

UNIVERZITET U BEOGRADU

HEMIJSKI FAKULTET

Mirjana Ž. Radomirović

**KOVALENTNE MODIFIKACIJE
GLOBULARNIH PROTEINA
FIKOCIJANOBILINOM I KARAKTERIZACIJA
DOBIJENIH KONJUGATA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2025.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF CHEMISTRY

Mirjana Ž. Radomirović

**COVALENT MODIFICATIONS OF GLOBULAR
PROTEINS WITH PHYCOCYANOBILIN AND
CHARACTERIZATION OF OBTAINED
CONJUGATES**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2025.

KOMISIJA ZA PREGLED, OCENU I ODBRANU DOKTORSKE DISERTACIJE:

Mentor:

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

Članovi komisije:

dr Marija Gavrović-Jankulović, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu – Hemijski fakultet

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

dr Veselin Maslak, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu – Hemijski fakultet

dr Simeon Minić, docent
Univerzitet u Beogradu – Hemijski fakultet

dr Andreja Rajković, redovni profesor
Univerzitet u Gentu – Fakultet za inženjerstvo u bionaukama

Datum odbrane:

Zahvalnica

Ova doktorska disertacija je urađena u istraživačkoj grupi prof. dr Tanje Ćirković Veličković, te koristim ovu priliku da joj zahvalim na slobodi i ukazanom poverenju koje sam imala u radu.

Mada mi nije bila formalni mentor, dr Dragana Stanić-Vučinić, naučni savetnik Hemijskog fakulteta, uvek je nalazila vremena za diskusiju i konsultaciju na bilo koju temu. Njena temeljitost, posvećenost i kritičko razmišljanje su osobine kojima stremim u sopstvenom radu, a njene metafore ulepšale su prethodne godine rada.

Docentu dr Simeonu Miniću hvala na saradnji u početnim etapama rada na ovoj tematici, na pragmatičnosti i konstruktivnim savetima.

Profesorki dr Mariji Gavrović-Jankulović hvala na tome što je prihvatila da bude član ove Komisije, na čitanju teze i stalnom interesovanju za to kada će ona ugledati svetlost dana.

Profesoru dr Veselinu Maslaku hvala što je prihvatio da bude član Komisije za ocenu i odbranu ove doktorske disertacije. Njegovo temeljno čitanje i perspektiva organskog hemičara doprineli su kvalitetu ove disertacije.

Profesoru dr Andreji Rajkoviću hvala što je prihvatio da bude član Komisije i na sjajnoj saradnji na drugim projektima. Vreme provedeno u njegovoj grupi na Univerzitetu u Gentu bilo je od velikog značaja za moj profesionalni razvoj.

Profesoru dr Milanu Nikoliću hvala na izolovanju fikocijanobilina.

U saradnji sa prof. dr Milošem Milčićem i dr Milicom Radibratović urađene su računarske metode u ovoj disertaciji, koje su značajno produbile dobijene rezultate, te im ovom prilikom srdačno zahvaljujem.

Dr Nikoli Gligorijeviću hvala na pomoći u eksperimentalnom radu onda kada su dani bili suviše kratki za sve što sam htela da uradim. Njegova efikasnost i fokusiranost u radu inspirišu.

Mojoj majci i mojoj sestri hvala na snazi i istrajnosti u mnogim izazovnim periodima; indirektno ste i vi deo ove teze.

Disertaciju posvećujem našoj Petri.

Kovalentne modifikacije globularnih proteina fikocijanobilinom i karakterizacija dobijenih konjugata

Izvod

C-fikocijanin (C-PC) je glavni hromoprotein cijanobakterije *Arthrospira platensis*, poznate kao Spirulina, koju odlikuje niz pozitivnih efekata po zdravlje ljudi. Predmet ove doktorske disertacije bilo je ispitivanje kovalentne modifikacije odabranih globularnih proteina fikocijanobilinom (PCB), bioaktivnom, fluorescentnom hromoforom C-PC-a.

Goveđi β -laktoglobulin (BLG) modifikovan je PCB-om direktno preko slobodne sulfhidrilne (SH) grupe Cys119. U albumin goveđeg seruma (BSA), IgG antitela i goveđi α -laktalbumin (ALA) SH grupe su uvedene modifikacijom lizinskih ostataka Trautovim reagensom (TR), nakon čega su modifikovani PCB-om. Modifikacijom BLG-a PCB-om dobija se neohromoprotein izmenjene strukture, poboljšanih antioksidativnih osobina, koji je stabilniji na oksidaciju, termički tretman i dejstvo proteolitičkih enzima, a uz to ima neizmenjene IgE-vezujuće osobine. BSA modifikovan PCB-om ima značajno povećanu antioksidativnu aktivnost i oksidativnu stabilnost, uz neizmenjenu sposobnost vezivanja malih bioaktivnih molekula. Antitela IgG klase modifikovana PCB-om zadržavaju specifičnost prepoznavanja antigena, dok osetljivost fluorescentne detekcije zasnovane na njima zahteva dalju optimizaciju. Modifikacija PCB-om nakon uvođenja SH grupa u ALA, koji sâm ne sadrži slobodnu SH grupu, dovodi do značajnih promena strukture i oligomerizacije proteina.

Dobijeni rezultati pružaju nova saznanja o efektima modifikacije PCB-om na strukturne i funkcionalne osobine proteina, čime se otvaraju nove mogućnosti za primenu PCB-a, a ujedno pružaju uvid u efekte tiolovanja. Optimizacijom koncentracije TR-a potrebno je napraviti balans između stepena modifikacije PCB-om i negativnog efekata na strukturne i funkcionalne osobine proteina.

Ključne reči: fikocijanobilin, kovalentna modifikacija, β -laktoglobulin, Trautov reagens, albumin goveđeg seruma, IgG antitela, α -laktalbumin, konjugat, funkcionalna hrana, fluorescentno obeležavanje

Naučna oblast: Hemijske nauke

Uža naučna oblast: Biohemija

Covalent modifications of globular proteins with phycocyanobilin and characterization of obtained conjugates

Abstract

C-Phycocyanin (C-PC) is the main chromoprotein of the cyanobacterium *Arthrospira platensis*, known as Spirulina, renowned for its numerous positive health effects on humans. This thesis investigates the covalent modification of selected globular proteins with phycocyanobilin (PCB), a bioactive fluorescent chromophore of C-PC.

Bovine β -lactoglobulin (BLG) was modified with PCB directly through the free sulfhydryl (SH) group of Cys119. In bovine serum albumin (BSA), IgG antibodies, and bovine α -lactalbumin (ALA), SH groups were introduced by modifying lysine residues using Traut's reagent (TR), followed by PCB modification. Modification of BLG with PCB resulted in a novel chromoprotein with an altered structure and enhanced antioxidant properties, showing increased stability against oxidation, thermal treatment, and proteolytic enzymes, while maintaining unaltered IgE-binding properties. PCB-modified BSA exhibited significantly improved antioxidant activity and oxidative stability, with its ability to bind small bioactive molecules remaining unchanged. PCB-modified IgG antibodies retained their specificity in antigen recognition, though further optimization is required to improve the sensitivity of fluorescent detection. The modification of ALA with PCB, following the introduction of SH groups into ALA, led to significant structural changes and protein oligomerization.

The obtained results provide new insights into the effects of PCB modification on the structural and functional properties of proteins, opening up new possibilities for PCB applications while also shedding light on the impact of thiolation. Optimizing TR concentration is essential to balance the degree of PCB modification with potential adverse effects on the structural and functional properties of proteins.

Keywords: phycocyanobilin, covalent modification, β -lactoglobulin, Traut's reagent, bovine serum albumin, IgG antibodies, α -lactalbumin, conjugate, functional food, fluorescent labelling

Scientific field: Chemistry

Scientific subfield: Biochemistry

LISTA SKRAĆENICA I AKRONIMA:

AA – akrilamid

AAPH – 2,2'-azobis(2-amidinopropan)dihidrohlorid

ABTS – 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)

ALA – α -laktalbumin

ANS – 8-anilinonaftalen-1-sulfonska kiselina

APS – amonijum-persulfat

APC – alofikocijanin

BLG – β -laktoglobulin

BPB – bromfenol plavo (od engl. *bromphenol blue*)

BSA – albumin goveđeg seruma (od engl. *bovine serum albumin*)

BCIP – 5-brom-4-hlor-3-indolil-fosfat (od engl. *5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate*)

DMSO – dimetilsulfoksid

DTNB – 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoeva kiselina)

EGCG – epigalokatehin-3-galat

EDC – 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid

FITC – fluorescein izotiocijanat

Ig – imunoglobulin

IPG – imobilizovani pH gradijentu (od engl. *immobilized pH gradient*)

LTLT – dugotrajna pasterizacija na niskoj temperaturi (od engl. *low-temperature long-time pasteurization*)

NBT – nitroplavotetrazolijum (od engl. *nitroblue tetrazolium*)

NHS – N-hidroksisukcinimid

OPA – o-ftalaldehid (od engl. *ortho-phthalaldehyde*)

ORAC – (od engl. *oxygen radical absorbance capacity*)

PE – fikoeritrin

PEG – polietilenglikol

PCB – fikocijanobilin

ROS – reaktivne kiseonične vrste (od engl. *reactive oxygen species*).

RP-HPLC – reverzno-fazna tečna hromatografija visokih performansi (od engl. *reversed-phase high-performance liquid chromatography*)

SGF – simulirana želudačna tečnost (od engl. *simulated gastric fluid*)

SDS-PAGE – natrijum-dodecilsulfat poliakrilamidna gel elektroforeza (od engl. *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*)

SIF – simulirana intestinalna tečnost (od engl. *simulated intestinal fluid*)

SMCC – sukcinimidil-(N-maleimidometil)cikloheksan-1-karboksilat

SSF – simulirana pljuvačna tečnost (od engl. *simulated salivary fluid*)

TE – Troloks ekvivalent

TEMED – tetrametiletildiamin

TMB – 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin

TCEP – tris[2-karboksietil]fosfin

UV/VIS – ultraljubičasta/vidljiva svetlost (od engl. *ultraviolet/visible*)

HRP – peroksidaza iz rena (od engl. *horseradish peroxidase*)

HSA – albumin humanog seruma (od engl. *human serum albumin*)

CBB – Komasi brilijant plavo (od engl. *Coomassie brilliant blue*)

CD – cirkularni dihiroizam

CID – kolizijom indukovana disocijacija, od engl. *collision-induced dissociation*).

Sadržaj

1. Uvod.....	1
2. Opšti deo	4
2.1. Kovalentne modifikacije proteina	4
2.1.1. Hemijske reakcije modifikacija proteina	6
2.1.2. Hemijske modifikacije bočnih ostataka lizina	7
2.1.2.1. Trautov reagens	9
2.1.3. Hemijske modifikacije bočnih ostataka cisteina.....	10
2.2. Kovalentne modifikacije proteina hrane	13
2.2.1. Beta-laktoglobulin	16
2.2.1.1. Goveđi β -laktoglobulin.....	16
2.2.1.2. Sekundarna i tercijarna struktura β -laktoglobulina.....	17
2.2.1.3. Kvaternarna struktura β -laktoglobulina.....	19
2.2.1.4. Uticaj temperature na ponašanje β -laktoglobulina	20
2.2.1.5. Amiloidni fibrili β -laktoglobulina	22
2.2.1.6. Digestibilnost β -laktoglobulina	23
2.2.1.7. Beta-laktoglobulin kao alergen hrane.....	24
2.2.1.8. Interakcije β -laktoglobulina i malih molekula.....	25
2.2.2. Albumin goveđeg seruma	27
2.2.2.1. Struktura albumina goveđeg seruma	28
2.2.2.2. Albumin goveđeg seruma kao protein hrane	30
2.2.2.3. Albumin goveđeg seruma kao transporter lekova i drugih bioaktivnih molekula.....	30
2.3. Kovalentne modifikacije proteina u analitici	31
2.3.1. Imunoglobulini	32
2.3.1.1. Struktura IgG antitela	33
2.3.1.2. Disulfidi IgG antitela i fragmentacija IgG antitela	34
2.3.1.3. Funkcionalne implikacije heterogenosti disulfidnih veza antitela.....	36
2.3.1.4. Primena antitela u imunološkim tehnikama	37
2.3.1.5. Kovalentne modifikacije antitela.....	38
2.3.1.5.1. Fluorescentno obeležavanje antitela	39
2.3.2. Alfa-laktalbumin.....	40
2.4. Fikocijanobilin.....	41
2.4.1. Spirulina kao održiva hrana budućnosti	41
2.4.2. Fikobilinski proteini kao prirodni pigmenti algi: struktura i funkcija	42

2.4.3. Fikocijanin i fikocijanobilin: struktura i hemijske osobine	43
2.4.4. Fikocijanin i fikocijanobilin: bioaktivna svojstva	45
2.4.5. Fikocijanin i fikocijanobilin: upotreba u industriji hrane	46
2.4.6. Fikobilinski proteini kao fluorescentni obeleživači.....	47
3. Eksperimentalni deo	50
3.1. Materijali i oprema	50
3.2. Ispitivanje kovalentnih interakcija β -laktoglobulina i fikocijanobilina	50
3.2.1. Fluorescentna spektroskopija	50
3.2.2. CD spektroskopija	51
3.2.3. UV/VIS spektroskopija.....	52
3.2.4. Natrijum-dodecilsulfat poliakrilamidna gel elektroforeza (SDS-PAGE) BLG-a i BLG-PCB-a ..	52
3.2.5. Priprema kovalentnog BLG-PCB adukta u većem prinosu	53
3.2.6. Određivanje prinosa reakcije BLG-a i PCB-a	53
3.2.7. Detekcija BLG-PCB adukta masenom spektrometrijom	55
3.2.8. Računarske metode.....	55
3.2.9. Uticaj pH na formiranje BLG-PCB adukta.....	56
3.2.10. Formiranje BLG-PCB adukta u simuliranim gastrointestinalnim uslovima.....	56
3.2.11. Antioksidativne osobine BLG-a i BLG-PCB-a	56
3.2.11.1. Oksidacija BLG-a i BLG-PCB-a slobodnim radikalima	56
3.2.11.2. ORAC test	57
3.2.11.3. Test obezbojavanja ABTS radikal-katjona.....	57
3.2.11.4. Test ukupne redukujuće moći.....	58
3.2.12. Izoelektrično fokusiranje u imobilizovanom pH gradijentu	58
3.2.13. Termički-indukovane promene BLG-a i BLG-PCB-a.....	58
3.2.13.1. Termički tretman BLG-a i BLG-PCB-a.....	58
3.2.13.2. Natrijum-dodecilsulfat (SDS) i nativna poliakrilamidna gel elektroforeza zagrevanih BLG-a i BLG-PCB-a	58
3.2.13.3. Površinska hidrofobnost BLG-a i BLG-PCB-a	59
3.2.13.4. CD spektroskopija BLG-a i BLG-PCB-a.....	59
3.2.13.5. Detekcija amiloidu sličnih fibrilarnih proteinskih struktura.....	59
3.2.13.6. Termalna stabilnost BLG-a i BLG-PCB-a.....	59
3.2.14. <i>In vitro</i> pepsinska i pankreatinska digestija nemodifikovanog BLG-a i BLG-PCB kovalentnog adukta	60
3.2.14.1. Digestija pepsinom u simuliranoj želudačnoj tečnosti	60
3.2.14.2. Digestija pankreatinom u simuliranoj intestinalnoj tečnosti.....	60
3.2.15. IgE-vezujuće osobine BLG-a i BLG-PCB-a.....	61

3.2.15.1. Western blot.....	61
3.2.15.2. Inhibicija vezivanja IgE antitela u ELISA testu	61
3.3. Ispitivanje kovalentnih interakcija proteina modifikovanih Trautovim reagensom i fikocijanobilina.....	62
3.3.1. Tiolovanje BSA, IgG antitela i ALA Trautovim reagensom.....	62
3.3.2. Određivanje ukupnog sadržaja slobodnih amino grupa tiolovanih proteina	63
3.3.3. Određivanje sadržaja slobodnih sulfhidrilnih grupa tiolovanih proteina.....	63
3.3.4. CD spektroskopija proteina modifikovanih Trautovim reagensom.....	63
3.3.5. Konjugacija proteina modifikovanih Trautovim reagensom sa fikocijanobilinom	64
3.3.6. Natrijum-dodecilsulfat i nativna poliakrilamidna gel elektroforeza (SDS-PAGE) proteina, prethodno tiolovanih Trautovim reagensom, konjugovanih sa fikocijanobilinom.....	64
3.3.7. CD spektroskopija BSA modifikovanog fikocijanobilinom.....	64
3.3.8. Vezivanje kvercetina za BSA kovalentno modifikovan fikocijanobilinom	64
3.3.9. Antioksidativna aktivnost BSA i BSA kovalentno modifikovanog fikocijanobilinom.....	65
3.3.10. Oksidacija BSA i BSA–PCB konjugata slobodnim radikalima	65
3.3.11. Imunološke osobine sekundarnih kozjih anti-zečjih antitela obeleženih fikocijanobilinom	66
3.3.11.1. Dot blot za proveru specifičnosti prepoznavanja antigena od strane fikocijanobilinom modifikovanih sekundarnih antitela	66
3.3.11.2. Dot blot za proveru osetljivosti prepoznavanja antigena od strane fikocijanobilinom modifikovanih sekundarnih antitela	66
3.4. Obrada dobijenih rezultata	67
4. Rezultati	68
4.1. Kovalentna modifikacija β -laktoglobulina fikocijanobilinom	68
4.1.1. Dodatak BLG-a povećava fluorescenciju PCB-a	68
4.1.2. Kinetika formiranja BLG–PCB adukta	68
4.1.3. PCB se kovalentno vezuje za BLG preko ostatka cisteina	69
4.1.4. Masena spektrometrija BLG–PCB adukta.....	71
4.1.5. Vezivanje PCB-a utiče na sekundarnu i tercijarnu strukturu BLG-a, uz promenu konformacije PCB-a	75
4.1.6. Uticaj pH na formiranje BLG–PCB adukta.....	76
4.1.7. Molekulski doking, molekulska dinamika i dirigovana molekulska dinamika	77
4.1.8. Antioksidativna svojstva BLG–PCB-a	79
4.1.8.1. Antioksidativna aktivnost BLG–PCB-a	79
4.1.8.2. Zaštitni efekat PCB-a na oksidaciju BLG-a indukovanu slobodnim radikalima.....	80
4.1.9. Karakteristike BLG–PCB-a nakon termičkog tretmana	80
4.1.9.1. Agregiranje BLG–PCB-a nakon zagrevanja pod blagim uslovima.....	81

4.1.9.2. Površinska hidrofobnost BLG-a i BLG-PCB-a	82
4.1.9.3. Promene sekundarnih struktura BLG-PCB-a nakon zagrevanja.....	83
4.1.9.4. Formiranje fibrilarnih struktura sličnih amiloidima zagrevanjem BLG-PCB-a	83
4.1.9.5. Termalna stabilnost BLG-PCB-a	84
4.1.10. Uticaj kovalentne modifikacije fikocijanobilinom na <i>in vitro</i> digestibilnost β -laktoglobulina...	85
4.1.10.1. Digestibilnost BLG-a i BLG-PCB adukta pepsinom.....	85
4.1.10.2. Digestibilnost BLG-a i BLG-PCB adukta pankreatinom.....	86
4.1.11. Uticaj kovalentne modifikacije PCB-om na IgE-vezujuće osobine BLG-a	86
4.2. Kovalentne modifikacije proteina fikocijanobilinom nakon modifikacije proteina Trautovim reagensom: albumin goveđeg seruma	87
4.2.1. Određivanje stepena tiolovanja BSA Trautovim reagensom.....	87
4.2.2. Efekti tiolovanja BSA Trautovim reagensom na terciarnu i sekundarnu strukturu proteina.....	87
4.2.3. Promene u oligomerizaciji BSA nakon tiolovanja Trautovim reagensom	88
4.2.4. Kovalentna modifikacija BSA modifikovanog Trautovim reagensom fikocijanobilinom.....	89
4.2.4.1. Priprema kovalentnih adukata fikocijanobilina i BSA modifikovanog Trautovim reagensom	90
4.2.5. Funkcionalne osobine BSA kovalentno modifikovanog fikocijanobilinom.....	91
4.2.5.1. Ligand-vezujuće osobine BSA-PCB konjugata	91
4.2.5.2. Antioksidativne osobine BSA-PCB konjugata	92
4.3. Kovalentne modifikacije proteina fikocijanobilinom nakon modifikacije proteina Trautovim reagensom: IgG antitela.....	93
4.3.1. Određivanje stepena tiolovanja humanih IgG antitela Trautovim reagensom.....	94
4.3.2. Efekti tiolovanja Trautovim reagensom na terciarnu i sekundarnu strukturu humanih IgG antitela	94
4.3.3. Promene u proteinskom profilu humanih IgG antitela nakon tiolovanja Trautovim reagensom...	95
4.3.4. Kovalentna modifikacija humanih IgG antitela modifikovanih Trautovim reagensom fikocijanobilinom	96
4.3.5. Kovalentna modifikacija sekundarnih IgG antitela modifikovanih Trautovim reagensom fikocijanobilinom	97
4.3.6. Imunološka reaktivnost sekundarnih IgG antitela modifikovanih fikocijanobilinom	98
4.4. Kovalentne modifikacije proteina fikocijanobilinom nakon modifikacije proteina Trautovim reagensom: α -laktalbumin	99
4.4.1. Efekti tiolovanja Trautovim reagensom na terciarnu i sekundarnu strukturu α -laktalbumina	99
4.4.2. Promene u proteinskom profilu α -laktalbumina nakon tiolovanja Trautovim reagensom	100
5. Diskusija.....	101
5.1. Kovalentna modifikacija β -laktoglobulina fikocijanobilinom	101

5.2. Kovalentne modifikacije proteina fikocijanobilinom nakon prethodne modifikacije Trautovim reagensom.....	107
5.2.1. Kovalentna modifikacija albumina goveđeg seruma fikocijanobilinom	108
5.2.2. Kovalentna modifikacija IgG antitela fikocijanobilinom	111
5.2.3. Kovalentna modifikacija α -laktalbumina fikocijanobilinom.....	114
6. Zaključci	116
7. Literatura.....	119

1. Uvod

Raznovrsnost strukturnih, katalitičkih i regulatornih funkcija proteina može se višestruko proširiti u cilju uvođenja novih funkcionalnih osobina, kao i povećanja stabilnosti ili, u slučaju enzima, aktivnosti proteina. Hemijske modifikacije proteina odvijaju se, uglavnom, zahvaljujući reaktivnim bočnim ostacima određenih aminokiselina. Nastali konjugati proteina i polipeptidnih i nepolipeptidnih molekula kombinuju osobine individualnih komponenti i imaju veliku primenu u industriji, medicini i istraživanju.

Predmet istraživanja ove doktorske disertacije je kovalentna modifikacija globularnih proteina fikocijanobilinom, bioaktivnom tetrapirolnom hromoforom C-fikocijanina (C-PC), glavnog proteina cijanobakterije *Arthrospira platensis*, komercijalno poznate kao Spirulina.

Spirulina je fotosintetska, filamentozna, spiralna cijanobakterija, koja ima značajno mesto u ishrani ljudi. Pored visokog sadržaja proteina i esencijalnih masnih kiselina, odlikuje je bogatstvo u pigmentima, vitaminima i makro- i mikroelementima. U prirodne pigmente algi spadaju i fikobilinski proteini (fikobiliproteini) - fluorescentni proteini intenzivnih boja, koje karakteriše prisustvo linearnih tetrapirolnih hromofora, fikobilina, koji su tioetarskom vezom vezani za cisteinski ostatak apoproteina. Glavni fikobiliprotein Spiruline je C-PC, plavo obojen protein, čija boja potiče od kovalentno vezane hromofore, fikocijanobilina (PCB). Ovaj intenzivno obojen protein ima veliki komercijalni značaj i upotrebljava se u industriji hrane, kozmetičkoj, farmaceutskoj i tekstilnoj industriji, gde nalazi primenu kao kolorant prirodnog porekla, kao i suplement u ishrani. Spirulina ispoljava i niz pozitivnih efekata po zdravlje ljudi, kao što su antioksidativna, inflamatorna, antikancerska, ali i druga bioaktivna svojstva, a ovi pozitivni efekti Spiruline pripisuju se upravo C-fikocijaninu i njegovoj hromofori PCB-u.

Osnovni cilj ove doktorske disertacije je eksperimentalna optimizacija uslova kovalentne modifikacije odabranih globularnih proteina PCB-om, bioaktivnom, fluorescentnom hromoforom C-PC-a, kao i strukturna i funkcionalna karakterizacija nastalih konjugata proteina i PCB-a. Bioaktivna svojstva s jedne strane, i izražene fluorescentne osobine sa druge strane, nude mogućnost eksploataisanja osobina PCB-a u dva različita pravca – u pravcu kovalentne modifikacije proteina hrane, u cilju dobijanja komponenti hrane sa poboljšanim funkcionalnim i tehnološkim svojstvima, i u pravcu iskorišćavanja fluorescentnih svojstava PCB-a, u cilju dobijanja novih fluorescentno obeleženih proba za upotrebu u tehnikama koje se baziraju na fluorescenciji. U tom smislu, kao model proteini za proteine hrane korišćeni su proteini hrane, β -laktoglobulin (BLG) i albumin goveđeg seruma (BSA), dok su poliklonska IgG antitela i α -laktalbumin (ALA) korišćeni kao model sistemi za obeležavanje proteina u cilju dobijanja novih fluorescentnih proba na bazi PCB-a. Korišćeni proteini mogli bi se istovremeno podeliti na one koji sadrže slobodnu sulfhidrilnu grupu u nativnom obliku, kao što su BLG i BSA, i one koji je ne sadrže, kao što su IgG antitela i α -laktalbumin.

Beta-laktoglobulin, glavni protein surutke, ima veliku primenu u industriji hrane, zbog svoje nutritivne vrednosti i izuzetnih tehno-funkcionalnih svojstava. Kako se poslednjih godina mnogo napora ulaže u razvoj novih sastojaka prehrambenih proizvoda sa poboljšanim funkcionalnim svojstvima, jedan od pristupa u dobijanju funkcionalne hrane podrazumeva upotrebu proteina kao transportnih sistema za prirodne bioaktivne komponente. Zbog svoje sposobnosti da nekovalentno i kovalentno vezuje brojne ligande, ali i zbog visoke rezistentnosti na digestiju pepsinom, BLG se često razmatra kao nosač bioaktivnih komponenti hrane. U tom smislu, ispitivanje mogućnosti kovalentne modifikacije BLG-a bioaktivnim tetrapirolom, koji ima dokazane pozitivne efekte na zdravlje ljudi, čini se interesantnim pristupom za proširivanje funkcije ovog značajnog proteina hrane. Kako BLG u svojoj strukturi poseduje slobodni reaktivni ostatak cisteina, a uzevši u obzir da se PCB vezuje za fikobilinske proteine preko ostatka cisteina i da ima mogućnost vezivanja i za druge molekule sa slobodnom tiolnom grupom, naša hipoteza je da je i BLG moguće kovalentno

modifikovati PCB-om, čime bi se otvorile nove mogućnosti za primenu ovog važnog proteina hrane. Kombinacijom spektroskopskih, elektroforetskih i tehnika masene spektrometrije, uz korišćenje *in silico* računarskih metoda, vezivanje PCB-a za BLG će biti detaljno okarakterisano. Budući da vezivanje bioaktivnih liganada može imati uticaj na strukturu proteina, što može imati uticaj i na njegova funkcionalna svojstva, jedan od definisanih ciljeva istraživanja predstavlja ispitivanje efekata kovalentne modifikacije BLG-a PCB-om na sekundarnu i tercijarnu strukturu proteina, kao i na funkcionalne osobine ovog proteina koje su relevantne za njegovu primenu u industriji hrane. Antioksidativne osobine, ponašanje pri zagrevanju, *in vitro* digestibilnost pepsinom i pankreatinom, kao i IgE-vezujuće osobine kovalentno modifikovanog BLG-a će biti ispitane i upoređene sa nemodifikovanim proteinom.

Albumin goveđeg seruma je jedan od najizučavanijih proteina i model protein u mnogim biohemijskim i biofizičkim studijama. To je monomerni, α -helikoidni globularni protein, najzastupljeniji protein plazme, koji ima ulogu u održavanju osmotskog pritiska i indirektno pH krvi. Albumin goveđeg seruma poseduje veliki broj vezivnih mesta za različite ligande, pa u cirkulaciji učestvuje u transportu brojnih endogenih i egzogenih supstanci. Zbog svoje biokompatibilnosti, biodegradabilnosti i velikog kapaciteta za vezivanje i hidrofilnih i hidrofobnih liganada, BSA se često razmatra i koristi kao nano-nosač lekova i bioaktivnih komponenti hrane. Modifikacijom BSA 2-iminotiolanom, poznatijim kao Trautov reagens, kojim se uvode slobodne sulfhidrilne grupe u molekul proteina, pokušaće se ostvariti uvođenje više od jednog molekula PCB-a u molekul proteina. Ispitivanjem uticaja tiolovanja proteina na strukturne i druge osobine BSA, odabraće se optimalan molarni odnos Trautovog reagensa za modifikaciju BSA, nakon čega će biti ispitana mogućnost kovalentne modifikacije tiolovanog molekula BSA PCB-om. U daljem toku istraživanja funkcionalne osobine tako dobijenog konjugata će biti ispitane i upoređene sa nemodifikovanim proteinom.

Intenzivna fluorescencija fikobiliproteina iskorišćena je kroz njihovu upotrebu kao fluorescentnih obeleživača, najčešće antitela, ali i drugih proteina. Imajući u vidu da izražena fluorescentna svojstva fikobiliproteina potiču od tetrapirolnih hromofora i činjenicu da, usled veličine fikobiliproteina, funkcionalna svojstva proteina koji je predmet fluorescentnog obeležavanja mogu biti izmenjena, sâm PCB se čini pogodnim, alternativnim kandidatom za primenu u fluorescentnom obeležavanju proteina. Uzevši navedeno u obzir, jedan deo ove disertacije bavi se ispitivanjem mogućnosti upotrebe fikocijanobilina kao fluorescentnog obeleživača proteina, i to proteina koji ne sadrže slobodni ostatak cisteina u nativnom obliku. Upotrebom Trautovog reagensa, uvešće se tiolna grupa u odabrane proteine koji u svojoj strukturi ne sadrže slobodnu tiolnu grupu, nakon čega će oni biti modifikovani PCB-om, čime se otvaraju nove perspektive za fluorescentno obeležavanje bilo kog proteina od interesa. Kao model proteini koristiće se poliklonska IgG antitela i α -laktalbumin.

Osim ključne uloge u imunom odgovoru, imunoglobulini (antitela) nalaze veliku primenu u istraživanju, medicini i industriji za specifičnu i osetljivu detekciju antigena od interesa. Kako bi mogla da se koriste za detekciju antigena, primarna ili sekundarna antitela je neophodno kovalentno modifikovati drugim signalnim molekulima, poput enzima, fluorofora, biotina i drugih. Kovalentna modifikacija antitela fluorescentnim PCB-om se stoga nudi kao moguća alternativa trenutno postojećim metodama za fluorescentno obeležavanje antitela. Optimalan molarni odnos Trautovog reagensa za modifikaciju sekundarnih, kozjih anti-zečjih, IgG antitela PCB-om biće izabran modifikacijom humanih IgG antitela različitim molarnim odnosima Trautovog reagensa, uz praćenje promena u sadržaju izloženih amino i sulfhidrilnih grupa i ispitivanje uticaja tiolovanja na strukturne osobine i promene u proteinskom profilu tiolovanih antitela. Specifičnost i osetljivost detekcije sekundarnih antitela modifikovanih PCB-om biće ispitana korišćenjem tropomiozina kao antigena.

Goveđi α -laktalbumin je mali, kalcijum-vezujući protein, koji u svojoj strukturi ne sadrži slobodnu tiolnu grupu, što ga čini pogodnim kandidatom za ispitivanje mogućnosti modifikacije PCB-om, nakon prethodnog uvođenja sulfhidrilnih grupa Trautovim reagensom. Efekti tiolovanja

na strukturne osobine ALA će biti ispitani, nakon čega će biti ispitana mogućnost kovalentne modifikacije ALA PCB-om.

Očekuje se da rezultati proistekli iz ove doktorske disertacije pruže nova saznanja o različitim aspektima kovalentne modifikacije proteina PCB-om, čime bi se otvorila vrata ka novim mogućnostima primene ovog interesantnog bioaktivnog molekula, koji poseduje izražena fluorescentna svojstva.

2. Opšti deo

2.1. Kovalentne modifikacije proteina

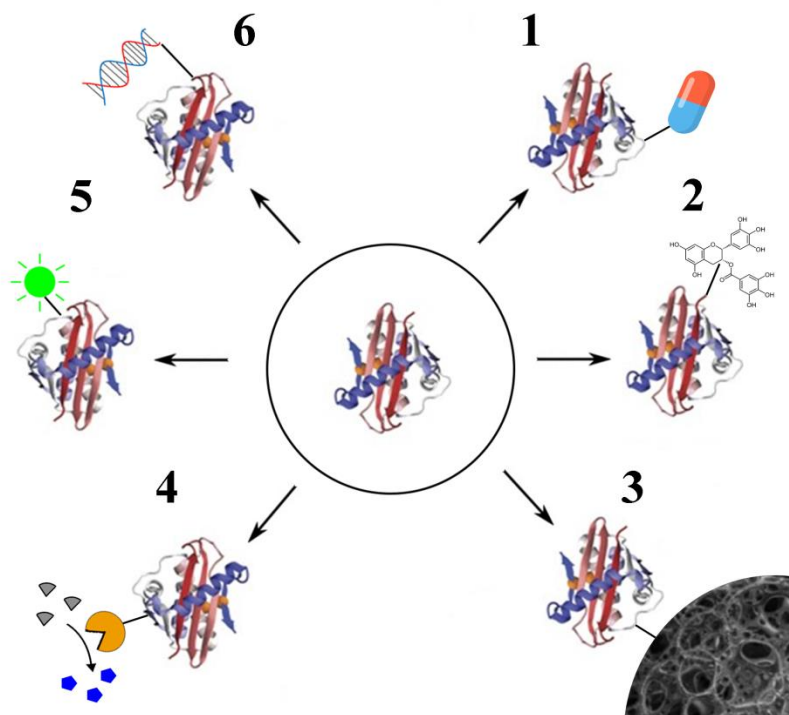
Proteini poseduju izuzetnu raznovrsnost strukturnih, katalitičkih i regulatornih funkcija, koje ostvaruju kroz 20 kanonskih aminokiselina koje ih izgrađuju. Međutim, funkcije proteina mogu se dodatno višestruko proširiti *in vivo* kroz enzimski katalizovane posttranslacione modifikacije aminokiselinskih ostataka, poput reakcija glikozilacije, lipidacije, fosforilacije, acetilacije, metilacije, ubikvitinacije i drugih, ali i kroz neenzimske reakcije glikozilovanja, karbonilacije, reakcije spontanog formiranja izopeptidnih veza (premda se one mogu formirati i enzimskim putem) i brojne druge reakcije (Jiang et al., 2018; McKerchar et al., 2019; Zhong et al., 2023).

Glikozilacija je najčešća i najraznovrsnija posttranslaciona modifikacija proteina, koja je zajednička svim eukariotskim ćelijama. Katalizovana je glikoziltransferazama, a zavisno od vrste bočnog lanca aminokiseline koja se modifikuje i ugljenohidratne komponente, razlikuju se N-glikozilacija, u kojoj se modifikuje bočni lanac asparagina, O-glikozilacija, u kojoj se modifikuju bočni ostaci serina, treonina i tirozina, C-glikozilacija, u kojoj se modifikuje ostatak triptofana, i glipiacija, kojom se glikofosfatidilinozitol preko fosfoetanolamina vezuje za C-terminus membranskih proteina (Schjoldager et al., 2020). Osim što doprinosi rastvorljivosti vanćelijskih proteina i čini ih stabilnijim na proteolizu, glikozilacija proteina igra ključnu ulogu u ćelijskom odgovoru na stimuluse iz vanćelijske sredine, kao i na rast i diferencijaciju ćelija, pa nije iznenađujuće da promene u sastavu šećerne komponente proteina mogu biti uključene u mnoge patofiziološke procese, poput autoimunosti, različitih inflamatornih stanja i kancera (Reily et al., 2019). Pored šećera, u molekulu proteina mogu da se nađu kovalentno vezani i drugi konstituenti. U membranskim proteinima su masne kiseline kovalentno vezane za određene amino, hidroksilne i sulfhidrilne grupe u obliku amida, estara i tioestara, obezbeđujući time veću solubilnost membranskih proteina u lipidnom dvosloju ćelijskih membrana (Jiang et al., 2018). Reverzibilna fosforilacija hidroksilnih grupa serina, treonina i tirozina proteina ima važnu ulogu u regulaciji aktivnosti mnogih enzima i regulatornih proteina, dok fosforilacija ostataka serina kazeina igra ulogu u vezivanju jona kalcijuma (Cross et al., 2005; Singh, 2011). (De)acetilacija i (de)metilacija ostataka arginina i lizina histona utiču na njihovo naelektrisanje i time na jačinu interakcije sa negativno naelektrisanim molekulom DNK, čime se indirektno reguliše transkripcija gena (Watson et al., 2008), dok metilacija bočnog ostatka lizina 72 citohroma c u nižim organizmima olakšava njegovo vezivanje za mitohondrije, zbog čega ima značajnu ulogu u procesu transporta elektrona (Polastro et al., 1978).

Osim kovalentnih modifikacija koje se dešavaju u organizmu, proteini se često *in vitro* kovalentno modifikuju drugim hemijskim grupama u cilju uvođenja novih funkcionalnih osobina, kao i povećanja stabilnosti i aktivnosti. Modifikacija se, uglavnom, odvija zahvaljujući reaktivnim bočnim ostacima određenih aminokiselina, ali i N- i C-terminalni krajevi molekula proteina mogu učestvovati u reakcijama konjugacije (Koniev i Wagner, 2015; Tamura i Hamachi, 2019). Nastali konjugati proteina i polipeptidnih i nepolipeptidnih molekula kombinuju osobine individualnih komponenti i imaju veliku primenu u industriji, medicini i istraživanju.

Konjugati proteina mogu, na primer, služiti kao stabilni i efikasni kancerski terapeutici na bazi monoklonskih antitela specifičnih za antigene eksprimirane na površini kancerskih ćelija. Modifikacijom bočnih ostataka cisteina i lizina ovih antitela bifunkcionalnim molekulom za koji je vezan antikancerski agens (poput antimitotskih agenasa monometil auristatina E i F i agenasa koji alkiluju DNK, kao što su duokarmicini) obezbeđuje se selektivno prepoznavanje kancerskih ćelija i duži polужivot konjugata u cirkulaciji, zahvaljujući stabilnosti molekula antitela (Tsuchikama et al., 2024). Konjugati polietilenglikolom (PEG)-modifikovanih proteina i polimera, poput konjugata antitumorskog hromoproteina neokarzinostatina i kopolimera stirena i maleinske kiseline, takođe imaju primenu kao terapeutici (Pelegri-O'Day et al., 2014). Građenje kovalentnih konjugata proteina/peptida i lekova u odnosu na nekovalentne komplekse obezbeđuje veću stabilnost leka,

produženo delovanje i primenu manjih doza leka (Gong et al., 2023; Vhora et al., 2015). Vakcine na bazi konjugata proteina i ugljenih hidrata koriste se za prevenciju bolesti koje izaziva *Haemophilus influenzae* tip B (Kelly et al., 2004), a glikozilacija igra važnu ulogu u fizičkoj i hemijskoj stabilnosti proteinskih terapeutika *in vitro* i *in vivo*, pa se manipulacijom stepena glikozilacije, veličine i strukture ugljenohidratne komponente može uticati na stabilnost i efikasnost konjugata (Solá i Griebenow, 2009). Sintetisani su i brojni novi materijali na bazi proteina za upotrebu u regenerativnoj medicini i tkivnom inženjeringu, poput kalupa i hidrogelova na bazi fibrina, keratina, kolagena i elastina (Choi et al., 2018). Karbonilna grupa redukjućih šećera može spontano, neenzimski, reagovati sa bočnim ostacima lizina i arginina u Majarovoj reakciji. U kompleksnoj reakcionoj kaskadi nastaju kasni proizvodi glikovanja, koji *in vivo* mogu imati ulogu u patogenezi hroničnih bolesti, poput dijabetesa, ateroskleroze i Alchajmerove bolesti. Međutim, ova reakcija se dešava i tokom termičke obrade hrane, a proizvodi Majarove reakcije odgovorni su za ukus, boju i miris termički obrađene hrane (de Oliveira et al., 2016). Kovalentni konjugati proteina hrane i polifenola imaju poboljšane antioksidativne i druge funkcionalne osobine (Liu et al., 2017). Bez upotrebe kovalentnih konjugata antitela i alkalne fosfataze ili peroksidaze ne može se zamisliti savremena imunološka dijagnostika (Hermanson, 2013), a kovalentni konjugati oligonukleotida i antitela primenjuju se za amplifikaciju signala sekundarnih antitela u imuno-PCR metodi, kojom se postiže izuzetno osetljiva detekcija i kvantifikaciju analita od interesa, poput proteina virusa (Monjezi et al., 2013) i alergena hrane (Radomirović et al., 2023). Imobilizacija enzima na čvrstim nosačima korišćenjem glutaraldehida je još jedan primer kovalentnog konjugata koji pruža široki spektar primena u industriji. Jedan od istaknutijih primera u ovoj oblasti je imobilizacija nitrilhidrataze umrežavanjem enzimskog agregata za industrijsku proizvodnju akrilamida iz akrilonitrila (van Pelt et al., 2008). Shematski prikaz nekih od navedenih *in vitro* kovalentnih modifikacija prikazan je na **Slici 1**.



Slika 1. Proteini se mogu kovalentno modifikovati u cilju dobijanja: 1) proteinskog terapeutika, 2) proteina sa kovalentno vezanom bioaktivnom komponentom hrane, 3) proteinskog imobilizata na nosaču od interesa, 4) konjugata proteina i enzima, 5) konjugata proteina i fluorofora ili 6) konjugata proteina i oligonukleotida.

Iz navedenog se može zaključiti da konjugati proteina i drugih molekula imaju višestruku primenu u mnogim oblastima. Optimizacijom uslova pripreme konjugata može se manipulirati njihovim fizičkim i hemijskim svojstvima, a time uticati i na funkcionalna svojstva konjugata, sve u cilju maksimalnog iskorišćenja svojstava interagujućih molekula. Kako strukturna svojstva proteina

direktno utiču na njihovu funkciju, jedan od glavnih izazova prilikom pripreme proteinskih konjugata je izvođenje hemijske reakcije modifikacije bez kompromitovanja native funkcije proteina. Metode funkcionalizacije proteina bi, u idealnim uslovima, trebalo da budu hemoselektivne, regiospecifične i da se odvijaju u nativnim uslovima, kako bi se sprečila denaturacija proteina. Reakcije biokonjugacije ne bi trebalo da budu osetljive na prisustvo kiseonika i redoks-aktivnih tiola, a uslovi pH i temperature sredine bi, idealno, trebalo da budu oko neutralne pH vrednosti i ambijentalne temperature. Osim toga, reakcija konjugacije treba da bude neosetljiva na prisustvo soli, koje su često neophodne za stabilnost proteina. Da bi se izbeglo agregiranje i precipitacija proteina pri visokim koncentracijama, reakcije modifikacije proteina najčešće se odvijaju u razblaženim vodenim rastvorima, pa je neophodno da korišćeni reagens bude kompatibilan ili makar delimično stabilan u vodenoj sredini. Ako je namena proteinskog konjugata koji se sintetiše upotreba u *in vivo* uslovima, neophodno je i da konjugat bude stabilan u plazmi i rezistentan na degradaciju enzimima. Dodatni faktori koji su bitni za reakcije biokonjugacije su reproducibilnost u pogledu stepena konjugacije i ireverzibilnost reakcije (Fischer et al., 2023). Pri odabiru metodologije biokonjugacije potrebno je voditi računa o reaktivnosti ciljanog aminokiselinskog ostatka i poziciji unutar molekula proteina (Koniev i Wagner, 2015). Smanjena reaktivnost uočava se kod bočnih ostataka aminokiselina koji se nalaze u unutrašnjosti proteina ili su na drugi način zaštićeni. U ovakvim slučajevima, stepen modifikacije može znatno da se poveća izvođenjem reakcije u prisustvu agenasa koji izazivaju denaturaciju proteina, kao što su urea i guanidin-hidrohlorid (Moinpour et al., 2020; Sakai et al., 2000). Međutim, u uslovima kada je neophodno da protein zadrži nativnu strukturu, korišćenje denaturišućih agenasa nije dobar izbor i reakcioni uslovi moraju biti biokompatibilni.

2.1.1. Hemijske reakcije modifikacija proteina

Od aminokiselina koje se nalaze u proteinima, one koje sadrže neku reaktivnu grupu podležu hemijskim reakcijama. Reaktivne grupe koje se nalaze u proteinima mogu da učestvuju u većem broju reakcija. Heteroatom azota, sumpora i kiseonika alifatičnih amina (bočni ostatak lizina i N-terminalna amino grupa), amida (bočni ostaci asparagina i glutamina), guanidino grupe arginina, hidroksilnih grupa serina i treonina, karboksilnih grupa bočnih ostataka asparaginske i glutaminske kiseline i one na C-terminusu, sulfhidrilne grupe cisteina i tioetarske grupe metionina ponašaju se kao nukleofili. Pored toga, i neke aromatične grupe mogu da se ponašaju kao heteroatomni nukleofili ili π -nukleofili, kao što su imidazolov prsten histidina, indolov prsten triptofana i fenolna grupa tirozina (Fischer et al., 2023). Većina reagenasa koji se primenjuju u proteinskoj biohemiji nije selektivna samo prema jednom tipu aminokiselina, već može reagovati sa više nego jednim aminokiselinskim ostatkom u molekulu proteina (Kjærsgaard et al., 2022). Selektivnost reagensa prema aminokiselinama je esencijalna za reakcije biokonjugacije, kako ne bi došlo do smanjenja ili gubitka funkcije proteina usled prekomerne modifikacije molekula proteina. Hemoselektivnost reakcije konjugacije se postiže pažljivim podešavanjem reakcionih uslova (Fischer et al., 2023). Kako se protonovani i deprotonovani oblik bočnih ostataka aminokiselina po pravilu međusobno znatno razlikuju u reaktivnosti, stepen modifikacije pojedinih bočnih ostataka zavisiće od njihovih pK_a vrednosti i pH reakcione smeše. Primera radi, haloacetati mogu reagovati sa bočnim ostacima cisteina, lizina, histidina i metionina. Reaktivnost sulfhidrilne grupe cisteina sa haloacetatima je najveća, dok reaktivnost drugih grupa zavisi od pH reakcione smeše: na niskom pH moguće je modifikovati ostatke metionina, jer njihova reaktivnost ne zavisi od pH; pod neutralnim uslovima, kada je amino grupa još protonovana, reaguje samo imidazolna grupa histidina, dok na višim pH vrednostima amino grupa najbrže reaguje (Gurd, 1967). Reaktivnost bočnih ostataka aminokiselina u proteinima može veoma da se razlikuje od reaktivnosti istih funkcionalnih grupa u malim molekulima, usled uticaja proteinske okoline na pK_a vrednosti pojedinih bočnih ostataka aminokiselina, kao i iz sternih razloga (Harms et al., 2009; Hermanson, 2013; Mehler et al., 2002).

Najveći broj reakcija konjugacija proteina odvija se preko reaktivnih bočnih ostataka lizina i cisteina, pa će u nastavku teksta fokus biti na modifikacijama upravo ovih aminokiselinskih ostataka.

2.1.2. Hemijske modifikacije bočnih ostataka lizina

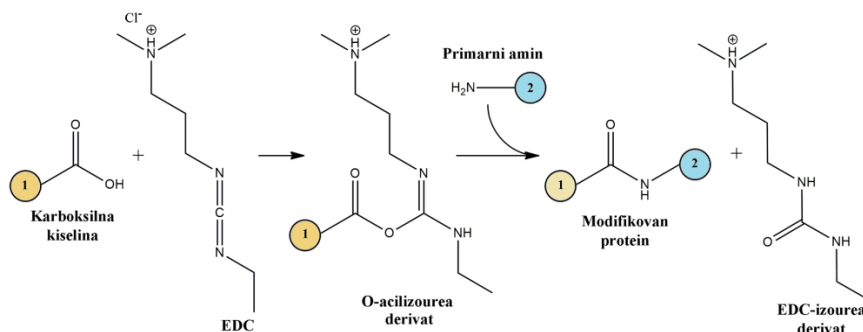
Korišćenje hemijskih grupa koje reaguju sa primarnim aminima jedna je od najstarijih tehnika za konjugovanje proteina, koja pruža veliki broj mogućnosti za konjugovanje različitih molekula reaktivnim prema amino grupama. Tradicionalne metode za modifikaciju proteina pretežno se oslanjaju na reakcije sa bočnim ostacima cisteina i lizina, dvema aminokiselinama koje su najnukleofilnije. Iako je bočni ostatak cisteina reaktivniji, ne sadrže svi proteini cisteine, pa su modifikacije amino grupe češće (Fischer et al., 2023).

Svi proteini sadrže primarne amino grupe u svojoj strukturi, koje mogu biti α -amino grupe na N-terminusu većine polipeptidnih lanaca i ϵ -amino grupe bočnih ostataka lizina (Lys, K), čija je zastupljenost u proteinima oko 6% (Pe'er et al., 2004). Kako su pK_a vrednosti ovih amino grupa oko 8 i 10 (za α - i ϵ -amino grupe, redom), u najvećem broju slučajeva ove amino grupe su protonovane na fiziološkim pH vrednostima i, prema tome, dominantno se nalaze na površini proteina, izložene rastvaraču. Kao takve, lako su dostupne za reakciju sa reagensima za konjugaciju (Koniev i Wagner, 2015). Usled velike zastupljenosti lizina u molekulu proteina, modifikacije lizinskih ostataka posebno su značajne u situacijama kada specifičnost reakcije nije ključna ili kada se teži većem stepenu modifikacije (Spicer i Davis, 2014). Deprotonovani primarni amini su najjači nukleofili među funkcionalnim grupama dostupnim u tipičnom molekulu proteina. Međutim, kako protonovanje drastično smanjuje njihovu nukleofilnost, uprkos većoj nukleofilnosti ϵ -amino grupe Lys za njeno deprotonovanje potrebna je veća pH vrednost, što je osnova za regulaciju reaktivnosti α - i ϵ - amino grupa podešavanjem pH vrednosti rastvora tokom reakcije konjugacije. Na visokim pH vrednostima, kada su oba tipa primarnih amina deprotonovana, bočni ostaci Lys su reaktivniji, dok je na nižim pH vrednostima reaktivnija N-terminalna α -amino grupa. Na pH vrednostima oko neutralnih se selektivno modifikuje N-terminalna amino grupa, dok su pH vrednosti od 8,5-9,5 optimalne za modifikaciju bočnih ostataka lizina (Koniev i Wagner, 2015). Slobodna sulfhidrilna grupa cisteinskih ostataka jači je nukleofil od primarnih amina i, ako je dostupna, takođe će reagovati sa većinom reagenasa reaktivnim prema aminima. Preferencijalna konjugacija sa aminima može se ostvariti upotrebom tvrdih elektrofila, kao što su aktivirani estri, sulfonil-hloridi ili izotiocijanati (Spicer i Davis, 2014). Osim sa cisteinom, reagensi reaktivni prema aminima, reagovaće i sa bočnim ostacima tirozina, serina i treonina, ako su prisutni u proteinu i dostupni za reakciju. Istovremeno, u vodenim rastvorima nemoguće je izbeći hidrolizu ovih reagenasa. Na brzinu sporednih reakcija, pored vrste proteina koji se modifikuje i agensa koji se konjuguje, utiču pH, temperatura i sastav pufera. Puferi koji sadrže slobodne amine, kao što je Tris, nisu pogodni za reakcije konjugacije u kojima se koriste reagensi reaktivni prema aminima, jer bi brzina reakcije sa puferom znatno premašila onu sa amino grupama proteina (Koniev i Wagner, 2015). Još jedan faktor koji treba uzeti u obzir je mikrokolina u molekulu proteina. Kako na nukleofilnost amino grupa u velikoj meri utiče mikrokruženje u molekulu proteina, pK_a vrednosti amino grupa mogu značajno varirati. Primera radi, pK_a vrednost amino grupe u aktivnom mestu acetoacetat-dekarboksilaze iznosi 5,9, što je za 4 pK_a jedinice manje od uobičajene pK_a vrednosti ϵ -amino grupe lizina (Westheimer i Schmidt, 1971).

Reakcije modifikacije amino grupa ostvaruju se korišćenjem različitih elektrofilnih hemijskih reagenasa, koji pripadaju jednoj od sledećih klasa jedinjenja: aktivirani estri (fluorofenil estri, N-hidroksisukcinimid (NHS) estri, sulfo-NHS estri, acil-azidi), izotiocijanati, izocijanati, aldehidi, anhidridi, sulfonil-hloridi, karbonati, fluorobenzeni, epoksidi i imidoestri (Koniev i Wagner, 2015). Najveći broj ovih reagenasa se vezuje za amino grupe brzim reakcijama acilovanja ili alkilovanja, kojima se dobijaju stabilni amidi ili sekundarni amini u velikom prinosu (Hermanson, 2013). Jedan od najpoznatijih primera jedinjenja koji se konjuguje preko ostatka lizina je gemtuzumab ozagamicin, prvi konjugat monoklonskog antitela i leka, koji je 2000. godine

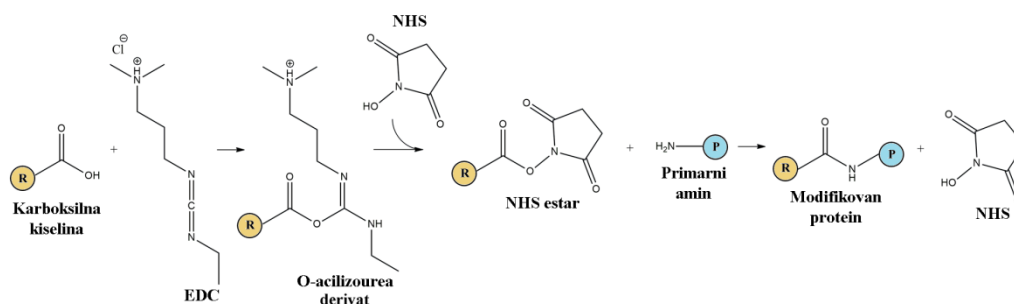
odobren od strane Uprave za hranu i lekove (FDA, od engl. *Food and Drug Administration*) za lečenje akutne mijeloidne leukemije. Ovaj konjugat je citotoksični agens iz klase kaliheamicina, koji se konjuguje za molekul anti-CD33 antitela acilovanjem bočnog ostatka lizina na površini antitela (Stasi et al., 2008). Za potrebe obeležavanja i umrežavanja proteina, NHS estri (i njihovi solubilniji analozi sulfo-NHS estri) i imidoestri su najkorišćenija jedinjenja i čine osnov velikog broja komercijalno dostupnih reagenasa za modifikaciju amina (Koniev i Wagner, 2015).

N-hidroksisukcinimid estri. Reagensi na bazi NHS estara imaju široku primenu u konjugovanju dva proteina ili kovalentnom obeležavanju (na primer, fluorescentnim molekulom ili biotinom) proteina ili peptida preko amino grupe. Počeli su da se koriste kao alternativa alkil-estrima, koji nisu podesni za reakcije sa amino grupama, jer su alkoksi grupe loše odlazeće grupe (Koniev i Wagner, 2015). NHS estri su reaktivne grupe koje nastaju u reakciji sa karboksilatima, u prisustvu karbodiimida. Reakcijom sa NHS-om, dolazi do aktivacije karboksilne grupe molekula (biotina, peptida, proteina ili fluorofore), koja potom reaguje sa primarnim aminom lizinskih ostataka proteina (Hermanson, 2013). Praktično svaki molekul koji ima karboksilnu grupu može se transformisati u NHS estar (Koniev i Wagner, 2015). Najčešće korišćen karbodiimid je u vodi rastvoran 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid (EDC). Naime, EDC u reakciji sa karboksilatima daje aktivirani O-acilizourea intermedijer, koji u reakciji sa primarnom amino grupom daje amid, uz oslobađanje sporednog EDC proizvoda u obliku rastvornog derivata uree (Slika 2).



Slika 2. Modifikacija amino grupe proteina karboksilnom kiselinom aktiviranom karbodiimidom.

Aktivirani O-acilizourea intermedijer je nestabilan u vodenim rastvorima, pa se za dobijanje stabilnog intermedijera u protokole za kuplovanje dodaje NHS, ili njegov u vodi rastvoran sulfo-analog, koji u reakciji sa O-acilizourea intermedijerom daje NHS-estar. NHS estri reaguju sa primarnim aminima u blago alkalnim uslovima (pH 7,2-9), uz oslobađanje N-hidroksisukcinimida (Slika 3) ili njegovog sulfonovanog analoga (Hermanson, 2013).

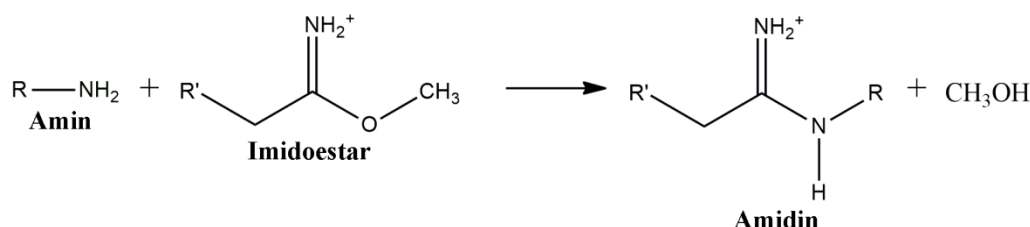


Slika 3. Modifikacija amino grupe proteina u reakciji sa NHS estrom.

Sulfo-NHS estri analogni su NHS estrima, s tom razlikom da sadrže sulfonatnu grupu na NHS prstenu. Za razliku od NHS estara koji se moraju rastvoriti u organskom rastvaraču pre dodavanja u vodeni rastvor, sulfo-NHS estri su rastvorni u vodi i stabilniji u vodenim rastvorima (Hermanson, 2013).

Reakcijom NHS estara sa sulfhidrilnom ili hidroksilnom grupom nastaju nestabilni tioestarski ili estarski konjugati, koji hidrolizuju u vodenoj sredini, pa se reagensi na bazi NHS estara smatraju specifičnim za ϵ -amino grupe lizina i α -amino grupu N-terminusa (Hermanson, 2013). Pažljivim podešavanjem pH vrednosti reakcione smeše, postiže se diferencijacija u pogledu modifikacije α - ili ϵ -amino grupa (Koniev i Wagner, 2015).

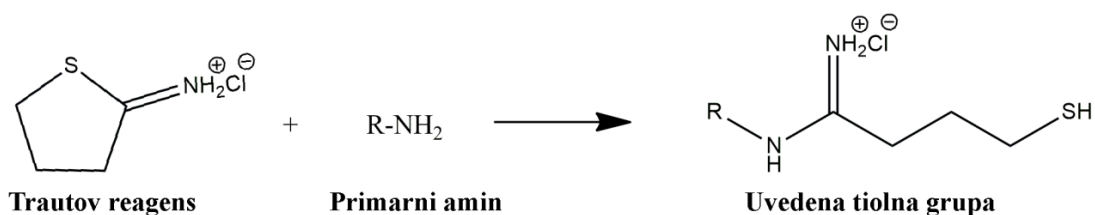
Imidoestri. Upotreba imidoestara (imidata) kao grupno specifičnih reagenasa za amino grupe proteina prvi put je ispitivana od strane Hantera i Ludviga, koji su ispitivali reakcije malih molekula (glicina, glicil-glicina i ϵ -kaproinske kiseline) i insulina sa metil-benzimidatom i metil-acetimidatom (Hunter i Ludwig, 1962). Međutim, tek 10 godina kasnije, sa sintezom 2-iminotiolana (kasnije nazvanog Trautov reagens), upotreba imidoestara za modifikacije amino grupa proteina doživljava ekspanziju. Imidoestri reaguju sa primarnim aminima, dajući imidoamide (amidine) u pH oblasti od 7-10, pri čemu je optimalna vrednost pH za reakciju od 8 do 9 (**Slika 4**). Za razliku od većine reagenasa, imidoestri pokazuju minimalnu reaktivnost prema drugim nukleofilnim grupama proteina (Hermanson, 2013). Specifičnost prema aminima postiže se reakcijom u alkalnim uslovima, korišćenjem pufera koji ne sadrže amine, kao što je boratni (Koniev i Wagner, 2015). Na kiselim pH vrednostima, amidinska veza je stabilna, dok je na povišenim pH vrednostima podložna hidrolizi (Hermanson, 2013).



Slika 4. Reakcija primarnog amina i imidoestra.

2.1.2.1. Trautov reagens

Trautov reagens, 2-iminotiolan (2-iminotetrahidrotiofen), jedan je od najkorišćenijih imidoestara, a ujedno i reagens koji je korišćen u ovoj disertaciji za uvođenje tiolnih grupa u proteine od interesa. To je ciklični tioimidat koji se primarno koristi za tiolovanje proteina, ali i drugih molekula koji sadrže slobodnu amino grupu (Hermanson, 2013). Premda je ranije opisivan kao metil-4-merkaptobutirimidat (Traut et al., 1973), imidoestar koji sadrži tiolnu grupu, kasnija istraživanja su pokazala da tokom hemijske sinteze dolazi do ciklizacije nastalog estera i formiranja stabilnog petočlanog prstena 2-iminotiolana (Jue et al., 1978). Trautov reagens spontano i efikasno modifikuje primarne amine u opsegu pH vrednosti od 7-9, ali je reaktivan i prema alifatičnim i aromatičnim hidroksilnim grupama, posebno na višim pH vrednostima. Ipak, brzina modifikacije hidroksilnih grupa je oko sto puta manja od brzine modifikacije amino grupa i ne odvija se u značajnom stepenu u prisustvu amino grupa (Hermanson, 2013). Meta modifikacije Trautovim reagensom su i α -amino grupa na N-terminalnom kraju proteina i ϵ -amino grupa lizinskih ostataka. Reakcijom primarnog amina sa Trautovim reagensom dolazi do otvaranja prstena 2-iminotiolana, čime nastaju derivati amidina koji sadrže slobodnu sulfhidrilnu grupu. Mehanizam reakcije tiolovanja proteina Trautovim reagensom prikazan je na **Slici 5**. Nastali tiolati omogućavaju dalje reakcije modifikacije proteina reagensima reaktivnim prema tiolima.



Slika 5. Reakcija primarnog amina i Trautovog reagensa.

Visoka specifičnost Trautovog reagensa prema primarnim aminima postiže se tiolovanjem u baznim uslovima i korišćenjem pufera koji ne sadrže amine, kao što je boratni (Koniev i Wagner, 2015). U poređenju sa drugim imidoestrima, Trautov reagens je stabilniji u vodenim rastvorima, pa je stepen hidrolize 2-iminotiolana na 7 °C u trietanolaminskom puferu, pH 8, zanemarljiv u odnosu na brzinu reakcije sa primarnom amino grupom glicilglicina ili glicinamida (Jue et al., 1978). Poluživot Trautovog reagensa se smanjuje sa povećanjem pH vrednosti rastvora, ali čak i u odsustvu primarnog amina, na pH 8 u 25 mM trietanolaminskom puferu, zanemarljiva je brzina nastajanja slobodne sulfhidrilne grupe (Hermanson, 2013). Kako se amidinacijom zadržava pozitivno naelektrisanje molekula proteina u blizini mesta modifikacije, modifikacija proteina etil-acetimidat-hidrohloridom ne dovodi do značajnih konformacionih promena koje bi mogle da izmene biološku aktivnost proteina, kao što je to pokazano na primeru zečjih antitela (Wofsy i Singer, 1963). Međutim, amidinacijom amino grupa proteina Trautovim reagensom, pored pozitivne amidinijum grupe uvodi se i slobodna sulfhidrilna grupa. Elektroforetska mobilnost proteina modifikovanih Trautovim reagensom je uglavnom nepromenjena u puferima pH vrednosti 8,6 koji sadrže 8 M ureu. Moguće manje promene elektroforetske mobilnosti usled parcijalne jonizacije –SH grupa se izbegavaju alkilovanjem uvedenih tiolnih grupa jodacetamidom (Traut et al., 1973). Tiolna grupa uvedena Trautovim reagensom podložna je oksidaciji i građenju disulfidne veze sa drugim tiolnim grupama, što bi moglo da dovede do neželjenog agregiranja i precipitacije proteina. Reakcija modifikacije se iz tog razloga izvodi u prisustvu metal-helirajućih agenasa, kao što je EDTA (0,01-0,1 M), kako bi se sprečila metal-katalizovana oksidacija sulfhidrilnih grupa (Hermanson, 2013).

Trautov reagens je prvi put sintetisan i upotrebljen 1973. godine za tiolovanje 30S subjedinice ribozoma *E. coli*, s ciljem da se identifikuju susedni ribozomalni proteini i mesta za vezivanje faktora inicijacije i elongacije na površini ribozoma. Uvođenjem sulfhidrilnih grupa, pored intramolekulskih disulfida, nastaju disulfidnom vezom povezani dimeri i viši oligomeri susednih proteina, a porast mase usled konjugacije detektuje se elektroforetski dijagonalnom poliakrilamidnom gel elektroforezom (Jue et al., 1978; Sommer i Traut, 1974; Traut et al., 1973). Analogan pristup primenjen je kasnije i za izučavanje topografije 50S subjedinice ribozoma (Kenny et al., 1979). Reagens je našao primenu u sintezi novih kopolimernih nanomaterijala za upotrebu kao vektora za transfekciju DNK (Kievit et al., 2009), konjugata monoklonskih antitela i demineralizovanog koštanog kolagenskog matriksa (Zhao et al., 2010), lipidnih nanočestica konjugovanih sa transferinom za isporuku malih interferirajućih RNK (Li et al., 2017), tiolovanih hidrogelova na bazi kolagena i želatina (Gajendiran et al., 2018) i konjugata goveđeg seruma albumina i nanočestica na bazi kopolimera ϵ -kaprolaktona i globalida za upotrebu u biomedicini (Guindani et al., 2019). Konjugati antitela i drugih proteina (streptavidina ili enzima) za upotrebu u imunološkim tehnikama mogu se dobiti reakcijom antitela tiolovanih Trautovim reagensom i proteina aktiviranog maleimidom (Hermanson, 2013; Hnasko, 2015).

2.1.3. Hemijske modifikacije bočnih ostataka cisteina

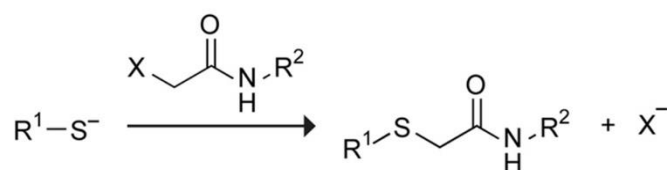
Cistein je, posle triptofana, druga po redu najmanje zastupljena aminokiselina u proteinima u sva tri domena organizama (bakterije, arheje, eukarioti) (Pe'er et al., 2004). Iako je malo zastupljen, cistein se često nalazi u funkcionalno bitnim mestima u različitim klasama proteina, poput proteaza, kinaza, metaboličkih enzima i transkripcionih faktora, u kojima obavlja značajne funkcije. Naime, reaktivni ostaci cisteina učestvuju u formiranju disulfidnih mostova, čime doprinose strukturnoj stabilnosti proteina, redoks-aktivni su, pa se nalaze u aktivnim centrima tiolnih oksido-reduktaza, ponašaju se kao nukleofili i donori protona u aktivnim centrima mnogih enzima, koordinuju jone metala, a podložni su i posttranslacionim modifikacijama (oksidacija, S-nitrozilacija, palmitoilacija i druge), kojima se reguliše aktivnost proteina *in vivo* (Pace i Weerapana, 2013). U proteinima se cistein nalazi u unutrašnjosti, što je posledica evolutivnog pritiska da se ostaci cisteina „uklone“ sa površine proteina usled njihove velike reaktivnosti (Marino i Gladyshev, 2010). Tiolna grupa cisteina je i redoks-aktivna i veoma nukleofilna zahvaljujući

velikom atomskom radijusu atoma sumpora i maloj energiji discocijacije S–H veze (Pace i Weerapana, 2013). Na nukleofilnost cisteina utiču pK_a vrednost i jonizacioni oblik tiolne grupe – tiolatni anjon cisteina je veoma reaktivan, dok je tiolni oblik inertniji, ali na nukleofilnost utiču i elektrostatičke interakcije između ostatka cisteina i susednih funkcionalnih grupa (Bulaj et al., 1998). Iako je pK_a vrednost cisteina izloženog rastvaraču oko 8, u zavisnosti od lokalnog mikrokruženja u molekulu proteina, pK_a vrednost ostatka cisteina može varirati u opsegu od 3,5 do 12 (Bak et al., 2019), pa tako, na primer, u albuminu humanog seruma pK_a vrednost sulfhidrilne grupe Cys34 iznosi oko 6,7, što je posledica blizine ostataka His39 i Tyr84 (Stewart et al., 2005).

Velika reaktivnost i mala zastupljenost cisteina u proteinima čine ga možda najpogodnijim kandidatom za reakcije konjugacije. U proteinima koji nemaju cistein, mesto-dirigovanom mutagenезom se može uvesti ostatak cisteina na unapred određenoj poziciji. U proteinima koji imaju slobodan ostatak cisteina, njihov broj je mnogo manji od ostataka lizina, zbog čega su reagensi aktivni prema tiolima poželjniji za reakcije konjugacije od onih koji su aktivni prema amino grupama (Koniev i Wagner, 2015). Primera radi, selektivna konjugacija preko tačno određenog ostatka cisteina iskorišćena je za specifičnu inhibiciju kinaza uključenih u nastanak kancera građenjem konjugata sa akrilamidnom funkcionalnom grupom lekova ibrutiniba, afatiniba, osimertiniba i neratatiniba (Chaikuad et al., 2018). Proteini koji imaju disulfidne mostove, a nemaju slobodnu sulfhidrilnu grupu u nativnim uslovima, mogu se redukovati ditiotreitolum (DTT-om), β -merkaptotanolom ili tris[2-karboksietil]fosfinom (TCEP), kako bi se dobila slobodna sulfhidrilna grupa za reakcije modifikacije (Koniev i Wagner, 2015). U tim slučajevima, važno je ukloniti višak neizreagovalog reagensa pre reakcije konjugacije gel-filtracijom, kako ne bi došlo do kompeticije funkcionalnih grupa reagenasa sa nastalim tiolima u molekulu proteina u reakciji sa konjugujućim agensom. Dodatni problem stvara osetljivost redukcionih agenasa, ali i novonastale slobodne sulfhidrilne grupe u molekulu proteina, na metal-katalizovanu oksidaciju, pa, kada je to moguće, potrebno je izvoditi reakciju konjugacije u atmosferi bez kiseonika i u prisustvu agenasa koji heliraju jone metala, kao što je EDTA (Hansen i Winther, 2009). Iako je sulfhidrilna grupa cisteina reaktivnija od amino grupa bočnih ostataka lizina, u hemijskim modifikacijama cisteina može doći do kompeticije između Cys i Lys. Kako se pK_a vrednosti sulfhidrilne grupe cisteina i ϵ -amino grupe lizina razlikuju za 3 pH jedinice, ovaj problem se delimično može prevazići podešavanjem pH vrednosti rastvora tako da reakcija modifikacije Cys bude favorizovana (Fischer et al., 2023).

Direktno obeležavanje slobodne sulfhidrilne grupe cisteina najčešće se postiže reakcijama nukleofilne adicije u kojima se cistein alkiluje odgovarajućim elektrofilima, kao što su α -halokarbonili i Majklovi akceptori, poput maleimida, vinil-sulfona i sličnih α,β -nezasićenih jedinjenja. Drugi tip reakcije u kojoj učestvuje ostatak cisteina su reakcije izmene disulfida sa drugim jedinjenjima koja sadrže tiolatni anjon koji se ponaša kao nukleofil (Koniev i Wagner, 2015).

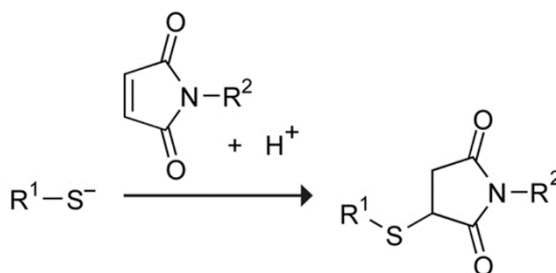
α -halokarbonili. Modifikacijom sulfhidrilne grupe cisteina α -halokarbonilima nastaju alkilovani derivati cisteina (Slika 6). Kako je jodidni anjon najbolja odlazeća grupa među halogenima, najčešće se u reakcijama alkilovanja cisteina koriste α -jodokarbonili, kao što je 2-jodacetamid, često korišćeni alkilujući agens u proteomici. Umreživači koji sadrže jodacetil grupu u osnovi su mnogih komercijalno dostupnih reagenasa za obeležavanje proteina, kao što su reagensi za biotinilovanje proteina i obeleživači cisteina za upotrebu u masenoj spektrometriji.



Slika 6. Alkilovanje sulfhidrilne grupe cisteina reakcijom sa haloacetamidima.

Iako odgovarajući reagensi na bazi maleimida brže reaguju sa cisteinima, konjugacije posredovane haloacetil- grupom su pogodnije u uslovima kada je stabilnost i kompaktna veličina uvedenog povezivača (linkera) ključna (Koniev i Wagner, 2015).

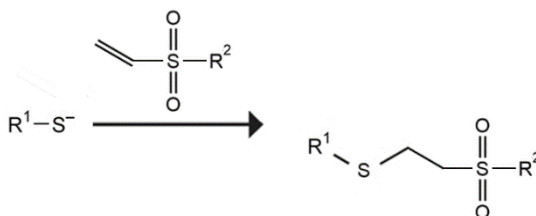
Maleimidi. Imidi maleinske kiseline (maleimidi) su najčešće korišćeni reagensi u reakcijama konjugacija proteina. Glavni razlog tome je izuzetna brzina reakcije na ambijentalnoj temperaturi i značajno visoka selektivnost prema ostacima cisteina u molekulu proteina (Koniev i Wagner, 2015). U reakciji sa maleimidima dolazi do Majklove adicije tiolata, pri čemu nastaju sukcinimidil tioetri (**Slika 7**) (Kalia i Raines, 2010). Optimalni uslovi za konjugaciju posredovanu maleimidima je pH reakcione smeše oko neutralnih vrednosti (6,5-7,5), čime se sprečava sporedna reakcija maleimida sa aminima (Koniev i Wagner, 2015). Od posebnog značaja u biohemiji su heterobifunkcionalni reagensi na bazi maleimida i NHS estara, koji služe za umrežavanje dva proteina. Reakcijom sa N-hidroksisukcinimid estarskim delom reagensa se modifikuju ostaci lizina jednog proteina, a maleimidnim delom reagensa se ovaj konjugat povezuje sa drugim proteinom preko slobodne sulfhidrilne grupe (Yoshitake et al., 1982). Nepoželjni aspekt upotrebe konjugata na bazi maleimida je podložnost njihove imido grupe spontanoj, ireverzibilnoj hidrolizi, posebno na pH vrednostima iznad 8, i mogućnost reakcije sa drugim jedinjenjima koja sadrže tiole, zbog čega proizvodi konjugacije mogu biti heterogeni, pa se poslednjih godina radi na razvoju alternativnih reagenasa reaktivnih sa cisteinima koji se modifikuju u reakcijama Majklove adicije (Ahangarpour et al., 2023).



Slika 7. Alkilovanje sulfhidrilne grupe cisteina reakcijom sa maleimidima.

Selektivnost α -halokarbonila i maleimida prema cisteinu je smanjena pri visokim koncentracijama reagenasa, jer nukleofilni ostaci histidina i lizina mogu takođe biti kovalentno modifikovani pri tim uslovima. Za razliku od njih, disulfidni reagensi pokazuju specifičnost prema tiolima (Kalia i Raines, 2010).

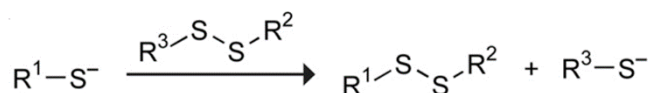
Vinil-sulfoni. Vinil-sulfoni (α,β -nezasićeni sulfoni) usled elektron-akceptorskih svojstava sulfona mogu da reaguju sa nukleofilima, kao što je sulfhidrilna grupa cisteina, u reakciji Majklove 1,4-adicije (**Slika 8**). Odsustvo sporednih proizvoda, formiranje stabilnih adukata i mogućnost odvijanja reakcije u fiziološkim uslovima čini ih pogodnim za reakcije modifikacije cisteina (Ahangarpour et al., 2023). Sporedna reakcija vinil-sulfona sa lizinima primećena je samo na pH vrednostima većim od 9,3 (Koniev i Wagner, 2015).



Slika 8. Modifikacija sulfhidrilne grupe cisteina reakcijom sa vinil-sulfonima.

Disulfidi. Najjednostavnija reakcija modifikacije cisteina je reakcija sa drugim molekulom koji sadrži slobodnu tiolnu grupu. Mala brzina reakcije i potreba za upotrebom reagensa u velikom višku, kako bi se smanjila mogućnost dimerizacije proteina, smanjuju primenljivost ovog pristupa u reakcijama biokonjugacije, pa je češći pristup reakcija sa disulfidima u reakciji tiol-disulfidne

izmene (Chalker et al., 2009). U povratnoj reakciji dolazi do nukleofilnog napada tiolata cisteina na disulfidnu vezu reagensa, raskidanja S–S veze i formiranja novog mešovito disulfida (**Slika 9**). Najpoznatiji primer ove reakcije je kolorimetrijska kvantifikacija slobodnih sulfhidrilnih grupa u reakciji sa Elmanovim reagensom (Ellman, 1959). Upotrebom aktiviranih tiola sa dobrim odlazećim grupama, kao što su tiosulfati (R–S–SO₃[–]), tiosulfonati (R–S–SO₂–R'), sulfenil-halidi (R–S–X) i piridil-disulfidi, pomera se ravnoteža reakcije u smeru nastanka proizvoda (Koniev i Wagner, 2015).



Slika 9. Modifikacija sulfhidrilne grupe cisteina reakcijom sa disulfidima.

U literaturi su opisane i druge reakcije modifikacije sulfhidrilne grupe cisteina u reakcijama biokonjugacija, poput radikalskog hidrotiolovanja terminalnih alkena i alkina (tiol-en i tiol-in kuplovanja), ali i mnoge druge, čiji se pregled može naći u brojnim revijskim radovima (Ahangarpour et al., 2023; Chalker et al., 2009; Fischer et al., 2023; Koniev i Wagner, 2015).

2.2. Kovalentne modifikacije proteina hrane

Proteini hrane su česta meta kovalentnih modifikacija. Savremeni način ishrane teži razvoju novih sastojaka prehrambenih proizvoda sa poboljšanim funkcionalnim osobinama, takozvane funkcionalne hrane, upotrebom fizičkih, hemijskih ili enzimskih tretmana. Jedan od pristupa u dobijanju funkcionalne hrane podrazumeva upotrebu proteina hrane kao transportnih sistema za inkorporisanje i efikasnu dostavu prirodnih bioaktivnih komponenti hrane, a interakcije između proteina hrane i bioaktivnih molekula mogu se ostvariti nekovalentnim interakcijama i kovalentnim vezama.

Kovalentne modifikacije proteina hrane mogu poboljšati, ali i proširiti funkcionalna svojstva proteina modifikacijom bočnih ostataka aminokiselina bioaktivnim molekulima. Možda najpoznatiji primer kovalentne modifikacije proteina hrane je Majarova reakcija, odnosno reakcija neenzimske glikozilacije proteina u kojoj bočni ostaci lizina i arginina reaguju spontano sa karbonilnom grupom redukujućih šećera. Do ove reakcije dolazi prilikom zagrevanja hrane, a Majarovi proizvodi su odgovorni za senzorne osobine hrane (ukus, boja, miris). Glikovanjem proteina pod kontrolisanim uslovima pH, temperature i dužine reakcije se može sprečiti nekontrolisano odvijanje reakcije i nastanak naprednih proizvoda glikovanja koji mogu imati antinutritivne osobine. Time se u kontrolisanim uslovima, osim poboljšanja organoleptičnih osobina hrane, mogu povećati rastvorljivost proteina, termalna stabilnost, emulgujuće osobine, antioksidativna i antimikrobna aktivnost glikovanih proteina u odnosu na nemodifikovane proteine (de Oliveira et al., 2016). Međutim, pored šećera, i brojni drugi molekuli, poput vitamina, koloranata, polifenola, organosumpornih molekula, bioaktivnih peptida i drugih bioaktivnih molekula, mogu spontano ili enzimski reagovati sa proteinima hrane (Liu et al., 2017; Quan et al., 2019; Zeeb et al., 2014).

Kovalentni konjugati proteina hrane i drugih komponenti hrane su, u najvećem broju slučajeva, ireverzibilni i kao takvi su, u poređenju sa nekovalentnim kompleksima proteina i bioaktivnih komponenti, mnogo stabilniji i manje osetljivi na promene pH i temperature do kojih dolazi prilikom procesovanja hrane, a nastali konjugati zadržavaju osobine oba molekula. U slučaju konjugata polifenola i proteina, nastali konjugat poseduje emulgujuće osobine proteina i antioksidativne osobine polifenola (Liu et al., 2017; Liu et al., 2016a). S druge strane, kovalentni konjugati proteina i polisaharida imaju poboljšanu rastvorljivost u odnosu na nemodifikovani protein, zahvaljujući prisustvu polisaharidne komponente (Wu et al., 2022). Osim što poboljšavaju i proširuju tehnofunkcionalna svojstva samih proteina, modifikacije proteina hrane su značajne i sa aspekta zaštite bioaktivnih molekula od uslova kojima su izloženi prilikom prerade, skladištenja i transporta hrane (toplota, svetlost, prisustvo kiseonika). Mnoge bioaktivne molekule odlikuje i mala

rastvorljivost u fiziološkim uslovima i nestabilnost u gastrointestinalnom traktu, što dalje utiče na njihovu biodostupnost, a time i biološku aktivnost (McClements et al., 2009). Karakterističan primer su polifenoli, sekundarni metaboliti mnogih biljaka, poznati po svojim izvanrednim antioksidativnim osobinama, kojima se pripisuju brojni kardioprotektivni, antimikrobni, antikancerski, neuroprotektivni i drugi povoljni efekti. Međutim, zbog velikog broja fenolnih grupa, polifenoli su nestabilni na svetlosti, pri povišenoj temperaturi i u baznoj sredini, što smanjuje njihovu biodostupnost (Oliver et al., 2016). Usled toga se intenzivno radi na razvoju novih nano- i mikro- sistema za enkapsuliranje i efikasnu dostavu polifenola, ali i drugih bioaktivnih molekula, pri čemu su proteini izvanredni nosači bioaktivnih komponenti hrane zbog svoje biokompatibilnosti (Visentini et al., 2023). Korišćenjem proteina kao nosača bioaktivnih komponenti hrane se tako može uticati na stabilnost liganada i njihove senzorne osobine, kao što su miris i ukus (Liu et al., 2017; McClements et al., 2009).

Formiranje kovalentnih konjugata proteina hrane i drugih biomolekula može se ostvariti korišćenjem enzima ili spontano, odnosno neenzimski. Enzimski pristupi se zasnivaju na korišćenju enzima poput transglutaminaza, polifenol-oksida (lakaze i tirozinaze), sulfhidril-oksida, glukozo-oksida, lipooksigenaza, peroksida i lizil-oksida. Enzimski katalizovane reakcije odlikuje visoka specifičnost i odvijanje reakcije u blagim uslovima sredine (Mariniello et al., 2014; Wu et al., 2022; Zeeb et al., 2014). Transglutaminaze, na primer, katalizuju formiranje izopeptidnih veza između bočnih ostataka glutamina proteina i ϵ -amino grupe lizina drugog proteina ili drugih jedinjenja koja sadrže primarne amino-grupe, poput polisaharida hitozana ili aminovanog alginata i aminovanog pektina (Mariniello et al., 2014). Kovalentnim konjugovanjem aminovanih polisaharida alginata i pektina za proteine soje dejstvom transglutaminaze dobijaju se jestivi umreženi biofilmovi poboljšanih mehaničkih osobina koji duže zadržavaju vodu (Di Pierro et al., 2010). U poređenju sa nemodifikovanim proteinima, konjugati polisaharida i proteina dobijeni dejstvom transglutaminaza, lakaza i peroksida imaju povećanu rastvorljivost, grade stabilnije emulzije i gelove koji bolje zadržavaju vodu i imaju poboljšane mehaničke osobine (Wu et al., 2022). Oksidacijom malih fenolnih jedinjenja, kao što su kofeinska ili hlorogena kiselina, i ostataka tirozina proteina vune tirozinazama omogućava se njihova međusobna hemijska reakcija, odnosno kovalentno vezivanje pomenutih antioksidanata za proteine vune. Ovime se povećava antioksidativna aktivnost vlakana vune (Jus et al., 2008). Enzimski katalizovane reakcije imaju i izvesna ograničenja. Na primer, za oksidacije proteina posredovane tirozinazama neophodno je da fenolni ostatatak tirozina bude lako dostupan, što kod globularnih proteina koji imaju kompaktnu strukturu nije slučaj (Mariniello et al., 2014).

Pored enzimski katalizovanih reakcija, proteini hrane se mogu kovalentno modifikovati i hemijski. Posle konjugata ugljenih hidrata i proteina nastalih Majarovom reakcijom, možda najizučavaniji su konjugati prethodno spomenutih fenolnih jedinjenja, koji, osim u enzimski katalizovanim reakcijama, mogu nastati u alkalnim uslovima ili slobodno-radikalnim mehanizmom. Zbog svoje hemijske strukture, polifenoli su veoma reaktivna jedinjenja koja se lako mogu oksidovati. U baznoj sredini (pH 9) u prisustvu kiseonika dolazi do oksidacije fenolnih grupa polifenola i formiranja semihinonskih radikala, koji zatim daju o-hinone. Ovi reaktivni intermedijerni proizvodi potom reaguju sa nukleofilnim bočnim ostacima lizina, cisteina, metionina i triptofana. U slobodno-radikalnim reakcijama, bočni ostaci aminokiselina se najpre oksiduju hidroksi-radikalima, generisanim reakcijom askorbinske kiseline i vodonik-peroksida. U sledećoj fazi, radikali na molekulu proteina reaguju sa polifenolima, formirajući kovalentnu vezu (Quan et al., 2019). Kovalentne modifikacije proteina polifenolima utiču na njihove fizičko-hemijske (rastvorljivost, termalna stabilnost, površina aktivnost, geliranje, antioksidativna aktivnost) i nutritivne osobine (digestibilnost, biodostupnost) (Ćirković Veličković i Stanić-Vučinić, 2018; Keppler et al., 2020; Liu et al., 2017; Ozdal et al., 2013; Quan et al., 2019). Mada kovalentne modifikacije oksidovanim polifenolima mogu negativno da utiču na osobine proteina, smanjujući im rastvorljivost (Kroll et al., 2000; Rawel et al., 2000, 2001), savremeni trendovi u industriji hrane teže da finim podešavanjem uslova prisutnih tokom procesovanja hrane eksploatišu pozitivne efekte

polifenola. U skladu sa tim, pokazano je da konjugovanje hlorogene kiseline ili (–)-epigallocatehin-3-galata (EGCG) za laktoferin smanjuje površinsku hidrofobnost laktoferina i sprečava njegovo termalno agregiranje u neutralnim uslovima, pri čemu konjugat sa hlorogenom kiselinom pokazuje bolju termalnu stabilnost od onog sa EGCG-om (Liu et al., 2016b). Najčešće opisivan pozitivan efekat dobijen konjugacijom fenolnih jedinjenja sa proteinima je povećana antioksidativna aktivnost konjugata u odnosu na nemodifikovani protein. Kovalentni konjugati proteina i polifenola smatraju se efikasnim emulgatorima, koji ujedno mogu da spreče oksidaciju emulzija. Primer je kovalentni konjugat ovalbumina i katehina, koji inhibira lipidnu oksidaciju emulzije ribljeg ulja (Feng et al., 2018). Slično tome, konjugat BSA i kofeinske kiseline štiti rezveratrol od oksidacije efikasnije nego sam BSA (Fan et al., 2018a). U literaturi su opisani i primeri ternarnih konjugata proteina, polifenola i ugljenih hidrata. U studiji Lijua i saradnika, ternarni konjugat koji se sastojao od laktoferina, hlorogene kiseline i glukoze ili polidekstroze pripremljen je alkalnim tretmanom i Majarovom reakcijom, sa idejom da proteinska komponenta konjugata omogući površinsku aktivnost, ugljenohidratna fizičku stabilnost, a hlorogena kiselina antioksidativnu aktivnost. Ovaj ternarni konjugat pokazao je dobre emulgujuće osobine, a istovremeno je inhibirao razgradnju enkapsuliranog β -karotena (Liu et al., 2016a). Iako kovalentna modifikacija fenolnim jedinjenjima može povoljno uticati na brojna funkcionalna svojstva proteina, ona u nekim slučajevima može negativno uticati na digestibilnost i biodostupnost proteina hrane. Naime, pokazano je da derivatizacija proteina surutke fenolnim jedinjenjima smanjuje *in vitro* digestiju tripsinom, himotripsinom, pepsinom i pankreatinom. Negativan uticaj na digestiju tripsinom posledica je modifikacije bočnih ostataka lizina fenolnim jedinjenjima, a efekat na digestibilnost pepsinom, enzimom male specifičnosti, očekivano je manji nego na digestibilnost ostalim enzimima i pripisuje se strukturnim promenama modifikovanih proteina (Rawel et al., 2001). Međutim, kovalentna modifikacija proteina fenolnim jedinjenjima može i povećati *in vitro* digestibilnost proteina, kao što je slučaj sa digestijom tripsinom, himotripsinom i pankreatinom modifikovanih proteina soje (Rawel et al., 2002) i digestijom ovalbumin-EGCG konjugata pepsinom i kombinacijom pepsina i pankreatina (He et al., 2019). Pored toga, u studiji Lua i saradnika pokazano je da kovalentni konjugat hlorogene kiseline i ovalbumina, osim što ima veću antioksidativnu aktivnost u odnosu na nemodifikovani ovalbumin, pokazuje manje prepoznavanje od strane IgE antitela iz seruma pacijenata alergičnih na jaja, kao i niži nivo aktivacije bazofila (Lu et al., 2018).

