

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Mateja PRESEČNIK

**ŠTUDIJ VEZAVE POLIFENOLOV NA GOVEJI SERUMSKI ALBUMIN Z
DIFERENČNO DINAMIČNO KALORIMETRIJO**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**THE STUDY OF POLYPHENOLS BINDING TO BOVINE SERUM ALBUMIN WITH
DIFFERENTIAL SCANNING CALORIMETRY**

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.

Študijska komisija Oddelka za živilstvo je za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Natašo Poklar Ulrich, za somentorico asist. dr. Mihaela Skrt, za recenzenta pa prof. dr. Davida Stoparja.

Mentorica: prof. dr. Nataša Poklar Ulrich

Somentorica: asist. dr. Mihaela Skrt

Recenzent: prof. dr. David Stopar

Komisija za zagovor:

Predsednik:

Članica:

Članica:

Član:

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Mateja Presečnik

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 547.56:577.112+577.3:536.6+543.545(043)=163.6
KG	polifenoli/goveji serumski albumin/BSA/kampferol/epigalokatehin/ epigalokatehin galat/kampferol-3-glukozid/denaturacija/diferenčna dinamična kalorimetrija/DSC/stafilokokni enterotoksin
AV	PRESEČNIK, Mateja
SA	POKLAR ULRIH, Nataša (mentorica)/SKRT, Mihaela (somentorica)/STOPAR, David (recenzent)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI	2010
IN	ŠTUDIJ VEZAVE POLIFENOLOV NA GOVEJI SERUMSKI ALBUMIN Z DIFERENČNO DINAMIČNO KALORIMETRIJO
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XI, 46 str., 5 pregl., 22 slik, 9 pril., 45 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Rastline se s sintezo fenolnih spojin ščitijo pred napadi virusov, bakterij in tudi rastlinojedih organizmov ter pred nevarnimi sončnimi žarki, ki sprožajo nastanek prostih radikalov. Prenos fenolnih spojin v organizmu po zaužitju še ni popolnoma raziskan. Goveji serum albumin (BSA) je znan po prenosu nepolarnih molekul po krvnem obtoku. Z dodajanjem različnih fenolnih spojin k proteinu BSA smo s pomočjo diferenčne dinamične kalorimetrije žeeli preučiti vpliv teh spojin na termično in termodinamsko stabilnost proteina. Pri raziskavah vezave fenolnih spojin na BSA smo uporabili diferenčno dinamično kalorimetrijo (DSC), elektroforezne tehnike ter metodo merjenja antioksidativne aktivnosti (AOP) z DPPH [•] reagentom. Z DSC metodo lahko zaznamo vse topotne spremembe, ki se zgodijo ob kemijskih reakcijah ali faznih prehodih vzorca. Iz DSC termogramov je razvidno, da dodatek kampferola, epigalokatehina, epigalokatehin galata in kampferol-3-glukozida povzroči dvig temperature denaturacije (T_d) in zvišanje entalpije (ΔH_d). Elektroforegrami pri različnih razmerjih BSA in fenolne spojin ne spremenijo elektroforetske proge samega BSA. Metoda merjenja antioksidativne aktivnosti pokaže, da se AOP samega BSA ob dodatku vseh uporabljenih fenolnih spojine poveča, medtem ko se AOP same fenolne spojine zmanjša pri vezavi kampferola, epigalokatehina ali epigalokatehin galata na BSA in poveča pri vezavi kampferol-3-gukozida na BSA.

KEY WORD DOKUMENTATION

DN	Dn
DC	UDC 547.56:577.112+577.3:536.6+543.545(043)=163.6
CX	polyphenols/bovine serum albumin/BSA/kaempferol/epigallocatechin/ pigallocatechin gallate/kaempferol-3-glucoside/denaturation/differential canning calorimetry/DSC/ staphylococcal enterotoxin
AU	PRESEČNIK, Mateja
AA	POKLAR ULRIH, Nataša (supervisor)/SKRT, Mihaela (co- advisor)/STOPAR, David (reviewer)
PP	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB	University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Department of Food Science and Technology
PY	2010
TI	THE STUDY OF POLYPHENOLS BINDING TO BOVINE SERUM ALBUMIN WITH DIFFERENTIAL SCANNING CALORIMETRY
DT	Graduation Thesis (University studies)
NO	XI, 46 p., 5 tab., 22 fig., 9 ann., 45 ref.
LA	Sl
AL	sl/en
AB	Plants synthesize phenolic compounds in order to protect themselves, from virus, bacteria and also herbivore organisms attacks and from dangerous sun rays, which trigger the formation of free radicals. The transfer of phenolic compounds in an organism after the consumption is not completely understood. Bovine serum albumin (BSA) is known for transporting nonpolar molecules in the blood circulation. We were researching the influence of different phenolic compounds on thermal and thermodynamic stability of protein by adding different phenolic compounds to the protein BSA. To investigate the binding of phenolic compounds to BSA, we used the differential scanning calorimetry (DSC), electrophoretic techniques and the method of measuring antioxidative activity (AOP) with a DPPH ⁺ radical. With the DSC method, we can follow all thermal changes, which occur with chemical reactions or phase transitions of the sample. It is evident from the DSC thermograms, that the addition of kaempferol, epigallocatechin, epigallocatechin gallate and kaempferol-3-glucoside, induces the increase of denaturation temperature (T_d) and enthalphy (ΔH_d). Electrophoregrams at different molar ratios between BSA and phenolic compounds do not change the electrophoretical line of BSA. The method of measuring the antioxidative activity shows, that the AOP of BSA increases by adding all used phenolic compounds, meanwhile the AOP of the phenolic compound alone decreases by adding kaempferol, epigallocatechin or epigallocatechin gallate to BSA and increases by adding kaempferol-3-glucoside to BSA.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORD DOKUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
KAZALO PRILOG	X
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA.....	1
1.2 DELOVNE HIPOTEZE.....	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 GOVEJI SERUMSKI ALBUMIN (BSA).....	2
2.2 FENOLNE SPOJINE	4
2.2.1 Uporabljene fenolne spojine.....	5
2.2.1.1 Kampferol.....	5
2.2.1.2 Epigalokatehin.....	5
2.2.1.3 Kampferol -3- glukozid	6
2.2.1.4 Epigalokatehin galat.....	6
2.3 VEZAVA FENOLNIH SPOJIN NA PROTEINE	7
2.4 STAFILOKOKNI ENTEROTOKSINI.....	10
3 MATERIALI IN METODE	11
3.1 MATERIALI.....	11
3.1.1 Fenolne spojine	11
3.1.2 Reagenti.....	11
3.2 METODE DELA.....	11
3.2.1 Dializa.....	12
3.2.2 Kromatografija.....	12
3.2.3 Elektroforeza	12
3.2.3.1 Nativna elektroforeza	12
3.2.3.2 Poliakrilamidna elektroforeza v prisotnosti natrijevega dodecil-sulfata (NaDS-PAGE)	13
3.2.4 Metoda z 1,1-difenil-2-pikrilhidrazilom (DPPH⁺ radikalom)	14

3.2.5 Diferenčna dinamična kalorimetrija (DSC)	15
4 REZULTATI	18
4.1 GELSKA KROMATOGRAFIJA	18
4.2 ELEKTROFOREZA	19
4.2.1 Nativna elektroforeza.....	19
4.2.2 NaDS-PAGE elektroforeza.....	24
4.3 METODA Z DPPH ⁺ RADIKALOM	26
4.4 DIFERENČNA DINAMIČNA KALORIMETRIJA	27
4.4.1 Reverzibilnost faznih prehodov	27
4.4.2 Fazni prehodi govejega serumskega albumina (BSA) v odvisnosti od kampferola, epigalokatehina, epigalokatehin galata in kampferol-3-glukozida ter stafilokoknega enterotoksina B (SEB).....	29
5 RAZPRAVA IN SKLEPI	37
5.1 RAZPRAVA	37
5.2 SKLEPI	41
6 POVZETEK.....	42
7 VIRI.....	43
ZAHVALA.....	47
PRILOGE	48

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Aminokislinska sestava BSA brez signalnega dela (583AK) (ExPASy, 2010). 2	
Preglednica 2: Aminokislinska sestava HSA brez signalnega dela (585AK) (Dugaiczky in sod., 1982)	3
Preglednica 3: Razvrstitev fenolnih spojin (Abram, 2000).....	4
Preglednica 4: Primerjava termodinamskih količin toplotne denaturacije BSA v prisotnosti kampferola, epigalokatehina, epigalokatehin galata ter kampferol-3-glukozida in SEB. T ₁ , T ₂ , T ₃ , T ₄ – posamezne temperature denaturacije, ΔH ₁ , ΔH ₂ , ΔH ₃ , ΔH ₄ - spremembe entalpije denaturacije posameznih vrhov, ΔH _{cal} – sprememba entalpije denaturacije celotnega prehoda.	35
Preglednica 5: Prikaz spremembe entalpije denaturacije celotnega prehoda glede na BSA. ...	36

KAZALO SLIK

Slika 1: Struktorna formula kampferola (Tocris, 2010).....	5
Slika 2: Struktorna formula epigalokatehina (Herbs-tech, 2010a).....	5
Slika 3: Struktorna formula kampferol-3-glukozida (Chemicalbook, 2007).....	6
Slika 4: Struktorna formula epigalokatehin galata (Herbs-tech, 2010b).....	6
Slika 5: Shema merilne enote N-DSC III s kapilarnimi celicami za A-referenco in B-vzorec (User's manual, 2005).	16
Slika 6: Primer tipičnega termograma za endotermni proces (Microcal, 2008). Cp – navidezna presežna toplotna kapaciteta, ΔH - sprememb entalpije denaturacije.	17
Slika 7: Gelska kromatografija BSA (97 %) na G-100 gelu. ($\gamma = 10 \text{ mg/ml}$, pH = 7,5, mobilna faza je 20 mM Na-fosfatni pufer, kateremu je dodana raztopina NaCl s končno koncentracijo 150 mM, pH = 7,5). Puščici na kromatogramu označujeta frakciji 25 in 26.	18
Slika 8: Nativna elektroforeza BSA z epigalokatehin galatom in rožmarinsko kislino pri 25 °C.....	19
Slika 9: Nativna elektroforeza BSA s kampferolom in kvercetinom pri 25 °C.....	20
Slika 10: Nativna elektroforeza BSA z epigalokatehinom in kampferol-3-glukozidom pri 25 °C.....	21
Slika 11: Nativna elektroforeza BSA in SEB v prisotnosti fenolnih spojin pred in po segrevanju na 120 °C.....	22
Slika 12: Nativna elektroforeza BSA in SEB s širšimi žepki v prisotnosti fenolnih spojin pred in po segrevanju na 120 °C.	23
Slika 13: NaDS elektroforeza BSA in SEB v prisotnosti fenolnih spojin pred in po segrevanju na 120 °C (brez reducenta).....	24
Slika 14: Prikaz antioksidativne aktivnosti vzorcev fenolnih spojin (FS) ter mešanic fenolnih spojin z BSA-jem ($\gamma = 1 \text{ mg/ml}$). Rumeni stolpci prikazujejo antioksidativno odvisnost samega BSA-ja in mešanic BSA/FS, oranžni pa prikazujejo antioksidativno aktivnost fenolnih spojin.	26
Slika 15: DSC termogram BSA (raztopljen v 20 mM HEPES pufru, $\gamma = 1 \text{ mg/ml}$, pH = 7,52). Prikaz merjenih krivulj segrevanja in ohlajevanja.	27

Slika 16: DSC termogram BSA (raztopljen v 20 mM HEPES pufru, $\gamma = 1 \text{ mg/ml}$, pH = 7,52) ob dodatku kampferola v množinskem razmerju 1:1. Prikaz merjenih krivulj segrevanja in ohlajanja. 27

Slika 17: DSC termogram BSA (raztopljen v 20 mM HEPES pufru, $\gamma = 1 \text{ mg/ml}$, pH = 7,52) ter termogram BSA ob dodatku 96 % etanola. Črne črte so originalne normalizirane meritve, barvne pa najboljši fiti. S črtanimi črtami so predstavljeni rezultati dekonvolucije. 29

Slika 18: DSC termogram BSA (raztopljen v 20 mM HEPES pufru, $\gamma = 1 \text{ mg/ml}$, pH = 7,52) ob dodatku kampferola v molskem razmerju 1:1 in 1:2 v primerjavi z BSA termogramom v prisotnosti enakih količin 96 % etanola. Črne črte so originalne normalizirane meritve, barvne pa najboljši fiti. S črtanimi črtami so predstavljeni rezultati dekonvolucije. 30

Slika 19: DSC termogram BSA (raztopljen v 20 mM HEPES pufru, $\gamma = 1 \text{ mg/ml}$, pH = 7,52) ob dodatku epigalokatehina v molskem razmerju 1:1 in 1:2 v primerjavi z BSA termogramom v prisotnosti enakih količin 96 % etanola. Črne črte so originalne normalizirane meritve, barvne pa najboljši fiti. 31

Slika 20: DSC termogram BSA (raztopljen v 20 mM HEPES pufru, $\gamma = 1 \text{ mg/ml}$, pH = 7,52) ob dodatku epigalokatehin galata v molskem razmerju 1:1 in 1:2 v primerjavi z BSA termogramom v prisotnosti enakih količin 96 % etanola. Črne črte so originalne normalizirane meritve, barvne pa najboljši fiti. 32

Slika 21: DSC termogram BSA (raztopljen v 20 mM HEPES pufru, $\gamma = 1 \text{ mg/ml}$, pH = 7,52) ob dodatku kampferol-3-glukozida v molskem razmerju 1:1 in 1:2 v primerjavi z BSA termogramom v prisotnosti enakih količin 96 % etanola. Črne črte so originalne normalizirane meritve, barvne pa najboljši fiti. 33

Slika 22: DSC termogram SEB (raztopljen v 25 mM fosfatnem pufru, $\gamma = 0,25 \text{ mg/ml}$, pH = 7,4). Črna črta je originalna meritev, barvna pa najboljši fit. 34

KAZALO PRILOG

Priloga A: Nativna elektroforeza dveh frakcij (25, 26) iz gelske kromatografije z 97 % BSA na G-100 gelu. Gel je sestavljen iz 9 % ločevalnega gela in 4 % zbiralnega gela.

Priloga B: Prikaz odstotnih vrednosti antioksidativne aktivnosti mešanic fenolnih spojin z BSA-jem ($\gamma = 1 \text{ mg/ml}$) ter vzorcev fenolnih spojin (FS).

Priloga C: DSC termogram BSA (raztopljen v 20 mM HEPES pufru, $\gamma = 1 \text{ mg/ml}$, pH= 7,52) ob dodatku kampferola v množinskem razmerju 1:2. Prikaz merjenih krivulj segrevanja in ohlajanja.

Priloga D: DSC termogram BSA (raztopljen v 20 mM HEPES pufru, $\gamma = 1 \text{ mg/ml}$, pH= 7,52) ob dodatku epigalokatehina v množinskem razmerju 1:2. Prikaz merjenih krivulj segrevanja in ohlajanja.

Priloga E: DSC termogram BSA (raztopljen v 20 mM HEPES pufru, $\gamma = 1 \text{ mg/ml}$, pH= 7,52) ob dodatku epigalokatehina v množinskem razmerju 1:2. Prikaz merjenih krivulj segrevanja in ohlajanja.

Priloga F: DSC termogram BSA (raztopljen v 20 mM HEPES pufru, $\gamma = 1 \text{ mg/ml}$, pH= 7,52) ob dodatku epigalokatehin galata v množinskem razmerju 1:1. Prikaz merjenih krivulj segrevanja in ohlajanja.

Priloga G: DSC termogram BSA (raztopljen v 20 mM HEPES pufru, $\gamma = 1 \text{ mg/ml}$, pH= 7,52) ob dodatku epigalokatehin galata v množinskem razmerju 1:2. Prikaz merjenih krivulj segrevanja in ohlajanja.

Priloga H: DSC termogram BSA (raztopljen v 20 mM HEPES pufru, $\gamma = 1 \text{ mg/ml}$, pH= 7,52) ob dodatku kampferol-3-glukozida v množinskem razmerju 1:1. Prikaz merjenih krivulj segrevanja in ohlajanja.

Priloga I: DSC termogram BSA (raztopljen v 20 mM HEPES pufru, $\gamma = 1 \text{ mg/ml}$, pH= 7,52) ob dodatku kampferol-3-glukozida v množinskem razmerju 1:2. Prikaz merjenih krivulj segrevanja in ohlajanja.

Okrajšave in simboli

AK aminokislina

AOP antioksidativna aktivnost

BSA goveji serumski albumin

CQA klorogenska kislina

DPPH⁺ 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil

DSC diferenčna dinamična kalorimetrija

EGC epigalokatehin

EGCG epigalokatehin galat

FS fenolna spojina

HEPES 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonska kislina

HSA človeški serumski albumin

KAMG kampferol-3-glukozid

KAMF kampferol

MK maščobna kislina

NaDS natrijev dodecil-sulfat

SEB stafilocokni enterotoksin B

1 UVOD

Številne raziskave navajajo podatke o stрукtri govejega serumskega albumina, možnih vezavah manjših molekul ter posledičnih spremembah v njegovi funkciji. BSA je globularni protein z veliko molekulske maso. Izoliran je iz krvne plazme govedi, v kateri predstavlja približno polovico krvnih serumskih proteinov in je med njimi tudi največji protein. Serumski albumini imajo funkcijo transportnih sistemov za prenos nepolarnih molekul kot so steroidi, maščobne kisline in tiroidni hormoni.

Zaradi dobro preučenih fizikalnih lastnosti BSA-ja je le-ta zelo pripraven za uporabo kot modelni protein za številne raziskave.

V raziskavi smo zajeli nekatere fenolne spojine, ker ni še popolnoma znano, kako se te molekule prenašajo po organizmu. Zaradi sposobnosti BSA, da prenaša nepolarne molekule po krvnem obtoku, smo preučevali vezavo različnih fenolnih spojin na ta protein. Fenolne spojine spadajo med antioksidante, raziskave na tem področju pa lahko precej pripomorejo k razumevanju obnašanja fenolnih spojin v organizmu.

Antioksidanti so znani po tem, da nam po zaužitju predstavljajo naravno obliko obrambe pred prostimi radikali, ki jih zaužijemo s hrano, ali pa se pri razgradnji hrane (oksidaciji) tvorijo v telesu. Prosti radikali so molekule, atomi ali ioni z vsaj enim nesparjenim elektronom, ki so zelo reaktivni in lahko poškodujejo celične strukture. Prosti radikali nastajajo tudi zaradi kajenja, pretiranega sončnega sevanja in stresa. Taki napadi na celice kasneje lahko vodijo do različnih bolezni, najbolj izrazita med njimi so gotovo rakava obolenja.

Prenizka koncentracija antioksidantov lahko v telesu povzroči oksidativni stres. Med antioksidante prištevamo vitamine (A, E, C), beta karotene, fenolne spojine in tudi nekatere encime.

S pridobljenimi podatki smo želeli postaviti model obnašanja vezav fenolnih spojin na proteine, ter vse skupaj preveriti še na nekaj vzorcih stafilokoknega enterotoksina.

1.1 NAMEN DELA

- Preučiti vezavo fenolnih spojin na BSA.
- Ugotoviti vpliv različnih fenolnih spojin na stabilnost BSA.
- Preveriti ali se fenolne spojine vežejo tudi na enterotoksin SEB.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

- Fenolne spojine se vežejo na BSA in s tem spremenijo termično in entalpijsko stabilnost proteina.
- Ob dodatku različnih fenolnih spojin bo učinek različno močno izražen.
- Derivati fenolnih spojin (epigalokatechin galat in kampferol-3-glukozid) vplivajo na vezavo fenolne spojine na protein.

