

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Evgen BENEDIK

**VPLIV KATEHINOV NA DELOVANJE
ENTEROTOKSINOV**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2010

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Evgen BENEDIK

VPLIV KATEHINOV NA DELOVANJE ENTEROTOKSINOV

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

IMPACT OF CATECHINS ON ENTEROTOXINS

GRADUATION THESIS

University studies

Ljubljana, 2010

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Opravljeno je bilo na Katedri za biokemijo in kemijo živil, Oddelka za živilstvo, Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani, kjer so bile v biokemijskem in kemijskem laboratoriju pripravljene vzorčne raztopine, analize pa so bile opravljene v fizikalno-kemijskem laboratoriju.

Študijska komisija za dodiplomski študij univerzitetnega študija živilske tehnologije Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete je dne 15. junija 2010 sprejela temo diplomske naloge in za mentorico diplomskega dela imenovalo prof. dr. Natašo Poklar Ulrich, somentorico asist. dr. Mihaela Skrt in recenzentko doc. dr. Polono Jamnik.

Mentorica: prof. dr. Nataša Poklar Ulrich

Somentorica: asist. dr. Mihaela Skrt

Recenzentka: doc. dr. Polona Jamnik

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Tatjana KOŠMERL

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
Članica: prof. dr. Nataša POKLAR ULRIH

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
Članica: asist. dr. Mihaela SKRT

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
Članica: doc. dr. Polona JAMNIK

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Datum zagovora: 31. avgust 2010

Diplomsko delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Podpisani se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddal v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Evgjen Benedik

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 577.322:547.56:615.9:543.726(043)=163.6
KG	enterotoksini/inaktivacija toksinov/proteini/denaturacija proteinov/stafilokokni enterotoksin B/SEB/goveji serumski albumin/BSA/polifenoli/katehini/hidroksicimetne kisline/flavonoidi/kavna kislina/p-kumarna kislina/rožmarinska kislina/epikatehin galat/epigalokatehin galat/epigalokatehin/kvercetin/kampferol/kampferol-3-glukozid/naringenin/UV-VIS spektrofotometrija/fluorimetrija/molekulska modeliranje/docking/vgnezdenje
AV	BENEDIK, Evgen
SA	POKLAR ULRIH, Nataša (mentorica)/SKRT, Mihaela (somentorica)/JAMNIK, Polona (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI	2010
IN	VPLIV KATEHINOV NA DELOVANJE ENTEROTOKSINOV
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XV, 121 str., 18 pregl., 56 sl., 2 pril., 262 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Termostabilni stafilokokni entrerotoksin B (SEB) je metabolni produkt bakterije <i>Staphylococcus aureus</i> , ki povzroča gastrointestinalne zastrupitve. Do zastrupitve pride zaradi oporečne vode in nepravilno pripravljene in skladišcene hrane. S fluorescenčno spektroskopijo smo spremljali strukturne spremembe SEB proteina ob dodatku štirih flavonoidov. Določili smo Stern-Volmerjevo konstanto vezanja, temperaturo denaturacije in standardno tvorbeno entalpijo in ugotovili, da se epigalokatechin, najbolje, verjetno površinsko, veže na SEB protein. Denaturacija SEB proteina je ireverzibilen proces. Dobljene eksperimentalne podatke smo potrdili z molekulskim vgnezdenjem, saj smo ugotovili, da se polifenolne spojine vežejo na SEB protein preko vodikovih vezi med polifenolno spojino in aminokislinskimi ostanki ali skeletom SEB proteina. V bližini teoretičnega vezavnega mesta ni triptofana (Trp). Vzporedno smo s fluorescenčno in UV-VIS spektroskopijo raziskovali vpliv treh hidroksicimetnih kislin in sedmih flavonoidov na goveji serumski albumin (BSA). Določili smo Stern-Volmerjevo konstanto, temperaturo denaturacije in standardno tvorbeno entalpijo ter ugotovili, da se na BSA protein najbolje vezeta epigalokatehin galat in epikatehin galat. Predvidevamo, da zaradi zaestrene galne kislne v njuni strukturi. Denaturacija BSA proteina je delno reverzibilen proces. Z molekulskim vgnezdenjem smo ugotovili, da se pri vezavi polifenolnih spojin na BSA protein vzpostavijo vodikove vezi med aminokislinskimi ostanki ali pa s skeletom BSA proteina. V teoretično izbranem mestu se nahaja Trp-212, ki ne tvori vodikovih vezi s polifenolnimi spojinami, vendar pa je bolj občutljiv na strukturne spremembe v njegovi okolici.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN	Dn
DC	UDC 577.322:547.56:615.9:543.726(043)=163.6
CX	enterotoxins/inactivation of toxins/proteins/protein denaturation/staphylococcal enterotoxin B/SEB/bovine serum albumine/BSA/polyphenols/catechins/hydroxycinnamic acids/flavonoids/caffeic acid/p-coumaric acid/rosemary acid/epicatechin gallate/epigallocatechin galatate/epigallocatechin/querçetin/kaempferol/kaempferol-3-glucoside/naringenin/ spectrometry/UV-VIS spectrophotometry/fluorometry/molecular modeling/docking
AU	BENEDIK, Evgen
AA	POKLAR ULRIH, Nataša (supervisor)/SKRT, Mihaela (co-advisor)/JAMNIK, Polona (reviewer)
PP	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB	University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Department of Food Science and Technology
PY	2010
TI	IMPACT OF CATECHINS ON ENTEROTOXINS
DT	Graduation Thesis (University studies)
NO	XV, 121 p., 18 tab., 56 fig., 2 ann., 262 ref.
LA	Sl
AL	sl/en
AB	Thermostable staphylococcal enterotoxin B (SEB) is a metabolic product of <i>Staphylococcus aureus</i> which causes gastrointestinal toxicity. Poisoning is due to contaminated water and improperly prepared and stored food. With fluorescence spectroscopy, we monitored the structural changes of SEB protein in the addition of four flavonoids. We have determined the Stern-Volmer constant, denaturation temperature and standard formational enthalpy. We have notes that epigallocatechin probably interact and maybe binds with SEB. SEB protein denaturation is an irreversible process. Experimental data were confirmed by molecular docking because we found that the polyphenol compounds binds to the SEB protein through hydrogen bond between the hydroxyl group on polyphenols and amino acid residues or with backbone of SEB protein. Nearby of the theoretical potential binding site there is no tryptophan (Trp). At the same time we use fluorescence spectroscopy and UV-VIS spectroscopy for studying the interaction between three hydroxycinnamic acids and seven flavonoids in the bovine serum albumin (BSA). We have determined Stern-Volmer constant, denaturation temperature and standard formational enthalpy. We found out that epicatechin gallate and epigallocatechin gallate have the best results probably because of esterified gallic acid. BSA denaturation is partially reversible process. With molecular docking we found out the same binding mechanism as described in SEB. Trp-212 is located inside the theoretical binding site but it does not form hydrogen bonds with the polyphenol compounds but it is more sensitive to structural changes in its surroundings.

KAZALO VSEBINE

KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO SLIK	VII
KAZALO PREGLEDNIC	XI
KAZALO PRILOG	XIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XIV
OKRAJŠAVE AMINOKISLIN	XV
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	1
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 ZASTRUPITVE S HRANO	2
2.2 <i>Staphylococcus aureus</i> IN ENTEROTOKSIN B	2
2.2.1 Mehanizem delovanja SEB	5
2.2.2 Klinični znaki zstrupitve	6
2.3 GOVEJI SERUMSKI ALBUMIN	7
2.4 POLIFENOLNE SPOJINE	11
2.4.1 Razdelitev polifenolnih spojin	12
2.4.2 Polifenolne spojine v vlogi antioksidantov	17
2.4.3 Polifenolne spojine v vlogi antimikrobnih učinkovin	18
2.4.4 Interakcije protein-polifenol	20
2.4.5 Uporaba polifenolnih spojin v prehrani in medicini	22
2.4.6 Metabolizem polifenolnih spojin v telesu	23
3 MATERIAL IN METODE	24
3.1 MATERIAL, OPREMA IN PRIPRAVA OSNOVNIH RAZTOPIN	24
3.1.1 Material	24
3.1.2 Laboratorijska oprema	25
3.1.3 Priprava osnovnih raztopin	26
3.1.3.1 Priprava HEPES pufra	26
3.1.3.2 Priprava osnovne raztopine stafilokoknega enterotoksina B (SEB)	26
3.1.3.3 Priprava osnovne raztopine govejega serumskega albumina (BSA)	27
3.1.3.3.1 Postopek dialize	28
3.1.3.4 Priprava osnovne raztopine polifenolnih spojin	29
3.2 METODE	30
3.2.1 UV-VIS spektrofotometrija in fluorimetrija	31
3.2.1.1 Osnove UV-VIS spektrofotometrije	33
3.2.1.1.1 Opis UV-VIS spektrofotometra	34
3.2.1.2 Osnove fluorimetrije	35
3.2.1.2.1 Dušenje (ang. Quenching)	36
3.2.1.2.2 Vezava liganda na receptorsko mesto na proteinu	37
3.2.1.2.3 Opis fluorimetra	42
3.2.2 Določitev termodinamskih parametrov termične denaturacije proteinov na osnovi enostopenjskega modela	43
3.2.3 Eksperimentalni del	45
3.2.3.1 Titracija SEB in BSA proteina z nekaterimi polifenolnimi spojinami	45

3.2.3.1.1	Parametri merjenja fluorescence raztopine SEB proteina	45
3.2.3.1.2	Parametri merjenja fluorescence raztopine BSA proteina.....	46
3.2.3.1.3	Obdelava izmerjenih emisijskih spektrov po zaključeni titraciji.....	46
3.2.3.2	Določanje temperature denaturacije proteina z UV-VIS spektrofotometrijo in fluorimetrijo.....	46
3.2.3.2.1	Določanje temperature denaturacije BSA proteina z UV-VIS spektrofotometrijo	46
3.2.3.2.2	Določanje termične stabilnosti SEB in BSA proteina s fluorimetrijo	48
3.2.4	Molekulsко modeliranje	49
3.2.4.1	Metoda vgnezdenja ("docking").....	49
3.2.4.1.1	Opis programa za vgnezdenje molekul – Glide program.....	50
3.2.4.1.1.1	Predstavitev metode Monte Carlo	51
3.2.4.2	Metoda modelov na osnovi homologije	52
3.2.4.2.1	Opis programskega paketa YASARA Structure	54
4	REZULTATI.....	55
4.1	ŠTUDIJ VEZAVE POLIFENOLNIH SPOJIN NA PROTEIN (SEB IN BSA) .	55
4.1.1	Spremljanje strukturnih sprememb proteina s fluorimetrijo.....	55
4.1.1.1	Rezultati titracij SEB proteina z različnimi polifenolnimi spojinami	55
4.1.1.2	Rezultati titracij BSA proteina s polifenolnimi spojinami	60
4.1.2	Spremljanje spremembe temperature denaturacije s fluorimetrijo....	63
4.1.2.1	Rezultati termične denaturacije SEB proteina z različnimi polifenolnimi spojinami	63
4.1.2.2	Rezultati termične denaturacije BSA proteina z različnimi polifenolnimi spojinami	69
4.1.3	Spremljanje spremembe temperature denaturacije z UV-VIS spektroskopijo za BSA	73
4.2	MOLEKULSKO MODELIRANJE.....	79
4.2.1	Rezultati molekulskega modeliranja za SEB protein.....	79
4.2.1.1	Molekulsko vgnezdenje s programom GLIDE za SEB protein	79
4.2.2	Rezultati molekulskega modeliranja za BSA protein	83
4.2.2.1	Modeliranje proteina BSA s programom YASARA	83
4.2.2.2	Molekulsko vgnezdenje s programom GLIDE za BSA protein	85
5	RAZPRAVA IN SKLEPI.....	90
5.1	STAFILOKOKNI ENTEROTOKSIN B (SEB).....	90
5.2	GOVEJI SERUMSKI ALBUMIN (BSA).....	93
5.3	SKLEPI.....	98
6	POVZETEK.....	99
7	VIRI	101
	ZAHVALA	122
	PRILOGE.....	123

KAZALO SLIK

Slika 1: Prikaz stimulacije T-celic z antigenom in s superantigenom (Todar, 2009).....	5
Slika 2: Model odziva organizma na SEB v tankem črevesu prebavnega trakta (Pinchuk in sod., 2010)	6
Slika 3: Osnovna struktura flavonoidov	13
Slika 4: Shematičen prikaz oksidacijskega procesa (CarefolinNAC, 2010)	18
Slika 5: Mesta in možni mehanizmi antimikrobnega delovanja polifenolnih spojin v bakterijski celici (Labnews, 2010; Davidson in Branen, 2005; Burt, 2004)	19
Slika 6: Reverzibilne in ireverzibilne protein-polifenol interakcije (Haslam in sod., 1999)	21
Slika 7: Shematičen prikaz protein-polifenol precipitacije (Jöbstl in sod., 2004)	21
Slika 8: Shematični prikaz dialize – pasivne difuzije (Koolman in Roehm, 2005)	28
Slika 9: Shema poteka dela.....	30
Slika 10: Elektromagnetno valovanje (Farlex Inc., 2007).....	31
Slika 11: Shematski prikaz relaksacijskega procesa (absorpcije in emisije fotona) (Herman in sod., 2005)	31
Slika 12: Absorpcijski vzbujevalni (ekscitacijski) in emisijski (fluorescenčni) spekter – Stokes-ov premik (Herman in sod., 2005).....	32
Slika 13: Prirejen Jabloński energijski diagram prikazuje procese od absorpcije do emisije oz. emitacije svetlobe (Herman in sod., 2005; Nelson in Cox, 2000, Skoog 1996).....	33
Slika 14: Shematski prikaz UV-VIS spektrofotometra (Spectro Analysis Co., 2010).....	34
Slika 15: Triptofan (Trp)	38
Slika 16: Tirozin (Tyr).....	38
Slika 17: Fenilanalin (Phe)	39

Slika 18: Cistein (Cys).....	39
Slika 19: Absorpcijski spekter aromatskih aminokislin (Trp, Tyr in Phe) (Albani, 2007) .	39
Slika 20: Emisijski fluorescenčni spektri aromatskih aminokislin (Trp, Tyr in Phe) (Teale in Weber, 1957)	40
Slika 21: Absorpcijski spekter BSA raztopine z molarno koncentracijo $1,25 \times 10^{-5}$ M oz. z masno koncentracijo 0,8 mg/ml v 20 mM HEPES pufru s pH 7,5	40
Slika 22: Shema fluorimetra (Poklar Ulrich, 2010)	42
Slika 23: Primer denaturacijske krivulje	44
Slika 24: Shematični prikaz temperaturnega režima pri spremjanju termične denaturacije z UV-VIS spektrofotometrijo in s fluorimetrijo.....	47
Slika 25: Ključni koraki v procesu vgnezdenja (Kukol, 2008)	50
Slika 26: Slika prikazuje dve coni prileganja aminokislinskih ostankov.	53
Slika 27: Spremljanje sprememb intenzitete fluorescence SEB proteina ob dodatku EGCG (A), EGC (B), KAM-G (C) in KAM (D) ($\lambda_{\text{ex}} = 275$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 328$ nm, T = 25 °C).	55
Slika 28: Spremljanje fluorescenčnih sprememb SEB proteina ob dodatku EGCG (A), EGC (B), KAM-G (C) in KAM (D) ($\lambda_{\text{ex}} = 295$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 328$ nm, T = 25 °C).	56
Slika 29: Odvisnost normalizirane intenzitete fluorescence $F/F_0 \times 100$ merjene pri $\lambda_{\text{em}} = 328$ nm v odvisnosti od množinskega razmerja polifenolne spojine n(F.SP) in SEB proteina n(SEB) pri $\lambda_{\text{ex}} = 275$ nm (A) in pri $\lambda_{\text{ex}} = 295$ nm (B).....	57
Slika 30: Stern-Volmerjev graf za SEB protein (F_0/F) v odvisnosti od množinske koncentracije polifenolne spojine [μM].	58
Slika 31: Fluorescenčni spektri BSA proteina ob dodatku EGCG (A), EGC (B), KAM-G (C), KAM (D), ECG (E), KAV (F), KVER (G), NAR (H), p-KUM (I), RK (J) ($\lambda_{\text{ex}} = 280$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 339$ nm, T = 25 °C).	60
Slika 32: Odvisnost normalizirane intenzitete fluorescence $F/F_0 \times 100$ v odvisnosti od množinskega razmerja polifenolne spojine n(F.SP) in BSA proteina n(BSA) ($\lambda_{\text{ex}} = 280$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 339$ nm, T = 25 °C).	61

Slika 33: Stern-Volmerjev graf za BSA protein (F_0/F) v odvisnosti od množinske koncentracije polifenolne spojine [μM] 62

Slika 34: Intenziteta fluorescence merjena pri $\lambda_{\text{em}} = 328 \text{ nm}$ v odvisnosti od temperature pri $\lambda_{\text{ex}} = 275 \text{ nm}$ (A, B) in pri $\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$ (C, D). 63

Slika 35: Intenziteta fluorescence merjene pri $\lambda_{\text{em}} = 328 \text{ nm}$ v odvisnosti od temperature pri $\lambda_{\text{ex}} = 275 \text{ nm}$ (A) in pri $\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$ (B) za SEB protein. 65

Slika 36: Delež denaturiranega SEB proteina pri $\lambda_{\text{em}} = 328 \text{ nm}$ v odvisnosti od temperature pri $\lambda_{\text{ex}} = 275 \text{ nm}$ (A) in pri $\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$ (B), pH = 7,5 66

Slika 37: Fluorescenčni spektri SEB proteina pred termično denaturacijo (20 °C), pri 95 °C in po termični denaturaciji (20 °C) ob dodatku EGCG (A), EGC (B), KAM-G (C), KAM (D) v molskem razmerju 1 : 1, merjene pri $\lambda_{\text{em}} = 328 \text{ nm}$ in $\lambda_{\text{ex}} = 275$ 67

Slika 38: Fluorescenčni spektri SEB proteina pred termično denaturacijo (20 °C), pri 95 °C in po termični denaturaciji (20 °C) ob dodatku EGCG (A), EGC (B), KAM-G (C), KAM (D) v molskem razmerju 1 : 1, merjene pri $\lambda_{\text{em}} = 328 \text{ nm}$ in $\lambda_{\text{ex}} = 295$ 68

Slika 39: Intenziteta fluorescence merjene pri $\lambda_{\text{em}} = 339 \text{ nm}$ v odvisnosti od temperature pri $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$ 69

Slika 40: Deleže denaturiranega BSA proteina v odvisnosti od temperature ($\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 339 \text{ nm}$, pH = 7,5) 70

Slika 41: Fluorescenčni spektri BSA proteina in BSA proteina ob dodatku polifenolnih spojin merjenega v odvisnosti od valovne dolžine ($\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 339 \text{ nm}$) pred termično denaturacijo (moder spekter), pri 95 °C (rumen spekter) in po termični denaturaciji (vijoličen spekter). 71

Slika 42: Intenziteta fluorescence merjena v odvisnosti od temperature ($\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 339 \text{ nm}$). 72

Slika 43: Absorbanca v odvisnosti od temperature spremljana pri valovni dolžini $\lambda = 280 \text{ nm}$ (A,B) in pri $\lambda = 293 \text{ nm}$ (C, D). 73

Slika 44: Absorpcijski spektri posneti za BSA protein (A) in BSA protein z ustreznimi polifenolnimi spojinami KAM-G (B), KAM (C), KAV (D), KVER (E) in p-KUM (F) v molskem razmerju BSA protein : polifenolna spojina = 1 : 1 pri spremeljanju termične denaturacije vzorca pri $\lambda = 280 \text{ nm}$ 75

Slika 45: Razlika absorpcijskih spektrov, pomerjenih pri 95 °C in absorpcijskih spektrov, pomerjenih pri 20 °C, pred izvedbo termične denaturacije pri $\lambda = 280 \text{ nm}$ 76

Slika 46: Absorpcijski spektri posneti za BSA protein (A) in BSA protein z ustreznimi polifenolnimi spojinami KAM-G (B), KAM (C), KAV (D), KVER (E) in p-KUM (F) v molskem razmerju BSA protein : polifenolna spojina = 1 : 1 pri spremljanju termične denaturacije vzorca pri $\lambda = 293$ nm.....	77
Slika 47: Razlika absorpcijskih spektrov pomerjenih pri 95 °C, in absorpcijskih spektrov, pomerjenih pri 20 °C, pred termično denaturacijo BSA pri $\lambda = 293$ nm.....	78
Slika 48: Prikaz pet različnih modelov za katere smo s programom GlideGrid (SEB-Model 1) in programa SiteMap (za ostale štiri modele) izračunali interakcijska polja.....	80
Slika 49: Prikaz štirih modelov (SEB-Model 2-5) in poze štirih ligandov z najnižjo vrednostjo GlideXP Score	81
Slika 50: EGCG vgnezden v potencialno vezavno mesto na SEB proteinu.....	82
Slika 51: KAM-G vgnezden v potencialno vezavno mesto na SEB proteinu	82
Slika 52: Struktura BSA zgrajena s pomočjo programom »YASARA Structure« z uporabo modula za modeliranja na osnovi homologije	85
Slika 53: Struktura kompleksa govejega serumskega albumina z ligandoma indometacinom in azopropazonom.....	86
Slika 54: Vgnezdenje EGCG v BSA model št. 3	88
Slika 55: Vgnezdenje KAM-G v BSA model št. 3	88
Slika 56: Vgnezdenje EPKG oz. ECG v BSA model št. 3	89

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Aminokislinska sestava govejega serumskega albumina (BSA) (Gasteiger in sod., 2003)	8
Preglednica 2: Vezavna mesta z visoko afiniteto vezave na BSA proteinu s pripadajočimi ligandi (Kragh-Hansen, 1981).....	10
Preglednica 3: Razvrstitev polifenolnih spojin v skupine in podskupine glede na število C-atomov v molekuli (Goodwin in Mercer, 1983; Strack, 1997).	16
Preglednica 4: Uporabljene polifenolne spojine.....	24
Preglednica 5: Strukturne formule uporabljenih polifenolnih spojin	24
Preglednica 6: Uporabljene kemikalije.....	25
Preglednica 7: Pregled uporabljene laboratorijske opreme	25
Preglednica 8: Absorpcijske in fluorescenčne lastnosti aromatskih aminokislin (Trp, Tyr in Phe) (Cantor, 2006).	40
Preglednica 9: Vsebnost aromatskih aminokislin v SEB in BSA (Gasteiger in sod., 2003)	41
Preglednica 10: Preglednica Stern-Volmerjevih konstant (Ksv) za SEB protein in polifenolne spojine.	59
Preglednica 11: Preglednica Stern-Volmerjevih konstant (Ksv) za BSA protein in polifenolne spojine.	62
Preglednica 12: Termodinamski profil termične denaturacije SEB proteina v prisotnosti različnih polifenolnih spojin pri pH = 7,5	68
Preglednica 13: Termodinamski profil termične denaturacije BSA proteina v prisotnosti različnih polifenolnih spojin pri pH = 7,5	72
Preglednica 14: Termodinamski profil termične denaturacije BSA v prisotnosti KAM, dobljen z UV-VIS spektrofotometrijo pri valovni dolžini 280 nm in pH = 7,5.	76
Preglednica 15: Rezultati vgnezdenja polifenolov na modele SEB proteina	81

Preglednica 16: Izhodne strukture na osnovi homologije, dobljene s programom YASARA za BSA protein	84
Preglednica 17: Rezultati vgnezdenja polifenolov na modele BSA.....	87
Preglednica 18: Primerjava objavljenih podatkov za spremembo $\lambda_{em\ max}$ z dobljenimi eksperimentalnimi rezultati	94

KAZALO PRILOG

Priloga A: Interakcijski diagrami za SEB protein in polifenolne spojine EGCG, EGC, KAM-G, KAM za teoretični model št. 5

Priloga B: Interakcijski diagrami za BSA protein in polifenolne spojine EGCG, EGC, KAM-G, KAM, KAM, ECG, KAV, KVER, NAR, p-KUM in R.K. za teoretični model št. 3

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

BSA	goveji serumski albumin
Da	dalton
ECG	epikatehin galat: [(2R,3R)-2-(3,4-dihidroksifenil)-5,7-dihidroksi-3,4-dihidro-2H-kroman-3-il] 3,4,5-trihidroksibenzoat
EGC	epigalokatehin: (2R,3R)-2-(3,4,5-trihidroksifenil)-3,4-dihidro-2H-benzopiran-3,5,7-triol
EGCG	epigalokatehin galat: (2R,3R)-2-(3,4,5-trihidroksifenil-3,4-dihidro-2H-benzopiran-3,5,7-triol 3-)3,4,5-trihidroksibenzoat
FAD	flavin adenin dinukleotid
FMN	riboflavin-5-fosfat
F.SP	fenolna spojina
HEPES	4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonska kislina
KAM	kampferol: 3,5,7-trihidroksi-2-(4-hidroksifenil)-4H-1-benzopiran-4-on
KAM-G	kampferol 3-O-glukozid (astragalin): 5,7-dihidroksi-2-(4-hidroksifenil)-3-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihidroksi-6-(hidroksimetil)oksan-2-il] oksikroman-4-on
KAV	kavna kislina: (E)-3-(3,4-dihidroksifenil) prop-2-enojska kislina
KVER	kvercetin dihidrat: 2-(3,4-dihidroksifenil)-3,5,7-trihidroksi-4H-1-benzopiran-4-on dihidrat
Mw	molekulska masa, izražena v daltonih (Da)
MWCO	mejna molekulska masa
NaCl	natrijev klorid
NAD	nikotinamid adenin dinukleotid
NaOH	natrijev hidroksid
NAR	naringenin: 5,7-dihidroksi-2-(4-hidroksifenil)-2,3-oksikroman-4-on
p-KUM	p-kumarna kislina: (E)-3-(4-hidroksifenil) prop-2-enojska kislina
R.K.	rožmarinska kislina: (2R)-3-(3,4-dihidroksifenil)-2-[(E)-3-(3,4-dihidroksifenil) prop-2-enol] oksopropanojska kislina
SEB	stafilocokni enterotoksin B
TRIS	2-amino-2-(hidroksimetil)-propan-1,3-diol
λ_{ex}	valovna dolžina vzbujanja (ekscitacije)
λ_{em}	valovna dolžina emisije
$\lambda_{\text{em max}}$	maksimalna valovna dolžina emisije
3D	tridimenzionalno

OKRAJŠAVE AMINOKISLIN

Ala	A	alanin
Arg	R	arginin
Asn	N	asparagin
Asp	D	asparaginska kislina
Cys	C	cistein
Glu	E	glutaminska kislina
Gln	Q	glutamin
Gly	G	glicin
His	H	histidin
Ile	I	izolevcin
Leu	L	levcin
Lys	K	lizin
Met	M	metionin
Phe	F	fenilalanin
Pro	P	prolin
Ser	S	serin
Thr	T	treonin
Trp	W	triptofan
Tyr	Y	tirozin
Val	V	valin

1 UVOD

Po poročanjih mednarodnih zdravstvenih organizacijah (WHO – World Health Organization, CDC – Centers for Disease Control and Prevention) imamo zdaj v razvitem svetu še vedno relativno veliko izbruho zastrupitev s hrano in pijačo, medtem ko je to v nerazvitem svetu eden glavnih vzrokov ne samo zastrupitev ampak tudi umrljivosti, poleg lakote in drugih bolezni. Velik del zastrupitev s hrano in pijačo je pripisanih patogenim bakterijam oz. raznim metabolnim produktom teh, kot so npr. enterotoksi. Slednje lahko vnesemo v telo neposredno s hrano in pijačo ali pa z istim medijem vnesemo samo patogene bakterije, ki kasneje v prebavnem traktu pričnejo tvoriti enterotoksine. Veliko laboratorijev po svetu se ukvarja z raziskovanjem enterotoksinov, predvsem z mehanizmi vstopa enterotoksinov v celico, kaskade reakcij, ki jih enterotoksin v celici povzroči, možnostmi inhibicije enterotoksinov ter povezave enterotoksinov z imunološkimi študijami.

1.1 NAMEN DELA

Namen diplomske naloge je bil proučiti, kako vezava različnih katehinov in drugih polifenolnih spojin vpliva na strukturo in delovanje enterotoksina B (SEB), ki ga izloča *Staphylococcus aureus*. Proučevali smo tudi vezavo katehinov in drugih polifenolnih spojin na goveji serumski albumin (BSA). Spremembe na SEB in BSA proteinu smo spremljali s fluorescenčno in UV-spektrofotometrijo. Poleg tega pa želimo preveriti tudi ujemanje eksperimentalnih podatkov z modelnimi simulacijskimi tehnikami.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

- Katehini oz. fenolne spojine se vežejo na enterotoksin in BSA ter s tem spremenijo strukturo proteina.
- Vezava glukoze na fenolno spojino vpliva na jakost vezave fenolne spojine na protein.
- Različne fenolne spojine imajo različne afinitete vezave do proteina.
- Računalniška simulacija vezave fenolnih spojin na SEB in BSA bo potrdila eksperimentalne podatke.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ZASTRUPITVE S HRANO

Ameriški center za nadzor bolezni in preventivo (CDC ..., 2008) ugotavlja, da se kar 80 milijonov ljudi vsako leto zastrupi s hrano, 325.000 ljudi je potrebno hospitalizirati, med tem ko jih 5.000 umre samo v Združenih državah Amerike (Buzby in Roberts, 1997; Hedberg, 1999).

Glavni razlogi za zastrupitev s hrano so v nepravilni pripravi hrane, tako doma kot v restavracijah. Najbolj utrjivejši so starejši in otroci, ki nimajo razvitega močnega imunskega sistema, ki bi jih bil sposoben braniti pred večino zastrupitev s hrano. Prav tako pred zastrupitvami s hrano niso varni niti zdravi posamezniki.

Populacija na zemlji se povečuje in potrebe po hrani se povečujejo. Posledično se povečuje tudi možnost okužbe s hrano, ki se jo s pomočjo modernih tehnologij že dá relativno dobro kontrolirati. Največja težava je kontrolirati ustreznost sveže zelenjave, ki trenutno velja za potencialno »nevarno« živilo.

CDC ... (2008) je ugotovil, da so za zastrupitev s hrano v večini primerov odgovorni patogeni mikroorganizmi ali njihovi produkti: *Campylobacter*, *Salmonella*, *Escherichia coli* O157:H7 in virus Norwalk. Poleg teh pa zastrupitve s hrano povzročajo tudi patogeni mikroorganizmi *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Yersinia enterocolitica*, *Shigella*, *Vibrio parahemolyticus*, virus hepatitisa, *Giardia lamblia* in *Cryptosporidium*.

Med našim raziskovalnim delom smo proučevali enterotoksin, ki ga proizvaja patogena bakterija *Staphylococcus aureus* (stafilokokni enterotoksin B).

2.2 *Staphylococcus aureus* IN ENTEROTOKSIN B

Spoznanje, da *Staphylococcus aureus* povzroča okužbe s hrano, sega v pozno 18. stoletje.

Staphylococcus aureus je Gram pozitivna, fakultativno anaerobna bakterija in tvori celice v obliki kokov, ki se združujejo v grozde. *Staphylococcus aureus* je halofilna bakterija, saj normalno raste in se razvija pri 7 % NaCl, nekateri sevi rastejo in se razmnožuje celo pri 20 % NaCl. *Staphylococcus aureus* ima sposobnost rasti in razmnoževanja tudi v živilih, v katerih je vodna aktivnost (a_w) 0,83 (razne omake, koncentriran sadni sok, sladkano kondenzirano mleko, čokoladni preliv, sadni in drugi sirupi, šunka, vlažna peciva, kaviar) (Jay in sod., 2005).

Staphylococcus aureus ima v primerjavi z drugimi bakterijami visoko sposobnost preživetja, saj lahko preživi v različnih okoljih z različnimi okoljskimi faktorji. Za svojo homestazo potrebujejo dušik iz aminokislin, vitamin B in C, nikotinsko kislino in tiamin. Arginin pa je neposredno hranilo za tvorbo enterotoksina B. Optimalna temperatura za rast je med 40 in 45 °C, vendar lahko preživi tudi v območju med 10 in 46 °C.

Nahaja se skoraj povsod v naravi in tudi na in v vsakem človeku (koži, laseh in dlakah; vlažnih predelih telesa in nosni žrelni sluznici) ter predstavlja del normalne človeške mikroflore skoraj pri polovici človeške populacije, saj smo ljudje idealni gostitelji in prenašalci bakterij (Jay in sod., 2005). Ponavadi bakterijska mikroflora, ki nas naseljuje, ne povzroča težav, lahko pa se zgodi, da zaradi določenih razlogov *Staphylococcus aureus* prične tvoriti virulentne faktorje, ki povzročijo vrsto bolezenskih stanj, v redkih primerih lahko nastopi celo smrt.

Zaradi zlorabe antibiotika meticilin, ki spada v skupino β -laktamskih antibiotikov, s katerim so začeli zdraviti okužbo s *Staphylococcus aureus* po letu 1959, je le-ta razvila močno rezistenco nanj (MRSA – Meticilin Rezistentni *Staphylococcus aureus*) in na druge antibiotike iz omenjene skupine, kar je zaskrbljujoče dejstvo (Trampuž in Pikelj, 2001; Holden in sod., 2004). Zaradi rezistentnosti bakterije na antibiotik ta lahko predstavlja velik problem v porodnišnicah, bolnišnicah in domovih za ostarele, kjer lahko pride tudi do resnejših okužb (sepsa, pljučnica). Rizična skupina so predvsem otroci in starostniki, pri katerih je okužba z MRSA vedno hujša, poleg tega pa beležijo vedno več tudi smrtnih žrtev. Ukrepi zoper širitev okužb z ustrezno higieno, rednim umivanjem in razkuževanjem rok so tako nujni (Hussain in sod., 2000; Kollef in Micek, 2006; Amador-Miranda in sod., 2008; Ho in sod., 2008; Robinson in sod., 2009).

Do večjih okužb z MRSA prihaja predvsem v nerazvitem svetu zaradi neustrezne osebne higiene, oporočne vode ter velikokrat tudi oporečne in neustreznoglobo skladiščene hrane (nehlavjeno meso, mleko in nekateri mlečni produkti, pecivo ipd.) (Woods, 2005).

Do zastrupitve v večini primerov pride prek ljudi, ki hrano predelujejo, pripravljajo (krompirjeva solata, mesna solata, sendviči, morski sadeži), prodajajo in servirajo, pri čemer pa se lahko *S. aureus* iz okuženega človeka na hrano prenese z neposrednim stikom ali s kihanjem. Lahko pa se *S. aureus* nahaja tudi že na oz. v surovem živilu. Na srečo se večini nevarnosti MRSA ob pripravi hrane izognemo zaradi toplotne obdelave živil. Ne moremo pa se izogniti temperaturno stabilnim toksinom, ki jih *S. aureus* lahko proizvede še pred toplotno obdelavo živila in jih je že izločil v okolje ali pa se nahajajo še v sami bakterijski celici in se izločijo v živilo pri inaktivaciji bakterije.

Bakterije poleg toksinov (eksotoksini, endotoksini) izločajo še druge vrste virulentnih faktorjev, kot so različni proteini, vgrajeni v celično membrano bakterije (adhezini), in encimi (termonukleaze, proteaze, kinaze, hemolizin, lipaze), ki omogočajo bakteriji, da preživi, kolonizira in se razmnožuje v gostitelju. Zaradi kolonizacije tkiva gostitelja pride do številnih odzivov gostiteljevega imunskega sistema, pri čemer pride do infekcij in drugih odzivov (Schmitt in sod., 1999; Hong-Geller in Gupta, 2003; Sandel in McKillip, 2004; Vancraeynest in sod., 2006; Kuroda in sod., 2007).

Bakterijske proteaze naj bi sodelovale pri inaktiviranju proteinov, ki so del gostiteljevega imunskega sistema, poleg tega pa pomagajo bakteriji pri kolonizaciji gostiteljskega tkiva (Archer, 1998). Bakterijske lipaze lahko preživijo temperaturo pasterizacije, zaradi česar lahko kljub toplotni obdelavi kvarijo živila, bogata na vsebnosti maščob (Andrews in sod., 1987; Braun in sod., 2001).

Toksini so strupi, ki jih proizvede živi organizem. Bakterije navadno nosijo zapise za sintezo toksinov na plazmidu (Alouf in Müller-Alouf, 2003). Do sinteze toksinov pride intracelularno, saj jih bakterija navadno izloči v okolje kot ekstracellularne produkte med infekcijo (Sriskandan in sod., 2007). Stafilokokni enterotoksin B (SEB) je eksotoksin bakterije *Staphylococcus aureus* in je samo eden od osmih (A, B, C1, C2, C3, D, E in H) identificiranih enterotoksinov, ki jih proizvaja omenjena bakterija. SEB ima poleg gastrointestinalnega učinkovanja tudi funkcijo bakterijskega superantigena. Najpogosteje povzroča zastrupitve s hrano, saj vpliva na epitelne celice prebavnega trakta, zaradi česar ga tudi uvrščamo med enterotoksine. Lahko pa je povzročitelj tudi različnih toksičnih šokov, nemenstrualnega sindroma (TSS) (Kehrberg in sod., 1981) in avtoimunskih bolezni (Kotzin in sod., 1993). Zastrupitve s SEB v razvitem svetu načeloma nimajo letalnih posledic, vplivajo pa na visoko obolenost (Woods, 2005). LD₅₀ vrednost za ljudi znaša 1 mg SEB toksina, manj kot 1 µg toksina pa je dovolj, da sproži bruhanje (Nedelkov in Nelson, 2003; Proft in Fraser, 2003).

SEB je relativno stabilen in v vodi topen protein. Njegova molekulska masa znaša 28 kDa. Sestavljen je iz ene same polipeptidne verige, ki jo gradi 239 aminokislinskih ostankov. Molekula je elipsoidne oblike, sestavljena iz dveh domen, povezanih z disulfidno vezjo. Sekundarna struktura SEB proteina vsebuje 9,5 % α-vijačnice, 55 % β-nagubane plošče, 16,5 % β-zavojev in 19 % neurejene verige (Singh in sod., 1988). Vsebuje tudi en Trp. Kristalna struktura SEB je pokazala, da je toksin kompakten, zaradi česar je SEB termostabilen. SEB je pri 60 °C stabilen kar 16 ur in več minut v vreli vodi (Schantz in sod., 1965). Poleg tega je odporen tudi na nizek pH in na črevesne encime iz skupine proteaz (Huang in Bergdoll, 1970; Jamlang in sod., 1971; Papageorgiou in sod., 1998). SEB se popolnoma inaktivira pri tehnološkem procesu priprave hrane v pločevinkah zaradi zelo ostrega temperaturnega režima sterilizacije, medtem ko se med pasterizacijskim režimom ne uniči (Denny in sod., 1966; Read in Bradshaw, 1966). *S. aureus* raste v širokem temperaturnem in pH razponu. Posledica je, da imamo tako široko paleto živil, ki so lahko podvržena okužbi z omenjeno bakterijo.

Mehanizem delovanja SEB toksina na povzročitev diareje še ni popolnoma znan. Znano je, da SEB vpliva na transport oz. absorbcijo elektrolitov in tekočin iz lumna prebavnega trakta v organizem (Sullivan, 1969; Huang in sod., 1974; Lu in sod., 1998). Vemo pa, da SEB ne tvori majhnih por v celice epitelija, kar zasledimo pri nekaterih drugih vrstah toksinov (Buxser in Bonventre, 1981).

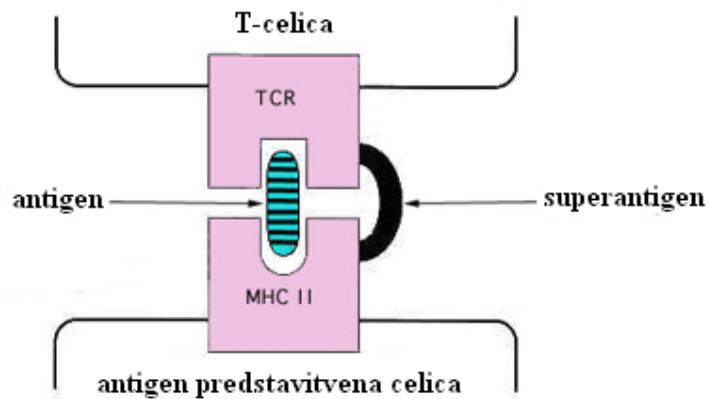
Za hitro ugotavljanje prisotnosti bakterij *S. aureus* ali njenih toksinov v živilu je razvitih že nekaj metod, veliko pa se jih še razvija (Stark in Middaugh, 1969; Dong in sod., 2006). Najbolj obetavne metode so metode s senzorji površinske plazmonske resonance (Homola in sod., 2002), senzorji optičnih vlaken (King in sod., 1999) in senzorji piezoelektričnih kristalov (Lin in Tsai, 2003).

SEB je bil zaradi svoje stabilnosti pri visokih temperaturah in kislem okolju ter dobrih aerosolnih lastnosti uporabljen v študijah za izdelavo potencialnega biološkega orozja (Alouf in Müller-Alouf, 2003; Ler in sod., 2006; Ulrich, 1997).

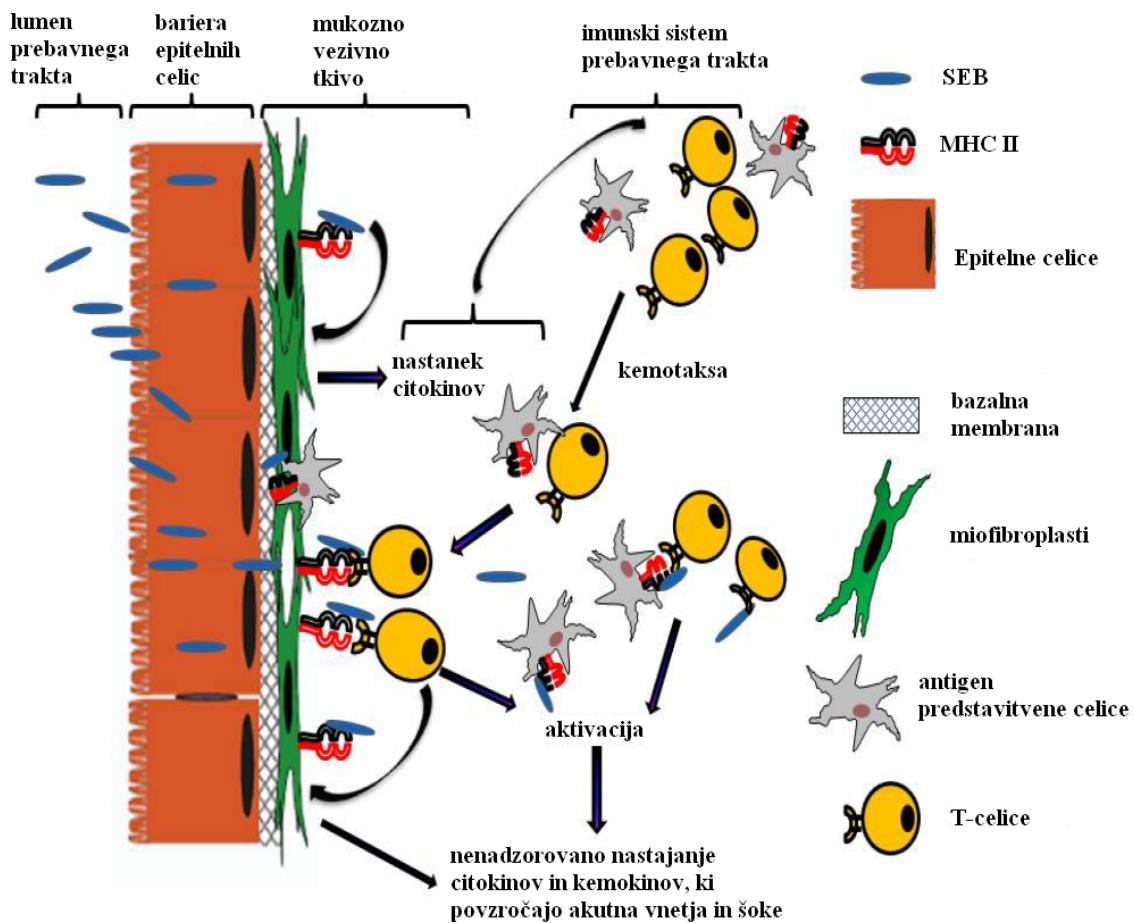
2.2.1 Mehanizem delovanja SEB

Bakterije, v tem primeru *Staphylococcus aureus*, intracelularno tvorijo različne metabolite (toksine) s superantigeneskimi lastnostmi z namenom, da bi se ubranile pred imunskim sistemom gostitelja v procesu infekcije (Schlievert, 1982). Stafilokokni enterotoksin B je samo eden od toksinov s superantigeneskimi lastnostmi, ki jih proizvaja bakterija *Staphylococcus aureus* (Alouf in Müller-Alouf, 2003).

Superantigeni so najmočnejši mitogeni T-celic. Sposobni so se vezati na proteine glavnega histokompatibilnostnega kompleksa (MHC) razreda II zunaj klasičnega veznega mesta za antigene in na V-β-regijo T-celičnega receptorja T-celic (TCR). Nastali kompleks (Slika 1, 2) stimulira največje možno število T-celic, pri čemer pride do nastanka velike količine citokinov (interleukin 2 (IL-2), faktorjev tumorske nekroze β (TNF-β) in interferonov, ki so glavni učinki SEB toksina in lahko povzročijo akutno stanje, imenovano toksični šok. (Choi in sod., 1989; Dellabona in sod., 1990; Mehindate in sod., 1995; Balaban in Rasooly, 2000; Proft in Fraser, 2003; Pinchuk in sod., 2010). Kadar pride do odgovora T-celic na prisoten antigen, se aktivira 0,001 – 0,0001 % vseh T-celic v telesu, medtem ko se pri odgovoru na superantigen aktivira kar do 20 % T-celic (Li in sod., 1998).



Slika 1: Prikaz stimulacije T-celic z antigenom in s superantigenom (Todar, 2009)



Slika 2: Model odziva organizma na SEB v tankem črevesu prebavnega trakta (Pinchuk in sod., 2010)

2.2.2 Klinični znaki zastrupitve

Po zaužitju zastrupljene oz. kontaminirane hrane s SEB toksinom (nepravilno shranjena, hlajena in pripravljena hrana) se v nekaj urah (3–12 h) pojavijo slabost, bruhanje in prebavni krči. Sledi močna nekrvava diareja. Praviloma se po 8–24 urah stanje umiri in normalizira (Schlievert in sod., 1996; Ulrich, 1997).

V primeru, da se stanje ne umiri, je potrebno poiskati medicinsko pomoč, saj lahko pride do vrste hudih bolezni kot so: menustruacijski in ne-menustruacijski sindrom toksičnega šoka (TTS), stafilokokne pljučnice, atopičnega dermatitisa, Kawasakiovega sindroma, določenih avto-imunih bolezni (Krakauer in sod., 2001).

Smrt nastopi zelo v redkih primerih in je ponavadi pogojena še z drugimi boleznimi, ki jih ima bolnik (Jay in sod., 2005). Smrtnost zaradi zastrupitve s hrano je 0,03 % (Schlievert in sod., 1996). Večini zastrupitev s hrano se je lahko izogniti z dobro higieno in dobro kuhinjsko prakso.

2.3 GOVEJI SERUMSKI ALBUMIN

Serumski albumini, ki jih najdemo v krvni plazmi vseh sesalcev, nosijo tudi ime po vrsti sesalca, iz katerega je bil serumski albumin izoliran (človeški serumski albumin – HSA, goveji serumski albumin – BSA, konjski serumski albumin – ESA, podganji serumski albumin – RSA, mišji serumski albumin – MSA, prašičji serumski albumin – PSA, ovčji serumski albumin – OSA itd.). Serumski albumini so od najbolj raziskanih proteinov, v naravi pa imajo zelo zanimive in pomembne funkcije. Predvsem zanimivi so kot transportni proteini za endogene in eksogene substance, poleg tega pa je proces izolacije relativno enostaven, kar poceni njegovo pridobivanje (Müller in Wollert, 1979; He in Carter, 1992; Carter in Ho, 1994).

Raziskave na serumskemu albuminu so usmerjene predvsem na študij vezanja različnih ligandov (zdravilnih učinkovin) na protein, ki bi lahko učinkovino nato dostavil do tarčne celice (Ghuman in sod., 2005; Gentili in sod., 2008).

Serumski albumini pa so zanimivi tudi za vezavo različnih drugih ligandov na protein, kot so arome, barve, antioksidanti, polifenolne spojine, ki bi lahko podaljševale rok obstojnosti živila in izboljšale senzorične in prehranske lastnosti živila (Tan in Siebert, 2008).

Za enkrat še ne poznamo 3D ali kristalne strukture BSA proteina, tako da si pri kreiranju homologne strukture z različnimi programskimi paketi, predstavljenih v nadaljevanju (YASARA Structure), pomagamo na podlagi znane terciarne strukture HSA proteina določene leta 1992 (He in Carter, 1992). Znano je, da imata HSA in BSA 76-odstotno podobnost v aminokislinskem zaporedju (Carter in sod., 1994; Dockal in sod., 2000).

Serumski albumini z molekulsko maso 66 kDa se nahajajo v krvni plazmi sesalcev s tipično koncentracijo 3,5–5 g/100 ml in prispeva kar 80 % k osmotskemu tlaku krvi (Carter in Ho, 1994) in k pH krvi (Figge in sod., 1991).

Serumski albumin se pri sesalcih sintetizira v jetrnih celicah kot preprotoalbumin z N-terminalno peptidno verigo, ki je odstranjena, preden protein (protoalbumin) zapusti endoplazmatski retikulum. Protoalbumin potuje naprej v Golgijev aparat, kjer se mu odstrani še šest aminokislinskih ostankov, nato pa se izloči v krvni obtok kot serumski albumin, kjer je njegova razpolovna doba 17–19 dni s 4-odstotno degradacijo proteina dnevno (Doweiko in Nompleggi, 1991).

Za albumine je značilno, da imajo nizko vsebnost Trp in Met ter visoko vsebnost Cys in nabitih aminokislin, kot so Asp, Glu, Lys in Arg. BSA se od ostalih serumskih albuminov razlikuje po nižji vsebnosti aminokisline Gly in Ile (Peters in sod., 1985).

Goveji serumski preprotoalbumin sestavlja 607 aminokislin; 1–18 aminokisline predstavljajo N-terminalno verigo, 19–24 aminokisline predstavljajo protoalbumin in aminokisline od 25–607 predstavljajo goveji serumski albumin – BSA, ki ga sestavlja skupaj 582 aminokislin (Preglednica 1). BSA je zgrajen iz treh α -heliksnih homolognih domen (I–III) (Gasteiger in sod., 2003) in vsaka od njih je razdeljena v devet zank (L1–L9). Vsaka domena ima dve poddomeni (A in B). Vsaka homologna domena vsebuje šest antiparalelnih heliksov. BSA

je zanimiv tudi zaradi tega, ker vsebuje t.i. hidrofobne žepe na domeni I in II, imenovani tudi Sudlowi poddomeni IIA in IIIA (Sudlow in sod., 1975; Muller in sod., 1994). Hidrofobni žepe omogočajo vezavo hidrofobnih ligandov na protein in s tem lažje transportiranje teh ligandov/zdravilnih učinkovin do tarčnih celic (Shaikh in sod., 2006). Domeni I in II sta glavni domeni, na kateri se veže večina zdravilnih učinkovin in so tako še posebno zanimivi za nadaljnje raziskovanje (Sudlow in sod., 1975; Sudlow in sod., 1976).

Sekundarna struktura BSA proteina je srčaste oblike (Bos in sod., 1989), zgrajena iz 60 % α -vijačnic, 5 % β -nagubane plošče, 13 % β -zavojev, 23 % proteina pa je naključno zvitega (Rawel in sod., 2002) tako kot to prikazuje slika 53. Vsebuje 17 disulfidnih vezi (Gelamo in Tabak, 2000; Gelamo in sod., 2002).

BSA ima v svoji strukturi dva aromatska Trp aminokislinskega ostanka, in sicer prvi Trp-134 se nahaja skoraj na površini proteina na homologni domeni I, ki ima hidrofobni značaj, medtem ko se drugi Trp-212 nahaja na notranjem mestu homologne domene II (Petitpas in sod., 2001). Zaradi prisotnosti Trp v proteinu in zaradi kemijskih lastnosti aromatskih aminokislín (so odlični fluorofori) lahko spremljamo vezavo različnih ligandov na protein in posledično opazujemo spremembe na strukturi proteina s fluorimetrijo (Peters in sod., 1985; Shi in sod., 2010).

Preglednica 1: Aminokislinska sestava govejega serumskega albumina (BSA) (Gasteiger in sod., 2003)

Ala	47	Leu	61
Arg	23	Lys	59
Asn	14	Met	4
Asp	40	Phe	27
Cys	35	Pro	28
Gln	20	Ser	28
Glu	59	Thr	33
Gly	16	Trp	2
His	17	Tyr	20
Ile	14	Val	36

Viskoznost serumskega albumina je odvisna od molekulske mase, velikosti, volumna, oblike, površinske napetosti in nagnjenosti k deformaciji (Bull, 1940; Yang, 1961). Seveda pa na viskoznost vplivajo tudi okoljski dejavniki, kot so pH, temperatura in ionska jakost. Zanimivo je, da na strukturne spremembe serumskega albumina vplivajo visoke ali nizke pH vrednosti, ko pa se pH ponovno pomakne proti nevtralnemu območju, se bo serumski albumin vrnil v prvotno obliko (Tung, 1978; Stanley in Taylor, 1993; Dockal in sod., 2000). Vrednosti za viskoznost serumskega albumina se gibljejo med 3,7–4,2 ml/g (Reynolds in sod., 1967; Kuntz in Kauzmann, 1974; Peters in sod., 1985). Viskoznost linearno narašča vse do 65 mg/ml, nato pa narašča eksponentno (Wetzel in sod., 1980).

