

Kalorimetrijsko određivanje utjecaja sinergijskog aniona i sijalinizacije na termodinamiku vezanja željeza na ljudski serumski transferin

Borko, Valentina

Doctoral thesis / Doktorski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:153534>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-18**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu

Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Valentina Borko

**KALORIMETRIJSKO ODREĐIVANJE
UTJECAJA SINERGIJSKOG ANIONA I
SIJALINIZACIJE NA TERMODINAMIKU
VEZANJA ŽELJEZA NA LJUDSKI
SERUMSKI TRANSFERIN**

DOKTORSKI RAD

Mentor:
izv. prof. dr. sc. Tin Weitner

Zagreb, 2024.



University of Zagreb

Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Valentina Borko

**CALORIMETRIC STUDY OF THE
EFFECT OF SYNERGISTIC ANION AND
SIALYLATION ON THE
THERMODYNAMICS OF THE IRON
BINDING TO HUMAN SERUM
TRANSFERRIN**

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisor:
Professor Tin Weitner, PhD

Zagreb, 2024

Informacije o mentoru

Doktorski rad je predan na ocjenu Fakultetskom vijeću Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja akademskog stupnja doktora znanosti iz područja biomedicine i zdravstva, polje farmacija, grana farmacija.

Rad je izrađen pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Tina Weitnera, na Zavodu za opću i anorgansku kemiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu u sklopu doktorskog studija „Farmaceutsko-biokemijske znanosti“ Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Rad je financiran iz projekta Hrvatske zaklade za znanost naziva „Glikozilacija serumskog transferina kao faktor u mehanizmu prijenosa željeza“ (HRZZ-UIP-2017-05-9537).

Zahvale

Veliko hvala mome mentoru, izv. prof. dr. sc. Tinu Weitneru, koji mi je prvenstveno pružio priliku izrade doktorskog rada, a onda me i vodio me kroz cijelo istraživanje, uvelike pomagao u snalaženju u svim novim i nepredvidivim situacijama. Hvala za strpljivost, svo izdvojeno (često i slobodno) vrijeme i za cjelokupno mentorstvo. Kao što bi Vi rekli: “Nešto smo naučili!”.

Isto tako veliko hvala i drugome članu grupe “transferinaca”, kolegi Tomislavu Friganoviću, na svim provedenim desijalinizacijama, karakterizacijama glikoformi te raspravama koje su rezultirale ovim radom. Dodajem tu i ostale „moje“ dečke, kolege Tina Šebu i Roberta Kerepa, koji su svi skupa činili nezaboravnu ekipu. Hvala za sva druženja i glupiranja, uvelike ste mi uljepšali boravak na FBF-u.

Hvala i ostatku ekipe sa ZOAK-a, izv. prof. dr. sc. Ani Budimir i prof. dr. sc. Mariju Gabričeviću, koji su zaslužni za opuštenu, ali radnu atmosferu na Zavodu. Hvala tehničkoj suradnici Grozdani Harapin na svim lijepim riječima.

Hvala kolegama sa Zavoda za molekularnu biologiju koji su nam bili podrška za glikansku karakterizaciju transferina.

Hvala i ostalim kolegama s FBF-a koje sam imala priliku upoznati te s njima raditi i družiti se. Posebno hvala najboljoj asistentskoj ekipi koja bi uvijek znala sve informacije, pogotovo gdje se ide petkom nakon posla.

Hvala na podršci svim mojim prijateljima i dragim ljudima.

Hvala mome Stipi koji mi je od početka podrška na ovom putu, kao i svima koji slijede. Hvala ti što si uvijek tu. Hvala mojoj obitelji, mami, tati i bratu koji su mi veliki oslonac i pomoć tijekom cijelog mog obrazovanja, rada, kao i života.

Sažetak

Ljudski serumski transferin glavni je prenosioč željeza u organizmu. Željezo vezano na transferin doprema se iz probavnog sustava do stanica kojima je ono potrebno i otpušta s transferina promjenom pH. Transferin ima dva mjesta za vezanje željeza u kojem sudjeluje i sinergijski anion. Kod zdravih pojedinaca najčešća glikoforma transferina je glikoforma s dva biantenarna oligosaharidna lanca s ukupno četiri sijalinske kiseline, a sinergijski anion je karbonat. U *in vitro* uvjetima pokazano je kako drugi strukturno slični karboksilni ioni poput oksalata mogu biti sinergijski anioni. Desijalinizacija transferina primijećena je kod pacijenata s dijagnozom kroničnog alkoholizma, ali i raznih upalnih bolesti te sepse, dok su povećane serumske koncentracije oksalata često rezultat hiperoksalurije ili gastrointestinalnih bolesti. Cilj ovog doktorskog rada bio je odrediti termodinamičke parametre vezanja željeza u formi FeNTA na transferin s različitim indeksom sijalinizacije, u prisutnosti karbonata i oksalata kao sinergijskih aniona. U mjerenjima sa sijaliniziranim transferinom korišten je komercijalno dostupan nativni serumski transferin, dok je desijalinizirani transferin pripremljen djelovanjem enzima neuraminidaze u *in vitro* uvjetima. Nakon što je desijalinizacija proteina potvrđena i udio sijalinskih kiselina je smanjen za oko 99%, termodinamički parametri određeni su korištenjem izotermne titracijske kalorimetrije. Potvrđeno je kako se dva vezna mjesta razlikuju kinetički i termodinamički te je otkriveno kako desijalinizacija utječe na termodinamičke parametre vezanja željeza u formi FeNTA na transferin tako da efektivne entalpije vezanja postaju egzotermije, a u prisutnosti karbonata pri koncentracijama koje odgovaraj onima u serumu, konstanta vezanja se povećava. Navedeno ide u prilog mogućoj povezanosti desijalinizacije i sekvestracijskog odgovora organizma na infekcije patogenom. Osim desijalinizacije, i oksalat kao sinergijski anion u *in vitro* uvjetima povećava konstantu vezanja željeza na transferin, a vezanje je egzergonije. Uz jače vezanje oksalata na transferin, navedeno daje osnovu za mogući nastanak ternarnog kompleksa Fe-oksalat-Tf u *in vivo* uvjetima, pogotovo u stanjima s povećanim koncentracijama oksalata.

Ključne riječi: ljudski serumski transferin, sijalinska kiselina, sinergijski anion, glikoproteomika, izotermna titracijska kalorimetrija, termodinamika

Summary

Introduction

Human serum transferrin is the major iron transport protein in human organisms. Iron bound to transferrin is transported from the digestive system to cells that require iron. A change in the pH causes the release of iron from transferrin. Transferrin has two iron binding sites that require the presence of the synergistic anion located on the C- and N-lobe of the protein. It is a highly glycosylated protein with two potential sites for N-glycans located on Asn-413 and Asn-611 residues of the C-lobe. Different combinations of the two N-glycans result in a range of asialo to hexasialo variants of human serum transferrin. The most common glycoform of transferrin in healthy humans consists of two biantennary oligosaccharide chains that together contain four sialic acids. Many pathological conditions are correlated with the glycan composition of glycoproteins. Diseases such as chronic alcoholic disease, inflammatory diseases and sepsis can increase the amount of desialylated transferrin isoforms. Also, the sequestration of the free iron is an antimicrobial response of the organism, and human serum transferrin has the main role in sequestration of the iron in serum. There is an assumption for a linkage between the sialylation and iron sequestration in pathological conditions. Sialic acids are negatively charged at physiological pH and may affect protein conformation and oligomerization, as well as protein interactions with other proteins and the extracellular matrix.

The usual synergistic anion in serum is carbonate, but other structurally similar carboxylic ions such as oxalate have shown to act as synergistic anions *in vitro*. Diseases such as hyperoxaluria or gastrointestinal diseases can lead to higher serum oxalate levels. In recent decades, isothermal titration calorimetry (ITC) has emerged as the most direct method for measuring the heat change in complexation reactions at constant temperature. ITC is applicable to many biological systems, and calorimetric studies have been performed on the binding of iron in the form of an iron nitrilotriacetic acid complex (FeNTA) to transferrin. It is shown that the two sites are thermodynamically and kinetically distinct and exhibit domain interactions. The objective of this study was to determine possible differences in the thermodynamics of iron binding to native sialylated transferrin (Tf+s) and enzymatically desialylated transferrin (Tf-s) both in the presence of carbonate and oxalate as synergistic anions using ITC.

Materials and methods

Sialylated human serum apotransferrin used in this study was commercially available, and desialylated apotransferrin (Tf-s) was prepared by incubating the buffered solution of native human serum apotransferrin in SialEXO® columns containing immobilized sialidase enzyme at room temperature. To verify the results of enzymatic desialylation, the native and desialylated hTf samples were analyzed using chromatofocusing. The separation of transferrin sialoforms was performed using pH gradient ion exchange chromatography buffers. After separation, the pH of each fraction containing the eluted protein was measured, corresponding to the approximate isoelectric point (pI) of the protein. To fully describe the glycan composition of the samples, the Tf+s and Tf-s samples were analyzed by UHPLC. N-glycans were assigned based on known retention times and results of the previous UHPLC-ESI-qTOF-MS analysis. Finally, the content of individual glycans was determined.

Once the desialylation was confirmed and resulted with satisfactory amount of reduced sialic acid content, working solutions for the ITC experiments were prepared independently for each ITC titration. Each test experiment required 0.2 mM apoTf and 4 mM FeNTA working solutions, while control experiments also required a working buffer solution. The buffer used in the titrations was either 0.1 M HEPES, pH 7.4, with 25 mM NaHCO₃ or 0.1 M HEPES, pH 7.4, with 25 mM K₂C₂O₄. ITC titrations of Tf+s and Tf-s with FeNTA in the presence of carbonate or oxalate were performed on the PEAQ-ITC MicroCal calorimeter. Titrations were performed at 25 °C in 30 injections with an added volume of 0.9 µL per injection. The interval between injections was 300 s. Titrations for all four combinations with two different transferrin sialoforms (Tf+s and Tf-s) and two synergistic anions were repeated three or more times. Only the control experiment with FeNTA added to the cell containing buffer without the protein resulted in a significant heat change. The injection peaks in all titrations and their control experiments were integrated and the *point-to-point* method was used to subtract the control experiments from the test experiments.

Data were analyzed using a model for two non-identical binding sites available in MicroCal PEAQ-ITC Analysis Software (version 1.30) and by refining a total of 7 parameters. The statistical significance of the differences was evaluated using two-way and one-way ANOVA. To account for the possible effects of the observed heterogeneous variances, an additional analysis was performed based on the more robust Welch-James statistic with approximate degrees of freedom.

Results

The most abundant glycoforms in Tf+s were biantennary sialylated glycoforms, which accounted for more than 70% of the total glycans. Conversely, Tf-s contained more than 90% biantennary glycoforms without sialic acid. The sialylation index values for Tf+s and Tf-s confirmed the 99% reduction in sialic acid content for the enzymatically desialylated protein. The results of pH chromatofocusing also confirmed successful desialylation, resulting in the expected difference in pI values of Tf+s (pI \approx 5.4) and Tf-s (pI \approx 6.8).

Calorimetric titrations of different transferrin sialoforms and different synergistic anions yielded peak profiles similar to those previously reported. It has been shown that there are 2 phases in the binding of FeNTA to transferrin: (i) a fast phase called contact binding caused by the weak and reversible binding of FeNTA to the binding site, and (ii) a slow phase due to the incorporation of the synergistic anion into the binding site and the replacement of NTA. The first series of injections corresponds to the saturation of the C-site of transferrin and shows a fast exothermic process followed by a slow exothermic process, while the second series of injections corresponds to the saturation of the N-site and shows a fast exothermic process followed by a slow endothermic process. The binding enthalpies in this study refer to the apparent binding enthalpies because the experiments were performed in one buffer only and the ionization enthalpy of the buffer was not subtracted from the apparent binding enthalpies. Therefore, the calculated thermodynamic parameters reflect not only the binding of the iron(III) ion to apoTf, but the overall process: the contact binding of FeNTA to apoTf, the removal of NTA from the FeNTA complex and its protonation, the binding of the synergistic anion, and the exchange of protons with the buffer.

Desialylation resulted in more exothermic binding of iron(III) to both sites, regardless of the synergistic anion. The binding entropies indicate more positive values for the N-lobe, regardless of sialylation or synergistic anion. Desialylation apparently has no effect on the binding entropy, but the effect of the synergistic anion is twofold: in the presence of oxalate, more positive values were observed for the C-site, while the same difference is much less pronounced for the N-site. Desialylation was found to increase the binding of the first iron(III) ion by about 10-fold in the presence of carbonate, while the effect on the binding of the second iron(III) ion was about 20-fold. Conversely, desialylation had virtually no effect on the overall saturation of transferrin in the presence of oxalate. Binding to the C-site is driven primarily by the enthalpy contribution ($\Delta_r H^\circ$), whereas binding to the N-site is driven primarily by the entropy contribution ($-T\Delta_r S^\circ$). The analysis of heat change rates using the proposed parameter

weighted width (l_x) confirmed a stronger prebinding of oxalate to the C-site of hTf compared to carbonate. This translates into the faster contact binding on the C-site in the presence of oxalate. Conversely, the reaction for the N-site was faster in the presence of carbonate for both Tf+s and Tf-s, which could explain the observed preferential loading of the transferrin N-site *in vivo*, despite the higher iron-binding affinity of the C-site.

Conclusion

Native or desialylated human serum transferrin binds iron(III) in the form of FeNTA in a consecutive manner with the C-site being saturated first and both carbonate and oxalate acting as synergistic anions. Lower sialylation index of transferrin (i.e., a lower sialic acid content) leads to more exothermic apparent binding enthalpies for both lobes, regardless of the synergistic anion. Furthermore, in the presence of carbonate at concentrations corresponding to those in human serum, desialylation increases the binding constant. These findings are in support of the possible connection between desialylation and sequestration as an organism's response to pathogen infections. In addition to desialylation, oxalate as a synergistic anion in *in vitro* conditions also increases the binding constant of iron to transferrin, and the binding becomes more exergonic. Together with the stronger prebinding constants of oxalate to human serum transferrin, the above provides the basis for the possible formation of the Fe-oxalate-Tf ternary complex in *in vivo* conditions, especially in conditions with increased concentration of oxalate.

Keywords

human serum transferrin, sialic acid, synergistic anion, glycoproteomics, isothermal titration calorimetry, thermodynamics

Sadržaj

§ 1. UVOD.....	1
1.1. Željezo u ljudskom organizmu.....	1
1.2. Ljudski serumski transferin.....	3
1.2.1. <i>Ciklus transferina.....</i>	<i>4</i>
1.2.2. <i>Struktura transferina.....</i>	<i>5</i>
1.2.3. <i>Vežanje željeza na transferin</i>	<i>6</i>
1.2.4. <i>Vežanje sinergijskih aniona na transferin.....</i>	<i>9</i>
1.2.5. <i>Vežanje nesinergijskih aniona na transferin.....</i>	<i>11</i>
1.2.6. <i>Sekvestracija željeza prilikom infekcija</i>	<i>11</i>
1.3. Oksalat u ljudskom organizmu.....	12
1.4. Glikozilacija proteina	13
1.4.1. <i>Struktura i funkcija glikana.....</i>	<i>14</i>
1.4.2. <i>Glikozilacija transferina</i>	<i>15</i>
1.5. Kalorimetrija vežanja metala na proteine.....	17
1.5.1. <i>Kalorimetrijska mjerenja s transferinom.....</i>	<i>19</i>
§ 2. OBRAZLOŽENJE TEME.....	21
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO	23
3.1. Materijali	23
3.1.1. <i>Reagensi.....</i>	<i>23</i>
3.1.2. <i>Ostali materijali.....</i>	<i>24</i>
3.2. Instrumentacija	24
3.3. Metode.....	25
3.3.1. <i>Enzimski desijalinizacija.....</i>	<i>25</i>
3.3.2. <i>Kromatofokusiranje</i>	<i>25</i>
3.3.3. <i>Analiza N-glikana</i>	<i>26</i>
3.3.4. <i>Priprema i standardizacija radnih otopina.....</i>	<i>27</i>
3.3.5. <i>Spektrofotometrijsko određivanje konačne koncentracije FeNTA u radnim otopinama</i>	<i>29</i>
3.3.6. <i>Izotermna titracijska kalorimetrija</i>	<i>30</i>
3.4. Analiza termodinamičkih podataka	31
3.4.1. <i>Obrada termograma i utočnjavanje termodinamičkih parametara (N, $\Delta_r H^\circ$, K_d).....</i>	<i>31</i>
3.4.2. <i>Izračun termodinamičkih parametara ($\Delta_r S^\circ$ i $\Delta_r G^\circ$) i propagacija pogreške.....</i>	<i>31</i>
3.5. Izračun konstanti u sustavu transferina i željezova(III) nitrilotriacetata	33
3.5.1. <i>Ravnoteža u otopini željezova(III) nitrilotriacetata.....</i>	<i>33</i>
3.5.2. <i>Efektivne konstante vežanja i propagacija pogreške</i>	<i>35</i>

3.5.3. Makroskopske konstante vezanja, frakcijska zasićenost i propagacija pogreške	37
3.6. Procjena reakcijskih brzina i morfologije signala	41
3.7. Statistička analiza	42
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA	44
4.1. Rezultati enzimske desijalinizacije	44
4.2. Rezultati termodinamike vezanja FeNTA na ljudski serumski transferin.....	48
4.2.1. Termodinamički parametri	48
4.2.2. Ravnotežne konstante	57
4.3. Parametri I_x i FWHM	62
4.4. Ograničenja i interpretacija rezultata	67
4.4.1. Efektivne entalpije vezanja.....	67
4.4.2. Ravnotežne konstante i ostali izvedeni termodinamički parametri	68
4.4.3. Efekt desijalinizacije	69
4.4.4. Efekt sinergijskog aniona.....	72
§ 5. ZAKLJUČAK	73
§ 6. POPIS LITERATURE	75
§ 7. PRILOZI.....	86
§ 8. POPIS KRATICA.....	112
§ 9. ŽIVOTOPIS	113

§ 1. UVOD

1.1. Željezo u ljudskom organizmu

Željezo je jedno od esencijalnih elemenata u većini živih organizama (1). Najvažnije otkriće za značaj željeza u ljudskom organizmu bilo je da je ono sastavni dio hemoglobina (2) čime je željezo direktno uključeno u unos kisika u organizam, odnosno disanje. Danas je poznato kako je željezo važan kofaktor za mnoge enzime uključene u metabolizam DNA poput helikaza, nukleaza, ribonukleotid reduktaza i mnogih drugih (3). Vrlo važno svojstvo željeza je da u ljudskom organizmu postoji u dva oksidacijska stanja: kao feri (Fe^{3+}) ili fero (Fe^{2+}) zbog čega je uključeno u mnoge oksidacijsko-redukcijske procese (2).