Elektrofilna organosumporna jedinjenja, prisutna u belom luku, slačici i vlašcu, takođe mogu kovalentno modifikovati proteine hrane (Keppler et al., 2020). Izotiocijanati i alil-sulfidi su dve klase reaktivnih, bioaktivnih organosumpornih jedinjenja za koje je pokazano da mogu kovalentno modifikovati proteine surutke (Keppler et al., 2017; Keppler i Schwarz, 2017; Rade-Kukic et al., 2011; Wilde et al., 2016a, 2016b, 2016c), albumin goveđeg seruma (Nakamura et al., 2009), ovalbumin (Kawakishi i Kaneko, 1987) i druge proteine (Keppler et al., 2020). Reakcija alil-sulfida, poput alicina i dialil-sulfida, se dešava preko sulfhidrilne grupe cisteina iz proteina, uz nastanak disulfidne veze, a brzina reakcije se povećava sa povećanjem pH vrednosti reakcije (Wilde et al., 2016a). S druge strane, elektrofilni atom ugljenika izotiocijanata, proizvoda enzimske hidrolize glukozinolata, sekundarnih metabolita biljaka, gradi tiokarbamoil adukte sa tiolima ili adukte tiouree sa amino grupama proteina. Tiokarbamoil adukti su nestabilni u baznoj sredini, pa, iako nastaju prvi, dolazi do oslobađanja izotiocijanata i reakcije sa amino grupama proteina, posebno na višim pH vrednostima (Kühn et al., 2018; Nakamura et al., 2009). Modifikacije proteina hrane organosumpornim jedinjenjima mogu imati različite efekte na strukturne i tehno-funkcionalne osobine proteina. Na primer, kovalentnom modifikacijom izolata proteina surutke alil-izotiocijanatom povećava se površinska hidrofobnost proteina, smanjuje pI vrednosti proteina i smanjuje uređenost proteina (Keppler et al., 2017), što doprinosi boljim emulgujućim osobinama na kiselim pH vrednostima (Keppler i Schwarz, 2017). Obogaćivanje namirnica konjugatom proteina i organosumpornih jedinjenja se razmatra kao način za smanjenje negativnih organoleptičnih osobina povezanih sa ovim jedinjenjima, koje bi, uprkos njihovim bioaktivnim svojstvima, mogle da utiču na konzumaciju hrane koja ih sadrži. Naime, Vajld i saradnici sugerišu da bi dodavanje konjugata

alicina, iz belog luka, i proteina hladnim napicima od kafe moglo da poboljša senzorne osobine povezane sa konzumiranjem belog luka (Wilde et al., 2016b). Nestabilnost alicina na pH vrednostima iznad 6, na visokim temperaturama i u prisustvu lipida je uzrok njegove brze degradacije tokom obrade i skladištenja hrane (Lee et al., 2014), pa je formiranje konjugata sa proteinima ujedno način za smanjenje degradacije alicina (de Vos et al., 2010). Istovremeno, kovalentna modifikacija alicinom povećava temperaturnu stabilnost β -laktoglobulina (Wilde et al., 2016b).

2.2.1. Beta-laktoglobulin

Beta-laktoglobulin (BLG) je glavni protein surutke preživala, ali je prisutan i u mleku drugih, mada ne svih, vrsta sisara. Naime, mleko glodara, dvozubaca i ljudi ne sadrži BLG. Česte su genetske varijante gena koji kodira BLG, posebno kod krava, ali je kod nekoliko vrsta nepreživala, kao što su konji i mačke, zabeleženo i prisustvo dva različita gena koji kodiraju BLG (Kontopidis et al., 2004). BLG se sintetise u sekretornim epitelnim ćelijama mlečnih žlezdi pod kontrolom prolaktina (Sawyer, 2003). Za razliku od drugog glavnog proteina surutke, α -laktalbumina, koji reguliše proizvodnju laktoze modulacijom enzimske aktivnosti laktozo-sintaze (Permyakov, 2020), BLG nema jasnu funkciju. BLG pripada lipokalinskoj familiji proteina koja ima raznovrsne uloge, od kojih je najčešća ligand-vezujuća (Flower et al., 2000). Sposobnost BLG-a da vezuje i transportuje lipofilna jedinjenja bi mogla da bude fiziološki razlog za veliku zastupljenost ovog proteina u mleku (domaća krava proizvodi 2-3 grama BLG-a po litru mleka, zavisno od rase, ishrane i faze laktacije). Poređenjem sekvenci proteina lipokalinske familije, utvrđeno je da je glikodelin, protein prisutan u humanom endometriju tokom rane faze trudnoće, najbliži BLG-u. Iako funkcija glikodelina nije u potpunosti razjašnjena, zna se da je u pitanju protein koji je esencijalan za fetalni razvoj. Pretpostavka je da je uloga BLG-a analogna ulozi glikodelina, u smislu da je u pitanju protein koji je u nekom aspektu uključen u razvoj. Smatra se da je primarna uloga BLG-a nutritivna i da je ova funkcija nastala kao rezultat duplikacije gena koji kodira za fiziološki esencijalan glikodelin. Neke vrste, poput glodara i ljudi, su izgubile funkciju ovog gena formiranjem pseudogena. Dodatne uloge BLG-a, poput vezivanja liganada i antimikrobnog dejstva, iako korisne, smatraju se sekundarnim u odnosu na njegovu nutritivnu ulogu (Kontopidis et al., 2004).

2.2.1.1. Govedi β -laktoglobulin

BLG je najzastupljeniji protein surutke mleka većine sisara. Čini oko 10% ukupnih proteina kravljeg mleka i oko 50% proteina surutke (Edwards i Jameson, 2014). Često se koristi kao aditiv u industriji hrane zbog svoje visoke nutritivne vrednosti, rastvorljivosti u širokom opsegu pH vrednosti i mnogih poželjnih tehnofunkcionalnih osobina. Naime, BLG pokazuje sposobnost geliranja, čime daje strukturu hrani, a pored sposobnosti da vezuje vodu, istovremeno poseduje odlične emulgujuće i osobine penjenja (Boland, 2011; Singh, 2011). BLG poseduje najmanje dva mesta za vezivanje liganada, za koja je u prethodnim studijama pokazano da mogu simultano da vezuju različite ligande, kao što su retinol, masne kiseline, holesterol i fenolna jedinjenja (Teng et al., 2015). Visoka rezistentnost na digestiju pepsinom je još jedna bitna osobina BLG-a, koja ga, uz sposobnost vezivanja brojnih liganada, čini stabilnim nosačem za integraciju bioaktivnih komponenti hrane i njihovo kontrolisano oslobađanje u gastrointestinalnom traktu. Osim toga, i sam BLG i njegovi peptidni fragmenti poseduju biološka svojstva. Naime, BLG poseduje izuzetan antioksidativni potencijal zahvaljujući ostacima cisteina, metionina, triptofana, histidina i tirozina. Smatra se da je slobodni ostatak cisteina (Cys121) najzaslužniji za antioksidativne osobine, ne samo BLG-a, već i mleka uopšte (Liu et al., 2007a). Pored toga, pokazano je i da peptidi koji nastaju digestijom BLG-a u gastrointestinalnom traktu ili u *in vitro* uslovima poseduju brojne biološke aktivnosti, kao što su antihipertenzivni, antioksidativni, antimikrobni, imunomodulatorni, hipoholesterolemični, ali i opiodni efekti (Hernández-Ledesma et al., 2008). Naime, peptidi nastali

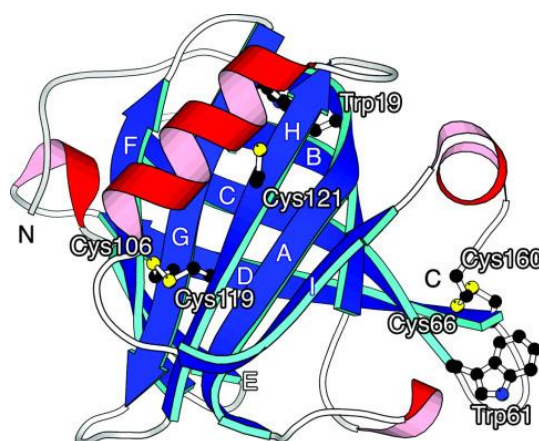
tripsinskom digestijom BLG-a, za razliku od intaktnog proteina, imaju inhibitornu aktivnost na angiotenzin-I-konvertujući enzim (Mullally et al., 1997), kao i bakteriostatske (Pihlanto-Leppälä et al., 1999), baktericidne (Pellegrini et al., 2001) i hipoholesterolemične aktivnosti (Nagaoka et al., 2001). Ovi bioaktivni peptidi su dužine od 3-20 aminokiselinskih ostataka i njihova primarna sekvenca definiše njihovu biološku aktivnost (Hernández-Ledesma et al., 2008). Naime, Pellegrini i saradnici su pokazali da se digestijom BLG-a tripsinom dobijaju peptidni fragmenti sa baktericidnom aktivnošću isključivo prema Gram-pozitivnim bakterijama. Modifikacijom jednog od ovih peptida, zamenom Asp98 argininom i dodavanjem jednog ostatka lizina na C-terminus, proširen je spektar baktericidnog dejstva i na neke Gram-negativne bakterije (Pellegrini et al., 2001). S druge strane, prisustvo unutrašnjeg ostatka prolina i ostatka arginina na C-terminalnom kraju peptidnog fragmenta 142-148 nastalog tripsinskom digestijom BLG-a doprinosi inhibitornom efektu na angiotenzin-I-konvertujući enzim (Mullally et al., 1997).

BLG je mali, globularni protein, rastvoran u razblaženim rastvorima soli, koji se sastoji od 162 aminokiselinska ostatka, molekulske mase od 18,4 kDa u svom monomernom obliku (Kontopidis et al., 2004). U kravljem mleku se javlja u 11 genetskih varijanti (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J i W), pri čemu su A i B izoforme najzastupljenije (Farrell et al., 2004). Razlika između A i B izoformi je u dve aminokiseline: Asp64 i Val118 izoforme A su u B izoformi zamenjeni glicinom i alaninom, redom (Eigel et al., 1984). Izoelektrična tačka dominantnih A i B izoformi je oko pH 5,13, a izojonske tačke su oko pH 5,35 i 5,41 za A i B izoforme, redom (Farrell et al., 2004). BLG poseduje dve intramolekulske disulfidne veze i jednu slobodnu tiolnu grupu. Jedna disulfidna veza se ostvaruje blizu površine molekula proteina između Cys66 i Cys160, a druga je dinamičkog karaktera i ostvaruje se u unutrašnjosti molekula između Cys106 i Cys119 ili Cys121, pa je slobodna sulfhidrilna grupa ili ona na poziciji 119, ili ona na poziciji 121 (Croguennec et al., 2003), mada postoje indicije da bilo koji od pet ostataka cisteina može biti slobodan (Creamer et al., 2004a).

2.2.1.2. Sekundarna i tercijarna struktura β -laktoglobulina

Proteine lipokalinske familije, mada su na nivou primarne sekvence izuzetno divergentni, odlikuje visoko konzervirana tercijarna struktura (Flower et al., 2000). Trodimenzionalnu strukturu BLG-a čini neobičan strukturni motiv antiparalelnog β -burenceta, koji je pre toga opisan samo kod retinol-vezujućeg proteina. Pored antiparalelnog β -burenceta, koje izgrađuje devet β -nizova (A–I) spojenih petljama, strukturu BLG-a čine još i kratak 3_{10} heliks na N-terminalnom kraju i α -heliks na C-terminalnom kraju polipeptidnog lanca. Osam β -nizova izgrađuju dve β -pločice, jednu koji čine nizovi A–D i drugu koju čine nizovi E–H, uz delimično učešće i niza A. Deveti β -niz (β I) čini veći deo dodirne površine u dimeru BLG-a na neutralnim pH vrednostima. Naspramno postavljene β -pločice izgrađuju hidrofobnu strukturu β -burenceta, koja je oivičena α -heliksom (Papiz et al., 1986) (**Slika 10**). Hidrofobna unutrašnjost β -burenceta, tj. hidrofobni džep, je izdužen/a, nalikuje čašici cveta (engl. *calyx*) i ima sposobnost vezivanja lipofilnih jedinjenja, poput retinola, masnih kiselina i holesterola (Kontopidis et al., 2004). Disulfidne veze povezuju Cys66 unutar CD petlje (koja povezuje nizove C i D) sa Cys160 koji je blizu C-terminusa, i Cys106 unutar β G niza sa Cys119 β H niza, ostavljajući Cys121 slobodnim, ali zaštićenim. Petlje koje povezuju B i C, D i E i F i G β -nizove su relativno kratke, dok su one koje povezuju A i B, C i D, E i F i G i H nizove duže i fleksibilnije (Edwards i Jameson, 2014). Kristalne strukture A i B izoformi su slične. Međutim, iako se razlikuju u samo dve aminokiseline, fine strukturne razlike između izoformi za posledicu imaju suptilne razlike u njihovim funkcionalnim osobinama. Naime, supstitucija Asp64 glicinom dovodi do izmenjene konformacije CD petlje. Kako se aminokiselinski ostatak 64 nalazi na površini molekula, to za posledicu ima smanjenu rastvorljivost i povećanu sklonost izoforme A ka oligomerizaciji i geliranju. Iako supstitucija Val118 alaninom, koja se dešava u zaklonjenom β H nizu, ne dovodi do značajnijih strukturnih promena, praznina nastala supstitucijom voluminoznijeg izopropil supstituenta manjom metil grupom je entropijski povoljnija i dovodi do labavije strukture

hidrofobnog jezgra, koja je možda razlog za manju termalnu stabilnost izoforme B BLG-a (Qin et al., 1999).



Slika 10. Shematski prikaz trodimenzionalne strukture β -laktoglobulina. Pozicije disulfidnih veza (Cys66–Cys160 i Cys106–Cys119), slobodnog ostatka cisteina (Cys121), triptofanskih ostataka (Trp19 i Trp61) i devet β -nizova (A-I) naznačene su u strukturi (preuzeto iz Yagi et al., 2003).

Premda u nativnim uslovima BLG dominantno sadrži β -pločice, interesantno je postojanje intermedijera sa delimično α -helikoidnom strukturom tokom uvijanja i razvijanja proteina. Naime, Širaki i saradnici su opisali kooperativan konformacioni prelaz β -pločica u α -helikse u prisustvu 10-20% 2,2,2-trifluoetanola (Shiraki et al., 1995), a ova neobična preferencija BLG-a ka helikoidnoj strukturi je uočena i u prisustvu metanola, etanola i 2-propanola (Dufour et al., 1993). Štaviše, predviđanja sekundarnih struktura ukazuju na to da BLG i njegovi peptidni fragmenti imaju intrinzičnu sklonost ka formiranju α -heliksa koja je uslovljena lokalnim interakcijama. Međutim, u slučaju BLG-a, iako lokalne interakcije favorizuju strukturu α -heliksa, u nativnoj strukturi je konformacija β -pločica stabilizovana interakcijama udaljenih aminokiselinskih ostataka (Hamada et al., 1995; Kuroda et al., 1996). Uzimajući navedeno u obzir, hipoteza Hamade i saradnika je da se uvijanje BLG-a odvija prema nehijerarhijskom mehanizmu, u kom se pre formiranja nativnih β -pločica akumuliraju intermedijeri sa nenativnom α -helikoidnom strukturom (Hamada et al., 1996).

Iako su proteini lipokalinske familije strukturno slični, odlikuje ih različito ponašanje u uslovima promene pH ili nekog drugog faktora sredine (Barteri et al., 2000). BLG je izuzetno stabilan u kiselj sredini, tako da i na pH 2 zadržava nativnu konformaciju (Fogolari et al., 1998; Kuwata et al., 1999), što je ujedno osnov njegove rezistentnosti na digestiju pepsinom, o čemu će više reći biti kasnije. Naime, CD spektroskopijom u bliskoj UV oblasti, pokazano je da, iako su signali poreklom od aromatičnih aminokiselina nešto manjeg intenziteta na pH 2 u poređenju sa neutralnim pH, izoforma A BLG-a ima očuvanu tercijarnu strukturu na kiselom pH. CD spektroskopija u dalekoj UV oblasti dodatno potkrepljuje tvrdnje o stabilnosti BLG-a u kiselj sredini, jer na pH 2 BLG u potpunosti zadržava sekundarnu strukturu. Sa druge strane, na pH 9 je u potpunosti očuvana tercijarna struktura izoforme A BLG-a, ali dolazi do blagog povećanja signala na 208 nm u dalekoj UV oblasti, što je indikacija blagog povećanja sadržaja α -heliksa na račun smanjenja β -pločica (Barteri et al., 2000).

Obe dominantne izoforme BLG-a podležu pH-zavisnim konformacionim promenama u oblasti pH od 6,5 do 7,5, takozvanim Tanfordovim prelazima. Ove konformacione promene povezuju se sa neobičnim ostatkom Glu89, koji se nalazi unutar fleksibilne EF petlje i čija karboksilna grupa ima pKa 7,3 (umesto 4,5). Rendgenskom strukturnom analizom je utvrđeno da na pH 6,2 EF petlja „zatvara“ hidrofobnu unutrašnjost β -burenceta, zaklanjajući ostatak Glu89. Na pH 8,1, ova petlja podleže konformacionoj promeni koja je udaljava od β -burenceta, pa prethodno zaklonjen ostatak glutaminske kiseline postaje izloženiji i u obliku karboksilatnog jona. Ova pH-zavisna kontrola pristupa unutrašnjosti β -burenceta BLG-a bi mogla da ima i funkcionalne implikacije. Zatvorena unutrašnjost BLG-a štiti ligande BLG-a u kiselim uslovima u želucu, dok

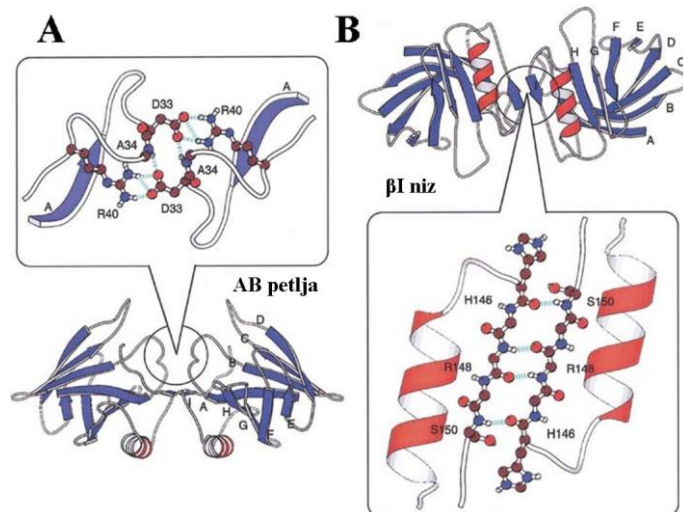
otvaranje kaliksa na baznijim pH vrednostima dozvoljava oslobađanje liganada BLG-a, čime se omogućava njihova apsorpcija (Qin et al., 1998).

2.2.1.3. Kvaternarna struktura β -laktoglobulina

Asocijacija i formiranje oligomera BLG-a zavisi od pH sredine, temperature i jonske sile rastvora, pa se, u zavisnosti od ovih uslova, BLG u rastvoru nalazi u monomernoj, dimernoj ili oktamernoj formi, dok u prisustvu trifluoroetanolu i uree gradi amiloidne fibrile.

Pri fiziološkim uslovima (neutralno pH i koncentracija BLG-a $>50 \mu\text{M}$), BLG je dominantno u obliku nekovalentnih dimera. Iako samo 6% površine monomera učestvuje u formiranju dimera, čak 12 intermolekulskih vodoničnih veza i 2 elektrostatičke interakcije učestvuju u građenju dimera BLG-a (Gottschalk et al., 2003). Dimer BLG-a je stabilizovan vodoničnim vezama koje uspostavljaju aminokiselinski ostaci susednih AB petlji koje se nalaze na površini molekula proteina (8 vodoničnih veza), kao i sa 4 vodonične veze između βI nizova dvaju monomera (**Slika 11**) (Sakurai et al., 2001). Pored toga, upostavljaju se elektrostatičke interakcije (soni mostovi) između susednih AB petlji interakcijama pozitivno naelektrisanih ostataka Arg40 i negativno naelektrisanih ostataka Asp33 koje su značajne za stabilizaciju dimera (Sakurai i Goto, 2002).

Snižavanjem pH ispod izoelektrične tačke ($\text{pI}=5,1\text{--}5,2$), formiraju se proteinski agregati. Naime, između pH 5,1 i pH 3,7 izoforma A BLG-a ima oktamernu strukturu, na pH vrednostima ispod 3,7 ponovo je u obliku dimera, dok na pH vrednostima ispod 3 dimer BLG-a disosuje na monomere. U opsegu pH vrednosti 5,1–7,5 BLG je u obliku dimera, dok u oblasti pH 7,5–8 podleže reverzibilnoj transformaciji u monomerni oblik. U alkalnim uslovima, iznad pH 8, BLG A je monomer, ali podleže sporoj, ireverzibilnoj denaturaciji, koja se ubrzava na pH 9,7 (Pessen et al., 1985; Sakurai et al., 2001). Važno je napomenuti da u oblasti pH 3,7–5,1 izoforma B BLG-a ne gradi oktamere, već dimere (Timasheff i Townend, 1961).



Slika 11. Interagujuća površina između dva monomera u dimeru BLG-a dobijena rendgenskom strukturnom analizom. Prikaz bočno (**A**) i odozgo (**B**) u odnosu na βI niz. Na slici su prikazani i pogledi izbliza na AB petlju i βI niz na kojima se vide vodonične veze koje učestvuju u interakcijama monomera (preuzeto i modifikovano iz Sakurai et al., 2001).

Varijabilnost kvaternarne strukture BLG-a rezultat je delikatne ravnoteže između hidrofobnih i elektrostatičkih interakcija i vodoničnih veza, na koju, pored pH vrednosti, utiču jonska sila rastvora i temperatura. Kako konstanta dimerizacije nije velika ($\sim 5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ na pH 6,5), udeo monomera se povećava pri manjoj koncentraciji proteina (Sakai et al., 2000), pa nije iznenađujuće da na pH vrednostima manjim od 3 u uslovima niske jonske sile dolazi do disocijacije dimera u monomere (Sakurai et al., 2001). Na ravnotežu monomer-dimer na pH 3 utiče suptilan

balans između hidrofobnih interakcija na dodirnoj površini monomera, koje favorizuju formiranje dimera, i elektrostatičkih odbijanja između pozitivno naelektrisanih monomera, što favorizuje disocijaciju dimera u monomerni oblik. Dodatak soli, odnosno kontra jona, smanjuje elektrostatičko odbijanje i dovodi do stabilizacije dimera hidrofobnim interakcijama. Mehanizam stabilizacije BLG dimera indukovane solima na pH 3 sličan je mehanizmu solima-indukovane stabilizacije konformacije stopljene globule u uslovima kisele denaturacije proteina (Sakurai et al., 2001). Za formiranje dimera na neutralnom pH od krucijalnog značaja su elektrostatičke interakcije između pozitivno naelektrisanih ostataka Arg40 i negativno naelektrisanih ostataka Asp33 unutar AB petlji, pa se mutacijama ovih aminokiselinskih ostataka može uticati na ravnotežu monomer-dimer na neutralnom pH (Sakurai i Goto, 2002). Pokazano je i da hemijske modifikacije slobodne tiolne grupe Cys121 koji se nalazi u sklopu β H niza, koja je u potpunosti zaklonjena C-terminalnim α -heliksom, smanjuju konstantu dimerizacije BLG-a. Naime, modifikacija zaklonjene tiolne grupe Cys121 reakcijom sa 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoevom kiselinom) (DTNB) na pH 7,5 dovodi do značajne destabilizacije hidrofobnog jezgra BLG-a i interagujuće površine monomera u dimeru BLG-a, te protein na pH 7,5 ima strukturu stopljene globule. Sve ovo za rezultat ima disocijaciju dimera BLG-a u monomer (Sakai et al., 2000). Ne sme se zaboraviti ni značajan uticaj temperature, pa je tako na pH 4,7, blizu izoelektrične tačke BLG-a, u odsustvu soli i pufera, pri koncentraciji 0,74 mM i 0,84 mM i na temperaturi 27 °C, BLG A gotovo u potpunosti u dimernom obliku. Snižavanjem temperature, dolazi do asocijacije BLG A dimera u oktamere (Gottschalk et al., 2003).

2.2.1.4. Uticaj temperature na ponašanje β -laktoglobulina

Termički indukovane promene BLG-a, kao glavnog proteina surutke, imaju značajan uticaj na funkcionalne karakteristike mlečnih proizvoda u procesima obrade hrane. Izolati i koncentrat surutke, čiji je sadržaj BLG-a najmanje 50%, tokom obrade hrane, u uslovima povišene temperature ili povišenog pritiska, grade gelove koji mogu biti od značaja za funkcionalne osobine hrane (Creamer et al., 2004a). Zagrevanjem rastvora koncentrata surutke (100 g/kg, pH 6,8) na 75 °C nastaju homodimeri BLG-a, ALA i BSA povezani disulfidnim vezama, kao i disulfidnom vezom povezani heterodimerni adukti ALA i BLG-a ili ALA i BSA (Havea et al., 2001), dok zagrevanjem mleka nastaju i agregati BLG-a i κ -kazeina povezani disulfidnom vezom (Lowe et al., 2004), posebno pri visokim temperaturama (100 ili 120 °C tokom 120 s i 140 °C tokom 5 s) u kojima takođe nastaju i agregati sa α_{s2} -kazeinom, koji se ne uočavaju na nižim temperaturama (85-90 °C) usled manje izloženosti disulfida α_{s2} -kazeina (Patel et al., 2006). Nativnom i dvodimenzionalnom poliakrilamidnom gel elektroforezom termički procesovanog mleka je pokazano da 90% monomerne forme BLG-a nestaje na račun agregata velikih molekulskih masa, što nije slučaj sa ALA, pa se BLG smatra svojevrsnim markerom termalnog procesovanja mleka (Chen et al., 2005).

Za proces agregiranja BLG-a izazvanog termičkim tretmanom hrane značajne su kako nenativne intermolekulske disulfidne veze nastale reakcijama izmena disulfida, tako i intermolekulski nekovalentni agregati, za koje se smatra da prethode formiranju intermolekulskih disulfidnih veza (Creamer et al., 2004a). Mutanti BLG-a (L104C i A132C) koji sadrže dodatni ostatak cisteina, pozicioniran tako da može da gradi disulfidnu vezu sa slobodnim ostatkom Cys121, povećavaju tačku topljenja proteina za 8-10 °C i rezistentni su na agregiranje izazvano temperaturom (Cho et al., 1994). Pored toga, BLG zagrevan u prisustvu N-etilmaleimida, reagensa koji blokira ostatke cisteina, iako formira nekovalentne agregate velikih molekulskih masa, ne može da formira agregate povezane disulfidnim vezama (Hoffmann i van Mil, 1997), što ukazuje na značaj Cys121 u agregiranju BLG-a. Naime, smatra se da je prvi efekat povišene temperature disocijacija nativnih BLG dimera u monomere, nakon koje dolazi do delimičnog razvijanja BLG monomera uz gubitak uređene strukture, čime slobodna sulfhidrilna grupa Cys121 postaje izloženija rastvaraču i dostupnija za interakciju sa disulfidnom vezom Cys106–Cys119. Tom prilikom dolazi do reverzibilne izmene disulfidnih veza, pa nastaje disulfidna veza Cys106–Cys121, a sulfhidrilna grupa Cys119 postaje slobodna (Croguennec et al., 2003). Ovaj „aktivirani“ monomer promoviše

dalje reakcije oligomerizacije i agregiranja proteina, kojima nastaju duži polimeri sa drugim proteinima koji sadrže disulfidne veze, kao što je ALA. Iako se generalno smatra da su u nativnom proteinu ili Cys121 ili Cys119 slobodni, Krimer i saradnici su pokazali da je u zagrevanom uzorku BLG-a oko 35% Cys160 redukovano, što implicira da bilo koji od pet ostataka cisteina može da ima slobodnu tiolnu grupu (Creamer et al., 2004a). Dok monomer BLG-a sa slobodnim Cys121 promovise formiranje intermedijernih oligomera (dimera, trimera, tetramera) koji brzo interaguju, formirajući agregate velikih molekulskih masa u prisustvu kalcijum-hlorida i, u manjem obimu, u prisustvu natrijum-hlorida, nenativni monomer BLG sa slobodnim Cys119 zauzima konformaciju koja usporava agregiranje BLG-a na pH 6,6 i 85 °C. Izoforme A i B BLG-a pokazuju suptilne razlike u brzini denaturacije/agregacije indukovane temperaturom, pri čemu izoforma B pokazuje nešto veću brzinu reakcije (Croguennec et al., 2004). Na neutralnom pH (6,8) i u odsustvu haotropnih agenasa, u uslovima u kojima je BLG u dimernom obliku, denaturacija BLG-a je dvostepeni proces kog karakteriše postojanje dva strukturna domena različite termalne stabilnosti koji se, kako je pokazano diferencijalnom skenirajućom kalorimetrijom, razvijaju nezavisno jedan od drugog. Pri nižim temperaturama, dolazi najpre do ireverzibilne denaturacije helikoidnog regiona BLG-a koji je bitan za stabilizaciju dimerne strukture. Denaturacija ovog regiona nezavisna je od koncentracije proteina. Nakon disocijacije dimera u monomer, dolazi do dalje denaturacije BLG-a. Najstabilniji domen BLG-a je onaj koji sadrži zaklonjen ostatak Trp19. Ovaj region leži na dnu ligand-vezujuće šupljine i čini ga klaster veoma hidrofobnih aminokiselinskih ostataka (uključujući Tyr99, Tyr102 i Val115) koji se nalaze unutar regiona petlji (Fessas et al., 2001).

Proces termalne denaturacije BLG-a je kompleksan i na njega utiču mnogi faktori, poput pH, koncentracije proteina, jonske sile, zastupljenosti BLG izoformi i prisustva liganda.

Podložnost BLG-a termalnoj denaturaciji u pH opsegu 6,7-8 veoma je zavisna od koncentracije, dok na kiselim pH vrednostima koncentracija proteina ne utiče značajno na stabilnost proteina. Na pH vrednostima 6,75 i pri koncentracijama manjim od 50 mg/ml, koncentracija BLG-a značajno utiče na termalnu stabilnost proteina, pokazujući minimalnu tačku topljenja pri koncentraciji od 25 mg/ml, uz povećanje tačke topljenja sa snižavanjem koncentracije proteina ispod 25 mg/ml. Nasuprot tome, pri koncentracijama većim od 50 mg/ml, uticaj koncentracije proteina na termalnu stabilnost je mnogo manji, pri čemu sa povećanjem koncentracije dolazi do povećanja tačke topljenja proteina. Na pH vrednosti 8,05, BLG pokazuje sličnu zavisnost temperature topljenja od koncentracije proteina kao i na pH 6,75, sa tom razlikom da su izmerene tačke topljenja niže za 6-9 °C (Qi et al., 1995).

Snižavanje pH vrednosti (Kella i Kinsella, 1988) ili dodavanje liganada čije je vezivno mesto u hidrofobnoj unutrašnjosti β -burenceta BLG-a (Considine et al., 2005) može dovesti do stabilizacije proteina prema denaturaciji izazvanoj temperaturom. Snižavanjem pH vrednosti rastvora od pH 7,5 do pH 1,5, dolazi do progresivnog povećanja batohromnog (crvenog) pomeranja u diferencijalnim UV spektrima BLG-a, koji ukazuje na promenu položaja hromofora iz polarnog u nepolarnije okruženje, najverovatnije kao rezultat kompaktnije strukture i manje konformacione fleksibilnosti proteina na kiselim pH vrednostima. Na neutralnim pH vrednostima, denaturacija BLG-a postaje ireverzibilna na temperaturama iznad 65 °C, dok se sa snižavanjem pH vrednosti tačka topljenja povećava, te na pH 1,5 dostiže vrednost od 83,3 °C (Kella i Kinsella, 1988).

Vezivanjem liganada za hidrofobnu unutrašnjost β -burenceta BLG-a povećava se temperaturna stabilnost proteina, pri čemu ligandi koji se jače vezuju za BLG, kao što su palmitat i SDS, imaju veći uticaj na temperaturnu stabilnost proteina, dok retinol manje stabilizuje protein, najverovatnije zbog manjeg afiniteta za vezivno mesto. Povećanje stabilnosti BLG-a reflektuje se povećanjem temperature topljenja i smanjenom sklonošću proteina ka agregiranju (Considine et al., 2005). Sličan stabilizujući efekat na temperaturnu denaturaciju BLG-a pokazuju konjugovana linolna kiselina i miristinska kiselina, čije dodavanje usporava formiranje agregata BLG-a velikih molekulskih masa (Considine et al., 2007).

Uticaj temperature na ponašanje BLG-a zavisi i od zastupljenosti izoformi. Literaturni navodi o razlikama u temperaturnoj stabilnosti dominantnih izoformi BLG-a su oprečni, pa nemali

broj autora prijavljuje veću stabilnost izoforme A (Hill et al., 1996; Manderson et al., 1999; Qin et al., 1999), dok pojedini opisuju veću stabilnost izoforme B (Boye et al., 2004; McSwiney et al., 1994). Kao moguće objašnjenje za razlike u rezultatima neki autori navode različite eksperimentalne uslove rada (koncentracija proteina, pH, jonska sila, brzina snimanja) (McSwiney et al., 1994; Qi et al., 1995). Premda izoforma B pokazuje veću termalnu stabilnost od izoforme A u radu Bojea i saradnika, njena tačka topljenja i sekundarne strukture su pod većim uticajem malih molekula koji utiču na strukturu proteina (poput SDS-a, cisteina, N-etilmaleimida) nego što je to slučaj sa izoformom A, što je možda posledica krhkije strukture izoforme B. Veću termalnu stabilnost izoforme B autori pripisuju većem odnosu dimerne i monomerne forme, usled koje je potrebna viša temperatura za disocijaciju dimera (Boye et al., 2004).

Funkcionalne osobine gelova nastalih zagrevanjem koncentrata surutke zavise kako od disulfidnih, tako i od nekovalentnih veza. Smatra se da su intermolekulske disulfidne veze zaslužne za gumenastu strukturu gelova, dok im nekovalentne veze daju rigidnost i krtost. Poređenjem funkcionalnih osobina gelova nastalih zagrevanjem rastvora koncentrata surutke sa onima koji nastaju u prisustvu SDS-a, koji sprečava nekovalentne interakcije, ili DTT-a, koji sprečava građenje disulfidnih veza, zaključeno je da nekovalentne interakcije daju veći doprinos strukturi gelova nastalih zagrevanjem koncentrata surutke (Havea et al., 2004).

2.2.1.5. Amiloidni fibrili β -laktoglobulina

Interesantna odlika BLG-a, iako je u pitanju globularan protein, je da pri visokim temperaturama ($>80^\circ\text{C}$), na niskoj pH vrednosti (obično oko pH 2) i niskoj jonskoj sili ($<20\text{ mM}$) formira amiloidne fibrile (Edwards i Jameson, 2014). Fibrili BLG-a imaju neke karakteristike klasičnih β -amiloidnih fibrila, kao što je vezivanje tioflavina T (ThT), fluorescentne boje čiji se intenzitet fluorescencije povećava za nekoliko redova veličine nakon vezivanja za amiloidne fibrile, pri čemu dolazi do promene ekscitacionog maksimuma ThT-a sa 385 nm na 450 nm, kao i promene emisijonog maksimuma sa 445 nm na 482 nm (Biancalana i Koide, 2010; Levine, 1993).

Fibrilacija BLG-a, i proteina uopšte, je kompleksan proces koji zavisi od mnogo faktora. Na niskim pH vrednostima, ravnoteža monomer–dimer je pomerena u stranu monomera, a tačka topljenja BLG-a je viša nego na neutralnim pH vrednostima. Osim toga, na pH vrednostima manjim od 7, smanjena je efikasnost formiranja disulfidnih veza, pa u nastalim agregatima preovlađuju nekovalentne interakcije (Schokker et al., 2000). Opšteprihvaćeni model formiranja amiloidnih fibrila podrazumeva nastanak oligomera proteina u koraku nukleacije, a zatim spajanje oligomera u protofilamente u koraku elongacije, koji zatim agregiraju u amiloidne fibrile. Zavisno od uslova fibrilacije, oligomeri nastaju ili delimičnim razvijanjem ili fragmentacijom proteina. Naime, u prvom slučaju, pod određenim uslovima temperature (zagrevanje iznad tačke topljenja) i pH, ravnoteža nativnog oblika BLG-a se pomera u pravcu delimično ili potpuno razvijenog proteina, koji je kao takav sklon formiranju umreženih β -strukture. Ove strukture su sastavljene od β -pločica, koje se povezuju vodoničnim vezama ortogonalno u odnosu na peptidnu kičmu. Drugi mehanizam formiranja oligomera podrazumeva hidrolizu BLG-a u kratke peptidne fragmente, koji potom agregiraju (van den Akker et al., 2014). Ovi peptidi su mase između 2 kDa i 8 kDa, a samo deo sekvence BLG-a ulazi u sastav fibrila, u zavisnosti od hidrofobnosti, distribucije naelektrisanja i sposobnosti peptida da formiraju β -pločice (Akkermans et al., 2008). Protofilamenti kao međukorak formiranja amiloida su dijametra oko 2,5–4 nm, a fibrili širine oko 8 nm i dužine i do nekoliko mikrometara (Gosal et al., 2002; Oboroceanu et al., 2010).

Na kinetiku formiranja fibrila i njihovu morfologiju utiču mnogi faktori, kao što su jonska sila rastvora, pH, koncentracija proteina, prisustvo organskog rastvarača ili enzima i dužina inkubacije (Gosal et al., 2002; Loveday et al., 2010; van den Akker et al., 2011, 2014). Pri koncentracijama BLG-a od 5–40 mg/ml, koncentracija proteina utiče samo na kinetiku formiranja fibrila, pri čemu brzina agregiranja raste sa povećanjem koncentracije BLG-a, bez uticaja na strukturu fibrila. Korišćenjem većih koncentracija proteina (do 75 mg/ml) može doći do promenjene morfologije fibrila. Pokazano je da produženim zagrevanjem BLG-a (16 sati) na 80°C na pH 2, pri

koncentraciji od 30 mg/ml nastaju dugački i linearni fibrili, dok su oni koji nastaju pri koncentraciji proteina od 75 mg/ml mnogo kraći i savijeni (nalik crvima). Pri korišćenim eksperimentalnim uslovima, konverzija monomera u fibrile je oko 50% pri koncentraciji proteina od 30 mg/ml, dok je pri koncentraciji BLG-a od 75 mg/ml čak 90% monomera nagradilo fibrile. Nastali fibrili ne samo da imaju drugačiju morfologiju, već imaju i različite sekundarne strukture, pa su tako kratki fibrili izgrađeni uglavnom od neuređenih i/ili α -helikoidnih struktura, dok su linearni fibrili izgrađeni od β -pločica (van den Akker et al., 2011, 2014). Kratki fibrili nalik crvima nastaju i pri koncentraciji natrijum-hlorida većoj od 60 mM i kalcijum-hlorida većoj od 33 mM, dok u odsustvu soli nastaju dugački semi-fleksibilni fibrili (Loveday et al., 2010). Dužina inkubacije je još jedan značajan faktor u nastanku fibrila BLG-a, koji utiče na reverzibilnost fibrilacije. Agregiranje BLG-a je ireverzibilno samo nakon produženog zagrevanja. Naime, fibrili nastali zagrevanjem BLG-a na pH 2 tokom nekoliko sati dezintegrišu se nakon hlađenja rastvora, dok su fibrili koji su formirani dužim zagrevanjem (9 sati) postojaniji. Međutim, čak i uz dugo zagrevanje rastvora BLG-a, fibrili nastaju u većem prinosu samo ako je koncentracija proteina iznad 25 mg/ml (Arnaudov et al., 2003).

Premda su najbolje opisani amiloidni fibrili BLG-a koji nastaju produženim zagrevanjem u kiseloj sredini, do formiranja amiloidnih fibrila i amiloidima sličnih struktura BLG-a može doći i primenom blažih uslova (neutralno pH i kraće zagrevanje), kao što su jednodobno zagrevanje na 80 °C (Zúñiga et al., 2010) ili na 75 °C (Sardar et al., 2014) na pH vrednostima koje su oko neutralnih (7-7,5).

Fibrili BLG-a imaju veliki potencijal za eksploataciju u industriji hrane za kontrolisanje tehnoloških osobina hrane, kao što su viskoznost, sklonost ka geliranju i stabilnost emulzija i pene (Edwards i Jameson, 2014). Proteinski fibrili BLG-a se potencijalno mogu koristiti kao zamena za zgušnjivače na bazi polisaharida (Oboroceanu et al., 2010).

2.2.1.6. Digestibilnost β -laktoglobulina

Alergene hrane, za koje se smatra da mogu da senzitivizuju preko gastrointestinalnog trakta, često odlikuje rezistentnost na gastrointestinalnu digestiju (Moreno, 2007). Evaluiranje digestibilnosti proteina u *in vitro* uslovima ranije je predlagano kao jedan od kriterijuma za svrstavanje nekog proteina u alergene (Astwood et al., 1996). Iako korelacija između rezistentnosti na digestiju i alergene proteina nije uvek prisutna, stabilnost na digestiju i dalje se smatra relevantnim parametrom za procenu alergenskog potencijala proteina (Fu et al., 2002).

Kao što je prethodno spomenuto, BLG je protein koji je izuzetno stabilan u kiseloj sredini (Kuwata et al., 1999). Monomer BLG-a na pH 2 ima u potpunosti očuvanu strukturu β -burenceta, koja se skoro u potpunosti poklapa sa strukturom dimera na fiziološkom pH. U poređenju sa strukturom proteina na pH 7, regioni petlji i terminalni segmenti proteina su delimično neuređeni na pH 2, a uočavaju se i razlike na dodirnoj površini β -burenceta i α -heliksa. Ove fine strukturne razlike utiču na elektrostatičke osobine BLG-a, posebno u oblasti oko otvorenog kraja β -burenceta i na dodirnoj površini α -heliksa i FG petlje, i najverovatnije imaju ulogu u moduliranju uloge BLG-a kao transportera negativno naelektrisanih liganada (Fogolari et al., 1998). Tek na pH 0,9 BLG pokazuje određene promene tercijarne strukture, dok je sekundarna struktura čak i na ovako niskim pH vrednostima skoro u potpunosti očuvana (Taulier i Chalikian, 2001). Zbog svoje stabilne, globularne tercijarne strukture, bogate β -pločicama, koju zauzima na niskom pH, i prisustva naelektrisanih i polarnih aminokiselina, BLG je otporan na gastričnu digestiju (Teng et al., 2015). Sa povećanjem pH, BLG prolazi kroz nekoliko konformacionih promena (Qin et al., 1998; Taulier i Chalikian, 2001), koje ga čine podložnim na digestiju pankreatinom (Schmidt et al., 1995).

Digestibilnost BLG-a analizirana je u mnogim *in vitro* digestionim modelima koji koriste fiziološki relevantne pH vrednosti i masene odnose enzima i proteina, imitiraju interakcije sa fiziološkim surfaktantima, kao što su fosfatidilholin i žučne soli, ili uzimaju u obzir specifičnosti gastrointestinalnog trakta dece, kao što su niža pH vrednost u želucu i manja aktivnost pepsina (Moreno, 2007). Rezistentnost BLG-a na aktivnost pepsina potvrđena je u mnogim studijama, kako *in vitro*, tako i *in vivo*, dok stepen njegove degradacije u duodenalnim uslovima veoma zavisi od

masenog odnosa enzima i proteina i prisustva i koncentracije fizioloških surfaktanata, kao što su fosfatidilholin i žučne soli (Astwood et al., 1996; Fu et al., 2002; Kitabatake i Kinekawa, 1998; Mandalari et al., 2009; Schmidt et al., 1995; Takagi et al., 2003; Thomas et al., 2004). U jednoj od tih studija, RP-HPLC (reverzno-fazna tečna hromatografija visokih performansi, od engl. *reversed-phase high-performance liquid chromatography*) analizom digesta dobijenog nakon 60 min digestije BLG-a pepsinom na 37 °C (pH 2,1 i aktivnost pepsina 182 U/mg BLG-a), a zatim tripsinom i himotripsinom još 30 min (pH 6,5, aktivnost tripsina 34,5 U/mg BLG-a, aktivnost himotripsina 0,49 U/mg BLG-a), primećeno je prisustvo intaktnog proteina u pepsinskom digestu, dok je izlaganje duodenalnim enzimima dovelo do potpune degradacije BLG-a, što je potvrđeno i progresivnim smanjenjem vezivanja IgE antitela iz seruma pacijenata alergičnih na mleko tokom trajanja digestije (Benedé et al., 2014). Međutim, rezistentnost BLG-a na intestinalnu digestiju veoma je zavisna od prisustva lipida. Fosfatidilholin, fiziološki relevantan surfaktant, značajno povećava rezistentnost BLG-a na duodenalnu digestiju, najverovatnije tako što, vezivanjem za BLG, sternim smetnjama sprečava aktivnost proteaza, ukazujući na to da je u fiziološki relevantnim uslovima BLG rezistentan i na gastričnu i na duodenalnu digestiju (Mandalari et al., 2009). Vezivanje i nekih drugih liganada može uticati na smanjenje mobilnosti polipeptidnog lanca BLG-a, što za posledicu ima smanjen pristup proteazama i povećanu rezistentnost na proteolizu, pa tako vezivanje palmitata za BLG povećava njegovu rezistenciju na digestiju tripsinom (Creamer et al., 2004b; Puyol et al., 1993). Na podložnost digestiji tripsinom utiče i zastupljenost izoformi BLG-a, pri čemu brzina hidrolize tripsinom opada u skladu sa strukturnom stabilnošću izoformi sledećim redosledom: BLG A > BLG B > BLG C (Creamer et al., 2004b).

2.2.1.7. Beta-laktoglobulin kao alergen hrane

Kako je BLG lako dostupan izvor esencijalnih aminokiselina, a istovremeno poseduje brojne poželjne tehno-funkcionalne karakteristike, on predstavlja često korišćen sastojak u prehrambenoj industriji. Međutim, alergija na kravlje mleko je najčešća alergija na hranu u Evropi, gledajući sve starosne grupe (Spolidoro et al., 2023). Učestalost alergije na mleko u Evropi je 0,54% u uzrastu do dve godine, sa nacionalnom učestalošću koja varira od manje od 0,3% u Litvaniji, Nemačkoj i Grčkoj do 1% u Holandiji i Ujedinjenom Kraljevstvu. Više od polovine dece koja pate od alergije na mleko ima IgE-om posredovanu alergiju na mleko. Iako je za odojčad bez detektabilnih IgE antitela u serumu najverovatnije da će godinu dana nakon dijagnoze postati tolerantni na kravlje mleko, samo polovina onih sa IgE antitelima u serumu „preraste“ alergiju na kravlje mleko u tom periodu (Schoemaker et al., 2015). Nešto više od 36% pacijenata sa IgE-om posredovanom alergijom na kravlje mleko reaguje upravo na BLG, koji se prema nomenklaturi alergena naziva još i Bos d 2. Iako mnogo veći broj pacijenata reaguje na kazeine, posebno α -kazein i β -kazein (64,6% i 75,2%, redom) (Shek et al., 2005), kod pacijenata kod kojih se klinička manifestacija alergije na kravlje mleko ispoljava isključivo kroz gastrointestinalne probleme, a ne sistemskom anafilaksom, dominantan je serumski IgE upravo na BLG (Poza-Guedes et al., 2016). Zbog svoje stabilnosti u kiseloj sredini, BLG je rezistentan na digestiju u želucu, pa do intestinalne mukoze može dospeti gotovo intaktan, što, zajedno sa njegovim odsustvom iz humanog mleka, doprinosi njegovoj alergenosti.

Alergene osobine BLG-a su dobro proučene i njegovi IgE-reaktivni epitopi su okarakterisani. Najveći broj studija bavio se karakterizacijom linearnih IgE-vezujućih epitopa BLG-a, korišćenjem hemijskih ili enzimskih hidrolizata BLG-a, ili, pak, sintetičkih peptida. Järvinen i saradnici su 2001. godine sproveli studiju u kojoj su sintetisali 77 dekapeptida, među kojima se dva susedna preklapaju u 8 aminokiselinskih ostataka, a svi zajedno pokrivaju kompletnu sekvencu BLG-a. Reaktivnost ovih peptida prema IgE antitelima ispitivana je korišćenjem seruma 11 pacijenata uzrasta od 4-18 godina sa perzistentnom alergijom na kravlje mleko ($\text{IgE} > 100 \text{ kU}_A/\text{l}$) i seruma 8 pacijenata mlađih od 3 godine, za koje je bilo verovatno da će prerasti alergiju na kravlje mleko ($\text{IgE} < 30 \text{ kU}_A/\text{l}$). Prisustvo IgE antitela specifičnih za veći broj epitopa bi možda moglo da posluži kao marker perzistentne alergije na kravlje mleko. Naime, 7 IgE-reaktivnih BLG

fragmenata identifikovano je korišćenjem pojedinačnih seruma pacijenata sa perzistentnom alergijom na kravlje mleko. U pitanju su linearni IgE-reaktivni epitopi koji odgovaraju regionima 75-86, 127-144, 47-60, 67-78, 141-152, 31-48 i 1-16 BLG-a, koje prepoznaje, redom, 10, 9, 8, 6, 6, 5 i 4 pacijenata od ukupno 11 testiranih. Mlađi pacijenti, za koje je verovatno da će prerasti alergiju na kravlje mleko i čiji zbirni serum je korišćen u studiji, prepoznali su 3 od ovih glavnih 7 IgE-reaktivnih epitopa, i to regione 49-60, 129-138 i 143-152. Dodatno je serum mlađih pacijenata prepoznao epitop koji odgovara regionu 119-128 BLG-a, koji je pokazao slabo vezivanje za serume starijih pacijenata i prema tome nije bio definisan kao glavni epitop (Järvinen et al., 2001). Mada različite naučne studije donekle pokazuju sličnost u identifikovanim IgE-reaktivnim epitopima BLG-a (iako se učestalost IgE antitela specifičnih za određene epitope razlikuje od studije do studije) (Adams et al., 1991; Sélo et al., 1999), nije retkost da se oni razlikuju, pa su tako Cerecedo i saradnici kao peptidne regione BLG-a koje prepoznaje više od 75% pacijenata sa IgE-om posredovanom alergijom na mleko identifikovali regione 58-77, 76-95 i 121-140. Međutim, samo je region 58-77 pokazao statistički značajnu razliku u prepoznavanju od strane grupe pacijenata sa pozitivnim rezultatima oralne provokacije hranom (tzv. reaktivna grupa) u odnosu na grupu pacijenata sa tolerancijom na mleko (tzv. tolerantna grupa), sa 81,3% reaktivnih pacijenata čiji serum prepoznaje ovaj peptidni fragment, u odnosu na 40% tolerantnih koji ga takođe prepoznaje (Cerecedo et al., 2008). Slično tome, Cong i saradnici, u studiji u kojoj su sintetisali 30 preklapajućih peptida dužine 15 aminokiselina (susedni peptidi su pomereni za 5 aminokiselina) i ispitivali njihovu reaktivnost sa serumima odojčadi, kao glavne linearne epitope BLG-a opisuju četiri regiona BLG-a koji odgovaraju fragmentima 17-31, 72-86, 92-106 i 152-166, od kojih se samo region 72-86 delimično poklapa sa glavnim epitopom opisanim u studiji Järvinena i saradnika. Mesto-dirigovanom mutagenезom su kao ključni aminokiselinski ostaci za IgE prepoznavanje identifikovani Thr20, Met23 i Asp27 ovih epitopa. Ispitivanje značaja pojedinačnih aminokiselinskih ostataka za alergеност proteina značajno je za dizajn rekombinantnih proteina za primenu u imunoterapiji (Cong i Li, 2012). Mapiranjem IgE-vezujućih peptida dobijenih *in vitro* gastričnom i gastroduodenalnom digestijom BLG-a uočeno je poklapanje ili delimično preklapanje ovih peptida sa prethodno identifikovanim IgE epitopima. Premda je rezidualna IgE reaktivnost ovih digesta zanemarljiva u odnosu na IgE reaktivnost čistog proteina, ne sme se zaboraviti uticaj drugih komponenti hrane na gastrointestinalnu stabilnost individualnih alergena mleka i, posledično, njihovu imunogenost (Benedé et al., 2014). Iako su za kliničku manifestaciju alergije na hranu podjednako značajni i linearni i konformacioni epitopi, mnogo je manje mapiranih konformacionih epitopa BLG-a. Baza podataka eksperimentalno mapiranih B-ćelijskih i T-ćelijskih epitopa je u 2018. godini brojala 3986 linearnih i 87 konformacionih epitopa alergena (Breiteneder, 2018). Ne sme se zaboraviti ni uticaj procesovanja hrane na alergеност, pa tako zagrevanjem izolata proteina surutke na temperaturama do 90 °C dolazi do značajnog povećanja antigenosti, najverovatnije usled izlaganja prethodno zaklonjenih epitopa. S druge strane, zagrevanjem na temperaturama višim od 90 °C dolazi do agregiranja proteina i smanjenja alergености, kao posledica gubitka konformacionih i maskiranja linearnih epitopa (Kleber et al., 2004).

2.2.1.8. Interakcije β-laktoglobulina i malih molekula

Kao što je već spomenuto, BLG ima sposobnost vezivanja velikog broja hidrofobnih liganada, kao što su retinol, masne kiseline, trigliceridi, vitamin D, holesterol i fenolna jedinjenja (Kontopidis et al., 2004; Sawyer, 2003; Teng et al., 2015). Premda se u *in vitro* uslovima retinol vezuje za BLG, u mleku se retinol dominantno vezuje za masne globule u obliku estara masnih kiselina (Jensen, 1995; Keenan i Patton, 1995). Masne kiseline su najzastupljeniji endogeni ligandi BLG-a. Izolovani BLG iz mleka krave ima oko 0,7 mol endogenih masnih kiselina po molu monomera proteina. Najzastupljenije masne kiseline među njima su palmitinska (31-35%), oleinska (22-23%) i miristinska (14-17%), koje zajedno čine 66-75% ukupnih masnih kiselina vezanih za BLG u mleku (Pérez et al., 1989). U *in vitro* uslovima, jačina vezivanja masnih kiselina za BLG je reda veličine 10^7 M^{-1} na neutralnom pH i zavisi od dužine lanca, pa se masne kiseline sa 12 ili

manje ugljenikovih atoma slabo vezuju, dok se one sa 16 ili 18 ugljenikovih atoma jače vezuju za hidrofobno jezgro. Za vezivanje negativno naelektrisanih liganada, kao što je palmitinska kiselina, od značaja su pozitivno naelektrisani ostaci Lys60 i Lys69 koji se nalaze na ulazu u ligand-vezujuću šupljinu BLG-a. Molekul svinjskog BLG-a u kom je Lys69 supstituisan glutaminskom kiselinom ne može da vezuje masne kiseline (Frapin et al., 1993). Sposobnost BLG-a da vezuje masne kiseline iskorišćena je za upotrebu BLG-a kao emulgatora u industriji hrane (Boland, 2011; Pérez et al., 1989; Singh, 2011).

Pored endogenih liganada BLG-a, u *in vitro* uslovima pokazana je sposobnost BLG-a da nekovalentno vezuje brojne druge ligande, poput polifenola (Shpigelman et al., 2012; Stojadinovic et al., 2013), vitamina (Liang et al., 2010) i masnih kiselina (Le Maux et al., 2012, 2014), zbog čega se često razmatra kao nosač bioaktivnih molekula (Teng et al., 2015).

Kovalentnim modifikacijama BLG-a kao vidu transporta bioaktivnih liganada se tek odskoro pridaje veći značaj. U poređenju sa nekovalentnim modifikacijama, kovalentne modifikacije su u većini slučajeva ireverzibilne i kao takve mogu da posluže za pravljenje stabilnih konjugata, koji su manje osetljivi na promene pH i temperature do kojih dolazi tokom procesovanja hrane, zbog čega su kovalentni konjugati podesniji kao aditivi u hrani. Kovalentne modifikacije BLG-a se mogu desiti spontano u prirodi ili tokom procesovanja hrane u reakciji neenzimskog glikozilovanja (de Oliveira et al., 2016; Jiang i Brodkorb, 2012; Karbasi et al., 2021) i u reakciji sa elektrofilnim jedinjenjima kao što su aldehidi (Meynier et al., 2004) i hinoni (Ali et al., 2013; Sladic et al., 2004).

Svega nekoliko studija se bavilo ciljanim kovalentnim modifikacijama BLG-a vezivanjem bioaktivnih liganada preko ostataka lizina ili cisteina. Pored reaktivne slobodne sulfhidrilne grupe, BLG ima i 16 reaktivnih amino grupa, jednu N-terminalnu α -amino grupu i 15 ϵ -amino grupa bočnih ostataka lizina, koje takođe mogu biti kovalentno modifikovane (Morgan et al., 1999a). Lizinske ostatke modifikuju avaron (Sladic et al., 2004) i neki polifenoli, poput kofeinske kiseline (Abd El-Maksoud et al., 2018), EGCG-a (Tao et al., 2019; Wu et al., 2018) i gentizinske kiseline (Li et al., 2019), dok se preko ostataka cisteina za BLG vezuju šikonin (Albrecht et al., 2012), dihidrolipoinna kiselina (Wijayanti et al., 2013), organosumporna jedinjenja alicin, tiosulfat poreklom iz belog luka, i njegov stabilan degradacioni proizvod dialil-disulfid (Wilde et al., 2016a). Neki od bioaktivnih liganada mogu istovremeno modifikovati i ostatke lizina i ostatke cisteina, kao što su alil-izotiocijanati (AITC) (Keppler et al., 2014a; Rade-Kukic et al., 2011), različiti molekuli odgovorni za aromu (Anantharamkrishnan et al., 2020) i hlorogena kiselina (Xu et al., 2019a).

Korišćenje BLG-a kao nosača bioaktivnih komponenti ne samo da povoljno utiče na stabilnost liganda i njegove senzorne osobine, kao što su nepoželjni ukus i miris (Rade-Kukic et al., 2011; Wilde et al., 2016b), već povoljno utiče i na funkcionalne osobine samog proteina. Štaviše, konjugati BLG-a i fenolnih jedinjenja imaju poboljšane antioksidativne osobine u poređenju sa slobodnim proteinom (Abd El-Maksoud et al., 2018; Ali et al., 2013; Tao et al., 2019) i proizvode stabilne pene, istovremeno popravljajući rastvorljivost i emulgujuće osobine proteina (Xu et al., 2019a). Pored toga, i konjugati proteina i šećera mogu imati poboljšane tehnofunkcionalne osobine u odnosu na nemodifikovani protein. Reakcija neenzimskog glikozilovanja, poznata i kao Majarova reakcija, je spontana reakcija u kojoj dolazi do kovalentnog vezivanja karbonilne grupe redukujućih šećera (npr. laktoze, galaktoze, tagatoze) za amino grupu bočnih ostataka lizina i arginina. To je jedna od najvažnijih reakcija koja se odvija tokom procesovanja i skladištenja hrane, a proizvodi Majarove reakcije odgovorni su za boju, ukus i miris termički obrađene hrane (de Oliveira et al., 2016). Neenzimskim glikozilovanjem BLG-a može se uticati na njegovu rastvorljivost, temperaturnu stabilnost, sposobnost pravljenja emulzija, stabilnost emulzija i antioksidativnu aktivnost, pri čemu tip ugljenohidratne komponente utiče na funkcionalne osobine konjugata (Chevalier et al., 2001; Chobert et al., 2006; Zhong et al., 2013). Bolje emulgujuće osobine proteina surutke, a time i BLG-a, na kiselim pH vrednostima mogu se dobiti modifikacijom alil-izotiocijanatom (Keppler i Schwarz, 2017).

Posebno su stabilni konjugati fenolnih jedinjenja i proteina koji u svojoj strukturi sadrže dodatne hemijske grupe za povezivanje (linkere), kao što su karbodiimid, tetraetilenglikol, EDC-NHS i drugi. Jedan od takvih konjugata BLG-a i gentizinske kiseline, koji sadrži EDC-NHS linker, pokazuje značajno povećanu antioksidativnu aktivnost u poređenju sa nemodifikovanim proteinom (Li et al., 2019). Antioksidativna aktivnost konjugata proteina i polifenola može biti dodatno povećana polimerizacijom fenolnih jedinjenja, pa su tako Abd El-Maksud i saradnici kovalentno konjugovali polimer kofeinske kiseline i BLG, koji je pokazao superiorne antioksidativne osobine ne samo u odnosu na nemodifikovani BLG, već i u odnosu na konjugat BLG-a i monomera kofeinske kiseline. Osim povećane antioksidativne aktivnosti, dobijeni konjugat imao je povećanu rastvorljivost u vodi i veću termalnu stabilnost u odnosu na nemodifikovani protein (Abd El-Maksoud et al., 2018). U literaturi su opisani i ternarni konjugati BLG-a i drugih molekula, kojima se nastoji postići dodatno poboljšanje i proširivanje funkcije proteina. Takav je, na primer, ternarni konjugat BLG-a, ferulinske kiseline i hitozana, dobijen posredstvom lakaze. Binarni konjugat hitozana i ferulinske kiseline, dobijen reakcijom kuplovanja na bazi karbodiimida, konjugovan je u sledećoj reakciji za BLG posredstvom lakaze. Dobijeni konjugat ima povećanu antioksidativnu aktivnost i termalnu stabilnost u odnosu na nemodifikovani protein (Wang et al., 2019).

Proteini kovalentno derivatizovani polifenolnim jedinjenjima mogu imati izmenjenu digestibilnost gastrointestinalnim proteazama. Efekat fenolnog derivata na digestibilnost proteina rezultat je mnogih faktora, uključujući aminokiselinski sastav proteina, mesto modifikacije, strukturu proteina i efekat derivatizacije fenolnim jedinjenjem na strukturu proteina, pa efekat na digestibilnost može biti dvojak (Ćirković Veličković i Stanić-Vučinić, 2018). Dok se konjugati proteina surutke i nekih fenolnih jedinjenja (ferulinska, hlorogena, kofeinska i galna kiselina) manje digestuju tripsinom, himotripsinom, pepsinom i pankreatinom u odnosu na nemodifikovanu surutku (Rawel et al., 2001), drugi konjugati, kao što je primer kovalentnog konjugata proteina surutke ili BLG-a sa kvercetinom i rutinom, imaju povećanu digestibilnost tripsinom, himotripsinom i pepsinom (Rawel et al., 2003).

Kovalentne modifikacije BLG-a mogu da utiču i na njegov alergeni potencijal, kao što je to slučaj sa modifikacijom BLG-a neenzimskim glikozilovanjem (Zhong et al., 2015; Zhong et al., 2013) ili polifenolima EGCG-om i hlorogenom kiselinom (Wu et al., 2018), kojima se smanjuje alergenicost BLG-a. Konjugati BLG-a i karboksimetildekstrana pokazuju manju imunogenost u poređenju sa nemodifikovanim proteinom, usled zaklanjanja epitopa hemijskom modifikacijom i promena u obradi od strane antigen-prezentujućih ćelija, a istovremeno se povećava termalna stabilnost proteina i zadržava osobina BLG-a da vezuje retinol (Hattori et al., 2000). Slično tome, galoil grupe EGCG-a maskiraju IgE epitope na površini BLG-a, čime utiču na smanjenje alergenicosti konjugata BLG-a i EGCG-a u poređenju sa nemodifikovanim proteinom (Zhang et al., 2021).

2.2.2. Albumin goveđeg seruma

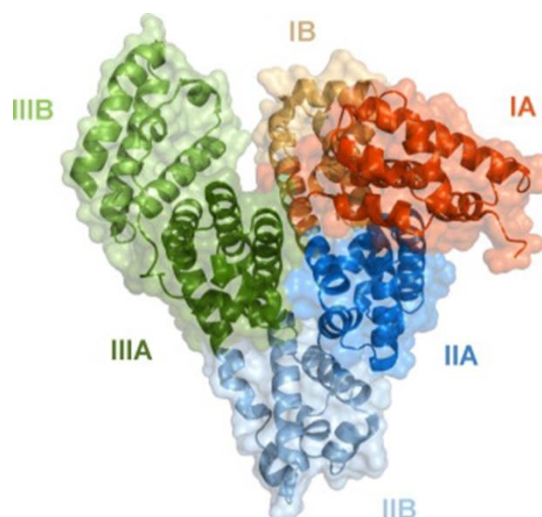
Albumini su jedni od najizučavanijih proteina i model proteini u mnogim biohemijskim i biofizičkim studijama. To su najzastupljeniji proteini plazme sisara i čine oko 60% svih proteina krvi. Sintetišu se u jetri i eksportuju u plazmu kao neglikozilovani proteini, gde dostižu visoku koncentraciju (oko 0,6 mM). Poluživot albumina u cirkulaciji je 19 dana. Osnovne biološke funkcije albumina vezane su za održavanje osmotskog pritiska i pH krvi, a istovremeno učestvuju u transportu brojnih endogenih i egzogenih supstanci, kao što su masne kiseline, bilirubin, aminokiseline, hormoni, vitamini, joni metala, lekovi i mnoge druge (Peters, 1995). Masne kiseline su primarni fiziološki ligandi albumina, pa albumini poseduju čak sedam vezivnih mesta za masne kiseline srednjeg i dugačkog lanca i četiri dodatna mesta za masne kiseline kratkog lanca. Pored toga, sadrže dva glavna mesta za vezivanje lekova, jedno mesto za bilirubin, pet vezivnih mesta za tiroksin i nekoliko mesta koja su specifična samo za određeni ligand, a mogu da vezuju i biološki važne katjone (Bujacz, 2012). Albumin goveđeg seruma (BSA, od engl. *bovine serum albumin*), sa najmanje tri vezivna mesta za jone kalcijuma, je glavni cirkulatorni protein koji je uključen u

vezivanje jona Ca^{2+} i Mg^{2+} , zbog čega je najodgovorniji za kontrolisanje njihovog jonizovanog, odnosno „biološki aktivnog“ nivoa u krvi (Majorek et al., 2012). Premda je konstanta vezivanja Ca^{2+} mala ($K_a=1,5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ za HSA, albumin humanog seruma) (Kragh-Hansen i Vorum, 1993), oko 45% kalcijuma u serumu je vezano za albumin (Peters, 1995). Vezivna mesta za mnoge aromatične i heterociklične ligande na molekulu HSA su locirana u hidrofobnim džepovima unutar subdomena IIA i IIIA, a analogna vezivna mesta postoje i na drugim serumskim albuminima. Ova mesta su poznata i kao Sadlouova (Sudlow) vezivna mesta I i II (Sudlow et al., 1975). Zbog velikog broja vezivnih mesta za različite ligande i velike zastupljenosti u serumu, HSA je značajan regulator biodostupnosti i farmakokinetike endogenih i egzogenih liganada koje vezuje i prenosi kroz sistemsku cirkulaciju, a sličnost aminokiselinske sekvence BSA i HSA čini BSA važnim model sistemom za izučavanje protein-ligand interakcija HSA i brojnih liganada.

2.2.2.1. Struktura albumina goveđeg seruma

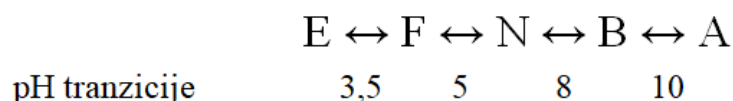
Albumin goveđeg seruma je monomerni, α -helikoidni globularni protein, molekulske mase 66400 Da i pI vrednosti 4,7. Sastoji se od jednog polipeptidnog lanca koji se sintetiše kao preproalbumin, koji uključuje signalnu sekvencu i propeptid, ukupne dužine 607 aminokiselina. Njihovim odsecanjem nastaje zreli protein koji sadrži 583 aminokiseline. Sličnost aminokiselinske sekvence zrelih formi albumina goveđeg seruma i albumina humanog seruma iznosi 75,6% (Majorek et al., 2012; Peters, 1995). Iako homologija aminokiselinskih sekvenci nije mnogo velika, dve odlike albumina su konzervirane u različitim vrstama – tercijarna struktura i obrazac disulfidnih veza (Bujacz, 2012). Naime, kristalografski podaci pokazuju da BSA čine tri strukturno slična domena (I, II i III) u kojima je α -heliks dominantan tip sekundarne strukture (74%), dok ostali deo polipeptidnog lanca čine zavijuci i izduženi/fleksibilni regioni između subdomena, uz odsustvo β -pločica, što je karakteristika svih molekula albumina. Svaki domen je sastavljen od dva subdomena (A i B) povezana dugačkom, fleksibilnom petljom, koji poseduju slične strukturne motive – subdomen A sadrži šest heliksa i četiri disulfidne veze (sa izuzetkom subdomena IA koji ima samo tri disulfida), a subdomen B četiri heliksa i dve disulfidne veze (Bujacz, 2012; Majorek et al., 2012). Polipeptidni lanac formira srcoliku strukturu koja je prikazana na **Slici 12** (Majorek et al., 2012). Premda su domeni BSA slične aminokiselinske sekvence i strukture, domen III se delimično razlikuje od druga dva domena i u pogledu aminokiselinske sekvence i u pogledu konformacije, pa se čini da se evolutivno brže menjao od druga dva (Bujacz, 2012).

BSA sadrži 59 ostataka lizina, koji mogu biti meta kovalentne modifikacije proteina, 17 konzerviranih disulfidnih veza koje doprinose stabilnosti albumina u cirkulaciji i jednu slobodnu tiolnu grupu na poziciji 34 (Bujacz, 2012; Majorek et al., 2012; Peters, 1995). Pored ostatka triptofana u hidrofobnom džepu subdomena IIA (Trp 212), BSA poseduje i dodatni ostatak triptofana (Trp 134), koji nije prisutan u molekulu HSA, a nalazi se u vezivnom džepu FA1, na površini subdomena IB. Ovaj ostatak triptofana bitan je sa aspekta spektrofluorimetrijskog ispitivanja vezivanja liganada za BSA (Bujacz, 2012). Slobodni ostatak cisteina 34 u domenu I albumina humanog seruma je vezivno mesto za mnoge biološki i klinički značajne male molekule, a analogan ostatak cisteina prisutan je i u molekulu BSA. On predstavlja najveći deo slobodnog tiola u krvi i kao takav najzaslužniji je za antioksidativnu aktivnost proteina krvi (Belinskaia et al., 2020; Stewart et al., 2005).



Slika 12. Struktura albumina goveđeg seruma sa obeleženim subdomenima (PDB 4F5S, , rezolucija 2,47 Å, pristupljeno 15.8.2024).

Albumini su stabilni u opsegu pH od 4-9 i trpe produženo zagrevanje na visokim temperaturama (10 h na 60 °C) (Peters, 1995), zbog čega su pogodni za korišćenje u prehrambenoj industriji kao aditivi. Iako je stabilan u širokom opsegu pH vrednosti, molekul albumina podleže određenim pH-zavisnim konformacionim promenama pod nefiziološkim uslovima. Pored „normalne“ (N) forme BSA, koja je dominantna na neutralnim pH vrednostima, prepoznate su još četiri forme BSA koje su međusobno u ravnoteži. U pitanju su F (od engl. *fast*) ili brza forma, koja je prisutna na pH 4, E (od engl. *extended*) ili izdužena forma koja se javlja na pH vrednostima manjim od 3, B ili bazna forma prisutna je na pH vrednostima oko 8 i A (od engl. *aged*) ili krajnja forma koja je prisutna na pH vrednostima oko 10 (**Slika 13**). U skladu sa tim, opisane su N–F tranzicija BSA, koja se javlja u oblasti pH 5-3,5, F–E tranzicija, koja se javlja na pH vrednostima ispod 3,5 i N–B tranzicija, koja se javlja u oblasti pH od 7-9 (Carter i Ho, 1994; Peters, 1995).



Slika 13. Shematski prikaz konformacionih prelaza molekula BSA.

U slučaju N–F tranzicije, snižavanjem pH vrednosti rastvora albumin prolazi kroz velike promene tercijarne i sekundarne strukture, tokom kojih dolazi do razvijanja domena III u odnosu na ostatak molekula i značajnog smanjenja helikoidne strukture, na račun povećanja β-pločica i β-zavijutaka. Tokom ove tranzicije, domen I HSA podleže samo manjim promenama sekundarne strukture, a sa snižavanjem pH vrednosti rastvora domen II zadobija konformaciju stopljene globule. Dalje snižavanje pH vrednosti ispod pH 3,5 dovodi do daljeg razvijanja proteina do pH vrednosti od oko 2,5 (F–E tranzicija), na kojoj je molekul proteina u maksimalno izduženoj konformaciji, koliko to disulfidne veze dozvoljavaju. U alkalnim uslovima, na pH vrednostima između 7 i 9, BSA i HSA podležu drugoj konformacionoj promeni, poznatoj kao N–B tranzicija, koja je mnogo manja od one do koje dolazi u kiselim uslovima. Tokom N–B tranzicije dolazi do labavljenja strukture proteina i gubljenja rigidnosti, koja posebno utiče na N-terminalni region i ima za posledicu izmenjena svojstva proteina u pogledu vezivanja liganada. Nasuprot N–F tranziciji, tokom ove tranzicije ne dolazi do strukturnih promena domena III, dok domeni I i II podležu promenama tercijarne strukture (Carter i Ho, 1994; Dockal et al., 2000; Wilting et al., 1980).

2.2.2.2. Albumin govedeg seruma kao protein hrane

Pored toga što se nalazi u serumu, BSA je i protein prisutan u hrani, poput kravljeg mleka, u kom čini oko 10% proteina surutke (Madureira et al., 2007), i mesa, a takođe se koristi i kao aditiv u prerađenoj hrani. Velika koncentracija u serumu i jednostavno izolovanje čine BSA proteinom koji se često koristi kao aditiv hrane zbog svojih emulgujućih i gelirajućih osobina, kao i sposobnosti vezivanja i stabilizacije različitih bioaktivnih liganada koji se oralno unose. Naime, BSA se dodaje kao stabilizator emulzija ulja u vodi (Saito et al., 2006), a stabilnost emulzije zavisna je od koncentracije proteina i, sa određenim odstupanjima pri najmanjim i najvećim koncentracijama BSA, pokazuje porast sa porastom koncentracije proteina (Al-Malah et al., 2000). Dodatni faktori koji utiču na stabilnost emulzija su pH i jonska sila rastvora (Rangsansarid i Fukada, 2007). Dodavanje BSA emulzijama pripremljenim od fenolnih jedinjenja devičanskog maslinovog ulja, osim što ih stabilizuje, povećava antioksidativnu aktivnost ovih emulzija, usporavajući lipidnu peroksidaciju čak i nakon produženog stajanja na visokoj temperaturi (45 dana na 60 °C) (Bonoli-Carbognin et al., 2008). Opisane su i dvoslojne emulzije na bazi BSA i gumirabike za stabilizaciju β -karotena, koje su, u poređenju sa jednoslojnim emulzijama, hemijski stabilnije na uticaj temperature, pH, UV zračenja i oksidaciju (Sheng et al., 2018). Istovremeno, BSA se zbog svoje dostupnosti, stabilnosti i biokompatibilnosti često razmatra u kontekstu pripreme pH-senzitivnih i redoks-senzitivnih hidrogelova za upotrebu u tkivnom inženjeringu (Raja et al., 2015) i biomedicini (Xia et al., 2021), a sposobnost geliranja BSA ima potencijalnu primenu i u industriji hrane za pripremu hidrogelova u koje se mogu inkorporirati bioaktivne komponente hrane, poput kofeina (Gan et al., 2009) i vitamina C (Peng et al., 2016), čime se obezbeđuje njihovo produženo oslobađanje.

Iako imaju veliku sličnost sekvence sa albuminom humanog seruma, albumini seruma, među njima i BSA, su okarakterisani kao alergeni (Chruszcz et al., 2013). U slučaju BSA, identifikovana su dva regiona na površini nativnog molekula, koja pokazuju značajne razlike u odnosu na molekul HSA, oba locirana u subdomenu IB. Ovi regioni mogu biti odgovorni za alergičnost BSA (Majorek et al., 2012). U populaciji pacijenata alergičnih na mleko, deo pacijenata reaguje i na crveno meso usled prisustva BSA u mesu, premda je reaktivnost manja kada je meso više pečeno, što se povezuje sa termolabilnošću BSA i govedeg gama-globulina (Werfel et al., 1997).

2.2.2.3. Albumin govedeg seruma kao transporter lekova i drugih bioaktivnih molekula

Kao što je već spomenuto, BSA se zbog svoje biokompatibilnosti, biodegradabilnosti i velikog kapaciteta za vezivanje i hidrofilnih i hidrofobnih liganada često razmatra kao nano-nosač lekova (Spada et al., 2021) i bioaktivnih komponenti hrane (Visentini et al., 2023). Vezivanje bioaktivnih molekula za albumine može biti nekovalentno i/ili kovalentno, a vezivanjem za protein uglavnom se teži povećanju stabilnosti malih molekula ili njihovom kontrolisanom otpuštanju, što posledično ima uticaj na poboljšanje njihovih farmakokinetičkih osobina i povećanje biološke aktivnosti (Elzoghby et al., 2012; Pilati i Howard, 2020; Tayyab i Feroz, 2021). U pogledu korišćenja BSA kao nosača za lekove, od značaja je i njegova specifična interakcija sa receptorima koji su eksprimirani na površini mnogih tumorskih ćelija, čime se obezbeđuje specifičnost delovanja i zaobilazi dodavanje posebnih liganada u nano-nosače na bazi BSA, kojima bi se inače težila postići specifičnost delovanja leka. U tom kontekstu od posebnog značaja je gp60 receptor, glikoprotein koji se nalazi na površini endotelne ćelije mnogih tumora, za koji se albumin vezuje visokim afinitetom. Nakon vezivanja albumina, gp60 se sa unutrašnje strane vezuje za kaveolin-1, što za posledicu ima invaginaciju ćelijske membrane i formiranje transcitoznih vezikula koje transportuju albumin, a time i njegove ligande, unutar tumora (Spada et al., 2021). Za povećanje specifičnosti, za nano-nosače na bazi BSA mogu se konjugovati monoklonska antitela ili njihovi fragmenti, citokini, peptidi, aptameri i drugi ligandi koji mogu specifično interagovati sa markerima na površini tumorskih ćelija (Fanciullino et al., 2013). Osim što se primenjuje kao nosač lekova,

BSA se čini obećavajućim proteinom za enkapsulaciju bioaktivnih jedinjenja poreklom iz hrane, posebno onih osetljivih na oksidaciju, poput fenolnih jedinjenja, lipida, vitamina i karoteonida (Visentini et al., 2023).

Paklitaksel, poznat pod komercijalnim imenom Taxol, najpoznatiji je prirodni lek protiv raka, koji je dostupan i u obliku nanočestica stabilizovanih albuminom (*nab-paclitaxel*, od engl. *nanoparticle albumin-bound paclitaxel*) (Stinchcombe, 2007). Kao alternativa postojećim formulacijama nanočestica na bazi albumina za enkapsulaciju paklitaksela, koje se dobijaju homogenizacijom pod visokim pritiskom, u novije vreme se, u cilju razvijanja terapijski efikasnijih formulacija, razvijaju alternativni načini pripreme stabilnih i monodisperznih albuminskih nanočestica. U jednom od njih, BSA se denaturiše guanidin-hidrohloridom i redukuje DTT-om, nakon čega se, u prisustvu diamida, prave čestice BSA povezane intermolekulskim disulfidnim vezama, koje sadrže enkapsuliran paklitaksel. Ovakve čestice pokazuju veću stabilnost i sporije otpuštaju paklitaksel, u poređenju sa trenutno dostupnim albuminskim formulacijama leka (Kono et al., 2024). Pored toga, enkapsulacija timohinona, glavne bioaktivne komponente crnog kumina, u nanočestice na bazi BSA dovodi do termalne stabilizacije timohinona, a ujedno deluje pozitivno na regeneraciju nervnog sistema pljosnatih crva (Kazan et al., 2019). Pokazano je i da se vezivanjem EGCG-a za hidrofobne džepove BSA nanočestica, pripremljenih zagrevanjem smeše BSA i α -karagenana, smanjuje degradacija i povećava aktivnost EGCG-a u pogledu uklanjanja slobodnih radikala na neutralnim pH vrednostima (Li i Wang, 2015), dok enkapsulacija katehina i epikatehina unutar nanočestica na bazi BSA povećava termostabilnost ovih flavonoida i obezbeđuje njihovo produženo oslobađanje sa površine nanočestica, uz istovremeno povećanje njihovih antioksidativnih i citotoksičnih osobina (Yadav et al., 2014). Slično tome, nanočestice na bazi BSA povećavaju stabilnost enkapsuliranog kvercetina u simuliranoj intestinalnoj tečnosti, uz očuvanje njegove antioksidativne aktivnosti (Fang et al., 2011). Kompleksiranje sa BSA predlaže se kao mogući način povećanja stabilnosti i rastvorljivosti rezveratrola, polifenola kojem se pripisuju brojni efekti povoljni po zdravlje ljudi (kardioprotektivni, antiinflamatorni, neuroprotektivni i drugi efekti) i čija je upotreba kao suplementa hrane limitirana usled smanjene oksidativne stabilnosti i rastvorljivosti u vodenim rastvorima (Tabibiazar et al., 2019). Kovalentnom modifikacijom N-acetilcisteinom nanočestica BSA sa inkorporiranim kurkuminom obezbeđuje se veća stabilnost i mukoadhezivnost kurkumina, što utiče na njegovo povećano zadržavanje u gastrointestinalnom traktu i poboljšanu biodostupnost (Zhang et al., 2019). Bolja disperzibilnost i veća biodostupnost hidrofobnog karotenoida fukoksantina u vodenim rastvorima postižu se njegovim enkapsuliranjem u nanočestice na bazi BSA i oleinske kiseline. U *in vivo* testu biodostupnosti, enkapsuliranjem u čestice na bazi BSA postiže se veća intestinalna apsorpcija i skoro 7 puta veća serumska koncentracija fukoksantina u poređenju sa direktnim oralnim unosom fukoksantina (Li et al., 2021).

U literaturi su opisani i brojni primeri kovalentnih konjugata BSA i bioaktivnih molekula. Kovalentni konjugat BSA i kofeinske kiseline poseduje značajno, čak sedam i po puta, veću antioksidativnu aktivnost od nemodifikovanog BSA. Zahvaljujući emulgujućim osobinama BSA, ovaj konjugat iskorišćen je za stabilizaciju nanočestica na bazi zeina koje sadrže rezveratrol. Pokazano je da konjugat štiti rezveratrol od oksidacije efikasnije od nemodifikovanog BSA (Fan et al., 2018a). Osim toga, kovalentnim konjugovanjem kurkumina za BSA postiže se povećanje rastvorljivosti kurkumina, a antikancerska aktivnost BSA–kurkumin konjugata pokazana je u prekliničkim ispitivanjima, korišćenjem mišjeg modela limfoma (Aravind i Krishnan, 2016).

2.3. Kovalentne modifikacije proteina u analitici

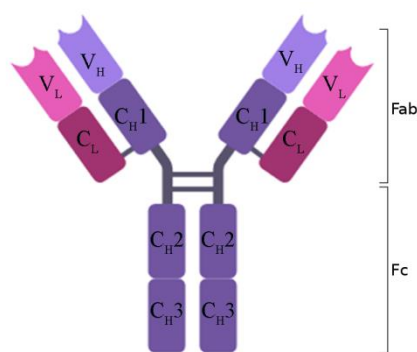
Proteini se mogu kovalentno modifikovati drugim molekulima u cilju upotrebe dobijenih konjugata u analitičke svrhe. Možda najreprezentativniji primer ovakvog vida kovalentne modifikacije je modifikacija molekula antitela enzimima, fluoroforima, oligonukleotidima i drugim molekulima. Tako dobijeni konjugati antitela koriste se u imunohemijskim metodama za specifičnu i osetljivu detekciju analita od interesa u oblasti medicine, prehrambene industrije i biotehnologije

(Berg i Fishman, 2020; Hermanson, 2013). Još jedan široko korišćen primer konjugata sa proteinima su matriksi za upotrebu u afinitetnoj hromatografiji, kao što su, na primer, Protein A i Protein G *Sepharose* matriksi za prečišćavanje antitela. U pitanju su matriksi na bazi umrežene agaroze, čije su hidroksilne grupe modifikuju u reakciji sa cijanogen-bromidom, NHS grupama ili epoksidima. Za tako aktiviran matriks se kovalentno vezuju Protein A ili Protein G, proteini koji imaju visok afinitet za Fc region IgG antitela, ali i Fab regiona antitela u slučaju proteina G, zbog čega se ovi afinitetni matriksi koriste u prečišćavanju antitela (Bolton i Mehta, 2016; Eliasson et al., 1991). Pored toga, BSA aktiviran maleimidom koristi se kao nosač za pripremu konjugata sa neimunogenim peptidima ili haptenima koji sadrže slobodnu sulfhidrilnu grupu, koji zbog male molekulske mase nisu dovoljno imunogeni sami po sebi. Ovako dobijeni konjugati zadržavaju rastvorljivost, čak i u slučaju ekstenzivne modifikacije haptenima, i koriste se u postupku imunizacije, za dobijanje odgovarajućih antitela, ili u metodama skrininga antitela (Hermanson, 2013). Dalje, u dvodimenzionalnoj diferencijalnoj gel elektroforezi (2D DIGE, od engl. *two-dimensional difference gel electrophoresis*) proteinski uzorci se kovalentno obeležavaju jednom od tri fluorescentne boje na bazi derivata cijanina (Cy) – Cy3, Cy2 ili Cy5, koje su aktivirane kovalentnom modifikacijom NHS-om i imaju talasne dužine ekscitacije i emisije koje se međusobno razlikuju dovoljno da obezbede specifičnu detekciju obeleženih proteina. Estarska reaktivna grupa NHS-a kovalentno se vezuje za ϵ -amino grupe lizinskih ostataka proteina od interesa. Alternativno, moguće je obeležiti i ostatke cisteina proteina od interesa analognim bojama koje su aktivirane maleimidnom grupom. Nakon kovalentnog obeležavanja bojom, proteinski uzorci se pomešaju, a zatim razdvajaju u prvoj dimenziji izoelektričnim fokusiranjem, a potom elektroforetski u drugoj dimenziji, nakon čega se porede intenziteti fluorescencija različitih boja, kako bi se izveli zaključci o razlikama u nivou ekspresije proteina između različitih uzoraka (Obermaier et al., 2021; Ünlü et al., 1997). Pored toga, u kvantitativnoj proteomici ističe se i metoda obeležavanja proteina stabilnim izotopima, u kojoj se slobodni ostaci Cys kovalentno modifikuju reagensom koji u svojoj strukturi sadrži grupu reaktivnu prema tiolima (na primer, jodacetamid), biotin i linker koji sadrži osam atoma vodonika ili deuterijuma. Nakon digestije endopeptidazom i prečišćavanja peptida koji sadrže biotin afinitetnom hromatografijom, uzorci se razdvajaju RP-HPLC-om i analiziraju masenom spektrometrijom, kojom se peptidni parovi koji potiču od različitih uzoraka identifikuju prema razlici u masama od 8 Da (Gygi et al., 1999). Još jedan primer kovalentne modifikacije proteina u cilju njihove kasnije detekcije je obeležavanje biološki relevantnih proteina fluoroforima zarad njihove ekstracelularne ili intracelularne lokalizacije, najčešće tehnikama fluorescentne mikroskopije (Ishikawa-Ankerhold et al., 2012). Primeri ovakvih konjugata su konjugat fluorescein-izotiocijanata (FITC) i fibronektina iz humane plazme, koji je iskorišćen za proučavanje uloge fibronektina u remodelovanju vanćelijskog matriksa (Hoffmann et al., 2008), ili fluorescentni konjugat glikovanog BLG-a i FITC-a kojim je, korišćenjem protočne citometrije i konfokalne mikroskopije, praćeno preuzimanje BLG-a od strane dendritskih ćelija (Perusko et al., 2018).

