

Vežanje indolnih spojeva na ljudski albumin

Sekelj, Maja

Master's thesis / Diplomski rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:474216>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-22**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Maja Sekelj

Vežanje indolnih spojeva na ljudski albumin

Diplomski rad

Zagreb, 2016.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za magnetske rezonancije na Zavodu za fizičku kemiju Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu, pod vodstvom dr. sc. Marine Ilakovac-Kveder. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

Dr.sc. Marini Ilakovac Kveder najljepše zahvaljujem na darovanom vremenu, strpljenju, podršci i dragocjenim savjetima prilikom izrade diplomskog rada.

Doc.dr.sc. Petri Peharec Štefanić hvala na korisnim savjetima tokom pisanja diplomskog rada.

Zahvaljujem se svima u Laboratoriju za magnetske rezonancije na susretljivosti i pristupačnosti, a posebno Dejani Carić na korisnim savjetima i svemu što me naučila tokom vremena provedenog zajedno.

Veliko hvala roditeljima i suprugu na ljubavi i podršci.

Svima koji su na bilo koji način omogućili izradu ovog diplomskog rada od srca zahvaljujem.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

VEZANJE INDOLNIH SPOJEVA NA LJUDSKI ALBUMIN

Maja Sekelj

Roosveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Albumin (HSA) jedan je od najvažnijih transportnih proteina u ljudskom serumu. Albumin veže različite endogene i egzogene tvari. U patološkim stanjima kao što je zatajenje bubrega te u bolestima jetre, dolazi do nakupljanja uremičnih spojeva koji se vežu na albumin i na taj način inhibiraju vezanje lijekova pa terapija nije učinkovita. Jedan od uremičnih spojeva je indol-3-octena kiselina (IAA) za koju je dokazano da se specifično veže na albumin u patološkim stanjima. U ovom radu istraženo je vezanje IAA, L-triptofana, 5-metil-IAA i 5-benziloksi-IAA na HSA u prisustvu i odsustvu vezanih masnih kiselina koje se normalno u organizmu vežu na HSA. Metodom ravnotežne dijalize i fluorescencijske spektroskopije određena je koncentracija nevezanog i vezanog liganda te su podaci analizirani grafičkim prikazom prema Scatchardu. Indolni spojevi se vežu specifično na jedno vezno mjesto u albuminu s različitim afinitetima. Najveći afinitet ima IAA u odnosu na ostale proučavane indolne spojeve.

(48 stranica, 23 slike, 15 tablica, 38 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: ligand, protein, fluorescencijska spektroskopija, stehiometrija vezanja, Scatchardova analiza

Voditelj: Dr. sc. Marina Ilakovac Kveder

Suvoditelj: Dr. sc. Petra Peharec Štefanić, doc.

Ocjenitelji: Dr. sc. Petra Peharec Štefanić, doc.

Dr. sc. Ana Galov, doc.

Dr. sc. Željka Vidaković-Cifrek, izv. prof.

Rad prihvaćen: 07.04.2016.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Division of Biology

Graduation Thesis

BINDING OF INDOLE COMPOUNDS TO HUMAN ALBUMIN

Maja Sekelj

Roosveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Human serum albumin (HSA) is one of the most important transport proteins in human serum. Albumin binds various endogenous and exogenous substances. In pathological conditions such as renal failure and in liver disease, there are present uremic compounds which bind to albumin and thereby inhibit the binding of drugs leading to ineffective therapies. One of the uremic compounds is indole-3-acetic acid (IAA) which has been shown to specifically bind to albumin in pathological conditions. This study investigated the binding of IAA, L-tryptophan, 5-methyl-IAA and 5-benzyloxy-IAA to HSA in the absence and presence of fatty acids, which are normally bound to HSA. By using methods of equilibrium dialysis and fluorescence spectroscopy, the concentrations of unbound and bound ligands were determined, and the data were analyzed according to Scatchard plot. Indole compounds are binding specifically to one binding site of the albumin with different affinities. IAA binds with the highest affinity as compared to other studied indoles.

(48 pages, 23 figures, 15 tables, 38 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library.

Key words : ligand, protein, fluorescence spectroscopy, stoichiometry of binding, Scatchard plot

Supervisor: Dr. Marina Ilakovic Kveder

Cosupervisor: Dr. Petra Peharec Štefanić, Asst. Prof.

Reviewers: Dr. Petra Peharec Štefanić, Asst. Prof.

Dr. Ana Galov, Asst. Prof.

Dr. Željka Vidaković-Cifrek, Assoc. Prof.

Thesis accepted: 07.04.2016.

SADRŽAJ

UVOD.....	1
1.1 Proteini.....	1
1.1.1 Protein – ligand interakcije.....	3
1.2 Albumin	6
1.2.1 VEZANJE LIGANDA NA ALBUMIN.....	7
1.3 Uremični spojevi	11
1.3.1 Indolni spojevi.....	12
1.4 CILJ ISTRAŽIVANJA.....	14
2 MATERIJALI I METODE	15
2.1 MATERIJALI	15
2.1.1 Kemikalije.....	15
2.1.2 Uređaji i pribor.....	16
2.1.3 Priprema otopina za snimanje apsorpcijskih spektra HSA i indolnih spojeva ...	16
2.1.4 Priprema otopine za određivanje ovisnosti apsorpcije o koncentraciji otopine IAA	16
2.1.5 Priprema reakcijskih smjesa u eksperimentima vezanja indola na HSA	17
2.1.6 Određivanje koncentracije nevezanog liganda	18
2.2 METODE.....	18
2.2.1 UV/VIS spektrofotometrija.....	18
2.2.2 Ravnotežna dijaliza	21
2.2.3 Fluorescencijska spektroskopija	21
2.2.4 Analiza rezultata Scatchardovim prikazom	24
3 REZULTATI.....	25
3.1 Apsorpcijski spektri HSA i indolnih spojeva.....	26
3.2 Ovisnost apsorpcije o koncentraciji otopine	29
3.3 Ovisnost intenziteta fluorescencije o koncentraciji otopine	30
3.4 Vežanje indolnih spojeva na HSA s i bez masnih kiselina.....	31
3.4.1 Fluorescencijski spektar vezanja triptofana na HSA s vezanim masnim kiselinama	32
3.4.2 Vežanje triptofana na HSA s masnim kiselinama.....	33
3.4.3 Vežanje IAA na HSA s masnim kiselinama.....	34
3.4.4 Vežanje IAA na HSA bez masnih kiselina.....	35

3.4.5	Vežanje 5-metil –IAA na albumin s masnim kiselinama.....	36
3.4.6	Vežanje 5-metil-IAA na HSA bez masnih kiselina	37
3.4.7	Vežanje 5-benziloksi-IAA na HSA s masnim kiselinama.....	38
3.4.8	Vežanje indolnih spojeva na HSA s i bez vezanih masnih kiselina.....	39
4	RASPRAVA.....	40
4.1	Vežanje IAA na HSA s i bez masnih kiselina	41
4.2	Vežanje triptofana na HSA s masnim kiselinama	41
4.3	Vežanje 5-metil-IAA na HSA s i bez masnih kiselina	41
4.4	Vežanje 5-benziloksi-IAA na HSA s masnim kiselinama.....	42
5	ZAKLJUČAK.....	43
6	LITERATURA	44
7	ŽIVOTOPIS	48

UVOD

Albumin u ljudskom serumu (engl. *Human serum albumin*, HSA) jedan je od najvažnijih transportnih proteina, a ima i ulogu u regulaciji osmotskog tlaka. Osim masnih kiselina, HSA veže različite endogene i egzogene tvari kao što su hormoni, aminokiseline, bilirubin, metali i lijekovi (Yamasaki i sur. 2013).

Vezna mjesta albumina se proučavaju već dugi niz godina, a posebni interes predstavljaju ligandi korelirani s patološkim stanjima organizma poput zatajenja bubrega gdje se zbog nakupljanja endogenih metabolita smanjuje bubrežna funkcija i biodostupnost lijekova (Sakai i sur. 1995). Vezanje molekula na HSA, osim istraživanja svojstava samih veznih mjesta, dodatno otvara problematiku biodostupnosti farmaceutika, a posebno utvrđivanja specifičnosti njihovog kompetitivnog vezanja na mjesta nativnih liganda kao što su masne kiseline. U tom slučaju se masne kiseline otpuštaju u krvotok gdje potencijalno stupaju u interakciju s drugim molekulama što također pridonosi fiziološkoj neravnoteži organizma.

Indol-3-octena kiselina (engl. *Indole-3-acetic acid*, IAA) se kao metabolit triptofana nalazi u krvotoku i veže se na HSA (Bertuzzi i sur. 1997). Budući da se smatra da nagomilavanje indolnih metabolita ima toksične posljedice, znanstveni interes proučavanja vezanja indolnih spojeva na albumin je i u kliničkim implikacijama rezultata takvih studija (Yamasaki i sur. 2013).

1.1 Proteini

Proteini su makromolekule građene od aminokiselina povezanih peptidnom vezom čiji je slijed kodiran nukleinskim kiselinama. Aminokiseline se sastoje od centralnog ugljikovog atoma, amino i karboksilne grupe, vodikovog atoma i bočnog ogranka (R) po kojem se razlikuju. Bočni ogranci se razlikuju po veličini, obliku, naboju, sposobnosti stvaranja vodikovih veza i kemijskoj reaktivnosti. Zbog tetraedarskog rasporeda četiriju različitih skupina oko ugljikovog atoma, aminokiseline su optički aktivne. Dva zrcalna oblika molekule zovu se L-izomer i D-izomer (Berg i sur. 2002). Aminokiseline u proteinima su L-izomeri. Osim jednostavnih proteina, postoje i složeni proteini koji imaju prostetičke skupine (u sastavu proteina su i druge molekule poput lipida, šećera, metala, nukleotida).

Prema strukturnoj građi razlikuju se primarna, sekundarna, tercijarna i kvaterna struktura.

- **Primarna struktura** – slijed aminokiselina povezanih peptidnom vezom gdje se karboksilna skupina povezuje s amino skupinom druge aminokiseline.
- **Sekundarna struktura** – većinom zbog vodikovih veza, dijelovi polipeptidnog lanca oblikuju specifične strukture poput α -zavojnice, β -ploče, β -okreta.
- **Tercijarna struktura** – prostorni raspored sekundarnih struktura i bočnih aminokiselinskih ostataka; utjecaj vodikovih, ionskih, hidrofobnih i disulfidnih veza.
- **Kvaterna struktura** – javlja se u proteinima koji imaju više polipeptidnih lanaca, opisuje prostorno uređenje tih podjedinica.

Proteini sudjeluju u gotovo svim biološkim procesima. Neke od uloga proteina u organizmima su: enzimski kataliza, koordinirano pokretanje mišića, mehanička čvrstoća kože i kostiju, imunosna zaštita, stvaranje i provođenje živčanih impulsa, a bitni su i za prijenos i pohranu molekula i iona (Berg i sur. 2002). Jedan od najvažnijih proteina plazme za prijenos endogenih i egzogenih tvari je albumin kojeg ima 55 – 60 % u krvi u odnosu na druge proteine.

Funkcija proteina ovisi direktno o strukturi proteina. Slijed aminokiselina se uvija u specifičnu trodimenzionalnu strukturu koja određuje funkciju proteina. Istraživanjem genoma otkriven je velik broj aminokiselinskih sekvenci koje su kodirane genima što je pridonijelo boljem predviđanju i razumijevanju strukture i funkcije takvih složenih makromolekula kao što su proteini. Proteini obavljaju biološke funkcije međudjelovanjem s drugim molekulama, npr. antitijelo se mora vezati na antigen da bi došlo do imunološkog odgovora, hormoni se vežu na receptore na staničnoj površini, enzimi se moraju vezati na supstrat, neki proteini se vežu na DNA i utječu na gensku ekspresiju.

U bolestima se fiziološka ravnoteža organizma narušava. Nakupljaju se različiti metaboliti u organizmu ili se njihova koncentracija smanjuje, a sve to utječe na funkciju proteina i interakciju s drugim molekulama. Funkcija proteina može biti promijenjena aktiviranjem epigenetičkih mehanizama i vanjskim faktorima. Stoga je identifikacija specifičnih molekula koje se mogu vezati na proteine i poznavanje strukture veznih mjesta u proteinima važno za razumijevanje funkcije proteina, ali i za sintezu novih lijekova. Različitim eksperimentalnim i računskim metodama kao što su rentgenska kristalografija, nuklearna magnetska rezonanca, računalni programi u bioinformatički, spektrofotometrijske analize, može se odrediti struktura proteina, a time i struktura veznih mjesta u proteinima, otkriti gdje su smještena takva vezna mjesta i na koji način dolazi do međudjelovanja s drugim molekulama.

1.1.1 Protein – ligand interakcije

Proteini (P) mogu reverzibilno vezati druge molekule tj. ligande (L) pa nastaje kompleks protein-ligand (PL) čija je koncentracija jednaka koncentraciji vezanog liganda L_v (engl. *L_{bound}*). Ligandi se vežu u vezno mjesto proteina koje je komplementarno ligandu bilo po veličini, naboju, obliku, hidrofobnim ili hidrofilnim svojstvima. Ligandi se vežu na proteine različitim afinitetima, a vezanje se postiže stvaranjem ionskih, vodikovih ili van der Waalsovih veza, dok kovalentno vezanje nije učestalo. Vezanje se može opisati kao reakcija proteina i liganda pa nastaje kompleks protein- ligand:



Konstanta vezanja (K_a) za takvu reakciju opisuje se kao omjer koncentracije kompleksa protein-ligand i koncentracije reaktanata. Ona opisuje afinitet liganda prema proteinu:

$$K_a = [PL] / ([P][L]) \quad [] \text{ označava koncentraciju spojeva} \quad (1.1)$$

Konstanta disocijacije (K_d) je recipročna vrijednost konstante vezanja i manja konstanta disocijacije znači da je ligand čvršće vezan (Kuriyan i sur. 2012).

$$K_d = ([P][L]) / [PL] \quad (1.2)$$

Ako je koncentracija proteina konstantna, a mijenjamo samo koncentraciju liganda, ukupna koncentracija proteina (P_0) u svim oblicima je:

$$[P_0] = [P] + [PL] \quad (1.3)$$

Iz toga slijedi da je:

$$[P] = [P_0] - [PL]. \quad (1.4)$$

Ukupna koncentracija liganda (L_0) se opisuje izrazom:

$$[L_0] = [L_n] + [PL] \quad (1.5)$$

$[L_n]$ je koncentracija nevezanog liganda (engl. L_{free} ili se u nekim slučajevima označava samo kao L).

Ako izraz (1.4) uvrstimo u formulu za konstantu vezanja (1.1) omjer koncentracije protein-ligand kompleksa i koncentracije nevezanog liganda (L_n) je:

$$[PL]/[L_n] = K_a ([P_0] - [PL]) \quad (1.6)$$

Jednadžba 1.6 je Scatchardova jednadžba kojom možemo odrediti K_a odnosno K_d . Ako grafički prikazemo odnos omjera koncentracija vezanog i nevezanog liganda prema koncentraciji vezanog liganda, nagib pravca je $-K_a$ odnosno $-1/K_d$.

Kada pretpostavljamo da na proteinu postoje identična i neovisna vezna mjesta, u Scatchardovu jednadžbu moramo uvrstiti i broj veznih mjesta (n) koja možemo odrediti iz odsječka na ordinati (nK_aP_0).

$$[PL]/[L_n] = nK_a ([P_0] - [PL]) \quad (1.7)$$

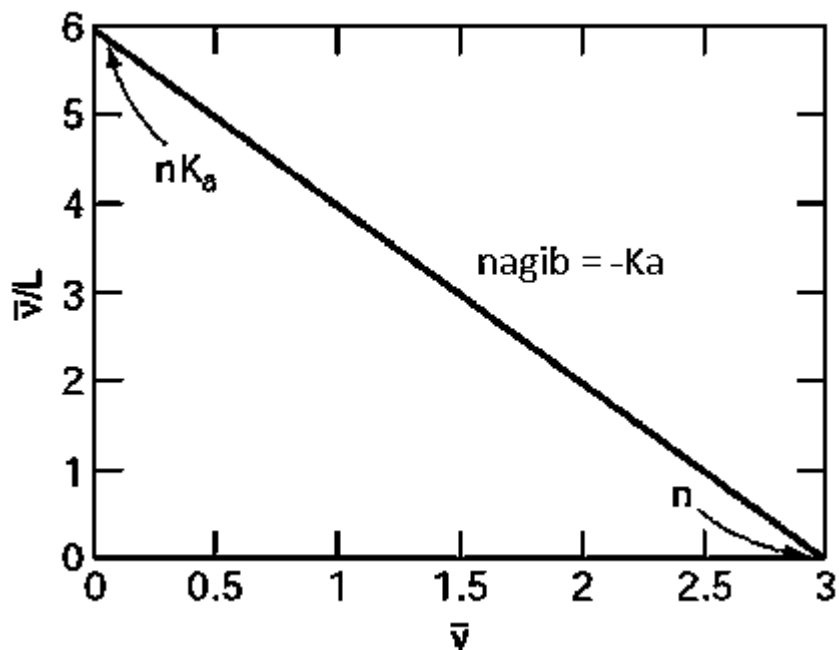
Osim takvog grafičkog prikaza gdje se pokazuje ovisnost omjera koncentracija vezanog i nevezanog liganda prema koncentraciji vezanog liganda, može se definirati i frakcija zauzetih mjesta (f_r , v , r ; postoje različite oznake u literaturi), a to je omjer koncentracije vezanog liganda na proteinu i ukupne koncentracije proteina (Sanders 2010):

$$v = [PL] / [P_0] \quad (1.8)$$

Prema izrazu 1.8 izvedena je inačica Scatchardove jednadžbe:

$$v / [L_n] = nK_a - vK_a \quad (1.9)$$

Ako grafički prikazemo ovisnost omjera frakcije zauzetih mjesta i koncentracije nevezanog liganda prema frakciji zauzetih mjesta, iz nagiba pravca se određuje K_a , a odsječak na apscisi predstavlja broj veznih mjesta (Slika 1).



