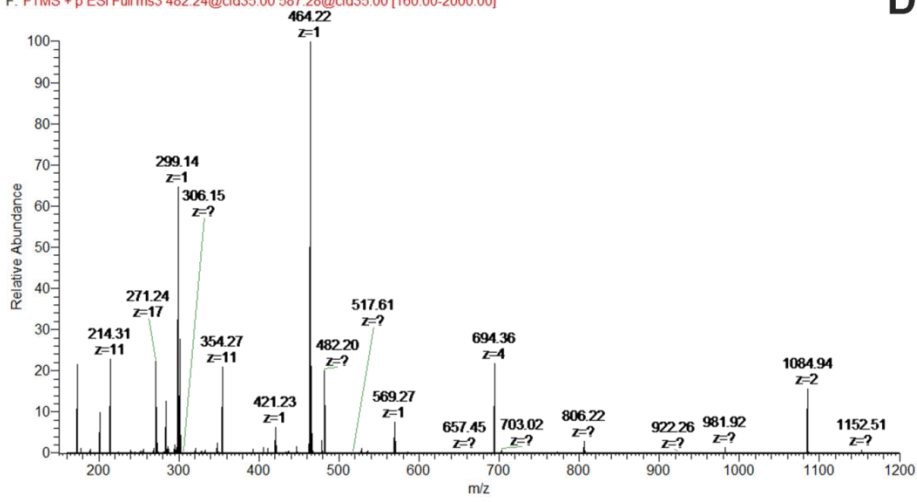
OB3479 #81-428 RT: 3.17-3.58 AV: 23 NL: 1.10E5
F: FTMS + p ESI Full ms3 482.24@cid35.00 377.18@cid35.00 [100.00-2000.00]

C



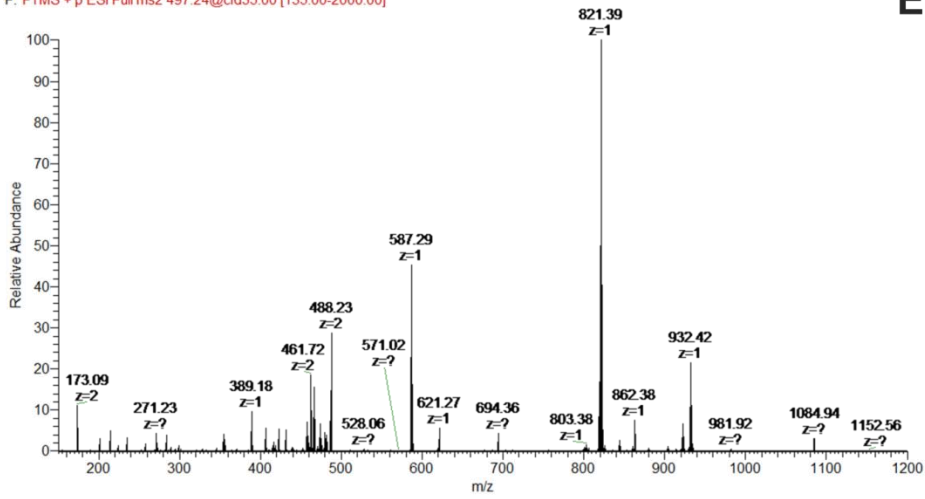
OB3479 #159-319 RT: 3.61-4.08 AV: 26 NL: 4.71E5
F: FTMS + p ESI Full ms3 482.24@cid35.00 587.28@cid35.00 [160.00-2000.00]

D



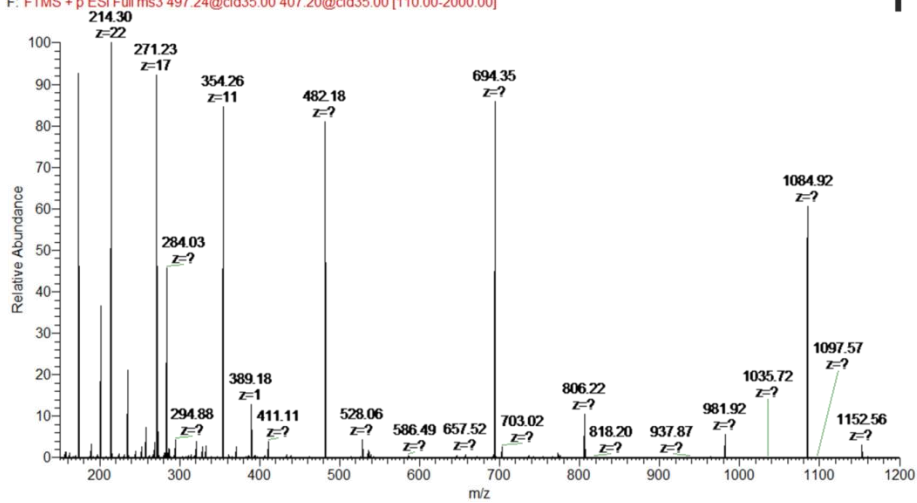
OB3479 #262-392 RT: 4.65-5.79 AV: 68 NL: 1.52E6
F: FTMS + p ESI Full ms2 497.24@cid35.00 [135.00-2000.00]

E



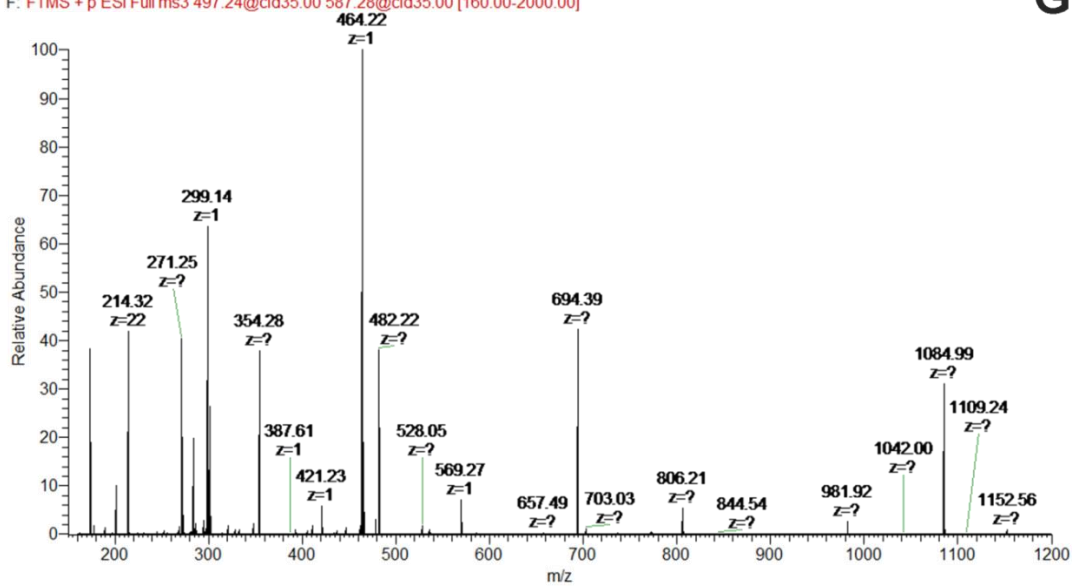
OB3479 #305-714 RT: 6.83-7.34 AV: 28 NL: 1.37E5
F: FTMS + p ESI Full ms3 497.24@cid35.00 407.20@cid35.00 [110.00-2000.00]

F



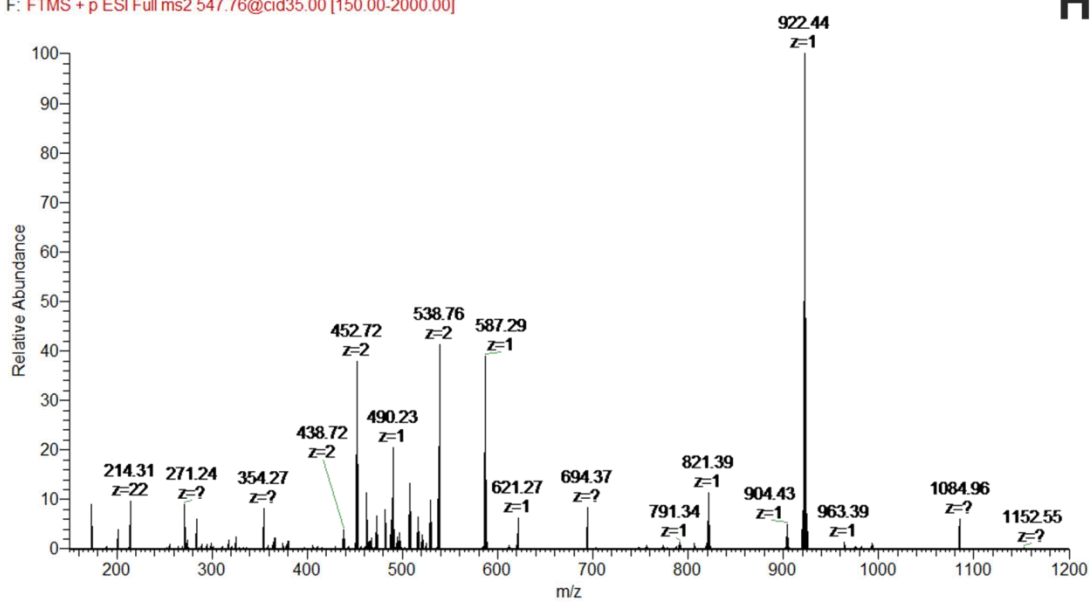
OB3479 #274.451 RT: 5.81-6.30 AV: 27 NL: 3.00E5
F: FTMS + p ESI Full ms3 497.24@cid35.00 587.28@cid35.00 [160.00-2000.00]

G

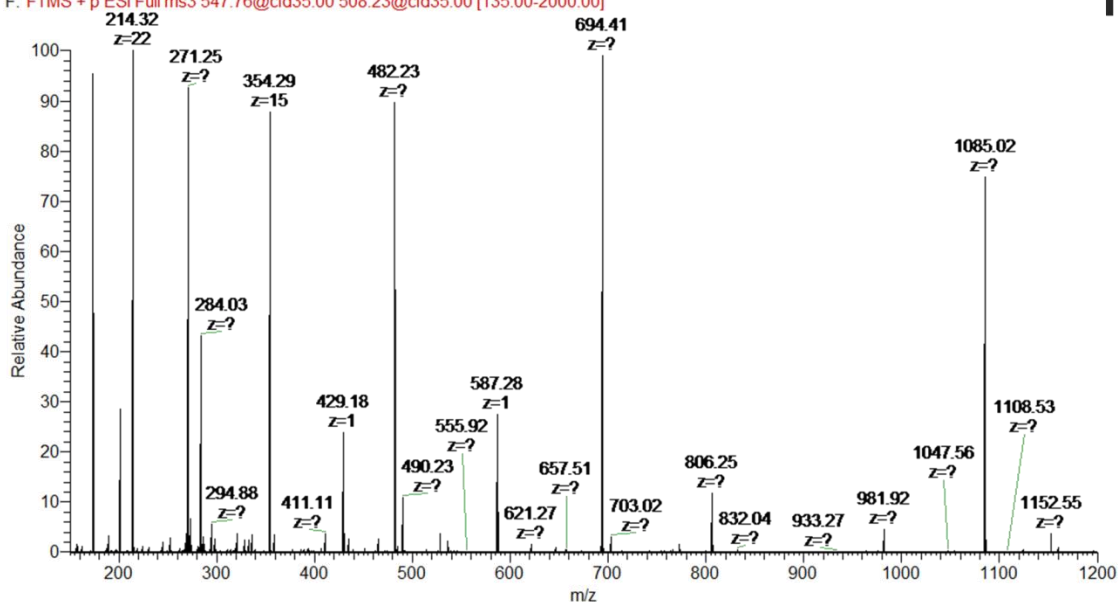


OB3479 #386.599 RT: 7.36-8.20 AV: 50 NL: 9.97E5
F: FTMS + p ESI Full ms2 547.76@cid35.00 [150.00-2000.00]