2.3.1. Imunoglobulini

Imunoglobulini (antitela) čine grupu proteina plazme koju sintetišu B ćelije, i koji učestvuju u humoralnom imunom odgovoru. To su heterodimerni glikoproteini, koji se sastoje iz četiri polipeptidna lanca – dva identična laka lanca (L, od engl. *light*) i dva identična teška (H, od engl. *heavy*) lanca, povezana disulfidnim vezama. Shematski prikaz strukture imunoglobulina prikazan je na **Slici 14**. Četiri polipeptidna lanca spojena su tako da grade molekul koji ima oblik slova Y. Disulfidne veze spajaju svaki laki lanac sa jednim teškim lancem, kao i teške lance međusobno. Teški i laki lanci imunoglobulina sastoje se od varijabilnih (V) domena, koji se nalaze na N-terminalnom kraju molekula, i konstantnih (C) domena na C-terminalnim krajevima lanaca, a svaki V ili C domen se sastoji od oko 110-130 aminokiselina. Svaki imunoglobulinski domen sastoji se od dve nabrane β -ploče koje su povezane disulfidnim mostom. Laki lanac čini jedan varijabilni V_L domen i jedan konstantni, C_L domen. Teški lanci sadrže jedan varijabilni V_H domen i tri ili četiri

konstantna domena (C_H1 , C_H2 , C_H3 , C_H4). Oni teški lanci koji sadrže tri konstantna domena sadrže region zgloba između domena C_H1 i C_H2 . Polipeptidni lanci imunoglobulina su povezani kovalentnim i nekovalentnim vezama. Svaki laki lanac je povezan sa jednim teškim lancem disulfidnom vezom i nekovalentnim interakcijama kao što su soni mostovi, vodonične veze i hidrofobne interakcije, čime se formira H–L heterodimer. Slične nekovalentne interakcije i disulfidne veze formiraju se i između dva teška lanca dajući $(H-L)_2$ tetramer. Strukturna kompaktnost pojedinačnih domena održava se intramolekulskim disulfidnim vezama, pa svaki V i C domen H i L lanca sadrži po jednu disulfidnu vezu. Dejstvom proteolitičkih enzima na molekul antitela dobijaju se tri fragmenta - dva identična Fab (od engl. *fragment antigen binding*) fragmenta koji mogu da vezuju antigene i jedan Fc (od engl. *fragment crystalline*) fragment, koji se tako naziva zbog osobine da kristališe u rastvoru. Fab fragment sadrži laki lanac i V_H i C_H1 domene jednog H lanca. Varijabilni regioni lakog i teškog lanca grade antigen-vezujuće mesto, dok su konstantni regioni oba lanca odgovorni za efektorske funkcije antitela (Abbas et al., 2021; Delves et al., 2017; Schroeder i Cavacini, 2010).



Slika 14. Shematski prikaz strukture imunoglobulina. Napravljeno u BioRender programu (<https://www.biorender.com/>).

Prema tipu teškog lanca imunoglobulini se dele u 5 klasa: IgG, IgM, IgA, IgD i IgE. Klasa IgG antitela se dalje deli na 4 potklase (IgG1, IgG2, IgG3 i IgG4), a IgA klasa na potklase IgA1 i IgA2, pa se ukupno razlikuje devet izotipova antitela. Klase i potklase antitela su posledica izotipskih varijacija imunoglobulinskih gena. Laki lanac imunoglobulina ima molekulsku masu od 25 kDa. Postoje dve vrste lakog lanca imunoglobulina kod ljudi – κ i λ lanac. U pojedinačnom molekulu antitela oba laka lanca su iste vrste. Teški lanac imunoglobulina ima masu od 50-77 kDa i u strukturnom smislu je različit kod različitih (pot)klasa imunoglobulina. Osim po sekvenci konstantnog regiona teškog lanca, klase antitela razlikuju se prema veličini, naelektrisanju i sadržaju ugljenih hidrata. Broj i pozicija disulfidnih veza takođe se razlikuju kod različitih klasa i potklasa antitela (Delves et al., 2017).

Imunoglobulin G je dominantan imunoglobulin u ljudskom serumu i sa koncentracijom u serumu od oko 13,5 mg/ml čini oko 70-75% ukupnih serumskih imunoglobulina i 10-20% ukupnih proteina plazme (Delves et al., 2017; Vidarsson et al., 2014). Ujedno je i imunoglobulin sa najdužim poluživotom u serumu. IgM antitela čine oko 10% ukupnih serumskih imunoglobulina, IgA oko 15-20% serumskih imunoglobulina, IgD manje od 1%, a IgE antitela ima najmanje u serumu ($< 0,05 \mu\text{g/ml}$) (Delves et al., 2017).

2.3.1.1. Struktura IgG antitela

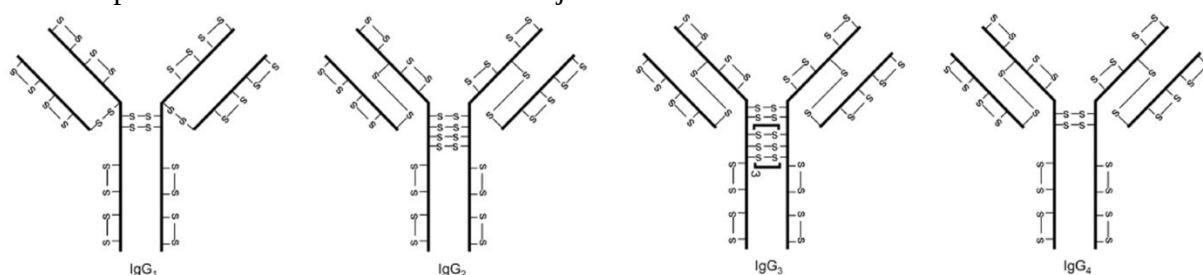
Imunoglobulin G je monomerni protein koji se sastoji od 2 laka i 2 teška lanca, ukupne molekulske mase od 146-170 kDa, zavisno od potklase (IgG3 potklasa ima molekulsku masu 170 kDa, a ostale potklase 146 kDa). Tip teškog lanca određuje klasu i potklasu imunoglobulinskog molekula, pa tako postoje 4 potklase IgG antitela (IgG1, IgG2, IgG3 i IgG4), čiji se teški lanci

označavaju kao $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$ i $\gamma 4$, a međusobno se razlikuju u sekvenci konstantnog regiona (Delves et al., 2017). Razlike su posebno izražene u regionu zgloba, koji je značajno duži i fleksibilniji kod antitela potklase IgG3 (videti **Odeljak 2.3.1.2.**), zbog čega su antitela ove potklase i veće molekulске mase, kao i na N-terminalnom kraju C_H2 domena. Mnogo manje razlika u aminokiselinskoj sekvenci je nađeno u preostalim domenima (Vidarsson et al., 2014). Potklase humanih IgG antitela razlikuju se po zastupljenosti u serumu (66%, 23%, 7% i 4%, redom, za IgG1, IgG2, IgG3 i IgG4) (Delves et al., 2017). Iako postoji preko 95% sličnosti aminokiselinske sekvence Fc regiona IgG antitela različitih potklasa, svaku od četiri potklase odlikuje jedinstvena biološka aktivnost u pogledu prepoznavanja antigena, formiranja imunih kompleksa, aktivacije komplementa i efektorskih ćelija (Delves et al., 2017; Vidarsson et al., 2014). Prethodno spomenute razlike u C_H domenu utiču na fleksibilnost antitela i njihov afinitet prema antigenima, pa se nalaze u osnovi antigenskih i funkcionalnih razlika različitih potklasa antitela. Ove strukturne i funkcionalne razlike detaljno su obrađene u literaturi (Schroeder i Cavacini, 2010; Vidarsson et al., 2014) i prevazilaze tematske okvire ove disertacije, te će fokus daljeg teksta biti samo na onim aspektima strukture IgG antitela koji su relevantni za njihova analizirana svojstva.

2.3.1.2. Disulfidi IgG antitela i fragmentacija IgG antitela

Disulfidne veze značajne su za strukturni integritet, stabilnost i biološku funkciju antitela. Zavisno od klase i potklase, antitela sadrže različiti broj inter- i intramolekulskih disulfidnih veza. Intermolekulske disulfidne veze su izložene rastvaraču i locirane su u fleksibilnom regionu zgloba molekula antitela, dok su intramolekulske disulfidne veze trodimenzionalnom strukturom antitela „zaštićene“ i manje izložene rastvaraču. IgG molekuli sadrže dvanaest intramolekulskih disulfidnih veza, po jednu u svakom C i V domenu svakog H i L lanca. U fiziološkim uslovima, IgG antitela nemaju slobodnu sulfhidrilnu grupu, ali se, pod određenim uslovima, izvestan broj slobodnih sulfhidrilnih grupa detektuje u svim potklasama IgG antitela.

Potklase IgG antitela razlikuju se u broju intermolekulskih disulfidnih veza u regionu zgloba, pa tako IgG1 i IgG4 antitela imaju 2 disulfidne veze, IgG2 antitela 4 disulfidne veze, a IgG3 čak 11 veza. Razlike između potklasa IgG antitela postoje i na nivou intramolekulskih disulfidnih veza koje povezuju laki lanac sa teškim. Naime, kod IgG1 potklase C-terminalni cistein lakog lanca gradi disulfidnu vezu sa Cys220 C_H1 domena teškog lanca, koji se nalazi blizu regiona zgloba, dok kod preostale tri potklase IgG antitela Cys lakog lanca uspostavlja vezu sa Cys131, koji se nalazi između varijabilnog i konstantnog domena teškog lanca (Liu i May, 2012; Vidarsson et al., 2014). Shematski prikaz ovih strukturnih razlika dat je na **Slici 15**.

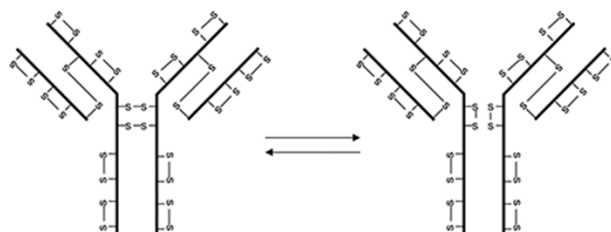


Slika 15. Obrasci disulfidnih veza u različitim potklasama IgG antitela (preuzeto i modifikovano iz Liu i May, 2012).

Dodatan nivo kompleksnosti se uočava u molekulima IgG2 i IgG4 antitela, kod kojih disulfidne veze u regionu zgloba mogu biti uspostavljene na više načina, usled čega se razlikuje više izomera ovih potklasa antitela. Mala energija disocijacije disulfidnih veza, kako slobodno-radikaliskim, tako i reduktivnim mehanizmom, i velika fleksibilnost u regionu zgloba antitela često dovode do modifikacija i fragmentacija antitela u ovom regionu antitela (Moritz i Stracke, 2017). Elektroforetska analiza antitela u neredukujućim uslovima bi, idealno, trebalo da da jednu traku na poziciji od oko 150 kDa. Međutim, artefakti nižih molekulskih masa od mase intaktnog antitela,

koji prema molekularnoj masi odgovaraju polovini molekula antitela, odnosno sastoje od jednog lakog i jednog teškog lanca, često se mogu uočiti pri elektroforetskoj analizi IgG antitela u neredukujućim uslovima, posebno IgG antitela potklase 4. Kao mogući razlozi nastanka značajnih količina „poluantitela“ potklase IgG4 navode se nepotpuno formiranje disulfidnih veza, ravnoteža između intra- i intermolekulskih disulfidnih veza u regionu zgloba IgG4 antitela, kao i proces izmene disulfidnih veza iniciran njihovim raskidanjem prilikom pripreme uzorka za SDS elektroforetsku analizu (Schoorman et al., 2001; Taylor et al., 2006).

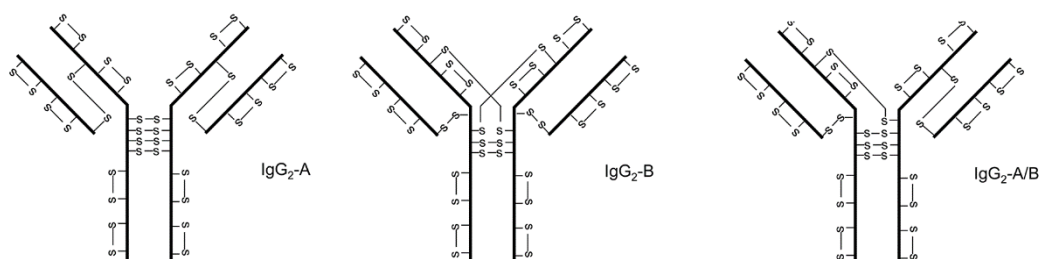
Nenativne disulfidne veze najbolje su okarakterisane kod IgG4 potklase antitela. Ova potklasa IgG antitela elektroforetskom analizom u denaturišućim, neredukujućim uslovima pokazuje traku na masi koja odgovara polovini molekula antitela, koja se ne detektuje u nativnim uslovima (Angal et al., 1993). Opisani fenomen objašnjava se postojanjem dva strukturna izomera IgG4 potklase antitela koji su u ravnoteži i razlikuju se na nivou disulfidnih veza u regionu zgloba. Naime, cisteinski ostaci regiona zgloba teškog lanca antitela IgG4 potklase mogu da grade intermolekulske disulfidne veze sa cisteinima drugog teškog lanca, ali i intramolekulsku disulfidnu vezu (**Slika 16**), pa, zavisno od redoks uslova okoline, ova potklasa IgG antitela gradi ili standardne, kovalentno povezane dimere, ili nekovalentno povezane molekule poluantitela, koji se sastoje od po jednog teškog i lakog lanca povezanih disulfidnom vezom. Smatra se da sekvenca IgG antitela potklase 4 u regionu zgloba nije optimalna za stabilnost intermolekulskih disulfidnih veza između dva teška lanca IgG₄ antitela. Mutacijom sekvence Cys-Pro-Ser-Cys regiona zgloba IgG4 antitela u sekvencu Cys-Pro-Pro-Cys, koja je prisutna u regionu zgloba IgG1 antitela, dolazi do stabilizacije intermolekulskih disulfidnih veza i gotovo u potpunosti se sprečava nastanak fragmenata IgG4 antitela (Schoorman et al., 2001). Mutagenezom C_H3 domena IgG4 antitela u C_H3 domen IgG1 antitela pokazano je da, pored regiona zgloba, i C_H3 domen igra značajnu ulogu u nestabilnosti IgG4 potklase antitela (van der Neut Kolfshoten et al., 2007). Kasnijim istraživanjima pokazano je da ključnu ulogu u nestabilnosti C_H3 domena teških lanaca ima aminokiselinski ostatak arginina na poziciji 409 teškog lanca IgG4 antitela (Labrijn et al., 2011).



Slika 16. Intermolekulske i intramolekulske disulfidne veze u strukturnim izomerima IgG4 potklase antitela (preuzeto i modifikovano iz Liu i May, 2012).

Nestandardne disulfidne veze uočene su i kod antitela IgG2 potklase i najpre su identifikovane kod rekombinantnih monoklonskih antitela, a zatim potvrđene kod molekula humanih IgG2 antitela izolovanih iz plazme pacijenata sa mijelomom, kao i kod poliklonskih IgG antitela izolovanih iz seruma zdravih ljudi, te se smatraju inherentnim svojstvom antitela IgG2 potklase (Wypych et al., 2008). Kod standardne izoforme A IgG2 antitela, četiri disulfidne veze se uspostavljaju u regionu zgloba antitela između dva teška lanca, dok se kod izoforme B uspostavljaju samo dva disulfidna mosta u regionu zgloba, dok preostala dva disulfidna mosta kovalentno povezuju Fab regione i region zgloba. Naime, dolazi do raskidanja postojećih intermolekulskih veza između lakih i teških lanca, pa preostala dva cisteina regiona zgloba teškog lanca uspostavljaju nove disulfidne veze, jednu sa cisteinom lakog lanca i drugu sa C_H1 domena drugog teškog lanca. Alternativno, kod mešovite A/B izoforme dolazi do raskidanja jedne disulfidne veze u regionu zgloba i raskidanja postojeće intermolekulske veze između samo jednog para lakog i teškog lanca. Cisteini regiona zgloba uspostavljaju nove disulfidne veze, jednu sa cisteinom lakog lanca i drugu sa C_H1 domena teškog lanca na način koji je shematski prikazan na **Slici 17** (Liu i May, 2012;

Wypych et al., 2008). Heterogena distribucija disulfidnih veza u antitelima potklase IgG2 zavisi od tipa lakog lanca u molekulu antitela. Naime, kod molekula IgG2 antitela koji sadrže λ laki lanac dominantna je IgG2 A izoforma, dok je izoforma B glavna forma kod IgG2 antitela koja sadrže κ laki lanac (Dillon et al., 2008). Iako se dugo smatralo da samo antitela IgA i IgM klasa mogu da grade kovalentne polimere, kasnija istraživanja su pokazala da IgG2 antitela, kako rekombinantna u ćelijskoj kulturi, tako i ona izolovana iz humanog seruma, mogu da grade disulfidnom vezom povezane dimere (Yoo et al., 2003), doprinoseći time diverzitetu strukturnih formi IgG antitela potklase 2.



Slika 17. Obrasci disulfidnih veza u strukturnim izomerima IgG2 potklase antitela (preuzeto i modifikovano iz Liu i May, 2012)

Prethodno opisana nestabilnost intermolekulskih disulfidnih veza između dva teška lanca IgG4 antitela može dovesti do fragmentacije molekula IgG4 na dva molekula poluantitela. Iako su sekvence regiona zgloba IgG1 i IgG2 potklasa IgG antitela optimalnije za stabilnost intermolekulskih disulfidnih veza (Angal et al., 1993; Schuurman et al., 2001), u literaturi su opisani fragmenti i ovih potklasa antitela, a koji prema masi odgovaraju fragmentima nastalim parcijalnom redukcijom molekula antitela. Prisustvo slobodnih sulfhidrilnih grupa u molekulima IgG1 i IgG2 antitela implicira postojanje nekompletnih disulfidnih veza (Zhang i Czupryn, 2002), koje time direktno doprinose nastanku fragmenata antitela. Ove nekompletne disulfidne veze doprinose fragmentaciji antitela i na indirektan način, jer promovišu izmenu disulfidnih veza (Liu et al., 2007b). Međutim, značajan deo fragmenata IgG1 i IgG4 antitela koji se uočavaju elektroforetskom analizom u neredukujućim uslovima potiče od uslova spremanja uzoraka za elektroforezu (zagrevanje u prisustvu detergenta na baznom pH) (Liu et al., 2007b; Zhu et al., 2013). Naime, poređenjem elektroforetskog profila rekombinantnog monoklonskog IgG1 antitela u neredukujućim i redukujućim uslovima i analizom fragmenata masenom spektrometrijom pokazano je da su u pitanju fragmenti koje čine: 1) molekuli antitela kojima nedostaje jedan laki lanac, 2) dva teška lanca, 3) poluantitela koja sadrže jedan laki i jedan teški lanac, 4) težak lanac antitela i 5) laki lanac antitela (Liu et al., 2007b). Dodatno, pojava više traka različite mobilnosti na poziciji od oko 25 kDa, koja po masi odgovara lakom lancu antitela, objašnjava se delimičnom redukcijom intramolekulskih disulfidnih veza lakih lanaca, što za posledicu ima različit stepen vezivanja SDS-a, a time i različitu mobilnost u električnom polju parcijalno redukovanih lakih lanaca u odnosu na neredukovane (Zhang i Czupryn, 2002). Smatra se da ovi fragmenti antitela nastaju primarno kao posledica izmene disulfida antitela do koje dolazi u denaturišućim uslovima prisutnim tokom priprema uzorka za elektroforezu, ali, u manjem obimu, i usled raskidanja disulfidne veze reakcijom β -eliminacije (Liu et al., 2007b). Intermolekulske disulfidne veze koje povezuju laki lanac sa teškim podložnije su redukciji od onih koje povezuju dva teška lanca IgG1 antitela (Liu et al., 2010). Prisustvo alkilujućih agenasa, poput jodacetamida i N-etilmaleimida, u puferu za pripremu uzoraka za elektroforetsku analizu inhibira fragmentaciju monoklonskih IgG4 antitela, blokiranjem slobodnih sulfhidrilnih grupa (Zhu et al., 2013).

2.3.1.3. Funkcionalne implikacije heterogenosti disulfidnih veza antitela

Heterogenost disulfidnih veza IgG antitela ima i funkcionalni značaj u pogledu uticaja na prepoznavanje antigena i efektorske funkcije Fc regiona antitela. Nenativne disulfidne veze mogu

dovesti do strukturnih promena antitela, koje se odražavaju na prepoznavanje antigena. U radu Dilon i saradnika, u kom su dizajnirana humana monoklonska IgG1 i IgG2 antitela sa identičnim antigen-vezujućim regionima specifičnim za tip 1 receptora za interleukin-1, zabeležena je razlika u inhibiciji vezivanja interleukin-1 β liganda za receptor za interleukin 1 zavisno od tipa antitela, pri čemu je aktivnost antitela opadala prema sledećem redosledu: IgG1 > IgG2-A > IgG2 >> IgG2-B. Izoforma IgG2-B pokazivala je čak tri puta manju aktivnost od IgG2-A izoforme, iako CD spektroskopijom nije pokazana razlika u sekundarnim strukturama između dve izoforme IgG2 antitela. Smanjena mobilnost Fab regiona IgG2-B izoforme navodi se kao mogući uzrok smanjene biološke aktivnosti (Dillon et al., 2008).

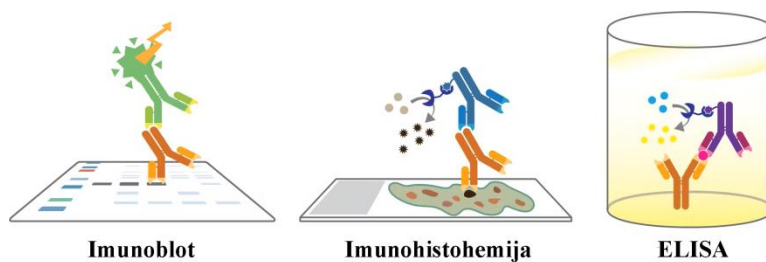
Izmena disulfida IgG4 antitela usled koje mogu nastati molekuli poluantitela takođe ima funkcionalne posledice. Ovako nastali molekuli poluantitela mogu se nasumično kombinovati sa drugim IgG4 poluantitelima različite specifičnosti prepoznavanja antigena, čime nastaju monovalentna bispecifična antitela. Iako ova antitela zadržavaju osobinu specifičnog prepoznavanja, usled gubitka multivalentnog prepoznavanja antigena pokazuju smanjenu aktivnost (van der Neut Kofschoten et al., 2007). Kombinovanje polovine molekula različitih IgG4 antitela pokazano je čak i između terapeutskog IgG4 antitela natalizumaba sa endogenim humanim IgG4 antitelima, što bi moglo da ima uticaj na farmakokinetiku i farmakodinamiku natalizumaba (Labrijn et al., 2009).

Navedene funkcionalne implikacije disulfidne heterogenosti i fragmentacije IgG antitela od posebnog su značaja u kontekstu upotrebe antitela u terapijske svrhe, gde je, pored analiziranja čistoće antitela, od posebne važnosti i karakterizacija integriteta i stabilnosti molekula antitela (Liu et al., 2007b; Moritz i Stracke, 2017; Tsuchikama et al., 2024). U tom smislu od posebnog značaja je poznavanje različitih uslova tokom kojih dolazi do izmene disulfidnih veza antitela i njihove fragmentacije.

2.3.1.4. Primena antitela u imunološkim tehnikama

Osim ključne uloge u humoralnom imunom odgovoru, antitela nalaze veliku primenu u istraživanju, medicini i industriji. Samo neki od primera upotrebe antitela su detekcija i kvantifikacija širokog spektra analita u kliničkim laboratorijama (Koivunen i Krogsrud, 2006; Monjezi et al., 2013), provera kvaliteta i bezbednosti hrane u industriji hrane (Samarajeewa et al., 1991), imunofenotipizacija i analiza citokina (McKinnon, 2018). Naime, usled specifičnog i visokoafinitetnog prepoznavanja antigena, antitela su reagensi izbora u imunološkim esejima za identifikaciju, kvantifikaciju i prečišćavanje određenog proteina u kompleksnoj proteinskoj smeši. Bilo koja bakterija, virus, protein ili kontaminant (poput pesticida) koji može stimulisati imuni odgovor se može koristiti kao antigen za proizvodnju antigen-specifičnih antitela, koja se potom mogu koristiti za dizajn imunoeseja za detekciju ili kvantifikaciju antigena od interesa, zasnovanom na specifičnom prepoznavanju antigena i antitela. Interakcije antitela i antigena, osim specifičnosti, odlikuje veoma visok afinitet, sa K_a do 10^{12} mol^{-1} .

Neke od najkorišćenijih imunoloških tehnika su enzimski povezan imunosorbentni esej (ELISA, od engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*), lateralni imunoešej, imunoblot, imunohistohemijsko bojenje, radioimunoeseji (Koivunen i Krogsrud, 2006; Yu et al., 2015), protočna citometrija (McKinnon, 2018), imunoprecipitacija (Kaboord i Perr, 2008), imunoafinitetna hromatografija (Moser i Hage, 2010; Yu et al., 2015), imuno-PCR (Monjezi et al., 2013; Radomirović et al., 2023), imunoeseji zasnovani na rezonanciji površinskog plazmona (SPR-imunoeseji, od engl. *surface plasmon resonance*) (Mullett et al., 2000; Yu et al., 2015), itd. Na **Slici 18** shematski su prikazane neke od ovih imunoloških metoda.



Slika 18. Primena antitela u različitim imunološkim tehnikama (preuzeto sa web sajta: <https://www.mlo-online.com/diagnostics/immunodiagnosics/article/21155155/choosing-the-right-antibody-for-successful-immunohistochemistry>). Antigen-specifično antitelo koristi se za specifičnu i osetljivu detekciju antigena od interesa.

2.3.1.5. Kovalentne modifikacije antitela

Za detekciju antigena od interesa u imunološkim metodama se koriste primarna antitela, koja specifično prepoznaju antigen od interesa, i sekundarna antitela, koja prepoznaju primarna antitela. Kako bi mogla da se koriste za detekciju antigena, primarna ili sekundarna antitela se kovalentno modifikuju drugim molekulima, poput enzima, fluorofora, biotina, DNK i radionuklida, signalnim molekulima koji na taj način indirektno služe za detekciju antigena. Istovremeno, i upotreba antitela kao proteinskih terapeutika se zasniva na kovalentnom konjugovanju leka i antitela specifičnog za određeni ćelijski marker.

Antitela se, uglavnom, kovalentno modifikuju nasumičnim ili, u novije vreme, mesto-specifičnim konjugacijama NHS estara i izotiocijanata, koji reaguju sa primarnim aminima lizinskih ostataka molekula antitela, ili maleimidima-aktiviranim molekulima koji modifikuju sulfhidrilne grupe ostataka cisteina. U nekim slučajevima, standardne tehnike obeležavanja dovode do smanjene imunoreaktivnosti antitela, usled modifikacija aminokiselinskih ostataka ključnih za prepoznavanje antigena. Ovi problemi se prevazilaze ili optimizovanjem standardnih metoda (na primer, zaštitom antigen-vezujućeg mesta pre kovalentne modifikacije antitela) ili korišćenjem alternativnih metoda obeležavanja antitela, koje modifikuju karboksilne grupe aminokiselina ili ugljenohidratnu komponentu antitela. Naelektrisane grupe, poput amino i karboksilne, koje se nalaze na površini molekula antitela, primarno su mesto hemijske modifikacije. Primarni amini su najčešća meta kovalentne modifikacije zbog svoje zastupljenosti i reaktivnosti amino grupe, usled čega se relativno jednostavno modifikuju (Berg i Fishman, 2020; Hermanson, 2013). U molekulu antitela se nalazi oko 80 ostataka lizina, pri čemu je gotovo polovina njih izložena rastvaraču i dostupna za konjugaciju sa drugim molekulima (Feng et al., 2014), mada je, zavisno od vrste antitela, nekad moguće modifikovati u proseku samo 2,5 amino grupe. Pored toga, iako je teoretski moguće modifikovati veliki broj ostataka lizina, veći stepen modifikacije sa sobom nosi negativan uticaj na rastvorljivost i imunološke osobine antitela, pa se u praksi antitela uglavnom modifikuju u manjem stepenu (Mueller et al., 1988). Mada je ϵ -amino grupa lizinskih ostataka češće meta modifikacije, i N-terminalni kraj antitela, ako nije blokiran, može biti modifikovan. Karboksilne grupe aminokiselinskih ostataka glutamata i aspartata su, takođe, dostupne za reakcije konjugacije. Međutim, kako su ovi aminokiselinski ostaci često uključeni u protein-protein interakcije, njihova hemijska modifikacija može negativno uticati na antigen-vezujuću aktivnost antitela, posebno kada su u pitanju monoklonska antitela, te je od posebne važnosti ispitivanje efekta modifikacija ovih aminokiselinskih ostataka na funkcionalne osobine antitela. Modifikacije ugljenohidratne komponente antitela, koja se nalazi na Fc regionu antitela, značajne su sa aspekta udaljenosti ovog regiona antitela od antigen-vezujućeg mesta, zbog čega je manje verovatno da će modifikacija ovog regiona imati uticaj na prepoznavanje antigena. Dioli ugljenih hidrata Fc domena antitela mogu se, u reakciji sa perjodatom, fragmentisati do reaktivnih aldehida bez značajnog uticaja na smanjenje antigen-vezujućih karakteristika antitela. Aldehidne grupe antitela reaguju sa hidrazidima obeleživača, a reakcija obeležavanja se sastoji iz više koraka, pri čemu su koraci oksidacije posebno kritični. Sulfhidrilne grupe antitela modifikuju se nakon prethodne redukcije disulfidnih mostova

blagim redukcionim sredstvom. Najčešće su disulfidi regiona zgloba antitela meta modifikacije antitela, jer se najlakše mogu redukovati do tiola. Blagom redukcijom disulfida dolazi do raskidanja intermolekuskih veza u regionu zgloba, usled čega nastaju dva monovalentna domena antitela, bez uticaja na antigen-vezujuće mesto, ali sa mogućim značajnim uticajem na aviditet antitela (Berg i Fishman, 2020). Ostaci tirozina specifično se jodiraju radioaktivnim izotopima joda ^{124}I , ^{125}I i ^{131}I (Berg i Fishman, 2020; Hermanson, 2013; Hnatowich, 1990) ili se, korišćenjem bifunkcionalnih helatora, antitela obeležavaju radiometalima, poput ^{89}Zr , ^{64}Cu , ^{68}Ga i drugih (Chomet et al., 2021). Iako je radioaktivno obeležavanje antitela sve manje zastupljeno usled negativnog uticaja na životnu sredinu, u medicini se i dalje koriste radioaktivno obeležena antitela u pozitronskoj emisionalnoj tomografiji, kao i u oblasti kancerskih terapeutika (Chomet et al., 2021; Parakh et al., 2022).

U proteinskom terapeutiku gemtuzumab ozagamicinu, konjugatu monoklonskog antitela i leka iz klase kaliheamicina, lek je za molekul antitela konjugovan acilovanjem bočnog ostatka lizina (Stasi et al., 2008). Za konjugovanje antitela sa drugim molekulima često se koriste heterobifunkcionalni reagensi, kao što su sukcinimidil ester sukcinimidil 4-(N-maleimidometil)cikloheksan-1-karboksilat (SMCC) i njegov sufonovan analog sulfo-SMCC, koji sadrže istovremeno i NHS i maleimidnu reaktivnu grupu (Hermanson, 2013). Ovi reagensi koriste se za konjugovanje enzima, poput peroksidaze iz rena (HRP, od engl. *horseradish peroxidase*), za molekul antitela. Naime, lizinski ostaci HRP-a se najpre modifikuju ovim reagensom u reakciji sa NHS grupom reagensa. Redukcijom antitela 2-merkaptotetilaminom se redukuju disulfidne veze regiona zgloba antitela ili se, u reakciji sa Trautovim reagensom, uvode slobodne sulfhidrilne grupe u molekul antitela, koje potom reaguju sa maleimidnom grupom aktiviranog enzima i grade konjugat antitela i enzima (Hnasko, 2015). U analitici se često koriste biotinilovana antitela, za čiju pripremu se koristi ili u vodi rastvoran NHS ester biotina, koji modifikuje lizinske ostatke antitela ili N-terminalnu amino grupu molekula antitela (Mao, 2010), ili maleimidom aktiviran biotin, koji modifikuje sulfhidrilne grupe antitela, dobijene redukcijom TCEP-om. Ovako pripremljena biotinilovana antitela detektuju se u reakciji sa fluorescentno obeleženim (strept)avidinom ili konjugatom (strept)avidina i enzima (Hermanson, 2013).

Konjugovanje drugih molekula ne bi smelo da utiče na integritet molekula antitela, njegovu rastvorljivost, imunoreaktivnost i *in vivo* biodistribuciju. Kako bi se očuvale sekundarne i tercijarne strukture proteina, pH reakcione smeše tokom reakcija konjugacije se obično održava između 7 i 9, a temperatura ne prelazi 50 °C (Chomet et al., 2021). Antitela IgG potklase se uobičajeno modifikuju na pH vrednostima između 8,3 i 9. Za razliku od njih, antitela IgM potklase se modifikuju na nižim pH vrednostima, bližim neutralnim, jer su nestabilna na višim pH vrednostima. Pri tim uslovima, hidroliza konjugata preovlađuje nad reakcijom obeležavanja, a primarno mesto modifikacije je α -amino grupa N-terminusa antitela, pa se za uspešno obeležavanje antitela IgM potklase koristi veći molarni višak reagensa za obeležavanje (50:1 ili 100:1, za razliku od antitela IgG potklase, koja se uglavnom obeležavaju 10:1 molarnim odnosom reagensa i antitela) (ThermoFischer, Fluorescent Amine-reactive Alexa Fluor Dye Labeling of IgM Antibodies, <https://www.thermofisher.com/rs/en/home/references/protocols/cell-and-tissue-analysis/labeling-chemistry-protocols/fluorescent-amine-reactive-alexa-fluor-dye-labeling-of-igm-antibodies.html>, pristupljeno 25.9.2024.). Kako bi se sprečio uticaj na imunoreaktivnost antitela, treba izbegavati reakcije konjugacije u blizini antigen-vezujućeg domena (Chomet et al., 2021).

2.3.1.5.1. Fluorescentno obeležavanje antitela

Antitela kovalentno modifikovana fluoroformama imaju veliki značaj u imunohemijskim analitičkim metodama. Prve imunofluorescentne metode za detekciju viralnih antigena razvijene su sada već davne 1950. godine, kada je omogućena mikroskopska detekcija bakterije rikecija i virusa zauški u ekskudatima i tkivima inficiranih životinja i ljudi, korišćenjem fluorescentno obeleženih antitela specifičnih za ove bakterije/viruse. Ova antitela su bila obeležena FITC-om (Coons et al., 1950), koji i danas predstavlja jednu od najkorišćenijih fluoroforma za obeležavanje antitela, ali i

drugih proteina, poput avidina i streptavidina, za primenu u imunološkim tehnikama baziranim na fluorescenciji, poput imunofluorescentne mikroskopije i protočne citometrije (Hermanson, 2013). Konjugovanjem fluorofore za antitelo omogućava se indirektna detekcija antitela, a time i antigena koje prepoznaje antitelo. Ekscitovanjem fluorofore na određenoj talasnoj dužini i merenjem emitovane svetlosti omogućena je detekcija i kvantifikacija prisutnog antigena (Yu et al., 2015).

Molekuli fluorofora su najčešće modifikovani NHS funkcionalnim grupama, čime je omogućena reakcija sa amino grupama antitela, premda su dostupni i derivati fluorescentnih molekula koji sadrže reaktivne grupe koje reaguju sa sulfhidrilnim i karbonilnim grupama antitela. Mali organski molekuli, poput cijanina, fluoresceina, rodamina i kumarina i njihovih derivata rastvornih u vodi, uobičajeno se koriste za fluorescentno obeležavanje antitela (Hermanson, 2013). Samo neke od često korišćenih fluorescentnih boja su Alexa Fluor 488 (analog fluoresceina), Texas Red (derivat rodamina), Pacific Blue (derivat kumarina) i Cy5 (derivat cijanina) (Berg i Fishman, 2020). Ovi molekuli imaju konzistentne emisije spektre i mali Stokes-ov pomeraj (50-100 nm), stabilni su i jednostavno se konjuguju za antitela (McKinnon, 2018). Danas je razvijen veliki broj novih derivata prethodno navedenih organskih molekula. Posebno se ističu „Alexa Fluor“ boje koje su dobijene hemijskim modifikacijama, najčešće sulfonovanjem, kumarina, cijanina i molekula sa ksantenskom strukturom u svojoj osnovi, kao što su rodamani i fluorescein. Ove boje zajedno pokrivaju širok opseg talasnih dužina, rezistentnije su na gašenje fluorescencije i stabilnije na promene pH vrednosti u poređenju sa osnovnim molekulima iz kojih su dobijene, zbog čega nalaze veliku primenu u istraživanju (Johnson i Spence, 2010). Pored malih organskih molekula, za fluorescentno obeležavanje antitela koriste se i fikobilinski proteini poreklom iz algi, i to na prvom mestu fikoeritrin, čije hromofore su fikoeritrobilin i fikourobilin, ali i fikocijanin i alofikocijanin, čija je hromofora fikocijanobilin (Kronick, 1986; Qiang et al., 2021). O fikobilinskim proteinima i njihovoj primeni kao fluorescentnih obeleživača će više reči biti u poglavlju 2.4.

2.3.2. Alfa-laktalbumin

Alfa-laktalbumin (ALA), sa prosečnom koncentracijom u zrelom humanom mleku od 2,4 g/l, je jedan od najvažnijih proteina prisutnih u mleku sisara, naročito u majčinom mleku, gde ima ključnu ulogu u regulaciji sinteze laktoze (Jackson et al., 2004; Permyakov, 2020). Alfa-laktalbumin čini oko 22% ukupnih proteina humanog mleka i oko 3,5% ukupnih proteina i oko 17% proteina surtuke kravljeg mleka (Layman et al., 2018). Zbog svoje specifične strukture, ALA je predmet mnogih naučnih istraživanja i često se proučava kao model protein u studijama uvijanja i denaturacije proteina, ali i kao model protein za kalcijum-vezujuće proteine (Permyakov, 2020). Osim toga, zbog svoje hranljive vrednosti, koja se prvenstveno ogleda u visokom sadržaju esencijalnih aminokiselina, uključujući triptofan, lizin i cistein, kao i zbog bioaktivnih svojstava, ali i dobre rastvorljivosti i termalne stabilnosti, ALA ima primenu kao funkcionalni sastojak u mnogim prehrambenim proizvodima (Layman et al., 2018).

Alfa-laktalbumin spada u familiju malih globularnih proteina. Osim alfa-laktalbumina pacova, koji poseduje 17 dodatnih aminokiselinskih ostataka na C-terminalnom kraju, ALA većine organizama se sastoji od 123 aminokiselinska ostatka i ima molekulsku masu oko 14,2 kDa. Alfa-laktalbumin poseduje karakterističnu strukturu, bogatu i α -heliksima i β -pločama. U pitanju je kiseli (pI 4-5), kalcijum-vezujući protein, pri čemu je veći deo ALA u mleku upravo u holo formi, odnosno ima vezan jon kalcijuma. U Goldžijevom aparatu sisarskih epitelnih ćelija, ALA čini regulatornu komponentu kompleksa laktozo-sintaze, u kojem učestvuje u transferu galaktoze sa UDP-galaktoze na glukozu, formirajući laktozu (Permyakov, 2020). U svojoj strukturi, ALA poseduje osam ostataka cisteina, koji formiraju četiri disulfidne veze, koje su ključne za održavanje native strukture proteina (Chang i Li, 2002). Pozicije cisteinskih ostataka i kalcijum-vezujućeg mesta su konzervirane u aminokiselinskim sekvencama svih α -laktalbumina za koje je poznata sekvenca (22 organizma) (Permyakov, 2020).

Iako su mnogi aspekti strukture i funkcije ALA izuzetno interesantni, u ovom radu ALA je posmatran isključivo kao model sistem za proteine koji u nativnom obliku nemaju slobodnu

sulfhidrilnu grupu. Imajući to u vidu, u nastavku će biti opisane samo osnovne strukturne karakteristike ALA, koje su relevantne za razumevanje dobijenih rezultata.

2.3.2.1. Struktura α -laktalbumina

Iako ima samo 40% sličnosti aminokiselinske sekvence sa lizozimom, u strukturnom smislu ALA je veoma sličan lizozimu, sa kojim deli zajedničkog evolutivnog pretka. Međutim, i pored strukturne sličnosti, supstitucije specifičnih aminokiselinskih ostataka dovele su do gubljenja lizozomalne katalitičke aktivnosti ALA, zbog čega su ALA i lizozim, iako homologni proteini, funkcionalno potpuno divergentni (Permyakov, 2020).

Alfa-laktalbumin čine dva domena: veliki α -helikoidni domen i manji domen, kog pretežno izgrađuju β -pločice, koji su međusobno povezani kalcijum-vezujućom petljom (**Slika 19**). Alfa-helikoidni domen čine tri klasična α -heliksa (ostaci 5-11 (heliks A), 23-34 (heliks B) i 86-99 (heliks C)) i dva kratka 3_{10} -heliksa (ostaci 17-21 i 115-119). Manji domen se sastoji od niza petlji, male trolančane antiparalelne β -pločice (ostaci 40-43, 47-50 i 55-56) i kratkog 3_{10} -heliksa (ostaci 76-82). Dva domena međusobno su povezana disulfidnim vezama koje se uspostavljaju između ostataka cisteina na pozicijama 73 i 91 i između ostataka 61 i 77. Glavni elementi sekundarne strukture su konzervirani u strukturama svih alfa-laktalbumina. Vezivno mesto za jon Ca^{2+} formiraju karboksilne grupe tri ostatka Asp i dve karbonilne grupe peptidne kičme (Lys79 i Asp84) (Chrysina et al., 2000; Permyakov, 2020).



Slika 19. Shematski prikaz trodimenzionalne strukture goveđeg α -laktalbumina (PDB 1F6S, rezolucija 2,2 Å).

Na niskim pH vrednostima (pH 2), ALA zadobija strukturu klasične stopljene globule (takozvana A struktura), koja ima narušenu terciarnu strukturu, ali relativno visok sadržaj nativnih elemenata sekundarne strukture, uz povećanu fleksibilnost velikog broja aminokiselinskih ostataka. Ovu strukturu ALA ima i u odsustvu kalcijuma na neutralnim pH vrednostima (apo oblik), kao i pri povišenoj temperaturi i u prisustvu malih koncentracija denaturanata (Dolgikh et al., 1981; Kuwajima, 1977; Permyakov, 2020; Polverino de Laureto et al., 2002; Vanderheeren i Hanssens, 1994). Radijus žiracije nativnog ALA, sa vezanim jonom Ca^{2+} , iznosi 15,7 Å, dok na kiselim pH vrednostima i u apo formi ALA ima radijus žiracije od 17,2 Å. Istovremeno, u nativnom obliku maksimalna dimenzija molekula ALA je 50 Å, dok je u konformaciji stopljene globule maksimalna dimenzija 60 Å (Kataoka et al., 1997).

2.4. Fikocijanobilin

2.4.1. Spirulina kao održiva hrana budućnosti

Cijanobakterija *Arthrospira platensis*, komercijalno poznata kao Spirulina, je fotosintetska, filamentozna, spiralna (helikoidna) cijanobakterija (modrozeleno alga prema staroj klasifikaciji), čija su prirodna staništa braktične (voda koja nastaje mešanjem slane i slatke vode) i slane vode alkalne pH vrednosti, pre svega u tropskim i subtropskim područjima. Spirulina se koristi u ishrani

ljudi više od 1000 godina (Stanic-Vucinic et al., 2018), a sedamdesetih godina prošlog veka je prepoznata kao hrana budućnosti od strane Internacionalne Unije za Primenjenu Mikrobiologiju, što je umnogome doprinelo njenoj komercijalnoj proizvodnji kao dijetetskog suplementa. Preko 30% globalne proizvodnje mikroalgi otpada na Spirulinu, što je čini najkultivisanijom mikroalgom (J. A. Costa et al., 2019). Komercijalni interes za uzgajanje Spiruline počiva na njenom visokom sadržaju proteina, esencijalnih masnih kiselina, pigmenata, biodostupnih vitamina (posebno vitamina A, K i kompleksa vitamina B) i makro- i mikroelemenata (kalijum, kalcijum, magnezijum, selen, gvožđe, cink), zbog čega se Spirulina smatra „superhranom“ (Lafarga et al., 2020). Proteini čine oko 60% suve mase Spiruline i dostižu i do 70% u optimalnim uslovima kultivacije, kada izvor azota nije ograničen (Danesi et al., 2002). Osim što ima sve značajnije mesto u ishrani ljudi, Spirulina se u poslednje vreme koristi i kao dodatak prehrani životinja, prvenstveno živine i svinja, ali u novije vreme i akvakulture (Altmann i Rosenau, 2022). Kako je interesovanje za održivim izvorima hrane poraslo poslednjih godina, Spirulina se nametnula kao atraktivan, održivi izvor visoko hranljivih sastojaka hrane. Pored činjenice da i do 70% sadržaja suve mase otpada na proteine, održivost Spiruline počiva i na tome što raste brže nego kopnene biljke i ima veći prinos biomase po jedinici površine nego drugi usevi poput soje, mahunarki ili pšenice. Osim toga, Spirulina ima ključnu ulogu u sekvestraciji ugljenika, čime doprinosi smanjenju ugljeničnog otiska (Fratelli et al., 2023; Tzachor et al., 2022).

Jedinstvena odlika Spiruline je njeno bogatstvo u prirodnim pigmentima. Tri glavne grupe fotosintetskih pigmenata Spiruline su hlorofili, karotenoidi i fikobilini (fikobilinski proteini) (Lafarga et al., 2020). Sa aspekta upotrebe u industriji hrane, najrelevantniji proteini Spiruline su fikobilinski proteini, i to fikocijanin, alofikocijanin i fikoeritrin. Ovi intenzivno obojeni proteini imaju veliki komercijalni značaj i upotrebljavaju se u industriji hrane, kozmetičkoj, farmaceutskoj i tekstilnoj industriji, gde nalaze primenu kao koloranti prirodnog porekla, kao alternativa sintetičkim bojama (Lafarga et al., 2020; Ma et al., 2024; Minić et al., 2024). Pored toga što se upotrebljavaju kao koloranti, fikobiliproteini mikroalgi se razmatraju i kao alternativni izvori hrane, ali i alternativa serumu goveđeg fetusa za upotrebu u kultivisanju veštačkog mesa (Minić et al., 2024). Ovi pigmenti pokazuju i brojna bioaktivna svojstva. Veliki broj istraživanja je nedvosmisleno pokazao niz blagotvornih efekata Spiruline po zdravlje čoveka, koji se prvenstveno pripisuju fikobiliproteinima. Naime, zbog snažne antioksidativne aktivnosti fikobiliproteina, ali i zbog brojnih drugih pozitivnih efekata, kao što su imunomodulatorna, antikancerska, antibakterijska, antiviralna i hipoholesterolemična aktivnost, Spirulina pokazuje potencijal da postane bitna hrana budućnosti i komponenta funkcionalne hrane (Dagnino-Leone et al., 2022; Lafarga et al., 2020; Tounsi et al., 2023).

2.4.2. Fikobilinski proteini kao prirodni pigmenti algi: struktura i funkcija

Fikobilinski proteini (fikobiliproteini) su fluorescentni proteini intenzivnih boja, koji imaju ulogu fotoreceptora. To je grupa proteina rastvornih u vodi, koje karakteriše prisustvo linearnih tetrapirolnih hromofora, fikobilina, koji su tioetarskom vezom vezani za apoprotein (Dagnino-Leone et al., 2022). Fikobiliproteini su fotosintetski pigmenti cijanobakterija, crvenih algi i kriptofita, koji omogućavaju efikasno sakupljanje svetlosti u zelenoj oblasti vidljivog dela spektra (500-600 nm) u kojoj hlorofili apsorbiraju slabo. Na taj način je omogućeno pokrivanje gotovo celog vidljivog dela spektra, čime fikobiliproteini značajno doprinose odvijanju procesa fotosinteze (Scheer i Zhao, 2008).

U strukturnom smislu, fikobiliproteini čine veliku familiju heterodimernih proteina. Sastoje se iz dve ili tri subjedinice koje čine apoproteinski deo molekula, za koji je tioetarskom vezom vezana tetrapirolna prostetična grupa, bilinska hromofora. Osim fikoeritrina, koji sadrži i γ subjedinicu, svi fikobiliproteini sadrže homologne α i β subjedinice (Glazer, 1977). I α i β subjedinice se sastoje od globinskog jezgra, za koje je vezana hromofora, dok je N-terminalni kraj obe subjedinice uključen u oligomerizaciju subjedinica. Subjedinice grade heterodimere, koji dalje oligomerizuju do „trimer“ (heteroheksamera) i „heksamera“ (heterododekamera), koji izgrađuju

fikobilizome, jedinstvene membranske multiproteinske antena komplekse, koji efikasno apsorbiraju svetlost u oblasti 450-650 nm (Dagnino-Leone et al., 2022; Scheer i Zhao, 2008). Oko 85% fikobilizoma čine fikobiliproteini, a ostalih 15% čine ostali proteini (Tandeau de Marsac, 2003). Ovi kompleksi se nalaze na spoljašnjoj (stromalnoj) strani tilakoidnih membrana i imaju ulogu u sakupljanju svetlosti u procesu fotosinteze. Glavne komponente fikobilizoma su proteini fikocijanin (PC), alofikocijanin (APC) i fikoeritrin (PE). Fikocijanin i alofikocijanin su prisutni kod svih cijanobakterija i crvenih algi, dok je fikoeritrin varijabilna komponenta fikobilizoma i njegovo prisustvo je regulisano količinom svetlosti. Neke cijanobakterije sadrže i fikoeritrocijanin (PEC) koji zamenjuje fikoeritrin u odgovoru na promenjeni kvalitet svetlosti (Dagnino-Leone et al., 2022; Scheer i Zhao, 2008). Prenosjenje energije u fikobilizomima se odvija od fikoeritrina, preko fikocijanina do alofikocijanina, nakon čega se ona prenosi do fotosintetskih reakcionih centara, pri čemu je efikasnost procesa veća od 95% (Padyana et al., 2001).

Kovalentna modifikacija fikobiliproteina najmanje jednom bilinskom hromoforom je zaslužna za njihovu ulogu u procesu fotosinteze. Postoje četiri tipa bilinskih hromofora, koje se za molekul proteina vezuju tioetarskom vezom preko specifičnog ostatka cisteina, a svaku odlikuje različita boja i različita talasna dužina maksimuma apsorpcije. Fikocijanobilin (PCB) je plave boje, sa maksimumom apsorpcije na 620 nm, fikoviolobilin (PVB) je ljubičaste boje sa maksimumom na 561 nm, fikoeritrobilin (PEB) je crvene boje i pokazuje maksimum apsorpcije na 560 nm, a fikourobilin (PUB) je žute boje i pokazuje maksimalnu apsorpciju na 495 nm (Dagnino-Leone et al., 2022). Svaki fikobilin ima sistem konjugovanih dvostrukih veza koji je zaslužan za spektroskopske osobine hromofora – PCB ima devet konjugovanih dvostrukih veza, PVB osam, PEB šest i PUB pet. Sa povećanjem broja konjugovanih dvostrukih veza, apsorpcioni maksimum hromofore se više pomera ka crvenoj oblasti spektra (Mimuro i Kikuchi, 2003). U svim fikobiliproteinima cijanobakterija postoji konzervirani ostatak Cys84 za koji je kovalentno vezana hromofora. Dodatna vezivna mesta hromofora nastala su insercijama blizu C-terminusa, u blizini aminokiselina na poziciji 150, kao i blizu pozicije 50 na N-terminalnom kraju globinskog domena proteina. Većina hromofora vezana je za ostatak cisteina apoproteina tioetarskom vezom preko ugljenika C-3¹ hromofore, mada su moguće i tioetarske veze preko C-18¹ (Scheer i Zhao, 2008).

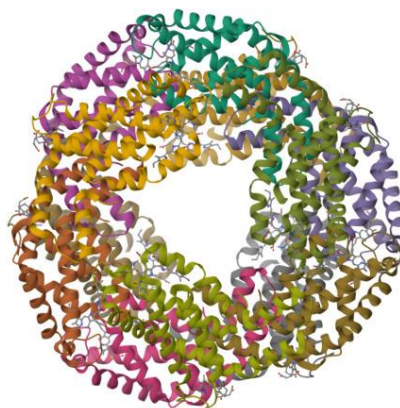
Za razliku od hlorofila, slobodni bilini, kao i denaturisani fikobiliproteini, nemaju odgovarajuće fotofizičke osobine za obavljanje fotoreceptorske funkcije. Samo nativan protein, u kom su interakcije hromofore i apoproteina takve da omogućavaju „pravilnu“ konformaciju hromofore, može da obavlja funkciju fotoreceptora (Scheer i Zhao, 2008). Premda se čini da je kovalentno vezivanje hromofore značajan faktor za uspostavljanje interakcija sa proteinskim delom molekula, i mutanti u kojima su ostaci cisteina koji učestvuju u vezivanju hromofore zamenjeni serinom, kao i mutanti kojima nedostaje lijaza, enzim koji katalizuje vezivanje hromofore za apoprotein, imaju sposobnost vezivanja hromofore, što ukazuje na to da kovalentno vezivanje hromofore nije apsolutno neophodno za funkciju fikobiliproteina (Gindt et al., 1992; Shen et al., 2006). Pored kovalentnog vezivanja, između apoproteina i bilinskih hromofora se uspostavljaju i brojne nekovalentne interakcije koje su esencijalne za funkciju fikobiliproteina. Posledica ovih interakcija je da, za razliku od slobodnih bilina koji imaju fleksibilnu, ciklično-helikoidnu konformaciju, biliproteinske hromofore u nativnim fikobilinskim proteinima imaju rigidnu, izduženu konformaciju. Varijacijama osnovne konformacije se postiže fino podešavanje sakupljanja svetlosti u različitim oblastima vidljivog spektra. Interesantno je da, pored uloge u apsorpciji svetlosti, hromofore imaju ulogu i u pravilnoj oligomerizaciji subjedinica (Scheer i Zhao, 2008).

2.4.3. Fikocijanin i fikocijanobilin: struktura i hemijske osobine

Fikocijanin je plavo obojen protein/pigment fikobilizoma fotosintetskih cijanobakterija koji im daje intenzivnu plavu boju, zbog koje su cijanobakterije poznate i kao modrozeleno alge (Eriksen, 2008). Fikobiliproteini mogu činiti i do 50% ukupnih proteina cijanobakterija, pri čemu je fikocijanin najzastupljeniji fikobiliprotein (Pagels et al., 2019). Za razliku od fikoeritrina, fikocijanin je uvek prisutan u cijanobakterijama i crvenim algama (Dagnino-Leone et al., 2022).

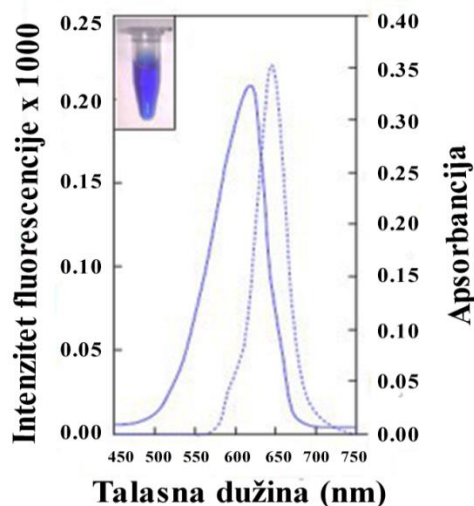
Cijanobakterija *Arthrospira platensis* sadrži samo dva fikobiliproteina – alofikocijanin i C-fikocijanin (C-PC), pri čemu je C-PC glavni pigment, a APC minorni (Padyana et al., 2001). Između 15 i 25 % suve biomase Spiruline otpada na fikocijanin, te je on ne samo glavni fikobiliprotein, već ujedno i najzastupljeniji protein (Sotiroudis i Sotiroudis, 2013). Fikocijanini koji sadrže samo jedan tip hromofore – fikocijanobilin, nazvani su C-fikocijaninima (C-PC), dok oni koji sadrže i fikoeritrobin i/ili fikourobilin pripadaju jednom od pet tipova R-fikocijanina (R-PC I-V), koji se međusobno razlikuju po tipu i položaju hromofora (Dagnino-Leone et al., 2022).

Fikocijanin je verovatno najbolje izučen fikobiliprotein. U PDB bazi podataka proteina nalazi se šezdeset jedna kristalna struktura fikobiliproteina, a najveći broj struktura, čak trideset šest, su fikocijanini (Dagnino-Leone et al., 2022). Struktura C-fikocijanina slična je drugim fikobiliproteinima. Čine ga dve relativno homologne subjedinice: α subjedinica, molekulske mase oko 18 kDa, koja ima jedan molekul fikocijanobilina vezan za Cys84, i β subjedinica, molekulske mase oko 19 kDa, koja sadrži dva molekula fikocijanobilina koji su kovalentno vezani za ostatke cisteina na pozicijama 84 i 155. Oba lanca sadrže konzerviran α -heliks kao dominantan tip sekundarnih struktura, a trodimenzionalna struktura subjedinica je slična u različitim organizmima, sa minornim razlikama. Naime, dve subjedinice formiraju $\alpha\beta$ monomer, koji agregira u $\alpha_3\beta_3$ trimer, a zatim u $\alpha_6\beta_6$ heksamer (Eriksen, 2008). Protein se nalazi u heksamernoj konformaciji u pH oblasti 5-6, dok je na pH 7 u obliku trimera (Pagels et al., 2019). Na **Slici 20** prikazana je kristalna struktura C-PC-a *A. platensis* dobijena kristalografijom X-zracima. Tercijarna struktura C-fikocijanina slična je molekulu mioglobina, pri čemu mesta vezivanja PCB-a na pozicijama α -84 i β -84 nalikuju vezivnim mestima za hem u molekulu mioglobina (Padyana et al., 2001). Subjedinica α C-fikocijanina *A. platensis* ima molekulsku masu oko 17,6 kDa i pI 5,83, a subjedinica β masu oko 18,1 kDa i pI 4,96 (Dagnino-Leone et al., 2022).



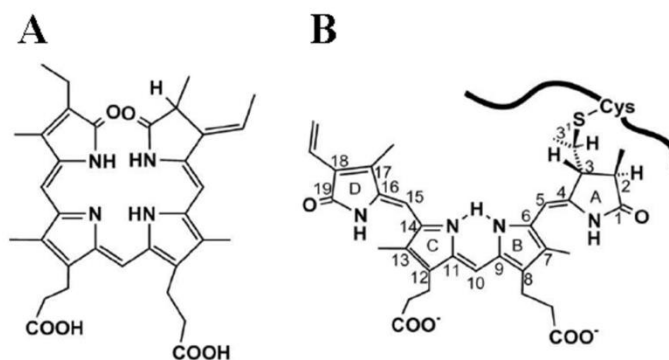
Slika 20. Kristalna struktura C-PC-a *A. platensis* dobijena kristalografijom X-zracima (PDB 1HA7, rezolucija 2,2 Å).

Intenzivna boja C-fikocijanina potiče od fikocijanobilina, kovalentno vezane tetrapirolna hromofore, molarne mase 586,7 Da, čija sposobnost apsorpcije svetlosti pokriva opseg talasnih dužina od gotovo 100 nm (Sonani et al., 2016; Stanic-Vucinic et al., 2018). Glavni prekursor svih fikobilina je biliverdin IX α , koji nastaje dejstvom hem-oksigenaze 1. Dvostepenom redukcijom biliverdina IX α feredoksin-zavisnim enzimom fikocijanobilin:feredoksin-oksidoireduktazom (PcyA), dolazi do sinteze 18,18-dihidrobiliverdina, koji potom daje fikocijanobilin (Dagnino-Leone et al., 2022). Kada su u pitanju spektroskopske osobine C-PC-a, njegov apsorpcioni spektar pokazuje veći maksimum apsorpcije na 620 nm (**Slika 21**) i znatno manji na 360 nm, oba poreklom od PCB-a. Fluorescentni spektar C-PC-a istovremeno pokazuje maksimum emisije na 640 nm pri ekscitaciji na 600 nm (**Slika 21**) (Scheer i Kufer, 1977; Sonani et al., 2016).



Slika 21. Apsorpcioni (puna linija) i emisijski fluorescentni spektar (isprekidana linija, pri ekscitaciji na 600 nm) C-fikocijanina (preuzeto i modificirano iz Sonani et al., 2016).

Nasuprot tome, apsorpcijski spektar slobodne hromofore, fikocijanobilina, se razlikuje od spektra nativne hromofore u molekulu C-fikocijanina u pogledu intenziteta i oblika dveju glavnih apsorpcijskih traka. Naime, slobodan PCB ima fleksibilnu, cikličnu konformaciju, dok u nativnom proteinu zauzima rigidniju, linearnu konformaciju (**Slika 22**), stabilizovanu vodoničnim vezivanjem sa bočnim grupama u proteinu (Scheer i Zhao, 2008). Slobodan PCB stoga pokazuje maksimum apsorpcije na oko 360 nm i manji maksimum na oko 620 nm (Minic et al., 2018). Različite spektroskopske osobine hromofore upravo su posledica razlike u konformaciji slobodnog PCB-a i onog koji je kovalentno vezan u proteinu (Scheer i Kufer, 1977).



Slika 22. Hemijska struktura (A) slobodnog fikocijanobilina i (B) fikocijanobilina vezanog tioetarskom vezom za apoprotein (preuzeto iz Middegou et al., 2012).

2.4.4. Fikocijanin i fikocijanobilin: bioaktivna svojstva

U poslednjoj deceniji je porastao interes ka novim izvorima bioaktivnih jedinjenja prirodnog porekla koja, zbog svog pozitivnog efekta na zdravlje ljudi, imaju potencijal za korišćenje u industriji hrane i farmaceutskoj industriji. U tom kontekstu, Spirulina pokazuje značajan potencijal da postane bitna komponenta funkcionalne hrane, zbog brojnih pozitivnih efekata po zdravlje ljudi koje poseduje. Pozitivni efekti Spiruline se upravo pripisuju C-fikocijaninu i njegovoj hromofori PCB-u. Bioaktivna svojstva C-PC-a pokazana su u mnogim *in vitro* i *in vivo* studijama, koje su pokazale antioksidativna, antiinflamatorna, antikancerska i druga bioaktivna svojstva C-PC-a.

Oksidativni stres izazvan akumulacijom reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS, od engl. *reactive oxygen species*) leži u osnovi ili prati mnoga oboljenja, poput dijabetesa, kardiovaskularnih bolesti, kancera, degenerativnih oboljenja i drugih. Neutralizacija ROS-a odvija se enzimskim ili

neenzimskim antioksidativnim mehanizmima, a molekuli kao što je PC mogu da deluju kao neenzimski antioksidanti, tako što uklanjaju nastale slobodne radikale ili snižavaju nivo oksidacije (Pagels et al., 2019). Antioksidativna aktivnost PCB-a u osnovi je antioksidativne aktivnosti PC-a. Pokazano je da PCB efikasno inhibira peroksidaciju metil-linoleata i lipozoma fosfatidilholina izazvanu dodatkom 2,2'-azobis(2-amidinopropan)dihidrohlorida (AAPH), generatora slobodnih radikala (Hirata et al., 2000). Pored toga, pokazano je da i C-PC i PCB efikasno uklanjaju peroksinitritne radikale i time inhibiraju oštećenje DNK (Bhat i Madyastha, 2001). Fikocijanobilin je odgovoran i za nefroprotektivni efekat C-PC-a u mišjem modelu akutne bubrežne insuficijencije izazvane delovanjem živa(II)-hlorida. Pri tome zaštitni efekat PCB-a se ogleda u snižavanju nivoa različitih markera oksidativnog stresa, poput reaktivnih kiseoničnih i azotnih vrsta, sprečavanju smanjenja aktivnosti antioksidativnih enzima, poput katalaze, glutation-peroksidaze i glutation-reduktaze, ali i u sprečavanju snižavanja ekspresije proteina povezanih sa glomerularnim oštećenjima, kao što su nefrin i podocin (Garcia-Pliego et al., 2021). Utvrđeno je i da tretman miševa PC-om pre ili tokom zračenja X-zracima dovodi do značajnog smanjenja nivoa alanin-aminotransferaze i aspartat-aminotransferaze u plazmi, markera akutnog oštećenje jetre, i povećanja ekspresije gena za superoksid-dismutazu i glutation-peroksidazu. Hepatoprotektivni efekat PC-a najverovatnije se ostvaruje kroz aktiviranje signalnog puta Nrf2/HO-1 (nuklearni faktor 2 povezan sa nuklearnim faktorom eritroidom 2/hem-oksigenaza 1, od engl. *nuclear factor erythroid 2-related factor 2/heme oxygenase 1*), koji igra značajnu ulogu u odgovoru na oksidativni stres, ali i kroz direktan antioksidativni efekat PC-a u uklanjanju nastalih ROS-a (Liu et al., 2020).

Fikobiliproteinima, posebno fikocijaninu, se pripisuje i antiinflamatorna aktivnost, koja se uglavnom povezuje sa inhibicijom ciklooksigenaze-2, enzima koji katalizuje prevođenje arahidonske kiseline u prostaglandin H₂, prekursor prostaciklina, koji ima važnu ulogu u procesu inflamacije. Antiinflamatorna aktivnost PC-a ostvaruje se i kroz inhibiciju mijeloperoksidaze i supresiju apoptoze (Leung et al., 2013), a oralna administracija C-PC-a i PCB-a u eksperimentalnom modelu autoimunog encefalomijelitisa povoljno utiče na smanjenje autoimunog odgovora, snižavanjem ekspresije proinflamatornih citokina IL-6 i IFN- γ (Cervantes-Llanos et al., 2018). Dodatno, antiinflamatorni efekat C-PC-a ostvaruje se i kroz smanjenje ekspresije drugih proinflamatornih citokina (IL-1 β , IL-2 i faktor nekroze tumora α) i transkripcionih faktora (Janus kinaza 3, signalni transduceri i aktivatori transkripcije 3), uz povećanje ekspresije antiinflamatornog citokina IL-4 (Jiang et al., 2017).

Fikocijanin pokazuje i antikancersku aktivnost prema različitim tipovima kancerskih ćelija, stimulišući apoptozu i smanjujući proliferaciju kancerskih ćelija, a pritom ne utičući na zdrave ćelije (Jiang et al., 2017; Pagels et al., 2019). Molekulski mehanizmi C-PC-om indukovane apoptoze humanih K562 ćelija hronične mijeloidne leukemije uključuju oslobađanje citohroma c iz mitohondrija u citosol, aktiviranje kaspaza i indukciju razgradnje poli(ADP-riboza)-polimeraze, proteina uključenog u proces programirane ćelijske smrti, i smanjenje ekspresije antiapoptotskog Bcl-2 proteina (Subhashini et al., 2004). Fikocijanin može da izmeni mitohondrijalni membranski potencijal, što stimuliše oslobađanje citohroma c i promoviše stvaranje ROS-a, a što pak za posledicu ima apoptozu kancerskih ćelija (Jiang et al., 2017). Antikancerska aktivnost C-PC-a pokazana je čak i na MDA MB 231 ćelijama veoma agresivnog trostruko negativnog karcinoma dojke, za koji konvencionalne terapije nisu učinkovite. Fikocijanin utiče na smanjenu migraciju i povećanu adheziju ovih ćelija, pokazujući i angiogene efekte, uz supresiju ekspresije ciklooksigenaze-2 i proizvodnje prostaglandina E(2). Svi biološki efekti PC-a pripisuju se inhibiciji signalnog puta mitogenom-aktivirane protein kinaze (Ravi et al., 2015).

2.4.5. Fikocijanin i fikocijanobilin: upotreba u industriji hrane

Zabrinutost potrošača u vezi sa bezbednošću sintetičkih boja doveo je do ograničene primene sintetičkih boja u hrani, konditorskim proizvodima i pićima i preusmeravanju fokusa na upotrebu prirodnih boja, posebno kada je u pitanju hrana za decu. Intenzivna boja fikobiliproteina čini ih interesantnom alternativom sintetičkim bojama za upotrebu kao koloranata u industriji hrane

(Lafarga et al., 2020; Ma et al., 2024; Minić et al., 2024). U poređenju sa drugim prirodnim pigmentima, prirodni pigmenti plave boje su retki. Antocijani su primarni izvor plave boje u prirodi, ali njihova boja je osetljiva na pH, te samo u opsegu pH vrednosti 5-7 imaju plavu boju, dok u kiselim napicima i hrani menjaju boju u ljubičastu ili pink (Newsome et al., 2014). S druge strane, gljive i mikroorganizmi u odgovoru na stres i predatore proizvode seriju plavo obojenih jedinjenja, ali je njihova potencijalna biološka aktivnost nepredvidiva, zbog čega je njihova bezbednost u industriji hrane upitna. Jedini prirodni pigmenti plave boje koji su trenutno odobreni za upotrebu u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji su gardenija plavo (u Japanu), plavi antocijani, kao i pigmenti Spiruline, koje dominantno čini C-fikocijanin (Stanic-Vucinic et al., 2018). Iako je gardenija plavo stabilnija na povišenim temperaturama i na dejstvo svetlosti od C-PC-a, C-PC se zbog intenziteta boje pokazao kao bolji kolorant (Jespersen et al., 2005). Američka Uprava za hranu i lekove je 2013. godine odobrila upotrebu fikocijanina u obliku ekstrakta Spiruline kao boje u žvakaćim gumama i slatkišima (Newsome et al., 2014). Zbog duge istorije upotrebe, Spirulina se ne smatra novom hranom i ne podleže Uredbi Evropske Unije 2015/2283 o novoj hrani, pa se može komercijalizovati i u Evropskoj Uniji (Lafarga et al., 2020). Optimalni uslovi za čuvanje C-fikocijanina su u mraku, na temperaturi ispod 45 °C i na pH 5,5-6 (Adjali et al., 2022). Iako manja stabilnost u kiselim uslovima, pri povišenoj upotrebi i u prisustvu svetlosti limitira upotrebu fikocijanina kao koloranta u nekim proizvodima (Newsome et al., 2014), njegova primena je danas proširena na sladolede, smrznute dezerte, jogurte, pudinge, džemove i druge proizvode koji se čuvaju na niskoj temperaturi i imaju visok sadržaj šećera, kojima se čuva stabilnost proteina (Ma et al., 2024; Stanic-Vucinic et al., 2018). Premda se smatra nestabilnim u kiselim uslovima, neke studije ukazuju da kisela pića sa dodatkom C-fikocijanina, čije je pH oko 3, zadržavaju plavu boju i do 11 dana, ako se čuvaju na hladnom (García et al., 2021). Iako se najveći broj stručnih radova bavi ispitivanjem mogućnosti upotrebe fikocijanina kao aditiva u industriji hrane, istražuje se i mogućnost enkapsulacije slobodnog PCB-a u nanočestice na bazi BSA. U kompleksu sa BSA, slobodan PCB je stabilniji prema oksidaciji, pa bi PCB vezan za BSA mogao da posluži kao funkcionalni aditiv koji istovremeno obezbeđuje i boju i bioaktivna svojstva, pri čemu interakcija sa proteinom produžava njegovu aktivnost usporavanjem oksidacije (Minic et al., 2018).

2.4.6. Fikobilinski proteini kao fluorescentni obeleživači

Fluorescentne osobine fikocijanina koriste se kao indikator rasta cijanobakterijskih kultura, za detekciju toksičnih cijanobakterija i daljinsko ispitivanje cijanobakterija u prirodnim vodama (Eriksen, 2008). Međutim, intenzivna fluorescencija fikobiliproteina iskorišćena je i *ex vivo* kroz njihovu upotrebu kao fluorescentnih obeleživača, najviše antitela, ali i drugih proteina (Kronick, 1986; Qiang et al., 2021). Kako fikobiliproteini sadrže više molekula bilinskih hromofora po molekulu proteina, njihovi ekstinkcioni koeficijenti mogu imati vrednosti od čak 2×10^6 i $2,4 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (za R-fikoeritrin i B-fikoeritrin, redom), što je gotovo 30 puta veća vrednost od ekstinkcionog koeficijenta često korišćenog fluorescentnog obeleživača fluoresceina i oko sto puta veća od ekstinkcionog koeficijenta rodamina, dok vrednosti kvantnog prinosa fikobiliproteina variraju od 0,51 za C-fikocijanin do čak 0,85 za R-fikoeritrin (Kronick i Grossman, 1983; Oi et al., 1982; Qiang et al., 2021). Osim toga, fikobiliproteine odlikuje veliki Stokes-ov pomeraj (75-200 nm), stabilnost i konzistentnost emisijonih spektara (McKinnon, 2018), kao i dobra rastvorljivost u vodenim rastvorima, zbog čega pokazuju nizak nivo nespecifičnog vezivanja (Kronick i Grossman, 1983). Fluorescencija fikobiliproteina nezavisna je od pH vrednosti u širokom opsegu pH vrednosti od interesa (od oko pH 5 do pH 9) (Kronick, 1986). Istovremeno, kovalentnim vezivanjem fluorofore za molekul proteina omogućena je bolja zaštita fluorofore od gašenja fluorescencije dejstvom faktora sredine (Johnson i Spence, 2010). Spektralne osobine fikobilinskih proteina od posebnog su značaja u radu sa biološkim uzorcima. Naime, u poređenju sa često korišćenim fluoresceinom, fikoeritrin se ekscituje i emituje na većim talasnim dužinama, u dalekom crvenom delu vidljivog spektra. Merenjem fluorescencije u crvenom delu spektra izbegava se pozadinski signal poreklom od autofluorescencije seruma i drugih bioloških matriksa, kao što su, na primer,

autofluorescentne citoplazmatske granule mikroglia (Soini i Hemmilä, 1979; Zhang et al., 2022). Navedene osobine čine fikobiliproteine veoma pogodnim za fluorescentno obeležavanje različitih proteina, poput imunoglobulina, proteina A i avidina, ali i nanočestica, za primenu u različitim tehnikama koje se zasnivaju na fluorescenciji, poput protočne citometrije, fluorescentne mikroskopije i fluorescentnih imunoeseja (Kronick, 1986; Oi et al., 1982; Qiang et al., 2021).

Konjugovanje fikobiliproteina za druge proteine omogućeno je korišćenjem heterobifunkcionalnih reagenasa. Najčešće se jedna ili više ϵ -amino grupa fikobiliproteina derivatizuju reagensima kojima se uvodi slobodna sulfhidrilna grupa (poput Trautovog reagensa), dok se amino grupe molekula koji se obeležava (antitelo ili neki drugi protein od interesa) derivatizuju sukcinimidil estrima, kao što su SMCC ili sukcinimidil-4-(p-maleimidofenil)butirat (SMPB), čime se uvodi maleimidna grupa, slobodna za reakciju sa sulfhidrilnom grupom fikobiliproteina, pri čemu nastaje tioetarska veza (Kronick, 1986).

Fikobiliproteini kao fluorescentni obeleživači najveću primenu našli su u fluorescentnoj mikroskopiji i protočnoj citometriji, i to u fluorescentnom obeležavanju ćelijskih površinskih molekula, korišćenjem antitela specifičnih za ćelijske markere, koja su fluorescentno obeležena fikobiliproteinima, najčešće fikoeritrinom. Veliki Stokes-ov pomeraj fikobiliproteina omogućio je simultanu upotrebu i detekciju antitela obeleženog fikoeritrinom, koje je specifično za jedan ćelijski marker, i drugog antitela, koje je specifično za neki drugi ćelijski marker, a čija detekcija se vrši drugim antitelom konjugovanim sa fluoresceinom, korišćenjem istog lasera za ekscitaciju fluorofore. Picolo i Čilosi su na ovaj način okarakterisali različite populacije T-ćelija u limfnim čvorovima (Pizzolo i Chilos, 1984). Dalji razvoj u ovoj oblasti omogućio je korišćenje dva laserska izvora za istovremenu detekciju tri fluorofore, a zatim i korišćenje tri lasera za istovremenu detekciju četiri fluorescentna molekula. Tako je korišćenjem lasera koji proizvodi svetlost talasne dužine 605 nm omogućena istovremena ekscitacija boje Texas Red i alofikocijanina, dok laser na 488 nm istovremeno ekscituje dva antitela različite specifičnosti obeležena fluoresceinom i fikoeritrinom, što je omogućilo analizu diferencijacije mišjih B ćelija (Hardy et al., 1984). Zbog manjeg pozadinskog signala poreklom od autofluorescencije mikroglia, antitela konjugovana sa fikoeritrinom nadmašuju ona konjugovana sa FITC-om i alofikocijaninom u osetljivosti detekcije LAG3 proteina mikroglia protočnom citometrijom (Zhang et al., 2022). Pored konjugata antitela i fikobiliproteina, konjugati aneksina V i alofikocijanina i R-fikoeritrina koriste se za praćenje ćelijske apoptoze protočnom citometrijom, vezujući se za fosfatidilserin, indikator intermedijarnih faza apoptoze (Farrokh-Siar et al., 1999; Mukhopadhyay et al., 2007). Osim u protočnoj citometriji, fikobiliproteini se koriste i u drugim esejima u kojima se koriste fluorescentno obeležena primarna ili sekundarna antitela ili avidin. Kronick i saradnici su detektovali humana IgG antitela u „sendvič“ esej u čvrstoj fazi, u kojem su za poliakrilamidne kuglice kuplovana zečja antitela na humani IgG, koja se potom inkubiraju sa humanim serumom u kom se žele kvantifikovati humana IgG antitela. Za detekciju su koristili ili fluorescentno obeležena sekundarna antitela ili biotini lovana sekundarna antitela i fluorescentno obeležen avidin. Kuplovanjem B-fikoeritrina za zečja antitela na humani IgG ili za avidin postiže se šest, odnosno pet puta veća osetljivost detekcije humanog IgG-a u poređenju sa konjugatima sa fluoresceinom (Kronick i Grossman, 1983). U esej u kojem su za magnetne kuglice kovalentno kuplovani antigeni od interesa, Ajoglu i saradnici su konjugovali R-fikoeritrin za sekundarna antitela na humani IgG i IgM, čime su merili nivoe IgG i IgM potklasa autoantitela u serumima pacijenata sa reumatoidnim artritisom. Istovremeno, korišćenjem kozjih IgG antitela na humani C3 obeleženih fikoeritrinom, merili su C3 komponentu komplemента i na taj način pratili aktivaciju komplemента (Ayoglu et al., 2014).

Zbog osobine da vezuju jone metala, fikobiliproteini se mogu koristiti i za osetljivu i visoko selektivnu detekciju jona metala u metodama baziranim na fluorescenciji. Konjugovanjem R-fikoeritrina ili C-fikocijanina za nanočestice na bazi srebra omogućena je detekcija i kvantifikacija jona bakra u uzorcima vode, praćenjem gašenja fluorescencije proteina u prisustvu jona metala (Wei et al., 2018; Xu et al., 2019b).

U reakcijama konjugacije fikobiliproteina i drugih molekula (antitela, proteina A, avidina, lekova, itd.) od posebne je važnosti da konjugovanje fluorofore ne utiče (značajno) na spektralne osobine fikobilinskih proteina, ali i na jedinstvene osobine molekula za koji se oni konjuguju (Kronick, 1986). Kada je u pitanju kovalentna modifikacija antitela fikobiliproteinima, konjugovanje fikobiliproteina ne bi smelo da utiče na imunološku specifičnost antitela ili afinitet za vezivanje antigena (Hermanson, 2013). Kako su fikobiliproteini veliki proteini, po veličini slični antitelima, u literaturi su zabeleženi slučajevi u kojima je konjugovanje fikobiliproteina za molekul antitela sterno interferiralo sa antigen-vezujućim mestima na molekulu antitela, što je značajno uticalo na smanjenje osetljivosti metode detekcije antigena (Kronick i Grossman, 1983).

3. Eksperimentalni deo

3.1. Materijali i oprema

Fikocijanobilin (PCB) je izolovan iz proteinskog ekstrakta komercijalno dostupnog praha Spiruline (*Spirulina pacifica*, Nutrex-Hawaii; Kailua-Kona, Havaji, SAD) prema prethodno opisanoj metodi (Fu et al., 1979). Koncentracija PCB-a određena je spektrofotometrijski, nakon razblaživanja dobijenog preparata smešom metanola i koncentrovane hlorovodonične kiseline (metanol:hlorovodonična kiselina, 19:1, v:v). Korišćen je molarni apsorpcioni koeficijent na 680 nm, koji iznosi $37\,900\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Cole et al., 1967). C-PC je izolovan i prečišćen iz istog izvora, prema prethodno opisanoj proceduri (Zhang i Chen, 1999). BLG i ALA su izolovani i prečišćeni iz svežeg kravljeg mleka prema prethodno opisanim metodama (Al-Hanish et al., 2016; Stojadinovic et al., 2012). Koncentracija proteina određena je spektrofotometrijski, korišćenjem molarnog ekstinkcionog koeficijenta od $17600\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ za BLG (Collini et al., 2000) i $28540\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ za ALA (Chaudhuri i Chattopadhyay, 2014), oba na 280 nm. Humana IgG antitela izolovana su i prečišćena iz humane krvi dobrovoljaca afinitetnom hromatografijom, korišćenjem Protein A *Sepharose* matriksa (Merck, Darmštat, Nemačka). Uzorkovanje biološkog materijala (puna periferna venska krv, 20 ml po ispitaniku; grupa od 10 zdravih ispitanika) urađeno je u laboratoriji Doma zdravlja Stari Grad u Beogradu, akreditovanoj prema zahevima standarda ISO/IEC 17025, nakon dobijanja pisane saglasnosti ispitanika za učešće u naučno-istraživačkoj studiji, u skladu sa principima proisteklim iz Helsinške deklaracije. BSA je nabavljen od proizvođača Sigma-Aldrich (Sent Luis, Misuri, SAD). Koncentracija proteina određena je spektrofotometrijski, korišćenjem molarnog ekstinkcionog koeficijenta od $43824\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ na 279 nm (Gamov et al., 2020). AAPH je nabavljen od proizvođača Acros Organics (Gel, Belgija), 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin (TMB) od proizvođača Athera Biotechnologies AB (Stokholm, Švedska), DTNB od proizvođača Fluka BioChemika (Buhs, Švajcarska), L-cistein od proizvođača Merck (Darmštat, Nemačka) i 2-iminotiolan (Trautov reagens) od proizvođača Thermo Fisher Scientific (Valtam, Masačusets, SAD). Sve ostale hemikalije bile su analitičke čistoće i, osim ako je drugačije naglašeno u tekstu, nabavljene su od proizvođača Sigma-Aldrich (Sent Luis, Misuri, SAD). Ultračista voda (Barnstead Smart2Pure Water Purification System, Thermo Fisher Scientific; Valtam, Masačusets, SAD) je korišćena u svim eksperimentima.

Spektri u UV/VIS oblasti snimani su korišćenjem NanoDrop 2000c spektrofotometra (Thermo Fisher Scientific; Valtam, Masačusets, SAD). Fluorescentni spektri snimani su korišćenjem FluoroMax-4 spektrofluorimetra (HORIBA Scientific; Kjoto, Japan). CD spektri snimani su korišćenjem Jasco J-815 CD spektropolarimetra (JASCO; Tokio, Japan).

3.2. Ispitivanje kovalentnih interakcija β -laktoglobulina i fikocijanobilina

Svi eksperimenti koji se tiču ispitivanja interakcija BLG-a i PCB-a rađeni su u 20 mM natrijum-fosfatnom puferu, pH 7,2, osim eksperimenata formiranja adukta na različitim pH vrednostima (**Odeljak 3.2.9.**) i formiranja adukta u simuliranim gastrointestinalnim uslovima (**Odeljak 3.2.10.**).

3.2.1. Fluorescentna spektroskopija

Formiranje BLG–PCB adukta analizirano je spektrofluorimetrijski, inkubiranjem BLG-a i PCB-a u različitim molarnim odnosima. Naime, pripremljeno je serijsko razblaženje BLG-a ($256\text{--}0,5\text{ }\mu\text{M}$ u 20 mM natrijum-fosfatnom puferu, pH 7,2), a zatim je $4\text{ }\mu\text{M}$ rastvor PCB-a u istom puferu pomešan 1:1 (V/V) sa razblaženjem proteina ili puferom. Pripremljene smeše inkubirane su dva časa na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, nakon čega su snimljeni fluorescentni spektri u oblasti od 600 do 700 nm na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, pri ekscitaciji od 580 nm. Širine ekscitacionog i emisijonog proreza bile su 5 nm. Emisija slobodnog PCB-a oduzeta je od fluorescencije BLG–PCB adukta. Približna konstanta vezivanja dobijena je ubacivanjem eksperimentalno dobijenih podataka u jednačinu 1 (Keppler et al., 2014b):

$$\Delta F = \frac{F_{\infty} \times [\text{BLG}]}{\frac{1}{K_a} + [\text{BLG}]} \quad (1),$$

gde je [BLG] koncentracija proteina izražena u μM , K_a približna konstanta formiranja BLG–PCB kompleksa, F_{∞} fluorescencija BLG–PCB kompleksa pri beskonačnoj koncentraciji BLG-a, dok je ΔF razlika fluorescencije BLG–PCB kompleksa i fluorescencije PCB-a.

Poređenje fluorescentnih spektara smeša PCB-a i aminokiselina i BLG–PCB kompleksa rađeno je inkubiranjem PCB-a sa cisteinom, argininom, lizinom, histidinom i BLG-om u 20 mM natrijum-fosfatnom puferu, pH 7,2 u molarnim odnosima 1:1 (20 μM svaki) tokom 2 časa na 37 °C. Smeše su razblažene 10 puta pre snimanja fluorescentnih spektara. Uslovi snimanja su bili identični prethodno opisanim za određivanje konstante afiniteta.

Kinetika formiranja BLG–PCB kompleksa izučavana je merenjem fluorescencije pigmenta po dodatku proteina. Formiranje adukta je analizirano u prisustvu i u odsustvu 7 M uree. Naime, BLG i PCB, oba u 20 mM natrijum-fosfatnom puferu, pH 7,2, sa dodatkom 7 M uree, su pomešani u molarnom odnosu 1:1 (5 μM oba), nakon čega je fluorescencija praćena svakih 20 sekundi tokom 2000 sekundi. Talasne dužine ekscitacije i emisije su bile 580 nm i 640 nm, redom. Širine ekscitacionog i emisionog proreza su bile podešene na 5 nm. Fluorescencija slobodnog PCB-a oduzeta je fluorescencije BLG–PCB adukta u svakoj vremenskoj tački. Koncentracija nevezanog PCB-a izračunata je prema sledećoj jednačini:

$$[\text{PCB}] = 5 \times \frac{F_t - F_0}{F_{\infty} - F_0} \quad (2),$$

gde F_t predstavlja fluorescenciju BLG–PCB kompleksa u vremenu t , F_0 i F_{∞} vrednosti fluorescencije u vremenu nula i beskonačnom vremenu, redom, a 5 je početna koncentracija PCB-a u μM . Konstanta brzine formiranja BLG–PCB adukta izračunata je ubacivanjem dobijenih rezultata u jednačinu prvog reda, korišćenjem jednačine 3:

$$[\text{slobodan PCB}] = 5 \times e^{-k \times t} \quad (3),$$

gde [slobodan PCB] predstavlja koncentraciju nevezanog liganda, k približnu konstantu brzine formiranja BLG–PCB adukta, a t vreme.

Kinetika vezivanja PCB-a za alkilovani BLG praćena je u prisustvu 7 M uree na prethodno opisan način. Alkilovani BLG pripremljen je inkubiranjem 200 μM BLG-a i 100 mM jodacetamida (IAA) u 20 mM natrijum-fosfatnom puferu, pH 7,2 na 37 °C tokom jednog časa. Višak neizreagovalog jodacetamida uklonjen je dijalizom naspram 500 zapremina 20 mM natrijum-fosfatnog pufera, pH 7,2. Dijaliza je trajala 24 časa na 4 °C, uz tri izmene pufera.

3.2.2. CD spektroskopija

CD spektri BLG-a, PCB-a i BLG–PCB adukta snimani su u vidljivoj, kao i u bliskoj i dalekoj UV oblasti. Spektri su snimani u termostatisanim uslovima, na 37 °C. Pre snimanja CD spektara, uzorci BLG-a i BLG–PCB kompleksa dijalizovani su naspram fosfatnog pufera tokom 24 časa na 4 °C.