Slika 1. Scatchardova analiza vezanja proteina i liganda. v/L je omjer frakcije zauzetih mjesta i koncentracije nevezanog liganda. v je frakcija zauzetih mjesta na proteinu, omjer koncentracije vezanog liganda i ukupne koncentracije proteina. Iz prikaza se može odrediti konstanta vezanja (K_a) i broj veznih mjesta na proteinu (n). (Preuzeto i prilagođeno iz <http://what-when-how.com/molecular-biology/scatchard-plot-molecular-biology>).

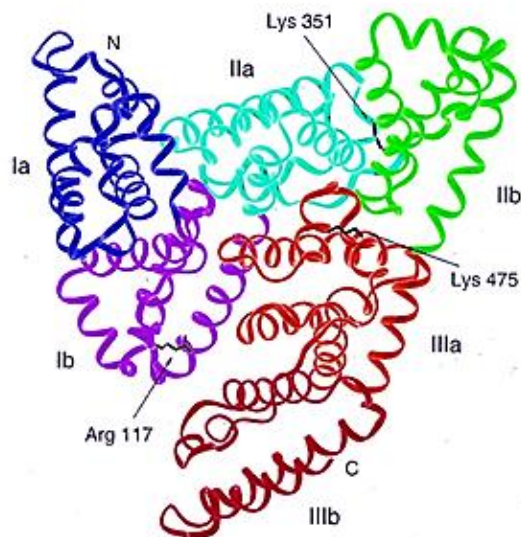
Postoje i drugi modeli koji opisuju vezanje liganda i proteina zato što na proteinu može postojati više veznih mjesta za ligand koja mogu biti različitog afiniteta, ligand se može vezati i na više proteina ili se dva liganda vežu na isto mjesto na proteinu pa postoji kompetitivna interakcija.

Grafički prikaz omjera koncentracija vezanog i nevezanog liganda prema koncentraciji vezanog liganda govori nam o tome da li je došlo do specifičnog vezanja, da li postoji nespecifično ili kooperativno vezanje, ovisno o izgledu pravca ili krivulje.

1.2 Albumin

Serumski albumin je jednolančani protein od 585 aminokiselina (Minghetti i sur. 1986) molekulske mase oko 66500 Da. Sintetizira se u jetri i nema prostetičke skupine i kovalentno vezanih lipida i ugljikohidrata. Regulacija sinteze je transkripcijska i posttranskripcijska, a važan čimbenik je i osmotski tlak intersticijske tekućine oko hepatocita (Nicholson i sur. 2000). Dnevno se sintetizira 10 - 15 g albumina i samo se mali dio skladišti u jetri. Oko 30 - 40% sintetiziranog albumina je u plazmi, a ostatak je u mišićima i koži. Koncentracija u serumu ovisi o stopi sinteze i degradacije te o raspodjeli između intravaskularnih i ekstravaskularnih prostora. Razgrađuje se većinom u mišićima, jetri i bubrezima.

Kristalografskom analizom je pokazano da polipeptidni lanac tvori srcoliki protein (Slika 2) koji se može podijeliti u tri homologne domene (I-III), a svaka ima dvije subdomene označene sa A i B (He i Carter, 1992). Oko 67% tercijarne strukture su α -uzvojnice. Albumin ima 35 cisteinskih ostataka od kojih svi osim Cys 34 koji je u domeni I, tvore 17 disulfidnih mostova što pridonosi stabilnosti proteina. He i Carter (1992) su zaključili da se glavna područja vezanja liganda nalaze u šupljinama subdomena IIA i IIIA.



Slika 2. Kristalna struktura HSA. Albumin ima tri domene (I-III) od kojih je svaka podijeljena u dvije subdomene (a i b). N i C označavaju N-kraj i C-kraj polipeptida. Arg 117, Lys 351 i Lys 475 su moguća vezna mjesta dugolančanih masnih kiselina. (Preuzeto i prilagođeno iz Sugio i sur. 1999)

1.2.1 VEZANJE LIGANDA NA ALBUMIN

1.2.1.1 Vezanje masnih kiselina na albumin

Masne kiseline (engl. *fatty acids*, FA) se sastoje od nerazgranatog ugljikovodičnog lanca i karboksilne grupe, a dijele se na zasićene, jednostruko nezasićene i višestruko nezasićene masne kiseline. Zasićene masne kiseline imaju samo jednostruke veze (palmitinska, stearinska), a nezasićene jednu ili više dvostrukih veza (oleinska je najrasprostranjenija nezasićena masna kiselina). U biološkim sustavima, masne kiseline obično sadrže paran broj ugljikovih atoma, a najčešće imaju 16 ili 18. Svojstva masnih kiselina kao i svojstva lipida koji od njih potječu, ovise o duljini lanca i stupnju njihove nezasićenosti.

Imaju važne funkcije u organizmu :

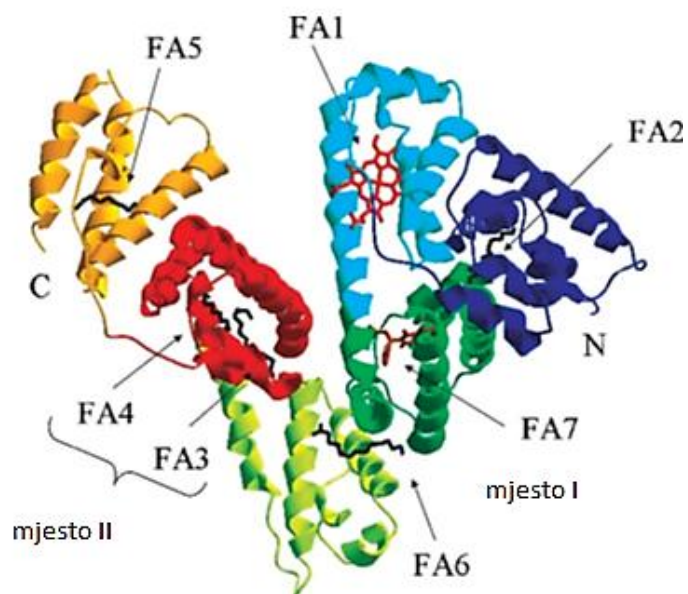
- služe kao metaboličko gorivo
- građevne su jedinice fosfolipida i glikolipida
- modificiraju proteine
- njihovi derivati su hormoni i unutarstanični glasnici

Slabo su topive u vodenim otopinama kao što je krvna plazma pa se moraju vezati na proteine kako bi se njihova koncentracija u vaskularnim i intersticijskim prostorima povećala.

Albumin je glavni protein na kojeg se masne kiseline vežu. Analizom kristalne strukture kompleksa HSA i miristinske kiseline, otkriveno je sedam veznih mjesta s različitim afinitetom vezanja (Slika 3).

Prema Sudlowoj nomenklaturi postoje dva glavna mjesta vezanja na molekuli albumina. Na mjesto I (engl. *site I*) vežu se heterociklični anioni, a aromatski karboksilati se vežu na mjesto II (engl. *site II*). Analizom je pokazano da se masne kiseline vežu na vezna mjesta FA1-5 elektrostatskim interakcijama ili stvaranjem vodikovih veza. Mjesta vezanja FA3 i FA4 odgovaraju Sudlowom mjestu II i nalaze se u subdomeni IIIA, a FA7 vezno mjesto nalazi se u Sudlowom mjestu I. Za vezna mjesta FA6 i FA7 smatra se da su to vezna mjesta niskog afiniteta (Fasano i sur. 2005). U novije vrijeme korištenjem 2D NMR (nuklearna magnetska rezonantna spektroskopija) i kristalografskih podataka otkriveno je devet različitih mjesta vezanja masnih kiselina (Hamilton 2013).

Vežanjem masnih kiselina dolazi do konformacijskih promjena albumina. Glavne domene se rotiraju, a dolazi i do rotacije bočnih lanaca aminokiselina ovisno o mjestu vezanja.



Slika 3. Kristalna struktura kompleksa HSA i miristinske kiseline. FA1 – FA7 su vezna mjesta masnih kiselina. (Preuzeto i prilagođeno iz Fasano i sur. 2005)

1.2.1.2 Vežanje lijekova na albumin

Lijekovi u krvi se vežu na proteine plazme ili cirkuliraju kao samostalne molekule. U bolesnim stanjima dolazi do promjena u vezanju lijekova na albumin. Kako bi se omogućila optimalna terapija potrebno je dobro poznavanje farmakoloških učinaka lijekova i interakcije s albuminom.

Mjesta na koja se vežu lijekovi su mjesto I (varfarin vezno mjesto) i mjesto II (diazepam vezno mjesto) smješteni u subdomenama IIA i IIIA (Curry i sur. 1998), a neki lijekovi se vežu i u drugim subdomenama ili imaju više različitih veznih mjesta. Varfarin se veže i na subdomeni IB za koju se smatra da je primarno mjesto vezanja lidokaina (Hein i sur. 2010) dok je sekundarno vezno mjesto za ibuprofen između subdomena IIA i IIB. Neki lijekovi se vežu kovalentno na Cys 34 u subdomeni IA .

Mjesto I na albuminu je vezna regija unutar subdomene II A, a sastoji se od preklapajućih veznih mjesta za varfarin i azapropazon (Fehske i sur. 1982), a između je smješten Trp 214. Unutrašnjost veznog mjesta je hidrofobna i sastoji se od dva nepolarna klastera, a pri dnu veznog džepa su Tyr 150, His 242, Arg 257, dok se na vanjskom dijelu pri ulazu u vezni džep nalaze Lys 199, Arg 218 i Arg 222. Aromatski spojevi se vežu u centralnoj

šupljini između bočnih lanaca Leu 238 i Ala 291 (Ghuman i sur. 2005). U prisustvu masnih kiselina, jače je vezanje varfarina i nekih drugih liganda na albumin zbog konformacijskih promjena koje se događaju u molekuli proteina (Petitpas i sur. 2001).

Mjesto II je nepolarna šupljina s Tyr 411 i Arg 410 koji su smješteni pri ulazu i tu se vežu aromatske karboksilne kiseline s negativnim nabojem na kraju molekule koji je odvojen hidrofobnim centrom (Otagiri 2005). Ovo vezno mjesto je manje fleksibilno od mjesta I i vezanje liganda često pokazuje stereoselektivnost, R-ibuprofen se veže jače od S-enantiomera (Itoh i sur. 1997). Vezanjem diazepama dolazi do rotacije bočnih lanaca Leu 387 i Leu 453 i interakcije s hidroksilnom grupom Tyr 411.

U bubrežnim bolestima kao što su nefrotski sindrom, zatajenje bubrega i uremija, koncentracija albumina se smanjuje te se smanjuje i vezanje samih lijekova na albumin. Tome pridonose i endogeni inhibitori kao što su uremični toksini koji se vežu na HSA ili povišena koncentracija masnih kiselina pa su vezna mjesta na proteinu zauzeta.

Funkcija albumina se remeti i u bolesti jetre, šećerne bolesti, šoka, trauma i karcinoma. U navedenim bolestima se mijenja koncentracija albumina u krvi, dolazi do strukturnih promjena molekule te nakupljanja endogenih tvari, a to sve utječe na vezanje lijekova na HSA i njihovu biodostupnost.

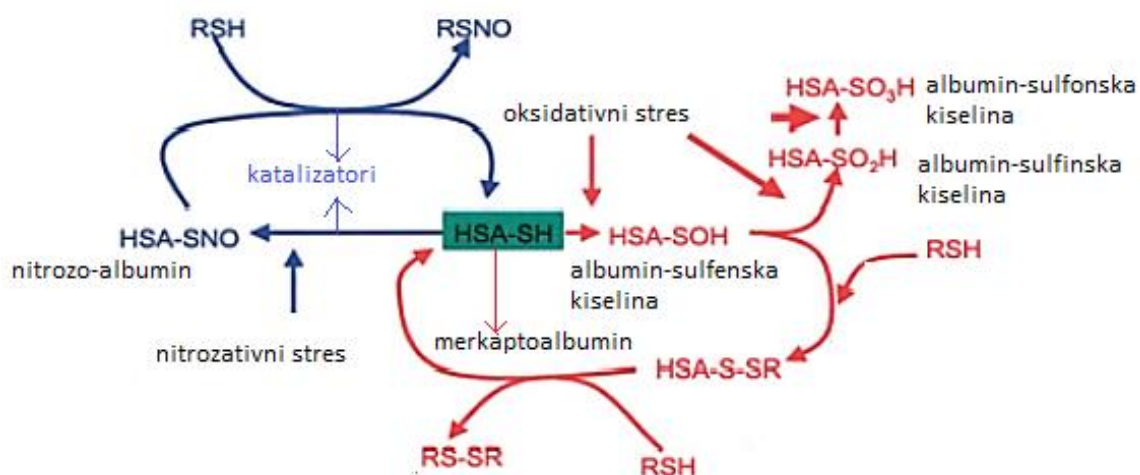
Osim navedenih masnih kiselina i lijekova, albumin veže i druge tvari. U subdomeni IB je vezno mjesto velikog afiniteta za bilirubin što ima važnu ulogu u detoksifikaciji organizma, a i vezanjem bilirubina, kompleks djeluje kao inhibitor lipidne peroksidacije. Kada je hem otpušten u krvotok zbog razgradnje eritrocita, veže se na albumin na jedno od veznih mjesta masnih kiselina u subdomeni IB te se na taj način transportira do hemopeksina te jetrenih stanica. Tiroksin, hormon štitnjače, primarno se veže u mjestu I, a sekundarna vezna mjesta su u domeni III. Albumin veže različite metalne ione i prijelazne metale i plemenite plinove, a dokazano je i da se mnoge gram pozitivne bakterije mogu vezati na albumin zbog prisutnosti nekih površinskih proteina kao što je G-protein (Navarre i Schneewind 1999). Na taj način bakterije mogu izbjeći imuni sustav i koristiti hranjive tvari koje su vezane na proteinu (Johansson i sur. 2002).

Dušikov oksid (NO) je važan biološki regulator i neuromodulator te se veže na sulfhidrilne grupe albumina i na taj način je zaštićen od brze degradacije. Njegovim vezanjem nastaje nitrozo-HSA koji prelazi u reduciranu formu vezanjem slobodnog cisteina ili glutaciona (Nicholson i sur. 2000). Reaktivni kisikovi i dušikovi spojevi (engl. *Reactive oxygen species*, ROS, *Reactive nitrogen species*, RNS) koji su normalni produkti metabolizma, mogu oštetiti

biomolekule što dovodi do oštećenja i disfunkcije stanica i nakupljanja toksičnih spojeva. Budući da albumin može vezati različite ligande jedna od funkcija mu je i zaštita od ROS i RNS. Albumin štiti od lipidne peroksidacije vezanjem reaktivnih spojeva nastalih u reakcijama ksantin oksidaze, enzima koji katalizira pretvorbu ksantina u mokraćnu kiselinu, završni produkt razgradnje purinskih nukleotida.

Albumin može vezati prijelazne metale kao što su bakar i željezo, koji mogu imati prooksidativna svojstva, jer reakcijom u prisutnosti vodikovog peroksida kataliziraju nastanak hidroksil radikala. Vezanjem na albumin, njihova reaktivnost je manja i ograničena je mogućnost sudjelovanja u reakcijama koje vode do nastanka štetnih spojeva (Stohs i Bagchi 1995).

U fiziološkim uvjetima oko dvije trećine molekula HSA ima slobodne tiolne skupine (merkoptoalbumin, HSA-SH) na Cys34. Oksidacijom nastaje sulfenska kiselina iz koje mogu nastati sulfinska i sulfonska kiselina ili reakcijom sa slobodnom tiolnom skupinom nastaju disulfidi i ponovno reducirana forma HSA-SH (Slika 4). Stoga albumin ima važnu zaštitnu ulogu u oksidativnom stresu kada je poremećena ravnoteža između stvaranja slobodnih radikala i sposobnosti obrambenih mehanizama da te radikale uklone.