H



OB3479 #536-639 RT: 9.74-9.96 AV: 13 NL: 1.39E5
F: FTMS + p ESI Full ms3 547.76@cid35.00 508.23@cid35.00 [135.00-2000.00]



Slika P4. (A) MS spektar frakcije IV, nakon 24-časovne digestije C-PC-a pepsinom. Pikovi sa m/z odnosima 482.24 ($z=2$), 497.24 ($z=2$) i 547.77 ($z=2$) potiču od AACL, ATCL i TATCL hromopeptida, redom; (B) MS2 spektar molekuskog jona sa m/z odnosom 482.24 ($z=2$) iz MS spektra frakcije IV; (C) Fragmentacija (MS3 spektar) jona sa m/z odnosom 377.18 ($z=1$) iz MS2 spektra jona sa m/z odnosom 482.24, koji predstavlja AACL sekvencu bez PCB-a; (D) Fragmentacija (MS3 sepktrar) jona sa m/z odnosom 587.29 ($z=1$) iz MS2 spektra jona sa m/z odnosom 482.24, koji predstavlja PCB; (E) MS2 spektar molekuskog jona sa m/z odnosom 497.24 ($z=2$) iz MS spektra frakcije IV; (F) Fragmentacija (MS3 spektar) jona sa m/z odnosom 407.20 ($z=1$) iz MS2 spektra jona sa m/z odnosom 497.24 ($z=2$), koji predstavlja ATCL sekvencu bez PCB-a; (G) Fragmentacija (MS3 spektar) jona sa m/z odnosom 587.29 ($z=1$) iz MS2 spektra jona sa m/z odnosom 497.24 ($z=2$), koji predstavlja PCB; (H) MS2 spektar molekuskog jona sa m/z odnosom 547.76 ($z=2$) iz MS spektra frakcije IV; (I) Fragmentacija (MS3 spektar) jona sa m/z odnosom 508.23 ($z=1$) iz MS2 spektra jona sa m/z odnosom 547.76 ($z=2$), koji predstavlja TATCL sekvencu bez PCB-a.

Tabela P5A. MS spektar frakcije V, nakon 24-časovne digestije C-PC-a pepsinom. PCB je vezan za cisteinski ostatak peptida.

m/z	z	Eksperimentalna masa	Teorijska masa	Δ mase	Sekvenca
411.1983	2	820.3809	820.3829	-0.0020	CL-PCB
821.3898	1	820.3820	820.3829	-0.0010	CL-PCB
587.2858	1	586.27797	586.279136	-0.0012	PCB

TabelaP5B. Fragmentacija (MS2 spektar) molekuskog jona sa m/z odnosom 411.20 (z=2) iz MS spektra frakcije V.

m/z	z	Eksperimentalna masa	Teorijska masa	Δ mase	Sekvenca
235.1106	1	234.1028	234.1038	-0.0010	CL
587.2849	1	586.2771	586.2791	-0.0021	PCB

TabelaP5C. Fragmentacija (MS3 spektar) jona sa m/z odnosom 235.11 (z=1) iz MS2 spektra jona sa m/z odnosom 411.20 (z=2), koji predstavlja CL sekvencu bez PCB-a (MS2 411.20, MS3 235.11).

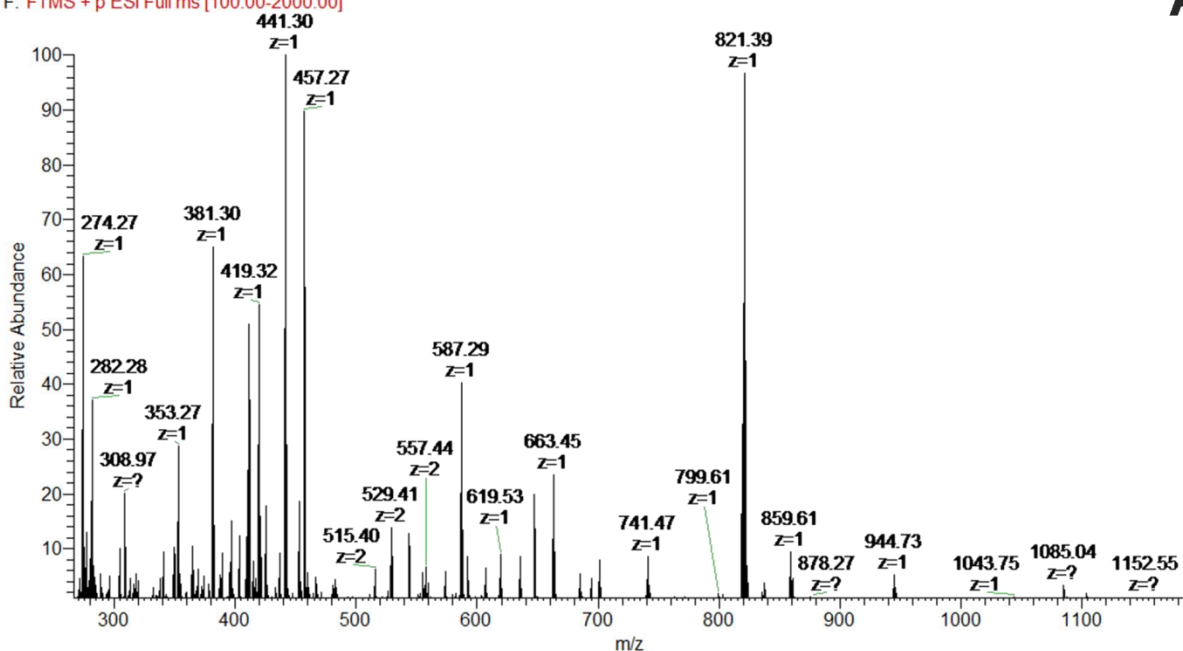
m/z	z	Eksperimentalna masa	Teorijska masa	Δ mase	Tip jona
132.1015	1	131.0937	131.0941	-0.0004	y1 1+

Tabela P5D. Fragmentacija (MS3 spektar) jona sa m/z odnosom 587.29 (z=1) koji predstavlja PCB i dobijen je iz MS2 spektra molekuskog jona sa m/z odnosom 411.20 (z=2) (MS2 411.20, MS3 587.29).

m/z	z	Eksperimentalna masa	Teorijska masa	Δ mase	Struktura
464.2164	1	464.2164	464.2185	-0.0021	C ₂₆ H ₃₀ N ₃ O ₅ (PCB sa jednim pirolom manje)
299.1382	1	299.1382	299.1396	-0.0014	C ₁₇ H ₁₉ N ₂ O ₃ (polovina molekula PCB-a)
271.1070	1	271.1070	271.1447	-0.0377	C ₁₆ H ₁₉ N ₂ O ₂ (polovina molekula PCB-a bez CO grupe)

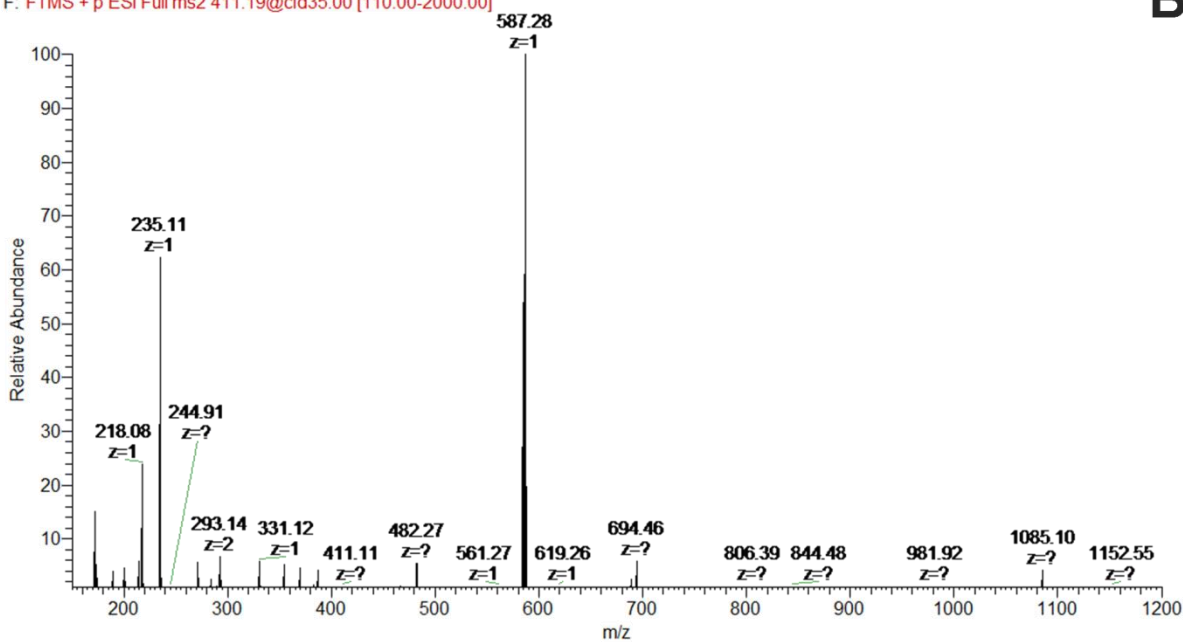
OB3481 #1-140 RT: 0.01-1.06 AV: 72 NL: 6.14E6
F: FTMS + p ESI Full ms [100.00-2000.00]