Toplotna denaturacija serumskega albumina poteka prek dveh strukturnih stanj (Wetzel in sod., 1980; Clark in sod., 1981; Wang, 1999; Honda in sod., 2000; Militello in sod., 2003):

- 1) Reverzibilni del denaturacije dosežemo s segrevanjem do 65 °C. Pri tem pride do transformacije nekaj α -vijačnic v neurejeno stanje. V primeru, da je na serumski albumin vezan ligand, lahko ta stabilizira molekulo, pri čemer se temperatura, ki povzroči strukturne spremembe premakne, za nekaj stopinj Celzija.
- 2) Irreverzibilni del denaturacije dosežemo s segrevanjem nad 65 °C. Pri tem najprej pride do tvorbe intermolekularne β -strukture in še pri višjih temperaturah do izpostavitve Cys-34, pri čemer pride do irreverzibilne tvorbe disulfidnih in nekovalentnih vezi z različnimi molekulami – nastanejo topni agregati.

Pri ohlajanju pride do sedimentacije denaturiranega dela proteina (Wetzel in sod., 1980).

Eksperimentalni podatki za temperaturo denaturacije BSA so različni in zavisijo od vrste metode, s katero je bila temperatura določena. Itoh in sod., 1976; je z diferenčno termično analizo (DTA) določil temperaturo denaturacije za BSA protein 64 °C, medtem ko so Ruegg in sod., 1985; določili temperaturo denaturacije z diferenčno dinamično kalorimetrijo (DSC) 62 °C.

Temperatura denaturacije se poviša v primeru, da se BSA veže z maščobnimi kislinami ali zniža v primeru, ko se veže s klupeinom (Poole in sod., 1987).

Ena najzanimivejših lastnosti serumskih albuminov je sposobnost reverzibilne vezave široke palete ligandov kot so maščobne kisline, bilirubin in vrsta majhnih negativno nabitih aromatičnih komponent. Z ligandi vzpostavi kovalentne vezi s piridoksil fosfatom, cisteinom (Cys), glutationom, pigmenti, vrsto zdravilnih učinkovin, majhnih hormonov in vrsto kovinskimi ioni (Cu²⁺, Ni²⁺, Hg²⁺, Ag²⁺ in Au¹⁺) (McLachlan in Walker, 1977; Emerson, 1989; Stamler in sod., 1992).

Serumski albumini imajo številne fiziološke funkcije v krvni plazmi sesalcev. Po telesu raznašajo maščobne kisline, ki so sicer netopne v plazmi, odstranjujejo kisikove radikale, nastale reaktivne fenolne spojine, inaktivirajo vrsto toksičnih lipofilnih metabolitov (npr. bilirubin) in služijo kot rezervoar NO⁻ ionov, ki imajo pomembno funkcijo pri številnih fizioloških procesih, vključno s pravilnim delovanjem nevrotransmiterjev (Emerson, 1989; Stamler in sod., 1992).

Kragh-Hansen je predvidel nekaj možnih vezavnih mest na proteinu, prikazana v preglednici 2. Zanimivo je, da je na proteinu nekaj vezavnih mest z visoko afiniteto do liganda in število vezavnih mest z nižjo afiniteto do vezave liganda (Kragh-Hansen, 1981).

Preglednica 2: Vezavna mesta z visoko afiniteto vezave na BSA proteinu s pripadajočimi ligandi (Kragh-Hansen, 1981).

Št. vezavnega mesta z visoko afiniteto vezave	Domena	Vrste ligandov
1	III	maščobne kisline
2	II ali III	tryptofan
3	II	bilirubin
4	N-konec	Cu ²⁺ , Zn ²⁺
5	II	heamin

Polifenolne spojine naj bi se vezale na protein prek aminokislinskih ostankov, kot so Pro, His, Arg in Phe. Aminokislinski ostanek Phe se navadno nahaja znotraj proteina in tako ni vedno izpostavljen na površini proteina, da bi bil primeren za vzpostavljanje vezi s polifenolnimi spojinami (Matei in Hillebrand, 2007).

Kako močno se bo polifenolna spojina vezala na protein, je odvisno tudi od njene strukture in velikosti. Ugotovljeno je, da se na protein veliko lažje vežejo večje polifenolne spojine (npr. ester galne kisline). Večje polifenolne spojine so sposobne tvoriti več kemijskih in močnejše kemijske vezi s proteinom kot manjše polifenolne molekule. Poleg tega pa velja, da imajo enake polifenolne spojine različno vezavno afiniteto do različnih proteinov (Matei in Hillebrand, 2007).

2.4 POLIFENOLNE SPOJINE

Osnovna skupina znotraj polifenolnih spojin so fenolne spojine zgrajene iz vsaj enega aromatskega oz. benzenovega obroča na katerega je pritrjena najmanj ena ali več hidroksilnih (-OH) funkcionalnih skupin in jih formalno ne uvrščamo med alkohole. Na obroč so lahko vezane tudi druge funkcionalne skupine. So reaktivne kisle spojine (Abram in Simčič, 1997). V naravi jih najdemo v zaestreni ali glikozidni obliki (Raccach, 1984; Vermerris in Nicholson, 2006) z več hidroksilnimi (-OH) funkcionalnimi skupinami, zato se je zanje uveljavilo tudi ime polifenoli (Abram, 2000) (Slika 3). Poznamo enostavne fenolne spojine z majhno molekulske maso, polifenolne spojine z molekulske maso okoli 100 Da in polifenolne spojine (polimerne oblike), pri katerih je molekulska masa lahko tude več tisoč Da.

Polifenolne spojine so topne v nepolarnih topilih, kot so etanol, metanol ipd. Več kot ima polifenolna spojina hidroksilnih skupin manj je topna v vodi. Če polifenolna spojina vsebuje eno hidroksilno skupino je njena topnost 50-odstotna, če pa ima še eno hidroksilno skupino pa se njena topnost zmanjša na 1–10 % (Raccach, 1984).

Polifenolne spojine so sekundarni metaboliti rastlin (Shahidi in Naczk, 1995). Koncentracija in vrsta polifenolnih spojin v rastlini (sadju in zelenjavu) je odvisna od vrste faktorjev, kot so: vrste rastline, zrelosti, časa obiranja, letine in podnebja (sončnih dni, deževnih dni, temperaturnega nihanja), kultivarja (pri sadju), tipa zemlje (vsebnost hranilnih snovi v zemlji), agrotehničnih dejavnikov ter od načina predelave (Häkkinen in sod., 1999; Vermerris in Nicholson, 2006).

Danes poznamo že več tisoč polifenolnih spojin, ki se nahajajo v rastlinah (vakuolah in kloroplastih), samo več sto se jih nahaja v užitnih rastlinah. V omenjenih organelih se nahajajo v topni oblikih, oblikih koloidov ali suspenzij. Ponavadi so vezane s sestavnami celične stene ali z monomeri, amino skupinami, lipidi in terpenoidi. V prosti obliki v citoplazmi jih ne najdemo, saj bi zaradi reaktivnosti in kislosti lahko prišlo do poškodb lastne celice (Robards in sod., 1999a).

Polifenolne spojine imajo mnogo pomembnih funkcij v rastlini. Razdelili smo jih na tri glavne skupine, in sicer: zaščitne, metabolne in ostale funkcije.

Zaščitne funkcije: Polifenolne spojine rastlino varujejo pred ultravijoličnim (UV) sevanjem (predvsem skupina flavonoidov, ki dobro absorbira UV svetlobo). Rastlino varujejo tudi pred vdorom bakterij (antimikrobnii učinek), pred vdorom gliv (antiglivični učinek (Okubo in sod., 1991)), pred vdorom virusov (antivirusni učinek) in pred manjšimi fizičnimi poškodbami, katere navadno povzročijo insekti. Polifenolne spojine so verjetno vključene v mehanizem lignifikacije celične stene okrog poškodovanega dela rastline (Shirley, 1996). Imajo tudi odvračalne, farmakološke, fitoaleksivne in fitotoksične učinke (Vermerris in Nicholson, 2006). Polifenolne spojine pa so tudi odlični antioksidanti, ki rastlino varujejo pred radikalni in tako pravimo, da imajo antioksidativen učinek (Donko, 1995; Shahidi in Naczk, 1995).

Metabolne funkcije: Polifenolne spojine sodelujejo pri modeliranju aktivnosti encimov (imajo funkcijo koencimov) in celičnih receptorjev ter tako sodelujejo pri rasti in razvoju rastlinskega tkiva (Manach in sod., 2004; Vermerris in Nicholson, 2006; Shahidi in Naczk, 1995; Petauer, 1993; Kreft in sod., 2000; Abram, 2000; Goodwin in Mercer, 1983).

Ostale funkcije: Polifenolne spojine skrbijo tudi za oprševanje in raznos semen, saj dajejo cvetom in plodovom barvo, okus in aroma, ki privablja oprševalce in raznašalce semen. Poleg tega pa imajo polifenolne spojine tudi alelopatski učinek, ki je lahko stimulativen ali zaviralen, kar se kaže v povečani ali zmanjšani kaljivosti semen, pospeševanju ali zaviranju rasti in razvoja druge rastline (Taiz in Zeiger, 1998; Rice, 1984).

2.4.1 Razdelitev polifenolnih spojin

Zaradi številčnosti in raznolikosti polifenolnih spojin, ki jih najdemo v naravi, imamo več načinov, kako klasificirati več tisoč polifenolnih spojin. Zaradi nepreglednosti v literaturi, se je uveljavila klasifikacija po številu C-atomov v molekuli (Vermerris in Nicholson, 2006), ki je predstavljena v preglednici št. 3. V preglednici so izpostavljene skupine polifenolnih spojin, katere smo uporabili pri eksperimentalnem delu in ki so v nadaljevanju tudi predstavljene (Goodwin in Mercer, 1983).

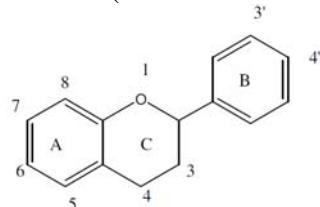
Hidroksicimetne kislina (C_6C_3) so v naravi zelo razširjene. Glavna predstavnika iz te skupine sta kavna in *p*-kumarna kislina (Preglednica 5, KAV in *p*-KUM). Največkrat ju najdemo v zaestreni in amidni obliki (Strack, 1997). Hidroksicimetne kisline so zaradi propenske stranske verige manj polarne, kar olajša njihovo prehajanje skozi celično membrano (Rodríguez Vaquero in sod., 2007). Hidroksicimetne kisline so vključene tudi v biosintezo kompleksnejših polifenolov (flavonoidov) (Laranjinha, 2002; Shahidi in Naczk, 1995).

Rožmarinska kislina (Preglednica 5, R.K.) je ester kavne in dihidroksi fenil mlečne kislina. Molska masa R.K. znaša 360,31 g/mol. Sestavljena je iz dveh aromatskih obročev in na vsakem sta po dve hidroksilni skupini. Med aromatskima obročema je esterska vez in karboksilna skupina (Chen in Ho, 1997). V trdnem stanju se nahaja v obliki belega prahu s tališčem $T_m = 174 \text{ } ^\circ\text{C}$ in z maksimumom absorbcije pri $\lambda_{max} = 288, 326 \text{ nm}$. Je polarna in dobro topna v vodi, zaradi česar pa je njeno antimikrobnno delovanje slabše. Antimikrobnno deluje samo na po Gram pozitivne bakterije. Rožmarinska kislina ima antioksidativne lastnosti in tako preprečuje oksidacijo lipidov in uničenje celičnih membran (Moreno in sod., 2006). Ima pa še antivnetno, antimutageno in antivirusno delovanje. Najvišja vsebnost rožmarinske kislino je v rožmarinu (*Rosmarinus officinalis* L.) (Sasikumar, 2004; Petersen in Simmonds, 2003).

p-kumarna kislina (Preglednica 5, p-KUM) spada v skupino hidroksicimetnih kislin in je v naravi najbolj razširjena. Njena molska masa je 164,16 g/mol. Najdemo jo v arašidih, paradižniku, korenju, zelju, česnu, sivki, timijanu, rožmarinu in šentraju. V slednjem *p*-kumarna kislina predstavlja kar 0,2-odstotkov suhe snovi (Zgórska in Gówniak, 2001). Čista *p*-kumarna kislina se nahaja v obliki kristalov, ki so zelo dobro topni v etanolu in dietil etru ter manj topni v vodi (Ayaz in sod., 2008).

Kavna kislina (Preglednica 5, KAV) je polifenolna spojina iz skupine hidroksicimetnih kislin z molsko maso 180,16 g/mol. Sestavljena je iz enega aromatskega obroča. V čisti obliki se nahaja kot rjavkast prah. Topna je v vroči vodi in alkoholu. Pehtran, sončnična semena, paradižnik in timijan so bogati na vsebnosti kavne kisline. Odgovorne so za encimsko porjavenje. V paradižniku pa nastopa predvsem kot antioksidant (Chen in Ho, 1997; Cowan, 1999).

Flavonoidi ($C_6C_3C_6$) so spojine s 15 C-atomi (Slika 3). Flavonoidi so zelo razširjena skupina fenolnih spojin. Med seboj se ločijo po stopnji oksidacije obroča oz. številu hidroksilnih skupin (-OH). Ločimo jih na flavanole, flavonole, flavone, flavanone, antocianidine in izoflavone. V naravi jih navadno najdemo kot v vodi topne 3-*O*-glikozide, kar pomeni, da so na C₃ atomu vezani različni sladkorji, kot so glukoza, arabinoza, ramnoza, ksiloza, manoza, glukuronska kislina ali galakturonska kislina. Monosaharidna komponenta se lahko veže tudi na C₅ in C₇ atom. Le redki flavonoidi imajo monosaharid vezan na B obroču. Del molekule, na kateremu ni pripetega monosaharida, imenujemo aglikon. Aglikoni nastanejo iz glikozidov s kislinsko hidrolizo, pri kateri se v raztopino sprosti tudi sladkor (Mazza, 1993). V rastlinah so flavonoidi, modri, rdeči, beli in rumeni pigmenti cvetov, sadežev, lubja in korenin. Imajo grenek okus, s čimer odganjajo parazite (Rice-Evans in sod., 1996; Abram in Simčič, 1997; Briviba in Sies, 1994). Če flavonoidi polimerizirajo, dobimo čreslovine ali tanine, ki imajo zelo trpek okus in jih najdemo v vinu (Wondra, 1997). Flavonoidi so iz celotne družine polifenolnih spojin najučinkovitejše kot antioksidativna in antimikrobna sredstva (Morillas-Ruiz in sod., 2006).



Slika 3: Osnovna struktura flavonoidov

Flavanoli imajo značilno zasičen C obroč s hidroksilnimi skupinami. V to skupino spadajo flavan-3,4-dioli in flavan-3-oli (Shahidi in Naczk, 1995). Flavan-3-oli so osnovne komponente proantocianidinov. V naravi so najpogostejsi (+)-catehin, (-)-epikatehin, (+)-galokatehin in (-)-epigalokatehin. To so izomerne molekule, ki se razlikujejo le v orientaciji hidroksilne skupine na C obroču (Murkovic, 2003; Mazza in Miniati, 1993).

Epikatehin galat (ECG) z molsko maso 442,37 g/mol je prav tako močen antioksidant in antimikrobno sredstvo. V večjih koncentracijah ga najdemo v listih zelenega čaja (Shiota in sod., 1999).

Epigalokatehin (Preglednica 5, EGC) z molsko maso 306,27 g/mol spada v skupino flavanolov in podksupino flavan-3-ol-ov. Veliko ga je v zelenem in črnem čaju, bananah in šipku. Ima prav tako pomembno antioksidativno in antimikrobnno delovanje. EGC naj bi imel med drugim tudi pozitiven učinek na kanabinoidne receptorje (Korte in sod., 2010).

Epigalokatehin galat (Preglednica 5, EGCG) z molsko maso 458,38 g/mol je ester epigalokatehina in galne kisline. EGCG je prisoten v večjih koncentracijah v zelenem, ne pa tudi v črnem čaju, saj se zaradi predhodne encimske fermentacije listov čajevca pretvori v polimirizirano obliko polifenolne spojine imenovane tearubigin (Robertson in Bendall, 1983). Tako EGCG kot polimerizirana oblika EGCG sta močna antioksidanta in imata močan antimikrobni učinek, poleg tega pa delujeta tudi sinergistično z β -laktamskimi antibiotiki (Hu in sod., 2002; Stapleton in sod., 2004; Katiyar in sod., 2007). Pri višjih temperaturah lahko pride do epimerizacije, kar pomeni, da se EGCG pretvori v EGC obliko. Zaradi tega ni primerno pripravljati pravega čaja v prevroči vodi. EGCG ima svoj absorpcijski maksimum pri 274 in 240 nm. Tekom laboratorijskih testiranj *in vitro* je EGCG izkazal inhibitorni učinek na virus HIV. Trenutno testirajo učinek EGCG tudi *in vivo* (Nance in Shearer, 2003). Prav tako je EGCG skupaj še z drugimi polifenolnimi spojinami izkazal inhibitorni vpliv tudi na rakave celice, in sicer na dva načina: prvi je ta, da prepreči angiogenezo (tvorjenje novih žilic) v okolini rakave celice, ki je ključen za razvoj in rast rakavih celic in ga tudi same rakave celice izzovejo, in kot drugi pa je ta, da povzroči uničenje rakavih celic prek procesa apoptoze (Ahmad in sod., 1997; Cherbonnel-Lasserre in Dosanjh, 1997; Yang in sod., 1998b; Kondo in sod., 2002; Morillas-Ruiz in sod., 2006). Prav tako naj bi EGCG pomagal pri boju proti nekaterim avtoimunskim boleznim kot je to Sjögrenov sindrom (Hsu in sod., 2007; Gillespie in sod., 2008).

Flavonoli in flavoni so značilni po tem, da imajo nenasičen C obroč ter da imajo dvojno vez med C_2 in C_3 . Flavonoli se od flavonov razlikujejo po tem, da vsebujejo hidroksilno skupino na C_3 , saj je na hidroksilno skupino na C_3 pogosto vezana sladkorna komponenta (Shahidi in Naczk, 1995; Rupnik, 1997). Flavonole najdemo v obliki aglikonov in glikozidov (Murkovic, 2003).

Kvercetin (Preglednica 5, KVER) z molsko maso 338,27 g/mol je od vseh flavonoidov najbolj dejaven. Najdemo ga v številnih zdravilnih rastlinah in tudi v zelenem ter črnem čaju, jabolkih, čebuli, rdečem grozdju, citrusih, brokoliju, češnjah, paradižniku ipd (Häkkinen in sod., 1999; Caridi in sod., 2007; Mitchell in sod., 2007). KVER deluje antivnetno, saj inhibira nastajanje in izločanje histamina ter drugih vnetnih mediatorjev. Prav tako pa deluje antikancerogeno na raka prostate (Paliwal in sod., 2005) ter antioksidativno, antialergijsko, antimikrobnno, antivirusno in antiglivično (Okubo in sod., 1991). Prav tako naj bi KVER pomagal pri težavah s prostatoto (Shoskes in sod., 1999), srčnožilnimi boleznimi (preprečuje strjevanje krvi, poškodb arterij) (Edwards in sod., 2007) in boleznih, povezanih z živčevjem, čeprav je tu potrebno opraviti še kar nekaj raziskav, ker naj bi bil KVER nevrotoksin *in vitro* (Ossola in sod., 2008). KVER povzroča diskoloracije sadja in zelenjave.

Kampferol (Preglednica 5, KAM in KAM-G) z molsko maso 286,24 g/mol in **kampferol-3-O-glukozid** oz. astragalin z molsko maso 448,38 g/mol sta široko zastopani polifenolni spojini v rastlinskem svetu, predvsem akaciji, zelenem čaju, brokoliju, čebuli, žajblju, jabolkih, citrusih ipd. (Park in sod., 2006) in (Zhang, 2008). KAM tvori rumene kristale in ima temperaturo tališča pri $T = 276\text{--}278\text{ }^{\circ}\text{C}$. Je delno topen v vodi in popolnoma topen v segretetu alkoholu in dietil etru (Shan in sod., 2005). V naravi je pogosto zastopan tudi kampferol-3-O-glukozid. Znano je, da KAM in KAM-G pozitivno učinkujeta na srčnožilni sistem, poleg tega pa ima KAM tudi antidepresiven učinek (Hosseinzadeh in sod., 2007).

Naringenin (Preglednica 5, NAR) z molsko maso 272,26 g/mol spada v skupino flavonoidov in podskupino flavanonov. Ima močne antioksidativne in antivnetne lastnosti. Prav tako naj bi NAR negativno vplival na virus hepatitis C in inhibiral izločanje VLDL (ang. very-low-density lipoprotein) iz celic (Nahmias in sod., 2008). Prav tako naj bi NAR zniževal koncentracije holesterola v krvni plazmi (Lee in sod., 1999). Največ ga je v grenivkah in citrusih (Felgines in sod., 2000; Erlund in sod., 2001). NAR se nahaja tudi v paradižniku. Ugotovljeno je, da lahko človeški organizem absorbira NAR tudi iz paradižnikove mezge (Bugianesi in sod., 2002).

Preglednica 3: Razvrstitev polifenolnih spojin v skupine in podskupine glede na število C-atomov v molekuli (Goodwin in Mercer, 1983; Strack, 1997). Pri vsaki skupini so izpostavljeni primeri polifenolnih spojin, katere smo uporabili v svojem raziskovalnem delu.

Število C-atomov	Osnovni skelet	Skupina	Podskupina	Primer
6	C ₆	Fenoli		
7	C ₆ C ₁	Fenolne kisline		
8	C ₆ C ₂	Fenilocetne kisline		
9	C ₆ C ₃	Hidroksicimetne kisline		Kavna kislina p-kumarna kislina Rožmarinska kislina (ester kavne in dihidroksi fenil mlečne kisline)
		Fenilpropeni		
		Kumarini		
		Izokumarini		
		Kromoni		
10	C ₆ C ₄	Naftokinoni		
13	C ₆ C ₁ C ₆	Ksantoni		
14	C ₆ C ₂ C ₆	Stilbeni		
		Antrakinoni		
15	C ₆ C ₃ C ₆	Flavonoidi	Flavanol	Epikatehin galat Epigalokatehin galat Epigalokatehin
			Flavonol	Kvercetin Kampferol Kampferol-3-glukozid
			Flavon	
			Flavanon	Naringenin
			Antocianidin	
			Izoflavon	
18	(C ₆ C ₃) ₂	Lignani		
		Neolignani		
30	(C ₆ C ₃ C ₆) ₂	Biflavonoidi		
n	(C ₆ C ₃) _n	Lignini		
	(C ₆) _n	Melanini		
	(C ₆ C ₃ C ₆) _n	kondenzirani tanini		

2.4.2 Polifenolne spojine v vlogi antioksidantov

Antioksidanti imajo lastnost, da zavrejo ali ustavijo oksidacijske procese lipidov ali drugih molekul s tem, da inhibirajo aktivatorje oksidacijskih procesov (radikale) in da sodelujejo v popravilu nastalih poškodb ali da sodelujejo pri odstranjevanju oksidativno poškodovanih biomolekul in tudi celic (Karou in sod., 2005, Korošec, 2000). Antioksidanti so lahko encimski ali neencimski sistemi, topni v vodi (npr. askorbinska kislina) ali v maščobah (npr. flavonoidi, karotenoidi, vitamin E) (Briviba in Sies, 1994). Glede na način delovanja antioksidante razdelimo v tri skupine, in sicer na antioksidante, ki vežejo radikale, reducente (reducirajo oksidante) in sinergiste, ki povečujejo delovanje antioksidantov (Korošec, 2000).

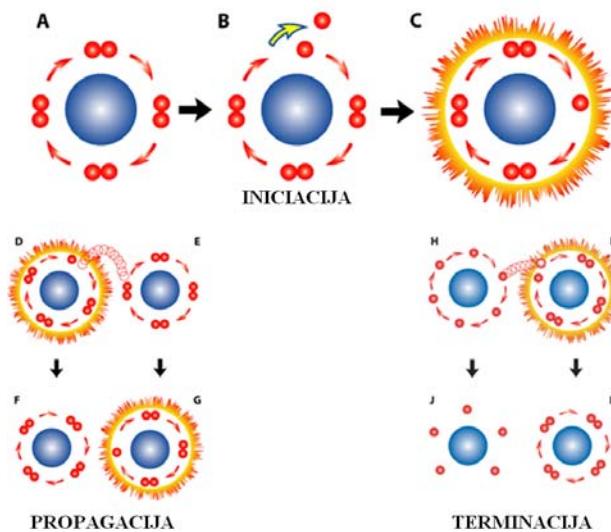
V živilski industriji poznamo primarne in sekundarne antioksidante. V skupino primarnih antioksidantov spadajo polifenolne spojine, ki se lahko obnašajo kot kovinski kelatorji, reducirne molekule ali dušilci singletnega kisika. Njihov učinek je večji, če je na aromatski obroč pripetih več hidroksilnih skupin (Kanner in sod., 1994).

V skupino sekundarnih antioksidantov spadajo prav tako lovilci kisika (sulfiti, askorbinska kislina), kelatni reagenti (polifosfati, EDTA, vinska kislina) in številni drugi (nitriti, aminokisline, vitamin A, cink, selen, β -karoten). Sekundarni antioksidanti delujejo sinergistično na primarne antioksidante (Madhavi in sod., 1996). Tako primarni kot sekundarni antioksidanti pa imajo eno samo nalogo, in sicer, da nevtralizirajo radikale oz. da sodelujejo v procesu terminacije. S pravočasnim nevtraliziranjem radikalov razbremenimo celične mehanizme, ki skrbijo za to, poleg tega pa se izognemo nepotrebnim celičnim poškodbam. Pri človeku se na ta način izognemo celi paleti civilizacijskih obolenj. Slika 4 shematično prikazuje vse tri stopnje oksidacijske reakcije: iniciacije, propagacije in terminacije. Antioksidanti imajo sposobnost oddati svoj elektron za nevtralizacijo radikala, s tem pa ne izgubijo svoje stabilnosti (Madhavi in sod., 1996).

Fung in Gailani (1985) sta definirala antioksidante v hrani kot substance, ki se dodajo maščobnim živilom z namenom zaustavitev oksidacijskih procesov, podaljšanje življenjske dobe, varnosti in stabilnosti izdelka, pri tem pa živilo ohrani prvotne senzorične lastnosti izdelka.

Z rednim uživanjem zadostnih količin polifenolnih spojin (neobdelane hrane, zelenjava in sadje) skupaj z ostalimi hranili, ki jih telo potrebuje za normalno rast in razvoj, je dokazano, da lahko preprečimo ali vsaj ublažimo posledice različnih stanj, ki povzročajo oksidativne strese, predvsem po dejavni fizični obremenitvi. Oksidativni stres pa je tudi povzročitelj številnih civilizacijskih bolezni, kot so rak in srčno-žilne bolezni (Doll, 1990).

Polifenoli tudi zmanjšajo citotoksičnost vodikovega peroksida (H_2O_2), ki nastaja v telesu kot stranski produkt metabolizma (Tsutomu in sod., 1993).



Slika 4: Shematičen prikaz oksidacijskega procesa (CarefolinNAC, 2010)

2.4.3 Polifenolne spojine v vlogi antimikrobnih učinkovin

Antimikrobnna učinkovina je vsaka učinkovina, ki zavira razvoj in razmnoževanje bakterij. Več kot ima polifenolna spojina v svoji strukturi hidroksilnih skupin, večji ima antimikrobni učinek (Cowan, 1999). Polifenolna spojina, ki ima antimikrobne lastnosti se uvršča med konzervanse. Lahko pa s svojo prisotnostjo v živilu delujejo sinergistično z drugimi dodanimi konzervansi in tako še povečajo antimikrobni učinek. V zadnjem času strokovnjaki ugotavljajo velikanski porast bakterij (več kot 70 %), ki so odporne na vsaj eno antimikrobnno učinkovino (National, 2006). Polifenolne spojine so ravno v tem segmentu zelo zanimive saj imajo sposobnost, da zavirajo rast in razvoj bakterij na način oz. na aktivnih mestih, na katere običajni antibiotiki ne morejo vplivati (Kimberlin in Whitley, 1996). Zaradi te lastnosti se posveča vedno več pozornosti polifenolnim spojinam.

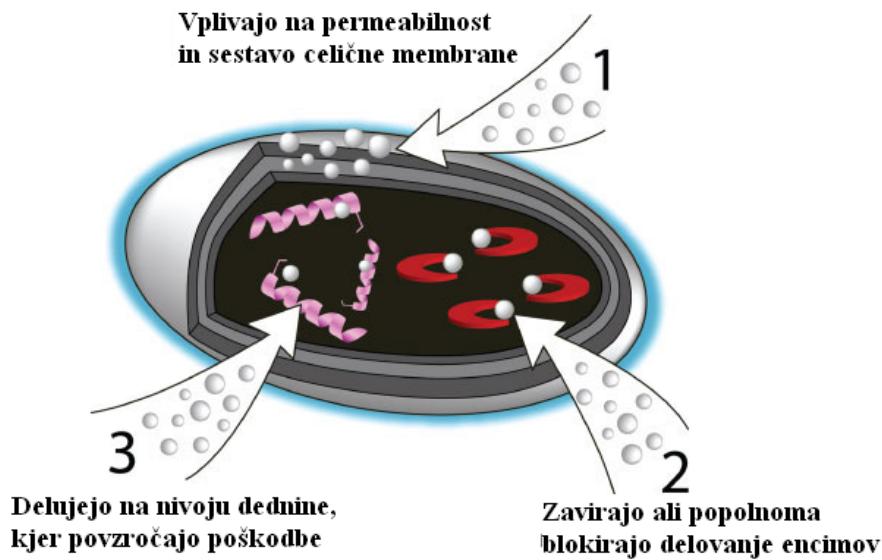
Iz celotne družine polifenolnih spojin imajo najvišjo stopnjo antimikrobnega učinka flavononi in flavonoli iz skupine flavonoidov (Tsuchiya in sod., 1996).

Kako točno polifenolne spojine vplivajo na bakterije in njihovo razmnoževanje, ne vemo, predvideva pa se, da je aktivnost polifenolnih spojin verjetno pogojena z nabitostjo in terciarno strukturo tarčne molekule. Imamo tri različne teorije o vplivu polifenolnih spojin na bakterijo in sicer prva pravi, da polifenolne spojine imitirajo spojino, ki je sicer ključnega pomena za razvoj bakterije (Fung in sod., 1985); druga teorija pravi, da polifenoli inhibirajo sintezo lipidov, proteinov, encimov (vpletenih v ATP sintezo) in vplivajo na razne metabolne poti (Haraguchi in sod., 1998), in tretja, sicer najverjetnejša hipoteza pravi, da polifenolne spojine povzročijo nepravilnosti v celični membrani (spremenijo maščobno kislinsko in fosfolipidno sestavo membrane, reagirajo z membranskimi proteini, vplivajo na agregacijo proteinov) (Singer in Wan, 1977; Poklar Ulrich in sod., 2010). Slednjo hipotezo potrjuje študija v kateri so proučevali vpliv ekstrakta

zelenega čaja (glavna komponenta je EGCG) tako Gram pozitivne bakterije kot Gram negativne bakterije. Opazili so večji inhibitorni učinek ekstrakta zelenega čaja na Gram pozitivne bakterije. Predvodevajo, da pride do interakcije med negativno nabitim EGCG in pozitivno nabitim lipidi na membrani Gram pozitivne bakterije, kjer povzroča poškodbe na celici (Gupta in sod., 1999). Gram negativne bakterije pa imajo v svoji membrani vpete negativno nabite lipopolisaharide, na katere se negativno nabit EGCG težje veže (Ikigai in sod., 1993).

Način antimikrobnega delovanja polifenolnih spojin je odvisen od njihove koncentracije. V primeru manjše koncentracije naj bi vplivali na encime, ki so povezani z oskrbo celice z energijo (sinteza ATP), medtem ko v primeru večje koncentracije lahko polifenolne spojine povzročijo agregacijo oz. obarjanje proteinov. Polifenolne spojine lahko zaradi svoje hidrofobne narave reagirajo z lipidi bakterijske celične membrane in lipidi mitohondrijske membrane. S tem pride do spremembe strukture celične in mitohondrijske membrane, ki postaneta propustnejši. Prav tako pa pride do sprememb v sestavi maščobnih kislin in vsebnosti fosfolipidov v membrani. Zaradi sprememb v permeabilnosti membrane pride lahko do manjše izgube celičnih sestavin, kar bakterijski celici oteži normalen razvoj in razmnoževanje, ali pa celica izgubi večje količine celičnih sestavin, kar povzroči celično smrt (Nychas, 1995; Burt, 2004; Vermerris in Nicholson, 2006).

Zaradi svoje reaktivnosti, ki jih polifenolne spojine imajo, lahko inaktivirajo posamezne encime ali lahko celo povzročijo poškodbe na genetskem materialu. Na antimikrobeno aktivnost polifenolnih spojin vplivajo tudi še prisotnost lipidov, soli, pH in temperatura. Soli delujejo sinergistično s polifenolnimi spojinami in tako povečajo njihovo antimikrobeno učinkovitost (Davidson in Branen, 2005).



Slika 5: Mesta in možni mehanizmi antimikrobnega delovanja polifenolnih spojin v bakterijski celici (Labnews, 2010; Davidson in Branen, 2005; Burt, 2004)

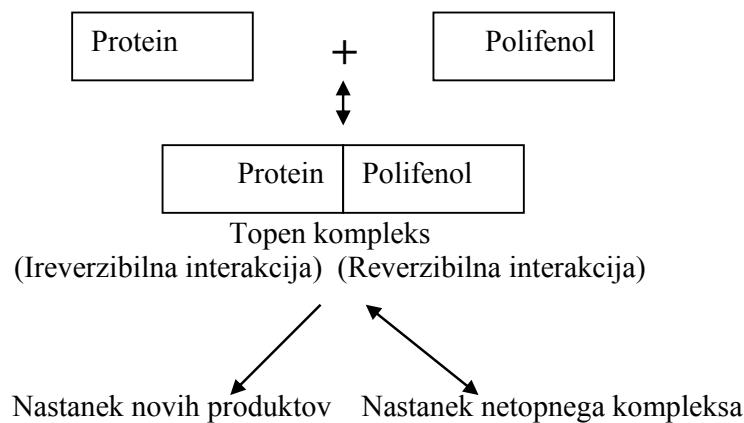
2.4.4 Interakcije protein-polifenol

Protein-polifenol interakcije so lahko reverzibilne ali ireverzibilne tako kot prikazuje slika 6 (Haslam in sod., 1999). Ireverzibilni kompleksi se tvorijo avtokatalitično ob prisotnosti kisika ali ob prisotnosti polifenoloksidaz (Mole in Waterman, 1986) in lahko vodijo do tvorbe popolnoma novih produktov. Za reverzibilne kompleksacije so značilne nekovalentne sile, kot so hidrofobne interakcije in vodikove vezi (Haslam in sod., 1999). Reverzibilne interakcije vodijo do formacije netopnih kompleksov v raztopini. Tesno zvit globularni protein kaže manjšo afiniteto za vezavo polifenolne spojine v primerjavi s proteinom, ki je naključno zvit ali, ki je izgubil svojo konformacijo. Tako aromatski obroč kot hidroksilne skupine v polifenolni spojini so ključnega pomena pri protein-polifenol vezavi oz. kompleksaciji.

Znano je, da se polifenolne komponente, prisotne v pivu, vinu, pravem čaju in sadnih sokovih, vežejo na tamkajšnje proteine, s čimer povzročijo tvorjenje koloidov zaradi koagulacije, ki ni najbolj zaželen proces, razen v vinarstvu, kjer koagulacija beljakovin pripomore k spontanemu bistrenju vina (Siebert, 1999; Šikovec, 1993). Ob uživanju prej omenjenih pijač polifenolne spojine iz njih v ustih reagirajo s proteini iz slin, pri čemer pride do tvorjenja netopnih kompleksov. Nastali netopni kompleksi nam dajejo poseben, ponavadi harmoničen oz. tipičen občutek v ustih za določeno pijačo (vino – trpko vino, suho vino) (Bennick, 2002).

Polifenolne spojine zaradi sposobnosti vezanja kovinskih ionov v kelatne spojine, vezave na proteine kot tudi s svojimi encimskimi in neencimskimi oksidacijskimi produkti, ki se dogajajo v živilih rastlinskega izvora, zmanjšujejo prehransko vrednost proteinov (Haslam, 1998). Oksidirani polifenoli lahko reagirajo z aminokislinami in proteini ter tako zavirajo delovanje proteolitičnih encimov, kot sta tripsin in lipaza (Milić in sod., 1968).

Hagerman (1989) je poročal, da goveji serumski albumin (BSA) spremeni relativni antioksidacijski potencial ferulni kislini, kavni kislini in katehinu, kar se je zgodilo zaradi vezave teh polifenolnih spojine na BSA protein. Haslam in sod. (1999) predvideva, da se za protein-polifenol interakcijo vzpostavijo vodikove vezi med hidroksilnimi skupinami na polifenolni spojini in med aminokislinskimi ostanki proteina. Oksidirani polifenoli naj bi vodili do močnih interakcij med polifenolom in proteinom (Siebert, 1999). Interakcije med polifenolom in peptidi lahko povzroči tudi α -vezavne komplekse (Bianco in sod., 1997). Hidrofobne interakcije med nepolarnim koncem polifenola in nepolarno domeno proteina so verjetno vzrok za šibke interakcije med polifenolno spojino in proteinom (Bartolomé in sod., 2000).

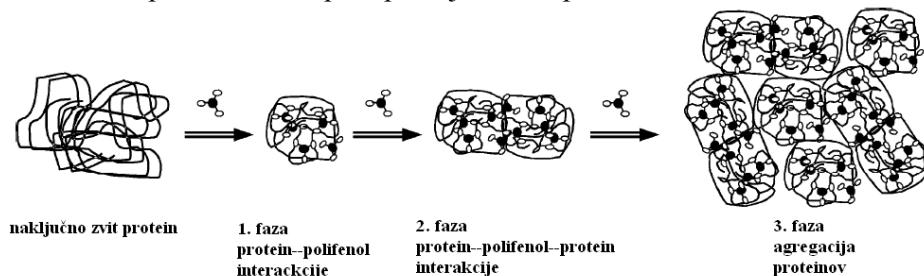


Slika 6: Reverzibilne in irreverzibilne protein-polifenol interakcije (Haslam in sod., 1999)

Proteini, ki imajo visoko afiniteto do polifenolov, imajo ponavadi relativno višjo molekulske maso in odprto strukturo, poleg tega so bogati na vsebnosti prolina (Hagerman, 1989). Glikozilirani proteini imajo prav tako visoko afiniteto do vezave polifenolnih spojin (Haslam in sod., 1999). Polifenolne spojine lahko precipitirajo proteine blizu njihove izoelektrične vrednosti. Prav tako so molekulska masa, število aromatskih obročev, orientacija in število funkcionalnih skupin, pripetih na aromatske obroče, konformacijska fleksibilnost in topnost v vodi pomembni dejavniki pri načinu in moči vezave polifenolne spojine na protein (Murray in sod., 1994).

Polifenolne spojine se lahko istočasno vežejo na različna mesta proteina prek več različnih funkcionalnih skupin, iz katerih so sestavljene. Protein-polifenol precipitacija, kot jo prikazuje slika 7, poteka v treh fazah (Jöbstl in sod., 2004):

1. faza: vezava polifenolne spojine na različna mesta na proteinu (vezava na aromatske aminokislinske ostanke in na prolin) povzroči, da se protein zvije, pri čemer se zmanjša njegova fizična velikost.
2. faza: pri višanju koncentracije polifenolne spojine se vzpostavijo kemijske vezi med polifenolno spojino vezano v prvem proteinu s fenolno spojino vezano v drugem proteinu – nastopi proces dimerizacije.
3. faza: pri nadalnjem višanju koncentracije polifenolne spojine pride do agregacije dimerov in posledično do precipitacije v raztopini.



Slika 7: Shematičen prikaz protein-polifenol precipitacije (Jöbstl in sod., 2004)

2.4.5 Uporaba polifenolnih spojin v prehrani in medicini

Skozi celotno zgodovino človeštva, so ljudje imeli stik z rastlinami, ki so bile bogate s polifenolnimi spojinami. Vedeli so, katera rastlina ali plod rastline blagodejno vpliva ali celo ozdravi poškodbe, vnetja, prehlade in vrsto druge bolezni ter s katerimi lahko izboljšajo okus in podaljšajo obstojnost živila. Vedeli pa so tudi, katere rastline so strupene. Edina razlika med našimi predniki in nami je ta, da danes znamo te učinkovine s prej omenjenimi lastnostmi izolirati in proučevati z modernimi laboratorijskimi tehnikami.

Polifenolne spojine so zanimive za študiranje farmakodinamike in farmakokinetike (Lamson in Brignall, 2000; Tian in sod., 2005), saj na podlagi parametrov vezave liganda na protein in distribucije nastalega kompleksa po telesu do tarčnih celic lahko proučujemo metabolizem posameznega liganda (Zsila in sod., 2003).

Danes poteka ogromno raziskav, ki so usmerjene v boljše razumevanje delovanja polifenolnih spojin v medicini in proizvodnji kakovostnejše in varnejše hrane. Ugotovili in dokazali so, da imajo polifenolne spojine antioksidativne, antikarcogene, antimikrobine, antivirusne, antialergijske, antitoksične, kardioprotективne (preventivno vlogo pri možganski in srčni kapi) učinke. Poleg tega naj bi preventivno delovale tudi pri preprečevanju izgube kostne mase po menopavzi in na splošno proti osteoporosi, pri bolezni ledvic in proti zlepljanju trombocitov (Kanner in sod., 1994; Setchell in Cassidy, 1999; Mukhtar in Ahmad, 2000; Wattel in sod., 2003; Morillas-Ruiz in sod., 2006; Kadoma in Fujisawa, 2008). Poleg teh lastnosti pa so polifenolne spojine lahko tudi nosilke arome in barve, ki se prek protein-polifenol interakcije vgradijo v določeno živilo, kateremu izboljšajo senzorične lastnosti. Tak primer je vanilin (aditiv), ki se uporablja v živilski industriji za jačanje arome živila (Ng in sod., 1989; Hansen in Heinis, 1991).

Zaradi vseh teh lastnosti so polifenolne spojine postale zelo zanimive za živilsko industrijo, saj vplivajo na prehranske in organoleptične lastnosti pa tudi na varnost in obstojnost živila, s čimer pa proizvajalec lahko dobro konkurira na tržišču. Poleg tega pa je pritisk potrošnikov in zdravstvenih organizacij vedno večji zoper uporabo sintetičnih konzervansov in aditivov (Fung in sod., 1985; Manach in sod., 2004; Cheynier, 2005; Tiwari in sod., 2009; Shahidi in Naczk, 1995; Rupnik, 1997).

Aktivnost polifenolnih spojin se močno zmanjša, če živila, bogata s polifenolnimi spojinami, kakorkoli toplotno obdelamo ali skladiščimo dlje časa (Shahidi in Naczk, 1995; Häkkinen in sod., 1999). Zanimiv pa je podatek, da s praženjem živila razgradimo glukozide (v tej študiji kvercetin glukozid) na monoglukozide in aglikone tako, da se lahko aglikoni v prebavnem traktu že pričnejo absorbirati v organizem (Rohn in sod., 2007).

Polifenolne spojine so postale zanimive tudi za živilsko-farmacevtsko industrijo, ki je izkoristila priložnost in pričela z izdelovanjem prehranskih dodatkov. Prehranski dodatki, ki jih najdemo na tržišču, lahko vsebujejo tudi 10–20-krat večjo količino posamezne spojine, kot bi jih sicer dnevno dobili s hrano, zato je pri dolgotrajnejši uporabi pripravkov potrebna previdnost, saj imajo lahko polifenolne spojine v prevelikih koncentracijah tudi toksične oz. citotoksične, prooksidativne in celo mutagene učinke (Haslam, 1998; Skibola in Smith, 2000; Liu, 2004; Matsuo in sod., 2005).

2.4.6 Metabolizem polifenolnih spojin v telesu

Večina polifenolnih spojin, ki jih najdemo v živilih rastlinskega izvora, se nahaja v obliki estrov, glikozidov ali polimerov, katere človeški organizem ni sposoben neposredno absorbirati v telo prek znanih metabolnih poti. Kako točno se polifenolne spojine absorbirajo v organizem, še ni znano, vemo pa, da jih organizem s črevesnimi encimi ali pa s pomočjo črevesne mikroflore in s svojimi lastnimi encimi najprej hidrolizirati in šele nato absorbirati v organizem (Walle in sod., 2005).

Kadar je v proces hidrolize vključena črevesna mikroflora, je učinkovitost absorpcije ponavadi nekoliko nižja, saj mikroflora razgradi tudi polifenolne spojine, ki jih ni potrebno razgraditi (aglikoni), saj so v primerni kemijski obliki, da bi lahko prišlo do absorpcije. Črevesna mikroflora hidrolizira glikozidne polifenole v aglikonske molekule in te razgradi naprej do aromatskih kislin. Pri absorpciji polifenolov v krvi in krvno plazmo pride do procesa konjugacije (združevanja) najprej v tankem črevesju in nato še v jetrih. V tem procesu pride lahko do metilacije, sulfatne konjugacije ali konjugacije z glutationom. Ti procesi v organizmu skrbijo za detoksifikacijo in so značilni metabolni procesi pri ksenobiotikih. Kroženje polifenolnih derivatov po organizmu je možna prek albuminov v krvi. Nekateri znanstveniki predvidevajo, da polifenolna spojina izgubi svojo aktivnost, ko je vezana na krvni protein, eksperimentalni podatki za kvercetin pa kažejo nasprotno. Dokazali so, da je polifenolna spojina kvercetin aktivna, kljub temu, da je vezana na krvni protein (Dangles in sod., 1999). Polifenoli imajo sposobnost prehajanja skozi tkiva. Polifenoli in njihovi derivati se v glavnem izločajo prek urina in žolča. Prek žolča prehajajo nazaj v prebavni trakt (dvanajstnik), kjer jih lahko mikroflora ponovno hidrolizira. Kot taki pa se lahko ponovno absorbirajo v organizem. Tovrstno kroženje ali recikliranje polifenolnih spojine lahko vodi do daljše prisotnosti polifenolnih spojin v telesu (Scalbert in Williamson, 2000; Manach in sod., 2004). Ugotovljeno je, da je koncentracija izločenih polifenolnih spojin prek urina in blata neposredno proporcionalna koncentraciji zaužitih polifenolnih spojin (He in Kies, 1994; Lee in sod., 1995; Yang in sod., 1998a).

Zdravilni učinek zaužitih polifenolnih spojin je zelo odvisen od količine zaužitih polifenolnih spojin in od njihove biorazpoložljivosti, saj ni nujno, da je določena polifenolna spojina tudi aktivna v telesu. Poleg tega je tudi znano, da se ne absorbirajo v telo vse polifenolne spojine z enako učinkovitostjo, nekatere se absorbirajo hitreje, druge počasneje (Manach in sod., 2004). Na biorazpoložljivost polifenolnih spojin v živilu vpliva mnogo dejavnikov. Najverjetneje se absorpcija v prebavnem traktu zmanjša zaradi interakcij med polifenolno spojino in drugimi komponentami živila, kot so proteini in polisaharidi. Prav tako lahko na absorpcijo polifenolnih spojin vplivajo tudi prehranske vlaknine, saj stimulirajo črevesno mikrofloro, da hidrolizirajo polifenolne spojine (Hendrich, 2002). Znanstveniki so proučili tudi vpliv alkohola na hitrost absorpcije polifenolov saj vemo, da se polifenolne spojine v etanolu dobro razapljaljo. Ugotovili so, da alkohol vpliva na povečanje absorpcije polifenolnih spojin v organizmu. Učinek je viden šele pri > 30 vol. %, kar pa je previsoka vol % vrednost, da bi se alkohol uporabljal v prehrani (Azuma in sod., 2002; Vermerris in Nicholson, 2006).

3 MATERIAL IN METODE

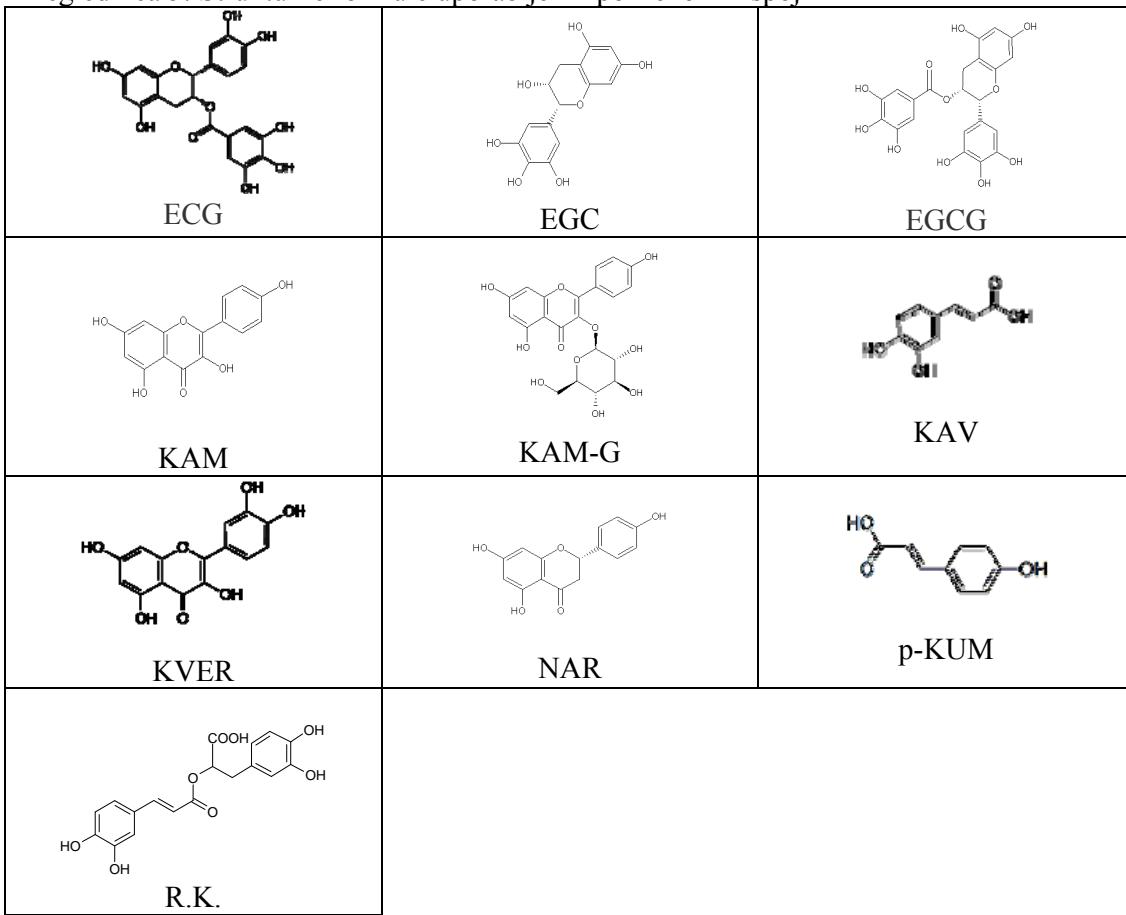
3.1 MATERIAL, OPREMA IN PRIPRAVA OSNOVNIH RAZTOPIN

3.1.1 Material

Preglednica 4: Uporabljene polifenolne spojine

Polifenolna spojina	Podana čistost (%)	Proizvajalec
ECG (epikatechin galat)		EXTRASYNTHESE, Francija
EGC (epigalokatechin)		EXTRASYNTHESE, Francija
EGCG (epigalokateching galat)		EXTRASYNTHESE, Francija
KAM (kampferol)		EXTRASYNTHESE, Francija
KAM-G (kampferol 3-O-glukozid)		EXTRASYNTHESE, Francija
KAV (kavna kislina)	≥ 99 % HPLC	SIGMA-ALDRICH, Nemčija
KVER (kvercetin)	≥ 98 % HPLC	SIGMA-ALDRICH, Nemčija
NAR (naringenin)	≥ 95 % HPLC	SIGMA-ALDRICH, Nemčija
p-KUM (p-kumarna kislina)		MERCK, Nemčija
R.K. (rožmarinska kislina)		Vitiva, Slovenija

Preglednica 5: Strukturne formule uporabljenih polifenolnih spojin



Preglednica 6: Uporabljene kemikalije

Kemikalija	Podana čistost (%)	Proizvajalec
BSA (Mw = 66433 Da)	≥ 99 %	SIGMA-ALDRICH, Nemčija
Etanol	96,0 %	MERCK, Nemčija
HEPES	≥ 99,5 %	SIGMA-ALDRICH, Nemčija
Metanol	99,9 %	MERCK, Nemčija
NaCl		MERCK, Nemčija
NaOH		MERCK, Nemčija
SEB (Mw = 28366 Da)		SIGMA-ALDRICH, Nemčija
TRIS/HCl		MERCK, Nemčija

3.1.2 Laboratorijska oprema

Preglednica 7: Pregled uporabljene laboratorijske opreme

	Naziv laboratorijske opreme	Proizvajalec
UV-kivete	semi-mikro, 1,5 ml – plastične dolžina optične poti: 10 mm 1,4 ml kvarčne kivete dolžina optične poti: 10 mm 0,7 ml kvarčne kivete dolžina optične poti: 2 mm	Plastibrand, Nemčija Starna Scientific Ltd., Velika Britanija Agilent, ZDA
Kivete za merjenje fluorescence	2,5 ml kvarčne kivete dolžina optične poti: 10 mm 400 µl kvarčna kiveta dolžina optične poti: 10 mm	FLR Cary, Varian, Avstralija FLR Cary, Varian, Avstralija
Spektrofotometri	fluorescenčni spektrofotometer Cary Eclipse UV-VIS spektrofotometer model 8453 UV-VIS spektrofotometer Cary 100 Bio	Cary Eclipse, Varian, Avstralija Hawlett-Packard, ZDA Cary, Varian, Avstralija
Druga laboratorijska oprema	pH meter HI 221 vrtinčnik Vibromax analitska tehnica AT201 sušilnik model: 100–800 0,5 ml centrifugirke MICROCON, Ultracell YM-3, 3.000 MWCO filter Millipore RiOs Mili-Q Gradient za filtriranje vode dializno črevo D9277 premera 10 mm	HANNA instruments, Italija Tehnica Železniki, Slovenija Mettler Toledo, Švica Memmert, Nemčija Amicon, Bioseparation (Millipore), ZDA Millipore, ZDA SIGMA-ALDRICH, Nemčija

3.1.3 Priprava osnovnih raztopin

3.1.3.1 Priprava HEPES pufra

Za pripravo 20 mM HEPES pufra smo na tehnicni (AT 201 METTLER TOLEDO) zatehtali 4,77 g HEPES-a v prahu in ga kvantitativno prenesli v merilno bučko, ki smo jo nato dopolnili z bidestilirano vodo do oznake enega litra in dobro premešali. Koliko HEPES-a je potrebno zatehtati za pripravo želene koncentracije in volumna raztopine, smo izračunali na podlagi naslednje enačbe:

$$c = \frac{n}{V} \Rightarrow n = c \times V \quad \dots (1)$$

$$n = \frac{m}{M} \Rightarrow m = n \times M \quad \dots (2)$$

$$m = c \times V \times M \quad \dots (3)$$

kjer c [mol/l] predstavlja molarno koncentracijo raztopine, V [l] volumen raztopine, M [g/mol] molsko maso topljenca, n [mol] množino topljenca in m [g] maso topljenca.