Gotovo dvije trećine ukupnog željeza u ljudskom organizmu nalazi se u hemoglobinu, oko četvrtina je vezana na proteine koji omogućuju pohranu viška željeza, dok je ostatak željeza sastavni dio mišića, odnosno mioglobina, ili raznih enzima koji omogućuju izmjenu kisika i druge funkcije stanice (4, 5). Proteini koji vežu željezo mogu se podijeliti u četiri skupine: proteini koji sadrže hem (hemoglobin, mioglobin, citokromi), željezo-sumpor enzimi (flavoproteini, hem-flavoproteini), proteini za prijenos i sklapanje željeza (transferin, laktoferin, feritin, hemosiderin) i drugi enzimi koji sadrže željezo. U željezo-sumpor enzimima željezo je vezano na sumpor, dok je u proteinima koji sadrže hem vezano na porfirinski prsten (4).

Ljudsko tijelo sadrži između 3-5 g željeza, a gubi oko 1-2 mg željeza dnevno kroz znojenje, uriniranje te odbacivanje epiderme ili epitela. Količinu izgubljenog željeza organizam mora nadoknaditi apsorpcijom iz hrane. Potrebe za unosom željeza veće su kod organizama u razvoju koji imaju veću potrebu za željezom, primjerice kod dojenčadi i adolescenata, te kod žena tijekom trudnoće i u reproduktivnoj dobi (2, 5).

Željezo u ljudski organizam ulazi apsorpcijom iz hrane i to prvenstveno preko dvanaesnika i tankog crijeva (5). Ukoliko se željezo nalazi u Fe^{3+} formi potrebno ga je reducirati kako bi moglo proći apikalnu i bazolateralnu membranu enterocita. Redukcija i prelazak membrana događa se uz pomoć nekoliko enzima poput feroreduktaze i ferroportina. Naposljetku se željezo uz pomoć ferooksidaze ponovno oksidira do Fe^{3+} kako bi se vezalo na transportni protein, ljudski serumski transferin, koji željezo cirkulacijom prenosi do stanica u potrebi za željezom (6).

Udio apsorbiranog željeza od unesenog je oko 5% do 35%, ovisno o formi u kojoj se željezo nalazi. Razlikujemo dvije vrste željeza kojeg unosimo prehranom: hemsko i nehemsko. Hemsko željezo potječe većinom iz hrane životinjskog podrijetla: meso, perad, riba, dok se nehemsko željezo nalazi u žitaricama, mahunarkama, voću i povrću (7). Hemsko željezo ima veću bioraspoloživost (8), ali na samu apsorpciju željeza mogu utjecati i druge tvari koji mogu smanjiti ili povećati apsorpciju željeza. Poznati inhibitori apsorpcije željeza su ftalati, polifenoli ili kalcij, dok askorbinska kiselina i hrana koja sadrži mišićno tkivo povećavaju apsorpciju željeza (7). Tvari koje potiču apsorpciju željeza potpomažu redukciju željeza i prolazak apikalne membrane enterocita (2).

Budući da je jedini način unosa željeza prehranom, ukoliko se ne unosi dovoljno hrane koja sadrži željezo, ili ukoliko je smanjena apsorpcija željeza, organizam može doći u stanje anemije. Na smanjenu apsorpciju željeza mogu utjecati bolesti gastrointestinalnog sustava poput upalnih bolesti crijeva, skraćeno crijevo nakon operativnog zahvata ili povećani pH želuca, kao i terapija antacidima. Isto tako, drugi metali poput bakara, kadmija ili olova mogu se u kompeticiji vezati jače od željeza. Razna krvarenja mogu dovesti do stanja anemije. Glavni simptomi anemije su bljedilo, slabost i gubitak energije (9, 10).

Najpoznatija nasljedna bolest prevelike apsorpcije željeza je hemokromatoza kod koje pacijenti prehranom apsorbiraju od dva do tri puta veće količine željeza, nego zdravi ljudi. Višak željeza taloži se u jetri, srcu, gušterači, hipofizi ili paratiroidnim žlijezdama. Većina bolesnika nema simptome do odrasle dobi, a oni uključuju umor, erektilnu disfunkciju ili pojačanu pigmentaciju kože. Ukoliko se ne liječi može dovesti do fibroze ili ciroze jetre, raka jetre, kardiomiopatije, dijabetesa i mnogih drugih oboljenja. Liječi se ponavljanim venepunkcijama kojima se uklanja višak željeza iz organizma (10). Povećana akumulacija željeza u specifičnim dijelovima mozga povezuje se s raznim neurodegenerativnim bolestima poput Parkinsonove ili Alzheimerove bolesti. Razlog tome je promijenjena homeostaza željeza. MRI se koristi kao dijagnostički alat koji može identificirati takve promjene i služiti kao biljeg za neurodegenerativne bolesti (11, 12).

Zbog svojstva Fe^{3+} da je netopljiv pri fiziološkom pH (produkt topljivosti $Fe(OH)_3 \approx 10^{-38} M^4$) razvijen je cijeli sustav vezanja, prijenosa i skladištenja željeza koji je uveliko kontroliran različitim proteinima. Osim zbog netopljivog ferri oblika željeza, homeostaza željeza iznimno je bitna jer višak željeza može katalizirati Fentonovu reakciju u kojoj nastaju štetni hidroksilni radikali (5, 13). Poznato je kako višak željeza u organizmu može dovesti do stvaranja reaktivnih hidroksilnih radikala koji mogu uzrokovati oksidativni stres, imati štetne posljedice za stanicu te konačnici dovesti do propadanja stanice (14). Nedavno je

identificiran oblik stanične smrti koji je popraćen akumulacijom velike količine željeza, a naziva se ferroptaza. Razlikuje se od ostalih poznatih oblika stanične smrti, a uključuje peroksidaciju masnih kiselina u fosfolipidima staničnih membrana i gubitak aktivnosti glutation peroksidaze. Pokazano je kako je ferroptaza blisko povezana s patofiziološkim procesima mnogih bolesti, uključujući tumore, bolesti živčanog sustava, krvna oboljenja, ishemijsko-reperfuzijske ozljede i bolesti bubrega (15). Ferroptaza ima potencijal kao antitumorska terapija za neke agresivne tumore koji su se pokazali najotporniji na terapiju lijekovima (16, 17).

1.2. Ljudski serumski transferin

Transferini su porodica glikoproteina koji su rasprostranjeni u fiziološkim tekućinama i stanicama kralješnjaka. Ono što im je zajedničko je da su nehemski glikoproteini koji na sebe vežu željezo (18). Iz porodice transferina ljudi eksprimiraju tri proteina: laktoferin, melanotransferin i ljudski serumski transferin (Tf), pri čemu laktoferin i ljudski serumski transferin spadaju u topljive proteine, a melanotransferin u membranske proteine. Laktoferin je prisutan u majčinom mlijeku i drugim tjelesnim izlučevinama poput suza, sline ili tekućina u dišnome sustavu. Ima ulogu vezanja željeza te tako sprečava vezanje željeza na mnoge patogene bakterije. Važan je za imunitet (19, 20). Melanotransferin je prvotno pronađen u stanicama melanoma, a osim u koži nalazi se u žlijezdama slinovnicama i bubrezima. Smatra se kako ima važnu ulogu u nastanku i metabolizmu tumora (21). Iz porodice transferina dolazi i važan protein ovotransferin koji je eksprimiran isključivo u pticama (jajima i serumu), a strukturno je vrlo sličan ljudskom serumskom transferinu i laktoferinu. Uloga mu je, slično kao i ostatku proteina iz porodice transferina, da sprečava infekcije koje mogu biti uzrokovane bakterijama, virusima ili gljivicama (22).

Ljudski serumski transferin glavni je prenosioč željeza u krvnoj plazmi, međustaničnim tekućinama, limfi i cerebrospinalnoj tekućini. Uz prijenos željeza, njegova je uloga da sprečava pojedine patogene bakterije u vezanju željeza (23), ali i omogućava da željezo u stanju Fe^{3+} ostane otopljeno u serumu i ne reducira se. Količinom vezanog željeza direktno šalje signale o potrebi ekspresije hepcidina, hormona koji kontrolira apsorpciju željeza u organizmu. Glavno mjesto sinteze Tf su hepatociti. Koncentracija transferina u krvnoj plazmi zdravih pojedinaca je oko 2,5 g/L, iako na količinu transferina u organizmu mogu utjecati tjelesna težina i postojeće zalihe željeza (24). Količine transferina mogu se smanjiti kod akutnih upalnih faza organizma

(25). Svaka molekula transferina može maksimalno vezati dva željeza pri čemu se transferin bez vezanog željeza naziva se apotransferin (apoTf), a transferin s dva vezana željeza naziva se holotransferin (holoTf) (24).

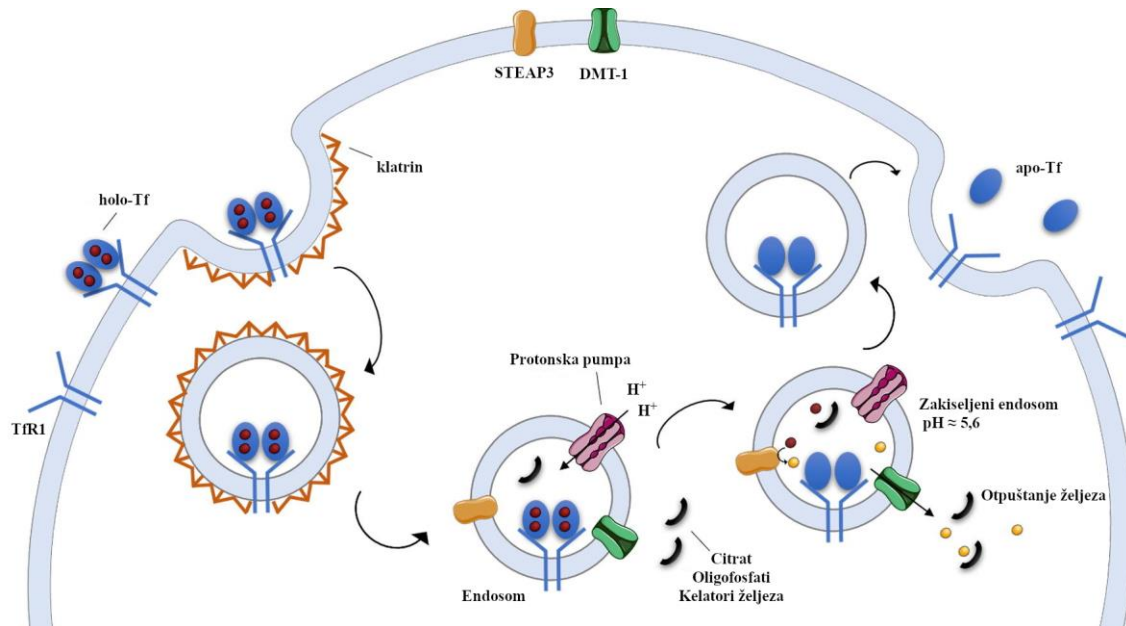
1.2.1. Ciklus transferina

Jednom kad je željezo apsorbirano u dvanaesniku i tankome crijevu, ulazi u sistemsku cirkulaciju i gotovo svo se vrlo snažno veže na ljudski serumski transferin. Transferin služi kao glavni prenosioč željeza od probavnog sustava do stanica u potrebi za željezom.

Stanice eksprimiraju određene količine transferinskog receptora (TfR1) koji na sebe veže dvije molekule holotransferina i tako omogućuju dostavu željeza u stanicu (slika 1.1.). Navedeni kompleks holotransferina i TfR1 u citoplazmu stanice ulazi procesom klatrin posredovane endocitoze. U citoplazmi stanice pH endosoma smanjuje se do pH 5,6 djelovanjem ATP-proton ovisnih pumpi, posljedično nestaje klatrinski omotač te se događa konformacijska promjena koja potiče oslobađanje Fe^{3+} iona iz kompleksa s transferinom. Oslobađanje željeza potpomaže i ferireduktaza (STEAP3) koja reducira Fe^{3+} u Fe^{2+} . Reducirano željezo prenosi se u citosol pomoću bivalentnog metalnog transportera (DMT1), dok se TfR1 zajedno s vezanim apotransferinom vraća na površinu stanice. Molekule apotransferina na površini stanice pri pH 7,4 disociraju s TfR1 i slobodne su u krvotoku za novi ciklus.

U svom životnom ciklusu molekula transferina napravi oko 100 ciklusa prijenosa željeza (24), što je više od 10 ciklusa dnevno (5). Prosječna saturacija transferina željezom u zdravih pojedinaca je oko 30% (26), a prosječno poluvrijeme života od 7-10 dana (27).

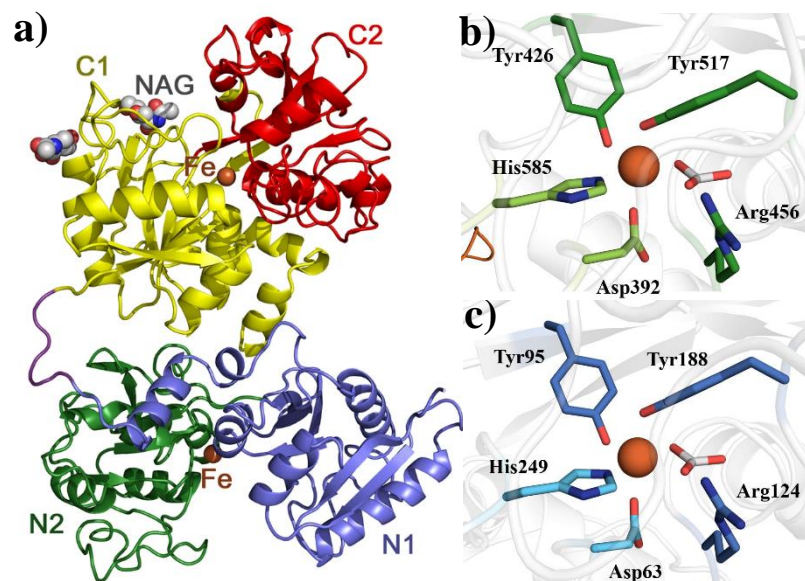
Kod bolesti poput hemokromatoze može se javiti pojačano zasićenje transferina željezom (od 50 do 60%) (11). Budući da pojedine tumorske stanice na površini eksprimiraju previše TfR1, transferin-konjugirani sustavi dostave lijekova koji bi ciljano djelovali na tumorske stanice su potencijal za moguću tumorsku terapiju (24, 28).



Slika 1.1. Isporuka željeza u stanicu pomoću transferina i transferinskog receptora. Preuzeto i prilagođeno iz (24).

1.2.2. Struktura transferina

679 aminokiselina čine ljudski serumski transferin s molekulskom masom od oko 80 kDa. Struktura proteina stabilizirana je sa 19 disulfidnih mostova, dok se s vanjske strane proteina nalaze dva N-vezana ugljikohidratna lanca (Asn-413 i Asn-611). Molekula transferina podijeljena je na dvije evolucijski slične domene od kojih N-domenu čine 336 aminokiseline, a C-domenu 343. Domene su povezane kratkom peptidnom sekvencom. Svaka domena može se podijeliti u dvije poddomene (C1, C2 i N1, N2) između kojih se nalaze vezna mjesta za vezanje metala (slika 1.2.a.). Konfiguracija aminokiselina u oba vezna mjesta je jednaka i sastoji se od dva tirozina, jedne asparaginske kiseline i jednog histidina (29, 30). Na C-domeni to su: Asp-392, Tyr-426, Tyr-517 i His-585, a na N-domeni Asp-63, Tyr-95, Tyr-188 i His-249 (slika 1.2.b. i slika 1.2.c.). Transferin može imati potpunu (holoTf) ili parcijalnu saturaciju, pri čemu željezo može biti vezano samo na C- ili samo na N-kraj transferina (FecTf ili Fe_NTf) (24).



Slika 1.2.a. Struktura ljudskog serumskog transferina. C1 i C2 označavaju poddomene C-domene, a N1 i N2 označavaju poddomene N-domene transferina. Između poddomena nalazi se vezno mjesto za željezo. N-glikani vezani su na C-domenu proteina. **b.** Prikaz željeza u veznom mjestu transferina na C-domenu. **c.** Prikaz željeza u veznom mjestu transferina na N-domenu. Preuzeto i prilagođeno iz (24, 31).

1.2.3. Vezanje željeza na transferin

Metal u veznome mjestu transferina koordiniraju donorski atomi sa aminokiselinskih ostataka aminokiselina veznog mjesta i donorski atomi sa sinergijskog aniona (najčešće karbonat) (32), čineći koordinaciju iskrivljenog oktaedra. Vezanje metala potiče značajnu konformacijsku promjenu u strukturi obje domene transferina pri čemu se poddomene rotiraju jedna u odnosu na drugu, a domene prelaze iz otvorene u zatvorenu konformaciju. U vezanju sudjeluju i obližnje aminokiseline koje dodatno stabiliziraju vezanje metala (24, 29). Jedan takav primjer su Lys206 i Lys296 koji međusobno tvore vodikove veze u zatvorenoj konformaciji N-domene (33). Dok vezanje metala potiče velike konformacijske promjene unutar domena, ne događaju se znatne razlike u relativnom položaju dvije domene. Vezanje metala na aminokiselinske ostatke je elektrostatsko pri čemu se pozitivno nabijeni metalni ioni vežu na negativno nabijene ostatke asparaginske kiseline te elektron donorske skupine ostalih aminokiselina i sinergijskog aniona (24).

Praćenje ravnoteže kao i kinetike vezanja željeza na ljudski serumski transferin izazovno je iz razloga što je konstanta vezanja vrlo velika, a željezo(III) je sklono hidrolizi. Iz tog razloga u takvim eksperimentima željezo se često veže na apotransferin posredstvom kelatora koji dovoljno snažno veže željezo da onemogućuje hidrolizu željeza, no opet slabije od transferina koji u kompeticiji uzima željezo kelatoru. Time se *in vitro* oponašaju uvjeti *in vivo* gdje se smatra da se Fe^{3+} ion veže na transferin posredstvom drugog kelatora (feroportina). Najčešće korišteni kelatori u *in vitro* eksperimentima su citrat i nitrilotriacetat (NTA) (34). Proces vezanja kelatiranog željeza na transferin sastoji se od nekoliko koraka. Prvo se sinergijski anion veže na transferin, a zatim željezo s kelatorom pri čemu nastaje intermedijalni kompleks anion-metal-kelator-transferin. Nakon što je željezo u veznome mjestu transferina, kelator zamjenjuje sinergijski anion i slijedi konformacijska promjena (34, 35).

Nasuprot eksperimentima gdje se transferin zasićuje željezom, drugi tip eksperimenata koji je moguće provesti u svrhu praćenja kinetike i ravnoteže su eksperimenti sa holotransferinom gdje se pomoću kelatora željezo oduzima transferinu. Najčešće korišten kelator u takvim eksperimentima je EDTA (36, 37).