A



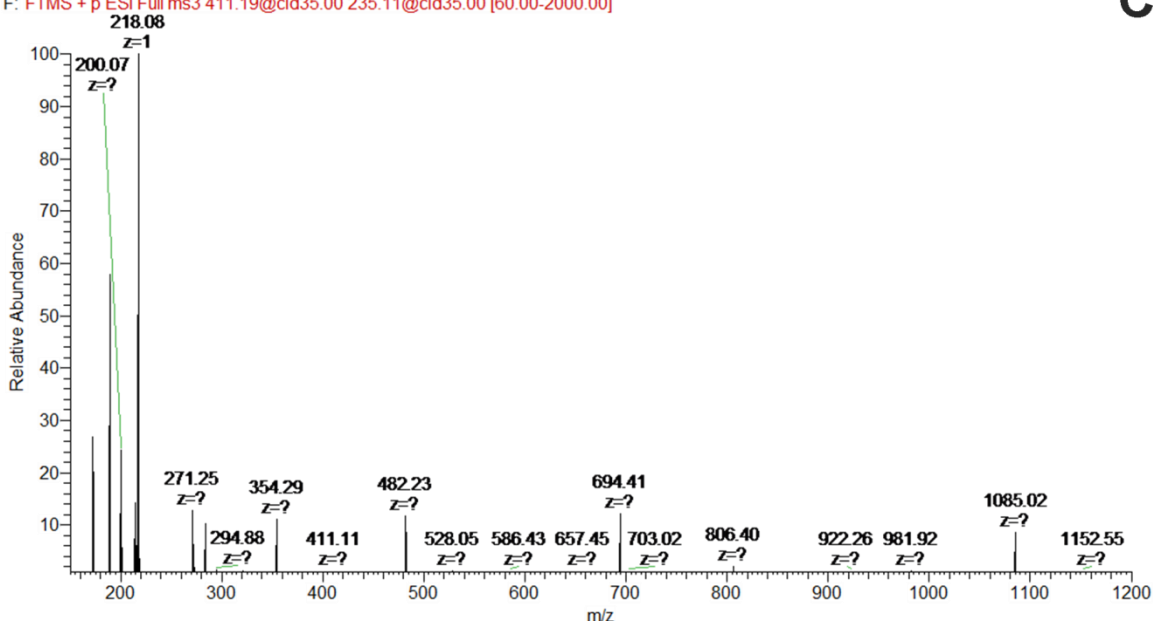
OB3481 #15-257 RT: 1.08-1.53 AV: 28 NL: 2.45E6
F: FTMS + p ESI Full ms 2 411.19@cid35.00 [110.00-2000.00]

B



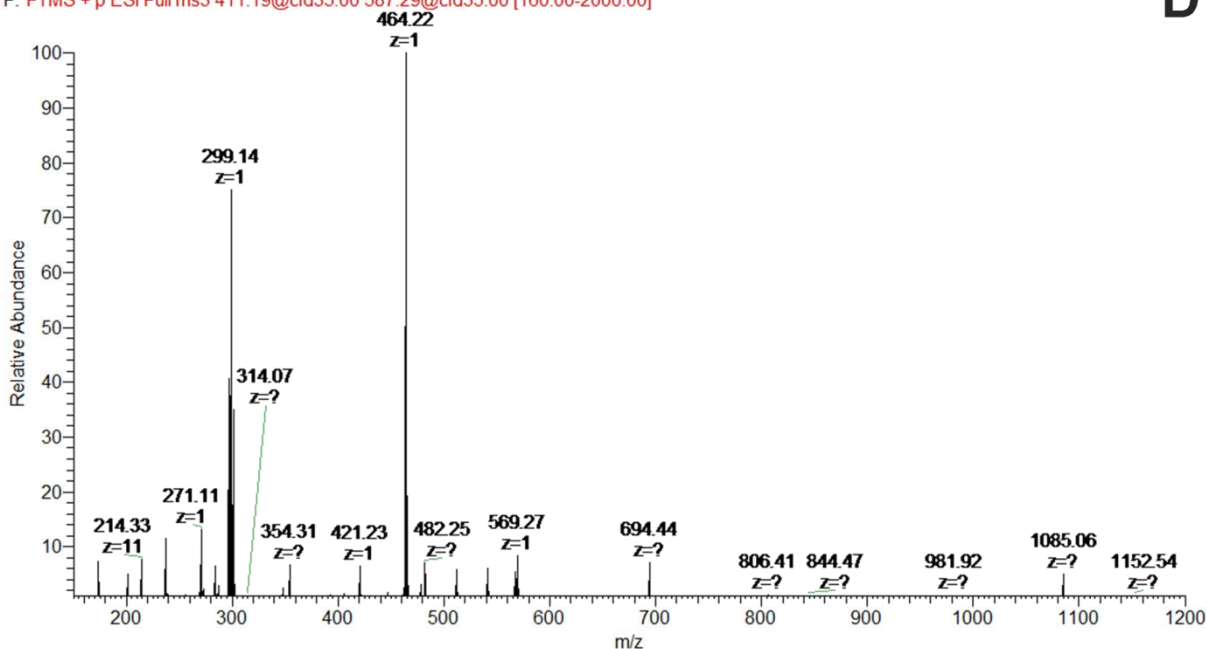
OB3481 #86-198 RT: 1.55-2.08 AV: 29 NL: 5.97E5
 F: FTMS + p ESI Full ms3 411.19@cid35.00 235.11@cid35.00 [60.00-2000.00]

C



OB3481 #107-274 RT: 2.11-2.68 AV: 31 NL: 9.37E5
 F: FTMS + p ESI Full ms3 411.19@cid35.00 587.29@cid35.00 [160.00-2000.00]

D



Slika P5. (A) MS spektar frakcije V, nakon 24-časovne digestije C-PC-a pepsinom. Pikovi sa m/z odnosima 411.19 i 821.39 potiču od hromopeptida CL; (B) MS2 spektar molekuskog jona sa m/z odnosom 411.19 (z=2) iz MS spektra frakcije V; (C) Fragmentacija (MS3 spektar) jona sa m/z odnosom 235.11 (z=1) iz MS2 spektra jona sa m/z odnosom 411.19 (z=2), koji predstavlja CL sekvencu bez PCB-a; Fragmentacija (MS3 spektar) jona sa m/z odnosom 587.29 (z=1) iz MS2 spektra jona sa m/z odnosom 411.19 (z=2), koji predstavlja PCB.

Tabela P6A. Molekulska masa PCB-a, određena snimanjem MS spektra preparata PCB-a.

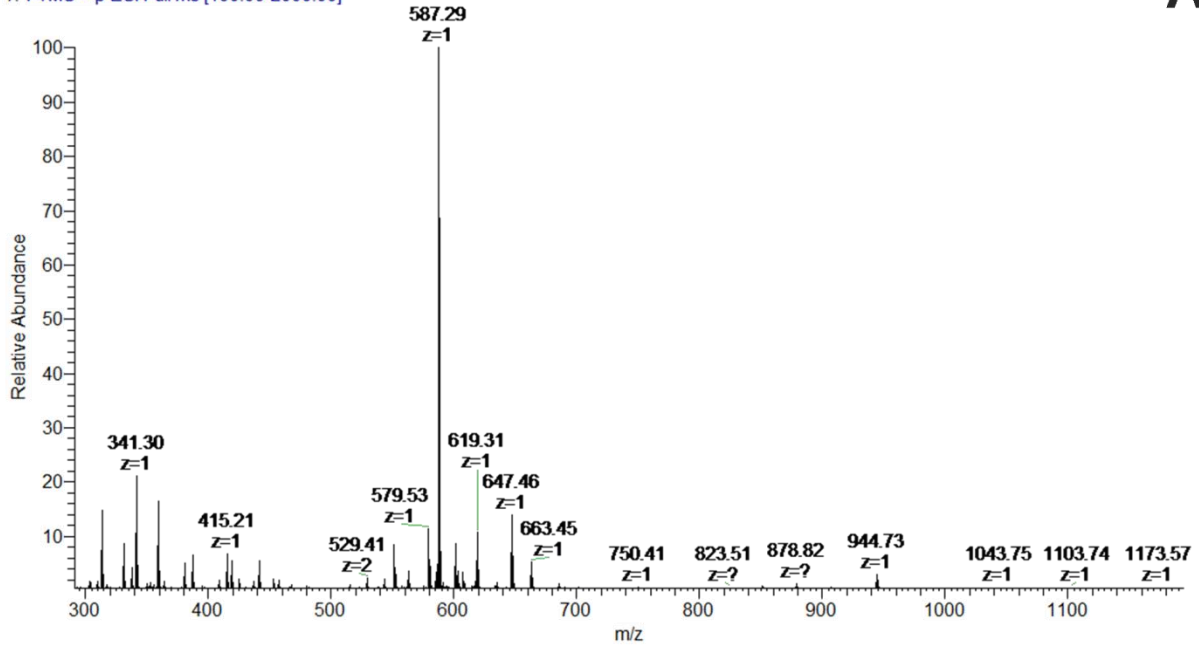
m/z	z	Eksperimentalna masa	Teorijska masa	Δ mase	Struktura
587.2857	1	586.2779	586.2791	-0.0013	PCB

Tabela P6B. Fragmentacija molekuskog jona sa m/z odnosom 587.29 (z=1) iz MS spektra preparata PCB-a. Podaci su dobijeni nakon snimanja MS2 spektar ovoga jona.

m/z	z	Eksperimentalna masa	Teorijska masa	Δ mase	Struktura
464.2178	1	464.2178	464.2185	-0.0007	$C_{26}H_{30}N_3O_5$ (PCB sa jednim pirolom manje)
299.1391	1	299.1391	299.1396	-0.0005	$C_{17}H_{19}N_2O_3$ (polovina molekula PCB-a)
271.1443	1	271.1443	271.1447	-0.0004	$C_{16}H_{19}N_2O_2$ (polovina molekula PCB-a bez CO grupe)

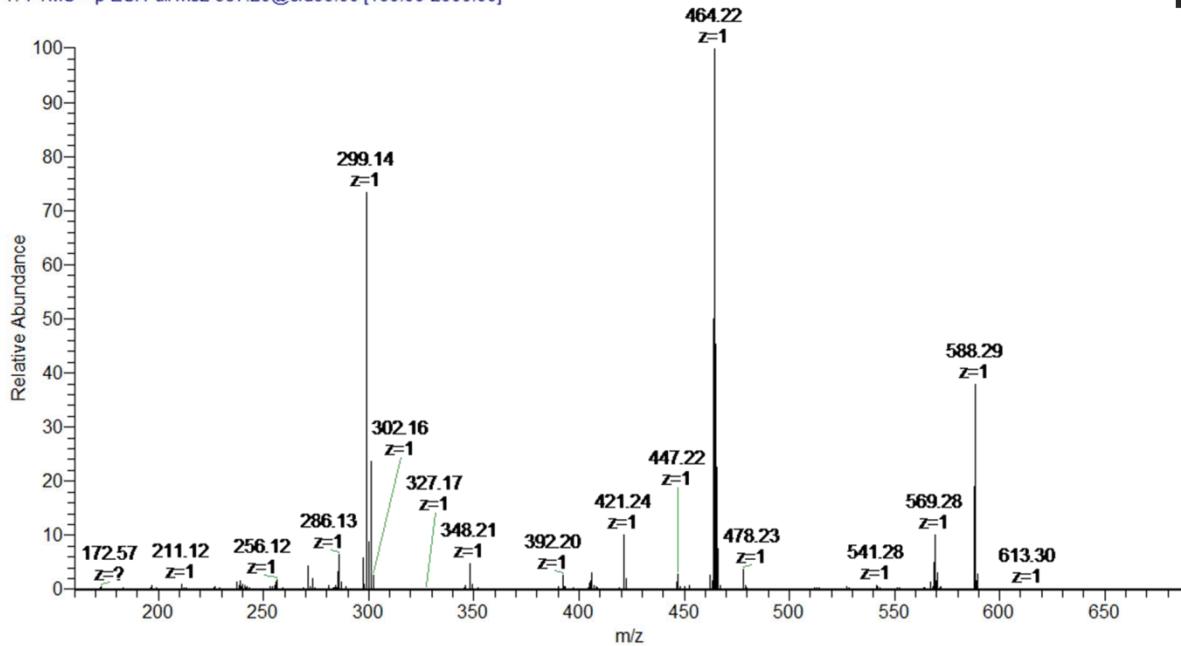
OB03431 #1 RT: 0.01 AV: 1 NL: 1.04E8
T: FTMS + p ESI Full ms [100.00-2000.00]