Tako pripravljenemu pufru smo uravnali pH na $7,50 \pm 0,02$ z dodajanjem 10 M NaOH (približno uravnanje) in z 1 M NaOH (točno uravnanje). pH vrednosti smo merili s pH-metrom (HI 221 HANNA Instruments). Elektrodo pH-metra smo pred pripravo pufra kalibrirali s standardnimi pufri, za katere poznamo pH vrednosti (pufer s pH = 4,0 in pH = 7,0). Kalibracija elektrode in uravnavanje pH-ja HEPES pufra je potekalo pri sobni temperaturi. Tako pripravljen HEPES pufer s pH = 7,5 smo hranili na sobni temperaturi v temnem prostoru največ pet dni. Pred vsako uporabo pufra smo preverili pH vrednost.

3.1.3.2 Priprava osnovne raztopine stafilokoknega enterotoksina B (SEB)

1 mg SEB toksina ($M_w = 28366$ Da) smo raztopili v 0,5 ml 20 mM HEPES pufra s pH = 7,5. Tako pripravljeno raztopino smo filtrirali preko membrane z mejno vrednostjo zadrževanja molekul, velikosti 3.000 MWCO oziroma 3.000 Da (MICROCON centrifugirke). Po centrifugiranju smo dobili 150 µl vzorca. Temu smo dodali še 450 µl 20 mM HEPES pufra s pH = 7,5. Množinsko koncentracijo SEB toksina smo določili spektrofotometrično (Hewlett-Packard 8453) pri 277 nm po naslednji enačbi:

$$c = \frac{A}{\varepsilon \times l} \quad \dots (4)$$

kjer c [mol/l] predstavlja molarno koncentracijo raztopine, A absorbanco raztopine pri 277 nm, ε [$\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$] molarni absorpcijski koeficient pri 277 nm ($\varepsilon_{277\text{nm}} = 39712,4 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$) in l [mm] dolžino optične poti kivete ($l = 0,2$ mm).

Na podlagi znane množinske koncentracije in molske mase SEB proteina smo izračunali še masno koncentracijo tega:

$$\gamma = c \times M \quad \dots (5)$$

kjer γ (mg/ml) označuje masno koncentracijo raztopine, c (mol/l) molarno koncentracijo SEB proteina in M (g/mol) molsko maso SEB proteina.

Pripravljeno raztopino smo razdelili v 50 µl alikvote in jih hranili v zamrzovalniku pri -20 °C.

Pred eksperimentom smo 50 µl raztopine SEB toksina odmrznili in mu dodali 1850 µl 20 mM HEPES pufra s pH = 7,5.

3.1.3.3 Priprava osnovne raztopine govejega serumskega albumina (BSA)

Za pripravo osnovne raztopine BSA proteina (z minimalno 99-odstotno čistostjo; Mw = 66433 Da) z masno koncentracijo 10 mg/ml smo na tehnici (AT 201 METTLER TOLEDO) zatehtali 50 mg kristaliziranega in liofiliziranega prahu BSA proteina in ga kvantitativno prenesli v čašo. Na podlagi enačbe 6 smo izračunali, da moramo BSA protein raztopiti v 5 ml HEPES pufru s pH 7,5. Tako pripravljeno raztopino BSA proteina smo dializirali (3.1.3.3.1 Postopek dialize).

$$\gamma = \frac{m}{V} \quad \dots (6)$$

kjer γ (mg/ml) označuje masno koncentracijo raztopine, m (mg) maso topljenca in V (ml) volumen topila.

Po dializiranju smo raztopini BSA spektrofotometrično (Hewlett-Packard 8453) določili množinsko koncentracijo proteina pri 280 nm po enačbi 4, kjer znaša dolžina optične poti kivete 0,2 mm, molarni absorpcijski koeficient za BSA protein pri 280 nm pa $\epsilon_{280\text{nm}} = 42925 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$. Iz tega sledi izračun masne koncentracije proteina po enačbi 5. Molska masa BSA proteina znaša 66433 g/mol.

Tako pripravljeno osnovno raztopino BSA proteina smo hranili v hladilniku pri temperaturi +4 °C do enega tedna.

Na podlagi določene masne koncentracije osnovne raztopine BSA proteina (8 mg/ml), smo si pripravili raztopine, ki smo jih potrebovali za izvedbo eksperimentov na UV-VIS spektrofotometru in fluorimetru. Za izvedbo eksperimentov na UV-VIS spektrofotometru smo si pripravili BSA protein z masno koncentracijo $\gamma = 0,8 \text{ mg/ml}$ in za izvedbo eksperimenta na fluorimetru z masno koncentracijo $\gamma = 0,08 \text{ mg/ml}$. Masna koncentracija proteina za izvedbo eksperimenta na UV-VIS spektrofotometru je večja zaradi tega, ker je občutljivost spektrofotometra nižja od fluorimeta. Vsaki razredčeni raztopini BSA

proteina pa smo pred izvedbo eksperimenta še enkrat spektrofotometrično določili masno koncentracijo.

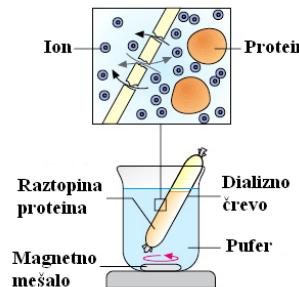
Tako pripravljene razredčene raztopine smo si dnevno pripravljali iz osnovne BSA raztopine proteina in jih hranili v hladilniku pri temperaturi +4 °C. Na koncu dneva smo neporabljen vzorec zavrgli.

3.1.3.3.1 Postopek dialize

Dializa opisuje proces prehajanja delcev skozi polprepustno membrano, skozi katero prehajajo le delci, ki so manjši od por v membrani. Delci vedno prehajajo skozi membrano v smeri koncentracijskega gradiента iz raztopine z večjo koncentracijo v raztopino z manjšo koncentracijo toliko časa, dokler se koncentraciji nekega delca na obeh straneh membrane ne izenačita. Prehajanje delcev opisuje pasivna difuzija (Turk in sod., 1997).

Dializa se uporablja predvsem za razsoljevanje ali čiščenje makromolekul – proteinov, pri čemer manjše molekule (voda, manjši proteini) in ioni prehajajo skozi polprepustno membrano v pufersko raztopino. Poroznost membran je različna (od 1–20 nm), kakšno bomo uporabili, pa je odvisno od tega, kaj želimo iz našega vzorca odstraniti (Koolman in Roehm, 2005). Prednost dialize je v tem, da je sama izvedba te nezahtevna in zelo poceni v primerjavi z drugimi metodami čiščenja proteinov (npr. gelska filtracija), poleg tega pa volumen vzorca po končani dializi ostane skoraj enak. Je pa relativno dolgotrajna metoda, ki zahteva pripravo velikega volumna pufra, saj vzorec dializiramo proti 100–1000-kratnemu volumnu vzorca (Harris, 2001).

Dializo raztopine proteina BSA smo izvajali pri sobni temperaturi v 20 mM HEPES pufru s pH = 7,5. Dializno membrano, ki prepušča molekule in proteine, manjše od 12 kDa, smo napolnili s 5 ml BSA raztopine s koncentracijo 8 mg/ml, smo imeli potopljeno v 1 l omenjenega pufra, ki smo ga v 36 urah štirikrat zamenjali. Dializa je potekala z mešanjem z magnetnim mešalom.



Slika 8: Shematični prikaz dialize – pasivne difuzije (Koolman in Roehm, 2005)

3.1.3.4 Priprava osnovne raztopine polifenolnih spojin

Pri eksperimentalnem delu smo uporabljali devet različnih polifenolnih spojin s končno koncentracijo 1 mM. Uporabljali smo: EGCG, EGC, KAM-G, KAM, ECG, KAV, KVER, NAR, p-KUM in R.K. Za vse, razen KVER, proizvajalec navaja, da se dobro topijo v 96-odstotnem etanolu, medtem ko se KVER dobro topi v 99-odstotnem metanolu.

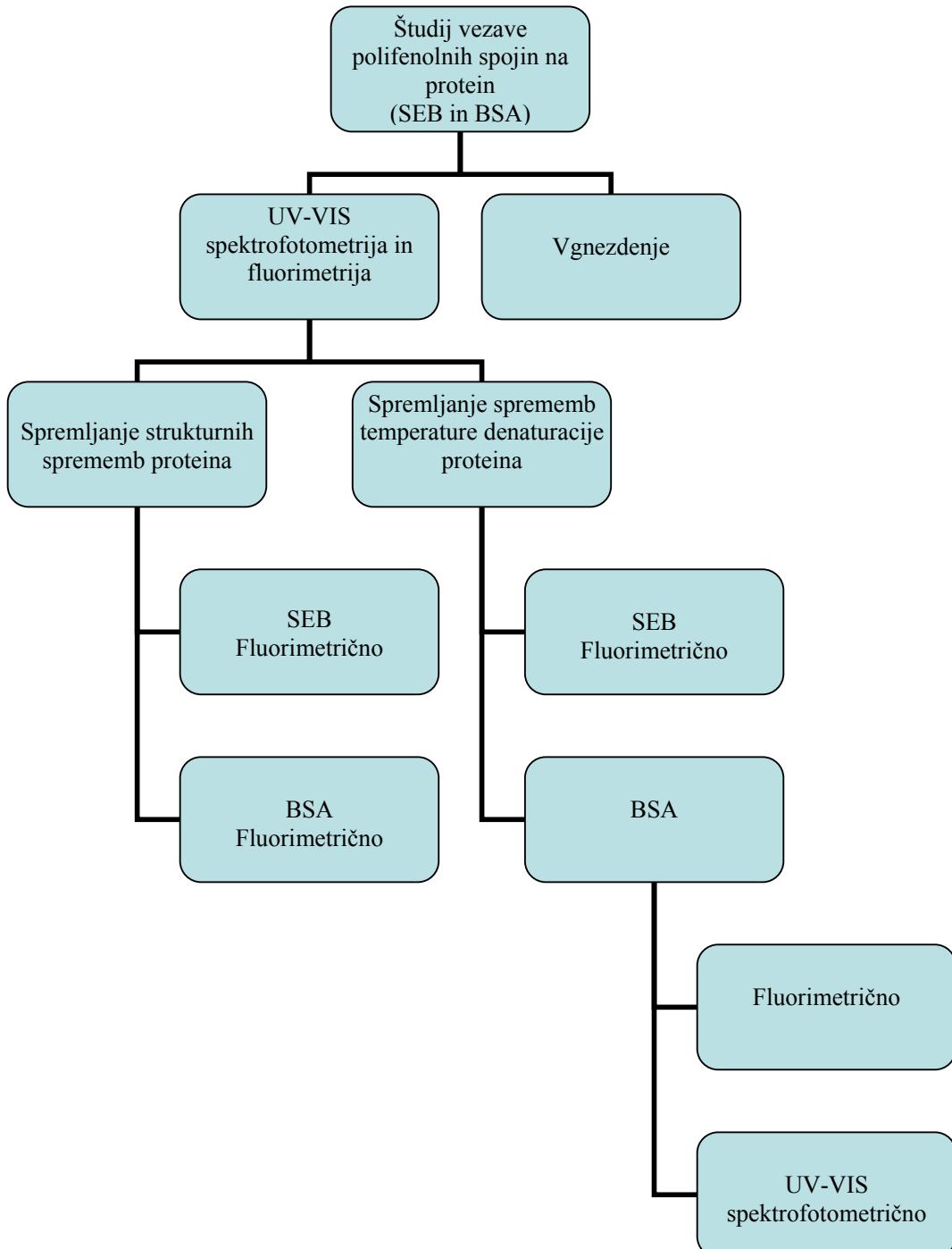
Za pripravo osnovne 1 mM raztopine polifenolne spojine smo na tehtnici (AT 201 METTLER TOLEDO) zatehtali 1 mg polifenolne spojine ter kvantitativno prenesli v plastično centrifugirko. Na podlagi znanih molskih mas polifenolnih spojin in zatehte smo po enačbi 3 preračunali, kolikšen volumen topila (etanola ali metanola) moramo dodati, da je končna koncentracija raztopine enaka 1 mM.

Tako pripravljene raztopine smo hranili na temnem v hladilniku pri + 4°C največ dva tedna, saj v primeru daljšega shranjevanja aktivnost polifenolnih spojin pada, kar se vidi z nižanjem karakterističnih vrhov iz absorpcijskih spektrov, ki smo jih posneli.

Iz tako pripravljenih osnovnih raztopin polifenolnih spojin smo si pripravljali 0,1 mM raztopine za potrebe eksperimentov. Za pripravo 1 ml 0,1 mM raztopine polifenolne spojine smo uporabili en del 1 mM osnovne raztopine polifenolne spojine ter devet delov 20 mM HEPES pufra s pH = 7,5.

3.2 METODE

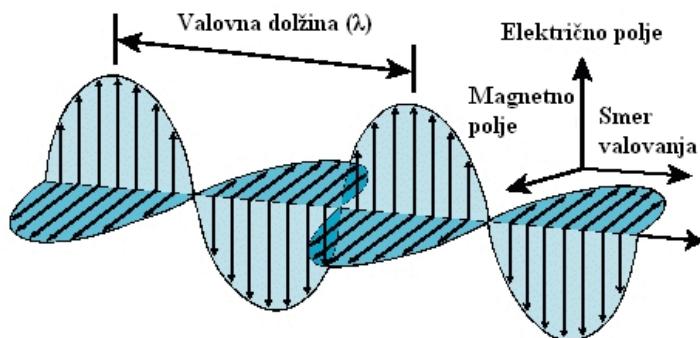
Shema (Slika 9) prikazuje potek dela, ki smo ga opravili tekom diplomskega dela.



Slika 9: Shema poteka dela

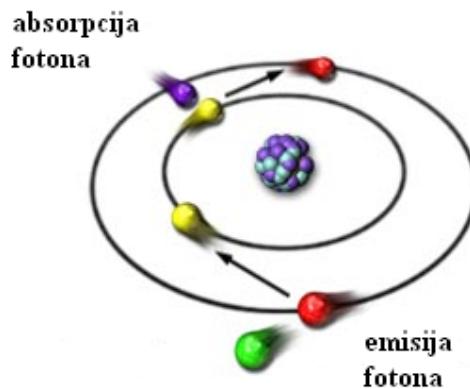
3.2.1 UV-VIS spektrofotometrija in fluorimetrija

Svetloba je elektromagnetno valovanje (EMV) in je sestavljena iz električne in magnetne komponente, katerih vektorja jakosti polja nihata pravokotno drug na drugega. Najmanjša razdalja med točkama v potujočem valovanju imenujemo valovna dolžina, ki se jo označuje z grško črko lambda (λ). Po zakonitostih fizike ima valovanje s krajšo valovno dolžino višjo energijo in obratno (Skoog, 1996).



Slika 10: Elektromagnetno valovanje (Farlex Inc., 2007)

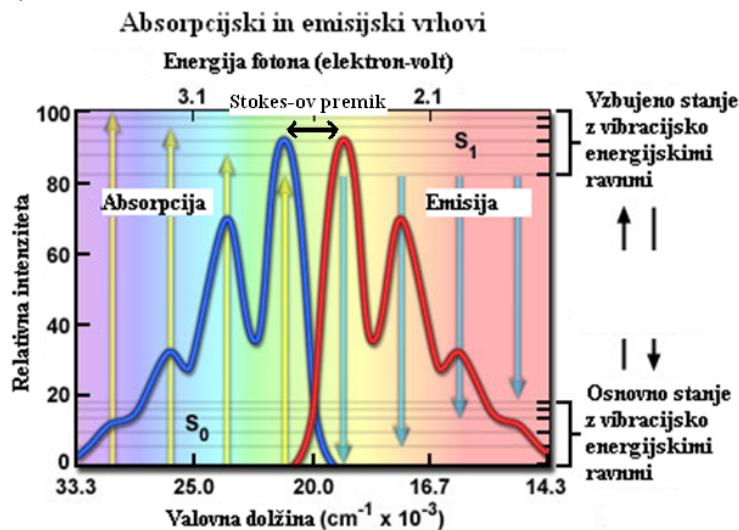
Po kvantni teoriji ima vsaka snov (molekule, atomi) določen niz energijskih nivojev. Ko obsevamo molekulo z ultravijolično ali vidno svetlobo (UV-VIS), lahko pride do absorpcije fotona, pri čemer elektron preskoči na višji energijski nivo. Vzbujen elektron se ponavadi takoj vrne nazaj v osnovni energijski nivo, pri čemer odda energijo, kar imenujemo relaksacijski proces.



Slika 11: Shematski prikaz relaksacijskega procesa (absorpcije in emisije fotona) (Herman in sod., 2005)

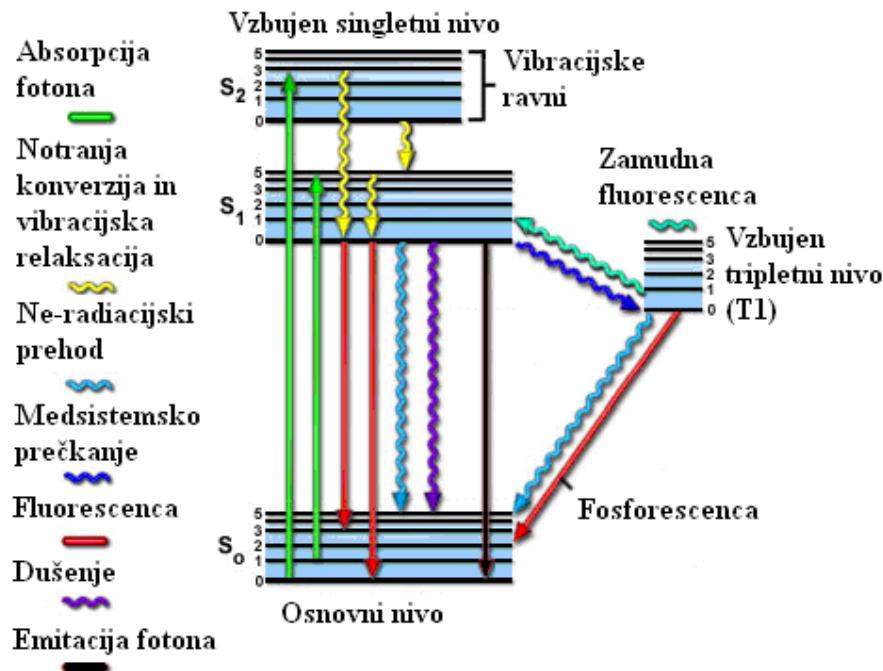
Medsebojno delovanje elektromagnetnega valovanja in snovi je lahko različno. Če pri tem snov (atom, molekula) sprejme energijo, imenujemo ta pojav absorpcija, ki ga spremljamo s spektrofotometrom in kot rezultat dobimo zvezni absorpcijski spekter (Skoog, 1996).

Lahko pa se zgodi, da vzbujen elektron med relaksacijskim procesom del energije odda v obliki svetlobe in del v obliki toplote ali kemijskega dela, kar posledično pomeni, da ima oddana svetloba daljšo valovno dolžino oz. nižjo energijo kot absorbirana. V tem primeru govorimo o fizikalnem pojavu – fluorescenci. Razliko med absorbirano in oddano valovno dolžino opisujemo s Stokesovim premikom (Slika 12), pri čemer pride do premika maksimuma valovne dolžine absorpcijskega in emisijskega spektra. Prehajanje elektronov iz vzbujenega v osnovno stanje opisujemo z razpolovnim časom, ki za fluorescenco znaša okrog 10 ns. Razpolovni čas je čas, v katerem se polovica vzbujenih molekul s fluorescenco vrne nazaj v osnovno stanje (Nelson in Cox, 2005; Herman in sod., 2005; Lakowicz, 2006).



Slika 12: Absorpcijski vzbujevalni (ekscitacijski) in emisijski (fluorescenčni) spekter – Stokes-ov premik (Herman in sod., 2005).

Absorpcijski spektri predstavljajo zvezo med absorpcijo in uporabljenou valovno dolžino, med tem ko emisijski spektri predstavljajo zvezo med emisijo in uporabljenou valovno dolžino. Za absorpcijo je značilen absorpcijski spekter, za fluorescenco pa fluorescenčni spekter, ki pa je zrcalna slika absorpcijskega spektra (Slika 12) (Herman in sod., 2005).



Slika 13: Prirejen Jabloński energijski diagram prikazuje procese od absorpcije do emisije oz. emitacije svetlobe (Herman in sod., 2005; Nelson in Cox, 2000, Skoog 1996).

3.2.1.1 Osnove UV-VIS spektrofotometrije

UV-VIS spektrofotometrija ima široko uporabnost v kemiji in biokemiji. Uporablja se za detekcijo in identifikacijo molekul ter za določitev njihove koncentracije v raztopini z pomočjo merjenjem absorbance vzorca proti »slepi probi«. Kadar imamo linearno zvezo med absorbanco pri določeni valovni dolžini in koncentracijo, lahko zapišemo Beer-Lambertov zakon:

$$\log \frac{I_0}{I} = A = \varepsilon \times c \times l \quad \dots (7)$$

kjer je I_0 intenziteta prepuščene svetlobe skozi kiveto, napolnjena s topilom (slepa proba); I je intenziteta prepuščene svetlobe skozi kiveto, napolnjena z raztopino; A je absorbanca in predstavlja logaritmični zapis $\log I_0/I$, ε [$\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$], ki je molarni absorpcijski koeficient dane spojine v ustreznom topilu pri dani valovni dolžini (λ) in temperaturi (T); c [mol/l] je koncentracija raztopine in l [cm] je dolžina optične poti svetlobnega žarka. (Nelson in Cox, 2000, Skoog 1996).

S pomočjo UV-VIS spektrofotometrije smo proučevali vezavo ligandov na SEB in BSA. Dodani ligand spremeni spekter, poleg tega pa lahko vpliva tudi na termično stabilnost proteina, kar proučujemo z merjenjem absorbance kot funkcijo temperature (UV-talilni poskus). Poleg termične stabilnosti proteinov pa smo spremljali tudi reverzibilnost teh.

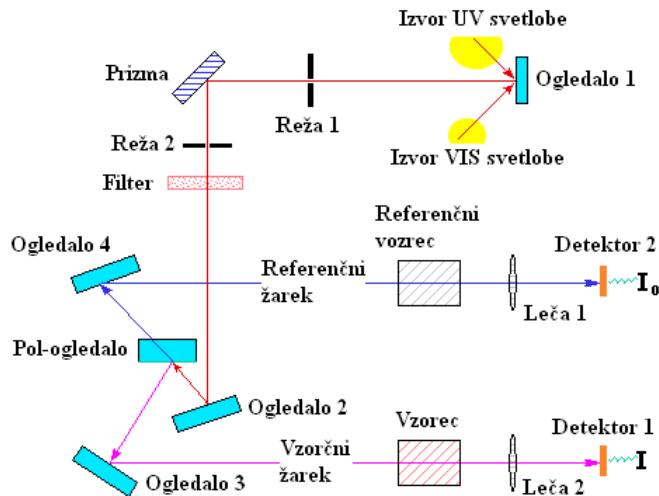
3.2.1.1.1 Opis UV-VIS spektrofotometra

Poznamo več različnih izvedb spektrofotometrov. Vsi so sestavljeni iz treh glavnih delov, in sicer iz izvora EMV, prostora za vzorec in detektorja. Osnovna shema aparature spektrofotometra je prikazana na sliki 21.

V UV-VIS spektrofotometriji se uporablja kot vir svetlobe devterijevo žarnico za zagotavljanje UV spektra svetlobe (UV) in volframovo žarnico za zagotavljanje vidnega spektra svetlobe (VIS).

Svetloba nato nadaljuje pot do monokromatorja (prizme) z ustrezeno nastavljeno valovno dolžino. Snop žarkov z ustrezeno valovno dolžino nadaljuje pot do kivete z vzorcem in če uporabljamo dvožarkovni spektrofotometer še do referenčnega vzorca.

Od tu naprej pa prepuščena svetloba nadaljuje pot do detektorja oz. fotopomnoževalke, ki nam signal pretvori v električno napetost, ki jo lahko računalnik pretvori v digitalno obliko, in nam tako izriše absorpcijski spekter v odvisnosti od valovne dolžine.



Slika 14: Shematski prikaz UV-VIS spektrofotometra (Spectro Analysis Co., 2010)

3.2.1.2 Osnove fluorimetrije

Fluorimetrija se veliko uporablja tako v znanstveno-raziskovalne namene kot za izvajanje rutinskih analiz. Odlikuje jo zelo visoka zanesljivost, natančnost in ponovljivost (Oravcova' in sod., 1996; Epps in sod., 1999), poleg tega pa lahko merimo zelo majhno količino snovi (Turk in sod., 1997) in ne potrebujemo velikih volumnov vzorca. Fluorimetrija je od spektroskopskih metod najobčutljivejša metoda, saj nam omogoča merjenje intenzitete fluorescence tudi v območju 10^{-7} M (Matías in Ana, 2002).

Med intenziteto fluorescence (F) in koncentracijo fluorofora [C] obstaja linearна odvisnost (enačba št. 8), ki velja samo za razredčene vzorce fluorofora (absorbanca pri valovni dolžini vzbujanja ne sme biti večja od 0,05).

$$F = C \times I_0 \times \varepsilon \times l \times \Phi \times Z \quad \dots (8)$$

kjer je I_0 – intenziteta vzbujanja, ε – molarni absorpcijski koeficient fluorofora, l – dolžina optične poti, ϕ – kvantni izkoristek fluorescence in Z – faktor fluorimetra (Feldman in sod., 1975; Matías in Ana, 2002).

Kvantni izkoristek je definiran kot:

$$\Phi = \frac{\text{število izsevanih fotonov}}{\text{število absorbiranih fotonov}} \quad \dots (9)$$

in ima za značljne fluorescenčne vzorce vrednosti med 0,01 in 1,00.

Ko govorimo o intenziteti fluorescence, se moramo zavedati, da je ta odvisna od mnogih dejavnikov, predvsem pa od hitrosti konkurenčnih pojavov, ki se odvijajo na nivoju relaksacijske poti (neradiacijski prehodi, dušenje, medsistemsko prečkanja) (Herman in sod., 2005).

V mediju, ki ga obsevamo z UV-VIS svetlobo, se nahajajo tako molekule, ki imajo sposobnost fluoresciranja (fluoroforji), kot molekule in ioni, ki znižujejo intenzitetu emisije (kromoforji). Kromoforji ponavadi povzročajo dušenje (ang. quenching). Fluoroforje delimo na interne in eksterne.

Interni fluoroforji imajo sposobnost lastne fluorescence in jih najdemo v naravi (aromatske aminokisline, FAD, NAD, FMN, nevrotransmiterji in porfirini). Najbolj znani fluoroforji so proteini, ki imajo v svoji strukturi vgrajene aromatske aminokisline (Trp, Tyr in Phe) in katere smo med proučevanjem SEB in BSA tudi izkoriščali. Slaba lastnost internih fluoroforov je, da pričnejo po več ciklih vzburjenja razpadati, s čimer spremenijo koncentracijo snovi v vzorcu.

Eksterne fluoroforji so lahko sintetičnega izvora (sintetične barve) ali pa modificirane biomolekule. S pridom se uporablajo za spremljanje intenzitete fluorescence v vzorcih, ki nimajo svojih internih fluoroforjev. Odlikovali naj bi se po stabilnosti, kazali naj bi veliko intenziteto in naj ne bi vplivali na molekulo ali proces, ki ga preiskujemo.

Za vse spojine, ki imajo možnost fluoresciranja, tako interne kot eksterne, pa velja, da v različnih pogojih različno fluorescirajo (Herman in sod., 2005).

3.2.1.2.1 Dušenje (ang. Quenching)

Intenziteta fluorescence se lahko spreminja že zaradi nihanja temperature, saj višja temperatura povzroči hitrejše gibanje molekul – več medmolekulskega trkov, kar privede do sproščanja energije v obliki topote in posledično do nižje intenzitete fluorescence. Tudi viskoznost vpliva na intenziteto fluorescence, in sicer večja, kot je viskoznost, počasneje se molekule topila gibljejo, kar povzroča manj medmolekulskega trkov in s tem večjo intenziteto fluorescence. Na intenziteto fluorescence vpliva tudi pH, vrsta topila, koncentracija raztopljenega kisika, koncentracija denaturantov, procesa oligomerizacije in koncentracija molekul v vzorcu ter sama struktura molekule (konjugiranost, funkcionalne skupine, togost ipd.) (Lakowicz, 2006).

Poznamo več mehanizmov dušenja. Najpogostejša sta:

- dinamično dušenje in
- statično dušenje.

Pri našem delu smo se srečali z dinamičnim dušenjem. Dinamično dušenje zmanjša intenziteto fluorescence z zmanjšanjem molekul v vzbujenem stanju vzporedno z ostalimi tovrstnimi procesi opisanimi v Jabłońskem diagramu (Slika 13). To je proces, ko se čas fluoroforne molekule v vzbujenem stanju skrajša na manj, kot je to tipično za vzbujeno fluoroforno molekulo oz. fluorescenco, in sicer 10 ns.

Odvisnost intenzitete fluorescence proteina v prisotnosti dušilca (F) od koncentracije dušilca [Q] podaja Stern-Volmerjeva zveza:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV} \times [Q] \quad \dots (10)$$

kjer je K_{SV} Stern-Volmerjeva konstanta (M^{-1}) in F_0 intenziteta fluorescence proteina brez dodanega dušilca.

Iz K_{SV} lahko izračunamo tudi biomolekulsko konstanto dušenja (k_q) po enačbi 11:

$$K_{SV} = k_q \times \tau_0 \quad \dots (11)$$

kjer je τ_0 življenska doba fluorofora v odsotnosti dušilca izražena v sekundah. k_q se podaja v $M^{-1}s^{-1}$ (Albani, 2007).

Na spremembo intenzitete fluorescence ne vplivajo samo dušilci kot taki, ampak tudi npr. dodatek liganda, ki se uporablja pri proučevanju vezave liganda na določen tarčni protein ali substrata na encim. V primeru, da imamo več različnih ligandov/substratov, lahko s pomočjo fluorimetrije točno določimo, kateri ligand/substrat se je vezal na protein/encim (Vesnaver, 1978).

Poleg tega lahko z intenziteto fluorescence proučujemo tudi konformacijske lastnosti spojin, stabilnosti liposomov in nanodelcev, imunoloških reakcij in vezave substratov na encime (Baumgartner, 1995; Schmid, 1997; Skoog in sod., 1996; Tompa, 2010).

Tekom našega eksperimentalnega dela smo se posluževali ravno proučevanju vezave različnih ligandov (polifenolnih spojin) na tarčni protein (SEB in BSA) s tem, da smo spremljali intenziteto fluorescence.

3.2.1.2.2 Vezava liganda na receptorsko mesto na proteinu

BSA protein ima v naravi (*in vivo*) transportno funkcijo, saj oskrbuje različna tkiva z različnimi metaboliti. Proučevanje vezave metabolitov (ligandov) na BSA protein nam pove veliko o funkciji in vlogi tega. Glede na to, da je BSA protein že relativno dobro raziskan protein, smo ga mi uporabili za vzporedno testiranje vezave ligandov (polifenolnih spojin) na SEB protein in ugotavljeni mehanizme vezave.

Pričakovali smo, da bomo proteinu (SEB ali BSA) spremenili oz. zmanjšali lastno intenziteto fluorescence z dodatkom liganda (polifenolne spojine) ter s tem ugotavljali ali se ligand (L) veže na protein (P) ali ne oz. ali se tvori kompleks protein—ligand (PL) ali ne. Enačba 12 opisuje kemijsko reakcijo proteina (SEB ali BSA) in ustreznega liganda (Matías in Ana, 2002):



Ravnotežno konstanto vezanja K_b lahko izrazimo kot:

$$K_b = \frac{[PL]}{[L]_f [P]_f} \quad \dots (12)$$

oz. konstanto disociacije

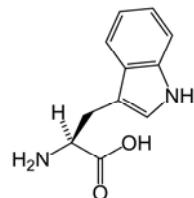
$$K_d = \frac{[L]_f [P]_f}{[LP]} \quad \dots (13)$$

kjer je $[L]_f$ koncentracija prostega liganda, $[P]_f$ koncentracija prostega proteina v raztopini in $[LP]$ koncentracija kompleksa.

V primeru interakcije med polifenolno spojino in proteinom pride do strukturnih sprememb na proteinu. Če pride do spremembe strukture v okolini fluoroforjev to zaznamo v spremembni intenzitete fluorescence.

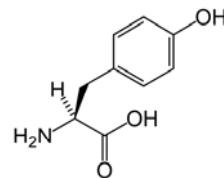
Aminokisline, zlasti aromatske aminokisline (Trp, Try in Phe) in aminokislina cistein (Cys), so zelo uporabne za študij proteinov tako z UV-VIS spektroskopijo kot s fluorimetrijo (Albani, 2007). Obe spektroskopski metodi smo uporabljali pri proučevanju vezave ligandov (polifenolnih spojin) na tarčni protein (SEB in BSA). Tako za UV-VIS spektroskopijo kot za fluorimetrijo velja, da na intenziteto vplivajo temperatura, pH, prisotnost encimov, ionska jakost, dodan denaturant in drugi dejavniki oz. dušilci (Lakowicz, 2006).

Absorpcija triptofana (Trp) se pojavi v območju med 240 in 290 nm. V območju 292 in 294 nm se tvorijo značilni vrhovi v spektrih Trp. V območju med 285 in 288 nm pa si absorpcijski vrh lastita tako Trp kot Tyr. Trp ima najmočnejšo lastno fluorescenco. Absorpcijski maksimum ima pri 280 nm, emisijski maksimum pa pri 348 nm. Intenziteta fluorescence Trp je zelo odvisna od okolja, v katerem se nahaja, saj je znano, da intenziteta fluorescence Trp v proteinih dušijo sosednje protonirane skupine aminokislinskih ostankov Asp in Glu, poleg tega pa na intenziteto fluorescence vpliva tudi polarnost oz. nepolarnost okolja. V nepolarnem okolju (v notranjosti nativnega proteina) je intenziteta fluorescence močnejša, vrh (maksimum) emisijskega spektra pa je pomaknjen k nižjim valovnim dolžinam. Če pa se Trp nahaja v polarnem okolju, kjer ga obdajajo molekule vode, ima šibkejšo intenziteto in vrh emisijskega spektra je pomaknjen k daljšim valovnim dolžinam (Lakowicz, 2006).



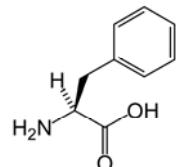
Slika 15: Triptofan (Trp)

Absorpcija tirozina (Tyr) se pojavi prav tako kot pri Trp v območju med 240 in 290 nm. Vrhovi Tyr se prekrivajo z vrhovi Trp v območju med 285 in 288 nm. Za Tyr je značilen absorpcijski maksimum pri 274 nm in emisijski maksimum pri 303 nm. Nima močne fluorescence, a vseeno prispeva svoj delež k fluorescenci proteina, saj je ponavadi v proteinu zastopan v večjem številu. Tyr intenziteta florescencije je zelo občutljiva na sosednje Trp, ki fluorescenco dušijo (Cantor, 2006; Lakowicz, 2006).



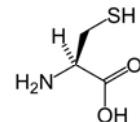
Slika 16: Tirozin (Tyr)

Absorpcija fenilanalina (Phe) se pojavi okrog 257 nm, med tem ko ima značilne vrhove v spektru pod 250 nm. Najšibkeje fluorescira fenilanalin (Phe), saj vsebuje poleg benzenovega obroča še metilirano skupino. Absorpcijski maksimum ima pri 257 nm, emisijski maksimum pa pri 282 nm. Zaradi tako nizke fluorescence Phe se ta meri samo v primerih, ko v proteinu nista prisotna Trp in Tyr. Phe molekula je zaradi svoje šibke fluorescence zanimiva za študiranje, kako struktura molekule vpliva na fluorescenco. Če bi npr. dodali v Phe molekulo hidroksilno skupino, bi se intenziteta fluorescence povečala za 20-krat, če pa bi dodali indolno skupino, pa bi se intenziteta povečala za 200-krat (Mocz, 1999; Lakowicz, 2006).

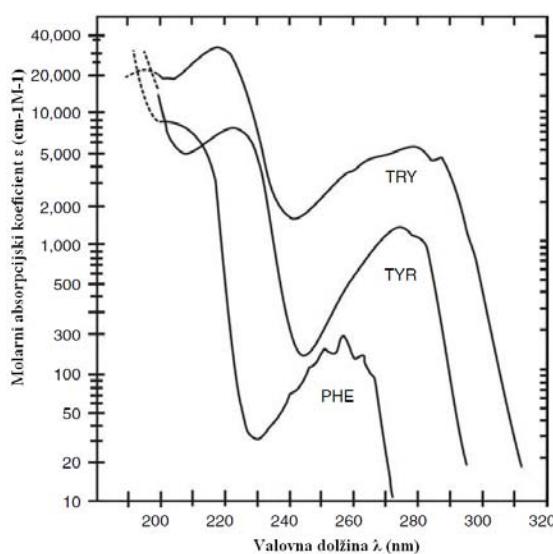


Slika 17: Fenilanalin (Phe)

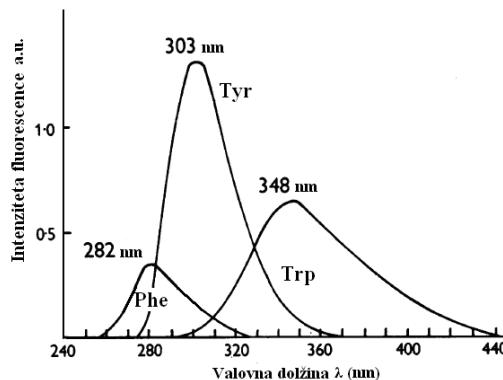
Absorpcija peptidne in disulfidne vezi, ki nastane med dvema molekulama cisteina (Cys), se pojavi v območju med 190 in 230 nm in se lahko spremeni za faktor dva, če pride do sprememb v konformaciji proteina. Večina raziskovalcev meni, da so spremembe v absorpciji pri 230 nm proporcionalne spremembam absorpcije pri 280 nm, kjer peptidna vez ne absorbira (Poklar, 1994). Disulfidna vez ima tudi sposobnost fluoresciranja (Lakowicz, 2006).



Slika 18: Cistein (Cys)



Slika 19: Absorpcijski spekter aromatskih aminokislinskih (Trp, Tyr in Phe) (Albani, 2007)

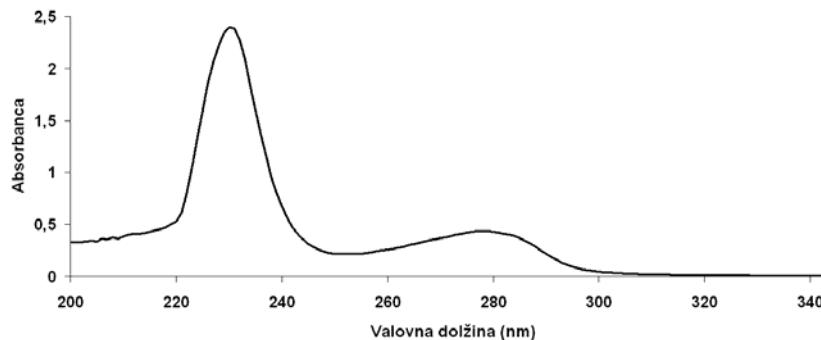


Slika 20: Emisijski fluorescenčni spektri aromatskih aminokislin (Trp, Tyr in Phe) (Teale in Weber, 1957)

Preglednica 8: Absorpcijske in fluorescenčne lastnosti aromatskih aminokislin (Trp, Tyr in Phe) (Cantor, 2006).

Aromatska aminokislina	Absorpcija λ_{\max} (nm)	Fluorescenza λ_{\max} (nm)
Trp	280	348
Tyr	274	303
Phe	257	282

V absorpcijskem spektru BSA imamo dva vrhova: prvega pri 230 nm in drugega pri 280 nm (Slika 21). Tovrstni spekter je značilen za vse proteine. Vrh pri 280 nm je značilen za prisotne aromatske aminokisline v proteinu (Trp, Tyr in Phe) (Albani, 2007). Molarni absorpcijski koeficinet za proteina se ponavadi poišče pri 280 nm.



Slika 21: Absorpcijski spekter BSA raztopine z molarno koncentracijo $1,25 \times 10^{-5}$ M oz. z masno koncentracijo 0,8 mg/ml v 20 mM HEPES pufru s pH 7,5

Preglednica 9: Vsebnost aromatskih aminokislin v SEB in BSA (Gasteiger in sod., 2003)

Raziskovan protein	Sekvenca proteina (št. aminok. ost.)	Absorpcijski vrh (nm)	Število aromatskih aminokislinskih ostankov v strukturi proteina		
SEB	239	280	Trp	Tyr	Phe
BSA	582	280	1	21	12
			2	20	27

Na podlagi znanega števila Trp in Tyr, ki se nahajajo v proteinu, in na podlagi števila cistinov (Cys-Cys) oz. številu disulfidnih vezi (imajo sposobnost fluoresciranja) v proteinu, ki nastanejo zaradi povezave dveh aminokislinskih ostankov cisteina (Cys), nam ExPASy Proteomic Server s funkcijo ProtParam izračuna molarni absorpcijski koeficient (Gasteiger in sod., 2003).

Lahko si molarni absorpcijski koeficient izračunamo tudi sami po enačbi 14, če poleg števila Trp in Tyr za SEB in BSA poznamo tudi število disulfidnih vezi. SEB ima eno disulfidno vez, BSA pa sedemnajst.

$$\varepsilon_{280\text{nm}} = \text{število}(\text{Tyr}) \times 1490 + \text{število}(\text{Trp}) \times 5500 + \text{število}(\text{Cys}) \times 125 \quad \dots (14)$$

kjer je število (Tyr, Trp in Cys) število aminokislin v sekvenci našega proteina, med tem ko so številčne vrednosti za posamezno aromatsko aminokislino vrednosti vzbujanja za posamezno nativno aminokislino, pomerjeno v vodi pri 280 nm (Gill in von Hippel, 1989).

Iz tega sledi, da molarni absorpcijski koeficient za SEB znaša $\varepsilon_{280\text{nm}} = 36915 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ in BSA $\varepsilon_{280\text{nm}} = 42925 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$.

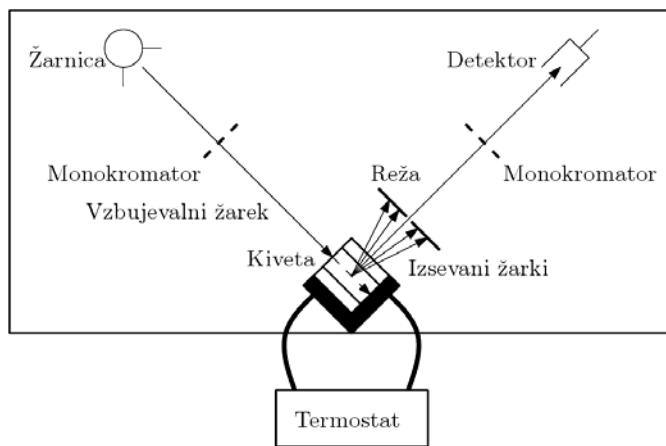
Fluorescenčne spektre, kot jih prikazuje slika 19, posnamemo s fluorimetrom.

3.2.1.2.3 Opis fluorimetra

Kot vir svetlobe je običajno uporabljen visokotlačna ksenonova žarnica (Xe), lahko pa se uporabljajo tudi živosrebrne žarnice in laserji. Xe žarnica daje zvezni spekter v območju valovnih dolžin med 270–700 nm (Lakowicz, 2006).

Funkcija monokromatorja za vzbujevalno svetlobo je, da prepušča svetlobo tiste valovne dolžine, s katero želimo vzbujati molekule vzorca v raztopini. Snop svetlobe iz monokromatorja za vzbujevalno svetlobo nato nadaljuje pot do kivete z raztopino. Vzorec del svetlobe absorbira. Fluorofori del absorbirane svetlobe emitirajo v obliki fluorescence. Emitirana svetloba potuje naprej skozi režo na monokromator in naprej na detektor oz. fotopomnoževalko, ki se običajno nahaja pod kotom 90° , kar še zmanjša morebitne motnje zaradi svetlobe drugih virov. Ravno ta lastnost fluorimetriji omogoča tudi do nekaj tisočkrat boljšo mejo detekcije, kot jo imajo spektrofotometri, in je tako metoda zelo uporabna pri delu z vzorci z nizkimi koncentracijami in majhnimi volumni vzorca (Lakowicz, 2006).

Z fluorimetrom merimo intenziteto fluorescenčne svetlobe v odvisnosti od njene valovne dolžine, nastavljene z emisijskim monokromatorjem. Tako posneti spektri se imenujejo emisijski fluorescenčni spektri (Vesnaver, 1978).



Slika 22: Shema fluorimetra (Poklar Ulrich, 2010)

3.2.2 Določitev termodinamskih parametrov termične denaturacije proteinov na osnovi enostopenjskega modela

Proteini so sestavljeni iz zaporedja aminokislin, ki so med seboj povezane s kovalentnimi, peptidnimi vezmi. Ločimo štiri tipe proteinske strukture:

- Primarna struktura, ki označuje zaporedje aminokislinskih ostankov v polimerni verigi, ki so povezani med seboj s kovalentnimi vezmi.
- Sekundarna struktura, za katero so značilne pravilno in ponavljajoče se razporeditve polipeptidne verige, kot sta α -vijačnica in β -struktura, in so povezani z intramolekularnimi interakcijami, ki so prav tako prisotne pri terciarni strukturi.
- Tertiarna struktura, ki predstavlja tridimensionalno strukturo proteina.
- Kvartarna struktura, ki označuje povezavo dveh ali več polipeptidnih verig v bolj kompleksnejše enote, ki so med seboj povezane z intermolekularnimi interakcijami.

Proteini se v fizioloških razmerah (določena temperatura, pH, ionska jakost, dielektrična konstanta) nahajajo v specifični tridimensionalni nativni obliki. Če protein izpostavimo okolju s spremenjenimi prej omenjenimi parametri, pa lahko pride do razvijanja ali denaturacije tega. V našem primeru smo se posluževali denaturacije proteina s povišanjem temperature.

Pri procesu denaturacije pride do porušitve sekundarne, terciarne in kvartarne strukture, saj se porušijo nekovalentne vezi, med tem ko se primarna struktura obori, saj ne pride do cepitve peptidnih vezi (Poklar, 1994). Temperaturo, pri kateri je delež denaturiranih molekul enak deležu molekul v nativnem stanju, imenujemo temperatura denaturacije (Td).

Proces denaturacije smo spremljali z UV-VIS spektrofotometrijo in fluorimetrijo. Denaturacijske krivulje, ki so ponavadi sigmoidne oblike, prikazujejo temperaturno odvisnost absorbance raztopine proteina (UV-VIS spektrofotometrija) ali odvisnost intenzitete fluorescence proteina (fluorimetrija). T_d smo določali na dva načina, in sicer grafično, kjer smo iz UV-termograma oz. iz fluorescenčnega termograma določili polovično razdaljo med platojem termograma v obliki sigmoidne krivulje in drugim načinom, kjer smo uporabili prvi odvod absorbance po temperaturi.

Pri določanju termodinamskih sprememb (standardne molarne entalpije) v posameznih modelih denaturacije je osnovana na termodinamski analizi denaturacijskega procesa. S predpostavko, da je proteinska denaturacija ravnotežni prehod med dvema makroskopskima stanjem, nativnim (N) in denaturiranim (D). Na podlagi enostopenjskega modela za reverzibilen prehod lahko zapišemo ravnotežje:



kjer je $K^0(T)$ ravnotežna konstanta denaturacije in je za dani model definirana kot

$$K^0(T) = \frac{f_D}{f_N} = \frac{f_D}{1 - f_D} \quad \dots (17)$$

kjer je f_D delež proteina v denaturirani obliki in f_N delež proteina v nativni obliki.

Konstanta K^0 je povezana s standardno prosto entalpijo denaturacije (ΔG°) prek enačbe:

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K^0 \quad \dots (18)$$

Iz enačbe št. 17 in enačbe št. 18 izrazimo delež denaturirane oblike proteina f_D :

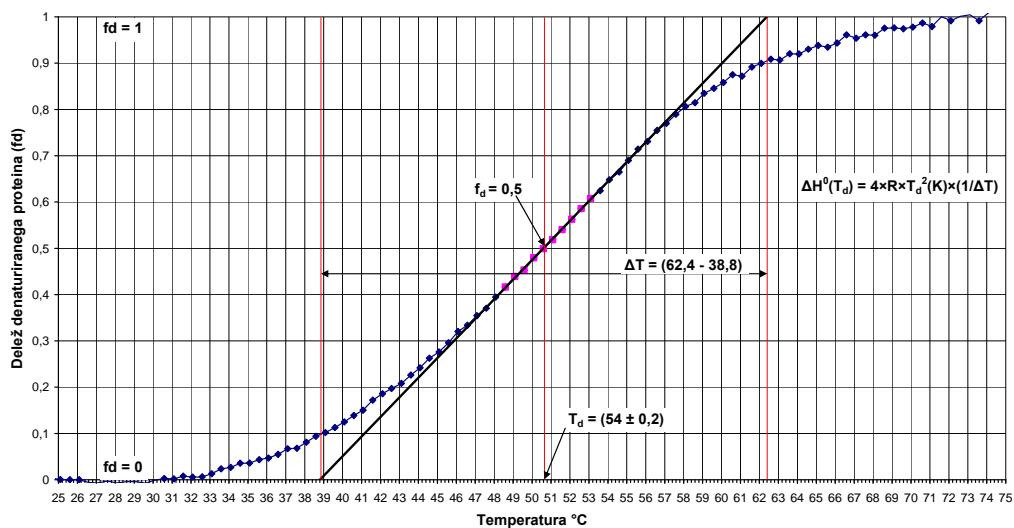
$$\Delta G^\circ = -RT \ln \frac{f_D}{1-f_D} \quad \dots (19)$$

f_D pri določenih pogojih lahko izračunamo iz spektroskopskih podatkov.

Termično denaturacijo proteina pri dani temperaturi lahko izrazimo tudi kot $f_D(T)$:

$$f_D(T) = \frac{I(T) - I_N(T)}{I_D(T) - I_N(T)} \quad \dots (20)$$

kjer $I(T)$ merjen signal (absorbanca ali intenziteta fluorescence) pri dani temperaturi (T), $I_N(T)$ in $I_D(T)$ pa sta vrednosti signala (absorbance ali intenzite fluorescence) nativnega in denaturiranega stanja pri isti temperaturi. Vrednosti $I_N(T)$ in $I_D(T)$ lahko dobimo pri katerikoli temperaturi v prehodnem območju z linearno ekstrapolacijo dela sigmoidne krivulje, ki ustreza nativnemu oz. denaturiranemu stanju (Poklar in Vesnauer, 2000).



Slika 23: Primer denaturacijske krivulje

Iz denaturacijske krivulje odčitamo temperaturo denaturacije T_d (K) pri $f_D = 0,5$ in ΔT (K). Iz dobljenih podatkov lahko izračunamo termodinamske vrednosti $\Delta H^\circ(T_d)$ po naslednji enačbi:

$$\Delta H^\circ(T_d) = 4RTd^2 \times \frac{1}{\Delta T} \quad \dots (21)$$

kjer R ($J\text{mol}^{-1}\text{K}^{-1}$) predstavlja splošno plinsko konstanto, T_d (K) temperaturo denaturacije in ΔT (K) razliko v temperaturi med denaturiranim in nativnim proteinom.

3.2.3 Eksperimentalni del

3.2.3.1 Titracija SEB in BSA proteina z nekaterimi polifenolnimi spojinami

Meritve smo opravili pri 25 °C v kvarčni kiveti z dolžino optične poti 10 mm. V kiveto smo dodali 500 µl raztopine proteina in nato začeli dodajati po 2 µl raztopine polifenolov. Začetna koncentracija proteina SEB v vzorcu je bila $0,012 \pm 0,001$ mg/ml in začetna koncentracija BSA $0,082 \pm 0,001$ mg/ml. Oba proteina sta bila pripravljena v 20 mM HEPES pufru s pH=7,5. Postopoma smo dodajali ustrezni volumen polifenolne raztopine s koncentracijo 0,1 mM, dokler nismo dosegli molskega razmerja 1 : 3 med proteinom in polifenolno spojino. Po vsakem dodatku raztopine polifenola je bil posnet fluorescenčni spekter.

Emisijski spektri so bili posneti z instrumentom Carry Eclipse Fluorimeter in s programom Scan ver. 1.1(132).

3.2.3.1.1 Parametri merjenja fluorescence raztopine SEB proteina

Za titracijo SEB proteina smo uporabljali naslednje raztopine polifenolov: EGC, EGCG, KAM in KAM-G.