Vezanje ili otpuštanje željeza s transferina moguće je pratiti UV-VIS spektroskopijom. Transferin intenzivno apsorbira u UV području pri valnoj duljini od 280 nm. Razlog tome su π - π^* prijelazi kod aromatskih aminokiselina: tirozina, triptofana i fenilalanina. Položaj dvaju tirozina u veznome mjestu kod vezanja nekih metalnih iona uzrokuje i dodatne apsorpcijske vrpce (primjerice kod vezanja bizmuta na 241 i 295 nm). U veznome mjestu dolazi i do prijenosa naboja s tirozina na metal što se očituje u drukčijoj boji kompleksa. Kod vezanja Fe^{3+} iona na transferin otopina poprimi specifičnu narančasto-crvenu boju, te nastaje široka apsorpcijska vrpca s maksimum oko 465 nm. Kod kompleksa kobalta ili bakra s transferinom otopina poprimi žutu boju, a kod kompleksa mangana smeđu (34).

Fluorescencijskom spektroskopijom moguće je pratiti vezanje metala na transferin. Uz pobudu na 280 nm (pobuda triptofana i tirozina) (38) i emisiju na 334 nm pokazano je kako se intenzitet intrinzične fluorescencije transferina smanjuje na oko 16% početne vrijednosti vezanjem dva iona Fe^{3+} na molekulu apotransferina (39). Vezanjem nekih drugih metala na apotransferin intenzitet intrinzične fluorescencije se povećava (38).

U svrhu proučavanja vezanja Fe^{3+} na transferin korištena je i elektronska paramagnetska rezonancija (EPR) koja pruža opis elektronske strukture metalnog iona i njegova koordinacijskog okruženja. EPR-om je moguće razlikovati vezanje željeza uz pomoć različitih sinergijskih aniona (40), ali i vidjeti razliku u elektronskoj strukturi vezanja željeza na dva

vezna mjesta transferina te promjene željeza u N-veznom mjestu dok se zasićuje C-vezno mjesto transferina (41).

Osim vezanja Fe^{3+} iona, transferin na sebe veže i druge metale, od kojih neki mogu imati i terapijski značaj, poput Ti^{4+} , $\text{VO}^{2+}(\text{V}^{4+})$, Cr^{3+} , Ru^{3+} i Bi^{3+} , ali i potencijalno toksične ione poput Al^{3+} ili aktinoide (42). Veže i ione poput Ga^{3+} , In^{3+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , no kao rezultat selektivnosti najveću konstantu vezanja na transferin od svih metalnih iona ima Fe^{3+} ion. Raspored bočnih ogranka aminokiselina u vezome mjestu transferina najvažniji je faktor u afinitetu metalnih iona za vezno mjesto. To sugerira veća korelacija u afinitetu vezanja obzirom na kiselost metalnih iona, nego obzirom na veličinu metalnih iona (24).

Iako su dvije domene transferina strukturno slične, male strukturne varijacije izazivaju razliku u termodinamici i kinetici (24). Razlika u jačini vezanja metalnih iona vidljiva je u većim konstantama vezanja metalnih iona na C-domenu proteina u odnosu na konstante vezanja na N-domenu proteina (34). Kondicionalna konstanta vezanja Fe^{3+} iona na transferin određena je pri atmosferskom karbonatu (oko 0,2 mM) (43) i dvije različite pH vrijednosti: pH 7,4 i 6,7. U tu svrhu korištena je metoda dijalize i eksperimenti su rađeni na transferinu u prisutnosti citrata kao kelatora. Za C-domenu kondicionalna konstanta pri pH 7,4 određena je da iznosi 20,7, a za N-domenu 19,4. Vrijednost kondicionalnih konstanti pri pH 6,7 manje su od onih na 7,4 i iznose 19,5 za C-domenu i 17,4 za N-domenu (44). Vrijednosti konstanti sugeriraju kako je utjecaj pH na afinitet vezanja željeza izraženiji na N-kraju proteina. Na jačinu vezanja željeza na transferin osim pH utječu ionska jakost i koncentracija sinergijskog aniona (34, 44, 45). Vrijednosti konstanti koje su dobivene pri atmosferskom karbonatu (44) kasnije su preračunate kako bi se odredile vrijednosti konstanti pri koncentraciji karbonata koji odgovara onoj u serumu. Pri pH 7,4 i 27 mM karbonatu (46) procijenjena je vrijednost kondicionalnih konstanti vezanja Fe^{3+} iona na 22,5 (C-domena) i 21,4 (N-domena) (47). Afinitet transferina za željezo smanjuje se smanjenjem pH. To svojstvo transferina omogućuje otpuštanje željeza u endosomu pri pH 5,6 u *in vivo* uvjetima (48).

Više studija ukazuje na kooperativnost dvaju veznih mjesta transferina prilikom vezanja, ali i otpuštanja željeza (49–52). Pokazano je kako je kooperativnost ovisna o pH, ali i koncentraciji soli (45).

Udio izoformi transferina moguće je odrediti uz pomoću urea gel elektroforeze (53, 54). Iako je konstanta vezanja željeza na C-kraj transferina veća od konstante vezanja na N-kraj, u zdravih pojedinaca veći je udio $\text{Fe}_\text{N}\text{Tf}$ od $\text{Fe}_\text{C}\text{Tf}$ izoforme. Williams i suradnici kvantificirali su udio izoformi transferina i odredili da one u normalnih zdravih pojedinaca iznose: apoTf 39,2%, $\text{Fe}_\text{C}\text{Tf}$ 11,2%, $\text{Fe}_\text{N}\text{Tf}$ 22,9% i holoTf 26,7% (55). Iako se u kasnijim studijama pokazalo kako

se odnos Fe_CTf i Fe_NTf formi može mijenjati, očita je preferencija željeza prema N-kraju u *in vivo* uvjetima. Moguće pojašnjenje veće popunjenosti N-veznog mjesta transferina je u fiziološkom značaju i različitim ulogama dviju izoformi. Povećano udio Fe_CTf povećava skladištenje željeza u jetri, dok je Fe_NTf učinkovitiji kao signal za ekspresiju hepcidina i eritropoetina (56).

U *in vitro* eksperimentima došlo se do zaključka kako pojedini ioni koji se vežu na transferin mogu utjecati na različitu preferenciju vezanja željeza za dva vezna mjesta. Osim na otpuštanje željeza, primijećen je njihov nejednolik utjecaj na kinetiku otpuštanja željeza sa dvaju veznih mjesta transferina. Primjerice, u prisutnosti natrijevih i kloridnih soli željezo se preferencijalno veže na N-kraj transferina. U slučaju otpuštanja željeza prisutnost kloridnih aniona pospješuje opuštanje željeza s C-kraja transferina, dok usporava otpuštanje s N-kraja (57). Na sklonost vezanja željeza za dva vezna mjesta transferina mogu utjecati i različiti kelatori. Citrat je jedan od kelatora koji preferencijalno predaje željezo N-kraju transferina, dok se željezo u kompleksu s nitrilotriacetatom prvo veže na C-kraj transferina (58).

Sklonost citrata prema N-kraju transferina mogla bi objasniti pojačanu saturaciju N-kraja transferina u *in vivo* uvjetima budući da je poznato kako je citrat potencijalni kelator željeza u krvnoj plazmi (59, 60) te ima sposobnost izmjene željeza s transferinom (55, 61). Ipak, još nije potpuno razjašnjeno koji ligand je donor željeza(III) transferinu u *in vivo* uvjetima. Druga hipoteza tvrdi kako transferin uzima željezo direktno od ceruloplazmida, feroksidaze za koju se zna da je odgovorna za održavanje željeza u oksidacijskom stanju +3. Nije pokazano da ceruloplazmid i transferin čine stabilan kompleks, ali pokazano je da prilikom njihove interakcije dolazi do izmjene željeza. Ipak, u takvim uvjetima preferencijalno se puni C-kraj transferina. U prilog prijenosu željeza preko ceruloplazmida ide i spora kinetika prijenosa željeza sa citrata kao i činjenica da je vrlo mala koncentracija željeza(III) (<0,5 μM) koji nije vezan na transferin u biološkim tekućinama, odnosno koji bi mogao biti vezan na citrat (62, 63).

1.2.4. Vezanje sinergijskih aniona na transferin

Sinergijski anioni su oni anioni koji vezanjem na transferin omogućuju stvaranje ternarnog kompleksa Fe-anion-transferin. U fiziološkim uvjetima karbonat je sinergijski anion, a u *in vitro* uvjetima pokazano je kako drugi strukturno slični anioni mogu zamijeniti karbonat. Kao ključni dio strukture pokazala se karboksilna skupina koja se veže na bočni ogranak arginina (Arg-124 na N-domeni i Arg-456 na C-domeni transferina) te postojanje elektron

donorske skupine na sinergijskom anionu koja koordinira željezo u veznome mjestu (32). Veći monokarboksilni anioni od karbonata poput glikolata, piruvata ili laktata mogu stvoriti stabilni ternarni kompleks sa željezom i ljudskim serumskim transferinom. Ipak, stabilnost takvih kompleksa nije usporediva sa stabilnosti Fe-CO₃-Tf ternarnog kompleksa. Osim monokarboksilnih, i manji dikarboksilni anioni poput oksalata i malonata mogu tvoriti stabilan ternarni kompleks (40, 64). Kristalna struktura Fe-CO₃-Tf kompleksa pokazala je postojanje šupljine u koju se uklapa molekula otapala, a nalazi se u veznome mjestu željeza (65). Postojanje takve šupljine može objasniti pojavu da veći anioni od karbonata tvore stabilan ternarni kompleks s transferinom, ali i da je veličina sinergijskog aniona ograničavajući faktor. Iz kristalne strukture Fe-CO₃-Tf pokazano je kako je karbonat povezan sa željezom dvjema koordinatnim vezama, dok je sa okolnim ograncima aminokiselina povezan preko nekoliko vodikovih veza (66).

Oksalat je jedini sinergijski anion koji s transferinom stvara ternarni kompleks usporedive stabilnosti s Fe-CO₃-Tf kompleksom (64, 67) što može biti objašnjeno bidentatnom koordinacijom željeza u veznome mjestu. Dok kod karbonata dva kisika iste karboksilne skupine koordiniraju željezo u veznome mjestu, kod oksalata po jedan kisik sa svake karboksilne skupine koordinira željezo. Oksalat ne čini tako mnogobrojne vodikove veze kao karbonat, no velika stabilnost kompleksa najvjerojatnije se može pripisati manjem naprezanju u koordinacijskom prstenu koji kod oksalata čini 5 atoma, a kod karbonata 4 atoma, kao i većoj simetriji oksalatnog kompleksa (32, 66, 67).

Kao što je opisano u poglavlju 1.2.1. *Ciklus transferina*, jedan od koraka koji prethodi oslobađanju željeza s transferina je smanjenje pH do 5,6. Smatra se kako se smanjenjem pH protonira sinergijski anion što potpomaže oslobađanju željeza iz ternarnog kompleksa. Primijećeno je kako je pH vrijednost pri kojoj je pola željeza oslobođeno s transferina niža za kompleks Fe-C₂O₄-Tf ($3,90 \pm 0,32$) od kompleksa Fe-CO₃-Tf za oko jednu pH jedinicu ($4,75 \pm 0,16$). Posljedično je kinetika otpuštanja željeza iz kompleksa Fe-C₂O₄-Tf sporija od Fe-CO₃-Tf, kao i mogućnost da transferin u jednakom roku stanicama dostavi određenu količinu željeza (67). Smatra se kako je uzrok toga razlika u pK_a vrijednostima oksalata i karbonata (pK_{a1}(H₂C₂O₄) = 1,25; pK_{a2}(H₂C₂O₄) = 4,14; pK_{a1}(H₂CO₃) = 6,35; pK_{a2}(H₂CO₃) = 10,33; vrijednosti pri 25°C) (67, 68). U serumu zdravih pojedinaca koncentracija oksalata je otprilike četiri reda veličine manja od koncentracije karbonata (oko 25 mM karbonat, 1,8 μM oksalat) (69–71).

U *in vitro* uvjetima pomoću urea gel elektroforeze Luck i suradnici (71) testirali su mogućnost da karbonat zamijeni oksalat u kompleksu Fe-C₂O₄-Tf, kao i obrnuti slučaj, gdje je

oksalat trebao zamijeniti karbonat u od Fe-CO₃-Tf kompleksu. Zaključeno je kako niti jedan sinergijski anion ne može zamijeniti drugi jednom kad je on u ternarnom kompleksu s transferinom, pri čemu su korištene fiziološki relevantne koncentracije aniona. Isto tako, u kompeticiji karbonata i oksalata za stvaranje ternarnog kompleksa, čak i pri puno višim koncentracijama oksalata od fizioloških (50 μM), karbonat sa svojim koncentracijama koje su u krvi oko 20 mM onemogućuje stvaranje Fe-C₂O₄-Tf kompleksa, već nastaje Fe-CO₃-Tf kompleks (71).

1.2.5. Vežanje nesinergijskih aniona na transferin

Alosterička vezna mjesta na transferinu na koja se vežu nesinergijski anioni, a utječu na kinetiku otpuštanja željeza s transferina skraćeno se zovu KISAB (engl. *kinetically significant anion binding sites*) mjesta (32). Dok sinergijski anioni igraju važnu ulogu u vezanju željeza na transferin, smatra se čak kako je vežanje jednostavnog nesinergijskog aniona poput klorida ili perklorata za KISAB mjesto ključno za poticanje konformacijske promjene i otpuštanje željeza s transferina (72, 73). Računalne studije sugeriraju postojanje mnoštva aminokiselina na transferinu čiji bočni ogranci bi bili potencijalna KISAB mjesta (74), no eksperimentalno su određena dva takva vezna mjesta (Arg143 na N-domeni i Lys569 na C-domeni transferina) (75, 76). Neki od aniona koji se vežu na transferin poredani po jakosti od onih koji se najjače vežu do onih koji se najslabije vežu su SCN⁻, ClO₄⁻, HP₂O₇³⁻, ATP³⁻, Cl⁻ (77). U studijama utjecaja KISAB mjesta na otpuštanje željeza s transferina važnu ulogu ima i promjena ionske jakosti koja mijenja elektrostatski potencijal površine transferina te može utjecati na konformaciju (78). Neki nesinergijski anioni poput sulfata i fosfata mogu otežati sposobnost vezanja metala na transferin, najvjerojatnije vežući se na vezna mjesta na koja se inače vežu sinergijski anioni (67).

1.2.6. Sekvestracija željeza prilikom infekcija

Različitim patogenim mikrobima koji napadaju ljudski organizam esencijalni nutrijent je željezo. Potreban im je za razne funkcije, od umnožavanja do razvoja infekcija. Sekvestracija slobodnog željeza je antimikrobni odgovor organizma pri čemu kod sisavaca u takvim procesima prvenstveno sudjeluju proteini iz porodice transferina. U serumu najveću sekvestracijsku aktivnost ima ljudski serumski transferin te je pokazana korelacija između povećane količine uskladištenog željeza s rasprostranjenosti bakterijskih te gljivičnih infekcija,

kao i sepe. Zbog velike konstante vezanja željeza na transferin, koncentracija slobodnog željeza je u intersticijskim tekućinama manja od 10^{-24} (79).

Budući da su koncentracije slobodnog željeza u organizmu vrlo male, bakterije su razvile razne procese vezanja slobodnog željeza. Jedan od procesa je proizvodnja i sekrecija jakih kelatora željeza, znanih kao siderofore. Nakon što nastane kompleks željezo-siderofore, taj kompleks veže bakterija i tako direktno dobavlja željezo. Drugi način je da bakterije eksprimiraju svoj, bakterijski transferinski receptor, koji na sebe veže holotransferin, i direktno od transferina uzimaju željezo. Za razliku od procesa preuzimanja željeza putem ljudskog transferinskog receptora, proces putem bakterijskog transferinskog receptora ne događa se endocitozom, već se željezo otpušta na površini bakterijske stanice (80–83).

1.3. Oksalat u ljudskom organizmu

Metabolizam oksalata u ljudskome organizmu uvelike je kontroliran razgradnjom aminokiselina (tirozina, fenilalanina, triptofana), glioksilata i askorbinske kiseline. Razgradnjom glioksilata u jetri nastaje oko 60-80% od ukupne količine oksalata u plazmi. Ljudi oksalat unose prehranom pri čemu je dnevni unos oksalata oko 80-130 mg. Uloga oksalata u ljudskom organizmu nije potpuno razjašnjena. Oksalat se najvećim dijelom izlučuje putem bubrega. Odrasli zdravi pojedinac dnevno izluči oko 40-45 mg oksalata. Ukoliko količine izlučenog oksalata premašuju tu vrijednost, govorimo o hiperoksaluriji (84–86).

Hiperoksalurija je jedan od poremećaja koji su karakterizirani povećanom koncentracijom oksalata u organizmu. Uzrok hiperoksalurije može biti (i) poremećaj u sintezi oksalata u jetri ili (ii) povećana apsorpcija oksalata u crijevima. Dok je hiperoksalurija(i) genetska nasljedna bolest, hiperoksalurija(ii) može biti posljedica povećanog unosa hrane koja sadrži oksalat ili poremećaja u apsorpciji gastrointestinalnog sustava. Povećana koncentracija oksalata kao posljedica hiperoksalurije rezultira hiperoksalemijom, precipitacijom oksalatnih soli, najčešće kalcijeva oksalata, u mekim tkivima. Precipitacija se uglavnom događa u bubrezima i miokardu, a može uzrokovati zatajenje bubrega (85, 87). Oko tri puta veće vrijednosti koncentracije oksalata od normalnih pronađene su u plazmi i urinu djece s dijagnozom autizma (69), a osim povećane koncentracije oksalata, javlja se i nedostatak željeza. Nije poznato je li uzrok takvog stanja značajni metabolički poremećaj, ili je posljedica gastrointestinalnih smetnji koje su česte kod djece s dijagnozom autizma (71). Koncentracije

oksalata u tjelesnim tekućinama ne mogu premašiti 30-45 $\mu\text{mol/L}$, što je granična vrijednost pri kojoj se oksalat taloži (88).

1.4. Glikozilacija proteina

Posttranslacijske modifikacije su kovalentne modifikacije na bočnim ograncima ili terminalnim krajevima aminokiselina, a mogu imati važnu ulogu za strukturu i funkciju proteina. Vezanje ugljikohidratnih lanaca na bočne ogranke proteina je jedna od najraznovrsnijih ko- i posttranslacijskih modifikacija proteina. Glikoproteini su proteini koji imaju na sebe vezan jedan ili više oligosaharidnih lanaca. Pronađeni su kod eukariota, ali i u jednostaničnim organizmima. Kod jednostaničnih organizama njihova je uloga uglavnom strukturalna (građa membrane), dok su kod mnogostaničnih organizama glikani u funkciji integracije mnoštva stanica u jednu funkcionalnu jedinicu, pa su im i uloge mnogo raznovrsnije i kompleksnije (89–91).