2 PREGLED OBJAV

2.1 GOVEJI SERUMSKI ALBUMIN (BSA)

BSA je globularni protein v krvni plazmi govedi. Je glavni protein plazme in ima dobro vezavno sposobnost za vodo, Ca^{2+} , K^+ , Na^+ , maščobne kislina, hormone, bilirubin in tudi nekatera zdravila. Njegova glavna funkcija je tudi regulacija osmotskega tlaka v krvi. BSA je glavni prenašalec cinka v plazmi (Lu in sod., 2008).

Polipeptidna veriga BSA je sestavljena iz 583 aminokislinskih ostankov, signalno zaporedje pa je sestavljeno iz 24 aminokislinskih ostankov. BSA ima 99 negativno nabitih aminokislinskih ostankov (asparaginska kislina in glutaminska kislina) in 82 pozitivnih (arginin in lizin). Njegova molska masa je 66432,9 g/mol, teoretična izoelektrična točka $\text{pI} = 5,6$. V njegovi strukturi se nahaja 17 disulfidnih mostičkov in ena prosta -SH skupina (Barone in sod., 1995).

Preglednica 1: Aminokislinska sestava BSA brez signalnega dela (583AK) (ExPASy, 2010).

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

Tridimenzionalna konfiguracija BSA je sestavljena iz treh homolognih domen (I, II, III). Vsaka od teh domen je sestavljena iz dveh poddomen (IA, IB, ipd.), ki sta po večini helične strukture in na široko povezani s številnimi disulfidnimi mostički (Michnick, 2003).

BSA je eden izmed najbolj proučevanih albuminov predvsem zaradi visoke strukturne homologije s človeškim serum albuminom (HSA), kar pa naredi te raziskave še posebej pomembne s stališča razvoja novih zdravil (Xiao in sod., 2008).

Albumini različnih vrst sesalcev imajo veliko fizikalno-kemijskih podobnosti. Za BSA in HSA so odkrili kar 76% sekvenčno ujemanje. Ta dva albumina imata podobne fizikalno-kemijske lastnosti, podobne površinske hidrofobne lastnosti in podobno se obnašata v vodnih dvofaznih sistemih (Michnick in sod., 2006).

Polipeptidna veriga HSA je sestavljena iz 585 aminokislinskih ostankov, njeno signalno zaporedje pa je tako kot pri BSA-ju dolgo 24 aminokislinskih ostankov. Tako BSA, kot tudi HSA, imata 17 disulfidnih mostičkov. Polipeptidna veriga HSA vsebuje 98 (asparaginska kislina in glutaminska kislina) negativno nabitih in 83 (arginin in lizin) pozitivno nabitih aminokislinskih ostankov (Lawn in sod., 1981).

Preglednica 2: Aminokislinska sestava HSA brez signalnega dela (585AK) (Dugaiczyk in sod., 1982).

Lev 61	Val 41	Phe 31	Gly 13
Lys 59	Cys 35	Arg 24	Asn 17
Glu 61	Thr 28	Tyr 18	Ile 8
Ala 62	Ser 24	Gln 20	Met 6
Asp 36	Pro 24	His 16	Trp 1

V referenčni študiji so Michnik in sodelavci (2006) izvedli raziskavo termične stabilnosti BSA in HSA z uporabo diferenčne dinamične kalorimetrije. Testirali so tudi oba albumina brez vezanih maščobnih kislin (MK), (BSAf-BSA brez MK in HSAf-HSA brez MK). Uporabljali so koncentracije od 1 mg/ml do 10 mg/ml, toplotno območje pa je obsegalo od 20 °C do 100 °C. Pri različnih koncentracijah in hitrostih segrevanja so opazovali temperaturno stabilnost albuminov brez vezanih maščobnih kislin in navadnih oblik obeh proteinov.

Naši raziskavi najbljižja koncentracija je bila $\gamma = 2 \text{ mg/ml}$, pri kateri so izmerili $T_d = 68,0 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Ta podatek so dobili s segrevanjem s hitrostjo 90 °C/h. Naše poskuse termične denaturacije BSA smo izvajali pri sledečih pogojih: hitrost segrevanja 60 °C/h, koncentracija proteina v vzorcu 1 mg/ml, pH = 7,52. Pri koncentraciji $\gamma = 3 \text{ mg/ml}$ in hitrosti segrevanja 60 °C/h, ki sta najbližji našim meritvam, so izmerili $T_d = 68,9 \text{ }^{\circ}\text{C}$. T_d in ΔH se večata, ko višamo koncentracijo proteina v vzorcu.

Ugotovili so, da so proteini HSA bolj termično stabilni kot albumini govejega izvora. V vodni raztopini pa je najbolj kompaktno strukturo ohranil BSA z vezanimi maščobnimi kislinami.

POMEMBNA UGOTOVITEV TE ŠTUDIJE (Michnik in sod., 2006) JE, DA OBSTAJA RAZLika V STABILNOSTI MED ALBUMINI, KOT TUDI MED OSNOVNIMI OBLIKAMI IN TISTIMI BREZ VEZANIH MAŠČOBNIH KISLIN.

Albumini z vezanimi maščobnimi kislinami se razvijejo pri višjih temperaturah in spremembalentalpije je večja. Odsotnost maščobnih kislin povzroči zmanjšanje reverzibilnosti toplotnega denaturacijskega procesa (Michnik in sod., 2006).

2.2 FENOLNE SPOJINE

Fenolne spojine so zelo široka skupina organskih substanc, ki imajo aromatični del (obroč) in vsaj eno – OH skupino vezano direktno nanj. Osnovne spojine so fenoli, vendar pa ima večina v svoji strukturi vključenih več – OH skupin, zato se pogosto pojavlja izraz polifenoli (Abram, 2000).

Samo majhno število polifenolov je živalskega izvora, večina je rastlinskega izvora in so pravzaprav karakteristične snovi, ki jih vsebujejo rastlinska tkiva (Harborne, 1994).

Fenolne spojine, izolirane iz rastlinskega tkiva, so kemijsko aktivne in imajo ponavadi kisle lastnosti. Razen v izjemnih primerih lahko tvorijo vodikove vezi, na intramolekularni ravni, med 5 – hidroksi in 4 – karbonilno skupino v večini flavonoidov. Fenolne spojine se lahko povezujejo tudi intermolekularno. Njihova lastnost je tudi sposobnost keliranja kovinskih ionov. Kelirani kovinski ioni pa imajo morda tudi veliko vlogo v bioloških sistemih (Harborne, 1994).

Fenolne spojine delimo glede na število ogljikovih atomov v osnovnem skeletu:

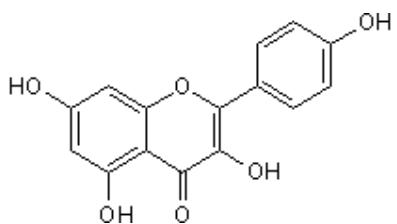
Preglednica 3: Razvrstitev fenolnih spojin (Abram, 2000).

št. C atomov	osnovni skelet	skupina
6	C ₆	fenoli
7	C ₆ C ₁	fenolne kisline
8	C ₆ C ₂	fenilacetne kisline
9	C ₆ C ₃	hidroksicimetne 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
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

2.2.1 Uporabljene fenolne spojine

2.2.1.1 Kampferol

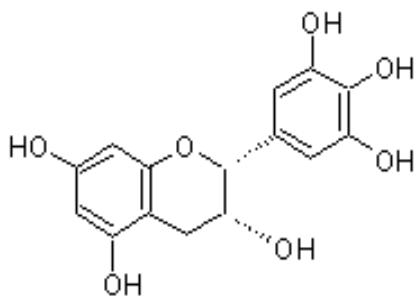
Kampferol spada med flavonoide. Njegova molska masa je 286,24 g/mol, kemijska formula pa je $C_{15}H_{10}O_6$. V standardnih pogojih je rumen kristalen prah. Kampferol se nahaja v največjih količinah v jabolkih, čebuli, poru, citrusih, grozdju, rdečem vinu in ginko bilobi (Tocris, 2010).



Slika 1: Strukturna formula kampferola (Tocris, 2010).

2.2.1.2 Epigalokatehin

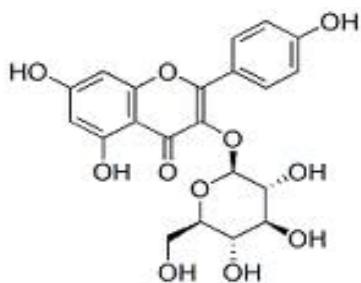
Epigalokatehin spada med katehine in je poznan tudi pod imenom flavan-3-ol. V standardnih razmerah se nahaja v obliki belega prahu. Njegova molska masa je 306,3 g/mol, kemijska formula pa $C_{15}H_{14}O_7$. Nahaja se pretežno v zelenem čaju, bananah in granatnem jabolku (Herbs-tech, 2010).



Slika 2: Strukturna formula epigalokatehina (Herbs-tech, 2010a).

2.2.1.3 Kampferol -3- glukozid

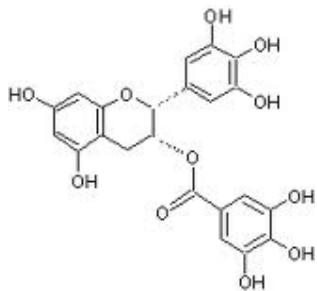
Kampferol -3- glukozid ima kemijsko formulo $C_{21}H_{20}O_{11}$, njegova molska masa pa je 448, 38 g/mol (Chemicalbook, 2007).



Slika 3: Struktorna formula kampferol-3-glukozida (Chemicalbook, 2007).

2.2.1.4 Epigalokatehin galat

Epigalokatehin galat se nahaja večinoma v listih zelenega čaja. Nekaj ga je tudi v listih črnega čaja, vendar pa zaradi fermentacije oksidira v nekatere druge temnejše obarvane molekule. Njegova molska masa je 458,37 g/mol, kemijska formula pa je $C_{22}H_{18}O_{11}$ (Herbs-tech, 2010). Z raziskavami so dokazali že veliko koristnih vlog v bioloških sistemih. Pripomogel naj bi k ustavitevi produkcije kisikovih prostih radikalov, inhibiciji ksantin oksidaze, antikarcinogenih efektih na različne organe ter inhibiciji tvorbe tumorjev in metastaz v transplantiranih in spontano induciranih metastaznih modelih (Lin in Weng, 2006).



Slika 4: Struktorna formula epigalokatehin galata (Herbs-tech, 2010b).

2.3 VEZAVA FENOLNIH SPOJIN NA PROTEINE

Vezave fenolnih spojin na proteine so predmet številnih raziskav. Včasih je raziskava osredotočena na protein in vezavo različnih snovi nanj, nekateri avtorji pa proučujejo kako protein, kot mesto kamor se vežejo fenolne spojine, vpliva na aktivnost samih fenolnih spojin. Nekatere fenolne spojine imajo sposobnost obarjati alkaloidne, želatine in globularne proteine iz raztopin. Interakcije med fenolnimi spojinami in proteini so tudi glavni vzrok za neželjeno motnost v pivu, vinu in bistrih sadnih sokovih. Posamezne fenolne spojine imajo pozitivno vlogo v procesu izboljšanja strukture in stabilnosti pene v živilskih proizvodih (Prigent in sod., 2003).

Dodatek fenolnih spojin iz zelenega čaja povzroči boljšo toplotno stabilnost mleka, kar nakazuje na možno uporabo fenolnih spojin kot aditivov v živilstvu (Prigent in sod., 2003).

V tehnologiji predelave mesa je že dolgo znano, da fenolne spojine preprečujejo oksidacijo maščob in s tem preprečijo neželjen žarek okus in vonj mesa in mesnih izdelkov.

Waszkowiak in sodelavci (2008) so proučevali kateri proteinski prenašalec bi bil najboljši v primeru prenosa antioksidantov po mesnem nadevu v klobasah. Ugotovili so, da je kolagen najboljši prenašalec za ekstrakt rožmarina, ki so si ga izbrali kot dodatek klobasam. Rožmarinski ekstrakt vsebuje pretežno rožmarinsko kislino in karnozolno kislino ($C_{20}H_{28}O_4$). V prisotnosti kolagena ekstrakt ohrani, če ne celo poveča aktivnost, vendar le če je v hidrirani obliki, ker le tako lahko tudi bolje reagira z lipidi v klobasah (Waszkowiak in sod., 2008).

Proučevali so tudi vezavo ekstrakta rožmarina na elastin. Pri vezavi na elastin je ekstrakt izgubil nekaj svoje aktivnosti. Elastin vsebuje več prolina, ki reagira z ekstraktom rožmarina. V kolagenu je prisotna večja vsebnost hidroksiprolina, ki pa ne reagira z ekstraktom rožmarina. V primeru, ko so kolagen hidrolizirali, pa je bilo zaradi tega na voljo več prolina in vezava je bila podobno slaba kot pri elastinu (Waszkowiak in sod., 2008).

Veliko raziskav je tudi na področju vezave klorogenske kisline (CQA) na različne proteine. Prigent in sodelavci (2007) so proučevali interakcije med fenolnimi spojinami in proteini predvsem s stališča pomembnosti teh reakcij v živilski industriji. V želji po razumevanju poteka teh interakcij so opazovali kovalentne reakcije med klorogensko kislino (CQA), oksidirano s polifenol oksidazo v kislem območju ($pH < 6$), ter α -laktoalbuminom in lizocimom. Rezultate so primerjali z neencimsko induciranimi kovalentnimi interakcijami v alkalnem ($pH = 9$) med BSA in CQA.

Topnost so merili z Dumasovo metodo sežiganja in proteinskim analizatorjem, z diferenčno dinamično kalorimetrijo pa so merili spremembo termične stabilnosti (BSA $\gamma = 2\text{g/L}$).

Ugotovili so, da obe modifikaciji klorogenske kisline premakneta ravnotežje v smeri tvorbe dimerov. Tvorba dimerov vodi do zmanjšanja topnosti proteinov. Topnost lizocima se je zmanjšala v širokem območju pH vrednosti, α -laktoalbuminu pa le okoli njegove izoelektrične točke. BSA je bil najbolj odporen na vplive CQA, saj so rahle spremembe v topnosti zaznali le pri nizkih pH vrednostih.

Temperatura denaturacije proteina BSA je bila $60,4 \pm 0,3^\circ\text{C}$, pri molskem razmerju CQA/BSA = 60/1 pa $65,8 \pm 0,6^\circ\text{C}$ (Prigent in sod., 2007).

Rawel in sodelavci (2002) so preučevali interakcije BSA in klorogenske kisline v alkalnem območju ($pH = 9$). Njihov namen je bil ugotoviti, kaj se na strukturni in funkcionalni ravni zgodi

s proteinom ob dodatku različnih koncentracij klorogenske kisline. Klorogensko kislino so dodajali k BSA-ju v molskih razmerjih 1:19, 1:27, 1:39, 1:64 in 1:97.

Klorogenska kislina se kot orto-difenol v alkalnem pH spremeni v pripadajoč o-kinon, ki se lahko kovalentno veže z nukleofilnimi skupinami na proteinih (triptofanski, lizinski ali cisteinski ostanek). BSA v zmesi s klorogensko kislino tvori topne konjugate. Ugotovili so, da se število prej omenjenih nukleofilnih skupin na proteinu zmanjša, če povečajo koncentracijo klorogenske kisline, kar pomeni, da je prišlo do interakcij.

Vsebnost prostih aminokislinskih ostankov so analizirali z uporabo trinitrobenzensulfonske kisline (TNBS) v 1 % raztopini Na-dodecilsulfata. Vsebnost triptofana so izmerili s fluorescenčnim detektorjem v raztopini 8 M uree, spremembo vsebnosti tiolnih skupin (cistein) pa so določili s tekočinsko kromatografijo.

Pri primerjanju reaktivnosti vseh treh ostankov so ugotovili, da je najbolj reaktivno mesto triptofan, saj se poveže s klorogensko kislino že ob majnih dodatkih (Rawel in sod., 2002).

Poleg omenjenih aminokislinskih ostankov, triptofana, lizina in cisteina pa so že teoretično in eksperimentalno dokazali, da imajo tudi metionin, histidin, tirozin in N-končni prolin potencialna mesta za vezavo fenolnih spojin (Rawel in sod., 2002).

Pri reakciji BSA s klorogensko kislino so ugotovili, da se zmanjša vsebnost α -helične strukture, ob istočasnem povečanjem ostale strukture (β -struktura), kar nakazuje na destruktiven učinek CQA na sekundarno strukturo proteina.

Pri isti raziskavi so z meritvami na DSC-ju so po dodatku CQA zabeležili znižanje temperature in entalpije denaturacije BSA-ja.

Te rezultati so pokazali, da se proteinu do neke stopnje spremeni struktura, to pa odpira možnosti za elektrostatske reakcije s polarnimi topili in s tem zmanjšanje topnosti derivatov, ki pri teh reakcijah nastanejo. Takšne interakcije lahko povzročijo tudi omejeno prebavljivost proteinov v živilu, kot tudi poslabšano absorpcijo esencialnih amino kislin kot sta triptofan in lizin (Rawel in sod., 2002).

Prigent in sodelavci (2003) so proučevali tudi možnost tvorbe nekovalentnih vezi med proteini ter fenolnimi spojinami in posledično vpliva takih interakcij na toplotno denaturacijo in topnost globularnih proteinov.

Zanimivo je, da so z DSC meritvami prišli do popolnoma drugačnih ugotovitev kot pri raziskavi, ki so jo opravili Rawel in sod. (2002). Temperatura denaturacije in entalpija sta bili večji po dodatku klorogenske kisline.

Ugotovili so, da ima BSA pri pH=7 vezavna mesta, ki se medseboj precej razlikujejo glede afinitete vezave za določene spojine. Pri nekovalentnih vezavah so opazili nekaj veznih mest s srednjo afiniteto, kot tudi veliko mest z nizko afiniteto, kar jim je razložilo vse težjo vezavo CQA ob večanju dodane količine.

Pri višjih temperaturah se je množina vezane CQA na BSA močno znižala, tudi pri temperaturah, kjer BSA še ni bil denaturiran. Število in jakost hidrofilnih interakcij (van der Waalsove, vodikove, elektrostatske vezi) pada z višanjem temperature. Avtorji so sklepali, da se CQA veže na BSA s hidrofilnimi interakcijami.

Zaključili so z ugotovitvijo, da ima pri tako nizkem razmerju kot ga najdemo v hrani (CQA/protein = 30/1), CQA premajhno afiniteto za BSA, da bi povzročila precipitacijo proteinov. Za vidnejše spremembe bi potrebovali razmerje vsaj CQA/protein = 100/1 (Prigent in sod., 2003).

Nekateri avtorji so testirali tudi interakcije fenolnih spojin z drugimi proteini. Rawel in sodelavci (2002) so raziskali sojin rezervni protein glicinin. Raziskava je zanimiva predvsem iz stališča predelave soje oziroma njene ekstrakcije, ki se izvaja v alkalnih pogojih. Tudi pri sojinih proteinih so opazili zmanjšanje števila lizinskih, triptofanovih in cisteinskih ostankov, kar verjetno pomeni, da je prišlo do derivatizacije proteina. Derivatizacija je odvisna od tega katero fenolno spojino dodamo proteinu, zaradi različnega števila in postavitve hidroksilnih skupin v njihovi strukturi (Rawel in sod., 2002).