A



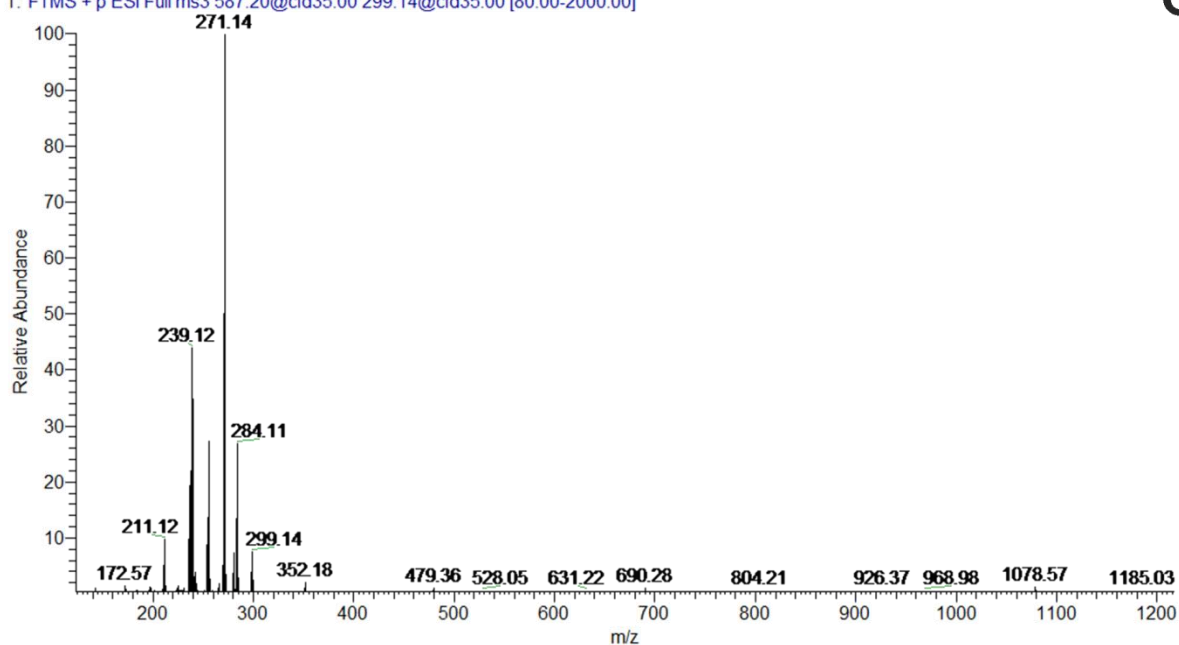
OB03432 #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 6.12E7
T: FTMS + p ESI Full ms2 587.20@cid35.00 [160.00-2000.00]

B

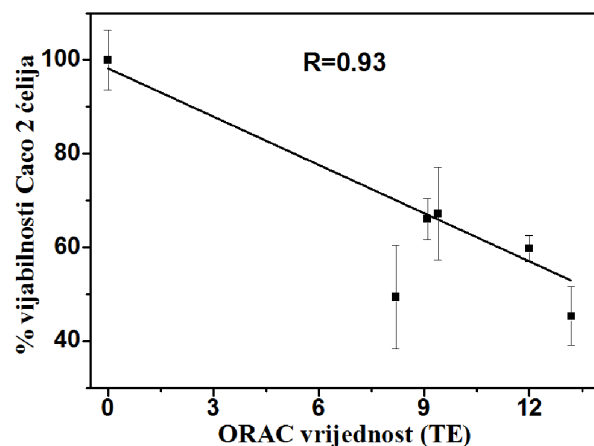


OB03434 #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 1.60E7
T: FTMS + p ESI Full ms3 587.20@cid35.00 299.14@cid35.00 [80.00-2000.00]

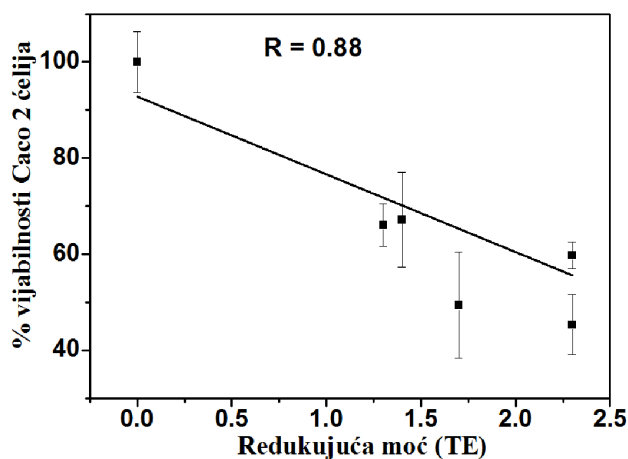
C



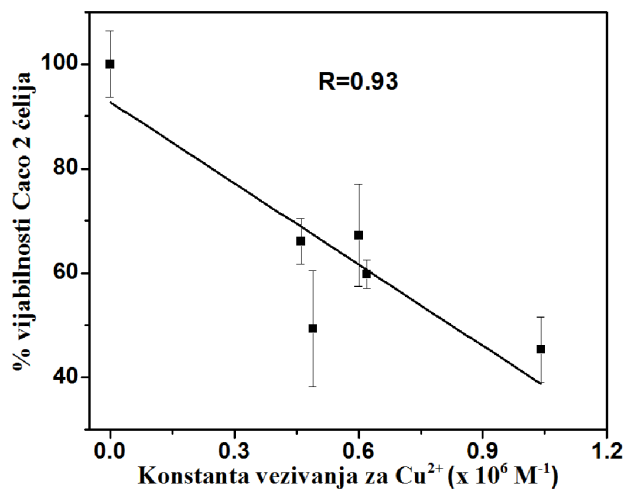
Slika P6. (A) MS spektar preparata PCB-a. Pik sa m/z odnosom 587.29 ($z=1$) potiče od PCB-a; (B) MS2 spektar molekuskog jona sa m/z odnosom 587.29 ($z=1$) iz MS spektra preparata PCB-a; (C) MS3 spektar jona sa m/z odnosom 299.14 ($z=1$) iz MS2 spektra jona sa m/z odnosom 587.29 ($z=1$).



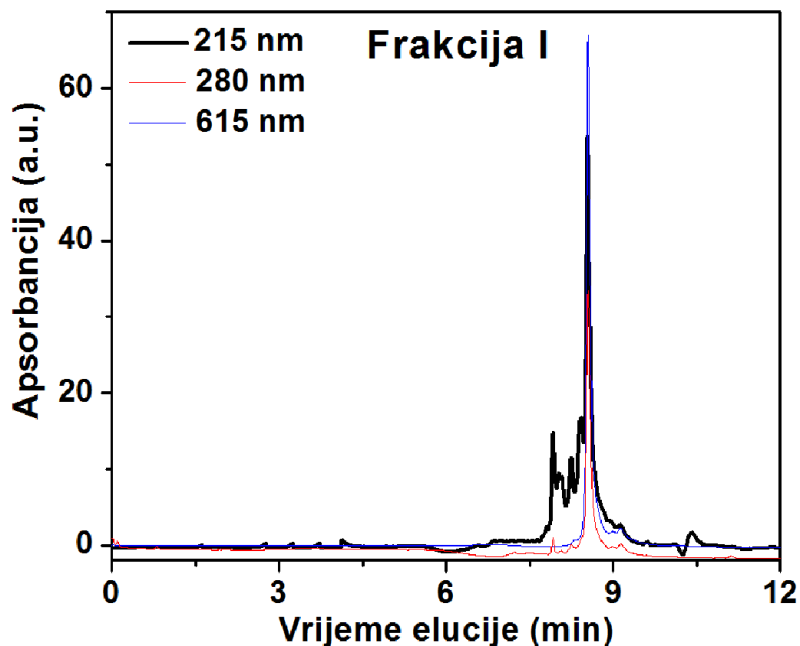
Slika P7. Korelacija između citotoksičnosti hromopeptida prema Caco-2 ćelijama i ORAC vrijednosti. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija (n=3).



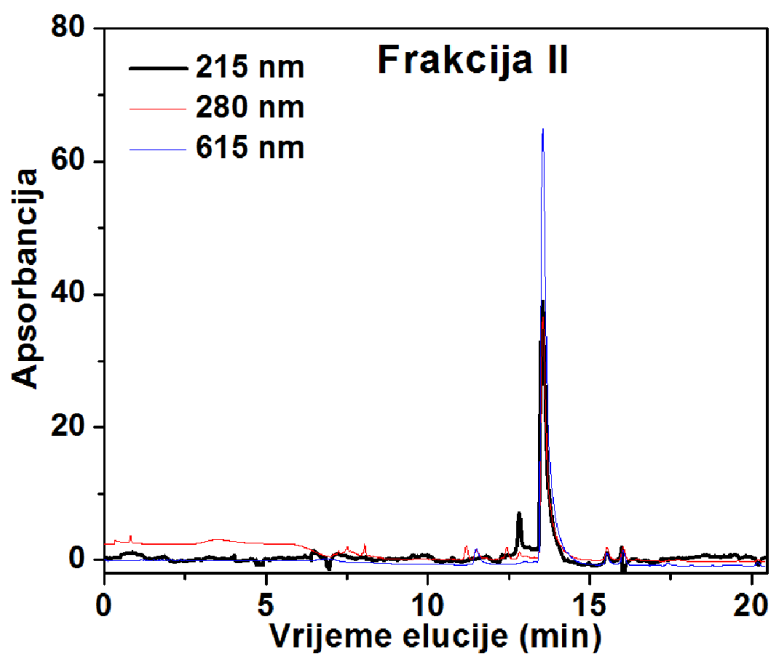
Slika P8. Korelacija između citotoksičnosti hromopeptida prema Caco-2 ćelijama i redukujuće moći. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija (n=3).