Titracijo SEB proteina smo izvedli pri dveh različnih valovnih dolžinah vzbujanja, saj smo spremljali fluorescenco dveh aromatskih aminokislinskih ostankov; Tyr in Trp. Tyr smo vzbujali pri 275 nm, med tem ko smo Trp vzbujali pri 295 nm. Emisijski spekter smo posneli med 290 in 600 nm za Tyr oz. med 310 in 600 nm za Trp. Širina rez monokromatorja za vzbujevalno in izsevano svetlobo je bila nastavljena na 5 nm, občutljivost fotopomnoževalke je bila 600 V in hitrost snemanja je bila nastavljena na 120 nm/min. Spektre smo korigirali s korekcijskim spektrom fotopomnoževalke. Na 12 min smo vzorcu dodali ustrezni volumen polifenolne raztopine s koncentracijo 0,025 mM, dokler nismo dosegli molskega razmerja 1:3 med SEB proteinom in polifenolno spojino.

Zaradi dodajanja raztopine polifenolnih spojin je prihajalo do razredčevanja SEB proteina v kiveti. Tako smo od posnetih emisijskih spektrov SEB proteina odšteli spektre topila in jih korigirali z razredčitvenim faktorjem tako kot to opisuje spodnja enačba:

$$F_k = \left(\frac{V_k}{V_z} \right) \times F_z \quad \dots (22)$$

kjer F_z predstavlja izmerjeno intenziteto fluorescence, F_k korigirano intenziteto fluorescence, V_z (ml) začetni volumen proteina v kiveti in V_k (ml) končni volumen raztopine v kiveti po dodanem volumnu polifenolne raztopine.

3.2.3.1.2 Parametri merjenja fluorescence raztopine BSA proteina

Za titracijo BSA proteina smo uporabljali naslednje polifenole: EGCG, EGC, KAM-G, KAM, ECG, KAV, KVER, NAR, p-KUM in R.K.

Titracijo raztopine BSA proteina smo izvedli pri valovni dolžini vzbujanja 280 nm. Emisijske spektre smo snemali med 290 in 600 nm. Širina rež monokromatorja za vzbujevalno in izsevano svetlobo je bila nastavljena na 5 nm, občutljivost fotopomnoževalke je bila 600 V in hitrost snemanja 120 nm/min. Spektre smo korigirali s korekcijskimi spektrom fotopomnoževalke. Na 12 min smo vzorcu dodali ustrezен volumen polifenolne raztopine s koncentracijo 0,1 mM.

Od vseh posnetih emisijskih spektrov smo odšeli spekter topila ter jih korigirali s faktorjem razredčitve zaradi dodajanja polifenolne raztopine.

3.2.3.1.3 Obdelava izmerjenih emisijskih spektrov po zaključeni titraciji

Iz korekcijskih spektrov SEB in BSA smo odčitali valovne dolžine in maksimalne intenzitete dobljenega vrha (prvi vrh). Iz teh podatkov smo izrisali tudi graf, ki prikazuje intenziteto fluorescence (a.u.) v odvisnosti od množinskega razmerja fenolne spojine in proteina pri določeni valovni dolžini. Izrisali pa smo tudi Stern-Volmerjev graf v odvisnosti od množinskega razmerja koncentracije dodane fenolne spojine iz katerega smo potem izračunali tudi Stern-Volmerjevo konstanto vezanja (K_{sv}).

3.2.3.2 Določanje temperature denaturacije proteina z UV-VIS spektrofotometrijo in fluorimetrijo

Spremljali smo absorbenco in intenziteto fluorescence proteina v prisotnosti polifenolne raztopine v odvisnosti od temperature. Hitrost segrevanja je bila 1 °C/min v temperaturnem intervalu od 20 °C do 95 °C. Vzorec smo nato ohladili nazaj na 20 °C in ponovno segrevali s hitrostjo 1 °C/min do 95 °C.

Z UV-VIS metodo smo določali temperaturo denaturacije samo BSA proteinu in ne tudi SEB proteinu, saj nismo imeli zadostne količine SEB proteina za analizo.

3.2.3.2.1 Določanje temperature denaturacije BSA proteina z UV-VIS spektrofotometrijo

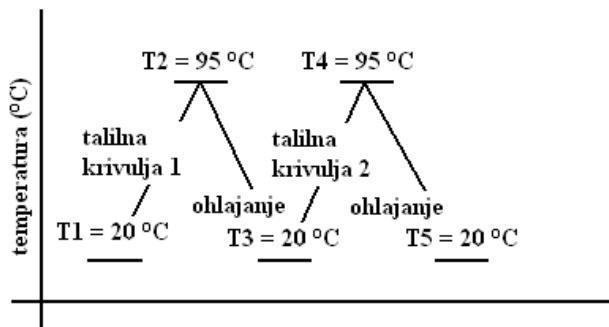
Absorpcijski spektri so bili posneti z UV-VIS spektrofotometrom Cary 100 Bio in s programom Thermal ver. 3.00/182.

Uporabili smo naslednje polifenolne spojine KAM-G, KAM, KAV in p-KUM. Za te spojine smo se odločili zaradi tega, ker smo lahko spremajali prehod nativnega proteina v denaturirano obliko. Vpliv vseh polifenolnih spojin na termično stabilnost BSA smo

spremljali tudi fluorimetrično, saj je fluorimetrija veliko bolj občutljiva metoda od UV-VIS spektrofotometrije.

Začetna koncentracija BSA je bila $0,8 \text{ mg/ml}$ oz. $1,25 \times 10^{-5} \text{ M}$ in molarnost polifenolnih raztopin pa $0,1 \text{ mM}$. Za merjenje smo uporabili $1,4 \text{ ml}$ kvarčno kiveto z dolžino optične poti 10 mm .

Pri spremeljanju termične denaturacije BSA smo snemali tudi absorpcijske spekture pri temperaturah T_1 , T_2 , T_3 , T_4 in T_5 , kot prikazano na sliki 24. Absorpcijske spekture smo posneli v HEPES pufru s $\text{pH} = 7,5$ (kontrolni vzorec), raztopini BSA (s koncentracijo $1,25 \times 10^{-5} \text{ M}$), pripravljenim v HEPES pufru s $\text{pH} = 7,5$ kot tudi BSA proteinu z ustreznim ligandom v molskem razmerju $1 : 1$.



Slika 24: Shematični prikaz temperaturnega režima pri spremeljanju termične denaturacije z UV-VIS spektrofotometrijo in s fluorimetrijo

Termično denaturacijo smo spremljali od T_1 do T_2 in od T_3 do T_4 , tako kot prikazuje slika 24. BSA protein smo vzbujali pri 280 nm . Vsi eksperimenti so bili izvedeni pri molskem razmerju protein : polifenol = $1 : 1$.

Za vsak optično zaznan prehod smo določili temperaturo denaturacije (T_d). Podane vrednosti T_d so povprečje dveh ločenih meritev.

Posnete UV termograme normaliziramo in odčitamo temperaturo denaturacije (T_d) za BSA proteina v odvisnosti od dodane količine polifenolne spojine.

3.2.3.2.2 Določanje termične stabilnosti SEB in BSA proteina s fluorimetrijo

Emisijski spektri so bili posneti z instrumentom Carry Eclipse Fluorimeter in s programom Thermal ver. 1.1(133).

Pri izvedbi termične denaturacije smo snemali tudi fluorescenčne spektre pri temperaturah T1, T2, T3, T4 in T5, kot je to prikazano na sliki 24. Fluorescenčne spektre SEB in BSA smo posneli v prisotnosti polifenolov v molskem razmerju 1 : 1.

Termično denaturacijo smo spremljali od T1 do T2 in od T3 do T4, tako kot prikazuje slika 24.

Termično stabilnost SEB smo proučevali v prisotnosti naslednjih polifenolov: EGCG, EGC, KAM-G in KAM s koncentracijo 0,025 mM. Začetna koncentracija SEB proteina je bila $0,012 \pm 0,001$ mg/ml oz. $4,4 \times 10^{-7}$ M. Za merjenje smo uporabili kvarčno kiveto z dolžino optične poti 10 mm. V kiveto smo dodali 500 μ l proteina in nato dodali ustrezni volumen polifenola ter vsebino dobro premešali. Molsko razmerje med raztopino SEB proteina in polifenolno spojino je bilo 1 : 1. Valovni dolžini sta bili 275 nm za Tyr in 295 nm za Trp. Emisijo smo spremljali pri $\lambda_{em} = 328$ nm.

Termično stabilnost BSA smo proučevali v prisotnosti naslednjih polifenolov: EGCG, EGC, KAM-G, KAM, ECG, KAV, KVER, NAR, p-KUM in R.K. s koncentracijo 0,1 mM. Začetna koncentracija raztopine BSA proteina je bila $0,08 \pm 0,0061$ mg/ml oz. $1,25 \times 10^{-6}$ M. Za merjenje smo uporabili 2,5 ml kvarčno kiveto z dolžino optične poti 10 mm. V kiveto smo dodali ustrezni volumen proteina in dodali ustrezni volumen polifenolne raztopine ter dobro premešali. Molsko razmerje med raztopino BSA proteina in polifenolno raztopino je bilo 1 : 1. Valovna dolžina vzbujanja je bila 280 nm. Emisijo smo spremljali pri $\lambda_{em} = 339$ nm.

Za vsak prehod smo določili temperaturo denaturacije (T_d). Podane vrednosti T_d so povprečje dveh ločenih meritev.

Posnete fluorescenčne termograme normaliziramo in odčitamo temperaturo denaturacije (T_d) za SEB in BSA proteina v odvisnosti od dodane količine polifenolne spojine.

3.2.4 Molekulska modeliranja

Hiter razvoj molekularne biologije in tehnike je v zadnjih nekaj letih doprinesel ogromno novega znanja o razumevanju bioloških procesov na nivoju genov tako, da se je razvilo novo znanstveno področje – strukturna biologija. Za razjasnitve številnih biološko pomembnih procesov, ki se dogajajo na molekularnem nivoju (zvitje-razvitje proteinov, delovanje encimov, študij interakcij med samimi proteini in proteini z manjšimi molekulami – ligandi, itd.) strukturni biologi uporabljajo med drugim tudi metode molekulskega modeliranja.

V praksi se molekulskega modeliranja v veliki meri poslužujejo farmacevtska podjetja saj z uporabo teoretičnih pristopov omogoča posnemanje obnašanja atomov, molekul in proteinov, kar vodi do optimizacije in racionalizacije načrtovanja novih zdravilnih učinkovin (Kukol, 2008).

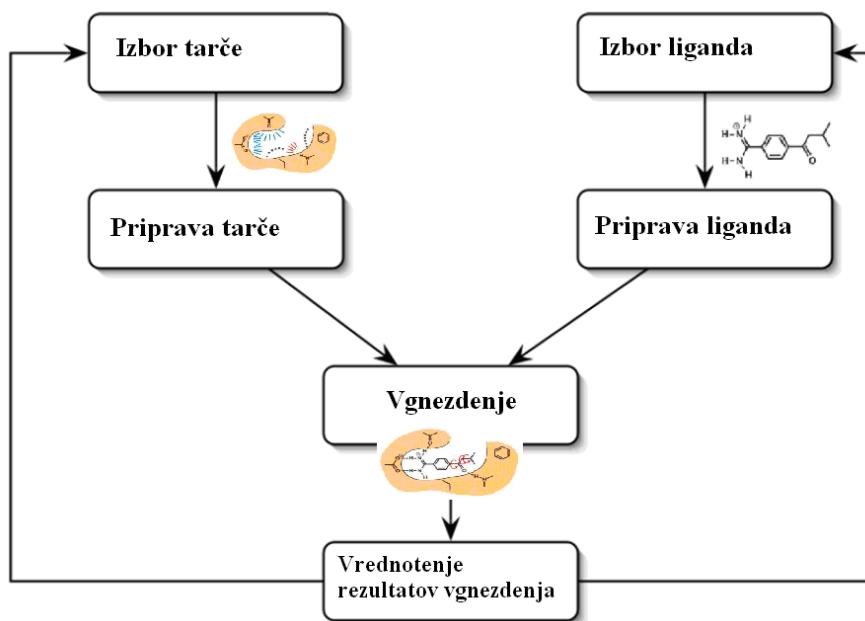
3.2.4.1 Metoda vgnezdenja ("docking")

Vgnezdenje ("docking") je postopek, s katerim lahko predvidimo, kako se ligand veže v receptorsko mesto tarčnega proteina. Pri tem postopku iščemo optimalno orientacijo liganda glede na receptor (tarčo). Metode vgnezdenja lahko delimo glede na to, v kakšni meri upoštevajo notranje prostostne stopnje ligandov in receptorja:

- Rigidno vgnezdenje je najenostavnnejši primer vgnezdenja, kjer notranjih prostostnih stopenj liganda in receptorja ne upoštevamo. V tem primeru predpostavimo, da sta ligand in receptor toggi molekuli (nimata vrtljivih vezi).
- Fleksibilno vgnezdenje, ki se ga v praksi najpogosteje uporablja, je primer vgnezdenja, kjer v tog model receptorja gnezdimo ligand, ki se nahaja v različnih konformacijskih stanjih.
- Vgnezdenje fleksibilnega liganda v fleksibilen model receptorja je izmed vseh primerov vgnezdenja računsko najzahtevnejši problem. Tu poleg spremenjanja konformacij liganda spremojamo tudi konformacijo samega receptorskega mesta.

Druga pomembna naloga vgnezdenja je ocena interakcijske energije med ligandom in receptorjem. Dobljene ocene so nam v pomoč pri razvrščanju oz. iskanju najustreznejšega liganda za določeno tarčo (Kuntz in sod., 1982).

Slika 25 shematično prikazuje izvedbo vgnezdenja. Za uspešno izvedbo vgnezdenja najprej potrebujemo 3D strukturo receptorskega mesta (tarče) in 3D strukturo liganda/ov, ki ga/jih želimo vgnezdit. Zelo pomembna faza v postopku je priprava tarče in liganda/ov, od te faze so v veliki meri odvisni končni rezultati. Tej fazi sledi vgnezdenje liganda/ov v tarčo. Samo vgnezdenje je optimizacijski postopek, pri katerem iščemo najugodnejšo pozicijo liganda znotraj receptorskega mesta. V praksi med samim vgnezdenjem minimiziramo energijsko funkcijo, ki predstavlja interakcijo med ligandom in tarčo. Poza liganda nam poda informacije o legi/orientaciji liganda glede na tarčo in/ali o konformacijskem stanju, v katerem se ligand nahaja. Pomemben del postopka vgnezdenja je končno vrednotenje rezultatov, na podlagi katerih lahko razvrstimo ligande glede na njihovo afiniteto do tarče.



Slika 25: Ključni koraki v procesu vgnezdenja (Kukol, 2008)

3.2.4.1.1 Opis programa za vgnezdenje molekul – Glide program

Glide (Grid-based Ligand Docking with Energetics) je program, ki smo ga v diplomskem delu uporabili za vgnezdenje molekul v receptorsko mesto tarčnih proteinov. Program Glide je namenjen iskanju ugodnih interakcij med eno ali več manjšimi molekulami – ligandi in večjo molekulo – receptor (običajno protein). Vsak ligand je pri postopku vgnezdenja molekul predstavljen kot ena sama molekula, receptor pa lahko sestoji iz več kot ene molekule; receptor je na primer lahko kompleks med proteinom in kofaktorjem.

Program Glide lahko poganjam na dva načina: pri prvem načinu (rigidno vgnezdenje) za ligand predpostavimo, da je toga struktura, pri iskanju optimalne interakcije med ligandom in receptorjem spremojamo le lego in orientacijo liganda glede na receptor; pri drugem pa (fleksibilno vgnezdenje) pa v postopku iskanja optimalne interakcije liganda z receptorjem poleg lege in orientacije liganda nasproti receptorju spremojamo tudi konformacijsko stanje liganda. Lego in orientacijo liganda glede na receptor, ki se nahaja v določenem konformacijskem stanju, imenujemo poza (Kukol, 2008).

Postopek vgnezdenja s programom Glide je hierarhičen in poteka v štirih stopnjah. V prvi stopnji program z geometrijskimi kriteriji ugotavlja vse možne razporeditve in orientacije liganda v točkah znotraj aktivnega mesta receptorja, ki tvorijo mrežo z razmikom 2 Å. V drugi program ovrednoti interakcije vseh možnih razporeditev/orientacij liganda znotraj receptorja, dobljenih v prvi fazi vgnezdenja. Za vrednotenje interakcij je v tej fazi uporabljena diskretna verzija ChemScore empirične funkcije ocene interakcij (Blundell in sod., 1987). Nekaj sto najbolj ovrednotenih poz dodatno energijsko minimiziramo znotraj interakcijskega polja receptorskega mesta, pri tej minimizaciji vedno spremojamo tako

translacijske in rotacijske prostostne stopnje, v primeru, da gre za fleksibilno vgnezdenje, pa spremjamamo tudi torzijske kote vrtljivih vezi. V četrti stopnji za vsako od minimiziranih poz izračunamo GlideScore (Gscore) po enačbi:

$$Gscore = 0.065 \times vdW + 0.130 \times Coul + Lipo + HBond + Metal + BuryP + RotB + Site \dots (23)$$

kjer posamezni členi v enačbi pomenijo: vdW – van der Waalsova energija; Coul – Coulombska (elektrostatska) energija; Lipo – lipofilne energije; HBond – energija vodikovih vezi; Metal – energija vezave kovinskih ionov; BuryP – »kazen« za polarne skupine; RotB – »kazen« za zamrznjene rotirajoče vezi; Site – polarna interakcija med aktivnimi mesti (Glide, 2009).

3.2.4.1.1.1 Predstavitev metode Monte Carlo

Metoda Monte Carlo je v domači literaturi le redko predstavljena, čeprav se jo v znanosti pogosto poslužujejo. Leta 1930 jo je nakazal Enrico Fermi, 1946 pa teoretično utemeljil poljski matematik Stanislaw Ulam, med tem ko se je poglobil v matematično ozadje igre Solitaire (Eckhardt, 1987). Nicholas Metropolis je prvi poimenoval to metodo kot Monte Carlo metoda, in sicer je inspiracijo za ime dobil v mestu Monte Carlo (Monako). Pri igrah na srečo je dobitek stvar naključja, naključne dogodke pa uporabimo tudi pri metodi Monte Carlo: gre za računske algoritme, kjer rezultate zberemo s slučajnim vzorčenjem (Metropolis in Ulam, 1949).

S pomočjo modernih in hitrih računalnikov je aplikacija Monte Carlo metode postala zelo razširjena in uporabna metoda. Uporablajo jo v fiziki (transport delcev skozi snov), matematiki (računanje določenih integralov), biokemiji in farmaciji (simulacija interakcij molekul, modeliranje materialov in kemikalij, obnašanje nanostruktur, napovedovanje proteinske strukture), medicini (načrtovanje obsevalnih doz pri zdravljenju raka), transportu (prometnih tokovih) in ekonomiji (analiza finančnih modelov).

V našem primeru smo se z metodo Monte Carlo srečali ob uporabi programa za molekulsko vgnezdenje Glide (Schrödinger). Z metodo Monte Carlo program Glide skuša poiskati konformacijo liganda, ki se najbolj prilega receptorju. Postopek prilagajanja liganda receptorju z metodo Monte Carlo poteka na naslednji način: najprej naključno spremenimo eno ali več zunanjih prostostnih stopenj molekule (rotacija, translacija) in/ali torzijski kot ene ali več vezi v molekuli, nato izračunamo interakcijsko energijo med ligandom in receptorjem (V_n). Če je interakcijska energija med ligandom in receptorjem V_n nižja od predhodnje interakcijske energije V_s uporabimo dobljeno pozno liganda¹, kot izhodiščno pozno za naslednji korak. V primeru, da je interakcijska energija V_n višja od predhodnice V_s izračunamo Boltzmanov faktor (B) po enačbi:

$$B = \exp[-(V_n - V_s)/kT] \dots (24)$$

¹ Poza liganda = pozicija + konformacija.

kjer so V_n nova interakcijska energija, V_s stara interakcijska energija, k – Boltzmanova konstanta in T temperatura. Če je Boltzmanov faktor višji od naključno izbranega števila v intervalu med 0 in 1, potem je poza liganda sprejeta; v nasprotnem primeru uporabimo kot izhodišče za naslednji korak predhodno pozno liganda (Leach, 2001; Rubinstein in Kroese, 2008; Kukol, 2008).

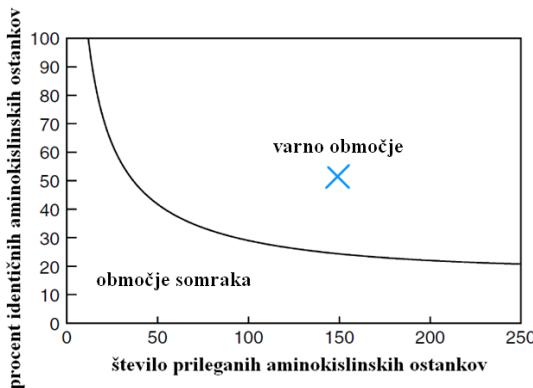
3.2.4.2 Metoda modelov na osnovi homologije

Vzporedno z razvojem molekularne biologije so se razvile tudi posebne podatkovne baze ali banke, kjer so shranjeni strurni podatki biološko pomembnih molekul. Primer takšne podatkovne banke je PDB (angl. Protein Data Bank) (Berman in sod., 2000). V PDB banki je trenutno shranjenih 66212 struktur (29. Jun 2010), večina teh (57298) je določena z uporabo X-žarkovne difrakcije (ang. X-ray diffraction). Kljub temu, da PDB banka podatkov vsebuje že ogromno rešenih 3D struktur, biološko pomembnih molekul, še vedno pogosto naletimo na vrzel v podatkovni banki (ne najdemo proteina, ki nas zanima). Kadarkar v podatkovni banki ne najdemo ustrezne 3D strukture, pogosto strukturo zgradimo na osnovi homologije, kar smo naredili tudi mi.

Modeliranje na osnovi homologije temelji na dveh glavnih predpostavkah, in sicer:

1. Struktura je za vsako vrsto proteina unikatna in je določena z natančnim aminokislinskim zaporedjem. Znana aminokislinska sekvenca vsaj v teoriji zadostuje za pridobitev 3D strukture (Blundell in sod., 1987; Johnson in sod., 1994; Krieger in sod., 2003).
2. Med evolucijo se je struktura proteinov bolj ali manj ohranila saj, ponavadi ne prihaja do večjih in nenadnih sprememb, a do mutacij, ki se dogajajo na nivoju genskega zapisa, vseeno pride. Tovrstne mutacije praviloma ne pustijo večjih sprememb na strukturi proteina, tako da lahko rečemo, da imajo proteini s sorodnim genskim zapisom skoraj identično 3D strukturo proteina. To povezavo sta prva ugotovila Chothia & Lesk (Chothia in Lesk, 1986), in kasneje pa Sander & Schneider to še količinsko določila (Sander in Schneider, 1991).

Dokler dolžina dveh različnih aminokislinskih zaporedij in odstotek identičnosti zaporedja ostane v območju »varno« označenem na sliki 26, je podobnost proteina praktično zajamčena. Za primer vzemimo sekvenco proteina A (tarčna sekvenca; ang. target), sestavljeni iz 150 aminokislin, in za katero bi radi izdelali 3D strukturo na podlagi homologije. Sekvenco proteina A primerjamo z vsemi sekvencami v PDB banki in dobimo zadetek sekvence, ki ustreza proteinu B, sestavljenem iz 300 aminokislin. Protein B ima regijo 150 aminokislin, ki se 50-odstotno ujema s sekvenco proteina A. Ta zadetek na sliki 26 pade v »varno« območje, kar pomeni, da je sekvenca proteina B primera za t.i. predlogo (ang. template). Z računalniškim programom proteinu B odrežemo odvečno aminokislinsko zaporedje in dobljeno predlogo mutiramo oz. ji spremenimo tiste aminokisline, ki se razlikujejo od sekvence proteina A. Predloga je tako pripravljena za homologijo.



Slika 26: Slika prikazuje dve coni prileganja aminokislinskih ostankov. Če se aminokislinsko zaporedje dveh različnih proteinov ujema v najmanj 50 % to vodi do podobne strukture. V tem primeru pade tovrstno modeliranje v varno območje, ki je na sliki označeno z modrim križcem.

Modeliranje na osnovi homologije poteka v več korakih, in sicer:

- 1) Iskanje predloge in inicializacija prileganja z algoritmoma, kot sta BLAST (ang. Basic Local Alignment Search Tool) ali FASTA, ki iščeta na podlagi tarčne sekvene ustrezno predlogo v PDB banki podatkov, ki se uvrsti v »varno« območje na sliki 28 (Lipman in Pearson, 1985; Pearson in Lipman, 1988; Altschul in sod., 1990). Pri iskanju predloge program uporablja oz. računa ustreznost/podobnost na podlagi dveh matrik, in sicer:
 - a. Izmenjalna matrika aminokislinskih ostankov (ang. residue exchange matrix) velikosti 20×20 , kjer išče podobnost za vsako od 20 aminokislin za sekvenco A in B.
 - b. Primerjalna matrika, kjer primerjamo celotni sekvenci med seboj na podlagi vrednosti, pridobljenih s prvo matriko – izmenjalno matriko aminokislinskih ostankov.
- 2) Generiranje ogrodja je trivialni postopek, kjer pričnemo z grajenjem modela na podlagi ogrodja predloge.
- 3) Modeliranje zanke je potreben postopek, saj se v večini primerov zgodi, da pri postopku prileganja sekvenc pride do vrzeli tako na modelni sekvenci (izbrisiti) kot na predlogi (vstavki). Vrzeli na modelni sekvenci je potrebno zapreti, med tem ko vrzeli na predlogi zapremo z vstavljanjem manjkajočih delov, ki jih dobimo iz osnovne predloge. Oba postopka spremenita konformacijo ogrodja modelnega proteina. Za modeliranje zanke poznamo dva glavna pristopa:
 - a. Brskanje po bazah podatkov (PDB baza podatkov), kjer poiščemo že znane zmodelirane zanke, ki jih enostavno prenesemo v naš sistem s pomočjo ustreznih računalniških programov.
 - b. *Ab initio* pristop pri katerem iščemo energijsko najugodnejšo konformacijo zanke. V ta namen lahko uporabimo metodo Monte Carlo. Pri daljših zankah je zaradi velikega števila prostostnih stopenj omenjeni postopek zelo zamuden.
- 4) Modeliranje stranskih verig (ang. rotamers) ponavadi poteka tako, da enostavno vstavimo v model poleg samega ogrodja tudi stranske verige iz predloge, saj s tem

dosežemo večjo natančnost kot, da bi s programom sami rekonstruirali stranske verige.

- 5) Optimizacija modela je korak, pri katerem dobljeni model energijsko minimiziramo. Pri tem koraku odpravimo določene pomankljivosti modela, kot so sterične ovire, neustrezne medatomske razdalje, nepravilna orientacija stranskih verig. Rezultat optimizacije je v prvi vrsti odvisen od izbire polja sil, pa tudi od izbire optimizacijske metode ter nastavitev konvergenčnih pogojev.
- 6) Validacija modela nam pove, koliko napak vsebuje naš homologni model, ki v veliki meri izvirajo iz napak v predlogi. Če je odstotek ujemanja sekvence A in B večji od 90 %, lahko točnost modela primerjamo s točnostjo določitve kristalne strukture. Če procent ujemanja pada do 50 %, pomeni, da ima homologni model veliko napak, a se ga dá vseeno uporabiti. Če pa procent ujemanja pada na 25 %, pa pomeni, da ima homologni model zelo velike napake in se ga navadno ne uporablja.

Po končanem modeliranju je težko oceniti ali je model pravi ali ne, saj je pri modeliranju nemogoče upoštevati vse faktorje, ki nastopajo v realnem svetu.

Kljud temu da obstajajo že zelo dovršeni računalniški programi za molekulsко modeliranje, ki upoštevajo že veliko faktorjev, je vseeno rezultate, pridobljene s homologijo potrebno potrditi tudi še s praktično izvedbo eksperimenta v laboratoriju.

3.2.4.2.1 Opis programskega paketa YASARA Structure

V našem primeru smo za izgradnjo struktur na osnovi homologije uporabili programski paket YASARA Structure (Yet Another Scientific Artificial Reality Application). Seveda bi lahko pri delu uporabili tudi druge programe, ki so dostopni prek spleta kot I-TASSER ONLINE strežnik (Roy in sod., 2010) in drugi, a smo se odločili za program YASARA Structure, ker imamo z njim največ izkušenj.

YASARA je programski paket, ki ga s svojimi sodelavci od leta 1993 naprej razvija in dopolnjuje dr. Elmar Krieger (Krieger in sod., 2002). Programski paket v najosnovnejši obliki (YASARA View) nam omogoča vizualizacijo molekulskih struktur. Najbolj napredno verzijo tega programa (YASARA Structure) pa lahko uporabimo za modeliranje biološko pomembnih molekul, molekulske dinamiko teh, molekulske vgnezdjenje ipd. Za naše delo je posebno zanimiv modul, ki omogoča modeliranje na osnovi homologije. Z YASARO je postopek modeliranja (opisan zgoraj) na osnovi homologije popolnoma avtomatiziran, edina informacija, ki jo potrebujemo za izdelavo modela, je aminokislinsko zaporedje tarčnega proteina. Rezultat izračuna modela na osnovi homologije je več 3D struktur tarčnega proteina, ki so razvrščene po padajočem Z-faktorju, ki ga v primeru YASARE uporabljam kot merilo za kakovost modela. Z-faktor je statistično merilo, ki pove, koliko standardnih deviacij je določena struktura odaljena od povprečja standardnih referenčnih struktur. Dobra lastnost YASARE je tudi ta, da vse nastavitev in rezultate modela na osnovi homologije poda v dobro dokumentiranem poročilu v formatu HTML, primernemu za objavo na spletu (Krieger in sod., 2002). YASARA Structure v PDB banki podatkov išče ustrezno predlogo z BLAST algoritmom.

4 REZULTATI

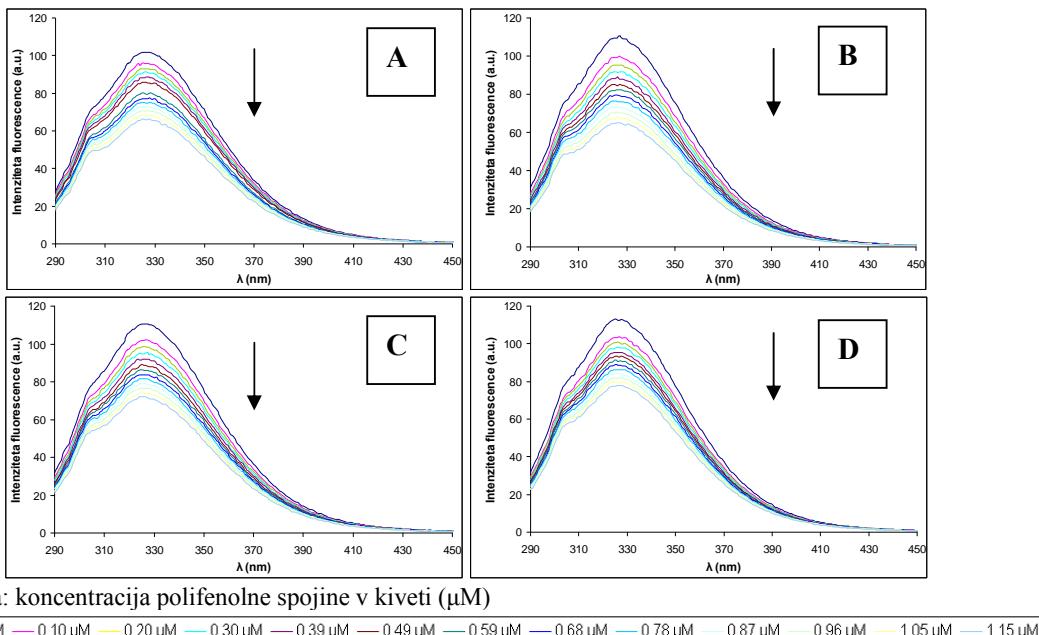
4.1 ŠTUDIJ VEZAVE POLIFENOLNIH SPOJIN NA PROTEIN (SEB IN BSA)

4.1.1 Spremljanje strukturnih sprememb proteina s fluorimetrijo

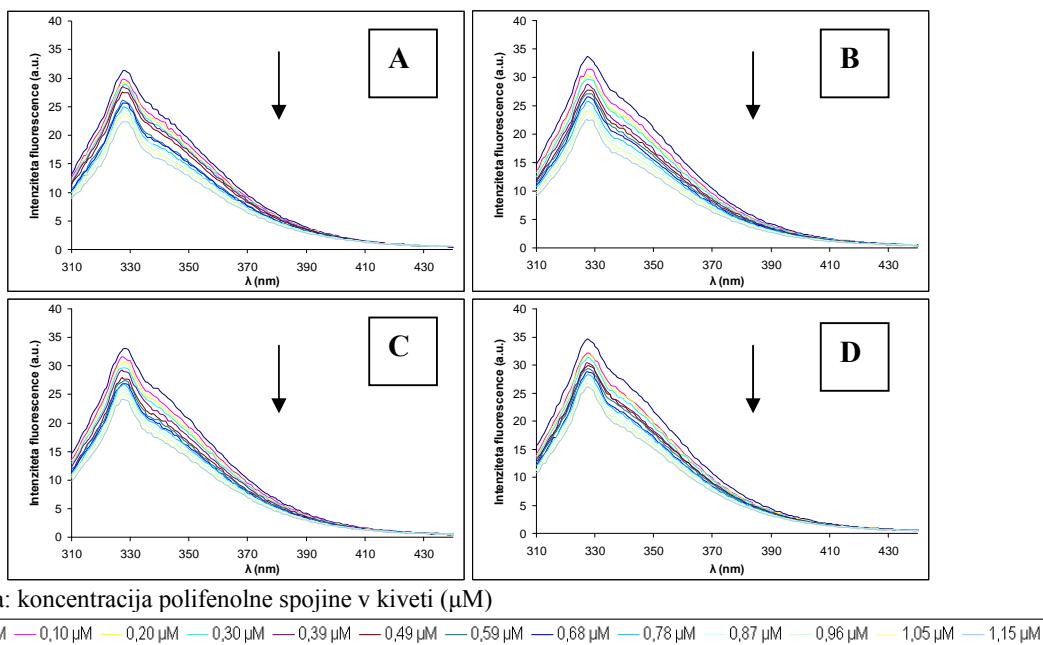
4.1.1.1 Rezultati titracij SEB proteina z različnimi polifenolnimi spojinami

Na sliki 27 so predstavljeni korigirani fluorescenčni spektri SEB proteina ob dodatku EGCG (A), EGC (B), KAM-G (C) in KAM (D). Spektri predstavljajo povprečje dveh paralelnih meritev. Izhodna koncentracija SEB proteina, raztopljenega v 20 mM HEPES pufru s pH = 7,5 je bila $0,012 \pm 0,001$ mg/ml. Izhodne koncentracije polifenolnih spojin so bile prav tako pripravljene v 20 mM HEPES pufru s pH = 7,5 s koncentracijo 0,1 mM. Celoten eksperiment je potekal pri standardnih pogojih ($T = 25^\circ\text{C}$, $p = 101,3$ kPa).

Intenziteto fluorescence smo spremljali v območju med valovnimi dolžinami od 290–600 nm pri valovni dolžini vzbujanja $\lambda_{\text{ex}} = 275$ nm (Slika 27) in v območju med valovnima dolžinama 310–600 nm pri $\lambda_{\text{ex}} = 295$ nm (Slika 28). Ob dodatku 2 μl polifenolne spojine s koncentracijo 0,1 mM k SEB proteinu smo dosegli koncentracijo v kiveti = 0,10 μM . Vsebino kivete smo dobro premešali in počakali 12 min, da se je vzpostavilo kemijsko ravnotežje. Nato smo pričeli z merjenjem. Z naknadnim dodajanjem osnovne raztopine polifenolne spojine k raztopini SEB proteina smo pridobili še koncentracije od 0,20 do 1,15 μM . Pri koncentraciji 1,15 μM je molsko razmerje proteina in polifenolne spojine enako 1 : 3.



Slika 27: Spremljanje sprememb intenzitete fluorescence SEB proteina ob dodatku EGCG (A), EGC (B), KAM-G (C) in KAM (D) ($\lambda_{\text{ex}} = 275$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 328$ nm, $T = 25^\circ\text{C}$).

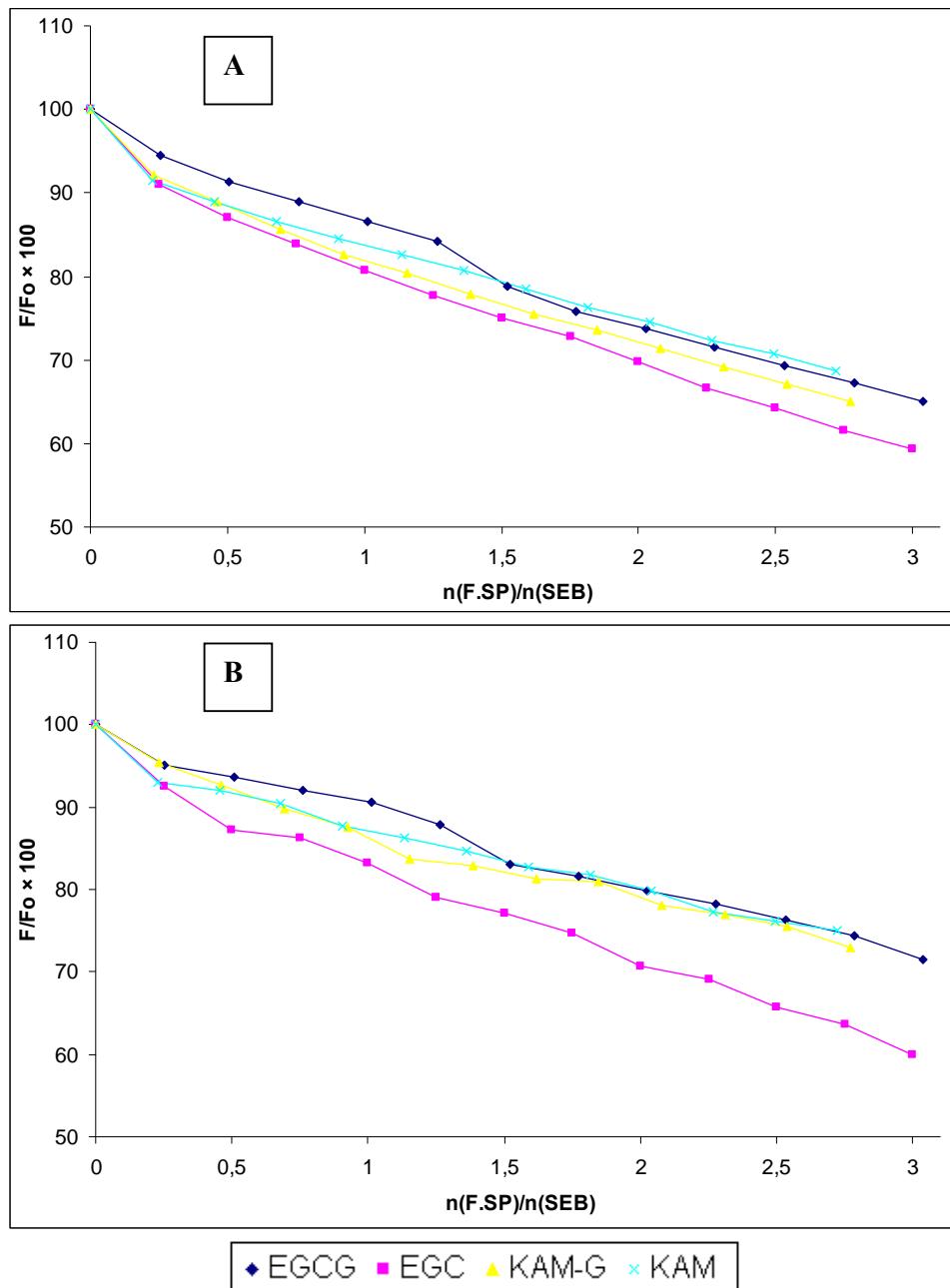


Slika 28: Spremljanje fluorescenčnih sprememb SEB proteina ob dodatku EGCG (A), EGC (B), KAM-G (C) in KAM (D) ($\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 328 \text{ nm}$, $T = 25^\circ\text{C}$).

S slike 27 in slike 28 je razvidno, da nobena od polifenolnih spojin ne spremeni oblike spektra. Intenziteta fluorescence linearno pada z naraščajočo koncentracijo polifenolne spojine. Sklepamo lahko, da verjetno prihaja bolj do površinskih interakcij med uporabljenimi polifenolnimi spojinami (EGCG (A), EGC (B), KAM-G (C) in KAM (D)) in SEB proteinom saj nismo zaznali večjih padkov intenzitete fluorescence, ki bi lahko nakazovale na močnejšo vezavo polifenolnih spojin na SEB protien.

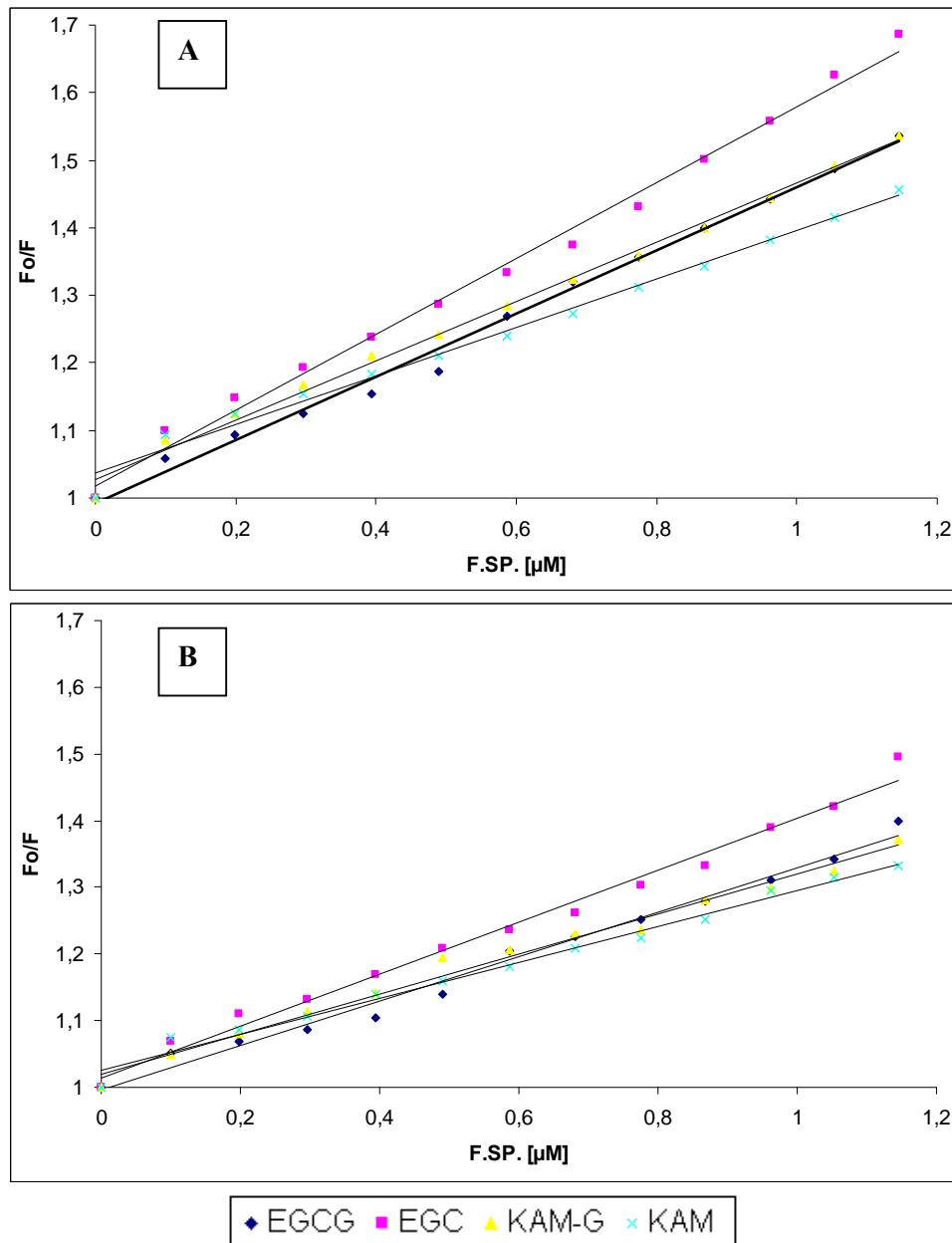
Rezultati odvisnosti normalizirane intenzitete fluorescence $F/F_0 \times 100$ v odvisnosti od množinskega razmerja polifenolne spojine $n(\text{F.SP})$ in proteina $n(\text{SEB})$ pri dveh različnih valovnih dolžinah vzbujanja; $\lambda_{\text{ex}} = 275 \text{ nm}$ (A) in pri $\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$ (B) so predstavljeni na sliki 29. Izmed vseh štirih testiranih polifenolnih spojin smo ugotovili, da EGC povzroča največje spremembe v fluorescenčni intenziteti proteina v primerjavi z KAM-G > KAM \approx EGCG.

S pomočjo izrisanih grafov (Slika 29), ki prikazujejo odvisnost intenzitete fluorescence $F/F_0 \times 100$ merjene v odvisnosti od množinskega razmerja polifenolne spojine n(F.SP) in SEB proteina n(SEB) smo grafično predstavili padec intenzitete fluorescence ob dodajanju posamezne polifenolne spojine. Padec intenzitete fluorescence se v tem primeru bolje vidi.



Slika 29: Odvisnost normalizirane intenzitete fluorescence $F/F_0 \times 100$ merjene pri $\lambda_{\text{em}} = 328 \text{ nm}$ v odvisnosti od množinskega razmerja polifenolne spojine n(F.SP) in SEB proteina n(SEB) pri $\lambda_{\text{ex}} = 275 \text{ nm}$ (A) in pri $\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$ (B).

Iz padca intenzitete lahko s Stern-Volmerjevim grafom (Slika 30), ki prikazuje odvisnost intenzitete fluorescence F_0/F merjene v odvisnosti od množinske koncentracije polifenolne spojine odčitamo Stern-Volmerjevo konstanto (K_{sv}), ki predstavlja naklon premice.



Slika 30: Stern-Volmerjev graf za SEB protein (F_0/F) v odvisnosti od množinske koncentracije polifenolne spojine [μM].

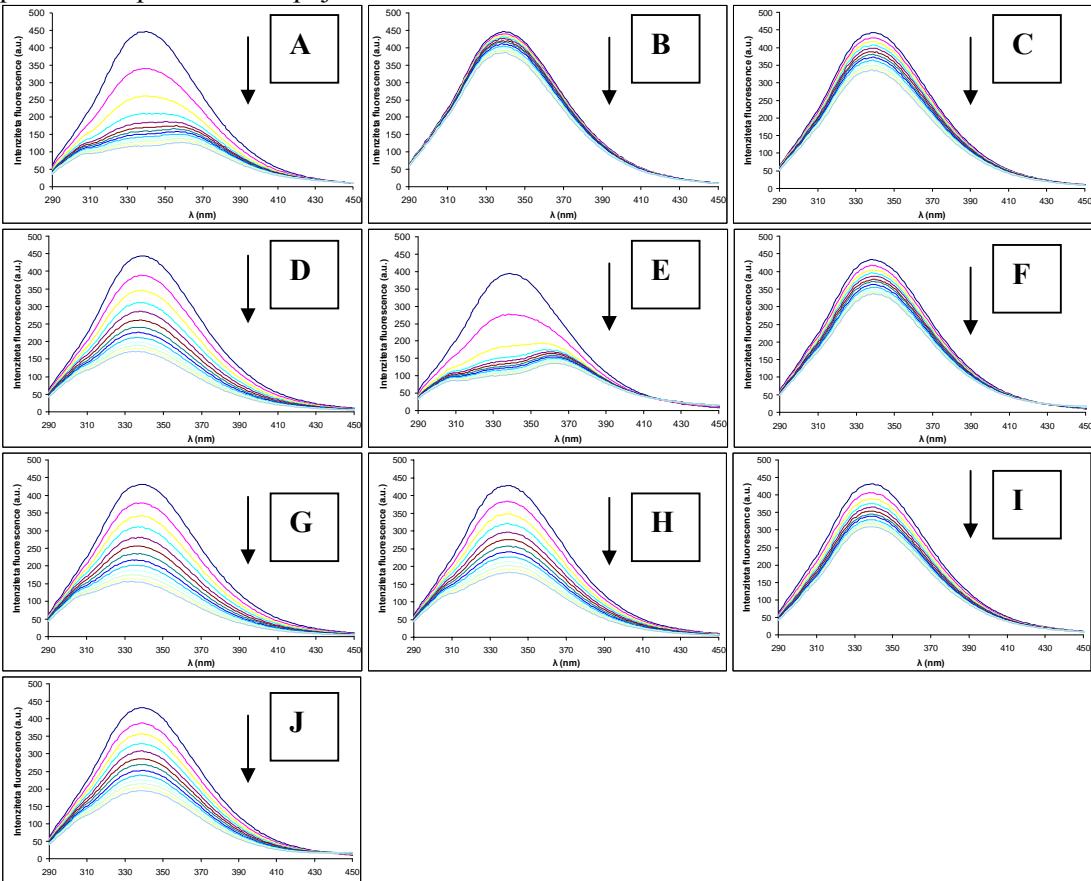
Iz enačbe 10 smo izračunali Stern-Volmerjevo konstanto (K_{sv}), ki so podane v preglednici 10.

Preglednica 10: Preglednica Stern-Volmerjevih konstant (K_{sv}) za SEB protein in polifenolne spojine.

Polifenolna spojina	$K_{sv} (\times 10^3)$ $[M]^{-1}$	
	275 nm	295 nm
EGCG	467 ± 3	333 ± 1
EGC	563 ± 4	390 ± 5
KAM-G	438 ± 2	300 ± 4
KAM	360 ± 4	270 ± 4

4.1.1.2 Rezultati titracij BSA proteina s polifenolnimi spojinami

Posneti fluorescenčni spektri za BSA proteina ob dodatku EGCG (A), EGC (B), KAM-G (C), KAM (D), ECG (E), KAV (F), KVER (G), NAR (H), p-KUM (I), RK (J) so prikazani na sliki 31. Spektri predstavljajo povprečje dveh paralelnih meritev z upoštevanjem faktorja razredčitve. Izhodna koncentracija BSA proteina, raztopljenega v 20 mM HEPES pufru s pH = 7,5 je bila $0,082 \pm 0,001$ mg/ml. Izhodne koncentracije 0,1 Mm polifenolnih spojin so bile pripravljene v 20 mM HEPES pufru s pH = 7,5. Celoten eksperiment je potekal pri standardnih pogojih ($T = 25^\circ\text{C}$, $p = 101,3$ kPa). Fluorescenčne spekture smo spremljali v območju valovnih dolžin 290 – 600 nm in pri valovni dolžini vzbujanja $\lambda_{\text{ex}} = 280$ nm. Ob dodatku 2 μl polifenolne spojine s koncentracijo 0,1 mM smo dosegli koncentracijo v kiveti = 0,40 μM . Vsebino kivete smo dobro premešali in počakali 12 min, da se je vzpostavilo kemijsko ravnotežje. Nato smo pričeli z merjenjem. Z naknadnim dodajanjem osnovne raztopine polifenolne spojine k raztopini proteina smo pridobili še koncentracije od 0,79 do 3,10 μM . Pri koncentraciji 3,10 μM je molsko razmerje BSA proteina in polifenolne spojine = 1 : 3.



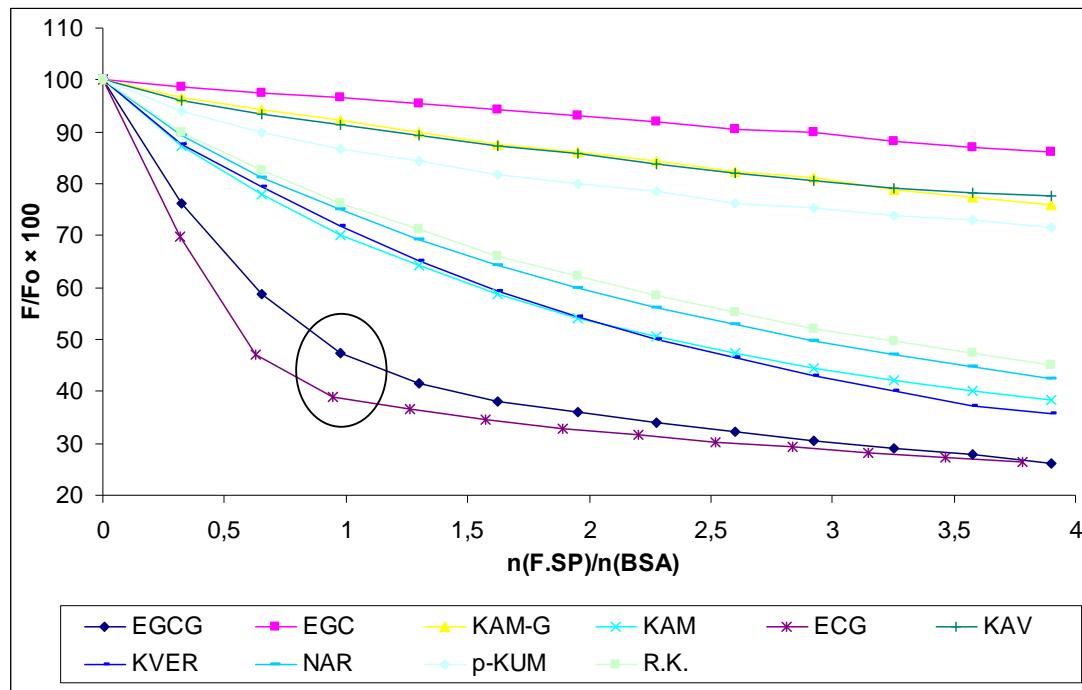
Legenda: koncentracija polifenolne spojine v kiveti (μM)

Slika 31: Fluorescenčni spektri BSA proteina ob dodatku EGCG (A), EGC (B), KAM-G (C), KAM (D), ECG (E), KAV (F), KVER (G), NAR (H), p-KUM (I), RK (J) ($\lambda_{\text{ex}} = 280$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 339$ nm, $T = 25^\circ\text{C}$).