Slika 4. Uloga albumina u oksidativnom stresu i vezanju dušičnog oksida (NO).

Vezanje dušičnog oksida na –SH grupu albumina (plavo). Spojevi koji nastaju u oksidativnom stresu i interakcija s albuminom (crveno). (Preuzeto i prilagođeno iz Quinlan i sur. 2005)

Albumin veže i peroksinitrit, produkt reakcije dušikovog oksida i superoksidnog radikala (Carballal i sur. 2003). Peroksinitrit je odgovoran za nitrozilaciju tirozina, oksidaciju lipida, proteina i DNA. HSA se smatra glavnom ekstracelularnom molekulom odgovornom za redoks stanje plazme (Quinlan i sur. 2005).

Osim procesa oksidacije i nitrozilacije, može doći i do drugih kemijskih modifikacija albumina kao što je glikozilacija što utječe na samu strukturu albumina i njegova antioksidacijska svojstva. Otkriveno je 29 različitih mjesta na albuminu koja mogu biti glikozilirana (Neuzil i Stocker 1994) od kojih su najvažnije aminokiseline lizin, arginin i cistein. Dolazi do konformacijskih promjena HSA i smanjuje se afinitet vezanja prema drugim ligandima i uz smanjenu koncentraciju u plazmi, narušena je antioksidativna funkcija albumina.

1.3 Uremični spojevi

U bubrežnim bolestima nakupljaju se endogeni spojevi kao što su indol-3-octena kiselina (IAA), indoksil sulfat (IS), hipurna kiselina (HA) i 3-karboksi-4-metil-5-propil-2-furan propanoična kiselina (CMPF). To su uremični spojevi koji utječu na vezanje masnih kiselina, ali i lijekova na albumin jer se vežu na ista vezna mjesta.

IAA i IS nastaju razgradnjom aminokiseline triptofana, a hipurna kiselina nastaje razgradnjom aromatskih aminokiselina. Sakai i sur. (1995) su uspjeli karakterizirati vezna mjesta uremičnih spojeva u albuminu i istražiti kakva je međusobna interakcija tih spojeva u procesima vezanja na albumin. Uremični spojevi se ne mogu ukloniti iz organizma hemodijalizom u bubrežnim bolestima i njihova koncentracija u krvi je povišena neko vrijeme čak i nakon uspješne transplantacije bubrega. Budući da se vezanjem takvih spojeva na albumin, smanjuje vezanje lijekova, to može imati štetne učinke za organizam.

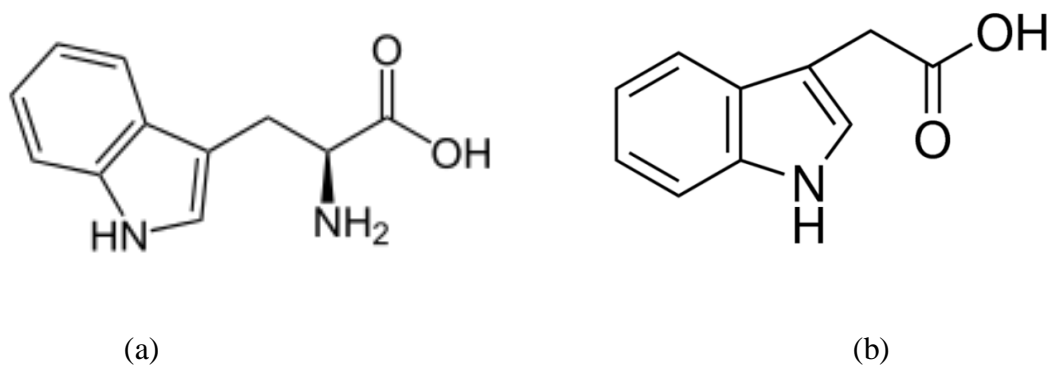
Njihovim istraživanjem je pokazano da se CMPF veže velikim afinitetom na mjesto I te na još dva vezna mjesta slabim afinitetom, dok se IAA, IS i HA primarno vežu na mjesto II u albuminu (pri pH 7.40 i temperaturi 25°C, IAA ima jedno vezno mjesto visokog afiniteta na albuminu koji nema vezanih masnih kiselina, s $K_a = 2.1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$). Mjesto II je zajedničko vezno mjesto u albuminu za endogene tvari poput masnih kiselina, L-triptofana i tiroksina. Mjesto I je zajedničko vezno mjesto za bilirubin i prostaglandin. S obzirom da i drugi

endogeni spojevi dijele ista vezna mjesta u albuminu kao i uremični spojevi, to može dovesti do povišene slobodne frakcije uremičnih spojeva u krvi što za posljedicu ima smanjeno vezanje lijekova.

Osim što su odredili koja su vezna mjesta za uremične spojeve u albuminu, Sakai i sur. (1995) su istražili i interakciju između uremičnih spojeva. Kompetitivno vezanje na albumin postoji za IAA i IS, a IS i CMPF ne utječu jedan na drugoga budući da se vežu na različita vezna mjesta u albuminu. Ako su prisutne visoke koncentracije HA, vezanje IAA i IS na albumin je smanjeno.

1.3.1 Indolni spojevi

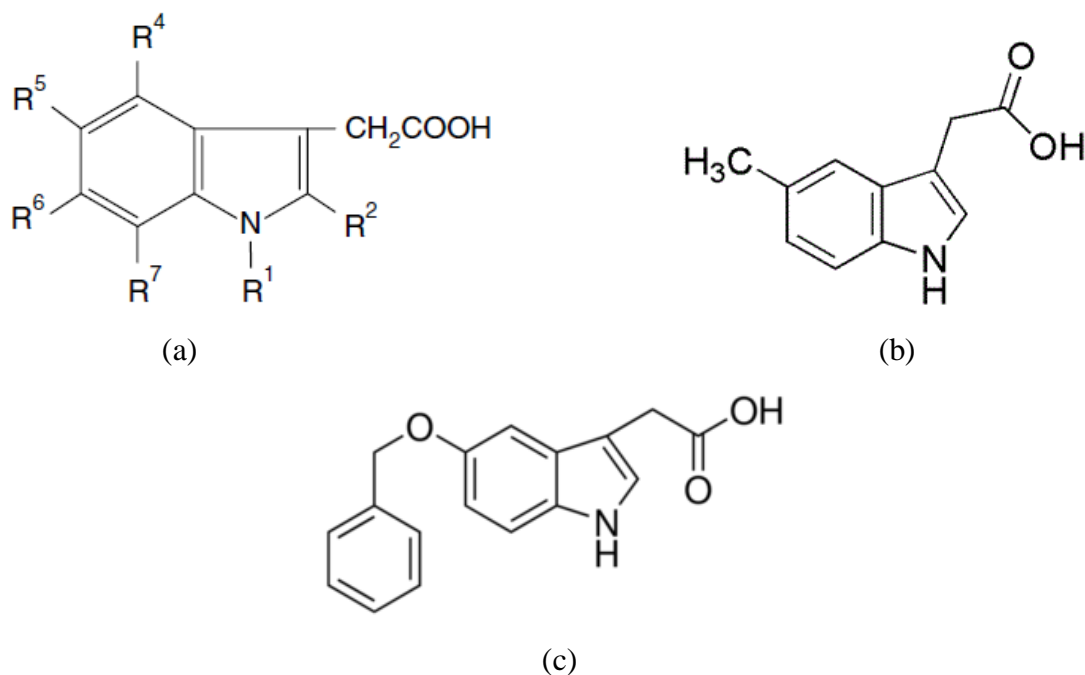
Indol-3-octena kiselina (IAA) je najvažniji prirodni auksin koji se sintetizira iz triptofana (Slika 5). Glavni je auksin kod viših biljaka i ima veliki utjecaj na rast i razvoj biljke (Zhao 2010), a građena je od indolnog prstena i karboskilne skupine koja je preko metilne skupine vezana na C-3 poziciju prstena.



Slika 5. Struktura (a) L-triptofana i (b) indol-3-octene kiseline. (Preuzeto i prilagođeno s <http://www.sigmaaldrich.com>)

Proizveden je čitav niz sintetičkih derivata IAA za koje je otkriveno da su potencijalni kandidati za terapije u liječenju karcinoma (Folkes i Wardman 2003). U ovom radu su osim

vezanja IAA i triptofana na albumin istraživani i 5-metilindol-3-octena kiselina (5-metil-IAA) i 5-benziloksiindol-3-octena kiselina (5-benziloksi-IAA) čije su strukture prikazane na slici 6.



Slika 6. Indolni spojevi. Struktura derivata IAA; (a) opća struktura derivata IAA, (b) 5-metil-IAA, (c) 5-benziloksi-IAA.

(Preuzeto i prilagođeno iz (a) Šoškić i Magnus 2007

(b) <http://www.chemimpex.com> i (c) <http://www.sigmaaldrich.com>)

Kod zdravih osoba IAA nema značajnu ulogu u organizmu, ali u već navednim patološkim stanjima zbog povišene koncentracije u krvi, utječe na biološku funkciju drugih molekula.

Osim što kompetira za vezna mjesta masnih kiselina i nekih lijekova u albuminu, vezanjem IAA smanjuje se i vezanje triptofana pa se koncentracija uremičnih spojeva u krvi povećava, a sve to ima toksične posljedice i može pridonijeti progresiji bolesti.

Bertuzzi i sur. (1997) su istražili vezanje IAA i triptofana na albumin bez masnih kiselina (engl. *defatted albumin*) i međudjelovanje ta dva spoja. Otkrili su dva specifična vezna mjesta na albuminu za molekulu IAA s time da mjesto 1 ima veću konstantu vezanja od ostalih. Utvrdili su da postoji i mnogo nespecifičnih veznih mjesta. Dominantno vezno mjesto za IAA je također i vezno mjesto triptofana. IAA inhibira vezanje triptofana na albumin čak i kada se ne veže na specifično zajedničko mjesto.

Iako postoji mnogo nespecifičnih veznih mjesta za IAA na albuminu, smatra se da je IAA u fiziološkim uvjetima pa čak i kod uremičnih stanja gdje je koncentracija u plazmi 10–12 puta povišena, većinom vezana na mjesto visokog afiniteta.

1.4 CILJ ISTRAŽIVANJA

Vezanje različitih endogenih i egzogenih tvari na albumin u ljudskom serumu je vrlo zanimljivo područje istraživanja.

Pri različitim bolestima, prvenstveno bubrega i jetre, nakupljaju se u krvi toksični spojevi kao što je i indol-3-octena kiselina. Takvi spojevi remete biološku funkciju albumina, utječu na vezanje drugih endogenih i egzogenih tvari na albumin što može imati negativne učinke za organizam i pridonijeti progresiji bolesti. Budući da je prepoznata uloga IAA u patološkim stanjima, proizveden je čitav niz različitih derivata indol-3-octene kiseline, a za neke je ustanovljeno da bi se mogli koristiti i u terapijske svrhe. Derivati IAA su spojevi sa supstituiranim grupama (npr. F, Cl, Br, I, alkili) na indolnom prstenu. Kako bi se što bolje razumjela uloga prirodnih i sintetičkih spojeva, potrebno je znati u kojim koncentracijama djeluju u organizmu, kakva im je interakcija sa ostalim molekulama i na koji način su molekularna struktura i biološka aktivnost povezane (Carić i sur. 2004).

U ovom diplomskom radu istraživat će se vezanje nekih indolnih spojeva na HSA s i bez vezanih masnih kiselina i usporediti s vezanjem komercijalno dostupne IAA koristeći metodu ravnotežne dijalize i fluorescentne spektroskopije. Posebna pozornost posvetit će se usporedbi vezanja liganda na HSA s obzirom na prisustvo masnih kiselina u njegovoj strukturi. Derivati indolnih spojeva originalno su sintetizirani sa svrhom proučavanja utjecaja supstituiranih grupa na svojstva/vezanje IAA u fiziološkim uvjetima. U eksperimentima će se koristiti sljedeći spojevi: IAA, L-triptofan, 5-metil-IAA i 5-benziloksi-IAA. Rezultati će se obraditi prema Scatchardovom prikazu.

Nove spoznaje u smislu interakcije indolnih spojeva i HSA s obzirom na kompetitivnost vezanja nativnih liganada poput masnih kiselina, pridonose razumijevanju specifičnih veznih mjesta takvih molekula, a što je cilj ovog istraživanja.

2 MATERIJALI I METODE

2.1 MATERIJALI

2.1.1 Kemikalije

Tablica 1. Popis kemikalija korištenih u eksperimentu.

Na ₂ HPO ₄	Kemika
NaH ₂ PO ₄ × H ₂ O	Kemika
Indol-3-octena kiselina	Sigma Aldrich
HSA s vezanim masnim kiselinama	Sigma Aldrich
HSA bez masnih kiselina	Sigma Aldrich
96%-tni etanol	Kemika
triptofan	Aldrich
5-benziloksi-indol-3-octena kiselina	Fluka
5-metil-indol-3-octena kiselina	Sintetiziran u laboratoriju Instituta Ruđer Bošković

2.1.1.1 Priprema polaznih otopina

U eksperimentu sam koristila ove koncentrirane (polazne otopine):

- 0.2 M Na₂HPO₄ – 14.195 g Na₂HPO₄ otopila sam u mili-Q vodi za pripremu 500 ml otopine
- 0.2 M NaH₂PO₄ × H₂O – 6.9 g je otopljeno u mili-Q vodi za pripremu 250 ml otopine
- 2.85 mM IAA – 2.5 mg IAA otopila sam u 5 ml etanola
- 0.5 mM HSA s i bez masnih kiselina – 0.2 g HSA otopila sam u 6 ml fosfatnog pufera
- 2.5 mM 5-metil-indol-3-octena kiselina – 2.4 mg otopila sam u 5 ml etanola
- 2.5 mM 5-benziloksi-indol-3-octena kiselina – 3.5 mg sam otopila u 5 ml etanola
- 2.5 mM triptofan – 5.1 mg otopila sam u 10 ml etanola

Priprema fosfatnog pufera (engl. *phosphate-buffered saline*, PBS):

- Za pripremu 0.1 M PBS pH 7.40, 200 ml, pomiješala sam 81 ml 0.2 M otopine Na₂HPO₄, 19 ml 0.2 M otopine NaH₂PO₄ × H₂O i 80 ml Mili-Q vode.
- Otopinu sam titrirala s 1 M NaOH do pH 7.40 i dodala vode do ukupnog volumena od 200 ml.

Iz gore navedenih polaznih otopina, razrjeđivanjem u PBS-u sam pripremila otopine određenih koncentracija za potrebe eksperimenta vezanja indolnih spojeva na HSA prema formuli $c_1V_1 = c_2V_2$.

Pri tome je koncentracija HSA bila konstantna i kada su na HSA vezane masne kiseline i kada nema vezanih masnih kiselina (u konačnim reakcijskim smjesama je bila 5×10^{-5} M).

2.1.2 Uređaji i pribor

UV/VIS spektrofotometar (Cary 50 tvrtke Varian)

Spektrofluorimetar (Cary Eclipse tvrtke Varian)

Centrifuga Allegra X – 22R (Beckman Coulter), rotor F0850 radijusa 9.40 cm

pH metar (Mettler Toledo)

Kvarcne kivete za mjerenje apsorbancije otopine, optički put = 1 cm

Kivete za mjerenje intenziteta fluorescencije

Centrikoni (Millipore) - posebne epruvete koje imaju membranom odvojeni dio za uzorak od dijela za filtrat, veličina pora 3000 NMWL (engl. *nominal molecular weight limit*)

2.1.3 Priprema otopina za snimanje apsorpcijskih spektra HSA i indolnih spojeva

Uzorke sam pripremila iz polaznih otopina razrjeđivanjem u PBS-u jer koncentracije za mjerenje apsorbancije trebaju biti za indolne spojeve 10^{-5} M, a za HSA 10^{-6} M tj. koncentracije otopina trebaju biti dovoljno niske kako bi vrijedio Beer-Lambertov zakon.

2.1.4 Priprema otopine za određivanje ovisnosti apsorbancije o koncentraciji otopine IAA

Otopila sam 4 mg IAA u 5 ml etanola za otopinu koncentracije 4.56×10^{-3} M. Polaznu otopinu razrijedila sam fosfatnim puferom (Tablica 2). Pripremila sam otopinu IAA za provjeru ovisnosti apsorbancije o koncentraciji iz čega se određuje ekstincijski koeficijent ovog spoja.