Za snimanja u vidljivoj i bliskoj UV oblasti (250-750 nm), koncentracija dijalizovanog BLG-a i BLG–PCB kompleksa iznosila je 50 μM . Spektri pufera i PCB-a oduzeti su od spektara BLG-a i BLG–PCB kompleksa, redom. Brzina snimanja iznosila je 200 nm/min, podaci su prikupljeni u intervalu od 0,1 nm, a broj akumulacija je bio tri. Korišćena je kiveta čiji je optički put 1 cm.

CD spektri u dalekoj UV oblasti dijalizovanih uzoraka BLG-a i BLG–PCB-a snimljeni su u oblasti 185-260 nm. Brzina snimanja iznosila je 50 nm/min, a podaci su prikupljeni u intervalu od 0,1 nm. Spektri su snimljeni u tri akumulacije, korišćenjem kvarcne kivete čiji je optički put 0,01

cm. Spektri pufera i PCB-a oduzeti su od spektara BLG-a i BLG-PCB kompleksa, redom. Sadržaj sekundarnih struktura izračunat je korišćenjem CDPPro softverskog paketa, korišćenjem CONTIN algoritma i SD43 baze podataka.

3.2.3. UV/VIS spektroskopija

UV/VIS apsorpcioni spektri 50 μ M BLG-a i 50 μ M BLG-PCB kompleksa nakon dijalize, kao i 50 μ M slobodnog PCB-a, snimljeni su u oblasti od 300-750 nm na sobnoj temperaturi.

3.2.4. Natrijum-dodecilsulfat poliakrilamidna gel elektroforeza (SDS-PAGE) BLG-a i BLG-PCB-a

Sve elektroforeze u ovoj disertaciji su rađene na vertikalnim sistemima Hoefer SE600 (Hoefer Inc., Bridžvoter, Masačusets, SAD) ili Mini-PROTEAN Tetra Vertical (Bio-Rad, Herkules, Kalifornija, SAD). U **Tabelama 1 i 2** dat je spisak supstanci, zajedno sa zapreminama rastvora ovih supstanci koje su potrebne za pripremu gelova odgovarajuće gustine za elektroforetsku analizu na Hoefer SE600 sistemu. Kada je korišćen Mini-PROTEAN Tetra Vertical sistem, zapremine gelova bile su dvostruko manje. Koncentracija akrilamida (AA) u gelu za koncentrovanje je uvek bila 4%, dok je koncentracija AA u gelovima za razdvajanje bila u opsegu od 8% do 16%, zavisno od analiziranih proteina i korišćenih uslova (redukujući/neredujući).

Tabela 1. Zapremine rastvora potrebnih za pripremu gela za razdvajanje.

	Koncentracije gelova				
	8%	10%	12%	14%	16%
Rastvori	Zapremine (ml)				
30% monomerni rastvor AA, 2,7% bisakrilamida	2,66	3,33	4	4,66	5,33
Pufer za razdvajanje (1,5 M Tris, pH 8,8)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
ddH ₂ O	4,67	4	3,33	2,67	2
TEMED (tetrametiletilendiamin)	0,004	0,004	0,004	0,004	0,004
10% SDS	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
10% APS (amonijum-persulfat)	0,075	0,075	0,075	0,075	0,075

Tabela 2. Zapremine rastvora potrebnih za pripremu 4% gela za koncentrovanje.

Rastvori	Zapremine (ml)
30% monomerni rastvor AA, 2,7% bisakrilamida	0,5
Pufer za koncentrovanje (0,5 M Tris, pH 6,8)	0,94
ddH ₂ O	2,25
TEMED (tetrametiletilendiamin)	0,002
10% SDS	0,038
10% APS (amonijum-persulfat)	0,028

Uzorci su za elektroforetsku analizu uvek pripremani mešanjem uzorka proteina sa odgovarajućom zapreminom 5X koncentrovanog pufera za pripremu uzoraka, tako da finalna koncentracija pufera za uzorke bude 1X, nakon čega su zagrevani 10 min na 95 °C. Koncentrovani pufer za pripremu uzoraka (5X PZU) sadrži: 300 mM Tris, pH 6,8, 10% SDS, 50% glicerol, 25% β -

merkaptetanol i 0,05% bromfenolplavo (BPB). Pufer za elektroforezu je sadržao 25 mM Tris, pH 8,3, 192 mM glicin i 0,1% SDS. Napon na ispravljaču je podešavan na 90 V do ulaska uzoraka u gel za razdvajanje, nakon čega je povećavan na 190 V. Kada je BPB stigao do kraja gela, elektroforeza je prekinuta. Gelovi su ispirani destilovanom vodom, fiksirani u rastvoru za fiksiranje (50% metanol, 10% sirćetna kiselina), a zatim bojeni (cink-sulfatom i/ili 10 minuta rastvorom CBB-a). Rastvor boje bio je 0,1% CBB R-250, 50% metanol, 10% sirćetna. Nakon bojenja, gelovi su najpre obezbojavani rastvorom za fiksiranje u trajanju od 10 min, a zatim rastvorom 7% sirćetne kiseline.

Formiranje kovalentnog adukta BLG-a i PCB-a praćeno je elektroforetski, korišćenjem osobine PCB-a da kompleksira jone Zn^{2+} i gradi fluorescentni proizvod (Berkelman i Lagarias, 1986). Smeša BLG-a i PCB-a (20 μ M oba), 20 μ M protein i 20 μ M slobodan pigment inkubirani su na 37 °C tokom 2 časa, nakon čega su analizirani elektroforetski u denaturišućim, neredukujućim uslovima na 16% poliakrilamidnom gelu. Nakon završene elektroforeze, gel je inkubiran 15 min u 1 M rastvoru $ZnSO_4$. Fluorescencija koja potiče od kompleksa PCB- Zn^{2+} je analizirana pod UV lampom, nakon čega su gelovi bojeni Coomassie Brilliant Blue R-250 bojom.

Kako bi se uporedio prinos formiranja BLG-PCB adukta u puferu i urei, smeša BLG-a i PCB-a (po 100 μ M svaki), 100 μ M slobodan protein i 100 μ M slobodan PCB inkubirani su na 37 °C tokom 2 časa u odsustvu i u prisustvu 7 M uree. Nakon inkubacije, uzorci su razblaženi do 20 μ M koncentracije i analizirani elektroforetski na prethodno opisan način.

Inhibicija formiranja BLG-PCB adukta blokiranjem ostataka cisteina alkilovanjem jodacetamidom takođe je analizirana elektroforetski. Naime, 20 μ M BLG u odsustvu i u prisustvu rastućih koncentracija jodacetamida (20, 200 i 2000 μ M IAA) preinkubiran je 30 min na 37 °C kako bi se odvila reakcija alkilovanja. Nakon toga je uzorcima dodat PCB (20 μ M finalna koncentracija). Inkubacija sa PCB-om je trajala još 2 časa na istoj temperaturi.

3.2.5. Priprema kovalentnog BLG-PCB adukta u većem prinosu

Kovalentni BLG-PCB adukt pripremljen je u većem prinosu, inkubiranjem smeše BLG-a i PCB-a u 20 mM natrijum-fosfatnom puferu (pH 7,2) tokom 2 časa na 37 °C, uz mešanje na termošejkeru, na sledeći način. U 200 μ M rastvor BLG-a je sukcesivno, u 4 porcije, dodavan štok rastvor PCB-a u dimetilsulfoksidu (DMSO), tako da finalna koncentracija pigmenta u smeši bude 300 μ M. PCB je dodavan u nultom minutu, kao i nakon 30, 60 i 90 minuta od početka inkubiranja. Reakciona smeša je tokom inkubiranja bila zaštićena od svetlosti aluminijumskom folijom. Kako bi kontrolni, nemodifikovani protein prošao isti tretman, pripremljen je i kontrolni rastvor BLG-a u koji je, umesto PCB-a, dodavan DMSO. Pripremljen je i kontrolni rastvor 300 μ M PCB-a. Obe kontrole su inkubirane tokom dva časa na 37 °C. Nakon dvočasovne inkubacije, uzorci BLG-a i BLG-PCB-a su dijalizovani naspram 20 mM fosfatnog pufera pH 7,2 na 4 °C, pri čemu je granična vrednost dijaliza pora creva za dijalizu iznosila 12 kDa. Dijaliza je trajala oko 8 sati bez izmene pufera. Tokom dijalize proteinskih uzoraka, kontrola PCB-a je, takođe, stajala na 4 °C. Kako bi se BLG-PCB adukt dobio u još većem prinosu, nakon dijalize je dijalizovani BLG-PCB adukt dodatno obogaćen PCB-om ponavljanjem postupka dodavanja PCB-a, dok je u dijalizovani kontrolni BLG uzorak dodavan DMSO. Nakon toga, uzorci su ponovo dijalizovani, kako bi se iz rastvora udaljio nevezani PCB, odnosno višak DMSO. Deo uzorka dijalizovan je naspram 20 mM fosfatnog pufera pH 7,2, dok je drugi deo uzorka dijalizovan naspram MilliQ vode. Dijaliza je trajala ukupno oko 24 sata, uz tri izmene pufera/vode. Za pepsinsku digestiju proteina (videti niže), korišćeni su uzorci koji su dijalizovani naspram MiliQ vode. U svim ostalim eksperimentima korišćeni su uzorci koji su dijalizovani naspram fosfatnog pufera, pH 7,2.

3.2.6. Određivanje prinosa reakcije BLG-a i PCB-a

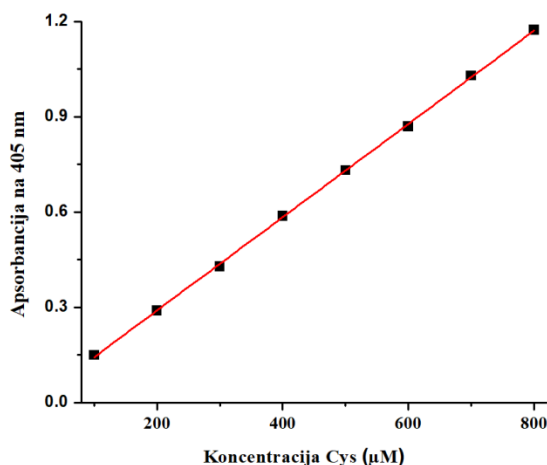
Za određivanje prinosa kovalentne modifikacije BLG-a PCB-om primenjena su dva pristupa. Prvi pristup se zasniva na određivanju sadržaja slobodnih -SH grupa u reakciji sa

Elmanovim reagensom (5,5'-ditio-bis(2-nitrobenzoeva kiselina, DTNB) (Morgan et al., 1999b). Naime, 60 μ l dijalizovanih uzoraka BLG-a, odnosno BLG-PCB adukta pomešano je sa 30 μ l 1 M Trisa (pH 8), 180 μ l vode i 30 μ l 2 mM rastvora DTNB-a (pripremljenog u 50 mM natrijum-acetatu). Nakon jednočasovne inkubacije, snimljena je apsorbancija na 405 nm. S obzirom da sâm BLG-PCB adukt pokazuje apsorpciju na ovoj talasnoj dužini, pripremljene su dve kontrole. Prva kontrola (AI) nije sadržavala DTNB (sadržala je protein, vodu i pufer), dok druga kontrola (AII) nije sadržavala protein (sadržala je vodu, pufer i DTNB). Apsorbancija uzorka je, prema tome, dobijena sledećom jednačinom:

$$A = A_m - AI - AII \quad (4),$$

gde je A_m izmerena apsorbancija uzorka (protein+voda+pufer+DTNB).

Kao standard korišćen je L-cistein ratvoren u 20 mM natrijum-fosfatnom puferu, pH 7,2 u opsegu koncentracija od 100-800 μ M. Korišćenjem kalibracione prave (**Slika 23**), izračunata je koncentracija slobodnih -SH grupa u uzorcima BLG-a i BLG-PCB-a.



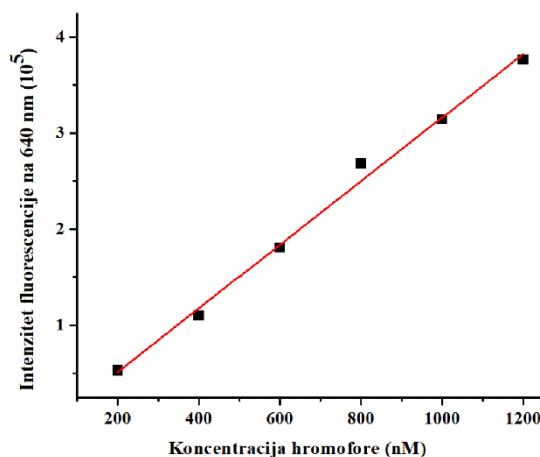
Slika 23. Kalibraciona prava za određivanje koncentracije slobodnih SH grupa BLG-a Elmanovim reagensom.

Prinos obeležavanja određen je pomoću sledeće jednačine:

$$\text{Prinos reakcije (\%)} = 100\% - \frac{\text{Koncentracija SH (BLG-PCB)}}{\text{Koncentracija SH (BLG)}} \times 100\% \quad (5),$$

gde su koncentracija SH (BLG-PCB) i koncentracija SH (BLG) koncentracije slobodnih -SH grupa u uzorcima BLG-PCB adukta i slobodnog BLG-a, redom.

Drugi pristup za računanje prinosa reakcije zasniva se na određivanju sadržaja hromofore u uzorku pepsinskog digesta BLG-PCB-a, korišćenjem pepsinskog digesta C-fikocijanina kao standarda, uzimajući u obzir koncentraciju hromofore (PCB) u digestu (Minic et al., 2016). Naime, C-PC i dijalizovani BLG-PCB adukt digestovani su pepsinom u simuliranoj gastričnoj tečnosti (SGF, od engl. *simulated gastric fluid*). Ukratko, 125 μ l C-PC-a (8 mg/ml) ili BLG-PCB adukta (2 mg/ml) je dodato u 375 μ l SGF-a (84 mM HCl, 35 mM NaCl, pH 1,3), koji je sadržavao 10 jedinica pepsina (svinjski pepsin, 2800 U/mg) po μ g proteina koji se digestuje. Smeše sa enzimom su inkubirane na 37 °C tokom 4 časa. Reakcija je zaustavljena dodatkom 60 μ l 1 M rastvora NaHCO₃. Kalibraciona prava je konstruisana korišćenjem pepsinskog digesta C-PC-a kao standarda, u opsegu koncentracija hromofore od 0,2 do 1,2 μ M (**Slika 24**).



Slika 24. Kalibraciona prava za određivanje koncentracije neohromosomeptida u pepsinskom digestu BLG–PCB-a (ekscitacija na 580 nm).

Razblaženja standarda pripremljena su u 20 mM fosfatnom puferu, pH 7,2. Emisija standarda i uzorka (50 puta razblažen digest BLG–PCB adukta u istom puferu) praćena je na 640 nm, pri ekscitaciji od 580 nm i korišćenjem ekscitacionih i emisionih proreza od 5 nm. Prinos modifikacije izračunat je korišćenjem sledeće jednačine:

$$\text{Prinos reakcije (\%)} = \frac{C(\text{hromofora})}{C(\text{protein})} \times 100\% \quad (6),$$

gde su $C(\text{hromofora})$ i $C(\text{protein})$ koncentracija vezanog PCB-a, određena korišćenjem kalibracione prave, i koncentracija BLG-a u dijalizovanom aduktu.

3.2.7. Detekcija BLG–PCB adukta masenom spektrometrijom

Formiranje BLG–PCB adukta analizirano je masenom spektrometrijom. BLG–PCB adukt, pripremljen inkubacijom 200 μM BLG-a i 200 μM PCB-a tokom 2 časa na 37 °C, razblažen je do 20 μM koncentracije 50% acetonitrilom koji je sadržao 1% mravlju kiselinu. Tako pripremljen uzorak BLG–PCB adukta analiziran je visokorezolutivnom tandemskom masenom spektrometrijom pomoću LTQ Obritrapp XL sistema (Thermo Fisher Scientific; Valtam, Masačusets, SAD). Urađena je direktna injekcija uzorka, brzinom od 20 $\mu\text{l/min}$. Jonizacija je rađena u pozitivnom modu, a kao tip jonizacije korišćen je HESI (elektrosprej jonizacija zagrevanjem, od engl. *heated electrospray ionization*). HESI parametri su bili sledeći: temperatura kapilare 275 °C, napon izvora 4,21 kV, napon kapilare 41,92 V, napon sočiva 110 V, protok gasa u omotaču i spoljnom ulazu 15,01 i 3,99 (u arbitrarnim jedinicama), redom. Snimanje je trajalo 1 min po uzorku. MS spektri su snimljeni u m/z opsegu 200-2000. MS2 i MS3 spektri su potom dobijeni fragmentacijom jonizovanih proteina upotrebom CID-a (kolizijom indukovana disocijacija, od engl. *collision-induced dissociation*). Fragmentacija je rađena pomoću helijuma, pri čemu je normalizovana kolizijska energija bila 35%, dok su roditeljski joni aktivirani tokom 30 ms. ESI-MS, ESI-MS2 i ESI-MS3 spektri su analizirani pomoću Xcalibur programa (verzija 2.1, Thermo Fisher Scientific; Valtam, Masačusets, SAD).

3.2.8. Računarske metode

Vezivanje PCB-a za BLG ispitivano je računarskim metodama, korišćenjem molekulskog dokinga, molekulske dinamike (MD), kao i dirigovane molekulske dinamike (SMD, od engl. *steered molecular dynamics*). Kristalna struktura BLG-a korišćena u proračunima preuzeta je iz Proteinske baze podataka (PDB broj: 3NQ3). Za predviđanje vezivnih mesta za PCB na površini BLG-a molekulskim dokingom korišćen je AutoDock Vina program (Trott i Olson, 2010). Strukture BLG-a i PCB-a pripremljene su za molekulski doking na način koji je prethodno opisan u

literaturi (Minic et al., 2015). Kako bi se pretražila sva potencijalna vezivna mesta u molekulu proteina, primenjena je metoda slepog dokinga. Korišćena je kutija dimenzija $28 \times 28 \times 28$ Å, koja je za 8 Å pomerana duž pravougaonog matriksa koji je sadržao protein. Iz svake simulacije molekulskog dokinga, 9 rezultata sa najvećim afinitetom je sačuvano za dalju analizu.

U cilju simuliranja izmene disulfidnih mostova BLG-a izvedena je dirigovana molekulsko dinamička simulacija. Tačnije, koristeći colvar modul (od engl. *collective variable module*) u NAMD 2.9 programu (Phillips et al., 2005), primenjeno je usmereno kretanje tri ostatka cisteina (Cys106, Cys119 i Cys121). Tokom prvih 150 ns molekulsko dinamičke simulacije, zadržano je usmereno kretanje ovih ostataka, kako bi se simulirala simultana izmena disulfidnih mostova između Cys119 i Cys121. Nakon toga, uspostavljena je nova disulfidna veza Cys106–Cys121 i sistem je simuliran dodatnih 150 ns klasičnom molekulsko dinamičkom simulacijom. Na kraju, interakcije između proteina i PCB-a, kovalentno vezanog za Cys119, ispitane su metodom kovalentnog dokinga, odnosno, preciznije, metodom fleksibilnih bočnih ostataka (Bianco et al., 2016), koristeći doking alat iz AutoDock 4.2 programa (Morris et al., 2009).

3.2.9. Uticaj pH na formiranje BLG–PCB adukta

Zavisnost formiranja BLG–PCB adukta od pH vrednosti rastvora analizirana je inkubiranjem smeše BLG-a i PCB-a (20 µM BLG, 100 µM PCB) u 50 mM citratno-fosfatnim puferima, čija je pH bila u opsegu 2-9. Inkubiranje je rađeno na 37 °C tokom 2 časa. Dobijeni uzorci su potom analizirani pomoću SDS-PAGE na prethodno opisan način (Odeljak 3.2.4.).

3.2.10. Formiranje BLG–PCB adukta u simuliranim gastrointestinalnim uslovima

Formiranje BLG–PCB adukta analizirano je i u simuliranim gastrointestinalnim uslovima. Eksperimentalni uslovi su jednaki onima u standardizovanom protokolu za *in vitro* digestiju proteina (Minekus et al., 2014), sa tom razlikom da su izostavljeni gastrointestinalni enzimi. Ukratko, ekvimolarna smeša BLG-a i PCB-a (po 500 µM) pomešana je u 1:1 zapreminskom odnosu sa simuliranom pljuvačnom tečnošću (SSF, od engl. *simulated salivary fluid*). Nakon dvominutne inkubacije, dobijenoj smeši je dodata simulirana gastrična tečnost (SGF, od engl. *simulated gastric fluid*) u 1:1 zapreminskom odnosu. Inkubacija u SGF-u je trajala 2 časa, nakon čega je smeši dodata simulirana intestinalna tečnost (SIF, od engl. *simulated intestinal fluid*), takođe u 1:1 zapreminskom odnosu. Inkubacija je trajala 2 časa. Nakon svake faze, uzimani su alikvoti smeše, koji su potom analizirani elektroforetski, na prethodno opisan način (Odeljak 3.2.4.). Koncentracija BLG-a u svakom alikvotu je podešena na 50 µM.

3.2.11. Antioksidativne osobine BLG-a i BLG–PCB-a

3.2.11.1. Oksidacija BLG-a i BLG–PCB-a slobodnim radikalima

Oksidacija BLG-a i BLG–PCB-a slobodnim radikalima, dobijenim raspadanjem AAPH-a, praćena je merenjem unutrašnje fluorescencije proteina u zavisnosti od vremena. AAPH je azo jedinjenje čijom dekompozicijom nastaju dva alkil-radikala, koji u reakciji sa rastvorenim kiseonikom generišu peroksi- i alkoksi-radikale, čime se iniciraju oksidacione reakcije preko slobodno-radikaliskih mehanizama. Rastvori BLG-a i BLG–PCB-a (3 µM u 20 mM fosfatnom puferu, pH 7,2) preinkubirani su na 37 °C u toku 15 minuta. Reakcija je započeta dodatkom štok rastvora AAPH (500 mM), pri čemu je finalna koncentracija AAPH-a u smeši bila 35 mM. Ekscitacione i emisijne talasne dužine su bile 280 i 336 nm, redom, dok je širina proreza na emisijom i ekscitacionom monohromatoru podešena na 5 nm. Opadanje fluorescencije je praćeno u toku 30 minuta. Od intenziteta fluorescencije BLG–PCB-a oduzete su odgovarajuće vrednosti intenziteta fluorescencije samog PCB-a.

Zaštitni efekat (ZE) PCB-a je izračunat prema sledećoj formuli:

$$ZE = \frac{PIK_{BLG-PCB} - PIK_{BLG}}{PIK_{BLG-PCB}} \times 100\% \quad (7),$$

gde ZE predstavlja zaštitni efekat PCB-a, a PIK površinu ispod krive zavisnosti intenziteta fluorescencije od vremena izlaganja APPH-u za navedene uzorke.

3.2.11.2. ORAC test

Spektrofluorimetrijski ORAC (od engl. *oxygen radical absorbance capacity*) test je urađen prema metodi Ou i saradnika (Ou et al., 2001), sa određenim modifikacijama. Test se zasniva na sposobnosti antioksidanata da inhibiraju oksidaciju fluorescentnog molekula (u ovom slučaju fluoresceina) izazvanu peroksi-radikalima, nastalih raspadanjem AAPH-a. Reakcijom peroksi-radikala sa fluorescentnom probom nastaje oksidativno modifikovan nefluorescentni proizvod, čija je brzina nastanka manja u prisustvu antioksidanata. Štok rastvori fluoresceina (5 μM), supstrata, i AAPH-a (320 mM), generatora slobodnih radikala, su napravljeni u 75 mM fosfatnom puferu, pH 7,4. Esej je izveden na sledeći način: pomešano je 1485 μl pufera (75 mM fosfat, pH 7,4) sa 15 μl fluoresceina i 250 μl 4 μM rastvora BLG-a, odnosno BLG-PCB adukta, a zatim je dobijena smeša preinkubirana 5 minuta. Nakon toga, reakcija oksidacije je inicirana dodatkom 250 μl rastvora AAPH-a. Ekscitacione i emisije talasne dužine su bile 485 nm i 511 nm, redom, dok je širina proreza iznosila 2 nm. Emisija je merena na svakih 30 sekundi u toku 20 minuta. Na identičan način određena je i antioksidativna aktivnost 20 μM rastvora Troloksa, analoga vitamina E. Dobijena kriva zavisnosti intenziteta fluorescencije od vremena izlaganja AAPH-u je upotrebljena za izračunavanje površine ispod krive (PIK).

Relativna ORAC vrednost je izračunata pomoću sledeće jednačine i izražena u jedinicama Troloks ekvivalenata (TE):

$$\text{ORAC vrednost} = \frac{PIK_{\text{uzorak}} - PIK_{\text{pufer}}}{PIK_{\text{troloks}} - PIK_{\text{pufer}}} \times \frac{C_{\text{troloks}}}{C_{\text{uzorak}}} \quad (8),$$

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

3.2.11.3. Test obezbojavanja ABTS radikal-katjona

Test obezbojavanja ABTS (2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)) radikal-katjona (ABTS^{•+}) je urađen prema prethodno publikovanom protokolu (Re et al., 1999), uz manje modifikacije. ABTS esej je kolorimetrijski esej za određivanje antioksidativne aktivnosti supstance, koji se zasniva na gubitku boje ABTS^{•+} u prisustvu antioksidanata, a koja se prati smanjenjem apsorbcije na 734 nm. Najpre je dobijen štok rastvor ABTS radikal-katjona, mešanjem štok rastvora ABTS-a i kalijum-persulfata. Finalne koncentracije ABTS-a i kalijum-persulfata bile su 2,33 mM i 0,83 mM, redom. Nakon mešanja ova dva rastvora, smeša je zaštićena od svetlosti aluminijumskom folijom i ostavljena na sobnoj temperaturi 12 sati. Pre upotrebe, koncentrovani rastvor ABTS^{•+} je razblažen vodom, tako da apsorbcija rastvora na 734 nm bude oko 1. Potom su pripremljene reakcione smeše, mešanjem 10 μl 30 μM rastvora proteina (ili 20 mM fosfatnog pufera pH 7,2 u slučaju kontrole) i 10 μl radnog rastvora ABTS-a. Smeša je potom dobro izmešana na vorteksu. Nakon 30 minuta stajanja na sobnoj temperaturi u mraku, izmerena je apsorbcija ove smeše na 734 nm, naspram pufera kao slepe probe. Kako bi se apsorbcija uzorka korigovala za apsorbciju samog BLG-PCB-a na 734 nm, na isti način pripremljen je i kontrolni BLG-PCB uzorak koji nije sadržao ABTS.

Efekat uklanjanja ABTS radikal-katjona kvantitativno je procenjen pomoću sledeće jednačine:

$$\text{efekat uklanjanja ABTS}^+(\%) = \left(\frac{A_{\text{kontrola}} - A_{\text{uzorka}}}{A_{\text{kontrola}}} \right) \times 100\% \quad (9),$$

gde je A_{kontrola} početna apsorbancija kontrolnog ABTS^{•+} uzorka na 734 nm, a A_{uzorka} apsorbancija uzorka.

3.2.11.4. Test ukupne redukujuće moći

Test ukupne redukujuće moći je jednostavan spektrofotometrijski test, koji se zasniva na tome da supstanca koja poseduje redukujuću moć reaguje sa kalijum-fericijanidom (Fe^{3+}), pri čemu nastaje ferocijanid (Fe^{2+}), koji onda reaguje sa feri-hloridom gradeći feri-fero kompleks sa apsorpcionim maksimumom na 700 nm. Test ukupne redukujuće moći je urađen uz manje modifikacije prethodno objavljene metode (Chawla et al., 2009). Najpre su napravljeni potrebni reagensi: 0,2 M natrijum-fosfatni pufer (pH 6,6), 1% rastvor kalijum-fericijanida [$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$], 20% trihlorsirćetna kiselina (TCA) i 0,1% ferihlorid (FeCl_3). U smešu koja je sadržala 10 μl pufera i 10 μl kalijum-fericijanida dodato je 10 μl 150 μM uzorka proteina (BLG, odnosno BLG–PCB adukt). Reakciona smeša je inkubirana 20 minuta na 50 °C. Nakon inkubacije, u reakcionu smešu je dodato 6,25 μl trihlorsirćetne kiseline. Uzorci su zatim centrifugirani 10 minuta na 7000 x g na sobnoj temperaturi i odvojen je supernatant. Zatim je 20 μl supernatanta pomešano sa 2 μl 0,1% ferihlorida. Nakon 10 minuta, izmerena je apsorbancija na 700 nm. Veća apsorbancija na 700 nm ukazuje na veću redukujuću moć uzorka. Pošto sam BLG–PCB kompleks apsorbuje na 700 nm, na isti način je pripremljen i kontrolni BLG–PCB uzorak, koji je sadržao sve prethodno pomenuto, osim 0,1% FeCl_3 .

3.2.12. Izoelektrično fokusiranje u imobilizovanom pH gradijentu

Izoelektrično fokusiranje BLG-a i BLG–PCB-a u imobilizovanom pH gradijentu (IPG, od engl. *immobilized pH gradient*) rađeno je korišćenjem IPG traka dužine 13 cm, sa nelinearnim pH gradijentom, opsega 3-5,6. IPG trake (GE Healthcare; Upsala, Švedska) su rehidratirane u rastvoru uzorka koji je sadržavao i odgovarajući IPG pufer (3,0-5,6), finalne koncentracije 0,5%. Izoelektrično fokusiranje rađeno je na Ettan IPGPhor sistemu (GE Healthcare; Upsala, Švedska). Nakon aktivne dvanaestčasovne rehidratacije traka pri naponu od 10 V, rađeno je izoelektrično fokusiranje koristeći sledeći program: 100 V u trajanju od 45 min, 300 V u trajanju od 1 časa, gradijentno povećanje napona do 1000 V u trajanju od 50 min, gradijentno povećanje napona do 8000 V u trajanju od 2 časa i 30 min, konstantan napon od 8000 V u trajanju od 25 min.

3.2.13. Termički-indukovane promene BLG-a i BLG–PCB-a

3.2.13.1. Termički tretman BLG-a i BLG–PCB-a

BLG i kovalentno modifikovani BLG–PCB adukt (70 μM) zagrevani su u 20 mM fosfatnom puferu, pH 7,2, u uslovima koji imitiraju one prisutne tokom LTLT pasterizacije (dugotrajna pasterizacija na niskoj temperaturi, od engl. *low-temperature long-time pasteurization*), poznate i kao „bač“ pasterizacija, koja podrazumeva zagrevanje tokom 30 min na 63 °C. Tako tretirani proteinski uzorci analizirani su u pogledu površinske hidrofobnosti, sposobnosti oligomerizacije i agregiranja, kao i u pogledu formiranja amiloidima sličnih fibrilarnih struktura. Dodatno, za analizu sposobnosti formiranja amiloidima sličnih proteinskih struktura pri intenzivnijem termičkom tretmanu, BLG i BLG–PCB podvrgnuti su dvočasovnom zagrevanju na 85 °C.

3.2.13.2. Natrijum-dodecilsulfat (SDS) i nativna poliakrilamidna gel elektroforeza zagrevanih BLG-a i BLG–PCB-a

Stepen oligomerizacije i agregiranja BLG-a i BLG–PCB-a nakon polučasovnog zagrevanja na 63 °C analiziran je elektroforetski, denaturišućom i nativnom elektroforezom. Proteini su razdvojeni na 14% poliakrilamidnom gelu. Redukujuća SDS-PAGE urađena je sa dodatkom β -merkaptetoetanolu u pufer za uzorke. Nativna elektroforeza urađena je bez SDS-a u poliakrilamidnom gelu i bez SDS-a i β -merkaptetoetanolu u puferu za uzorke.

3.2.13.3. Površinska hidrofobnost BLG-a i BLG-PCB-a

Površinska hidrofobnost zagrevanih uzoraka BLG-a i BLG-PCB-a ispitivana je korišćenjem 8-anilinonaftalen-1-sulfonske kiseline (ANS) kao hidrofobne probe. Fluorescentni spektri 10,9 μM BLG-a i BLG-PCB-a snimljeni su u prisustvu 80 μM ANS-a u 20 mM natrijum-fosfatnom puferu (pH 7,2). Spektri su snimljeni u oblasti od 360-620 nm, na temperaturi od 25 °C, pri čemu je talasna dužina ekscitacije iznosila 350 nm. Širina proreza na ekscitacionom i emisionom monohromatoru je bila 5 nm. Kao kontrolni uzorci snimljeni su nezagrevani uzorci oba proteina u prisustvu iste koncentracije ANS-a (10,9 μM protein, 80 μM ANS). Emisija samih proteina oduzeta je od odgovarajućih fluorescentnih spektara uzoraka proteina u prisustvu ANS-a. Rezultati su izraženi kao odnos fluorescencije na 494 nm, talasnoj dužini koja odgovara emisionom maksimumu ANS-a kada je vezan za protein, i 524 nm, što je talasna dužina emisionog maksimuma slobodnog ANS-a ($F_{494\text{nm}}/F_{524\text{nm}}$).

3.2.13.4. CD spektroskopija BLG-a i BLG-PCB-a

CD spektri zagrevanih uzoraka BLG-a i BLG-PCB-a (70 μM) snimljeni su na pH 7,2 u dalekoj UV oblasti. Snimljeni su i CD spektri kontrolnih, nezagrevanih, uzoraka oba proteina pri istim uslovima. Spektri su snimani u spektralnoj oblasti od 200-260 nm, u termostatiranim uslovima (25 °C). Podaci su prikupljeni u intervalu od 0,1 nm, pri brzini od 50 nm/min, korišćenjem kivete širine 0,01 cm. Dobijeni spektri predstavljaju srednju vrednost dve akumulacije. Spektri pufera i PCB-a oduzeti su od odgovarajućih spektara BLG-a i BLG-PCB-a. Sadržaj sekundarnih struktura određen je korišćenjem CONTIN algoritma dostupnog u CDPro softverskom paketu. Za procenu sekundarnih struktura korišćena je SP37 baza podataka.

3.2.13.5. Detekcija amiloidu sličnih fibrilarnih proteinskih struktura

Za detekciju oligomera nastalih zagrevanjem BLG-a se koristi tioflavin T, boja koja se specifično vezuje za amiloidima slične proteinske strukture i čiji intenzitet fluorescencije na 485 nm raste po vezivanju za oligomere i slične strukture.

Vezivanje za tioflavin T analizirano je nakon zagrevanja BLG-a/BLG-PCB-a tokom 30 min na 63 °C ili 2 časa na 85 °C. BLG i BLG-PCB (3,5 μM finalna koncentracija) pomešani su sa rastvorom tioflavina T (20 μM finalna koncentracija) u 20 mM natrijum-fosfatnom puferu (pH 7,2), nakon čega su snimljeni fluorescentni spektri. Talasna dužina ekscitacije je bila 435 nm, a emisija tioflavina je praćena na talasnoj dužini od 485 nm. Širina proreza na ekscitacionom i emisionom monohromatoru je bila 5 nm. Fluorescentni spektri proteina u puferu su snimljeni pod istim uslovima i vrednosti intenziteta fluorescencije oduzete su od odgovarajućih vrednosti intenziteta fluorescencije protein-tioflavin kompleksa, kako bi se korigovala emisija koja potiče od samih proteina. Od dobijenih spektara oduzet je potom spektar samog tioflavina, kako bi se pratio neto porast fluorescencije tioflavina T izazvan dodatkom proteina.

3.2.13.6. Termalna stabilnost BLG-a i BLG-PCB-a

Termalna denaturacija BLG-a i BLG-PCB-a analizirana je fluorescentnom spektroskopijom, snimanjem fluorescentnih spektara u oblasti od 35-91 °C. Naime, 2 μM rastvori BLG-a i BLG-PCB-a zagrevani su u navedenom opsegu, na pH 7,2 (20 mM natrijum-fosfatni pufer) ili pH 2,5 (100 mM Gly-HCl). Ekvilibraciono vreme za svaku temperaturu bilo je 1 min, nakon čega su spektri snimljeni u oblasti od 310-370 nm, pri čemu je talasna dužina ekscitacije iznosila 280 nm. Spektri su snimani na svaka dva stepena Celzijusa. Fluorescencija PCB-a na svakoj temperaturi oduzeta je od odgovarajućih spektara BLG-PCB-a. Rezultati su prikazani kao zavisnost količnika fluorescencija na 350 nm i 336 nm ($F_{350\text{nm}}/F_{336\text{nm}}$) od temperature. Vrednosti količnika fluorescencija prethodno su normirane od 0-100%. Intenzitet fluorescencije na 350 nm ($F_{350\text{nm}}$) odgovara emisionom maksimumu slobodnog triptofana u 10 mM natrijum-fosfatnom puferu pH vrednosti 7,2 (Albani, 2014), dok intenzitet fluorescencije na 336 nm ($F_{336\text{nm}}$) odgovara

emisionom maksimumu BLG-a na početnoj temperaturi merenja (35 °C). Dobijene krive ubačene su u dozno-zavisnu sigmoidalnu funkciju. Prevojna tačka predstavlja temperaturu topljenja (T_m) BLG-a, odnosno BLG-PCB-a.

3.2.14. *In vitro* pepsinska i pankreatinska digestija nemodifikovanog BLG-a i BLG-PCB kovalentnog adukta

3.2.14.1. Digestija pepsinom u simuliranoj želudačnoj tečnosti

Pepsinska digestija 15 μ M BLG-a i BLG-PCB adukta je izvedena prema protokolu Tomasa i saradnika u simuliranoj gastričnoj tečnosti (SGF, od engl. *simulated gastric fluid*, 0,1 M HCl sa 2 g/l NaCl, pH 2,5), uz dodatak pepsina (Thomas et al., 2004). Aktivnost preparata svinjskog pepsina je određena korišćenjem goveđeg hemoglobina kao supstrata, prema protokolu opisanom u radu Minekusa i saradnika (Minekus et al., 2014), i iznosila je 2800 U/mg. Odnos pepsina u digestionoj smeši bio je 10 IU pepsina na 1 μ g BLG-a (Thomas et al., 2004). Digestija je trajala šest časova na 37 °C, uz kontinuirano mešanje na termošejkeru. Alikvoti digestione smeše zapremine 80 μ l uzimani su 2 min, 5 min, 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h i 6 h od početka digestije i dodavani u 28 μ l 0,3 M NaHCO₃ (pH 11), kako bi se zaustavila reakcija. Zatim je tome dodato 27 μ l 5X koncentrovanog pufera za pripremu uzoraka za SDS-PAGE. Uzorci su zagrevani 10 minuta na 95°C, a potom analizirani pomoću SDS-PAGE. Uzorci u nultom vremenu su spremljeni tako što je pepsin (u SGF-u) inhibiran u baznoj sredini dodatkom NaHCO₃ pre dodavanja proteina. Pripremljeni su i uzorci za kontrolu autoproteolize pepsina u nultom vremenu i nakon šest sati inkubacije pepsina u SGF-u, kao i kontrola proteina (protein bez pepsina).

Alikvoti su analizirani SDS-PAGE elektroforezom pod redukujućim uslovima, na 16%-tnom poliakrilamidnom gelu. Obojeni gelovi su skenirani i intenziteti traka su kvantifikovani denzitometrijski, korišćenjem ImageJ softvera (National Institutes of Health, SAD). Intenziteti traka u svakoj vremenskoj tački prikazani su relativno u odnosu na intenzitet trake BLG-a, odnosno BLG-PCB adukta, u nultom vremenu, koji je izražen kao 100%. Prikazana je zavisnost dobijenih intenziteta traka u odnosu na vreme trajanja digestije. Rezultati su ubačeni u eksponencijalnu jednačinu prvog reda. Nakon toga, određeni su poluživoti proteina, tako što je sa dobijene eksponencijalne krive očitana vrednost X (vreme) pri Y vrednosti (relativni intenzitet trake) od 50%.

3.2.14.2. Digestija pankreatinom u simuliranoj intestinalnoj tečnosti

Digestija BLG-a i BLG-PCB adukta pankreatinom izvedena je na sledeći način: 400 μ l rastvora BLG-a ili BLG-PCB-a (0,5 mg/ml u 20 mM natrijum-fosfatnom puferu, pH 7,2) preinkubirano je tokom 2 min na 37 °C i pomešano sa 400 μ l rastvora pankreatina (0,4 mg/ml u 80 mM natrijum-fosfatnom puferu, pH 7,2), koji je takođe preinkubiran tokom 2 min na 37 °C. Digestija je trajala 4 časa na 37 °C, na termošejkeru, uz kontinuirano mešanje (400 obrtaja po minuti). U vremenskim razmacima od 1, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 120 i 240 min od početka digestije uzimani su alikvoti digestione smeše zapremine 80 μ l i dodavani u 20 μ l 5X koncentrovanog redukujućeg pufera za uzorke. Uzorci su odmah zagrevani 10 minuta na 95°C i potom analizirani SDS-PAGE elektroforezom. Uzorci u nultom vremenu su pripremljeni tako što je rastvor pankreatina dodat 5X koncentrovanom puferu za uzorke, a zatim je tome dodat rastvor proteina. Po analogiji sa pepsinskom digestijom, pripremljeni su i kontrolni uzorci za autodigestiju pankreatina (pankreatin bez BLG-a), koji su umesto rastvora proteina sadržali 20 mM fosfatni pufer pH 7,2. Kontrola pankreatina analizirana je u nultom vremenu i u krajnjoj tački (240 min). Istovremeno su pripremljene i kontrole stabilnosti proteina, kojima je, umesto rastvora pankreatina, dodat 80 mM fosfatni pufer pH 7,2. Uzorci kontrole su takođe zagrevani 10 minuta na 95 °C i potom analizirani elektroforetski u redukujućim uslovima, na 16%-tnom poliakrilamidnom gelu. Intenziteti traka su analizirani denzitometrijski, a zatim dalje obrađeni na način prethodno opisan za pepsinsku digestiju.

3.2.15. IgE-vezujuće osobine BLG-a i BLG-PCB-a

3.2.15.1. Western blot

Nakon završene elektroforeze BLG-a i BLG-PCB-a, gel je iskorišćen za transfer uzoraka na polivinilidendifluorid (PVDF) membranu. Korišćen je sistem za polusubi transfer proteina (VWR; Darmštat, Nemačka). Sendvič za blot je sklopljen tako što su postavljena 3 filter papira, PVDF membrana prethodno aktivirana u metanolu, gel nakon završene SDS PAGE i još 3 filter papira jedni preko drugih. Sendvič je sklapan u puferu za blot (25 mM Tris, 192 mM glicin, 0,1% SDS, 20% metanol; pH=8,3). Jačina struje pod kojom je vršen transfer na membranu je iznosila 1,5 mA/cm² gela, a transfer je trajao 45 min. Nakon toga su razmontirani sendviči i isečeni delovi membrane na kojima su se nalazili markeri. Markeri su sačuvani, a membrane su nakon ispiranja u destilovanoj vodi prebačene u rastvor za blokiranje koji sadrži 1% BSA u tTBS-u (20 mM TBS; 0,2% Tween 20; pH=7,4). Blokiranje je, uz neprestano mešanje, vršeno 1 h na sobnoj temperaturi, a zatim je membrana inkubirana sa smešom seruma osoba alergičnih na mleko razblaženom četiri puta u 0,1% rastvoru BSA u tTBS-u. Serum 10 pacijenata za koje je prethodno u imunoCAP-u pokazano da reaguju na mleko su spojeni mešanjem jednakih zapremina seruma čije su ukupne IgE vrednosti na mleko određene prethodno i iznosile su: 10,5 kU/L, 47,3 kU/L, 18,4 kU/L, >100 kU/L, 20 kU/L, 71 kU/L, 12,9 kU/L, 5,3 kU/L, >100 kU/L i 9,67 kU/L. Inkubacija je vršena na 4 °C preko noći (12 sati) uz lagano mešanje. Sledećeg dana membrana je isprana 3 puta po 5 min tTBS-om i dodata su odgovarajuća sekundarna antitela. Kao sekundarna antitela korišćena su 2000 puta razblažena zečja anti-humani IgE antitela (MIAB; Upsala, Švedska) u 1% BSA u tTBS-u. Inkubacija je trajala 1 h na sobnoj temperaturi, a zatim je membrana isprana 3 puta po 5 min tTBS-om, te inkubacija sa tercijarnim kozjim anti-zečjim IgG antitelima obeleženim alkalnom fosfatazom (AbD Serotec; Kidlington, Ujedinjeno Kraljevstvo) 10 000 puta razblaženim u 0,1% BSA u tTBS-u. Inkubacija je trajala 1 sat na sobnoj temperaturi, nakon čega je membrana isprana 3 puta po 5 min tTBS-om, zatim 2 puta po 5 min TBS-om. Na kraju je membrana inkubirana u rastvoru supstrata (1,5 mg 5-brom-4-hlor-3-indolil-fosfata (BCIP, od engl. *5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate*) i 3 mg nitroplavotetrazolijuma (NBT, od engl. *nitroblue tetrazolium*) u 10 ml 100 mM karbonatno-bikarbonatnog pufera koji sadrži 5 mM MgCl₂, pH=9,5). Nastao je nerastvoran ljubičast talog na mestima gde postoji fosfatazna aktivnost. Reakcija je zaustavljena ispiranjem membrana destilovanom vodom.

3.2.15.2. Inhibicija vezivanja IgE antitela u ELISA testu

IgE-vezujuće osobine BLG-a i BLG-PCB-a kvantitativno su procenjene inhibitornim ELISA testom. Bunarići mikrotitar pločice sa 96 bunara, sa visokim kapacitetom za vezivanje proteina (NUNC Maxisorp, Thermo Fisher Scientific; Valtam, Masačusets, SAD), kuplovani su sa po 100 µl rastvora BLG-a koncentracije 25 µg/ml u puferu za vezivanje (50 mM karbonatni pufer, pH 9,6). Inkubacija je vršena preko noći (12 sati) na 4 °C, u vlažnoj atmosferi. Sledećeg dana su bunarići isprani pet puta sa po 300 µl tTBS-a (30 mM Tris sa 9 g/l NaCl (TBS) sa 0,2% Tween 20), nakon čega su mesta za nespecifično vezivanje blokirana sa po 300 µl rastvora za blokiranje (1% BSA u tTBS-u) sat vremena na sobnoj temperaturi. Za vreme blokiranja, pripremljeno je serijsko trostruko razblaženje BLG-a, odnosno BLG-PCB-a, počev od koncentracije 1,8 mg/ml. Za pripremu razblaženja BLG-a/BLG-PCB-a korišćen je rastvor za blokiranje. Zbirni serum osoba alergičnih na mleko (opisan u **Odeljku 3.2.15.1.**), razblažen četiti puta, preinkubiran je u 1:1 zapreminskom odnosu sa različitim razblaženjima nemodifikovanog i kovalentno modifikovanog BLG-a u duplikatu tokom jednog časa na 37 °C. Finalno razblaženje seruma bilo je 8 puta (razblaženje seruma potrebno da se postigne 80% vezivanja IgE-a za kuplovani BLG je prethodno određeno u direktnoj ELISA-i). Nakon blokiranja, po 100 µl smeše seruma i proteina je dodato u

bunare, nakon čega je inkubacija trajala preko noći (12 sati) na 4 °C. Sutradan su bunari isprani tri puta sa po 100 µl tTBS-a. Vezani IgE je detektovan jednočasovnom inkubacijom na sobnoj temperaturi sa 100 µl mišjih anti-humani IgE monoklonskih antitela konjugovanih sa peroksidazom iz rena (Abcam; Kembridž, Ujedinjeno Kraljevstvo), razblaženih 2000 puta rastvorom 0,1% BSA u tTBS-u. Nakon jednočasovnog inkubiranja sa sekundarnim antitelima na sobnoj temperaturi, bunari su isprani dva puta tTBS-om i jednom TBS-om i dodato je 100 µl supstrata. Kao supstrat je korišćen TMB (0,1% TMB, 0,006% H₂O₂ u 100 mM citratno-fosfatnom puferu; pH 5). Reakcija je zaustavljena 20 min nakon dodatka supstrata, dodatkom 30 µl 2 M rastvora H₂SO₄, nakon čega je izmerena apsorbancija na 450 nm na čitaču mikrotitar pločica (BioTek Epoch, Agilent; Santa Klara, Kalifornija, SAD). Pozitivna kontrola (bez dodatka BLG-a kao inhibitora) pripremljena je mešanjem rastvora za blokiranje (1% BSA u tTBS-u) sa serumom (1:1, vol:vol). Negativna kontrola pripremljena je dodavanjem 0,1% rastvora BSA umesto seruma. U slučaju obe kontrole, svi prethodni i naredni koraci rađeni su na način prethodno opisan za smešu seruma i razblaženja inhibitora. Pre analize, od apsorbancije uzorka oduzeta je apsorbancija negativne kontrole. Inhibicija vezivanja IgE antitela izračunata je prema formuli:

$$\% \text{ inhibicije} = \frac{\text{OD (bez inhibitora)} - \text{OD (inhibitora)}}{\text{OD (bez inhibitora)}} \times 100\% \quad (10)$$

Nakon konstruisanja zavisnosti procenta inhibicije od koncentracije inhibitora, dobijena kriva ubačena je u model asimetrične sigmoide, takozvani „5-parameter logistic“ model. IC₅₀ vrednost inhibitora predstavlja onu koncentraciju inhibitora koja je potrebna da bi se dobilo 50% inhibicije u odnosu na pozitivnu kontrolu i određen je metodom linearne regresije na linearnom delu krive.

3.3. Ispitivanje kovalentnih interakcija proteina modifikovanih Trautovim reagensom i fikocijanobilina

3.3.1. Tiolovanje BSA, IgG antitela i ALA Trautovim reagensom

Tiolovanje BSA Trautovim reagensom rađeno je u 20 mM boratnom puferu, koji je sadržavao 5 mM EDTA, pH 9. Pripremljeno je sedam različitih reakcionih smeša, od kojih je svaka sadržala različit molarni odnos Trautovog reagensa u odnosu na protein. Naime, finalna koncentracija BSA iznosila je 3 mg/ml, dok je Trautov reagens bio prisutan u molarnim odnosima 5:1, 10:1, 20:1, 50:1, 100:1, 150:1 i 200:1 (reagens:protein, mol:mol). Dodatno je pod istim uslovima (20 mM boratni pufer, sa 5 mM EDTA, pH 9) pripremljen kontrolni uzorak proteina, koji nije sadržavao Trautov reagens. Inkubacija sa reagensom trajala je jedan čas na sobnoj temperaturi (25 °C), uz mešanje na termošejkeru (400 obrtaja/minuti). Višak neizereagovalog reagensa uklonjen je rasoljavanjem (gel filtracijom), korišćenjem Sephadex G-25 matriksa i istog pufera (20 mM boratni pufer, 5 mM EDTA, pH 9). Nakon rasoljavanja, svi proteinski uzorci (tiolovani uzorci proteina i netiolovana kontrola) svedeni su na istu koncentraciju (10 µM) i kao takvi korišćeni u daljim eksperimentima.

Tiolovanje humanih IgG antitela i sekundarnih zečjih anti-kozjih antitela rađeno je na analogan način onom za tiolovanje BSA, sa manjim razlikama. Naime, finalna koncentracija IgG antitela u oba slučaja iznosila je 2 mg/ml, dok su molarni odnosi Trautovog reagensa u slučaju modifikacije humanih IgG antitela bili identični onim korišćenim za modifikaciju BSA, a u slučaju kozjih anti-zečjih antitela korišćen je samo pedesetostruki molarni višak Trautovog reagensa. U oba slučaja, višak reagensa uklonjen je gel filtracijom uz korišćenje 20 mM fosfatnog pufera, koji je sadržavao 5 mM EDTA, pH 7,2.

Tiolovanje ALA rađeno je korišćenjem 4 mg/ml ALA i pedesetostrukog molarnog viška reagensa. Za uklanjanje viška reagensa gel filtracijom, korišćen je 20 mM fosfatni pufer, sa 5 mM EDTA, pH 7,2.

3.3.2. Određivanje ukupnog sadržaja slobodnih amino grupa tiolovanih proteina

Ukupni sadržaj slobodnih amino grupa nemodifikovanih proteina (BSA, humana IgG antitela i ALA) i proteina modifikovanih Trautovim reagensom određen je korišćenjem *o*-ftalaldehidnog (OPA, od engl. *o-phthalaldehyde*) esaja, prema protokolu Nielsena i saradnika (Nielsen et al., 2001), uz manje modifikacije. U prisustvu redukovanih sulfhidrilnih grupa OPA reaguje sa primarnim i ϵ -amino grupama lizina, gradeći fluorescentne proizvode sa maksimumom apsorpcije na 340 nm. Dodatkom SDS-a, koji obezbeđuje razvijanje proteina, OPA esejem se određuje sadržaj ukupnih slobodnih amino grupa. OPA reagens je pripremljen na sledeći način: 8 mg OPA je rastvoreno u 200 μ l metanola, zatim je tome dodato 5 ml 0,1 M natrijum-tetraborata, 0,5 ml 20% SDS-a i 20 μ l β -merkaptotetanol, te je na kraju smeša razblažena destilovanom vodom do zapremine od 10 ml. U slučaju BSA, 30 μ l uzoraka nemodifikovanih i modifikovanih proteina (10 μ M BSA u 20 mM boratnom puferu, 5 mM EDTA, pH 9) pomešano je sa 200 μ l OPA reagensa i inkubirano 5 minuta na sobnoj temperaturi. U slučaju humanih IgG antitela i ALA, pomešano je 5 μ l uzoraka nemodifikovanih i modifikovanih proteina (4 μ M IgG ili 67 μ M ALA u 20 mM fosfatnom puferu, 5 mM EDTA, pH 7,2) sa 20 μ l OPA reagensa i inkubirano 15 minuta na sobnoj temperaturi. U sva tri slučaja, nakon inkubacije proteina sa reagensom očitana je apsorbcija na 340 nm. Sadržaj slobodnih amino grupa u modifikovanim proteinima izražen je procentualno u odnosu na kontrolne, nemodifikovane proteine, čiji je sadržaj amino grupa izražen kao 100%.

3.3.3. Određivanje sadržaja slobodnih sulfhidrilnih grupa tiolovanih proteina

Sadržaj izloženih slobodnih sulfhidrilnih grupa nemodifikovanih i Trautovim reagensom modifikovanih proteina (BSA, humana IgG antitela i ALA) određen je derivatizacijom sa Elmanovim reagensom, prema protokolu Morgana i saradnika (Morgan et al., 1999b). Ukratko, 200 μ l uzorka proteina (10 μ M BSA u 20 mM boratnom puferu, 5 mM EDTA, pH 9, 4 μ M IgG u 20 mM fosfatnom puferu, 5 mM EDTA, pH 7,2 ili 67 μ M ALA u 20 mM fosfatnom puferu, 5 mM EDTA, pH 7,2) pomešano je u mikrotitar pločici sa 30 μ l Elmanovog reagensa (2 mM DTNB u vodi). Nakon petominutne inkubacije na sobnoj temperaturi, očitana je apsorbcija na 405 nm. Za konstruisanje kalibracione krive, pripremljeni su standardi L-cisteina u opsegu koncentracija od 5-100 μ M, koji su pripremljeni u istom puferu u kom se nalaze uzorci proteina (20 mM boratni pufer, 5 mM EDTA, pH 9 ili 20 mM fosfatni pufer, 5 mM EDTA, pH 7,2). Koncentracija ukupnih slobodnih sulfhidrilnih grupa u svakom uzorku izračunata je korišćenjem standardne krive, nakon čega je sadržaj sulfhidrilnih grupa po molekulu proteina izračunat iz odnosa molarnih koncentracija sulfhidrilnih grupa i koncentracije proteina.

3.3.4. CD spektroskopija proteina modifikovanih Trautovim reagensom

CD spektri u dalekoj i bliskoj UV oblasti nemodifikovanih i Trautovim reagensom modifikovanih proteina (BSA, humana IgG i ALA) snimljeni su u spektralnim oblastima 185-260 i 260-320 nm, redom. Spektri su snimljeni u termostatisanim uslovima (25 °C), pri brzini od 50 nm/min u kvarcnim kivetama optičkog puta 0,01 cm ili 0,05 cm (za snimanja u dalekoj UV oblasti; 0,01 cm za BSA i ALA i 0,05 cm za IgG) i 1 cm (za sva snimanja u bliskoj UV oblasti). BSA je u obe oblasti sniman u 10 μ M koncentraciji, IgG antitela su u dalekoj oblasti snimana u koncentraciji 2 μ M, a u bliskoj UV oblasti u koncentraciji 4 μ M. Koncentracija ALA je bila 67 μ M za snimanja u obe oblasti. Podaci su prikupljeni u intervalu od 0,1 nm. Dobijeni spektri predstavljaju srednju vrednost tri akumulacije. Spektri pufera oduzeti su od odgovarajućih proteinskih spektara. Sadržaj sekundarnih struktura BSA određen je korišćenjem CONTIN algoritma dostupnog u CDPro softverskom paketu. Za procenu sekundarnih struktura korišćena je SP29 baza podataka.

3.3.5. Konjugacija proteina modifikovanih Trautovim reagensom sa fikocijanobilinom

Konjugovanje PCB-a za BSA i IgG antitela urađeno je inkubiranjem proteina, prethodno tiolovanih Trautovim reagensom, sa dvadesetostrukim molarnim viškom fikocijanobilina. Konjugovanje PCB-a za tiolovan ALA rađeno je inkubiranjem proteina sa približno četverostrukim molarnim viškom PCB-a (tačne koncentracije videti niže u tekstu). Sve reakcije su trajale 2 časa na 37 °C. U slučaju modifikacije BSA, inkubacija je rađena u 20 mM boratnom puferu, sa 5 mM EDTA, pH 9. Koncentracije BSA i PCB-a bile su 10 µM i 200 µM, redom. U slučaju humanih i kozjih anti-zečjih IgG antitela i ALA, inkubacija sa PCB-om je rađena u 20 mM fosfatnom puferu, sa 5 mM EDTA, pH 7,2. Koncentracije humanih IgG antitela i PCB-a bile su 4 µM i 80 µM, koncentracije kozjih anti-zečjih IgG antitela i PCB-a iznosile su 6,7 µM i 134 µM, redom, dok su koncentracije ALA i PCB-a iznosile 67 µM i 300 µM, redom. Višak neizreagovalog PCB-a uklonjen je rasoljavanjem reakcionih smeša, korišćenjem Sephadex G-25 matriksa i 20 mM fosfatnog pufera, sa 5 mM EDTA, pH 7,2.

3.3.6. Natrijum-dodecilsulfat i nativna poliakrilamidna gel elektroforeza (SDS-PAGE) proteina, prethodno tiolovanih Trautovim reagensom, konjugovanih sa fikocijanobilinom

Proteinski profil BSA, IgG i ALA, tiolovanih, a zatim konjugovanih sa fikocijanobilinom, analiziran je denaturišućom poliakrilamidnom gel elektroforezom, korišćenjem poliakrilamidnih gelova koji su bili u rasponu koncentracija od 8 do 16%, zavisno od analiziranog proteina i primenjenih uslova (redukujući/neredukujući). Elektroforeza pod redukujućim uslovima urađena je dodatkom β-merkaptotetanolu u pufer za pripremu uzoraka. Adukti BSA sa PCB-om su analizirani i nativnom elektroforezom, koja je urađena bez SDS-a u poliakrilamidnom gelu i SDS-a i β-merkaptotetanolu u puferu za uzorke. Formiranje kovalentnih adukata između BSA modifikovanog Trautovim reagensom i PCB-a praćeno je nakon desetominutnog inkubiranja gela u 1 M rastvoru ZnSO₄. Fluorescencija koja potiče od PCB-Zn²⁺ kompleksa je detektovana nakon stavljanja gela pod UV svetlost. Gelovi bojeni cinkom su nakon toga bojeni Coomassie Brilliant Blue R-250 bojom. Formiranje kovalentnih adukata IgG antitela i ALA, tiolovanih Trautovim reagensom, sa PCB-om praćeno je fluorescentnim skeniranjem na fluorescentnom skeneru gelova (Typhoon FLA 7000, GE Healthcare, Čikago, Illinois, SAD). Talasna dužina ekscitacije bila je 532 nm, a emisija je praćena na 580 nm.

3.3.7. CD spektroskopija BSA modifikovanog fikocijanobilinom

CD spektri u dalekoj UV oblasti tiolovanih uzoraka BSA modifikovanih PCB-om (6 µM svaki) snimljeni su u spektralnoj oblasti 185-260 nm. Spektri su snimljeni u termostatisanim uslovima (25 °C), pri brzini od 50 nm/min, u kvarcnoj kiveti optičkog puta 0,01 cm. Podaci su prikupljeni u intervalu od 0,1 nm. Dobijeni spektri predstavljaju srednju vrednost tri akumulacije. Spektri pufera oduzeti su od odgovarajućih proteinskih spektara.

3.3.8. Vezivanje kvercetina za BSA kovalentno modifikovan fikocijanobilinom

Vezivanje kvercetina za nemodifikovan BSA i BSA kovalentno modifikovan PCB-om ispitano je spektrofotometrijski, titrovanjem rastvora proteina rastvorom kvercetina. Rastvor BSA koncentracije 0,5 µM, pripremljen u 20 mM natrijum-fosfatnom puferu, pH vrednosti 7,2, titrovan je alikvotima rastvora kvercetina, tako da finalne koncentracije kvercetina u reakcionoj smeši budu u opsegu od 0-12 µM, nakon čega su snimani fluorescentni emisijski spektri. Promena emisije praćena je jedan minut nakon dodavanja svakog alikvota liganda u rastvor proteina. Talasna dužina ekscitacije bila je 280 nm, a emisija je praćena u opsegu od 290-420 nm. Širina ekscitacionog i emisijonog proreza iznosila je 5 nm, a spektri su snimani pri konstantnoj temperaturi od 25 °C. Fluorescentni spektri kvercetina u puferu snimljeni su pod istim uslovima i vrednosti intenziteta fluorescencije kvercetina oduzete su od odgovarajućih vrednosti intenziteta fluorescencije uzoraka,

kako bi se korigovala pozadinska emisija koja potiče od samog kvercetina. Intenziteti fluorescencije proteina u odsustvu i u prisustvu rastućih koncentracija kvercetina iskorišćeni su za određivanje konstante vezivanja kvercetina za BSA i BSA-PCB. Imajući u vidu da kvercetin značajno apsorbira svetlost na talasnim dužinama ekscitacije i emisije, odnosno da je prisutan efekat unutrašnjeg filtera, izmereni intenziteti fluorescencije su korigovani za apsorpciju ekscitacione (primarni efekat unutrašnjeg filtera) i reapsorpciju emitovane svetlosti (sekundarni efekat unutrašnjeg filtera).

Korigovani intenzitet fluorescencije (F_c) dobijen je iz sledeće jednačine:

$$F_c = F_0 10^{\frac{A_{ex} + A_{em}}{2}} \quad (11),$$

gde je F_0 izmereni intenzitet fluorescencije, a A_{ex} i A_{em} apsorpcije kvercetina na talasnim dužinama ekscitacije (280 nm) i maksimuma emisije (340 nm), redom.

Konstanta vezivanja kvercetina za BSA/BSA-PCB određena je korišćenjem sledeće jednačine (Bi et al., 2004):

$$\log \frac{F_0 - F}{F} = -n \log \frac{1}{[L] - [P] \frac{F_0 - F}{F_0}} + n \log K_a \quad (12),$$

gde su F_0 i F emisijski signali BSA u odsustvu i prisustvu liganda (kvercetina), redom, $[P]$ i $[L]$ ukupne koncentracije proteina (BSA/BSA-PCB) i kvercetina, redom, K_a je konstanta vezivanja, a n broj vezivnih mesta.

3.3.9. Antioksidativna aktivnost BSA i BSA kovalentno modifikovanog fikocijanobilinom

Antioksidativna aktivnost BSA i BSA-PCB konjugata određena je korišćenjem spektrofluorimetrijskog ORAC testa, koji je prethodno opisan u **Odeljku 3.2.11.2.** za BLG/BLG-PCB. Koncentracije BSA i BSA-PCB iznosile su 4 μ M. Širine proreza na ekscitacionom i emisijom monohromatoru bile su 3 nm. Fluorescencija je merena na svakih 20 sekundi tokom 30 minuta. Krive zavisnosti intenziteta fluorescencije od vremena su upotrebljene za izračunavanje površine ispod krive zavisnosti intenziteta fluorescencije od vremena izlaganja AAPH-u (PIK) oba uzorka. Relativne ORAC vrednosti uzoraka, izražene u arbitrarnim jedinicama, dobijene su oduzimanjem PIK vrednosti pufera od PIK vrednosti uzoraka.

3.3.10. Oksidacija BSA i BSA-PCB konjugata slobodnim radikalima

Oksidacija BSA i BSA-PCB konjugata slobodnim radikalima rađena je na način sličan onom koji je prethodno opisan za oksidaciju BLG-a i BLG-PCB-a (**Odeljak 3.2.11.1.**), sa određenim razlikama. Naime, finalna koncentracija BSA i BSA-TR-PCB-a bila je 0,5 μ M, a finalna koncentracija AAPH-a 25 mM. Emisija je praćena na talasnoj dužini od 340 nm.

Zaštitni efekat (ZE) PCB-a prema oksidaciji BSA izazvanoj slobodnim radikalima je izračunat prema sledećoj formuli:

$$ZE = \frac{PIK_{BSA-PCB} - PIK_{BSA}}{PIK_{BSA-PCB}} \times 100\% \quad (13),$$

gde ZE predstavlja zaštitni efekat pigmenta, a PIK površinu ispod krive zavisnosti intenziteta fluorescencije od vremena izlaganja AAPH-u za navedene uzorke.

3.3.11. Imunološke osobine sekundarnih kozjih anti-zečjih antitela obeleženih fikocijanobilinom

3.3.11.1. Dot blot za proveru specifičnosti prepoznavanja antigena od strane fikocijanobilinom modifikovanih sekundarnih antitela

Na suhu nitroceluloznu membranu veličine pora 0,2 μ M (Bio-Rad, Herkules, Kalifornija, SAD) naneto je po 4 μ l komercijalnog preparata prirodnog tropomiozina poreklom iz škampa koncentracije 40 ng/ μ l (Indoor Biotechnologies, Šarlotsvil, Virdžinija, SAD). Mesta za nespecifično vezivanje blokirana su jednočasovnim inkubiranjem membrane u 1% rastvoru BSA u tTBS-u na sobnoj temperaturi. Nakon blokiranja, membrana je inkubirana sa primarnim zečjim anti-tropomiozin antitelima (Indoor Biotechnologies, Šarlotsvil, Virdžinija, SAD), razblaženim 10 000 puta rastvorom 0,2% BSA u tTBS-u. Inkubacija je trajala preko noći (12 sati) na 4 °C uz lagano mešanje. Narednog dana, membrana je isprana 5 puta tTBS-om, nakon čega je inkubirana 1 čas na sobnoj temperaturi sa sekundarnim kozjim anti-zečjim IgG antitelima konjugovanim sa PCB-om, razblaženim 500 ili 1000 puta. Nakon inkubacije sa sekundarnim antitelom, membrana je isprana 5 puta po 5 min tTBS-om, a zatim inkubirana tokom 1 časa na sobnoj temperaturi sa tercijarnim magarećim anti-kozjim IgG antitelom koje je obeleženo alkalnom fosfatazom (Jackson ImmunoResearch, West Grove, Pensilvanija, SAD) razblaženim 10000 puta rastvorom 0,2% BSA u tTBS-u. Pripremljena je i kontrola nespecifičnog vezivanja sekundarnih i tercijarnih antitela, izostavljanjem koraka inkubacije sa primarnim antitelima, dok su svi ostali koraci bili identični. Nakon inkubacije sa tercijarnim antitelom, membrana je isprana 3 puta po 5 min tTBS-om, zatim 2 puta po 5 min TBS-om, nakon čega je inkubirana u rastvoru supstrata (1,5 mg BCIP-a i 3 mg NBT-a u 10 ml 100 mM karbonatno-bikarbonatnog pufera koji sadrži 5 mM $MgCl_2$, pH=9,5). Nastao je nerastvoran ljubičast talog na mestima gde postoji fosfatazna aktivnost. Reakcija je zaustavljena ispiranjem membrana destilovanom vodom.

3.3.11.2. Dot blot za proveru osetljivosti prepoznavanja antigena od strane fikocijanobilinom modifikovanih sekundarnih antitela

Na suhu nitroceluloznu membranu veličine pora 0,2 μ M (Bio-Rad, Herkules, Kalifornija, SAD) naneto je po 4 μ l tropomiozina poreklom iz škampa koncentracije 40 ng/ μ l (Indoor Biotechnologies, Šarlotsvil, Virdžinija, SAD). Mesta za nespecifično vezivanje blokirana su jednočasovnim inkubiranjem membrane u 1% rastvoru BSA u tTBS-u na sobnoj temperaturi. Nakon blokiranja, membrana je inkubirana sa primarnim zečjim anti-tropomiozin antitelima, razblaženim 10 000 puta rastvorom 0,2% BSA u tTBS-u. Inkubacija je trajala preko noći (12 sati) na 4 °C uz lagano mešanje. Narednog dana, membrana je isprana 5 puta tTBS-om, nakon čega je na sobnoj temperaturi inkubirana 1 čas sa sekundarnim kozjim anti-zečjim antitelima obeleženim fikocijanobilinom, razblaženim 500 ili 1000 puta. Nakon inkubacije sa sekundarnim antitelom, membrana je ispirana 5 puta po 5 min tTBS-om. Pripremljena je i kontrola sekundarnog antitela, inkubiranjem membrane u rastvoru za blokiranje, umesto sa primarnim antitelima, dok su svi ostali koraci bili identični.

Kao kontrola osetljivosti fluorescentne detekcije, pripremljena je i membrana na koju je direktno naneto serijsko četvorostruko razblaženje sekundarnih kozjih anti-zečjih antitela obeleženih fikocijanobilinom, počev od nerazblaženog antitela koncentracije 0,8 mg/ml. Na membranu je nanet po jedan mikrolitar svakog razblaženja antitela.

Membrane su snimane na fluorescentnom skeneru gelova. Talasna dužina ekscitacije bila je 532 nm, a emisija je praćena na 580 nm.

3.4. Obrada dobijenih rezultata

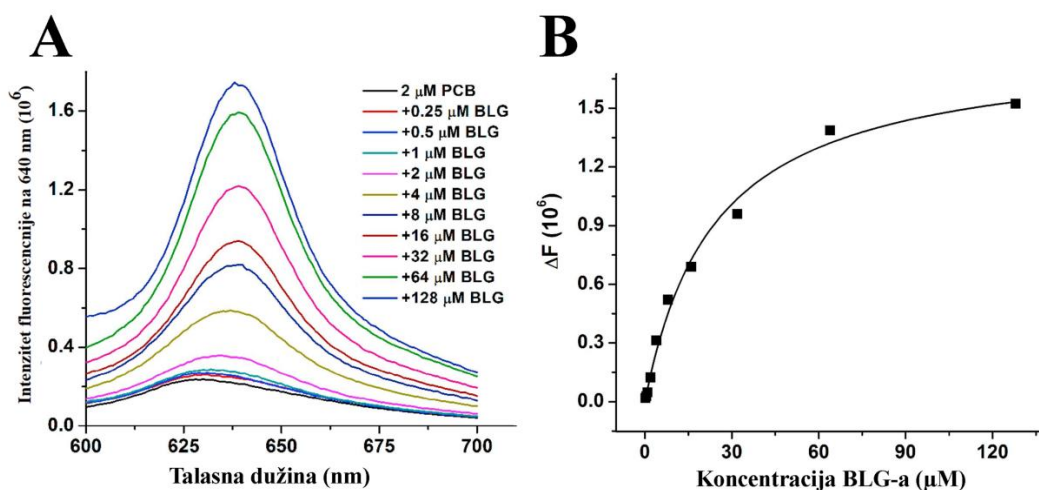
Eksperimentalni podaci su analizirani pomoću OriginPro softvera (verzija 8) za Windows (OriginLab Corporation, SAD). Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost $\pm$ standardna devijacija. Statistička obrada rezultata rađena je korišćenjem studentskog t-testa ili jednofaktorske analize varijansi (ANOVA) na nivou značajnosti od 0,05.

4. Rezultati

4.1. Kovalentna modifikacija β -laktoglobulina fikocijanobilinom

4.1.1. Dodatak BLG-a povećava fluorescenciju PCB-a

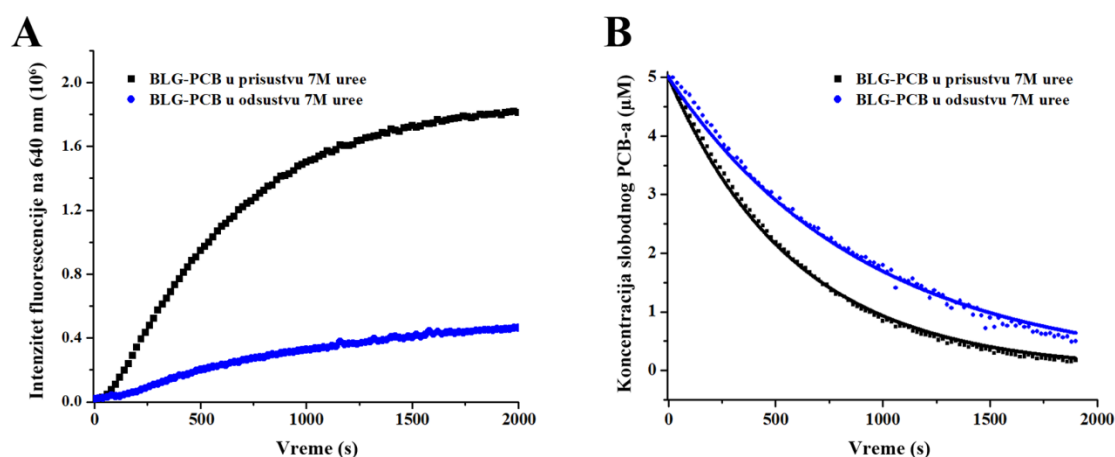
Slobodan, nevezani, PCB pri ekscitaciji od 580 nm pokazuje maksimum emisije na 630 nm (Slika 25A). Dvočasovnim inkubiranjem rastućih koncentracija BLG-a sa PCB-om na 37 °C, u 20 mM natrijum-fosfatnom puferu pH 7,2, indukuje se značajno povećanje fluorescencije PCB-a na dozno-zavistan način, uz promenu emisionog maksimuma ka većim talasnim dužinama (640 nm). Prema tome, čini se da vezivanje PCB-a za BLG dovodi do značajnih promena u fluorescentnom spektru liganda. Kako kovalentno vezana hromofora u nativnom C-PC-u ima veću fluorescenciju od slobodne hromofore, značajno povećanje fluorescencije PCB-a po dodatku BLG-a ukazuje na vezivanje pigmenta za protein. Povećanje fluorescencije PCB-a iskorišćeno je za računanje približne konstante vezivanja PCB-a za BLG, korišćenjem jednačine 1. Iz dobijene krive vezivanja (Slika 25B) određena je približna konstanta vezivanja, koja iznosi $4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$.



Slika 25. (A) Emisioni spektar PCB-a u 20 mM natrijum-fosfatnom puferu pH 7,2 u odsustvu i prisustvu različitih koncentracija BLG-a (ekscitacija na 580 nm); (B) Zavisnost BLG-om indukovano povećanja fluorescencije PCB-a od koncentracije BLG-a.

4.1.2. Kinetika formiranja BLG–PCB adukta

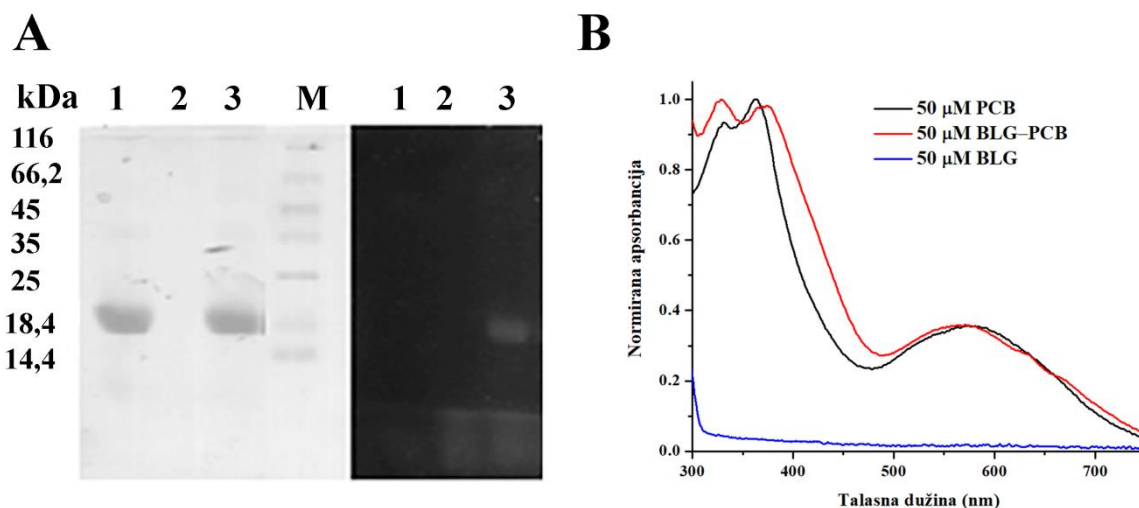
Kako bi se dobio uvid u kinetiku vezivanja pigmenta za protein, povećanje fluorescencije PCB-a nakon mešanja sa BLG-om praćeno je tokom vremena. Vezivanje PCB-a za BLG odvija se sporo i dostiže zasićenje nakon 1000 sekundi (Slika 26A). Kinetika formiranja BLG–PCB adukta je takođe praćena i u 20 mM natrijum-fosfatnom puferu pH 7,2 sa dodatkom 7 M uree, kako bi se ispitalo da li se formiranje BLG–PCB adukta odvija brže pod uslovima koji favorizuju razvijanje, tj. denaturaciju proteina. Kao što se može primetiti na Slici 26A, vezivanje pigmenta je brže u prisustvu 7 M uree, pri čemu je istovremeno intenzitet fluorescencije BLG–PCB kompleksa u prisustvu uree značajno veći nego bez prisustva uree, što ukazuje na veći prinos formiranja BLG–PCB kompleksa i/ili veći fluorescentni kvantni prinos hromofore u urei. Dobijeni rezultati ubačeni su u eksponencijalnu jednačinu prvog reda (Slika 26B) i određene su približne konstante brzine reakcija, koje iznose $0,065 \text{ min}^{-1}$ za reakciju bez prisustva uree i $0,101 \text{ min}^{-1}$ za reakciju u prisustvu 7 M uree. Premda slobodan PCB *per se* ima veću fluorescenciju u prisustvu uree, čak i oduzimanjem fluorescencije slobodnog PCB-a od fluorescencije adukta dobija se veći intenzitet fluorescencije adukta u prisustvu uree, u poređenju sa fluorescencijom adukta bez njenog prisustva (Slika 26A), potvrđujući veći prinos formiranja BLG–PCB adukta u prisustvu uree.



Slika 26. (A) Kinetika formiranja BLG–PCB adukta u 20 mM natrijum-fosfatnom puferu pH 7,2 u odsustvu i prisustvu 7 M uree, praćena povećanjem fluorescencije PCB-a nakon dodavanja BLG-a (ekscitacija na 580 nm); (B) Promena koncentracije slobodnog PCB-a tokom vremena ubačena je u eksponencijalnu jednačinu prvog reda.

4.1.3. PCB se kovalentno vezuje za BLG preko ostatka cisteina

Mogućnost kovalentnog vezivanja PCB-a za BLG ispitana je elektroforetskom analizom BLG–PCB reakcione smeše, pripremljene u 20 mM natrijum-fosfatnom puferu pH 7,2, pod neredukujućim uslovima. Za detekciju kovalentnog BLG–PCB adukta iskorišćena je osobina PCB-a da kompleksira jone Zn^{2+} i gradi fluorescentne proizvode koji se mogu uočiti posmatranjem gela pod svetlošću UV lampe (Berkelman i Lagarias, 1986). Naime, nakon elektroforeze BLG–PCB smeše i bojenja poliakrilamidnog gela najpre cinkom, a zatim CBB-om, detektovana je fluorescencija u gelu koja po položaju odgovara traci BLG monomera (18,4 kDa) (**Slika 27A**). Očuvanje BLG–PCB kompleksa nakon SDS-PAGE ukazuje na formiranje kovalentne veze između monomernog proteina i PCB-a.

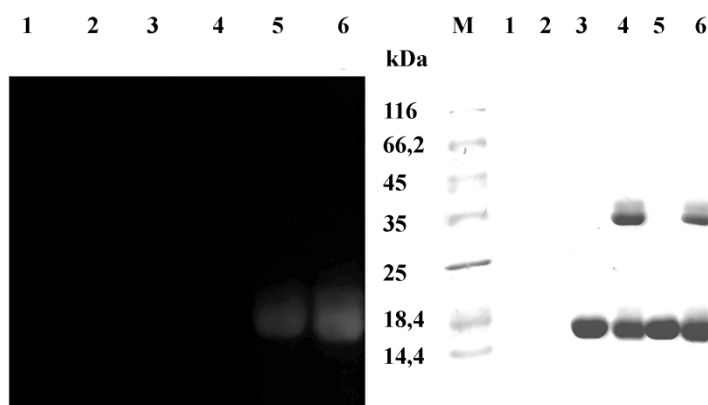


Slika 27. (A) SDS-PAGE analiza (16% poliakrilamidni gel, neredukujući uslovi) (1) slobodnog BLG-a, (2) slobodnog PCB-a (3) BLG–PCB kompleksa pripremljenog u 20 mM natrijum-fosfatnom puferu pH 7,2. Levo: CBB bojenje; Desno: bojenje 1 M cink-sulfatom; (B) UV/VIS apsorpcioni spektri dijalizovanog BLG–PCB kompleksa, slobodnog BLG-a i slobodnog PCB-a.

Kao dodatna potvrda kovalentnog vezivanja PCB-a poslužili su UV/VIS apsorpcioni spektri dijalizovanog BLG–PCB adukta. Naime, UV/VIS spektar slobodnog PCB-a (**Slika 27B**) pokazuje apsorpcione maksimume na talasnim dužinama 330, 363 i 575 nm, pri čemu maksimumi na 330 i 570 nm potiču od oksidacionih proizvoda pigmenta (Bhat i Madyastha, 2001) koji su nastali tokom 48-časovnog inkubiranja u puferu. Interesantno, UV/VIS spektar dijalizovanog BLG–PCB adukta je sličan slobodnom PCB-u, sa tri apsorpciona maksimuma: jednim na 330 nm, jednim sa blagim

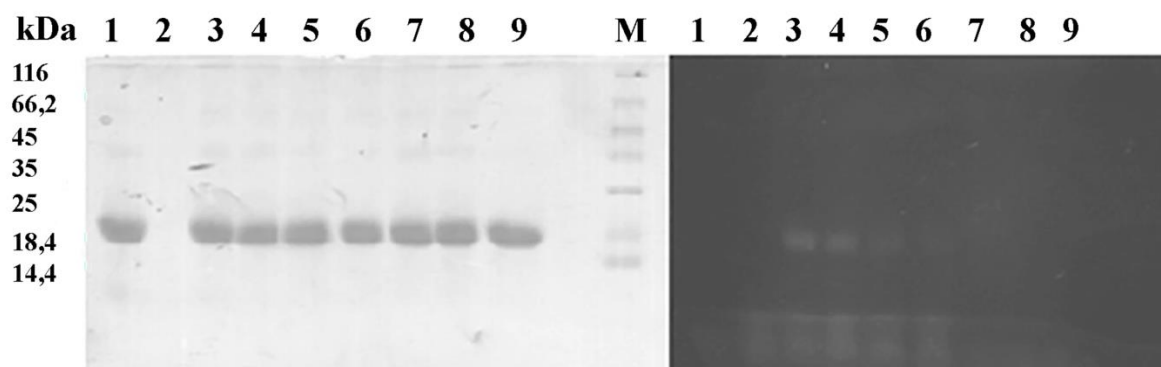
crvenim pomerajem (u odnosu na slobodan PCB) koji je na talasnoj dužini od 375 nm i trećim, koji pokazuje blagi plavi pomeraj, na talasnoj dužini od 570 nm (**Slika 27B**). Dobijeni rezultati predstavljaju dodatnu potvrdu kovalentne modifikacije BLG-a PCB-om.

Veći prinos BLG–PCB adukta u uslovima denaturacije proteina 7 M ureom, osim fluorescentnom spektroskopijom, dodatno je potvrđen elektroforetskom analizom BLG–PCB reakcione smeše koja je pripremljena u prisustvu 7 M uree. Naime, SDS-PAGE analiza tako pripremljenog adukta pokazuje veći intenzitet fluorescencije u poređenju sa aduktom pripremljenim bez prisustva uree (**Slika 28**). Mada inkubacija BLG-a u prisustvu uree čini slobodne sulfhidrilne grupe izloženijim i time dostupnijim za formiranje disulfidnih dimera, dodavanje PCB-a smanjuje intenzitet trake koja potiče od BLG dimera, ukazujući na to da slobodni ostaci cisteina mogu biti uključeni u vezivanje PCB-a. Štaviše, fluorescentna detekcija u gelu pokazuje da je samo monomerna forma BLG-a, koja ima slobodan ostatak cisteina, kovalentno vezana za ligand (**Slika 28**).



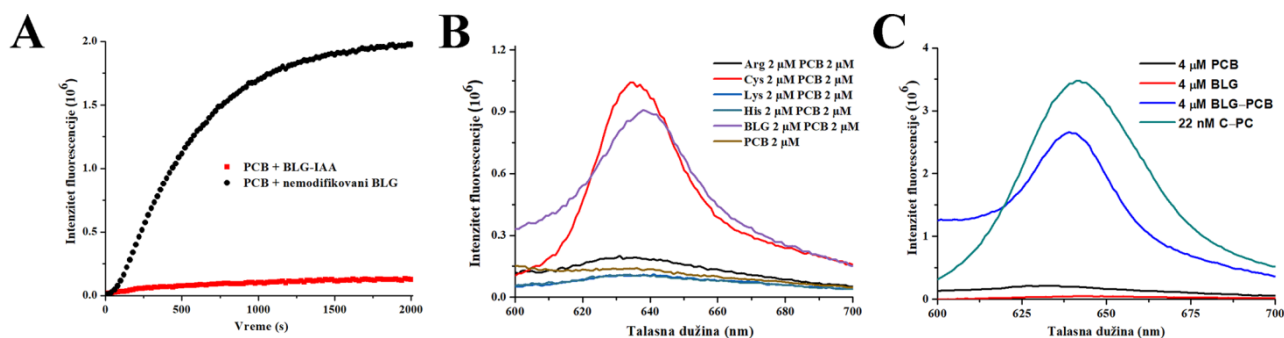
Slika 28. (A) SDS-PAGE analiza (16% poliakrilamidni gel, neredukujući uslovi) slobodnog PCB-a, slobodnog BLG-a i BLG–PCB kompleksa pripremljenog u 20 mM natrijum-fosfatnom puferu pH 7,2 u odustvu (1, 3, 5, redom) i u prisustvu 7 M uree (2, 4, 6, redom). Levo: bojenje 1 M cink-sulfatom; Desno: CBB bojenje.

Kako bi se potvrdilo da se reakcija modifikacije PCB-om zaista odvija preko ostataka cisteina, najpre je analizirano formiranje kovalentnog BLG–PCB adukta nakon prethodnog blokiranja slobodnih ostataka cisteina proteina alkilovanjem jodacetamidom. Blokiranje ostataka cisteina BLG-a jodacetamidom je uistinu inhibiralo reakciju formiranja BLG–PCB adukta, pri čemu rastuća koncentracija jodacetamida dovodi do veće inhibicije formiranja adukta, odnosno manjeg intenziteta fluorescentnog signala na gelu (**Slika 29**).



Slika 29. Inhibicija vezivanja PCB-a za BLG prisustvom jodacetamida (SDS-PAGE, 16% poliakrilamidni gel, neredukujući uslovi): 1) 20 μ M BLG, 2) 20 μ M PCB, 3) BLG:PCB (po 20 μ M svaki), 4) BLG:PCB (po 20 μ M svaki) + 20 μ M IAA, 5) BLG:PCB (po 20 μ M svaki) + 200 μ M IAA, 6) BLG:PCB (po 20 μ M svaki) + 2 mM IAA, 7) 20 μ M BLG + 20 μ M IAA, 8) 20 μ M BLG + 200 μ M IAA, 9) 20 μ M BLG + 2 mM IAA. Levo: CBB bojenje; desno: bojenje cink-sulfatom, uz posmatranje gela pod UV lampom.

Kao dodatna potvrda modifikacije BLG-a preko ostataka cisteina poslužio je poređenje kinetike reakcije modifikacije PCB-om nemodifikovanog BLG-a i onog koji je prethodno modifikovan jodacetamidom. Naime, kao što se na **Slici 30A** može uočiti, inkubacijom alkilovanog BLG-a sa fikocijanobilinom dolazi do neznatnog povećanja fluorescencije PCB-a, u poređenju sa nemodifikovanim proteinom. Istovremeno, snimljeni su i fluorescentni spektri PCB-a inkubiranog sa aminokiselinama čiji su bočni ostaci nukleofilni (cistein, lizin, arginin i histidin). Fluorescentni spektar PCB-a inkubiranog sa cisteinom sličan je spektru BLG–PCB adukta (**Slika 30B**). Osim toga, fluorescentni spektar dijalizovanog BLG–PCB adukta, koji pokazuje maksimum emisije na 639 nm, sličan je spektru nativnog C-fikocijanina, čiji maksimum emisije je na 642 nm (**Slika 30C**).