Iz posameznih fluorescenčnih spektrov BSA proteina ob dodatku polifenolnih spojin je razvidno, da fluorescensa v okolici emisijskega maksimuma (340 nm) ob dodajanju polifenolne spojine pada, poleg tega pa je razvidno, da se ob dodatku določenih polifenolnih spojin premakne celo vrh BSA proteina. Prav tako je razvidno, da se struktura BSA proteina verjetno spremeni ob dodatku EGCG (A) in ECG (E) med tem, ko ostale polifenolne spojine na strukturo BSA proteina ne vplivajo.

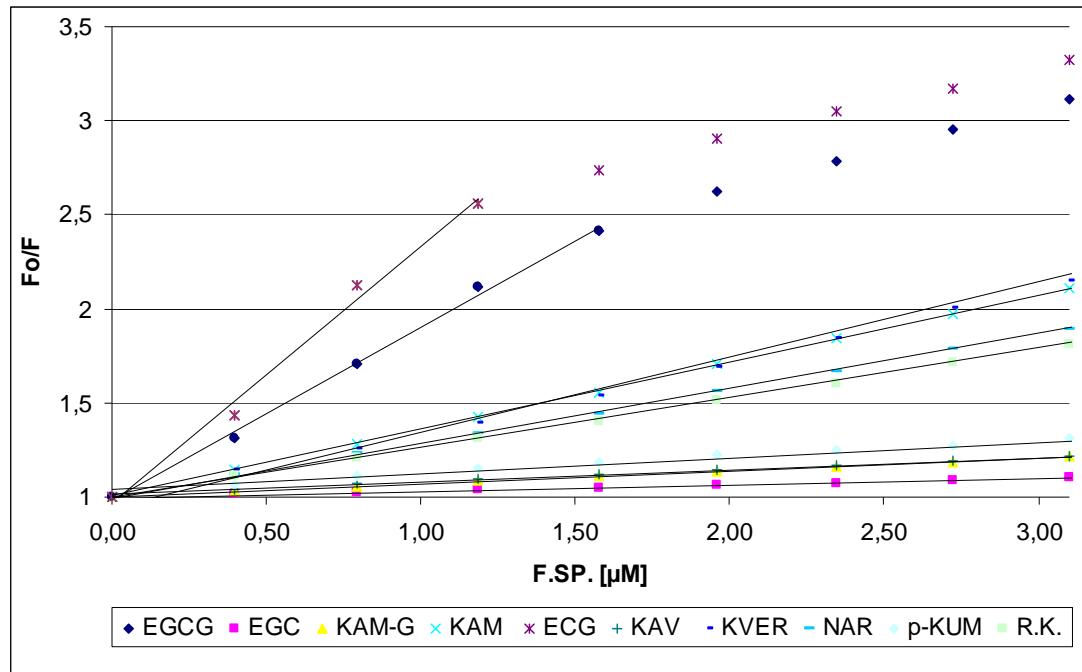
Rezultati odvisnosti normalizirane intenzitete fluorescence $F/F_0 \times 100$ v odvisnosti od množinskega razmerja polifenolne spojine $n(F.SP)$ in BSA proteina $n(BSA)$ so predstavljeni na sliki 32. Izmed vseh 10 testiranih polifenolnih spojin, smo dobili najboljše rezultate za EGCG in ECG saj na podlagi grafa (Slika 32) lahko sklepamo, da pri obeh spojinah pride do vezave pri molskem razmerju $n(BSA)/n(F.SP) \approx 1 : 1$. Krivulja se od te točke naprej bistveno ne spreminja več iz česar lahko sklepamo, da je prišlo do nasičenja BSA proteina s polifenonimi spojinami vsaj na vezavnih mestih v okolici Trp.

Pri drugi skupini polifenolnih spojin, ki vključujejo KVER, KAM, NAR in R.K. pride verjetno do šibkih interakcij z BSA proteinom med tem, ko pri p-KUM, KAM-G, KAV, EGC ne pride do bistvenih sprememb v intenziteti fluorescence emisijskih spektrov.



Slika 32: Odvisnost normalizirane intenzitete fluorescence $F/F_0 \times 100$ v odvisnosti od množinskega razmerja polifenolne spojine $n(F.SP)$ in BSA proteina $n(BSA)$ ($\lambda_{ex} = 280$ nm, $\lambda_{em} = 339$ nm, $T = 25$ °C).

S Stern-Volmerjevim grafom (Slika 33), ki prikazuje odvisnost intenzitete fluorescence F/F_0 merjene v odvisnosti od množinske koncentracije polifenolne spojine smo določili Stern-Volmerjevo konstanto (K_{sv}) iz naklona premice.



Slika 33: Stern-Volmerjev graf za BSA protein (F_0/F) v odvisnosti od množinske koncentracije polifenolne spojine [μM].

Iz enačbe 10 smo izračunali Stern-Volmerjevo konstanto (K_{sv}). Dobljene vrednosti so podane v preglednici 11.

Preglednica 11: Preglednica Stern-Volmerjevih konstant (K_{sv}) za BSA protein in polifenolne spojine.

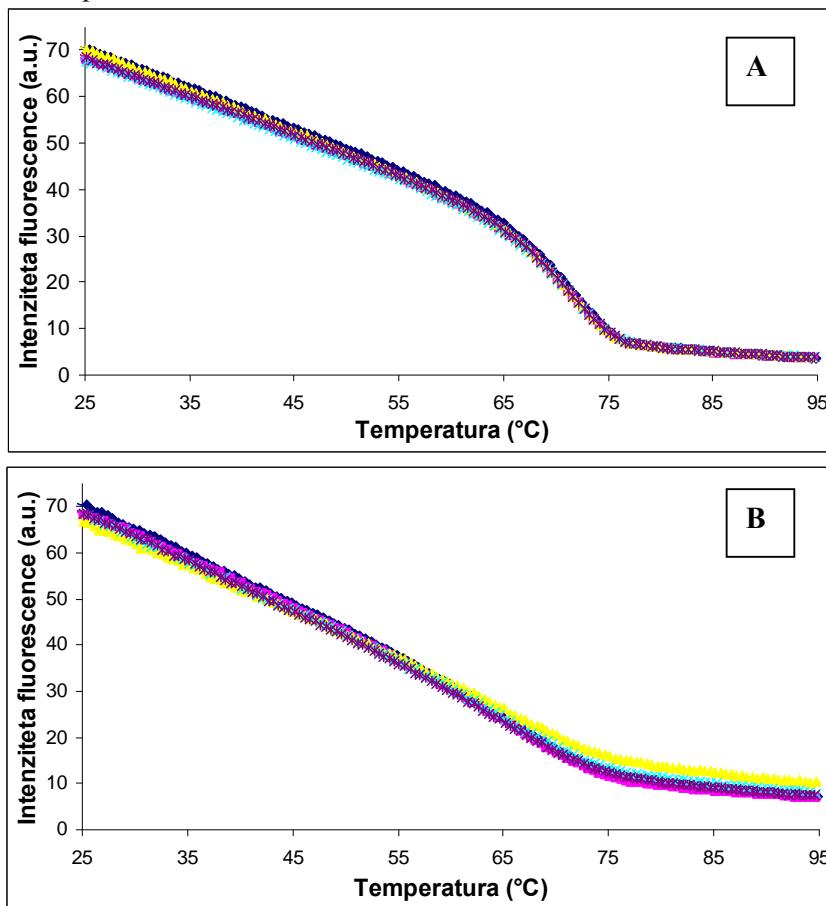
Polifenolna spojina	$K_{sv} (\times 10^3) [M]^{-1}$	$k_q^* (\times 10^{12}) [M \cdot s]^{-1}$
→ EGCG	922 ± 3	184,3 ± 0,6
EGC	35,1 ± 0,2	7,00 ± 0,04
KAM-G	68,0 ± 0,1	13,60 ± 0,01
KAM	354,3 ± 0,1	70,00 ± 0,03
→ ECG	1361 ± 13	272 ± 3
KAV	63,3 ± 0,5	12,6 ± 0,1
KVER	400 ± 1	80,0 ± 0,3
NAR	293,6 ± 0,2	58,00 ± 0,03
p-KUM	83 ± 2	16,6 ± 0,4
R.K.	265,0 ± 0,1	54,00 ± 0,03

* τ_0 za BSA znaša 5×10^{-9} s (Papadopoulou in sod., 2005).

4.1.2 Spremljanje spremembe temperature denaturacije s fluorimetrijo

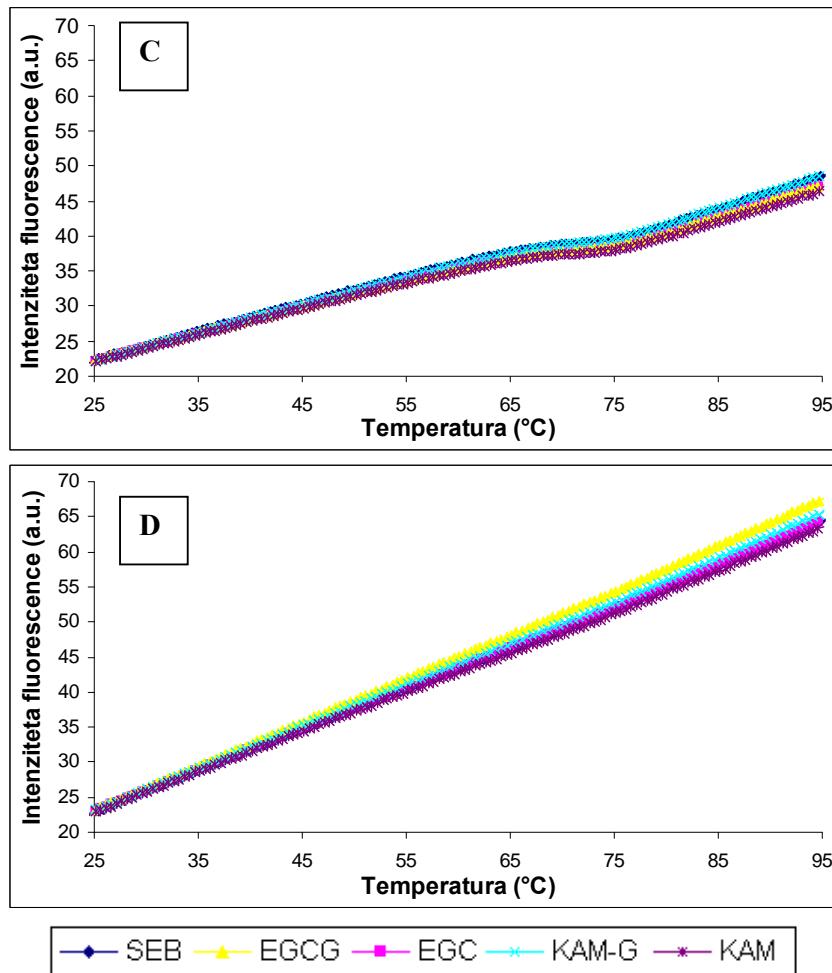
4.1.2.1 Rezultati termične denaturacije SEB proteina z različnimi polifenolnimi spojinami

V primeru, da pride do interakcije ali vezave polifenolne spojine s SEB proteinom pričakujemo spremembo temperature denaturacije SEB proteina. Polifenolne spojine lahko protein stabilizirajo (pričakujemo višjo temperaturo denaturacije) ali destabilizirajo (pričakujemo nižjo temperaturo denaturacije). Poleg tega pa smo tudi preverili, če je proces denaturacije za SEB protein reverzibilen in sicer tako, da smo najprej izvedli prvo segrevanje od 20 do 95 °C (Slika 34: A, C) in nato še drugo segrevanje vzorca v istem temperaturnem območju (Slika 34: B, D). Slika 34 prikazuje intenziteto fluorescence v odvisnosti od temperature.



Slika 34: Intenziteta fluorescence merjena pri $\lambda_{\text{em}} = 328 \text{ nm}$ v odvisnosti od temperature pri $\lambda_{\text{ex}} = 275 \text{ nm}$ (A, B) in pri $\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$ (C, D). Slika prikazuje normalizirane fluorescenčne denaturacijske krivulje za SEB in SEB z dodanimi polifenolnimi spojinami v molskem razmerju SEB protein : polifenolna spojine = 1 : 1.

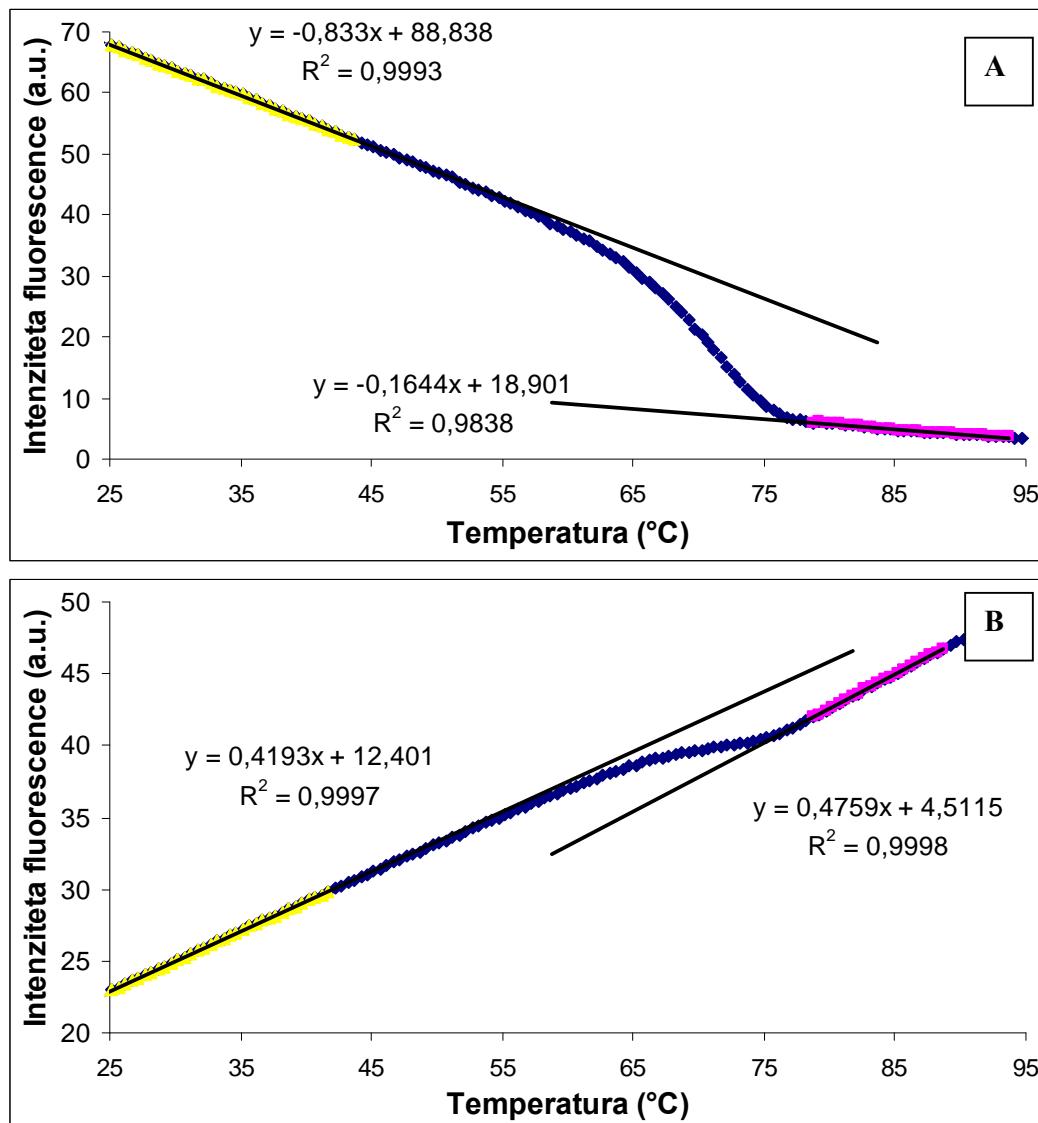
se nadaljuje



nadaljevanje

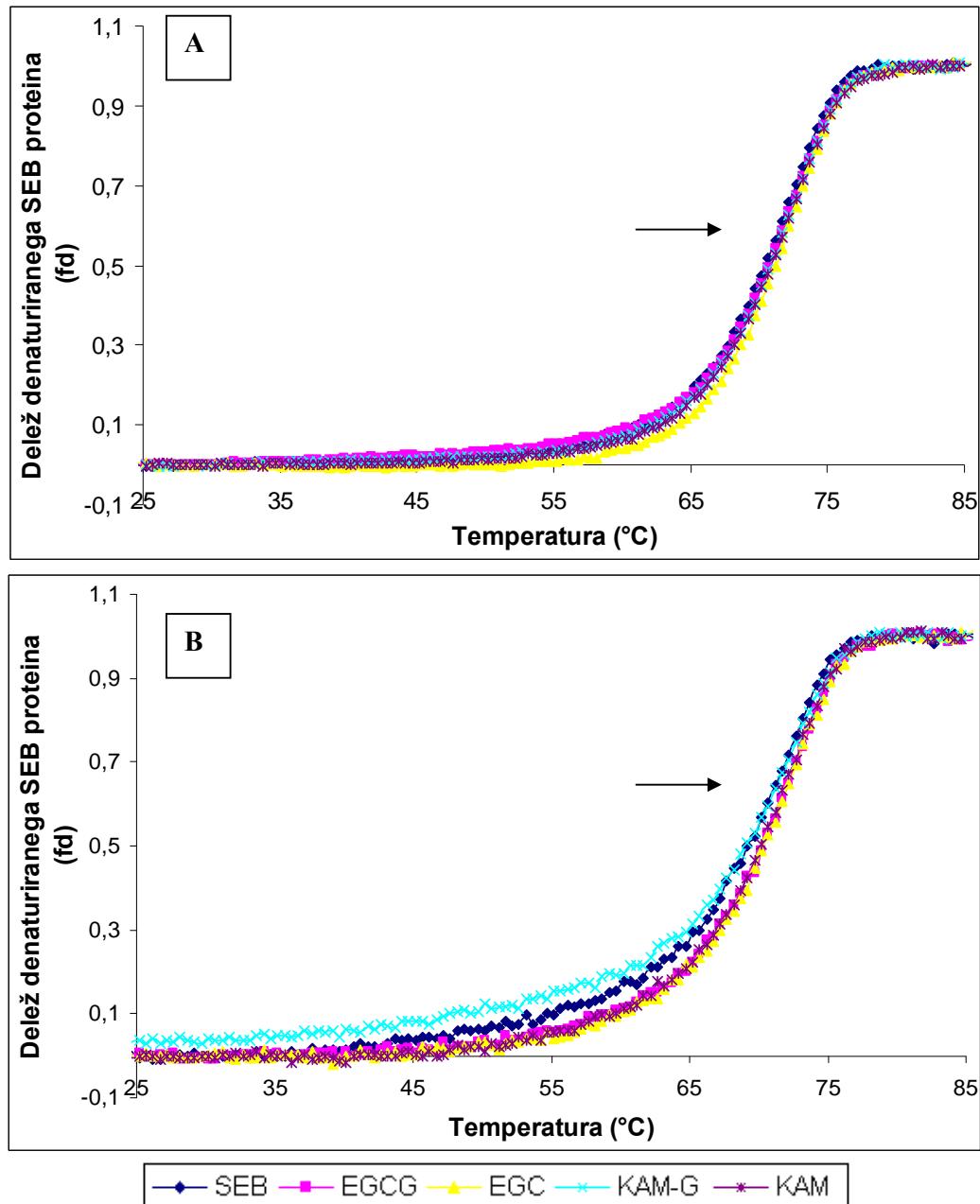
Slika 34: Intenziteta fluorescence merjena pri $\lambda_{\text{em}} = 328 \text{ nm}$ v odvisnosti od temperature pri $\lambda_{\text{ex}} = 275 \text{ nm}$ (A, B) in pri $\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$ (C, D). Slika prikazuje normalizirane fluorescenčne denaturacijske krivulje za SEB in SEB z dodanimi polifenolnimi spojinami v molskem razmerju SEB protein : polifenolna spojina = 1 : 1.

Iz dobljenih normaliziranih fluorescenčnih denaturacijskih krivulj smo poiskali linearen del premice v območju nativnega (rumen del krivulje) in v območju denaturiranega dela proteina (vijoličen del krivulje) ter določili enačbo premice. Dobljeno enačbo premice smo uporabili pri računanju deleža denaturiranega SEB proteina (fd) (Slika 36).



Slika 35: Intenziteta fluorescence merjene pri $\lambda_{\text{em}} = 328 \text{ nm}$ v odvisnosti od temperature pri $\lambda_{\text{ex}} = 275 \text{ nm}$ (A) in pri $\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$ (B) za SEB protein.

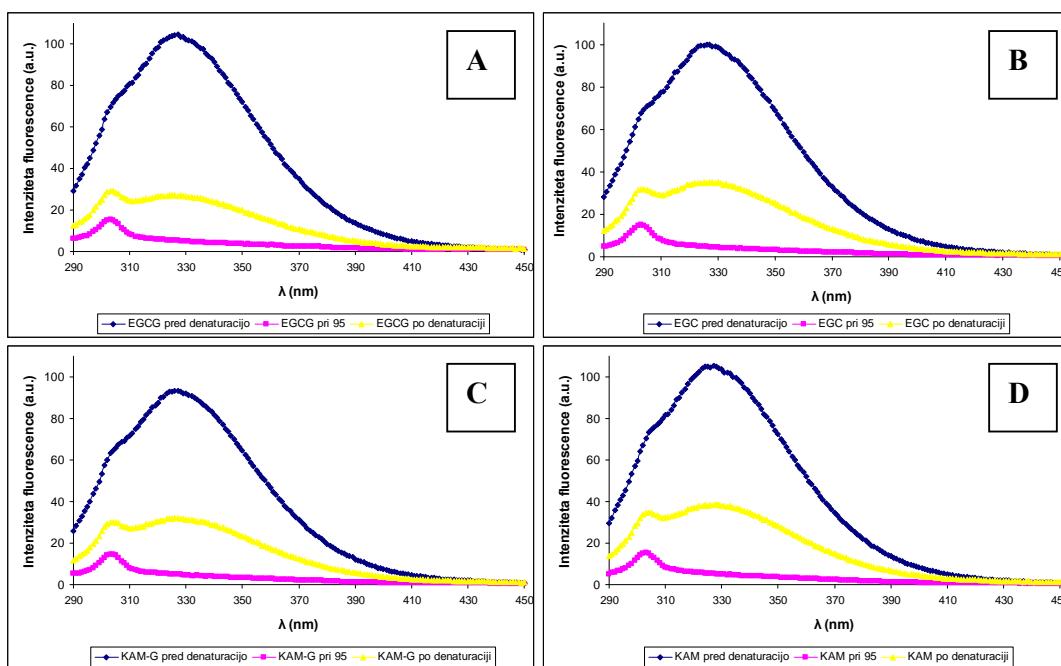
Na podlagi enačb premic, ki smo jih dobili na način predstavljen na sliki 35 smo uporabili za izres krivulj deleža denaturiranega SEB proteina (fd) v odvisnosti od temperature. Iz naklona premice označenega na sliki 36 dobimo vse potrebne podatke za določitev temperature denaturacije (T_d) in izračun termodinamske vrednosti po enačbi 21 ($\Delta H^0(T_d)$) kar je natančneje prikazano na sliki 23.



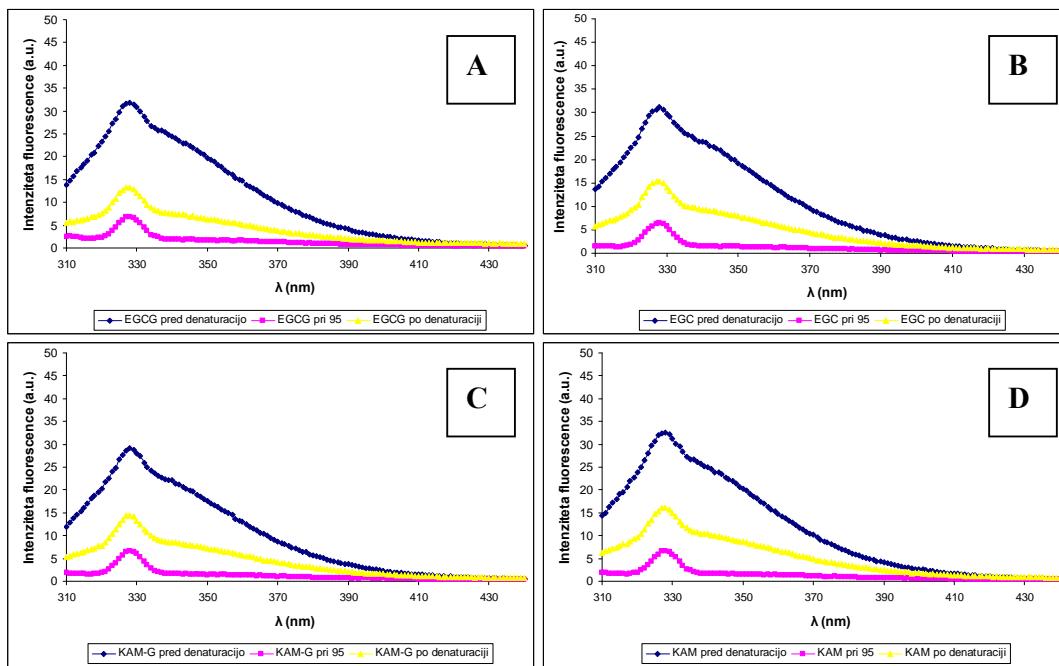
Slika 36: Delež denaturiranega SEB proteina pri $\lambda_{em} = 328$ nm v odvisnosti od temperature pri $\lambda_{ex} = 275$ nm (A) in pri $\lambda_{ex} = 295$ nm (B), pH = 7,5

Reverzibilnost denaturacijskega procesa SEB proteina smo preverili tudi s snemanjem fluorescenčni spektrov pred termično denaturacijo pri temperaturi 20 °C (moder spekter), ob končani termični denaturaciji pri temperaturi 95 °C (vijoličen spekter) in po termični denaturaciji, ko smo vzorec ohladili na 20 °C (rumen spekter). Slike 37 in 38 prikazujejo posnete fluorescenčne spektre za SEB protein ob dodatku EGCG (A), EGC (B), KAM-G (C), KAM (D) v molskem razmerju 1 : 1. Pogoji merjenja so isti kot pri pogojih termične denaturacije SEB proteina. Spektri so posneti pri dveh valovnih dolžinah vzbujanja in sicer: $\lambda_{\text{ex}} = 275 \text{ nm}$ in $\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$.

Na podlagi dobljenih rezultatov lahko potrdimo, da termična denaturacija SEB proteina ni reverzibilen proces.



Slika 37: Fluorescenčni spektri SEB proteina pred termično denaturacijo (20 °C), pri 95 °C in po termični denaturaciji (20 °C) ob dodatku EGCG (A), EGC (B), KAM-G (C), KAM (D) v molskem razmerju 1 : 1, merjene pri $\lambda_{\text{em}} = 328 \text{ nm}$ in $\lambda_{\text{ex}} = 275 \text{ nm}$.



Slika 38: Fluorescenčni spektri SEB proteina pred termično denaturacijo (20 °C), pri 95 °C in po termični denaturaciji (20 °C) ob dodatku EGCG (A), EGC (B), KAM-G (C), KAM (D) v molskem razmerju 1 : 1, merjene pri $\lambda_{\text{em}} = 328 \text{ nm}$ in $\lambda_{\text{ex}} = 295$.

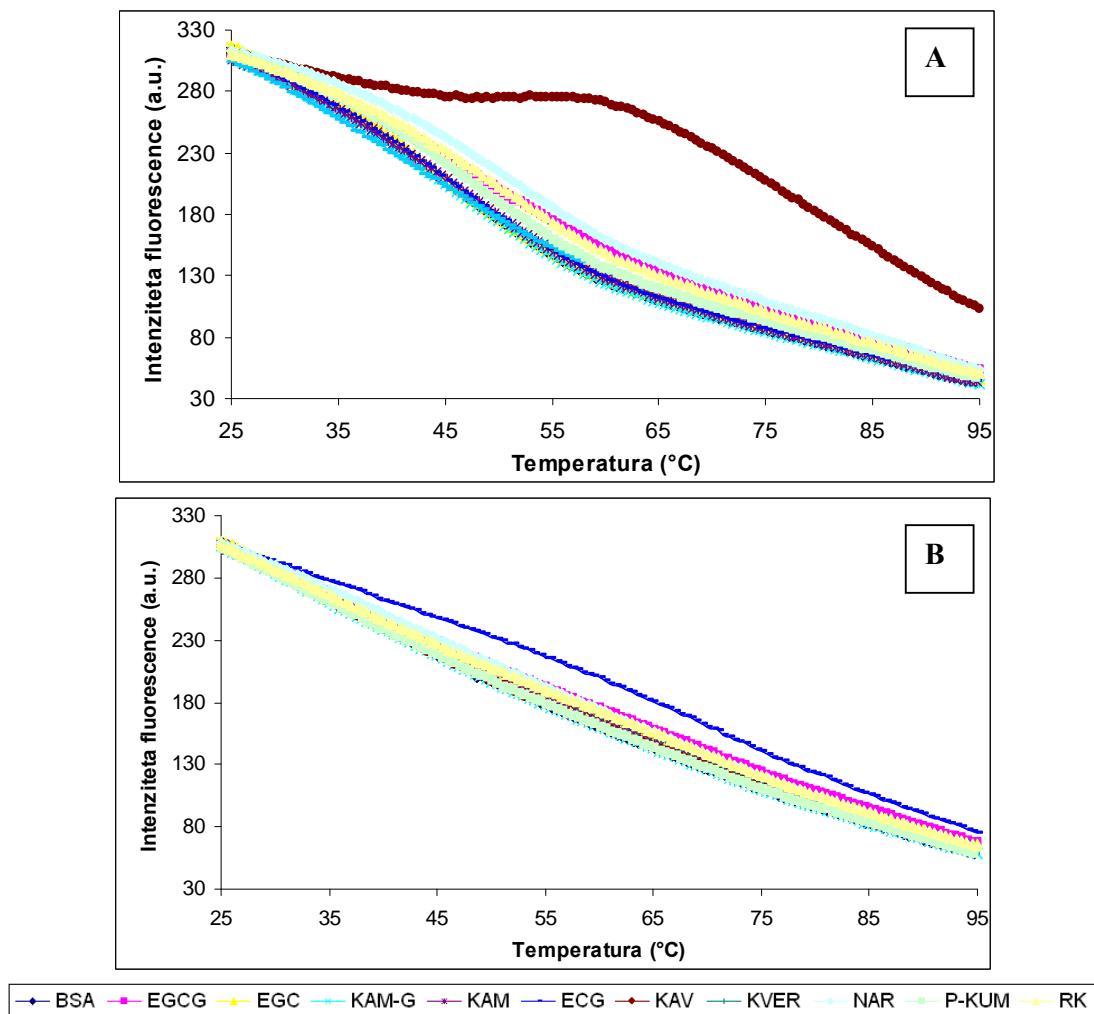
Po načinu, ki ga opisuje slika 23 smo določili temperaturi denaturacije (T_d) in po enačbi 21 smo izračunali $\Delta H^\circ(T_d)$. Določene in izračunane vrednosti so podane v preglednici 12.

Preglednica 12: Termodinamski profil termične denaturacije SEB proteina v prisotnosti različnih polifenolnih spojin pri pH = 7,5

Molsko razmerje 1 : 1	T_d (K)		$\Delta H^\circ(T_d)$ (kJ/mol)	
	275 nm	295 nm	275 nm	295 nm
SEB	$343,6 \pm 0,2$	$343,9 \pm 0,2$	325 ± 12	242 ± 6
EGCG	$343,8 \pm 0,2$	$343,4 \pm 0,2$	335 ± 12	305 ± 19
EGC	$344,4 \pm 0,2$	$343,4 \pm 0,2$	364 ± 11	292 ± 18
KAM-G	$344,0 \pm 0,2$	$343,6 \pm 0,2$	333 ± 18	309 ± 15
KAM	$344,0 \pm 0,2$	$342,4 \pm 0,2$	341 ± 10	260 ± 14

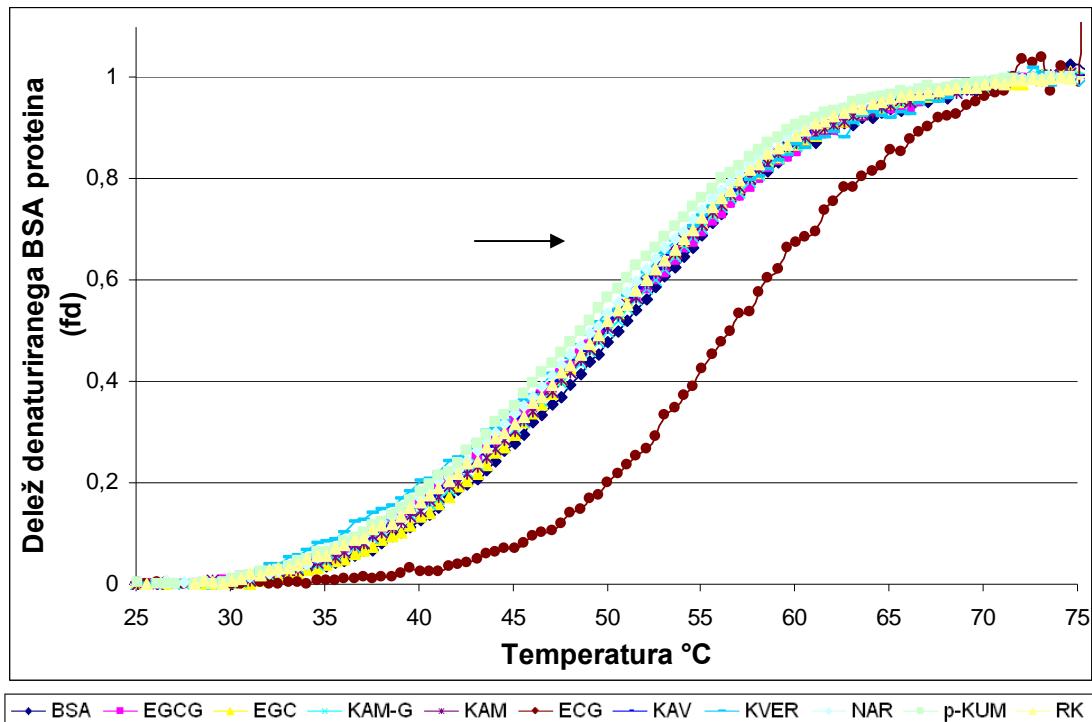
4.1.2.2 Rezultati termične denaturacije BSA proteina z različnimi polifenolnimi spojinami

Spremembo temperature denaturacije, ki je posledica interakcij ali vezave polifenolnih spojin na BSA protein smo določali na podlagi fluorescenčnih termogramov. Polifenolne spojine lahko stabilizirajo BSA protein (pričakujemo višjo temperaturo denaturacije) ali destabilizirajo (pričakujemo nižjo temperaturo denaturacije). Iz fluorescenčnih termogramov smo tudi preverili ali je proces denaturacije BSA proteina reverzibilen. To smo preverili tako, da smo poleg prvega segrevanja od 20 do 95 °C (Slika 39: A, C) izvedli še drugo segrevanje vzorca v istem temperaturnem območju (Slika 39: B, D).



Slika 39: Intenziteta fluorescence merjene pri $\lambda_{\text{em}} = 339 \text{ nm}$ v odvisnosti od temperature pri $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$. Slika prikazuje normalizirane fluorescenčne denaturacijske krivulje za BSA in BSA z dodanimi polifenolnimi spojinami v molskem razmerju BSA : polifenolna spojine = 1 : 1.

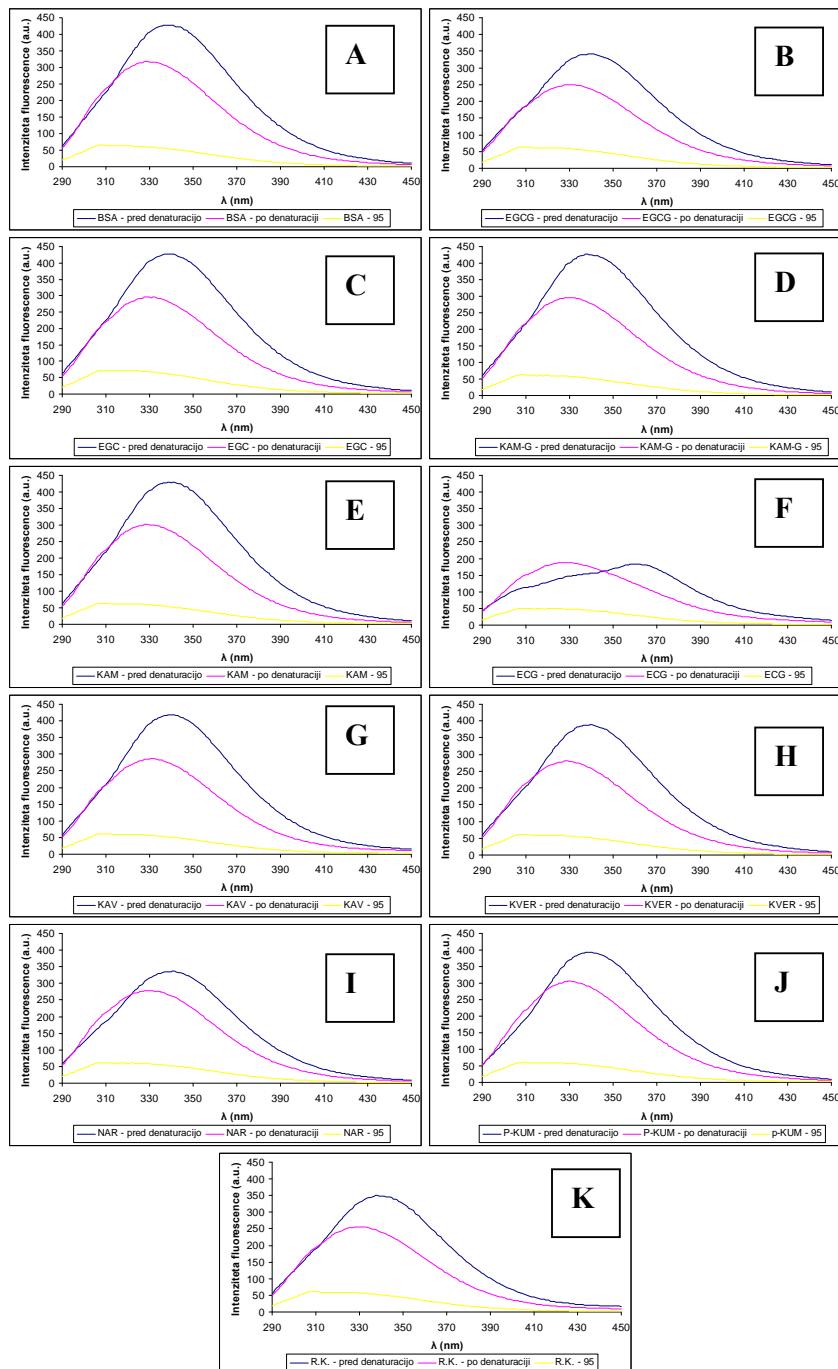
Iz enakega način kot je predstavljen sliki 35 smo določili enačbe premic, ki smo jih uporabili za izres krivulj deleža denaturiranega SEB proteina (fd) v odvisnosti od temperature. Iz naklona premice (Slika 40) dobimo vse potrebne podatke za določitev temperature denaturacije (T_d) in izračun termodinamske vrednosti po enačbi 21 ($\Delta H^0(T_d)$) kar je natančneje prikazano na sliki 23.



Slika 40: Deleže denaturiranega BSA proteina v odvisnosti od temperature ($\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 339 \text{ nm}$, pH = 7,5)

Iz slike 40 lahko opazimo, da ECG krivulja odstopa iz povprečja iz česar lahko sklepamo, da je verjetno prišlo do vezave ECG na BSA protein.

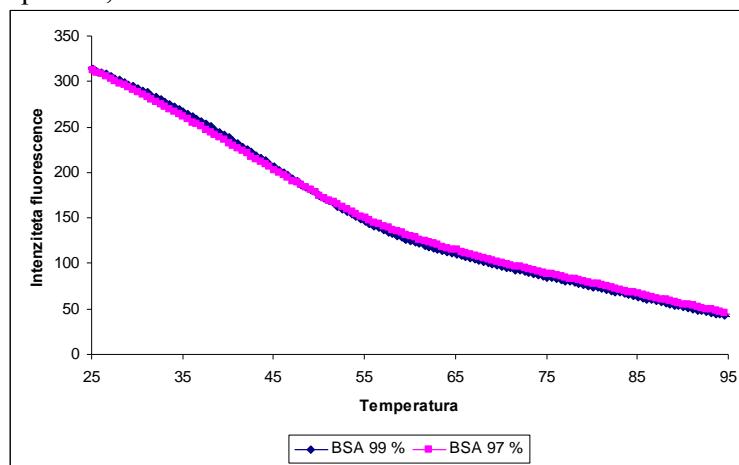
Slika 41 prikazuje fluorescenčne spektre za BSA protein (A) in BSA protein ob dodatku EGCG (B), EGC (C), KAM-G (D), KAM (E), ECG (F), KAV (G), KVER (H), NAR (I), p-KUM (J), RK (K). Pogoji merjenja so isti kot pri pogojih termične denaturacije BSA proteina. Spektri so posneti v območju valovnih dolžin od 290 – 600 nm, $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$. Fluorescenčni spektri so bili posneti pred termično denaturacijo pri temperaturi 20 °C (moder spekter), ob končani termični denaturaciji pri temperaturi 95 °C (rumen spekter) in po termični denaturaciji, ko smo vzorec ohladili na 20 °C (vijoličen spekter).



Slika 41: Fluorescenčni spektri BSA proteina in BSA proteina ob dodatku polifenolnih spojin merjenega v odvisnosti od valovne dolžine ($\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 339 \text{ nm}$) pred termično denaturacijo (moder spekter), pri $95 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (rumen spekter) in po termični denaturaciji (vijoličen spekter). Oznake na spektrih si sledijo: BSA protein (A) in BSA protein ob dodatku EGCG (B), EGC (C), KAM-G (D), KAM (E), ECG (F), KAV (G), KVER (H), NAR (I), p-KUM (J) in RK (K) v molskem razmerju 1 : 1.

Na podlagi dobljenih rezultatov (Slika 41) lahko po vsej verjetnosti potrdimo, da termična denaturacija BSA proteina ni popolnoma reverzibilen proces.

Zanimalo nas je tudi, ali čistost proteina vpliva na potek denaturacijske krivulje BSA proteina in ali vpliva na spremembo temperature denaturacije in termodinamske vrednosti. Slika 42 prikazuje fluorescenčni termogram za BSA protein pripravljenem v 20 mM HEPES pufru s pH = 7,5.



Slika 42: Intenziteta fluorescence merjena v odvisnosti od temperature ($\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 339 \text{ nm}$). Slika prikazuje normalizirane fluorescenčne denaturacijske krivulje za BSA z 99-odstotno čistostjo in BSA z 97-odstotno čistostjo.

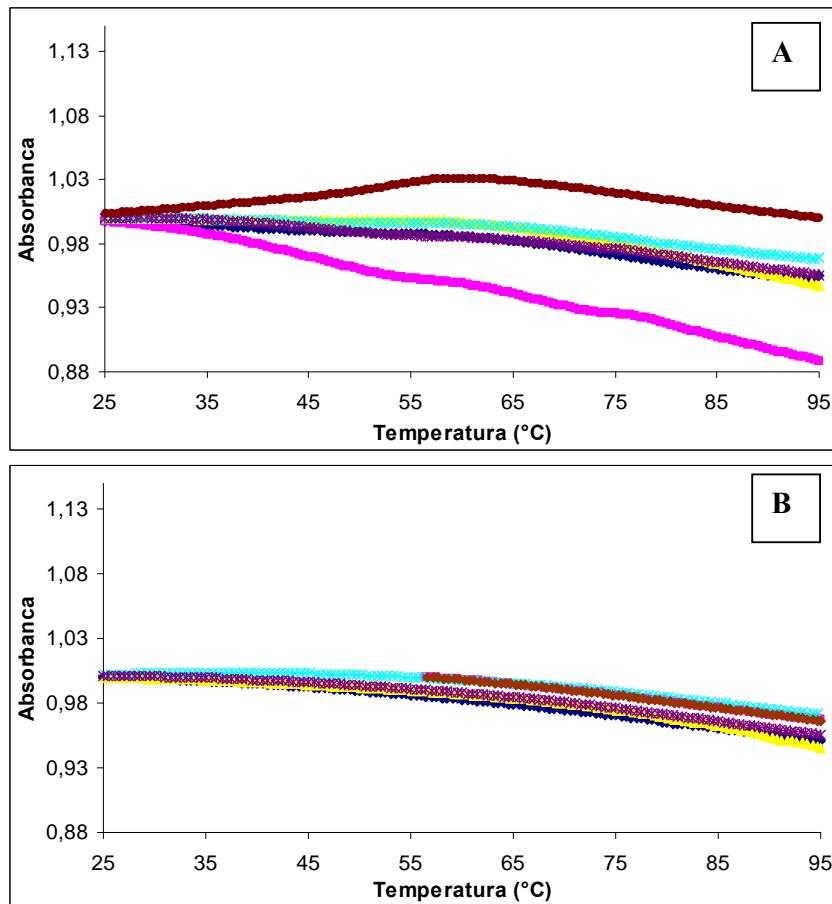
Ugotovili smo, da je vpliv čistosti v primeru BSA proteina malenkosten, kar prikazuje preglednica 13.

Preglednica 13: Termodinamski profil termične denaturacije BSA proteina v prisotnosti različnih polifenolnih spojin pri pH = 7,5

Molsko razmerje 1 : 1	T _d (K)	ΔH°(T _d) (kJ/mol)
BSA 99 %	323,8 ± 0,2	147 ± 1
BSA 97 %	325,4 ± 0,2	127 ± 2
EGCG	323,0 ± 0,2	131 ± 2
EGC	323,0 ± 0,2	150 ± 3
KAM-G	323,2 ± 0,2	142 ± 2
KAM	323,2 ± 0,2	144 ± 5
ECG	329,8 ± 0,2	181 ± 4
KAV	322,8 ± 0,2	142 ± 3
KVER	322,4 ± 0,2	136 ± 2
NAR	322,4 ± 0,2	142 ± 1
p-KUM	321,8 ± 0,2	142 ± 2
R.K.	322,8 ± 0,2	140 ± 4

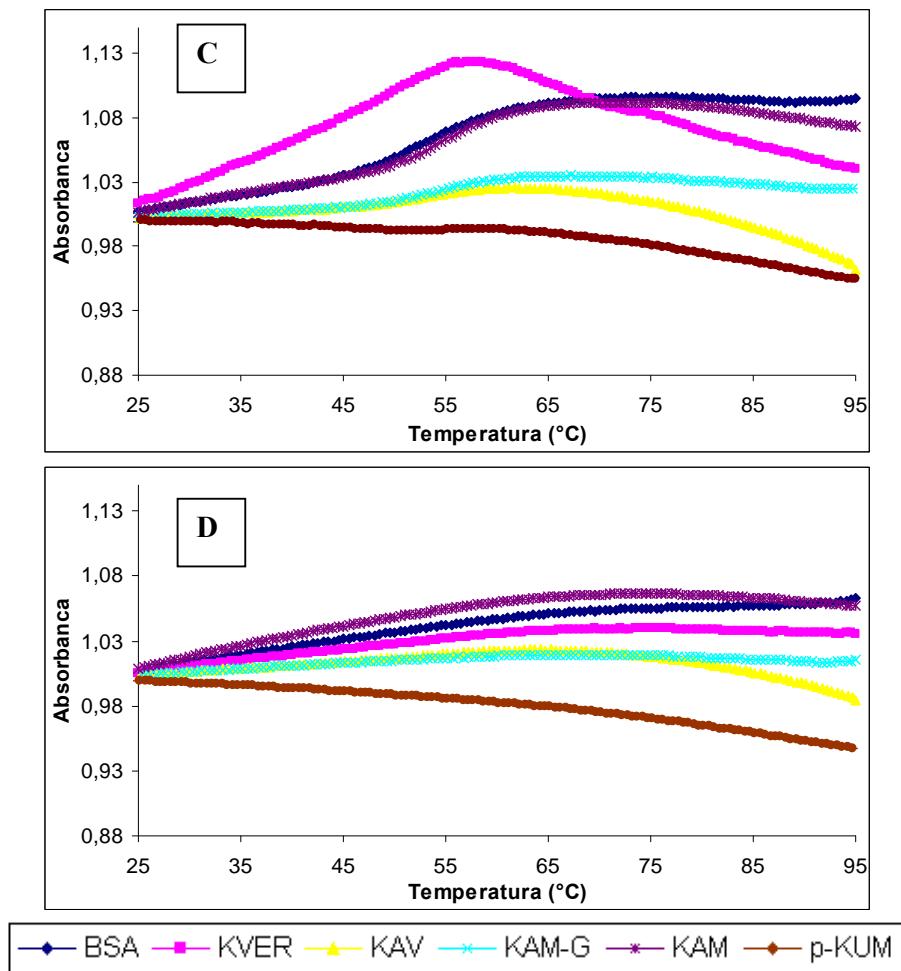
4.1.3 Spremljanje spremembe temperature denaturacije z UV-VIS spektroskopijo za BSA

Tekom našega eksperimentalnega dela smo žeeli uporabiti tudi UV-VIS spektroskopijo za določanje temperature denaturacije. Vemo, da je UV-VIS spektroskopija manj natančna in občutljiva od fluorimetrije. Poleg tega pa je zahtevana koncentracija vzorca v kiveti v primerjavi s fluorimetrijo visoka. V našem primeru smo za fluorimetrijo uporabljali BSA s koncentracijo $\approx 0,08$ mg/ml in za UV-VIS spektrometrijo $\approx 0,8$ mg/ml. Za proučevanje primerjave UV-VIS spektrometrije in fluorimetrije smo iz ekonomičnih razlogov uporabljali samo BSA protein. Enako kot pri fluorimetriji smo tudi z uporabo UV-VIS spektrometrije žeeli določiti temperaturo denaturacije BSA proteina ob dodatku različnih polifenolnih spojin. Prav tako pa smo žeeli preveriti ali je denaturacijski proces reverzibilen in sicer tako, da smo izvedli najprej prvo segrevanje od 20 do 95 °C (A, C) in nato še drugo prav tako od 20 do 95 °C (B, D).



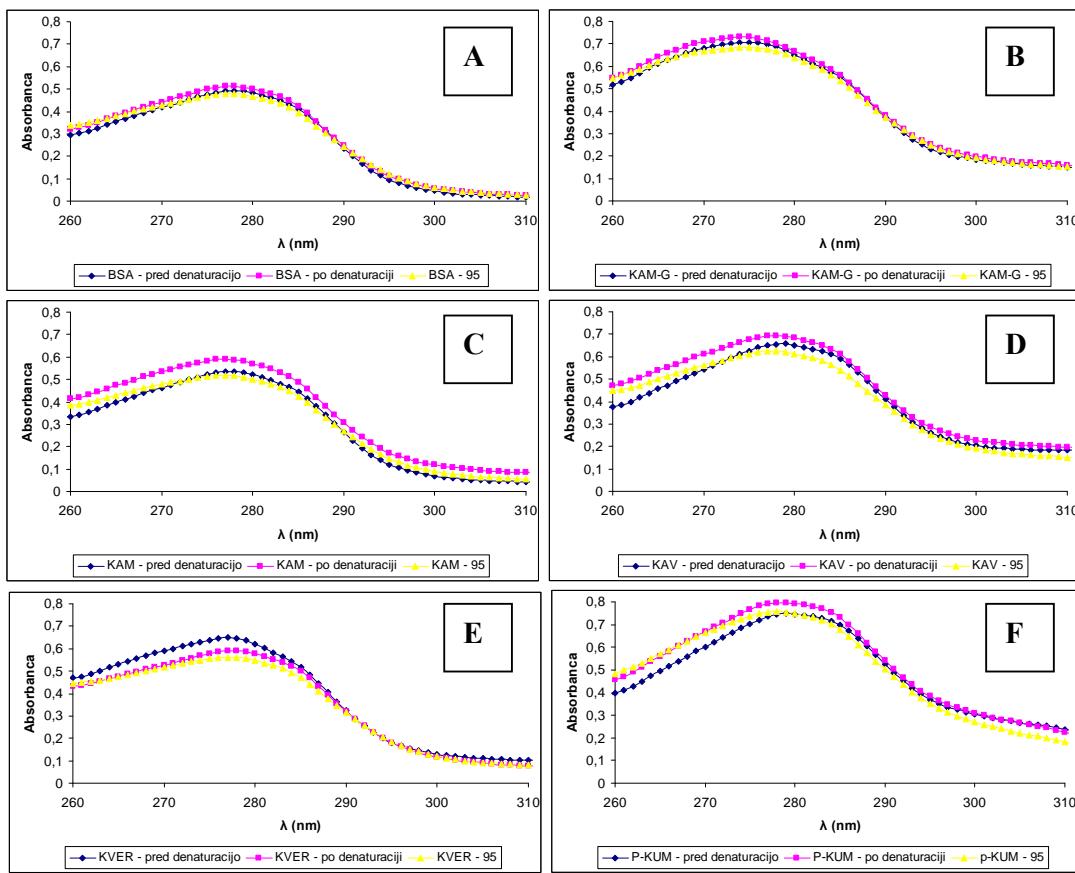
Slika 43: Absorbanca v odvisnosti od temperature spremljana pri valovni dolžini $\lambda = 280$ nm (A,B) in pri $\lambda = 293$ nm (C, D). Slika prikazuje normalizirane absorpcijske denaturacijske krivulje za BSA in BSA z dodanimi polifenolnimi spojinami v molskem razmerju BSA : polifenolna spojina = 1 : 1.

se nadaljuje



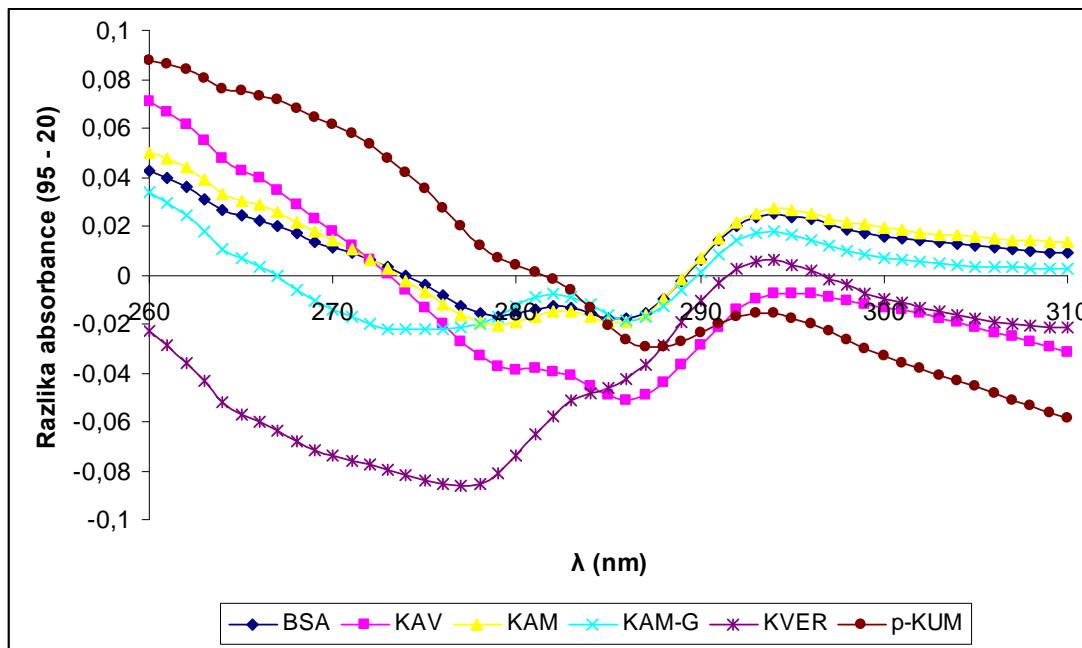
nadaljevanje

Slika 43: Absorbanca v odvisnosti od temperature spremljana pri valovni dolžini $\lambda = 280$ nm (A,B) in pri $\lambda = 293$ nm (C, D). Slika prikazuje normalizirane absorpcijske denaturacijske krivulje za BSA in BSA z dodanimi polifenolnimi spojinami v molskem razmerju BSA : polifenolna spojina = 1 : 1.