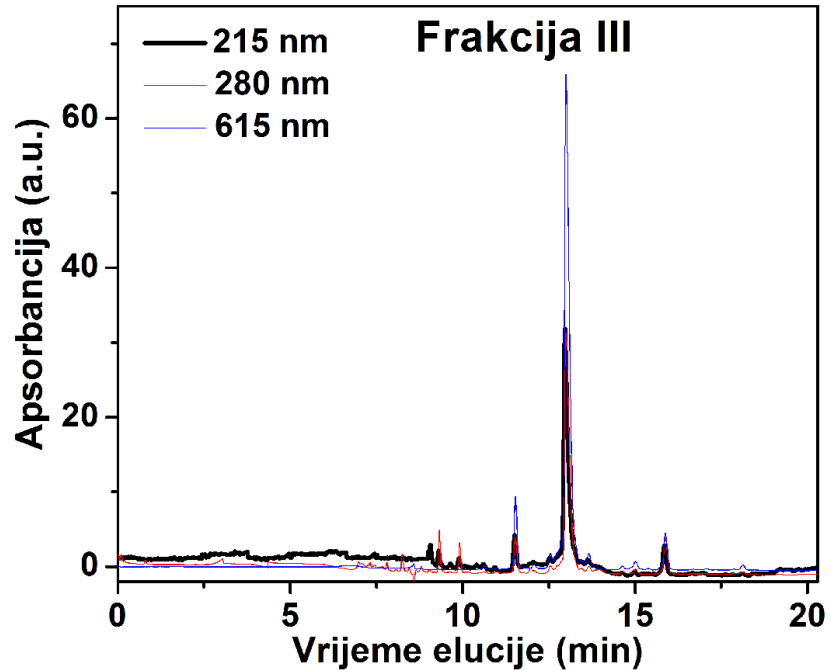
Slika P9. Korelacija između citotoksičnosti prema Caco-2 ćelijama i vezivne konstante za Cu²⁺. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija (n=3).



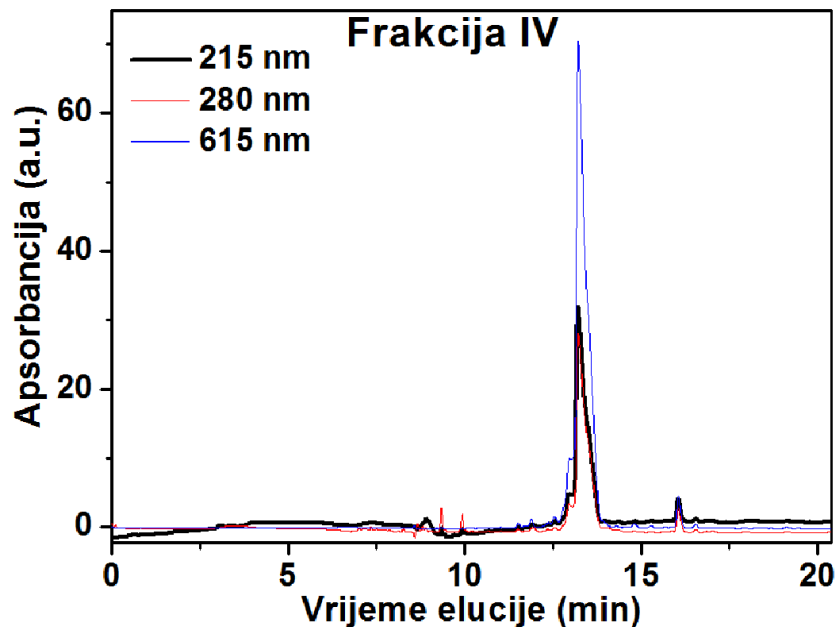
Slika P10. Rehromatogram frakcije I; Uslovi elucije: 100% rastvarač A (0.1% mravlja kiselina) - jedna zapremina kolone, gradijent od 100% rastvarača A do 20% rastvarača B (0.1% mravlja kiselina u acetonitrilu) – jedna zapremina kolone, gradijent od 80% rastvarača A do 25% rastvarača B - pet zapremina kolone. *Relativna čistoća 72%.*



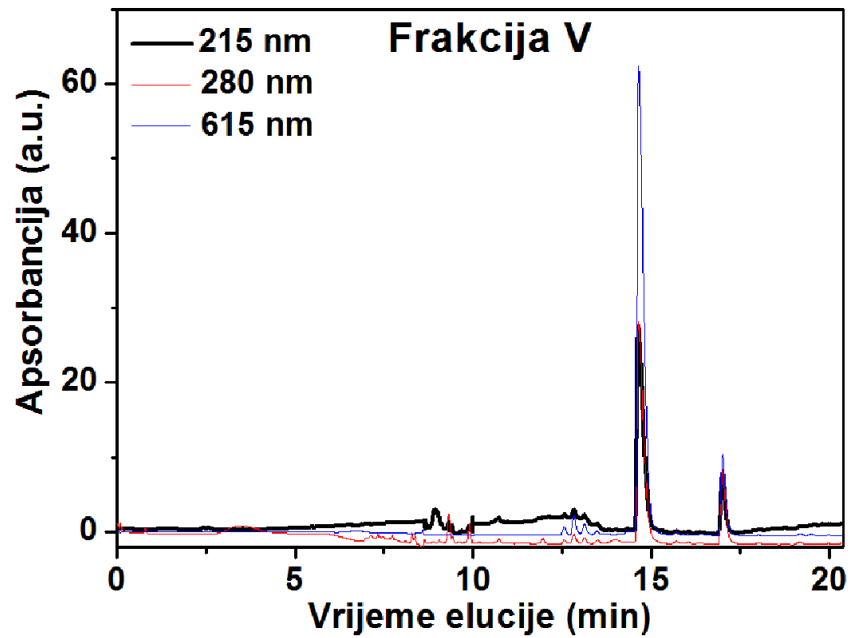
Slika P11. Rehromatogram frakcije II; Uslovi elucije: 100% rastvarač A (0.1% mravlja kiselina) - jedna zapremina kolone, gradijent od 100% rastvarača A do 20% rastvarača B (0.1% mravlja kiselina u acetonitrilu) – jedna zapremina kolone, gradijent od 80% rastvarača A do 30% rastvarača B - deset zapremina kolone. *Relativna čistoća 91%.*



Slika P12. Rehromatogram frakcije III; Uslovi elucije: 100% rastvarač A (0.1% mravlja kiselina) - jedna zapremina kolone, gradijent od 100% rastvarača A do 25% rastvarača B (0.1% mravlja kiselina u acetonitrilu) - jedna zapremina kolone, gradijent od 75% rastvarača A do 35% rastvarača B - deset zapremina kolone. *Relativna čistoća 95%.*



Slika P13. Rehromatogram frakcije IV; Uslovi elucije: 100% rastvarač A (0.1% mravlja kiselina) - jedna zapremina kolone, gradijent od 100% rastvarača A do 25% rastvarača B (0.1% mravlja kiselina u acetonitrilu) - jedna zapremina kolone, gradijent od 75% rastvarača A do 35% rastvarača B - deset zapremina kolone. *Relativna čistoća 98%.*



Slika P14. Rehromatogram frakcije V; Uslovi elucije: 100% rastvarač A (0.1% mravlja kiselina) - jedna zapremina kolone, gradijent od 100% rastvarača A do 25% rastvarača B (0.1% mravlja kiselina u acetonitrilu) – jedna zapremina kolone, gradijent od 75% rastvarača A do 35% rastvarača B - deset zapremina kolone. *Relativna čistoća 92%.*

Tabela P7. Vezivne energije PCB-a za 16 kristalnih struktura HSA koje se preuzete sa www.rcsb.org.

PDB kod	Vezivno mjesto liganda	Vezivno mjesto PCB-a	Vezivna energija (kcal/mol)
1HA2	IIA	IIA	10.5
		IB	10.8
1HK1	IIA	IIA	9.9
	IIIB IIIA	IB	8.7
1O9X	IB	IIA	9.7
		IB	10.5
2BXB	IIA	IIA	8.5
		IB	8.8
2BXD	IIA	IIA	8.7
		IB	9.7
2BXF	IIIA	IIA	9.1
		IB	8.8
2BXI	IB IIA	IIA	9.3
		IB	10.5
2BXK	IIA IMN ^a	IIA	10.2
	IIA AZQ ^a	IB	9.7
2VUE	IB	IIA	8.6
		IB	8.4
2VUF	IB	IIA	8.5
	IIIB	IB	9.1
2XVU	IIA	IIA	9.5
	IIIA	IB	9.3
3CX9	IIA	IIA	9.5
		IB	9.5
4L9K	IB	IIA	8.9
		IB	10.2
4L9Q	IB	IIA	9.6
		IB	10.3
4LA0	IB	IIA	9.2
		IB	10.3
1E7G	-	IIA	9.3
		IB	10.7

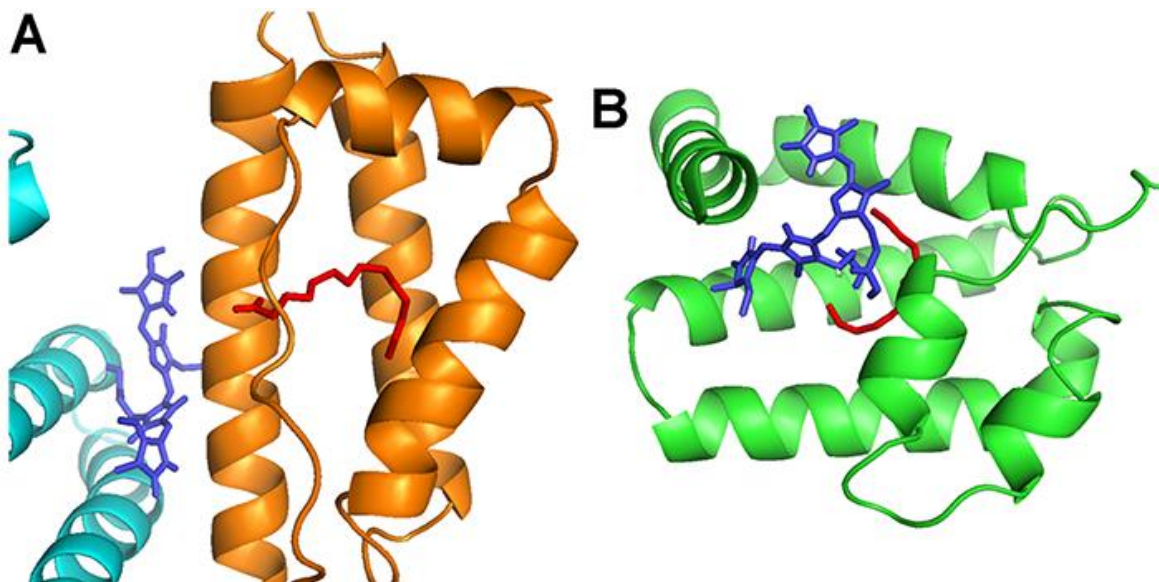
^a IMN - Indometacin; AZQ – Azapropazon

Tabela P8. Vezivne energije PCB-a za 6 kristalnih struktura HSA sa miristinskom kiselinom, preuzetih sa www.rcsb.org.