Proučevali so vezave velikega števila fenolnih spojin in opazili, da je vezava zelo odvisna od strukture fenolne spojine, množine dodane fenolne spojine in seveda samih pogojev reakcije.

Morinaga in sodelavci (2005) so proučevali vezavo rastlinskih polifenolov na kolera toksin, ki je protein.

Domnevali so, da lahko rastlinski polifenoli zaradi obarjanja proteinov, preprečijo vstop toksina v celico.

Uporabili so ekstrakt iz nezrelih jabolk, (applephenon, ABT), hmeljev ekstrakt (HBT) in tanin, izoliran iz rabarbare (RG-tanin). Ekstrakt iz kislih jabolk je sestavljen iz klorogenske kisline, katehinov in procianidinov. Hmeljev ekstrakt vsebuje veliko flavonoidov in procianidinov, RG-tanin pa skupek mnogih fenolnih spojin, ki jih povezuje enaka osnovna poli-galatna struktura (Oi in sod., 2002).

Ugotovili so, da koncentrirana oblika ABT in HBT inhibira vezavo toksina na Vero celice. Vero celice so izolirali iz epitelija ledvic Afriške zelene opice, kot celična linija pa so izredno dovetne za širok spekter virusov. Zaradi te lastnosti jih množično uporabljajo za razvoj novih zdravil proti boleznim povezanimi s temi virusi (Phillips, 2010). HBT je inhibiral vezavo toksina za 80 % že pri dodatku 50 µg/ml, za ABT je bila potrebna večja koncentracija, medtem ko RG-tanin ni bil učinkovit.

2.4 STAFILOKOKNI ENTEROTOKSINI

Stafilocokni enterotoksini so skupina ekstracelularnih proteinov, ki so odgovorni za veliko različnih vrst obolenj in zastrupitev. Stafilocokne enterotoksine sintetizira bakterija *Staphylococcus aureus*. Enterotoksini povzročajo med drugim prebavne motnje, kožne infekcije, vnetje srčne opne, pljučnico, infekcijsko vnetje sklepov in vnetje kostnega mozga (Tseng in sod., 2005). Bakterija je posebej nevarna tudi zato, ker proizvaja poleg ekstracelularnih proteinov tudi druge virulentne komponente, ki se na takšen ali drugačen način vežejo na celično steno in ji s tem škodujejo. Za zastrupitev zadostuje že med 20 ng in 100 ng toksina na osebo (Yang in sod., 2009).

Posebej alarmantno je število prijavljenih zastrupitev s temi toksini v ZDA. Na leto zdravniško pomoč obišče kar 2 milijona ljudi, vendar je verjetno neprijavljenih primerov še veliko več (Liu in sod., 2004).

Stafilocokni enterotoksini so klasificirani v šest seroloških skupin: A, B, C₁, C₂, D in E. V posamezne serološke skupine so toksini razdeljeni glede na reakcije s specifičnimi protitelesi. Po strukturi so majhni proteini z molsko maso okoli 30000 g/mol in imajo podobne strukturne in biološke lastnosti. Največje količine enterotoksinov se proizvedejo v po-eksponencialni fazi bakterijske rasti.

Aktiven enterotoksin B (SEB) je sestavljen iz ene polipeptidne verige, ki je sestavljena iz 239 aminokislinskih ostankov in ima molsko maso 28336 g/mol (Mahmood in sod., 1990).

Različni sevi *S. aureus* proizvajajo različne količine SEB, ki lahko nihajo od nekaj µg do več sto µg na mililiter gojišča kulture.

Za detektiranje SEB-a in ostalih stafilocoknih enterotoksinov so razvili različne metode. Pri CNT metodi (carbon nano tubes), so v uporabi ogljikovi cilindri, s premerom nekaj nanometrov in dolžino do nekaj milimetrov. Meja detekcije s CNT metodo je 0,1 ng/ml. Slaba stran te metode je težavnost pri uporabi in toksičnost teh cilindrov. Pri tej metodi je detekcija osnovana na elektrokemičnem signalu, razvijajo pa tudi take oblike, ki bi lahko nase vezale razne imunosenzorje. Na ta način bi lahko metodo povezali z encimsko imunskimi testi (ELISA), ki so bili do sedaj najpogostejša metoda za detekcijo toksinov (Yang in sod., 2008). Problem pri ELISA metodi je, da pogosto ni dovolj občutljiva za detekcijo tako majhnih količin toksinov zadostnih za zastrupitev. V zadnjem času so razvili novo metodo, kjer detekcija poteka z zlatimi nano delci.

Metoda temelji na posebnih imunosenzorjih, ki merijo luminescenco. Zlati nano delci imajo sposobnost povečanja občutljivosti detekcije biološkega materiala zaradi njihove velike površine in električne prevodnosti. Delci imajo tudi dobre optične lastnosti, kar jih naredi še bolj uporabne pri detekciji luminiscence biološkega materiala. Problem se pojavi, ker vse metode, ki temeljijo na uporabi nano delcev, zahtevajo nove detekcijske sisteme, kar pa močno otežuje njihovo praktično uporabo (Yang in sod., 2009).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

Za naše raziskave smo uporabili štiri fenolne spojine in 99 % čist BSA. Raztopine fenolnih spojin smo pripravili z raztpaljanjem v 96 % etanolu. Raztopino BSA smo pripravili z raztpaljanjem BSA v 20 mM HEPES pufra s pH 7,52. Vse raztopine fenolnih spojin, BSA-ja in pufra smo med raziskavami hranili v hladilniku, kjer so bile v temi in zavarovane s parafilmom.

3.1.1 Fenolne spojine

Z analizami smo preverjali učinkovitost vezave kampferola (Extrasynthese), epigalokatehina (Extrasynthese), epigalokatehin galata (Extrasynthese) in kampferol -3- glukozida (Extrasynthese) na protein BSA (Sigma-Aldrich, 99 %). Analizirali smo raztopine mešanic fenolnih spojin in BSA v množinskem razmerju 1:1 in 1:2.

3.1.2 Reagenti

Pri analitskem delu smo uporabljali čiste reagente in kemikalije od podjetij Sigma Aldrich, Merck, Pharmacia fine chemicals, Extrasynthese in Riedel. Pri pripravi raztopin smo uporabljali izključno deionizirano vodo miliQ. Posamezne uporabljeni kemikaliji so navedene ob podrobni opisih uporabljenih metod.

3.2 METODE DELA

Priprava 20 mM raztopine HEPES pufra za nadalnje delo:

Količino 9,5324 g smo raztopili v ustreznom volumnu milli Q vode, uravnali pH na 7,52 ter razredčili do 2000 ml.

Priprava 25 mM raztopine fosfatnega pufra za nadalnje delo:

Zatehtali smo 0,2177 g K₂HPO₄ v 50 ml bučko in jo dopolnili do oznake z miliQ. Količino 0,1701 g KH₂PO₄ smo stresli v drugo 50 ml bučko in dopolnili do oznake z miliQ. Nato smo izmerili pH v prvi bučki. Ker je bil previsok, smo ga uravnali z dodajanjem raztopine iz druge bučke. Umerili smo vrednost pH na 7,4.

3.2.1 Dializa

Pripravili smo si založno raztopino BSA v 20 mM HEPES pufru s pH 7,52. Vzorec smo prenesli v dializno vrečko z mejno vrednostjo zadrževanja molekul velikosti 12000 g/mol (Sigma) in 24 ur dializirali v 100-kratni količini 20 mM HEPES pufra s pH 7,52. Dializna vrečka je bila potopljena v pufer v katerem smo z magnetnim mešalnikom omogočili konstantno mešanje.

Po končani dializi smo raztopini spektrofotometrično izmerili koncentracijo pri karakteristični valovni dolžini 280 nm .

3.2.2 Kromatografija

Z gelsko filtracijo smo preverjali, ali bi lahko 97 % protein BSA očistili primesi.

Gel Sephadex G-100 smo suspendirali v Na-fosfatnem pufru (20 mM, pH = 7,5). Suspenzijo gela smo po 72 urah nalili v stekleno kolono z notranjim premerom 3cm. Gelu je bil dodan natrijev azid kot antimikrobnostvo.

Pripravljeno kromatografsko kolono smo najprej spirali z mobilno fazo (20 mM Na-fosfatni pufer, 150 mM NaCl, pH=7,5).

Prosti volumen kolone (void volume), V_0 , smo določili z modrim dekstrandom (molekulska masa 200000 Da). Totalni volumen kolone smo določili po formuli $V_t = \pi \times r^2 \times L$, pri čemer je r notranji polmer kolone (1,5cm), L pa višina gela v stekleni koloni (25cm). Pretok mobilne faze skozi kolono je bil 0,71 ml na minuto.

Zbirali smo 2 ml-frakcije. Frakcijam smo nato pomerili absorbanco pri 278 nm, narisali kromatogram, ter posamezne frakcije nadalje analizirali z elektroforezno metodo.

3.2.3 Elektroforeza

Z elektroforezo na poliakrilamidnih gelih smo analizirali raztopine 97 % BSA, dializiranega 99 % BSA, pripravljene mešanice BSA in posameznih fenolnih spojin, frakciji iz gelske filtracije raztopine 97 % BSA, ter raztopine, ki smo jih analizirali z diferenčno dinamično kalorimetrijo.

Za prvi set elektroforeznih meritev smo pripravili diskontinuirni gel iz dveh različno zamreženih faz: iz 9 % ločevalnega in 4 % zbiralnega gela.

3.2.3.1 Nativna elektroforeza

LOČEVALNI GEL:

Naredili smo 9 % ločevalni gel.

Za pripravo tega smo zmešali 4,5 ml miliQ vode,

3,0 ml 30 % raztopine akrilamida in bisakrilamida ter
2,5 ml 1,5 M Tris-HCl pufra s pH = 8.

Mešanico smo razplinili v ultrazvočni kopeli. Dodali smo 50 µl 10 % amonijevega persulfata (APS) in 5 µl tetrametyletiendiamina (TEMED), rahlo premešali in vlili med dve stekleni plošči.

ZBIRALNI GEL:

Pripravili smo 4 % zbiralni gel.

Za pripravo tega smo zmešali 6,2 ml miliQ vode,

1,3 ml 30% raztopine akrilamida in bisakrilamida ter

2,5 ml 0,5 M Tris-HCl pufra s pH = 8.

Mešanico smo razplinili, potem pa dodali 50 µl 10 % APS in 10 µl TEMED-a ter rahlo premešali. Raztopino zbiralnega gela smo nalili nad ločevalni gel in vstavili glavniček.

Za potek elektroforeze smo uporabljali elektroforezni pufer, katerega smo pripravili v 10-kratni potrebnii koncentraciji in ga nato pred uporabo razredčili. Za 10-kratno koncentracijo smo zmešali 30 g Tris baze ter 144 g glicina, ter dolili do 1000 ml deionizirane vode.

Vzorce smo pred nanosom zmešali z nanašalnim pufrom v razmerju 1:1.

V elektroforezne žepke smo nanašali raztopino BSA ($\gamma = 1 \text{ mg/ml}$) kot kontrolo, ter BSA zmešan z različnimi fenolnimi spojinami v množinskih razmerjih 1:1, 1:2 ter 1:3. Elektroforeza je potekala pri konstantnem toku 25 mA/gel. Po končani elektroforezi smo proteine obarvali z raztopino barvila Coomassie Brilliant Blue.

3.2.3.2 Poliakrilamidna elektroforeza v prisotnosti natrijevega dodecil-sulfata (NaDS-PAGE)

Pri tej vrsti elektroforeze smo pri pripravi obej gelov, zbiralnega in ločevalnega, dodali po 0,1 ml 10-odstotnega NaDS reagenta, ki je denaturant.

Vzorcem smo dodali nanašalni pufer v razmerju 1:5 ter segreli na 95 °C za 1 minuto.

Sestava nanašalnega 5-kratnega pufra je bila naslednja: 0,313 M Tris HCl

(pH = 6,8 pri 25 °C),

10 % (w/v) NaDS,

0,005 % (w/v) bromfenol modro,

50 % (v/v) glicerol.

Za potek elektroforeze smo uporabljali elektroforezni pufer katerega smo pripravili v 10-kratni potrebnii koncentraciji in ga pred uporabo razredčili. Za pripravo takega pufra smo zmešali 30 g Tris baze, 144 g glicina in 10 g NaDS, ter dolili do 1000 ml deionizirane vode.

Elektroforeza je potekala pri konstantnem toku 25 mA/gel. Po končani elektroforezi smo proteine obarvali z raztopino barvila Coomassie Brilliant Blue.

Pri NaDS elektroforezi smo uporabljali standard Pierce 3-color prestained protein molecular weight marker mix, ki je vseboval standarde za miozin (210 kDa), fosforilazo B (110 kDa), BSA (80 kDa), ovalbumin (47 kDa), karbonsko anhidrazo (32 kDa), sojin tripsinski inhibitor (25 kDa) in lizocim (16 kDa).

3.2.4 Metoda z 1,1-difenil-2-pikrilhidrazilom (DPPH[·] radikalom)

Z DPPH[·] metodo smo merili sposobnost BSA in fenolnih spojin za lovljenje prostih radikalov. DPPH[·] radikal je eden izmed redkih stabilnih organskih dušikovih radikalov, ki ima močno vijolično barvo (Prior in sod., 2005).

Pri karakteristični valovni dolžini (517 nm) smo spektrofotometrično sledili izginjanju barve DPPH[·] radikala, ki v reakciji z antioksidativno komponento prehaja v neobarvano spojino, kar se odraža v zmanjšanju absorbance.

Za merjenje antioksidativne aktivnosti (AOP) smo uporabili nekoliko spremenjeno metodo po Klompong in sod. (2008). Avtorji so za meritve uporabljali koncentracijo proteina 40 mg/ml, mi pa smo uporabili koncentracijo proteina 1 mg/ml.

Za merjenje antioksidativne aktivnosti BSA proteina ($\gamma = 1 \text{ mg/ml}$) in njegovim mešanicam s fenolnimi spojinami (molsko razmerje 1:1 in 1:2) smo najprej v kiveto odpipetirali 2,4 ml vzorca. Kiveto smo nato vstavili v spektrofotometer ter istočasno v vzorec primešali 0,6 ml 0,1 mM DPPH[·] radikala raztopljenega v 96 % etanolu in pomerili absorbanco pri 517 nm. Absorbanco smo še enkrat pomerili po 500 sekundah. Kot slepo probo smo uporabili 2,4 ml 20 mM HEPES (pH = 7,52) pufra in vanj vmešali 0,6 ml 96 % etanola.

Enako smo postopali pri merjenju antioksidativne aktivnosti samih fenolnih spojin, le da smo vzorec pripravili le iz HEPES pufra in fenolnih spojin, in sicer v obeh molskih razmerjih. Za te meritve smo zmešali enako količino fenolne kot smo jo dodali BSA, vendar smo tokrat BSA nadomestili z HEPES pufrom. Vse vzorce smo zmešali v dvojnih količinah in jih nato razdelili na paralelki.

V izračunu smo rezultate meritev odštevali od absorbance samega DPPH[·] radikala pri enaki valovni dolžini (absorbanca DPPH[·]).

Antioksidativno aktivnost smo izračunali po naslednji enačbi:

$$\text{AOP (\%)} = 1 - \frac{(A_{517\text{nm}}(\text{vzorec z DPPH}^{\cdot} \text{ po } 500\text{s}) / A_{517\text{nm}}(\text{absorbanca DPPH}^{\cdot}))}{100} \quad \dots(1)$$

3.2.5 Diferenčna dinamična kalorimetrija (DSC)

Diferenčna dinamična kalorimetrija (DSC differential scanning calorimetry) je neposredna metoda, s katero lahko določimo termodinamske parametre toplotne denaturacije.

Denaturacija se zgodi, ko se proteinu zaradi nekega dejavnika spremeni sekundarna, terciarna in/ali kvartarna struktura.

Proteini so sestavljeni iz aminokislin, ki so med seboj povezane s peptidnimi vezmi. To strukturo imenujemo primarna struktura proteina. Ko se takšna struktura zvije in poveže z vodikovimi vezmi, govorimo o sekundarni strukturi. Tertiarna struktura ali nativna struktura proteina je oblika, v kateri se protein nahaja pri fizioloških pogojih in je ponavadi tudi biološko aktivna oblika. V tej strukturi se aminokislinskimi ostanki lahko povezujejo z vodikovimi vezmi, ionskimi interakcijami, hidrofobnimi interakcijami (van der Waals, hidrofobna hidratacija) ali disulfidnimi mostički (Poklar, 2000).

Primarna struktura proteina, ali drugače imenovana sekvenca proteina, se med denaturacijo ne spremeni.

Denaturirano stanje se pogosto povezuje z izgubo funkcije proteina, kar pa ni vedno pravilo. Včasih lahko majhno konformacijske spremembe vodijo do izgube funkcije, vendar pa se nativna struktura proteina ne spremeni (Devlin, 2006).

Denaturacijo lahko povzročimo s spremembami pH, ionskimi spremembami ali pa s temperaturo. Prav tako vplivamo na stabilnost nativne strukture s prisotnostjo prostetičnih skupin, kofaktorjev in substratov.

Proteinu se z denaturacijo spreminjajo fizikalno-kemijske lastnosti, med katere spada tudi toplotna kapaciteta.

Z DSC metodo lahko zaznamo vse toplotne spremembe, ki se zgodijo ob kemijskih reakcijah ali faznih prehodih vzorca. Merjenje temelji na primerjavi referenčne celice napolnjene s topilom in vzorčne celice napolnjene z vzorcem, raztopljenim v enakem topilu (Salobir, 1998).

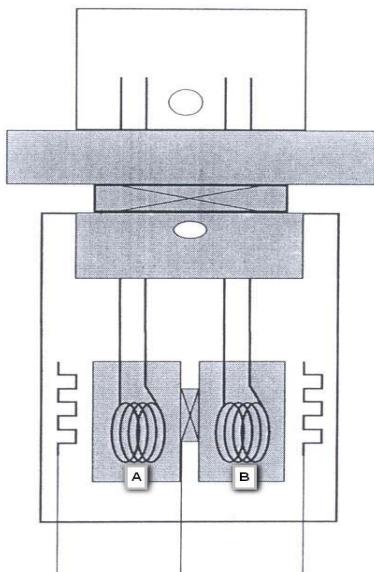
Kalorimeter segreva obe celici v nastavljenem temperaturnem območju. Celici vzdržuje na enaki temperaturi vzdolž segrevanja, mi pa merimo kvantitativno spremembo potrebne dovedene toplotne energije, ki je potrebna, da med vzorcem in referenco ne pride do temperaturnih razlik. Ta toplotna energija je torej enaka toploti, ki se porablja ali sprošča pri kemijskih reakcijah ali faznih prehodih v vzorcu (Šubic, 2008).

Poznamo dve izvedbi kalorimetrov. Energijske spremembe lahko merimo pri konstantnem volumnu ali pri konstantnem tlaku. Precej lažje je natančno uravnati tlak, zato je večina kalorimetrov narejena za meritve pri konstantnem tlaku.

Naše raziskovalno delo smo opravljali na N-DSC III kalorimetru (CSC 6300, CSC ZDA).

S to metodo smo spremljali fazni prehod proteina BSA ob dodatku različnih fenolnih spojin.

Kalorimeter je sestavljen iz dveh zlatih merilnih celic, katerih volumen je 352,8 µL.



Slika 5: Shema merilne enote N-DSC III s kapilarnimi celicami za A-referenco in B-vzorec (User's manual, 2005).