Slika 44: Absorpcijski spektri posneti za BSA protein (A) in BSA protein z ustreznimi polifenolnimi spojinami KAM-G (B), KAM (C), KAV (D), KVER (E) in p-KUM (F) v molskem razmerju BSA protein : polifenolna spojina = 1 : 1 pri spremeljanju termične denaturacije vzorca pri $\lambda = 280$ nm. Absorpcijski spektri so bili posneti pred termično denaturacijo na 20 °C (moder spekter), po končani temeperurni denaturaciji na 95 °C (rumen spekter) in ponovno ohljenemu vzorcu na 20 °C (vijoličen spekter).

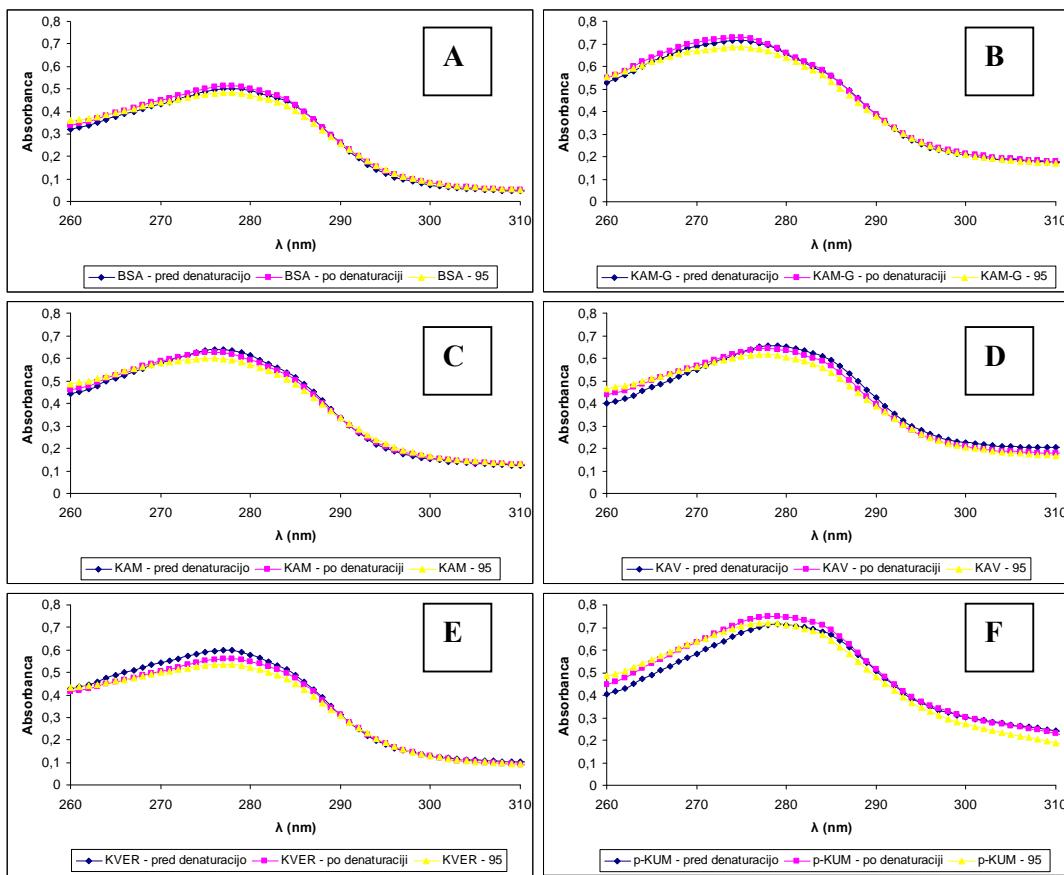
Za prikaz zgoraj navedenih polifenolnih spojin smo se odločili, ker smo dobili od vseh spojin najboljše rezultate za termično denaturacijo ravno za te spojine. Pri ostalih spojinah nismo dobili UV-termograme katere nismo mogli uporabiti za nadaljno obdelavo.



Slika 45: Razlika absorpcijskih spektrov, pomerjenih pri 95 °C in absorpcijskih spektrov, pomerjenih pri 20 °C, pred izvedbo termične denaturacije pri $\lambda = 280$ nm.

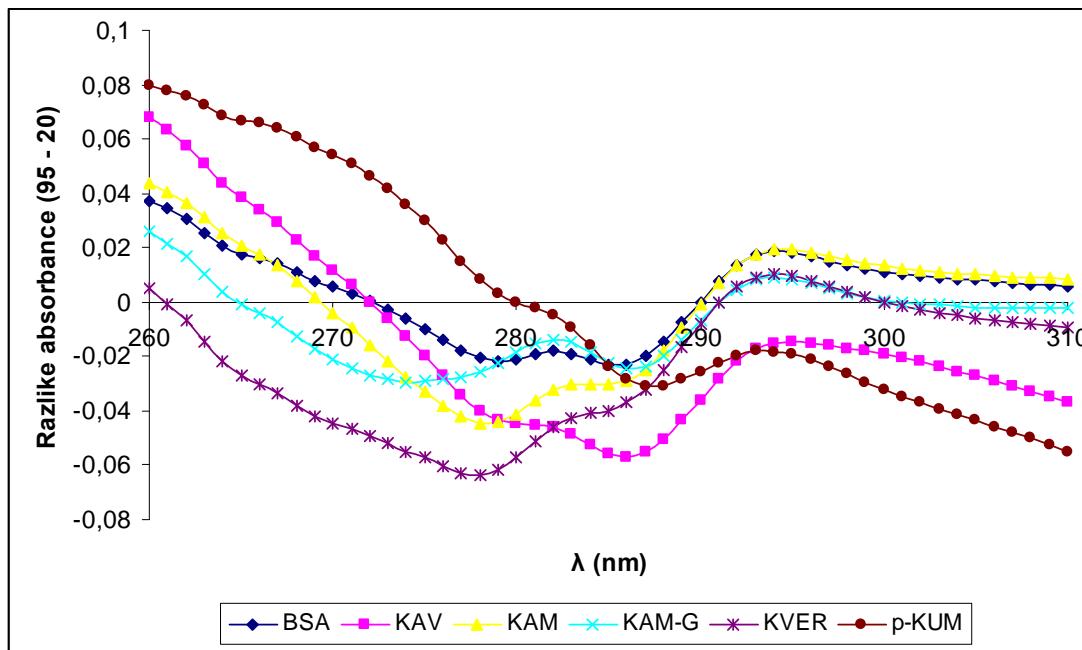
Preglednica 14: Termodinamski profil termične denaturacije BSA v prisotnosti KAM, dobljen z UV-VIS spektrofotometrijo pri valovni dolžini 280 nm in pH = 7,5.

Molsko razmerje 1 : 1	T _d (K)	ΔH°(T _d) (kJ/mol)
BSA	327,2 ± 0,2	218 ± 3
KAM	328,8 ± 0,2	291 ± 5



Slika 46: Absorpcijski spektri posneti za BSA protein (A) in BSA protein z ustreznimi polifenolnimi spojinami KAM-G (B), KAM (C), KAV (D), KVER (E) in p-KUM (F) v molskem razmerju BSA protein : polifenolna spojina = 1 : 1 pri spremeljanju termične denaturacije vzorca pri $\lambda = 293$ nm. Absorpcijski spektri so bili posneti pred termično denaturacijo na $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (moder spekter), po končani temeperurni denaturaciji na $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ (rumen spekter) in ponovno ohljenemu vzorcu na $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (vijoličen spekter).

Za prikaz omenjenih in ne vseh polifenolnih spojin smo se odločili, ker smo dobili od vseh spojin najboljše rezultate ravno za te spojine.



Slika 47: Razlika absorpcijskih spektrov pomerjenih pri 95 °C, in absorpcijskih spektrov, pomerjenih pri 20 °C, pred termično denaturacijo BSA pri $\lambda = 293$ nm.

4.2 MOLEKULSKO MODELIRANJE

4.2.1 Rezultati molekulskega modeliranja za SEB protein

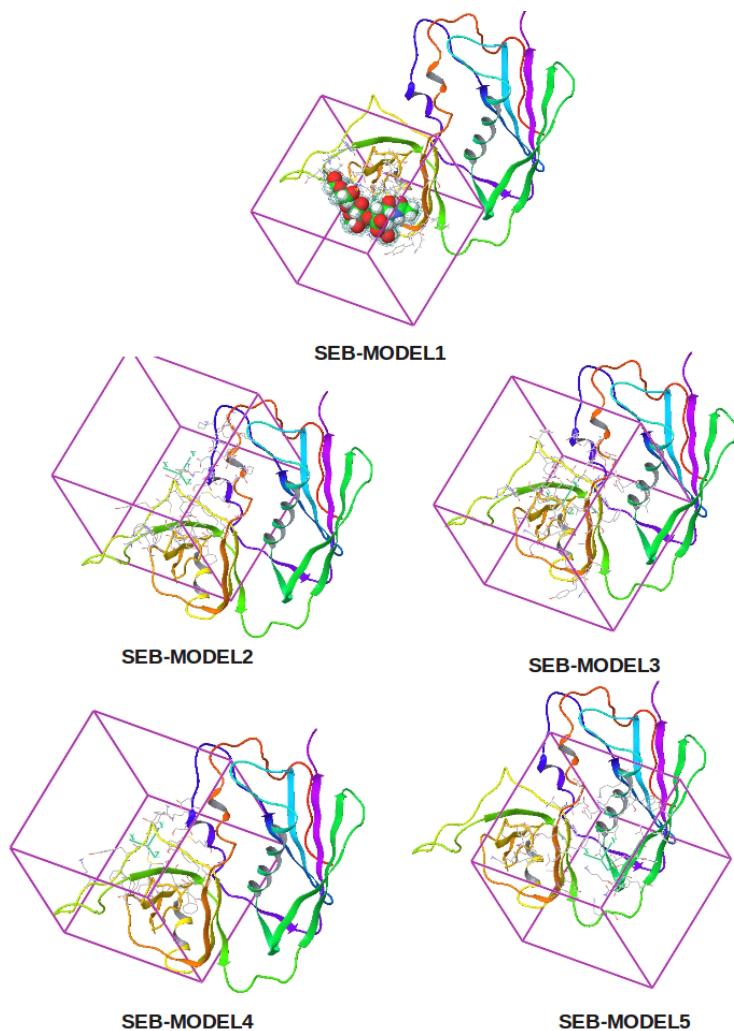
4.2.1.1 Molekulsko vgnezdenje s programom GLIDE za SEB protein

Postopek vgnezdenja molekul s programom GLIDE je sestavljen iz več faz, in sicer: priprava tarče (receptorja); izračun interakcijskih mrež; priprava ligandov; vgnezdenje; vizualizacija in analiza rezultatov.

3D strukturo stafilokoknega enterotoksina B smo našli pod oznako 1SE3 v podatkovni banki proteinskih struktur PDB. Omenjena struktura ima poleg proteinskega dela še kompleksiran oligosaharidni del ganglioza GM3. Protein smo pripravili s skriptnim programom Protein Preparation Wizard (poženemo ga v grafičnem vmesniku Maestro – programskega paketa Schrödinger suite), ki po vrsti izvede naslednje operacije: v prvi fazi določi red vezi za vse vezi v proteinski strukturi, proteinu doda vodike, izbriše vse vode, ki so za več kot nastavljeno razdaljo oddaljene od proteina (v našem primeru smo zbrisali vse vode); v drugi fazi program določi vsa možna protonacijska in tautomerna stanja, v katerem se lahko nahaja ligand; tej fazi sledi za izbrano protonacijsko/tautomerno stanje optimizacija mreže vodikovih vezi v proteinu; v zadnji fazi molekulo še energijsko minimiziramo s programom Impact (Schrödinger suite; polje sil – OPLS2001, konvergenčni kriterij – RMSD = 0,30 Å). Tako pripravljeno strukturo receptorja lahko uporabimo kot osnovo za izdelavo interakcijskih mrež.

V naslednji fazi uporabimo tako pripravljen receptor za izdelavo (izračun) interakcijskih mrež. Če ima tarčni protein že vgnezden ligand, v območju katerega nameravamo raziskati, le tega vzamemo za izhodišče pri izgradnji interakcijskih mrež. V našem primeru smo imeli v vezavno mesto tarčnega proteina vgnezden GM3. To mesto nam je služilo za postavitev prve mreže, in sicer tako, da smo središče mreže postavili v središče GM3 (Slika 48: SEB-Model 1). Ostala štiri vezavna mesta pa smo poiskali s programom SiteMap, ki je del programskega paketa Schrödinger Suite. Sledila je izdelava interakcijskih mrež s programom GlideGrid (za SEB-Model 1), ki na podlagi podanih parametrov izračuna mreže interakcijskih polj. Izračunane mreže so shranjene v datoteki arhivskega tipa. Programa za vgnezdenje Glide uporabi podatke shranjene v tej datoteki za izračun interakcij med receptorjem in ligandom. Središča preostalih štirih mrež smo določili na podlagi podatkov, dobljenih s programom SiteMap. Slika 48 prikazuje pet različnih območij, v katerih je program GlideGrid izračunal interakcijska polja.

Ligandi oz. 2D strukture polifenolnih spojin ki smo jih uporabili v naši študiji, so predstavljeni v preglednici 5.



Slika 48: Prikaz pet različnih modelov za katere smo s programom GlideGrid (SEB-Model 1) in programu SiteMap (za ostale štiri modele) izračunali interakcijska polja.

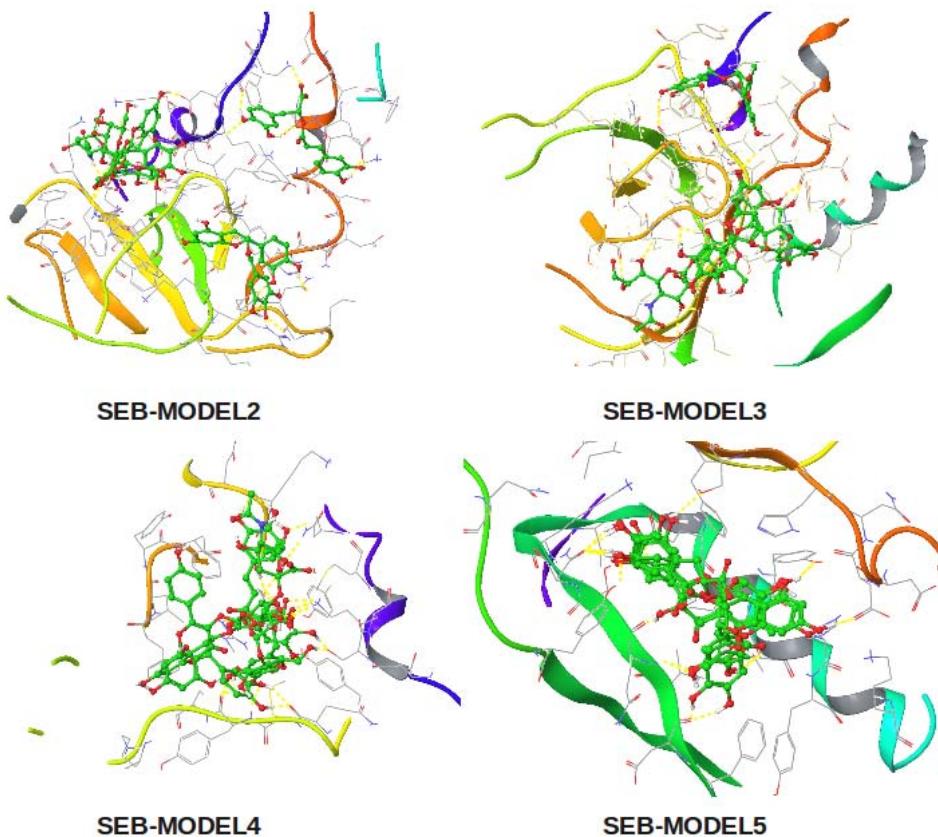
Vgnezdenje molekul smo izvršili s programom Glide (ver. 5.0), ki ponuja tri postopke vgnezdenja, in sicer Glide HTVS (High Throughput Virtual Screening), Glide SP (Standard Precision) in Glide XP (Extra Precision). Ker smo imeli ligandov relativno malo, smo se odločili za uporabo najbolj natančnega postopka – Glide XP. Receptor je bil v postopku vgnezdenja rigiden – uporabil sem vnaprej izračunane interakcijske mreže. Pri ligandih so se poleg njihovih položajev in orientacij glede na receptor spremojali tudi torzijski koti njihovih vrtljivih (enojnih) vezi.

Rezultati vgnezdenja polifenolnih ligandov na pet modelov SEB proteina so predstavljeni v preglednici 15.

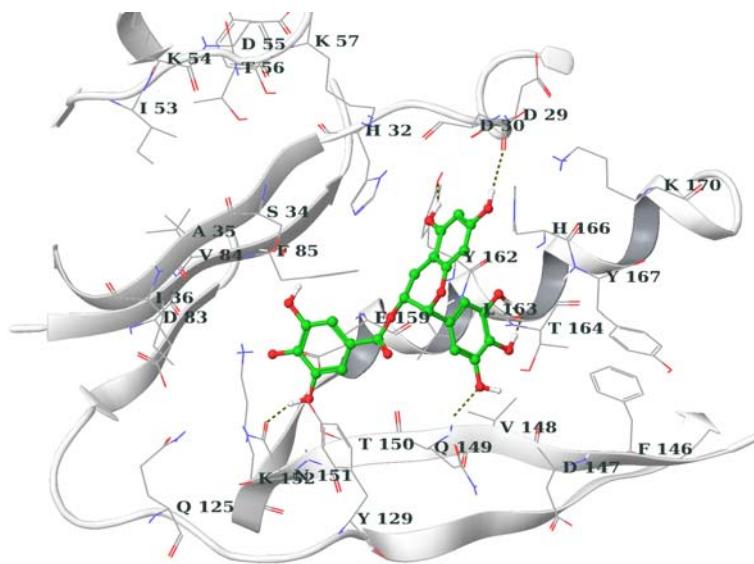
Preglednica 15: Rezultati vgnezdenja polifenolov na modele SEB proteina

Ligand	GlideXP Score (kcal /mol)				
	Model1	Model2	Model3	Model4	Model5
GM3*	-8,84	-8,26	-8,98	-8,56	-7,83
EGCG	-6,03	-8,02	-7,98	-6,81	-10,46
EGC	-5,51	-6,47	-8,14	-6,69	-9,47
KAM-G	-5,66	-5,73	-5,98	-6,97	-8,73
KAM	-1,68	-4,49	-6,81	-4,31	-6,51

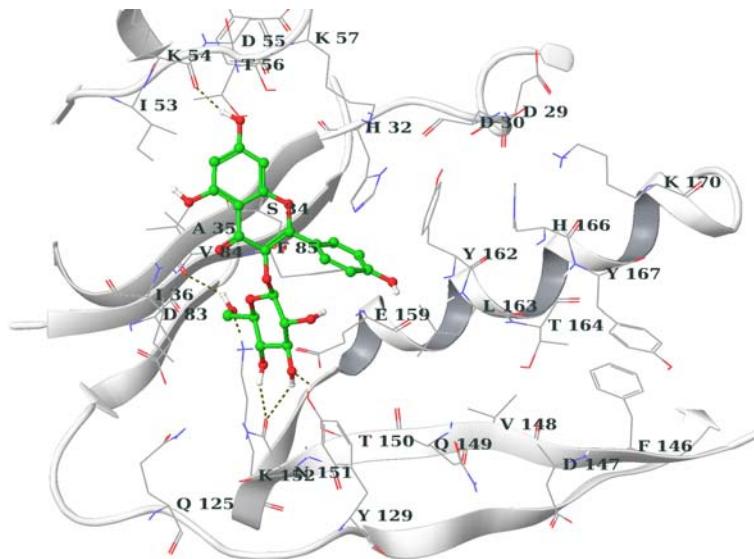
* Izračunali smo GlideXP Score vrednosti za GM3. Izmed vseh rezultatov za GlideXP Score vidimo, da ima GM3 v vseh modelih razen 5, najvišje vrednosti GlideXP Score, kar naj bi pomenilo, da se ta zdravilna učinkovina dobro veže na SEB protein.



Slika 49: Prikaz štirih modelov (SEB-Model 2-5) in poze štirih ligandov z najnižjo vrednostjo GlideXP Score



Slika 50: EGCG vgnezden v potencialno vezavno mesto na SEB proteinu – model 5
(Ogljiki liganda so zeleni, proteina BSA pa sivi)



Slika 51: KAM-G vgnezden v potencialno vezavno mesto na SEB proteinu – model 5
(Ogljiki liganda so zeleni, proteina BSA pa sivi)

4.2.2 Rezultati molekulskega modeliranja za BSA protein

4.2.2.1 Modeliranje proteina BSA s programom YASARA

Ker 3D strukture proteina BSA nismo našli v podatkovni bazi proteinskih struktur (PDB), smo strukturo omenjenega proteina zgradili z metodo na osnovi homologije, uporabili pa smo programski paket YASARA Structure. Izgradnjo 3D strukture proteina smo začeli z izbiro ustrezne aminokislinske sekvene BSA proteina. Ustrezno sekvenco smo našli na strežniku UniProtKB/Swiss-Prot pod oznako P02769. Program YASARA v prvem koraku zahteva sekvenco v zapisu FASTA, za BSA je sekvenca podana spodaj:

```
>BSA
MKWVTFISLLLFFSSAYSRGVFRDTHKSEIAHFKDLGEEHKGLVLIAFSQYLQQCPF
DEHVKLVNELTTEFAKTCVADESHAGCEKSLHTLFGDELCKVASLRETYGDMADCCEKQEP
ERNECFLSHKDDSPDLPKLKPDPNTLCDEFKADEKKFWGKYLYEIARRHPYFYAPELLYY
ANKYNGVFQECCQAEDKGACLLPKIETMREKVЛАSSARQRLRCASIQKGERALKAWSVA
RLSQKFPKAEEFVEVTKLVTDLTKVHKЕCCHGDLLECADDRADLAKYICDNQDTISSKLKE
CCDKPLLEKSHCIAEVKAIPENLPLTADFAEDKDVKNYQEAKDAFLGSFLYEYSRR
HPEYAVSVLLRAKEYEATLEECCAKDPPHACYSTVFDKLKHLVDEPQNLIKQNCDQFEK
LGEYGFQNALIVRYTRKVPQVSTPTLVEVSRSLGKVГRCCTKPESERMPCTEDYLSLIL
NRLCVLHEKTPVSEKVTKCCTESLVNRRPCFSALTPDETYVPKAFDEKLFTFHADICTLP
DTEKQIKKQTALVELLKHKPKATEEQLKTMENFVAFVDKCAADDKEACFAVEGPKLVV
STQTALA
```

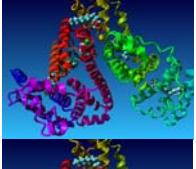
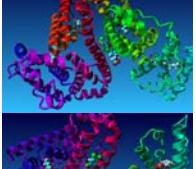
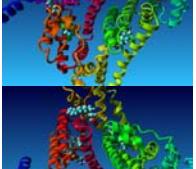
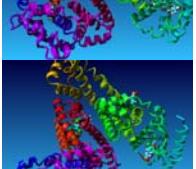
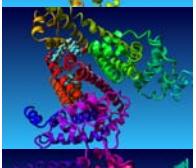
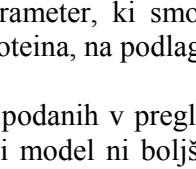
Sekvenca predstavlja aminokislinski zapis za BSA protein sestavljen iz zaporedja 607 aminokislin.

Parametri, ki smo jih nastavili za delovanje YASARE so bili standardni: za hitrost modeliranja smo izbrali počasen (boljši) način; število PSI-BLAST iterakcij smo omejili na 6; število predlog (templates), uporabljenih za modeliranje 3D strukture BSA je bilo do 10; v primeru, da je bilo na voljo več predlog z določeno sekvenco, smo od teh predlog uporabili le eno samo; število vzorčenj za vsako zanko v BSA je bilo 50.

YASARA je glede na podane parametre najprej s programom PSI-BLAST predložila 13 struktur, katerih sekvence so podobne sekvenci tarčnega proteina (BSA). V skladu s pričakovanji je PSI-BLAST na prvih osem mest razporedil sekvence za človeški serumski albumin (HSA), katerega sekvenca se le za 4 % razlikuje od tarčnega proteina – govejega serumskega albumina (BSA). Ostale predložene strukture so vsebovale sekvence človeškega proteina, ki veže D vitamin, tudi sekvenca tega proteina je zelo podobna tarčnemu proteinu, zaporedje obeh omenjenih sekvenc je v 75 % enako.

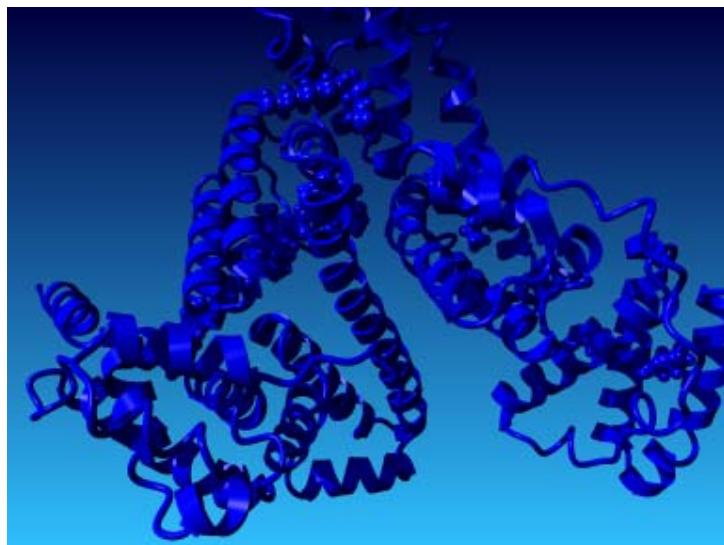
YASARA je nato na osnovi teh predlog zgradila 8 modelov, ki so podani v preglednici 16.

Preglednica 16: Izhodne strukture na osnovi homologije, dobljene s programom YASARA za BSA protein

Zap. št.	Z-score	Struktura	ID-modela	Komentar
1	0,42		2BXK-A	Optimalno
2	0,17		1HK5-A	Optimalno
3	0,11		1BKE_A	Optimalno
4	0,1		3CX9-A	Optimalno
5	0,07		1HK3-A	Optimalno
6	-0,02		2I2Z-A	Dobro
7	-0,06		1TF0_A	Dobro
8	-0,42		2VDB-A	Dobro

Opombe: Z-Score – statistični parameter, ki smo ga uporabili kot merilo za kakovost modela; ID-modela – PDB koda proteina, na podlagi katerega je zgrajen model.

YASARA je na podlagi modelov, podanih v preglednici 16, poskušala narediti »Hibridni model«. Izkazalo se je, da hibridni model ni boljši od modela pod zaporedno številko 1 (najvišji Z-score). Končni model BSA, ki smo ga uporabili za študij vezave polifenolnih spojin, je prikazan na sliki 52.



Slika 52: Struktura BSA zgrajena s pomočjo programom »YASARA Structure« z uporabo modula za modeliranja na osnovi homologije

Struktura z oznako 2BXK-A je zgrajena na predlogi kristalne strukture človeškega serumskega albumina (HSA), v katerega sta vgnezdena dva liganda azapropazon² in indometacin³, v podatkovni bazi proteinskih struktur najdemo to strukturo pod oznako 2BXK.

4.2.2.2 Molekulsко vgnezdenje s programom GLIDE za BSA protein

V našem primeru smo kot tarčo uporabili strukturo govejega serumskega albumina (BSA) zgrajeno na osnovi homologije s programom YASARA Structure. Strukturo BSA z oznako 2BXK-A smo dodatno obdelali s skriptnim programom Protein Preparation Wizard po identičnem postopku, kot v primeru priprave proteina SEB.

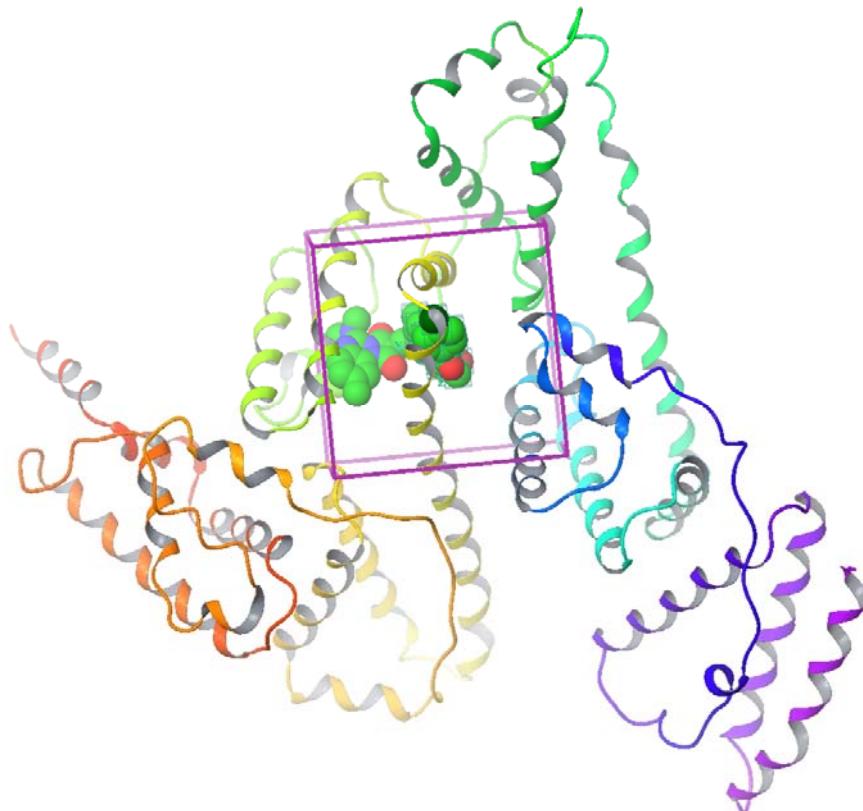
Za vezavo polifenolov smo predvideli tri vezavna mesta. V našem primeru smo imeli v vezavno mesto tarčnega proteina vgnezdena dva manjša liganda (indometacin in azapropazon), zato smo mreže pripavili tako, da smo najprej središče mreže postavili v središče indometacina (Model 1), nato v središče azapropazona (Model 2), v zadnjem primeru pa smo središče mreže postavili v točko med obema ligandoma v receptorskem mestu (Model 3).

Slika 53 prikazuje območje okoli indometacina (stranica kocke, v kateri je definirana mreža, in meri 20 Å). Program GlideGrid nato na enak način kot v primeru SEB proteina izračuna mreže interakcijskih polj, ki se shranijo v datoteki arhivskega tipa. Program za

² Azapropazon – nesteroidno antivnetno zdravilo.

³ Indometacin – nesteroidno antivnetno zdravilo.

vgnezdenje Glide uporabi podatke shranjene v tej datoteki za izračun interakcij med receptorjem in ligandom.



Slika 53: Struktura kompleksa govejega serumskega albumina z ligandoma indometacinom in azopropazonom

Za izvedbo vgnezdenja poleg receptorja potrebujemo tudi ligande, ki jih želimo v receptor vgnezdit. V našem primeru smo ligande izrisali s programom Marvin Sketch (msketch) in jih shranili v obliki sdf formata. V preglednici 5 so 2D stukture ligandov, ki smo jih uporabili tekom študije.

Program LigPrep (Schrödinger Suite) smo uporabili za pripravo ligandov. Program LigPrep je v našem primeru najprej pretvoril 2D strukture ligandov v njihovo 3D reprezentacijo. Tem strukturam pa dodal strukture vseh možnih protonacijskih stanj v določenem območju pH območju (v našem primeru $\text{pH} = 7.0 \pm 2.0$), tautomer in stereoisomer.

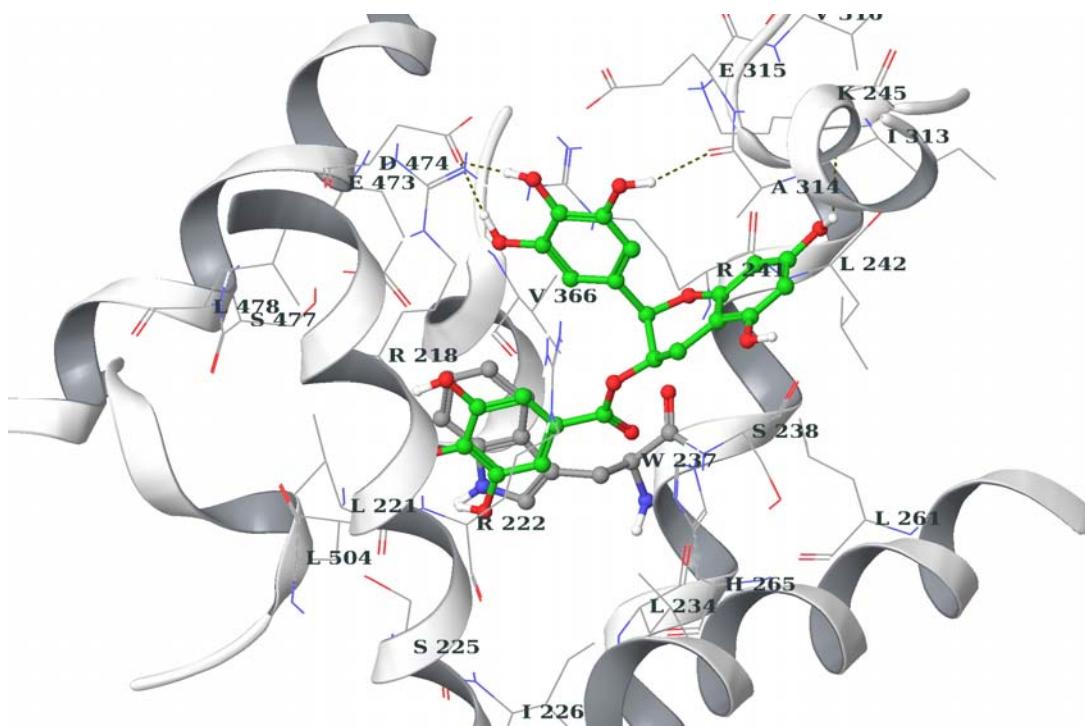
Molekulska vgnezdenje za BSA protein smo izvedli prav tako kot v primeru SEB proteina s programom Glide (ver. 5.0) in postopkom Glide XP (Extra Precision).

Rezultati vgnezdenja polifenolnih spojin na tri modele BSA so predstavljeni v preglednici 17.

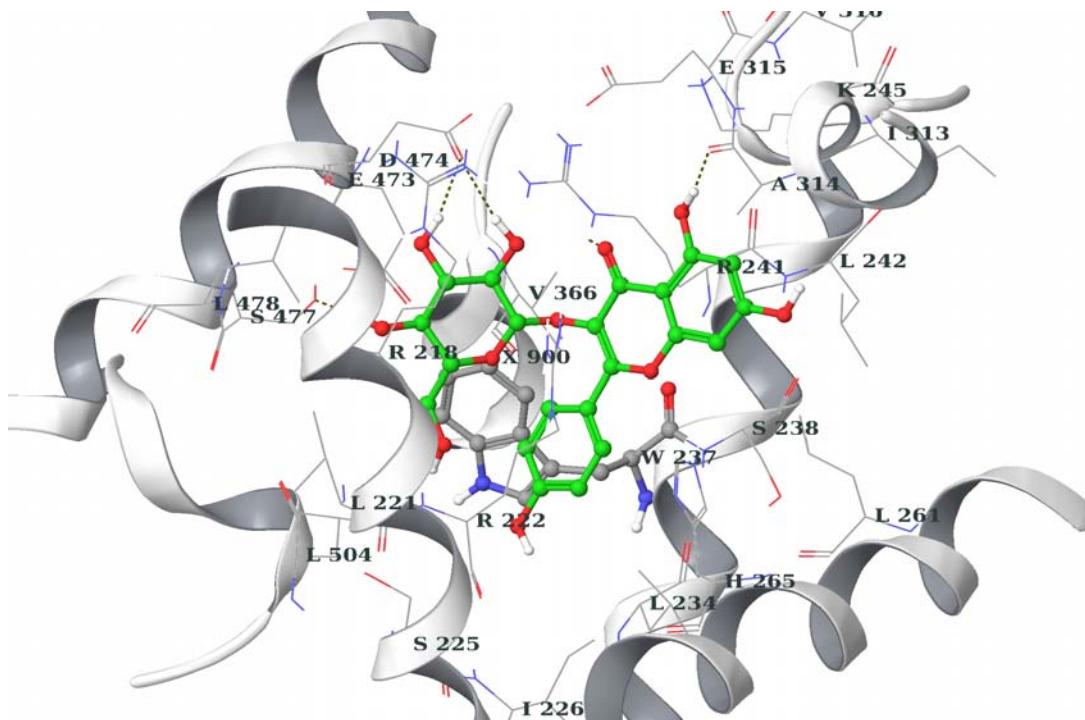
Preglednica 17: Rezultati vgnezdenja polifenolov na modele BSA

Ligand	GlideXP Score (kcal /mol)		
	Model1	Model2	Model3
Indometacin*	-9,82	-9,34	-9,99
Azapropazon*	-5,17	-5,66	-5,57
EGCG	-9,17	-9,05	-9,58
EGC	-5,9	-7,29	-6,55
KAM-G	-8,03	-8,57	-8,73
KAM	-7,98	-7,22	-7,87
ECG	-8,03	-8,61	-8,43
KAV	-4,45	-5,63	-4,46
KVER	-8,14	-7,99	-8,4
NAR	-7,42	-7,5	-8,17
p-KUM	-4,66	-4,86	-5,24
R.K.	-8,55	-9,16	-8,08

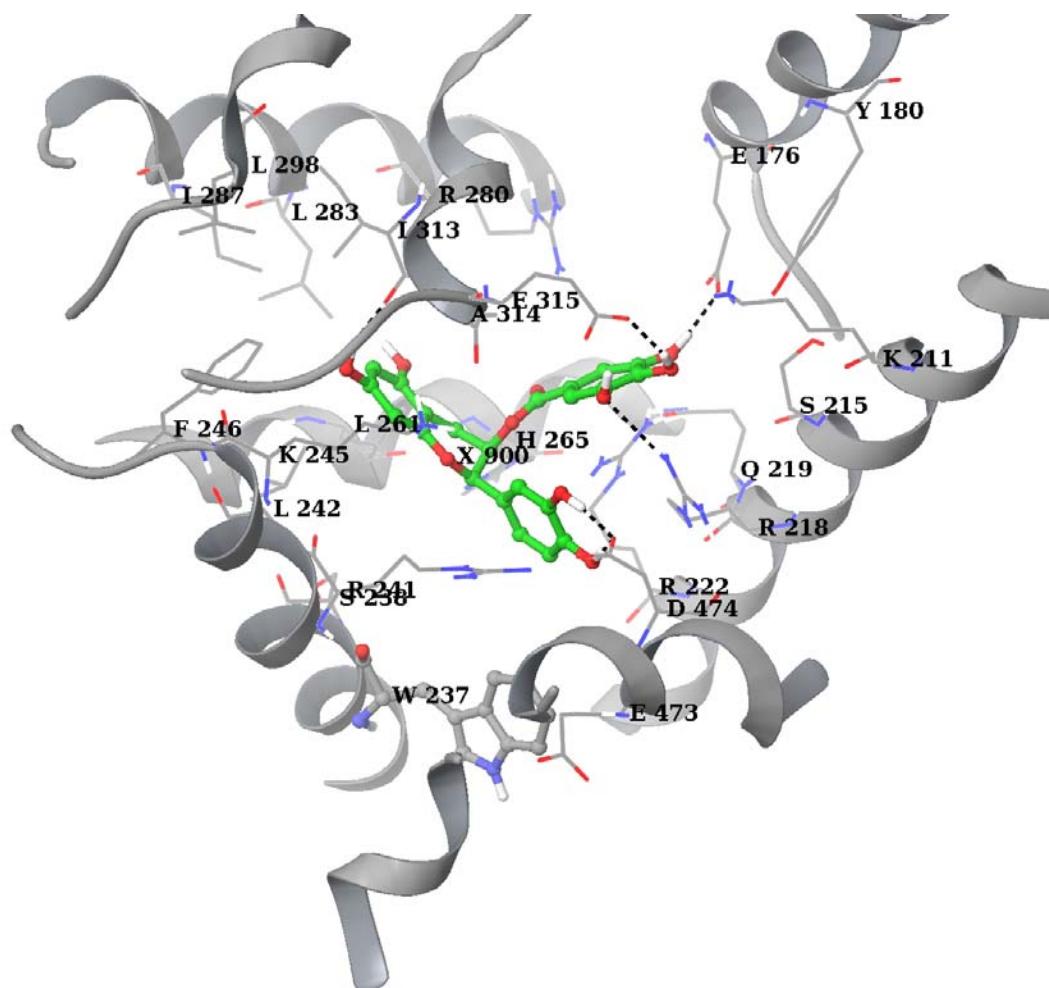
* Izračunali smo tudi GlideXP Score vrednosti za zdravilo indometacin in azopropazon. Izmed vseh rezultatov za GlideXP Score vidimo, da ima indometacin najvišje vrednosti GlideXP Score, kar naj bi pomenilo, da se ta zdravilna učinkovina dobro veže na BSA protein.



Slika 54: Vgnezdenje EGCG v BSA model št. 3 (Ogljiki liganda so zeleni, proteina BSA pa sivi)



Slika 55: Vgnezdenje KAM-G v BSA model št. 3 (Ogljiki liganda so zeleni, proteina BSA pa sivi)



Slika 56: Vgnezdenje EPKG oz. ECG v BSA model št. 3 (Ogljiki liganda so zeleni, proteina BSA pa sivi)

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 STAFILOKOKNI ENTEROTOKSIN B (SEB)

S fluorescenčno spektroskopijo smo analizirali interakcije med SEB proteinom in izbranimi polifenolnimi spojinami: EGCG, EGC, KAM-G in KAM. Rezultati interakcij med proteinom in polifenolnimi spojinami so odvisni od strukture samega proteina, okolja v katerem se protein nahaja ter lastnosti polifenolnih spojin.

K fluorescenci raztopine proteina prispevajo največ aromatske aminokisline, med katerimi je Trp najmočnejši fluorofor (Lakowicz, 2006). Molekulska masa SEB proteina je 28 kDa. Sestavlja ga ena sama polipeptidna veriga zgrajena iz 239 aminokislinskih ostankov. V primarni strukturi SEB proteina je le en Trp, enaindvajset Tyr in 12 Phe (Preglednica 9). V strukturi SEB proteina se Trp–197 nahaja v notranjosti 3D strukture in je manj dostopen za interakcije z dušilci, posledično je dušenje manjše (Singh in sod., 1988).

Pri vzbujanju raztopine SEB proteina v 20 mM HEPES pufru s pH = 7,5 pri valovni dolžini $\lambda_{ex} = 275$ nm in $\lambda_{ex} = 295$ nm sta bila vrhova emisijskega spektra pri ≈ 326 nm in ≈ 328 nm (Sliki 27 in 28). Te vrednosti so podobne objavljenim rezultatom analize SEB proteina (10 mM Na-fosfatni pufer, pH = 7,2), pri kateri je bil emisijski vrh pri 333 nm in $\lambda_{ex} = 295$ nm (Singh in sod., 1988).

Ob dodajanju polifenolnih spojin (EGCG, EGC, KAM-G in KAM) k raztopini SEB proteina se je intenziteta fluorescence zmanjševala ne glede na izbrano λ_{ex} , medtem ko premika $\lambda_{em\ max}$ ni bilo zaznati (Sliki 29). Rezultati nakazujejo, da ni prišlo do sprememb v neposredni okolici Trp, temveč da so se polifenolne spojine vgnezdale v bližnjo okolico Trp preostanka, zaradi česar pride do dušenja fluorescence.

Rezultate dušenja fluorescence lahko podamo tudi v obliki Stern-Volmerjevih grafov (Slika 30), ki prikazujejo odvisnost F/F₀ od množinske koncentracije dodane polifenolne spojine. V vseh primerih dodanih polifenolnih spojin je prikazana linearna odvisnost F/F₀ od množinske koncentracije polifenolne spojine, iz česar lahko sklepamo, da je do dušenja fluorescence prišlo zaradi istočasnih interakcij polifenolne spojine s fluoroforji na hidrofilni površini proteina in fluoroforji v hidrofobnih žepih proteina. Iz naklona premice lahko določimo Stern-Volmerjevo konstanto, K_{sv}. Vrednosti K_{sv} si sledijo od najnižje do najvišje vrednosti (od 360000 do 563000 M⁻¹ pri $\lambda_{ex} = 275$ nm in od 270000 do 390000 M⁻¹ pri $\lambda_{ex} = 295$ nm) za dodane polifenolne spojine v sledečem vrstnem redu: KAM, KAM-G, EGCG, EGC (Preglednica 10). Vse dodane polifenolne spojine uvrščamo med flavonoide. Razliko med različnimi vplivi dušenja posameznih dodanih flavonoidov lahko najverjetneje pripisemo njihovi strukturi, ki vpliva na interakcije v SEB proteinu. Največjo razliko opazimo med KAM in EGC. EGC je flavanol in se razlikuje od KAM, ki je flanonol, po številu hidroksilnih skupin v B obroču ter odsotnosti keto skupine na C obroču (Preglednica 3, Slika 3). EGCG, ki je ester EGC in galne kisline, pa ima manjši učinek dušenja od EGC a večji od KAM-G. Očitno ima glikoziliran flanonol manjši učinek dušenja kot pa ester flavanola.

Dobljene Ksv vrednosti za polifenolne spojine in SEB protein so 10^5 -krat večje od Ksv vrednosti za Γ in SEB (0 M^{-1}) ter za akrilamid ($4,41 \text{ M}^{-1}$) (Singh in sod., 1988). Γ je tipičen površinski dušilec, akrilamid pa hidrofoben. Iz primerjave lahko sklepamo, da se izbrane polifenolne spojine vežejo v notranjost proteina, najverjetneje v okolini Trp ter, da je interakcija KAM, KAM-G, EGCG, EGC močnejša od interakcije akrilamida s Trp.

S pomočjo molekulskega modeliranja z metodo molekulskega vgnezdenja s programom GLIDE smo poskušali določiti interakcije posameznih polifenolnih spojin s proteinom SEB. Kot najugodnejše vezavno mesto za polifenolne spojine smo izbrali model št. 5 (Preglednica 15, Slika 49). V izbranem vezavnem mestu se na izbrano vezavno mesto najbolje vgnezdi EGCG > EGC > KAM-G > KAM. Do vgnezdenja kateregakoli polifenola v izbrano vezavno mesto pride v največji meri zaradi vodikovih vezi med hidroksilnimi skupinami polifenolne spojine na flavonoidnem obroču A in B, hidroksilnih skupin na glikozidnem delu molekule, ter s stranskimi verigami pretežno polarnih aminokislin npr. Tyr-162, Glu-159, Asn-151 ali s skeletom polipeptidne verige SEB proteina (Priloga A). Za najmočnejšo vezavo EGCG so verjetno odgovorne tri vodikove vezi med hidroksilnimi skupinami na flavonoidnem obroču B in skeletom polipeptidne verige z aminokislinami Leu-163 in Gln-149 ter tri vodikove vezi s stranskimi verigami med hidroksilnimi skupinami preostalega dela molekule s stranskimi verigami polarnih aminokislin Tyr-162, Asp-30 in Asn-151. Najmanj učinkovito vgnezdenje pa smo določili pri KAM, ki pa je posledica interakcije le dveh vodikovih vezi z polarnimi aminokislinami Gln-149 in Asn-151. Iz vseh teoretičnih prikazov je razvidno, da gre najverjetneje za površinske interakcije polifenolnih spojin s polipeptidno verigo SEB. V tem modelu vezavnega mesta ni nobenega Trp.

Rezultati Stern-Volmerjevih grafov potrdijo najverjetnejšo površinsko interakcijo polifenolnih spojin s SEB proteinom, ovržejo pa zaporedje jakosti interakcij izbranih polifenolnih spojin s SEB proteinom glede na rezultate molekulskega vgnezdenja. Do razlike zaporedja jakosti interakcij polifenolnih spojin s SEB med eksperimentalnimi rezultati in molekularnim vgnezdenjem pride najverjetneje zaradi večjih dejanskih stericnih interakcij v raztopini SEB proteina in polifenolnih spojin, ki v modelu niso upoštevane.

Vezavo EGCG na SEB protein so potrdili tudi (Hisano in sod., 2003) z *in vitro* in *in vivo* raziskavami. Ugotovili so, da se EGCG hitro veže na imobilizirane SEB molekule, da je inhibicija SEB-a odvisna od koncentracije in časa inkubacije z EGCG ter da pri vezavi na SEB molekule EGCG ne povzroči spremembo molekulske mase SEB molekul ali degeneracije le-teh. Iz rezultatov so sklepali, da interakcija EGCG s SEB molekulami lahko povzroči konformacijske spremembe antigenskega mesta na molekulah ali pa da direktno blokira vezavo protitelesa na epitop.

Termično denaturacijo SEB proteina smo analizirali s pomočjo fluorescenčne spektroskopije raztopine SEB proteina v 20 mM HEPES pufru, $\text{pH} = 7,5$. Spektri so bili posneti pri dveh valovnih dolžinah vzbujanja ($\lambda_{\text{ex}} = 275 \text{ nm}$ in $\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$) in valovni dolžini emisije $\lambda_{\text{em}} = 328 \text{ nm}$ (Slika 34).

Med procesom termične denaturacije se z višanjem temperature oslabijo vodikove vezi, ojačajo pa hidrofobne interakcije. Z nadaljnjam segrevanjem lahko pride do razpada vodikovih vezi, ki stabilizirajo α -heliksno strukturo, zaradi česar pridejo hidrofobne skupine v stik s topilom in posledično do razvijanja polipeptidne verige ali sprememb strukture proteina. Te spremembe lahko spremljamo tudi s spremembami fluorescenčnih emisijskih spektrov.

Vpliv interakcije polifenolnih spojin na SEB protein smo analizirali tudi s termično denaturacijo, ki smo jo spremljali s fluorescenčno spektroskopijo. Termično denaturacijo smo preverili s segrevanjem SEB proteina s polifenolnimi spojinami v molskem razmerju 1 : 1 od 20 °C do 95 °C, reverzibilnost pa ohlajanjem na 20 °C in ponovnim segrevanjem na 95 °C (Slika 37 in 38). Pri segrevanju od 20 °C do 95 °C smo spremljali intenziteto fluorescence v odvisnosti od temperature pri $\lambda_{\text{ex}} = 275 \text{ nm}$ in $\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$ in $\lambda_{\text{em}} = 328 \text{ nm}$ (Slika 34).

Iz posnetih spektrov in po modelu enostopenjskega reverzibilnega prehoda (Enačba 20) smo določili delež molekul SEB proteina v denaturiranem stanju v odvisnosti od temperature in prisotnosti posamezne polifenolne spojine (Slika 36) ter pri deležu $f_d = 0,5$ kar pomeni, da je polovica molekul proteina SEB v denaturiranem stanju in polovica v natinivnem, določili temperaturo denaturacije (T_d) (Slika 23). Sprememba temperature denaturacije od vrednosti T_d natinivnega proteina (343 K) nam pove, ali polifenolna spojina vpliva na stabilnost proteina SEB. Iz preglednice 12 je razvidno, da se temperatura denaturacije bistveno ne spremeni zaradi prisotnih polifenolnih spojin. Iz tega lahko sklepamo, da so interakcije med polifenolnimi spojinami in SEB proteinom šibke, površinske. Določena temperatura denaturacije čistega SEB proteina (70 °C) je višja od T_d SEB proteina določene z metodo UV-CD, ki znaša 62,2 °C (Cavallin in sod., 2003).