Ugljikohidratni lanci na protein mogu biti vezani uz pomoć enzima u procesu koji se naziva glikozilacija ili na neenzimski način putem procesa koji se naziva glikacija. U procesu glikacije glukoza (u formi aldehida) reagira s bočnim ogranom lizina ili argininina, dok je enzimski glikozilacija složeniji proces koji uključuje nekoliko uzastopnih koraka koji se događaju u endoplazmatskom retikulumu i Golgijevu tijelu. U glikozilaciju proteina u ljudskome organizmu uključeno je oko 200 enzima glikoziltransferaza koji određuju poziciju glikana na proteinu, strukturu glikana te koji proteini će biti glikozilirani. Ovisno o tome u kojoj stanici je pojedini protein eksprimiran i koja je njegova funkcija, protein može biti drukčije glikoziliran (92). Proteini koji sudjeluju u biosintezi glikana rezultat su ekspresije nekoliko stotina različitih gena. Odnosi između tih proteina mnogobrojni su i kompleksni, što omogućuje okolišnim čimbenicima da imaju utjecaj na glikozilaciju proteina (90).

Glikom je zajednički naziv za sve ugljikohidrate pojedinog organizma. Ugljikohidrati su u ljudskom organizmu rijetko u slobodnoj formi te su često u formi glikokonjugata kovalentno vezani na proteine ili lipide. Iako je glikom čovjeka raznovrsan i uključuje različite glikokonjugate i oligosaharide različitog sastava, zajednički obrasci slaganja ugljikohidrata u glikanima, kao i slične terminalne modifikacije mogu se pronaći kod glikokonjugata (91, 92). Za razliku od proteoma, glikom je rezultat procesa koji se ne događa prema obrascu te je nekoliko puta kompleksniji od proteoma (93). Glikozilacija je vrlo česta modifikacija među sekretornim proteinima i proteinima plazme te je oko polovice staničnih proteina glikozilirano (90, 92).

1.4.1. Struktura i funkcija glikana

Tipičan glikan sastoji se od 10 do 15 monosaharida koji su povezani na različit način. Osim slijeda monosaharida, glikane razlikuje i položaj glikozidne veze, anomerna konfiguracija (α ili β), način grananja i položaj „antena“ koje nastaju grananjem. Svi ti faktori doprinose kompleksnosti glikana, ali i broju izomera koji se mogu dobiti iz istog slijeda monosaharida za pojedini glikan. Ovisno o strukturi glikana i proteina na koji je pričvršćen, glikani mogu imati različite funkcije: mogu imati ulogu u smatanju proteina, adaptivnosti stanične membrane, služiti za molekulsko prepoznavanje, biti medijatori interakcija među stanicama i imati mnoge druge funkcije, od kojih mnoge nisu do kraja razjašnjene. Molekulsko prepoznavanje koje se temelji na glikanima služi i kao zaštita od patogena (90).

Glikani su na protein vezani glikozidnom vezom. O-glikozidna veza nastaje između anomernog ugljika ugljikohidrata i -OH skupine bočnog ogranka aminokiseline (serin ili treonin). N-glikozidna veza nastaje između anomernog ugljika ugljikohidrata i amidnog dušika bočnog ogranka asparagina. Uvjet da bi N-glikozidna veza nastala je da se asparagin nalazi u tripeptidnoj sekvenci Asn-X-Ser/Thr/Cys, pri čemu je X bilo koja aminokiselina osim prolina. Udio glikana u glikoproteinima često se izražava masenim udjelom, pri čemu glikanski dio može činiti od 1 do 70% ukupne mase glikoproteina (91, 94). N-glikozilacija je češća od O-glikozilacije te oko 90% okarakteriziranih glikoproteina ima na sebi vezan N-glikan (95). Svi N-glikani eukariota imaju istu osnovnu pentasaharidnu sekvencu koja se sastoji od dva *N*-acetilglukozamina i tri manoze: $\text{Man}\alpha 1-3(\text{Man}\alpha 1-6)\text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-\text{Asn-X-Ser/Thr/Cys}$. Ostatak glikana ovisno o rasporedu šećera uglavnom se može svrstati u neku od tri kategorije: visokomanoznu, kompleksnu ili hibridnu (96, 97).

Glikani mnogih plazmatskih proteina završavaju *N*-acetilneuraminskom kiselinom (Neu5Ac) koja se još naziva i sijalinska kiselina. Smatra se kako upravo ona štiti mnoge plazmatske proteine od razgradnje u jetri. Enzim sijalidaza (neuraminidaza) koji se nalazi u ljudskom organizmu odstranjuje sijalinske kiseline te se smatra kako je to jedan od mehanizama organizma da se riješi „starih“ proteina i zamijeni ih novima. Nakon što je sijalinska kiselina skinuta s glikoproteina, protein lektin koji je sastavni dio hepatocita prepoznaje takve asijaloglikoproteine (glikoproteine bez vezane sijalinske kiseline) što dalje vodi do ubrzanog katabolizma tih proteina (91). Osim što prisutstvo sijalinskih kiselina na glikanima može produžiti vijek glikoproteina, negativni naboj koji nosi sijalinska kiselina može pomoći u stabilizaciji konformacije te vezanju i prijenosu lijekova. Sijalinske kiseline mogu imati ulogu

i u regulaciji afiniteta pojedinih receptora, transmembranskoj signalizaciji, rastu, razvoju itd (98).

Kongenitalni poremećaj glikozilacije (CDG) naziv je za skupinu sistematskih bolesti kojima su zajednički defekti u biosintezi ili metabolizmu glikana. Radi se o nasljednim bolestima koje su često letalne za embrij, a manifestiraju se na više razina: mišićnoj, razvojnoj i neurološkoj. Postoji više vrsta CDG-a pri čemu se tipovi bolesti razlikuju i prema tome je li zahvaćen jedan glikozilacijski korak ili više njih. Bolest je prvo otkrivena kod djece s neobjašnjivim višesustavnim poremećajima. Kod njih je primijećena smanjena glikozilacija ljudskog serumskog transferina, čija je detekcija kasnije služila za dijagnozu te bolesti (93).

Veliki značaj kod razvoja tumora imaju upravo glikani. Uključeni su u temeljne molekularne i biološke tumorske procese poput komunikacija među stanicama, dijeljenja stanica, stvaranje metastaza, stvaranja imuloškog odgovora itd. Iz tog razloga alteracije među glikanima mogu regulirati razvoj i napredovanje tumora, ali i služiti kao važan biomarker za dijagnozu i razvoj bolesti. Osim tog, definiraju specifične mete za potencijalno terapijsko djelovanje na tumore (99–101).

Pokazano je kako su glikani biomarkeri starenja. N-glikani imunoglobulina, koji među ostalim sudjeluju u upalnim procesima, starenjem čovjeka pokazuju promjene u glikozilaciji te su direktno povezani s kronološkom i biološkom dobi (102). Kako je starenje čovjeka povezano s raznim bolestima i stanjima organizma, promjene u glikanima moguće je dovesti u vezu s raznim bolestima čestim kod starije populacije, poput dijabetesa ili Alzheimerove bolesti (103, 104).

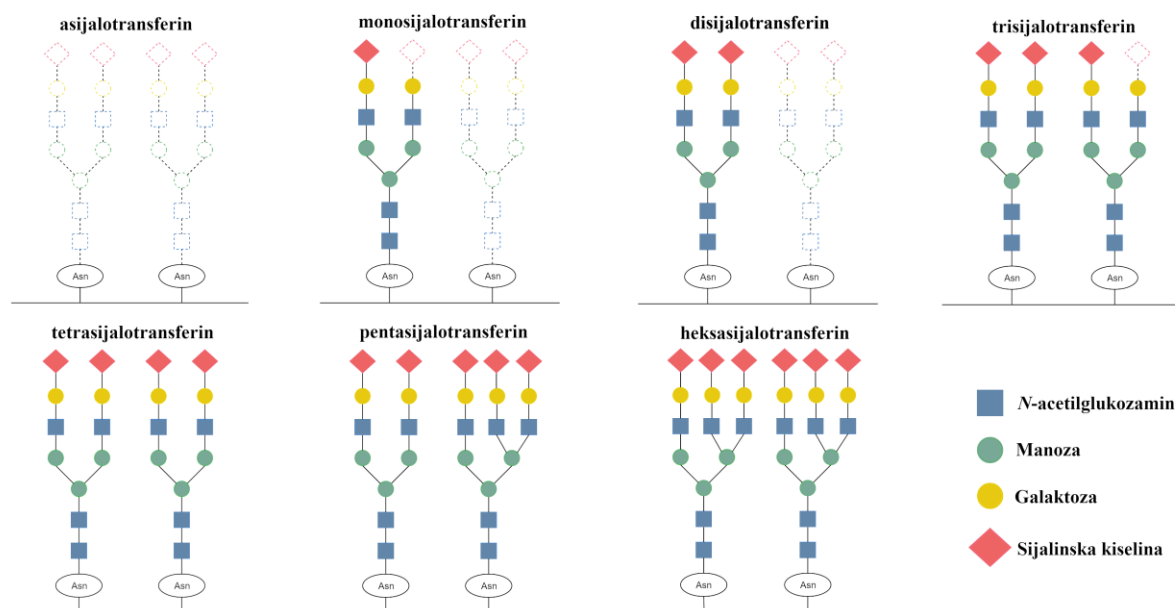
1.4.2. Glikozilacija transferina

Važan faktor mikroheterogenosti transferina su posttranslacijske modifikacije poput fosforilacije, glikacije ili oksidacije. Najpoznatija posttranslacijska modifikacija na transferinu je glikozilacija. Svi članovi porodice transferina koji se javljaju kod sisavaca posjeduju N-vezane glikane na bočne ogranke asparagina. Dok je sama aminokiselinska sekvenca kod transferina uvelike očuvana, glikozilacija predstavlja veliku varijabilnost u strukturi transferina. Oko 6% transferina čine ugljikohidratni lanci (24).

Glikani se na transferinu nalaze na Asn413 i Asn611, oba na C-domeni proteina. Smatra se kako je i Asn491 potencijalno vezno mjesto za glikane, ali je zastupljen u puno manjoj mjeri (oko 2%) (105, 106). Najčešći glikan transferina je biantenarni glikan s dvije sijalinske kiseline na kraju koji rasporedom svojih ugljikohidrata spada u kompleksni tip N-glikana. U manjoj

mjeri na transferinu zastupljeni su drugi bi- i triantenarni N-glikani (106). Smatra se kako je omjer bi- i triantenarnih glikana transferina u ljudskom serumu zdravih pojedinaca oko 85:15 (107).

Transferin koji sadrži dva biantenarna glikana sa ukupno četiri sijalinske kiseline naziva se tetrasijalotransferin. Normalni serum sadrži još i di-, tri- i pentasijalotransferin, no u manjoj mjeri (slika 1.3.). Izoforme transferina razlikuju se na temelju njihovih pI vrijednosti. Na temelju razlike u pI vrijednostima, izoforme transferina se mogu odvojiti i tako odrediti njihova zastupljenost u serumu. Pokazano je kako se koncentracija disijalotransferina koji je u zdravih pojedinaca prisutan sa oko 1% kod bolesnika s dijagnozom kroničnog alkoholizma može povećati nekoliko puta. Osim disijalotransferina, kod kroničnog alkoholizma javlja se i forma asijalotransferin koju karakterizira potpuni izostanak ne samo sijalinskih kiselina, već i cijelih ugljikohidratnih lanaca (108). Atipične izoforme transferina koje karakterizira izostanak oligosaharidnih lanaca nazivaju se CDT (engl. *carbohydrate-deficient transferrin*) izoforme. Upravo te izoforme transferina koriste se kao biomarkeri za dijagnosticiranje kroničnog alkoholizma (109). Povećanje razine CDT izoformi kod pacijenata s dijagnozom kroničnog alkoholizma u odnosu na pacijente s niskom dozom konzumacije alkohola veće je kod žena, nego kod muškaraca. Procijenjeno je da povećanje CDT formi kod žena iznosi 249% za asijalo-, 58% za monosijalo- i 225% za disijalotransferin, a kod muškaraca 219% za asijalo-, 28% za monosijalo- i 148% za disijalotransferin (110).



Slika 1.3. Prikaz sijaloformi ljudskog serumskog transferina. Glikani su vezani na dva asparagina pri čemu jedan predstavlja Asn413, a drugi Asn611.

Osim kod kroničnog alkoholizma, CDT izoforme transferina koriste se kao biomarker kod nekih tipova kongenitalnih poremećaja glikozilacije (111, 112). Povećane razine desijaliniziranog transferina primijećene su i kod alkoholne bolesti jetre kao i opstruktivne plućne bolesti (113, 114). Pokazano je kako se proces desijalinizacije transferina naglo dešava kod bolesnika koji obole od sepse, najviše u samom početku pojave bolesti, pri čemu je promjena u desijalinizaciji transferina mogući direktan pokazatelj jačine upalnog procesa (115, 116). Osim kod sepse, moguće je postojanje veze između upalnih procesa u organizmu i desijalinizacije transferina i kod drugih upalnih procesa, poput upale gušterače (117, 118).

Obzirom na to da je desijalinizacija serumskih proteina često signal za brži katabolizam proteina, pokazalo se kako desijalinizirani transferin ima dulji vijek trajanja u sistemskoj cirkulaciji od drugih plazmatskih glikoproteina (119, 120). Ipak, eksperimenti rađeni na miševima pokazali su kako se poluvrijeme života asijalotransferina smanji na dvije trećine poluvremena života normalnog transferina, ali isto tako kako asijalotransferin 3 do 4 puta brže isporučuje željezo u jetru (121). Nije pokazano da glikanski sastav transferina ima utjecaj na interakciju transferina s transferinskim receptorom prilikom isporuke željeza (122).

Kod trudnica primijećeno je kako se napredovanjem trudnoće povećava koncentracija sijaliniziranog transferina, dok se nakon poroda smanjuje na normalne razine (123). Promjene u strukturi glikana transferina primijećene su i kod drugih nasljednih bolesti poput galaktosemije (124), a kod bolesti poput reumatoidnog artritisa ili uceroznog kolitisa primijećeno je pojačano grananje glikana transferina (125, 126).

Uloga sijalinizacije transferina kao odgovora organizma na bolesti i razna stanja organizma nije potpuno razjašnjena: moguće objašnjenje desijalinizacije može biti u pojačanoj aktivnosti neuraminidaze, povećanom klirensu desijaliniziranog transferina (118), ili pak biti povezana sa drukčijim svojstvima prijenosa ili vezanja željeza na desijalinizirani transferin, odnosno sekvestracijom željeza (79).

1.5. Kalorimetrija vezanja metala na proteine

Izotermna titracijska kalorimetrija (ITC) je tehnika koja je postala komercijalno dostupna prije oko 40 godina i trenutno je jedna od glavnih tehnika za kvantitativna mjerenja termodinamike vezanja. Tehnika se temelji na direktnoj mjeri topline oslobođene ili vezane prilikom nekog kemijskog procesa. Otopina titranta (u kojoj se najčešće nalazi ligand) dodaje se u otopinu koja se nalazi u mjernoj ćeliji (u kojoj se najčešće nalazi makromolekula).

Instrument se sastoji od dvije ćelije: mjerene i referentne pri čemu se u referentnoj ćeliji nalazi samo otapalo. Obje ćelije su pomoću grijača održavane na istoj temperaturi. Snaga koja se primjenjuje na referentnoj ćeliji je konstantna i naziva se referentna snaga (slika 1.4.). Ovisno o tome događa li se u mjernoj ćeliji egzoterman ili endoterman proces, snaga koja se primjenjuje na mjernoj ćeliji može biti veća ili manja od referentne. Ta diferencijalna snaga bilježi se kao odziv instrumenta u vremenu (u kojem se provodi titracija).

Budući da se mjerenje odvija pri stalnom tlaku, vrijedi da je izmjenjena toplina q_p jednaka promjeni entalpije koja se može dovesti u vezi s dosegom i reakcijskom entalpijom:

$$q_p = \Delta H = \xi \cdot \Delta_r H \quad (1.5.1.)$$

Titracija daje vrijednost konstante vezanja iz koje je moguće izračunati vrijednost slobodne Gibbsove energije:

$$\Delta_r G^\circ = -RT \ln K^\circ \quad (1.5.2.)$$

a posljedično i vrijednost entropije vezanja:

$$\Delta_r S^\circ = \frac{\Delta_r H^\circ - \Delta_r G^\circ}{T} \quad (1.5.3.)$$

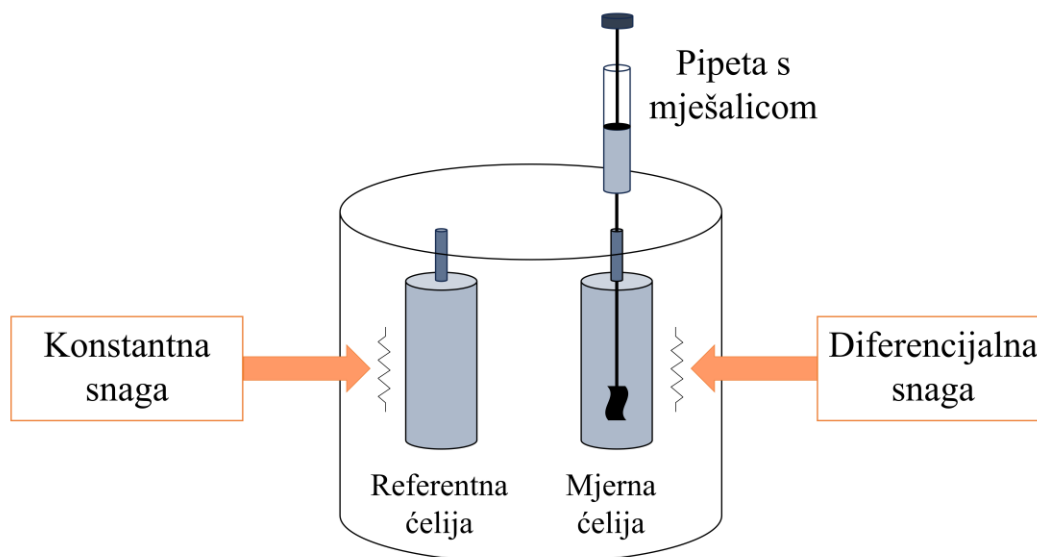
Prilikom kalorimetrijskog mjerenja važno je imati na umu sve tvari prisutne u otopinama, kao i moguće toplinske procese koji bi mogli doprinjeti ukupnoj izmjerenoj toplini, odnosno promjeni entalpije.