Najprej smo obe celici napolnili s čistim topilom, ki je bil v našem primeru HEPES pufer. Topilo smo segrevali od 0-120 °C, ohlajali nazaj na 0 °C, ter ponovno segrevali. Kasneje smo od vsakega termograma naših vzorcev odšteli bazno linijo.

Pripravili smo si raztopino dializiranega proteina BSA, raztopljenega v 20 mM HEPES pufru s pH = 7,52. Končna koncentracija proteina v pufru je bila 1 mg/ml.

V 96 % etanolu smo pripravili 5 mM raztopine fenolnih spojin. Analizirali smo raztopine mešanic fenolnih spojin in BSA v množinskem razmerju 1:1 in 1:2.

Vzorce smo pred vstavljanje v kalorimeter razplinili in s tem preprečili motnje zaradi mehurčkov, ki se tvorijo med segrevanjem.

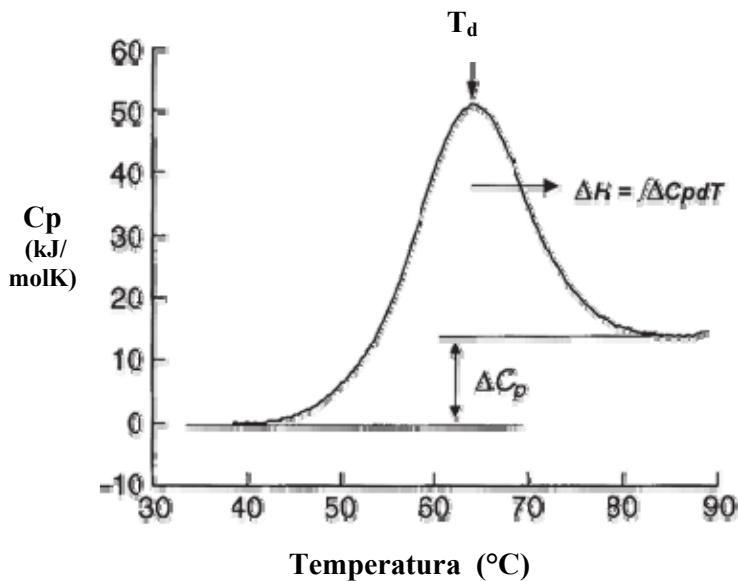
Kalorimeter smo napolnili z referenčnim topilom in vzorcem, ga zaprli, nastavili tlak 3 atmosfere in začeli z merjenjem.

Merili smo tri cikle, začeli smo s segrevanjem, kateremu je sledilo ohlajanje, in ponovno segrevanje. Ta postopek nam je služil kasneje, ko smo ugotavljali ali je proces reverzibilen ali ne.

Območje merjenja je bilo od 0-120 °C, hitrost segrevanja in ohlajanja pa je bila 1 °/min.

Iz poskusov dobljene termograme smo nato analizirali s programsko opremo OriginPro8 in jih še nadalje obdelali.

Termogram je direkten prikaz presežne toplotne kapacitete C_p (kJ/molK) v odvisnosti od temperature T (°C).

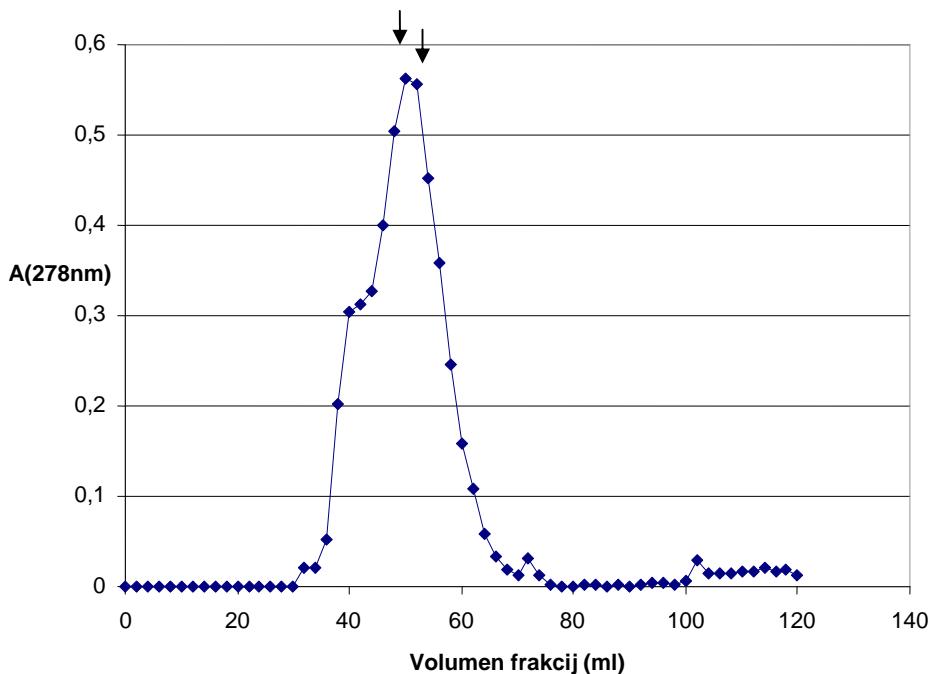


Slika 6: Primer tipičnega termograma za endotermni proces (Microcal, 2008). C_p – navidezna presežna toplotna kapaciteta, ΔH - sprememba entalpije denaturacije.

Na sliki 6 je označena temperatura glavnega prehoda (T_d), sprememba toplotne kapacitete (ΔC_p), površina pod krivuljo je enaka spremembi entalpije denaturacije (ΔH) sprememba toplotne denaturacije (ΔC_p).

4 REZULTATI

4.1 GELSKA KROMATOGRAFIJA



Slika 7: Gelska kromatografija BSA (97 %) na G-100 gelu. ($\gamma = 10 \text{ mg/ml}$, $\text{pH} = 7,5$, mobilna faza je 20 mM Na-fosfatni pufer, kateremu je dodana raztopina NaCl s končno koncentracijo 150 mM , $\text{pH} = 7,5$). Puščici na kromatogramu označujeta frakciji 25 in 26.

Čistost 97 % BSA smo preverjali z gelsko kromatografijo. Uporabljali smo gel z zmožnostjo frakcioniranja od $4000 - 150000 \text{ g/mol}$ za globularne proteine. Velikost zrnc gela je bila $40 - 120 \mu\text{m}$.

Mobilna faza je 20 mM Na-fosfatni pufer, kateremu je bila dodana 150 mM raztopina NaCl , $\text{pH}=7,5$.

Pobirali smo frakcije po 2 ml in jim pomerili absorbanco pri 278 nm .

Na kromatogramu opazimo, da ima vrh ramo. Predvidevamo, da so te frakcije nečistoče oziroma primesi. Označeni frakciji na sliki 7 smo analizirali tudi z nativno elektroforezo (glej prilogo A).

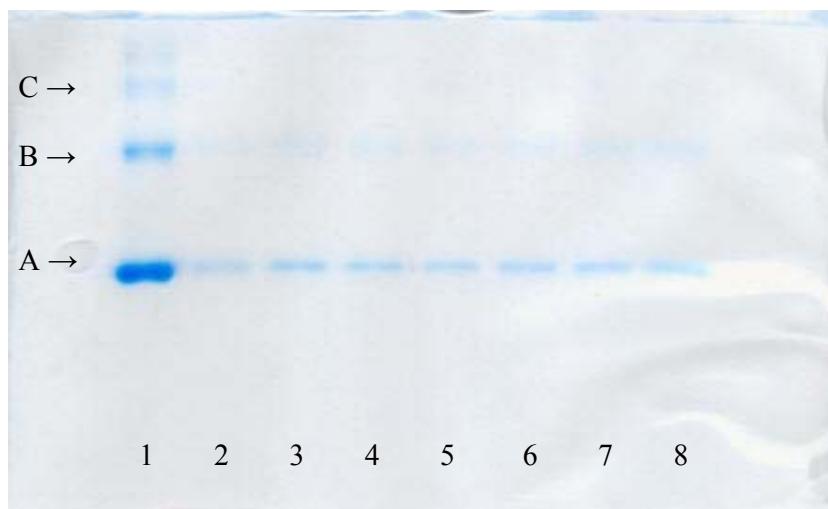
4.2 ELEKTROFOREZA

4.2.1 Nativna elektroforeza

Stabilnost BSA smo preverjali z elektroforetskimi metodami. Uporabili smo nativno elektroforezo, s katero smo analizirali vzorce BSA ter BSA/FS v molskih razmerjih 1:1, 1:2 in 1:3.

Elektroforetski gel smo pripravili iz ločevalnega dela (9 %) in zbiralnega dela (4 %). Po končani elektroforezi smo proteine obarvali s barvilo Coomassie Brilliant Blue.

Naš standard na prvem elektroforegramu je bil 97 % BSA, na naslednjih pa 99 % BSA. Na gelu je poleg vzorca raztopine BSA s koncentracijo 1 mg/ml tudi 10-krat razredčen vzorec BSA iz katerega smo tudi pripravljali mešanice z fenolnimi spojinami.

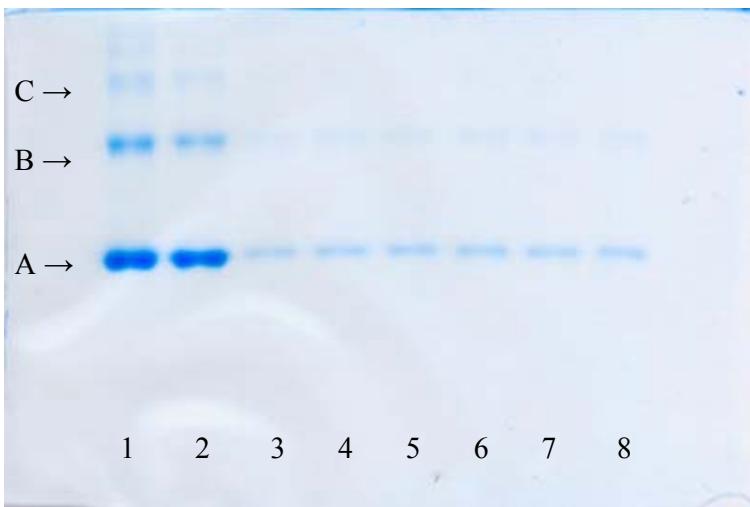


Slika 8: Nativna elektroforeza BSA z epigalokatehin galatom in rožmarinsko kislino pri 25 °C.

- 1 - BSA (97%) 1 mg/ml,
- 2 - BSA (97%) 10x razredčen,
- 3 - BSA:EGCG = 1:1,
- 4 - BSA:EGCG = 1:2,
- 5 - BSA:EGCG = 1:3,
- 6 - BSA:rožmarinska kislina = 1:1,
- 7 - BSA:rožmarinska kislina = 1:2,
- 8 - BSA:rožmarinska kislina = 1:3.

Iz slike 8 lahko razberemo, da ni opazne razlike med 2 progo (sam BSA), ter vsemi naslednjimi progami (proge 3-8). Z dano metodo ni mogoče zaznati razlik med posameznimi mešanicami.

Proga 1 ima več lis, ki so verjetno trimerne in dimerne oblike BSA v primeru lise B in oligomerne oblike BSA v primeru lise C.

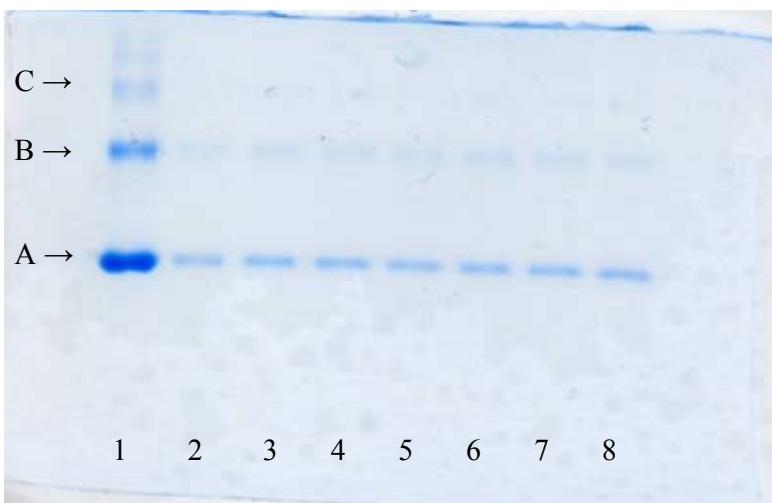


Slika 9: Nativna elektroforeza BSA s kampferolom in kvercetinom pri 25 °C.

- 1 - BSA (97%) $\gamma = 1 \text{ mg/ml}$,
- 2 - BSA (99%) $\gamma = 1 \text{ mg/ml}$,
- 3 - BSA:KAMF = 1:1,
- 4 - BSA:KAMF = 1:2,
- 5 - BSA:KAMF = 1:3,
- 6 - BSA:kvercetin = 1:1,
- 7 - BSA:kvercetin = 1:2,
- 8 - BSA:kvercetin = 1:3.

Na sliki 9 vidimo, da se elektroforetske lise BSA v prisotnosti kampferola in kvercetina ne razlikujejo med seboj, kakor tudi ne od druge proge, kamor pa smo tokrat nanesli 99 % čist BSA.

Iz elektroforegrama na sliki 9 je razvidna razlika v čistosti med progama 1 in 2, zato smo od druge proge naprej smo uporabljali vedno 99 % BSA (proga 1, slika 9).



Slika 10: Nativna elektroforeza BSA z epigalokatehinom in kampferol-3-glukozidom pri 25 °C.

- 1 - BSA (99%) $\gamma = 1 \text{ mg/ml}$,
- 2 - BSA (99%) 10x razredčen,
- 3 - BSA:EGC = 1:1,
- 4 - BSA:EGC = 1:2,
- 5 - BSA:EGC = 1:3,
- 6 - BSA:KAMG = 1:1,
- 7 - BSA:KAMG = 1:2,
- 8 - BSA:KAMG = 1:3.

Na sliki 10 zopet nismo opazili bistvene spremembe med kontrolo BSA (2 proga) in mešanicami BSA v prisotnosti epigalokatehina in kampferol-3-glukozida v različnih molskih razmerjih, ki so nanešene na progah 3-8.

Pri naslednji elektroforezah je bil vzorec 99 % BSA dializiran. Takšnega smo uporabljali tudi pri meritvah z DSC metodo. Vzorce smo po meritvi shranili v hladilniku. Vzorci po opravljeni DSC meritvi so v legendah označeni z opombo (po segrevanju).



Slika 11: Nativna elektroforeza BSA in SEB v prisotnosti fenolnih spojin pred in po segrevanju na 120 °C.

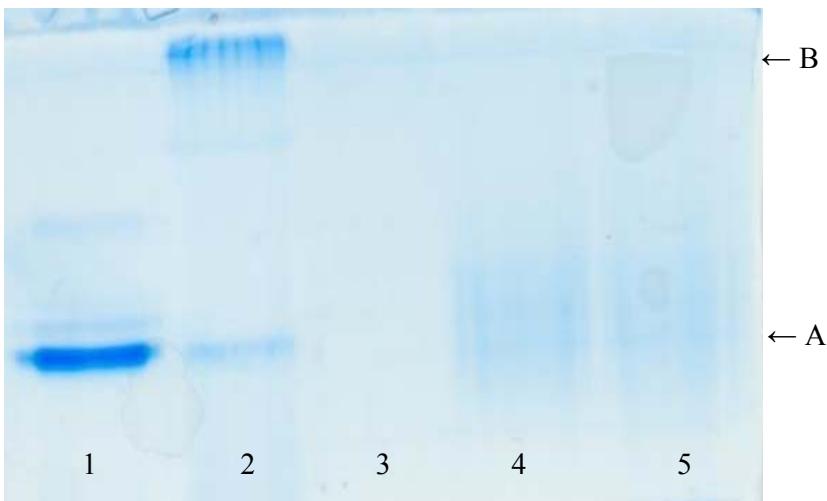
- 1 - BSA (99%) $\gamma = 1 \text{ mg/ml}$ (dializiran, pred segrevanjem),
- 2 - BSA:EGCG = 1:1 (po segrevanju na 120 °C),
- 3 - BSA:EGCG = 1:2 (po segrevanju na 120 °C),
- 4 - BSA:KAMG = 1:1 (po segrevanju na 120 °C),
- 5 - BSA:KAMG = 1:2 (po segrevanju na 120 °C),
- 6 - SEB $\gamma = 0,25 \text{ mg/ml}$ (pred segrevanjem),
- 7 - SEB $\gamma = 0,25 \text{ mg/ml}$ (po segrevanju na 120 °C),
- 8 - SEB:EGCG = 1:1 (po segrevanju na 120 °C).

Na elektroforetske gele smo nanašali tudi SEB protein (proge 6-8). Toksin ni dobro viden, ker je na progah namešena količina toksina 2,5 μg , kar pa ne zadostuje za detekcijo z barvilmom Coomassie Brilliant Blue, pri katerem je spodnja meja detekcije 5 μg .

Na gelu se je pri vzorcih BSA v prisotnosti fenolnih spojin (proge 2-5) po segrevanju na 120 °C pojavila še ena lisa, ki je pri samem BSA nismo opazili (lisa B). To lisa bi lahko nakazovala tvorbo nekaterih derivatov med BSA in fenolno spojino (aggregatov).

BSA, nanešen v prvi žepek, ni bil prej segret. V referenčnem članku (Arakawa in Kita, 2000) so na gel nanesli BSA, ki ni bil segrevan in več različno dolgo segrevanih vzorcev BSA. Vzorce BSA-ja so segrevali pri 60°C, in sicer 15 in 30 min. Ugotovili so, da je elektroforetska proga vsebovala več lis pri bolj segretem vzorcu.

Z dano metodo ni mogoče zaznati razlik med posameznimi mešanicami, saj ni tako natančna, da bi z njo lahko določili tako majhne konformacijske spremembe kot so očitno prisotne pri vezavi uporabljenih fenolnih spojin na BSA v razmerjih BSA:FS = 1:1 in BSA:FS = 1:2.

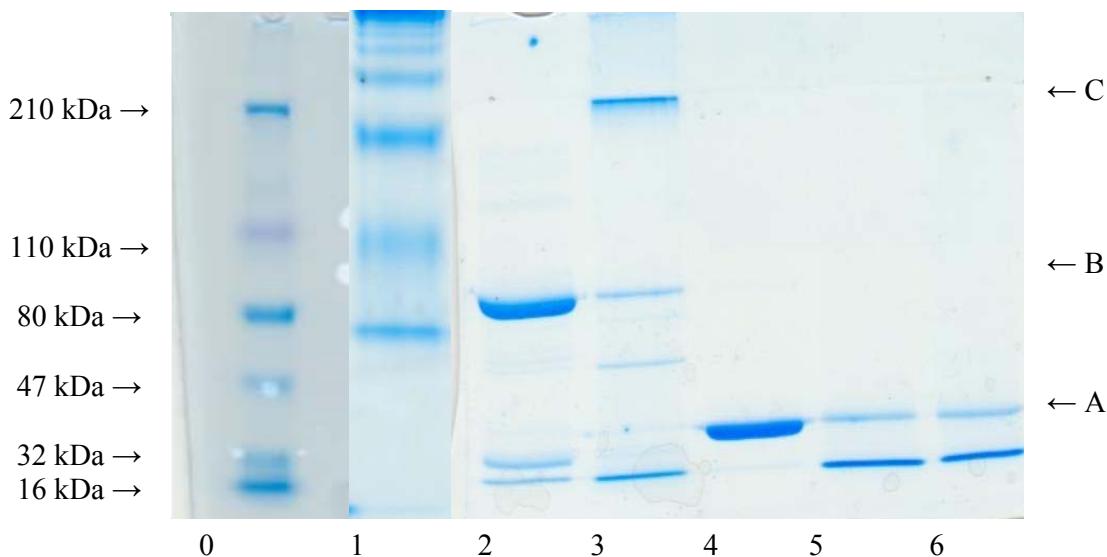


Slika 12: Nativna elektroforeza BSA in SEB s širšimi žepki v prisotnosti fenolnih spojin pred in po segrevanju na 120 °C.