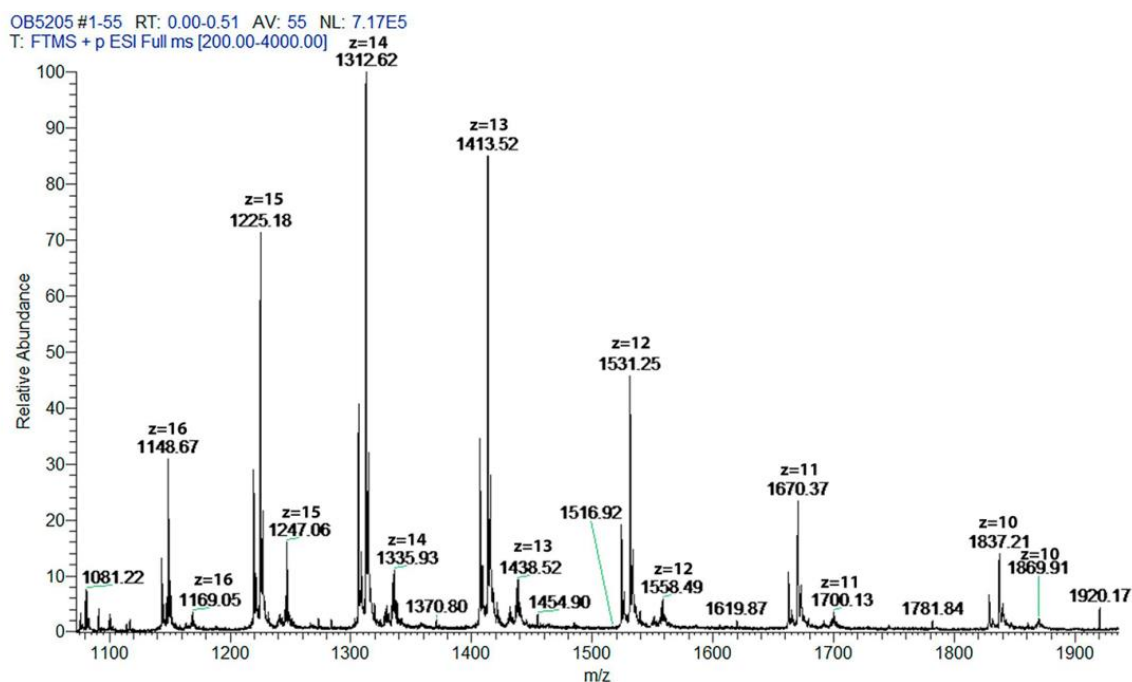


Slika 30. (A) Efekat prethodnog alkilovanja slobodnog ostatka cisteina BLG-a jodacetamidom na kinetiku formiranja BLG–PCB adukta u prisustvu 7 M uree; (B) Emisioni spektri PCB-a u odsustvu i prisustvu BLG-a i aminokiselina; (C) Emisioni spektri dijalizovanog BLG–PCB adukta i nativnog C-fikocijanina pri ekscitaciji na 580 nm.

Kako bi se dobio veći prinos reakcije modifikacije BLG-a PCB-om, rastvor proteina je obogaćen PCB-om sukcesivnim dodavanjem svežeg štoka pigmenta (za detalje pripreme adukta videti **Odeljak 3.2.5.**). Dva različita eseja su iskorišćena za kvantifikaciju prinosa formiranja BLG–PCB adukta i oba su dala slične rezultate za procenu prinosa reakcije. Naime, prema Elmanovom eseju, kojim je određena promena u sadržaju slobodnih ostataka cisteina pre i nakon reakcije modifikacije BLG-a PCB-om, prinos reakcije modifikacije BLG-a je procenjen na $72 \pm 1\%$. Drugi pristup se zasniva na određivanju sadržaja hromofore u pepsinskom digestu BLG–PCB adukta. Sadržaj hromofore određen je korišćenjem pepsinskog digesta C-fikocijanina kao standarda (Minic et al., 2016). Ovim pristupom, kvantifikacijom sadržaja PCB-a u BLG–PCB-u, procenjeno je da je prinos reakcije $71 \pm 6\%$. Tako dobijen preparat sa većim prinosom BLG–PCB adukta dalje je okarakterisan.

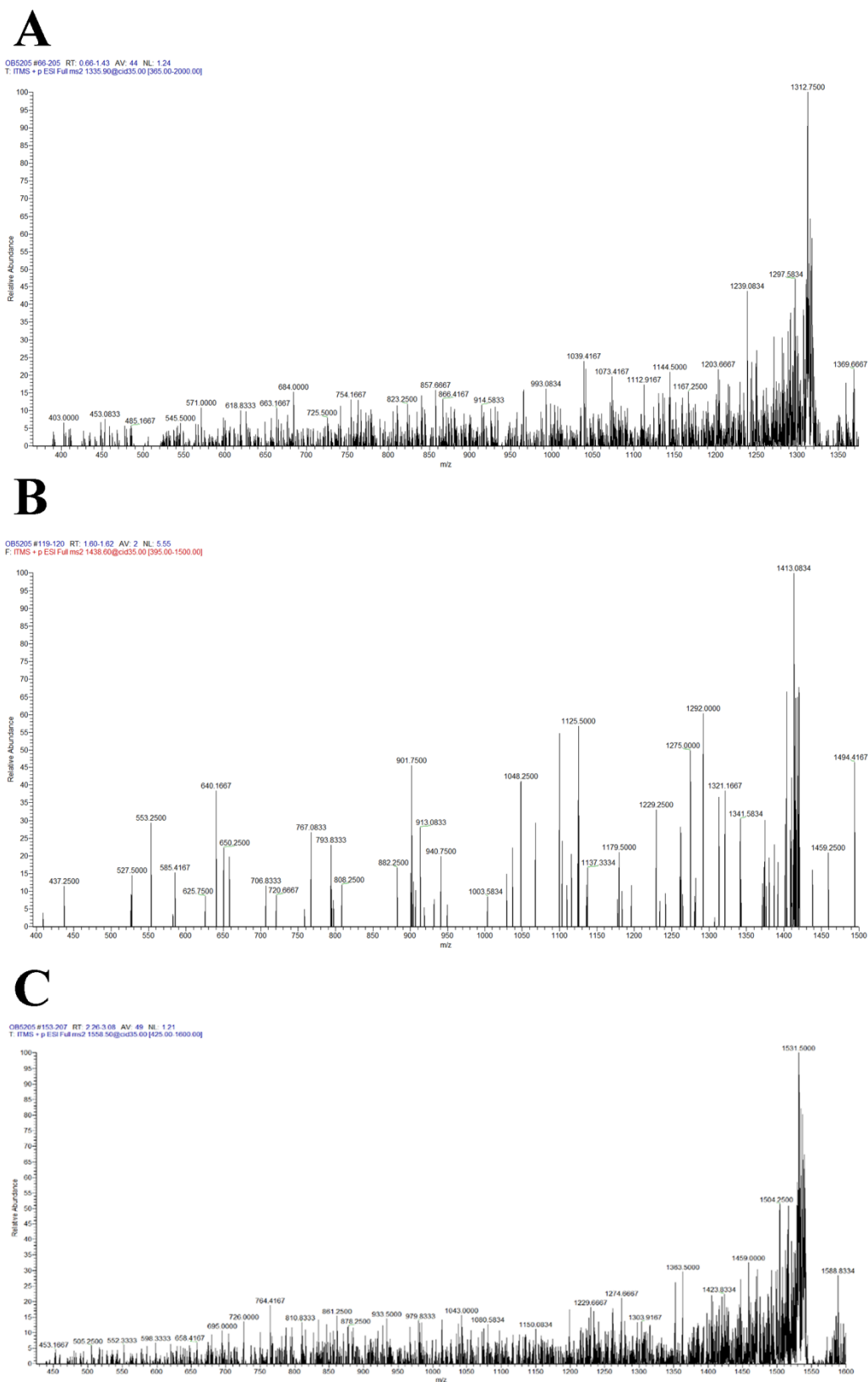
4.1.4. Masena spektrometrija BLG–PCB adukta

U cilju karakterizacije dobijenog BLG–PCB adukta, adukt je analiziran visokorezolutivnom masenom spektrometrijom (MS), koja predstavlja izuzetno osetljivu analitičku tehniku za merenje odnosa mase i naelektrisanja jona. Na **Slici 31** prikazan je dobijeni MS spektar, na kom se, pored signala nemodifikovanih A i B izoformi BLG-a, na svim naelektrisanjima, na nešto većem m/z odnosu, uočavaju i signali koji odgovaraju kovalentnim aduktima obe izoforme, što ukazuje na to da se i jedna i druga izoforma modifikuju u sličnom obimu.



Slika 31. Maseni spektar 20 μ M BLG-a inkubiranog sa 20 μ M PCB-om tokom 2 h na 37 °C u 20 mM fosfatnom puferu, pH 7,2.

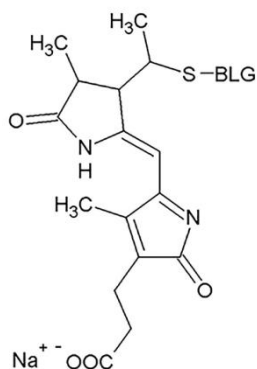
MS/MS spektri jona čiji su m/z odnosi 1335,90 (z=14), 1438,50 (z=13) i 1558,50 (z=12) (**Slike 32A, 32B, 32C**) pokazuju da se njihovom fragmentacijom dobijaju joni čiji su m/z odnosi isti kao m/z joni nemodifikovane izoforme B BLG-a. Ovo je potvrda da navedeni joni odgovaraju aduktima BLG-a. Razlika u masi adukta BLG-PCB i nemodifikovanog BLG-a je 325 Da (**Tabela 3**), manja od mase intaktnog PCB-a, što ukazuje na to da analizirani BLG-PCB adukt sadrži samo dva pirola, najverovatnije usled oksidacije i fragmentacije PCB-a na centralnom metilenskom mostu. Predložena struktura oksidacionog proizvoda PCB-a slična je propentdiopentima, oksidovanim metabolitima bilirubina (Kunikata et al., 2000), i prikazana je na **Slici 33**.



Slika 32. MS² spektri dobijeni fragmentacijom molekulskih jona čiji je m/z odnos **(A)** 1335,90 ($z=14$), **(B)** 1438,60 ($z=13$) i **(C)** 1558,50 ($z=12$) iz MS spektra BLG inkubiranog u prisustvu PCB-a tokom 2 časa na 37 °C u 20 mM fosfatnom puferu, pH 7,2.

Tabela 3. Mase dobijene iz MS spektra BLG-a inkubiranog u prisustvu prisustvu PCB-a tokom 2 časa na 37 °C u 20 mM fosfatnom puferu, pH 7,2. BLG A – izoforma A β-laktoglobulina, BLG B – izoforma B β-laktoglobulina, BLG A–PCB – kovalentni adukt izoforme A i oksidacionog proizvoda PCB-a, BLG B–PCB – kovalentni adukt izoforme B i oksidacionog proizvoda PCB-a.

Uzorak	m/z	z	masa	Δ m (BLG–PCB – BLG)
BLG A	2031,800	9	18277,20	325,403
BLG A–PCB	2067,956	9	18602,60	
BLG B	2041,276	9	18362,48	324,482
BLG B–PCB	2077,33	9	18686,97	
BLG A	1828,658	10	18276,58	323,483
BLG A–PCB	1861,006	10	18600,06	
BLG B	1837,217	10	18362,17	326,263
BLG B–PCB	1869,843	10	18688,43	
BLG A	1662,516	11	18276,67	325,4559
BLG A–PCB	1692,102	11	18602,13	
BLG B	1670,394	11	18363,34	324,1271
BLG B–PCB	1699,860	11	18687,46	
BLG A	1524,033	12	18276,40	326,2368
BLG A:PCB	1551,220	12	18602,63	
BLG B	1531,252	12	18363,02	326,7768
BLG B–PCB	1558,483	12	18689,80	
BLG A	1406,843	13	18275,95	326,56
BLG A–PCB	1431,963	13	18602,51	
BLG B	1413,519	13	18362,74	325,1313
BLG B–PCB	1438,529	13	18687,88	
BLG A	1306,476	14	18276,66	326,0096
BLG A–PCB	1329,762	14	18602,67	
BLG B	1312,621	14	18362,69	326,1776
BLG B–PCB	1335,919	14	18688,87	
BLG A	1219,511	15	18277,66	326,136
BLG A–PCB	1241,253	15	18603,80	
BLG B	1225,179	15	18362,69	328,1595
BLG B–PCB	1247,057	15	18690,85	
BLG A	1143,292	16	18276,68	326,192
BLG A–PCB	1163,679	16	18602,87	
BLG B	1148,67	16	18362,72	326,1216
BLG B–PCB	1169,053	16	18688,84	

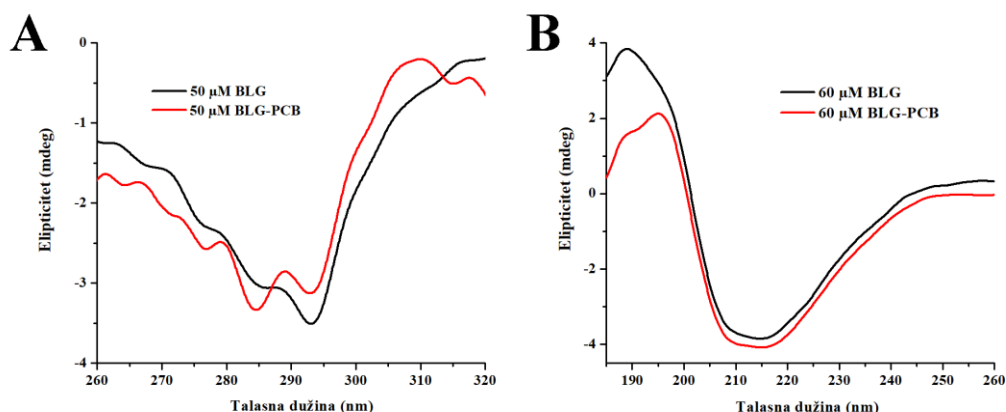


Slika 33. Predložena struktura kovalentnog adukta BLG-a i oksidacionog proizvoda PCB-a nakon masene spektrometrije.

4.1.5. Vezivanje PCB-a utiče na sekundarnu i tercijarnu strukturu BLG-a, uz promenu konformacije PCB-a

Spektroskopija cirkularnog dihiroizma (CD spektroskopija) se koristi za proučavanje brojnih hirlnih molekula, ali svoju najveću primenu je našla u analizi sekundarnih struktura i konformacija makromolekula, posebno proteina, čija je sekundarna struktura osetljiva na promene u temperaturi, pH vrednosti, kao i promene mikrokruženja nastale kao posledica interakcija proteina sa drugim molekulima. Kako bi se procenio uticaj kovalentne modifikacije PCB-om na sekundarnu i tercijarnu strukturu BLG-a, snimljeni su CD spektri dijalizovanog BLG–PCB adukta u bliskoj i dalekoj UV oblasti i upoređeni sa nemodifikovanim proteinom. Glavne hromofore proteina u bliskoj UV oblasti su aminokiseline fenilalanin, tirozin i triptofan, dok je to u dalekoj UV oblasti peptidna veza.

CD spektar BLG-a u bliskoj UV oblasti ima dve karakteristične trake, sa maksimumima na 285 i 293 nm, obe poreklom od ostataka triptofana. S druge strane, u CD spektru BLG–PCB adukta, maksimum na 285 nm postaje mnogo izraženiji, odnosno većeg intenziteta, dok se intenzitet trake na 293 nm smanjuje, u poređenju sa nemodifikovanim proteinom (**Slika 34A**). Promene oblika i amplitude CD spektra u bliskoj UV oblasti ukazuju na to da modifikacija PCB-om dovodi do značajnih promena tercijarne strukture BLG-a.

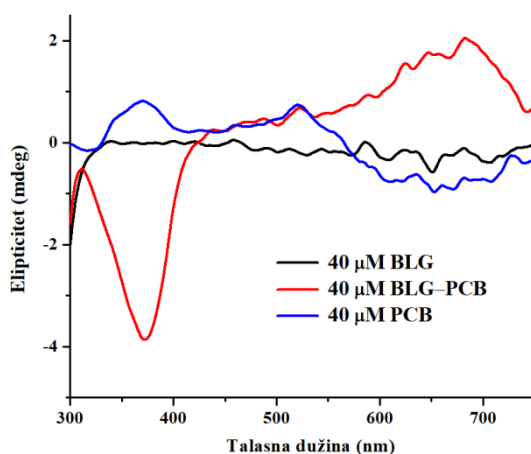


Slika 34. (A) CD spektri u bliskoj i (B) dalekoj UV oblasti dijalizovanog BLG–PCB adukta i nemodifikovanog BLG-a.

Pored toga, analizirane su i promene sekundarnih struktura BLG-a nakon modifikacije PCB-om. CD spektar nemodifikovanog BLG-a u dalekoj UV oblasti pokazuje negativnu, široku traku, sa maksimumom na talasnoj dužini od 215 nm, usled velike zastupljenosti β -pločica u molekulu proteina, kao i usku, pozitivnu traku, na talasnoj dužini od oko 190 nm (**Slika 34B**). Modifikacija proteina PCB-om dovodi do blagog povećanja negativnog maksimuma i značajnog smanjenja

pozitivnog maksimuma. Softverskom analizom dobijenog spektra, korišćenjem CDPro softvera, pokazano je da nemodifikovani BLG sadrži 10% α -heliksa, 37% β -pločica, 22% β -zavijutaka i 30% neuređenih struktura. Kovalentna modifikacija PCB-om dovodi do diskretnog povećanja sadržaja α -heliksa na 12%, dok sadržaj β -pločica opada na 35%. Sadržaj β -zavijutaka ostao je nepromenjen, dok sadržaj neuređenih struktura zanemarljivo raste za 1%.

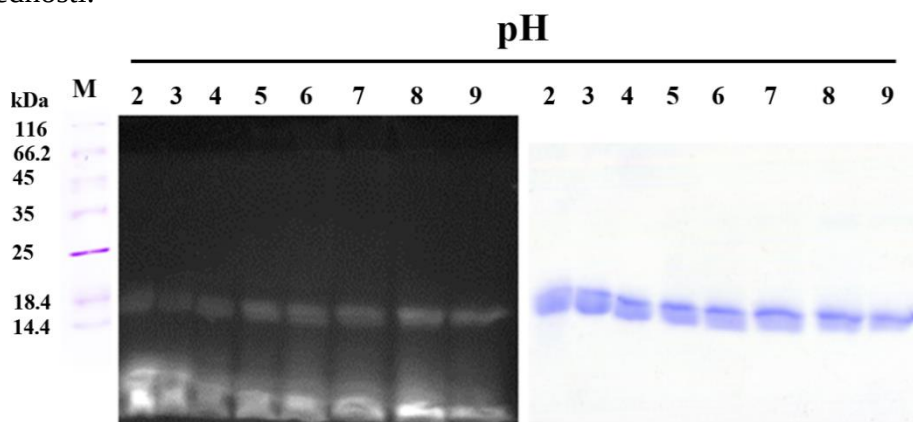
Kako bi se stekao uvid u konformacione promene PCB-a nakon vezivanja za BLG, snimljeni su i CD spektri u bliskoj UV/vidljivoj oblasti, u oblasti od 300 do 750 nm. Pošto PCB u rastvoru postoji u obliku dva konformera – P i M, njegov rastvor nije optički aktivan i ne daje signal u CD spektru. Međutim, spektar BLG–PCB kompleksa u istoj oblasti pokazuje dve trake: pozitivnu na 680 nm i negativnu na 380 nm (**Slika 35**), pokazujući pozitivan Kotonov efekat. Prema tome, vezivanje PCB-a za BLG indukuje optičku aktivnost tetrapirolnе hromofore kroz konformacione promene PCB-a, što ukazuje na to da se PCB vezuje za BLG stereospecifično.



Slika 35. Bliski UV/vidljivi CD spektri dijelizovanog BLG–PCB adukta, slobodnog BLG-a i slobodnog PCB-a (40 μ M svaki).

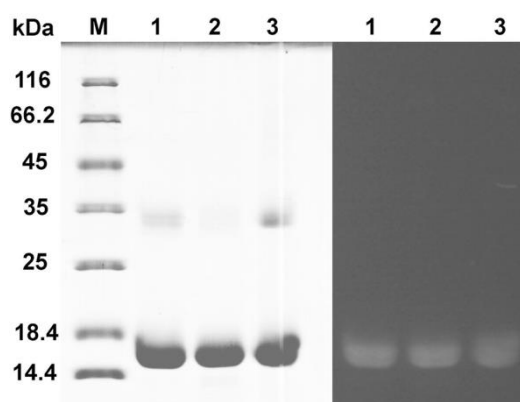
4.1.6. Uticaj pH na formiranje BLG–PCB adukta

Formiranje BLG–PCB adukta u zavisnosti od pH vrednosti rastvora analizirano je elektroforetski, nakon inkubiranja BLG-a i PCB-a u rastvorima različitih pH vrednosti. Kao što se na **Slici 36** može uočiti, sa porastom pH vrednosti rastvora, povećava se i intenzitet fluorescentne trake BLG–PCB adukta, ukazujući na to da je prinos reakcije modifikacije veći na višim pH vrednostima (pH 8 i 9). Međutim, vezivanje PCB-a odvija se i na nižim pH vrednostima (pH 2), iako u manjem obimu. Prema tome, BLG ima sposobnost da kovalentno veže PCB u širokom opsegu pH vrednosti.



Slika 36. pH zavisnost formiranja BLG–PCB adukta; SDS-PAGE (16% PAA gel, neredukujući uslovi); Levo: bojenje cink-sulfatom, uz posmatranje gela pod svetlošću UV lampe; desno: CBB bojenje istog gela.

Formiranje BLG–PCB adukta analizirano je i u uslovima koji simuliraju one prisutne u gastrointestinalnom traktu u pogledu pH vrednosti i sastava gastrointestinalnih tečnosti. Elektroforetskom analizom je uočeno da BLG–PCB adukt nastaje i u simuliranim fiziološkim uslovima, čak i nakon samo 2 min inkubacije u simuliranoj pljuvačnoj tečnosti (**Slika 37**).



Slika 37. SDS-PAGE analiza (12% poliakrilamidni gel, neredukujući uslovi) smeše BLG-a i PCB-a nakon inkubacije u simuliranim gastrointestinalnim tečnostima. 1 – simulirana pljuvačna tečnost, 2 – simulirana pljuvačna tečnost kojoj je dodata simulirana гастриčna tečnost, 3 – simulirana pljuvačna tečnost kojoj je dodata simulirana гастриčna tečnost i nakon toga simulirana intestinalna tečnost. Levo: bojenje CBB-om, desno: bojenje 1 M cink-sulfatom.

4.1.7. Molekulski doking, molekulska dinamika i dirigovana molekulska dinamika

Kako bi se odredila vezivna mesta za PCB (**Slika 38A**) na molekulu BLG-a, urađena je studija molekulskog dokinga, kojom je identifikovano jedno visokoafinitetno mesto za PCB u hidrofobnom džepu, takozvanom kaliksu, BLG-a (**Slika 38B**), stabilizovano hidrofobnim interakcijama i vodoničnim vezama. U ovoj orijentaciji, C3' atom PCB-a je suviše udaljen od tiolne grupe slobodnog ostatka Cys121 (15,35 Å) da bi formirao kovalentnu vezu (**Slika 38C**). Štaviše, na osnovu provere svih trodimenzionalnih struktura BLG-a dostupnih u PDB bazi podataka, može se zapaziti da je ostatak Cys121 zaštićen heliksom i u potpunosti orijentisan prema unutrašnjosti proteina, daleko od kaliksa, zbog čega nije dostupan za formiranje kovalentne veze ni sa PCB-om niti sa drugim ligandima.

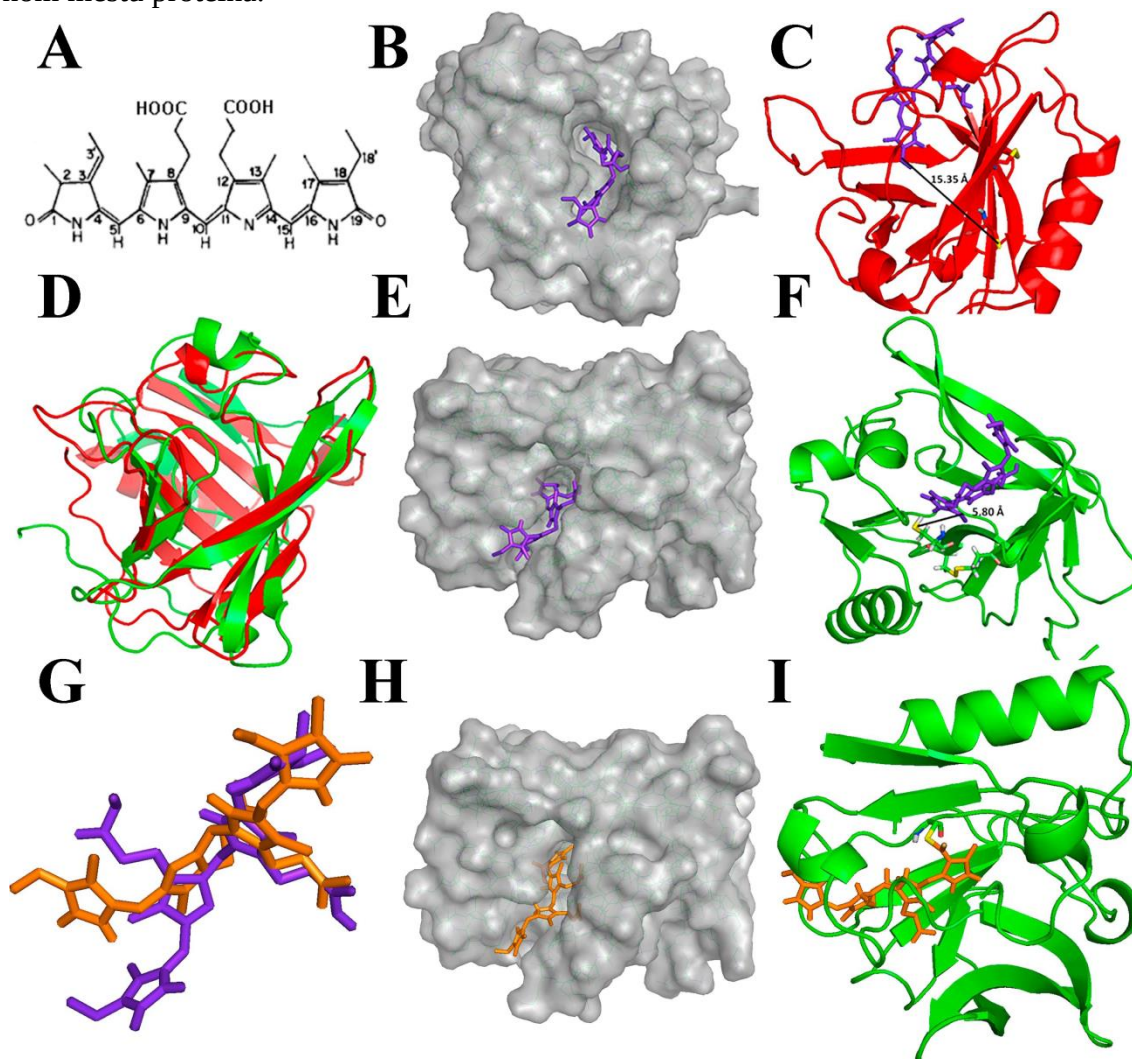
BLG je protein koji je podložan izmeni disulfida, naročito na povišenim temperaturama, pri čemu blizina atoma sumpora slobodnog Cys121 i disulfidne veze Cys106–Cys119 od 11 Å može rezultirati u intramolekulskoj izmeni disulfida između Cys121 i Cys106–Cys119, čime bi se oslobodio Cys119 (Croguennec et al., 2003). Stoga je prvo urađena simulacija izmene disulfida između Cys121 i Cys iz disulfidne veze Cys106–Cys119, nakon čega je na tako dobijenoj strukturi BLG-a urađen molekulski doking PCB-a, kako bi se *in silico* ispitalo da li postoji mogućnost formiranja kovalentnog BLG–PCB adukta preko ostatka cisteina.

Simulacija izmene disulfida u BLG-u urađena je dirigovanim molekulskom dinamikom (SMD). Disulfidna veza Cys106–Cys119 je raskinuta i nova disulfidna veza Cys106–Cys121 je uspostavljena tokom prvih 150 ns SMD simulacije. Nakon toga, rađena je SMD simulacija sistema sa slobodnim ostatkom Cys119 dodatnih 150 ns. Za vreme SMD simulacije došlo je do nekih promena u sekundarnoj strukturi BLG-a (posebno u β -nizu koji sadrži Cys119 i Cys121), ali su glavne 3D karakteristike proteina (kaliks i α -heliks) bile samo delimično izmenjene (**Slika 38D**).

Na proteinskoj strukturi koja je dobijena nakon SMD simulacije ponovo je rađen molekulski doking PCB-a. Premda se PCB i dalje preferencijalno vezuje za kaliks BLG-a (**Slika 38E**), PCB se, nakon simulacije izmene disulfida, nalazi u blizini slobodnog ostatka Cys119, koji je u novoj konformaciji proteina orijentisan prema unutrašnjosti kaliksa, odnosno bliže PCB-u (**Slika 38F**).

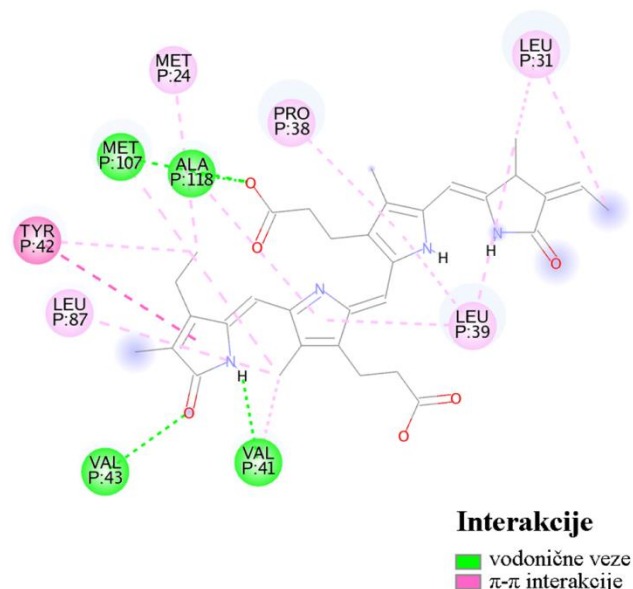
Udaljenost između atoma sumpora u Cys119 i C3' atoma etilidenske grupe PCB-a je manja nego ranije, samo 5,8 Å, ukazujući na mogućnost formiranja kovalentne veze između PCB-a i Cys119.

Kako bi se simuliralo kovalentno vezivanje PCB-a za slobodan ostatak Cys119 nakon izmene disulfida i našla najbolja orijentacija PCB-a u kaliksu BLG-a, urađen je *in silico* eksperiment kovalentnog dokinga. Kovalentna veza između atoma sumpora Cys119 i C3' atoma PCB-a indukuje male promene konformacije pigmenta, u poređenju sa PCB-om koji je nekovalentno udokovan u istu strukturu BLG-a (Slika 38G), dok je PCB i dalje pozicioniran u kaliksu (Slika 38H). Građenje kovalentne veze (Slika 38I) dovodi do velikog afiniteta PCB-a za BLG, koji je posledica dodatnih nekovalentnih interakcija PCB-a sa aminokiselinским ostacima u vezivnom mestu proteina.



Slika 38. (A) Hemijska struktura PCB-a. Molekulski doking PCB-a (obeležen ljubičastom bojom) vezanog za kaliks BLG-a (PDB broj kristalne strukture 3NQ3) prikazan kao (B) model površina dostupnih rastvaraču i (C) krupni plan trakastog (engl. *ribbon*) modela molekula BLG-a. Ostaci Cys106, Cys119 i Cys121 prikazani su kao štapići sa atomom sumpora žute boje; udaljenost između C3' atoma PCB-a i atoma S odgovarajućeg ostatka cisteina obeležena je crnom bojom; (D) Preklapljene trodimenzionalne strukture BLG-a pre (crveno) i nakon (zeleno) dirigovane molekulske dinamike koja simulira izmenu disulfidnih mostova BLG- (raskidanje disulfidne veze Cys106–Cys119 i formiranje disulfidne veze Cys106–Cys121). Molekulski doking PCB-a (obeležen ljubičastom bojom) vezanog za kaliks BLG-a nakon SMD simulacije prikazan je kao (E) model površina dostupnih rastvaraču i (F) krupni plan trakastog (engl. *ribbon*) modela. (G) Preklapljene trodimenzionalne strukture PCB-a vezanog za BLG nakon SMD simulacije i nekovalentnog (ljubičasto) i kovalentnog (narandžasto) dokinga. Kovalentni doking PCB-a (obeležen narandžastom bojom) vezanog za kaliks BLG-a nakon SMD simulacije prikazan je kao (H) model površina dostupnih rastvaraču i (I) krupni plan trakastog (engl. *ribbon*) modela.

U kovalentnom BLG–PCB aduktu, PCB gradi jake nekovalentne hidrofobne interakcije sa brojnim aminokiselinским ostacima kaliksa BLG-a, kao i vodonične veze sa Val41, Val43, Met107, Ala118 i π - π interakcije sa ostatkom Tyr 42 (Slika 39). Ovi rezultati ukazuju na to da je nakon molekulske dinamičke simulacije izmene disulfida, kaliks BLG-a, mada strukturno blago izmenjen, sada dovoljno veliki da akomodira PCB i njegovu etilidensku C3-C3' vezu, koja se pozicionira u blizini, sada slobodnog, ostatka Cys119, dok drugi aminokiselinski ostaci kaliksa interagujući sa PCB-om stabilizuju njegovu orijentaciju, i time dodatno favorizuju formiranje kovalentne veze.



Slika 39. Dijagram interakcija PCB-a kovalentno udokovanog za BLG nakon SMD simulacije izmene disulfida (PDB broj: 3NQ3).

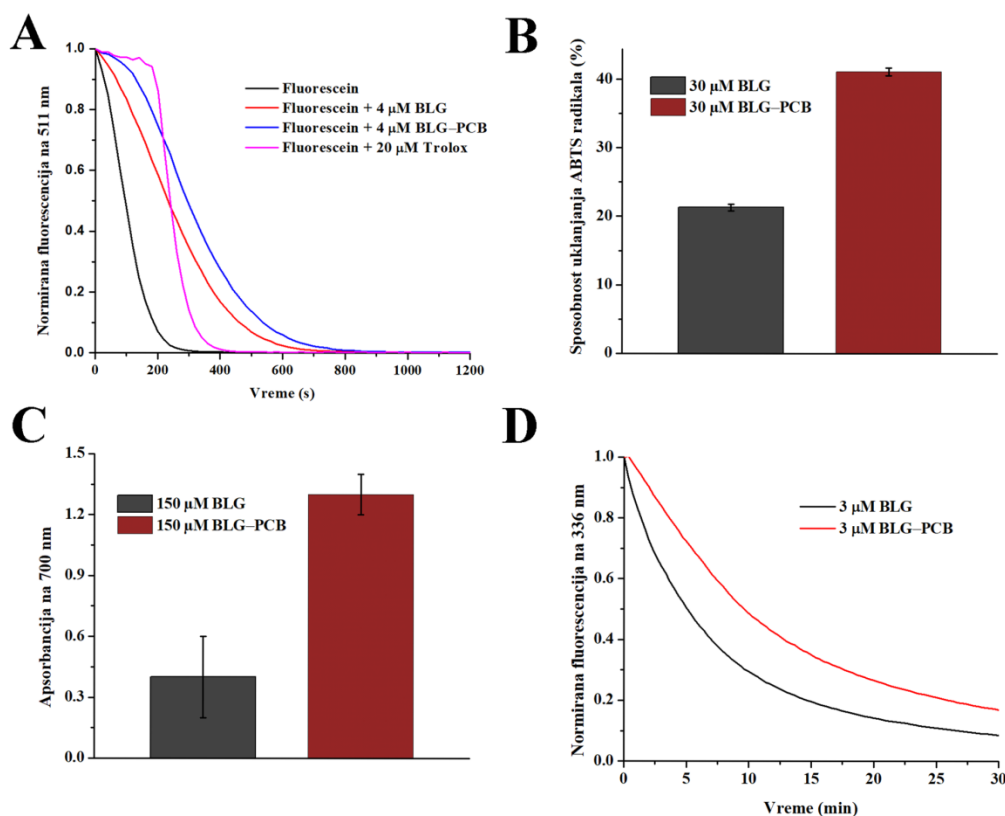
4.1.8. Antioksidativna svojstva BLG–PCB-a

4.1.8.1. Antioksidativna aktivnost BLG–PCB-a

Antioksidativni potencijal BLG–PCB-a i BLG-a evaluiran je *in vitro* korišćenjem nekoliko uobičajenih testova za ispitivanje antioksidativne aktivnosti – ORAC (od engl. *oxygen radical absorbance capacity*) testa, testa obezbojavanja ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)) radikal-katjona ($ABTS^{\cdot+}$) i testa ukupne redukujuće moći. U ORAC testu, 2,2' - azobis(2-amidinopropan) dihidrohlorid (AAPH) je korišćen kao generator peroksi-radikala, koji direktno reaguju sa fluoresceinom, pri čemu nastaje oksidativno izmenjen nefluorescentni proizvod. Grafik opadanja fluorescencije na 511 nm u funkciji od vremena (Slika 40A) pokazuje da je opadanje fluorescencije sporije u prisustvu antioksidanata, kao što su BLG, BLG–PCB i Troloks (standardni antioksidant, analog vitamina E rastvoran u vodi, 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilroman-2-karboksilna kiselina), pri čemu je BLG–PCB uspješniji od nemodifikovanog BLG-a u usporavanju opadanja fluorescencije, odnosno oksidacije fluoresceina. Iako je BLG uklonio peroksi-radikale, sa antioksidativnom aktivnošću od $5,3 \pm 0,1$ Troloks ekvivalenta (TE), BLG–PCB je pokazao značajno ($p < 0,05$) veću antioksidativnu aktivnost ($7,6 \pm 0,3$ TE). Sposobnosti uklanjanja ABTS radikala od strane BLG-a i BLG–PCB-a prikazane su na Slici 40B. Antioksidativna aktivnost BLG-a u ABTS testu iznosila je $41,1 \pm 0,6\%$, što je značajno više ($p < 0,05$) u poređenju sa kontrolnim BLG uzorkom, čija je ABTS antioksidativna aktivnost $21,3 \pm 0,5\%$. Ukupna redukujuća moć BLG-a i BLG–PCB-a (Slika 40C) u skladu je sa rezultatima ORAC i ABTS eseja. Naime, BLG–PCB pokazuje veliku redukujuću moć, koja se ogleda u značajno većoj ($p < 0,05$) apsorbanciji na 700 nm u prisustvu BLG–PCB-a ($1,3 \pm 0,1$) nego u prisustvu ekvivalentne količine BLG-a ($0,4 \pm 0,2$), ukazujući na izuzetan antioksidativni kapacitet BLG–PCB-a.

4.1.8.2. Zaštitni efekat PCB-a na oksidaciju BLG-a indukovanu slobodnim radikalima

Oksidativne promene proteina, nastale dejstvom slobodnih radikala, mogu se pratiti merenjem promena u fluorescenciji triptofanskih ostataka (Fuentes-Lemus et al., 2016). Oksidacija BLG-a i BLG-PCB-a slobodnim radikalima praćena je merenjem promena intrinzične fluorescencije proteina po dodatku AAPH-a, generatora slobodnih radikala. Na **Slici 40D** prikazane su krive opadanja fluorescencije na 336 nm (talasna dužina emisijonog maksimuma BLG-a nakon ekscitacije na 280 nm) tokom 30 min, po dodatku AAPH-a u rastvor BLG-a, odnosno BLG-PCB-a. Na slici se može uočiti da nakon dodavanja AAPH-a, generatora slobodnih (pre svega peroksi-) radikala, u rastvor proteina fluorescencija nemodifikovanog BLG-a eksponencijalno opada, kao i da je opadanje fluorescencije *sporije* kod kovalentnog BLG-PCB adukta. Kako krive prate kinetiku prvog reda, ubacivanjem dobijenih krivih u eksponencijalnu jednačinu prvog reda, dobijene su konstantne brzine opadanja fluorescencije. Ova konstanta iznosi $0,068 \pm 0,016 \text{ min}^{-1}$ za BLG-PCB i značajno ($p < 0,05$) je manja od one za BLG, koja iznosi $0,117 \pm 0,014 \text{ min}^{-1}$, što ukazuje na to kovalentno vezani PCB štiti BLG od oksidacije izazvane slobodnim radikalima. Iz razlike površina ispod dobijenih krivih, izračunat je zaštitni efekat PCB-a, koji je iznosio $33,6 \pm 4,9\%$.



Slika 40. (A) Oksidacija fluoresceina indukovana dodatkom AAPH-a, generatora slobodnih radikala, u odsustvu i prisustvu 4 μM BLG-a, 4 μM BLG-PCB-a i 20 μM Troloksa. (B) Sposobnost uklanjanja ABTS radikala BLG-a i BLG-PCB-a (oba 30 μM). (C) Redukujuća moć BLG-a i BLG-PCB-a (oba 150 μM). (D) Oksidacija BLG-a i BLG-PCB-a (oba 3 μM) slobodnim radikalima nakon dodatka AAPH-a.

4.1.9. Karakteristike BLG-PCB-a nakon termičkog tretmana

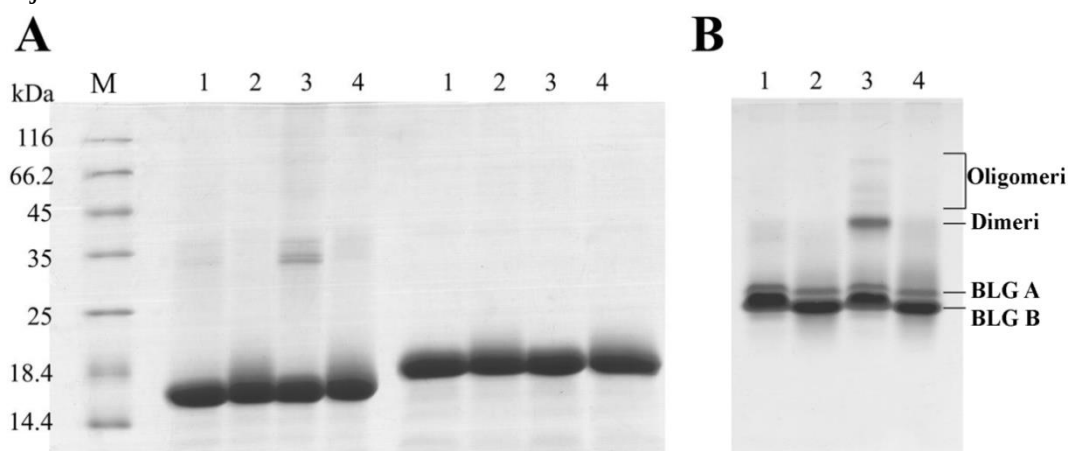
Za ispitivanje uticaja temperature na funkcionalne osobine BLG-a i BLG-PCB-a, zagrevani BLG i kovalentno modifikovani BLG-PCB adukt analizirani su i upoređeni međusobno, kao i sa kontrolnim, nezagrevanim kontrolama u pogledu strukture i funkcionalnih promena koje bi mogle nastati kao posledica termičkog tretmana. Naime, analizirani su termalna stabilnost, površinska hidrofobnost, sklonost ka oligomerizaciji i nekovalentnom agregiranju proteina, promene u sadržaju

sekundarnih struktura po zagrevanju, kao i građenje amiloidima sličnih fibrilarnih struktura nemodifikovanog i kovalentno modifikovanog proteina.

4.1.9.1. Agregiranje BLG–PCB-a nakon zagrevanja pod blagim uslovima

Kako bi se stekao uvid u podložnost BLG–PCB-a ka agregiranju pri blagim termičkim tretmanima od značaja u industriji hrane, nemodifikovani BLG i kovalentno modifikovani BLG–PCB podvrgnuti su zagrevanju pri uslovima koji imitiraju one prisutne tokom LTLT pasterizacije, takozvane „batch“ pasterizacije. Naime, ova pasterizacija podrazumeva polučasovno zagrevanje velike zapremine mleka u kontejnerima, na temperaturi od 63 °C (Dash et al., 2022). Nakon zagrevanja BLG-a i BLG–PCB-a na 63 °C, zagrevani BLG–PCB i BLG, kao i kontrolni, nezagrevani BLG i BLG–PCB, analizirani su elektroforetski u redukujućim i neredukujućim denaturišućim uslovima, kao i u nativnim uslovima.

Elektroforetski profili nemodifikovanog i kovalentno modifikovanog BLG-a u denaturišućim uslovima prikazani su na **Slici 41**. Slično prethodno uočenom, da se primetiti da u kontrolnom, nezagrevanom uzorku, kovalentna modifikacija PCB-om dovodi do blagog razmaza trake BLG monomera ka većim molekulskim masama, usled kovalentnog vezivanja jednog ili više molekula PCB-a molekulske mase 587,6 Da. Elektroforetska analiza zagrevanog BLG-a u neredukujućim uslovima (**Slika 41A, levo**) pokazuje traku molekulske mase 36 kDa, koja odgovara masi BLG dimera. S druge strane, u zagrevanom BLG–PCB-u uočavaju se samo tragovi dimerne forme BLG-a. SDS-PAGE analiza istih uzoraka u redukujućim uslovima (**Slika 41A, desno**) nedvosmisleno pokazuje na to da su dimeri, prisutni u neredukujućim uslovima, povezani disulfidnim vezama. Gotovo potpuno odsustvo dimera u zagrevanom BLG–PCB-u nije iznenađujuće, imajući u vidu da je slobodna tiolna grupa BLG-a, koja je odgovorna za građenje disulfidne veze sa drugim molekulom BLG-a, u BLG–PCB-u blokirana kovalentnom modifikacijom PCB-om.



Slika 41. Elektroforeza (1) nezagrevanog BLG-a i (2) BLG–PCB-a i (3) BLG-a i (4) BLG–PCB-a zagrevanih 30 min na 63 °C u (A) denaturišućim (**levo**) neredukujućim i (**desno**) redukujućim i (B) nativnim uslovima (14% gelovi).

S druge strane, nativna poliakrilamidna gel elektroforeza istih uzoraka pokazuje prisustvo nekovalentnih agregata velikih molekulskih masa u zagrevanom BLG-u, koji nisu prisutni u BLG–PCB-u (**Slika 41B**), ukazujući na to da kovalentna modifikacija BLG PCB-om ne samo da utiče na sposobnost BLG da formira disulfidne dimere, već redukuje i stvaranje rastvornih nekovalentnih agregata BLG-a. Na nativnoj elektroforezi uočava se i nešto veća pokretljivost BLG–PCB-a u poređenju sa BLG-om, uprkos većoj masi BLG–PCB-a, usled kovalentno vezanog PCB-a. Štaviše, izoelektričnim fokusiranjem BLG-a i BLG–PCB-a u imobilizovanom pH gradijentu pokazano je da je izoelektrična tačka BLG-a pomerena ka kiselijim pH vrednostima (**Slika 42**). Pomeraj pI ka kiselijim vrednostima prisutan je kod obe izoforme BLG-a (BLG A i BLG B). Dobijeni rezultati

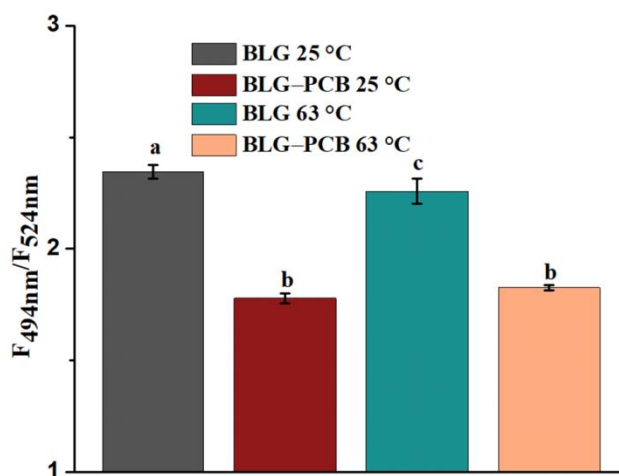
ukazuju na to da vezivanje PCB-a za BLG pomera izoelektričnu tačku BLG-a usled prisustva dve karboksilne grupe u molekulu PCB-a.



Slika 42. Izoelektrično fokusiranje (1) BLG-a i (2) BLG–PCB-a.

4.1.9.2. Površinska hidrofobnost BLG-a i BLG–PCB-a

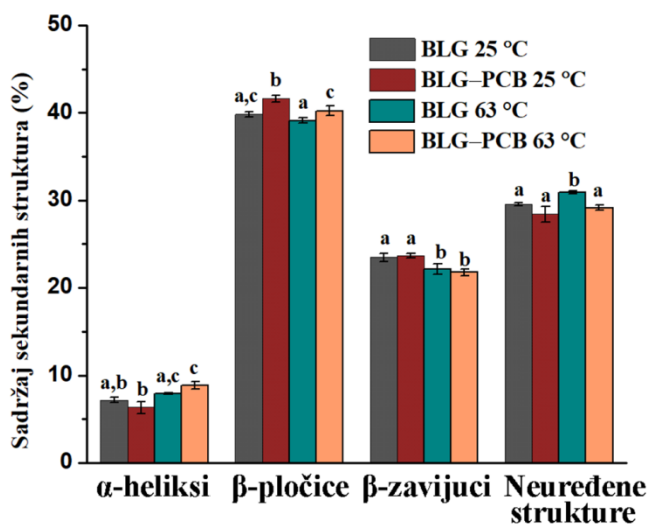
Vezivanjem hidrofobne probe ANS-a (8-anilinonaftalen-1-sulfonska kiselina) za molekule proteina može se steći uvid u površinsku hidrofobnost molekula proteina. Naime, ANS je fluorescentna boja čiji se intenzitet fluorescencije povećava i do 100 puta nakon vezivanja za hidrofobna mesta na površini proteina, pri čemu dolazi do promene emisionog maksimuma boje ka manjim talasnim dužinama (Munishkina i Fink, 2007). Poređenjem količnika intenziteta fluorescencije slobodnog ANS-a na 524 nm i fluorescencije vezanog ANS-a na 494 nm dobijen je uvid u razlike u vezivanju ANS-a za BLG/BLG–PCB. Razlike u intenzitetu fluorescencije ANS-a nakon vezivanja za zagrevani ili nezagrevani BLG i BLG–PCB ukazuju na to da kovalentna modifikacija BLG-a PCB-om značajno ($p < 0,05$) smanjuje fluorescenciju vezanog ANS-a (**Slika 43**), ukazujući na manju površinsku hidrofobnost BLG–PCB-a u poređenju sa nemodifikovanim BLG-om, kako u zagrevanim, tako i u nezagrevanim uzorcima. Ovaj rezultat se može objasniti zaklanjanjem hidrofobnih ostataka BLG-a od strane vezanog PCB-a, čije je vezivno mesto za BLG u hidrofobnom džepu BLG-a. Nakon zagrevanja BLG-a, intenzitet fluorescencije ANS-a blago opada u poređenju sa nezagrevanim proteinom ($p < 0,05$), u skladu sa literaturnim podacima (Fessas et al., 2001). Međutim, intenzitet fluorescencije ANS-a ostaje isti u prisustvu zagrevanog BLG–PCB-a, u poređenju sa nezagrevanim BLG–PCB-om ($p > 0,05$). Različito ponašanje BLG-a i BLG–PCB-a prilikom zagrevanja može se objasniti različitom tendencijom BLG-a i BLG–PCB ka oligomerizaciji ili agregiranju. Naime, oligomerizacija i agregiranje BLG-a nakon zagrevanja smanjuje dostupnost hidrofobnih površina za vezivanje ANS-a. S druge strane, gotovo potpuno odsustvo oligomerizacije/agregiranja zagrevanog BLG–PCB-a obezbeđuje nivo vezivanja ANS-a sličan onome koji je prisutan kod nezagrevanog BLG–PCB-a.



Slika 43. Površinska hidrofobnost nezagrevanih i zagrevanih (30 min na 63 °C) uzoraka BLG-a i BLG–PCB-a. Rezultati su izraženi kao odnos fluorescencije na 494 nm (ANS vezan za protein) i fluorescencije na 524 nm (slobodan ANS). Podaci su analizirani korišćenjem ANOVA testa, uz upotrebu Tukijevog *post hoc* testa na nivou značajnosti od 0,05. Različitim slovima (a do c) su obeleženi uzorci koji se značajno razlikuju ($p < 0,05$).

4.1.9.3. Promene sekundarnih struktura BLG–PCB-a nakon zagrevanja

Strukturne promene nastale kao posledica zagrevanja BLG-a/BLG–PCB-a na 63 °C tokom 30 min praćene su CD spektroskopijom u dalekoj UV oblasti. Sadržaj sekundarnih struktura procenjen softverskom analizom prikazan je na **Slici 44**. Dobijeni rezultati ukazuju na to da zagrevanjem BLG-a pod uslovima pasterizacije dolazi do povećanja sadržaja neuređenih struktura, na račun smanjenja β -zavijutaka, uz neizmenjen sadržaj α -heliksa i β -pločica. Kovalentna modifikacija BLG-a pigmentom menja ponašanje proteina pri termalnom tretmanu, dovodeći do takozvane tranzicije β -pločica u α -helikse, uz istovremeni blagi pad sadržaja β -zavijutaka, ne utičući pritom na sadržaj neuređenih struktura. Kako blago zagrevanje BLG-a/BLG–PCB-a na temperaturi pasterizacije smanjuje uređenost nemodifikovanog BLG-a, dok kod BLG–PCB-a dovodi samo do reorganizovanja sekundarnih struktura, čini se da vezani PCB održava sadržaj uređenih struktura BLG-a.

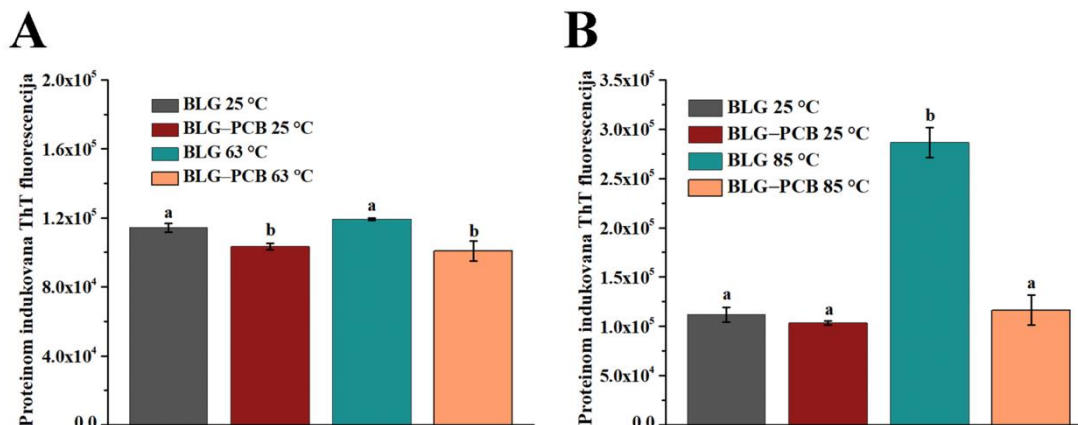


Slika 44. Sadržaj sekundarnih struktura nezagrevanih i zagrevanih (30 min na 63 °C) uzoraka BLG-a i BLG–PCB-a. Podaci su analizirani korišćenjem ANOVA testa, uz upotrebu Tukijevog *post hoc* testa na nivou značajnosti od 0,05. Različitim slovima (a do c) su obeleženi uzorci koji se značajno razlikuju ($p < 0,05$).

4.1.9.4. Formiranje fibrilarnih struktura sličnih amiloidima zagrevanjem BLG–PCB-a

U ekstremnim uslovima sredine (nisko pH, produženo zagrevanje iznad temperature topljenja, niska jonska sila i prisustvo denaturanata) BLG gradi fibrile. Međutim, kako je BLG protein sklon fibrilaciji, u literaturi je opisano građenje fibrila BLG-a u manjem obimu i pod blažim uslovima, kao što su neutralno pH i kraće vreme inkubacije (Sardar et al., 2014; Zúñiga et al., 2010). Tioflavin T (ThT) je fluorescentna proba koja se često koristi za specifičnu detekciju amiloidnih fibrila i sličnih oligomernih struktura bogatih β -pločicama, usled osobine ThT-a da mu se intenzitet fluorescencije na 485 nm povećava nakon vezivanja za ovakve strukture (Biancalana i Koide, 2010). Formiranje oligomernih struktura nastalih interakcijama β -pločica nakon zagrevanja BLG-a i BLG–PCB-a pri uslovima LTLT pasterizacije (63 °C tokom 30 min) praćeno je indirektno preko vezivanja ThT-a. Ako se uporede nezagrevani BLG i BLG–PCB, nezagrevani BLG–PCB pokazuje značajno ($p < 0,05$) manje povećanje emisije ThT-a u poređenju sa nezagrevanim BLG-om (**Slika 45A**), što je u skladu sa smanjenom površinskom hidrofobnošću BLG–PCB-a. Naime, osim što se vezuje za umrežene β -strukture amiloidnih fibrila, ThT se takođe vezuje i za hidrofobne strukture (Biancalana i Koide, 2010). Međutim, u poređenju sa nezagrevanim uzorcima, nakon zagrevanja proteina pri uslovima LTLT pasterizacije, ne uočava se statistički značajna promena fluorescencije ThT-a ni u prisustvu zagrevanog BLG-a, niti u prisustvu zagrevanog BLG–PCB-a (**Slika 45A**). Slično tome, Zenker i saradnici zapazili su samo blago povećanje emisije ThT-a nakon zagrevanja BLG-a na 60 °C tokom 24 časa (Zenker et al., 2020). Dobijeni rezultati ukazuju na to da,

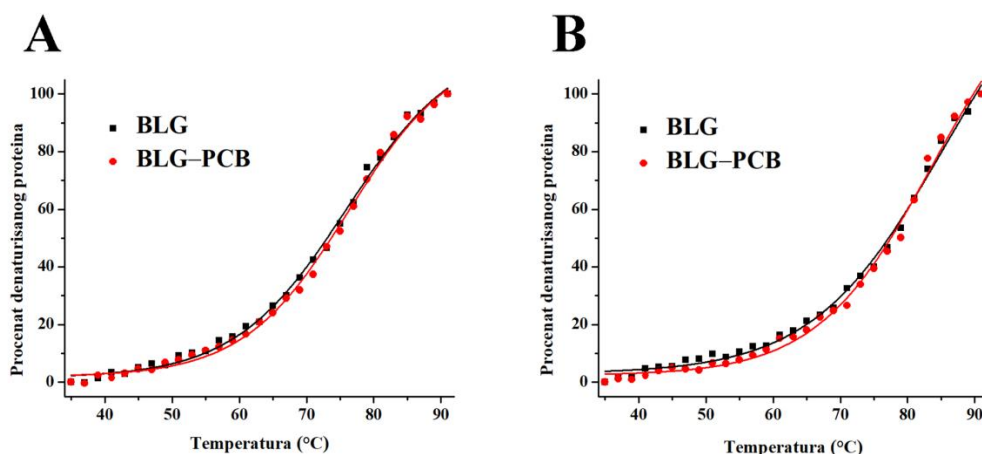
iako vezivanje PCB-a neznatno menja strukturu BLG-a, kovalentna modifikacija PCB-om ne dovodi do povećane podložnosti BLG-a prema građenju fibrila, makar ne u uslovima blagog termičkog tretmana tokom kratkog vremenskog perioda (tridesetominutno zagrevanje na 63 °C). Nasuprot tome, dvočasovno zagrevanje BLG-a i BLG-PCB-a na 85 °C značajno ($p < 0,05$) povećava emisiju ThT-a u prisustvu BLG-a, dok se emisija ThT-a u prisustvu BLG-PCB-a ne povećava značajno ($p > 0,05$) (**Slika 45B**), što indirektno ukazuje ne samo na manju podložnost BLG-PCB-a prema agregiranju, već i prema formiranju amiloidnih fibrila i amiloidnim fibrilima sličnih struktura. Prema tome, kovalentna modifikacija BLG-a PCB-om smanjuje podložnost BLG-a prema formiranju fibrila indukovanu produženim termičkim tretmanom na visokoj temperaturi (2 časa na 85 °C u ovde ispitivanom slučaju).



Slika 45. Povećanje fluorescencije Tioflavina T nakon zagrevanja BLG-a i BLG-PCB-a (**A**) 30 min na 63 °C i (**B**) 2 h na 85 °C. Podaci su analizirani korišćenjem ANOVA testa, uz upotrebu Tukijevog *post hoc* testa na nivou značajnosti od 0,05. Različitim slovima (a do b) su obeleženi uzorci koji se značajno razlikuju ($p < 0,05$).

4.1.9.5. Termalna stabilnost BLG-PCB-a

Kako bi se ispitaio efekat konjugacije PCB-a na termalnu stabilnost BLG-a, opadanje intrinzične fluorescencije BLG-a (emisija na 336 nm, pri ekcitaniji na 280 nm) tokom termalne denaturacije praćeno je na dve pH vrednosti – 7,2 i 2,5. Odgovarajuće krive topljenja prikazane su na **Slikama 46A i 46B**. Temperatura topljenja BLG-PCB-a slična je temperaturi topljenja BLG-a, kako na pH 7,2, tako i na pH 2,5. Naime, temperature topljenja na pH 7,2 iznose $76,3 \pm 1,1$ °C za BLG i $75,99 \pm 0,7$ °C za BLG-PCB, te ne pokazuju statistički značajnu razliku ($p > 0,05$), dok su značajno veće u odnosu na pH 7,2, ali međusobno iste ($p > 0,05$) temperature topljenja dobijene na pH 2,5 i iznose $84,3 \pm 3,3$ °C za BLG i $85,3 \pm 2,0$ °C za BLG-PCB. Dobijeni rezultati ukazuju na to da kovalentna modifikacija PCB-om ne utiče na termalnu stabilnost BLG-a.



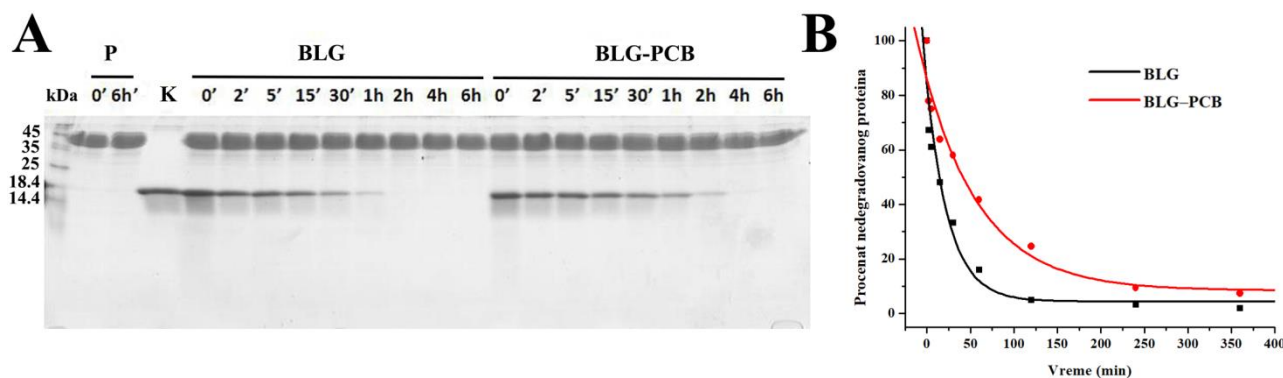
Slika 46. Termalna stabilnost 2 μ M BLG-a i 2 μ M BLG-PCB-a na (A) pH 7,2 i (B) pH 2,5. Stabilnost proteina praćena je spektrofotometrijski (ekscitacija na 280 nm).

4.1.10. Uticaj kovalentne modifikacije fikocijanobilinom na *in vitro* digestibilnost β -laktoglobulina

Korišćenjem *in vitro* esaja za proućavanje digestibilnosti proteina, ispitana je digestibilnost nemodifikovanog BLG-a i BLG-a kovalentno modifikovanog fikocijanobilinom pepsinom i pankreatinom, u uslovima koji simuliraju one prisutne u gastrointestinalnom traktu. Korišćeni *in vitro* modeli predstavljaju alternativu životinjskim i humanim *in vivo* modelima, koji su, iako pouzdaniji, vremenski zahtevni i problematićni sa etićkog aspekta.

4.1.10.1. Digestibilnost BLG-a i BLG-PCB adukta pepsinom

Digestibilnost BLG-a i BLG-PCB-a pepsinom analizirana je u *in vitro* modelu koji simulira uslove digestije u Źeludaćnoj tećnosti, na pH 2,5, prema protokolu Tomasa i saradnika u kojem se protein digestuje korišćenjem 10 U pepsina po μ g proteina (Thomas et al., 2004). Tokom trajanja digestije, uzimani su alikvoti digestione smeše, reakcija zaustavljana, a proteinski profil elektroforetski analiziran. Na Slici 47A prikazani su elektroforetski profili dobijeni nakon šestoćasovne digestije pepsinom BLG-a i BLG-PCB-a. Sa gela se, na osnovu postojanosti trake intaktnog proteina na 18,4 kDa tokom trajanja digestije, moŹe zakljućiti da je BLG-PCB znatno rezistentniji na digestiju pepsinom nego nemodifikovani BLG. Promene u intenzitetu trake na 18,4 kDa, dobijene denzitometrijskom analizom gela, su prikazane u zavisnosti od vremena trajanja digestije (Slika 47B).

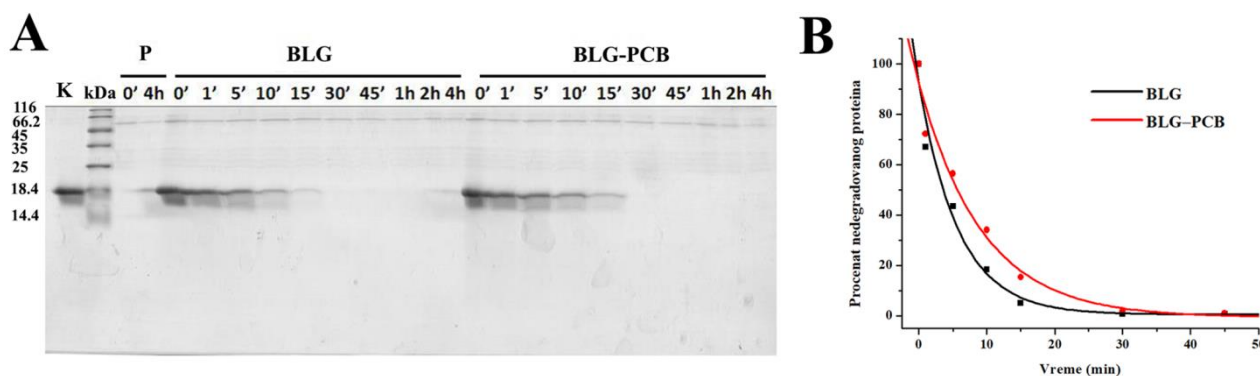


Slika 47. (A) SDS-PAGE analiza (16% gel) BLG-a i BLG-PCB-a digestovanog pepsinom. P – kontrola stabilnosti pepsina, K – kontrola stabilnosti BLG-a. (B) Zavisnost procenta nedigestovanog BLG-a i BLG-PCB-a tokom 6 h trajanja pepsinske digestije. Traka BLG-a/BLG-PCB-a u nultom vremenu posmatrana je kao 100%.

Rezultati brzine opadanja intenziteta trake intaktnog proteina ubačeni su u eksponencijalnu jednačinu prvog reda zavisnosti procenta nedegradovanog BLG-a od vremena digestije, i na osnovu nje izračunata su vremena poluživota proteina ($T_{50\%}$) pri datim uslovima. Poluživot nemodifikovanog BLG-a procenjen je na $18,1 \pm 3,9$ min, dok je kovalentna modifikacija proteina PCB-om značajno ($p < 0,05$) produžila poluživot BLG-a, na čak $40,6 \pm 0,7$ min.

4.1.10.2. Digestibilnost BLG-a i BLG-PCB adukta pankreatinom

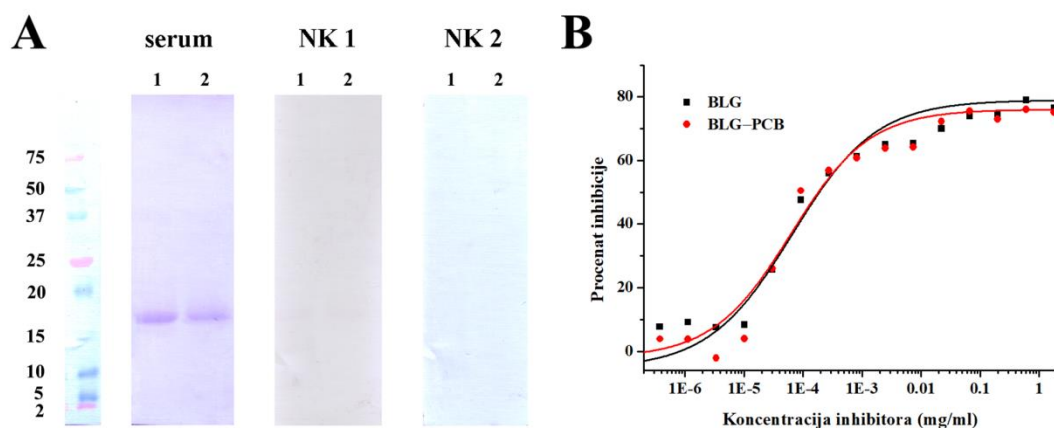
Ispitivanje digestibilnosti BLG-a i BLG-PCB-a pankreatinom urađena je u *in vitro* modelu koji simulira uslove digestije u intestinalnoj tečnosti. Analogno digestiji pepsinom, tokom trajanja digestije (4 h) uzimani su alikvoti digestione smeše, koji su analizirani elektroforetski. Dobijeni elektroforetski profili prikazani su na **Slici 48A**. Kovalentna modifikacija PCB-om usporava i digestiju pankreatinom, mada efekat nije toliko izražen kao efekat na gastričnu digestiju. Denzitometrijski dobijeni intenziteti traka nedigestovanog intaktnog proteina iskorišćeni su za dobijanje grafika eksponencijalne krive zavisnosti procenta nedigestovanog proteina od vremena trajanja digestije (**Slika 48B**). Pri ovim eksperimentalnim uslovima, procenjeni poluživot nemodifikovanog BLG-a tokom pankreatinske digestije iznosio je $2,7 \pm 0,9$ min. Kovalentna modifikacija PCB-om produžila je poluživot proteinu na $5,1 \pm 0,6$ min.



Slika 48. (A) SDS-PAGE analiza (16% gel) BLG-a i BLG-PCB-a digestovanog pankreatinom. P – kontrola stabilnosti pankreatina, K – kontrola stabilnosti BLG-a. (B) Zavisnost procenta nedigestovanog BLG-a i BLG-PCB-a tokom 45 min trajanja pankreatinske digestije. Traka BLG-a/BLG-PCB-a u nultom vremenu posmatrana je kao 100%.

4.1.11. Uticaj kovalentne modifikacije PCB-om na IgE-vezujuće osobine BLG-a

IgE-vezujuće osobine BLG-a i BLG-PCB-a analizirane su Western blot tehnikom i inhibitornom ELISA-om, korišćenjem seruma pacijenata alergičnih na mleko. Western blotom u kom je korišćen zbirni serum pacijenata alergičnih na mleko pokazano je da se i BLG i BLG-PCB vezuju za IgE antitela iz seruma (**Slika 49A**). Dodatno, IgE-vezujuće osobine oba proteina kvantitativno su analizirane inhibitornom ELISA-om, ispitivanjem inhibicije vezivanja IgE antitela za nemodifikovani BLG. Kao što se može videti na **Slici 49B**, BLG i BLG-PCB pokazuju sličan obrazac dozno-zavisne inhibicije vezivanja IgE antitela za nemodifikovani BLG. Gotovo identične inhibitorne krive ukazuju da modifikacija PCB-om ne utiče značajno na IgE-vezujuće osobine BLG-a, što se može zaključiti i poređenjem dobijenih IC_{50} vrednosti koje za BLG i BLG-PCB, redom, iznose: $6,4 \times 10^{-5} \pm 6,9 \times 10^{-7}$ mg/ml i $6,2 \times 10^{-5} \pm 2,1 \times 10^{-7}$ mg/ml ($p > 0,05$, $n=2$).

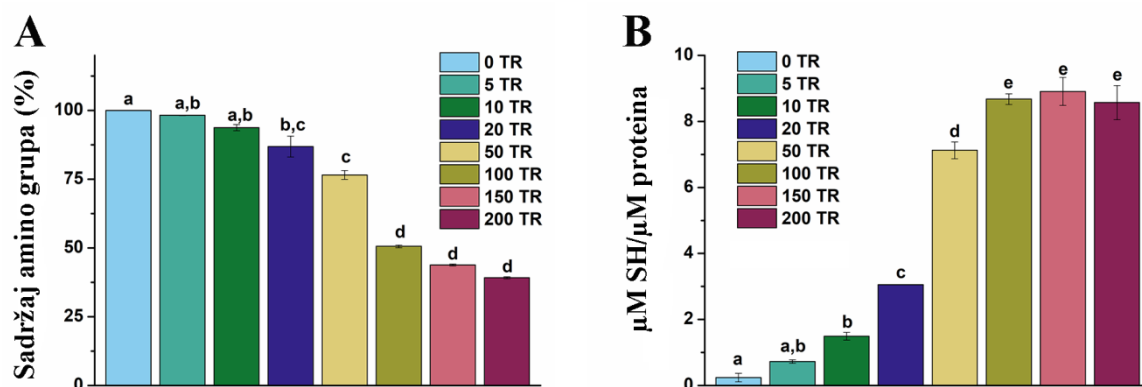


Slika 49. (A) Western blot analiza (1) BLG-a i (2) BLG-PCB-a. Nakon imunoblota, membrana je najpre inkubirana sa smešom seruma pacijenata alergičnih na mleko, a zatim sa zečjim antitelima naspram humanih IgE antitela, te kozjim antitelima naspram zečjih IgG antitela konjugovanih sa alkalnom fosfatazom. NK 1– negativna kontrola 1 (inkubirana sa serumom osobe koja nije alergična na mleko), NK 2 – negativna kontrola 2 (membrana nije inkubirana sa serumom). (B) Inhibitorna ELISA: Vezivanje IgE antitela iz smeše seruma pacijenata alergičnih na mleko inhibirano je BLG-om i BLG-PCB-om.

4.2. Kovalentne modifikacije proteina fikocijanobilinom nakon modifikacije proteina Trautovim reagensom: albumin goveđeg seruma

4.2.1. Određivanje stepena tiolovanja BSA Trautovim reagensom

Albumin goveđeg seruma (BSA) je modifikovan Trautovim reagensom, korišćenjem serije različitih molarnih odnosa Trautovog reagensa i BSA, od 0:1 do 200:1. Kako bi se procenio stepen modifikacije BSA Trautovim reagensom, određen je sadržaj ukupnih amino grupa i tiolnih grupa izloženih vodi proteina modifikovanog Trautovim reagensom i upoređen sa nemodifikovanim proteinom. Kao što se može primetiti na **Slici 50**, modifikacija BSA Trautovim reagensom (TR) dovodi do značajnog ($p < 0,05$) opadanja sadržaja ukupnih amino grupa i do istovremenog porasta sadržaja slobodnih sulfhidrilnih grupa sve do molarnog odnosa 100:1 u korist reagensa.



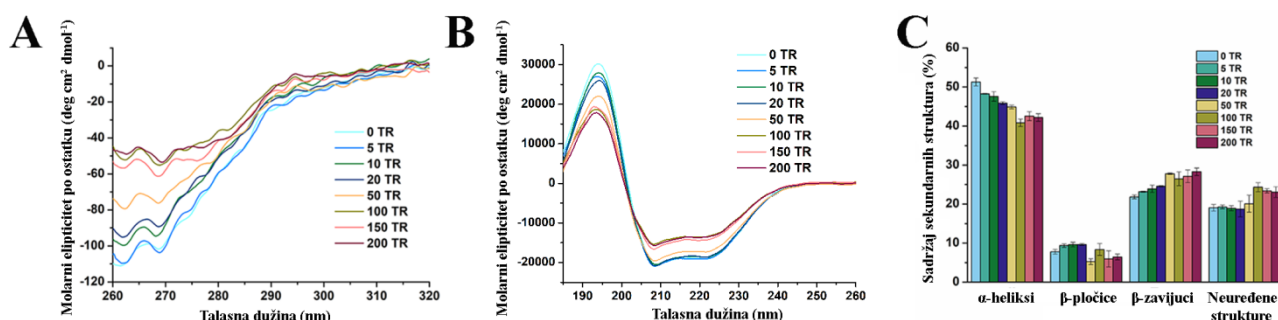
Slika 50. (A) Relativan sadržaj ukupnih slobodnih amino grupa u BSA proteinu koji je modifikovan Trautovim reagensom u 5-, 10-, 20-, 50-, 100-, 150- i 200-strukom molarnom višku u odnosu na protein (5 TR, 10 TR, 20 TR, 50 TR, 100 TR, 150 TR i 200 TR, redom) izražen kao udeo od sadržaja izloženih amino grupa u kontrolnom, nemodifikovanom proteinu (0 TR) koji je izražen kao 100%. (B) Sadržaj izloženih slobodnih sulfhidrilnih grupa nemodifikovanog (0 TR) BSA i BSA proteina modifikovanog Trautovim reagensom, izražen kao $\mu\text{M SH}/\mu\text{M proteina}$ BSA. Podaci su analizirani korišćenjem ANOVA testa, uz upotrebu Tukijevog *post hoc* testa na nivou značajnosti od 0,05. Različitim slovima (a do e) su obeleženi uzorci koji se značajno razlikuju ($p < 0,05$).

Opadanje sadržaja amino grupa i istovremeni porast sadržaja tiolnih grupa odvija se progresivno sa povećanjem molarnog odnosa reagensa, počev od molarnog odnosa 5:1 do molarnog

odnosa 100:1. Korišćenjem stostrukog molarnog viška TR reagensa postiže se opadanje amino grupa do $50,6 \pm 0,5$ %, uz istovremeno povećanje broja sulfhidrilnih grupa, od $0,2 \pm 0,1$ u kontrolnom, nemodifikovanom uzorku proteina, do $8,7 \pm 0,2$ u uzorku proteina koji je modifikovan korišćenjem molarnog odnosa TR:protein 100:1. Dalje povećanje molarnog odnosa TR:BSA do 150-strukog i 200-strukog molarnog viška reagensa nema značajan ($p > 0,05$) efekat na sadržaj amino i tiolnih grupa molekula BSA.

4.2.2. Efekti tiolovanja BSA Trautovim reagensom na tercijarnu i sekundarnu strukturu proteina

Promene tercijarne i sekundarne strukture BSA nakon tiolovanja proteina Trautovim reagensom ispitivane su korišćenjem CD spektroskopije u bliskoj i dalekoj UV oblasti, redom. Osim u slučaju petostrukog molarnog viška Trautovog reagensa, za koji se čini da ne utiče na CD spektre BSA u bliskoj UV oblasti, dalje dodavanje reagensa indukuje promene u tercijarnoj strukturi BSA (**Slika 51A**). Uočene promene u izgledu bliskih UV CD spektara, koje se ogledaju u smanjenju elipticiteta u oblasti ispod 280 nm, karakterističnog za molekul BSA (Dockal et al., 2000), izraženije su sa porastom molarnog odnosa Trautovog reagensa, posebno pri molarnim odnosima TR:protein (mol:mol) 100, 150 i 200 u korist reagensa. Slično rezultatima određivanja sadržaja amino i sulfhidrilnih grupa, modifikacija Trautovim reagensom pri molarnom odnosu reagensa 150:1 i 200:1 u odnosu na protein ne dovodi do daljih značajnih promena tercijarne strukture BSA, u poređenju sa molarnim odnosom 100:1.



Slika 51. CD spektri u (A) bliskoj-UV i (B) dalekoj-UV oblasti nemodifikovanog BSA (0 TR) i BSA koji je modifikovan korišćenjem različitih molarnih odnosa Trautovog reagensa (5, 10, 20, 50, 100, 150 i 200 mol TR prema mol BSA). (C) Sadržaj sekundarnih struktura nemodifikovanog BSA i BSA modifikovanog Trautovim reagensom.

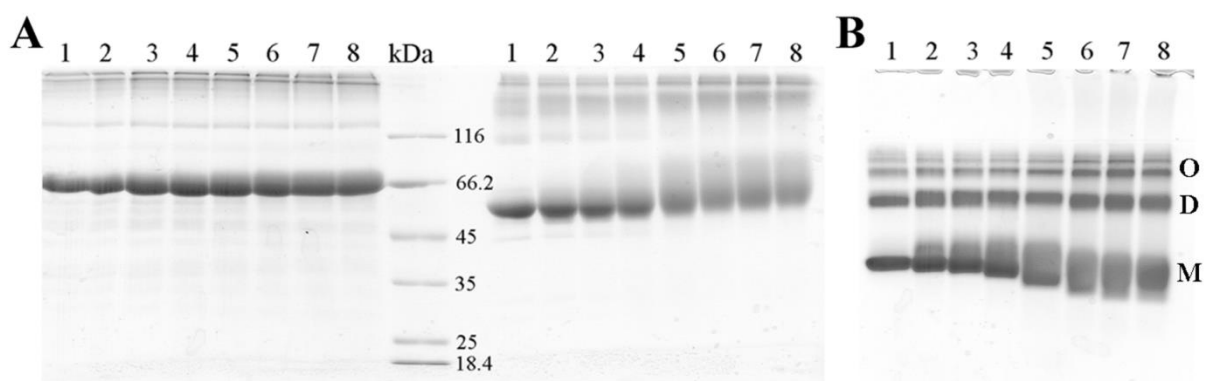
U CD spektrima BSA u dalekoj UV oblasti uočavaju se dva karakteristična dvogrba minimuma na pozicijama od oko 208 i 222 nm, svojstvena proteinima sa visokim sadržajem α -helikoidnih elemenata u sekundarnoj strukturi (Sen et al., 2008). Izražene promene u CD spektrima BSA u dalekoj UV oblasti nakon tiolovanja proteina Trautovim reagensom uočavaju se tek pri većim molarnim odnosima TR (100, 150 i 200 TR) (**Slika 51B**). Manji molarni odnosi reagensa nemaju efekat na sekundarnu strukturu proteina. Smanjenje intenziteta maksimuma na 208 i 222 nm nakon tiolovanja BSA Trautovim reagensom ukazuje na smanjenje sadržaja α -heliksa u molekulu proteina. Izračunavanje sadržaja sekundarnih struktura korišćenjem CDPro softvera to i potvrđuje. Naime, može se primetiti porast β -zavijutaka i neuređenih struktura na račun smanjenja α -heliksa sa porastom molarnog odnosa Trautovog reagensa, pri čemu sadržaj β -pločica ostaje gotovo nepromenjen (**Slika 51C**).

4.2.3. Promene u oligomerizaciji BSA nakon tiolovanja Trautovim reagensom

Kako tiolovanje BSA Trautovim reagensom indukuje promene u sekundarnoj i tercijarnoj strukturi proteina, uz istovremeni porast sulfhidrilnih grupa, sklonih oksidaciji, od interesa je bilo analizirati promene u oligomerizaciji i agregiranju BSA nakon tiolovanja. Oligomerizacija i

agregiranje nemodifikovanog i modifikovanog BSA analizirani su elektroforetski, kako u denaturišućim, tako i u nativnim uslovima.

Poliakrilamidnom gel elektroforezom u denaturišućim, neredukujućim uslovima, pokazano je da rast molarnog odnosa Trautovog reagensa i proteina ima postepen uticaj na proteinski profil BSA. Naime, BSA tiolovan petostrukim i desetostrukim molarnim viškom Trautovog reagensa pokazuje sličan proteinski profil kao nemodifikovani BSA (**Slika 52A, levo**), što je u saglasnosti sa gotovo nepromenjenim sadržajem amino i sulfhidrilnih grupa i nepromenjenom tercijskom strukturom proteina u modifikovanim proteinima u odnosu na nemodifikovani. Međutim, BSA modifikovan većim molarnim viškom Trautovog reagensa ne samo da pokazuje suptilne promene u odnosu zastupljenosti oligomerne i monomerne forme BSA, koji raste sa porastom molarnog odnosa reagensa, već pokazuje i uočljive razmaze proteinskih traka koje odgovaraju monomernoj formi BSA (oko 66 kDa) ka većim molekulskim masama. Postepeno povećanje mase monomera BSA i razmaz ka većim molekulskim masama rezultat su porasta mase monomerne forme BSA usled uvođenja sulfhidrilnih grupa (102 Da po uvedenoj grupi), ali i heterogenosti prisutnih molekulskih vrsta. Može se primetiti da sa porastom molarnog odnosa TR/BSA, dimeri BSA postepeno nestaju na račun povećanja viših oligomera (trimeri, tetrameri, itd.). Analizom istih uzoraka u redukujućim uslovima (**Slika 52A, desno**), uočava se odsustvo promene u oligomernom profilu, što jasno ukazuje na značaj disulfidne veze u formiranju viših oligomera BSA od dimernog oblika BSA.



Slika 52. Poliakrilamidna gel elektroforeza (10% gel) BSA i BSA modifikovanog Trautovim reagensom pod (A) denaturišućim (levo) redukujućim i (desno) neredukujućim i (B) nativnim uslovima. Uzorak 1: nemodifikovani BSA; uzorci 2-8: BSA modifikovan Trautovim reagensom korišćenjem 5, 10, 10, 50, 100, 150 i 200 mol Trautovog reagensa na mol BSA, redom. M, D i O označavaju monomere, dimere i oligomere velikih molekulskih masa.

Istovremeno, analiza istih uzoraka u nativnim uslovima (**Slika 52B**) pokazuje porast doprinosa viših oligomera u ukupnom proteinskom profilu modifikovanih BSA molekula. Ovi viši oligomeri, uključujući i one veoma velikih molekulskih masa koji su zadržani u gelu za koncentrovanje, zastupljeniji su u nativnim uslovima nego u denaturišućim, implicirajući da je većina BSA oligomera koji se mogu uočiti pod nativnim uslovima nekovalentne prirode. Uprkos povećanju molekulske mase BSA molekula modifikovanih Trautovim reagensom usled uvođenja sulfhidrilnih grupa, u nativnim uslovima se primećuje veća mobilnost monomerne forme modifikovanih proteina u odnosu na nemodifikovani. Ovaj rezultat ukazuje na to da porast mobilnosti BSA, usled povećanja negativne šarže molekula proteina, nadmašuje smanjenje mobilnosti proteina usled povećanja molekulske mase.

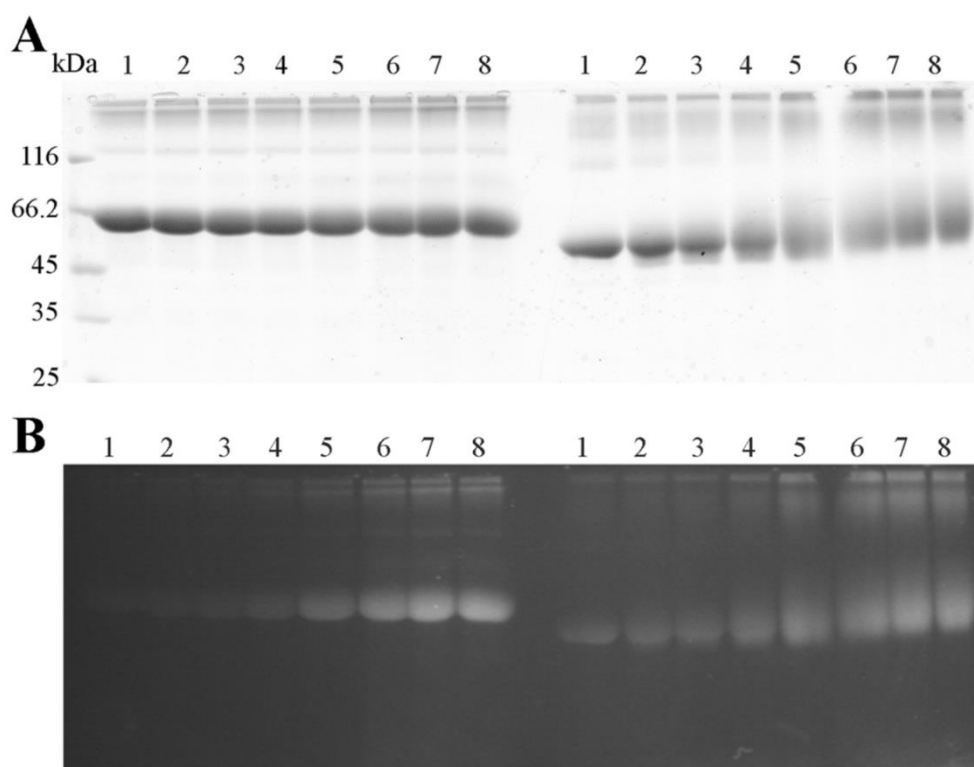
4.2.4. Kovalentna modifikacija BSA modifikovanog Trautovim reagensom fikocijanobilinom

Nakon tiolovanja BSA Trautovim reagensom u različitim molarnim odnosima, modifikovani BSA je kovalentno modifikovan PCB-om, korišćenjem dvadesotostrukog molarnog

viška pigmenta u odnosu na protein. Funkcionalne osobine dobijenog BSA–PCB konjugata su ispitane i upoređene sa nemodifikovanim proteinom u pogledu antioksidativnog potencijala i sposobnosti vezivanja bioaktivnih liganada, poput kvercetina.