Tablica 2. Razrjeđenja polazne otopine indol-3-octene kiseline (IAA) fosfatnim puferom pH 7.40 i konačne koncentracije otopina za pokus ovisnosti apsorbancije o koncentraciji otopine IAA.

razrjeđenje	c (IAA), M
15×	3.04×10^{-4}
20×	2.28×10^{-4}
40×	1.14×10^{-4}
60×	7.60×10^{-5}
80×	5.70×10^{-5}
100×	4.56×10^{-5}

2.1.5 Priprema reakcijskih smjesa u eksperimentima vezanja indola na HSA

Za svaki omjer vezanja HSA i određenog indolnog spoja (Tablica 3), u epruvetu sam stavila 1 ml HSA + 1 ml indolnog spoja i ostavila reakcijsku smjesu 15 minuta na sobnoj temperaturi. Pretpostavka je da se u tom vremenskom periodu postiže ravnoteža vezanja liganda na HSA. Nakon 15 minuta sam prebacila uzorke u centrikone i podvrgnula ih ultrafiltraciji. Uzorci su centrifugirani 30 minuta pri 946 x g. Konačne koncentracije indolnih spojeva u reakcijskim smjesama navedene su u tablici 3.

Tablica 3. Konačne koncentracije indolnih spojeva u reakcijskim smjesama uz koncentraciju albumina (HSA) = 5×10^{-5} M.

HSA : Indolni spojevi	c (indolnih spojeva), M
1:1	5.00×10^{-5}
1.5:1	3.33×10^{-5}
2:1	2.50×10^{-5}
3:1	1.66×10^{-5}
4:1	1.25×10^{-5}
5:1	1.00×10^{-5}
6:1	8.33×10^{-6}
8:1	6.25×10^{-6}
10:1	5.00×10^{-6}

2.1.6 Određivanje koncentracije nevezanog liganda

Nakon centrifugiranja uzoraka, u ultrafiltratu je nevezani ligand budući da su pore membrane centrikona takve veličine da HSA ne može proći. Volumen nevezanog liganda procijenila sam automatskom pipetom, razrijedila fosfatnim puferom i mjerila intenzitet fluorescencije.

2.2 METODE

2.2.1 UV/VIS spektrofotometrija

UV/VIS spektrofotometrija je osjetljiva metoda i služi za određivanje koncentracije otopina, analizu kemijskih reakcija, ispitivanje strukture molekula, identifikaciju nepoznatih tvari i primjenjiva je za velik broj organskih i anorganskih spojeva. Koristi se u kemiji, biokemiji, farmaciji za analizu različitih spojeva.

Zasniva se na Beer Lambertovom zakonu:

$$A = \log I_0/I_p = \epsilon c l \quad (2.1)$$

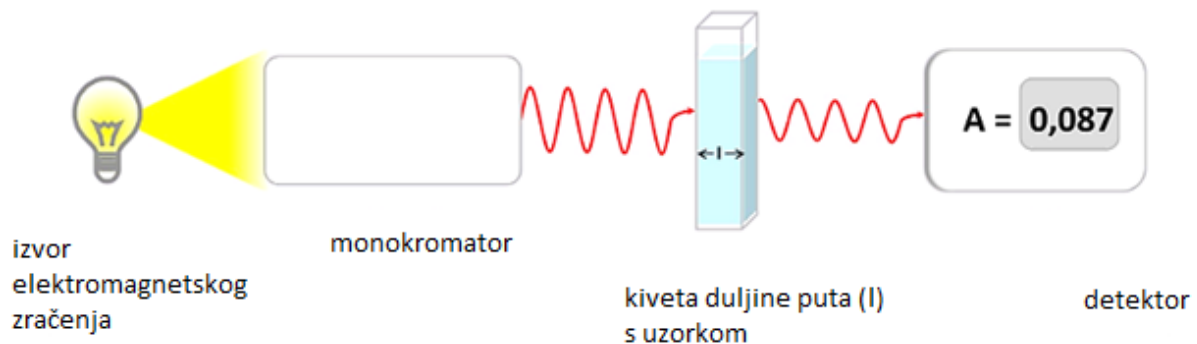
ϵ je ekstincijski koeficijent koji je karakterističan za svaku tvar ($M^{-1}cm^{-1}$),

c = koncentracija otopine (M), a l = duljina optičkog puta kroz kivetu u cm.

Apsorbancija se definira kao logaritam omjera intenziteta upadnog zračenja na uzorak (I_0) i propuštenog zračenja kroz uzorak (I_p) (Valeur 2001). Prema Beer-Lambertovom zakonu, apsorbancija je jednaka umnošku ekstincijskog koeficijenta neke tvari, koncentracije otopine i duljine optičkog puta. Količina elektromagnetskog zračenja kojeg molekule apsorbiraju ovisna je o duljini optičkog puta i koncentraciji otopine.

Apsorbancija se mjeri pomoću spektrofotometra. Svaki spektrofotometar ima izvor elektromagnetskog zračenja, monokromator koji propušta zračenje određene valne duljine, držač uzorka i detektor (Slika 7). Uzorci se mjere u kivetama koje za UV područje moraju biti kvarcne. Kao izvor zračenja koriste se halogena ili volframova žarulja, deuterijska lampa ili ksenonska lampa (ima jaki intenzitet u vidljivom i UV području). Monokromatori mogu biti

staklena ili kvarcna prizma i optička mrežica, a detektori su fotomultiplikator, fotodioda ili fotodiodni niz.



Slika 7. Princip rada spektrofotometra. Spektrofotometar se sastoji od izvora zračenja, monokromatora, prostora za uzorak i detektora. (Preuzeto i prilagođeno s https://bib.irb.hr/datoteka/641532.Praktikum_iz_biokemije_2013.pdf).

UV/VIS je metoda kojom se mjeri apsorbancija uzorka. Ako se otopina izloži elektromagnetskom zračenju određene valne duljine, dio tog zračenja je apsorbiran elektronima (to su većinom elektroni dvostrukih veza i nespareni elektronski parovi) u molekuli koji prelaze iz osnovnog u pobuđeno stanje, a neapsorbirani dio prolazi kroz uzorak i detektira se.

Ako nam je poznat ekstincijski koeficijent, možemo na osnovi izmjerene apsorbancije odrediti nepoznatu koncentraciju otopine, ili ako znamo koncentraciju otopine, možemo odrediti ekstincijski koeficijent neke tvari. Tako na primjer ako grafički prikažemo ovisnost apsorbancije o koncentraciji i dobijemo pravac, ekstincijski koeficijent možemo odrediti iz nagiba pravca.

Grafički prikaz ovisnosti apsorbancije i valne duljine je apsorpcijski spektar neke tvari. Različite molekule imaju karakteristične apsorpcijske spektre pa se to može koristiti za identifikaciju nepoznatih tvari i određivanje strukture. Položaj apsorpcijskog maksimuma karakterističan je za molekulu. Apsorpcijske osobine samih molekula ovise o podjedinicama od kojih su građene, ali na valnu duljinu samog apsorpcijskog maksimuma djeluje i njihov prostorni raspored.

Karakteristična apsorbancija otopine proteina mjeri se na 280 nm i ovisi o apsorbanciji bočnih lanaca aromatskih aminokiselina (triptofan, tirozin, fenilalanin) koje općenito apsorbiraju zračenje u području 240 - 300 nm, dok iznad 310 nm ne apsorbiraju zračenje. Proteini koji u

svojoj strukturi nemaju triptofan ne apsorbiraju iznad 300 nm. Apsorpcijski spektar aromatskih aminokiselina je osjetljiv na promjene u njihovoj okolini. Apsorbancija proteina ovisi i o peptidnim i disulfidnim vezama. Peptidne veze apsorbiraju u području od 180 - 230 nm, dok su disulfidne veze odgovorne za apsorpciju zračenja pri 260 nm.

Ekstincijski koeficijent proteina na 280 nm može se predvidjeti ako znamo broj aromatskih aminokiselina u proteinu i njihove ekstincijske koeficijente (Pace i sur. 1995) prema formuli:

$$\epsilon \text{ proteina } (\lambda = 280 \text{ nm}) = (\#\text{Trp})(5500) + (\#\text{Tyr})(1490) + (\#\text{Cys})(125) \quad (2.2)$$

= broj aminokiselina

brojevi u zagradama predstavljaju ekstincijski koeficijent dotične aminokiseline

Za indolne spojeve ekstincijski koeficijent se može odrediti ako nam je poznata koncentracija spoja iz izmjerene apsorbancije.

Pri mjerenju apsorbancije može se pojaviti nelinearnost ovisnosti apsorbancije i koncentracije otopine. Problemi nastaju ako dolazi do kemijskih izmjena kao što su hidratacija, disocijacija molekula, agregacije molekula, reakcije uzorka s otapalom, ako uzorci imaju kisele ili bazne grupe pa se pH ne prilagodi, pri stvaranju suspenzija, ali i raspršeno zračenje iz unutrašnjih dijelova instrumenta može dovesti do pogrešaka u mjerenoj apsorbanciji. Bitno je i kakvo se otapalo koristi, valna duljina pri kojoj se mjerenje izvodi, prisutnost nečistoća u uzorku, temperatura mjerenja.

Postupak mjerenja apsorbancije:

- instrument se prije mjerenja mora zagrijati (oko 15 minuta)
- odabrala sam valnu duljinu od 280 nm za mjerenje apsorbancije HSA i indolnih spojeva budući da proteini dominantno apsorbiraju na 280 nm, a prema literaturi indolni spojevi također apsorbiraju na 280 nm
- snimila sam spektar samog pufera; utjecaj njegove apsorbancije se eliminira računalno odbijanjem njegovog spektra od spektra uzorka
- uzorke sam pripremila iz polaznih otopina razrjeđivanjem
- apsorpcijske spektre HSA i indolnih spojeva snimala sam u području od 200-500 nm

2.2.2 Ravnotežna dijaliza

Ravnotežna dijaliza se koristi u istraživanju interakcije liganda i proteina. To je metoda kojom se može odrediti koncentracija vezanog liganda na proteinu, a time i stehiometrija protein-ligand kompleksa tj. broj veznih mjesta (n) i K_d . Nakon pripreme uzoraka, tj. postizanja pretpostavljene ravnoteže (ne)vezanog liganda, otopina je podvrgnuta ultrafiltraciji. Koncentracija nevezanog liganda u ultrafiltratu određena je fluorescencijskom spektroskopijom.

2.2.3 Fluorescencijska spektroskopija

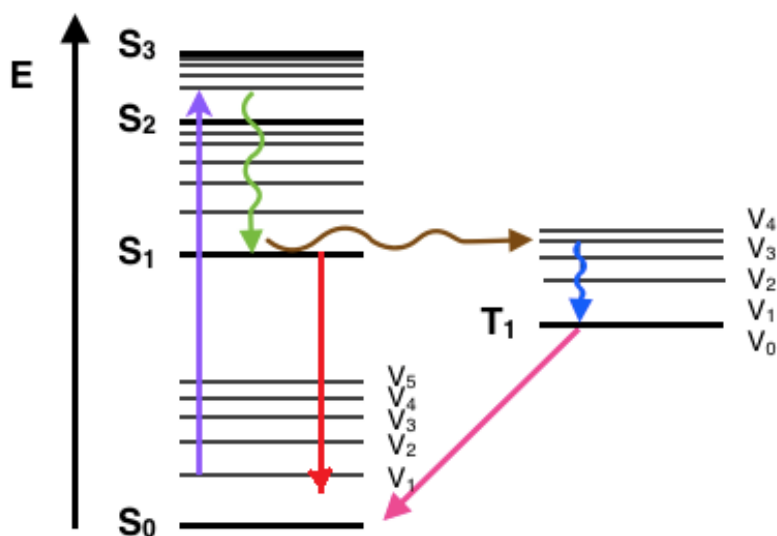
Fluorescencija je svojstvo nekih atoma i molekula da apsorbiraju zračenje određene valne duljine kojem su izloženi i prelaze u pobuđene energetske razine, a prilikom vraćanja u osnovno stanje emitiraju zračenje u vidljivom dijelu elektromagnetskog spektra. To je zračenje veće valne duljine od pobudnog tj. energija emitiranog zračenja manja je od apsorbirane energije što se naziva Stokesovim pomakom.

Energija molekule je zbroj elektronske, vibracijske, rotacijske, translacijske i spinske energije ako molekula ima kvantni broj spina (Van Holde i sur. 2006). Energijske razine uključene u apsorpciju i emisiju zračenja uzorka mogu se objasniti Jablonski dijagramom (Slika 8).

Jablonski dijagram prikazuje osnovno singletno elektronsko stanje molekule (S_0) i pobuđena singletna stanja (S_1, S_2, S_3), a horizontalne linije označavaju vibracijska elektronska stanja. Za većinu molekula S_0 je elektronski singlet sa spinski sparenim elektronima. Apsorpcijom zračenja elektroni prelaze iz osnovnog u pobuđeno stanje, a direktnom relaksacijom u osnovno stanje dolazi do emisije vidljive svjetlosti. Stokesov pomak se događa jer se dio pobudne energije troši na razne druge neradijativne prijelaze kao što su unutrašnja pretvorba i vibracijska relaksacija u kojoj elektroni prelaze iz viših u niže vibracijske razine istog elektronskog stanja ili procesi uzrokuju prijelaz u osnovno stanje.

Moguć je i prijelaz iz pobuđenog singletnog stanja u odgovarajuće pobuđeno tripletno stanje, što je u osnovi zabranjen prijelaz te se govori o zakašnjeloj fluorescenciji odnosno fosforescenciji.

Povratak iz tripletnog u osnovno energetske stanje može biti i bez radijativnog prijelaza (Gauglitz i Vo-Dinh 2003).

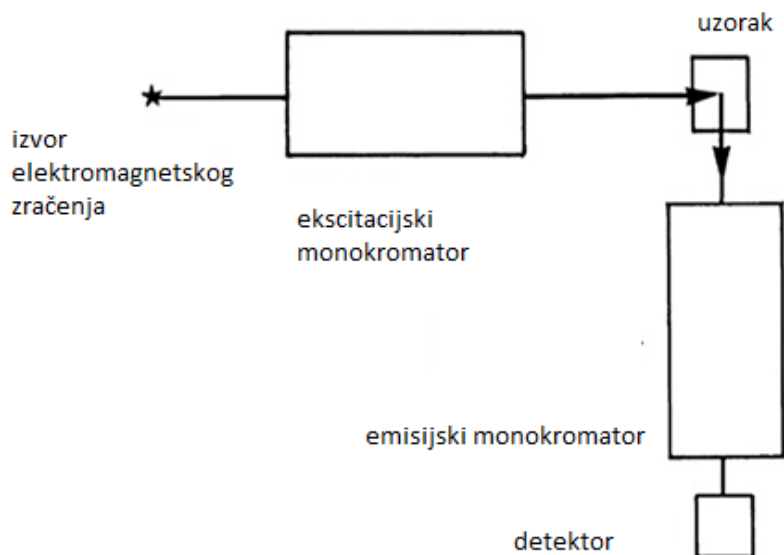


Slika 8. Jablonski dijagram. Opisuje procese koji se mogu dogoditi u molekuli nakon apsorpcije elektromagnetskog zračenja. Apsorpcija elektromagnetskog zračenja (ljubičasta strelica), unutrašnja pretvorba (zeleno strelica), prijelaz iz pobuđenog singletnog stanja u tripletno stanje (smeđa strelica), vibracijske relaksacije (plava strelica), fluorescencija (crvena strelica), fosforescencija (roza strelica). (Preuzeto i prilagođeno s <https://www.uni-leipzig.de/~pwm/web/?section=introduction&page=fluorescence>)

Indolni spojevi i aromatske aminokiseline u proteinima općenito fluoresciraju. Osim strukture same molekule, na fluorescenciju mogu utjecati i različiti faktori. U otopini visoke koncentracije, emitirano zračenje može biti ponovno apsorbirano drugim nepobuđenim molekulama. Fluorescencija je intenzivnija na nižim temperaturama jer povišenje temperature povećava vibracijske relaksacije, veća je vjerojatnost sudara molekula iz otapala s molekulama otopine pa se gubi energija neradijativnim putem. Isto tako fluorescencija je veća u uzorcima u kojima se koriste viskozija otapala, a važan je i pH otopine.

Kvantnim prinosom (Q) opisuje se efikasnost fluorescencije i karakterističan je za svaki spoj koji fluorescira, a definira se kao omjer broja emitiranih i apsorbiranih fotona. Vrijednost kvantnog prinosa je između 0 i 1 i ovisi o različitim eksperimentalnim uvjetima poput temperature, koncentracije uzorka, prisutnosti kisika i sl.

Fluorescencija se mjeri spektrofluorimetrom. Uređaj ima izvor zračenja, prostor za uzorak, ekscitacijski i emisijski monokromator i detektor, a radno područje je od 200 – 1200 nm (Slika 9). Kivete koje se koriste imaju četiri prozirne strane jer se intenzitet emitirane svjetlosti mjeri pod kutom od 90° u odnosu na pobudnu zraku.



Slika 9. Princip rada spektrofluorimetra.