- 1 - BSA (99%) $\gamma = 1 \text{ mg/ml}$ (dializiran, pred segrevanjem),
- 2 - BSA:EGCG = 1:1 (po segrevanju na 120 °C),
- 3 - SEB $\gamma = 0,25 \text{ mg/ml}$ (pred segrevanjem),
- 4 - SEB $\gamma = 0,25 \text{ mg/ml}$ (po segrevanju na 120 °C),
- 5 - SEB:EGCG = 1:1 (po segrevanju na 120 °C).

Na sliki 12 je prikazan elektroforeogram pri katerem smo uporabili glavniček s širšimi žepki, da smo lahko nanesli več vzorca. Tudi na tem elektroforegramu toksin ni bil dobro viden, opazne so bile le široke proge vzdolž potovanja vzorca. Tudi pri BSA in drugem vzorcu kjer smo nanesli samo eno mešanico s fenolno spojino, ni bilo opaznih razlik glede na prejšnji gel (slika 11).

4.2.2 NaDS-PAGE elektroforeza



Slika 13: NaDS elektroforeza BSA in SEB v prisotnosti fenolnih spojin pred in po segrevanju na 120 °C (brez reducenta)

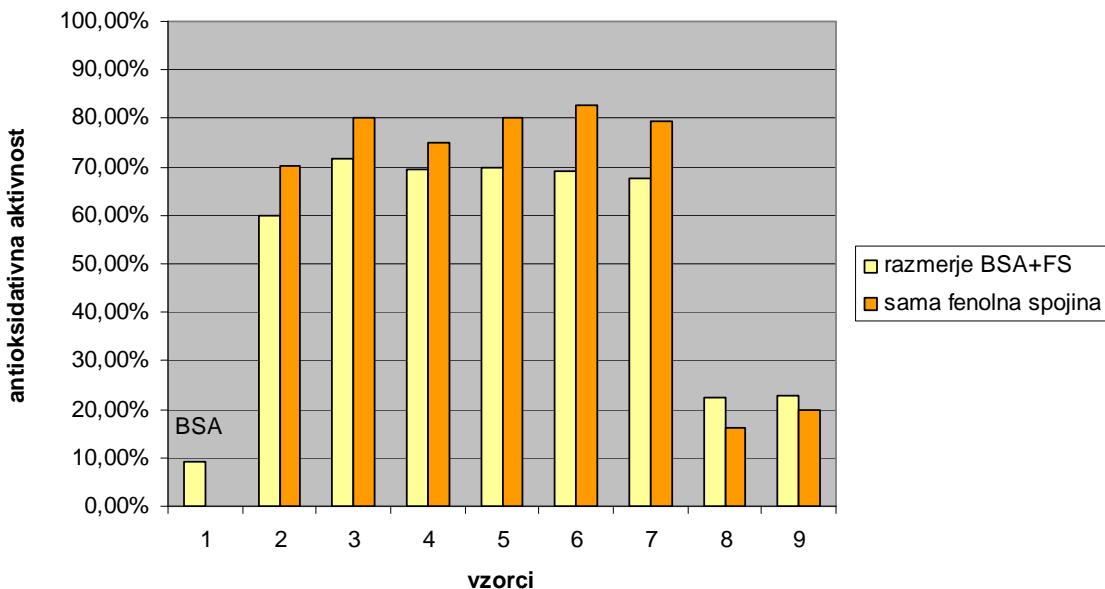
- 0 - standard
- 1 - BSA (99%, dializiran) $\gamma = 1\text{ mg/ml}$ (po segrevanju na 120 °C)
- 2 - BSA (99%, dializiran) $\gamma = 1\text{ mg/ml}$ (pred segrevanjem),
- 3 - BSA:EGCG = 1:1 (po segrevanju na 120 °C),
- 4 - SEB $\gamma = 0,25\text{ mg/ml}$ (pred segrevanjem),
- 5 - SEB $\gamma = 0,25\text{ mg/ml}$ (po segrevanju na 120 °C),
- 6 - SEB:EGCG = 1:1 (po segrevanju na 120 °C).

Na tej elektroforetski sliki (Slika 13) so jasno razvidne proge naših vzorcev.

Vzorec SEB pred segrevanjem (prog 3) je mnogo bolj viden kot pa naslednja dva vzorca, kjer sta nanešena SEB po segrevanju (prog 4) ter SEB po segrevanju in dodatku fenolne spojine v molskem razmerju 1:1 (prog 5). Vzrok za to, da je elektroforetska črta SEB-a pred segrevanjem precej bolj vidna, je verjetno spremembra v strukturi toksina. Opazili smo, da se je pri nanešenem vzorcu BSA s fenolno spojino (prog 2) pojavila lisa (lisa C), ki pa ni vidna pri vzorcu, kjer je nanešen sam BSA (prog 1). Vzorcev pred segrevanjem (razen samega BSA in SEB) nismo analizirali zato, ker rezultati nativne elektroforeze niso pokazali nobenih razlik med samim BSA in mešanicom BSA:FS. Glede na sliko 13 lahko sklepamo, da smo z dializo 99 % BSA v 20 mM HEPES pufru (pH = 7,52) dosegli, da v dializiranem vzorcu prevladujejo monomerne oblike BSA. Količina večmernih oblik BSA pa se je glede na precejšnje zmanjšanje intenzitete pripadajočih elektroforetskih lis, bistveno zmanjšala. V dializiranem vzorcu 99 % BSA pa so opazne manjše frakcije od monomerne oblike BSA, ki bi bile lahko posledica delne hidrolize BSA molekul ali razpada večmernih oblik BSA.

Na elektroforetski progi 1 (slika 13) opazimo več elektroforetskih lis pri BSA po segrevanju, kot na elektroforetski progi 1 pri BSA pred segrevanjem. Lise se pojavijo na mestih, ki nakazujejo na možnost tvorbe neke vrste oligomernov BSA. Na elektroforetski progi 3 (slika 13) je razvidno, da ima mešanica BSA:FS po segrevanju na 120 °C v primerjavi z samim BSA pred segrevanjem več lis. Če primerjamo progo 1 z progo 3 vidimo da so lise BSA v prisotnosti EGCG po segrevanju 120 °C bolj ostre in jih je manj kot pri segrevanju samega BSA. Sklepamo lahko, da gre za tvorbo definiranih agregatov med molekulami BSA v prisotnosti EGCG, katerih velikost je približno 210 kDa.

4.3 METODA Z DPPH[·] RADIKALOM



Slika 14: Prikaz antioksidativne aktivnosti vzorcev fenolnih spojin (FS) ter mešanic fenolnih spojin z BSA-jem ($\gamma = 1 \text{ mg/ml}$). Rumeni stolpci prikazujejo antioksidativno odvisnost samega BSA-ja in mešanic BSA/FS, oranžni pa prikazujejo antioksidativno aktivnost fenolnih spojin.

- 1 - BSA
- 2 - BSA:KAMF = 1:1, v primerjavi z samim KAMF
- 3 - BSA:KAMF = 1:2, v primerjavi z samim KAMF
- 4 - BSA:EGC = 1:1, v primerjavi z samim EGC
- 5 - BSA:EGC = 1:2, v primerjavi z samim EGC
- 6 - BSA:EGCG = 1:1, v primerjavi z samim EGCG
- 7 - BSA:EGCG = 1:2, v primerjavi z samim EGCG
- 8 - BSA:KAMG = 1:1, v primerjavi z samim KAMG
- 9 - BSA:KAMG = 1:2, v primerjavi z samim KAMG

Metodo z DPPH[·] radikalom smo priredili po članku (Klompong in sod., 2008), da smo lahko antioksidativno aktivnost lahko izmerili tudi proteinu BSA. Rezultate za diplomsko delo smo dobili z meritvami AOP proteinu BSA s koncentracijo 1 mg/ml.

Merili smo absorbanco vzorca pri 517 nm ob dodatku DPPH[·] reagenta. Absorbanco smo začeli meriti ob času $t = 0$ sekund. Odčitali smo jo vsakih 10 sekund do končne absorbance pri času $t = 500$ sekund in to vrednost uporabili v izračunih.

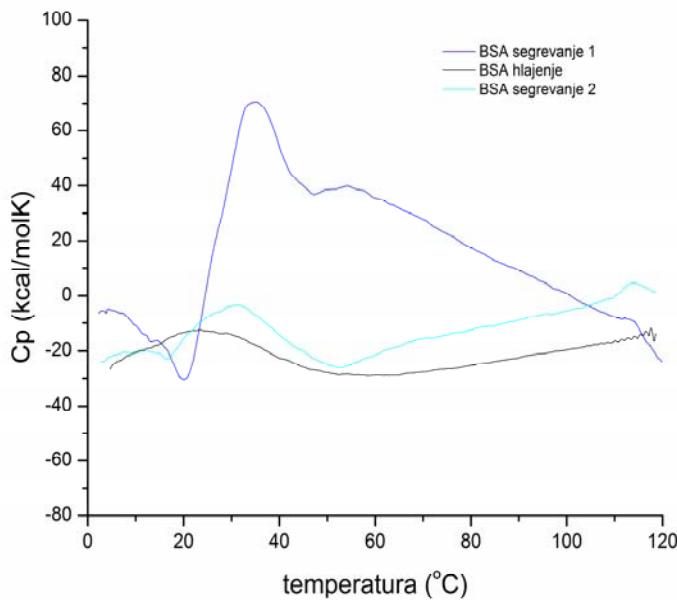
Ugotovili smo, da se BSA-ju AOP dvigne ob dodatku vseh štirih fenolnih spojin.

Izmerili smo tudi AOP samih fenolnih spojin in opazili, da se fenolni spojini (kampferol, epigalokatehin, epigalokatehin galat) AOP zmanjša ob dodatku k BSA-ju.

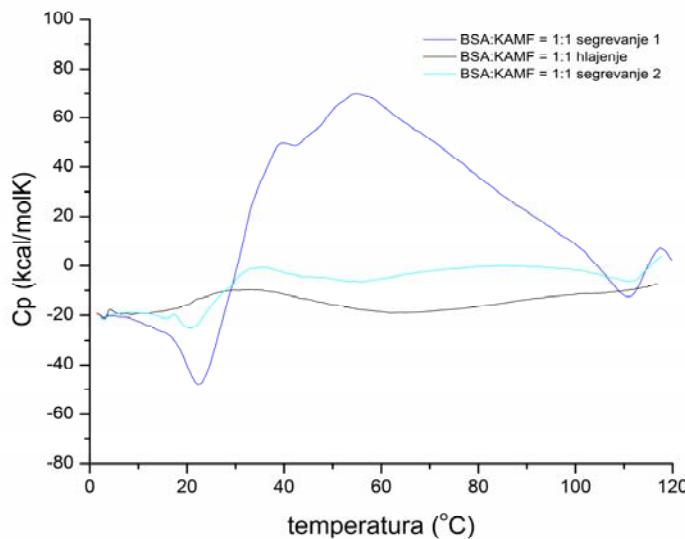
Ob dodatku kampferol-3-glukozida pa se AOP kompleksa z BSA-jem poveča.

4.4 DIFERENČNA DINAMIČNA KALORIMETRIJA

4.4.1 Reverzibilnost faznih prehodov



Slika 15: DSC termogram BSA (raztopljen v 20 mM HEPES pufru, $\gamma = 1 \text{ mg/ml}$, pH = 7,52). Prikaz merjenih krivulj segrevanja in ohlajevanja.



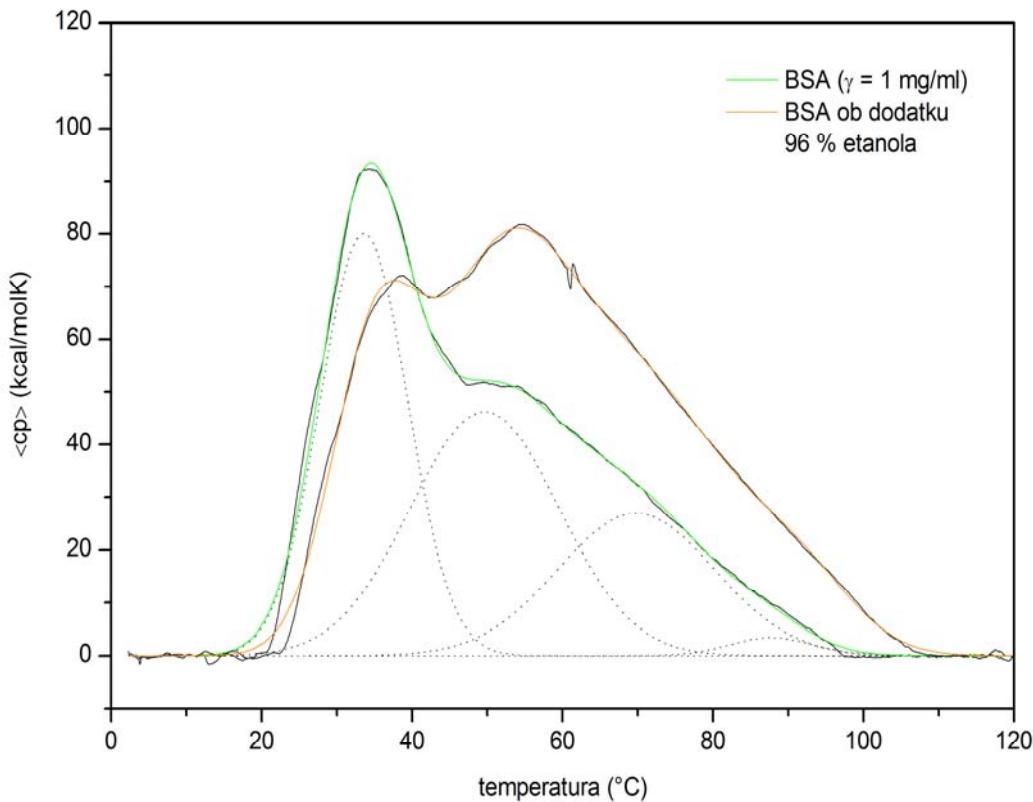
Slika 16: DSC termogram BSA (raztopljen v 20 mM HEPES pufru, $\gamma = 1 \text{ mg/ml}$, pH = 7,52) ob dodatku kampferola v množinskem razmerju 1:1. Prikaz merjenih krivulj segrevanja in ohlajjanja.

Sliki 15 in 16 prikazujeta rezultate reverzibilnosti faznih prehodov BSA brez ali z dodatkom fenolne spojine (kampferol, slika 16). Razvidno je, da proces ni reverzibilen.

Tukaj sta prikazana le DSC termograma BSA in $BSA:KAMF = 1:1$. DSC termogrami BSA ob dodatku ostalih uporabljenih fenolnih spojin in razmerij se nahajajo v prilogi.

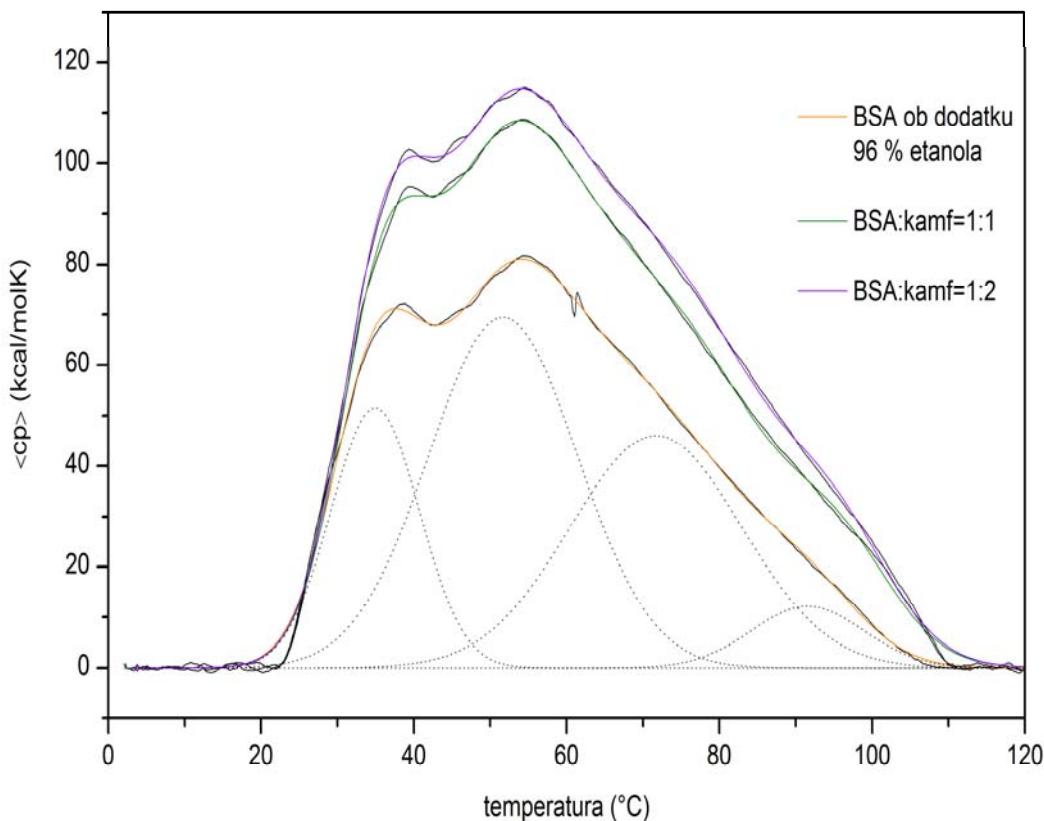
4.4.2 Fazni prehodi govejega serumskega albumina (BSA) v odvisnosti od kampferola, epigalokatehina, epigalokatehin galata in kampferol-3-glukozida ter stafilokoknega enterotoksina B (SEB)

Termično in termodinamsko stabilnost BSA smo preverili z DSC metodo. Uporabljali smo koncentracijo BSA 1 mg/ml, k njemu pa v molskih razmerjih 1:1 in 1:2 dodajali kampferol, epigalokatehin, epigalokatehin galat ter kampferol-3-glukozid. BSA je bil raztopljen v 20 mM HEPES pufru s pH = 7,52. Raztopine fenolnih spojin smo raztoplili v 96 % etanolu. Termograme smo posneli v območju od 0-120 °C, in sicer smo najprej segrevali, nato hladili, na koncu pa zaradi rezultatov o reverzibilnosti še enkrat segrevali. Na slikah 17-22 so prikazane le normalizirane krivulje prvega segrevanja Ena meritve smo izvedli v vsaj dveh paralelkah. Termograme smo z uporabo Gaussove metode razstavili (dekonvolucija) v štiri vrhove.