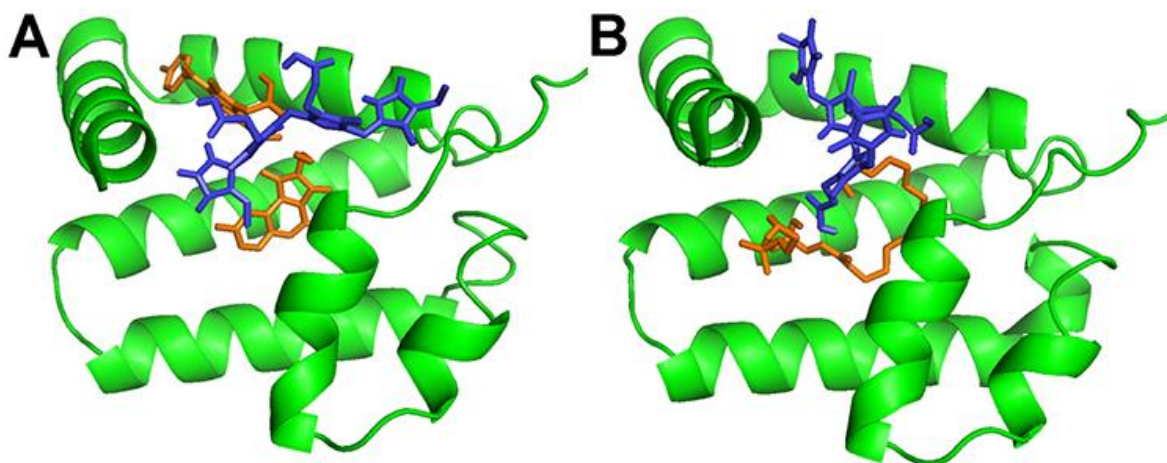
PDB kod	Vezivno mjesto miristinske kiseline	Vezivno mjesto PCB-a	Vezivna energija (kcal/mol)
1HA2	FA1, FA2, FA3, FA4, FA5, FA6	IIA	10.5
		IB	-
1O9X	FA2, FA3, FA4, FA5, FA6, FA7	IIA	10.4
		IB	10.5
2BXI	FA2, FA3, FA4, FA5, FA6	IIA	9.3
		IB	10.6
2BXK	FA1, FA2, FA3, FA4, FA5, FA6	IIA	10.3
		IB	-
3CX9	FA2, FA3, FA4, FA5, FA6	IIA	9.5
		IB	9.5
1E7G	FA1, FA2x2, FA3, FA4, FA5, FA6, FA7	IIA	8.2
		IB	-

Tabela P9. Vezivne energije PCB-a za 14 kristalnih struktura HSA sa ligandima koji su vezani za isto vezivno mjesto na proteinu.

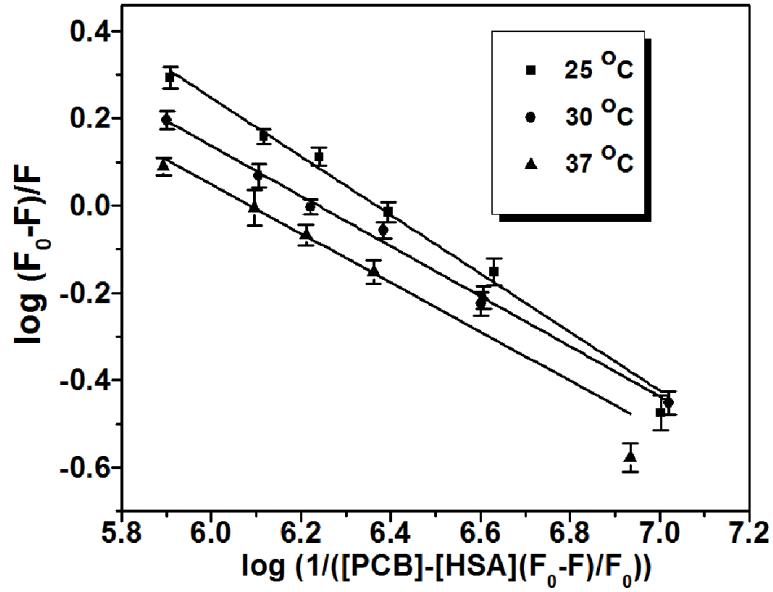
PDB kod	Vezivno mjesto liganda/miristinske kiseline	Vezivno mjesto PCB-a	Vezivna energija (kcal/mol)
1HA2	IIA, FA1, FA2, FA3, FA4, FA5, FA6	IIA	-
1HK1	IIA	IIA	-
1O9X	IB, FA2, FA3, FA4, FA5, FA6, FA7	IB	-
2BXB	IIA	IIA	-
2BXD	IIA	IIA	-
2BXI	IB, IIA, FA2, FA3, FA4, FA5, FA6	IIA IB	8.6 -
2BXK	IIA IMN, IIA AZQ	IIA	9.0
2VUE	IB	IB	-
2VUF	IB, IIIB	IB	-
2XVU	IIA, IIIA	IIA	-
3CX9	IIA, FA2, FA3, FA4, FA5, FA6	IIA	9.0
4L9K	IB	IB	-
4L9Q	IB	IB	-
4LA0	IB	IB	-



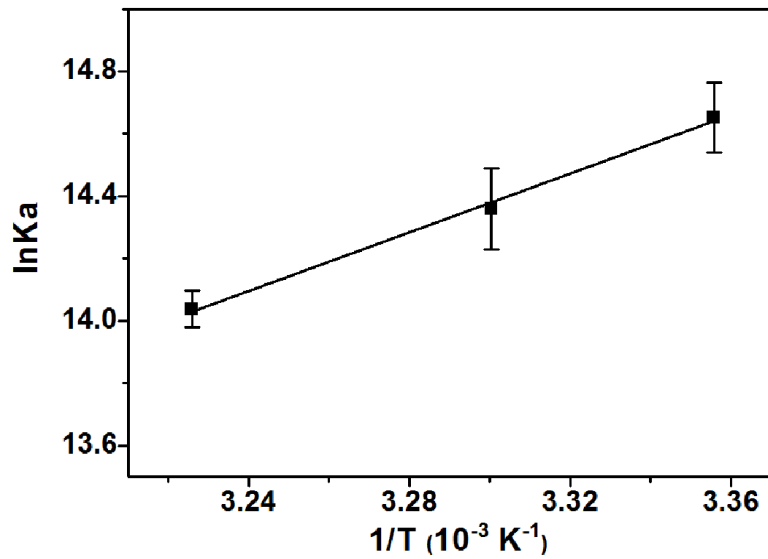
Slika P15. (A) Miristinska kiselina (crveno) u FA1 mjestu i udokovani PCB (ljubičasto) u međudomenskoj šupljini; (B) Miristinska kiselina (crveno) u FA7 mjestu i udokovani PCB (ljubičasto) za IIA mjesto u HSA.



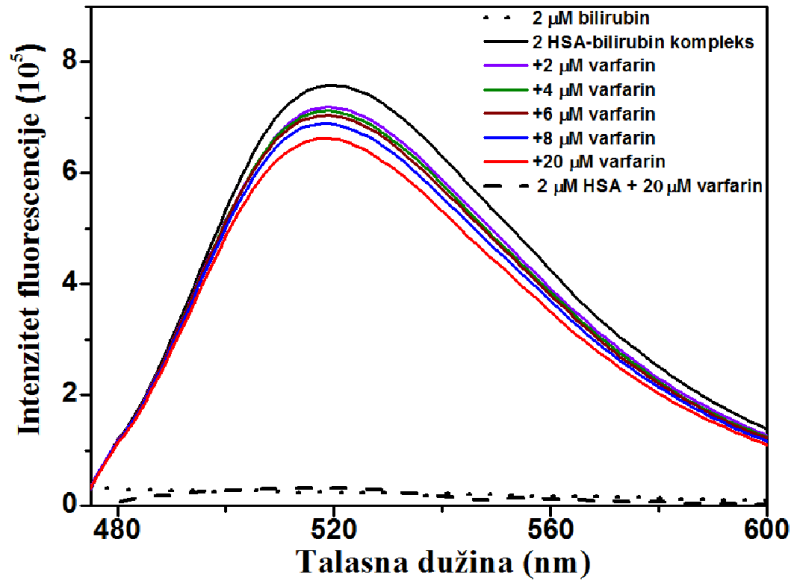
Slika P16. Ligandi (narandžasto) i udokovani PCB (ljubičasto) u IIA vezivnom mjestu HSA; PDB kodovi: 2BXK (A) i 3CX9 (B).



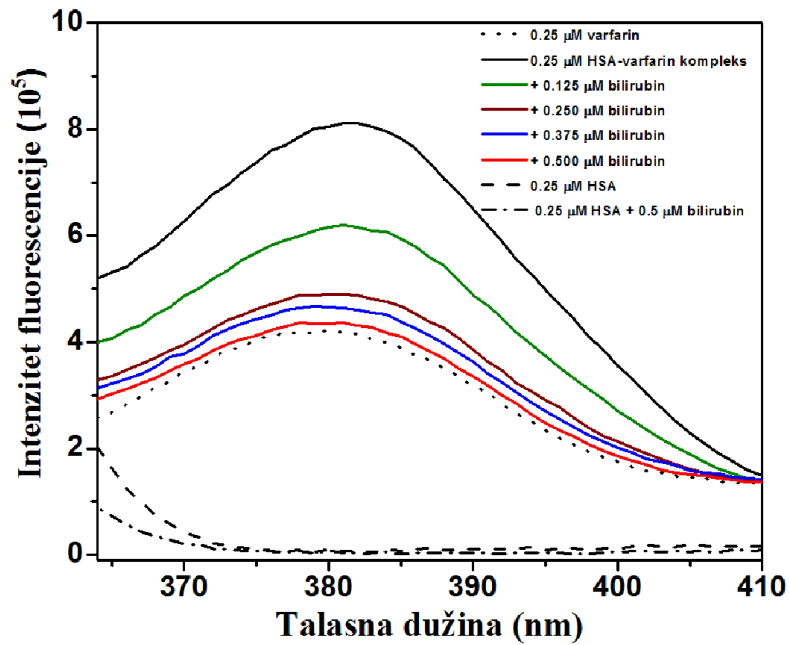
Slika P17. Dijagrami zasnovani na gašenju fluorescencije HSA u cilju određivanja vezivne konstante PCB-a za protein. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (n=3).