(Preuzeto i prilagođeno s <http://www.slideshare.net>)

Za mjerenje intenziteta fluorescencije, pripremila sam otopine indolnih spojeva i za svaki pokus prilagodila uvjete snimanja fluorescencijskog spektra. Koncentracije za detekciju fluorescencije indolnih spojeva moraju biti reda veličine 10^{-6} M. Nakon ultrafiltracije uzoraka, mjerila sam intenzitet fluorescencije nevezanog liganda i odredila njegovu točnu koncentraciju. Iz tog podatka se prema izrazu 1.5 računa koncentracija vezanog liganda i u obzir sam uzela faktore razrjeđenja jer sam ultrafiltrat morala razrijediti kako bih mogla mjeriti intenzitet fluorescencije. Ovisnost intenziteta fluorescencije i koncentracije otopine je linearna za niske koncentracije promatranog spoja; koncentraciju nevezanog liganda odredila sam prema intenzitetu fluorescencije otopine poznate koncentracije (5×10^{-6} M za IAA, 2.5×10^{-6} M za druge spojeve).

2.2.4 Analiza rezultata Scatchardovim prikazom

Nakon što sam izmjerila intenzitet fluorescencije nevezanog liganda za svaki uzorak i odredila koncentraciju, izračunala sam prema balansu mase kolika je koncentracija vezanog liganda. Iz jednadžbe 1.5 slijedi:

$$[PL] = [L_0] - [Ln] \quad (2.3)$$

Za analizu rezultata koristila sam Scatchardov prikaz. To je metoda kojom se iz grafičkog prikaza odnosa vezanog i nevezanog liganda mogu odrediti parametri bitni za vezanje liganda na protein, a to su K_d i n . U ovom pristupu je pretpostavka da postoje identična i neovisna vezna mjesta na albuminu za indolne spojeve korištene u ovom diplomskom radu.

Grafičkim prikazom omjera koncentracije vezanog i nevezanog liganda prema koncentraciji vezanog liganda dobije se pravac iz čijeg nagiba odredimo K_d (Attie i Raines 1995), a n se može odrediti iz odsječka na ordinati.

3 REZULTATI

U ovom diplomskom radu proučavala sam vezanje L-triptofana (Trp), indol-3-octene kiseline (IAA), 5-metil-indol-3-octene kiseline (5-metil-IAA) i 5-benziloksi-indol-3-octene kiseline (5-benziloksi-IAA) na albumin (HSA) s i bez vezanih masnih kiselina. UV/VIS spektrofotometrijom snimila sam apsorpcijske spektre albumina i indolnih spojeva pri pH 7.40.

Mjerenjem apsorbancije otopina indolnih spojeva i albumina odredila sam točne koncentracije ovih spojeva koje su bile potrebne za različite omjere albumina i indolnih spojeva u eksperimentima vezanja liganda i proteina.

Mjerenjem apsorbancije otopine indol-3-octene kiseline različitih koncentracija istražila sam ovisnost apsorbancije o koncentraciji otopine. Mjerenjem intenziteta fluorescencije otopine indol-3-octene kiseline različitih koncentracija istražila sam ovisnost intenziteta fluorescencije o koncentraciji otopine.

Vezanje indolnih spojeva na albumin proučavala sam koristeći metodu ravnotežne dijalize i fluorescencijske spektroskopije. Nakon ultracentrifugiranja reakcijskih smjesa indolnih spojeva i albumina, u ultrafiltratu je prisutan nevezani ligand. Uspoređivanjem intenziteta fluorescencije određenog indolnog spoja prije vezanja na albumin i nakon reakcije vezanja na albumin, odredila sam koncentraciju nevezanog liganda. Prema formuli 2.3 izračunala sam koncentraciju vezanog liganda na albumin te sam podatke analizirala Scatchardovim prikazom i odredila konstantu disocijacije (K_d) i broj veznih mjesta na albuminu (n) za određeni indolni spoj.

Svi rezultati su obrađeni u programu Sigma plot.

3.1 Apsorpcijski spektri HSA i indolnih spojeva

Apsorpcijski spektri HSA i indolnih spojeva pri pH 7.40 snimljeni su u području valnih duljina od 200 – 500 nm (Slike 10 – 14).

Podaci o apsorbanciji spojeva navedeni su u tablici 4.

Tablica 4. Apsorbancija (A) promatranih molekula pri valnoj duljini (λ) = 280 nm prema izrazu 2.1.

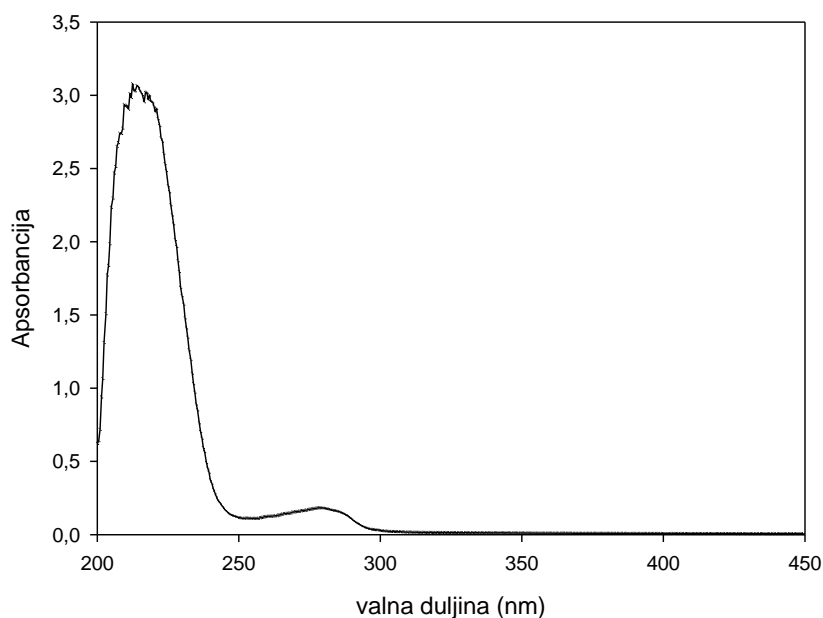
HSA (albumin), IAA (indol-3-octena kiselina), 5-metil-IAA (5-metil-indol-3-octena kiselina), 5-benziloksi-IAA (5-benziloksi-indol-3-octena kiselina), ϵ (ekstincijski koeficijent).

spojevi	c (spojeva), M	ϵ ($M^{-1}cm^{-1}$)	A
HSA ^a	5.04×10^{-6}	36500	0.184
IAA ^b	2.96×10^{-6}	5729	0.170
5-metil-IAA ^b	5.56×10^{-5}	4676	0.260
5-benziloksi-IAA ^b	4.80×10^{-5}	6165	0.296
Triptofan ^c	9.34×10^{-5}	5650	0.532

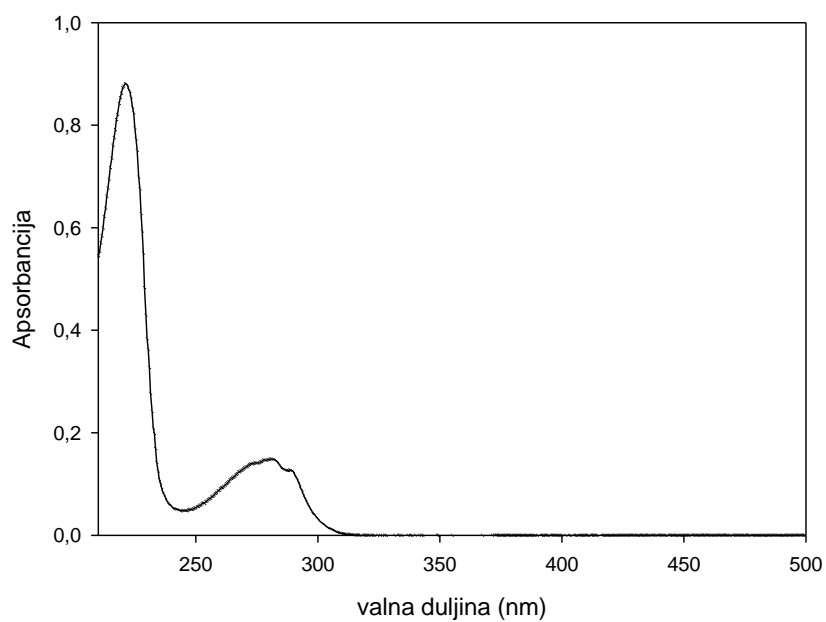
a (Khan i sur. 2007)

b (Carić i sur. 2004)

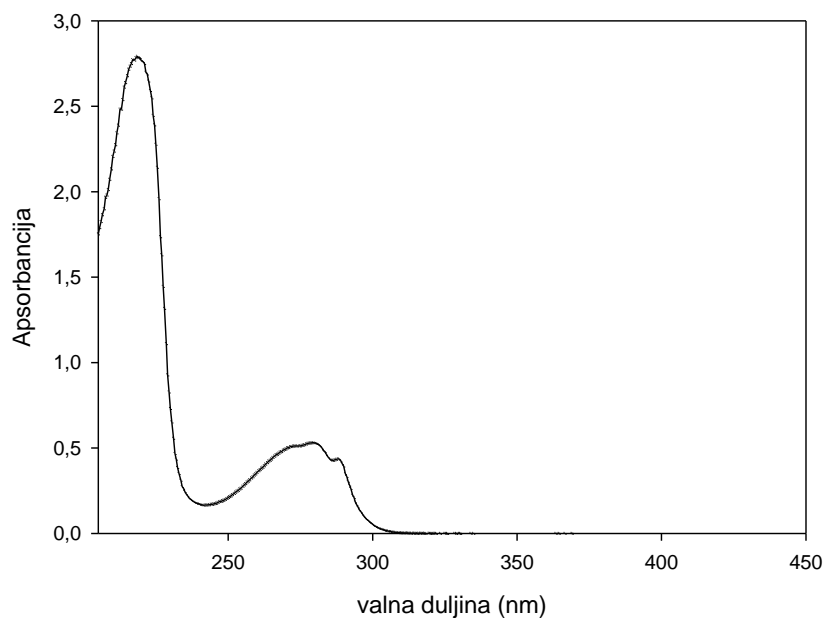
c (Herve i sur. 1982)



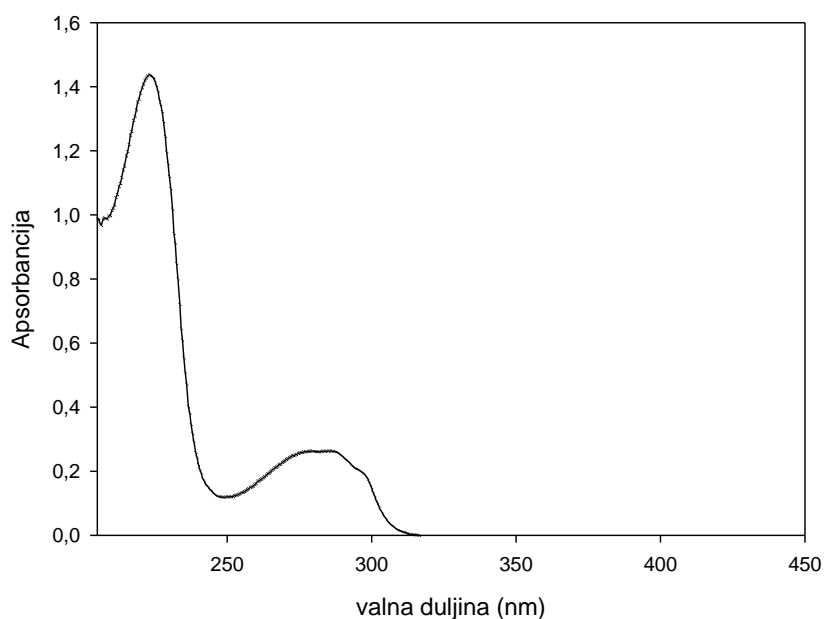
Slika 10. Apsorpcijski spektar albumina (HSA). Ovisnost apsorbancije o valnoj duljini zračenja. Apsorbancija otopine HSA ($c = 5.04 \times 10^{-6}$ M) je 0.184 na valnoj duljini 280 nm.



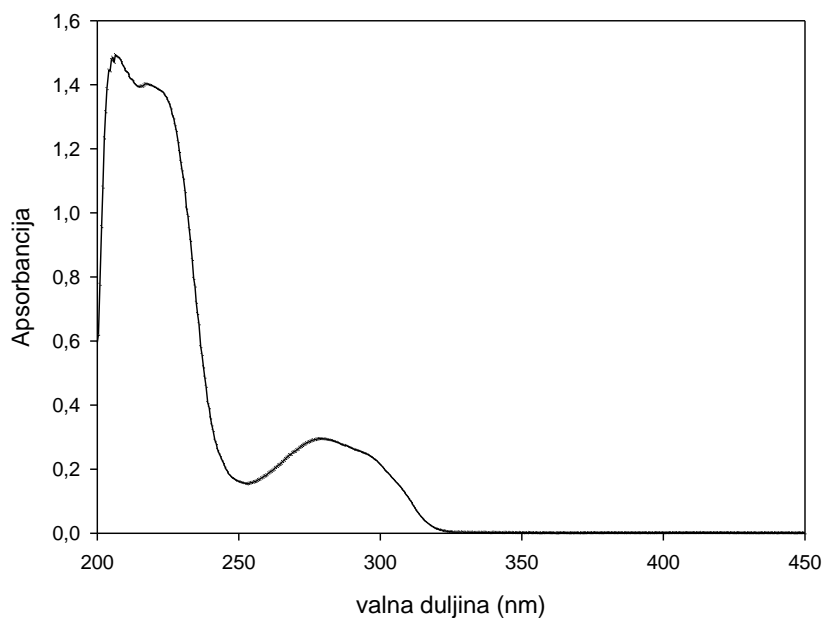
Slika 11. Apсорpcijski spektar indol-3-octene kiseline (IAA). Ovisnost apsorбancije o valnoj duljini. Apсорбancija otopine IAA ($c = 2.96 \times 10^{-6}$ M) je 0.170 na valnoj duljini 280 nm.



Slika 12. Apсорpcijski spektar triptofana. Ovisnost apsorбancije o valnoj duljini. Apсорбancija otopine triptofana ($c = 9.34 \times 10^{-5}$ M) je 0.532 na valnoj duljini 280 nm.



Slika 13. Apsorpcijski spektar 5-metil-indol-3-octene kiseline (5-metil-IAA). Ovisnost apsorbancije o valnoj duljini. Apsorbancija otopine 5-metil-IAA ($c = 5.56 \times 10^{-5}$ M) je 0.260 na valnoj duljini 280 nm.



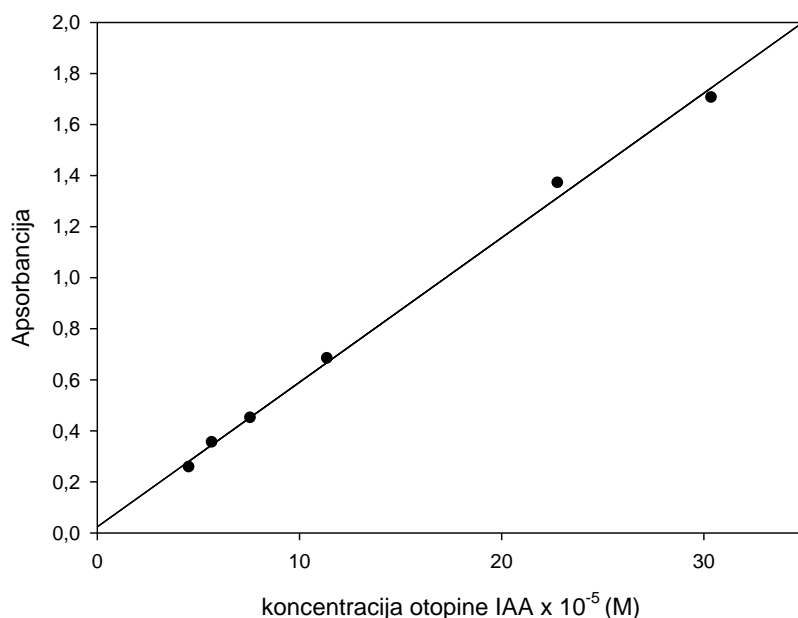
Slika 14. Apsorpcijski spektar 5-benziloksi-indol-3-octene kiseline (5-benziloksi-IAA). Ovisnost apsorbancije o valnoj duljini. Apsorbancija otopine 5-benziloksi-IAA ($c = 4.80 \times 10^{-5}$ M) je 0.296 na valnoj duljini 280 nm.