Prilikom ITC titracije s metalnim ionima važno je voditi računa o svojstvima korištenih metala, poput oksidacijsko-redukcijskih svojstava, topljivosti (ovisno o korištenim otapalima ili puferu), kao i potencijalnoj hidrolizi. Zato što su Lewisove kiseline, metali se mogu vezati na pufer. Ukoliko entalpija vezanja metala na pufer nije zanemariva, bitno je oduzeti njenu vrijednost od eksperimentalnih vrijednosti promjene entalpije. Ako se u titraciji radi o pH ovisnom procesu, važno je voditi računa i o entalpiji protonacije pufera kao i mogućim drugim protonacijskim doprinosima ukupnoj izmjerenoj promjeni entalpije.

Još jedan doprinos ukupnoj izmjerenoj promjeni entalpije je i entalpija razrjeđenja koja je posljedica dodatka titranta u ćeliju. Njenu vrijednost moguće je dobiti iz zadnjih nekoliko točaka titracije gdje je makromolekula potpuno zasićena, ali i iz kontrolnih titracija pufera titrantom. Takvim kontrolnim titracijama moguće je i odrediti veže li se metal (titrant) na pufer (127).

ITC je tehnika kojom je moguće direktno odrediti konstantu vezanja, no samo ukoliko je njena vrijednost $\log K$ u rasponu između 4 i 9 (128). Ipak, kako bi se dobili termodinamički parametri za sustave s visokim konstantama vezanja moguće je provesti kompeticijsku titraciju u kojoj su metal (ili makromolekula) vezani na ligand slabijeg afiniteta. U tom slučaju potrebno

je provesti dvije titracije: prvu sa slabim ligandom kako bi se dobili termodinamički parametri za tu reakciju, a zatim s jakim kako bi se dobila entalpija vezanja i u konačnici kompeticijska reakcija (129).



Slika 1.4. Shematski prikaz glavnih komponenti izoternog titracijskog mikrokalorimetra.

Jednom kad su otklonjeni svi dodatni doprinosi intrinzičnoj entalpiji vezanja i dobivena je vrijednost koja se odnosi samo na promatrani sustav metal-protein, ona može biti direktan pokazatelj jačine interakcija između liganda i proteina (primjerice van der Waalsove ili vodikove veze), relativno prema interakcijama između proteina i molekula otapala. Promjena entropije većinom ima dva doprinosa: promjenu u entropiji solvatacije i promjenu u konformacijskoj entropiji. Promjena u entropiji solvatacije većinom je posljedica oslobađanja molekula vode iz veznog mjesta, dok vezanjem liganda protein gubi konformacijsku slobodu (129).

1.5.1. Kalorimetrijska mjerenja s transferinom

Kalorimetrijsku metodu vezanja Fe^{3+} iona u formi FeNTA (molarni omjer Fe:NTA = 1:2) na transferin prvo su razvili Lin i suradnici prilikom eksperimenta s ovotransferinom (130). Mjerenja su proveli u 0,1 M HEPES-u pri pH 7,5. Primijetili su dvije kinetičke faze prilikom vezanja željeza na ovotransferin: prvu, brzu koja odgovara kontaktnom vezanju FeNTA u vezno

mjesto, i drugu, sporu koja odgovara zamjeni nitrilotriacetata karbonatom. Brza kinetička faza egzotermna je za C- i N-vezno mjesto transferina, dok je spora kinetička faza endotermna za N-vezno mjesto transferina, a egzotermna za C-vezno mjesto. Spore kinetičke faze javljaju se samo ukoliko se mjerenja odvijaju u prisutnosti karbonata; bez karbonata mjerenje se sastoji samo od brzih egzotermnih signala (130).

Dok se prilikom titracije ovotransferina željezo prvo veže na N-vezno mjesto, kasnija mjerenja s ljudskim serumskim transferinom pri istim uvjetima pokazala su kako se željezo (u formi FeNTA) prvo veže na C-vezno mjesto (35). Iste kinetičke faze (spora i brza), kao i predznaci izmjene topline (egzo i endo) u tim fazama kod ljudskog serumskog transferina jednake su kao kod vezanja željeza na ovotransferin (130). Kontrolne injekcije (dodatak FeNTA) u pufer sadržavale su endotermne signale i oduzete su od eksperimentalnih mjerenja te su određene entalpije vezanja željeza na C- i N-kraj ljudskog serumskog transferina. Izračunato je kako je entalpija vezanja željeza u formi FeNTA na C-kraj ljudskog serumskog transferina egzotermnija ($-10,7$ kcal/mol) od entalpije vezanja na N-kraj ($-4,2$ kcal/mol) te je procijenjen omjer konstanti vezanja na C- i N-kraj transferina ($K_C/K_N = 150$) (35). Razlika u termodinamici vezanja na dva kraja transferina pobila je raniji zaključak Binforda i suradnika koji su zaključili da su dva kraja transferina termodinamički jednaka (131).

Osim ovotransferina i ljudskog serumskog transferina, pri istim uvjetima kasnije je provedena titracija melanotransferina (titracija sa Fe:NTA = 1:2 u 0,1 M HEPES-u, 25 mM karbonatu, pri pH 7,5) (132). ITC je korišten i za karakterizaciju vezanja drugih vrsta na ljudski serumski transferin, poput titanijeva iona (u formi titanijeva citrata, u puferu 50 mM Tris, 10 mM $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, 20 mM NaHCO_3 , 0,2 M NaCl pri pH 7,4) te raznih vanadijevih spojeva (u 0,05 M HEPES-u, 5 mM karbonatu i 0,16 M NaCl-u pri pH 7,4) (133, 134).

ITC studija s transferinom i transferinskim receptorom pokazala je snažno vezanje između transferinskog receptora i transferina s povoljnim vrijednostima entropije i entalpije vezanja. Također, pokazano je kako je afinitet transferinskog receptora prema vrsti Fe_2Tf ($\log K \approx 8$) oko 10 redova veličine veći, nego prema parcijalno zasićenim vrstama transferina ($\log K \approx 7$) (135).

§ 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Najvažnije svojstvo ljudskog serumskog transferina, ono da snažno veže željezo ($\log K \approx 20$ za oba vezna mjesta), oblikovalo je vrlo važnu ulogu transferina kao glavnog prenosioca željeza u ljudskome organizmu. Vezanje željeza u oba vezna mjesta transferina ne događa se bez prisustva sinergijskog aniona. Karbonat, kao jedini sinergijski anion koji je identificiran *in vivo*, mogu zamijeniti drugi karboksilni sinergijski anioni, od čega ternarni kompleks slične jakosti čini oksalat. Stabilnost ternarnog oksalatnog kompleksa velika je obzirom na simetriju, ali i manje naprezanje u prstenu u usporedbi s karbonatnim kompleksom. No, bez obzira na veliku stabilnost oksalatnog kompleksa, jedan od razloga zašto je karbonat glavni sinergijski anion *in vivo* je i koncentracija karbonata koja je u serumu zdravih pojedinaca otprilike četiri reda veličine veća od koncentracije oksalata. Ipak, kod stanja poput hiperoksalurije ili drugih metaboličkih poremećaja koncentracije oksalata mogu se povećati nekoliko puta. Postoje indikacije za povezanost nekih od tih stanja s nedostatkom željeza u organizmu. Termodinamika vezanja željeza na kompleks transferina s oksalatom u dosadašnjoj literaturi nije istražena te je stoga cilj ovog rada usporediti termodinamiku vezanja željeza na transferin s oksalatom i karbonatom. Razlika u termodinamici vezanja željeza na ljudski serumski transferin ovisno o prisutnosti karbonata ili oksalata kao sinergijskog aniona može imati značajan utjecaj na homeostazu željeza, pogotovo u stanjima povećane koncentracije oksalata gdje je veća šansa nastanka takvog kompleksa *in vivo*.

Transferin je glikoprotein koji na sebi ima vezana dva N-glikana. Pri fiziološkim uvjetima glikani na svojim završecima imaju negativno nabijene sijalinske kiseline. Desijalinizacija transferina primijećena je kod raznih upalnih stanja i sepse, a koristi se i kao biomarker kroničnog alkoholizma. Uloga desijalinizacije transferina kao odgovora na razna stanja organizma nije u potpunosti jasna, te je moguće da sama desijalinizacija utječe na afinitet transferina prema vezanju željeza. U dosadašnjim istraživanjima koja su uključivala određivanje konstante vezanja, ali i drugih termodinamičkih parametara vezanja željeza na transferin zanemaren je mogući utjecaj sijalinizacije. U tim istraživanjima utjecaj sijalinizacije nije testiran te je korišten transferin koji nije imao okarakteriziran glikanski sastav. Iz tog razloga, cilj ovog rada je istražiti utjecaj sijalinizacije ljudskog serumskog transferina na termodinamiku vezanja željeza na transferin.

Na homeostazu željeza u ljudskom organizmu mogu utjecati razni patogeni kojima je željezo esencijalni nutrijent. Razlika u termodinamici vezanja željeza na ljudski serumski transferin ovisno o sijalinizaciji transferina mogla bi objasniti vezu između fizioloških i patoloških promjena u organizmu prilikom djelovanja takvih patogena, s naglaskom na potencijalni utjecaj sijalinizacije na virulenciju tijekom infekcije ili sepse.

Hipoteza ovog istraživanja je da različite sijaloforme ljudskog serumskog transferina, kao i prisutnost različitih sinergijskih aniona prilikom vezanja željeza na transferin, rezultiraju značajnom razlikom u termodinamičkim parametrima vezanja.

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

Sljedeći pododjeljci sadrže popis kemikalija i ostalih korištenih materijala u izradi ovog rada. Svi reagensi korišteni su bez dodatnog pročišćavanja. Za pripremu svih otopina korištena je ultračista voda dobivena uz pomoć uređaja za pročišćavanje vode navedenog u poglavlju 3.2.

3.1.1. Reagensi

- ljudski serumski apotransferin ($\geq 98\%$, Sigma-Aldrich)
- natrijev hidrogenkarbonat (Kemika)
- kalijev oksalat monohidrat (Sigma-Aldrich)
- 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonska kiselina, HEPES (BDH Pro-lab)
- željezov(III) klorid (Riedel-de Haën, Honeywell)
- natrijev nitrilotriacetat (Sigma-Aldrich)
- titrival 1M NaOH (Gram-Mol)
- klorovodična kiselina (37%, Carlo Erba Reagents)
- tris(hidroksimetil)aminometan, TRIS (Amresco)
- sialidaza (Genovis, Immobilized SialEXO® Smart Enzymes™)
- natrijev hidroksid (Kemika)
- standardna otopina željeza (Inorganic Ventures, $9992 \pm 30 \mu\text{g/mL}$ u 5% $\text{HNO}_3(\text{aq})$, standard za spektrometriju masa uz induktivno spregnutu plazmu)
- standardna otopina germanija (Inorganic Ventures, $1001 \pm 4 \mu\text{g/mL}$, standard za spektrometriju masa uz induktivno spregnutu plazmu)
- metanol (Kemika)
- amidaza (PNGaza F 1,2 U, Promega)
- 2-aminobenzamid (Sigma Aldrich)
- amonijev formijat (Merck)

3.1.2. Ostali materijali

- kvarcna kiveta (Hellma, 1 cm)
- filteri za injekcijske šprice (FilterBio, PES, promjer 4 mm, veličina pora 0,22 μm)
- standardi za pH metar (Gram-Mol)
- centrifugalni filteri (Merck, Amicon® Ultra, 0.5 mL, 30 kDa)
- deterđent Decon 90 (Decon Laboratories)
- puferi za ionsku kromatografiju (CryoBioPhysica, Inc., pISep Buffer Kit - koncentrat A i koncentrat B)
- kromatografska kolona za ionsku izmjenu (Cytiva, HiTrap™ Q HP columns, 1 mL)
- kromatografska kolona (Waters™, ACQUITY Premier BEH HILIC, 1.7 μm , 2.1 mm x 150 mm)
- pH senzor za potenciometriju (Mettler Toledo DGi101-SC)
- elektroda za određivanje pH (Mettler Toledo™ InLab®421 kombinacijska pH semi-mikro elektroda)
- membranski filteri za filtraciju pufera (Millipore, PES, promjer 47 mm, veličina pora 0,22 μm)

3.2. Instrumentacija

U ovome radu korištena je sljedeća instrumentacija:

- izotermni titracijski kalorimetar (Malvern Panalytical Ltd., PEAQ-ITC MicroCal)
- analitička vaga (Mettler Toledo AG245)
- centrifuga (VWR Compact Star CS4)
- pH metar (Mettler Toledo MP 220)
- UV-Vis spektrofotometar (Varian Cary 50 Bio)
- uređaj za vorteksiranje (Cole-Parmer Vortex Mixer)
- ultrazvučna kupelj (Ultrasonic Cleaner, Sper Scientific Direct, 42000 Hz)
- rotator za tubice (Thermo Fischer Scientific)
- deionizator (Benchtop Air Ionizer)
- uređaj za pročišćavanje vode (SG Water, Ultra Clear UV)
- vakuumska pumpa (Millipore Corporation)

- uređaj za niskotlačnu tekućinsku kromatografiju (Cytiva, ÄKTA Start protein purification system)
- ICP-MS uređaj (Agilent, 7900 sa ASX-500 Series automatskim uzorkivačem i kvadrupolnim detektorom)
- uređaj za visokotlačnu tekućinsku kromatografiju (Waters, Acquity UPLC H-Class instrument)
- titrator (Mettler Toledo, T70)

3.3. Metode

3.3.1. Enzimska desijalinizacija

Desijalizirani apotransferrin (Tf-s) pripremljen je inkubacijom otopine nativnog apotransferina ($\geq 98\%$, Sigma-Aldrich) u SialEXO® kolonama (tubicama) s imobiliziranom sijalidazom. U pojedinu SialEXO® kolonu dodano je 800 μL otopine nativnog apotransferina koncentracije 2,5 mg/mL otopljenog u 20 mM TRIS puferu pri pH 6,8. Kolona je rotirana pomoću rotatora za tubice 48 h na sobnoj temperaturi brzinom od 10 RPM. Nakon perioda inkubacije desijalizirani apotransferin prikupljen je skidanjem donjeg poklopca SialEXO® kolone i centrifugiranjem kolone (3 min brzinom 1 RCF). Takvim postupkom iz jedne kolone prikupljeno je oko 2 mg desijaliziranog proteina u pojedinom ciklusu. Proces desijalinizacije proveden je u više kolona, pri čemu je pojedina kolona korištena nekoliko puta. Rezultat desijalinizacije potvrđen je neposredno nakon procesa desijalinizacije prema postupcima opisanim u poglavljima 3.3.2. i 3.3.3. Desijalizirani transferin koji je dobiven iz različitih ciklusa desijalinizacije objedinjen je u jednome uzorku te je taj uzorak ispran vodom minimalno 5 puta u Amicon® Ultra centrifugalnim filterima. Uzorak je ujedno ukoncentriran te je dobiveni koncentrat alikvotiran u tubice zapremnine 200 μL . Alikvoti su pohranjeni na temperaturi $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.3.2. Kromatofokusiranje

Kako bi potvrdili proces enzimske desijalinizacije ljudskog serumskog transferina, nativni i desijalizirani transferin analizirani su pomoću kromatografije ionske izmjene pri čemu je cilj bio utvrditi razliku u njihovim pI vrijednostima. Linearni gradijent pH dobiven je pomoću

dva pIsep pufera dizajnirana za kromatofokusiranje, dok je količina eluiranog proteina praćena apsorbanjski na 280 nm.

Priprema pufera za kromatofokusiranje sastojala se od dva koraka. U prvome koraku iz pIsep koncentrata A i B pripremljeni su temeljni pIsep puferi: temeljni pIsep 1 i temeljni pIsep 2. Temeljni pIsep 1 pripremljen je miješanjem 5 mL pIsep koncentrata B s 1 mL pIsep koncentrata A te je ostatak do 400 mL nadopunjen vodom, a pH podešen na 2,4. Temeljni pIsep 2 pripremljen je razrjeđivanjem 5 mL pIsep koncentrata B do 400 mL i podešavanjem pH na 10,8. Za podešavanje pH korištene su otopine HCl i NaOH.

U drugome koraku pripreme pufera korišten je program pIsep pH Gradient Maker Software v. 2,0 (136) pomoću kojeg je izračunat omjer u kojem je bilo potrebno pomiješati temeljni pIsep 1 i temeljni pIsep 2 kako bi dobili pIsep pufer A (pH = 8) i pIsep pufer B (pH = 4). pIsep puferi A i B korišteni su kao inicijalni i finalni pufer u dobivanju željenog pH gradijenta za eluciju proteina. pIsep pufer A pripremljen je kao smjesa 39,3% temeljnog pIsep pufera 1 i 60,7% temeljnog pIsep pufera 2, dok je pIsep pufer B pripremljen kao smjesa 81,4% temeljnog pIsep pufera 1 i 18,6% temeljnog pIsep pufera 2.

Radi bolje separacije proteinskih komponenti dvije kromatografske kolone (HiTrap Q HP anion exchange 1 mL) spojene su serijski metodom kap na kap. Prije pokretanja kromatofokusiranja kolone su isprane s oko 10 mL vode i jednako toliko pIsep pufera A. Za jedno kromatofokusiranje bilo je dovoljno 0,15 mg proteina koji je otopljen u 0,5-1 mL pIsep pufera A. Nakon otapanja uzorka bilo je potrebno ponovno provjeriti i podesiti pH uzorka na pH 8,0. Prije injektiranja uzorka na kolonu, omća ÄKTA Start protein uređaja za unošenje uzorka isprana je vodom i pIsep puferom A. Uzorak je injektiran putem omće na kromatografsku kolonu. Elucija s kolone provedena je u linearnom gradijentu pri čemu se udio pIsep pufera B (pH \approx 4) povećavao od 0 do 100%, a udio pIsep pufera A smanjivao od 100 do 0%. Podtlak u sustavu je iznosio 0,15 MPa. Eluirane proteinske komponente prikupljane su u frakcijama od oko 1,5 mL. Nakon provedenog kromatofokusiranja određen je pH svake pojedine frakcije te je preko veze između pH pojedine proteinske komponente i A_{280} bilo moguće odrediti pI vrijednosti desijaliziranog i nativnog transferina te tako pratiti uspješnost procesa desijalinizacije.

3.3.3. Analiza N-glikana

Za detaljnu analizu glikana uzorci nativnog i desijaliziranog transferina analizirani su pomoću tehnike UHPLC prema protokolu (137). Za pojedinu analizu bilo je potrebno 200 μ g

proteina koji je otopljen u 50 μ L vode. Nakon denaturacije uzoraka, *N*-glikani su otpušteni s proteina djelovanjem amidaze (PNGase F). Oslobođeni glikani fluorescentno su obilježeni uz pomoć 2-aminobenzamida.