Izračunane termodinamske vrednosti za $\Delta H^\circ(T_d)$ (Enačba 21) so v primeru čistega SEB proteina in proteina z dodanimi polifenolnimi spojinami v molskem razmerju 1 : 1 pozitivne in se gibljejo v območju med $325 \pm 12 \text{ kJ/mol}$ za čisti SEB protein do $364 \pm 11 \text{ kJ/mol}$ za EGC (Preglednica 12). $\Delta H^\circ(T_d)$ vrednosti nekoliko naraščajo v smeri $\text{SEB} < \text{KAM} \approx \text{KAM-G} \approx \text{EGCG} < \text{EGC}$. Pozitivna vrednost $\Delta H^\circ(T_d)$ nakazuje, da je proces termične denaturacije SEB proteina pri pH vrednosti 7,5 in 343 K endotermen proces. Endotermne $\Delta H^\circ(T_d)$ vrednosti so posledica intramolekularnih vodikovih vezi, van der Waalsovih interakcij in hidratacijskega učinka (Poklar in Vesnaver, 2000). Določene $\Delta H^\circ(T_d)$ vrednosti termične denaturacije proteina iz fluorescenčnih termičnih krivulj so odvisne od uporabljenega modela pri izračunu, zato bi se morale temperaturne denaturacije določiti z metodo, ki je neodvisna od modela npr. DSC metodo.

Pri pregledu literature nismo dobili nobenega podatka o študiju termične denaturacije SEB proteina.

5.2 GOVEJI SERUMSKI ALBUMIN (BSA)

Interakcije med BSA proteinom in polifenolnimi spojinami smo spremljali s fluorescenčno spektroskopijo in UV-VIS spektroskopijo. Analizirali smo vpliv sledečih polifenolnih spojin na BSA protein: EGCG, EGC, KAM-G, KAM, ECG, KAV, KVER, NAR, p-KUM in R.K. Medij v katerem so raztopljene polifenolne spojine in BSA, strukture polifenolnih spojin in BSA proteina vplivajo na vrsto in moč medsebojnih interakcij.

Molekulska masa BSA proteina je 66 kDa. Primarna struktura je sestavljena iz zaporedja 582 aminokislinskih ostankov (brez signalne sekvence) (Preglednica 1) (Gasteiger in sod., 2003). V svoji strukturi BSA vsebuje 17 disulfidnih vezi (Gelamo in Tabak, 2000; Gelamo in sod., 2002), dva Trp, dvajset Tyr in sedemindvajset Phe (Preglednica 9). Prvi Trp-134 se nahaja na površini proteina, medtem ko se druga Trp-212 nahaja v hidrofobnem žepu proteina (Petitpas in sod., 2001). BSA je tako odličen fluorofor (Peters in sod., 1985; Shi in sod., 2010). Sekundarna struktura je zgrajena iz 60 % α -vijačnic, 5 % β -nagubane plošče, 13 % β -zavojev, 23 % proteina pa je naključno zvitega (Rawel in sod., 2002) tako kot to prikazuje slika 52. BSA je zanimiv predvsem zaradi t.i. hidrofobnih žepov, ki omogočajo lažjo vezavo hidrofobnih ligandov na protein (Shaikh in sod., 2006).

Pri vzbujanju raztopine BSA proteina v 20 mM HEPES pufru s pH = 7,5 pri valovni dolžini $\lambda_{\text{ex}} = 280$ nm je bil vrh emisijskega spektra pri $\lambda_{\text{em max}} \approx 339$ nm (Slika 31). Te vrednosti so podobne objavljenim vrednostim analize BSA proteina (0,05 M Tris-HCl pufer, pH = 7,40) pri kateri je bil emisijski vrh pri ≈ 340 nm in $\lambda_{\text{ex}} = 280$ nm (Shi in sod., 2010).

Ob dodajanju polifenolnih spojin (EGCG, EGC, KAM-G, KAM, ECG, KAV, KVER, NAR, p-KUM in R.K.) k raztopini BSA proteina se je intenziteta fluorescence zmanjševala (Slika 32). Pri tem pa smo opazili, da pride pri EGCG, KAM in KVER do spremembe $\lambda_{\text{em max}}$ v smeri nižje valovne dolžine (\downarrow), in sicer od 5–10 nm, v primeru ECG pa pride do spremembe $\lambda_{\text{em max}}$ v smeri višje valovne dolžine (\uparrow) in sicer za ≈ 14 nm. Spremembe maksimalne valovne dolžine emisije pa nismo opazili pri naslednjih polifenolnih spojinah EGC, KAM-G, KAV, NAR, p-KUM in R.K. Dobljene vrednosti za spremembo $\lambda_{\text{em max}}$ so podobne literaturnim vrednostim. Vrednosti so podane v preglednici 18.

Preglednica 18: Primerjava objavljenih podatkov za spremembo $\lambda_{\text{em max}}$ z dobljenimi eksperimentalnimi rezultati

Pogoji merjenja fluorescence BSA proteina	λ_{ex} (nm)	$\lambda_{\text{em max}}$ (nm)	$\Delta \lambda_{\text{em max}}$ (nm)	Vir:
20 Mm HEPES pufer s pH = 7,5	280	339	(↓) 5-10 nm za EGCG, KAM in KVER (↑) 14 nm za ECG Ni sprememb za EGC, KAM-G, KAV, NAR, p-KUM in R.K.	Naši podatki.
0,1 M Na-fosfatni pufer pH = 7,0 T = 298 K	290	346	Do molskega razmerja BSA /klorogenska kislina = 1 : 3 ni sprememb; > 1 : 3 pride do spremembe (↑) 22 nm	(Rawel in sod., 2002)
100 Mm acetatni pufer pH = 5,0 T = 298 K	282	350	Ni sprememb.	(Soares in sod., 2007)
0,1 M fosfatni pufer pH = 5,3 T = 298 K	270	339	Ob dodatku dekstrana in dvigu T = 40 °C se $\lambda_{\text{em max}}$ (↑) za 3 nm	(Antonov in Wolf, 2005)
Tris-HCl pufer z 0,5 M NaCl pH = 7,4 T = 296 K	280	342	(↓) za KAM so opazili manjšo spremembo	(Tian in sod., 2004)
0,1 M Fosfatni pufer pH = 7,4 T = 298 K	282	348	(↓) 28 nm za epikatehin (↓) za KVER so opazili manjšo spremembo	(Papadopoulou in sod., 2005)

Iz literarnih podatkov lahko vidimo, da se naše eksperimentalne vrednosti za $\Delta \lambda_{\text{em max}}$ ob dodatku KAM in KVER ujemajo z razpoložljivimi literurnimi podatki.

Sprememba $\lambda_{\text{em max}}$ k nižjim (↓) valovnim dolžinam pomeni, da je okolica Trp postala bolj nepolarna, $\lambda_{\text{em max}}$ k višjim, pa da je okolica Trp postala bolj polarna, bolj dostopejša topilu. V primeru, ko okolica Trp postane bolj polarna, je verjetno prišlo do vsaj delnega razprtja verige proteina (Albani, 2007; Soares in sod., 2007). Ko se valovna dolžina ob dodatku polifenolne spojine pomakne k višjim vrednostim, lahko sklepamo, da se je polifenolna spojina vezala na protein.

Ob dodajanju (titriranju) BSA proteina s polifenolnimi spojinami prihaja lahko tudi do dušenja fluorescence, ki jo podajamo v obliki Stern-Volmerjevih grafov (Slika 33), ki prikazujejo linearno odvisnost F_0/F od množinske koncentracije, dodane polifenolne spojine. V primerih EGC, KAM-G, KAM, KAV, KVER, NAR, p-KUM in R.K je prikazana linearna odvisnost F_0/F od množinske koncentracije dodane polifenolne spojine.

Pri EGCG in ECG smo uporabili samo prvi del krivulje, linearni del. Drug del krivulje v tem primeru nam nakazuje, da prihaja do tvorjenja kompleksov med BSA in EGCG ter ECG.

V primeru ECGC in ECG sklepamo, da je prišlo do močnejših interakcij omenjenih polifenolnih spojin z BSA proteinom. Verjetno sta se tako EGCG in ECG vezala s hidrofobnimi žepi BSA proteina, kjer se nahaja en Trp in s tem spremenila okolica Trp, kar bi bil lahko odraz velikega padca intenzitete fluorescence (Slika 32) ali pa se vežejo v bližino površinskega Trp.

Iz naklona premic iz Stern-Volmerjevega grafa dobimo Stern-Volmerjevo konstanto (K_{sv}) po enačbi 10. Vrednosti K_{sv} si sledijo od najnižje do najvišje vrednosti pri $\lambda_{ex} = 280$ nm in $\lambda_{em} = 339$ nm za sledeče polifenolne spojine: EGC (35000 M^{-1}) > KAV > KAM-G > p-KUM > R.K. > NAR > KAM > KVER > EGCG > ECG (1361000 M^{-1}) (Preglednica 11).

Iz dobljenih K_{sv} vrednosti lahko sklepamo, da ima ester galne kisline v EGCG in ECG pomembno vlogo pri vezavi polifenolne spojine na BSA protein.

V literaturi smo našli primerjalno vrednost K_{sv} za KAM. Tian in sod., 2004 podajajo K_{sv} vrednost za KAM (Tris-HCl pufer z $0,5\text{ M NaCl}$, $pH = 7,4$, $T = 296\text{ K}$), ki znaša 87000 M^{-1} med tem, ko naša vrednost znaša 354000 M^{-1} . Papadopoulou in sod., 2005 podajajo vrednost za KVER, ki znaša 530000 M^{-1} ($0,1\text{ M Fosfatni pufer, pH = 7,4, T = 298 K}$), kar pa je veliko bližje naši vrednosti, ki znaša 400000 M^{-1} .

Določili smo tudi biomolekulske konstante dušenja (k_q) (Enačba 11) za BSA in polifenolne spojine (Preglednica 11). Vrednosti se gibljejo med $7,0 \times 10^{12}\text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (EGC) in $273 \times 10^{12}\text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (ECG). Tako za ECG ima najvišjo vrednost EGCG z $184 \times 10^{12}\text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Za k_q velja, da vse dobljene vrednosti, ki so večje od $10^{10}\text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ nakazujejo na tvorbo kompleksa med polifenolno spojino in proteinom. V literaturi nismo našli neposredno primerljivih podatkov, smo pa našli podatek za katechin, za katerega k_q znaša $1,74 \times 10^{12}\text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Soares in sod., 2007). Glede na kemijsko strukturo katechina in v našem primeru EGC sta si ti dve polifenolni spojini podobni, iz česar lahko sklepamo na podobno k_q vrednosti.

S pomočjo molekulskega modeliranja z metodo molekulskega vgnezdenja s programom GLIDE smo poskušali določiti interakcije posameznih polifenolnih spojin s proteinom BSA. Kot najugodnejše vezavno mesto smo izbrali model št. 3 (Preglednica 17). V izbrano vezavno mesto se najbolje ugnedijo: EGCG > KAM-G > ECG > KVER > NAR > R.K. > KAM > EGC > p-KUM > KAV. Do vgnezdenja kateregakoli polifenola v izbrano vezavno mesto pride v največji meri zaradi tvorbe vodikovih vezi med hidroksilnimi skupinami polifenolne spojine na flavonoidnem obroču A in B, hidroksilnih skupin na glikozidnem delu molekule ter s stranskimi verigami aminokislinskih ostankov ali pa se vežejo s skeletom (Priloga B). Aminokislinski ostanki, ki so udeleženi v interakciji s polifenolnimi spojinami so Arg-474, Arg-241, Arg-218, Ala-314, Asp-474, His-265, Ser-225, Ser-477, Ile-313, Gly-230, Glu-315, Glu-176. V bližini vezavnega mesta se nahaja tudi Trp-212 (na Prilogi B označen kot Trp-237 zaradi upoštevanja celotne aminokislinske sestave SEB proteina), ki pa ne tvori vodikovih vezi z nobeno od polifenolnih spojin.

Teoretični modeli se najbolje ujemajo z eksperimentalnimi podatki – Ksv vrednostmi, sicer si zaporedje učinkovitosti vezave polifenolne spojine na BSA ne sledi popolnoma, ampak je vseeno razvidno, da sta EGCG in ECG najučinkovitejši polifenolni spojini, predvidevamo, da zaradi zaestrene galne skupine.

Termično denaturacijo BSA proteina smo spremljali s fluorescenčno spektroskopijo raztopine BSA v 20 mM HEPES pufru s pH = 7,5. Spektri so bili posneti $\lambda_{\text{em}} = 339$ nm v odvisnosti od temperature pri $\lambda_{\text{ex}} = 280$ nm (Slika 40).

Tekom termične denaturacije se z višanjem temperature slabijo vodikove vezi, ki pri določeni temperaturi pričnejo razpadati pri čemer pride do spremembe strukture ali razvijta proteina. Te spremembe smo pri BSA proteinu spremljali s snemanjem fluorescenčnih emisijskih spektrov in UV-VIS spektrov, na podlagi katerih sklepamo na reverzibilnost/ireverzibilnost proteina.

Vpliv polifenolnih spojin na strukturo BSA proteina smo analizirali s termično denaturacijo, ki smo jo spremljali s fluorescenčno spektroskopijo in UV-VIS spektroskopijo. Termično denaturacijo smo spremljali s segrevanjem BSA proteina s polifenolnimi spojinami v molskem razmerju 1 : 1. Segrevali smo ga od 20 °C do 95 °C. Reverzibilnost smo preverili z ohlajanjem na 20 °C in s ponovnim segrevanjem na 95 °C (Slika 41). Pri segrevanju od 20 °C do 95 °C smo spremljali intenziteto fluorescence v odvisnosti od temperature pri $\lambda_{\text{ex}} = 280$ nm in $\lambda_{\text{em}} = 399$ nm (Slika 49).

Iz posnetih spektrov enostopenjskega reverzibilnega prehoda (Enačba 20) smo določili delež molekul BSA proteina v denaturiranem stanju v odvisnosti od temperature in prisotnosti posamezne polifenolne spojine (Slika 40). Pri deležu $fd = 0,5$ smo odčitali T_d (K) za BSA protein (BSA s 97-odstotno čistostjo in BSA s 99-odstotno čistostjo) in za BSA protein (99-odstotno čistostjo) z dodanimi polifenolnimi spojinami. T_d vrednost za BSA s 97-odstotno čistostjo znaša 325,4 K in za BSA z 99 čistostjo 323,8 K. Iz dobljenih T_d vrednosti za BSA protein lahko sklepamo, da čistost BSA proteina v tem območju nima večjega vpliva na spremembo T_d . Iz preglednice 13 lahko vidimo, da se ob dodatku polifenolne spojine vrednosti T_d bistveno ne spreminja, bistvena razlika pa je opazna pri ECG, kjer znaša T_d 329,8 K. Iz tega lahko sklepamo, da ECG vpliva na strukturo in stabilnost proteina.

Temperaturo denaturacije smo določili tudi z UV-VIS spektroskopijo. Določili smo T_d za BSA in KAM (Preglednica 14). Vrednost T_d za BSA je 327,2 K in za KAM 328,8 K. Tako vrednost T_d za BSA in KAM so primerljive z vrednostmi, ki smo jih dobili s fluorescenčno spektroskopijo, iz česar lahko sklepamo na natančnost dveh različnih metod.

Iz literarnih podatkov dobimo različne vrednosti T_d za BSA protein. Michnik in sod., 2006 navajajo T_d za BSA raztopljenim v sterilni vodi s pH = 6,0 in koncentracijo 2 mg/ml 341 K. Ostojić in sod., 2007 so določili T_d za BSA protein pripravljen v deionizirani vodi s pH = 6,2 in molarno koncentracijo BSA proteina (0,05 mM) je 325,4 K. (Antonov in Wolf, 2005) podajata T_d za BSA protein pri pH = 5,3 in koncentraciji BSA proteina 0,149 M, ki znaša 338,12 K.

Termodinamske vrednosti $\Delta H^\circ(T_d)$ (Enačba 21) si sledijo v naslednjem vrstnem redu (Preglednica 13): EGCG < KVER < R.K. \approx p-KUM \approx NAR \approx KAV \approx KAM-G < KAM < BSA \approx EGC < ECG. Iz tega sledi, da je najbolj endotermen proces na BSA protein interakcija ECG, najmanj pa vezava EGCG na BSA.

Za BSA smo s fluorescenčno spektroskopijo določili, da je $\Delta H^\circ(T_d) = 147 \text{ kJ/mol}$ in z UV-VIS spektroskopijo, da je $\Delta H^\circ(T_d) = 218 \text{ kJ/mol}$. Ostojić in sod., 2007 podajajo $\Delta H^\circ(T_d)$ za BSA pri pH = 6,2 in molarno koncentracijo proteina 0,05 Mm 163,51 kJ/mol. (Antonov in Wolf, 2005) pa podajata $\Delta H^\circ(T_d)$ za BSA pri pH = 5,3 in koncentraciji proteina 0,149 M 316 kJ/mol.

5.3 SKLEPI

- S fluorescenčno spektroskopijo smo potrdili interakcije med polifenolnimi spojinami EGCG, EGC, KAM-G in KAM in SEB proteinom ter med EGCG, EGC, KAM-G, KAM, ECG, KAV, KVER, NAR, p-KUM in R.K. z BSA proteinom.
- Vezava polifenolnih spojin na protein (SEB in BSA) je odvisna od njihove kemijske strukture.
- Estri galne kisline v EGCG, ECG vplivajo na jakost vezave na protein.
- Določili smo točko Td za SEB protein, ki znaša 343 K in Td za BSA znaša 323,8 K.
- Ugotovili smo, da ni bistvene razlike med Td BSA z 99-odstotno čistostjo in BSA z 97-odstotno čistostjo.
- Ugotovili smo, da je termična denaturacija SEB proteina ireverzibilna in termična denaturacija BSA proteina delno reverzibilna.
- Z molekulskim vgnezdenjem smo določili teoretično najugodnejša vezavna mesta za protein in ugotovili, da gre pri vezavi polifenolnih spojin s proteinom za vodikove vezi, ki se tvorijo med hidroksilno skupino polifenolne spojine in stranskimi verigami aminokislinskih ostankov ali z ogrodjem proteina. Boljša korelacija med modeliranjem in eksperimentalnimi podatki je pri BSA in polifenolnih spojinah.
- Z eksperimentalnimi podatki in modeliranjem smo ugotovili, da se fenolne spojine vežejo v bližnjo okolico Trp, da so interakcije s proteini bolj površinske in kot take bistveno ne vplivajo na spremembo strukture proteina (SEB in BSA).
- Za izračun Td smo uporabili enostopenjski proces termične denaturacije. Da bi se izognili enostopenjskemu modelu bi bilo zaželeno Td določiti tudi še z DSC metodo pri kateri določitev ni odvisna od modela.

6 POVZETEK

Stafilokokni enterotoksin B (SEB) je termostabilen eksotoksin bakterije *Staphylococcus aureus*, ki v svetu povzroča ogromno zastrupitev, predvsem s hrano. SEB uvrščamo v skupino enterotoksinov, ker deluje na epitelne celice črevesja ter izzove bruhanje in diarejo.

Ljudska medicina zoper tovrstne okužbe uporablja zelišča, predvsem kot čaje. Znano je, da rastline lahko vsebujejo visoke koncentracije polifenolnih spojin, za katere so dokazane in se dokazuje vrsta pozitivnih učinkov na zdravje in počutje človeka (antioksidativno delovanje, antimikrobno delovanje, antivnetno delovanje ipd.). Zaradi vseh teh pozitivnih lastnosti in vedno večjega povpraševanja potrošnikov po naravnih bioloških zdravilih se trenutno izvaja ogromno raziskav na tem področju. Predvsem proučujejo antimikroben vpliv polifenolnih spojin na širok spekter bakterij, ni pa narejenih veliko študij na področju vpliva polifenolnih spojin na vezavo potencialnih virulentnih faktorjev (toksini), ki jih proizvajajo bakterije in posledično inhibicijo le-teh.

V naši raziskavi smo naredili korak naprej prav v tem delu, saj smo študirali vpliv polifenolnih spojin (EGCG, EGC, KAM-G in KAM) na spremembo strukture SEB. Pri delu smo se posluževali fluorescenčne spektroskopije, saj je metoda zelo natančna in občutljiva. Najprej smo SEB protein titrirali z dodajanjem polifenolne spojine do molskega razmerja 1 : 3 = SEB : polifenolna spojina. Opazili smo, da se ob dodajanju polifenolne spojine intenziteta fluorescence linearno znižuje. Pri tem pa nismo zaznali spremembe maksimalnih valovnih dolžin emisije. Na podlagi izračunanih K_{sv} vrednosti smo določili konstanto vezanja in ugotovili, da se polifenolne spojine v vseh primerih vežejo, verjetno s površinskimi vezmi na SEB protein.

Naša predvidevanja smo potrdili, ko smo izvedli termično denaturacijo SEB protein s prej omenjenimi polifenolnimi spojinami v molskem razmerju 1 : 1. Iz termogramov smo odčitali T_d , ki znaša 343 K in se bistveno ne spreminja vrste polifenolne spojine. Prav tako smo določili tudi $\Delta H^\circ(T_d)$ za SEB protein, ki znaša 325 kJ/mol. Iz dobljenih podatkov lahko sklepamo, da je protein res termostabilen, saj ima relativno visoko T_d in $\Delta H^\circ(T_d)$. Na podlagi posnetih fluorescenčnih spektrov, ki so bili posneti med termično denaturacijo proteina, lahko zaključimo, da je denaturacija SEB proteina ireverzibilen proces.

Zanimivo bi bilo nadaljevati s proučevanjem vpliva polifenolnih spojin na SEB protein. Raziskavo bi bilo zanimivo razširiti na še več polifenolnih spojin in študirati vezavo na protein *in vitro*, nato pa bi bilo zanimivo prestaviti model tudi *in vivo* saj v tem okolju pride verjetno še do mnogih drugih interakcij med polifenolnimi spojinami in drugimi komponentami hrane, želodčnega soka in črevesne vsebine. Raziskave pa bi lahko, če bi se izkazale za uporabne, lahko povezali širše z gospodarstvom (živilsko industrijo in farmacijo) ter zdravstvom.

Zaključimo lahko, da smo z eksperimentalnimi podatki (K_{sv} , T_d , $\Delta H^\circ(T_d)$) in teoretičnimi podatki ugotovili, da se polifenolne spojine površinsko vežejo na SEB protein. S tem lahko posredno predvidevamo, da polifenolne spojine v čajih (predvsem zelenem čaju) lahko blažijo zastrupitve s toksini.

Pri raziskovalnem delu smo pručevali tudi vpliv polifenolnih spojin (EGCG, EGC, KAM-G, KAM, ECG, KAV, KVER, NAR, p-KUM in R.K.) na strukturo govejega serumskega albumina (BSA), ki je verjetno eden od najbolj raziskanih in cenovno dostopnih proteinov na tržišču. S fluorescenčno spektroskopijo in z UV-VIS spektrofotometrijo smo prav tako spremljali vezavo različnih polifenolnih spojin z metodo titracije, pri čemer smo ugotovili, da se najbolje vežejo na BSA protein EGCG in ECG, polifenolni spojini, ki imata v svoji strukturi ester galne kisline, za katero predvidevamo, da omogoča večjo fleksibilnost molekule (rotiranje). S pomočjo termične denaturacije, ki smo jo spremljali s fluorescenčno spektroskopijo in UV-VIS spektroskopijo smo določili T_d , ki je v obeh primerih znašala približno 325 K in $\Delta H^\circ(T_d)$, ki znaša v primeru fluorimetrije 147 kJ/mol in v primeru UV-VIS spektroskopije in 218 kJ/mol za UV-VIS spektroskopijo. Termična denaturacija je potekala v molskem razmerju 1 : 1 med polifenolno spojino in BSA proteinom. Pri termični denaturaciji BSA protein smo opazili, da gre za delno reverzibilen/ireverzibilen proces.

Podatki se v večini zelo dobro ujemajo tudi s teoretičnimi podatki, ki smo jih dobili z molekulskim modeliranjem oz. vgnezdenjem.

Proučevanje vezave polifenolnih spojin na BSA je prav tako zelo zanimivo področje, saj s tem poskušamo ugotoviti, kateri ligandi se lahko vežejo na SEB protein za katerega vemo, da spada v skupino serumskih albuminov, in da se nahajajo v krvi vsakega sesalca, kjer imajo zelo pomembno transportno funkcijo.

7 VIRI

- A Abram V. 2000. Antioksidativno delovanje flavonoidov. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 26. in 27. oktober 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 23-32
- A Abram V., Simčič M. 1997. Fenolne spojine kot antioksidanti. Farmacevtski vestnik, 48: 573-587
- A Ahmad N., Feyes D.K., Nieminen A.L., Agarwal R., Mukhtar H. 1997. Green tea constituent epigallocatechin-3-gallate and induction of apoptosis and cell cycle arrest in human carcinoma cells. Journal of the National Cancer Institute, 89, 24: 1881-1886
- A Albani J.R. 2007. Principles and applications of fluorescence spectroscopy. Oxford, Blackwell Publishing: 255 str.
- A Alouf J.E., Müller-Alouf H. 2003. Staphylococcal and streptococcal superantigens: Molecular, biological and clinical aspects. International Journal of Medical Microbiology, 292, 7-8: 429-440
- A Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. 1990. Basic local alignment search tool. Journal of Molecular Biology, 215, 3: 403-410
- A Amador-Miranda R., Bertrán-Pasarell J., González M., Conde A. 2008. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the community. Boletín De La Asociación Médica De Puerto Rico, 100, 3: 21-23
- A Andrews A.T., Anderson M., Goodenough P.W. 1987. A study of the heat stabilities of a number of indigenous milk enzymes. Journal of Dairy Research, 54, 2: 237-246
- A Antonov Y.A., Wolf B.A. 2005. Calorimetric and structural investigation of the interaction between bovine serum albumin and high molecular weight dextran in water. Biomacromolecules, 6, 6: 2980-2989
- A Archer G.L. 1998. *Staphylococcus aureus*: a well-armed pathogen. Clinical Infectious Diseases: 26, 5: 1179-1181
- A 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
- A Ayaz F.A., Hayrlıoglu-Ayaz S., Alpay-Karaoglu S., Grúz J., Valentová K., Ulrichová J., Strnad M. 2008. Phenolic acid contents of kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala* DC.) extracts and their antioxidant and antibacterial activities. Food Chemistry, 107, 1: 19-25

- Azuma K., Ippoushi K., Ito H., Higashio H., Terao J. 2002. Combination of lipids and emulsifiers enhances the absorption of orally administered quercetin in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 6: 1706-1712
- Balaban N., Rasooly A. 2000. Staphylococcal enterotoxins. *International Journal of Food Microbiology*, 61, 1: 1-10
- Bartolomé B., Estrella I., Hernández M. 2000. Interaction of low molecular weight phenolics with proteins (BSA). *Journal of Food Science*, 65, 4: 617-621
- Baumgartner S. 1995. Teoretične osnove in uporabnost fluorescenčne spektroskopije v farmaciji. *Farmacevtski vestnik*, 46, 3-4: 305-328
- Bennick A. 2002. Interaction of plant polyphenols with salivary proteins. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 13, 2: 184-196
- Berman H.M., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Bhat T.N., Weissig H., Shindyalov I.N., Bourne P.E. 2000. The protein data bank. *Nucleic Acids Research*, 28, 1: 235-242
- Bianco A., Chiacchio U., Rescifina A., Romeo G., Uccella N. 1997. Biomimetic supramolecular biophenol-carbohydrate and biophenol-protein models by NMR experiments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 11: 4281-4285
- Blundell T.L., Sibanda B.L., Sternberg M.J., Thornton J.M. 1987. Knowledge-based prediction of protein structures and the design of novel molecules. *Nature*, 326, 6111: 347-352
- Bos O.J., Labro J.F., Fischer M.J., Wilting J., Janssen L.H. 1989. The molecular mechanism of the neutral-to-base transition of human serum albumin. Acid/base titration and proton nuclear magnetic resonance studies on a large peptic and a large tryptic fragment of albumin. *Journal of Biological Chemistry*, 264, 2: 953-959
- Braun P., Balzer G., Fehlhaber K. 2001. Activity of bacterial lipases at chilling temperatures. *Food Microbiology*, 18, 2: 211-215
- Briviba K., Sies H. 1994. Nonenzymatic antioxidant defence systems. V: Natural antioxidants in human health and disease. Feri B. (ed.). San Diego, Academic Press: 107-128
- Bugianesi R., Catasta G., Spigno P., D'Uva A., Maiani G. 2002. Naringenin from cooked tomato paste is bioavailable in men. *Journal of Nutrition*, 132, 11: 3349-3352
- Bull H.B. 1940. Viscosity of solutions of denatured and of native egg albumin. *Journal of Biological Chemistry*, 133, 1: 39-49

- Burt S. 2004. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. International Journal of Food Microbiology, 94, 3: 223-253
- Buxser S., Bonventre P.F. 1981. Staphylococcal enterotoxins fail to disrupt membrane integrity or synthetic functions of Henle 407 intestinal cells. Infection and Immunity, 31, 3: 929-934
- Buzby J.C., Roberts T. 1997. Economic costs and trade impacts of microbial foodborne illness. World Health Statistics Quarterly/Rapport Trimestriel De Statistiques Sanitaires Mondiales, 50, 1-2: 57-66
- Cantor M. 2006. Fluorescence spectroscopy. Rutgers, The State University New Jersey, Department of Chemistry: 11 str.
<http://chemistry.rutgers.edu/grad/chem585/lecture2.html> (junij 2009)
- CarefolinNAC. 2010. Oxidative stress. Covington, CarefolinNAC: 2 str.
<http://www.cerefolin.com/OxyStress.php> (avgust 2010)
- Caridi D., Trenergy V.C., Rochfort S., Duong S., Laugher D., Jones R. 2007. Profiling and quantifying quercetin glucosides in onion (*Allium cepa* L.) varieties using capillary zone electrophoresis and high performance liquid chromatography. Food Chemistry, 105, 2: 691-699
- Carter D.C., Chang B., Ho J.X., Keeling K., Krishnasami Z. 1994. Preliminary crystallographic studies of four crystal forms of serum albumin. European Journal of Biochemistry, 226, 3: 1049-1052
- Cavallin A., Petersson K., Forsberg G. 2003. Spectrophotometric methods for the determination of superantigen structure stability. V: Superantigen protocols. Vol. 214. Krakauer T. (ed.). New Jersey, Humana Press: 55-63
- CDC - Centers for Disease Control and Prevention. 2008. Notifiable diseases and mortality tables. Morbidity and Mortality Weekly Report: 57, 34: 929-934
- Chen J.H., Ho C.-T. 1997. Antioxidant activities of caffeic acid and its related hydroxycinnamic acid compounds. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45, 7: 2374-2378
- Cherbonnel-Lasserre C., Dosanjh M.K. 1997. Suppression of apoptosis by overexpression of Bcl-2 or Bcl-xL promotes survival and mutagenesis after oxidative damage. Biochimie, 79, 9-10: 613-617
- Cheynier V. 2005. Polyphenols in foods are more complex than often thought. American Journal of Clinical Nutrition, 81, Suppl. 1: 223S-229S

- Choi Y.W., Kotzin B., Herron L., Callahan J., Marrack P., Kappler J. 1989. Interaction of *Staphylococcus aureus* toxin "superantigens" with human T cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 86, 22: 8941-8945
- Chothia C., Lesk A.M. 1986. The relation between the divergence of sequence and structure in proteins. EMBO Journal, 5, 4: 823-826
- Clark A., Saunderson D., Suggett A. 1981. Infrared and laser-raman spectroscopic studies of thermally-induced globular protein gels. International Journal of Peptide and Protein Research, 17, 3: 353-364
- Cowan M.M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. Clinical Microbiology Reviews, 12, 4: 564-582
- Dangles O., Dufour C., Bret S. 1999. Flavonol-serum complexation: Two-electron oxidation of flavonols and their complexes with serum albumin. Journal of Chemical Society, Perkin Transactions 2, 4: 737-744
- Davidson P.M., Branen A.L. 2005. Food antimicrobials – an introduction. V: Antimicrobials in food. 3rd ed. Davidson P.M., Sofos J.N., Branen A.L. (eds.). Boca Raton, Taylor&Francis Group: 1-10
- Dellabona P., Peccoud J., Kappler J., Marrack P., Benoit C., Mathis D. 1990. Superantigens interact with MHC class II molecules outside of the antigen groove. Cell, 62, 6: 1115-1121
- Denny C.B., Tan P.L., Bohrer C.W. 1966. Heat inactivation of staphylococcal enterotoxin A. Journal of Food Science, 31, 5: 762-767
- Dockal M., Carter D.C., Rüker F. 2000. Conformational transitions of the three recombinant domains of human serum albumin depending on pH. Journal of Biological Chemistry, 275, 5: 3042-3050
- Doll R. 1990. An overview of the epidemiological evidence linking diet and cancer. Proceedings of the Nutrition Society, 49, 2: 119-131
- Dong Y., Phillips K.S., Cheng Q. 2006. Immunosensing of staphylococcus enterotoxin B (SEB) in milk with PDMS microfluidic systems using reinforced supported bilayer membranes (r-SBMs). Lab on a Chip, 6, 5: 675-681
- Donko M. 1995. Antimikrobná aktívnosť netreska. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 60 str.
- Doweiko J.P., Nompleggi D.J. 1991. Role of albumin in human physiology and pathophysiology. Journal of Parenteral and Enteral Nutrition, 15, 2: 207-211

- Eckhardt R. 1987. Stan Ulam, John von Neumann, and the Monte Carlo method. *Los Alamos Science*, 15, Special issue: 131-137
- Edwards R.L., Lyon T., Litwin S.E., Rabovsky A., Symons J.D., Jalili T. 2007. Quercetin reduces blood pressure in hypertensive subjects. *Journal of Nutrition*, 137, 11: 2405-2411
- Emerson T.E., Jr. 1989. Unique features of albumin: a brief review. *Critical Care Medicine*, 17, 7: 690-694
- Epps D.E., Raub T.J., Caiolfa V., Chiari A., Zamai M. 1999. Determination of the affinity of drugs toward serum albumin by measurement of the quenching of the intrinsic tryptophan fluorescence of the protein. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 51, 1: 41-48
- Erlund I., Meririnne E., Alfthan G., Aro A. 2001. Plasma kinetics and urinary excretion of the flavanones naringenin and hesperetin in humans after ingestion of orange juice and grapefruit juice. *Journal of Nutrition*, 131, 2: 235-241
- Feldman I., Young D., McGuire R. 1975. Static and dynamic quenching of protein fluorescence. I. Bovine serum albumin. *Biopolymers*, 14, 2: 335-351
- Felgines C., Texier O., Morand C., Manach C., Scalbert A., Regerat F., Remesy C. 2000. Bioavailability of the flavanone naringenin and its glycosides in rats. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 279, 6: 1148-1154
- Fetrow J.S., Bryant S.H. 1993. New programs for protein tertiary structure prediction. *Bio/Technology*, 11, 4: 479-484
- Figge J., Rossing T.H., Fencl V. 1991. The role of serum proteins in acid-base equilibria. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 117, 6: 453-467
- Fung D.Y., Lin C.C., Gailani M.B. 1985. Effect of phenolic antioxidants on microbial growth. *Critical Reviews in Microbiology*, 12, 2: 153-183
- Gasteiger E., Gattiker A., Hoogland C., Ivanyi I., Appel R.D., Bairoch A. 2003. ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Research*, 31, 13: 3784-3788
- Gelamo E.L., Silva C.H.T.P., Imasato H., Tabak M. 2002. Interaction of bovine (BSA) and human (HSA) serum albumins with ionic surfactants: Spectroscopy and modelling. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1594, 1: 84-99
- Gelamo E.L., Tabak M. 2000. Spectroscopic studies on the interaction of bovine (BSA) and human (HSA) serum albumins with ionic surfactants. *Spectrochimica Acta. Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 56A, 11: 2255-2271

- Gentili P.L., Ortica F., Favaro G. 2008. Static and dynamic interaction of a naturally occurring photochromic molecule with bovine serum albumin studied by UV-visible absorption and fluorescence spectroscopy. *Journal of Physical Chemistry, B*, 112, 51: 16793-16801
- Ghumar J., Zunzain 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
- Gill S.C., von Hippel P.H. 1989. Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Analytical Biochemistry*, 182, 2: 319-326
- Gillespie K., Kodani I., Dickinson D.P., Ogbureke K.U.E., Camba A.M., Wu M., Looney S., Chu T.-C., Qin H., Bisch F., Sharawy M., Schuster G.S., Hsu S.D. 2008. Effects of oral consumption of the green tea polyphenol EGCG in a murine model for human Sjogren's syndrome, an autoimmune disease. *Life Sciences*, 83, 17-18: 581-588
- Gleason B.A., Huebner K.D. 2009. CBRNE - Staphylococcal enterotoxin B. Omaha, Medscape: 3 str.
<http://emedicine.medscape.com/article/830715-overview> (julij 2010)
- Glide. 2009. Glide 5.5 User manual. Munchen, Schrödinger Press: 5-9
- Goodwin T.W., Mercer E.I. 1983. Introduction to plant biochemistry. 2nd ed. Oxford, Pergamon Press: 528-563
- Gupta S., Ahmad N., Mukhtar H. 1999. Prostate cancer chemoprevention by green tea. *Seminars in Urologic Oncology*, 17, 2: 70-76
- Häkkinen S.H., Kärenlampi S.O., Heinonen I.M., Mykkänen H.M., Törrönen A.R. 1999. Content of the flavonols quercetin, myricetin, and kaempferol in 25 edible berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 6: 2274-2279
- Hagerman A.E. 1989. Chemistry of tannin-protein complexation. V: Chemistry and significance of condensed tannins. Hemingway R.W., Karchesy J.J. (eds.). New York, Plenum Press: 323-323
- Hansen A.P., Heinis J.J. 1991. Decrease of vanillin flavor perception in the presence of casein and whey proteins. *Journal of Dairy Science*, 74, 9: 2936-2940
- Haraguchi H., Tanimoto K., Tamura Y., Mizutani K., Kinoshita T. 1998. Mode of antibacterial action of retrochalcones from *Glycyrrhiza inflata*. *Phytochemistry*, 48, 1: 125-129
- Harris D.C. 2001. Exploring chemical analysis. 2nd ed. New York, W.H. Freeman: 395-395

- Haslam E. 1998. Practical polyphenolic: From structure to molecular recognition and physiological action. Cambridge, Cambridge University Press: 442 str.
- Haslam E., Williamson M.P., Baxter N.J., Charlton A.J. 1999. Astringency and polyphenol protein interactions. V: Phytochemicals in human health protection, nutrition and plant defense. Romeo J.T. (ed.). New York, Kluwer Academic: 289-318
- He X.M., Carter D.C. 1992. Atomic structure and chemistry of human serum albumin. Nature, 358, 6383: 209-215
- He Y.H., Kies C. 1994. Green and black tea consumption by humans: Impact on polyphenol concentrations in feces, blood and urine. Plant Foods for Human Nutrition, 46, 3: 221-229
- Hedberg C. 1999. Food-related illness and death in the United States. Emerging Infectious Diseases, 5, 6: 840-842
- Hendrich S. 2002. Bioavailability of isoflavones. Journal of Chromatography B, 777, 1-2: 203-210
- Herman B., Frohlich V., Lakowicz J.R., Murphy D.B., Spring K.R., Davidson M. W. 2005. Basic concepts in fluorescence. Mebrille, Olympus Microscopy Research Centre: 12 str.
<http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/fluorescence/fluorointrohome.html> (junij 2009)
- Hisano M., Yamaguchi K., Inoue Y., Ikeda Y., Iijima M., Adachi M., Shimamura T. 2003. Inhibitory effect of catechin against the superantigen staphylococcal enterotoxin B (SEB). Archives of Dermatological Research, 295, 5: 183-189
- Ho P.-L., Chuang S.-K., Choi Y.-F., Lee R.A., Lit A.C.H., Ng T.-K., Que T.-L., Shek K.-C., Tong H.-K., Tse C.W.S., Tung W.-K., Yung R.W.H. 2008. Community-associated methicillin-resistant and methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*: Skin and soft tissue infections in Hong Kong. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 61, 3: 245-250
- Holden M.T.G., Feil E.J., Lindsay J.A., Peacock S.J., Day N.P.J., Enright M.C., Foster T.J., Moore C.E., Hurst L., Atkin R., Barron A., Bason N., Bentley S.D., Chillingworth C., Chillingworth T., Churcher C., Clark L., Corton C., Cronin A., Doggett J., Dowd L., Feltwell T., Hance Z., Harris B., Hauser H., Holroyd S., Jagels K., James K.D., Lennard N., Line A., Mayes R., Moule S., Mungall K., Ormond D., Quail M.A., Rabbinowitsch E., Rutherford K., Sanders M., Sharp S., Simmonds M., Stevens K., Whitehead S., Barrell B.G., Spratt B.G., Parkhill J. 2004. Complete genomes of two clinical *Staphylococcus aureus* strains: Evidence for the rapid evolution of virulence and drug resistance. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 101, 26: 9786-9791

- Homola J., Dostálek J., Chen S., Rasooly A., Jiang S., Yee S.S. 2002. Spectral surface plasmon resonance biosensor for detection of staphylococcal enterotoxin B in milk. International Journal of Food Microbiology, 75, 1-2: 61-69
- Honda C., Kamizono H., Samejima T., Endo K. 2000. Studies on thermal aggregation of bovine serum albumin as a drug carrier. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 48, 4: 464-466
- Hong-Geller E., Gupta G. 2003. Therapeutic approaches to superantigen-based diseases: A review. Journal of Molecular Recognition: 16, 2: 91-101
- Hosseinzadeh H., Motamedshariaty V., Hadizadeh F. 2007. Antidepressant effect of kaempferol, a constituent of safron (*Crocus sativus*) petal, in mice and rats. Pharmacologyonline, 2: 367-370
<http://www.mums.ac.ir/shares/pharmacy/HadizadehF/publication/29Kaempferol-antidepressant.pdf> (julij 2010)
- Hou W.-C., Lin R.-D., Chen C.-T., Lee M.-H. 2005. Monoamine oxidase B (MAO-B) inhibition by active principles from *Uncaria rhynchophylla*. Journal of Ethnopharmacology, 100, 1-2: 216-220
- Hsu S.D., Dickinson D.P., Qin H., Borke J., Ogbureke K.U.E., Winger J.N., Camba A.M., Bollag W.B., Stöppler H.J., Sharawy M.M., Schuster G.S. 2007. Green tea polyphenols reduce autoimmune symptoms in a murine model for human Sjogren's syndrome and protect human salivary acinar cells from TNF-alpha-induced cytotoxicity. Autoimmunity, 40, 2: 138-147
- Hu Z.-Q., Zhao W.-H., Asano N., Yoda Y., Hara Y., Shimamura T. 2002. Epigallocatechin gallate synergistically enhances the activity of carbapenems against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 46, 2: 558-560
- Huang I.Y., Bergdoll M.S. 1970. The primary structure of staphylococcal enterotoxin B. Journal of Biological Chemistry, 245, 14: 3493-3525
- Huang K.C., Chen T.S., Rout W.R. 1974. Effect of staphylococcal enterotoxins A, B, and C, on ion transport and permeability across the flounder intestine. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 147, 1: 250-254
- Hussain F.M., Boyle-Vavra S., Bethel C.D., Daum R.S. 2000. Current trends in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at a tertiary care pediatric facility. Pediatric Infectious Disease Journal, 19, 12: 1163-1166
- Ikigai H., Nakae T., Hara Y., Shimamura T. 1993. Bactericidal catechins damage the lipid bilayer. Biochimica et Biophysica Acta, 1147, 1: 132-136

- Jamlang E.M., Bartlett M.L., Snyder H.E. 1971. Effect of pH, protein concentration, and ionic strength on heat inactivation of staphylococcal enterotoxin B 1. *Applied Microbiology*, 22, 6: 1034-1040
- Jay J.M., Loessner M.J., Golden D.A. 2005. Modern food microbiology. 7th ed. New York, Springer Science + Business media: 125-148, 545-566
- Jöbstl E., O'Connell J., Fairclough J.P.A., Williamson M.P. 2004. Molecular model for astringency produced by polyphenol/protein interactions. *Biomacromolecules*, 5, 3: 942-949
- Johnson M.S., Srinivasan N., Sowdhamini R., Blundell T.L. 1994. Knowledge-based protein modeling. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 29, 1: 1-68
- Kadoma Y., Fujisawa S. 2008. A comparative study of the radical-scavenging activity of the phenolcarboxylic acids caffeic acid, p-coumaric acid, chlorogenic acid and ferulic acid, with or without 2-mercaptoproethanol, a thiol, using the induction period method. *Molecules*, 13, 10: 2488-2499
- Kanner J., Frankel E., Granit R., German B., Kinsella J.E. 1994. Natural antioxidants in grapes and wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 1: 64-69
- Karou D., Dicko M.H., Simpore J., Traore A.S. 2005. Antioxidant and antibacterial activities of polyphenols from ethnomedicinal plants of Burkina Faso. *African Journal of Biotechnology*, 4, 8: 823-828
- Katiyar S., Elmets C.A., Katiyar S.K. 2007. Green tea and skin cancer: Photoimmunology, angiogenesis and DNA repair. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 18, 5: 287-296
- Kehrberg M.W., Latham R.H., Haslam B.T., Hightower A., Tanner M., Jacobson J.A., Barbour A.G., Noble V., Smith C.B. 1981. Risk factors for staphylococcal toxic-shock syndrome. *American Journal of Epidemiology*, 114, 6: 873-879
- Kehrer J.P., Smith C.V. 1994. Free radicals in biology: Sources, reactivities, and roles in the ethiology of human diseases. V: Natural antioxidants in human health and disease. Frei B. (ed.). San Diego, Academic Press: 25-62
- Kimberlin D.W., Whitley R.J. 1996. Antiviral resistance: Mechanisms, clinical significance, and future implications. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 37, 3: 403-421
- King K.D., Anderson G.P., Bullock K.E., Regina M.J., Saaski E.W., Ligler F.S. 1999. Detecting staphylococcal enterotoxin B using an automated fiber optic biosensor. *Biosensors & Bioelectronics*, 14, 2: 163-170

- Kollef M.H., Micek S.T. 2006. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a new community-acquired pathogen? Current Opinion in Infectious Diseases, 19, 2: 161-168
- Kondo T., Ohta T., Igura K., Hara Y., Kaji K. 2002. Tea catechins inhibit angiogenesis *in vitro*, measured by human endothelial cell growth, migration and tube formation, through inhibition of VEGF receptor binding. Cancer Letters, 180, 2: 139-144
- Koolman J., Roehm K.H. 2005. Color atlas of biochemistry. 2nd ed. Marburg, Thieme: 78-79
- Korošec L. 2000. Prosti radikali in vloga antioksidantov v bioloških sistemih V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi 2000, Portorož, 26. in 27. oktober 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 11-21
- Korte G., Dreiseitel A., Schreier P., Oehme A., Locher S., Geiger S., Heilmann J., Sand P.G. 2010. Tea catechins' affinity for human cannabinoid receptors. Phytomedicine, 17, 1: 19-22
- Kotzin B.L., Leung D.Y., Kappler J., Marrack P. 1993. Superantigens and their potential role in human disease. Advances in Immunology, 54: 99-166
- Kragh-Hansen U. 1981. Molecular aspects of ligand binding to serum albumin. Pharmacological Reviews, 33, 1: 17-53
- Krakauer T., Li B.Q., Young H.A. 2001. The flavonoid baicalin inhibits superantigen-induced inflammatory cytokines and chemokines. FEBS Letters, 500, 1-2: 52-55
- Kreft I., Škrabanja V., Bonafaccia G. 2000. Temelji prehranskih in biotskih vplivov antioksidantov. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi 2000, Portorož, 26. in 27. oktober 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 33-37
- Krieger E., Koraimann G., Vriend G. 2002. Increasing the precision of comparative models with YASARA NOVA-a self-parameterizing force field. Proteins, 47, 3: 393-402
- Krieger E., Nabuurs S.B., Vriend G. 2003. Homology modeling. V: Structural Bioinformatics. Bourne P.E., Weissing H. (eds.). New Jersey, John Wiley & Sons, Inc.: 509-523
- Kuntz I.D., Blaney J.M., Oatley S.J., Langridge R., Ferrin T.E. 1982. A geometric approach to macromolecule-ligand interactions. Journal of Molecular Biology, 161, 2: 269-288
- Kuntz I.D., Jr., Kauzmann W. 1974. Hydration of proteins and polypeptides. Advances in Protein Chemistry, 28: 239-345

- Kuroda M., Nagasaki S., Ito R., Ohta T. 2007. Sesquiterpene farnesol as a competitive inhibitor of lipase activity of *Staphylococcus aureus*. FEMS Microbiology Letters, 273, 1: 28-34
- Labnews. 2010. Silver – more than a precious metal. Croydon, Labnews: 4 str.
http://www.labnews.co.uk/feature_archive.php/1199/5/silver---more-than-a-precious-metal (avgust 2010)
- Lakowicz J.R. 2006. Principles of fluorescence spectroscopy. 3rd ed. New York, Springer Science + Business Media: 954 str.
- Laranjihnh J. 2002. Caffeic acid and related antioxidant compounds: Biochemical and cellular effect. V: Handbook of antioxidants. 2nd ed. Cadenas E., Packer L. (eds.). New York, Marcel Dekker, Inc: 279-302
- Lamson D.W., Brignall M.S. 2000. Antioxidants and cancer, part 3: Quercetin. Alternative Medicine Review: A Journal of Clinical Therapeutic, 5, 3: 196-208
- Leach A.R. 2001. Molecular modeling: Principles and applications. 2nd ed. Harlow, Addison Wesley Longman: 410-454
- Lee M.J., Wang Z.Y., Li H., Chen L., Sun Y., Gobbo S., Balentine D.A., Yang C.S. 1995. Analysis of plasma and urinary tea polyphenols in human subjects. Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: 4, 4: 393-399
- Lee S.H., Park Y.B., Bae K.H., Bok S.H., Kwon Y.K., Lee E.S., Choi M.S. 1999. Cholesterol-lowering activity of naringenin via inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase and acyl coenzyme A: Cholesterol acyltransferase in rats. Annals of Nutrition & Metabolism, 43, 3: 173-180
- Ler S.G., Lee F.K., Gopalakrishnakone P. 2006. Trends in detection of warfare agents. Detection methods for ricin, staphylococcal enterotoxin B and T-2 toxin. Journal of Chromatography. A, 1133, 1-2: 1-12
- Li H., Llera A., Tsuchiya D., Leder L., Ysern X., Schlievert P.M., Karjalainen K., Mariuzza R.A. 1998. Three-dimensional structure of the complex between a T cell receptor, chain and the superantigen staphylococcal enterotoxin B. Cell Press, 9, 6: 807-816
- Lin H.-C., Tsai W.-C. 2003. Piezoelectric crystal immunosensor for the detection of staphylococcal enterotoxin B. Biosensors & Bioelectronics, 18, 12: 1479-1483
- Lindahl E.R. 2008. Molecular dynamics simulations. V: Molecular modeling of proteins. Methods in molecular biology. Vol. 443. Kukol A. (ed.). Hertfordshire, Human Press: 3-36

- Lipman D.J., Pearson W.R. 1985. Rapid and sensitive protein similarity searches. *Science*, 227, 4693: 1435-1441
- Liu R.H. 2004. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: Mechanism of action. *Journal of Nutrition*, 134, Suppl 12: 3479S-3485S
- Lu J., Philpott D.J., Saunders P.R., Perdue M.H., Yang P.C., McKay D.M. 1998. Epithelial ion transport and barrier abnormalities evoked by superantigen-activated immune cells are inhibited by interleukin-10 but not interleukin-4. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 287, 1: 128-136
- Madhavi D.L., Deshpande S.S., Salunkhe D.K. 1996. Food antioxidants: Technological, toxicological and health perspective. New York, Marcel Dekker: 490 str.
- Manach C., Scalbert A., Morand C., Rémesy C., Jiménez L. 2004. Polyphenols: Food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79, 5: 727-747
- Matei I., Hillebrand M. 2007. Interaction of kaempferol with human serum albumin: A fluorescence and circular dichroism study. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 51, 3: 768-773
- Matías M., Ana D. 2002. Study of protein-ligand binding by fluorescence. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 30, 5: 309-312
- Matsuo M., Sasaki N., Saga K., Kaneko T. 2005. Cytotoxicity of flavonoids toward cultured normal human cells. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 28, 2: 253-259
- Mazza G., Miniati E. 1993. Antocyanins in fruits, vegetables, and grains. Boca Raton, CRC Press: 362 str.
- McLachlan A.D., Walker J.E. 1977. Evolution of serum albumin. *Journal of Molecular Biology*, 112, 4: 543-558
- Mehindate K., Thibodeau J., Dohlsten M., Kalland T., Sékaly R.P., Mourad W. 1995. Cross-linking of major histocompatibility complex class II molecules by staphylococcal enterotoxin A superantigen is a requirement for inflammatory cytokine gene expression. *Journal of Experimental Medicine*, 182, 5: 1573-1577
- Metropolis N., Ulam S. 1949. The Monte Carlo method. *Journal of the American Statistical Association*, 44, 247: 335-341
- Michnik A., Michalik K., Kluczevska A., Drzazga Z. 2006. Comparative DSC study of human and bovine serum albumin. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 84, 1: 113-117
- Milić B., Stojanović S., Vučurević N., Turčić M. 1968. Chlorogenic and quinic acids in sunflower meal. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 19, 2: 108-113