4.2.4.1. Priprema kovalentnih adukata fikocijanobilina i BSA modifikovanog Trautovim reagensom

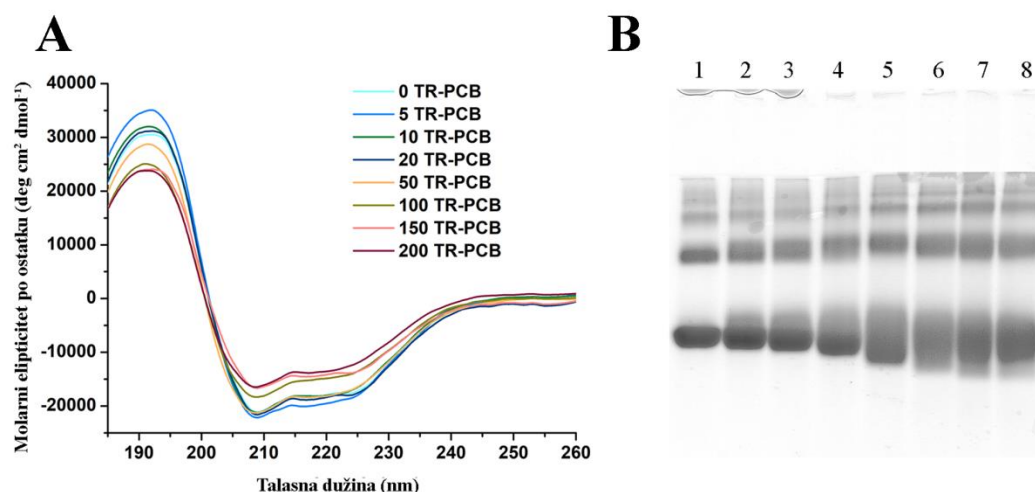
BSA, prethodno modifikovan Trautovim reagensom, čime je dobijen panel modifikovanih proteina koji su sadržavali različit broj uvedenih sulfhidrilnih grupa, modifikovan je PCB-om. Uspešnost modifikacije je analizirana elektroforetski, korišćenjem osobine PCB-a da kompleksira jone cinka i formira fluorescentne proizvode koji se mogu vizualizovati pod UV svetlošću. Nakon bojenja cink-sulfatom, gel je bojem uobičajenom metodom, odnosno Coomassie Brilliant Blue bojom. Kao što se može uočiti na **Slici 53B**, pozicija fluorescentnog proizvoda poklapa se sa pozicijom BSA na gelu bojenom CBB-om (**Slika 53A**), ukazujući na formiranje kovalentne veze između molekula BSA i PCB-a.



Slika 53. Natrijum-dodecilsulfat poliakrilamidna gel elektroforeza (10% gel) konjugata PCB-a i BSA tiolovanog različitim molarnim odnosima Trautovog reagensa. Gel bojen (**A**) Coomassie Brilliant Blue R-250 bojom i (**B**) cink-sulfatom, nakon čega je vizualizovan pod UV lampom. Na levoj strani oba gela je SDS-PAGE pod redukujućim uslovima, a na desnoj strani isti uzorci u neredukujućim uslovima. Uzorak 1: Konjugat PCB-a i netiolovanog BSA; uzorci 2-8: konjugat PCB-a i BSA tiolovanog različitim molarnim odnosima TR:BSA (5, 10, 20, 50, 100, 150 i 200 mol Trautovog reagensa po molu BSA, redom).

Kako BSA ima jednu slobodnu sulfhidrilnu grupu koja je slobodna za reakciju sa PCB-om, fluorescentni signal vidljiv je delimično čak i u kontrolnom uzorku proteina (0 TR) koji nije modifikovan Trautovim reagensom. Međutim, povećanje molarnog odnosa Trautovog reagensa u odnosu na protein dovodi do amplifikacije fluorescentnog signala BSA–PCB konjugata. Povećanje fluorescencije koja potiče od PCB-a vidljivo je sve do stotrukog molarnog viška reagensa u odnosu na protein (uzorak označen kao 100 TR), nakon čega više nema daljih promena u intenzitetu fluorescencije, što je u skladu sa sadržajem uvedenih tiolnih grupa (**Poglavlje 4.2.1.**). Na **Slici 53B** može se uočiti da je PCB konjugovan ne samo za tiolovani BSA u monomernoj formi, već i za više

oligomerne forme, ukazujući na to da agregiranje BSA (nekovalentno) ili oligomerizacija (kovalentna preko disulfidnih veza) ne utiče značajno na efikasnost konjugacije PCB-a. Tiolovan BSA kovalentno modifikovan PCB-om nema značajno izmenjenu sekundarnu strukturu (**Slika 54A**), niti profil agregiranja (**Slika 54B**) u odnosu na nemodifikovani tiolovani BSA, iz čega se može zaključiti da konjugacija sa PCB-om ne dovodi do daljih strukturnih promena BSA u odnosu na reakciju tiolovanja Trautovim reagensom.



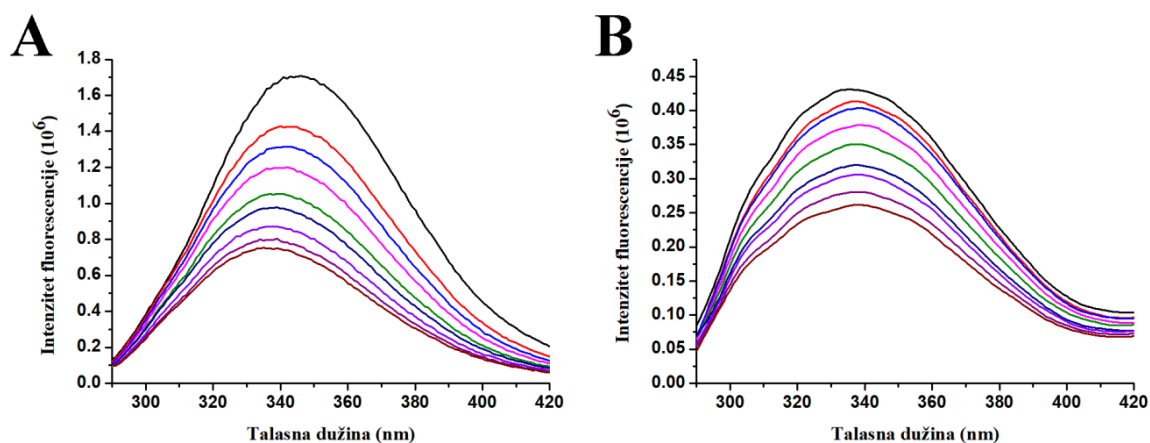
Slika 54. Karakterizacija BSA–PCB konjugata. **(A)** CD spektri u dalekoj-UV oblasti nativnog BSA (0 TR) i BSA modifikovanog različitim molarnim odnosima Trautovog reagensa (5, 10, 20, 50, 100, 150 i 200 mol TR prema mol BSA) koji su potom modifikovani fikocijanobilinom. **(B)** Poliakrilamidna gel elektroforeza (10% gel) u nativnim uslovima konjugata nativnog (netiolovanog) BSA i tiolovanog BSA sa fikocijanobilinom. 1 – konjugat netiolovanog BSA i PCB-a, 2-8 – konjugati BSA, tiolovanog različitim molarnim odnosima Trautovog reagensa (5, 10, 20, 50, 100, 150 i 200 mol TR prema mol BSA, redom), i PCB-a.

4.2.5. Funkcionalne osobine BSA kovalentno modifikovanog fikocijanobilinom

Kako bi se ispitali efekti konjugacije PCB-a za BSA na funkcionalne osobine proteina, ispitane su ligand-vezujuće i antioksidativne osobine BSA–PCB konjugata i upoređene sa nekonjugovanim i netiolovanim BSA. Eksperimenti su izvedeni korišćenjem BSA–PCB konjugata koji je pripremljen tako što je BSA najpre tiolovan pedesetostрукim molarnim viškom Trautovog reagensa, koji je prethodno odabran kao optimalan odnos reagensa za modifikaciju BSA, a zatim je tako tiolovani BSA modifikovan dvadesetostрукim molarnim viškom PCB-a.

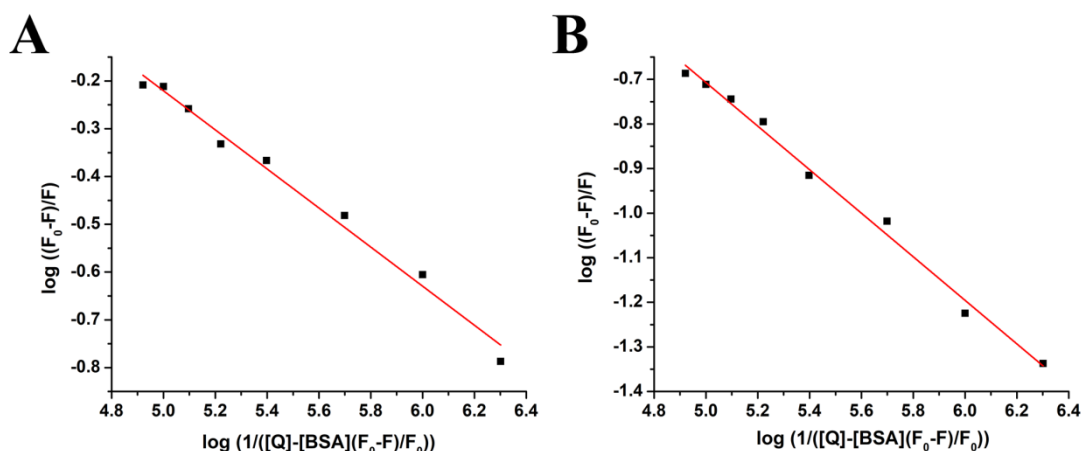
4.2.5.1. Ligand-vezujuće osobine BSA–PCB konjugata

Kako je BSA, zbog svoje osobine da vezuje različite endogene i egzogene ligande, često razmatran kao nosač raznih bioaktivnih jedinjenja u različitim formulacijama za dodatak ishrani (Visentini et al., 2023), od interesa je bilo ispitati da li konjugacija PCB-a za BSA značajno utiče na ligand-vezujuće osobine BSA. Za ispitivanje efekta konjugacije PCB-a na vezivne osobine BSA kao model sistem za male, bioaktivne ligande koji se vezuju za BSA izabran je kvercetin, flavonoid za koji je poznato da se vezuje za BSA umerenim afinitetom (Papadopoulou et al., 2005). Promene unutrašnje fluorescencije, koja potiče od ostataka triptofana, nativnog BSA (nekonjugovanog i netiolovanog) (**Slika 55A**) i BSA kovalentno modifikovanog PCB-om (**Slika 55B**) nakon titrovanja kvercetinom upotrebljene su za računanje konstanti afiniteta (K_a) za kvercetin.



Slika 55. Emisioni spektri 0,5 μM BSA u prisustvu rastućih koncentracija kvercetina (0; 0,5; 1; 2; 4; 6; 8; 10 i 12 μM , za krive od a-i, redom) (ekscitacija na 280 nm). (A) nativni BSA (netiolovani i nekonjugovani) i (C) BSA tiolovan Trautovim reagensom u odnosu 50:1 i modifikovan fikocijanobilinom u odnosu 20:1.

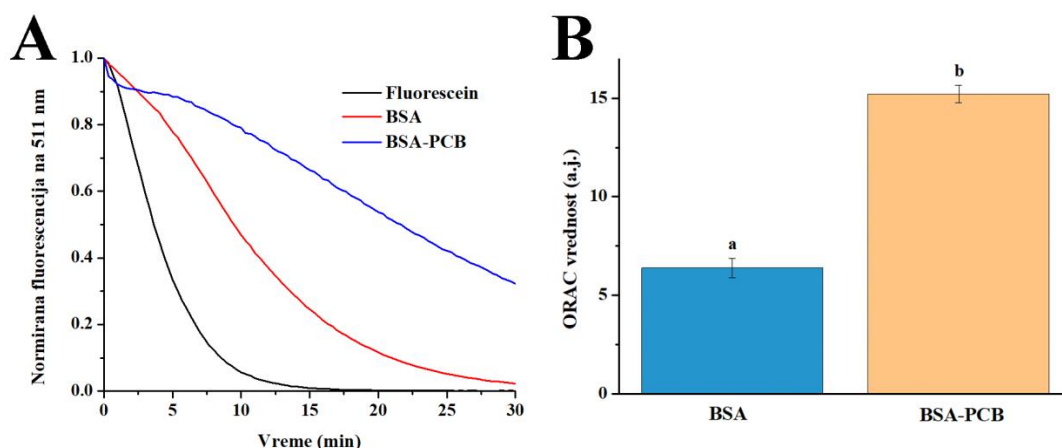
Štern-Volmerovi grafici za određivanje konstante vezivanja kvercetina za nativan i PCB-om modifikovan tiolovan BSA prikazani su na **Slikama 56A** i **56B**, redom. Izračunate konstante vezivanja kvercetina iznose $(2,3 \pm 0,9) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ ($n=2$) za nemodifikovan BSA i $(0,4 \pm 0,1) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ ($n=2$) za BSA–PCB konjugat. Konstanta vezivanja kvercetina, iako je nešto manja za BSA–PCB konjugat, istog je reda veličine, što ukazuje na očuvanost ligand-vezujućih osobina BSA ili makar na očuvanje vezivnog mesta lociranog u subdomenu IIA (Sadlounovo mesto I) za koje se kvercetin preferencijalno vezuje (Ni et al., 2009).



Slika 56. Štern-Volmerovi grafici za određivanje konstante vezivanja kvercetina za (A) nativan i (B) PCB-om modifikovan tiolovan BSA.

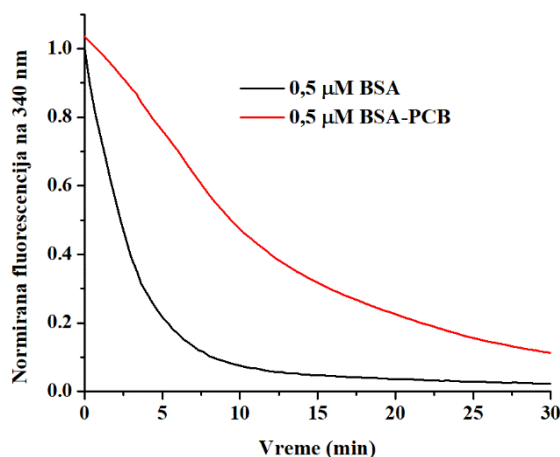
4.2.5.2. Antioksidativne osobine BSA–PCB konjugata

Antioksidativna aktivnost BSA–PCB konjugata evaluirana je *in vitro* korišćenjem ORAC esej a i upoređena sa nemodifikovanim BSA. Brzina oksidacije fluoresceina, koja se indirektno može kvantifikovati preko površine ispod odgovarajuće krive opadanja fluorescencije, manja je u prisustvu BSA nego bez njegovog prisustva (**Slika 57A**). Usporavanje oksidacije fluoresceina još je izraženije u prisustvu BSA–PCB konjugata, što ukazuje na zaštitni efekat PCB komponente BSA–PCB konjugata prema oksidaciji izazvanoj slobodnim radikalima. Uistinu, ako se površine ispod odgovarajućih krivih opadanja fluorescencije posmatraju kao kvantitativna mera antioksidativnog potencijala, BSA–PCB konjugat, sa 2,4 puta većom ORAC vrednošću, pokazuje značajno veću ($p < 0,05$) antioksidativnu aktivnost u ORAC testu u poređenju sa nemodifikovanim molekulom BSA (**Slika 57B**).



Slika 57. (A) Oksidacija fluoresceina indukovana dodatkom AAPH-a, generatora slobodnih radikala, u odsustvu i prisustvu 0,5 μ M nemodifikovanog i netiolovanog BSA proteina (0 TR) i 0,5 μ M BSA-PCB konjugata. (B) ORAC vrednosti nativnog BSA i BSA-PCB konjugata (oba 0,5 μ M); a.j. arbitrarne jedinice.

Istovremeno sa zaštitnim efektom PCB-a prema radikalski posredovanoj oksidaciji malih molekula, PCB takođe ispoljava i zaštitni efekat u pogledu radikalski-indukovane oksidacije samog molekula BSA. Naime, oksidativne modifikacije BSA moguće je pratiti indirektno putem merenja promena unutrašnje fluorescencije proteina na 340 nm (usled oksidacije triptofana) tokom vremena po dodatku AAPH-a, generatora slobodnih radikala. Kao što se može uočiti na **Slici 58**, oksidacija BSA-PCB konjugata, indukovana slobodnim radikalima, sporija je kod BSA konjugovanog sa PCB-om u poređenju sa nemodifikovanim BSA. Površine ispod odgovarajućih krivih značajno ($p < 0,05$) su veće u slučaju BSA-PCB konjugata ($749,5 \pm 14,8$) u poređenju sa nemodifikovanim BSA ($239,1 \pm 2,1$), ukazujući na to da kovalentno vezani PCB štiti BSA od oksidacije izazvane slobodnim radikalima, pri čemu PCB ispoljava protektivni efekat od $68 \pm 0,4\%$.



Slika 58. Opadanje fluorescencije BSA i BSA-PCB konjugata (oba 0,5 μ M) indukovano dodatkom AAPH-a.

4.3. Kovalentne modifikacije proteina fikocijanobilinom nakon modifikacije proteina Trautovim reagensom: IgG antitela

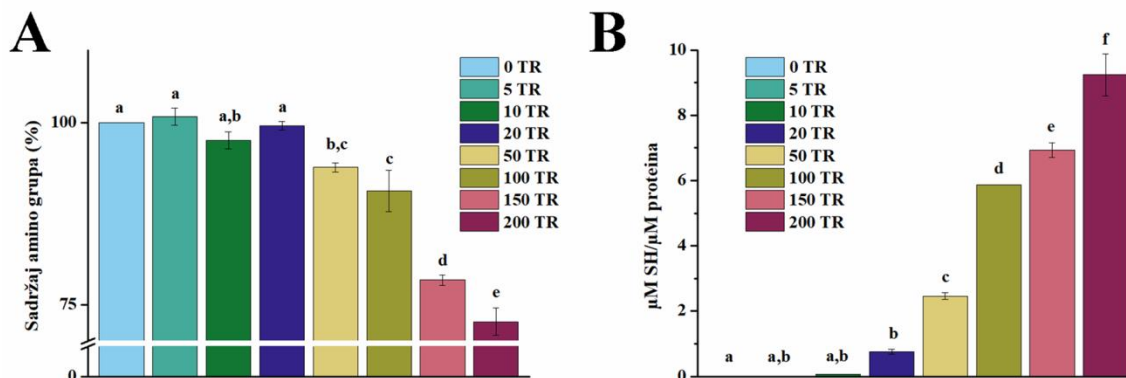
Kako je za optimizaciju metode fluorescentnog obeležavanja sekundarnih kozjih anti-zećjih IgG antitela fikocijanobilinom neophodna veća količina antitela, optimizacija koncentracije Trautovog reagensa potrebne za modifikaciju sekundarnih antitela rađena je korišćenjem humanih IgG antitela, izolovanih i prečišćenih iz seruma dobrovoljaca afinitetnom hromatografijom, korišćenjem Protein A Sepharose matriksa. Optimalan molarni odnos koncentracija Trautovog reagensa i IgG antitela odabran je nakon određivanja sadržaja slobodnih amino i sulfhidrilnih grupa humanih IgG antitela modifikovanih različitim koncentracijama Trautovog reagensa, uz praćenje

promena strukture i proteinskog profila antitela nakon tiolovanja, a zatim primenjen u postupku fluorescentnog obeležavanja sekundarnih kozjih anti-zecjih IgG antitela fikocijanobilinom.

4.3.1. Određivanje stepena tiolovanja humanih IgG antitela Trautovim reagensom

Za procenu stepena modifikacije IgG antitela Trautovim reagensom određivan je ukupan sadržaj amino grupa i sadržaj tiolnih grupa izloženih rastvaraču u modifikovanom proteinu i upoređen sa kontrolnim, nemodifikovanim proteinom. Slično tiolovanju BSA, sa porastom molarnog odnosa Trautovog reagensa dolazi do progresivnog opadanja sadržaja ukupnih amino grupa (**Slika 59A**) i istovremenog porasta broja SH grupa (**Slika 59B**) u molekulu IgG. Međutim, za razliku od modifikacije BSA Trautovim reagensom, prilikom koje se korišćenjem molarnog odnosa 100:1 (TR:BSA, mol:mol) postiže zasićenje, odnosno dalje povećanje molarnog odnosa reagensa ne dovodi do dalje modifikacije molekula BSA, modifikacija IgG antitela se nastavlja sa povećanjem molarnog odnosa reagensa preko molarnog odnosa 100:1.

Naime, prvo značajno opadanje sadržaja amino grupa IgG antitela uočava se tek pri korišćenju pedesetostrukog molarnog viška reagensa, koje dovodi do opadanja sadržaja amino grupa od 100% u kontrolnom, nemodifikovanom proteinu, do $93,9 \pm 0,6$ % u uzorku proteina koji je modifikovan 50:1 odnosom reagensa. Štaviše, dalje povećanje molarnog odnosa reagensa dovodi do još značajnijeg opadanja broja amino grupa, pa se tako, korišćenjem dvestostrukog molarnog viška reagensa, sadržaj amino grupa snižava na $72,6 \pm 1,9$ %. U skladu sa tim, prvo značajno povećanje broja sulfhidrilnih grupa uočava se korišćenjem dvadesetostrukog molarnog viška reagensa, koji prosečno uvodi $0,8 \pm 0,1$ tiolnih grupa po molekulu proteina. Daljim povećanjem molarnog odnosa reagensa postiže se značajno povećanje broja uvedenih sulfhidrilnih grupa, pa se korišćenjem molarnog odnosa reagensa 200:1 postiže uvođenje čak $9,2 \pm 0,6$ sulfhidrilnih grupa po molekulu IgG.

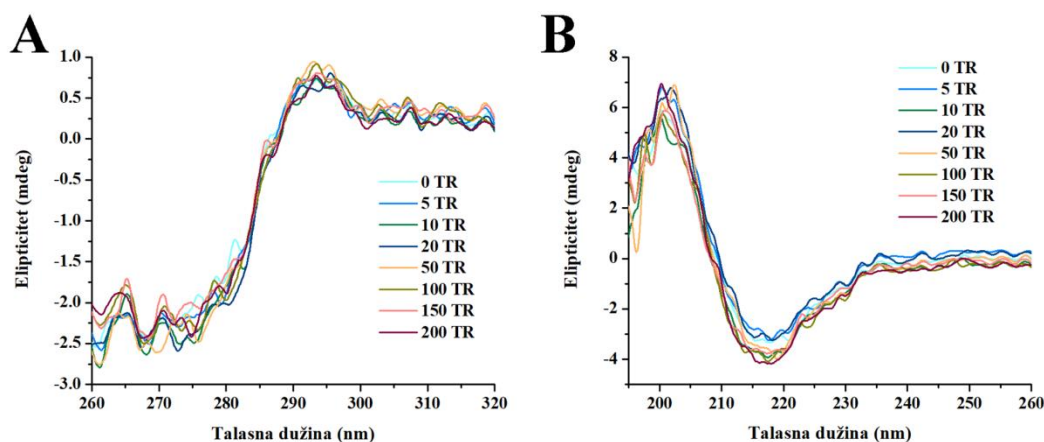


Slika 59. (A) Relativan sadržaj ukupnih amino grupa u humanim IgG antitelima modifikovanim Trautovim reagensom u 5-, 10-, 20-, 50-, 100-, 150- i 200-strukom molarnom višku u odnosu na protein (5 TR, 10 TR, 20 TR, 50 TR, 100 TR, 150 TR i 200 TR, redom) izražen kao udeo od sadržaja izloženih amino grupa u kontrolnom, nemodifikovanom proteinu (0 TR) izraženom kao 100%. (B) Broj izloženih sulfhidrilnih grupa u nemodifikovanim (0 TR) i modifikovanim humanim IgG antitelima, izražen kao $\mu\text{M SH}/\mu\text{M proteina}$. Podaci su analizirani korišćenjem jednofaktorske analize varijanse, uz upotrebu Tukijevog *post hoc* testa na nivou značajnosti od 0,05. Različitim slovima (a do f) su obeleženi uzorci koji se značajno razlikuju ($p < 0,05$).

4.3.2. Efekti tiolovanja Trautovim reagensom na tercijarnu i sekundarnu strukturu humanih IgG antitela

Efekat tiolovanja Trautovim reagensom na tercijarnu i sekundarnu strukturu antitela ispitan je CD spektroskopijom. CD spektri humanih IgG antitela u dalekoj i bliskoj UV oblasti odgovaraju literaturnim spektrima IgG antitela. U dalekoj UV oblasti glavni doprinos CD signalima potiče od β -pločicama bogatih imunoglobulinskih domena, dok u bliskoj UV oblasti signali uglavnom potiču od aromatičnih aminokiselinskih ostataka Tyr i Trp lociranih u varijabilnim regionima antitela (Bruque et al., 2024; Uesson i Hansson, 1982). CD spektri IgG antitela modifikovanih Trautovim

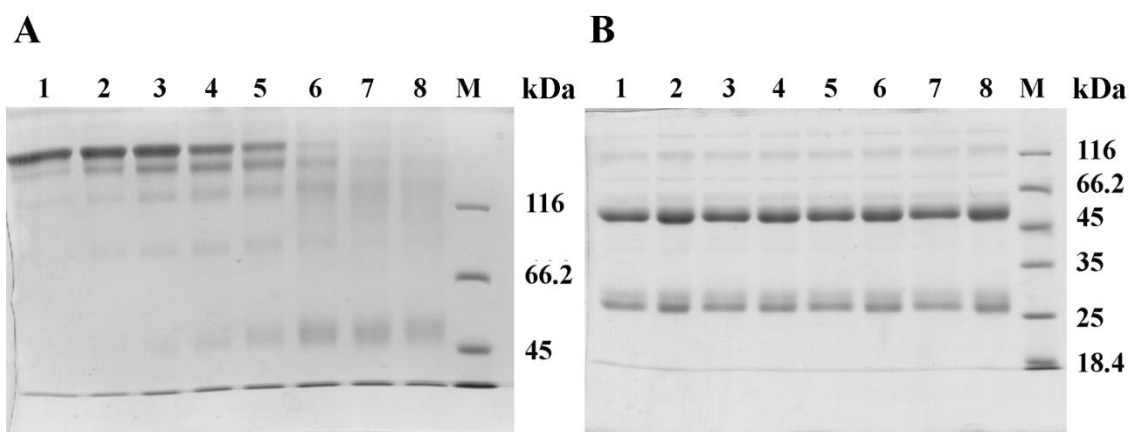
reagensom pokazuju sličan oblik i intenzitet signala kao spektri nemodifikovanih antitela i u bliskoj UV oblasti (**Slika 60A**) i u dalekoj UV oblasti (**Slika 60B**), ukazujući na to da tiolovanje antitela Trautovim reagensom ne dovodi do značajnih promena ni u terciarnoj, a ni u sekundarnoj strukturi antitela.



Slika 60. CD spektri humanih IgG antitela nemodifikovanih (0 TR) i antitela modifikovanih Trautovim reagensom u 5-, 10-, 20-, 50-, 100-, 150- i 200-strukom molarnom višku u odnosu na protein (5 TR, 10 TR, 20 TR, 50 TR, 100 TR, 150 TR i 200 TR, redom) u (**A**) bliskoj i (**B**) dalekoj UV oblasti.

4.3.3. Promene u proteinskom profilu humanih IgG antitela nakon tiolovanja Trautovim reagensom

Elektroforetskom analizom nemodifikovanih i Trautovim reagensom modifikovanih humanih IgG antitela dobija se uvid u promene proteinskog profila antitela nakon tiolovanja Trautovim reagensom. Iako elektroforetski profili nemodifikovanih i modifikovanih antitela u redukujućim uslovima izgledaju identično, odnosno pokazuju trake na identičnim masama (oko 25 kDa i oko 50 kDa), koje odgovaraju masama lakih i teških lanaca antitela (**Slika 61B**), u neredukujućim uslovima su razlike značajne (**Slika 61A**). Naime, tiolovanjem antitela Trautovim reagensom se značajno menja proteinski profil IgG antitela.



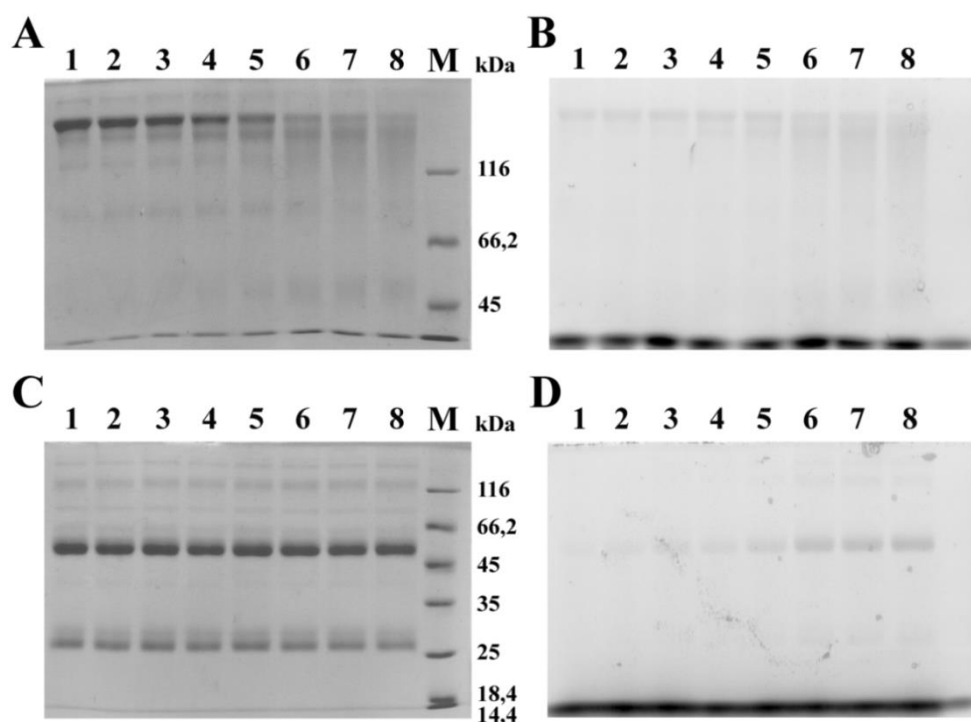
Slika 61. Elektroforetska analiza humanih IgG antitela nemodifikovanih (1) i modifikovanih Trautovim reagensom u molarnom odnosu 5:1 (2), 10:1 (3), 20:1 (4), 50:1 (5), 100:1 (6), 150:1 (7) i 200:1 (8) (reagens:protein) u (**A**) neredukujućim (8% gel) i (**B**) redukujućim uslovima (12% gel). Gelovi su bojeni Coomassie Brilliant Blue R-250 bojom.

Iako modifikacija IgG antitela petostrukim i desetostrukim molarnim viškom Trautovog reagensa ne menja sadržaj amino i sulfhidrilnih grupa antitela (**Slika 59**), ove koncentracije reagensa dovode do suptilnih promena proteinskog profila modifikovanih antitela, pa se u

neredukujućim uslovima, pored trake koja odgovara intaktnom molekulu antitela (oko 150 kDa), mogu uočiti i trake nižih masa, od kojih su najizraženije trake molekulskih masa oko 125 kDa, 100 kDa i oko 75 kDa, za koje je pretpostavka da potiču od fragmentisanih molekula antitela, i to onih: kojima nedostaje jedan laki lanac (125 kDa), kog čine dva teška lanca (100 kDa) i poluantitela kog čine jedan laki i jedan teški lanac (75 kDa). Nesaglasnost sa rezultatima sadržaja slobodnih sulfhidrilnih grupa mogla bi se možda objasniti izmenom dela intermolekulskih disulfida u intramolekulske, čime bi ukupan sadržaj sulfhidrilnih grupa ostao isti, a proteinski profil antitela bio značajno izmenjen. Dalje povećanje molarnog odnosa Trautovog reagensa dovodi do još značajnih promena proteinskog profila modifikovanih antitela, pa tako molarni odnosi reagensa od 20:1 i 50:1 (reagens:antitelo) dovode do povećanja intenziteta traka na pozicijama od 125 kDa, 100 kDa i 75 kDa, ali i do pojave trake na poziciji od oko 50 kDa, dok molarni odnosi reagens:antitelo 100:1 i veći (150:1 i 200:1, reagens:antitelo) dovode do gotovo potpunog izostanka trake intaktnog molekula antitela i značajnog intenziteta trake molekulske mase oko 50 kDa. Trake na poziciji 50 kDa potiču od monomernog teškog lanca, kao i od dimera lakog lanca. Sa porastom molarnog odnosa Trautovog reagensa primetan je i porast intenziteta proteinske trake na frontu gela, čija se masa, zbog male gustine gela, ne može precizno odrediti, a potiče od monomernog lakog lanca antitela (25 kDa).

4.3.4. Kovalentna modifikacija humanih IgG antitela modifikovanih Trautovim reagensom fikocijanobilinom

Humana IgG antitela, prethodno modifikovana Trautovim reagensom, modifikovana su potom PCB-om, korišćenjem dvadesetostrukog molarnog viška PCB-a. Konjugati antitela sa PCB-om analizirani su elektroforetski, korišćenjem osobine PCB-a da fluorescira. Nakon fluorescentne detekcije, gel je bojen uobičajenom metodom, odnosno Coomassie Brilliant Blue bojom.

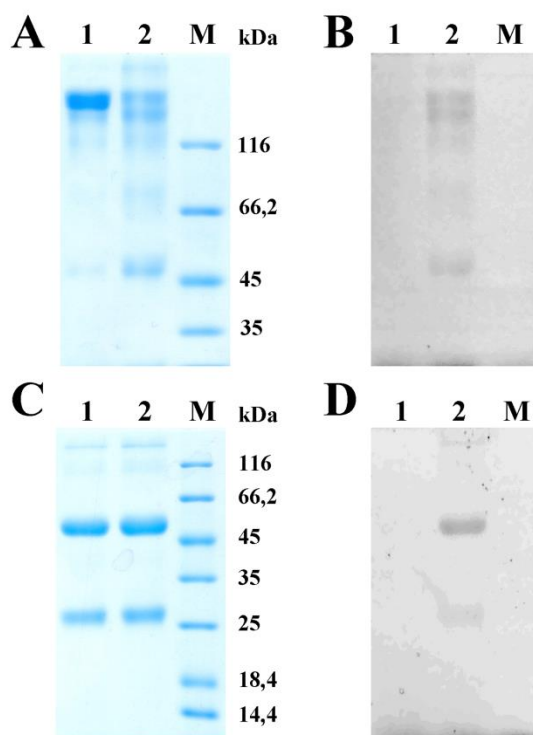


Slika 62. Natrijum-dodecilsulfat poliakrilamidna gel elektroforeza konjugata PCB-a i humanih IgG antitela tiolovanih različitim molarnim odnosima Trautovog reagensa u (A), (B) neredukujućim (8% gel) i (C), (D) redukujućim uslovima (12% gel). Gelovi su bojeni (A), (C) Coomassie Brilliant Blue R-250 bojom ili je (B), (D) konjugat sa PCB-om detektovan fluorescentnim skeniranjem gela (eksitacija 532 nm, emisija 580 nm). Uzorak 1: Kontrolni uzorak netiolovanih humanih IgG antitela inkubiranih sa PCB-om; uzorci 2-8: konjugat PCB-a i humanih IgG antitela tiolovanih različitim molarnim odnosima TR:IgG (5, 10, 20, 50, 100, 150 i 200 mol Trautovog reagensa po molu IgG-a).

Kao što se može uočiti na **Slikama 62B i 62D**, pozicije fluorescentnih proizvoda poklapaju se sa pozicijama proteinskih traka na gelovima bojenim CBB-om (**Slika 62A i 62C**), ukazujući na formiranje kovalentne veze između molekula antitela i PCB-a. Sa povećanjem molarnog odnosa Trautovog reagensa, dolazi do kontinualnog povećanja intenziteta fluorescentnog signala antitela, što je u saglasnosti i sa sadržajem sulfhidrilnih grupa, koji kontinualno raste sa povećanjem koncentracije reagensa. Međutim, uzevši u obzir negativan uticaj tiolovanja na kvaternarnu strukturu antitela, kao optimalan molarni odnos Trautovog reagensa za modifikaciju IgG antitela odabran je odnos 50:1 u korist reagensa, kojim se u, u proseku, uvodi 2,5 mola sulfhidrilnih grupa po molu proteina.

4.3.5. Kovalentna modifikacija sekundarnih IgG antitela modifikovanih Trautovim reagensom fikocijanobilinom

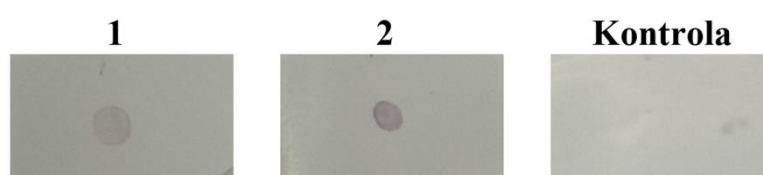
Sekundarna kozja anti-zečja IgG antitela modifikovana su najpre pedesetostrukim molarnim viškom Trautovog reagensa, nakon čega su modifikovana dvadesetostrukim molarnim viškom PCB-a. Uspešnost modifikacije analizirana je elektroforetski. Na **Slici 63** prikazani su dobijeni elektroforetski profili, na kojima se može uočiti da je uvođenjem sulfhidrilnih grupa u molekul antitela omogućeno njihovo fluorescentno obeležavanje PCB-om. Slično prethodno uočenom za modifikaciju humanih IgG antitela, i tiolovanjem kozjih anti-zečjih antitela dolazi do promene proteinskog profila antitela u neredukujućim uslovima, u smislu pojave traka nižih molekulskih masa od mase intaktnog molekula antitela (150 kDa), uključujući trake od 125 kDa, 100 kDa, 75 kDa i 50 kDa.



Slika 63. Natrijum-dodecilsulfat poliakrilamidna gel elektroforeza konjugata PCB-a i sekundarnih kozjih anti-zečjih IgG antitela tiolovanih Trautovim reagensom u molarnom odnosu 50:1 u korist reagensu u (A), (B) neredukujućim (8% gel) i (C), (D) redukujućim uslovima (12% gel). Gelovi su bojeni (A), (C) Coomassie Brilliant Blue R-250 bojom ili je (B), (D) konjugat sa PCB-om detektovan fluorescentnim skeniranjem gela (eksitacija 532 nm, emisija 580 nm). Uzorak 1: Kontrolni uzorak netiolovanih sekundarnih kozjih anti-zečjih IgG antitela inkubiranih sa PCB-om; uzorak 2: konjugat PCB-a i sekundarnih IgG antitela tiolovanih Trautovim reagensom u odnosu 50:1 (mol:mol, reagens:protein).

4.3.6. Imunološka reaktivnost sekundarnih IgG antitela modifikovanih fikocijanobilinom

Imajući u vidu da kovalentna modifikacija može negativno uticati na funkcionalne osobine antitela, ispitan je uticaj kovalentne modifikacije PCB-om na imunološku reaktivnost sekundarnih IgG antitela u pogledu njihove specifičnosti i osetljivosti prepoznavanja antigena, koristeći tropomiozin poreklom iz škampa kao antigen i zečja anti-tropomiozin antitela kao primarna antitela. Prvi eksperiment je imao za cilj da pokaže da li modifikovana antitela zadržavaju sposobnost prepoznavanja antigena, korišćenjem tercijarnih antitela specifičnih za modifikovana kao detekcionih antitela. Na **Slici 64** se može primetiti pozitivan signal za oba primenjena razblaženja PCB-om obeleženih antitela (500 i 1000 puta), što potvrđuje da modifikovana antitela zadržavaju svoje funkcionalne osobine, kako u pogledu antigen-vezujućeg regiona, tako i u pogledu Fc regiona, kog prepoznaju korišćena tercijarna antitela.



Slika 64. Dot blot detekcija tropomiozina. Nakon direktnog nanošenja tropomiozina na membranu, membrana je najpre inkubirana sa zečjim anti-tropomiozin antitelima kao primarnim, zatim sa kozjim anti-zečjim antitelima obeleženim fikocijanobilinom razblaženim (1) 1000 puta i (2) 500 puta kao sekundarnim antitelima i na kraju sa magarećim anti-kozjim antitelima obeleženim alkalnom fosfatazom kao tercijarnim antitelima. Kontrola – kontrola nespecifičnog prepoznavanja sekundarnih i tercijarnih antitela.

Iako je specifičnost anti-zečjih antitela zadržana i nakon modifikacije PCB-om, korišćenjem sekundarnih antitela obeleženih fikocijanobilinom kao detekcionih antitela nije ostvarena detekcija antigena, ni korišćenjem 1000 puta, niti korišćenjem 500 puta razblaženog antitela (**Slika 65**), zbog čega je dalje određeno maksimalno razblaženje, tj. minimalna količina ovih antitela koja se pouzdano može detektovati na membrani pri korišćenim uslovima detekcije.



Slika 65. Dot blot fluorescentna detekcija tropomiozina sekundarnim kozjim anti-zečjim IgG antitelima obeleženim fikocijanobilinom (eksitacija 532 nm, emisija 580 nm). Nakon direktnog nanošenja tropomiozina na membranu, membrana je najpre inkubirana sa zečjim anti-tropomiozin antitelima, a zatim sa kozjim anti-zečjim antitelima obeleženim fikocijanobilinom razblaženim (1) 1000 puta i (2) 500 puta. Kontrola – kontrola sekundarnih antitela.

Analizom serijskog razblaženja sekundarnih antitela obeleženih PCB-om pokazano je da se ona mogu detektovati na membrani pri maksimalnom razblaženju od 4^3 (64) puta, što, uzimajući u obzir zapreminu antitela nanetu na gel, odgovara količini od oko 12 ng antitela (**Slika 66**). Imajući to u vidu, jasno je da je efektivna količina detekcionih antitela u prethodnom eksperimentu manja od limita detekcije korišćene metode.



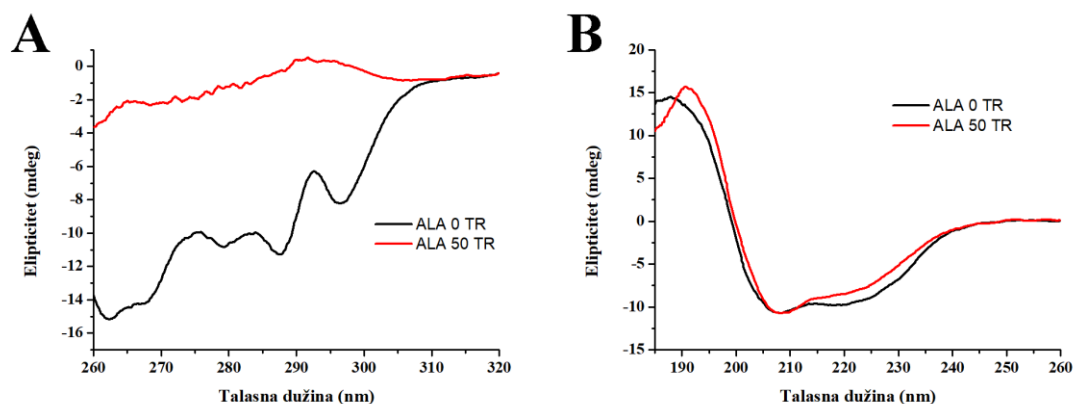
Slika 66. Dot blot fluorescentna detekcija serijskog četverostrukog razblaženja sekundarnih kozjih anti-zečjih antitela obeleženih fikocijanobilinom (eksitacija 532 nm, emisija 580 nm). Nerazblažena antitela (4^0), antitela razblažena 4 puta (4^1), 16 puta (4^2), 64 puta (4^3), 256 puta (4^4) i 1024 puta (4^5).

4.4. Kovalentne modifikacije proteina fikocijanobilinom nakon modifikacije proteina Trautovim reagensom: α -laktalbumin

Pored modifikacije IgG antitela, pokušano je fluorescentno obeležavanje fikocijanobilinom α -laktalbumina (ALA), još jednog proteina koji u svom nativnom obliku ne sadrži slobodnu sulfhidrilnu grupu. Sulfhidrilne grupe su uvedene u molekul proteina korišćenjem samo jednog molarnog odnosa Trautovog reagensa (50:1), po uzoru na rezultate prethodno dobijene za BSA i antitela, nakon čega je određen sadržaj ukupnih amino grupa i izloženih slobodnih sulfhidrilnih grupa u molekulu ALA koji je modifikovan Trautovim reagensom. Kovalentnom modifikacijom ALA pedesetostrukim molarnim viškom reagensa dolazi do opadanja sadržaja amino grupa za 65%, odnosno sa 100% u nemodifikovanom uzorku proteina na $35 \pm 2,4$ % u modifikovanom proteinu, pri čemu broj uvedenih sulfhidrilnih grupa po molekulu proteina raste sa 0 u kontrolnom, netiolovanom proteinu, na $1,6 \pm 0,1$ u tiolovanom uzorku ALA.

4.4.1. Efekti tiolovanja Trautovim reagensom na terciarnu i sekundarnu strukturu α -laktalbumina

Spektroskopijom cirkularnog dihiroizma u bliskoj i dalekoj UV oblasti analiziran je uticaj tiolovanja Trautovim reagensom na terciarnu i sekundarnu strukturu ALA. CD spektri kontrolnog, netiolovanog ALA u bliskoj UV oblasti, na pH 9 (**Slika 67A**), nalikuju literaturnim CD spektrima apo forme proteina na neutralnim pH vrednostima, koji pokazuju nešto manje intenzitete signala, odnosno blago izmenjenu terciarnu strukturu proteina, u poređenju sa holo formom proteina na neutralnim pH vrednostima (Radibratovic et al., 2019). Dobijeni rezultati nisu iznenađujući, s obzirom da je i kontrolni uzorak proteina takođe inkubiran u puferu koji je sadržavao EDTA, koji kompleksira jone kalcijuma neophodne za održavanje native strukture ALA. S druge strane, tiolovanjem ALA Trautovim reagensom dolazi do drastične promene u CD spektrima u bliskoj UV oblasti, odnosno potpunog gubitka terciarne strukture proteina (**Slika 67A**). Spektri tiolovanog proteina slični su onima koji su u literaturi dobijeni za strukturu proteina na kiselim pH vrednostima (pH 2,5 i pH 1,2), na kojima je protein u konformaciji stopljene globule (Radibratovic et al., 2019).



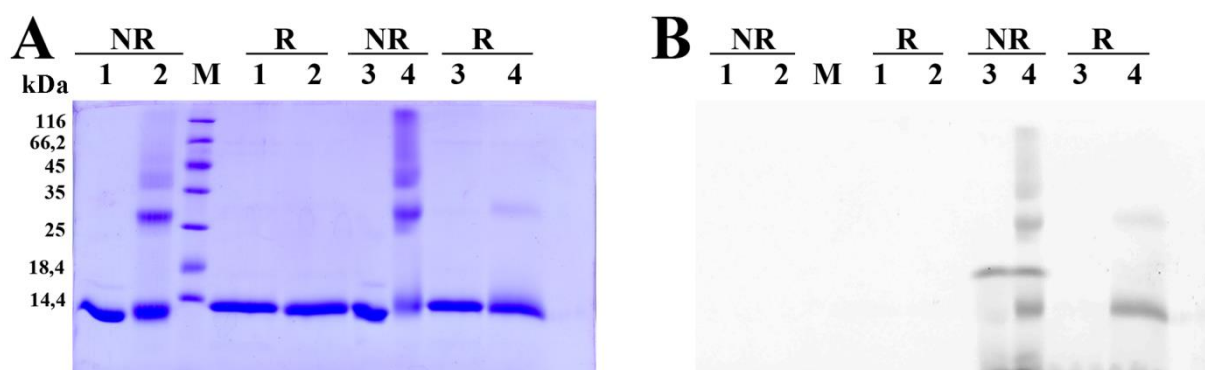
Slika 67. CD spektri goveđeg nemodifikovanog α -laktalbumina (0 TR) i α -laktalbumina modifikovanog Trautovim reagensom u pedesetostrukom molarnom višku u odnosu na protein (50 TR) u (A) bliskoj i (B) dalekoj UV oblasti.

Slično CD spektrima u bliskoj UV oblasti, i CD spektri netiolovanog ALA u dalekoj UV oblasti (**Slika 67B**) nalikuju spektrima apo forme proteina na neutralnim pH vrednostima, u kojima se uočava blago povećanje intenziteta minimuma na 208 nm, u poređenju sa holo formom proteina (Radibratovic et al., 2019). CD spektri u dalekoj UV oblasti tiolovanog proteina pokazuju izvesne razlike u poređenju sa spektrima netiolovanog proteina (**Slika 67B**), pri čemu su uočene promene slične onima koje se uočavaju u CD spektrima proteina u dalekoj UV oblasti na kiselim pH vrednostima (Radibratovic et al., 2019).

4.4.2. Promene u proteinskom profilu α -laktalbumina nakon tiolovanja Trautovim reagensom

Nakon modifikacije Trautovim reagensom, tiolovani ALA kovalentno je modifikovan PCB-om dvočasovnim inkubiranjem sa dvadesetostrukim molarnim viškom PCB-a. Elektroforetskom analizom u neredukujućim i redukujućim uslovima analizirani su uticaj tiolovanja na proteinski profil ALA, kao i uspešnost modifikacije PCB-om.

Kao što se na **Slici 68** može primetiti, tiolovanjem ALA Trautovim reagensom značajno se menja proteinski profil proteina. Naime, u neredukujućim uslovima uočavaju se proteinske trake na pozicijama koje po masi odgovaraju dimerima, trimerima i drugim oligomerima viših molekulskih masa α -laktalbumina (uporediti trake 1 i 2). Odsustvo ovih traka u redukujućim uslovima ukazuje na disulfidnu prirodu veze u oligomerima ALA. Prisustvo oligomera ALA ujedno ukazuje na to da se tiolovanjem ALA najverovatnije uvodi veći broj sulfhidrilnih grupa od broja određenog u testu sa Elmanovim reagensom ($1,6 \pm 0,1$), ali one podležu oksidaciji i građenju disulfidnih mostova sa drugim molekulima ALA.



Slika 68. Natrijum-dodecilsulfat poliakrilamidna gel elektroforeza (16% gel) (1) netiolovanog α -laktalbumina (ALA), (2) ALA tiolovanog Trautovim reagensom u molarnom odnosu 50:1 u korist reagensa, (3) netiolovanog ALA inkubiranog sa fikocijanobilinom (PCB) i (4) tiolovanog ALA inkubiranog sa PCB-om u neredukujućim (NR) i redukujućim (R) uslovima. Gelovi su bojeni (**A**) Coomassie Brilliant Blue R-250 bojom ili je (**B**) konjugat sa PCB-om detektovan fluorescentnim skeniranjem gela (eksitacija 532 nm, emisija 580 nm).

Inkubiranjem tiolovanog proteina sa PCB-om dolazi do kovalentne modifikacije uvedenih sulfhidrilnih grupa (**Slika 68B, desno**). Molekul PCB-a konjugovan je ne samo za monomerni oblik ALA, već i za sve oligomerne forme ALA (videti uzorak 4 u neredukujućim uslovima). Interesantno je i prisustvo fluorescentne trake na poziciji od 18,4 kDa, koja po masi odgovara BLG-u, kako u kontrolnom, netiolovanom uzorku ALA, tako i u tiolovanom, što ukazuje na to da preparat ALA nije bio u potpunosti čist. Kako je na gelu bojenom CBB-om (**Slika 68A**) traka BLG-a značajno manjeg intenziteta, dobijeni rezultati ukazuju na povećanu osetljivost detekcije BLG-a modifikovanog PCB-om fluorescentnim skeniranjem, u poređenju sa detekcijom bojenjem CBB-om. Isti nivo fluorescencije BLG-a u netiolovanom i tiolovanom uzorku ALA ukazuje na preferencijalnu modifikaciju ALA, što i ne čudi, imajući u vidu značajno veću količinu ALA u uzorku.

5. Diskusija

U okviru ove doktorske disertacije ispitana je mogućnost kovalentne modifikacije odabranih globularnih proteina fikocijanobilinom, intenzivno plavo obojenom tetrapirolnom hromoforom fikobiliproteina C-fikocijanina. C-fikocijanin je glavni protein Spiruline, cijanobakterije koja poseduje brojne osobine pozitivne po zdravlje ljudi. Pozitivni efekti C-PC-a umnogome se pripisuju njegovoj hromofori PCB-u. Pored brojnih bioaktivnih svojstava, C-PC odlikuju izražena fluorescentna svojstva, koja takođe potiču od hromofore.

Kako se kovalentnim modifikacijama proteina mogu proširiti funkcije proteina, cilj ove doktorske disertacije bio je ispitivanje mogućnosti funkcionalizacije proteina PCB-om, bilo u cilju dobijanja kovalentno modifikovanih proteina hrane sa poboljšanim funkcionalnim i tehnološkim osobinama, bilo u cilju dobijanja fluorescentnih proba za upotrebu u tehnikama koje se baziraju na fluorescenciji.

Proteini koji su poslužili kao model proteini za kovalentnu modifikaciju PCB-om mogli bi se podeliti u dve grupe – one koji sadrže slobodnu sulfhidrilnu grupu, kao što je β -laktoglobulin, protein mleka, i albumin goveđeg seruma, često korišćen kao nosač bioaktivnih molekula, i one koji je u nativnom obliku ne sadrže, kao što su imunoglobulini i α -laktalbumin. U ove proteine sulfhidrilna grupa je najpre uvedena, modifikacijom amino grupa proteina Trautovim reagensom, nakon čega su oni modifikovani PCB-om.

5.1. Kovalentna modifikacija β -laktoglobulina fikocijanobilinom

Beta-laktoglobulin je glavni protein suruke, koji ima značajan uticaj na nutritivne i tehnološke osobine mlečnih proizvoda. Konstanta afiniteta i kinetika vezivanja PCB-a za BLG analizirana je fluorescentnom spektroskopijom. Kovalentno vezivanje pigmenta za BLG ispitano je elektroforetski i masenom spektrometrijom. Uticaj PCB-a na tercijarnu i sekundarnu strukturu BLG-a i konformacione promene PCB-a analizirani su CD spektroskopijom. Molekulskim dokingom i dirigovanom molekulskom dinamikom identifikovana su vezivna mesta PCB-a na molekulu BLG-a.

Dozno-zavisno povećanje fluorescencije PCB-a inkubiranjem sa rastućim koncentracijama BLG-a ukazuje na vezivanje PCB-a za BLG, slično porastu fluorescencije polifenola rezveratrola nakon vezivanja za BLG (Liang et al., 2008). Kvantni prinos hromofore zavisi od rigidnosti njene strukture. U nativnom C-PC-u hromofora ima rigidniju i linearnu konformaciju, u poređenju sa slobodnim PCB-om, koji ima ciklično-helikoidnu i fleksibilnu konformaciju (Scheer i Zhao, 2008), što za posledicu ima uticaj na spektroskopske osobine hromofore. Naime, rigidnija konformacija PCB-a u nativnom proteinu indukuje povećanje fluorescencije za čak tri reda veličine u poređenju sa denaturisanim proteinom, u kom je hromofora u cikličnoj konformaciji (Kupka i Scheer, 2008). Povećanje fluorescencije PCB-a vezivanjem za BLG ukazuje na promenu konformacije PCB-a iz ciklične u linearnu. Procenjena konstanta vezivanja PCB-a za BLG iznosi $4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$. Premda se PCB vezuje za fitohrom konstantom vezivanja koja je za red veličine veća od ove (Li et al., 1995), vezivanje drugih liganada za BLG, kao što je alil-izotocijanat (Keppler et al., 2014a), odvija se sa više nego 10 puta manjim afinitetom u poređenju sa onim dobijenim za BLG-PCB sistem, što ukazuje na umeren afinitet PCB-a za BLG. Iako je vezivanje PCB-a za BLG sporo, sa konstantom brzine od $0,065 \text{ min}^{-1}$, veća brzina formiranja BLG-PCB kompleksa ($0,101 \text{ min}^{-1}$) i veći prinos kompleksa postižu se odvijanjem reakcije u prisustvu 7 M uree. Veća brzina formiranja BLG-PCB kompleksa u prisustvu 7 M uree ukazuje na to da denaturisanje proteina nije uticalo na vezivno mesto za PCB na molekulu proteina i da, pored nekovalentnog vezivanja, dolazi i do kovalentnog vezivanja pigmenta za protein. Štaviše, činjenica da se razvijanjem proteina ureom postiže veći prinos reakcije u poređenju sa reakcijom bez prisustva uree, ukazuje na to da su mete kovalentne modifikacije PCB-om manje izloženi aminokiselinski ostaci, koji su u nativnom proteinu zaklonjeni. Slično povećanje brzine reakcije BLG-a u prisustvu denaturišućeg agensa uočeno je u

reakciji sa DTNB-om (5,5'-ditiobis(2-nitrobenzojeva kiselina, Elmanov reagens) u prisustvu guanidin-hidroklorida (Sakai et al., 2000).

Formiranje kovalentne veze između BLG-a i PCB-a potvrđeno je elektroforetskom analizom smeše BLG-a i PCB-a i vizualizacijom poliakrilamidnog gela pod UV lampom, nakon prethodnog inkubiranja gela u rastvoru cink-sulfata. Naime, oslanjajući se na sposobnost PCB-a da sa jonima Zn^{2+} formira fluorescentni proizvod, u gelu je na poziciji koja po masi odgovara traci monomera BLG-a detektovana fluorescencija, potvrđujući time kovalentno vezivanje BLG-a i PCB-a. Veći prinos reakcije formiranja BLG-PCB adukta u prisustvu 7 M uree, osim fluorescentnom spektroskopijom, potvrđen je i elektroforetski. Naime, inkubiranjem smeše BLG-a i PCB-a u prisustvu 7 M uree, na gelu se uočava veći intenzitet fluorescencije na poziciji monomera BLG-a, u poređenju sa smešom koja je inkubirana bez prisustva uree (samo u puferu). Ako se dodatno uzme u obzir činjenica da je deo BLG-a nagradio S-S dimere u prisustvu uree, tim pre je razlika u intenzitetu fluorescentnog signala monomerne forme značajnija. Smanjenje intenziteta trake dimerne forme BLG-a u prisustvu PCB-a, u odnosu na kontrolni BLG koji je inkubiran bez PCB-a, ukazuje na ulogu cisteina u vezivanju PCB-a. Činjenica da samo monomerna forma BLG-a, koja ima slobodni ostatak cisteina, gradi fluorescentni proizvod, dodatno potkrepljuje ove tvrdnje. Kao dodatna potvrda kovalentnog vezivanja pigmenta za BLG, poslužilo je poređenje UV/VIS spektara dijalizovanog BLG-PCB adukta i slobodnog PCB-a. Naime, i slobodan PCB i dijalizovani BLG-PCB adukt pokazuju slične UV-VIS spektre, sa apsorpcionim maksimumima koji se razlikuju u svega par nanometara.

Kao potvrda da se kovalentna modifikacija BLG-a PCB-om zaista ostvaruje posredstvom cisteina poslužio je eksperiment blokiranja ostataka cisteina alkilovanjem jodacetamidom, kojim se inhibira formiranje BLG-PCB adukta. Osim toga, fluorescentni spektri PCB-a inkubiranog sa različitim aminokiselinama nukleofilnog bočnog ostatka (cisteinom, lizinom, argininom i histidinom) pokazuju sličnost fluorescentnog spektra PCB-a inkubiranog sa cisteinom i spektra BLG-PCB adukta. Štaviše, fluorescentni spektar dijalizovanog BLG-PCB adukta sličan je spektru nativnog C-fikocijanina.

PCB je u fikobiliproteinima kovalentno vezan za ostatke cisteina preko svoje etilidenske grupe (Scheer i Zhao, 2008). Osim toga, pokazano je da metil ester L-cisteina može da formira kovalentne adukte sa PCB-om (Bishop et al., 1991). Štaviše, slično našim rezultatima, formiranje C-PC-a praćeno je značajnim porastom fluorescencije PCB-a nakon dodavanja α -subjedinice C-fikocijanina kompleksu PCB-a sa fikobiliprotein lijazom (Zhao et al., 2006). Dobijeni rezultati nedvosmisleno ukazuju na to da se vezivanje PCB-a za BLG odvija preko slobodnog ostatka cisteina. Slobodni ostatak cisteina BLG-a nalazi se duboko u unutrašnjosti proteina, zbog čega je u nativnom proteinu manje reaktivan (Le Maux et al., 2014; Vetri i Militello, 2005). Imajući to u vidu, ne čudi da je vezivanje PCB-a za BLG na pH 7,2 sporo i odvija se desetinama minuta, a formiranje adukta prati kinetiku pseudo-prvog reda. Slični rezultati prethodno su opisani za reakciju između bilina (uključujući PCB) i apofitohroma (Li et al., 1995). U navedenoj studiji predloženo je da se formiranje holo-fitohroma odvija u dva koraka: u prvom koraku dolazi do brzog formiranja nekovalentnog kompleksa između bilina i apo-fitohroma, nakon čega u sledećem koraku dolazi do sporog formiranja tioetarske veze. Sličan mehanizam predložen je i za spontano vezivanje PCB-a za apo-fikocijanin u *in vitro* uslovima (Arciero et al., 1988). Prema tome, čini se da brzo formiranje nekovalentnog BLG-PCB kompleksa prethodi sporom formiranju kovalentnog adukta. U prisustvu uree, protein se denaturiše, čime slobodni ostaci cisteina postaju izloženi za reakciju sa pigmentom, zbog čega je prinos reakcije modifikacije veći u prisustvu 7 M uree. Ipak, spontano vezivanje PCB-a za slobodan ostatak cisteina ne odvija se u velikom prinosu, verovatno zbog nestabilnosti hromofore (Arciero et al., 1988), koja se zapaža i u UV/VIS apsorpcionim spektrima, u kojima se uočava prisustvo oksidacionih proizvoda PCB-a. Zbog toga je rastvor dijalizovanog BLG-PCB adukta obogaćen dodatnim inkubiranjem sa svežim rastvorom PCB-om, čime je postignut prinos adukta od 71-72% (zavisno od metode određivanja).

Masenom spektrometrijom BLG–PCB adukta i daljom fragmentacijom nastalih jona potvrđeno je da se obe izoforme BLG-a (A i B) modifikuju PCB-om. Međutim, porast mase po molekulu proteina bio je oko 325 Da, što je gotovo dvostruko manje od mase intaktnog PCB-a. Predložena struktura PCB-a u BLG–PCB aduktu, koja sadrži samo dva tetrapirolna jezgra, najverovatnije je slična propentdiopentima, oksidovanim metabolitima bilirubina (Kunikata et al., 2000). Kako ovakav adukt nije konjugovan dovoljno da bi apsorbovao na oko 600 nm, a imajući u vidu apsorpcione spektre BLG–PCB adukta, fragmentacija molekula PCB-a u BLG–PCB aduktu najverovatnije je posledica uslova primenjenih tokom elektrosprej jonizacije zagrevanjem, pre same MS analize. Ovakav zaključak u skladu je sa literaturnim navodima u kojima vezivanjem PCB-a za apo-fikocijanin u *in vitro* uslovima nastaje smeša proizvoda u kojima je struktura bilina različita od one u nativnom C-fikocijaninu, dok proizvod sa nativnim bilinom nastaje u malom i varijabilnom prinosu. Ovi različiti proizvod nastaju usled nestabilnosti hromofore i njenoj sklonosti ka oksidaciji (Arciero et al., 1988).

Kako modifikacije malim molekulima, posebno kovalentne, mogu da dovedu do značajnih promena sekundarne i tercijarne strukture proteina, od interesa je bilo ispitati da li, i u kojoj meri, kovalentna modifikacija BLG-a PCB-om dovodi do strukturnih promena proteina. Spektroskopijom cirkularnog dihroizma u bliskoj i dalekoj UV oblasti analizirane su promene tercijarne i sekundarnih struktura BLG-a. BLG u svojoj strukturi sadrži dva ostatka triptofana, Trp19 na β A nizu i Trp61 na β D nizu (Sakai et al., 2000). Signali u bliskoj UV oblasti u CD spektrima BLG-a na primarno su rezultat hiralnog okruženja oko ovih ostataka triptofana. Triptofan na poziciji 19 je zaklonjen od rastvarača i nalazi se u unutrašnjosti proteina, okrenut prema dnu hidrofobnog džepa, te je veća verovatnoća da bude hiralan nego Trp61, koji se nalazi na eksternoj petlji na površini molekula, gde je izložen rastvaraču i fleksibilniji. Iz tog razloga se smatra da Trp19 najviše doprinosi signalima u CD spektrima BLG-a u bliskoj UV oblasti (Creamer, 1995; Wang et al., 1997). Značajne promene u obliku i intenzitetu signala u CD spektrima u bliskoj UV oblasti nakon modifikacije PCB-om ukazuju na labavljenje tercijarne strukture proteina nakon vezivanja pigmenta. Važno je spomenuti da se slobodan ostatak Cys121 nalazi u blizini ostatka Trp19 (Sakai et al., 2000; Yagi et al., 2003), što ukazuje na to da vezivanje PCB-a za Cys121 BLG-a najverovatnije indukuje promene u mikrookruženju oko ostatka triptofana. Ove promene tercijarne strukture proteina nakon modifikacije PCB-om reflektuju se na signale u CD spektrima u bliskoj UV oblasti. Slične promene mikrookruženja oko ostatka Trp19 uočavaju se modifikacijom slobodnog ostatka cisteina BLG-a DTNB-om, tokom koje dolazi do značajnih promena intenziteta fluorescencije BLG-a (Sakai et al., 2000), dok modifikacija Cys121 izoforme B BLG-a merkaptopropionskom kiselinom dovodi do promena u CD signalima u bliskoj UV oblasti (Burova et al., 1998). Premda su promene u sadržaju sekundarnih struktura BLG-a manje nego promene tercijarne strukture, modifikacija PCB-om dovodi do blagog porasta sadržaja α -heliksa i smanjenja β -pločica, uz gotovo nepromenjen sadržaj neuređenih struktura i β -zavijutaka. Slične promene u sadržaju sekundarnih struktura dobijene su kovalentnom modifikacijom ostataka cisteina BLG-a alil-izotiocijanatom (Rade-Kukic et al., 2011). Osim promena strukture proteina, vezivanje PCB-a za BLG dovodi do pozitivnog Kotonovog efekta u bliskoj UV/vidljivoj oblasti CD spektra, slično efektu koji se uočava vezivanjem PCB-a za BSA (Minic et al., 2018). Indukovanje optičke aktivnosti hromofore, koja u slobodnom, nevezanom obliku postoji u smeši dva konformera, te prema tome nije optički aktivna, navodi na zaključak da BLG vezuje PCB stereospecifično. CD spektar nativnog C-PC-a sličnog je oblika kao CD spektar BLG–PCB adukta (pozitivna VIS i negativna UV traka) (Glazer et al., 1973), što ukazuje na to da je konformacija hromofore u ova dva proteina slična. Štaviše, studija koja se bavila stereohemijom derivata PCB-a pokazala je da 3-hidro-3'-cisteinotiofikocijanobilin trimetil-estar i 3-hidro-3'-glutationotiofikocijanobilin tetrametil-estar R konfiguracije na 3'C atomu (3'R) pokazuju pozitivan Kotonov efekat u CD spektrima (Cheng i Jiang, 1992). Prema tome, može se izvesti zaključak da kovalentno vezivanje PCB-a za BLG indukuje hiralnost na 3'C atomu, koji zauzima R konfiguraciju.

Modifikacija BLG-a PCB-om odvija se u širokom opsegu pH vrednosti. Premda se povećanjem pH vrednosti rastvora povećava prinos kovalentnog adukta, reakcija modifikacije odvija se i na nižim pH vrednostima (pH 2). Nukleofilnost sulfhidrilne grupe zavisi od njenog deprotonovanja, odnosno od pH vrednosti rastvora (Sardi et al., 2013). Na niskim pH vrednostima, konformacija BLG-a je promenjena, što najverovatnije čini slobodne ostatke cisteina izloženijim i time dostupnijim za reakciju sa PCB-om. Prethodnim istraživanjima je pokazano da joni Hg^{2+} i Cd^{2+} mogu formirati komplekse sa slobodnim ostacima cisteina na svim pH vrednostima (Kontopidis et al., 2004). Prema tome, formiranje BLG–PCB adukta ne samo da je zavisno od (de)protonovanja slobodne SH grupe, već i konformacione promene BLG-a indukovane promenom pH mogu takođe uticati na formiranje kovalentnog adukta preko uticaja na izloženost i dostupnost slobodnih ostataka cisteina za reakciju sa PCB-om. Interesantno, formiranje kovalentnog BLG–PCB adukta dešava se i u simuliranoj gastričnoj (pH 3) i simuliranoj intestinalnoj tečnosti (pH 8), što ukazuje da bi oralni unos PCB-a mogao dovesti do formiranja kovalentnih adukata sa proteinima hrane, ali i endogenim proteinima gastrointestinalnog trakta koji sadrže slobodne ostatke cisteina.

Za identifikaciju vezivnog mesta za PCB na molekulu BLG-a, urađena je studija molekulskog dokinga, koja je pokazala jedno visokoafinitetno mesto za PCB u kaliksu BLG-a, koje je udaljeno od slobodnog ostatka Cys121 BLG-a i zbog toga nedostupno za formiranje kovalentne veze. Poznato je da je BLG podložan izmeni disulfida na visokim temperaturama i da je udaljenost atoma sumpora tiolne grupe Cys121 i disulfidne veze Cys106–Cys119 (11 Å) kompatibilna sa intramolekulskom reakcijom izmene disulfida, kojom se formira disulfidna veza Cys106–Cys121, a Cys119 postaje slobodan (Croguennec et al., 2003). Međutim, čak i nakon inkubacije BLG-a na nižim temperaturama (37 °C) identifikovani su peptidi koji sadrže oba tipa disulfidnih veza (Cys106–Cys119 i Cys106–Cys121) (Albrecht et al., 2012), ukazujući na to da do reakcije izmene disulfida dolazi i na nižim temperaturama. Iz tog razloga izvedena je dirigovana molekulska dinamika (SMD), kako bi se simulirala izmena disulfida BLG-a, a potom je opet urađen molekulski doking na strukturi BLG-a dobijenoj nakon SMD simulacije. Iako se PCB nakon izmene disulfida preferencijalno i dalje vezuje za kaliks, sada je znatno bliži slobodnom ostatku Cys119. Prema tome, osim Cys121, Cys119 bi takođe mogao biti meta reakcije sa PCB-om. Poznato je da je formiranje intermolekulskih disulfida favorizovano u prisustvu haotropa, kao što je urea, koji denaturacijom proteina favorizuju tiol-disulfidnu izmenu BLG-a (Rasmussen et al., 2007). Prema tome, naši eksperimentalno dobijeni rezultati, koji pokazuju da u prisustvu uree dolazi do većeg prinosa modifikacije BLG-a PCB-om, u poređenju sa reakcijom koja se odvija bez uree (**Slika 28**), u saglasnosti su sa predviđanjima dobijenim računarskim metodama, koji pokazuju da je izmena disulfida neophodna za pravilnu orijentaciju PCB-a i kovalentnu reakciju sa slobodnim ostatkom Cys119. Kovalentnim dokingom nakon SMD simulacije izmene disulfida pokazano je da je blago izmenjena struktura kaliksa, tj. hidrofobnog džepa, sada dovoljno velika da smesti etilidensku C3–C3' vezu PCB-a u neposrednu blizinu, sada slobodnog, ostatka Cys119. Istovremeno, aminokiselinski ostaci kaliksa BLG-a svojim brojnim nekovalentnim interakcijama sa PCB-om stabilizuju orijentaciju pigmenta i favorizuju formiranje kovalentne veze.

Mehanizam kovalentne modifikacije bi mogao da se odvija nukleofilnom adicijom, u kojoj tiolna grupa Cys121 ili Cys119 napada elektrofilnu etilidensku C3–C3' vezu PCB-a, pri čemu se formira tioetarska veza, slično formiranju tioetra između Cys121 BLG-a i šikonina (Albrecht et al., 2012).

Na osnovu svih rezultata dobijenih eksperimentalnim i računarskim metodama, pretpostavka je da inicijalno dolazi do brzog formiranja nekovalentnog BLG–PCB kompleksa, pri čemu se PCB preferencijalno vezuje za kaliks BLG-a. U ovoj konformaciji, ostatak Cys121 koji sadrži slobodnu SH grupu nije pravilno orijentisan za formiranje kovalentne veze sa PCB-om. Nakon blagih konformacionih promena BLG-a i izmene disulfida, dolazi do oslobađanja tiolne grupe ostatka Cys119, što za posledicu ima sporo formiranje kovalentnog BLG–PCB konjugata. Eksperimentalno dobijeni rezultati nedvosmisleno pokazuju formiranje kovalentne veze, koja uključuje modifikaciju

slobodnog ostatka cisteina i konformacione promene. SMD simulacija vezivanja nakon disulfidne izmene u saglasnosti je sa pretpostavljenim mehanizmom reakcije, pri čemu je Cys119 bolje orijentisan za formiranje kovalentne veze.

Uticaj kovalentne modifikacije BLG-a fikocijanobilinom na funkcionalne osobine β -laktoglobulina

Nakon detaljne karakterizacije nastalog BLG–PCB aduka, a imajući u vidu da se struktura BLG-a neznatno menja nakon vezivanja PCB-a, ispitane su funkcionalne osobine BLG-a od interesa za industriju hrane, na koje bi strukturne promene izazvane modifikacijom PCB-om mogle imati efekta. Antioksidativna aktivnost, ponašanje pri termičkom tretmanu, digestibilnost enzimima gastrointestinalnog trakta i IgE reaktivnost BLG–PCB adukta ispitani su i upoređeni sa nemodifikovanim proteinom.

BLG poseduje veliku sposobnost uklanjanja slobodnih radikala zbog toga što sadrži 4 ostatka metionina, 2 triptofana, 2 histidina, 4 tirozina i, prvenstveno, jednu slobodnu sulfhidrilnu grupu Cys-121. Svi navedeni aminokiselinski ostaci imaju sposobnost doniranja elektrona/atoma vodonika, zbog čega su odgovorni za antioksidativnu aktivnost BLG-a u ORAC esej (Zheng et al., 2016). Iako je slobodan ostatak cisteina u BLG–PCB konjugatu blokiran formiranjem tioetarske veze sa PCB-om, antioksidativna aktivnost BLG adukta je znatno veća od antioksidativne aktivnosti nemodifikovanog proteina, zahvaljujući prisustvu PCB-a, koji poseduje izuzetnu antioksidativnu aktivnost, slično drugim tetrapirolima, kao što je bilirubin (Benedetti et al., 2010; Jansen et al., 2010). Prema tome, iako BLG ima više od 10 aminokiselinskih ostataka koji doprinose ukupnoj ORAC aktivnosti, vezivanje samo jednog molekula PCB-a po molekulu BLG-a povećava antioksidativnu aktivnost proteina za gotovo 50%, doprinoseći ORAC vrednosti modifikovanog proteina sa više od 30%. Štaviše, ABTS esej je dodatno potvrdio izuzetnu antioksidativnu aktivnost BLG–PCB-a, gotovo dvostruko veću u poređenju sa nemodifikovanim proteinom. Kako je ostatak cisteina jedini koji pokazuje značajnu redukujuću moć u testu ukupne redukujuće moći (Zheng et al., 2016), moglo bi se očekivati da bi blokiranje slobodne sulfhidrilne grupe proteina formiranjem kovalentne veze sa PCB-om smanjilo ukupnu redukujuću moć proteina. Međutim, ukupna redukujuća moć BLG–PCB-a gotovo je tri puta veća od redukujuće moći kontrolnog, nemodifikovanog BLG-a, ukazujući na to da je najveći deo antioksidativne aktivnosti BLG–PCB-a poreklom od vezanog PCB-a *per se*. Doista, pokazano je da redukujuća moć pepsinskog digesta C-fikocijanina gotovo u potpunosti potiče od PCB-a (Minic et al., 2016). Pored toga, kovalentna modifikacija BLG-a fikocijanobilinom inhibira oksidaciju samog proteina izazvanu slobodnim radikalima, pri čemu vezani PCB pokazuje zaštitni efekat od $31,5 \pm 4,4\%$.

Kako se BLG koristi kao emulgator i stabilizator u emulzijama ulja u vodi, nekoliko studija je pokušalo da poveća njegov antioksidativni kapacitet kovalentnim modifikacijama, kao što su neenzimska glikozilacija u Majarovoj reakciji (Chobert et al., 2006) i konjugovanje sa polifenolima (Abd El-Maksoud et al., 2018). Pored toga, BLG kovalentno modifikovan katehinom može se koristiti kao emulgator u nanoemulzijama ulja u vodi, stabilizujući β -karoten efikasnije od nemodifikovanog proteina (Yi et al., 2015). Prema tome, BLG–PCB bi mogao da nađe široku primenu kao efikasan površinski aktivan agens sa izuzetnim antioksidativnim kapacitetom. Štaviše, ima odličan potencijal i za razvoj jestivih filmova na bazi BLG-a za pakovanje hrane, čime bi osetljivim komponentama hrane pružao efikasnu zaštitu od oksidacije.

Zagrevanjem BLG-a dolazi do razvijanja njegove globularne strukture, čime se hidrofobne površine i reaktivna tiolna grupa, koji su u nativnom proteinu u unutrašnjosti molekula, izlažu rastvaraču i time iniciraju proces agregiranja BLG-a. Slobodna tiolna grupa je uključena u reakcije izmene disulfida, pri čemu se formiraju oligomeri/polimeri sa drugim molekulima BLG ili sa drugim proteinima, dok izloženi hidrofobni regioni hidrofobnim interakcijama učestvuju u procesu formiranja nekovalentnih agregata. Zbog važnosti sulfhidrilne grupe u polimerizaciji BLG-a, cilj mnogih studija bio je da se, dodavanjem reagenasa reaktivnim prema sulfhidrilnoj grupi,

formiranjem kovalentnih derivata BLG-a spreči denaturacija i agregiranje BLG-a prilikom termičkog procesovanja. Tioli kompatibilni sa upotrebom u industriji hrane, kao što su dihidrolipoinna kiselina i glutation, izučavani su kao potencijalni agensi za redukovanje agregiranja BLG i izolata proteina surutke izazvanog zagrevanjem (Wijayanti et al., 2013, 2014).

Rezultati ove disertacije pokazuju da se zagrevanjem pod blažim uslovima, koji imitiraju one prisutne tokom LTLT pasterizacije (63 °C tokom 30 min), formiranje kako kovalentnih polimera, tako i nekovalentnih agregata, odvija u mnogo manjoj meri kod BLG-PCB adukta u poređenju sa nemodifikovanim proteinom. Nizak nivo kovalentnih disulfidnih polimera BLG-PCB-a posledica je blokiranja slobodne sulfhidrilne grupe nakon reakcije sa PCB-om. Sa druge strane, smanjeno formiranje nekovalentnih agregata velikih molekulskih masa je posledica više faktora. Naime, manja površinska hidrofobnost BLG-PCB konjugata, koja je posledica zaklanjanja hidrofobnih ostataka od strane vezanog PCB-a, doprinosi smanjenoj agregabilnosti kovalentno modifikovanog BLG-a. Pored toga, prethodnim studijama je pokazano da hemijske modifikacije cisteina malim molekulima reaktivnim prema tiolnoj grupi, kao što su DTNB, merkaptopropionska kiselina i tetrametilrodamin maleimid, dovode do destabilizacije kvaternarne strukture BLG-a i disocijacije BLG dimera u monomer (Burova et al., 1998; Sakai et al., 2000; Yamasaki et al., 1999). Do slične destabilizacije dimera BLG-a najverovatnije dolazi i nakon modifikacije PCB-om. Istovremeno, blago zagrevanje (63 °C tokom 30 min) dovodi do smanjenja sadržaja uređenih struktura, ali ne i β -pločica, nemodifikovanog BLG-a. Nasuprot tome, ukupan sadržaj uređenih struktura BLG-PCB-a se zadržava, ali dolazi do tranzicije β -pločica u α -helikse, što je moglo da doprinese smanjenoj sklonosti BLG-PCB-a ka agregiranju. Naime, u studiji Purjabbar-a i saradnika prethodno je pokazano da je nenativna, α -heliksima bogata konformacija BLG-a, iako manje rigidna, rezistentna na agregiranje, te da BLG postaje podložniji agregiranju kada nenativna α -helikoidna struktura pređe u nativnu, bogatu β -pločicama (Pourjabbar et al., 2015). Tranzicija β -pločica u α -helikse do koje dolazi pri termalnom tretmanu BLG-PCB-a čini adukt rezistentnijim na agregiranje.

Interesantno, iako se ponašanje nemodifikovanog i modifikovanog BLG-a pri termičkom tretmanu razlikuje, termalna stabilnost BLG-a, u pogledu tački topljenja, ne menja se nakon kovalentne modifikacije PCB-om.

Iako blagi termalni tretman koji imitira uslove LTLT pasterizacije (63 °C tokom 30 min) nije doveo do formiranja struktura nalik fibrilima, produženo izlaganje proteina visokoj temperaturi (85 °C tokom 120 min) dovodi do formiranja amiloidima sličnih fibrilarnih struktura, ali u značajno manjoj meri u slučaju BLG-PCB konjugata u poređenju sa nemodifikovanim proteinom. Sterne smetnje velike tetrapirolne strukture PCB-a mogle su delimično doprineti smanjenom formiranju amiloidima sličnih fibrilarnih struktura BLG-PCB-a. Pokazano je da sterne smetnje nametnute glikovanjem BLG-a značajno inhibiraju njegovu fibrilaciju i da, nezavisno od stepena glikovanja, laktozilacija BLG-a značajnije utiče na fibrilaciju od glukozilacije (Dave et al., 2014). Osim toga, pokazano je i da blokiranje ostatka cisteina BLG-a jodacetamidom inhibira formiranje fibrilarnih struktura u prisustvu subdenaturišućih koncentracija uree (Rasmussen et al., 2007), što dodatno potvrđuje ulogu PCB-a u smanjenju tendencije formiranja amiloidima sličnih fibrilarnih struktura BLG-PCB-a.

Uzevši sve u obzir, rezultati dobijeni u ovoj disertaciji ukazuju na to da je, pored dihidrolipoinne kiseline i glutationa, PCB obećavajući agens reaktivan prema sulfhidrilima i kompatibilan sa upotrebom u prehrambenoj industriji, koji bi se mogao koristiti za redukovanje polimerizacije, agregiranja i formiranja fibrila tokom zagrevanja BLG-a.

BLG ima izuzetno stabilnu terciarnu strukturu na kiselom pH, zbog prisustva mnogih naelektrisanih i polarnih aminokiselinskih ostataka, velikog sadržaja rigidnih β -pločica i dva disulfidna mosta koji dodatno stabilizuju strukturu BLG-a, čineći ga veoma rezistentnim na digestiju pepsinom (Teng et al., 2015). Nasuprot tome, sa povećanjem pH on prolazi kroz nekoliko konformacionih promena (Qin et al., 1998), koje ga čine podložnim na digestiju pankreatinom (Schmidt et al., 1995). Kovalentna modifikacija PCB-om značajno je uticala na digestibilnost BLG-

a, kako pepsinom, tako i pankreatinom, pri čemu se kovalentno modifikovani BLG značajno sporije digestuje u oba slučaja, a posebno pepsinom. Moguće je da je vezivanje PCB-a za BLG dovelo do sternog zaklanjanja mesta koja su meta proteolitičkih enzima, čime je ograničena dostupnost proteina enzimima, što zauzvrat smanjuje digestiju proteina. Slično tome, kovalentna modifikacija BLG-a glikovanjem galaktooligosaharidima smanjuje digestibilnost BLG-a (Luz Sanz et al., 2007). Velika rezistentnost kovalentno modifikovanog BLG-a na digestiju pepsinom i pankreatinom mogla bi stoga biti iskorišćena za efikasnu isporuku bioaktivnog PCB-a do distalnih delova gastrointestinalnog trakta, doprinoseći time zdravlju GIT-a. U studiji Jianga i Lijua predloženo je da bi kompleks BLG-a i *cis*-9, *trans*-11 konjugovane linolne kiseline mogao poslužiti za isporuku konjugovane linolne kiseline u cilju dejstva na kancerske ćelije kolona (Jiang i Liu, 2010). Zbog svoje rezistentnosti na proteolitičku degradaciju, BLG se često razmatra kao potentan nosač za isporuku brojnih bioaktivnih liganada (Teng et al., 2015). U svom kovalentno modifikovanom obliku, čini se kao obećavajući nosač, jer se oslobađanje EGCG-a iz nanočestica na bazi konjugata BLG-a i hlorogene kiseline u simuliranoj gastrointestinalnoj tečnosti odvija sporije i u manjem stepenu u poređenju sa oslobađanjem iz nanočestica na bazi nemodifikovanog proteina, upravo usled velike rezistencije konjugata BLG-a i hlorogene kiseline na proteolizu (Fan et al., 2017). Prema tome, niža sklonost modifikovanog BLG-a ka enzimskoj digestiji mogla bi da omogući ne samo produženu isporuku bioaktivnih molekula koji modifikuju protein, kao što je PCB, već i enkapsuliranih bioaktivnih molekula i bioaktivnih peptida koji potiču od samog BLG-a. Štaviše, prethodno je pokazano da hromosomeptidi dobijeni pepsinskom digestijom fikocijanina ispoljavaju citotoksičnu aktivnost prema humanim epitelnim ćelijama kancera kolona (Minic et al., 2016). Slični bioaktivni hromosomeptidi mogli bi nastati i pepsinskom digestijom BLG–PCB konjugata.

BLG je jedan od glavnih alergena kravljeg mleka. Čak 36% pacijenata sa IgE-posredovanom alergijom na kravle mleko reaguje na BLG (Shek et al., 2005). Kako kovalentne modifikacije BLG-a mogu da utiču na njegov alergeni potencijal, kao što je to slučaj sa modifikacijom glikovanjem (Zhong et al., 2015; Zhong et al., 2013) ili polifenolima (X. Wu et al., 2018), bilo je od interesa ispitati IgE-vezujuće osobine ovog važnog alergena hrane nakon modifikacije PCB-om. Modifikacija alergena Majarovom reakcijom može čak povećati alergnost proteina hrane (Costa et al., 2022), pa je sa aspekta moguće primene u industriji hrane bilo važno pokazati da modifikacija BLG-a PCB-om nije negativno uticala na IgE vezivanje. IgE vezivanje kovalentno modifikovanog BLG-a nije bilo izmenjeno, što je u dobroj korelaciji sa strukturnom sličnošću modifikovanog i nemodifikovanog proteina. Tripsinski fragment 102-124, u kojem se nalazi slobodan ostatak cisteina koji je meta modifikacije PCB-om, jedan je od glavnih epitopa BLG-a, kako u pogledu intenziteta, tako i u pogledu frekvencije IgE odgovora (Sélo et al., 1999). Nepostojanje razlike u IgE-vezujućim osobinama BLG-a i BLG–PCB konjugata implicira da je sterno zaklanjanje ovog IgE-vezujućeg epitopa od strane PCB-a minimalno i/ili doprinos ovog epitopa u ukupnom IgE odgovoru pacijenata čiji su serumu korišćeni u istraživanju je manji.

5.2. Kovalentne modifikacije proteina fikocijanobilinom nakon prethodne modifikacije Trautovim reagensom

Drugi deo istraživanja sprovedenog u okviru ove doktorske disertacije imao je za cilj kovalentne modifikacije fikocijanobilinom, odnosno fluorescentno obeležavanje, proteina koji ne sadrže ili, u slučaju albumin goveđeg seruma, sadrže jednu slobodnu tiolnu grupu sa ciljem funkcionalizacije proteina modifikacijom PCB-om i ispitivanja mogućnosti primene dobijenih konjugata kao fluorescentnih proba. U te svrhe, kao model proteini korišćeni su albumin goveđeg seruma, IgG antitela i goveđi α -laktalbumin. Kako fikocijanobilin, kao što je prethodno pokazano, kovalentno modifikuje slobodne tiolne grupe proteina, u proteine su najpre uvedene (dodatne) sulfhidrilne grupe tiolovanjem slobodnih amino grupa 2-iminotiolanom, poznatijim kao Trautov reagens. S obzirom da proteini, u proseku, sadrže veći broj amino nego sulfhidrilnih grupa (Pe'er et

al., 2004), ovim pristupom omogućeno je uvođenje većeg broja molekula fikocijanobilina po molekulu proteina, a time i značajna amplifikacija fluorescentnog signala.