3.2 Ovisnost apsorbancije o koncentraciji otopine

Prema formuli 2.1, apsorbancija je proporcionalna koncentraciji otopine. Apsorbanciju otopine IAA različitih koncentracija mjerila sam na valnoj duljini od 280 nm (Tablica 5) Grafičkim prikazom sam potvrdila linearnu ovisnost apsorbancije i koncentracije otopine (Slika 15). Iz nagiba pravca odredila sam ekstincijski koeficijent (ϵ) za IAA u fosfatnom puferu i dobila sam vrijednost $\epsilon = 5702 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Tablica 5. Apsorbancija indol-3-octene kiseline (IAA) u fosfatnom puferu pH 7.40 na valnoj duljini 280 nm.

razrjeđenje	c (IAA), M	A na 280 nm
15×	3.04×10^{-4}	1.704
20×	2.28×10^{-4}	1.370
40×	1.14×10^{-4}	0.682
60×	7.60×10^{-5}	0.449
80×	5.70×10^{-5}	0.353
100×	4.56×10^{-5}	0.256



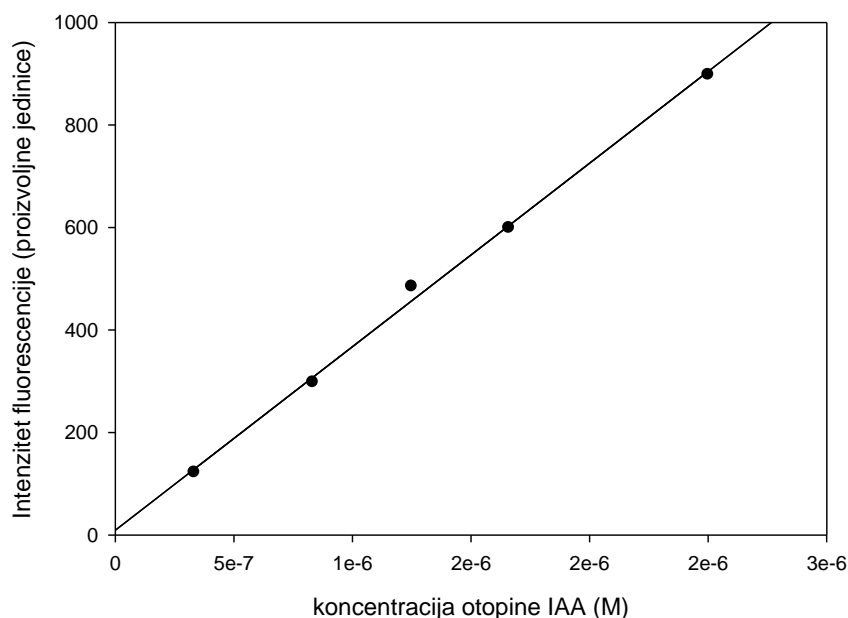
Slika 15. Ovisnost apsorbancije o koncentraciji otopine indol-3-octene kiseline (IAA). Na ordinati je izmjerena apsorbancija na valnoj duljini od 280 nm, a na apscisi su prikazane koncentracije otopine IAA u fosfatnom puferu pH 7.40.

3.3 Ovisnost intenziteta fluorescencije o koncentraciji otopine

Kako bih utvrdila da je intenzitet fluorescencije proporcionalan koncentraciji otopine i to kasnije mogla iskoristiti za određivanje koncentracije nevezanog liganda, snimila sam fluorescencijske spektre u području od 290 – 550 nm za različite koncentracije otopine IAA i očitala maksimalne intenzitete fluorescencije (Tablica 6). Grafičkim prikazom sam potvrdila linearnu ovisnost intenziteta fluorescencije i koncentracije otopine IAA (Slika 16).

Tablica 6. Intenzitet fluorescencije za različite koncentracije indol-3-octene kiseline (IAA). (ekscitacijska i emisijska pukotina = 5 nm, PMT (napon na fotomultiplikatoru) = 620 V, ekscitacijska valna duljina = 280 nm)

c (IAA), M	Intenzitet fluorescencije (proizvoljne jedinice)
3.33×10^{-7}	122
8.33×10^{-7}	298
1.25×10^{-6}	485
1.66×10^{-6}	599
2.50×10^{-6}	898



Slika 16. Ovisnost intenziteta fluorescencije o koncentraciji otopine indol-3-octene kiseline (IAA). Na ordinati je intenzitet fluorescencije, a apscisa prikazuje koncentracije otopine IAA. Vidi se linearna ovisnost intenziteta fluorescencije o koncentraciji otopine.

3.4 Vežanje indolnih spojeva na HSA s i bez masnih kiselina

Za svaki indolni spoj prilagodila sam uvjete snimanja fluorescencijskog spektra (Tablica 7). Uspoređujući intenzitete fluorescencije otopine poznate koncentracije određenog indolnog spoja (5×10^{-6} M za IAA, 2.5×10^{-6} M za ostale spojeve) koji su navedeni u tablici 8 i intenzitete fluorescencije nevezanog liganda, odredila sam koncentraciju nevezanog liganda i prema izrazu 2.3 izračunala koncentraciju vezanog liganda na HSA. Dobivene podatke o koncentracijama nevezanog i vezanog indolnog spoja na HSA analizirala sam Scatchardovim prikazom.

Tablica 7. Uvjeti snimanja fluorescencijskog spektra indolnih spojeva. Indol-3-octena kiselina (IAA), 5-metil-indol-3-octena kiselina (5-metil-IAA), 5-benziloksi-indol-3-octena kiselina (5-benziloksi-IAA), valna duljina (λ), napon na fotomultiplikatoru (PMT).

Parametar	IAA	Triptofan	5-metil-IAA	5-benziloksi-IAA
λ (ekscitacije) (nm)	280	280	280	280
Ekscitacijska pukotina (nm)	2.5	5	5	5
Emisijska pukotina (nm)	5	5	5	5
PMT (V)	680	690	670	800

Tablica 8. Maksimalni intenzitet fluorescencije. Navedeni su očitani intenziteti fluorescencije za indolne spojeve : indol-3-octena kiselina (IAA), 5-metil-indol-3-octena kiselina (5-metil-IAA), 5-benziloksi-indol-3-octena kiselina (5-benziloksi-IAA).

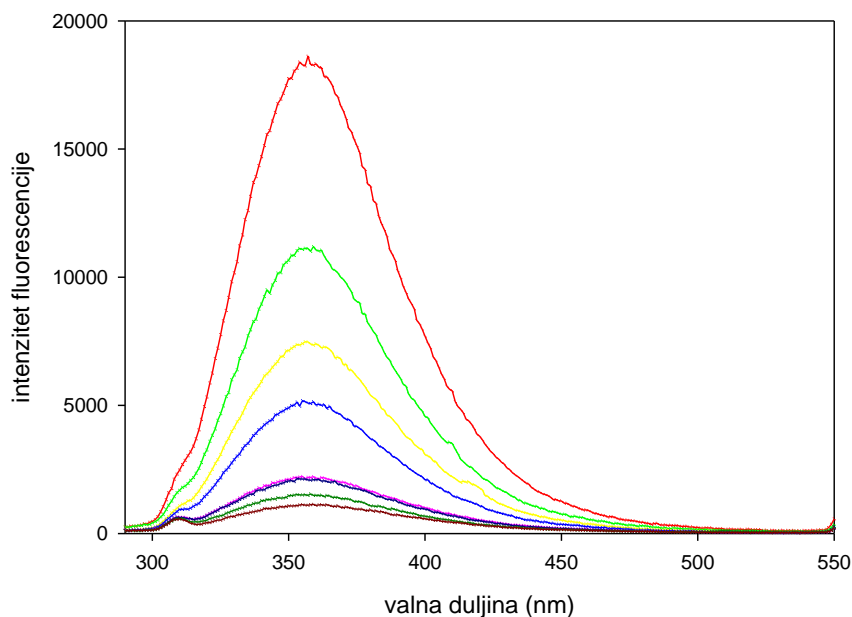
Ligand	Intenzitet fluorescencije (proizvoljne jedinice)
IAA	962.40
Triptofan	958.46
5-metil-IAA	982.45
5-benzoksil-IAA	880.43

3.4.1 Fluorescencijski spektar vezanja triptofana na HSA s vezanim masnim kiselinama

Grafički prikaz ovisnosti intenziteta fluorescencije i valne duljine zračenja je fluorescencijski spektar određenog spoja. Fluorescencijski spektar indolnih spojeva snimala sam prije i poslije reakcije vezanja na HSA. Vezanje triptofana na HSA sam odabrala kao standard za prikaz fluorescencijskog spektra vezanja liganda na protein. Fluorescencijski spektri vezanja ostalih indolnih spojeva su isti kao i fluorescencijski spektar vezanja triptofana na HSA.

Na slici 17. je prikazan fluorescencijski spektar nevezanog triptofana snimljen nakon reakcije vezanja na molekulu HSA.

Iz spektra se vidi da su intenziteti fluorescencije manji kada je veći omjer HSA : Trp, tj. kako se koncentracija HSA povećava u odnosu na koncentraciju triptofana, to je manje nevezanog liganda pa je stoga i intenzitet fluorescencije manji.



Slika 17. Fluorescencijski spektar nevezanog triptofana. Na ordinati je prikazan intenzitet fluorescencije, a na apscisi je valna duljina fluorescencijske emisije. Manji intenzitet fluorescencije znači da je i koncentracija nevezanog liganda manja, odnosno više je vezanog liganda na HSA.

Boje označavaju sljedeće omjere HSA: trp; crvena – standard za triptofan, zelena – 1:1, žuta – 1.5:1, plava – 2:1, roza – 4:1, tamno plava – 5:1, tamno zelena – 6:1, tamno crvena – 8:1.

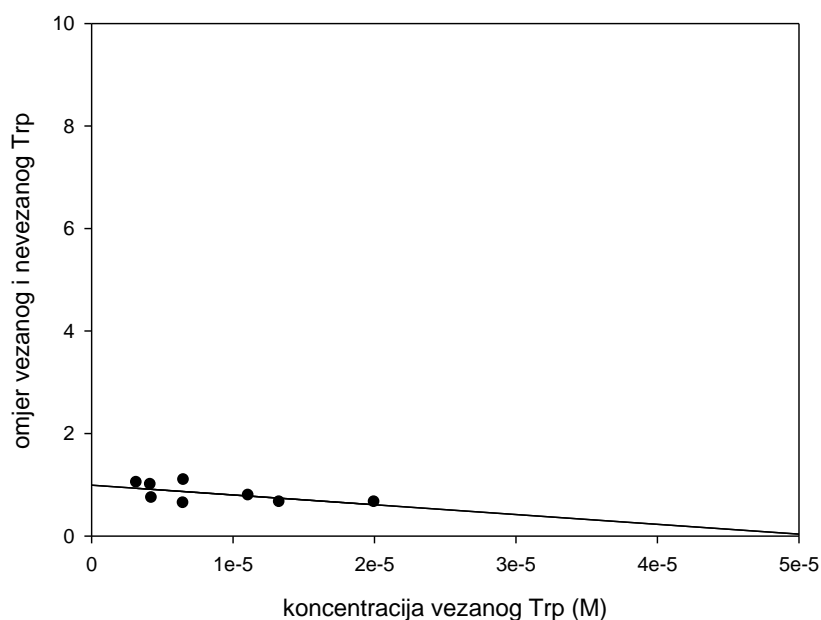
3.4.2 Vežanje triptofana na HSA s masnim kiselinama

U tablici 9. su navedeni podaci dobiveni vežanjem triptofana na HSA s vežanim masnim kiselinama. Scatchardovim prikazom (Slika 18) dobiveni su $K_d = (5 \pm 3) \times 10^{-5} \text{ M}$, $n = 1.1 \pm 0.6$. Triptofan se veže na jedno vežno mjesto na HSA s masnim kiselinama.

Tablica 9. Vežanje triptofana (Trp) na albumin (HSA) s masnim kiselinama.

c (HSA), M	c (ukupni Trp), M	c (nevezani Trp), M	c (vezani Trp), M*	Omjer vezanog i nevezanog Trp	Intenzitet fluorescencije nevezanog Trp (proizvoljne jedinice)
5×10^{-5}	5.00×10^{-5}	3.00×10^{-5}	2.00×10^{-5}	0.66	746.59
5×10^{-5}	3.33×10^{-5}	2.00×10^{-5}	1.33×10^{-5}	0.66	748.46
5×10^{-5}	2.50×10^{-5}	1.39×10^{-5}	1.11×10^{-5}	0.79	518.32
5×10^{-5}	1.66×10^{-5}	1.01×10^{-5}	6.50×10^{-6}	0.64	377.68
5×10^{-5}	1.25×10^{-5}	5.97×10^{-6}	6.53×10^{-6}	1.09	222.53
5×10^{-5}	1.00×10^{-5}	5.74×10^{-6}	4.26×10^{-6}	0.74	214.08
5×10^{-5}	8.33×10^{-6}	4.15×10^{-6}	4.18×10^{-6}	1.00	154.58
5×10^{-5}	6.25×10^{-6}	3.05×10^{-6}	3.20×10^{-6}	1.04	113.57

*prema jednadžbi 2.3



Slika 18. Scatchardov prikaz za vežanje triptofana (Trp) na albumin s masnim kiselinama.

Vrijednosti dobivene prema jednadžbi 1.7 bile su $K_d = (5 \pm 3) \times 10^{-5} \text{ M}$, $n = 1.1 \pm 0.6$.

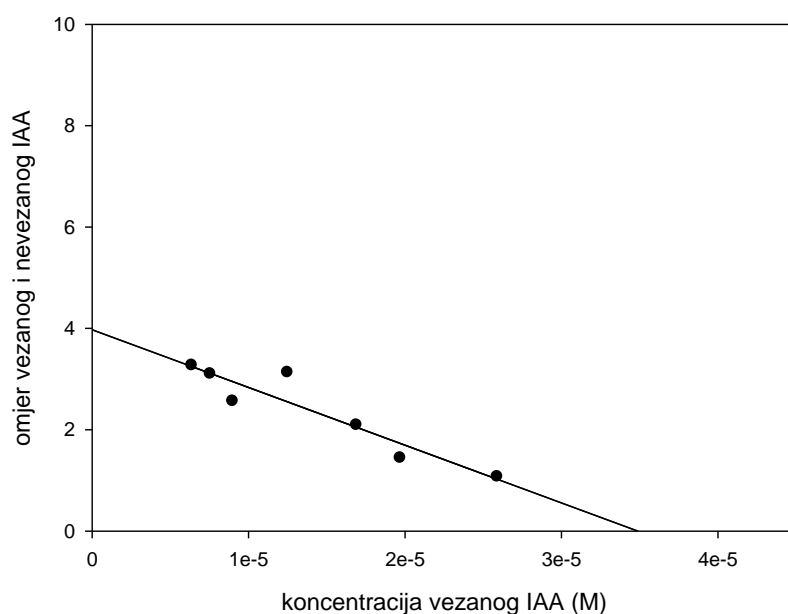
3.4.3 Vežanje IAA na HSA s masnim kiselinama

Uspoređivanjem intenziteta fluorescencije IAA prije vežanja i nakon vežanja na HSA dobiveni su podaci prikazani u tablici 10. Scatchardovim prikazom (Slika 19) dobiveni su $K_d = (9 \pm 1) \times 10^{-6}$ M, $n = 0.7 \pm 0.1$. Vežanje IAA na HSA je bilo s većim afinitetom u odnosu na triptofan.

Tablica 10. Podaci dobiveni za vežanje indol-3-octene kiseline (IAA) na albumin (HSA) s vežanim masnim kiselinama.

c (HSA), M	c (ukupni IAA), M	c (nevezani IAA), M	c (vezani IAA), M*	Omjer vezanog i nevezanog IAA	Intenzitet fluorescencije nevezanog IAA (proizvoljne jedinice)
5×10^{-5}	5.00×10^{-5}	2.41×10^{-5}	2.59×10^{-5}	1.07	387.00
5×10^{-5}	3.33×10^{-5}	1.36×10^{-5}	1.97×10^{-5}	1.44	263.00
5×10^{-5}	2.50×10^{-5}	8.08×10^{-6}	1.69×10^{-5}	2.09	155.60
5×10^{-5}	1.66×10^{-5}	4.01×10^{-6}	1.25×10^{-5}	3.13	77.00
5×10^{-5}	1.25×10^{-5}	3.51×10^{-6}	8.99×10^{-6}	2.56	68.00
5×10^{-5}	1.00×10^{-5}	2.44×10^{-6}	7.56×10^{-6}	3.10	47.00
5×10^{-5}	8.33×10^{-6}	1.95×10^{-6}	6.38×10^{-6}	3.27	37.60

*prema jednadžbi 2.3



Slika 19. Scatchardov prikaz za vežanje indol-3-octene kiseline (IAA) na albumin s masnim kiselinama. Vrijednosti dobivene prema jednadžbi 1.7 bile su $K_d = (9 \pm 1) \times 10^{-6}$ M, $n = 0.7 \pm 0.1$.