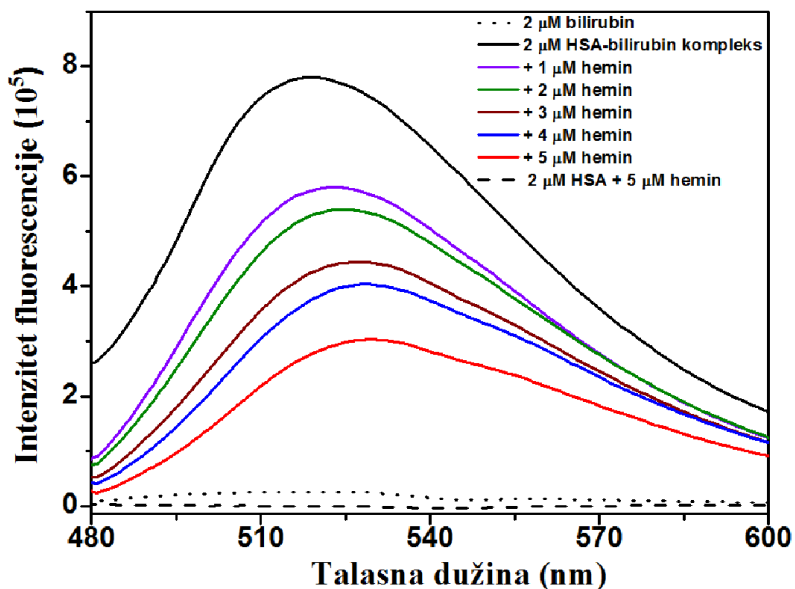
Slika P18. Dijagram dobijen na osnovu Van't Hoff jednačine za određivanje termodinamičkih parametara HSA-PCB sistema. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (n=3).



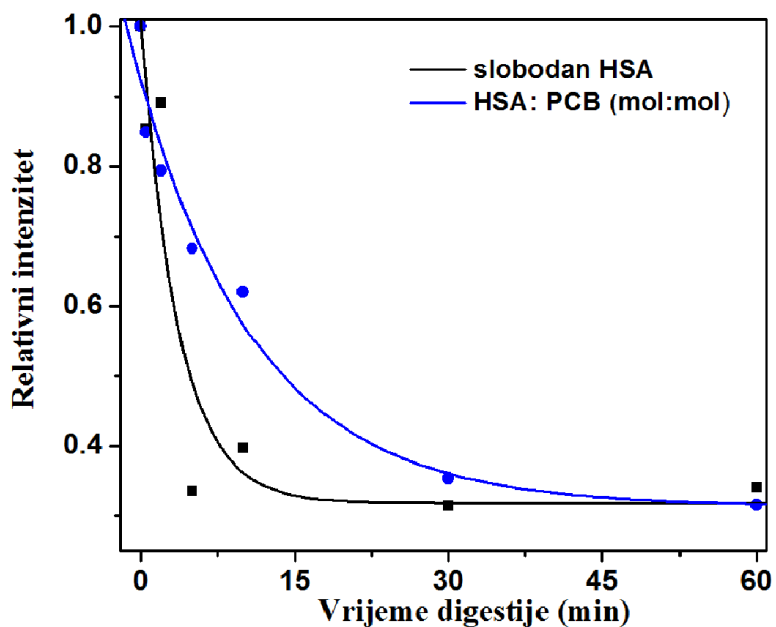
Slika P19. Gašenje fluorescencije koja potiče od HSA-bilirubin kompleksa (2 μM oba) varfarinom (ekscitacija na 460 nm).



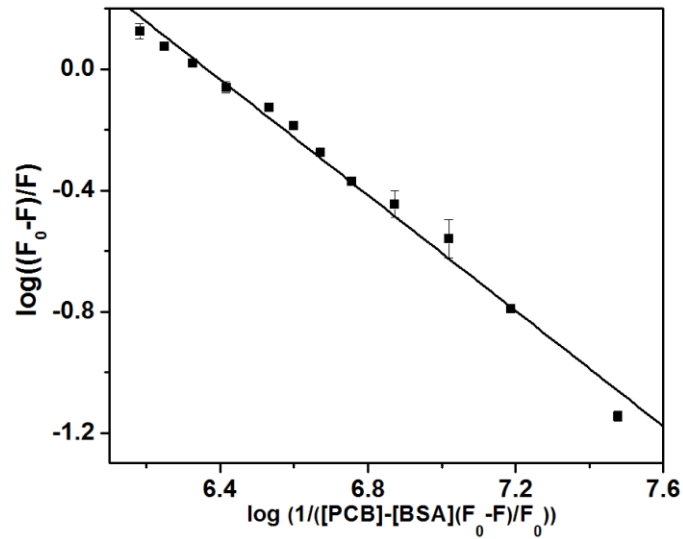
Slika P20. Gašenje fluorescencije koja potiče od HSA-varfarin kompleksa (0.25 μM oba) bilirubinom, upotrebom sinhronne fluorescentne spektroskopije, $\Delta\lambda$ 64 nm.



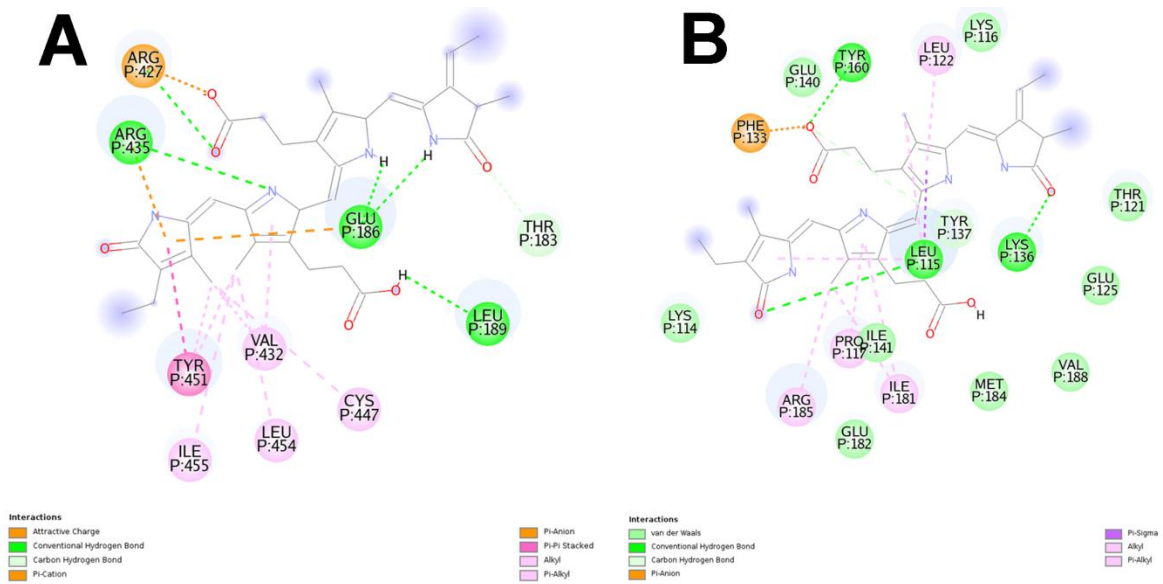
Slika P21. Gašenje fluorescencije HSA-bilirubin kompleksa (2 μ M oba) heminom (ekscitacija na 460 nm).



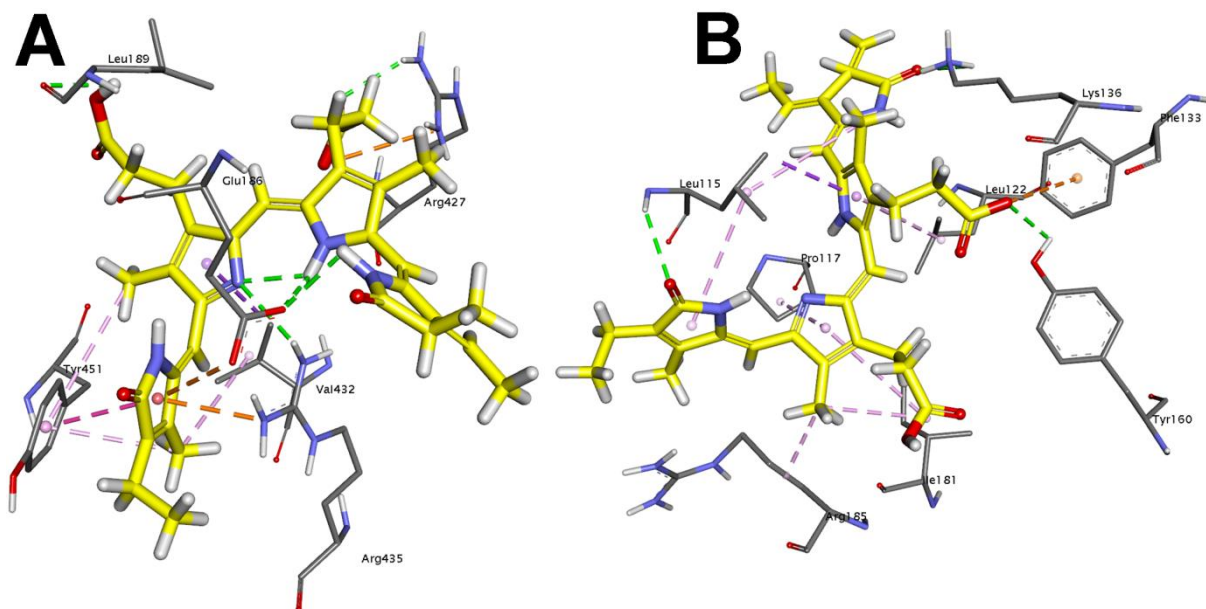
Slika P22. Kvantifikacija digestije HSA tripsinom u prisustvu i odsustvu PCB-a. Intenzitet traka na 66 kDa je kvantifikovan denzitometrijom nakon SDS-PAGE.



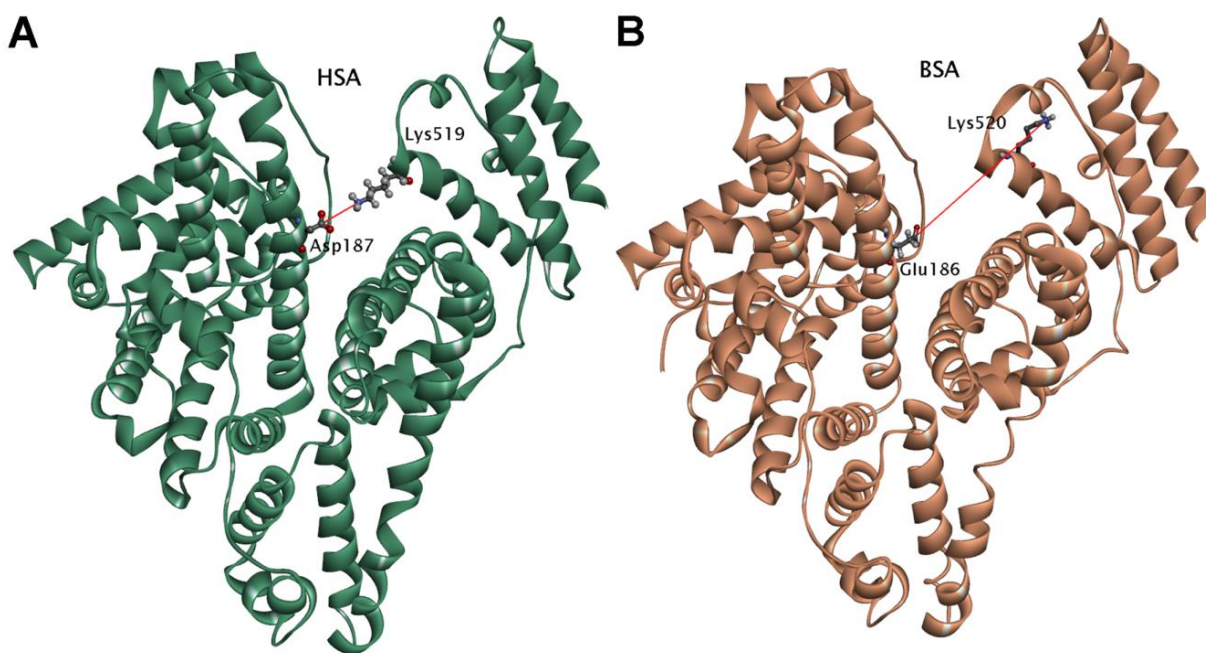
Slika P23. Određivanje konstante vezivanja PCB-a za BSA, na osnovu gašenja fluorescencije BSA. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija ($n=3$).