Tako obilježeni glikani odvojeni su na temelju različitih hidrofilnih svojstava na kromatografskoj koloni ACQUITY Premier BEH HILIC uz kontrolu UHPLC uređaja (Waters, Acquity UPLC H-Class). Kromatografija je provedena u linearnom gradijentu dva otapala: acetonitrila (70-53%) kao otapala A i 100 mM amonijeva formijata pri pH 4,4 kao otapala B. Protok je bio 0,56 mL/min, a kromatografsko razdvajanje trajalo je 25 min. Fluorescencijski signal glikana dobiven je pobudom na 250 nm uz emisiju na 428 nm.

Dobiveni kromatogrami integrirani su i asignirani prema poznatim retencijskim vremenima glikana nativnog i desijaliniziranog transferina. Asignirani glikani transferina koji su služili za usporedbu prije su određeni uz pomoću UHPLC-ESI-qTOF-MS sustava (138) gdje su glikani, kao i u ovome slučaju, prema istom protokolu (137) otpušteni s proteina, fluorescentno obilježeni i odvojeni na koloni. Nakon snimanja njihovih qTOF/MS spektara uz usporedbu s glikanskim bazama podataka ti glikani su asignirani.

3.3.4. Priprema i standardizacija radnih otopina

Izotermni titracijski eksperimenti provedeni su u dva pufera: 1) 0,1 M HEPES, 25 mM NaHCO₃, pH 7,4; 2) 0,1 M HEPES, 25 mM K₂C₂O₄, pH 7,4. Puferi su pripremljeni otapanjem 1) 4,766 g HEPES-a i 0,420 g NaHCO₃ u 200 mL visokopročišćene vode; 2) 4,766 g HEPES-a i 0,9212 g K₂C₂O₄ x H₂O u 200 mL visokopročišćene vode. pH vrijednosti pufera podešene su na 7,4 te su puferi profiltrirani preko membranskih filtera (Milipore, PES, promjer 47 mm, veličina pora 0,22 μ m).

Sve radne otopine pripremane su neposredno prije samog titracijskog eksperimenta u neovisnim pripremanjima te je koncentracija svake radne otopine FeNTA i radne otopine transferina određena spektrofotometrijski neposredno prije eksperimenta. U svrhu pripreme radne otopine FeNTA prvi korak bila je priprema stabilne temeljne otopine FeNTA, a kasnije su određene koncentracije obje komponente temeljne otopine (željeza i NTA).

Prvi korak u pripremi temeljne otopine FeNTA bila je priprema otopine Na₃NTA. Otopina je pripremljena otapanjem 25,71 g Na₃NTA u 200 mL vode bez otopljenog CO₂ (prokuhane vode), i nakon toga je standardizirana potenciometrijskom titracijom. Otopina za titraciju pripremljena je tako da je od ishodne otopine Na₃NTA (pH \approx 11) uzet je alikvot od 8

mL i razrijeđen je do 40 mL vodom bez otopljenog CO₂. pH otopine je zatim podešen na ≈ 3 dodatkom 1 M HCl u otopinu. Zakiseljena otopina titrirana je standardnom 1 M otopinom NaOH (Gram-Mol). Iz razlike točaka infleksije određena je koncentracija otopine Na₃NTA. Titracija je rađena u triplikatu i srednja vrijednost je uzeta kao stvarna vrijednost koncentracije otopine Na₃NTA. Primjer provedene potenciometrijske titracije otopine Na₃NTA prikazan je na slici 7.1. u prilogu ovog rada.

Potrebna količina željezova klorida otopljena je u 0,5 M otopini HCl kako bi se dobila 0,5 M otopina FeCl₃ u HCl. pH vrijednost standardizirane otopine Na₃NTA smanjena je dodatkom otopine HCl do pH $\approx 8,5$ i postupno je dodavana u 0,5 M otopinu FeCl₃ u HCl-u (pH < 1) uz jako miješanje na magnetskoj miješalici u cilju dobivanja temeljne otopine FeNTA. Postupak predzakiseljavanja i postupnog dodavanja otopine Na₃NTA ključan je kako bi izbjegli nastajanje netopljivih željezovih hidroksida. Otopine FeCl₃ i Na₃NTA pomiješane su u omjeru NTA : Fe = 2 : 1 kako bi se količina nekelatiranog željeza svela na minimum. pH konačne temeljne otopine FeNTA bio je 2,2 što je omogućilo dugotrajno skladištenje otopine FeNTA bez stvaranja hidroksida. Temeljna otopina FeNTA alikvotirana je u tubice zapremnine 500 μ L i skladištena na -20 °C do upotrebe.

Točna koncentracija željeza u temeljnoj otopini FeNTA određena je pomoću ICP-MS tehnike. Koncentracija željeza određena je za pet nasumičnih tubica te je na kraju izračunata srednja vrijednost koncentracije željeza. Sustav je kalibriran komercijalnim standardom željeza (Inorganic Ventures, 9992 ± 30 μ g/mL u 5% otopini HNO₃) koji je razrijeđen 100 puta u 1% v/v HNO₃ i uz pomoć kojeg je dobivena kalibracijska krivulja. Svaki uzorak FeNTA temeljne otopine razrijeđen je 1000 puta te je kao unutarnji standard korištena otopina germanija (Inorganic Ventures, 1001 ± 4 μ g/mL).

Radne otopine FeNTA pripremljene su razrjeđivanjem FeNTA temeljne otopine u puferu (0,1 M HEPES, 25 mM NaHCO₃, pH 7,4 ili 0,1 M HEPES, 25 mM K₂C₂O₄, pH 7,4) kako bi se pripremila otopina FeNTA koncentracije 4 mM. Dodaci FeNTA temeljne otopine u pufer iznosili su oko 3% (v/v). Kako bi pH otopine ostao 7,4 nakon dodatka kisele temeljne otopine FeNTA, pufer je predzakiseljen dodatkom nekoliko kapi 1 M NaOH. U suprotnom, ako bi se podešavao pH radne otopine FeNTA primijećeno je nastajanje netopljivog narančastog taloga željezova hidroksida. Stvaranje željezova hidroksida uzrokuje nestabilnost otopine FeNTA pri čemu se mijenja koncentracija otopljenih vrsta FeNTA. Nakon pripreme radnih otopina FeNTA, otopine su profiltrirane preko filtera za injekcijske šprice (FilterBio, PES, promjer 4 mm, veličina pora 0,22 μ m) te su spektrofotometrijski određene njihove koncentracije koristeći UV-Vis spektrofotometar (Varian Cary 50 Bio) i kvarcnu kivetu

(Hellma, 1 cm). Korišteni molarni apsorpcijski koeficijent za FeNTA iznosio je $\varepsilon(\text{FeNTA}, 260 \text{ nm}) = 6000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (139), a za NTA $\varepsilon(\text{NTA}, 260 \text{ nm}) = 31,2 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Molarni apsorpcijski koeficijent za NTA određen je iz otopine Na_3NTA poznate koncentracije. Postupak izračuna konačne koncentracije radne otopine FeNTA iz $A_{260 \text{ nm}}$ opisana je u poglavlju 3.3.5.

Radne otopine nativnog transferina pripravljene su otapanjem oko 9 mg komercijalnog apotransferina (Sigma) u puferu (0,1 M HEPES, 25 mM NaHCO_3 , pH 7,4 ili 0,1 M HEPES, 25 mM $\text{K}_2\text{C}_2\text{O}_4$, pH 7,4) kako bi pripravili 0,2 mM otopinu apotransferina. Određena količina vode dodana je u radnu otopinu kako bi razrjeđenje pufera bilo kao i u radnoj otopini FeNTA (oko 3%). Radne otopine desijaliniziranog transferina pripravljene su miješanjem određene količine koncentrata desijaliniziranog transferina u vodi čija je priprema opisana u poglavlju 3.3.1., i pufera, vodeći računa da razrjeđenje pufera bude jednako u svim radnim otopinama. Radne otopine pufera pripravljene su miješanjem pufera i vode u jednakim omjerima kao i kod apotransferina (oko 3% razrjeđenje pufera). pH otopina nativnog i desijaliniziranog transferina naknadno je podešen kako bi bio 7,4. Sve radne otopine profiltrirane su preko filtera za injekcijske šprice (FilterBio, PES, promjer 4 mm, veličina pora 0,22 μm). Koncentracija proteina određena je spektrofotometrijski u radnim otopinama nativnog i desijaliniziranog transferina koristeći molarni apsorpcijski koeficijent $\varepsilon(\text{apoTf}, 280 \text{ nm}) = 84,0 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (140).

3.3.5. Spektrofotometrijsko određivanje konačne koncentracije FeNTA u radnim otopinama

Iz Beer-Lambertova zakona slijedi da je:

$$\frac{A_{260 \text{ nm}}}{l} = \varepsilon_{260 \text{ nm}}(\text{NTA}) c(\text{NTA}) + \varepsilon_{260 \text{ nm}}(\text{FeNTA}) c(\text{FeNTA}) \quad (3.3.1.)$$

pri čemu NTA predstavlja sve NTA vrste u otopini FeNTA koje ne sadrže željezo, a FeNTA predstavlja sve NTA vrste u otopini FeNTA koje sadrže željezo. Detaljan prikaz ravnoteže u otopini FeNTA opisan je u poglavlju 3.5.1.

Ukupna koncentracija NTA jednaka je sumi koncentracije NTA vrsta i FeNTA vrsta:

$$c_{\text{tot}}(\text{NTA}) = c(\text{NTA}) + c(\text{FeNTA}) \quad (3.3.2.)$$

Izraz se može napisati kao razlika:

$$c(\text{NTA}) = c_{\text{tot}}(\text{NTA}) - c(\text{FeNTA}) \quad (3.3.3.)$$

Supstitucijom jednadžbe 3.3.3. u 3.3.1. dobivamo:

$$\begin{aligned} \frac{A_{260 \text{ nm}}}{l} = & \varepsilon_{260 \text{ nm}}(\text{NTA}) (c_{\text{tot}}(\text{NTA}) - c(\text{FeNTA})) \\ & + \varepsilon_{260 \text{ nm}}(\text{FeNTA}) c(\text{FeNTA}) \end{aligned} \quad (3.3.4.)$$

Iz izraza 3.3.4. moguće je dobiti konačni izraz za izračun koncentracije FeNTA:

$$c(\text{FeNTA}) = \frac{\frac{A_{260 \text{ nm}}}{l} - c_{\text{tot}}(\text{NTA}) \varepsilon_{260 \text{ nm}}(\text{NTA})}{\varepsilon_{260 \text{ nm}}(\text{FeNTA}) - \varepsilon_{260 \text{ nm}}(\text{NTA})} \quad (3.3.5.)$$

koji je korišten za izračun koncentracije radnih otopina FeNTA iz $A_{260 \text{ nm}}$ te korištenjem molarnih apsorpcijskih koeficijenata navedenih u poglavlju 3.3.4. Primjer UV/VIS spektra radne otopine FeNTA prikazan je na slici 7.2. u prilogu ovog rada.

3.3.6. Izotermna titracijska kalorimetrija

ITC titracije nativnog i desijaliniziranog transferina u prisutnosti karbonata ili oksalata provedene su koristeći PEAQ-ITC MicroCal kalorimetar (Malvern Panalytical Ltd.) koji sadrži ćeliju volumena 204,9 μL . Nakon filtracije radnih otopina sve radne otopine su degazirane u dva ciklusa pri čemu se svaki ciklus sastojao od degaziranja u ultrazvučnoj kupelji (Ultrasonic Cleaner, Sper Scientific Direct, 42000 Hz) u trajanju od 30 s, centrifugiranja (3 min na 14k RCF) i držanja uzoraka u vakuumu (3 min na -80 kPa). Titracije su provedene na $25 \text{ }^\circ\text{C}$ u 30 injekcija od kojih je dodani volumen titranta u prvoj injekciji iznosio 0,4 μL , a volumeni dodatka u ostalim injekcijama bili su 0,9 μL . Brzina miješanja iznosila je 750 RPM, a referentna snaga 20 μW . Razmak između injekcija bio je 300 sekundi, a trajanje injekcije 4 s (osim prve injekcije gdje je trajanje bilo 2 s). Titracije za svaku od četiri različite kombinacije desijaliniziranog i nativnog transferina te sinergijskog aniona rađene su u triplikatima ($n = 3$) ili kvadruplikatima ($n = 4$).

Od triju vrsta provedenih kontrolnih eksperimenata: pufer dodavan u pufer, pufer dodavan u ćeliju i titrant dodavan u ćeliju u kojoj je samo pufer, jedino je zadnji kontrolni

eksperiment gdje je FeNTA dodavan u ćeliju bez transferina (samo pufer) rezultirao značajnim toplinskim promjenama ($>10 \mu\text{J/injekciji}$). Kod ostalih kontrolnih eksperimenata toplinske promjene bile su nesigifikantne ($\pm 0.5 \mu\text{J/injekciji}$).

3.4. Analiza termodinamičkih podataka

3.4.1. Obrada termograma i utočnjavanje termodinamičkih parametara (N , $\Delta_r H^\circ$, K_d)

Svi signali dobivenih termograma integrirani su metodom „point to point“ te su oduzete vrijednosti toplinskih promjena kontrolnih eksperimenata od odgovarajućih vrijednosti toplinskih promjena testnih eksperimenata. Podaci su analizirani pomoću programa MicroCal PEAQ-ITC Analysis Software (v. 1,30). Analiza je obuhvaćala integraciju signala, oduzimanje kontrolnih eksperimenata te utočnjavanje termodinamičkih parametara kako bi odgovarali modelu s dva neidentična vezna mjesta.

Pomoću navedenog modela, optimalne parametre moguće je dobiti simpleks ili Levenberg-Marquardt algoritmom pronalaska minimuma. Termodinamički parametri koji su dobiveni su: broj veznih mjesta (N), standardna reakcijska entalpija ($\Delta_r H^\circ$), konstanta disocijacije (K_d) te „offset“. Prva tri navedena parametra dobivena su za oba vezna mjesta čime je broj utočnjenih termodinamičkih parametara iznosio sedam. „Offset“ označava konstantnu toplinu prisutnu kroz titraciju, a većinom se može pripisati toplini razrjeđenja. Kako su sva mjerenja rađena minimalno u triplikatima, njihove vrijednosti izražene su kao srednje vrijednosti sa standardnim devijacijama u zagradama. Ostali termodinamički parametri: standardna reakcijska entropija i Gibbsova energija ($\Delta_r S^\circ$ i $\Delta_r G^\circ$) izračunati su iz srednjih vrijednosti utočnjenih termodinamičkih parametara vodeći računa o propagaciji pogreške kao što je opisano u sljedećem poglavlju.

3.4.2. Izračun termodinamičkih parametara ($\Delta_r S^\circ$ i $\Delta_r G^\circ$) i propagacija pogreške

Sve titracije su provedene na $25 \text{ }^\circ\text{C}$, uz mala odstupanja ($\leq 0,3 \text{ }^\circ\text{C}$). Budući da je vrijednost termodinamičke temperature potrebna za izračun slobodne Gibbsove energije, termodinamička temperatura izračunata je kao:

$$T(\text{K}) = t(^{\circ}\text{C}) + 273,15 \text{ K} \quad (3.4.1.)$$

a srednja vrijednost termodinamičke temperature i njena standardna devijacija kao:

$$\bar{T} = \frac{\sum_{i=1}^n T_n}{n} \quad (3.4.2.)$$

$$s(T) = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (T_n - \bar{T})^2} \quad (3.4.3.)$$

pri čemu je n broj replikata pojedinog mjerenja.

Standardna reakcijska Gibbsova energija može se izračunati iz termodinamičke konstante ravnoteže prema jednadžbi (1.5.2.). Koncentracijska konstanta ravnoteže dovodi se u vezu s termodinamičkom preko koeficijenata aktiviteta pomoću jednadžbe:

$$K^\circ = K_\gamma K_c \quad (3.4.4.)$$

pri čemu K_γ predstavlja umnožak koeficijenata aktiviteta sudionika reakcije potenciranih njihovim stehiometrijskim koeficijentom. Uz pretpostavku da su koeficijenti aktiviteta za sve sudionike promatranih reakcija prikazanih u jednadžbama 3.5.16. i 3.5.26. približno jednaki 1, vrijedi da je $K^\circ \approx K_c$, pri čemu se pretpostavlja idealnost sustava. Uz takvu pretpostavku standardna reakcijska Gibbsova energija izračunata je iz vrijednosti ravnotežne konstante K_d kao:

$$\Delta_r G^\circ = RT \ln K_d \quad (3.4.5.)$$

pri čemu se za istu vrijednost standardna devijacija može izraziti kao:

$$s(\Delta_r G^\circ) = s(RT \ln K_d) = |RT \ln K_d| \sqrt{\left(\frac{s(T)}{T}\right)^2 + \left(\frac{s(\ln K_d)}{\ln K_d}\right)^2 + 2\text{COV}(RT, \ln K_d)} \quad (3.4.6.)$$

A standardna devijacija za $\ln K_d$ jednaka je:

$$s(\ln K_d) = \frac{s(K_d)}{K_d} \quad (3.4.7.)$$

Produkt standardne reakcijske entropije s temperaturom izražen je preko jednadžbe:

$$T \Delta_r S^\circ = \Delta_r H^\circ - \Delta_r G^\circ \quad (3.4.8.)$$

Pri čemu je standardna devijacija za taj izraz izračunata kao:

$$s(T \Delta_r S^\circ) = \sqrt{s(\Delta_r H^\circ)^2 + s(\Delta_r G^\circ)^2 - 2\text{COV}(\Delta_r H^\circ, \Delta_r G^\circ)} \quad (3.4.9.)$$

Kovarijancija u prethodnim izrazima i u svim sljedećima u ovome radu izražena je kao maksimum Cauchy-Schwarzove nejednakosti preko jednadžbe:

$$\text{COV}(X, Y) \leq \sqrt{s(X)^2 s(Y)^2} \quad (3.4.10.)$$

Standardna reakcija entropija jednostavno je izračunata kao:

$$\Delta_r S^\circ = \frac{T\Delta_r S^\circ}{T} \quad (3.4.11.)$$

dok je standardna devijacija za standardnu reakcijsku entropiju izračunata kao:

$$s(\Delta_r S^\circ) = |\Delta_r S^\circ| \sqrt{\left(\frac{s(T\Delta_r S^\circ)}{T\Delta_r S^\circ}\right)^2 + \left(\frac{s(T)}{T}\right)^2 + \frac{2\text{COV}(T\Delta_r S^\circ, T)}{T^2\Delta_r S^\circ}} \quad (3.4.12.)$$

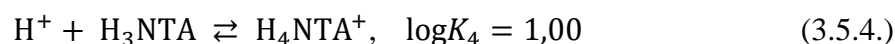
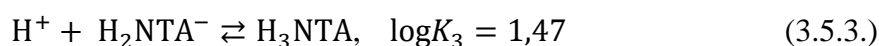
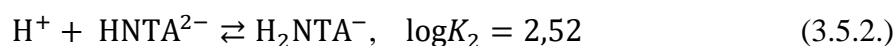
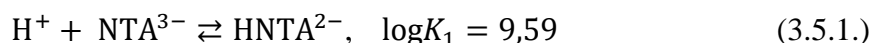
3.5. Izračun konstanti u sustavu transferina i željezova(III) nitrilotriacetata

Iz kalorimetrijske titracije ljudskog serumskog transferina željezom u kompleksu sa nitrilotriacetatom moguće je dobiti dvije konstante vezanja. Konstante opisuju vezanje FeNTA na C- ili na N-kraj transferina, pri čemu se NTA otpušta iz kompleksa. Sam proces osim željeza i transferina stoga uključuje i NTA. Kako bi kvantificirali afinitet transferina prema željezu, potrebno je sagledati ukupnu ravnotežu koja uključuje i sve pH ovisne NTA- i FeNTA-vrste u otopini, odnosno izraziti kondicionalnu konstantu pri danim uvjetima.