5.2.1. Kovalentna modifikacija albumina goveđeg seruma fikocijanobilinom

Kao prvi model sistem za uvođenje sulfhidrilnih grupa u molekule proteina i njihovu potonju modifikaciju fikocijanobilinom odabran je albumin goveđeg seruma (BSA), najzastupljeniji serumski protein, a ujedno i protein hrane, koji se u literaturi često razmatra kao nosač bioaktivnih molekula u prehrambenim i farmaceutskim formulacijama (Spada et al., 2021; Visentini et al., 2023). Iako BSA sadrži jednu sulfhidrilnu grupu, slobodnu za reakciju sa fikocijanobilinom, usled svoje dostupnosti i niske cene dobar je model sistem za uvođenje dodatnih sulfhidrilnih grupa, a time i dodatnih molekula fikocijanobilina. BSA je kovalentno modifikovan Trautovim reagensom, korišćenjem različitih molarnih odnosa Trautovog reagensa i proteina, a potom i PCB-om. Strukturne i funkcionalne osobine tiolovanog BSA i BSA-PCB adukta su detaljno ispitane kombinacijom spektroskopskih i elektroforetskih metoda.

Trautov reagens uspešno je modifikovao BSA pri svim korišćenim molarnim odnosima reagensa i proteina. Povećanje molarnog odnosa reagensa sukcesivno je modifikovalo BSA u većoj meri sve do molarnog odnosa reagensa 100:1, nakon čega više nije bilo značajnih promena u sadržaju slobodnih amino i sulfhidrilnih grupa. Pri modifikovanju BSA stostrukim molarnim viškom reagensa, sadržaj slobodnih amino grupa izloženih rastvaraču opada za 50% u poređenju sa kontrolnim, nemodifikovanim BSA uzorkom, dok broj sulfhidrilnih grupa raste od $0,2 \pm 0,1$, koliko ih je u kontrolnom uzorku BSA, do $8,7 \pm 0,2$ u uzorku modifikovanim 100:1 molarnim odnosom reagensa i proteina. Kako BSA sadrži 59 ostataka lizina koji imaju slobodne ϵ -amino grupe i jednu N-terminalnu amino grupu, koje mogu biti podvrgnute reakciji tiolovanja, opadanje sadržaja slobodnih amino grupa za 50% značilo bi prosečnu modifikaciju čak 30 amino grupa, odnosno uvođenje čak 30 slobodnih sulfhidrilnih grupa po molekulu BSA. Međutim, u nativnom proteinu samo deo lizinskih ostataka dostupan je rastvaraču za reakciju sa Trautovim reagensom, čime se delimično može objasniti diskrepancija između opadanja sadržaja amino grupa i broja uvedenih sulfhidrilnih grupa. Osim toga, ne može se isključiti i mogućnost delimične oksidacije uvedenih sulfhidrilnih grupa.

CD spektroskopijom u bliskoj i dalekoj UV oblasti i elektroforetskom analizom u nativnim i redukujućim uslovima uočeno je da povećanje stepena modifikacije BSA Trautovim reagensom dovodi do sve većih promena strukture BSA, uz istovremene minorne promene u profilu oligomerizacije i agregiranja BSA. Naime, već 10:1 (mol:mol) odnos reagensu u odnosu na protein, iako prosečno uvodi svega 1,3 sulfhidrilnu grupu po molekulu proteina, dovoljan je da indukuje promene tercijarne strukture BSA. Optičkom rotatortornom disperzijom pokazano je da na prelazu pH vrednosti od 8,0 ka 9,0 BSA podleže strukturnim promenama, poznatijim kao bazna tranzicija (ili N-B tranzicija, odnosno neutralno-bazna tranzicija), tokom koje BSA delimično gubi na rigidnosti, a koja najviše pogađa N-terminalni deo proteina, uz istovremeni blagi porast radijusa. Međutim, rezultati dobijeni skretanjem x-zraka pod malim uglom pokazali su da BSA zadržava nativnu konformaciju u rasponu pH vrednosti od 4 do 9 (Barbosa et al., 2010). Ovo ukazuje na to da su uočene konformacione promene tiolovanog BSA posledica uvođenja sulfhidrilnih grupa, a ne alkalne pH vrednosti (pH 9) kojoj je protein bio izložen tokom reakcije modifikacije. Zbilja, uočene promene u CD spektrima sve su izraženije sa porastom molarnog odnosa Trautovog reagensu i BSA i u dobroj su korelaciji sa promenama u sadržaju slobodnih amino i sulfhidrilnih grupa. Značajno smanjenje signala u CD spektrima u bliskoj UV oblasti, posebno u regionu fenilalanina (255-270 nm), koje se može uočiti pri molarnim odnosima reagensu većim od 50:1 u odnosu na protein, istovremeno sa relativno očuvanom sekundarnom strukturom, ukazuju na postepeno formiranje konformacije stopljene globule sa povećanjem molarnog odnosa reagensu. Molarni odnosi reagensu veći od 100:1, odnosno 150:1 i 200:1 u korist reagensu, ne dovode do daljih većih promena tercijarne strukture BSA, što je u skladu sa sadržajem sulfhidrilnih grupa koji ne pokazuje dalje značajne promene nakon istog molarnog odnosa reagensu. Slično CD spektrima u bliskoj UV

oblasti, i CD spektri u dalekoj UV oblasti, koji odražavaju promene u sekundarnoj strukturi BSA, takođe pokazuju promene nakon modifikacije proteina tiolovanjem, ali su promene uočljive tek pri višim molarnim odnosima reagensa (100:1, 150:1 i 200:1). Pedesetostruki molarni višak Trautovog reagensa je najveći primenjeni molarni odnos reagensa i proteina koji indukuje izražene promene tercijarne strukture BSA, bez značajnog uticaja na sekundarne strukture proteina. Nativni BSA sadrži 17 intramolekulskih disulfida koji stabilizuju njegovu strukturu, pa ekstenzivnije uvođenje tiolnih grupa (pri molarnim odnosima reagensa 100:1, 150:1 i 200:1) dovodi do izmene većeg broja disulfida i samim tim do nastanka većeg broja nenativnih disulfida, što za posledicu ima dramatičnije promene u sekundarnoj, i naročito tercijarnoj strukturi.

Iako ima uvedene nascentne tiolne grupe, BSA modifikovan Trautovim reagensom nije oligomerizovao u većoj meri u odnosu na kontrolni, nemodifikovani uzorak proteina, sve do molarnog odnosa reagensa od 20:1, dok od odnosa 50:1 efekat na oligomerizaciju i agregabilnost BSA počinje da bude vidljiv. Molarni odnos 50:1, koji prosečno uvodi 7,1 sulfhidrilnu grupu po molekulu BSA, indukuje suptilne promene u odnosu zastupljenosti BSA oligomera i monomerne forme, koji sa porastom koncentracije reagensa raste u korist oligomernih formi. Smatra se da Trautov reagens reaguje sa primarnim aminima i uvodi sulfhidrilne grupe, pri čemu se zadržava početno naelektrisanje molekula, jer se reakcijom uvodi katjonska amidinijum grupa umesto primarnog amina. Međutim, poliakrilamidna gel elektroforeza u nativnim uslovima pokazala je povećanu mobilnost tiolovanih BSA molekula prema anodi sa povećanjem broja uvedenih sulfhidrilnih grupa, koja čak nadmašuje smanjenje mobilnosti usled povećanja molekulske mase modifikovanog proteina. Ova zapažanja ukazuju na to da je na pH 8,3, koliko je pH pufera tokom native elektroforeze, naelektrisanje BSA sve negativnije sa povećanjem broja tiolnih grupa, što se može objasniti samo formiranjem tiolatnog anjona. Iako je pK_a tiolne grupe u proteinima oko 8,5, zavisno od mikrokruženja pK_a može biti u rasponu od 3,5 do 12 (Hatahet i Ruddock, 2009). Susedna amidinijum grupa, koja je veoma bazna jer je pozitivno naelektrisanje delokalizovano na oba atoma azota, najverovatnije snižava pK_a vrednost uvedenih tiolnih grupa, zbog čega su one na pH 8,3 jonizovane, odnosno u obliku tiolatnog anjona. Prema tome, kako je u tiolovanom molekulu BSA na pH 8,3 jedno pozitivno naelektrisanje lizinskog ostatka zamenjeno jednim pozitivnim naelektrisanjem (amidinijum grupa) i jednim negativnim (tiolati anjon), molekul BSA je ukupno kiseliji, odnosno ima manju pI vrednost. Snižavanje pI vrednosti je veće sa povećanjem stepena tiolovanja.

Nakon tiolovanja Trautovim reagensom, novouvedene slobodne tiolne grupe BSA kovalentno su modifikovane fikocijanobilinom na pH 9, korišćenjem dvadesetostrukog molarnog viška PCB-a u odnosu na protein. Kako bi se izbeglo formiranje disulfidnih veza između novouvedenih tiolnih grupa, tiolovani BSA je inkubiran sa PCB-om odmah nakon uklanjanja viška neizreagovalog Trautovog reagensa. Povećanje molarnog odnosa Trautovog reagensa dovodi do pojačavanja fluorescentnog signala poreklom od PCB-a, što je najuočljivije počev od molarnog odnosa reagensa od 50:1 naviše. Tiolovanje BSA molarnim odnosima 100:1, 150:1 i 200:1 u korist reagensa povećava prinos BSA-PCB konjugata u poređenju sa molarnim odnosom 50:1, ali istovremeno ispoljava negativni uticaj na strukturu i oligomerizaciju BSA. Prema tome, pedesetostruki molarni višak Trautovog reagensa čini se optimalnim, balansirajući stepen modifikacije PCB-om i negativni uticaj tiolovanja na strukturne osobine BSA, te je taj, optimalan, molarni odnos izabran za pripremanje BSA-PCB konjugata za potrebe ispitivanja njegovih funkcionalnih osobina.

Mnogobrojne bioaktivne osobine C-fikocijanina pripisuju se njegovoj hromofori fikocijanobilinu, i to njegovim antioksidativnim osobinama (Hirata et al., 2000; Wu et al., 2016). Istovremeno, BSA poseduje više ligand-vezujućih mesta za brojne bioaktivne ligande (Bourassa et al., 2010; Skrt et al., 2012; Wu et al., 2017), zbog čega je često razmatran kao nano-nosač bioaktivnih jedinjenja (Visentini et al., 2023). Nekovalentne, visokoafinitetne interakcije između BSA i PCB prethodno su opisane u studiji Minića i saradnika, u kojoj je BSA predložen kao nosač PCB-a kao bioaktivne komponente ili koloranta hrane (Minic et al., 2018). Istovremeno, u ovoj

disertaciji je pokazano da se kovalentnom modifikacijom slobodne sulfhidrilne grupe β -laktoglobulina fikocijanobilinom proširuju funkcionalne osobine ovog važnog proteina hrane. Imajući to u vidu, za očekivati je da bi se kovalentnom modifikacijom BSA PCB-om mogli dobiti stabilniji konjugati, u poređenju sa nekovalentnim kompleksom BSA i PCB-a, koji bi imali poboljšana svojstva u odnosu na nemodifikovani BSA.

Zbilja, BSA–PCB konjugat ima veću antioksidativnu aktivnost u poređenju sa kontrolnim, nemodifikovanim molekulom BSA, zahvaljujući velikoj antioksidativnoj aktivnosti PCB-a (Benedetti et al., 2010). Iako i sam BSA, slično drugim serumskim albuminima (Roche et al., 2008), poseduje značajnu aktivnost uklanjanja slobodnih radikala, BSA–PCB konjugat ima gotovo 2,5 puta veću antioksidativnu aktivnost u ORAC eseju u poređenju sa nemodifikovanim BSA. Slično tome, albumin seruma za koji je kovalentno vezan bilirubin ima veću antioksidativnu aktivnost nego albumin seruma i slobodan bilirubin (Condezo-Hoyos et al., 2009). Visoka antioksidativna aktivnost BSA–PCB konjugata od posebnog je značaja u pogledu zaštite od oksidacije bioaktivnih liganada, poput fenolnih jedinjenja, lipida, vitamina i karotenoida, koji su veoma osetljivi na oksidaciju i čija se enkapsulacija u različite nosače na bazi BSA (Visentini et al., 2023) za primenu u prehranbene (Cheng et al., 2018; Fan, et al., 2018b; Pápay et al., 2017; Wu et al., 2017) i farmaceutске (Kazan et al., 2019; Spada et al., 2021) svrhe uveliko istražuje. Dodatno, oksidativni stres izazvan primenom lekova, koji je delimično odgovoran za njihovu toksičnost, kao što je to slučaj sa paklitakselom, mogao bi da bude umanjen ako se lek primenjuje istovremeno sa antioksidantima (Ali et al., 2023). Prema tome, farmaceutski nosači na bazi BSA–PCB konjugata bi enkapsuliranim lekovima mogli da pruže sličan nivo antioksidativne zaštite.

Istovremeno sa visokom antioksidativnom aktivnošću BSA–PCB adukta prema oksidaciji malih molekula, potencijalnih liganada BSA, vezani PCB ispoljava zaštitni efekat prema oksidaciji samog BSA indukovanoj slobodnim radikalima. Poznato je da oksidativne modifikacije serumskih albumina mogu da izmene njihove ligand-vezujuće i druge funkcionalne osobine, zavisno od vrste liganda i tipa oksidativne modifikacije (Oetl i Stauber, 2007). Oksidativne modifikacije izazvane hlor-dioksidom (Ogata, 2007) ili vodonik-peroksidom (Gorobets et al., 2019) mogu dovesti do snižavanja temperature topljenja BSA. Prema tome, zaštitni efekat PCB-a prema oksidaciji BSA mogao bi da utiče na strukturnu stabilnost proteina u slučajevima oksidativnog stresa, čime bi se očuvala mesta vezivanja drugih nekovalentnih liganada. Slična zaštita BSA prema oksidaciji izazvanoj slobodnim radikalima pokazana je u slučaju nekovalentno vezanog PCB-a (Minic et al., 2018) i bilirubina (Neužil i Stocker, 1993). Ipak, kovalentno vezani PCB pruža stabilniju zaštitu od nekovalentno vezanog PCB-a.

Kovalentne modifikacije proteina mogu da utiču na njihov afinitet prema drugim ligandima. Imajući to u vidu, od značaja je bilo ispitati da li su funkcionalne osobine BSA u pogledu sposobnosti vezivanja bioaktivnih liganada izmenjene u prisustvu kovalentno vezanog PCB-a. Pokazano je da kovalentna modifikacija BSA ne utiče negativno na vezivanje flavonoida kvercetina kao model liganda, pri čemu su konstante vezivanja bile u sličnom opsegu za nemodifikovani i PCB-om modifikovani BSA. Slično tome, pokazano je da kovalentna modifikacija BLG-a neenzimskom glikozilacijom u Majarovoj reakciji gotovo da ne utiče na sposobnost vezivanja EGCG-a (Perusko et al., 2017). Dobijeni rezultati ukazuju na to da nekovalentno vezivanje i drugih BSA liganada, ili makar onih čije je mesto vezivanja Sadlouovo mesto I, najverovatnije ne bi bilo narušeno usled kovalentne modifikacije PCB-om. Očuvanje ligand-vezujućih osobina BSA–PCB konjugata ukazuje na to da bi BSA mogao da se koristi kao simultani nosač PCB-a i drugih bioaktivnih liganada. Slični multiligandni kompleksi BSA već su opisani u literaturi. Toksičnost slobodnog Cu(II) pri uklanjanju radikala od strane kvercetina suprimirana je u prisustvu BSA (Zhou et al., 2022), dok nekovalentni triligandni kompleks BSA sa retinolom, rezveratrolom i EGCG-om pruža bolju zaštitu od oksidacije retinola i rezveratrola u poređenju sa moniligandnim kompleksom, sa EGCG-om kao ključnim protektivnim faktorom (Wu et al., 2017). Slični multiligandni kompleksi BSA–PCB konjugata i drugih bioaktivnih komponenti mogli bi da služe ne samo kao stabilni nosači bioaktivnog PCB-a, već bi mogli da štite i druge ligande od oksidativnog stresa usled

visokog antioksidativnog potencijala PCB-a. S druge strane, različiti proteini sa kovalentno vezanim PCB-em mogu imati različite optičke osobine, kao što je to slučaj sa fikocijaninom i alofikocijaninom, koji oba sadrže PCB hromoforu (Shang et al., 2023). Prema tome, kovalentno vezivanje PCB-a nakon modifikacije Trautovim reagensom čini se kao obećavajući pristup za dobijanje ne samo proteina sa željenim fiziološkim funkcijama, već i sa željenim optičkim karakteristikama za detekcione sisteme zasnovane na fluorescenciji.

5.2.2. Kovalentna modifikacija IgG antitela fikobilinobilinom

Oslanjajući se na fluorescentne osobine PCB-a, deo ove doktorske disertacije posvećen je ispitivanju mogućnosti upotrebe PCB-a kao fluorescentne probe za obeležavanje proteina od interesa. Kao model sistemi korišćeni su proteini koji u svom nativnom obliku ne sadrže sulfhidrilnu grupu, pa je ona prethodno uvedena u proteine modifikacijom Trautovim reagensom.

Fluorescentno obeležavanje antitela ima veliku primenu i koristi se za osetljivu i specifičnu detekciju antigena od interesa. Pored malih organskih molekula, za koje je manje verovatno da će imati uticaj na funkcionalne osobine antitela, za fluorescentno obeležavanje antitela se danas koriste i fikobilinski proteini algi, na prvom mestu PEB i PUB, ali i PC i APC, čija je hromofora PCB (Kronick, 1986; Qiang et al., 2021). Fikobiliproteine odlikuju velike vrednosti ekstinkcionih koeficijenata, solidni kvantni prinosi, stabilni emisijski spektri i druge osobine koje ih čine dobrim izborom za fluorescentno obeležavanje proteina (Kronick, 1986; Kronick i Grossman, 1983; McKinnon, 2018). Budući da su u literaturi zabeleženi slučajevi u kojima je konjugovanje fikobiliproteina za molekul antitela uticalo na imunološke osobine antitela (Kronick i Grossman, 1983), u ovoj disertaciji ispitana je mogućnost direktnog konjugovanja hromofore fikobiliproteina, u ovom slučaju PCB-a, za molekul antitela, te korišćenje tako dobijenog konjugata za detekciju antigena. Mala veličina hromofore bi, u poređenju sa velikim molekulom fikobiliproteina, trebalo da manje interferira sa antigen-vezujućim osobinama konjugovanog antitela. Kako antitela u nativnim uslovima ne sadrže slobodnu sulfhidrilnu grupu, a imajući u vidu da PCB modifikuje slobodne sulfhidrilne grupe proteina, u antitela su najpre uvedene dodatne sulfhidrilne grupe, modifikacijom lizinskih ostataka antitela Trautovim reagensom. Uvedene sulfhidrilne grupe su potom modifikovane PCB-om. Optimalan molarni odnos Trautovog reagensa za modifikaciju komercijalno dostupnih sekundarnih, kozjih anti-zečjih, IgG antitela, odabran je korišćenjem humanih IgG antitela i ispitivanjem uticaja tiolovanja Trautovim reagensom na strukturu i proteinski profil modifikovanih antitela.

Povećanje molarnog odnosa Trautovog reagensa od 5:1 do 200:1 dovodi do progresivnog opadanja sadržaja amino grupa i povećanja sadržaja sulfhidrilnih grupa u molekulu humanih IgG antitela, pri čemu dvestostruki molarni višak reagensa prosečno uvodi čak 9 sulfhidrilnih grupa u molekul antitela. Iako CD spektroskopijom nije pokazan značajan uticaj na terciarnu i sekundarnu strukturu antitela nakon modifikacije Trautovim reagensom, značajne promene uočene su na nivou kvaternarne strukture tiolovanih antitela. Naime, elektroforetski profil tiolovanih humanih IgG antitela u neredukujućim uslovima nalik je elektroforetskom profilu koji se dobija tokom pripreme uzorka antitela za elektroforezu u neredukujućim uslovima (Liu et al., 2007b; Zhu et al., 2013). Tiolovanjem humanih IgG antitela Trautovim reagensom dolazi do postepene pojave traka manjih molekulskih masa od mase intaktnog antitela, pri čemu stepen promena proteinskog profila zavisi od primenjenog molarnog odnosa Trautovog reagensa, odnosno broja uvedenih sulfhidrilnih grupa. Naime, pri manjim molarnim odnosima reagensa (5:1 i 10:1), pored dominantne trake intaktnog antitela (150 kDa) javljaju se dodatne trake antitela kojima nedostaje jedan laki lanac (125 kDa), antitela kog čine dva teška lanca (100 kDa) i poluantitela kog čine jedan laki i jedan teški lanac (75 kDa). Veći molarni odnosi reagensa (150:1 i 200:1) dovode do potpunog izostanka trake intaktnog antitela i dominantnog prisustva trake koja po masi odgovara teškom lancu (50 kDa). Uočena promena proteinskog profila antitela najverovatnije je posledica tiol-disulfidne izmene uzrokovane uvedenim sulfhidrilnim grupama, pri čemu najverovatnije dolazi do raskidanja postojećih

intermolekulskih disulfidnih veza, koje povezuju lake lance sa teškim ili dva teška lanca međusobno, i nastajanja novih, intramolekulskih disulfidnih veza.

Nakon uvođenja dodatnih sulfhidrila u laki (L) lanac, izmena disulfida može rezultirati u raskidanju disulfida sa teškim (H) lancem i formiranju intramolekulskog disulfida između uvedenog sulfhidrila i ostatka cisteina koje je formirao disulfid sa ostatkom cisteina teškog lanca. Kao rezultat ovakve izmene disulfida nastaje antitelo kojem nedostaje jedan laki lanac, tj. u oligomernoj formi L–H–H (125 kDa). Ovakva izmena disulfida u oba laka lanca dovodi do gubitka oba laka lanca, čime nastaje antitelo koje se sastoji od dva teška lanca, tj. dimer teškog lanca H–H (100 kDa). Nakon uvođenja dodatnih sulfhidrila u teški lanac, izmena disulfida može dovesti do raskidanja svih disulfida sa drugim teškim lancem i formiranja intramolekulskih disulfida između uvedenih sulfhidrila i ostatka cisteina koji su formirali disulfide sa ostacima cisteina drugog teškog lanca. Na ovaj način nastaju poluantitela koja se sastoje od jednog teškog i jednog lakog lanca, tj. L–H (75 kDa). Traka na 50 kDa može poticati kako od monomera teškog lanca (H), koji je nastao istovremenim raskidanjem disulfida sa drugim teškim lancem i lakim lancem, kao i od dimera lakog lanca (L–L). Međutim, treba napomenuti da trake na 75 kDa, 100 kDa i 125 kDa mogu poticati i od trimera (L–L–L), tetramera (L–L–L–L) i pentamera (L–L–L–L–L) lakog lanca, a traka na 100 kDa još može poticati od dimera teškog lanca (H–H). Takođe, traci na 150 kDa mogu doprineti, pored intaktnog IgG-a (L–H–H–L), i trimer teškog lanca (H–H–H), kao i druge nenativne forme dva laka i dva teška lanca ili četiri laka i jednog teškog lanca (npr. L–L–L–L–H), dok traci na 125 kDa mogu doprineti nenativne forme tri laka i jednog teškog lanca (npr. L–L–L–H). Moguće oligomerne forme teških i lakih lanaca IgG antitela tabelarno su prikazane u **Tabeli 4**.

Kako su laki lanci povezani sa teškim lancima samo jednom disulfidnom vezom, pri nižem nivou tiolovanja (pri molarnom višku reagensa do 50:1) najobilnije su nenativne forme antitela kojima nedostaje jedan ili oba laka lanca, pri čemu oslobođeni laki lanci mogu formirati dimere, trimere i više oligomere, ili čak reformirati kompletno antitelo (H₂L₂), ali građenjem nenativnih disulfida. Za razliku od toga, teški lanci su međusobno povezani sa 2 do 11 disulfida, zavisno od potklase IgG antitela, pa oni ostaju vezani dok ne dođe do izmene svih disulfida koji ih povezuju, te tek pri visokom nivou tiolovanja dolazi do intenzivnijeg razdvajanja teških lanaca, odnosno pri nižem stepenu tiolovanja doprinos H₂, H₂L i H₂L₂ u odgovarajućim trakama (100, 125 i 150 kDa) je najveći, a u traci 50 kDa veći je doprinos dimera lakog lanca od monomera teškog lanca. U **Tabeli 4** su označene oligomerne forme IgG antitela čiji je doprinos najveći pri niskom nivou tiolacije.

Tabela 4. Moguće oligomerne forme lakih i teških lanaca humanih IgG antitela. Oligomerne forme čiji je doprinos najveći pri niskom nivou tiolacije su označene podebljanim slovima.

Molekulska masa trake (kDa)	Moguća oligomerizacija lakih i teških lanaca
25	L
50	L ₂ , H
75	HL , L ₃
100	H ₂ , HL ₂ , L ₄
125	H ₂ L, HL ₃ , L ₅
150	L-H-H-L nativna , H ₂ L ₂ nenativna , HL ₄ , H ₃

Dobijeni rezultati pokazuju da kod proteina sa kvaternarnom strukturom koja je stabilizovana intermolekulskim disulfidima, kao što su IgG antitela, uvođenje tiolnih grupa može imati za posledicu narušavanje nativne kvaternarne strukture. Iako modifikacija TR-om dovodi do progresivnog raskidanja intermolekulskih disulfidnih veza antitela, interesantno je da nisu uočene značajnije promene tercijarne i sekundarne strukture nakon tiolovanja antitela. Nativni IgG sadrži 16-25 disulfida, u zavisnosti od IgG potklase, od kojih 4-13 intermolekulskih, koji stabilizuju njegovu kvaternarnu strukturu, i 12 intramolekulskih disulfida koji stabilizuju njegovu tercijarnu strukturu. Pošto su intermolekulski disulfidi najizloženiji rastvoru, oni su bili glavna meta za

izmenu disulfida pod primenjenim uslovima tiolovanja, dok su nativni intramolekulski disulfidi mahom ostali očuvani. Samim tim, ekstenzivnije uvođenje tiolnih grupa (pri molarnim odnosima reagensa 100:1, 150:1 i 200:1) dovelo je do izmene većeg broja prvenstveno intermolekulskih disulfida, što je imalo za posledicu sve progresivnije narušavanje kvaternarne strukture, dok su tercijarna i sekundarna struktura teških i lakih lanaca, u bilo kojoj od gore navedenih oligomernih formi, ostale mahom očuvane. Slično je pokazano u radu Dilon i saradnika, u kom nisu uočene razlike na nivou sekundarnih struktura između disulfidnih izoformi humanih antitela IgG2 potklase (Dillon et al., 2008).

Premda su disulfidne veze od velikog značaja za integritet strukture antitela, veliki broj dodatnih nekovalentnih interakcija koje se uspostavljaju između teških lanaca antitela i između teških i lakih lanaca značajno doprinosi strukturi antitela (Delves et al., 2017). Neki raniji literaturni navodi ukazivali su na to da nativne disulfidne veze možda nisu apsolutno neophodne za očuvanje kvaternarne strukture antitela, oslanjajući se na zapažanja da antitelo ABPC48 mišjeg plazmacitoma, u kojem je cistein varijabilnog domena teškog lanca zamenjen ostatkom tirozina, zadržava sposobnost vezivanja antigena (Rudikoff i Pumphrey, 1986). Međutim, čak i u uslovima očuvanosti nekovalentnih interakcija koje stabilizuju kvaternarnu strukturu antitela, pokazano je da izmenjen profil disulfidnih veza antitela može imati značajan uticaj na imunološku reaktivnost antitela. Nepotpuno formiranje disulfidnih veza u varijabilnom domenu teškog lanca rekombinantnog terapijskog anti-IgE antitela može dovesti do značajnog smanjenja njegove reaktivnosti (Ouellette et al., 2010), a slično smanjenje aktivnosti za čak 70% pokazano je i slučaju rekombinantnog humanizovanog antitela koje je imalo slobodnu tiolnu grupu u Fab regionu (Chaderjian et al., 2008). Istovremeno, veća količina slobodnih sulfhidrilnih grupa se povezuje sa manjom termalnom stabilnošću i rekombinantnih i humanih IgG antitela (Lacy et al., 2008). Opsežnija istraživanja uočenih fenomena trenutno su u toku, a funkcionalne implikacije izmene disulfida IgG antitela tiolovanih Trautovim reagensom, često korišćenim reagensom za modifikaciju amino grupa, od posebnog su značaja u kontekstu upotrebe antitela kao terapeutika.

Nakon uvođenja sulfhidrilnih grupa Trautovim reagensom, tiolovana antitela su kovalentno modifikovana PCB-om, korišćenjem dvadesetostrukog molarnog viška PCB-a u odnosu na protein. Mada humana IgG antitela u nativnom obliku ne bi trebalo da sadrže slobodnu sulfhidrilnu grupu, što određivanje sadržaja slobodnih sulfhidrilnih grupa u kontrolnom, nemodifikovanom, uzorku antitela i potvrđuje, usled dinamičke prirode disulfidnih veza IgG antitela (Liu i May, 2012) određen nivo modifikacije PCB-om uočen je i u netiolovanom uzorku antitela. Veći stepen modifikacije TR-om dovodi do većeg stepena modifikacije antitela PCB-om i amplifikacije fluorescentnog signala. Međutim, usled negativnog uticaja modifikacije TR-om na kvaternarnu strukturu antitela, koja bi se mogla odraziti na funkcionalne osobine antitela, kao optimalan molarni odnos reagensa za modifikaciju IgG antitela izabran je molarni odnos 50:1 u korist reagensa, koji u proseku uvodi 2,5 sulfhidrilne grupe. Ovaj molarni odnos TR-a potom je primenjen u postupku modifikacije sekundarnih, kozjih anti-zečjih, IgG antitela.

Iako je, modifikacijom pedesetostrukim molarnim viškom Trautovog reagensa, kozje anti-zečje IgG antitelo uspešno obeleženo fluorescentnim PCB-om, upotrebom tako obeleženog sekundarnog antitela kao detekcionog antitela nije postignuta detekcija tropomiozina kao antigena u dot blotu. Budući da je u kontrolnom eksperimentu pokazano da se, korišćenjem PCB-om obeleženih antitela kao sekundarnih antitela i tercijarnih anti-kozjih antitela obeleženih alkalnom fosfatazom kao detekcionih antitela, postiže detekcija antigena, čini se da je specifičnost prepoznavanja primarnih zečjih antitela od strane sekundarnih (kozjih anti-zečjih) antitela obeleženih PCB-om i prepoznavanja sekundarnih antitela od strane tercijarnih (anti-kozjih) antitela očuvana i nakon modifikacije PCB-om.

Postoje najmanje dva moguća razloga za neuspehu detekciju tropomiozina sekundarnim antitelima obeleženim PCB-om. Prvi je efektivna koncentracija detekcionih antitela u imunoblotu, koja je očigledno manja od limita detekcije korišćene metode, koji je procenjen na oko 12 ng antitela. Osim toga, korišćeni uslovi detekcije (ekscitacija na 532 nm, emisija na 580 nm) nisu

najoptimalniji za fluorescentnu detekciju PCB-a. Primenom ekscitacionog lasera i emisionog filtera koji su približniji talasnim dužinama ekscitacije i emisije PCB-a najverovatnije bi se značajno povećao prag detekcije. Pored toga, korišćena detekciona sekundarna antitela imaju maksimalno po 2-3 molekula PCB-a po molekulu antitela. Kako je pokazano da se, korišćenjem dvestostrukog molarnog viška reagensa, može uvesti čak 9-10 sulfhidrilnih grupa, za očekivati je da bi se pri tim uslovima uvelo više molekula PCB-a po molekulu antitela. Amplifikacija fluorescentnog signala pri većim molarnim odnosima Trautovog reagensa je i pokazana (**Slika 56**) i posebno je izražena pri molarnim odnosima reagensa većim od 50:1. Sa druge strane, primena većih molarnih odnosa Trautovog reagensa dovodi do značajnih promena kvaternarne strukture antitela. U tom smislu, potrebno je naći balans između amplifikacije fluorescentnog signala i potencijalnog negativnog uticaja modifikacije na imunološku reaktivnost antitela. U ovom radu je kao odlučujući kriterijum za optimalan odnos reagensa korišćen negativan efekat modifikacije na izmenu disulfida i kvaternarnu strukturu antitela. Efikasnost konjugovanja tiolovanih antitela PCB-om mogla bi se povećati i tako što se dijalizovani adukt antitelo-PCB podvrgne ponovljenom postupku konjugacije sa svežim alikvotom/alikvotima PCB-a, kao što je to rađeno kod pripreme BLG-PCB adukta, gde je ponovljenom inkubacijom postignuta efikasnost konjugacije PCB-a od 70%. Na ovaj način tiolovanje čak i sa optimalnim viškom Trautovog reagensa (50:1) bi znatno povećalo broj vezanih PCB molekula po molekulu antitela, a samim tim i fluorescenciju antitela. Neophodna su dalja istraživanja za optimizaciju ovog pristupa obeležavanja antitela i razumevanje uticaja modifikacije na imunološku reaktivnost antitela, kako bi se PCB-om obeležena antitela mogla koristiti u imunološkim metodama baziranim na fluorescenciji.

5.2.3. Kovalentna modifikacija α -laktalbumina fikocijanobilinom

Mogućnost fluorescentnog obeležavanja fikocijanobilinom čak i onih proteina koji u svom nativnom obliku ne sadrže slobodnu sulfhidrilnu grupu dodatno je potvrđena korišćenjem goveđeg α -laktalbumina kao model proteina. Alfa-laktalbumin je mali (14 kDa), kalcijum-vezujući protein, koji u svom nativnom obliku sadrži četiri disulfidne veze, ali ne i slobodnu sulfhidrilnu grupu (Permyakov, 2020).

Korišćenjem Trautovog reagensa u odnosu 50:1 (mol:mol, reagens:protein), u molekul ALA uvedeno je, u proseku, 1,6 sulfhidrilnih grupa. Broj uvedenih sulfhidrilnih grupa najverovatnije je veći, ali uvedene sulfhidrilne grupe podležu građenju disulfidnih veza sa drugim molekulima ALA, čime nastaju dimeri, trimeri i viši oligomeri ALA. Osim značajnog uticaja na kvaternarnu strukturu ALA, u smislu promovisanja oligomerizacije, modifikacija Trautovim reagensom ima bitan uticaj i na terciarnu strukturu ALA. Naime, tiolovanjem ALA Trautovim reagensom protein u potpunosti gubi terciarnu strukturu, uz očuvanje sekundarnih struktura, odnosno zadobija tipičnu strukturu stopljene globule, nalik onoj koju ALA zadobija na kiselim pH vrednostima, pri povišenoj temperaturi i u prisustvu malih koncentracija denaturanata (Ku wajima, 1977; Permyakov, 2020; Radibratovic et al., 2019; Vanderheeren i Hanssens, 1994). U literaturi je opisano postojanje velikog broja konformacionih izomera ALA koji sadrže nenativne disulfidne veze (Chang i Li, 2001). Slične nenativne disulfidne veze najverovatnije nastaju tiolovanjem proteina Trautovim reagensom, ali, za razliku od efekta uočenog prilikom tiolovanja antitela, u slučaju ALA dovode do oligomerizacije proteina.

Nakon tiolovanja, i monomer ALA, ali i oligomerne forme ALA, uspešno su modifikovane PCB-om. Kako tiolovanjem ALA dolazi do velikih promena u pogledu strukture proteina, nije se nastavilo sa daljim istraživanjima funkcionalnih karakteristika ALA, kao u slučaju BSA i antitela. Međutim, nenativna struktura ALA nastala tiolovanjem ne mora nužno imati negativnu konotaciju. Naime, ALA u konformaciji stopljene globule u kompleksu sa oleinskom kiselinom ispoljava antikancersku aktivnost (Pettersson-Kastberg et al., 2009). Stoga potencijalna buduća istraživanja treba da se fokusiraju na potencijalne funkcionalne osobine koje ALA dobija modifikacijom PCB-om, a koje mogu zavisiti kako od strukture samog ALA, tako i od bioaktivnih svojstava PCB-a.

Rezultati ispitivanja efekata tiolovanja na strukturne osobine ALA, posmatrani u kontekstu onih dobijenih za BSA i IgG antitela, ujedno ukazuju da su efekti kovalentne modifikacije proteina tiolovanjem Trautovim reagensom na strukturu i konformaciju jedinstveni za svaki izučavani protein. Međutim, i pored toga što se čini da se ne mogu izvoditi opšti zaključci o efektima tiolovanja na strukturne i funkcionalne osobine proteina, neke pravilnosti se ipak mogu uočiti. Naime, na osnovu rezultata dobijenih nakon uvođenja tiolnih grupa Trautovim reagensom na različitim proteinima, može se zaključiti da nivo destabilizacije tercijarne strukture uvođenjem tiolnih grupa zavisi pre od broja uvedenih tiolnih grupa po aminokiselinskom ostatku ili po molekulskoj masi, nego po molekulu proteina. Naime, kod BSA do značajnije destabilizacije tercijarne strukture dolazi tek uvođenjem više od 7,1 tiolnih grupa po molekulu proteina, dok kod ALA uvođenje svega 1,6 tiolnih grupa po molekulu proteina dramatično destabilizuje tercijarnu strukturu. Međutim, kada se ovi brojevi uvedenih tiolnih grupa izračunaju po aminokiselinskom ostatku (0,012 kod BSA i 0,013 kod ALA), ili po molekulskoj masi (0,107/kDa za BSA i 0,113 /kDa za ALA) vidi se da je kod oba proteina došlo do značajne destabilizacije pri sličnom nivou tiolovanja u odnosu na njihovu veličinu. Kod IgG antitela izgleda da nije došlo do značajne destabilizacije tercijarne strukture, jer i nakon najekstenzivnijeg tiolovanja, sa uvedenih 9 tiola po molekulu, nivo tiolovanja u odnosu na veličinu antitela je bio duplo manji nego u slučaju BSA i ALA (0,006 po aminokiselinskom ostatku, tj. 0,06/kDa). Dobijeni rezultati stoga, bar grubo, ukazuju da se pri uvođenju tiolnih grupa Trautovim reagensom u nivou većem od 0,011 tiola po aminokiselinskom ostatku, tj. većem od 0,10 tiola po kDa proteina, mogu očekivati drastičnije promene u tercijarnoj strukturi bilo kog proteina. Samim tim, u budućim eksperimentima, pri uvođenju tiolnih grupa Trautovim reagensom u proteine, treba uzimati u obzir odnos molova reagensa prema broju molova aminokiselina, a ne samo prema broju molova proteina. Pored toga, treba uzeti u obzir da su intermolekulski disulfidi koji stabilizuju kvaternarnu strukturu proteina najizloženiji rastvaraču i samim tim glavne mete za izmenu disulfida. Dodatno treba imati u vidu da tokom uvođenja tiola Trautovim reagensom u narušavanju tercijarne strukture mogu igrati ulogu i modifikacije lizinskih ostataka, prvenstveno onih koji su uključeni u sone mostove i time značajnije doprinose stabilizaciji strukture, a što je specifično za svaki protein.

Uzevši sve navedeno u obzir, dobijeni rezultati mogu poslužiti kao korisna smernica za balansirano uvođenje tiolnih grupa u druge proteine Trautovim reagensom, kako monomerne, tako i oligomerne proteine, sa kvaternarnom strukturom stabilizovanom disulfidima, kako bi se dobili proteini sa maksimalnim brojem uvedenih tiola, uz minimalne efekte na strukturu i funkciju proteina.

6. Zaključci

Fikocijanobilin je bioaktivna, fluorescentna hromofora C-fikocijanina, glavnog hromoproteina cijanobakterije *Arthrospira platensis*, komercijalno poznate kao Spirulina. Predmet ove doktorske disertacije bilo je ispitivanje kovalentne modifikacije odabranih globularnih proteina fikocijanobilinom. Bioaktivna svojstva, sa jedne strane, i izražene fluorescentne osobine, s druge strane, čine PCB atraktivnim kandidatom za kovalentne modifikacije proteina. U tom kontekstu, za unapređenje funkcionalnih osobina kao model proteini za modifikaciju PCB-om u ovoj disertaciji korišćeni su proteini hrane goveđi β -laktoglobulin (BLG) i albumin goveđeg seruma (BSA), dok su za ispitivanje mogućnosti fluorescentnog obeležavanja proteina, za primenu u metodama baziranim na fluorescenciji, korišćena poliklonska IgG antitela i goveđi α -laktalbumin (ALA). Odabrani proteini mogli bi se podeliti u dve grupe – one koji u svom sastavu sadrže slobodnu sulfhidrilnu grupu, poput BLG-a i BSA, i one koji je u nativnom obliku ne sadrže, kao što su IgG antitela i ALA.

Beta-laktoglobulin je glavni protein surutke koji poseduje brojne tehno-funkcionalne osobine poželjne u industriji hrane, a ujedno je i jedan od glavnih alergena kravljeg mleka. Kombinacijom spektroskopskih, elektroforetskih metoda i metoda masene spektrometrije, uz korišćenje računarskih metoda, pokazano je da se BLG na fiziološkim uslovima, na pH 7,2 i 37 °C, kovalentno modifikuje PCB-om. Vezivanje pigmenta za slobodan ostatak cisteina BLG-a je sporo ($k_a=0,065 \text{ min}^{-1}$), umerenog afiniteta ($K_a=4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$) i stereoselektivno. Vezivanje pigmenta se odvija u širokom opsegu pH vrednosti, uključujući uslove koji simuliraju one prisutne u gastrointestinalnom traktu. Formiranje kovalentnog adukta odvija se brže i u većem prinosu na višim pH vrednostima, kao i u prisustvu uree ($k_a=0,101 \text{ min}^{-1}$). Modifikacija PCB-om dovodi do značajnih promena tercijarne strukture BLG-a i diskretnih promena sekundarne strukture. Istovremeno, vezani PCB ima veću vrednost fluorescencije i linearniju konformaciju u vezanom obliku, u poređenju sa slobodnim pigmentom. Kombinacijom računarskih metoda, poput dirigovane molekulske dinamike, kojom se simulira izmena disulfidnih mostova BLG-a, kao i nekovalentnog i kovalentnog molekuskog dokinga, pokazano je da je preferencijalna meta kovalentne modifikacije Cys119 BLG-a, koji se nalazi u hidrofobnom džepu (tzv. kaliksu) proteina.

Imajući u vidu efekat kovalentne modifikacije PCB-om na strukturne osobine BLG-a, deo disertacije je bio posvećen ispitivanju uticaja PCB-a na funkcionalne osobine ovog važnog proteina hrane, koje su relevantne za njegovu upotrebu u industriji hrane. Antioksidativne osobine, ponašanje pri zagrevanju, *in vitro* digestibilnost pepsinom i pankreatinom, kao i IgE-vezujuće osobine kovalentno modifikovanog BLG-a ispitane su i upoređene sa nemodifikovanim proteinom. Modifikovani hromoprotein ima poboljšane antioksidativne osobine u poređenju sa nemodifikovanim proteinom, dok vezani PCB štiti protein od oksidacije izazvane slobodnim radikalima. Iako nemodifikovani BLG i kovalentni BLG-PCB konjugat pokazuju sličnu termalnu stabilnost u pogledu tački topljenja, kako na pH 7,2, tako i na pH 2,5, BLG-PCB konjugat manje je podložan kovalentnom i nekovalentnom agregiranju u uslovima blagog termičkog tretmana koji imitira uslove dugotrajne pasterizacije na niskoj temperaturi (polučasovno zagrevanje proteina na 63 °C). Blokirana tiolna grupa i smanjena površinska hidrofobnost BLG-PCB konjugata, kao i nenativna tranzicija β -pločica u α -helikse, doprinose manjoj podložnosti BLG-PCB konjugata termički indukovanom agregiranju. Kovalentni BLG-PCB konjugat ispoljava veću rezistenciju na digestiju pepsinom i pankreatinom u odnosu na nemodifikovani BLG u *in vitro* modelima digestije, a istovremeno ima neizmenjenu IgE reaktivnost.

Oslanjajući se na prethodno pokazanu sposobnost PCB-a da kovalentno modifikuje sulfhidrilne grupe proteina, drugi deo disertacije bio je fokusiran na ispitivanje mogućnosti uvođenja sulfhidrilnih grupa u proteine koji u svom nativnom obliku ne sadrže slobodnu tiolnu grupu ili sadrže samo jednu, nakon čega su uvedene sulfhidrilne grupe modifikovane PCB-om. Korišćenjem 2-iminotiolana, poznatijeg kao Trautov reagens, u BSA, poliklonska IgG antitela i

ALA uvedene su sulfhidrilne grupe, modifikacijom lizinskih ostataka ovih proteina, nakon čega su oni modifikovani PCB-om.

Albumin goveđeg seruma predstavlja jedan od najizučavanijih proteina i model protein u mnogim biohemijским i biofizičkim studijama. Zbog svoje biokompatibilnosti, biodegradabilnosti i velikog kapaciteta za vezivanje i hidrofilnih i hidrofobnih liganada, često se proučava i koristi kao nano-nosač lekova i bioaktivnih komponenti hrane u farmaceutskim i prehrambenim formulacijama. Modifikacijom BSA Trautovim reagensom uspešno su uvedene sulfhidrilne grupe u molekul BSA pri različitim molarnim odnosima reagensa i proteina. Povećanje molarnog odnosa reagensa i BSA progresivno je modifikovalo BSA. CD spektroskopijom u bliskoj i dalekoj UV oblasti i elektroforetskom analizom u nativnim i redukujućim uslovima uočeno je da povećanje stepena modifikacije BSA Trautovim reagensom dovodi do sve većih promena strukture BSA, uz istovremene minorne promene u profilu oligomerizacije i agregiranja BSA. Pedesetostruki molarni višak Trautovog reagensa pokazao se kao najveći primenjeni molarni odnos reagensa, koji indukuje izražene promene tercijarne strukture BSA, ne utičući pritom na sekundarne strukture, pri tome uvodeći prosečno 7,1 sulfhidrilnu grupu po molekulu BSA. Nakon tiolovanja Trautovim reagensom, novouvedene sulfhidrilne grupe BSA kovalentno su modifikovane PCB-om na pH 9, korišćenjem dvadesetostrukog molarnog viška PCB-a u odnosu na protein. Iako povećanje molarnog odnosa Trautovog reagensa dovodi do pojačavanja fluorescentnog signala poreklom od PCB-a, usled negativnog uticaja tiolovanja na strukturne osobine BSA i profil agregiranja, kao optimalan molarni odnos Trautovog reagensa za modifikaciju PCB-om izabran je molarni odnos 50:1 u korist reagensa. Vezivanje kvercetina za BSA-PCB konjugat, koji je pripremljen korišćenjem ovog molarnog odnosa reagensa, odvija se sa sličnim afinitetom kao i za netiolovani BSA. Pored toga, BSA-PCB konjugat poseduje znatno veću antioksidativnu aktivnost i povećanu oksidativnu stabilnost u odnosu na nemodifikovani protein.

Optimalan molarni odnos Trautovog reagensa za modifikaciju sekundarnih, kozjih anti-zečjih, IgG antitela PCB-om izabran je na osnovu prethodne modifikacije humanih IgG antitela različitim molarnim odnosima Trautovog reagensa, uz praćenje promena u sadržaju izloženih amino i sulfhidrilnih grupa i ispitivanje uticaja tiolovanja na strukturne osobine i promene u proteinskom profilu tiolovanih antitela. Koristeći uticaj na kvaternarnu strukturu antitela kao primarni kriterijum, kao optimalni molarni odnos Trautovog reagensa za modifikaciju IgG antitela izabran je odnos 50:1, koji u proseku uvodi 2,5 sulfhidrilne grupe po molekulu antitela. Modifikacijom pedesetostrukim molarnim viškom Trautovog reagensa, sekundarna antitela uspešno su obeležena PCB-om. Imunološka reaktivnost PCB-om modifikovanih sekundarnih antitela u pogledu prepoznavanja test antigena tropomiozina je zadržana. Međutim, primena ovih sekundarnih antitela za fluorescentnu detekciju antigena zahteva dalju optimizaciju, kako u pogledu eksperimentalnih uslova tiolacije i modifikacije PCB-om (dužina inkubacije, pH i temperatura reakcije, koncentracija Trautovog reagensa i PCB-a), tako i u pogledu stabilizacije kovalentno uvedenog PCB-a u cilju očuvanja njegovih fluorescentnih svojstava.

Mogućnost kovalentne modifikacija PCB-om proteina koji ne sadrže slobodnu sulfhidrilnu grupu dodatno je potvrđena korišćenjem goveđeg ALA kao model sistema. Pri pedesetostrukom molarnom višku Trautovog reagensa, u molekul ALA uvedeno je, u proseku, 1,6 sulfhidrilnih grupa. U poređenju sa efektima tiolovanja na strukturne i funkcionalne osobine BSA i IgG antitela, modifikacija ALA Trautovim reagensom je imala drastičan efekat na strukturu proteina, pri čemu je došlo do potpunog gubljenja tercijarne strukture proteina i zadobijanja strukture stopljene globule. Pored toga, tiolovani ALA podleže oligomerizaciji u dimere, trimere i više oligomere. Međutim, bez obzira na to, sve tiolovane nenativne forme ALA uspešno su modifikovane PCB-om. Potencijalne funkcionalne osobine tako nastalog konjugata biće predmet budućih istraživanja.

Dobijeni rezultati pokazuju da uvođenje tiola u proteine Trautovim reagensom za posledicu ima izmenu disulfida, kojom se raskidaju nativni disulfidi, uz istovremeno nastajanje nenativnih disulfida između uvedenih tiola i ostataka cisteina koji su bili disulfidno vezani, što može dovesti do narušavanja strukture proteina. Uzevši navedeno u obzir, pažljivom optimizacijom reakcionih

uslova potrebno je odabrati optimalan odnos Trautovog reagensa, kako bi se napravio balans između stepena tiolovanja proteina, a time i stepena modifikacije PCB-om, i potencijalnog negativnog efekta modifikacije na strukturne i funkcionalne osobine proteina.

Rezultati ove doktorske disertacije pružaju nova saznanja o kovalentnim modifikacijama globularnih proteina fikocijanobilinom. Kovalentnim modifikacijama proteina bioaktivnim i fluorescentnim PCB-om moguće je proširiti funkcije proteina, bilo u cilju sticanja novih bioaktivnih osobina, bilo u cilju dobijanja novih fluorescentnih proba za primenu u tehnikama baziranim na fluorescenciji. Osim značajnih saznanja o različitim aspektima efekata modifikacije PCB-om na strukturne i funkcionalne osobine proteina, dobijeni rezultati pružaju i nova saznanja o efektima tiolovanja proteina. Rezultati proistekli iz ove doktorske disertacije predstavljaju svojevrsan dokaz koncepta za modifikaciju bilo kog proteina fikocijanobilinom, nezavisno od toga da li sadrži slobodnu sulfhidrilnu grupu, ali i bilo kojim reagensom reaktivnim sa sulfhidrilnim grupama proteina.

7. Literatura

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2021). *Cellular and Molecular Immunology* (10th ed). Elsevier.
- Abd El-Maksoud, A. A., Abd El-Ghany, I. H., El-Beltagi, H. S., Anankanbil, S., Banerjee, C., Petersen, S. V., Pérez, B., & Guo, Z. (2018). Adding functionality to milk-based protein: Preparation, and physico-chemical characterization of β -lactoglobulin-phenolic conjugates. *Food Chemistry*, 241, 281–289. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.08.101>
- Adams, S. L., Barnett, D., Walsh, B. J., Pearce, R. J., Hill, D. J., & Howden, M. E. H. (1991). Human IgE-binding synthetic peptides of bovine β -lactoglobulin and α -lactalbumin. In vitro cross-reactivity of the allergens. *Immunology & Cell Biology*, 69(3), 191–197. <https://doi.org/10.1038/icb.1991.28>
- Adjali, A., Clarot, I., Chen, Z., Marchioni, E., & Boudier, A. (2022). Physicochemical degradation of phycocyanin and means to improve its stability: A short review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 12(3), 406–414. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2021.12.005>
- Ahangarpour, M., Kavianinia, I., & Brimble, M. A. (2023). Thia-Michael addition: the route to promising opportunities for fast and cysteine-specific modification. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 21(15), 3057–3072. <https://doi.org/10.1039/D2OB02262A>
- Akkermans, C., Venema, P., van der Goot, A. J., Gruppen, H., Bakx, E. J., Boom, R. M., & van der Linden, E. (2008). Peptides are Building Blocks of Heat-Induced Fibrillar Protein Aggregates of β -Lactoglobulin Formed at pH 2. *Biomacromolecules*, 9(5), 1474–1479. <https://doi.org/10.1021/bm7014224>
- Al-Hanish, A., Stanic-Vucinic, D., Mihailovic, J., Prodic, I., Minic, S., Stojadinovic, M., Radibratovic, M., Milcic, M., & Cirkovic Velickovic, T. (2016). Noncovalent interactions of bovine α -lactalbumin with green tea polyphenol, epigallocatechin-3-gallate. *Food Hydrocolloids*, 61, 241–250. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.05.012>
- Al-Malah, K. I., Azzam, M. O. J., & Omari, R. M. (2000). Emulsifying properties of BSA in different vegetable oil emulsions using conductivity technique. *Food Hydrocolloids*, 14(5), 485–490. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(00\)00028-X](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(00)00028-X)
- Albani, J. R. (2014). Origin of Tryptophan Fluorescence Lifetimes Part 1. Fluorescence Lifetimes Origin of Tryptophan Free in Solution. *Journal of Fluorescence*, 24(1), 93–104. <https://doi.org/10.1007/s10895-013-1277-8>
- Albrecht, A., Vovk, I., & Simonovska, B. (2012). Addition of β -Lactoglobulin Produces Water-Soluble Shikonin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(43), 10834–10843. <https://doi.org/10.1021/jf303153d>
- Ali, M., Homann, T., Khalil, M., Kruse, H.-P., & Rawel, H. (2013). Milk Whey Protein Modification by Coffee-Specific Phenolics: Effect on Structural and Functional Properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(28), 6911–6920. <https://doi.org/10.1021/jf402221m>
- Ali, Y. A., Ahmed, O. M., Soliman, H. A., Abdel-Gabbar, M., Al-Dossari, M., Abd El-Gawaad, N.

- S., El-Nahass, E.-S., & Ahmed, N. A. (2023). Rutin and Hesperidin Alleviate Paclitaxel-Induced Nephrocardiotoxicity in Wistar Rats via Suppressing the Oxidative Stress and Enhancing the Antioxidant Defense Mechanisms. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2023(1), 1–15. <https://doi.org/10.1155/2023/5068304>
- Altmann, B. A., & Rosenau, S. (2022). Spirulina as Animal Feed: Opportunities and Challenges. *Foods*, 11(7), 965. <https://doi.org/10.3390/foods11070965>
- Anantharamkrishnan, V., Hoye, T., & Reineccius, G. A. (2020). Covalent Adduct Formation Between Flavor Compounds of Various Functional Group Classes and the Model Protein β -Lactoglobulin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(23), 6395–6402. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c01925>
- Angal, S., King, D. J., Bodmer, M. W., Turner, A., Lawson, A. D. G., Roberts, G., Pedley, B., & Adair, J. R. (1993). A single amino acid substitution abolishes the heterogeneity of chimeric mouse/human (IgG4) antibody. *Molecular Immunology*, 30(1), 105–108. [https://doi.org/10.1016/0161-5890\(93\)90432-B](https://doi.org/10.1016/0161-5890(93)90432-B)
- Aravind, S. R., & Krishnan, L. K. (2016). Curcumin-albumin conjugates as an effective anti-cancer agent with immunomodulatory properties. *International Immunopharmacology*, 34, 78–85. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2016.02.010>
- Arciero, D. M., Dallas, J. L., & Glazer, A. N. (1988). In vitro Attachment of Bilins to Apophycocyanin. *Journal of Biological Chemistry*, 263(34), 18350–18357. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)81366-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)81366-2)
- Arnaudov, L. N., de Vries, R., Ippel, H., & van Mierlo, C. P. M. (2003). Multiple Steps during the Formation of β -Lactoglobulin Fibrils. *Biomacromolecules*, 4(6), 1614–1622. <https://doi.org/10.1021/bm034096b>
- Astwood, J. D., Leach, J. N., & Fuchs, R. L. (1996). Stability of food allergens to digestion in vitro. *Nature Biotechnology*, 14(10), 1269–1273. <https://doi.org/10.1038/nbt1096-1269>
- Ayoglu, B., Szarka, E., Huber, K., Orosz, A., Babos, F., Magyar, A., Hudecz, F., Rojkovich, B., Gáti, T., Nagy, G., Schwenk, J. M., Sármay, G., Prechl, J., Nilsson, P., & Papp, K. (2014). Bead Arrays for Antibody and Complement Profiling Reveal Joint Contribution of Antibody Isotypes to C3 Deposition. *PLOS One*, 9(5), e96403. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096403>
- Bak, D. W., Bechtel, T. J., Falco, J. A., & Weerapana, E. (2019). Cysteine reactivity across the subcellular universe. *Current Opinion in Chemical Biology*, 48, 96–105. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2018.11.002>
- Barbosa, L. R. S., Ortore, M. G., Spinozzi, F., Mariani, P., Bernstorff, S., & Itri, R. (2010). The Importance of Protein-Protein Interactions on the pH-Induced Conformational Changes of Bovine Serum Albumin: A Small-Angle X-Ray Scattering Study. *Biophysical Journal*, 98(1), 147–157. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2009.09.056>
- Barteri, M., Gaudiano, M. C., Rotella, S., Benagiano, G., & Pala, A. (2000). Effect of pH on the structure and aggregation of human glycodelin A. A comparison with β -lactoglobulin A. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1479(1–2), 255–264. [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(00\)00021-2](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(00)00021-2)

- Belinskaia, D. A., Voronina, P. A., Shmurak, V. I., Vovk, M. A., Batalova, A. A., Jenkins, R. O., & Goncharov, N. V. (2020). The universal soldier: Enzymatic and non-enzymatic antioxidant functions of serum albumin. *Antioxidants*, 9(10), 966. <https://doi.org/10.3390/antiox9100966>
- Benedé, S., López-Expósito, I., Giménez, G., Grishina, G., Bardina, L., Sampson, H. A., López-Fandiño, R., & Molina, E. (2014). Mapping of IgE epitopes in in vitro gastroduodenal digests of β -lactoglobulin produced with human and simulated fluids. *Food Research International*, 62, 1127–1133. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.05.069>
- Benedetti, S., Benvenuti, F., Scoglio, S., & Canestrari, F. (2010). Oxygen Radical Absorbance Capacity of Phycocyanin and Phycocyanobilin from the Food Supplement *Aphanizomenon flos-aquae*. *Journal of Medicinal Food*, 13(1), 223–227. <https://doi.org/10.1089/jmf.2008.0257>
- Berg, E. A., & Fishman, J. B. (2020). Labeling Antibodies. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2020(7), 252–263. <https://doi.org/10.1101/pdb.top099242>
- Berkelman, T. R., & Lagarias, J. C. (1986). Visualization of Bilin-Linked Peptides and Proteins in Polyacrylamide Gels. *Analytical Biochemistry*, 156(1), 194–201. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(86\)90173-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(86)90173-9)
- Bhat, V. B., & Madyastha, K. M. (2001). Scavenging of Peroxynitrite by Phycocyanin and Phycocyanobilin from *Spirulina platensis*: Protection against Oxidative Damage to DNA. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 285(2), 262–266. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5195>
- Bi, S., Ding, L., Tian, Y., Song, D., Zhou, X., Liu, X., & Zhang, H. (2004). Investigation of the interaction between flavonoids and human serum albumin. *Journal of Molecular Structure*, 703(1–3), 37–45. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2004.05.026>
- Biancalana, M., & Koide, S. (2010). Molecular Mechanism of Thioflavin-T Binding to Amyloid Fibrils. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1804(7), 1405–1412. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2010.04.001>
- Bianco, G., Forli, S., Goodsell, D. S., & Olson, A. J. (2016). Covalent docking using autodock: Two-point attractor and flexible side chain methods. *Protein Science*, 25(1), 295–301. <https://doi.org/10.1002/pro.2733>
- Bishop, J. E., Nagy, J. O., O'Connell, J. F., & Rapoport, H. (1991). Diastereoselective Synthesis of Phycocyanobilin-Cysteine Adducts. *Journal of the American Chemical Society*, 113(21), 8024–8035. <https://doi.org/10.1021/ja00021a032>
- Boland, M. (2011). Whey proteins. In G. O. Phillips & P. A. Williams (Eds.), *Handbook of Food Proteins* (1st Edition, Vol. 13, Issue 4, pp. 30–55). Elsevier Science. <https://doi.org/10.1533/9780857093639.30>
- Bolton, G. R., & Mehta, K. K. (2016). The role of more than 40 years of improvement in protein A chromatography in the growth of the therapeutic antibody industry. *Biotechnology Progress*, 32(5), 1193–1202. <https://doi.org/10.1002/btpr.2324>
- Bonoli-Carbognin, M., Cerretani, L., Bendini, A., Almajano, M. P., & Gordon, M. H. (2008). Bovine Serum Albumin Produces a Synergistic Increase in the Antioxidant Activity of Virgin Olive Oil Phenolic Compounds in Oil-in-Water Emulsions. *Journal of Agricultural and Food*

Chemistry, 56(16), 7076–7081. <https://doi.org/10.1021/jf800743r>

- Bourassa, P., Kanakis, C. D., Tarantilis, P., Pollissiou, M. G., & Tajmir-Riahi, H. A. (2010). Resveratrol, Genistein, and Curcumin Bind Bovine Serum Albumin. *The Journal of Physical Chemistry B*, 114(9), 3348–3354. <https://doi.org/10.1021/jp9115996>
- Boye, J. I., Ma, C. Y., & Ismail, A. (2004). Thermal stability of β -lactoglobulins A and B: effect of SDS, urea, cysteine and N-ethylmaleimide. *Journal of Dairy Research*, 71(2), 207–215. <https://doi.org/10.1017/S0022029904000184>
- Breiteneder, H. (2018). Mapping of conformational IgE epitopes of food allergens. *Allergy*, 73(11), 2107–2109. <https://doi.org/10.1111/all.13592>
- Bruque, M. G., Rodger, A., Hoffmann, S. V., Jones, N. C., Aucamp, J., Dafforn, T. R., & Thomas, O. R. T. (2024). Analysis of the Structure of 14 Therapeutic Antibodies Using Circular Dichroism Spectroscopy. *Analytical Chemistry*, 96, 15151–15159. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.4c01882>
- Bujacz, A. (2012). Structures of bovine, equine and leporine serum albumin. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 68(10), 1278–1289. <https://doi.org/10.1107/S0907444912027047>
- Bulaj, G., Kortemme, T., & Goldenberg, D. P. (1998). Ionization–Reactivity Relationships for Cysteine Thiols in Polypeptides. *Biochemistry*, 37(25), 8965–8972. <https://doi.org/10.1021/bi973101r>
- Burova, T. V., Choiset, Y., Tran, V., & Haertlé, T. (1998). Role of free Cys121 in stabilization of bovine β -lactoglobulin B. *Protein Engineering, Design and Selection*, 11(11), 1065–1073. <https://doi.org/10.1093/protein/11.11.1065>
- Carter, D. C., & Ho, J. X. (1994). Structure of Serum Albumin. In C. B. Anfinsen, J. T. Edsall, F. M. Richards, & D. S. Eisenberg (Eds.), *Advances in Protein Chemistry* (Vol. 45, pp. 153–203). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0065-3233\(08\)60640-3](https://doi.org/10.1016/S0065-3233(08)60640-3)
- Cerecedo, I., Zamora, J., Shreffler, W. G., Lin, J., Bardina, L., Dieguez, M. C., Wang, J., Muriel, A., de la Hoz, B., & Sampson, H. A. (2008). Mapping of the IgE and IgG4 sequential epitopes of milk allergens with a peptide microarray–based immunoassay. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 122(3), 589–594. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2008.06.040>
- Cervantes-Llanos, M., Lagumersindez-Denis, N., Marín-Prida, J., Pavón-Fuentes, N., Falcon-Cama, V., Piniella-Matamoros, B., Camacho-Rodríguez, H., Fernández-Massó, J. R., Valenzuela-Silva, C., Raíces-Cruz, I., Pentón-Arias, E., Teixeira, M. M., & Pentón-Rol, G. (2018). Beneficial effects of oral administration of C-Phycocyanin and Phycocyanobilin in rodent models of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Life Sciences*, 194, 130–138. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2017.12.032>
- Chaderjian, W. B., Chin, E. T., Harris, R. J., & Etcheverry, T. M. (2008). Effect of Copper Sulfate on Performance of a Serum-Free CHO Cell Culture Process and the Level of Free Thiol in the Recombinant Antibody Expressed. *Biotechnology Progress*, 21(2), 550–553. <https://doi.org/10.1021/bp0497029>
- Chaikuad, A., Koch, P., Laufer, S. A., & Knapp, S. (2018). The Cysteinome of Protein Kinases as a

Target in Drug Development. *Angewandte Chemie International Edition*, 57(16), 4372–4385. <https://doi.org/10.1002/anie.201707875>

Chalker, J. M., Bernardes, G. J. L., Lin, Y. A., & Davis, B. G. (2009). Chemical Modification of Proteins at Cysteine: Opportunities in Chemistry and Biology. *Chemistry – An Asian Journal*, 4(5), 630–640. <https://doi.org/10.1002/asia.200800427>

Chang, J.-Y., & Li. (2002). Pathway of Oxidative Folding of α -Lactalbumin: A Model for Illustrating the Diversity of Disulfide Folding Pathways. *Biochemistry*, 41(26), 8405–8413. <https://doi.org/10.1021/bi020169k>

Chang, J.-Y., & Li, L. (2001). The Structure of Denatured α -Lactalbumin Elucidated by the Technique of Disulfide Scrambling. *Journal of Biological Chemistry*, 276(13), 9705–9712. <https://doi.org/10.1074/jbc.M010700200>

Chaudhuri, A., & Chattopadhyay, A. (2014). Lipid binding specificity of bovine α -lactalbumin: A multidimensional approach. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1838(8), 2078–2086. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.04.027>

Chawla, S. P., Chander, R., & Sharma, A. (2009). Antioxidant properties of Maillard reaction products obtained by gamma-irradiation of whey proteins. *Food Chemistry*, 116(1), 122–128. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.01.097>

Chen, W. L., Hwang, M. T., Liao, C. Y., Ho, J. C., Hong, K. C., & Mao, S. J. T. (2005). β -Lactoglobulin is a Thermal Marker in Processed Milk as Studied by Electrophoresis and Circular Dichroic Spectra. *Journal of Dairy Science*, 88(5), 1618–1630. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)72833-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72833-2)

Cheng, H., Fang, Z., Wusigale, Bakry, A. M., Chen, Y., & Liang, L. (2018). Complexation of trans- and cis-resveratrol with bovine serum albumin, β -lactoglobulin or α -lactalbumin. *Food Hydrocolloids*, 81, 242–252. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.02.037>

Cheng, L., & Jiang, L. (1992). Circular dichroism and stereochemistry of the phycobilins and their derivatives. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 15(4), 343–353. [https://doi.org/10.1016/1011-1344\(92\)85140-P](https://doi.org/10.1016/1011-1344(92)85140-P)

Chevalier, F., Chobert, J. M., Popineau, Y., Nicolas, M. G., & Haertlé, T. (2001). Improvement of functional properties of β -lactoglobulin glycosylated through the Maillard reaction is related to the nature of the sugar. *International Dairy Journal*, 11(3), 145–152. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00040-1](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00040-1)

Cho, Y., Gu, W., Wakins, S., Lee, S.-P., Kim, T.-R., Brady, J. W., & Batt, C. A. (1994). Thermostable variants of bovine β -lactoglobulin. *Protein Engineering, Design and Selection*, 7(2), 263–283. <https://doi.org/10.1093/protein/7.2.263>

Chobert, J.-M., Gaudin, J.-C., Dalgalarondo, M., & Haertlé, T. (2006). Impact of Maillard type glycation on properties of beta-lactoglobulin. *Biotechnology Advances*, 24(6), 629–632. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.07.004>

Choi, S. M., Chaudhry, P., Zo, S. M., & Han, S. S. (2018). Advances in Protein-Based Materials: From Origin to Novel Biomaterials. In H. J. Chun, C. H. Park, I. K. Kwon, & G. Khang (Eds.), *Cutting-Edge Enabling Technologies for Regenerative Medicine* (1st ed., Vol. 1078, pp. 161–

210). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-0950-2_10

- Chomet, M., van Dongen, G. A. M. S., & Vugts, D. J. (2021). State of the Art in Radiolabeling of Antibodies with Common and Uncommon Radiometals for Preclinical and Clinical Immuno-PET. *Bioconjugate Chemistry*, 32(7), 1315–1330. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.1c00136>
- Chruszcz, M., Mikolajczak, K., Mank, N., Majorek, K. A., Porebski, P. J., & Minor, W. (2013). Serum albumins—Unusual allergens. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1830(12), 5375–5381. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.06.016>
- Chrysina, E. D., Brew, K., & Acharya, K. R. (2000). Crystal structures of Apo- and holo-bovine α -lactalbumin at 2.2-Å resolution reveal an effect of calcium on inter-lobe interactions. *Journal of Biological Chemistry*, 275(47), 37021–37029. <https://doi.org/10.1074/jbc.M004752200>
- Cirkovic Velickovic, T. D., & Stanic-Vucinic, D. J. (2018). The Role of Dietary Phenolic Compounds in Protein Digestion and Processing Technologies to Improve Their Antinutritive Properties. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17(1), 82–103. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12320>
- Cole, W. J., Chapman, D. J., & Siegelman, H. W. (1967). Structure of Phycocyanobilin. *Journal of the American Chemical Society*, 89(14), 3643–3645. <https://doi.org/10.1021/ja00990a055>
- Collini, M., D’Alfonso, L., & Baldini, G. (2000). New insight on β -lactoglobulin binding sites by 1-anilinonaphthalene-8-sulfonate fluorescence decay. *Protein Science*, 9(10), 1968–1974. <https://doi.org/10.1110/ps.9.10.1968>
- Condezo-Hoyos, L., Abderrahim, F., Conde, M. V., Susín, C., Díaz-Gil, J. J., González, M. C., & Arribas, S. M. (2009). Antioxidant activity of liver growth factor, a bilirubin covalently bound to albumin. *Free Radical Biology and Medicine*, 46(5), 656–662. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.12.002>
- Cong, Y. J., & Li, L. F. (2012). Identification of the critical amino acid residues of immunoglobulin E and immunoglobulin G epitopes in β -lactoglobulin by alanine scanning analysis. *Journal of Dairy Science*, 95(11), 6307–6312. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5543>
- Considine, T., Patel, H. A., Singh, H., & Creamer, L. K. (2005). Influence of Binding of Sodium Dodecyl Sulfate, All-trans-retinol, Palmitate, and 8-Anilino-1-naphthalenesulfonate on the Heat-Induced Unfolding and Aggregation of β -Lactoglobulin B. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(8), 3197–3205. <https://doi.org/10.1021/jf0481756>
- Considine, T., Patel, H. A., Singh, H., & Creamer, L. K. (2007). Influence of binding conjugated linoleic acid and myristic acid on the heat- and high-pressure-induced unfolding and aggregation of β -lactoglobulin B. *Food Chemistry*, 102(4), 1270–1280. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.07.022>
- Coons, A. H., Snyder, J. C., Cheever, F. S., & Murray, E. S. (1950). Localization of Antigen in Tissue Cells: IV. Antigens of Rickettsiae and Mumps Virus. *Journal of Experimental Medicine*, 91(1), 31–38. <https://doi.org/10.1084/jem.91.1.31>
- Costa, J. A. V., Freitas, B. C. B., Rosa, G. M., Moraes, L., Morais, M. G., & Mitchell, B. G. (2019). Operational and economic aspects of Spirulina-based biorefinery. *Bioresource Technology*,

- Costa, J., Villa, C., Verhoeckx, K., Cirkovic-Velickovic, T., Schrama, D., Roncada, P., Rodrigues, P. M., Piras, C., Martín-Pedraza, L., Monaci, L., Molina, E., Mazzucchelli, G., Mafra, I., Lupi, R., Lozano-Ojalvo, D., Larré, C., Klueber, J., Gelencser, E., Bueno-Díaz, C., ... Holzhauser, T. (2022). Are Physicochemical Properties Shaping the Allergenic Potency of Animal Allergens? *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 62(1), 1–36. <https://doi.org/10.1007/s12016-020-08826-1>
- Creamer, L. K. (1995). Effect of Sodium Dodecyl Sulfate and Palmitic Acid on the Equilibrium Unfolding of Bovine β -Lactoglobulin. *Biochemistry*, 34(21), 7170–7176. <https://doi.org/10.1021/bi00021a031>
- Creamer, L. K., Bienvenue, A., Nilsson, H., Paulsson, M., van Wanroij, M., Lowe, E. K., Anema, S. G., Boland, M. J., & Jiménez-Flores, R. (2004a). Heat-Induced Redistribution of Disulfide Bonds in Milk Proteins. 1. Bovine β -Lactoglobulin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(25), 7660–7668. <https://doi.org/10.1021/jf049388y>
- Creamer, L. K., Nilsson, H. C., Paulsson, M. A., Coker, C. J., Hill, J. P., & Jiménez-Flores, R. (2004b). Effect of Genetic Variation on the Tryptic Hydrolysis of Bovine β -Lactoglobulin A, B, and C. *Journal of Dairy Science*, 87(12), 4023–4032. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73543-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73543-2)
- Croguennec, T., Bouhallab, S., Mollé, D., O’Kennedy, B. T., & Mehra, R. (2003). Stable monomeric intermediate with exposed Cys-119 is formed during heat denaturation of β -lactoglobulin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 301(2), 465–471. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(02\)02997-2](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(02)02997-2)
- Croguennec, T., O’Kennedy, B. T., & Mehra, R. (2004). Heat-induced denaturation/aggregation of β -lactoglobulin A and B: kinetics of the first intermediates formed. *International Dairy Journal*, 14(5), 399–409. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2003.09.005>
- Cross, K. J., Huq, N. L., Palamara, J. E., Perich, J. W., & Reynolds, E. C. (2005). Physicochemical Characterization of Casein Phosphopeptide-Amorphous Calcium Phosphate Nanocomplexes. *Journal of Biological Chemistry*, 280(15), 15362–15369. <https://doi.org/10.1074/jbc.M413504200>
- Dagnino-Leone, J., Figueroa, C. P., Castañeda, M. L., Youlton, A. D., Vallejos-Almirall, A., Agurto-Muñoz, A., Pavón Pérez, J., & Agurto-Muñoz, C. (2022). Phycobiliproteins: Structural aspects, functional characteristics, and biotechnological perspectives. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 20, 1506–1527. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2022.02.016>
- Danesi, E. D. ., de O. Rangel-Yagui, C., de Carvalho, J. C. M., & Sato, S. (2002). An investigation of effect of replacing nitrate by urea in the growth and production of chlorophyll by *Spirulina platensis*. *Biomass and Bioenergy*, 23(4), 261–269. [https://doi.org/10.1016/S0961-9534\(02\)00054-5](https://doi.org/10.1016/S0961-9534(02)00054-5)
- Dash, K. K., Fayaz, U., Dar, A. H., Shams, R., Manzoor, S., Sundarsingh, A., Deka, P., & Khan, S. A. (2022). A comprehensive review on heat treatments and related impact on the quality and microbial safety of milk and milk-based products. *Food Chemistry Advances*, 1, 100041. <https://doi.org/10.1016/j.focha.2022.100041>

- Dave, A. C., Loveday, S. M., Anema, S. G., Jameson, G. B., & Singh, H. (2014). Glycation as a Tool To Probe the Mechanism of β -Lactoglobulin Nanofibril Self-Assembly. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(14), 3269–3278. <https://doi.org/10.1021/jf405441g>
- de Oliveira, F. C., Coimbra, J. S. dos R., de Oliveira, E. B., Zuñiga, A. D. G., & Rojas, E. E. G. (2016). Food Protein-Polysaccharide Conjugates Obtained via the Maillard Reaction: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(7), 1108–1125. <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.755669>
- de Vos, P., Faas, M. M., Spasojevic, M., & Sikkema, J. (2010). Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *International Dairy Journal*, 20(4), 292–302. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2009.11.008>
- Delves, P. J., Martin, S. J., Burton, D. R., & Roitt, I. M. (2017). *Roitt's Essential Immunology* (13th Ed). Wiley-Blackwell.
- Di Pierro, P., Mariniello, L., Sorrentino, A., Villalonga, R., Chico, B., & Porta, R. (2010). Putrescine–polysaccharide conjugates as transglutaminase substrates and their possible use in producing crosslinked films. *Amino Acids*, 38(2), 669–675. <https://doi.org/10.1007/s00726-009-0427-4>
- Dillon, T. M., Ricci, M. S., Vezina, C., Flynn, G. C., Liu, Y. D., Rehder, D. S., Plant, M., Henkle, B., Li, Y., Deechongkit, S., Varnum, B., Wypych, J., Balland, A., & Bondarenko, P. V. (2008). Structural and Functional Characterization of Disulfide Isoforms of the Human IgG2 Subclass. *Journal of Biological Chemistry*, 283(23), 16206–16215. <https://doi.org/10.1074/jbc.M709988200>
- Dockal, M., Carter, D. C., & Rüker, F. (2000). Conformational transitions of the three recombinant domains of human serum albumin depending on pH. *Journal of Biological Chemistry*, 275(5), 3042–3050. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.5.3042>
- Dolgikh, D. A., Gilmanshin, R. I., Brazhnikov, E. V., Bychkova, V. E., Semisotnov, G. V., Venyaminov, S. Y., & Ptitsyn, O. B. (1981). α -lactalbumin: compact state with fluctuating tertiary structure? *FEBS Letters*, 136(2), 311–315. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(81\)80642-4](https://doi.org/10.1016/0014-5793(81)80642-4)
- Dufour, E., Bertrand-Harb, C., & Haertlé, T. (1993). Reversible effects of Medium Dielectric Constant on Structural Transformation of β -lactoglobulin and Its Retinol Binding. *Biopolymers*, 33(4), 589–598. <https://doi.org/10.1002/bip.360330408>
- Edwards, P. J. B., & Jameson, G. B. (2014). Structure and Stability of Whey Proteins. In H. Singh & A. Thompson (Eds.), *Milk Proteins: From Expression to Food* (Second Edi, pp. 201–242). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405171-3.00007-6>
- Eigel, W. N., Butler, J. E., Ernstrom, C. A., Farrell, H. M., Harwalkar, V. R., Jenness, R., & Whitney, R. M. (1984). Nomenclature of Proteins of Cow's Milk: Fifth Revision. *Journal of Dairy Science*, 67(8), 1599–1631. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(84\)81485-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(84)81485-X)
- Eliasson, M., Andersson, R., Nygren, P.-Å., & Uhlén, M. (1991). Structural and functional analysis of the human IgG-Fab receptor activity of streptococcal protein G. *Molecular Immunology*, 28(10), 1055–1061. [https://doi.org/10.1016/0161-5890\(91\)90020-K](https://doi.org/10.1016/0161-5890(91)90020-K)

- Ellman, G. L. (1959). Tissue Sulfhydryl Groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 82(1), 70–77. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(59\)90090-6](https://doi.org/10.1016/0003-9861(59)90090-6)
- Elzoghby, A. O., Samy, W. M., & Elgindy, N. A. (2012). Albumin-based nanoparticles as potential controlled release drug delivery systems. *Journal of Controlled Release*, 157(2), 168–182. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.07.031>
- Eriksen, N. T. (2008). Production of phycocyanin—a pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 80(1), 1–14. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1542-y>
- Fan, Y., Liu, Y., Gao, L., Zhang, Y., & Yi, J. (2018a). Improved chemical stability and cellular antioxidant activity of resveratrol in zein nanoparticle with bovine serum albumin-caffeic acid conjugate. *Food Chemistry*, 261, 283–291. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.04.055>
- Fan, Y., Yi, J., Zhang, Y., & Yokoyama, W. (2018b). Fabrication of curcumin-loaded bovine serum albumin (BSA)-dextran nanoparticles and the cellular antioxidant activity. *Food Chemistry*, 239, 1210–1218. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.075>
- Fan, Y., Zhang, Y., Yokoyama, W., & Yi, J. (2017). β -Lactoglobulin–chlorogenic acid conjugate-based nanoparticles for delivery of (–)-epigallocatechin-3-gallate. *RSC Advances*, 7(35), 21366–21374. <https://doi.org/10.1039/C6RA28462K>
- Fanciullino, R., Ciccolini, J., & Milano, G. (2013). Challenges, expectations and limits for nanoparticles-based therapeutics in cancer: A focus on nano-albumin-bound drugs. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 88(3), 504–513. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2013.06.010>
- Fang, R., Hao, R., Wu, X., Li, Q., Leng, X., & Jing, H. (2011). Bovine Serum Albumin Nanoparticle Promotes the Stability of Quercetin in Simulated Intestinal Fluid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(11), 6292–6298. <https://doi.org/10.1021/jf200718j>
- Farrell, H. M., Jimenez-Flores, R., Bleck, G. T., Brown, E. M., Butler, J. E., Creamer, L. K., Hicks, C. L., Hollar, C. M., Ng-Kwai-Hang, K. F., & Swaisgood, H. E. (2004). Nomenclature of the Proteins of Cows' Milk—Sixth Revision. *Journal of Dairy Science*, 87(6), 1641–1674. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73319-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73319-6)
- Farrokh-Siar, L., Rezai, K. A., Semnani, R. T., Patel, S. C., Ernest, J. T., Peterson, E. J., Koretzky, G. A., & van Seventer, G. A. (1999). Human Fetal Retinal Pigment Epithelial Cells Induce Apoptosis in the T-cell Line Jurkat. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 40(7), 1503–1511. <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1076/ceyr.18.6.430.5269>
- Feng, J., Cai, H., Wang, H., Li, C., & Liu, S. (2018). Improved oxidative stability of fish oil emulsion by grafted ovalbumin-catechin conjugates. *Food Chemistry*, 241, 60–69. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.08.055>
- Feng, Y., Zhu, Z., Chen, W., Prabakaran, P., Lin, K., & Dimitrov, D. (2014). Conjugates of Small Molecule Drugs with Antibodies and Other Proteins. *Biomedicines*, 2(1), 1–13. <https://doi.org/10.3390/biomedicines2010001>
- Fessas, D., Iametti, S., Schiraldi, A., & Bonomi, F. (2001). Thermal unfolding of monomeric and dimeric β -lactoglobulins. *European Journal of Biochemistry*, 268(20), 5439–5448.

<https://doi.org/10.1046/j.0014-2956.2001.02484.x>

- Fischer, N. H., Oliveira, M. T., & Diness, F. (2023). Chemical modification of proteins – challenges and trends at the start of the 2020s. *Biomaterials Science*, 11(3), 719–748. <https://doi.org/10.1039/D2BM01237E>
- Flower, D. R., North, A. C. T., & Sansom, C. E. (2000). The lipocalin protein family: Structural and sequence overview. *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1482(1–2), 9–24. [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(00\)00148-5](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(00)00148-5)
- Fogolari, F., Ragona, L., Zetta, L., Romagnoli, S., De Kruif, K. ., & Molinari, H. (1998). Monomeric bovine β -lactoglobulin adopts a β -barrel fold at pH 2. *FEBS Letters*, 436(2), 149–154. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(98\)00936-3](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)00936-3)
- Frapin, D., Dufour, E., & Haertle, T. (1993). Probing the Fatty Acid Binding Site of β -lactoglobulins. *Journal of Protein Chemistry*, 12(4), 443–449. <https://doi.org/10.1007/BF01025044>
- Fratelli, C., Nunes, M. C., De Rosso, V. V., Raymundo, A., & Braga, A. R. C. (2023). Spirulina and its residual biomass as alternative sustainable ingredients: impact on the rheological and nutritional features of wheat bread manufacture. *Frontiers in Food Science and Technology*, 3(October), 1–13. <https://doi.org/10.3389/frfst.2023.1258219>
- Fu, E., Friedman, L., & Siegelman, H. W. (1979). Mass-Spectral Identification and Purification of Phycoerythrobilin and Phycocyanobilin. *Biochemical Journal*, 179(1), 1–6. <https://doi.org/10.1042/bj1790001>
- Fu, T.-J., Abbott, U. R., & Hatzos, C. (2002). Digestibility of Food Allergens and Nonallergenic Proteins in Simulated Gastric Fluid and Simulated Intestinal Fluid-A Comparative Study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(24), 7154–7160. <https://doi.org/10.1021/jf020599h>
- Fuentes-Lemus, E., Dorta, E., Escobar, E., Aspée, A., Pino, E., Abasq, M. L., Speisky, H., Silva, E., Lissi, E., Davies, M. J., & López-Alarcón, C. (2016). Oxidation of free, peptide and protein tryptophan residues mediated by AAPH-derived free radicals: role of alkoxyl and peroxy radicals. *RSC Advances*, 6(63), 57948–57955. <https://doi.org/10.1039/C6RA12859A>
- Gajendiran, M., Rhee, J.-S., & Kim, K. (2018). Recent Developments in Thiolated Polymeric Hydrogels for Tissue Engineering Applications. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 24(1), 66–74. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2016.0442>
- Gamov, G. A., Meshkov, A. N., Zavalishin, M. N., Petrova, M. V., Khokhlova, A. Y., Gashnikova, A. V., & Sharnin, V. A. (2020). Binding of pyridoxal, pyridoxal 5'-phosphate and derived hydrazones to bovine serum albumin in aqueous solution. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 233, 118165. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2020.118165>
- Gan, C.-Y., Cheng, L.-H., Phuah, E.-T., Chin, P.-N., AlKarkhi, A. F. M., & Easa, A. M. (2009). Combined cross-linking treatments of bovine serum albumin gel beadlets for controlled-delivery of caffeine. *Food Hydrocolloids*, 23(5), 1398–1405. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.09.009>

- Garcia-Pliego, E., Franco-Colin, M., Rojas-Franco, P., Blas-Valdivia, V., Serrano-Contreras, J. I., Pentón-Rol, G., & Cano-Europa, E. (2021). Phycocyanobilin is the molecule responsible for the nephroprotective action of phycocyanin in acute kidney injury caused by mercury. *Food & Function*, 12(7), 2985–2994. <https://doi.org/10.1039/D0FO03294H>
- García, A. B., Longo, E., & Bermejo, R. (2021). The application of a phycocyanin extract obtained from *Arthrospira platensis* as a blue natural colorant in beverages. *Journal of Applied Phycology*, 33(5), 3059–3070. <https://doi.org/10.1007/s10811-021-02522-z>
- Gindt, Y. M., Zhou, J., Bryant, D. A., & Sauer, K. (1992). Core mutations of *Synechococcus* sp. PCC 7002 phycobilisomes: A spectroscopic study. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 15(1–2), 75–89. [https://doi.org/10.1016/1011-1344\(92\)87007-V](https://doi.org/10.1016/1011-1344(92)87007-V)
- Glazer, A. N. (1977). Structure and molecular organization of the photosynthetic accessory pigments of cyanobacteria and red algae. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 18(2–3), 125–140. <https://doi.org/10.1007/BF00280278>
- Glazer, A. N., Fang, S., & Brown, D. M. (1973). Spectroscopic Properties of C-Phycocyanin and of Its α and β Subunits. *Journal of Biological Chemistry*, 248(16), 5679–5685. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)43559-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)43559-X)
- Gong, L., Zhao, H., Liu, Y., Wu, H., Liu, C., Chang, S., Chen, L., Jin, M., Wang, Q., Gao, Z., & Huang, W. (2023). Research advances in peptide–drug conjugates. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 13(9), 3659–3677. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2023.02.013>
- Gorobets, M. G., Wasserman, L. A., Bychkova, A. V., & Rosenfeld, M. A. (2019). Thermodynamic features of bovine and human serum albumins under ozone and hydrogen peroxide induced oxidation studied by differential scanning calorimetry. *Chemical Physics*, 523, 34–41. <https://doi.org/10.1016/j.chemphys.2019.03.018>
- Gosal, W. S., Clark, A. H., Pudney, P. D. A., & Ross-Murphy, S. B. (2002). Novel Amyloid Fibrillar Networks Derived from a Globular Protein: β -Lactoglobulin. *Langmuir*, 18(19), 7174–7181. <https://doi.org/10.1021/la025531a>
- Gottschalk, M., Nilsson, H., Roos, H., & Halle, B. (2003). Protein self-association in solution: The bovine β -lactoglobulin dimer and octamer. *Protein Science*, 12(11), 2404–2411. <https://doi.org/10.1110/ps.0305903>
- Guindani, C., Frey, M., Simon, J., Koynov, K., Schultze, J., Ferreira, S. R. S., Araújo, P. H. H., de Oliveira, D., Wurm, F. R., Mailänder, V., & Landfester, K. (2019). Covalently Binding of Bovine Serum Albumin to Unsaturated Poly(Globalide-Co- ϵ -Caprolactone) Nanoparticles by Thiol-Ene Reactions. *Macromolecular Bioscience*, 19(10), 1900145. <https://doi.org/10.1002/mabi.201900145>
- Gurd, F. R. N. (1967). [62] Carboxymethylation. In C. H. W. Hirs (Ed.), *Methods in Enzymology* (Vol. 11, pp. 532–541). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(67\)11064-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(67)11064-1)
- Gygi, S. P., Rist, B., Gerber, S. A., Turecek, F., Gelb, M. H., & Aebersold, R. (1999). Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nature Biotechnology*, 17(10), 994–999. <https://doi.org/10.1038/13690>
- Hamada, D., Kuroda, Y., Tanaka, T., & Goto, Y. (1995). High Helical Propensity of the Peptide

Fragments Derived from β -Lactoglobulin, a Predominantly β -sheet Protein. *Journal of Molecular Biology*, 254(4), 737–746. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1995.0651>

Hamada, D., Segawa, S., & Goto, Y. (1996). Non-native α -helical intermediate in the refolding of β -lactoglobulin, a predominantly β -sheet protein. *Nature Structural & Molecular Biology*, 3(10), 868–873. <https://doi.org/10.1038/nsb1096-868>

Hansen, R. E., & Winther, J. R. (2009). An introduction to methods for analyzing thiols and disulfides: Reactions, reagents, and practical considerations. *Analytical Biochemistry*, 394(2), 147–158. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2009.07.051>

Hardy, R. R., Hayakawa, K., Parks, D. R., Herzenberg, L. A., & Herzenberg, L. A. (1984). Murine B cell differentiation lineages. *Journal of Experimental Medicine*, 159(4), 1169–1188. <https://doi.org/10.1084/jem.159.4.1169>

Harms, M. J., Castañeda, C. A., Schlessman, J. L., Sue, G. R., Isom, D. G., Cannon, B. R., & García-Moreno E., B. (2009). The pKa Values of Acidic and Basic Residues Buried at the Same Internal Location in a Protein Are Governed by Different Factors. *Journal of Molecular Biology*, 389(1), 34–47. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.03.039>

Hatahet, F., & Ruddock, L. W. (2009). Protein Disulfide Isomerase: A Critical Evaluation of Its Function in Disulfide Bond Formation. *Antioxidants & Redox Signaling*, 11(11), 2807–2850. <https://doi.org/10.1089/ars.2009.2466>

Hattori, M., Nagasawa, K., Ohgata, K., Sone, N., Fukuda, A., Matsuda, H., & Takahashi, K. (2000). Reduced Immunogenicity of β -Lactoglobulin by Conjugation with Carboxymethyl Dextran. *Bioconjugate Chemistry*, 11(1), 84–93. <https://doi.org/10.1021/bc990096q>

Havea, P., Carr, A. J., & Creamer, L. K. (2004). The roles of disulphide and non-covalent bonding in the functional properties of heat-induced whey protein gels. *Journal of Dairy Research*, 71(3), 330–339. <https://doi.org/10.1017/S002202990400024X>

Havea, P., Singh, H., & Creamer, L. K. (2001). Characterization of heat-induced aggregates of β -lactoglobulin, α -lactalbumin and bovine serum albumin in a whey protein concentrate environment. *Journal of Dairy Research*, 68(3), 483–497. <https://doi.org/10.1017/S0022029901004964>

He, W., Xu, H., Lu, Y., Zhang, T., Li, S., Lin, X., Xu, B., & Wu, X. (2019). Function, digestibility and allergenicity assessment of ovalbumin–EGCG conjugates. *Journal of Functional Foods*, 61, 103490. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103490>

Hermanson, G. T. (2013). *Bioconjugate Techniques* (3rd edition). Academic Press.