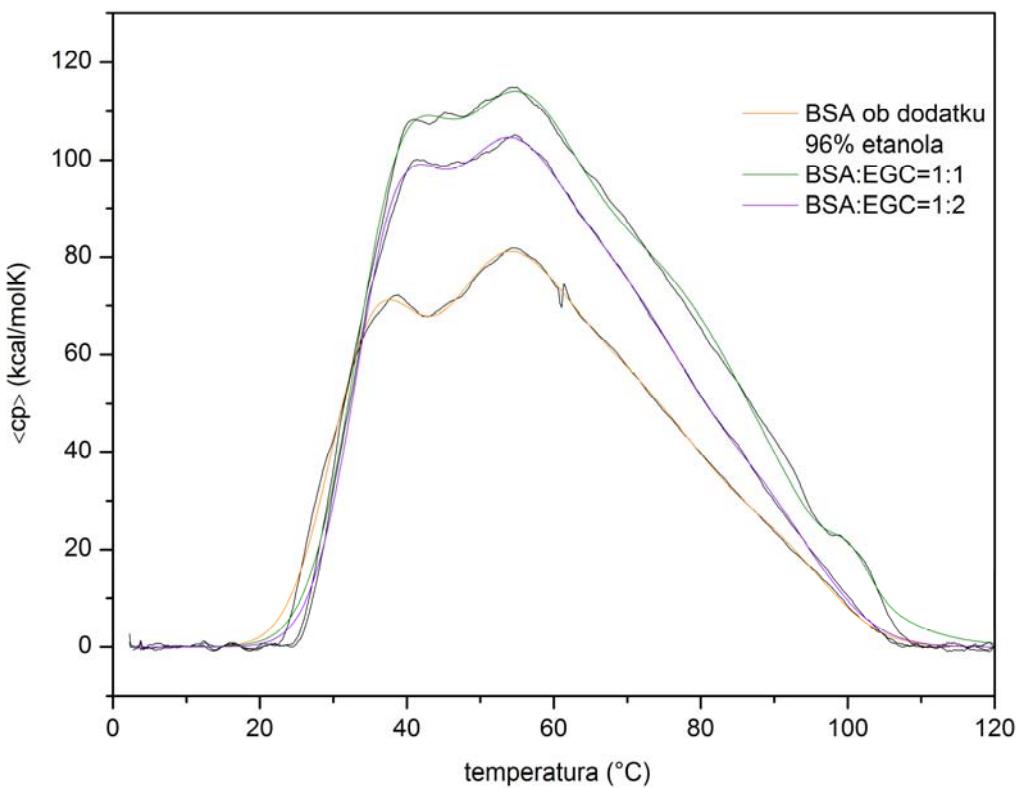
Slika 17: DSC termogram BSA (raztopljen v 20 mM HEPES pufru, $\gamma = 1 \text{ mg/ml}$, pH = 7,52) ter termogram BSA ob dodatku 96 % etanola. Črne črte so originalne normalizirane meritve, barvne pa najboljši fiti. S črtanimi črtami so predstavljeni rezultati dekonvolucije.

Termograme obh množinskih razmerij (BSA:FS = 1:1 in 1:2) od vseh štirih uporabljenih fenolnih spojin smo primerjali z termogramom vzorca BSA kateremu je bil dodan 96 % etanol v tolikšni količini, kot pri razmerjih z fenolnimi spojinami, da smo lahko odstranili tudi vpliv samega etanola na BSA.



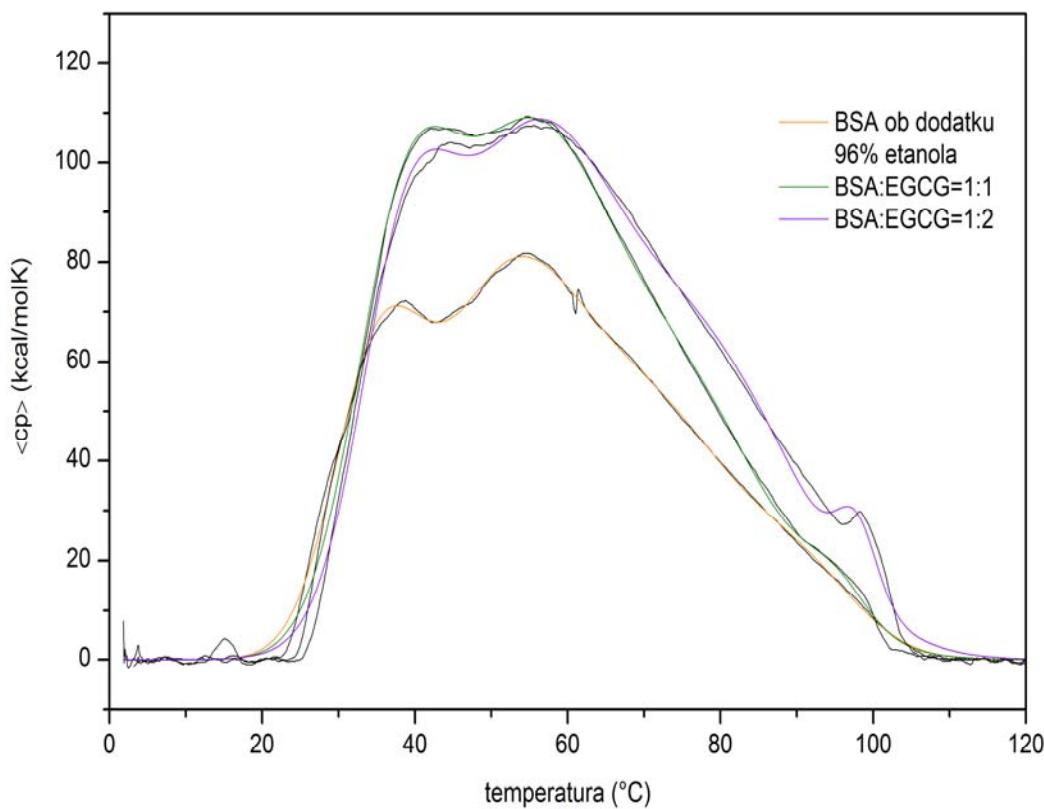
Slika 18: DSC termogram BSA (raztopljen v 20 mM HEPES pufru, $\gamma = 1\text{mg/ml}$, $\text{pH} = 7,52$) ob dodatku kampferola v molskem razmerju 1:1 in 1:2 v primerjavi z BSA termogramom v prisotnosti enakih količin 96 % etanola. Črne črte so originalne normalizirane meritve, barvne pa najboljši fiti. S črtkanimi črtami so predstavljeni rezultati dekonvolucije.

Iz slike 18 je razvidno, da je dodatek kampferola k BSA, v množinskem razmerju 1:2, zvečal površino pod krivuljo na termogramu in s tem BSA entalpijsko stabiliziral, saj se je sprememba entalpije denaturacije BSA povečala. Temperatura prehoda obh vrhov se premakne k višjim vrednostim v primerjavi z samim BSA.



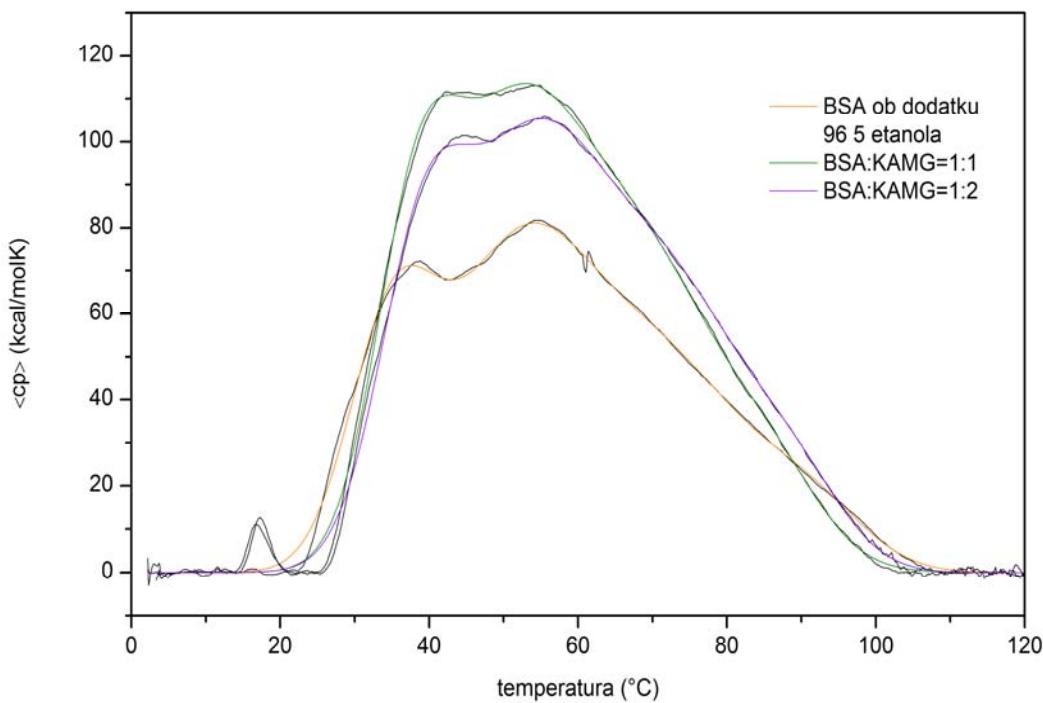
Slika 19: DSC termogram BSA (raztopljen v 20 mM HEPES pufru, $\gamma = 1 \text{ mg/ml}$, $\text{pH} = 7,52$) ob dodatku epigalokatehina v molskem razmerju 1:1 in 1:2 v primerjavi z BSA termogramom v prisotnosti enakih količin 96 % etanola. Črne črte so originalne normalizirane meritve, barvne pa najboljši fiti.

Pri dodatku epigalokatehina k BSA se je sprememb entalpije denaturacije BSA povečala. Do večjih entalpijskih sprememb je prišlo pri množinskem razmerju 1:1 kot pa 1:2. Temperatura prehoda obeh vrhov se je pomaknila k višjim vrednostim v primerjavi z samim BSA.



Slika 20: DSC termogram BSA (raztopljen v 20 mM HEPES pufru, $\gamma = 1 \text{ mg/ml}$, pH = 7,52) ob dodatku epigalokatehin galata v molskem razmerju 1:1 in 1:2 v primerjavi z BSA termogramom v prisotnosti enakih količin 96 % etanola. Črne črte so originalne normalizirane meritve, barvne pa najboljši fiti.

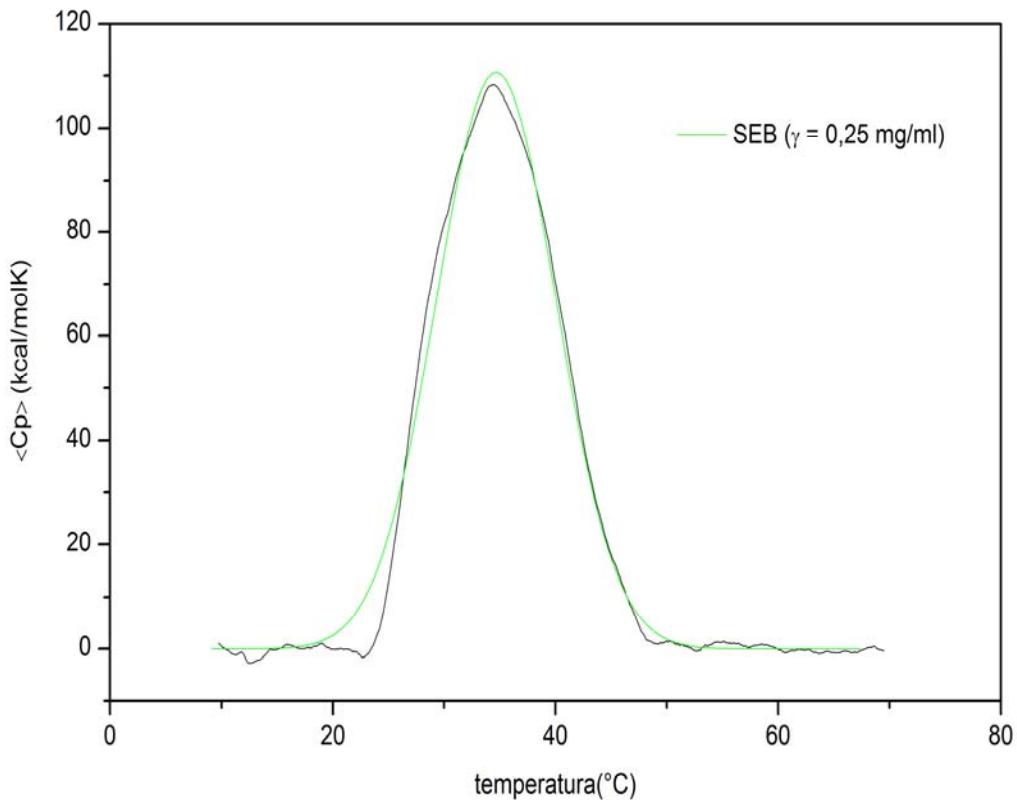
Sprememba entalpije denaturacije BSA v prisotnosti epigalokatehin galata je bila večja, kot samega BSA. Temperatura denaturacije BSA se je prav tako povečala v prisotnosti epigalokatehin galata.



Slika 21: DSC termogram BSA (raztopljen v 20 mM HEPES pufru, $\gamma = 1 \text{ mg/ml}$, pH=7,52) ob dodatku kampferol-3-glukozida v molskem razmerju 1:1 in 1:2 v primerjavi z BSA termogramom v prisotnosti enakih količin 96 % etanola. Črne črte so originalne normalizirane meritve, barvne pa najboljši fiti.

Iz slike 21 vidimo, da je sprememba entalpije denaturacije BSA v prisotnosti kampferol-3-glukozida večja kot samega BSA. Pri množinskem razmerju BSA:KAMG =1:2 je vrednost entalpije denaturacije manjše, kot pri razmerju 1:1. Temperatura denaturacije se je v prisotnosti kampferol-3-glukozida premaknila k višjim vrednostim.

Na sliki 22 je prikaz termograma stafilocoknega enterotoksina B (SEB).



Slika 22: DSC termogram SEB (raztopljen v 25 mM fosfatnem pufru, $\gamma = 0,25$ mg/ml, pH = 7,4). Črna črta je originalna meritev, barvna pa najboljši fit.

Na sliki 22 je prikazan normaliziran DSC termogram SEB proteina. Temperatura prehoda je 34,4 °C, sprememba entalpije denaturacije pa 1510 ± 300 kcal/mol. Originalna meritev se ujema z enostopenjskim modelom fitanja.

Preglednica 4: Primerjava termodinamskih količin topotne denaturacije BSA v prisotnosti kampferola, epigalokatehina, epigalokatehin galata ter kampferol-3-glukozida in SEB. T₁, T₂, T₃, T₄ – posamezne temperature denaturacije, ΔH₁, ΔH₂, ΔH₃, ΔH₄ - spremembe entalpije denaturacije posameznih vrhov, ΔH_{cal} – spremembra entalpije denaturacije celotnega prehoda.

	T ₁ (°C)	T ₂ (°C)	T ₃ (°C)	T ₄ (°C)	ΔH ₁ (kcal/mol)	ΔH ₂ (kcal/mol)	ΔH ₃ (kcal/mol)	ΔH ₄ (kcal/mol)	ΔH _{cal} (kcal/mol)
BSA	33,6 ± 0,1	50 ± 2	70 ± 3	88 ± 1,1	1170 ± 60	1100 ± 300	700 ± 300	47 ± 40	3000 ± 300
BSA+ etOH	34,9 ± 0,1	52 ± 2	72 ± 3	92 ± 1	750 ± 60	1700 ± 600	1300 ± 700	200 ± 100	3900 ± 100
BSA:KAMF 1:1	35,7 ± 0,1	50,6 ± 0,3	72,1 ± 0,1	96,4 ± 0,2	780 ± 90	2100 ± 200	2400 ± 200	240 ± 40	5400 ± 300
BSA:KAMF 1:2	35,9 ± 0,1	50,7 ± 0,4	72 ± 1	95,7 ± 0,3	880 ± 50	2200 ± 300	2600 ± 300	320 ± 60	5800 ± 400
BSA:EGC 1:1	38,4 ± 0,1	52,5 ± 0,2	72,3 ± 0,5	100,5 ± 0,2	1110 ± 50	1600 ± 100	3000 ± 100	38 ± 5	5400 ± 300
BSA:EGC 1:2	37,9 ± 0,2	52 ± 1	70 ± 3	89 ± 2	900 ± 100	1900 ± 700	1600 ± 700	400 ± 200	5000 ± 100
BSA:EGCG 1:1	38,3 ± 0,1	53,7 ± 0,3	73 ± 1	95,2 ± 0,2	1190 ± 70	2100 ± 200	1800 ± 200	74 ± 10	5600 ± 500
BSA:EGCG 1:2	38,5 ± 0,1	54,5 ± 0,3	77,8 ± 0,7	97,8 ± 0,1	880 ± 60	2700 ± 200	1800 ± 100	92 ± 6	5300 ± 100
BSA:KAMG 1:1	38,1 ± 0,2	50,4 ± 0,6	68 ± 2	87,0 ± 0,6	900 ± 100	1900 ± 400	2100 ± 300	170 ± 80	4800 ± 200
BSA:KAMG 1:2	38,8 ± 0,2	53 ± 1	73 ± 2	90 ± 1	800 ± 100	2300 ± 400	1500 ± 500	200 ± 200	4900 ± 400
SEB	34,4 ± 0,2	/	/	/	1510 ± 30	/	/	/	1510 ± 300

Posamezne termograme BSA v prisotnosti polifenolnih spojin smo z uporabo Gaussove metode dekonvolucije razstavili v štiri vrhove. Posamezne vrednosti sprememb entalpij posameznih vrhov so podane v preglednici 4.

Preglednica 5: Prikaz spremembe entalpije denaturacije celotnega prehoda glede na BSA.

	$\Delta(\Delta H_{\text{cal}})$ (kcal/mol)			
	BSA:KAMF	BSA:EGC	BSA:EGCG	BSA:KAMG
množinsko razmerje 1:1	1500±400	1500±400	1700±600	900±300
množinsko razmerje 1:2	1900±500	1100±200	1400±200	1000±500

Vrednosti za relativno spremembo entalpije denaturacije celotnega procesa smo izračunali po naslednji enačbi:

$$\Delta(\Delta H_{\text{cal}}) = \Delta H_{\text{cal}}(\text{BSA:FS}) - \Delta H_{\text{cal}}(\text{BSA}) \quad \dots(2)$$

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

V okviru diplomskega dela smo preverjali termično in termodinamsko stabilnost proteina BSA.

Čistost komercialno dostopnega BSA proteina z deklarirano čistostjo 97 %, smo najprej preverjali z gelsko kromatografijo. Iz dobljenega kromatograma (slika 7) je razvidno, da ima kromatografski vrh ramo, ki je verjetno posledica prisotnih nečistoč v komercialnem 97 % čistem BSA. Čistost dveh frakcij iz gelske kromatografije (frakciji 25 in 26) smo preverili še z nativno elektroforezo in ugotovili, da še vedno vsebuje frakcijo, v kateri so prisotni višji oligomere (priloga A).

Preden smo se odločili kako čist protein BSA bomo uporabljali, smo oba (97 % in 99 %) nanesli na nativno elektroforezo. Elektroforezo smo izvajali na gelu sestavljenemu iz 9 % ločevalnega in 4 % zbiralnega gela. Proteine smo obarvali z raztopino barvila Coomassie Brilliant Blue. Na elektroforegramu s slike 9 je mogoče zaznati malo šibkejše obarvano liso, ki vsebuje trimere in dimere, na progi 2 (99 %) kot na progi 1 (97 %). Glede na rezultate kromatografije in elektroforeze smo sklepali, da za DSC potrebujemo bolj čist protein, zato smo se odločili za uporabo 99 % BSA.