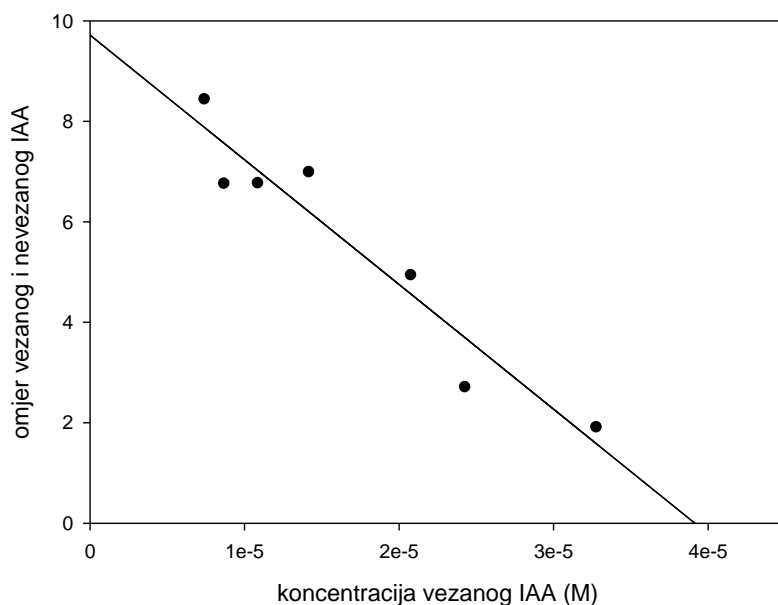
3.4.4 Vežanje IAA na HSA bez masnih kiselina

U tablici 11. su navedeni podaci dobiveni vežanjem IAA na HSA bez masnih kiselina. Kada nema vežanih masnih kiselina na HSA, više IAA se vežalo na HSA. Scatchardovim prikazom (Slika 20) dobiveni su $K_d = (4.1 \pm 0.5) \times 10^{-6} \text{ M}$, $n = 0.8 \pm 0.1$.

Tablica 11. Vežanje indol-3-octene kiseline (IAA) na albumin (HSA) bez masnih kiselina.

c (HSA), M	c (ukupni IAA), M	c (nevezani IAA), M	c (vežani IAA), M*	Omjer vežanog i nevezanog IAA	Intenzitet fluorescencije nevezanog IAA (proizvoljne jedinice)
5×10^{-5}	5.00×10^{-5}	1.72×10^{-5}	3.28×10^{-5}	1.90	331.00
5×10^{-5}	3.33×10^{-5}	9.02×10^{-6}	2.43×10^{-5}	2.70	173.64
5×10^{-5}	2.50×10^{-5}	4.21×10^{-6}	2.08×10^{-5}	4.93	81.00
5×10^{-5}	1.66×10^{-5}	2.08×10^{-6}	1.42×10^{-5}	6.98	40.00
5×10^{-5}	1.25×10^{-5}	1.61×10^{-6}	1.09×10^{-5}	6.76	31.00
5×10^{-5}	1.00×10^{-5}	1.29×10^{-6}	8.71×10^{-6}	6.75	25.00
5×10^{-5}	8.33×10^{-6}	8.83×10^{-7}	7.44×10^{-6}	8.43	17.00

*prema jednadžbi 2.3



Slika 20. Scatchardov prikaz za vežanje indol-3-octene kiseline (IAA) na albumin bez vežanih masnih kiselina.

Vrijednosti dobivene prema jednadžbi 1.7 bile su $K_d = (4.1 \pm 0.5) \times 10^{-6} \text{ M}$, $n = 0.8 \pm 0.1$.

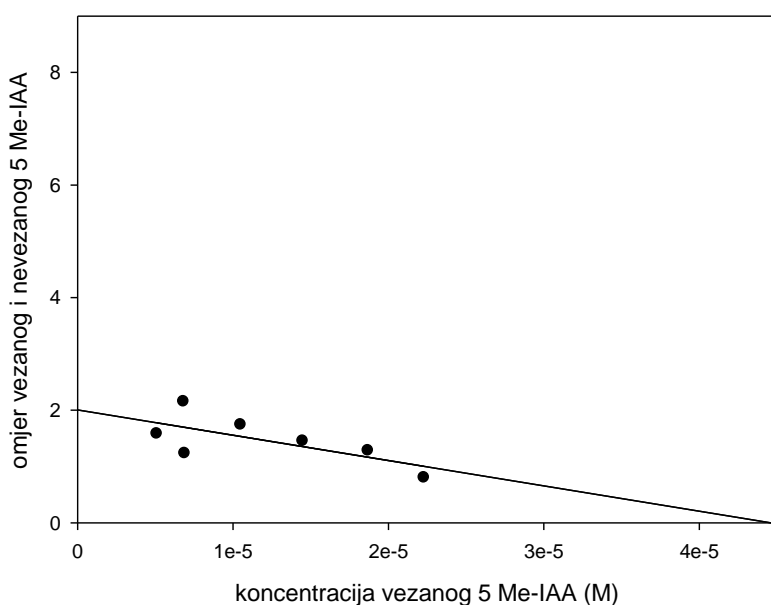
3.4.5 Vežanje 5-metil-IAA na albumin s masnim kiselinama

U tablici 12. su navedeni podaci za vežanje 5-metil-IAA na HSA s vežanim masnim kiselinama. Scatchardovim prikazom (Slika 21) dobiveni su $K_d = (2.2 \pm 1) \times 10^{-5} \text{ M}$, $n = 0.9 \pm 0.4$. 5-metil-IAA veže se jačim afinitetom na HSA nego triptofan, u odnosu na IAA vežanje je bilo slabije.

Tablica 12. Vežanje 5-metil-indol-3-octene kiseline (5-metil-IAA) na albumin (HSA) s masnim kiselinama.

c (HSA), M	c (ukupni 5-metil- IAA), M	c (nevezani 5-metil- IAA), M	c (vezani 5-metil- IAA), M*	Omjer vezanog i nevezanog 5-metil-IAA	Intenzitet fluorescencije nevezanog 5-metil-IAA (proizvoljne jedinice)
5×10^{-5}	5.00×10^{-5}	2.77×10^{-5}	2.23×10^{-5}	0.80	544.29
5×10^{-5}	3.33×10^{-5}	1.46×10^{-5}	1.87×10^{-5}	1.28	575.90
5×10^{-5}	2.50×10^{-5}	1.02×10^{-5}	1.48×10^{-5}	1.45	404.60
5×10^{-5}	1.66×10^{-5}	6.00×10^{-6}	1.05×10^{-5}	1.74	237.80
5×10^{-5}	1.25×10^{-5}	5.60×10^{-6}	6.90×10^{-6}	1.23	220.00
5×10^{-5}	1.00×10^{-5}	3.17×10^{-6}	6.83×10^{-6}	2.15	124.80
5×10^{-5}	8.33×10^{-6}	3.22×10^{-6}	5.11×10^{-6}	1.58	126.56

*prema jednadžbi 2.3



Slika 21. Scatchardov prikaz za vežanje 5-metil-indol-3-octene kiseline (5-metil-IAA) na albumin s masnim kiselinama.

Vrijednosti dobivene prema jednadžbi 1.7 bile su $K_d = (2.2 \pm 1) \times 10^{-5} \text{ M}$, $n = 0.9 \pm 0.4$.

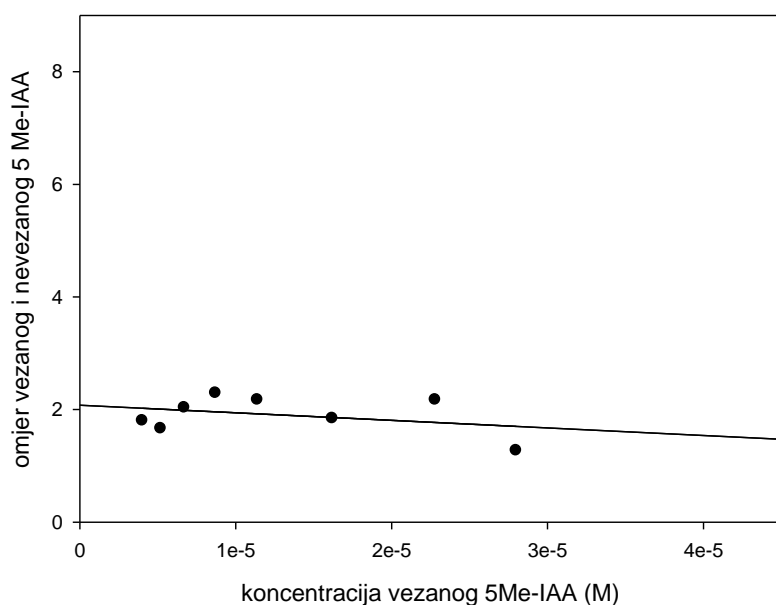
3.4.6 Vežanje 5-metil-IAA na HSA bez masnih kiselina

U tablici 13. su podaci o vežanju 5-metil-IAA na albumin bez masnih kiselina. Scatchardovim prikazom (Slika 22) dobiveni su $K_d = (5 \pm 5) \times 10^{-5} \text{ M}$, $n = 2 \pm 2$. U ovom eksperimentu nije dobiven tipičan Scatchardov prikaz. Budući da je mali nagib pravca, vrijednosti K_d i n određene su s velikom pogreškom.

Tablica 13. Vežanje 5-metil-indol-3-octene kiseline (5-metil-IAA) na albumin (HSA) bez masnih kiselina.

c (HSA), M	c (ukupni 5-metil- IAA), M	c (nevezani 5-metil- IAA), M	c (vezani 5-metil- IAA), M	Omjer vezanog i nevezanog 5metil- IAA	Intenzitet fluorescencije nevezanog 5-metil-IAA (proizvoljne jedinice)
5×10^{-5}	5.00×10^{-5}	2.20×10^{-5}	2.80×10^{-5}	1.27	577.16
5×10^{-5}	3.33×10^{-5}	1.05×10^{-5}	2.28×10^{-5}	2.17	415.57
5×10^{-5}	2.50×10^{-5}	8.80×10^{-6}	1.62×10^{-5}	1.84	345.71
5×10^{-5}	1.66×10^{-5}	5.23×10^{-6}	1.14×10^{-5}	2.17	205.81
5×10^{-5}	1.25×10^{-5}	3.79×10^{-6}	8.71×10^{-6}	2.29	149.00
5×10^{-5}	1.00×10^{-5}	3.29×10^{-6}	6.71×10^{-6}	2.03	129.50
5×10^{-5}	8.33×10^{-6}	3.13×10^{-6}	5.20×10^{-6}	1.66	123.00
5×10^{-5}	6.25×10^{-6}	2.23×10^{-6}	4.02×10^{-6}	1.80	87.96

*prema jednadžbi 2.3



Slika 22. Scatchardov prikaz za vežanje 5-metil-indol-3-octene kiseline (5 Me-IAA) na albumin bez masnih kiselina.

Vrijednosti dobivene prema jednadžbi 1.7 bile su $K_d = (5 \pm 5) \times 10^{-5} \text{ M}$, $n = 2 \pm 2$.

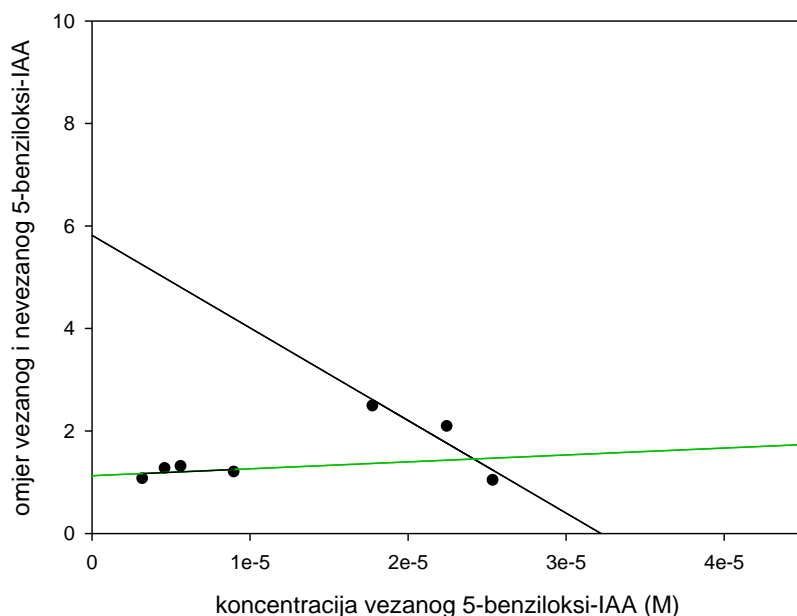
3.4.7 Vežanje 5-benziloksi-IAA na HSA s masnim kiselinama

U tablici 14. su podaci dobiveni o vežanju 5-benziloksi-IAA na HSA s masnim kiselinama. Budući da sam prikazom rezultata dobila dva pravca, procijenila sam da se ovaj spoj veže na jedno mjesto na HSA s većim afinitetom, zeleni pravac (Slika 23) predstavlja nespecifično vežanje.

Tablica 14. Vežanje 5-benziloksi-indol-3-ocetne kiseline (5-benziloksi-IAA) na albumin (HSA) bez masnih kiselina.

c (HSA), M	c (ukupni 5-benziloksi-IAA), M	c (nevezani 5-benziloksi-IAA), M	c (vezani 5-benziloksi-IAA), M*	Omjer vezanog i nevezanog 5-benziloksi-IAA	Intenzitet nevezanog 5-benziloksi-IAA (proizvoljne jedinice)
5×10^{-5}	5.00×10^{-5}	2.46×10^{-5}	2.54×10^{-5}	1.03	288.48
5×10^{-5}	3.33×10^{-5}	1.08×10^{-5}	2.25×10^{-5}	2.70	382.07
5×10^{-5}	2.50×10^{-5}	7.18×10^{-6}	1.78×10^{-5}	2.48	253.10
5×10^{-5}	1.66×10^{-5}	7.58×10^{-6}	9.02×10^{-6}	1.19	267.15
5×10^{-5}	1.00×10^{-5}	4.34×10^{-6}	5.66×10^{-6}	1.30	152.86
5×10^{-5}	8.33×10^{-6}	3.68×10^{-6}	4.65×10^{-6}	1.26	129.61
5×10^{-5}	6.25×10^{-6}	3.02×10^{-6}	3.23×10^{-6}	1.06	106.58

*prema jednadžbi 2.3



Slika 23. Scatchardov prikaz za vežanje 5-benziloksi-IAA na albumin s masnim kiselinama. Vrijednosti dobivene prema jednadžbi 1.7 bile su K_d (crni pravac) = 5.53×10^{-6} M, $n = 0.64$, a K_d (zeleni pravac–nespecifično vežanje) = 7.39×10^{-5} M, $n = 1.66$.

3.4.8 Vezanje indolnih spojeva na HSA s i bez vezanih masnih kiselina

Rezultate vezanja indolnih spojeva na HSA analizirala sam grafičkim prikazom prema Scatchardu i odredila parametre vezanja, K_d i n . Iz nagiba pravca odredila sam K_d , a iz odsječka na ordinati odredila sam broj veznih mjesta u albuminu za određeni indolni spoj prema formuli 1.7.

Triptofan sam koristila kao standard u eksperimentima vezanja budući da je to aminokiselina s indolnim prstenom u strukturi. Iz tablice 15 se vidi da se IAA i triptofan vežu na jedno vezno mjesto u albuminu, ali se IAA veže većim afinitetom od triptofana jer je K_d manja za vezanje IAA na albumin. U odnosu na ostale spojeve koje sam koristila u eksperimentu, IAA se veže najvećim afinitetom na albumin što bi se moglo objasniti činjenicom da prisustvo supstituiranih grupa na indolnom prstenu remeti vezanje i smanjuje afinitet vezanja tih spojeva. Kada na HSA nisu bile vezane masne kiseline, K_d za IAA u odnosu na vezanje na albumin s masnim kiselinama je manja odnosno afinitet vezanja je bio veći.

5-metil-IAA se veže na HSA u prisustvu masnih kiselina na jedno vezno mjesto i većim afinitetom od triptofana, a u slučaju vezanja tog spoja na HSA bez masnih kiselina Scatchardov prikaz je horizontalni pravac s malim nagibom (Slika 22) što bi značilo da ne može doći do zasićenja veznih mjesta te sam zaključila da se radi o nespecifičnom vezanju.

Vežanjem 5-benziloksi-IAA, grafičkim prikazom dobila sam dva seta podataka (Slika 23) i zaključila da je moguće da je jedno vezno mjesto na albuminu za ovaj spoj većeg afiniteta od ostalih veznih mjesta na koja bi se mogao vezati. Sam pristup prema Scatchardu nije primjeren za obradu ovih eksperimentalnih podataka vezanja 5-benziloksi-IAA na HSA.

Tablica 15. Rezultati vezanja indolnih spojeva na HSA.

	IAA vezana na HSA s masnim kiselinama	IAA vezana na HSA bez masnih kiselina	Triptofan vezan na HSA s masnim kiselinama	5-metil-IAA vezan na HSA s masnim kiselinama	5-metil-IAA vezan na HSA bez masnih kiselina	5-benziloksi-IAA vezan na HSA s masnim kiselinama
K_d (M)	$(9\pm 1)\times 10^{-6}$	$(4.1\pm 0,5)\times 10^{-6}$	$(5\pm 3)\times 10^{-5}$	$(2.2\pm 1)\times 10^{-5}$	$(5\pm 5)\times 10^{-5}$	1. 5.53×10^{-5} 2. 7.39×10^{-5}
n	0.7 ± 0.1	0.8 ± 0.1	1.1 ± 0.6	0.9 ± 0.4	2 ± 2	1. 0.64 2. 1.66

4 RASPRAVA

Vežanje liganda na HSA i ostale proteine važno je područje istraživanja koje nam otkriva fiziološku ulogu kompleksa protein-ligand i pomaže u razumijevanju nekih patoloških stanja. Dokazano je da se vežanjem drugih molekula na proteine u krvi kao što je HSA, onemogućava vežanje lijekova i time terapija postaje neučinkovita ili ima toksične posljedice za organizam. Otkrivanjem strukture veznih mjesta i faktora koji utječu na interakcije proteina i liganda, mogu se dizajnirati lijekovi za optimalne terapije u bolestima.