Budući da se vezanje željeza na transferin događa na dva vezna mjesta, uz pretpostavku neidentičnih veznih mjesta i kooperativnosti, razlikujemo ukupno dvije makroskopske i četiri mikroskopske konstante vezanja ovisno o tome kojim redoslijedom se željezo veže u koje vezno mjesto (141).

3.5.1. Ravnoteža u otopini željezova(III) nitrilotriacetata

Ravnoteže koje se odnose na disocijaciju H_4NTA^+ u vodenim otopinama su (142):



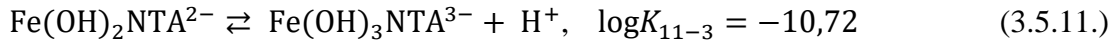
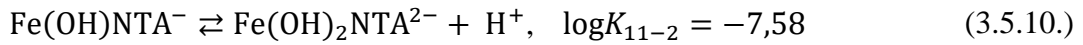
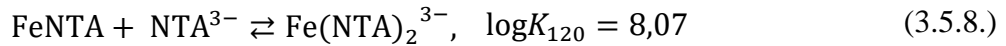
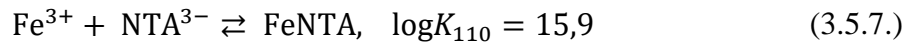
Pri čemu je suma koncentracija svih vrsta prisutnih u otopini NTA jednaka:

$$[\text{HNTA}]_{\text{total}} = [\text{NTA}^{3-}] + [\text{HNTA}^{2-}] + [\text{H}_2\text{NTA}^-] + [\text{H}_3\text{NTA}] + [\text{H}_4\text{NTA}^+] \quad (3.5.5.)$$

Vrijednost koeficienta disocijacije (α) za vrstu NTA^{3-} može se izraziti kao omjer $[\text{NTA}^{3-}]$ i $[\text{HNNTA}]_{\text{total}}$:

$$\alpha_{\text{NTA}^{3-}}^{-1} = \frac{[\text{HNNTA}]_{\text{total}}}{[\text{NTA}^{3-}]} = 1 + [\text{H}^+]K_1 + [\text{H}^+]^2K_1K_2 + [\text{H}^+]^3K_1K_2K_3 + [\text{H}^+]^4K_1K_2K_3K_4 \quad (3.5.6.)$$

Ravnoteže koje se odnose na otopinu FeNTA su (142, 143):



Pri čemu je suma koncentracija svih vrsta koje uključuju NTA i Fe jednaka:

$$\begin{aligned} [\text{FeNTA}]_{\text{total}} = & [\text{FeNTA}] + [\text{Fe}(\text{NTA})_2^{3-}] + [\text{Fe}(\text{OH})\text{NTA}^-] \\ & + [\text{Fe}(\text{OH})_2\text{NTA}^{2-}] + [\text{Fe}(\text{OH})_3\text{NTA}^{3-}] \\ & + 2[(\text{Fe}(\text{OH})\text{NTA})_2^{2-}] \end{aligned} \quad (3.5.13.)$$

Vrijednost koeficienta α za vrstu FeNTA može se izraziti kao omjer $[\text{FeNTA}]$ i $[\text{FeNTA}]_{\text{total}}$:

$$\begin{aligned} \alpha^{-1}(\text{FeNTA}) = \frac{[\text{FeNTA}]_{\text{total}}}{[\text{FeNTA}]} = & 1 + K_{120} [\text{NTA}^{3-}] + \frac{K_{11-1}}{[\text{H}^+]} + \frac{K_{11-1}K_{11-2}}{[\text{H}^+]^2} + \\ & + \frac{K_{11-1}K_{11-2}K_{11-3}}{[\text{H}^+]^3} + 2 \frac{K_{22-2} K_{110} [\text{Fe}^{3+}] [\text{NTA}^{3-}]}{[\text{H}^+]^2} \end{aligned} \quad (3.5.14.)$$

Pri niskim koncentracijama Fe i NTA korištenim u ovome radu zadnji član je zanemariv te se izraz svodi na:

$$\begin{aligned} \alpha^{-1}'(\text{FeNTA}) = \frac{[\text{FeNTA}]_{\text{total}}}{[\text{FeNTA}]} & \quad (3.5.15.) \\ = 1 + \frac{K_{11-1}}{[\text{H}^+]} + \frac{K_{11-1}K_{11-2}}{[\text{H}^+]^2} + \frac{K_{11-1}K_{11-2}K_{11-3}}{[\text{H}^+]^3} \end{aligned}$$

i konstantan je pri fiksnom pH.

3.5.2. Efektivne konstante vezanja i propagacija pogreške

U narednim izrazima radi jednostavnosti izostavljeni su naboji pojedinih vrsta. Vezanje željeza u formi FeNTA na C-kraj transferina može se opisati kao:



pri čemu konstanta vezanja za taj proces u kombinaciji s jednadžbama 3.5.6. i 3.5.15. glasi:

$$K_{\text{FeNTA-Tf}} = \frac{[\text{FeTf}] [\text{NTA}]}{[\text{apoTf}] [\text{FeNTA}]} = \frac{[\text{FeTf}] [\text{NTA}]_{\text{total}} \alpha(\text{NTA})}{[\text{apoTf}] [\text{FeNTA}]_{\text{total}} \alpha(\text{FeNTA})} \quad (3.5.17.)$$

a $[\text{NTA}]_{\text{total}}$ i $[\text{FeNTA}]_{\text{total}}$ su ukupne koncentracije svih NTA i FeNTA vrsta. Kondicionalna konstanta (koja vrijedi pri specifičnom pH) za vezanje željeza u formi FeNTA na transferin glasi:

$$K'_{\text{FeNTA-Tf}} = K_{\text{FeNTA-Tf}} \frac{\alpha(\text{FeNTA})}{\alpha(\text{NTA})} = \frac{[\text{FeTf}] [\text{NTA}]_{\text{total}}}{[\text{apoTf}] [\text{FeNTA}]_{\text{total}}} \quad (3.5.18.)$$

Kombinacijom jednadžbe 3.5.7. s jednadžbama 3.5.6. i 3.5.15. dobivamo:

$$K'_{110} = \frac{[\text{FeNTA}]_{\text{total}}}{[\text{Fe}] [\text{NTA}]_{\text{total}}} = \frac{[\text{FeNTA}] \alpha(\text{NTA})}{[\text{Fe}] [\text{NTA}] \alpha(\text{FeNTA})} = K_{110} \frac{\alpha(\text{NTA})}{\alpha(\text{FeNTA})} \quad (3.5.19.)$$

Konstanta 3.5.19. je pH ovisna i njenom perturbacijom moguće je dobiti izraz:

$$\frac{[\text{NTA}]_{\text{total}}}{[\text{FeNTA}]_{\text{total}}} = \frac{\alpha(\text{FeNTA})}{[\text{Fe}] K_{110} \alpha(\text{NTA})} \quad (3.5.20.)$$

Vezanje slobodnog željeza(III) na C-kraj apotransferina opisuje izraz:



Čija je efektivna konstanta:

$$K_{\text{app,C}} = \frac{[\text{FeTf}]}{[\text{Fe}] [\text{apoTf}]} \quad (3.5.22.)$$

Supstitucijom jednadžbe 3.5.20. u jednadžbu 3.5.18. dobiva se:

$$K'_{\text{FeNTA-Tf}} = \frac{K_{\text{app,C}} \alpha(\text{FeNTA})}{K_{110} \alpha(\text{NTA})} \quad (3.5.23.)$$

Pri čemu je moguće efektivnu konstantu vezanja na C-kraj transferina izraziti kao:

$$K_{\text{app,C}} = \frac{K'_{\text{FeNTA-Tf}} K_{110} \alpha(\text{NTA})}{\alpha(\text{FeNTA})} \quad (3.5.24.)$$

Logaritamski oblik jednadžbe 3.5.24. glasi:

$$\log K_{\text{app,C}} = \log K'_{\text{FeNTA-Tf}} + \log K'_{110} \quad (3.5.25.)$$

Obzirom na to da se vezanje FeNTA na N-kraj transferina pri uvjetima u ITC eksperimentu događa nakon što je željezo već vezano na C-kraj, izraz za vezanje drugog željeza(III) glasi:



pri čemu je kondicionalna konstanta vezanja za taj izraz jednaka:

$$K'_{\text{FeNTA-FeTf}} = \frac{[\text{Fe}_2\text{Tf}] [\text{NTA}]_{\text{total}}}{[\text{FeTf}] [\text{FeNTA}]_{\text{total}}} \quad (3.5.27.)$$

Jednadžba vezanja slobodnog željeza(III) na N-kraj transferina jednaka je:



a odgovara efektivnoj konstanti vezanja:

$$K_{\text{app,N}} = \frac{[\text{Fe}_2\text{Tf}]}{[\text{Fe}] [\text{FeTf}]} \quad (3.5.29.)$$

Ponovno, supstitucijom jednadžbe 3.5.20. u jednadžbu 3.5.27. dobivaju se sljedeći izrazi:

$$K'_{\text{FeNTA-FeTf}} = \frac{K_{\text{app,N}} \alpha(\text{FeNTA})}{K_{110} \alpha(\text{NTA})} \quad (3.5.30.)$$

$$K_{\text{app,N}} = \frac{K'_{\text{FeNTA-FeTf}} K_{110} \alpha(\text{NTA})}{\alpha(\text{FeNTA})} \quad (3.5.31.)$$

$$\log K_{\text{app,N}} = \log K'_{\text{FeNTA-FeTf}} + \log K'_{110} \quad (3.5.32.)$$

Kondicionalne konstante $\log K'_{\text{FeNTA-Tf}}$ i $\log K'_{\text{FeNTA-FeTf}}$ odgovaraju asocijacijskim konstantama koje se dobiju iz disocijacijskih konstanti K_d za C- i N-vezno mjesto.

Konstanta asocijacije može se dobiti iz konstante disocijacije kao:

$$K_a = \frac{1}{K_d} \quad (3.5.33.)$$

ili u logaritamskom obliku:

$$\log K_a = -\log K_d \quad (3.5.34.)$$

Standardne devijacije logaritamskih vrijednosti jednake su:

$$s(K_a) = s(K_d) \quad (3.5.35.)$$

Standardne devijacije za izraze 3.5.25. i 3.5.32. stoga glase:

$$s(\log K_{app}) = \sqrt{s(\log K_d)^2 + s(\log(K'_{110}))^2 - 2COV(\log K_d, \log K'_{110})} \quad (3.5.36.)$$

Pri čemu se vrijednosti K_d razlikuju ovisno o tome radi li se o vezanju na C- ili N-vezno mjesto te vrijedi da je:

$$s(\log K_d) = \frac{s(K_d)}{K_d \ln 10} \quad (3.5.37.)$$

Procijenjena vrijednost za standardnu devijaciju $\log K'_{110}$ je 0,01 (142).

3.5.3. Makroskopske konstante vezanja, frakcijska zasićenost i propagacija pogreške

Makroskopske konstante vezanja (slika 3.1.) za vezanje prvog (K_1) i drugog (K_2) iona željeza(III) mogu se dobiti iz ITC mjerenja. Asocijacijske konstante vezanja računaju se iz logaritma disocijacijskih konstanti pri čemu asocijacijska konstanta vezanja za vezanje transferina na C-kraj iznosi:

$$K_C = \frac{1}{10^{\log K_D}} \quad (3.5.38.)$$

Izraz je analogan za N-kraj transferina.

Konstante K_C i K_N opisuju ravnotežu prilikom vezanja željeza na C- i N-kraj transferina s time da se pritom ne razlikuju konstante k_{1C} i k_{2C} (slika 3.1.). Slijedi da je $K_C = k_{1C} = k_{2C}$, i $K_N = k_{1N} = k_{2N}$. Makroskopske konstante vezanja mogu se izračunati uz pretpostavku dva neidentična vezna mjesta kao (44, 141):

$$K_1 = k_{1C} + k_{1N} = K_C + K_N \quad (3.5.39.)$$

$$K_2 = \frac{k_{2C} k_{2N}}{k_{2C} + k_{2N}} = \frac{K_C K_N}{K_C + K_N} \quad (3.5.40.)$$

Efektivne konstante vezanja definirane jednadžbama 3.5.25. i 3.5.32. opisuju vezanje željeza na C- i N-kraj transferina uz pretpostavku da se željezo prvo veže na C-kraj transferina, odnosno nastaje vrsta FeC Tf , a zatim se veže na N-kraj transferina, odnosno nastaje vrsta Fe_2Tf . Navedena pretpostavka vrijedi ukoliko je konstanta $K_C \gg K_N$. Ako se definira R kao omjer konstanti K_C i K_N :

$$R = \frac{K_C}{K_N} \quad (3.5.41.)$$

omjer makroskopske konstante K_1 i konstante K_C može se definirati kao:

$$\frac{K_1}{K_C} = \frac{R + 1}{R} \quad (3.5.42.)$$

a omjer makroskopske konstante K_2 i konstante K_N kao:

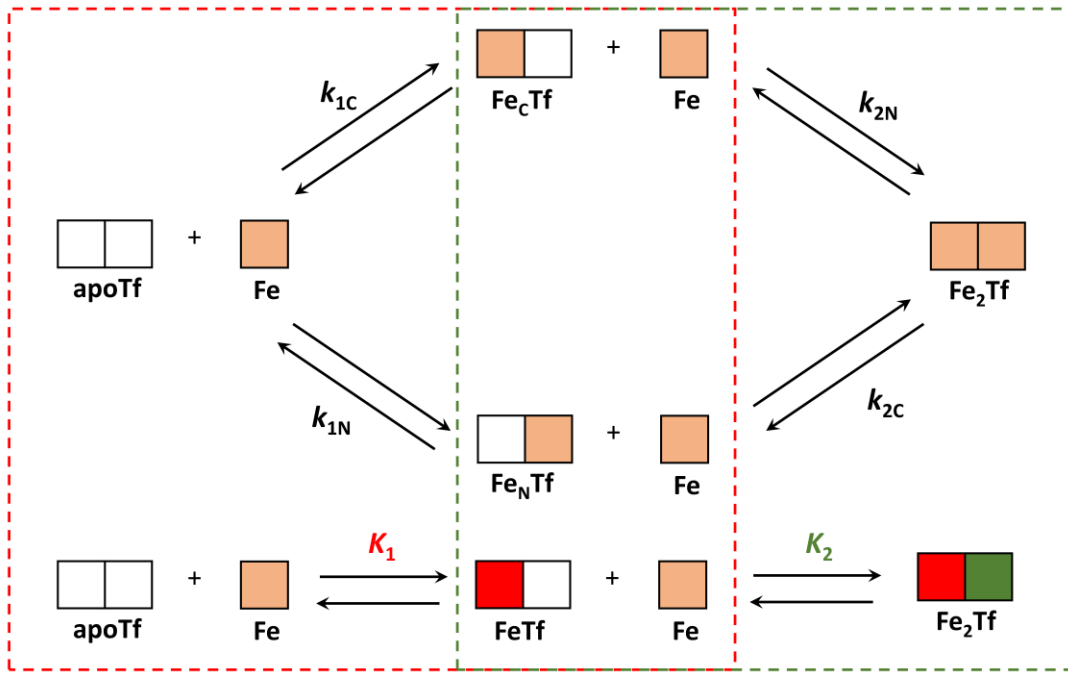
$$\frac{K_2}{K_N} = \frac{R + 1}{R} \quad (3.5.43.)$$

pri čemu vrijedi da ukoliko je vrijednost $R \approx 100$, greška u vrijednostima $K_{\text{app,C}}$ i $K_{\text{app,N}}$, odnosno u pretpostavci da se željezo prvo veže na C-kraj transferina, a zatim na N-kraj iznosi oko 1%. Što je vrijednost R veća, navedena greška je manja.

Makroskopske konstante mogu se izraziti kao efektivne makroskopske konstante na jednak način kao što je to opisano u poglavlju 3.5.2. Efektivne makroskopske konstante jednake su:

$$\log K'_1 = \log K_1 + \log K'_{110} \quad (3.5.44.)$$

$$\log K'_2 = \log K_2 + \log K'_{110} \quad (3.5.45.)$$



Slika 3.1. Shematski prikaz mikroskopskih (k_{1C} , k_{2C} , k_{1N} , k_{2N}) i makroskopskih (K_1 , K_2) konstanti vezanja željeza na ljudski serumski transferin. Crveni iscrtkani pravokutnik opisuje makroskopsku konstantu vezanja za vezanje prvog željeza na ljudski serumski transferin (K_1), dok zeleni iscrtkani pravokutnik opisuje vezanje drugog željeza na ljudski serumski transferin (K_2).