Komercialni 99 % BSA je drugače imenovan tudi frakcija V. Znotraj te frakcije naj bi HPLC analiza pokazala tri vrhove oziroma tri podfrakcije, ki so poimenovane z V-I, V-II in V-III (Barone in sod., 1995). Frakcijo V-III, so analizirali na NaDS elektroforeznem gelu in iz molske mase 66300 g/mol razbrali, da je to monomerne oblike BSA, medtem ko je bila frakcija V-II sestavljena iz trimernih in dimernih oblik BSA. Določili so da je protein BSA vseboval kar 15-18 % frakcije trimernih in dimernih oblik (V-II), ki je najverjetneje prisotna tudi v našem vzorcu BSA.

Na nativni elektroforezni gel smo nanesli tudi mešanice BSA in fenolnih spojin v množinskih razmerjih 1:1, 1:2 ter 1:3. Iz elektroforegramskeh prog teh mešanic, ki smo jih pridobili s to metodo ne moremo trditi, da imajo dodatki teh fenolnih spojin kakšen bistven vpliv na spremembo strukture BSA, ker je detekcija z barvilom Coomassie Brilliant Blue premalo občutljiva.

Kusuda in sodelavci (2006) so pri dodatku epigalokatehin galata k proteinu BSA, brez segrevanja, na nativnem elektroforetskem gelu, opazili premik monomerne oblike BSA v smeri tvorbe makromolekulskega kompleksa (večja migracija). To so povezali z oksidacijo epigalokatehin galata, saj so mešanice BSA in epigalokatehin galata pri katerih so opazili premik monomerne oblike BSA, inkubirali različno dolgo časa na sobni temperaturi, preden so jih nanesli na elektroforetski gel. Vse skupaj pa bi lahko bila tudi posledica tega, da so uporabljali precej večja množinska razmerja, in sicer je bilo razmerje BSA:FS = 1:84 najnižje. Premik lise, ki vsebuje monomerne oblike BSA, je lahko tudi zaradi same vezave fenolne spojine na BSA in s tem spremembe v neto naboju proteina, od česar je odvisno potovanje proteina na nativni elektroforezi (Haroon, 2002).

Haroon (2002) je na nativni elektroforezi analiziral mešanice BSA in fenolnih spojin v množinskem razmerju 1:1, ki jih je prej inkubiral na 35 °C, 45 °C in 55 °C. Mešanice BSA in fenolnih spojin (galna kislina, kofeinska kislina, p-kumarna kislina) je pripravil v različnih pH (5, 7, 9). Na nativnih elektroforetskih gelih ni bilo videti zaznavnih premikov monomerne oblike BSA, oziroma so bili minimalni, in sicer v smeri manjših enot od monomerne BSA v primeru dodatka kavne in galne kisline. Vzorce BSA z dodano galno kislino je analiziral tudi z NaDS elektroforezo (brez reducenta), kjer ni prišlo do nobenih vidnih sprememb v strukturi BSA.

Naše prve mešanice so bile nanešene na gel brez segrevanja, saj smo kasneje za primerjavo na nativno elektroforezo nanesli tudi vzorce mešanic iz meritev na DSC aparatu, kjer smo jih segrevali od 0 °C-120 °C, shladili nazaj na 0 °C, ter postopek segrevanja še enkrat ponovili. Iz literaturne primerjave (Arakawa in Kita, 2000) lahko sklepamo, da se je na elektroforetskih progah segretih vzorcev pojavila dodatna lisa (slika 11) na začetku potovanja vzorca po gelu, verjetno zaradi tvorbe agregatov med procesom segrevanja.

Z nativno elektroforezo smo preiskovali stafilokokni enterotoksin B (SEB), ki pa ni bil dobro viden tudi potem, ko smo povečali nanos vzorca, zato smo pripravili elektroforezo v prisotnosti anionskega detergenta natrijevega dodecil-sulfata (NaDS). NaDS s svojim negativnim nabojem v celoti zamaskira naboj proteinske molekule. Z nespecifično vezavo na protein ga denaturira, ohranijo pa se kovalentne vezi, tako peptidne kot tudi disulfidne vezi (Abram, 2006). Na ta gel (slika 13) smo nanesli BSA, mešanico BSA:EGCG = 1:1, SEB pred segrevanjem, SEB po segrevanju in SEB:EGCG = 1:1 po segrevanju.

Na progi 2 kjer smo nanesli razmerje BSA:EGCG = 1:1 je bila zopet opazna prva izmed lis, ki verjetno vsebuje oligomerne enote BSA in se je pojavila tudi pri nativni elektroforezi. Pri vzorcu BSA po segrevanju (slika 14) je na elektroforetski progi vidnih 5 do 6 lis, ki se nahajajo višje od monomerne oblike BSA, torej predstavljajo oligomere oziroma neke vrste agregatov. Na elektroforetski progi mešanice BSA:EGCG = 1:1 je vidna le ena lisa v tem območju, kar bi lahko pomenilo, da se ob vezavi fenolne spojine na protein oblikuje ena vrsta oligomera.

Vzorec SEB pred segrevanjem je na progi 3 pustil močnejšo liso A kot pa segret vzorec SEB in SEB:EGCG na progah 4 in 5. Vzrok za to je verjetno v strukturi toksina, ki po segrevanju zmanjša afiniteto do barvila. V referenčnem članku (Yanaka in sod., 2010) so SEB inkubirali pri 37 °C in na NaDS elektroforetski gel nanesli prvi vzorec po enem dnevu in drugega po petih dneh. Pri SEB toksinu se po petih dneh inkubacije na elektroforetski progi pokažeta še dve lisi vzdolž proge, ki nakazujeta na prisotnost manjših oblik od osnovne strukture SEB proteina, na našem gelu pa je po segrevanju opazna le ena.

Za merjenje antioksidativne aktivnosti (AOP) smo uporabili metodo iz članka, kjer so merili sposobnost lovljenja prostih radikalov v proteinskem hidrolizatu ribjega mesa (Klompong in sod., 2008). Ta metoda se razlikuje od navadne metode za računanje AOP v tem, da merimo to vrednost proteinom, ki nimajo visokih vrednosti AOP, zato je potrebno uporabiti višje koncentracije vzorca. Klompong in sodelavci so (2008) uporabljali koncentracijo proteinov 40 mg/ml, mi pa smo najprej poizkusili z 10 mg/ml, nato pa zaradi dobro vidnih rezultatov glavni del meritev izvedli na proteinu s koncentracijo 1 mg/ml. Pri proteinskem hidrolizatu ribjega mesa so ugotovili, da spremembe v velikosti, položaju in sestavi prostih aminokislinskih ostankov in majhnih peptidov vplivajo na antioksidativno aktivnost. AOP

smo merili mešanicam množinskih razmerij BSA:FS = 1:1 in 1:2, ter posamezno vsem štirim fenolnim spojinam (v enakih količinah kot v mešanicah z BSA) in samemu BSA proteinu.

Vzorcu BSA s koncentracijo 1 mg/ml smo izmerili vrednost AOP 9%. Naši rezultati pokažejo, da se je AOP BSA proteinu dvignila, ob dodatku vseh uporabljenih fenolnih spojin (kampferol, epigalokatehin, epigalokatehin galat in kampferol-3-glukozid). Ob dodatku prvih

treh fenolnih spojin (kampferol, epigalokatehin, epigalokatehin galat), se je AOP mešanice BSA:FS dvignila glede na AOP BSA za povprečno 57% pri množinskem razmerju 1:1 ter za 61% pri množinskem razmerju 1:2. AOP fenolnih spojin pa se je ob dodatku kampferola, epigalokatehina in epigalokatehin galata k BSA proteinu znižala v povprečju za 9% pri množinskem razmerju 1:1 in za 10 % pri razmerju 1:2, kar pa si lahko razlagamo kot možnost, da se je fenolna spojina vezala na BSA in s tem zmanjšala svojo antioksidativno učinkovitost. AOP BSA se je ob dodatku kampferol-3-glukozida dvignila za 13% pri množinskem razmerju 1:1 in za 14% pri razmerju 1:2. Zanimivo pa se je ravno nasprotno kot pri prvih treh fenolnih spojinah kampferol-3-glukozidu AOP ob dodatku k BSA proteinu zvišala.

Znano je, da je edinstvena nativna oblika proteina vitalnega pomena za njegovo specifično naloge in učinkovitost. BSA je dobro poznan globularni protein, ki ima tendenco po agregaciji v makromolekulske skupke (Militello in sod., 2003). Njegova tridimenzionalna (terciarna, nativna) struktura je sestavljena iz treh homolognih domen (I, II, III), vsaka od teh domen pa je sestavljena iz dveh poddomen (IA, IB, ipd.) (Michnik, 2003). Pri sobni temperaturi je nativna oblika BSA torej stabilna in dobro definirana. Med naraščanjem temperature, nekatere molekulske regije postanejo dostopne za nove intermolekularne interakcije, kar pomeni tvorbo topnih agregatov preko disulfidnih in ne-kovalentnih vezi (Militello in sod., 2003).

Proteinska primarna struktura je sestavljena iz močnih kovalentnih vezi (peptidnih vezi) med posameznimi aminokislinami v verigi proteina. V tej nativni obliki se proteini nahajajo v fizioloških razmerah, pri določeni temperaturi, pH, ionski moči in dielektrični konstanti medija (Poklar, 2000). Izpostavljanje različnim efektom, ki povzročajo spremembo terciarne, sekundatne ali kvartarne strukture (višje urejenih struktur) preko ne-kovalentnih vezi imenujemo denaturacija. Za toplotno denaturacijo globularnih proteinov velja, da je to prehod med dvema makroskopskima stanjem, nativnim (N) in denaturiranim (D). Denaturacijski prehodi proteinov v vodnih raztopinah med tema stanjem so vedno povezani s povečanjem toplotne kapacitete. Za toplotno kapaciteteto (ΔC_p) lahko rečemo, da nam sprememba te pokaže, da imamo spremembe v proteinskih stanjih (Poklar, 2000).

Toplotna denaturacija je endotermen proces, ki ga spreminja povečanje entalpije (ΔH) in entropije sistema (ΔS). V endoternem procesu se toplota porablja, zato lahko ΔH definiramo kot toploto, ki se porabi pri kemijski reakciji pri konstantnem tlaku, ter vrednost entalpije označimo z pozitivnim predznakom.

Z metodo DIFERENČNE DINAMIČNE KALORIMETRIJE smo ob dodajanju fenolnih spojin k BSA v množinskem razmerju 1:1 in 1:2 ob konstantnem tlaku 3 atm merili spremembo entalpije denaturacije. Dekonvolucijo smo izvedli z štirimi vrhovi zato, ker smo na NaDS elektroforezi s slike 13 na progi kjer je bilo nanešeno razmerje BSA:EGCG = 1:1 opazili štiri lise, ki predstavljajo različne aggregate BSA.

Sprememba entalpije denaturacije (ΔH_d) se je v prisotnosti vseh preučevanih fenolnih spojin povečala.

Pri množinskem razmerju BSA:FS = 1:1 so bile fenolne spojine glede na spremembo entalpije denaturacije samega BSA (preglednica 5) razvrščene v naslednjem vrstnem redu:
epigalokatehin galat>kampferol>epigalokatehin>kampferol-3-glukozid.

Pri množinskem razmerju 1:2 se je zaporedje spremenilo:

kampferol>epigalokatehin galat>epigalokatehin>kampferol-3-glukozid.

Dodatek vseh fenolnih spojin je termično stabiliziral BSA. Termična stabilizacija pomeni, da se je temperatura denaturacije premaknila k višjim temperaturam. Enak trend temperaturne stabilizacije BSA s fenolnimi spojinami opazimo tudi pri entalpijski stabilizaciji. Termično stabilizacijo BSA opazimo pri obeh proučevanih razmerjih.

V sorodni raziskavi toplotne stabilnosti proteinov, (Haroon, 2002), je bil analiziran protein BSA ob dodatku galne kisline in 4-metil-genisteina. Entalpije denaturacije so se pri različnih pH vrednostih, v vseh primerih dodane galne kisline dvignite, prav tako se je dvignila temperatura denaturacije. Ob dodatku metiliranega genisteina pa so bile vrednosti entalpije denaturacije malo nižje v primerjavi z samim BSA, temperatura denaturacije pa se je tako kot v primeru galne kisline dvignite. Interakcija fenolov je povzročila spremembo v sekundarni strukturi proteina (Haroon, 2002).

Reakcije protein-fenolne spojine lahko razvrstimo v reverzibilne ali irreverzibilne. Reverzibilne reakcije vodijo v nastajanje netopnih kompleksov, irreverzibilne pa lahko povzročijo tvorbo čisto nove oblike molekulskega agregata. Aromatsko jedro in hidroksilna skupina na proteinu sta osnovni mesti za vezavo fenolnih spojin na proteine (Haroon, 2002).

Iz naših eksperimentalnih podatkov lahko zaključimo, da je bil proces toplotne denaturacije samega BSA v prisotnosti fenolnih spojin irreverzibilen proces. V primeru irreverzibilnih procesov je termodinamska analiza podatkov zelo zapletena. V našem primeru smo uporabljali Gaussove metode dekonvolucije, ki nam je vsaj delno omogočila vpogled v mehanizem denaturacije BSA.

Iz termodinamskih količin denaturacije BSA lahko zaključimo, da prehod ni enostopenjski, da se med segrevanjem tvorijo različni oligomeri, ki so različno termično stabilni.

5.2 SKLEPI

Elektroforegrami nativne elektroforeze samega BSA in množinskih razmerij BSA/FS je 1:1 in 1:2, pri 25 °C in po segrevanju na 120 °C, ne kažejo opaznih sprememb na elektroforetskih lisah. S to metodo ne zaznamo morebitnih sprememb v strukturi BSA ob dodatku fenolne spojine.

Antioksidativna učinkovitost (AOP) BSA proteina je ob dodatku vseh uporabljenih fenolnih spojin višja v primerjavi z AOP samega BSA. V primeru kampferola, epigalokatehina in epigalokatehin galata je razlika bistvena, v primeru kampferol-3-glukozida pa precej manjsa. AOP vrednost mešanic BSA:FS je v primeru dodatka kampferola, epigalokatehina in epigalokatehin galata k BSA nižja v primerjavi z AOP samih fenolnih spojin. Ravno obratno je pri dodatku kampferol-3-glukozida, kjer ima mešanica BSA:FS nekoliko višjo vrednost AOP kot sama fenolna spojina.

Sprememba entalpije denaturacije celotnega prehoda (ΔH_{cal}) se ob dodatku fenolnih spojin h BSA-ju poveča, ne glede na analizirano množinsko razmerje.

Največjo termično in entalpijsko stabilizacijo Δ (ΔH_{cal}) na BSA ima pri množinskem razmerju 1:1 epigalokatehin galat>kampferol>epigalokatehin>kampferol-3-glukozid.

Toplotna denaturacija BSA in BSA v prisotnosti fenolne spojine ni enostopenjski proces, temveč poteka preko številnih intermediatnih stanj.

Toplotna denaturacija ni reverzibilen proces.

6 POVZETEK

V raziskavi, ki smo jo opravili v okviru diplomske naloge smo žeeli proučiti vezavo fenolnih spojin (kampferol, epigalokatehin, epigalokatehin galat, kampferol-3-glukozid) na goveji serumski albumin (BSA). Za pridobitev podatkov smo uporabili gelsko kromatografijo, elektroforetske tehnike, diferenčno dinamično kalorimetrijo ter metodo določanja antioksidativne aktivnosti z DPPH[·] radikalom.

Z gelsko kromatografijo smo 97 % BSA preverili, če je zadost čist za uporabo v nadalnjih raziskavah. Glede na kromatografski vrh, ki bi lahko bil bolj izrazit in glede na poznejše elektroforetske primerjave z 99 % BSA, smo se odločili za uporabo slednjega.

Zanimala nas je razlika med mešanicami množinskih razmerij BSA:fenolna spojina (FS) = 1:1, 1:2, in sicer brez segrevanja, ter po segrevanju na 120 °C. Vzorce brez segrevanja smo nanesli na nativno PAGE elektroforezo. Med vzorci mešanic in standardom (99 % BSA) s to metodo nismo opazili bistvenih razlik v na elektroforetskih progah, kar pa še ne pomeni da, niso prisotne. Detekcija sprememb je bila omejena z omejitvijo natančnosti razločevanja raztopine barvila Coomassie Brilliant Blue.

Nadaljevali smo z metodo merjenja antioksidativne aktivnosti (AOP) z DPPH[·] radikalom. AOP smo pomerili za vzorce mešanic množinskih razmerij BSA:fenolna spojina (FS) = 1:1 in 1:2. AOP smo izmerili tudi samim fenolnim spojinam v takšnih količinah, kot so bile dodane množinskim razmerjem z BSA. Osnovno metodo za določanje AOP smo morali preurediti, ker smo žeeli antioksidativno aktivnost izmeriti tudi za sam BSA, metoda pa je zasnovana za merjenje spojin z visokim antioksidativnim potencialom.

Iz rezultatov, ki smo jih dobili na vzorcu 99 % BSA s koncentracijo 1 mg/ml, lahko razberemo, da je se AOP BSA proteina dvigne ob dodatku katerekoli izmed naših uporabljenih fenolnih spojin (kampferol, epigalokatehin, epigalokatehin galat, kampferol-3-glukozid) in v obeh množinskih razmerjih.

Pri rezultatih AOP samih fenolnih spojin pa se je pojavila izjema. AOP fenolne spojine (kampferol, epigalokatehin in epigalokatehin galat) je bila nižja kot pripadajoča AOP kompleksa te spojine z BSA. V primeru kampferol-3-glukozida pa je bila AOP kompleksa višja kot AOP samega kamperol-3-glukozida.

Za določanje vrednosti temperатурne denaturacije (T_d) in spremembe entalpije denaturacije (ΔH_d) smo uporabili metodo diferenčne dinamične kalorimetrije.

Iz dobljenih vrednosti temperатурne denaturacije (T_d) in spremembe entalpije denaturacije lahko zaključimo, da se polifenolne spojine vežejo na BSA in termično in entalpijsko stabilizirajo protein.

Največjo entalpijsko stabilizacijo smo opazili pri vezavi epigalokatehin galata (množinsko razmerje 1:1) in kampferola (množinsko razmerje 1:2) na BSA, najmanjšo pa pri vezavi kampferol-3-glukozida. Proces denaturacije BSA tudi v prisotnosti polfenolnih spojin ni bil reverzibilen proces, ter poteka preko številnih intermediatov, ki so glede na rezultate NaDS elektroforeze različno veliki oligomeri BSA.

7 VIRI

Abram V. 2000. Antioksidativno delovanje flavonoidov. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi 2000, Portorož, 26.-27. oktober 2000. Žlender B, Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 23-32

Abram V., Cigić B., Poklar Ulrich N., Skrt M. 2006. Eksperimentalna biokemija: za študente biotehnologije in živilske tehnologije. Ljubljana, Biotehniška fakulteta : 111 str.

Arakawa T., Kita Y. 2000. Stabilizing effects of caprylate and acetyltryptophanate on heat-induced aggregation of bovine serum albumin. Biochimica et Biophysica Acta, 1479: 32-36

Chemical Book. 2007. Astralagin. Beijing, Chemical Book: 1 str.

http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB3732744.htm (30. 6. 2010)

Barone G., Capasso S., Del Vecchio P., De Sena C., Fessas D., Giancola C., Graziano G., Tramonti P. 1995. Thermal denaturation of bovine serum albumin and its oligomers and derivatives pH dependence. Journal of Thermal Analysis, 45: 1255-1264

Devlin T. M. 2006. Textbook of biochemistry with clinical correlations. 6thed. New Jersey, Wiley-Liss: 115-116

Dugaiczyk A., Law S. W., Dennison O. E. 1982. Nucleotide sequence and the encoded amino acids of human serum albumin mRNA. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 79: 71-75

ExPASy proteomics server. 2010. BSA primary structure. Lausanne, ExPASy: 1 str.