- Militello V., Vetri V., Leone M. 2003. Conformational changes involved in thermal aggregation processes of bovine serum albumin. *Biophysical Chemistry*, 105, 1: 133-141
- Mitchell A.E., Hong Y.-J., Koh E., Barrett D.M., Bryant D.E., Denison R.F., Kaffka S. 2007. Ten-year comparison of the influence of organic and conventional crop management practices on the content of flavonoids in tomatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 15: 6154-6159
- Mocz G. 1999. The use of fluorescence in research into protein structures. A PPS'99 Project. London, Department of Crystallography, Birbeck College, University of London: 3 str.
<http://dwb4.unl.edu/Chem/CHEM869N/CHEM869NLinks/pps99.cryst.bbk.ac.uk/projects/gmocz/index.htm> (junij 2010)
- Mole S., Waterman P.G. 1986. Tannic acid and proteolytic enzymes: Enzyme inhibition or substrate deprivation? *Phytochemistry*, 26, 1: 99-102
- Moreno S., Scheyer T., Romano C.S., Vojnov A.N.A. 2006. Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. *Free Radical Research*, 40, 2: 223-231
- Morillas-Ruiz J.M., Villegas García J.A., López F.J., Vidal-Guevara M.L., Zafrilla P. 2006. Effects of polyphenolic antioxidants on exercise-induced oxidative stress. *Clinical Nutrition*, 25, 3: 444-453
- Morris G.M., Lim-Wilby, M. 2008. Molecular docking. V: Molecular modeling of proteins. *Methods in molecular biology*. Vol. 443. Kukol A. (ed.). Hertfordshire, Human Press: 365-382
- Mukhtar H., Ahmad N. 2000. Tea polyphenols: prevention of cancer and optimizing health. *American Journal of Clinical Nutrition*, 71, Suppl. 6: 1698S-1698S
- Muller N., Lapicque F., Drelon E., Netter P. 1994. Binding sites of fluorescent probes on human serum albumin. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 46, 4: 300-304
- Müller W.E., Wollert U. 1979. Human serum albumin as a 'silent receptor' for drugs and endogenous substances. *Pharmacology*, 19, 2: 59-67
- Murray N.J., Williamson M.P., Lilley T.H., Haslam E. 1994. Study of the interaction between salivary proline-rich proteins and a polyphenol by ¹H-NMR spectroscopy. *European Journal of Biochemistry*, 219, 3: 923-935
- Murkovic M. 2003. Phenolic compounds. V: *Encyclopedia of food sciences and nutrition*. Vol. 3. 2nd ed. Caballero B., Trugo L.C., Finglas P.M. (eds.). Oxford, Academic Press: 4507-4513

- Nahmias Y., Goldwasser J., Casali M., van Poll D., Wakita T., Chung R.T., Yarmush M.L. 2008. Apolipoprotein B-dependent hepatitis C virus secretion is inhibited by the grapefruit flavonoid naringenin. *Hepatology*, 47, 5: 1437-1445
- Nance C.L., Shearer W.T. 2003. Is green tea good for HIV-1 infection? *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 112, 5: 851-853
- Nedelkov D., Nelson R.W. 2003. Detection of staphylococcal snterotoxin B via biomolecular interaction analysis mass spectrometry. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 9: 5212-5215
- Ng P.K.W., Hoehn E., Bushuk W. 1989. Sensory evaluation of binding of vanillin by fababean proteins. *Journal of Food Science*, 54, 2: 324-325
- Nychas G.J.E. 1995. Natural antimicrobials from plants. V: New methods of food preservation. Gould G.W. (ed.). London, Blackie Academic&Professional: 59-89
- Okubo S., Toda M., Hara Y., Shimamura T. 1991. Antifungal and fungicidal activities of tea extract and catechin against Trichophyton. *Nippon Saikingaku Zasshi. Japanese Journal of Bacteriology*, 46, 2: 509-514
- Oravcova' J., Bo'hs B., Lindner W. 1996. Drug-protein binding studies new trends in analytical and experimental methodology. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 677, 1: 1-28
- Ossola B., Kääriäinen T.M., Raasmaja A., Männistö P.T. 2008. Paradoxical co-existence of protective and toxic effects of quercetin in the same *in vitro* neurodegeneration model. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 34, Suppl. 1: S33-S33
- Ostojić S., Dragutinović V., Kićanović M., Simonović B.R. 2007 A DSC study of zinc binding to bovine serum albumin (BSA). *Journal of the Serbian Chemical Society*, 72, 4: 331-337
- Paliwal S., Sundaram J., Mitragotri S. 2005. Induction of cancer-specific cytotoxicity towards human prostate and skin cells using quercetin and ultrasound. *British Journal of Cancer*, 92, 3: 499-502
- Papadopoulou A., Green R.J., Frazier R.A. 2005. Interaction of flavonoids with bovine serum albumin: a fluorescence quenching study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1: 158-163
- Papageorgiou A.C., Tranter H.S., Acharya K.R. 1998. Crystal structure of microbial superantigen staphylococcal enterotoxin B at 1.5 Å resolution: implications for superantigen recognition by MHC class II molecules and T-cell receptors. *Journal of Molecular Biology*, 277, 1: 61-79

- Park J.S., Rho H.S., Kim D.H., Chang I.S. 2006. Enzymatic preparation of kaempferol from green tea seed and its antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 8: 2951-2956
- Pearson W.R., Lipman D.J. 1988. Improved tools for biological sequence comparison. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85, 8: 2444-2448
- Petauer T. 1993. Leksikon rastlinskih bogastev. 1. izdaja. Ljubljana, Tehniška založba Slovenije: 684 str.
- Peters T., Anfinsen C.B., Edsall J.T., Richards F.M. 1985. Serum albumin. *Advances in Protein Chemistry*, 37: 161-245
- Petersen M., Simmonds M.S.J. 2003. Rosmarinic acid. *Phytochemistry*, 62: 121-125
- 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. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 25: 22804-22809
- Pinchuk I.V., Beswick E.J., Reyes V.E. 2010. Staphylococcal enterotoxins. *Toxins*, 2, 8: 2177-2197
- Poklar N., Vesnaver G. 2000. Thermal denaturation of proteins studied by UV Spectroscopy. *Journal of Chemical Education*, 77, 3: 380-382
- Poklar Ulrich N. 2010. Dopolnilo k vajam iz biofizikalne kemije. Interno gradivo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 14-14
- Poklar Ulrich N., Ota A., Sentjurc M., Kure S., Abram V. 2010. Flavonoids and cell membrane fluidity. *Food Chemistry*, 121, 1: 78-84
- Poole S., West S.I., Fry J.C. 1987. Effects of basic proteins on the denaturation and heat-gelation of acidic proteins. *Food Hydrocolloids*, 1, 4: 301-316
- Proft T., Fraser J.D. 2003. Bacterial superantigens. *Clinical & Experimental Immunology*, 133, 3: 299-306
- Raccach M. 1984. The antimicrobial activity of phenolic antioxidants in foods: a review. *Journal of Food Safety*, 6, 3: 141-170
- Rawel H.M., Rohn S., Kruse H.-P., Kroll J. 2002. Structural changes induced in bovine serum albumin by covalent attachment of chlorogenic acid. *Food Chemistry*, 78, 4: 443-455
- Read Jr R.B., Bradshaw J.G. 1966. Staphylococcal enterotoxin B thermal inactivation in milk. *Journal of Dairy Science*, 49, 2: 202-203

- Reynolds J.A., Herbert S., Polet H., Steinhardt J. 1967. The binding of divers detergent anions to bovine serum albumin. *Biochemistry*, 6, 3: 937-947
- Rice E.L. 1984. *Allelopathy*. 2nd ed. London, Academic Press: 424 str.
- Rice-Evans C.A., Miller N.J., Paganga G. 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology & Medicine*, 20, 7: 933-956
- Robards K., Prenzler P.D., Tucker G., Swatsitang P., Glover W. 1999. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry*, 66, 4: 401-436
- Robertson A., Bendall D.S. 1983. Production and HPLC analysis of black tea theaflavins and thearubigins during *in vitro* oxidation. *Phytochemistry*, 22, 4: 883-887
- Robinson J.O., Pearson J.C., Christiansen K.J., Coombs G.W., Murray R.J. 2009. Community-associated versus healthcare-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia: a 10-year retrospective review. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 28, 4: 353-361
- Rodríguez Vaquero M.J., Alberto M.R., Manca de Nadra M.C. 2007. Influence of phenolic compounds from wines on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 18, 5: 587-593
- Rohn S., Buchner N., Driemel G., Rauser M., Kroh L.W. 2007. Thermal degradation of onion quercetin glucosides under roasting conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 4: 1568-1573
- Roy A., Kucukural A., Zhang Y. 2010. I-TASSER: A unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature Protocols*, 5, 4: 725-738
- Rubinstein R.Y., Kroese D.P. 2008. *Simulation and the Monte Carlo method*. 2nd ed. New Jersey, John Wiley & Sons: 201-201
- Rupnik B. 1997. Polifenoli v netresku. Diplomsko delo. Ljubljana. Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 6-9
- Sandel M.K., McKillip J.L. 2004. Virulence and recovery of *Staphylococcus aureus* relevant to the food industry using improvements on traditional approaches. *Food Control*, 15, 1: 5-10
- Sander C., Schneider R. 1991. Database of homology-derived protein structures and the structural meaning of sequence alignment. *Proteins*, 9, 1: 56-68
- Sasikumar B. 2004. Rosemary. V: *Handbook of herbs and spices*. Vol. 2. Peter K.V. (ed.). Abington, Woodhead Publishing Ltd: 255-267

- Farlex Inc. 2007. Dorland's medical dictionary for health consumers: Wave. Huntingdon Valley, The free dictionary by Farlex: 1 str.
<http://medical-dictionary.thefreedictionary.com/wave-like> (junij 2010)
- Scalbert A., Williamson G. 2000. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *Journal of Nutrition*, 130, Suppl. 8: 2073S-2085S
- Schantz E.J., Roessler W.G., Wagman J., Spero L., Dunnery D.A., Bergdoll M.S. 1965. Purification of staphylococcal enterotoxin B. *Biochemistry*, 4, 6: 1011-1016
- Schlievert P.M. 1982. Enhancement of host susceptibility to lethal endotoxin shock by staphylococcal pyrogenic exotoxin type C. *Infection and Immunity*, 36, 1: 123-128
- Schlievert P.M., Aris P.A., Cleary P.P. 1996. Severe invasive group A streptococcal disease: Clinical description and mechanisms of pathogenesis. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 127, 1: 13-22
- Schmid X.F. 1997. Optical spectroscopy to characterize protein conformation and conformational changes V: Protein structure: A practical approach. Creighton T.E., Hames B.D. (eds.). Oxford, Oxford University Press: 261-296
- Schmitt C.K., Meysick K.C., O'Brien A.D. 1999. Bacterial toxins: Friends or foes? *Emerging Infectious Diseases*, 5, 2: 224-234
- Setchell K.D., Cassidy A. 1999. Dietary isoflavones: Biological effects and relevance to human health. *Journal of Nutrition*, 129, Suppl. 3: 758S-767S
- Shahidi F., Naczk M. 1995. Food phenolics. Lancaster, Technomic Publishing Co., Inc.: 331 str.
- Shaikh S.M.T., Seetharamappa J., Kandagal P.B., Ashoka S. 2006. Binding of the bioactive component isothipendyl hydrochloride with bovine serum albumin. *Journal of Molecular Structure*, 786, 1: 46-52
- Shan B., Cai Y.Z., Sun M., Corke H. 2005. Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 20: 7749-7759
- Shi X., Li X., Gui M., Zhou H., Yang R., Zhang H., Jin Y. 2010. Studies on interaction between flavonoids and bovine serum albumin by spectral methods. *Journal of Luminescence*, 130, 4: 637-644
- Shiota S., Shimizu M., Mizushima T., Ito H., Hatano T., Yoshida T., Tsuchiya T. 1999. Marked reduction in the minimum inhibitory concentration (MIC) of beta-lactams in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* produced by epicatechin gallate, an ingredient of green tea (*Camellia sinensis*). *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 22, 12: 1388-1390

- Shirley B.W. 1996. Flavonoid biosynthesis: new functions for an old pathway. *Trends in Plants*, 1, 11: 377-382
- Shoskes D.A., Zeitlin S.I., Shahed A., Rajfer J. 1999. Quercetin in men with category III chronic prostatitis: a preliminary prospective, double-blind, placebo-controlled trial. *Urology*, 54, 6: 960-963
- Siebert K.J. 1999. Effects of protein-polyphenol interactions on beverage haze, stabilization, and analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 2: 353-362
- Singer M., Wan J. 1977. Interaction of butylated hydroxytoluene (BHT) with phospholipid bilayer membranes: Effect on ^{22}Na permeability and membrane fluidity. *Biochemical Pharmacology*, 26, 23: 2259-2268
- Singh B.R., Evenson M.L., Bergdoll M.S. 1988. Structural analysis of staphylococcal enterotoxins B and C1 using circular dichroism and fluorescence spectroscopy. *Biochemistry*, 27, 24: 8735-8741
- Skibola C.F., Smith M.T. 2000. Potential health impacts of excessive flavonoid intake. *Free Radical Biology and Medicine*, 29, 3-4: 375-383
- Spectro Analysis Co. 2010. UV-visible spectroscopy. Bangkok, Spectro Analysis Co., Ltd.: 1 str.
<http://www.spectro.co.th/index.php?lay=show&ac=article&Id=538686094&Ntype=1> (junij 2010)
- Sriskandan S., Faulkner L., Hopkins P. 2007. Streptococcus pyogenes: Insight into the function of the streptococcal superantigens. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39, 1: 12-19
- Stamler J.S., Singel D.J., Loscalzo J. 1992. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science*, 258, 5090: 1898-1902
- Stanley N.L., Taylor L.J. 1993. Rheological basis of oral characteristics of fluid and semi-solid foods: A review. *Acta Psychologica*, 84, 1: 79-92
- Stapleton P.D., Shah S., Anderson J.C., Hara Y., Hamilton-Miller J.M.T., Taylor P.W. 2004. Modulation of beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus* by catechins and gallates. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 23, 5: 462-467
- Stark R.L., Middaugh P.R. 1969. Immunofluorescent detection of enterotoxin B in food and a culture medium. *Applied Microbiology*, 18, 4: 631-635
- Strack D. 1997. Phenolic metabolism. V: Plant biochemistry. Dey P.M., Harborne J.B. (eds.). San Diego, Academic Press: 387-416

- Soares S., Mateus N., Freitas V.D. 2007. Interaction of different polyphenols with bovine serum albumin (BSA) and human salivary alpha-amylase (HSA) by fluorescence quenching. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 16: 6726-6735
- 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
- Sudlow G., Birkett D.J., Wade D.N. 1976. Further characterization of specific drug binding sites on human serum albumin. *Molecular Pharmacology*, 12, 6: 1052-1061
- Sullivan R. 1969. Effects of enterotoxin B on intestinal transport *in vitro*. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 131, 4: 1159-1162
- Šikovec S. 1993. Vinarstvo – od grozdja do vina. Ljubljana, Kmečki glas: 82-82, 157-157
- Taiz L., Zeiger E. 1998. Plant physiology. 2nd ed. Sunderland, Sinaur Associates: 792 str.
- Tan Y., Siebert K. 2008. Modeling bovine serum albumin binding of flavor compounds (alcohols, aldehydes, esters, and ketones) as a function of molecular properties. *Journal of Food Science*, 73, 1: S56-S63
- Teale F.W., Weber G. 1957. Ultraviolet fluorescence of the aromatic amino acids. *Biochemical Journal*, 65, 3: 476-482
- Tian J., Liu J., Hu Z., Chen X. 2005. Interaction of wogonin with bovine serum albumin. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 13, 12: 4124-4129
- Tian J., Liu J., Tian X., Hu Z., Chen X. 2004. Study of the interaction of kaempferol with bovine serum albumin. *Journal of Molecular Structure*, 691, 1-3: 197-202
- Tiwari B.K., Valdramidis V.P., O'Donnell C.P., Muthukumarappan K., Bourke P., Cullen P.J. 2009. Application of natural antimicrobials for food preservation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 14: 5987-6000
- Trampuž A., Pikelj F. 2001. Na meticilin odporen *Staphylococcus aureus* (MRSA): Ali smo zamudili priložnost za zaježitev epidemije? *Medicinski Razgledi*, 40, Suppl. 2: 19S-29S
- Tsuchiya H., Sato M., Miyazaki T., Fujiwara S., Tanigaki S., Ohyama M., Tanaka T., Iinuma M. 1996. Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Ethnopharmacology*, 50, 1: 27-34
- Tsutomu N., Munetaka Y., Toshihiko O., Shunro K. 1993. Suppression of active oxygen-induced cytotoxicity by flavonoids. *Biochemical Pharmacology*, 45, 1: 265-267

- Todar K. 2009. The microbial world: *Staphylococcus* and staphylococcal disease. Madison, University of Wisconsin-Madison, Department of Bacteriology: 11 str. <http://textbookofbacteriology.net/themicrobialworld/staph.html> (avgust 2010)
- Tompa P. 2010. Structure and function of intrinsically disordered proteins. Boca Raton, CRC Press: 1-18, 55-72
- Tung M.A. 1978. Rheology of protein dispersions. Journal of Texture Studies, 9, 1-2: 3-31
- Turk T., Maček P., Anderluh G., Sepčić K. 1997. Biokemijski praktikum. Ljubljana, Študentska organizacija Univerze v Ljubljani: 32-33, 75-75
- van Oers N.S., Cohen B.L., Murgita R.A. 1989. Isolation and characterization of a distinct immunoregulatory isoform of alpha-fetoprotein produced by the normal fetus. Journal of Experimental Medicine, 170, 3: 811-825
- Vancraeynest D., Hermans K., Haesebrouck F. 2006. Prevalence of genes encoding exfoliative toxins, leucotoxins and superantigens among high and low virulence rabbit *Staphylococcus aureus* strains. Veterinary Microbiology, 117, 2-4: 211-218
- Vermerris W., Nicholson R. 2006. Phenolic compound biochemistry. Dordrecht, Springer: 276 str.
- Vesnaver G. 1987. Osnove spektrofluorimetrije. V: Živilsko inženirstvo 4. Bitenčevi živilski dnevi 1987, Ljubljana, 15. do 16. december 1987. Bučar F. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 67-76
- Walle T., Browning A.M., Steed L.L., Reed S.G., Walle U.K. 2005. Flavonoid glucosides are hydrolyzed and thus activated in the oral cavity in humans. Journal of Nutrition, 135, 1: 48-52
- Wang W. 1999. Instability, stabilization, and formulation of liquid protein pharmaceuticals. International Journal of Pharmaceutics, 185, 2: 129-188
- Wattel A., Kamel S., Mentaverri R., Lorget F., Prouillet C., Petit J.-P., Fardelonne P., Brazier M. 2003. Potent inhibitory effect of naturally occurring flavonoids quercetin and kaempferol on *in vitro* osteoclastic bone resorption. Biochemical Pharmacology, 65, 1: 35-42
- Wetzel R., Becker M., Behlke J., Billwitz H., Böhm S., Ebert B., Hamann H., Krumbiegel J., Lassmann G. 1980. Temperature behaviour of human serum albumin. European Journal of Biochemistry / FEBS, 104, 2: 469-478
- Wondra M. 1997. Zdravstveni učinki vina. V: Tehnologija, hrana, zdravje. Zv. 1. Knjiga del 1. slovenski kongres o hrani in prehrani z mednarodno udeležbo, Bled, 21. do 25. aprila 1996. Raspor P., Pitako D., Hočevar I. (ur). Ljubljana, Društvo živilskih in prehranskih strokovnih delavcev Slovenije: 39-45

- Woods J.B. 2005. USAMRIID medical management of biological casualties handbook. 6th ed. Maryland, U.S. Army Medical Research Institute of Infectious Diseases: 97-100
- Yang C.S., Chen L., Lee M.J., Balentine D., Kuo M.C., Schantz S.P. 1998a. Blood and urine levels of tea catechins after ingestion of different amounts of green tea by human volunteers. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 7, 4: 351-354
- Yang G.Y., Liao J., Kim K., Yurkow E.J., Yang C.S. 1998b. Inhibition of growth and induction of apoptosis in human cancer cell lines by tea polyphenols. *Carcinogenesis*, 19, 4: 611-616
- Yang J.T. 1961. The viscosity of macromolecules in relation to molecular conformation. *Advances in Protein Chemistry*, 16: 323-400
- Zbigniew M. 1996. Genetic algorithms + data structures = evolution programs. 3rd ed. Berlin, Springer-Verlag: 387 str.
- Zgórka G., Głowniak K. 2001. Variation of free phenolic acids in medicinal plants belonging to the Lamiaceae family. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 26, 1: 79-87
- Zhang Z.F. 2008. Fruits, vegetables and teas may protect smokers from lung cancer. Researchers report. ScienceDaily, May 31, 2008: 2 str.
<http://www.sciencedaily.com/releases/2008/05/080529091128.htm> (avgust 2010)
- Zsila F., Bikádi Z., Simonyi M. 2003. Probing the binding of the flavonoid, quercetin to human serum albumin by circular dichroism, electronic absorption spectroscopy and molecular modelling methods. *Biochemical Pharmacology*, 65, 3: 447-456

ZAHVALA

Najprej bi se rad najlepše zahvalil mentorici prof. dr. Nataši Poklar Ulrich za vsestransko nesebično pomoč, nasvete pri raziskovalnem delu in pisaju diplomske naloge ter za ves trud, razumevanje in spodbudne besede.

Rad bi se zahvalil tudi somentorici asist. dr. Mihaeli Skrt, ki me je spremljala pri laboratorijskem delu in svetovala pri urejanju in obdelavi podatkov.

Zahvaljujem se tudi asist. dr. Črtomirju Podlipniku da me je popeljal v svet molekulskega modeliranja.

Zahvala gre tudi recenzenti doc. dr. Poloni Jamnik za strokovni pregled diplomske naloge in za podane koristne napotke za izboljšavo le-te.

Zahvalil bi se rad tudi prof. dr. Tatjani Košmerl, predsednici komisije za zagovor za sodelovanja pri moji diplomi in predvsem za vso pomoč, nasvete in trud pri realizaciji Erasmus študijske izmenjave na Finskem in Erasmus prakse na Švedskem.

Ob tej priložnosti bi se rad zahvalil celotni ekipi iz Katedre za biokemijo in kemijo živil Oddelka za živilstvo saj mislim, da smo se imeli res lepo.

Posebna zahvala gre Jani Martinuč, Andreji Habjan in Mateji Vidmar za vso tehnično pomoč pri eksperimentalnem delu diplomskega dela.

Zahvalil bi se rad tudi Ajdi Ota, Petri Terpinc, Špeli Može, Katji Pirc, Dejanu Gmajnerju in Marku Šnajderju za res nepozabne trenutke, ki smo jih preživel skupaj v laboratoriju in za vse strokovne nasvete.

Zahvala gre tudi kolegicama Mateji Presečnik in Tjaši Prevc za prijetno družbo v laboratoriju.

Zahvaljujem se tudi Lini Burkan za pregled referenc in same oblike diplomske naloge ter Anji Miklavčič za hitre slovnične napotke.

Velika zahvala gre tudi naši Katji Černe za vso njeni pomoč pri tiskanju in vezavi diplomske naloge.

Prav tako pa se zahvaljujem cimrom, še posebno Urošu Gnidovcu, s katerimi sem preživel res lepe in nepozabne trenutke.

Največja zahvala gre mojima staršema Marjetki in Antonu Benediku, ki sta mi omogočila študij. Zahvala gre tudi sestri Tinki in bratu Davidu.

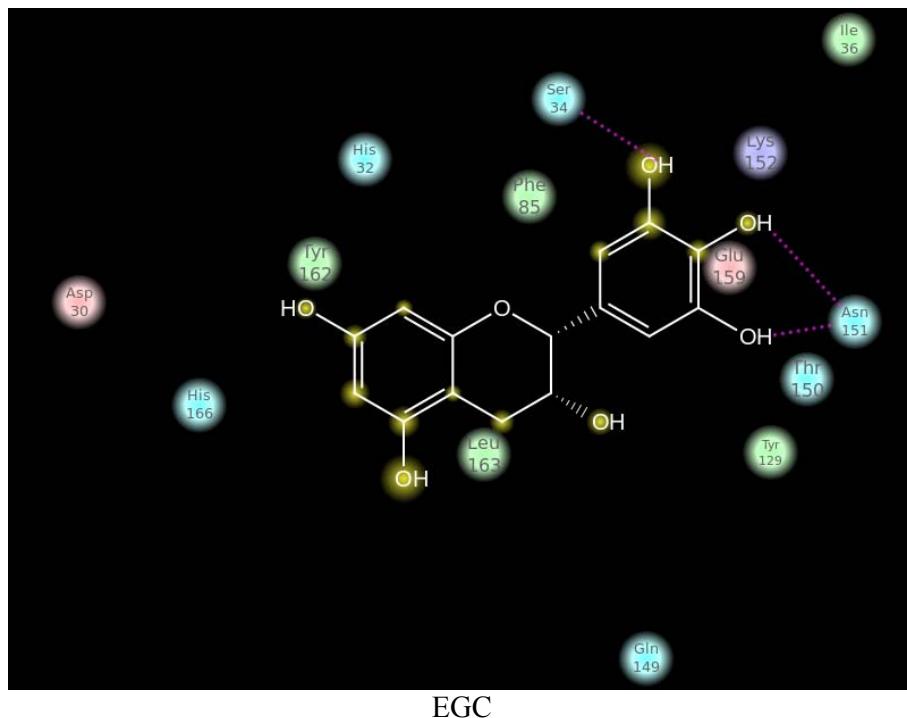
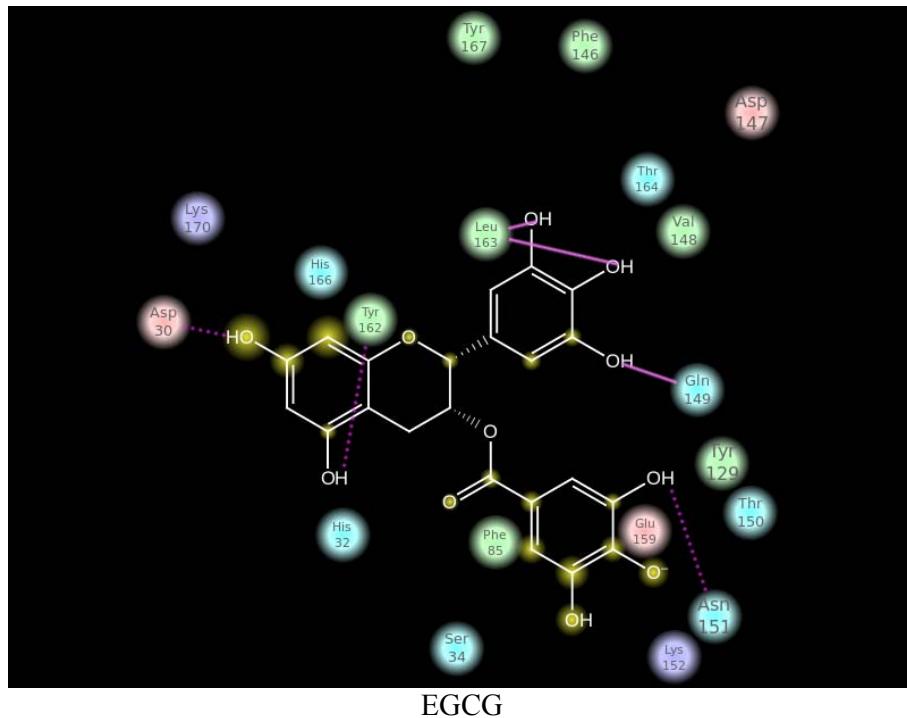
Seznam ljudi, ki so bili tako ali drugače vpletjeni v moje študentsko življenje je še zelo dolg ampak, ker imam že tako preveliko število strani v diplomski nalogi se moram na tej točki ustaviti!

PRILOGE

Legenda k prilogam:

- vodikova vez med hidroksilno skupino na polifenolni spojini in med aminokislinskimi ostanki na proteinu
- vodikova vez med hidroksilno skupino na polifenolni spojini in med skeletom proteina
-  pozitivno nabiti aminokislinski ostanki
-  nenabiti polarni aminokislinski ostanki
-  hidrofobni aminokislinski ostanki
-  aminokislina glicin
-  negativno nabiti aminokislinski ostanki
-  rumene lise različnih velikosti ponazarjajo izpostavljenost liganda topilu; večji je krogec, bolj je ligand izpostavljen topilu in obratno

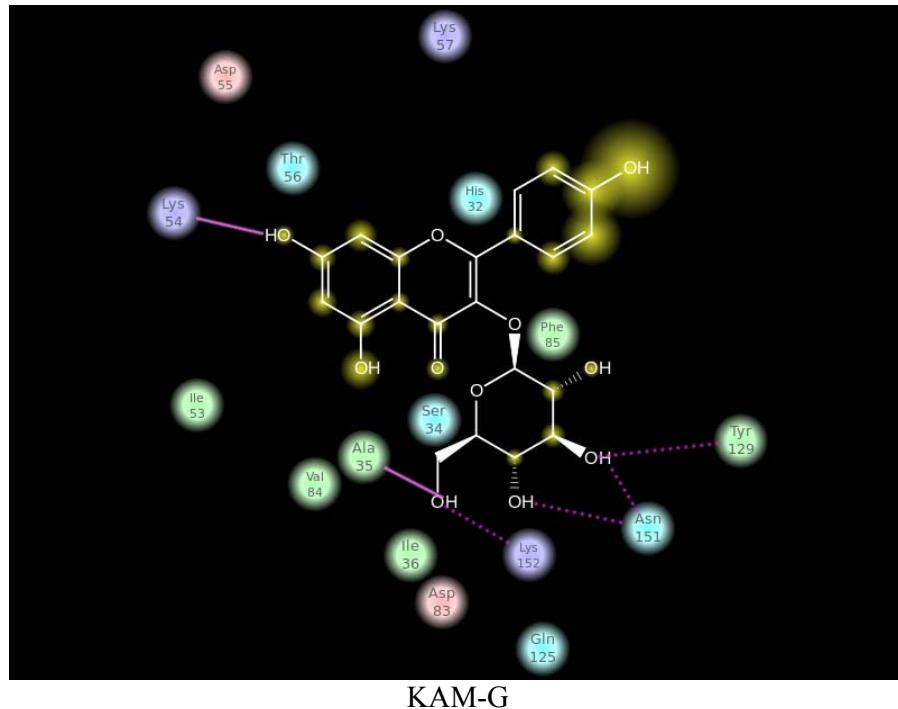
Priloga A: Interakcijski diagrami za SEB protein in polifenolne spojine EGCG, EGC, KAM-G, KAM za teoretični model št. 5



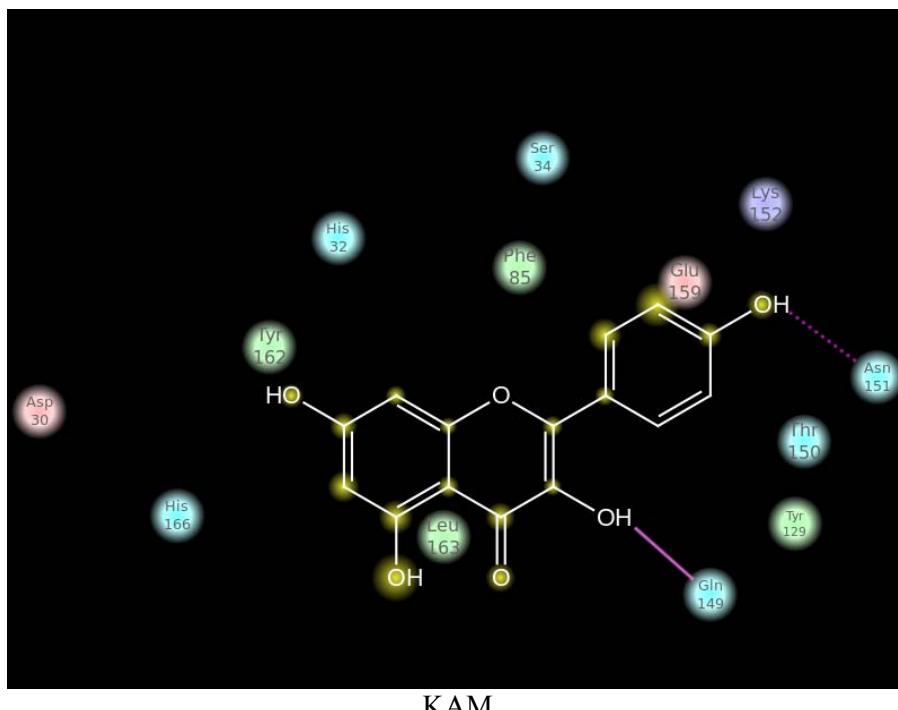
se nadaljuje

nadaljevanje

Priloga A: Interakcijski diagrami za SEB protein in polifenolne spojine EGCG, EGC, KAM-G, KAM za teoretični model št. 5

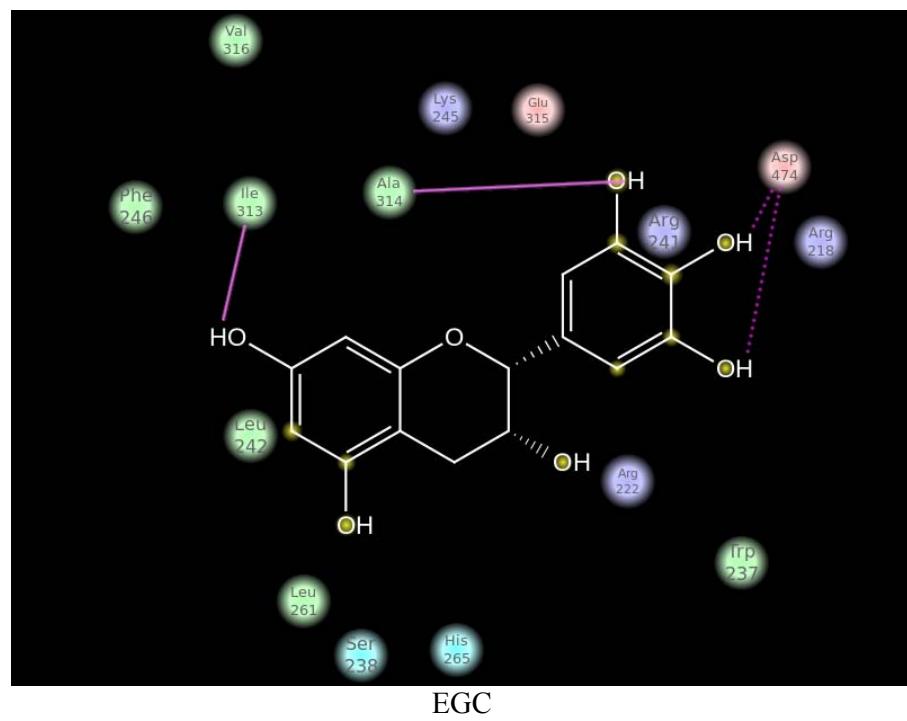
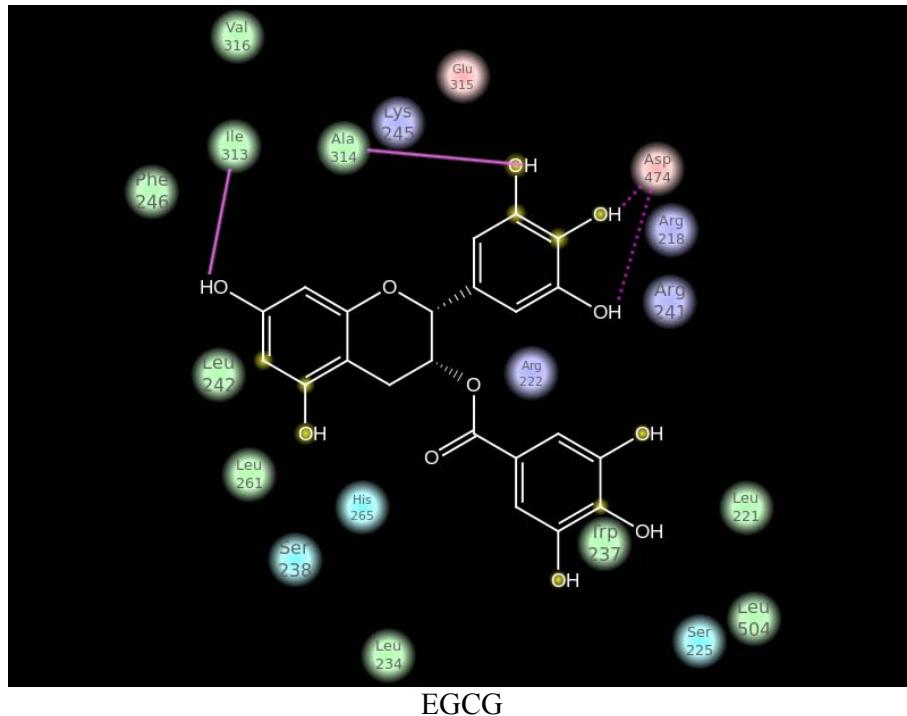


KAM-G



KAM

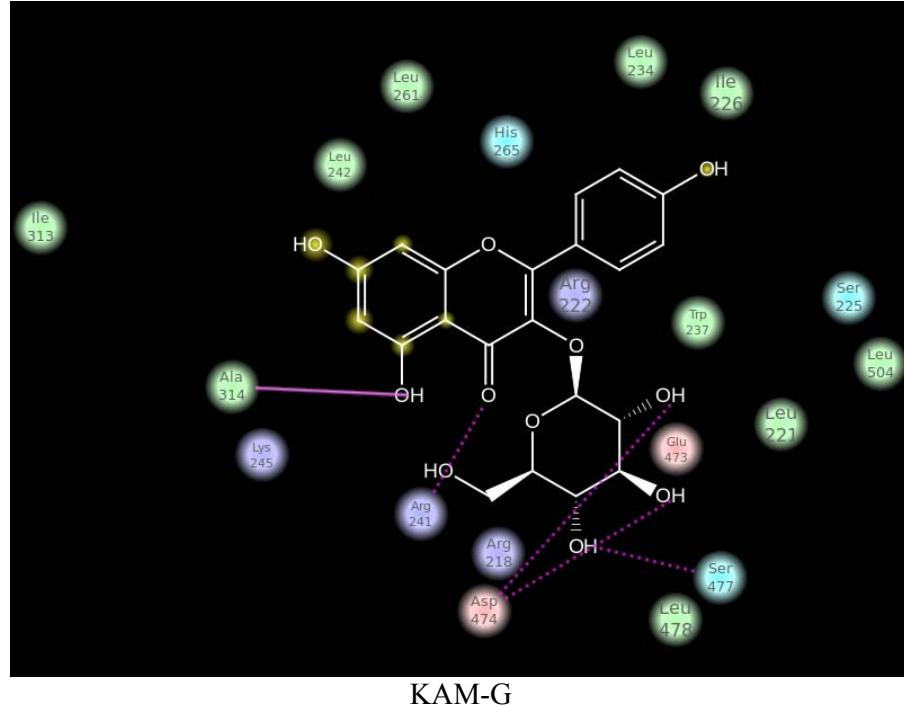
Priloga B: Interakcijski diagrami za BSA protein in polifenolne spojine EGCG, EGC, KAM-G, KAM, KAM, ECG, KAV, KVER, NAR, p-KUM in R.K. za teoretični model št. 3



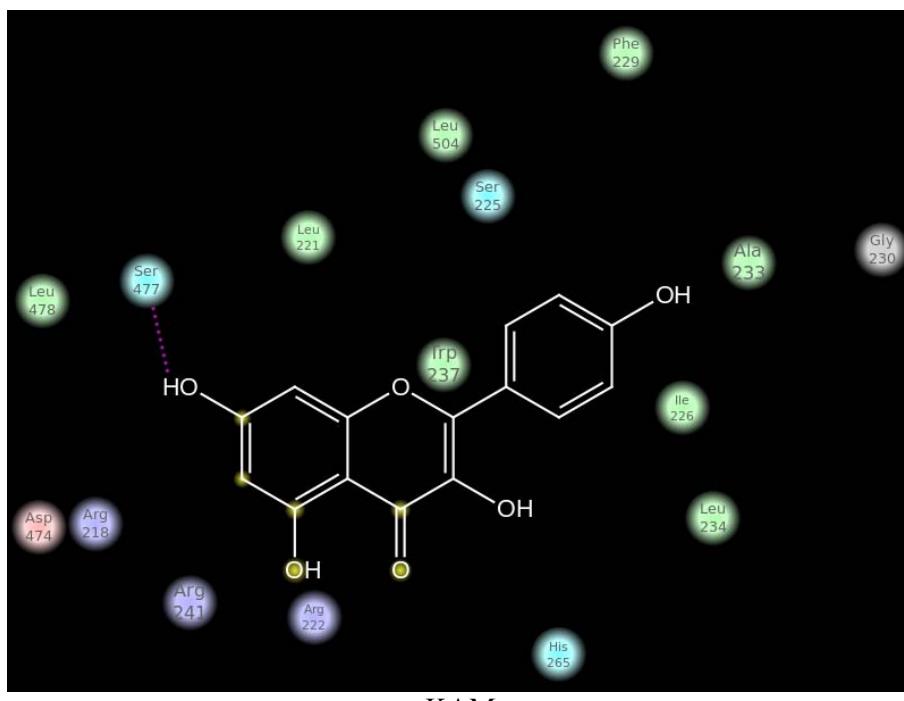
se nadaljuje

nadaljevanje

Priloga B: Interakcijski diagrami za BSA protein in polifenolne spojine EGCG, EGC, KAM-G, KAM, KAM, ECG, KAV, KVER, NAR, p-KUM in R.K. za teoretični model št. 3



KAM-G

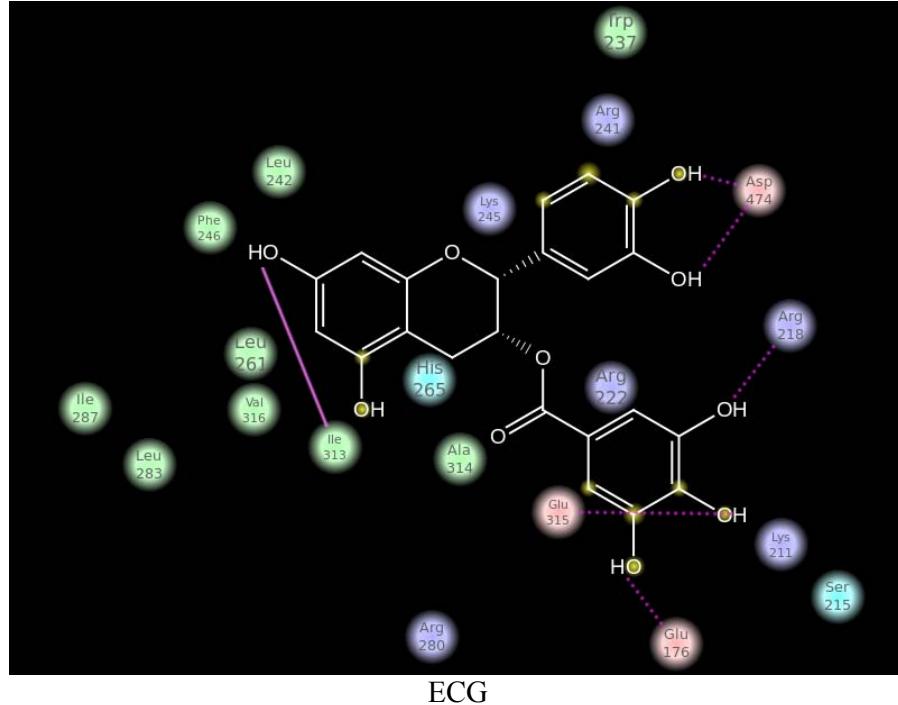


KAM

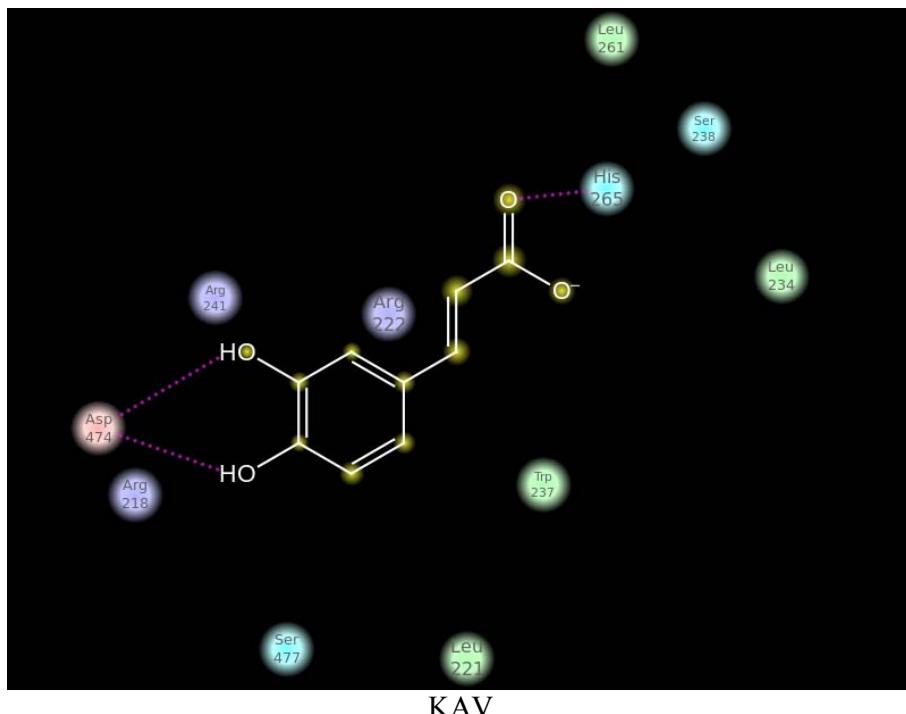
se nadaljuje

nadaljevanje

Priloga B: Interakcijski diagrami za BSA protein in polifenolne spojine EGCG, EGC, KAM-G, KAM, KAM, ECG, KAV, KVER, NAR, p-KUM in R.K. za teoretični model št. 3



ECG

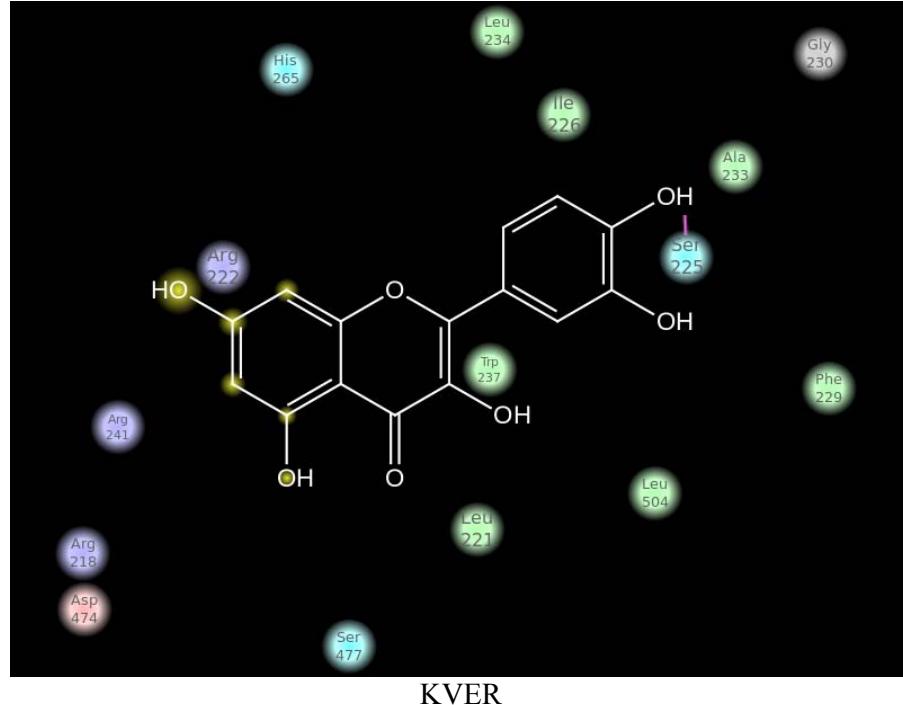


KAV

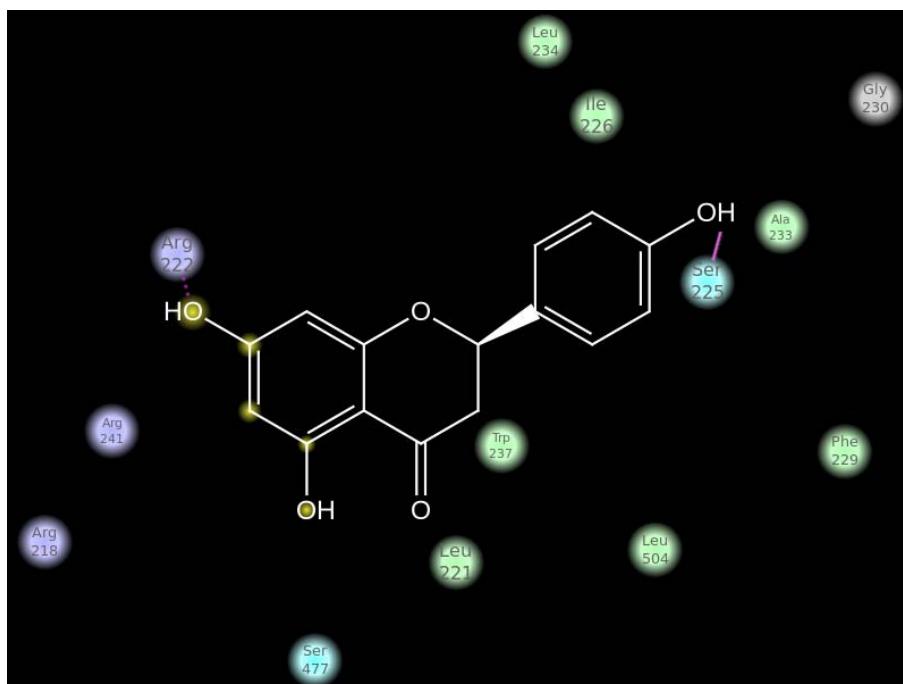
se nadaljuje

nadaljevanje

Priloga B: Interakcijski diagrami za BSA protein in polifenolne spojine EGCG, EGC, KAM-G, KAM, KAM, ECG, KAV, KVER, NAR, p-KUM in R.K. za teoretični model št. 3



KVER

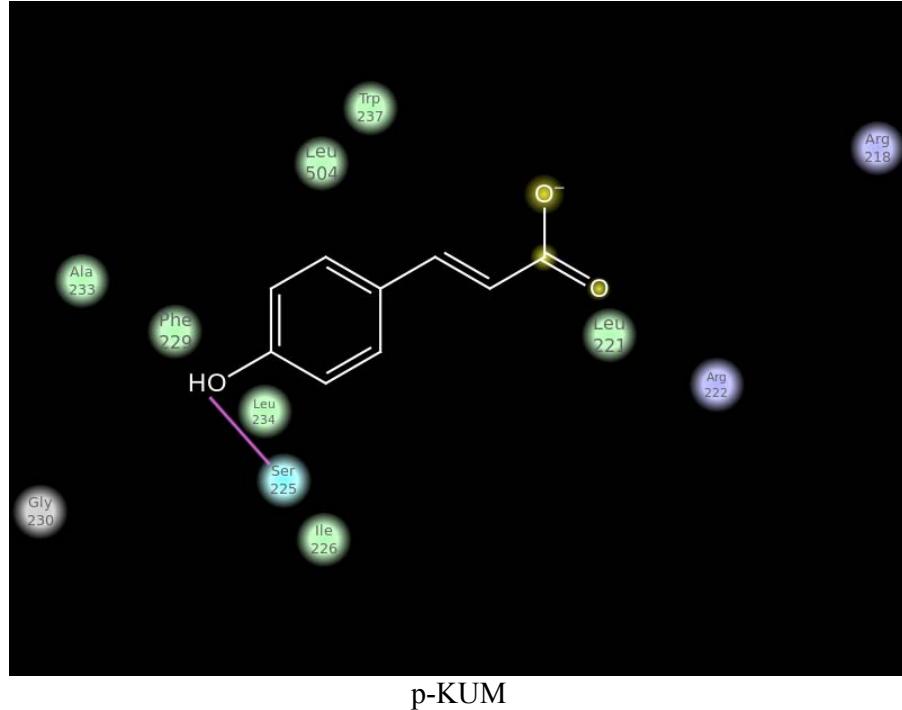


NAR

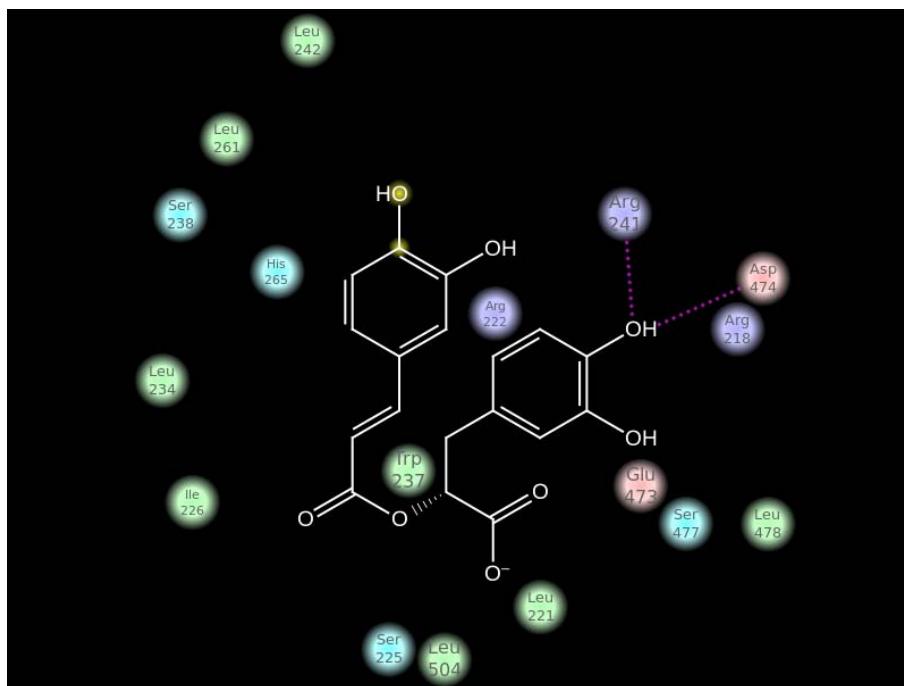
se nadaljuje

nadaljevanje

Priloga B: Interakcijski diagrami za BSA protein in polifenolne spojine EGCG, EGC, KAM-G, KAM, KAM, ECG, KAV, KVER, NAR, p-KUM in R.K. za teoretični model št. 3



p-KUM



R.K.