Indolni spojevi su zanimljivi za istraživanje jer osim što su bitni za rast i razvoj biljaka, indolni prsten je sastavni dio strukture nekih lijekova, a postoje i derivati koji bi u kombinaciji s drugim spojevima mogli biti potencijalna terapija za zloćudne tumore.

HSA je jedan od glavnih transportnih proteina za različite molekule. U patološkim stanjima organizma narušena je funkcija samog proteina i mijenja se vežanje liganada na HSA.

IAA je metabolit triptofana i kod zdravih osoba nema značajnu ulogu, međutim u nekim patološkim stanjima, nakupljaju se u krvi IAA i ostali uremični spojevi. Dokazano je da se takvi spojevi vežu na HSA i ometaju vežanje masnih kiselina kao nativnih liganada, ali i vežanje lijekova pa terapija nije učinkovita. Budući da se vežu na HSA, povećava se koncentracija slobodne frakcije lijekova u krvi što može imati toksične posljedice. Postoji niz derivata IAA od kojih su neki prirodni, a neki sintetizirani kako bi se istražio utjecaj supstituiranih grupa na svojstva i vežanje IAA u fiziološkim uvjetima.

Na afinitet vežanja indolnih spojeva na HSA utječu hidrofobne interakcije. Lipofilniji spojevi se vežu jače od polarnijih analoga. Glomazni supstituenti na poziciji šest u indolnom prstenu povećavaju afinitet, alkilne skupine u poziciji dva sterički ometaju orijentaciju molekule unutar veznog mjesta, dok za supstituente na ostalim pozicijama nema steričkog utjecaja (Šoškić i Magnus 2007). Supstituenti s elektron-akceptorskim svojstvima pojačavaju vežanje na HSA. Esterifikacija karboksilne kiseline i metiliranje dušika u prstenu ne dovodi do smanjenja afiniteta za protein.

U ovom diplomskom radu istražila sam vežanje IAA, triptofana, 5-metil-IAA i 5-benziloksi-IAA na HSA s i bez vezanih masnih kiselina.

4.1 Vezanje IAA na HSA s i bez masnih kiselina

Istraživanjem vezanja IAA na HSA bez masnih kiselina pri pH 7.40 i temperaturi od 25°C, Sakai i sur. (1995) su utvrdili da se IAA veže na jedno mjesto s visokim afinitetom, a K_d je 4.76×10^{-6} M i da postoji pet veznih mjesta niskog afiniteta. U mojem istraživanju K_d za vezanje na HSA bez masnih kiselina je u skladu s prijašnjim rezultatima. Za raspon koncentracija koje sam koristila te analizirajući vezanje fluorescencijskom spektroskopijom, Scatchardov prikaz je bio linearan što znači da postoji jedno specifično vezno mjesto na HSA molekuli. Kada se usporede grafički prikazi vezanja na HSA s i bez masnih kiselina, vidi se da je vezanje IAA bilo većeg afiniteta kada nema prisutnih masnih kiselina, u oba slučaja IAA se veže na jedno vezno mjesto na HSA.

4.2 Vezanje triptofana na HSA s masnim kiselinama

L-triptofan se često koristi kao selektivna proba za Sudlowo mjesto II kada se ispituje vezanje lijekova na HSA (Joseph i Hage 2010). Otkriveno je da se L-triptofan veže puno većim afinitetom od D-triptofana, a na interakciju sa HSA utječe pH i temperatura te u manjoj mjeri i djelomična zauzetost veznih mjesta masnim kiselinama (McMenamy i Oncley 1958).

Triptofan se veže na isto vezno mjesto kao i IAA na HSA te se pokazalo da postoji kompetitivna interakcija između ta dva spoja. Vežanje triptofana na HSA je inhibirano kada je IAA vezana bilo na zajedničko mjesto ili na druga mjesta u albuminu. Moji rezultati su bili u skladu s dosadašnjim istraživanjima, iz grafičkog prikaza ustanovila sam da se triptofan veže specifično na jedno vezno mjesto, ali s manjim afinitetom nego IAA što je u skladu s literaturnim podacima.

4.3 Vežanje 5-metil-IAA na HSA s i bez masnih kiselina

Vežanjem 5-metil-IAA na HSA sa vezanim masnim kiselinama, ustanovila sam da se veže specifično na jedno vezno mjesto i s manjim afinitetom nego IAA. S obzirom da su rezultati bili prihvatljivi, ponovila sam pokus vezanja na HSA bez masnih kiselina. Grafički prikaz dobivenih podataka bio je pravac s malim nagibom pa su vrijednosti K_d i n određene s

velikom pogreškom. Budući da nisam mogla pronaći literaturu o vezanju tog spoja na HSA, zaključila sam da je moguće nespecifično vezanje indola na HSA u ovom slučaju ili je moglo doći do razgradnje ili agregacije molekula što je utjecalo na vezanje 5-metil-IAA na HSA.

4.4 Vezanje 5-benziloksi-IAA na HSA s masnim kiselinama

Analizom podataka za vezanje 5-benziloksi-IAA na HSA, iz omjera vezanja 1:1, 1.5:1 i 2:1 zaključila sam da se ovaj spoj vjerojatno veže na jedno vezno mjesto na HSA. Čini mi se da bi trebalo napraviti više mjerenja u većem rasponu koncentracija da bi sa sigurnošću mogla reći da je to specifično vezanje na jedno vezno mjesto na HSA. Na interakciju ovog spoja sa HSA mogla je utjecati i građa molekule budući da postoji dodatni prsten, a i prisutnost masnih kiselina pa je moguće da je došlo do djelomičnog vezanja.

Cilj ovog istraživanja bio je usporediti vezanje triptofana, IAA i derivata sa supstituiranim grupama na indolnom prstenu na HSA. Rezultati su pokazali da se indolni spojevi vežu specifično na jedno vezno mjesto na HSA i da su afiniteti takvih spojeva prema proteinu različiti u odnosu na triptofan te supstituirane grupe imaju utjecaj na vezanje. K_d za IAA je bila manja u odnosu na druge spojeve što znači da se IAA veže jačim afinitetom na HSA od ostalih spojeva. Eksperimente vezanja indolnih spojeva na HSA sam radila jedanput na sobnoj temperaturi. Nažalost instrument za proučavanje interakcije ovih spojeva na 37°C nije bio u funkciji pa bi za bolje razumijevanje interakcije HSA i indolnih spojeva koje sam koristila u mojem istraživanju trebalo istražiti na koji način se mijenjaju parametri vezanja kada je temperatura 37°C i za svaki spoj proučiti vezanje na HSA koji nema vezanih masnih kiselina. Vezanje bi trebalo proučavati i u većem rasponu koncentracija, s više omjera HSA : ligand i vidjeti kakvo će biti vezanje na HSA kada je koncentracija liganda u suvišku.

Budući da je u ovom radu osnovna metoda bila fluorescencijska spektroskopija, zanimljivo bi bilo istražiti na koji način se mijenja fluorescencija kompleksa protein-ligand u odnosu na fluorescenciju samog proteina i na koji način kemijske modifikacije proteina i promjena pH imaju utjecaj na promjene u intenzitetu fluorescencije, a time i na vezanje indolnih spojeva na HSA.

5 ZAKLJUČAK

- Vežanjem indol-3-octene kiseline (IAA) na albumin (HSA) pokazalo se da postoji barem jedno specifično vezno mjesto i da se IAA veže jače kada nema prisutnih masnih kiselina, K_d je tada manja što znači da je ligand čvršće vezan. U odnosu na triptofan, IAA se veže većim afinitetom na HSA.
- Triptofan se kao i IAA veže na jedno vezno mjesto na HSA, ali sa manjim afinitetom nego IAA.
- 5-metil-IAA i 5-benziloksi-IAA su derivati IAA sa supstituiranom grupom na indolnom prstenu. Istraživanjem vezanja ovih spojeva pokazano je da se takvi spojevi unatoč prisutnim grupama vežu na HSA s i bez masnih kiselina i u odnosu na IAA vežu se slabijim afinitetom.
- Na podatke o vezanju liganda na HSA utječu mnogi faktori te je za što bolju analizu potrebno odabrati način na koji će se mjeriti koncentracije vezanog i slobodnog liganda, dobra metoda koja će ukazati na postojanje nespecifičnog vezanja te analiza rezultata programima koji će najbolje prikazati set podataka u ovisnosti jedan prema drugome.

6 LITERATURA

Attie A.D., Raines R.T. 1995. Analysis of receptor – ligand interactions. *J. Chem. Edu.* **72**, 119-123.

Berg J.M., Tymoczko J.L., Stryer L. (2002): *Biochemistry*, 5. izdanje. W.H. Freeman i Company, New York.

Bertuzzi A., Mingrone G., Gandolfi A., Greco A.V., Ringoir S., Vanholder R. 1997. Binding of indole-3-acetic acid to human serum albumin and competition with L-tryptophan. *Clin. Chim. Acta* **265**, 183-192.

Carballal S., Radi R., Kirk M.C., Barnes S., Freeman B.A., Alvarez B. 2003. Sulfenic acid formation in human serum albumin by hydrogen peroxide and peroxynitrite. *Biochemistry* **42**, 9906-9914.

Carić D., Tomišić V., Kveder M., Galić N., Pifat G., Magnus V., Šoškić M. 2004. Absorbtion and fluorescence spectra of ring – substituted indole-3-acetic acids. *Biophys. Chem.* **111**, 247-257.

Curry S., Brick P., Franks N.P. 1999. Fatty acid binding to human serum albumin: new insights from crystallographic studies. *Biochim. Biophys. Acta* **1441**, 131-140.

Fasano M., Curry S., Terreno E., Galliano M., Fanali G., Narcino P., Notari S., Accenzi P. 2005. The extraordinary ligand binding properties of human serum albumin. *Life* **57**, 787-796.

Fehske K.J., Schlafer U., Wollert U., Muller W.E. 1982. Characterization of an important drug binding area on human serum albumin including the high-affinity binding sites of warfarin and azapropazone. *Mol. Pharmacol.* **21**, 387-393.

Folkes L.K., Wardman P. 2003. Oxidative activation of indole-3-acetic-acids to cytotoxic species – a potential new role for plant auxins in cancer therapy. *Biochem. Pharmacol.* **61**, 129-136.

Gauglitz G., Vo-Dinh T. (2003): *Handbook of spectroscopy*. Wiley-VCH, Weinheim.

Ghuman J., Zunszain P.A., Petitpas I., Bhattacharya A.A., Otagiri M., Curry S. 2005. Structural basis of the drug – binding specificity of human serum albumin. *J. Mol. Biol.* **353**, 38-52.

Hamilton J.A. 2013. NMR reveals molecular interactions and dynamics of fatty acid binding to albumin. *Biochim. Biophys. Acta* **1830**, 5418-5426.

He X.M., Carter D.C. 1992. Atomic structure and chemistry of human serum albumin. *Nature* **358**, 209–215.

Hein K.L., Kragh-Hansen U., Morth J.P., Jeppesen M.D., Moller J.V., Nissen P. 2010. Crystallographic analysis reveals a unique lidocaine binding site on human serum albumin. *J. Struct. Biol.* **171**, 353-360.

Herve F., Grigorova A.M., Rajkowski K., Cittanova N. 1982. Differences in the binding of thyroid hormones and indoles by rat α_1 -fetoprotein and serum albumin. *Eur. J. Biochem.* **122**, 609-612.

Itoh T., Saura Itoh T., Saura Y., Tsuda Y., Yamada H. 1997. Stereoselectivity and enantiomer-enantiomer interactions in the binding of ibuprofen to human serum albumin. *Chirality* **9**, 643-649.

Johansson M.U., Frick I.M., Nilsson H., Kraulis P.J., Hober S., Jonasson P., Linhult M., Nygren P.A., Uhlen M., Bjorck L., Drakenberg T., Forsen S., Wikstrom M. 2002. Structure, specificity and mode of interaction for bacterial albumin-binding modules. *J. Biol. Chem.* **277**, 8114-8120.

Joseph K.S., Hage D.S. 2010. The effects of glycation on the binding of human serum albumin to warfarin and L-tryptophan. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **53**, 811-818.

Khan S.N., Islam B., Khan A.U. 2007. Probing midazolam interaction with human serum albumin and its effects on structural state of protein. *Int. J. Integr. Biol.* **2**, 102-112.

Kuriyan J., Konforti B., Wemmer D. (2012): *The molecules of life: Physical and chemical principles*. Garland Science, New York and London.

McMenamy R.H., Oncley J.L. 1958. The specific binding of L-tryptophan to serum albumin. *J. Biol. Chem.* **233**, 1436-1447.

Minghetti P.P., Ruffner D.E., Kuang W.J., Dennison O.E., Hawkins J.W., Beattie W.G., Dugaiczky A. 1986. Molecular structure of the human albumin gene is revealed by nucleotide sequence within q11-22 of chromosome 4. *J. Biol. Chem.* **261**, 6747-6757.

Navarre W.W., Schneewind O. 1999. Surface proteins of gram positive bacteria and mechanism of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**, 174-229.

Neuzil J., Stocker R. 1994. Free and albumin bound bilirubin are efficient co-antioxidants for α -tocopherol, inhibiting plasma and low density lipoprotein lipid peroxidation. *J. Biol. Chem.* **269**, 16712-16719.

Nicholson J.P., Wolmarans M.R., Park G.R. 2000. The role of albumin in critical illness. *Br. J. Anaesth.* **85**, 599-610.

Otagiri M. 2005. A molecular functional study on the interactions of drugs with plasma proteins. *Drug Metab. Pharmacokinet.* **20**, 309-323.

Pace C.N., Vajdos F., Fee L., Grimsley G., Gray T. 1995. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Science* **4**, 2411-2423.

Petitpas I., Bhattacharya A.A., Twine S., East M., Curry S. 2001. Crystal structure analysis of warfarin binding to human serum albumin, anatomy of drug site I. *J. of Biol. Chem.* **276**, 22804-22809.

Quinlan G.J., Martin G.S., Evans T.W. 2005. Albumin: biochemical properties and therapeutic potential. *Hepatology* **41**, 1211-1219.

Sakai T., Takadate A., Otagiri M. 1995. Characterization of Binding Site of Uremic Toxins on Human Serum Albumin. *Biol. Pharm. Bull.* **18**, 1755-1761.

Sanders C.R. 2010. Biomolecular ligand-receptor binding studies: theory, practice and analysis. Skripta.

Stojs S.J., Bagchi D. 1995. Oxidative mechanism in the toxicity of metal ions. *Free Radic. Biol. Med.* **18**, 321-336.

Sugio S., Kashina A., Mochizuki S., Noda M., Kobayashi K. 1999. Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution. *Protein Eng.* **6**, 439-446.

Šoškić M., Magnus V. 2007. Binding of ring – substituted indole-3-acetic acids to human serum albumin. *Bioorg. Med. Chem.* **15**, 4595-4600.

Valeur B. (2001): *Molecular fluorescence: Principles and Applications*. Wiley–VCH, Weinheim.

Van Holde K.E., Ho P.S., Johnson W.C. (2006): *Principles of Physical Biochemistry*, 2. izdanje. Pearson Prentice Hall, New Jersey.

Yamasaki K., Chang V.T.G., Maruyana T., Otagiri M. 2013. Albumin-drug interaction and its clinical implication. *Biochim. Biophys. Acta* **1830**, 5435-5443.

Zhao Y. 2010. Auxin biosynthesis and its role in plant development. *Annu. Rev. Plant. Biol.* **61**, 49-6

https://bib.irb.hr/datoteka/641532.Praktikum_iz_biokemije_2013.pdf

<http://what-when-how.com/molecular-biology/scatchard-plot-molecular-biology>

<http://www.chemimpex.com>

<http://www.sigmaaldrich.com>

<http://www.slideshare.net>

<https://www.uni-leipzig.de/~pwm/web/?section=introduction&page=fluorescence>

7 ŽIVOTOPIS

Rođena sam 29. travnja 1984. godine u Varaždinu. Osnovnu školu sam pohađala u Sračincu, a srednjoškolsko obrazovanje za zdravstveno-laboratorijskog tehničara sam stekla u medicinskoj školi u Varaždinu od 1998. – 2002. godine. Preddiplomski studij molekularne biologije upisala sam 2006. godine, a 2013. godine sam upisala diplomski studij molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu.

- znanstveni interes: molekularna biologija stanice (signalni putevi)
- aktivno poznavanje engleskog jezika i rada na računalu, njemački jezik (pasivno)
- bračni status: udana
- hobi: biciklizam, ples