<http://www.expasy.org/cgi-bin/protparam1?P02769@25-607@> (12. 6. 2010)

Haroon A. 2002. Protein-phenolic interaction in food. Thesis. Montreal, McGill University: 80 str.

Herbs-tech. 2010a. Epigallocatechin. Shanghai, Herbs-tech: 1 str.

<http://www.herbs-tech.com/product/egc.asp> (30.6.2010)

Herbs-tech . 2010b. Epigallocatechin gallate. Shanghai, Herbs-tech :1 str.

<http://www.herbs-tech.com/product/egcg.asp> (30.6.2010)

Giancola C., De Sena C., Fessas D., Graziano G., Barone G. 1997. DSC studies on bovine serum albumin denaturation effects of ionic strength and SDS concentration. International Journal of Biological Macromolecules, 20: 193-204

Harborne J. B. 1994. Phenolics. V: Natural products: Their chemistry and biological significance. Hann J., Davidson R. S., Hobbs J. B., Banthorpe D. V., Harborne J. B. (eds.). New York, John Wiley & Sons Inc.: 361-372

Oi H., Matsuura D., Miyake M., Ueno M., Takai I., Yamamoto T., Kubo M., Moss J., Noda M. 2002. Identification in traditional herbal medications and confirmations by synthesis of factors that inhibit cholera toxin-induced fluid accumulation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 99, 5: 3042-3046

Tocris Bioscience. 2010. Kaempferol. Ellisville, Tocris bioscience: 1 str.
<http://www.tocris.com/dispprod.php?ItemId=231432> (30. 6. 2010)

Klompong V., Benjakul S., Kantachote D., Shahidi F. 2008. Antioxidant activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. International Journal of Food Science and Technology, 43, 6: 1019-1026

Kusuda M., Hatano T., Yoshida T. 2006. Water-soluble complexes formed by natural polyphenols and bovine serum albumin: Evidence from gel electrophoresis. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 70, 1: 152-160

Lawn R.M., Adelman J., Bock S.C., Franke A.E., Houck C.M., Najarian R.C., Seeburg P.H., Wion K.L. 1981. The sequence of human serum albumin cDNA and its expression in *E. coli*. Nucleic Acid Research, 9: 6103-6114

Lin J. K., Weng M. S. 2006. Flavonoids as nutraceuticals. V: The science of flavonoids. Grotewold E. (ed.). Ohio, Springer science + Business media, Inc.: 213-229

Liu D., Liu X. Y., Robinson D., Burnett C., Jackson C., Seele L., Veach R. A., Downs S., Collins R. D., Ballard D. W., Hawinger J. 2004. Suppression of Staphylococcal enterotoxin B-induced toxicity by a nuclear import inhibitor. Journal of Biological Chemistry, 279, 18: 19239-19246

Lu J., Stewart A. J., Sadler P. J., Pinheiro T. J. T., Blindauer C. A. 2008. Albumin as a zinc carrier: Properties of its high-affinity zinc-binding site. Biochemical Society Transactions, 36, 6: 1317-1321

Lyubarev A. E., Kurganov B. I. 2007. Study of irreversible thermal denaturation of proteins by differential scanning calorimetry. V: Methods in protein structure and stability analysis. Uversky V., Permyakov E. (eds.). New York, Nova Science Publishers, Inc.: 109-145

Mahmood R., Khan S. A. 1990. Role of upstream sequences in the expression Staphylococcal enterotoxin B gene. Journal of Biological Chemistry, 265, 8: 4652-4656

Michnik A. 2003. Thermal stability of bovine serum albumin. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, 71: 509-519

Michnik A., Michalik K., Drzazga Z. 2005. Stability of bovine serum albumin at different pH. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, 80: 399-406

Michnik A., Michalik K., Kluczecka A., Drzazga Z. 2006. Comparative DSC study of human and bovine serum albumin. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, 84, 1: 113-117

Militello V., Vetri V., Leone M. 2003. Conformational changes involved in thermal aggregation processes of bovine serum albumin. *Biophysical Chemistry*, 105: 133-141

Morinaga N., Iwamaru Y., Yahiro K., Tagashira M., Moss J., Noda M. 2005. Differential activities of plant polyphenols on the binding and internalization of Cholera toxin in Vero cells. *Journal of Biological Chemistry*, 280, 24: 23303-23309

Neyestani T. R., Djalali M., Pezeshki M. 2003. Isolation of α -lactoglobulin and bovine serum albumin from cow's milk using gel filtration and anion-exchange chromatography including evaluation of their antigenicity. *Protein Expression and Purification*, 29: 202-208

Phillips T. 2010. What are Vero cells? New York, About.com, Inc: 1str.
<http://biotech.about.com/od/faq/f/VeroCells.htm> (23. 7. 2010)

Poklar N. 2000. Praktikum iz biofizikalne kemije. Ljubljana, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo: 78 str.

Prior R. L., Wu X., Schaich K. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 4290-4302

Prigent S.V.E., Gruppen H., Visser A. J. W. G., Van Koningsveld G. A., De Jong G. A. H., Voragen A. G. J. 2003. Effects of non-covalent interactions with 5-O-caffeoylequinic acid (chlorogenic acid) on the heat denaturation and solubility of globular proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 5088-5095

Prigent S. V. E., Voragen A. G. J., Visser A. J. W. G., Van Koningsveld G. A., Gruppen H. 2007. Covalent interactions between proteins and oxidation products of caffeoylequinic acid (chlorogenic acid). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87, 13: 2502-2510

Rawel H. M., Czajka D., Rohn S., Kroll J. 2002. Interactions of different phenolic acids and flavonoids with soy proteins. *International Journal of Biological Macromolecules*, 30: 137-150

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

Salobir M. 1998. Vpliv mutacij na konformacijsko stabilnost ekvinatoksina II. Doktorska disertacija. Ljubljana, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo: 101 str.

Microcal. 2008. Stability. New Jersey, Microcal: 1 str.
<http://www.microcal.com/functional-application-areas/stability/default.asp> (30.7. 2010)

Šubic M. 2008. DSC-termična analiza. Kranj, Iskraemeco, laboratorijski center: 1str.,
<http://iskraemeco-lab.si/show/dsc-termicna-analiza>, (20.6.2010)

User's manual. 2005. Chapter three: Instrument description and theory. Delaware, Calorimetry Sciences Corporation: 17-27

Waszkowiak K. 2008. The application of connective tissue proteins as antioxidant carriers in food production. Electronica Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry, 7, 8: 3331-3334

Wen Tseng C., Stewart G. C. 2005. Rot repression of enterotoxin B expression in *Staphylococcus aureus*. Journal of Bacteriology, 187, 15: 5301-5309

Yanaka S., Kudou M., Tanaka Y., Sasaki T., Takemoto S., Sakata A., Hattori Y., Koshi T., Futaki S., Tsumoto K., Nakatashima T. 2010. Contribution of the flexible loop region to the function of staphylococcal enterotoxin B. Protein Engineering, Design & Selection, 23, 5: 415-421

Yang M., Kostov Y., Bruck H. A., Rasooly A. 2009. Gold nanoparticle-based enhanced chemiluminescence immunosensor for detection of Staphylococcal enterotoxin B (SEB) in food. International Journal of Food Microbiology, 133, 3: 265-271

Yang M., Kostov Y., Rasooly A. 2008. Carbon nanotubes based optical immunodetection of Staphylococcal enterotoxin B (SEB) in food. International Journal of Food Microbiology, 127: 78-83

ZAHVALA

V prvi vrsti se zahvaljujem mentorici prof. dr. Nataši Poklar Ulrich in somentorici asist. dr. Mihaeli Skrt za vso pomoč pri laboratorijskem delu in pisanku diplomskega dela.

Zahvaljujem se tudi prof. dr. Davidu Stoparju, za pomoč in recenzijo diplomske naloge.

V laboratoriju si prav posebno zahvalo zaslužita Ajda Ota in Dejan Gmajner, ki sta mi pomagala reševati velike in majhne težave in ob prisotnosti katerih je vsak problem izgledal manjši kot na prvi pogled.

Posebno omembo in zahvalo si zaslužijo tudi Katja Pirc, Petra Terpinc in Marko Šnajder, ki so mi nesebično pomagali in svetovali pri delu, ter poskrbeli za dobro vzdušje v laboratoriju.

Zahvaljujem se Katji Černe, ki nam je neutrudno razmnoževala zapiske in brez katere bi bila študijska leta precej težja.

Pri pisanju in urejanju diplomske naloge se zahvaljujem Evgenu Benediku in Tjaši Prevc, ki sta mi bila v veliko pomoč tako na fakulteti kot zasebno.

Na koncu se zahvaljujem vsem, ki so mi stali ob strani tekom diplomskega dela.
Anja, Katarina, Grega in starši, HVALA!

PRILOGE

Priloga A: Nativna elektroforeza dveh frakcij (25, 26) iz gelske kromatografije z 97 % BSA na G-100 gelu. Gel je sestavljen iz 9 % ločevalnega gela in 4 % zbiralnega gela.

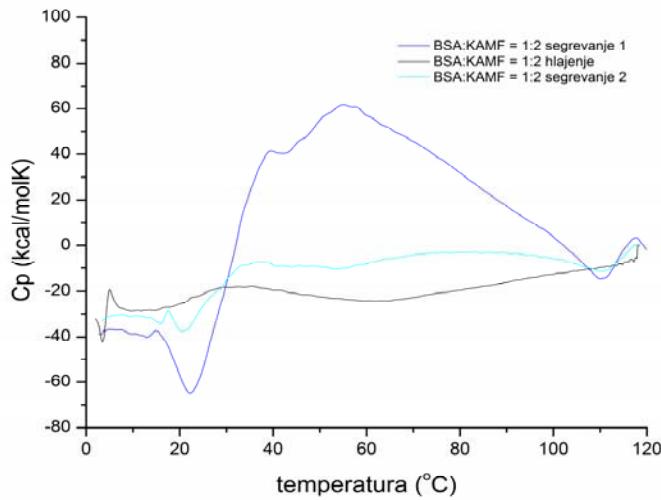
Frakcija 26 Frakcija 25



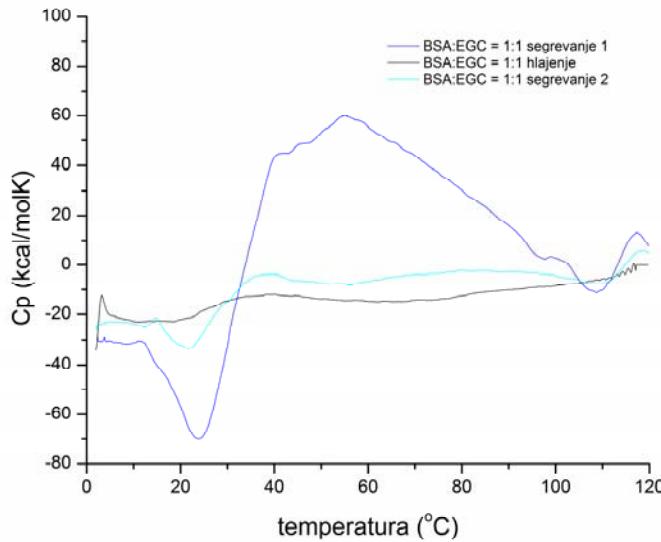
Priloga B: Prikaz odstotnih vrednosti antioksidativne aktivnosti mešanic fenolnih spojin z BSA-jem ($\gamma = 1 \text{ mg/ml}$) ter vzorcev fenolnih spojin (FS).

	AOP razmerja BSA/FS (%)	AOP fenolne spojine (%)
BSA	9,0±2	/
BSA:KAMF=1:1	60±3	70±2
BSA:KAMF=1:2	72±1	80±4
BSA:EGC=1:1	70±2	75±5
BSA:EGC=1:2	70±4	80±1
BSA:EGCG=1:1	69±4	83±2
BSA:EGCG=1:2	68±2	79±2
BSA:KAMG=1:1	22±2	16±4
BSA:KAMG=1:2	23±4	20±2

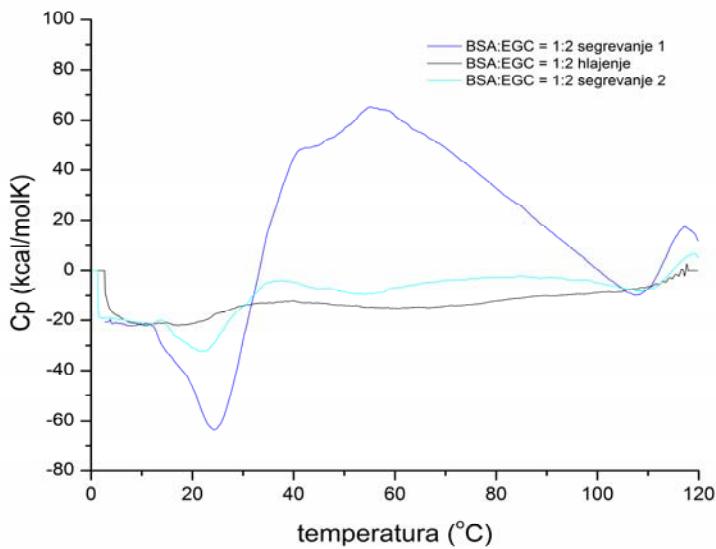
Priloga C: DSC termogram BSA (raztopljen v 20 mM HEPES pufru, $\gamma = 1 \text{ mg/ml}$, pH= 7,52) ob dodatku kampferola v množinskem razmerju 1:2. Prikaz merjenih krivulj segrevanja in ohlajanja.



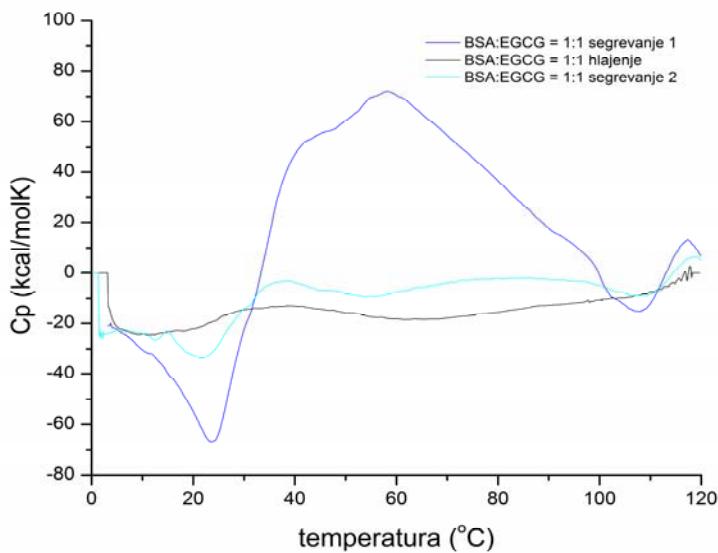
Priloga D: DSC termogram BSA (raztopljen v 20 mM HEPES pufru, $\gamma = 1 \text{ mg/ml}$, pH= 7,52) ob dodatku epigalokatehina v množinskem razmerju 1:2. Prikaz merjenih krivulj segrevanja in ohlajanja.



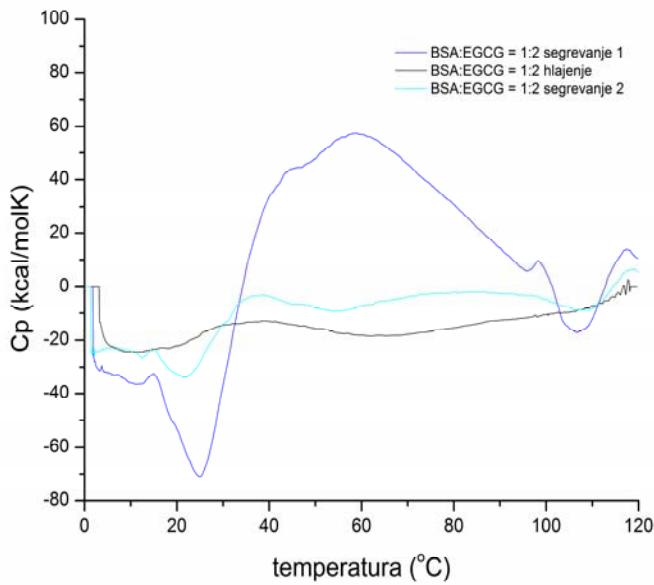
Priloga E: DSC termogram BSA (raztopljen v 20 mM HEPES pufru, $\gamma = 1 \text{ mg/ml}$, pH= 7,52) ob dodatku epigalokatehina v množinskem razmerju 1:2. Prikaz merjenih krivulj segrevanja in ohlajanja.



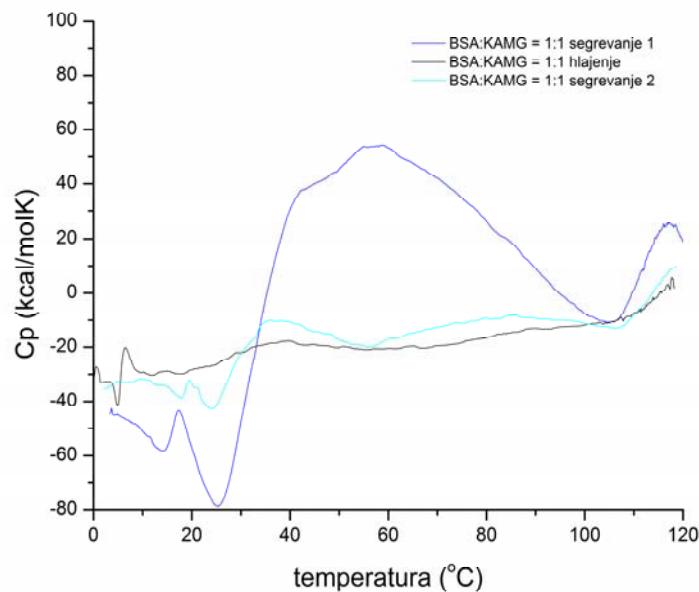
Priloga F: DSC termogram BSA (raztopljen v 20 mM HEPES pufru, $\gamma = 1 \text{ mg/ml}$, pH= 7,52) ob dodatku epigalokatehin galata v množinskem razmerju 1:1. Prikaz merjenih krivulj segrevanja in ohlajanja.



Priloga G: DSC termogram BSA (raztopljen v 20 mM HEPES pufru, $\gamma = 1 \text{ mg/ml}$, pH= 7,52) ob dodatku epigalokatehin galata v množinskem razmerju 1:2. Prikaz merjenih krivulj segrevanja in ohlajanja.



Priloga H: DSC termogram BSA (raztopljen v 20 mM HEPES pufru, $\gamma = 1 \text{ mg/ml}$, pH= 7,52) ob dodatku kampferol-3-glukozida v množinskem razmerju 1:1. Prikaz merjenih krivulj segrevanja in ohlajanja.



Priloga I: DSC termogram BSA (raztopljen v 20 mM HEPES pufru, $\gamma = 1 \text{ mg/ml}$, pH= 7,52) ob dodatku kampferol-3-glukozida v množinskem razmerju 1:2. Prikaz merjenih krivulj segrevanja in ohlajanja.