Hernández-Ledesma, B., Recio, I., & Amigo, L. (2008). β -Lactoglobulin as source of bioactive peptides. *Amino Acids*, 35(2), 257–265. <https://doi.org/10.1007/s00726-007-0585-1>

Hill, J. P., Boland, M. J., Creamer, L. K., Anema, S. G., Otter, D. E., Paterson, G. R., Lowe, R., Motion, R. L., & Thresher, W. C. (1996). Effect of the Bovine β -Lactoglobulin Phenotype on the Properties of β -Lactoglobulin, Milk Composition, and Dairy Products. In N. Parris, A. Kato, L. K. Creamer, & J. Pearce (Eds.), *Macromolecular Interactions in Food Technology* (1st edition, pp. 281–294). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/bk-1996-0650.ch022>

- Hirata, T., Tanaka, M., Ooike, M., Tsunomura, T., & Sakaguchi, M. (2000). Antioxidant activities of phycocyanobilin prepared from *Spirulina platensis*. *Journal of Applied Phycology*, 12(3–5), 435–439. <https://doi.org/doi.org/10.1023/A:1008175217194>
- Hnasko, R. (2015). Bioconjugation of Antibodies to Horseradish Peroxidase (HRP). In R. Hnasko (Ed.), *ELISA: Methods and Protocols* (Vol. 1318, pp. 43–50). Springer New York. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2742-5>
- Hnatowich, D. J. (1990). Recent Developments in the Radiolabeling of Antibodies with Iodine, Indium, and Technetium. *Seminars in Nuclear Medicine*, 20(1), 80–91. [https://doi.org/10.1016/S0001-2998\(05\)80178-3](https://doi.org/10.1016/S0001-2998(05)80178-3)
- Hoffmann, C., Leroy-Dudal, J., Patel, S., Gallet, O., & Pauthe, E. (2008). Fluorescein isothiocyanate-labeled human plasma fibronectin in extracellular matrix remodeling. *Analytical Biochemistry*, 372(1), 62–71. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2007.07.027>
- Hoffmann, M. A. M., & van Mil, P. J. J. M. (1997). Heat-Induced Aggregation of β -Lactoglobulin: Role of the Free Thiol Group and Disulfide Bonds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(8), 2942–2948. <https://doi.org/10.1021/jf960789q>
- Hunter, M. J., & Ludwig, M. L. (1962). The Reaction of Imidoesters with Proteins and Related Small Molecules. *Journal of the American Chemical Society*, 84(18), 3491–3504. <https://doi.org/10.1021/ja00877a016>
- Ishikawa-Ankerhold, H. C., Ankerhold, R., & Drummen, G. P. C. (2012). Advanced Fluorescence Microscopy Techniques—FRAP, FLIP, FLAP, FRET and FLIM. *Molecules*, 17(4), 4047–4132. <https://doi.org/10.3390/molecules17044047>
- Jackson, J. G., Janszen, D. B., Lonnerdal, B., Lien, E. L., Pramuk, K. P., & Kuhlman, C. F. (2004). A multinational study of α -lactalbumin concentrations in human milk. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 15(9), 517–521. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2003.10.009>
- Jansen, T., Hortmann, M., Oelze, M., Opitz, B., Steven, S., Schell, R., Knorr, M., Karbach, S., Schuhmacher, S., Wenzel, P., Münzel, T., & Daiber, A. (2010). Conversion of biliverdin to bilirubin by biliverdin reductase contributes to endothelial cell protection by heme oxygenase-1—evidence for direct and indirect antioxidant actions of bilirubin. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 49(2), 186–195. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2010.04.011>
- Järvinen, K.-M., Chatchatee, P., Bardina, L., Beyer, K., & Sampson, H. A. (2001). IgE and IgG Binding Epitopes on α -Lactalbumin and β -Lactoglobulin in Cow's Milk Allergy. *International Archives of Allergy and Immunology*, 126(2), 111–118. <https://doi.org/10.1159/000049501>
- Jensen, R. G. (1995). E - Fat-Soluble Vitamins in Bovine Milk. In R. G. Jensen (Ed.), *Handbook of Milk Composition* (1st edition, pp. 718–725). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-012384430-9/50032-9>
- Jespersen, L., Strømdahl, L. D., Olsen, K., & Skibsted, L. H. (2005). Heat and light stability of three natural blue colorants for use in confectionery and beverages. *European Food Research and Technology*, 220(3–4), 261–266. <https://doi.org/10.1007/s00217-004-1062-7>
- Jiang, H. R., & Liu, N. (2010). Self-assembled β -lactoglobulin–conjugated linoleic acid complex for colon cancer-targeted substance. *Journal of Dairy Science*, 93(9), 3931–3939.

<https://doi.org/10.3168/jds.2010-3071>

- Jiang, H., Zhang, X., Chen, X., Aramsangtienchai, P., Tong, Z., & Lin, H. (2018). Protein Lipidation: Occurrence, Mechanisms, Biological Functions, and Enabling Technologies. *Chemical Reviews*, 118(3), 919–988. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00750>
- Jiang, L., Wang, Y., Yin, Q., Liu, G., Liu, H., Huang, Y., & Li, B. (2017). Phycocyanin: A Potential Drug for Cancer Treatment. *Journal of Cancer*, 8(17), 3416–3429. <https://doi.org/10.7150/jca.21058>
- Jiang, Z., & Brodtkorb, A. (2012). Structure and antioxidant activity of Maillard reaction products from α -lactalbumin and β -lactoglobulin with ribose in an aqueous model system. *Food Chemistry*, 133(3), 960–968. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.016>
- Johnson, I. D., & Spence, M. T. Z. (Eds.). (2010). *Molecular Probes Handbook: A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies* (11th ed). Life Technologies Corporation.
- Jue, R., Lambert, J. M., Pierce, L. R., & Traut, R. R. (1978). Addition of Sulfhydryl Groups to Escherichia coli Ribosomes by Protein Modification with 2-iminothiolane (Methyl 4-Mercaptobutyrimidate). *Biochemistry*, 17(25), 5399–5406. <https://doi.org/10.1021/bi00618a013>
- Jus, S., Kokol, V., & Guebitz, G. M. (2008). Tyrosinase-catalysed coupling of functional molecules onto protein fibres. *Enzyme and Microbial Technology*, 42(7), 535–542. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2008.02.012>
- Kaboord, B., & Perr, M. (2008). Isolation of Proteins and Protein Complexes by Immunoprecipitation. In A. Posch (Ed.), *2D PAGE: Sample Preparation and Fractionation. Methods in Molecular Biology* (Vol. 424, pp. 349–364). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-064-9_27
- Kalia, J., & Raines, R. T. (2010). Advances in Bioconjugation. *Current Organic Chemistry*, 14(2), 138–147. <https://doi.org/10.2174/138527210790069839>
- Karbasi, M., Sánchez-Ferrer, A., Adamcik, J., Askari, G., Madadlou, A., & Mezzenga, R. (2021). Covalent β -lactoglobulin-maltodextrin amyloid fibril conjugate prepared by the Maillard reaction. *Food Chemistry*, 342, 128388. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128388>
- Kataoka, M., Kuwajima, K., Tokunaga, F., & Goto, Y. (1997). Structural characterization of the molten globule of α -lactalbumin by solution X-ray scattering. *Protein Science*, 6(2), 422–430. <https://doi.org/10.1002/pro.5560060219>
- Kawakishi, S., & Kaneko, T. (1987). Interaction of Proteins with Allyl Isothiocyanate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 35(1), 85–88. <https://doi.org/10.1021/jf00073a020>
- Kazan, A., Yesil-Celiktas, O., & Zhang, Y. S. (2019). Fabrication of Thymoquinone-Loaded Albumin Nanoparticles by Microfluidic Particle Synthesis and Their Effect on Planarian Regeneration. *Macromolecular Bioscience*, 19(11), 1900182. <https://doi.org/10.1002/mabi.201900182>
- Keenan, T. W., & Patton, S. (1995). The Structure of Milk: Implications for Sampling and Storage: A. The Milk Lipid Globule Membrane. In R. G. Jensen (Ed.), *Handbook of Milk Composition*

- (1st ed, pp. 5–50). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-012384430-9/50004-4>
- Kella, N. K. D., & Kinsella, J. E. (1988). Enhanced thermodynamic stability of β -lactoglobulin at low pH. *Biochemical Journal*, 255(1), 113–118. <https://doi.org/10.1042/bj2550113>
- Kelly, D. F., Moxon, E. R., & Pollard, A. J. (2004). Haemophilus influenzae type b conjugate vaccines. *Immunology*, 113(2), 163–174. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2004.01971.x>
- Kenny, J. W., Lambert, J. M., & Traut, R. R. (1979). [43] Cross-linking of Ribosomes Using 2-Iminoethanol (Methyl 4-Mercaptobutyrimidate) and Identification of Cross-Linked Proteins by Diagonal Polyacrylamide/Sodium Dodecyl Sulfate Gel Electrophoresis. In K. Moldave & L. Grossman (Eds.), *Methods in Enzymology* (1st Edition, Vol. 59, Issue 1973, pp. 534–550). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(79\)59112-5](https://doi.org/10.1016/0076-6879(79)59112-5)
- Keppler, J. K., Koudelka, T., Palani, K., Stuhldreier, M. C., Temps, F., Tholey, A., & Schwarz, K. (2014a). Characterization of the covalent binding of allyl isothiocyanate to β -lactoglobulin by fluorescence quenching, equilibrium measurement, and mass spectrometry. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 32(7), 1103–1117. <https://doi.org/10.1080/07391102.2013.809605>
- Keppler, J. K., Martin, D., Garamus, V. M., Berton-Carabin, C., Nipoti, E., Coenye, T., & Schwarz, K. (2017). Functionality of whey proteins covalently modified by allyl isothiocyanate. Part 1 physicochemical and antibacterial properties of native and modified whey proteins at pH 2 to 7. *Food Hydrocolloids*, 65, 130–143. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.11.016>
- Keppler, J. K., & Schwarz, K. (2017). Increasing the emulsifying capacity of whey proteins at acidic pH values through covalent modification with allyl isothiocyanate. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 522, 514–524. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2017.03.033>
- Keppler, J. K., Schwarz, K., & van der Goot, A. J. (2020). Covalent modification of food proteins by plant-based ingredients (polyphenols and organosulphur compounds): A commonplace reaction with novel utilization potential. *Trends in Food Science & Technology*, 101, 38–49. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.04.023>
- Keppler, J. K., Stuhldreier, M. C., Temps, F., & Schwarz, K. (2014b). Influence of mathematical models and correction factors on binding results of polyphenols and retinol with β -lactoglobulin measured with fluorescence quenching. *Food Biophysics*, 9(2), 158–168. <https://doi.org/10.1007/s11483-013-9328-x>
- Kievit, F. M., Veisheh, O., Bhattarai, N., Fang, C., Gunn, J. W., Lee, D., Ellenbogen, R. G., Olson, J. M., & Zhang, M. (2009). PEI-PEG-Chitosan-Copolymer-Coated Iron Oxide Nanoparticles for Safe Gene Delivery: Synthesis, Complexation, and Transfection. *Advanced Functional Materials*, 19(14), 2244–2251. <https://doi.org/10.1002/adfm.200801844>
- Kitabatake, N., & Kinebawa, Y.-I. (1998). Digestibility of Bovine Milk Whey Protein and β -Lactoglobulin in Vitro and in Vivo. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(12), 4917–4923. <https://doi.org/10.1021/jf9710903>
- Kjærsgaard, N. L., Nielsen, T. B., & Gothelf, K. V. (2022). Chemical Conjugation to Less Targeted Proteinogenic Amino Acids. *ChemBioChem*, 23(19), e202200245. <https://doi.org/10.1002/cbic.202200245>

- Kleber, N., Krause, I., Illgner, S., & Hinrichs, J. (2004). The antigenic response of β -lactoglobulin is modulated by thermally induced aggregation. *European Food Research and Technology*, 219(2), 105–110. <https://doi.org/10.1007/s00217-004-0924-3>
- Koivunen, M. E., & Krogsrud, R. L. (2006). Principles of Immunochemical Techniques Used in Clinical Laboratories. *Laboratory Medicine*, 37(8), 490–497. <https://doi.org/10.1309/MV9RM1FDLWAUWQ3F>
- Koniev, O., & Wagner, A. (2015). Developments and recent advancements in the field of endogenous amino acid selective bond forming reactions for bioconjugation. *Chemical Society Reviews*, 44(15), 5495–5551. <https://doi.org/10.1039/c5cs00048c>
- Kono, Y., Sugaya, T., Yasudome, H., Ogiso, H., & Ogawara, K. (2024). Preparation of stable and monodisperse paclitaxel-loaded bovine serum albumin nanoparticles via intermolecular disulfide crosslinking. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 38, 101713. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2024.101713>
- Kontopidis, G., Holt, C., & Sawyer, L. (2004). Invited Review: β -Lactoglobulin: Binding Properties, Structure, and Function. *Journal of Dairy Science*, 87(4), 785–796. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73222-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73222-1)
- Kragh-Hansen, U., & Vorum, H. (1993). Quantitative Analyses of the Interaction between Calcium Ions and Human Serum Albumin. *Clinical Chemistry*, 39(2), 202–208. <https://doi.org/10.1093/clinchem/39.2.202>
- Kroll, J., Rawel, H. M., & Seidelmann, N. (2000). Physicochemical Properties and Susceptibility to Proteolytic Digestion of Myoglobin–Phenol Derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(5), 1580–1587. <https://doi.org/10.1021/jf991172m>
- Kronick, M. N. (1986). The use of phycobiliproteins as fluorescent labels in immunoassay. *Journal of Immunological Methods*, 92(1), 1–13. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(86\)90496-5](https://doi.org/10.1016/0022-1759(86)90496-5)
- Kronick, M. N., & Grossman, P. D. (1983). Immunoassay Techniques with Fluorescent Phycobiliprotein Conjugates. *Clinical Chemistry*, 29(9), 1582–1586. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6883673>
- Kühn, C., von Oesen, T., Herz, C., Schreiner, M., Hanschen, F. S., Lamy, E., & Rohn, S. (2018). In Vitro Determination of Protein Conjugates in Human Cells by LC-ESI-MS/MS after Benzyl Isothiocyanate Exposure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(26), 6727–6733. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b01309>
- Kunikata, T., Itoh, S., Ozaki, T., Kondo, M., Isobe, K., & Onishi, S. (2000). Formation of propentdyopents and biliverdin, oxidized metabolites of bilirubin, in infants receiving oxygen therapy. *Pediatrics International*, 42(4), 331–336. <https://doi.org/10.1046/j.1442-200x.2000.01246.x>
- Kupka, M., & Scheer, H. (2008). Unfolding of C-phycocyanin followed by loss of non-covalent chromophore-protein interactions. 1. Equilibrium experiments. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1777(1), 94–103. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2007.10.009>
- Kuroda, Y., Hamada, D., Tanaka, T., & Goto, Y. (1996). High Helicity of Peptide Fragments Corresponding to β -strand Regions of β -lactoglobulin Observed by 2D-NMR Spectroscopy.

- Kuwajima, K. (1977). A Folding Model of α -Lactalbumin Deduced from the Three-state Denaturation Mechanism. *Journal of Molecular Biology*, 114(2), 241–258.
- Kuwata, K., Hoshino, M., Forge, V., Era, S., Batt, C. A., & Goto, Y. (1999). Solution structure and dynamics of bovine β -lactoglobulin A. *Protein Science*, 8(11), 2541–2545. <https://doi.org/10.1110/ps.8.11.2541>
- Labrijn, A. F., Buijsse, A. O., van den Bremer, E. T. J., Verwilligen, A. Y. W., Bleeker, W. K., Thorpe, S. J., Killestein, J., Polman, C. H., Aalberse, R. C., Schuurman, J., van de Winkel, J. G. J., & Parren, P. W. H. I. (2009). Therapeutic IgG4 antibodies engage in Fab-arm exchange with endogenous human IgG4 in vivo. *Nature Biotechnology*, 27(8), 767–771. <https://doi.org/10.1038/nbt.1553>
- Labrijn, A. F., Rispiens, T., Meesters, J., Rose, R. J., den Bleker, T. H., Loverix, S., van den Bremer, E. T. J., Neijssen, J., Vink, T., Lasters, I., Aalberse, R. C., Heck, A. J. R., van de Winkel, J. G. J., Schuurman, J., & Parren, P. W. H. I. (2011). Species-Specific Determinants in the IgG CH3 Domain Enable Fab-Arm Exchange by Affecting the Noncovalent CH3–CH3 Interaction Strength. *The Journal of Immunology*, 187(6), 3238–3246. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1003336>
- Lacy, E. R., Baker, M., & Brigham-Burke, M. (2008). Free sulfhydryl measurement as an indicator of antibody stability. *Analytical Biochemistry*, 382(1), 66–68. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2008.07.016>
- Lafarga, T., Fernández-Sevilla, J. M., González-López, C., & Acién-Fernández, F. G. (2020). Spirulina for the food and functional food industries. *Food Research International*, 137, 109356. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109356>
- Layman, D. K., Lönnerdal, B., & Fernstrom, J. D. (2018). Applications for α -lactalbumin in human nutrition. *Nutrition Reviews*, 76(6), 444–460. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuy004>
- Le Maux, S., Bouhallab, S., Giblin, L., Brodkorb, A., & Croguennec, T. (2014). Bovine β -lactoglobulin/fatty acid complexes: binding, structural, and biological properties. *Dairy Science and Technology*, 94(5), 409–426. <https://doi.org/10.1007/s13594-014-0160-y>
- Le Maux, S., Giblin, L., Croguennec, T., Bouhallab, S., & Brodkorb, A. (2012). β -Lactoglobulin as a Molecular Carrier of Linoleate: Characterization and Effects on Intestinal Epithelial Cells in Vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(37), 9476–9483. <https://doi.org/10.1021/jf3028396>
- Lee, S.-Y., Kim, D.-S., & Kyung, K. H. (2014). Factors Influencing the Stability of Garlic Thiosulfinates. *Food Science and Biotechnology*, 23(5), 1593–1600. <https://doi.org/10.1007/s10068-014-0216-z>
- Leung, P., Lee, H.-H., Kung, Y.-C., Tsai, M.-F., & Chou, T.-C. (2013). Therapeutic Effect of C-Phycocyanin Extracted from Blue Green Algae in a Rat Model of Acute Lung Injury Induced by Lipopolysaccharide. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2013/916590>
- Levine, H. (1993). Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease β -amyloid

peptides: Detection of amyloid aggregation in solution. *Protein Science*, 2(3), 404–410. <https://doi.org/10.1002/pro.5560020312>

- Li, D., Zhang, Q., Huang, L., Chen, Z., Zou, C., Ma, Y., Cao, M.-J., Liu, G.-M., Liu, Y., & Wang, Y. (2021). Fabricating hydrophilic particles with oleic acid and bovine serum albumin to improve the dispersibility and bioaccessibility of fucoxanthin in water. *Food Hydrocolloids*, 118, 106752. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106752>
- Li, H., Pan, Y., Yang, Z., Rao, J., & Chen, B. (2019). Improving Antioxidant Activity of β -Lactoglobulin by Nature-Inspired Conjugation with Gentisic Acid [Research-article]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(42), 11741–11751. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b05304>
- Li, J., & Wang, X. (2015). Binding of (–)-epigallocatechin-3-gallate with thermally-induced bovine serum albumin/ κ -carrageenan particles. *Food Chemistry*, 168, 566–571. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.07.097>
- Li, L., Murphy, J. T., & Lagarias, J. C. (1995). Continuous Fluorescence Assay of Phytochrome Assembly in Vitro. *Biochemistry*, 34(24), 7923–7930. <https://doi.org/10.1021/bi00024a017>
- Li, Y., Lee, R. J., Huang, X., Li, Y., Lv, B., Wang, T., Qi, Y., Hao, F., Lu, J., Meng, Q., Teng, L., Zhou, Y., Xie, J., & Teng, L. (2017). Single-step microfluidic synthesis of transferrin-conjugated lipid nanoparticles for siRNA delivery. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 13(2), 371–381. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2016.09.014>
- Liang, L., Leung Sok Line, V., Remondetto, G. E., & Subirade, M. (2010). In vitro release of α -tocopherol from emulsion-loaded β -lactoglobulin gels. *International Dairy Journal*, 20(3), 176–181. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2009.09.008>
- Liang, L., Tajmir-Riahi, H. A., & Subirade, M. (2008). Interaction of β -Lactoglobulin with Resveratrol and its Biological Implications. *Biomacromolecules*, 9(1), 50–56. <https://doi.org/10.1021/bm700728k>
- Liu, F., Ma, C., Gao, Y., & McClements, D. J. (2017). Food-Grade Covalent Complexes and Their Application as Nutraceutical Delivery Systems: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(1), 76–95. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12229>
- Liu, F., Wang, D., Ma, C., & Gao, Y. (2016b). Conjugation of polyphenols prevents lactoferrin from thermal aggregation at neutral pH. *Food Hydrocolloids*, 58, 49–59. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.02.011>
- Liu, F., Wang, D., Xu, H., Sun, C., & Gao, Y. (2016a). Physicochemical properties of β -carotene emulsions stabilized by chlorogenic acid-lactoferrin-glucose/polydextrose conjugates. *Food Chemistry*, 196, 338–346. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.09.047>
- Liu, H. C., Chen, W. L., & Mao, S. J. T. (2007a). Antioxidant Nature of Bovine Milk β -Lactoglobulin. *Journal of Dairy Science*, 90(2), 547–555. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(07\)71538-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(07)71538-2)
- Liu, H., Chumsae, C., Gaza-Bulseco, G., Hurkmans, K., & Radziejewski, C. H. (2010). Ranking the Susceptibility of Disulfide Bonds in Human IgG1 Antibodies by Reduction, Differential Alkylation, and LC–MS Analysis. *Analytical Chemistry*, 82(12), 5219–5226.

<https://doi.org/10.1021/ac100575n>

- Liu, H., Gaza-Bulsecos, G., Chumsae, C., & Newby-Kew, A. (2007b). Characterization of lower molecular weight artifact bands of recombinant monoclonal IgG1 antibodies on non-reducing SDS-PAGE. *Biotechnology Letters*, 29(11), 1611–1622. <https://doi.org/10.1007/s10529-007-9449-8>
- Liu, H., & May, K. (2012). Disulfide bond structures of IgG molecules. *MAbs*, 4(1), 17–23. <https://doi.org/10.4161/mabs.4.1.18347>
- Liu, Q., Li, W., & Qin, S. (2020). Therapeutic effect of phycocyanin on acute liver oxidative damage caused by X-ray. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 130, 110553. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110553>
- Loveday, S. M., Wang, X. L., Rao, M. A., Anema, S. G., Creamer, L. K., & Singh, H. (2010). Tuning the properties of β -lactoglobulin nanofibrils with pH, NaCl and CaCl₂. *International Dairy Journal*, 20(9), 571–579. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2010.02.014>
- Lowe, E. K., Anema, S. G., Bienvenue, A., Boland, M. J., Creamer, L. K., & Jiménez-Flores, R. (2004). Heat-Induced Redistribution of Disulfide Bonds in Milk Proteins. 2. Disulfide Bonding Patterns between Bovine β -Lactoglobulin and κ -Casein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(25), 7669–7680. <https://doi.org/10.1021/jf0491254>
- Lu, Y., Li, S., Xu, H., Zhang, T., Lin, X., & Wu, X. (2018). Effect of Covalent Interaction with Chlorogenic Acid on the Allergenic Capacity of Ovalbumin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(37), 9794–9800. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b03410>
- Luz Sanz, M., Corzo-Martínez, M., Rastall, R. A., Olano, A., & Moreno, F. J. (2007). Characterization and in Vitro Digestibility of Bovine β -Lactoglobulin Glycated with Galactooligosaccharides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(19), 7916–7925. <https://doi.org/10.1021/jf0711111>
- Ma, J., Hu, J., Sha, X., Meng, D., & Yang, R. (2024). Phycobiliproteins, the pigment-protein complex form of natural food colorants and bioactive ingredients. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 64(10), 2999–3017. <https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2128714>
- Madureira, A. R., Pereira, C. I., Gomes, A. M. P., Pintado, M. E., & Malcata, F. X. (2007). Bovine whey proteins – Overview on their main biological properties. *Food Research International*, 40(10), 1197–1211. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.07.005>
- Majorek, K. A., Porebski, P. J., Dayal, A., Zimmerman, M. D., Jablonska, K., Stewart, A. J., Chruszcz, M., & Minor, W. (2012). Structural and immunologic characterization of bovine, horse, and rabbit serum albumins. *Molecular Immunology*, 52(3–4), 174–182. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2012.05.011>
- Mandalari, G., Mackie, A. M., Rigby, N. M., Wickham, M. S. J., & Clare Mills, E. N. (2009). Physiological phosphatidylcholine protects bovine β -lactoglobulin from simulated gastrointestinal proteolysis. *Molecular Nutrition & Food Research*, 53(S1), 131–139. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200800321>
- Manderson, G. A., Hardman, M. J., & Creamer, L. K. (1999). Effect of Heat Treatment on Bovine β -Lactoglobulin A, B, and C Explored Using Thiol Availability and Fluorescence. *Journal of*

- Mao, S. Y. (2010). Biotinylation of Antibodies. In C. Oliver & M. C. Jamur (Eds.), *Immunocytochemical Methods and Protocols* (Third Edition, Vol. 588, Issue 4, pp. 49–52). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-324-0_7
- Mariniello, L., Porta, R., Sorrentino, A., Giosafatto, C. V. L., Rossi Marquez, G., Esposito, M., & Di Pierro, P. (2014). Transglutaminase-mediated macromolecular assembly: production of conjugates for food and pharmaceutical applications. *Amino Acids*, 46(3), 767–776. <https://doi.org/10.1007/s00726-013-1561-6>
- Marino, S. M., & Gladyshev, V. N. (2010). Cysteine Function Governs Its Conservation and Degeneration and Restricts Its Utilization on Protein Surfaces. *Journal of Molecular Biology*, 404(5), 902–916. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.09.027>
- McClements, D. J., Decker, E. A., Park, Y., & Weiss, J. (2009). Structural Design Principles for Delivery of Bioactive Components in Nutraceuticals and Functional Foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 49(6), 577–606. <https://doi.org/10.1080/10408390902841529>
- McKerchar, H. J., Clerens, S., Dobson, R. C. J., Dyer, J. M., Maes, E., & Gerrard, J. A. (2019). Protein-protein crosslinking in food: Proteomic characterisation methods, consequences and applications. *Trends in Food Science & Technology*, 86, 217–229. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.02.005>
- McKinnon, K. M. (2018). Flow Cytometry: An Overview. *Current Protocols in Immunology*, 120(1), 5.1.1-5.1.11. <https://doi.org/10.1002/cpim.40>
- McSwiney, M., Singh, H., Campanella, O., & Creamer, L. K. (1994). Thermal gelation and denaturation of bovine β -lactoglobulins A and B. *Journal of Dairy Research*, 61(2), 221–232. <https://doi.org/10.1017/S0022029900028235>
- Mehler, E. L., Fuxreiter, M., Simon, I., & Garcia-Moreno E, B. (2002). The role of hydrophobic microenvironments in modulating p K a shifts in proteins. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 48(2), 283–292. <https://doi.org/10.1002/prot.10153>
- Meynier, A., Rampon, V., Dalgalarrodo, M., & Genot, C. (2004). Hexanal and t-2-hexenal form covalent bonds with whey proteins and sodium caseinate in aqueous solution. *International Dairy Journal*, 14(8), 681–690. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.01.003>
- Middepogu, A., Murthy, S.D.S., & Prasanna, R.B. (2012). Structural organization and functions of phycobiliproteins in cyanobacteria. *International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences*, 2(2), 9-17.
- Mimuro, M., & Kikuchi, H. (2003). Antenna Systems and Energy Transfer in Cyanophyta and Rhodophyta. In B. R. Green & W. W. Parson (Eds.), *Light-Harvesting Antennas in Photosynthesis* (pp. 281–306). Springer. https://doi.org/10.1007/978-94-017-2087-8_9
- Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carrière, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Egger, L., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., Macierzanka, A., Mackie, A., ... Brodkorb, A. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus. *Food & Function*, 5(6), 1113–1124. <https://doi.org/10.1039/C3FO60702J>

- Minić, S., Gligorijević, N., Veličković, L., & Nikolić, M. (2024). Narrative Review of the Current and Future Perspectives of Phycobiliproteins' Applications in the Food Industry: From Natural Colors to Alternative Proteins. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(13), 7187. <https://doi.org/10.3390/ijms25137187>
- Minic, S. L., Milcic, M., Stanic-Vucinic, D., Radibratovic, M., Sotiroudīs, T. G., Nikolic, M. R., & Velickovic, T. Č. (2015). Phycocyanobilin, a bioactive tetrapyrrolic compound of blue-green alga *Spirulina*, binds with high affinity and competes with bilirubin for binding on human serum albumin. *RSC Advances*, 5(76), 61787–61798. <https://doi.org/10.1039/C5RA05534B>
- Minic, S. L., Stanic-Vucinic, D., Mihailovic, J., Krstic, M., Nikolic, M. R., & Cirkovic Velickovic, T. (2016). Digestion by pepsin releases biologically active chromopeptides from C-phycocyanin, a blue-colored biliprotein of microalga *Spirulina*. *Journal of Proteomics*, 147, 132–139. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.03.043>
- Minic, S., Stanic-Vucinic, D., Radomirovic, M., Radibratovic, M., Milcic, M., Nikolic, M., & Cirkovic Velickovic, T. (2018). Characterization and effects of binding of food-derived bioactive phycocyanobilin to bovine serum albumin. *Food Chemistry*, 239, 1090–1099. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.066>
- Moinpour, M., Barker, N. K., Guzman, L. E., Jewett, J. C., Langlais, P. R., & Schwartz, J. C. (2020). Discriminating changes in protein structure using tyrosine conjugation. *Protein Science*, 29(8), 1784–1793. <https://doi.org/10.1002/pro.3897>
- Monjezi, R., Tan, S. W., Tey, B. T., Sieo, C. C., & Tan, W. S. (2013). Detection of hepatitis B virus core antigen by phage display mediated TaqMan real-time immuno-PCR. *Journal of Virological Methods*, 187(1), 121–126. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2012.09.017>
- Moreno, F. J. (2007). Gastrointestinal digestion of food allergens: Effect on their allergenicity. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 61(1), 50–60. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2006.10.005>
- Morgan, F., Léonil, J., Mollé, D., & Bouhallab, S. (1999b). Modification of Bovine β -Lactoglobulin by Glycation in a Powdered State or in an Aqueous Solution: Effect on Association Behavior and Protein Conformation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(1), 83–91. <https://doi.org/10.1021/jf9804387>
- Morgan, F., Mollé, D., Henry, G., Vénien, A., Léonil, J., Peltre, G., Levieux, D., Maubois, J., & Bouhallab, S. (1999a). Glycation of bovine β -Lactoglobulin: effect on the protein structure. *International Journal of Food Science & Technology*, 34(5–6), 429–435. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.1999.00318.x>
- Moritz, B., & Stracke, J. O. (2017). Assessment of disulfide and hinge modifications in monoclonal antibodies. *Electrophoresis*, 38(6), 769–785. <https://doi.org/10.1002/elps.201600425>
- Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S., & Olson, A. J. (2009). AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of Computational Chemistry*, 30(16), 2785–2791. <https://doi.org/10.1002/jcc.21256>
- Moser, A. C., & Hage, D. S. (2010). Immunoaffinity Chromatography: An Introduction to Applications and Recent Developments. *Bioanalysis*, 2(4), 769–790. <https://doi.org/10.4155/bio.10.31>

- Mueller, B. M., Wrasidlo, W. A., & Reisfeld, R. A. (1988). Determination of the Number of e - Amino Groups Available for Conjugation of Effector Molecules to Monoclonal Antibodies. *Hybridoma*, 7(5), 453–456. <https://doi.org/10.1089/hyb.1988.7.453>
- Mukhopadhyay, P., Rajesh, M., Haskó, G., Hawkins, B. J., Madesh, M., & Pacher, P. (2007). Simultaneous detection of apoptosis and mitochondrial superoxide production in live cells by flow cytometry and confocal microscopy. *Nature Protocols*, 2(9), 2295–2301. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.327>
- Mullally, M. M., Meisel, H., & FitzGerald, R. J. (1997). Identification of a novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptide corresponding to a tryptic fragment of bovine β -lactoglobulin. *FEBS Letters*, 402(2–3), 99–101. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(96\)01503-7](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(96)01503-7)
- Mullett, W. M., Lai, E. P. C., & Yeung, J. M. (2000). Surface Plasmon Resonance-Based Immunoassays. *Methods*, 22(1), 77–91. <https://doi.org/10.1006/meth.2000.1039>
- Munishkina, L. A., & Fink, A. L. (2007). Fluorescence as a method to reveal structures and membrane-interactions of amyloidogenic proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1768(8), 1862–1885. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.03.015>
- Nagaoka, S., Futamura, Y., Miwa, K., Awano, T., Yamauchi, K., Kanamaru, Y., Tadashi, K., & Kuwata, T. (2001). Identification of Novel Hypocholesterolemic Peptides Derived from Bovine Milk β -Lactoglobulin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 281(1), 11–17. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.4298>
- Nakamura, T., Kawai, Y., Kitamoto, N., Osawa, T., & Kato, Y. (2009). Covalent Modification of Lysine Residues by Allyl Isothiocyanate in Physiological Conditions: Plausible Transformation of Isothiocyanate from Thiol to Amine. *Chemical Research in Toxicology*, 22(3), 536–542. <https://doi.org/10.1021/tx8003906>
- Neužil, J., & Stocker, R. (1993). Bilirubin attenuates radical-mediated damage to serum albumin. *FEBS Letters*, 331(3), 281–284. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(93\)80353-V](https://doi.org/10.1016/0014-5793(93)80353-V)
- Newsome, A. G., Culver, C. A., & van Breemen, R. B. (2014). Nature's Palette: The Search for Natural Blue Colorants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(28), 6498–6511. <https://doi.org/10.1021/jf501419q>
- Ni, Y., Zhang, X., & Kokot, S. (2009). Spectrometric and voltammetric studies of the interaction between quercetin and bovine serum albumin using warfarin as site marker with the aid of chemometrics. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 71(5), 1865–1872. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2008.07.004>
- Nielsen, P. M., Petersen, D., & Dambmann, C. (2001). Improved Method for Determining Food Protein Degree of Hydrolysis. *Journal of Food Science*, 66(5), 642–646. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2001.tb04614.x>
- Obermaier, C., Griebel, A., & Westermeier, R. (2021). Principles of Protein Labeling Techniques. In A. Posch (Ed.), *Proteomic Profiling* (Vol. 2261, pp. 549–562). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1186-9_35
- Oboroceanu, D., Lizhe, W., André, B., Edmond, M., & Auty, M. A. E. (2010). Characterization β -

lactoglobulin fibrillar assembly using atomic force microscopy polyacrylamide gel electrophoresis, and in situ fourier transform infrared spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(6), 3667–3673. <https://doi.org/10.1021/jf9042908>

Oettl, K., & Stauber, R. (2007). Physiological and pathological changes in the redox state of human serum albumin critically influence its binding properties. *British Journal of Pharmacology*, 151(5), 580–590. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707251>

Ogata, N. (2007). Denaturation of Protein by Chlorine Dioxide: Oxidative Modification of Tryptophan and Tyrosine Residues. *Biochemistry*, 46(16), 4898–4911. <https://doi.org/10.1021/bi061827u>

Oi, V. T., Glazer, A. N., & Stryer, L. (1982). Fluorescent phycobiliprotein conjugates for analyses of cells and molecules. *The Journal of Cell Biology*, 93(3), 981–986. <https://doi.org/10.1083/jcb.93.3.981>

Oliver, S., Vittorio, O., Cirillo, G., & Boyer, C. (2016). Enhancing the therapeutic effects of polyphenols with macromolecules. *Polymer Chemistry*, 7(8), 1529–1544. <https://doi.org/10.1039/C5PY01912E>

Ou, B., Hampsch-Woodill, M., & Prior, R. L. (2001). Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(10), 4619–4626. <https://doi.org/10.1021/jf010586o>

Ouellette, D., Alessandri, L., Chin, A., Grinnell, C., Tarcsa, E., Radziejewski, C., & Correia, I. (2010). Studies in serum support rapid formation of disulfide bond between unpaired cysteine residues in the VH domain of an immunoglobulin G1 molecule. *Analytical Biochemistry*, 397(1), 37–47. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2009.09.027>

Ozdal, T., Capanoglu, E., & Altay, F. (2013). A review on protein–phenolic interactions and associated changes. *Food Research International*, 51(2), 954–970. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.02.009>

Pace, N. J., & Weerapana, E. (2013). Diverse Functional Roles of Reactive Cysteines. *ACS Chemical Biology*, 8(2), 283–296. <https://doi.org/10.1021/cb3005269>

Padyana, A. K., Bhat, V. B., Madyastha, K. M., Rajashankar, K. R., & Ramakumar, S. (2001). Crystal Structure of a Light-Harvesting Protein C-Phycocyanin from *Spirulina platensis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 282(4), 893–898. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.4663>

Pagels, F., Guedes, A. C., Amaro, H. M., Kijjoo, A., & Vasconcelos, V. (2019). Phycobiliproteins from cyanobacteria: Chemistry and biotechnological applications. *Biotechnology Advances*, 37(3), 422–443. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.02.010>

Papadopoulou, A., Green, R. J., & Frazier, R. A. (2005). Interaction of Flavonoids with Bovine Serum Albumin: A Fluorescence Quenching Study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(1), 158–163. <https://doi.org/10.1021/jf048693g>

Pápay, Z. E., Kósa, A., Böddi, B., Merchant, Z., Saleem, I. Y., Zariwala, M. G., Klebovich, I., Somavarapu, S., & Antal, I. (2017). Study on the Pulmonary Delivery System of Apigenin-

Loaded Albumin Nanocarriers with Antioxidant Activity. *Journal of Aerosol Medicine and Pulmonary Drug Delivery*, 30(4), 274–288. <https://doi.org/10.1089/jamp.2016.1316>

Papiz, M. Z., Sawyer, L., Eliopoulos, E. E., North, A. C. T., Findlay, J. B. C., Sivaprasadarao, R., Jones, T. A., Newcomer, M. E., & Kraulis, P. J. (1986). The structure of β -lactoglobulin and its similarity to plasma retinol-binding protein. *Nature*, 324(6095), 383–385. <https://doi.org/10.1038/324383a0>

Parakh, S., Lee, S. T., Gan, H. K., & Scott, A. M. (2022). Radiolabeled Antibodies for Cancer Imaging and Therapy. *Cancers*, 14(6), 1454. <https://doi.org/10.3390/cancers14061454>

Patel, H. A., Singh, H., Anema, S. G., & Creamer, L. K. (2006). Effects of Heat and High Hydrostatic Pressure Treatments on Disulfide Bonding Interchanges among the Proteins in Skim Milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(9), 3409–3420. <https://doi.org/10.1021/jf052834c>

Pe'er, I., Felder, C. E., Man, O., Silman, I., Sussman, J. L., & Beckmann, J. S. (2004). Proteomic Signatures: Amino Acid and Oligopeptide Compositions Differentiate among Phyla. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, 54(1), 20–40. <https://doi.org/10.1002/prot.10559>

Pelegri-O'Day, E. M., Lin, E.-W., & Maynard, H. D. (2014). Therapeutic Protein–Polymer Conjugates: Advancing Beyond PEGylation. *Journal of the American Chemical Society*, 136(41), 14323–14332. <https://doi.org/10.1021/ja504390x>

Pellegrini, A., Dettling, C., Thomas, U., & Hunziker, P. (2001). Isolation and characterization of four bactericidal domains in the bovine β -lactoglobulin. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1526(2), 131–140. [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(01\)00116-7](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(01)00116-7)

Peng, H., Chen, S., Luo, M., Ning, F., Zhu, X., & Xiong, H. (2016). Preparation and Self-Assembly Mechanism of Bovine Serum Albumin–Citrus Peel Pectin Conjugated Hydrogel: A Potential Delivery System for Vitamin C. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(39), 7377–7384. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b02966>

Pérez, M. D., de Villegas, C. D., Sánchez, L., Aranda, P., Ena, J. M., & Calvo, M. (1989). Interaction of Fatty Acids with β -Lactoglobulin and Albumin from Ruminant Milk. *Journal of Biochemistry*, 106(6), 1094–1097. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a122971>

Permyakov, E. A. (2020). α -Lactalbumin, Amazing Calcium-Binding Protein. *Biomolecules*, 10(9), 1210. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/biom10091210>

Perusko, M., Al-Hanish, A., Mihailovic, J., Minic, S., Trifunovic, S., Prodic, I., & Cirkovic Velickovic, T. (2017). Antioxidative capacity and binding affinity of the complex of green tea catechin and beta-lactoglobulin glycosylated by the Maillard reaction. *Food Chemistry*, 232, 744–752. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.074>

Perusko, M., van Roest, M., Stanic-Vucinic, D., Simons, P. J., Pieters, R. H. H., Cirkovic Velickovic, T., & Smit, J. J. (2018). Glycation of the Major Milk Allergen β -Lactoglobulin Changes Its Allergenicity by Alterations in Cellular Uptake and Degradation. *Molecular Nutrition and Food Research*, 62(17), 1–12. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201800341>

Pessen, H., Purcell, J. M., & Farrell, H. M. (1985). Proton relaxation rates of water in dilute solutions of β -lactoglobulin. Determination of cross relaxation and correlation with structural

changes by the use of two genetic variants of a self-associating globular protein. *Biochimica et Biophysica Acta*, 828(1), 1–12. [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(85\)90002-0](https://doi.org/10.1016/0167-4838(85)90002-0)

Peters, T. (1995). *All About Albumin* (1st ed). Academic Press.

Pettersson-Kastberg, J., Mossberg, A. K., Trulsson, M., Yong, Y. J., Min, S., Lim, Y., O'Brien, J. E., Svanborg, C., & Mok, K. H. (2009). α -Lactalbumin, Engineered to be Nonnative and Inactive, Kills Tumor Cells when in Complex with Oleic Acid: A New Biological Function Resulting from Partial Unfolding. *Journal of Molecular Biology*, 394(5), 994–1010. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.09.026>

Phillips, J. C., Braun, R., Wang, W., Gumbart, J., Tajkhorshid, E., Villa, E., Chipot, C., Skeel, R. D., Kalé, L., & Schulten, K. (2005). Scalable molecular dynamics with NAMD. *Journal of Computational Chemistry*, 26(16), 1781–1802. <https://doi.org/10.1002/jcc.20289>

Pihlanto-Leppälä, A., Marnila, P., Hubert, L., Rokka, T., Korhonen, H. J. T., & Karp, M. (1999). The effect of α -lactalbumin and β -lactoglobulin hydrolysates on the metabolic activity of *Escherichia coli* JM103. *Journal of Applied Microbiology*, 87(4), 540–545. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00849.x>

Pilati, D., & Howard, K. A. (2020). Albumin-based drug designs for pharmacokinetic modulation. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 16(9), 783–795. <https://doi.org/10.1080/17425255.2020.1801633>

Pizzolo, G., & Chilosi, M. (1984). Double Immunostaining of Lymph Node Sections by Monoclonal Antibodies Using Phycoerythrin Labeling and Haptenated Reagents. *American Journal of Clinical Pathology*, 82(1), 44–47. <https://doi.org/10.1093/ajcp/82.1.44>

Polastro, E., Schneck, A. G., Leonis, J., Kim, S., & Paik, W. K. (1978). Cytochrome C methylation. *International Journal of Biochemistry*, 9(11), 795–801. [https://doi.org/10.1016/0020-711X\(78\)90028-9](https://doi.org/10.1016/0020-711X(78)90028-9)

Polverino de Laureto, P., Frare, E., Gottardo, R., & Fontana, A. (2002). Molten globule of bovine α -lactalbumin at neutral pH induced by heat, trifluoroethanol, and oleic acid: A comparative analysis by circular dichroism spectroscopy and limited proteolysis. *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, 49(3), 385–397. <https://doi.org/10.1002/prot.10234>

Pourjabbar, B., Hassani, L., & Sajedi, R. H. (2015). Investigating the effect of structural transition on aggregation of β -lactoglobulin. *Protein & Peptide Letters*, 22(12), 1089–1097. <https://doi.org/10.2174/0929866522666150929103520>

Poza-Guedes, P., Barrios, Y., González-Pérez, R., Sánchez-Machín, I., Franco, A., & Matheu, V. (2016). Role of specific IgE to β -lactoglobulin in the gastrointestinal phenotype of cow's milk allergy. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology*, 12(1), 1–4. <https://doi.org/10.1186/s13223-016-0111-7>

Puyol, P., Perez, M. D., Mata, L., Ena, J. M., & Calvo, M. (1993). Effect of Retinol and Fatty Acid Binding by Bovine β -lactoglobulin on its Resistance to Trypsin Digestion. *International Dairy Journal*, 3(7), 589–597. [https://doi.org/10.1016/0958-6946\(93\)90102-6](https://doi.org/10.1016/0958-6946(93)90102-6)

Qi, X. L., Brownlow, S., Holt, C., & Sellers, P. (1995). Thermal denaturation of β -lactoglobulin: effect of protein concentration at pH 6.75 and 8.05. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1248(1),

- Qiang, X., Wang, L., Niu, J., Gong, X., & Wang, G. (2021). Phycobiliprotein as fluorescent probe and photosensitizer: A systematic review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 193, 1910–1917. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.11.022>
- Qin, B. Y., Bewley, M. C., Creamer, L. K., Baker, E. N., & Jameson, G. B. (1999). Functional implications of structural differences between variants A and B of bovine β -lactoglobulin. *Protein Science*, 8(1), 75–83. <https://doi.org/10.1110/ps.8.1.75>
- Qin, B. Y., Bewley, M. C., Creamer, L. K., Baker, H. M., Baker, E. N., & Jameson, G. B. (1998). Structural Basis of the Tanford Transition of Bovine β -Lactoglobulin. *Biochemistry*, 37(40), 14014–14023. <https://doi.org/10.1021/bi981016t>
- Quan, T. H., Benjakul, S., Sae-leaw, T., Balange, A. K., & Maqsood, S. (2019). Protein–polyphenol conjugates: Antioxidant property, functionalities and their applications. *Trends in Food Science & Technology*, 91, 507–517. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.07.049>
- Rade-Kukic, K., Schmitt, C., & Rawel, H. M. (2011). Formation of conjugates between β -lactoglobulin and allyl isothiocyanate: Effect on protein heat aggregation, foaming and emulsifying properties. *Food Hydrocolloids*, 25(4), 694–706. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.08.018>
- Radibratovic, M., Al-Hanish, A., Minic, S., Radomirovic, M., Milcic, M., Stanic-Vucinic, D., & Cirkovic Velickovic, T. (2019). Stabilization of apo α -lactalbumin by binding of epigallocatechin-3-gallate: Experimental and molecular dynamics study. *Food Chemistry*, 278, 388–395. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.11.038>
- Radomirović, M., Gligorijević, N., Stanić-Vučinić, D., Rajković, A., & Ćirković Veličković, T. (2023). Ultrasensitive Quantification of Crustacean Tropomyosin by Immuno-PCR. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(20), 15410. <https://doi.org/10.3390/ijms242015410>
- Raja, S. T. K., Thiruselvi, T., Mandal, A. B., & Gnanamani, A. (2015). pH and redox sensitive albumin hydrogel: A self-derived biomaterial. *Scientific Reports*, 5(1), 15977. <https://doi.org/10.1038/srep15977>
- Rangsansarid, J., & Fukada, K. (2007). Factors affecting the stability of O/W emulsion in BSA solution: Stabilization by electrically neutral protein at high ionic strength. *Journal of Colloid and Interface Science*, 316(2), 779–786. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2007.07.040>
- Rasmussen, P., Barbiroli, A., Bonomi, F., Faoro, F., Ferranti, P., Iriti, M., Picariello, G., & Iametti, S. (2007). Formation of Structured Polymers upon Controlled Denaturation of β -lactoglobulin with Different Chaotropes. *Biopolymers*, 86(1), 57–72. <https://doi.org/10.1002/bip.20704>
- Ravi, M., Tentu, S., Baskar, G., Rohan Prasad, S., Raghavan, S., Jayaprakash, P., Jeyakanthan, J., Rayala, S. K., & Venkatraman, G. (2015). Molecular mechanism of anti-cancer activity of phycocyanin in triple-negative breast cancer cells. *BMC Cancer*, 15(1), 768. <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1784-x>
- 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(3–4),

137–150. [https://doi.org/10.1016/S0141-8130\(02\)00016-8](https://doi.org/10.1016/S0141-8130(02)00016-8)

- Rawel, H. M., Kroll, J., & Hohl, U. C. (2001). Model studies on reactions of plant phenols with whey proteins. *Nahrung/Food*, 45(2), 72–81. [https://doi.org/10.1002/1521-3803\(20010401\)45:2<72::AID-FOOD72>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/1521-3803(20010401)45:2<72::AID-FOOD72>3.0.CO;2-U)
- Rawel, H. M., Kroll, J., & Riese, B. (2000). Reactions of Chlorogenic Acid with Lysozyme: Physicochemical Characterization and Proteolytic Digestion of the Derivatives. *Journal of Food Science*, 65(6), 1091–1098. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2000.tb09424.x>
- Rawel, H. M., Rohn, S., & Kroll, J. (2003). Influence of a sugar moiety (rhamnosylglucoside) at 3-O position on the reactivity of quercetin with whey proteins. *International Journal of Biological Macromolecules*, 32(3–5), 109–120. [https://doi.org/10.1016/S0141-8130\(03\)00044-8](https://doi.org/10.1016/S0141-8130(03)00044-8)
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9–10), 1231–1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
- Reily, C., Stewart, T. J., Renfrow, M. B., & Novak, J. (2019). Glycosylation in health and disease. *Nature Reviews Nephrology*, 15(6), 346–366. <https://doi.org/10.1038/s41581-019-0129-4>
- Roche, M., Rondeau, P., Singh, N. R., Tarnus, E., & Bourdon, E. (2008). The antioxidant properties of serum albumin. *FEBS Letters*, 582(13), 1783–1787. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.04.057>
- Rudikoff, S., & Pumphrey, J. G. (1986). Functional antibody lacking a variable-region disulfide bridge. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(20), 7875–7878. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.20.7875>
- Saito, M., Yin, L.-J., Kobayashi, I., & Nakajima, M. (2006). Comparison of stability of bovine serum albumin-stabilized emulsions prepared by microchannel emulsification and homogenization. *Food Hydrocolloids*, 20(7), 1020–1028. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2005.10.018>
- Sakai, K., Sakurai, K., Sakai, M., Hoshino, M., & Goto, Y. (2000). Conformation and stability of thiol-modified bovine beta-lactoglobulin. *Protein Science*, 9(9), 1719–1729. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11045618> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2144692>
- Sakurai, K., & Goto, Y. (2002). Manipulating Monomer-Dimer Equilibrium of Bovine β -Lactoglobulin by Amino Acid Substitution. *Journal of Biological Chemistry*, 277(28), 25735–25740. <https://doi.org/10.1074/jbc.M203659200>
- Sakurai, K., Oobatake, M., & Goto, Y. (2001). Salt-dependent monomer–dimer equilibrium of bovine β -lactoglobulin at pH 3. *Protein Science*, 10(11), 2325–2335. <https://doi.org/10.1110/ps.17001>
- Samarajeewa, U., Wei, C. I., Huang, T. S., & Marshall, M. R. (1991). Application of immunoassay in the food industry. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 29(6), 403–434. <https://doi.org/10.1080/10408399109527535>

- Sardar, S., Pal, S., Maity, S., Chakraborty, J., & Halder, U. C. (2014). Amyloid fibril formation by β -lactoglobulin is inhibited by gold nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules*, 69, 137–145. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.05.006>
- Sardi, F., Manta, B., Portillo-Ledesma, S., Knoops, B., Comini, M. A., & Ferrer-Sueta, G. (2013). Determination of acidity and nucleophilicity in thiols by reaction with monobromobimane and fluorescence detection. *Analytical Biochemistry*, 435(1), 74–82. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2012.12.017>
- Sawyer, L. (2003). β -Lactoglobulin. In P. F. Fox & P. L. H. McSweeney (Eds.), *Advanced Dairy Chemistry—1 Proteins* (Vol. 1, pp. 319–386). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-8602-3_7
- Scheer, H., & Kufer, W. (1977). Conformational Studies on C-Phycocyanin from *Spirulina platensis*. *Zeitschrift Für Naturforschung C*, 32(7–8), 513–519. <https://doi.org/10.1515/znc-1977-7-806>
- Scheer, H., & Zhao, K. -H. (2008). Biliprotein maturation: the chromophore attachment. *Molecular Microbiology*, 68(2), 263–276. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06160.x>
- Schjoldager, K. T., Narimatsu, Y., Joshi, H. J., & Clausen, H. (2020). Global view of human protein glycosylation pathways and functions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 21(12), 729–749. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00294-x>
- Schmidt, D. G., Meijer, R. J. G. M., Slangen, C. J., & Van Beresteijn, E. C. H. (1995). Raising the pH of the pepsin-catalysed hydrolysis of bovine whey proteins increases the antigenicity of the hydrolysates. *Clinical and Experimental Allergy*, 25(10), 1007–1017. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.1995.tb00404.x>
- Schoemaker, A. A., Sprikkelman, A. B., Grimshaw, K. E., Roberts, G., Grabenhenrich, L., Rosenfeld, L., Siegert, S., Dubakienė, R., Rudzeviciene, O., Reche, M., Fiandor, A., Papadopoulos, N. G., Malamitsi-Puchner, A., Fiocchi, A., Dahdah, L., Sigurdardottir, S. T., Clausen, M., Stańczyk-Przyłuska, A., Zeman, K., ... Beyer, K. (2015). Incidence and natural history of challenge-proven cow's milk allergy in European children – EuroPrevall birth cohort. *Allergy*, 70(8), 963–972. <https://doi.org/10.1111/all.12630>
- Schokker, E. P., Singh, H., Pinder, D. N., & Creamer, L. . (2000). Heat-induced aggregation of β -lactoglobulin AB at pH 2.5 as influenced by ionic strength and protein concentration. *International Dairy Journal*, 10(4), 233–240. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(00\)00047-9](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(00)00047-9)
- Schroeder, H. W., & Cavacini, L. (2010). Structure and function of immunoglobulins. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2), S41–S52. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.09.046>
- Schuurman, J., Perdok, G. J., Gorter, A. D., & Aalberse, R. C. (2001). The inter-heavy chain disulfide bonds of IgG4 are in equilibrium with intra-chain disulfide bonds. *Molecular Immunology*, 38(1), 1–8. [https://doi.org/10.1016/S0161-5890\(01\)00050-5](https://doi.org/10.1016/S0161-5890(01)00050-5)
- Sélo, I., Clément, G., Bernard, H., Chatel, J.-M., Créminon, C., Peltre, G., & Wal, J.-M. (1999). Allergy to bovine β -lactoglobulin: specificity of human IgE to tryptic peptides. *Clinical and Experimental Allergy*, 29(8), 1055–1063. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2222.1999.00612.x>
- Sen, P., Ahmad, B., & Khan, R. H. (2008). Formation of a molten globule like state in bovine

serum albumin at alkaline pH. *European Biophysics Journal*, 37(8), 1303–1308.
<https://doi.org/10.1007/s00249-008-0335-7>

- Shang, M., Sun, J., Bi, Y., Xu, X., & Zang, X. (2023). Fluorescence and antioxidant activity of heterologous expression of phycocyanin and allophycocyanin from *Arthrospira platensis*. *Frontiers in Nutrition*, 10, 1127422. <https://doi.org/10.3389/fnut.2023.1127422>
- Shek, L. P. C., Bardina, L., Castro, R., Sampson, H. A., & Beyer, K. (2005). Humoral and cellular responses to cow milk proteins in patients with milk-induced IgE-mediated and non-IgE-mediated disorders. *Allergy*, 60(7), 912–919. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2005.00705.x>
- Shen, G., Saunée, N. A., Williams, S. R., Gallo, E. F., Schluchter, W. M., & Bryant, D. A. (2006). Identification and Characterization of a New Class of Bilin Lyase. *Journal of Biological Chemistry*, 281(26), 17768–17778. <https://doi.org/10.1074/jbc.M602563200>
- Sheng, B., Li, L., Zhang, X., Jiao, W., Zhao, D., Wang, X., Wan, L., Li, B., & Rong, H. (2018). Physicochemical Properties and Chemical Stability of β -Carotene Bilayer Emulsion Coated with Bovine Serum Albumin and Arabic Gum Compared to Monolayer Emulsions. *Molecules*, 23(2), 495. <https://doi.org/10.3390/molecules23020495>
- Shiraki, K., Nishikawa, K., & Goto, Y. (1995). Trifluoroethanol-induced Stabilization of the α -Helical Structure of β -Lactoglobulin: Implication for Non-hierarchical Protein Folding. *Journal of Molecular Biology*, 245(2), 180–194. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1994.0015>
- Shpigelman, A., Cohen, Y., & Livney, Y. D. (2012). Thermally-induced β -lactoglobulin–EGCG nanovehicles: Loading, stability, sensory and digestive-release study. *Food Hydrocolloids*, 29(1), 57–67. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.01.016>
- Singh, H. (2011). Aspects of milk-protein-stabilised emulsions. *Food Hydrocolloids*, 25(8), 1938–1944. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.02.022>
- Skr̆t, M., Benedik, E., Podlipnik, Č., & Ulrih, N. P. (2012). Interactions of different polyphenols with bovine serum albumin using fluorescence quenching and molecular docking. *Food Chemistry*, 135(4), 2418–2424. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.114>
- Sladic, D., Novakovic, I., Vujcic, Z., Bozic, T., Bozic, N., Milic, D., Solaja, B., & Gasic, M. J. (2004). Protein covalent modification of biologically active quinones. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 69(11), 901–907. <https://doi.org/10.2298/JSC0411901S>
- Soini, E., & Hemmilä, I. (1979). Fluoroimmunoassay: Present Status and Key Problems. *Clinical Chemistry*, 25(3), 353–361. <https://doi.org/10.1093/clinchem/25.3.353>
- Solá, R. J., & Griebenow, K. (2009). Effects of Glycosylation on the Stability of Protein Pharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 98(4), 1223–1245. <https://doi.org/10.1002/jps.21504>
- Sommer, A., & Traut, R. R. (1974). Diagonal Polyacrylamide-Dodecyl Sulfate Gel Electrophoresis for the Identification of Ribosomal Proteins Crosslinked with Methyl-4-Mercaptobutyrimidate. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 71(10), 3946–3950. <https://doi.org/10.1073/pnas.71.10.3946>

- Sonani, R. R., Rastogi, R. P., Patel, R., & Madamwar, D. (2016). Recent advances in production, purification and applications of phycobiliproteins. *World Journal of Biological Chemistry*, 7(1), 100–109. <https://doi.org/10.4331/wjbc.v7.i1.100>
- Sotiroudis, T. G., & Sotiroudis, G. T. (2013). Health aspects of *Spirulina* (Arthrospira) microalga food supplement. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 78(3), 395–405. <https://doi.org/10.2298/JSC121020152S>
- Spada, A., Emami, J., Tuszynski, J. A., & Lavasanifar, A. (2021). The Uniqueness of Albumin as a Carrier in Nanodrug Delivery. *Molecular Pharmaceutics*, 18(5), 1862–1894. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.1c00046>
- Spicer, C. D., & Davis, B. G. (2014). Selective chemical protein modification. *Nature Communications*, 5(1), 4740. <https://doi.org/10.1038/ncomms5740>
- Spolidoro, G. C. I., Ali, M. M., Amera, Y. T., Nyassi, S., Lisik, D., Ioannidou, A., Rovner, G., Khaleva, E., Venter, C., van Ree, R., Worm, M., Vlieg-Boerstra, B., Sheikh, A., Muraro, A., Roberts, G., & Nwaru, B. I. (2023). Prevalence estimates of eight big food allergies in Europe: Updated systematic review and meta-analysis. *Allergy*, 78(9), 2361–2417. <https://doi.org/10.1111/all.15801>
- Stanic-Vucinic, D., Minic, S., Nikolic, M. R., & Velickovic, T. C. (2018). *Spirulina* Phycobiliproteins as Food Components and Complements. In E. Jacob-Lopes, L. Q. Zepka, & M. I. Queiroz (Eds.), *Microalgal Biotechnology* (Vol. 11, pp. 129–149). InTechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.73791>
- Stasi, R., Evangelista, M. L., Buccisano, F., Venditti, A., & Amadori, S. (2008). Gemtuzumab ozogamicin in the treatment of acute myeloid leukemia. *Cancer Treatment Reviews*, 34(1), 49–60. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2007.09.001>
- Stewart, A. J., Blindauer, C. A., Berezenko, S., Sleep, D., Tooth, D., & Sadler, P. J. (2005). Role of Tyr84 in controlling the reactivity of Cys34 of human albumin. *The FEBS Journal*, 272(2), 353–362. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2004.04474.x>
- Stinchcombe, T. E. (2007). Nanoparticle Albumin-Bound Paclitaxel: A Novel Cremphor-EL® - Free Formulation of Paclitaxel. *Nanomedicine*, 2(4), 415–423. <https://doi.org/10.2217/17435889.2.4.415>
- Stojadinovic, M., Burazer, L., Ercili-Cura, D., Sancho, A., Buchert, J., Velickovic, T. C., & Stanic-Vucinic, D. (2012). One-step method for isolation and purification of native β -lactoglobulin from bovine whey. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(7), 1432–1440. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4722>
- Stojadinovic, M., Radosavljevic, J., Ognjenovic, J., Vesic, J., Prodic, I., Stanic-Vucinic, D., & Cirkovic Velickovic, T. (2013). Binding affinity between dietary polyphenols and β -lactoglobulin negatively correlates with the protein susceptibility to digestion and total antioxidant activity of complexes formed. *Food Chemistry*, 136(3–4), 1263–1271. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.09.040>
- Subhashini, J., Mahipal, S. V. K., Reddy, M. C., Mallikarjuna Reddy, M., Rachamallu, A., & Reddanna, P. (2004). Molecular mechanisms in C-Phycocyanin induced apoptosis in human chronic myeloid leukemia cell line-K562. *Biochemical Pharmacology*, 68(3), 453–462.

<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2004.02.025>

- Sudlow, G., Birkett, D. J., & Wade, D. N. (1975). The Characterization of Two Specific Drug Binding Sites on Human Serum Albumin. *Molecular Pharmacology*, 11(6), 824–832. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1207674>
- Tabibiazar, M., Mohammadifar, M. A., Roufegarinejad, L., Ghorbani, M., Hashemi, M., & Hamishehkar, H. (2019). Improvement in dispersibility, stability and antioxidant activity of resveratrol using a colloidal nanodispersion of BSA-resveratrol. *Food Bioscience*, 27(October 2018), 46–53. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2018.10.015>
- Takagi, K., Teshima, R., Okunuki, H., & Sawada, J. (2003). Comparative Study of in Vitro Digestibility of Food Proteins and Effect of Preheating on the Digestion. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 26(7), 969–973. <https://doi.org/10.1248/bpb.26.969>
- Tamura, T., & Hamachi, I. (2019). Chemistry for Covalent Modification of Endogenous/Native Proteins: From Test Tubes to Complex Biological Systems. *Journal of the American Chemical Society*, 141(7), 2782–2799. <https://doi.org/10.1021/jacs.8b11747>
- Tandeau de Marsac, N. (2003). Phycobiliproteins and phycobilisomes: the early observations. *Photosynthesis Research*, 76(1–3), 197–205. <https://doi.org/https://doi.org/10.1023/A:1024954911473>
- Tao, F., Xiao, C., Chen, W., Zhang, Y., Pan, J., & Jia, Z. (2019). Covalent modification of β -lactoglobulin by (–)-epigallocatechin-3-gallate results in a novel antioxidant molecule. *International Journal of Biological Macromolecules*, 126, 1186–1191. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.01.017>
- Taulier, N., & Chalikian, T. V. (2001). Characterization of pH-induced Transitions of β -lactoglobulin: Ultrasonic, Densimetric, and Spectroscopic studies. *Journal of Molecular Biology*, 314(4), 873–889. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.5188>
- Taylor, F. R., Prentice, H. L., Garber, E. A., Fajardo, H. A., Vasilyeva, E., & Blake Pepinsky, R. (2006). Suppression of sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis sample preparation artifacts for analysis of IgG4 half-antibody. *Analytical Biochemistry*, 353(2), 204–208. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2006.02.022>
- Tayyab, S., & Feroz, S. R. (2021). Serum albumin: clinical significance of drug binding and development as drug delivery vehicle. In *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology* (Vol. 123, pp. 193–218). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2020.08.003>
- Teng, Z., Xu, R., & Wang, Q. (2015). Beta-lactoglobulin-based encapsulating systems as emerging bioavailability enhancers for nutraceuticals: a review. *RSC Advances*, 5(44), 35138–35154. <https://doi.org/10.1039/C5RA01814E>
- Thomas, K., Aalbers, M., Bannon, G. A., Bartels, M., Dearman, R. J., Esdaile, D. J., Fu, T. J., Glatt, C. M., Hadfield, N., Hatzos, C., Hefle, S. L., Heylings, J. R., Goodman, R. E., Henry, B., Herouet, C., Holsapple, M., Ladics, G. S., Landry, T. D., MacIntosh, S. C., ... Zawodny, J. (2004). A multi-laboratory evaluation of a common in vitro pepsin digestion assay protocol used in assessing the safety of novel proteins. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 39(2), 87–98. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2003.11.003>

- Timasheff, S. N., & Townend, R. (1961). Molecular Interactions in β -Lactoglobulin. V. the Association of the Genetic Species of β -Lactoglobulin below the Isoelectric Point. *Journal of the American Chemical Society*, 83(2), 464–469. <https://doi.org/10.1021/ja01463a049>
- Tounsi, L., Ben Hlima, H., Hentati, F., Hentati, O., Derbel, H., Michaud, P., & Abdelkafi, S. (2023). Microalgae: A Promising Source of Bioactive Phycobiliproteins. *Marine Drugs*, 21(8), 440. <https://doi.org/10.3390/md21080440>
- Traut, R. R., Bollen, A., Sun, T.-T., Hershey, J. W. B., Sundberg, J., & Pierce, L. R. (1973). Methyl 4-Mercaptobutyrimidate as a Cleavable Cross-Linking Reagent and Its Application to the Escherichia coli 30S Ribosome. *Biochemistry*, 12(17), 3266–3273. <https://doi.org/10.1021/bi00741a019>
- Trott, O., & Olson, A. J. (2010). AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*, 31(2), 455–461. <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>
- Tsuchikama, K., Anami, Y., Ha, S. Y. Y., & Yamazaki, C. M. (2024). Exploring the next generation of antibody–drug conjugates. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 21(3), 203–223. <https://doi.org/10.1038/s41571-023-00850-2>
- Tzachor, A., Smidt-Jensen, A., Ramel, A., & Geirsdóttir, M. (2022). Environmental Impacts of Large-Scale Spirulina (Arthrospira platensis) Production in Hellisheidi Geothermal Park Iceland: Life Cycle Assessment. *Marine Biotechnology*, 24(5), 991–1001. <https://doi.org/10.1007/s10126-022-10162-8>
- Uesson, M., & Hansson, U. -B. (1982). Circular Dichroism of Immune Complexes, IgG and Faby with Unique Antigenic Determinants from Rheumatoid Serum. *Scandinavian Journal of Immunology*, 16(3), 249–256. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.1982.tb00720.x>
- Ünlü, M., Morgan, M. E., & Minden, J. S. (1997). Difference gel electrophoresis: A single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis*, 18(11), 2071–2077. <https://doi.org/10.1002/elps.1150181133>
- van den Akker, C. C., Engel, M. F. M., Velikov, K. P., Bonn, M., & Koenderink, G. H. (2011). Morphology and Persistence Length of Amyloid Fibrils Are Correlated to Peptide Molecular Structure. *Journal of the American Chemical Society*, 133(45), 18030–18033. <https://doi.org/10.1021/ja206513r>
- van den Akker, C. C., Schleeger, M., Bonn, M., & Koenderink, G. H. (2014). Structural Basis for the Polymorphism of β -Lactoglobulin Amyloid-Like Fibrils. In V. N. Uversky & Y. L. Lyubchenko (Eds.), *Bio-nanoimaging* (pp. 333–343). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394431-3.00031-6>
- van der Neut Kolfshoten, M., Schuurman, J., Losen, M., Bleeker, W. K., Martínez-Martínez, P., Vermeulen, E., den Bleker, T. H., Wiegman, L., Vink, T., Aarden, L. A., De Baets, M. H., van de Winkel, J. G. J., Aalberse, R. C., & Parren, P. W. H. I. (2007). Anti-Inflammatory Activity of Human IgG4 Antibodies by Dynamic Fab Arm Exchange. *Science*, 317(5844), 1554–1557. <https://doi.org/10.1126/science.1144603>
- van Pelt, S., Quignard, S., Kubáč, D., Sorokin, D. Y., van Rantwijk, F., & Sheldon, R. A. (2008). Nitrile hydratase CLEAs: The immobilization and stabilization of an industrially important

- enzyme. *Green Chemistry*, 10(4), 395–400. <https://doi.org/10.1039/B714258G>
- Vanderheeren, G., & Hanssens, I. (1994). Thermal Unfolding of Bovine alpha-Lactalbumin. *Journal of Biological Chemistry*, 269(10), 7090–7094. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)37250-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)37250-2)
- Vetri, V., & Militello, V. (2005). Thermal induced conformational changes involved in the aggregation pathways of beta-lactoglobulin. *Biophysical Chemistry*, 113(1), 83–91. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2004.07.042>
- Vhora, I., Patil, S., Bhatt, P., & Misra, A. (2015). Protein– and Peptide–Drug Conjugates: An Emerging Drug Delivery Technology. In R. Donev (Ed.), *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology* (1st edition, Vol. 98, pp. 1–55). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2014.11.001>
- Vidarsson, G., Dekkers, G., & Rispens, T. (2014). IgG Subclasses and Allotypes: From Structure to Effector Functions. *Frontiers in Immunology*, 5, 1–17. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00520>
- Visentini, F. F., Perez, A. A., & Santiago, L. G. (2023). Bioactive compounds: Application of albumin nanocarriers as delivery systems. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 63(25), 7238–7268. <https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2045471>
- Wang, D., Lv, P., Zhang, L., Yang, S., & Gao, Y. (2019). Structural and Functional Characterization of Laccase-Induced β -Lactoglobulin–Ferulic Acid–Chitosan Ternary Conjugates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(43), 12054–12060. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b04557>
- Wang, Q., Allen, J. C., & Swaisgood, H. E. (1997). Binding of Retinoids to β -Lactoglobulin Isolated by Bioselective Adsorption. *Journal of Dairy Science*, 80(6), 1047–1053. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(97\)76029-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(97)76029-6)
- Watson, J. D., Baker, T. A., Bell, S. P., Gann, A. A. F., Levine, M., & Losick, R. M. (2008). *Molecular Biology of the Gene* (6th ed). Pearson/Benjamin Cummings: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Wei, N., Hou, Y., Lu, Z., Yu, H., & Wang, Q. (2018). Synthesis of silver nanoparticles stabilized with C-phycocyanin and for fluorimetric detection of copper ions. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 108(2), 022030. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/108/2/022030>
- Werfel, S. J., Cooke, S. K., & Sampson, H. A. (1997). Clinical reactivity to beef in children allergic to cow's milk. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 99(3), 293–300. [https://doi.org/10.1016/S0091-6749\(97\)70045-9](https://doi.org/10.1016/S0091-6749(97)70045-9)
- Westheimer, F. H., & Schmidt, D. E. (1971). pK of the Lysine Amino Group at the Active Site of Acetoacetate Decarboxylase. *Biochemistry*, 10(7), 1249–1253. <https://doi.org/10.1021/bi00783a023>
- Wijayanti, H. B., Bansal, N., Sharma, R., & Deeth, H. C. (2014). Effect of sulphhydryl reagents on the heat stability of whey protein isolate. *Food Chemistry*, 163, 129–135. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.04.094>

- Wijayanti, H. B., Oh, H. E., Sharma, R., & Deeth, H. C. (2013). Reduction of aggregation of β -lactoglobulin during heating by dihydrolipoic acid. *Journal of Dairy Research*, 80(4), 383–389. <https://doi.org/10.1017/S0022029913000332>
- Wilde, S. C., Keppler, J. K., Palani, K., & Schwarz, K. (2016a). β -Lactoglobulin as nanotransporter – Part I: Binding of organosulfur compounds. *Food Chemistry*, 197, 1015–1021. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.010>
- Wilde, S. C., Keppler, J. K., Palani, K., & Schwarz, K. (2016b). β -Lactoglobulin as nanotransporter for allicin: Sensory properties and applicability in food. *Food Chemistry*, 199, 667–674. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.12.055>
- Wilde, S. C., Treitz, C., Keppler, J. K., Koudelka, T., Palani, K., Tholey, A., Rawel, H. M., & Schwarz, K. (2016c). β -Lactoglobulin as nanotransporter - Part II: Characterization of the covalent protein modification by allicin and diallyl disulfide. *Food Chemistry*, 197, 1022–1029. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.011>
- Wilting, J., van der Giesen, W. F., Janssen, L. H. M., Weideman, M. M., Otagiri, M., & Perrin, J. H. (1980). The Effect of Albumin Conformation on the Binding of Warfarin to Human Serum Albumin. *Journal of Biological Chemistry*, 255(7), 3032–3037. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)85847-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)85847-7)
- Wofsy, L., & Singer, S. J. (1963). Effects of the Amidination Reaction on Antibody Activity and on the Physical Properties of Some Proteins. *Biochemistry*, 2(1), 104–116. <https://doi.org/10.1021/bi00901a019>
- Wu, Q., Liu, L., Miron, A., Klímová, B., Wan, D., & Kuča, K. (2016). The antioxidant, immunomodulatory, and anti-inflammatory activities of Spirulina: an overview. *Archives of Toxicology*, 90(8), 1817–1840. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1744-5>
- Wu, T., Liu, C., & Hu, X. (2022). Enzymatic synthesis, characterization and properties of the protein-polysaccharide conjugate: A review. *Food Chemistry*, 372, 131332. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131332>
- Wu, X., Lu, Y., Xu, H., Lin, D., He, Z., Wu, H., Liu, L., & Wang, Z. (2018). Reducing the allergenic capacity of β -lactoglobulin by covalent conjugation with dietary polyphenols. *Food Chemistry*, 256, 427–434. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.02.158>
- Wu, Y., Cheng, H., Chen, Y., Chen, L., Fang, Z., & Liang, L. (2017). Formation of a Multiligand Complex of Bovine Serum Albumin with Retinol, Resveratrol, and (–)-Epigallocatechin-3-gallate for the Protection of Bioactive Components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(14), 3019–3030. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b00326>
- Wypych, J., Li, M., Guo, A., Zhang, Z., Martinez, T., Allen, M. J., Fodor, S., Kelner, D. N., Flynn, G. C., Liu, Y. D., Bondarenko, P. V., Ricci, M. S., Dillon, T. M., & Balland, A. (2008). Human IgG2 Antibodies Display Disulfide-mediated Structural Isoforms. *Journal of Biological Chemistry*, 283(23), 16194–16205. <https://doi.org/10.1074/jbc.M709987200>
- Xia, T., Jiang, X., Deng, L., Yang, M., & Chen, X. (2021). Albumin-based dynamic double cross-linked hydrogel with self-healing property for antimicrobial application. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 208, 112042. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.112042>

- Xu, H., Zhang, T., Lu, Y., Lin, X., Hu, X., Liu, L., He, Z., & Wu, X. (2019a). Effect of chlorogenic acid covalent conjugation on the allergenicity, digestibility and functional properties of whey protein. *Food Chemistry*, 298(April), 125024. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125024>
- Xu, Y., Hou, Y., Wang, Y., Wang, Y., Li, T., Song, C., Wei, N., & Wang, Q. (2019b). Sensitive and selective detection of Cu²⁺ ions based on fluorescent Ag nanoparticles synthesized by R-phycoerythrin from marine algae *Porphyra yezoensis*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 168, 356–362. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.10.102>
- Yadav, R., Kumar, D., Kumari, A., & Yadav, S. K. (2014). Encapsulation of catechin and epicatechin on BSA NPS improved their stability and antioxidant potential. *EXCLI Journal*, 13, 331–346. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26417264>
- Yagi, M., Sakurai, K., Kalidas, C., Batt, C. A., & Goto, Y. (2003). Reversible Unfolding of Bovine β -Lactoglobulin Mutants without a Free Thiol Group. *Journal of Biological Chemistry*, 278(47), 47009–47015. <https://doi.org/10.1074/jbc.M308592200>
- Yamasaki, R., Hoshino, M., Wazawa, T., Ishii, Y., Yanagida, T., Kawata, Y., Higurashi, T., Sakai, K., Nagai, J., & Goto, Y. (1999). Single molecular observation of the interaction of GroEL with substrate proteins. *Journal of Molecular Biology*, 292(5), 965–972. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.3129>
- Yi, J., Zhang, Y., Liang, R., Zhong, F., & Ma, J. (2015). Beta-Carotene Chemical Stability in Nanoemulsions Was Improved by Stabilized with Beta-Lactoglobulin–Catechin Conjugates through Free Radical Method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(1), 297–303. <https://doi.org/10.1021/jf5056024>
- Yoo, E. M., Wims, L. A., Chan, L. A., & Morrison, S. L. (2003). Human IgG2 Can Form Covalent Dimers. *Journal of Immunology*, 170(6), 3134–3138. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.6.3134>
- Yoshitake, S., Imagawa, M., Ishikawa, E., Niitsu, Y., Urushizaki, I., Nishiura, M., Kanazawa, R., Kurosaki, H., Tashibana, S., Nakazawa, N., & Ogawa, H. (1982). Mild and Efficient Conjugation of Rabbit Fab' and Horseradish Peroxidase Using a Maleimide Compound and Its Use for Enzyme Immunoassay. *Journal of Biochemistry*, 92(5), 1413–1424. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a134065>
- Yu, H.-W., Halonen, M. J., & Pepper, I. L. (2015). Immunological Methods. In I. L. Pepper, C. P. Gerba, & T. J. Gentry (Eds.), *Environmental Microbiology* (Third Edition). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394626-3.00012-0>
- Zeeb, B., Fischer, L., & Weiss, J. (2014). Stabilization of food dispersions by enzymes. *Food & Function*, 5(2), 198–213. <https://doi.org/10.1039/c3fo60499c>
- Zenker, H. E., Teodorowicz, M., Ewaz, A., van Neerven, R. J. J., Savelkoul, H. F. J., De Jong, N. W., Wichers, H. J., & Hettinga, K. A. (2020). Binding of CML-Modified as Well as Heat-Glycated β -lactoglobulin to Receptors for AGEs Is Determined by Charge and Hydrophobicity. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(12), 4567. <https://doi.org/10.3390/ijms21124567>
- Zhang, H., Tan, C., Shi, X., & Xu, J. (2022). Impacts of autofluorescence on fluorescence based techniques to study microglia. *BMC Neuroscience*, 23(1), 21. <https://doi.org/10.1186/s12868->

- Zhang, S., Asghar, S., Yu, F., Chen, Z., Hu, Z., Ping, Q., Shao, F., & Xiao, Y. (2019). BSA Nanoparticles Modified with N -Acetylcysteine for Improving the Stability and Mucoadhesion of Curcumin in the Gastrointestinal Tract. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(33), 9371–9381. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b02272>
- Zhang, W., & Czupryn, M. J. (2002). Free Sulfhydryl in Recombinant Monoclonal Antibodies. *Biotechnology Progress*, 18(3), 509–513. <https://doi.org/10.1021/bp025511z>
- Zhang, X., Li, S., Shao, X., Li, M., & Hemar, Y. (2021). Probing the conjugation of epigallocatechin gallate with β -lactoglobulin and its in vivo desensitization efficiency. *Food & Function*, 12(22), 11343–11350. <https://doi.org/10.1039/D1FO02293H>
- Zhang, Y.-M., & Chen, F. (1999). A simple method for efficient separation and purification of c-phycocyanin and allophycocyanin from *Spirulina platensis*. *Biotechnology Techniques*, 13(9), 601–603. <https://doi.org/10.1023/A:1008914405302>
- Zhao, K., Wu, D., Zhang, L., Zhou, M., Böhm, S., Bubenzer, C., & Scheer, H. (2006). Chromophore attachment in phycocyanin. *The FEBS Journal*, 273(6), 1262–1274. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2006.05149.x>
- Zhao, Y., Zhang, J., Wang, X., Chen, B., Xiao, Z., Shi, C., Wei, Z., Hou, X., Wang, Q., & Dai, J. (2010). The osteogenic effect of bone morphogenetic protein-2 on the collagen scaffold conjugated with antibodies. *Journal of Controlled Release*, 141(1), 30–37. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.06.032>
- Zheng, L., Zhao, Y., Dong, H., Su, G., & Zhao, M. (2016). Structure–activity relationship of antioxidant dipeptides: Dominant role of Tyr, Trp, Cys and Met residues. *Journal of Functional Foods*, 21, 485–496. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.12.003>
- Zhong, J., Tu, Y., Liu, W., Luo, S., & Liu, C. (2015). Comparative study on the effects of nystose and fructofuranosyl nystose in the glycation reaction on the antigenicity and conformation of β -lactoglobulin. *Food Chemistry*, 188, 658–663. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.05.015>
- Zhong, J. Z., Xu, Y. J., Liu, W., Liu, C. M., Luo, S. J., & Tu, Z. C. (2013). Antigenicity and functional properties of β -lactoglobulin conjugated with fructo-oligosaccharides in relation to conformational changes. *Journal of Dairy Science*, 96(5), 2808–2815. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-6259>
- Zhong, Q., Xiao, X., Qiu, Y., Xu, Z., Chen, C., Chong, B., Zhao, X., Hai, S., Li, S., An, Z., & Dai, L. (2023). Protein posttranslational modifications in health and diseases: Functions, regulatory mechanisms, and therapeutic implications. *MedComm*, 4(3), 1–112. <https://doi.org/10.1002/mco2.261>
- Zhou, L., Lu, N., Pi, X., Jin, Z., & Tian, R. (2022). Bovine Serum Albumin as a Potential Carrier for the Protection of Bioactive Quercetin and Inhibition of Cu(II) Toxicity. *Chemical Research in Toxicology*, 35(3), 529–537. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.2c00001>
- Zhu, Z. C., Chen, Y., Ackerman, M. S., Wang, B., Wu, W., Li, B., Obenauer-Kutner, L., Zhao, R., Tao, L., Ihnat, P. M., Liu, J., Gandhi, R. B., & Qiu, B. (2013). Investigation of monoclonal

antibody fragmentation artifacts in non-reducing SDS-PAGE. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 83, 89–95. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2013.04.030>

Zúñiga, R. N., Tolkach, A., Kulozik, U., & Aguilera, J. M. (2010). Kinetics of Formation and Physicochemical Characterization of Thermally-Induced β -Lactoglobulin Aggregates. *Journal of Food Science*, 75(5). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01617.x>

Biografija

Mirjana (Živorad) Radomirović je rođena 8.11.1990. godine u Kragujevcu. Osnovnu školu i gimnaziju je završila u Rači. Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu, smer Diplomirani biohemičar, završila je 2016. godine. Master studije na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, na smeru Biohemija, završila je 2017. godine. Iste godine upisuje doktorske akademske studije na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, na smeru Biohemija.

Od oktobra 2016. godine zaposlena je na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu kao stručni saradnik, od 2018. godine kao istraživač-pripravnik, a od 2021. godine kao istraživač-saradnik. Kao istraživač učestovala je na više nacionalnih i međunarodnih projekata. Tokom doktorskih studija kontinuirano je bila angažovana kao saradnik u nastavi na više predmeta na osnovnim i master akademskim studijama.

Usavršavala se na prestižnim institucijama u inostranstvu. Dobitnica je više stipendija Federacije evropskih biohemijskih društava za učešća na godišnjim FEBS konferencijama, kao i stipendije za učešće na Forumu mladih naučnika 2022. godine.

Mirjana Radomirović je u dosadašnjoj karijeri objavila 17 radova u međunarodnim časopisima. Koautor je jednog prijavljenog nacionalnog patenta i jednog odobrenog tehničkog rešenja. Član je Srpskog hemijskog društva i sekretar Sekcije za molekularne nauke o hrani ovog društva od 2024. godine, član Biohemijskog društva Srbije, Evropske akademije za alergologiju i kliničku imunologiju, kao i Srpskog udruženja za proteomiku.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора **Мирјана Ж. Радомировић**

Број индекса **ДБ03/2017**

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

**Ковалентне модификације глобуларних протеина фикоцијанобилином и
карактеризација добијених конјугата**

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

Потпис аутора

У Београду, 24.1.2025.

Мирјана Радомировић

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора **Мирјана Ж. Радомировић**
Број индекса **ДБ03/2017**
Студијски програм **Биохемија**
Наслов рада **Ковалентне модификације глобуларних протеина
фиикоцијанобилином и карактеризација добијених конјугата**

Ментор **Проф. др Тања Ћирковић Величковић**

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

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

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

Потпис аутора

У Београду, 24.1.2025.

Мирјана Радомировић

Изјава о коришћењу

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

Ковалентне модификације глобуларних протеина фикоцијанобилином и карактеризација добијених конјугата

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство (CC BY)

☒ 2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)

3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)

5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)

6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.

Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

у Београду, 24.1.2025.

Мирјана Радомирчић

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.