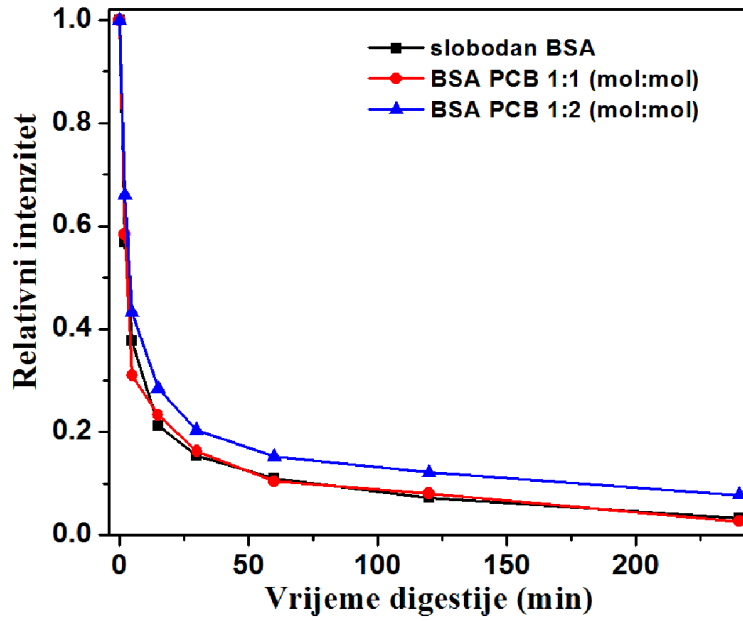
Slika P24. 2D dijagram interakcija udokovanog PCB-a za BSA u međudomenskoj šupljini (A) i subdomenu IB (B).



Slika P25. Glavne interakcije između PCB-a i BSA u međudomenskoj šupljini (A) i subdomenu IB (B).



Slika P26. Poređenje distanci između Lys-519/520 (domen III) i Asp-187 (domen I) koji ovičavaju međudomensku šupljinu (A) humanog (PDB ID 1BM0) i (B) govedeg (PDB ID: 3V03) serum albumina. Distance između domena I i III su prikazane zelenom linijom: 0.49 nm između Lys-519 i Asp-187 u HSA, i 1.92 nm između Lys-520 i Asp-187 u BSA. Obilježene aminokiseline su prikazane kao štapićasti model.



Slika P27. Kvantifikacija digestije BSA pepsinom u prisustvu i odsustvu PCB-a. Kvantifikacija intenziteta trake na 66.2 kDa je urađena denzitometrijski nakon SDS-PAGE.

Biografija kandidata

Simeon (Lazar) Minić je rođen 25.11.1989. u Nikšiću, Crna Gora, SFRJ, gdje je završio osnovnu školu i gimnaziju. Studije biohemije na Hemijskom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, upisao je 2008., a završio 2012. godine sa prosječnom ocjenom 9,97 i ocjenom 10 na završnom radu. Master akademske studije je upisao 2012., a završio 2013. godine sa prosječnom ocjenom 9,80 i radom: „*In vitro* studija digestibilnosti C-fikocijanina i efekti fikocijanobilina, njegove hromofore, na kontraktilnost glatke muskulature uterusu pacova *ex vivo*“ (Mentori: profesor dr Tanja Ćirković Veličković i docent dr Milan Nikolić). Trenutno je student doktorskih akademskih studija na smjeru Biohemija, na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu (Mentori: profesor dr Tanja Ćirković Veličković i docent dr Milan Nikolić). Kao srednjoškolac, osvajao je tri puta prvo mjesto na Republičkom takmičenju iz hemije u Crnoj Gori. Takođe, dobitnik je i stipendije Federacije evropskih biohemijskih društava (FEBS) za pohađanje Forumu mladih naučnika (Young Scientists' Forum) i FEBS-ovog kongresa u Berlinu, 2015. godine. Nosilac je više priznanja: diplome „Đorđe Stefanović“, kao najbolji student studijske grupe Diplomirani biohemičar u generaciji; nagrade „Student generacije“, koju dodjeljuje Univerzitet u Beogradu kao studentu generacije Hemijskog fakulteta; Godišnje nagrade Srpskog hemijskog društva; Studentske nagrade opštine Nikšić (Republika Crna Gora), kao jednom od pet najboljih studenata na teritoriji opštine Nikšić za 2013. godinu. Član je Biohemijskog društva Srbije, Srpskog hemijskog društva i Srpske asocijacije za proteomiku. Glavne oblasti naučno-istraživačkog rada su protein-ligand interakcije i bioktivne supstance iz mikroalgi. Do sada je objavio pet naučnih radova u vrhunskim međunarodnim časopisima. Imao je dvanaest saopštenja na skupovima međunarodnog i nacionalnog značaja.

Objavljeni radovi i saopštenja koji čine deo disertacije

Radovi u vrhunskim međunarodnim časopisima (M₂₁) koji su integralni deo disertacije:

1. Minić, S.L., Stanić-Vučinić, D., Mihailovic, J., Krstić, M., Nikolić, M. R., & Ćirković Veličković, T. (2016). **Digestion by pepsin releases biologically active chromopeptides from C-phycoyanin, a blue-colored biliprotein of microalga Spirulina.** *Journal of Proteomics*, 147, 132-139. (IF 3,867; Kategorija: Biohemijske metode u istraživanjima: 15/77 u 2015. g.).
2. Minić, S.L., Milčić, M., Stanić-Vučinić, D., Radibratović, M., Sotiroudis, T. G., Nikolić, M. R., & Ćirković Veličković, T. (2015). **Phycocyanobilin, a bioactive tetrapyrrolic compound of blue-green alga Spirulina, binds with high affinity and competes with bilirubin for binding on human serum albumin.** *RSC Advances*, 5(76), 61787-61798. (IF 3,840; Kategorija: Hemija, multidisciplinarna: 33/157 u 2014. g.).

Rad na recenziji u međunarodnom časopisu izuzetnih vrednosti (M_{21a}) koji je integralni deo disertacije:

Minić, S.L., Stanić-Vučinić, D., Radomirović, M., Radibratović, M., Milčić, M., Nikolić, M. R., & Ćirković Veličković, T. (2017). **Characterization and effects of binding of food-derived bioactive phycocyanobilin to bovine serum albumin.** *Food Chemistry*. (IF 4,052; Kategorija: Hemija, primenjena: 7/72 u 2015. g.)

Drugi radovi Kandidata u vrhunskim međunarodnim časopisima iz oblasti istraživanja:

Radibratović, M., Minić, S.L., Stanić-Vučinić, D., Nikolić, M.R., Milčić, M., & Ćirković Veličković, T. (2016). **Stabilization of human serum albumin by the binding of phycocyanobilin, a bioactive chromophore of blue-green alga Spirulina: molecular dynamics and experimental study.** *PLoS One*, 11(12), e0167973. (IF 3,057; Kategorija: Multidisciplinarne nauke: 11/62 u 2015. g.).

Saopštenja sa međunarodnih skupova štampana u izvodu (M₃₄)

1. Minić, S.L., Stanić-Vučinić, D., Krstić, M., Nikolić, M.R., & Ćirković Veličković, T. Digestion-released antioxidative chromopeptides of c-phycoyanin, a chromoprotein of blue-green alga spirulina, exert cytotoxic effect in human cervical adenocarcinoma and colonic cancer cells. EuroFoodChem conference, Madrid, Spain, 13th to 16th October, 2015.

2. Minić, S.L., Krstić, M., Apostolović, D., Vesić, J., Stanić-Vučinić D., Nikolić M.R., & Ćirković Veličković, T. Pepsin digestion of C-phycoyanin releases chromopeptides with potent anticancer and antioxidant activities. The FEBS 2015 congress, Berlin, Germany, 4th to 9th July, 2015.
3. Minić, S.L., Stanić-Vučinić D., Ćirković Veličković, T., & Nikolić M.R. The binding of phycoyanobilin to human hemoglobin and serum albumin: comparison with bilirubin. The FEBS EMBO 2014 Conference. Paris, France, 30th August to 4th September, 2014.

Saopštenja sa skupova nacionalnog značaja štampana u izvodu (M₆₄)

1. Minić, S.L. Phycocyanobilin and chromopeptides from C-phycoyanin: structure, biological activity and binding to human serum albumin. 6th Conference of the Serbian Biochemical Society: Biochemistry and Interdisciplinarity: Transcending the Limits of Field. Belgrade, Serbia, 18th November, 2016.
2. Minić, S.L., Stanić-Vučinić, D., Krstić, M., Mihailović, J., Nikolić M.R., & Ćirković Veličković, T. Structure determination of chromopeptides obtained by pepsin digestion of C-phycoyanin from microalga *Arthrospira platensis*. 53rd Meeting of the Serbian Chemical Society, Kragujevac, Serbia, 10th to 11th June, 2016.
3. Minić S.L., Milčić M., Stanić-Vučinić D., Radibratović M., Sotirudis, T., Nikolić M.R., & Ćirković Veličković, T. Binding of phycoyanobilin to human serum albumin. 52nd Meeting of the Serbian Chemical Society, Novi Sad, Serbia, 29th to 30th May, 2015.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора **Симеон Минић**

Број индекса **ДБ16/2013**

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Структура, биолошка активност и интеракције са протеинама фикоцијанобилина и хромопептида С-фикоцијанина из цијанобактерије *Arthrospira platensis*

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора



У Београду, 14.06.2017.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора **Симеон Минић**

Број индекса **ДБ16/2013**

Студијски програм **доктор биохемијских наука**

Наслов рада **Структура, биолошка активност и интеракције са протеинама фикоцијанобилина и хромопептида С-фикоцијанина из цијанобактерије *Arthrospira platensis***

Ментори **проф. др Тања Ћирковић Величковић и доц. др Милан Николић**

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора



У Београду, 14.06.2017.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Структура, биолошка активност и интеракције са протеинама фикоцијанобилина и хромопептида С-фикоцијанина из цијанобактерије *Arthrospira platensis*

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
- 3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)**
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора



У Београду, 14.06.2017.

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.