Frakcijska zasićenost kompleksa FeTf pri polovici popunjenosti svih veznih mjesta na transferinu, $F(\text{FeTf})$, može se izračunati preko jednadžbe (144):

$$F(\text{FeTf}) = \frac{K_1}{2\sqrt{K_1 K_2} + K_1} \quad (3.5.46.)$$

Asocijacijske konstante vezanja (K_C and K_N) dovode se u vezu sa $\log K_D$ vrijednostima preko jednadžbe 3.5.38. Propagacija pogreške za K_C i K_N opisana je u sljedećim jednadžbama:

$$K_C = \frac{1}{10^{\log K_D}} = 10^{\log K_A} \quad (3.5.47.)$$

$$K_N = \frac{1}{10^{\log K_D}} = 10^{\log K_A} \quad (3.5.48.)$$

$$s(K_C) = 10^{\log K_A} \ln 10 s(\log K_A) \quad (3.5.49.)$$

$$s(K_N) = 10^{\log K_A} \ln 10 s(\log K_A) \quad (3.5.50.)$$

Prema izrazu 3.5.39., slijedi da je propagacije pogreške za K_1 jednaka:

$$s(K_1) = \sqrt{s^2(K_N) + s^2(K_C) + 2\text{COV}(K_C, K_N)} \quad (3.5.51.)$$

dok je prema izrazu 3.5.40., propagacija pogreške za K_2 prikazana sljedećim jednadžbama:

$$\frac{\partial K_2}{\partial K_N} = \frac{\partial \left(\frac{K_N K_C}{K_N + K_C} \right)}{\partial k_N} = \frac{K_C^2}{(K_N + K_C)^2} \quad (3.5.52.)$$

$$\frac{\partial K_2}{\partial K_C} = \frac{\partial \left(\frac{K_N K_C}{K_N + K_C} \right)}{\partial k_C} = \frac{K_N^2}{(K_N + K_C)^2} \quad (3.5.53.)$$

$$s(K_2)^2 = \left(\frac{\partial K_2}{\partial K_N} s(K_N) \right)^2 + \left(\frac{\partial K_2}{\partial K_C} s(K_C) \right)^2 + 2 \frac{\partial K_2}{\partial K_C} \frac{\partial K_2}{\partial K_N} \text{COV}(K_C, K_N) \quad (3.5.54.)$$

$$s(K_2) = \sqrt{\left(\frac{\partial K_2}{\partial K_N} s(K_N) \right)^2 + \left(\frac{\partial K_2}{\partial K_C} s(K_C) \right)^2 + 2 \frac{\partial K_2}{\partial K_C} \frac{\partial K_2}{\partial K_N} \text{COV}(K_C, K_N)} \quad (3.5.55.)$$

Propagacija pogreške za logaritamske vrijednosti K_1 i K_2 je:

$$s(\log(K_1)) = \frac{s(K_1)}{\ln(10)K_1} \quad (3.5.56.)$$

$$s(\log(K_2)) = \frac{s(K_2)}{\ln(10)K_2} \quad (3.5.57.)$$

dok je propagacija pogreške za logaritamske vrijednosti K'_1 i K'_2 :

$$s(\log(K'_1)) = \sqrt{s(K_1)^2 + s(K'_{110})^2 + \text{COV}(K_1, K'_{110})} \quad (3.5.58.)$$

$$s(\log(K'_2)) = \sqrt{s(K_2)^2 + s(K'_{110})^2 + \text{COV}(K_1, K'_{110})} \quad (3.5.59.)$$

Uzevši u obzir izraz za frakcijsku popunjenost kompleksa pri polovici zasićenja (3.5.46.), propagacija pogreške može se odrediti sljedećim jednadžbama:

$$\frac{\partial F(\text{FeTf})}{\partial K_1} = \frac{\partial \left(\frac{K_1}{2\sqrt{K_1 K_2} + K_1} \right)}{\partial K_1} = \frac{\sqrt{K_1 K_2}}{(2\sqrt{K_1 K_2} + K_1)^2} \quad (3.5.60.)$$

$$\frac{\partial F(\text{FeTf})}{\partial K_2} = \frac{\partial \left(\frac{K_1}{2\sqrt{K_1 K_2} + K_1} \right)}{\partial K_2} = - \frac{K_1^2}{\sqrt{K_1 K_2} (2\sqrt{K_1 K_2} + K_1)^2} \quad (3.5.61.)$$

$$s(F(\text{FeTf})) = \sqrt{\left(s(K_1) \frac{\partial F(\text{FeTf})}{\partial K_1} \right)^2 + \left(s(K_2) \frac{\partial F(\text{FeTf})}{\partial K_2} \right)^2 + 2\text{COV}(K_1, K_2) \frac{\partial F(\text{FeTf})}{\partial K_1} \frac{\partial F(\text{FeTf})}{\partial K_2}} \quad (3.5.62.)$$

3.6. Procjena reakcijskih brzina i morfologije signala

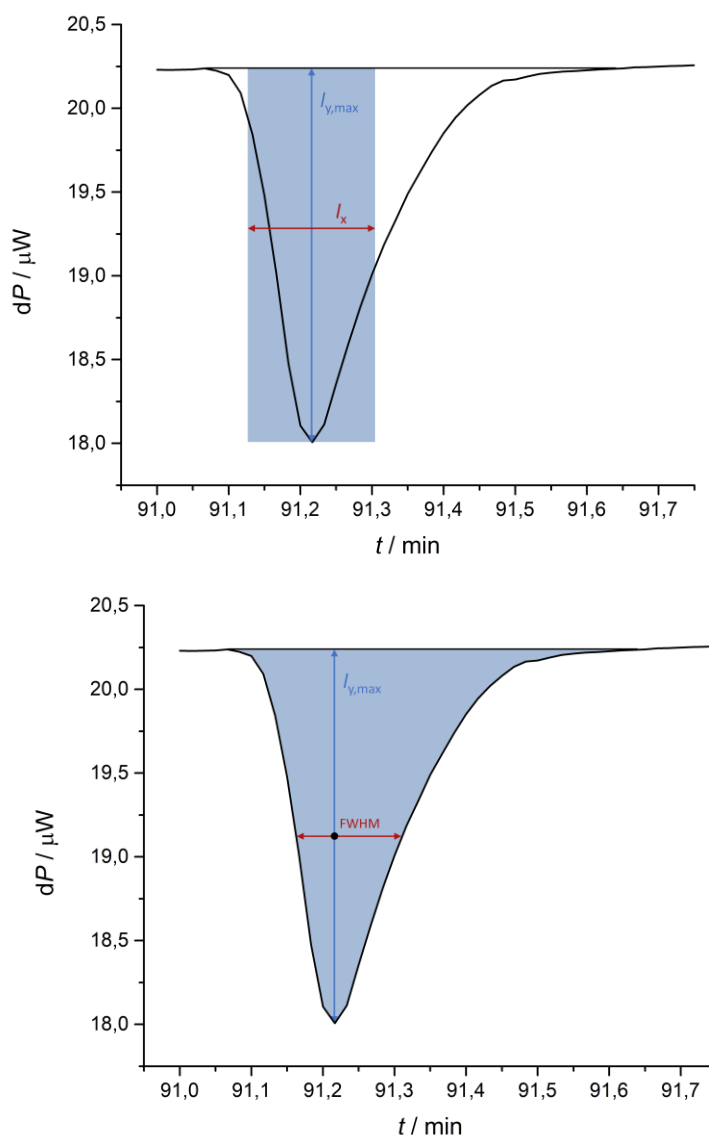
Za usporedbu morfologije signala u različitim ITC eksperimentima definiran je parametar l_x (vagana širina) kao omjer topline oslobođene po pojedinom signalu (ΔQ) i visine tog signala ($l_{y,\max}$) prema jednadžbi:

$$l_x = \frac{\Delta Q}{l_{y,\max}} \quad (3.6.1.)$$

Matematička reprezentacija parametra l_x je širina pravokutnika čija je površina jednaka površini integriranog signala i koji ima istu visinu kao i integrirani signal (slika 3.6.1.). Parametar l_x predstavlja količinu topline oslobođenu u jedinici primijene diferencijalne snage te njegova vrijednost može biti indicacija razlike u kinetici toplinskih promjena. Dimenzija parametra l_x je sekunda pri čemu veće vrijednosti parametra označavaju sporiju, a manje vrijednosti bržu toplinsku promjenu.

Parametar l_x određen je za sve testne ITC eksperimente za signal koji odgovara drugoj injekciji na C-kraju transferina te za egzotermni signal na N-kraju transferina koji odgovara molarnom omjeru FeNTA : transferin $\approx 1,6$. Kako bi se odredila visina signala ($l_{y,\max}$) prvo su određene vrijednosti dP koje odgovaraju baznoj liniji i maksimumu signala, a zatim je iz njihove razlike dobivena visina. Vrijednost ΔQ odgovara integriranom egzotermnom dijelu analiziranih signala.

Uz parametar l_x , parametar FWHM (engl. *full width half maximum*), odnosno širina signala na pola visine (slika 3.2.), procijenjen je za iste signale u testnim ITC eksperimentima. Postupak određivanja FWHM sastojao se od određivanja visine signala (udaljenost od minimuma signala do bazne linije), određivanja polovice visine signala (množenje s faktorom 0,5) te određivanja pripadajućih x-vrijednosti koje odgovaraju širini pika na pola visine.



Slika 3.2. Shematski prikaz parametara l_x (gore) i FWHM (dolje). Površina plave regije jednaka je u obje slike te odgovara površini integriranog signala. Vrijednost $l_{y,max}$ označava visinu signala.

3.7. Statistička analiza

Statistička analiza rađena je uz pomoć dodatka *Real Statistics Resource Pack* u programu *Microsoft Excel* (145). Dvosmjerna analiza varijancije (engl. *Two-way analysis of variance, ANOVA*) provedena je kako bi se evaluirao utjecaj sijalinizacije i aniona (te njihove interakcije) na termodinamičke parametre ($\Delta_r H^\circ$, $\log K_{app}$, $-T\Delta_r S^\circ$, $\Delta_r S^\circ$, l_x , i FWHM). Svaki od

dva faktora imao je dvije razine: sijalinizacija Tf+s ili Tf-s, a sinergijski anion karbonat ili oksalat. Budući da su vrijednosti $\log K_{app}$, $-T\Delta_r S^\circ$ i $\Delta_r S^\circ$ računane iz srednjih vrijednosti $\Delta_r H^\circ$ i K_d , za statističku analizu generirani su ekvivalentni surogat podaci s jednakom srednjom vrijednosti i standardnom devijacijom kao i originalni podaci (146). Dvosmjerna ANOVA provedena je uz razinu značajnosti od $\alpha = 0,05$ koja označava 5% vjerojatnosti da se dođe do zaključka da postoji statistički značajna razlika, iako je nema (pogreška tipa I). Za vrijednosti čija je vrijednost $p \leq \alpha$ vrijedi da postoji statistički značajna razlika među mjerenjima. Statistička značajnost interakcijskog člana označava da jedan faktor ovisi o razini drugog faktora, primjerice statistički je značajna razlika nekog parametra kod različite sijalinizacije ovisno o tome je li sinergijski anion oksalat ili karbonat. Kao mjera veličine učinka te kako bi se odredila količina varijancije objašnjena pojedinim faktorom, računat je i parametar ω_p^2 . To je jedan od manje pristranih statističkih parametra za izražavanje veličine učinka, osobito za mali broj uzoraka. Za razliku od ω^2 koji se koristi za usporedbu efekata unutar iste studije, ω_p^2 koristi se za usporedbu efekata među različitim studijama koje imaju isti eksperimentalni dizajn (147, 148).

Obzirom na to da rezultati dvosmjerne analize varijancije pokazuju efekt jednog faktora prema uprosječenom drugom faktoru, osim dvosmjerne analize varijancije provedena je i jednosmjerna. Kao rezultat jednosmjerne analize varijancije moguće je primjerice dobiti razinu značajnosti razlike nekog termodinamičkog parametra sijaliniziranog prema desijaliniziranom transferinu za svaki anion zasebno. Obzirom da jednosmjerna ANOVA analizira dva zasebna faktora, razina značajnosti koja određuje pogrešku tipa I određena je kao $\alpha/2 = 0,025$ (149). Slično kao i kod dvosmjerne ANOVE, veličina učinka izražena je preko manje pristrane ω^2 vrijednosti za izražavanje veličine učinka (147). Vrijednosti koje karakteriziraju male, jake i velike učinke kod interpretacije vrijednosti ω^2 i ω_p^2 su 0,01, 0,06 i 0,016 (150).

Pretpostavke koje vrijede za podatke analizirane uz pomoću ANOVE su normalna raspodjela podataka, nezavisnost podataka, izostanak „outliera“ te homogenost varijancija, odnosno homoskedastičnost. Iako je ANOVA znana kao metoda koja je robustna za mala odstupanja od normalnosti, heteroskedastičnost podataka može imati nepovoljan utjecaj na zaključke o pogrešci tipa I. Radi toga je na navedenim podacima provedena i Welch-James statistička analiza koja je također robustna statistička metoda, ali pretpostavlja heteroskedastičnost podataka i procjenjuje stupnjeve slobode. Za jednosmjernu ANOVU korišten je Welch test koji je uključen u dodatku *Real Statistics Resource Pack* u programu *Microsoft Excel* (145), dok je za dvosmjernu ANOVU korišten Welch test iz *welchADF* dodatka za program R (151).

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Rezultati enzimske desijalinizacije

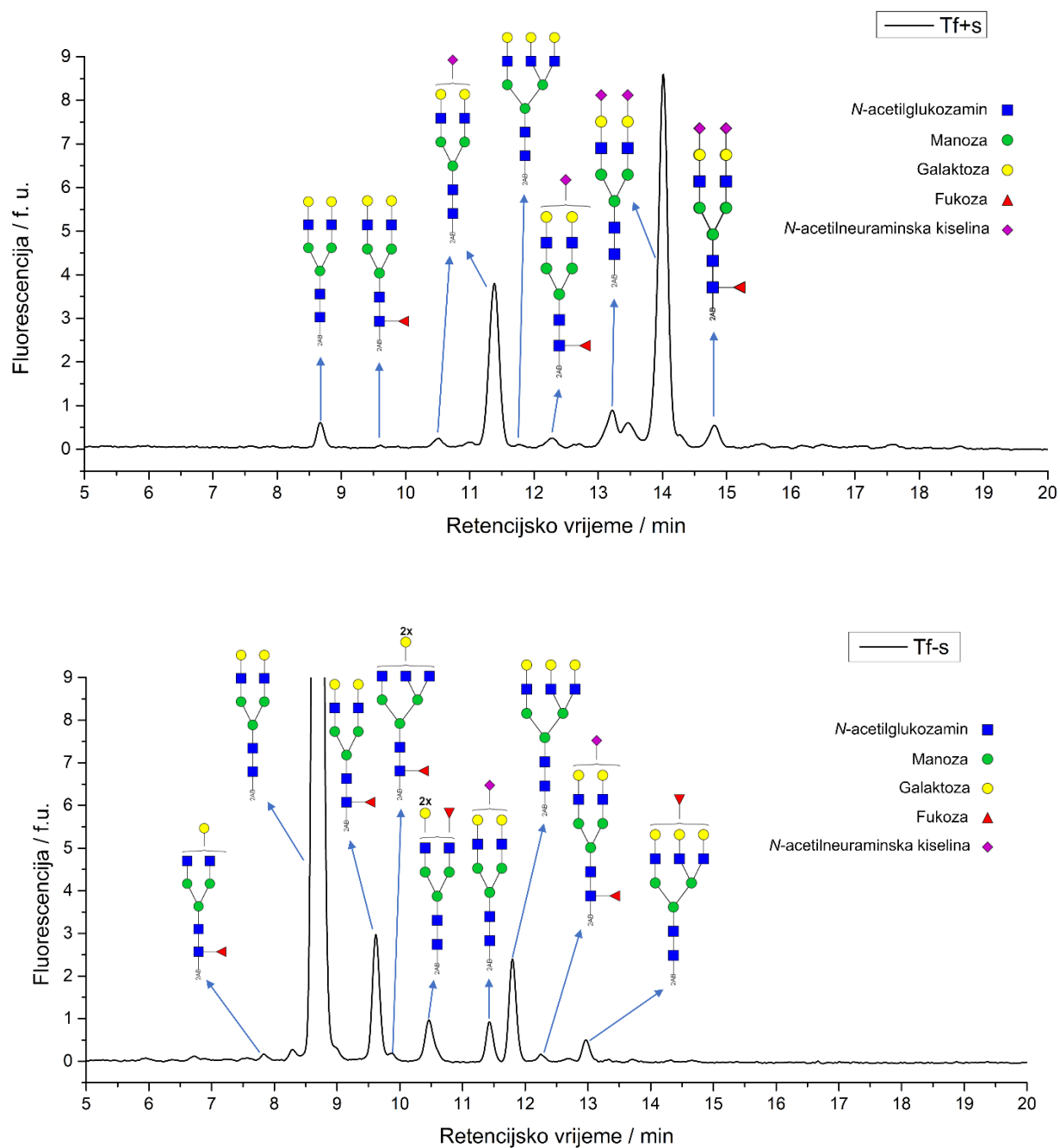
Nakon identifikacije N-glikana na kromatogramu dobivenom pomoću UHPLC-a, signali su integrirani u rasponu od 4-20 min. Kromatogram je sadržavao i intenzivan signal na oko 0,7 min koji odgovara slobodnom 2-aminobenzamidu koji se koristio za fluorescentno obilježavanje. Nakon integracije signala, određen je sadržaj pojedinog glikana u odnosu na ukupni integral. Na slici 4.1. prikazan je kromatogram koji je rezultat UHPLC analize nativnog i desijaliniziranog transferina zajedno sa strukturama glikana koji odgovaraju pojedinim signalima.

U tablici 4.1. izražen je sadržaj svakog N-glikana. Najzastupljeniji glikani u nativnom transferinu su biantenarni sijalizirani glikani (A2G2S2 i A2G2S1) sa oko 70%. Posljedično, najzastupljeniji glikani kod desijaliniziranog transferina su biantenarni bez sijalinske kiseline (A2G2 i FA2G2). Asignirani signali prikazani u tablici 4.1. čine >93% ukupnog integrala za nativni transferin, a >99% za desijalinizirani transferin. Ostatak UHPLC signala (oko 6,2% za Tf+s i oko 0,4% za Tf-s) nisu asignirani budući da njihova retencijska vremena nisu odgovarala retencijskim vremenima glikana prethodno određenih UHPLC-MS analizom (138), te su strukture tih glikana nepoznate.

Indeks sijalinizacije (*IS*) računat je za nativni i desijalinizirani transferin prema formuli:


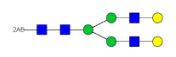
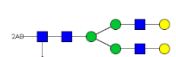




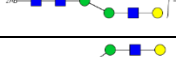
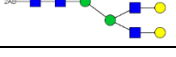
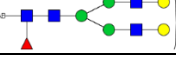


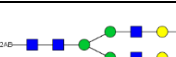

$$IS = \sum_{i=1}^n f_i \cdot s_i \quad (4.1.1.)$$

pri čemu je n broj različitih N-glikana na transferinu, f_i udio pojedinog glikana, a s_i broj sijalinskih kiselina na tom glikanu. Vrijednosti *IS* za nativni i desijalinizirani transferin potvrdile su smanjenje udjela sijalinskih kiselina enzimskom desijalinizacijom na glikanima za oko 99%. Vrijednosti *IS* za nativni i desijalinizirani transferin izražene su u tablici 4.1.



Slika 4.1. Prikaz retencijskog vremena i struktura različitih N-glikana nativnog apotransferina (Tf+s, gore) i desijaliniziranog transferina (Tf-s, dolje) kao rezultat UHPLC analize.

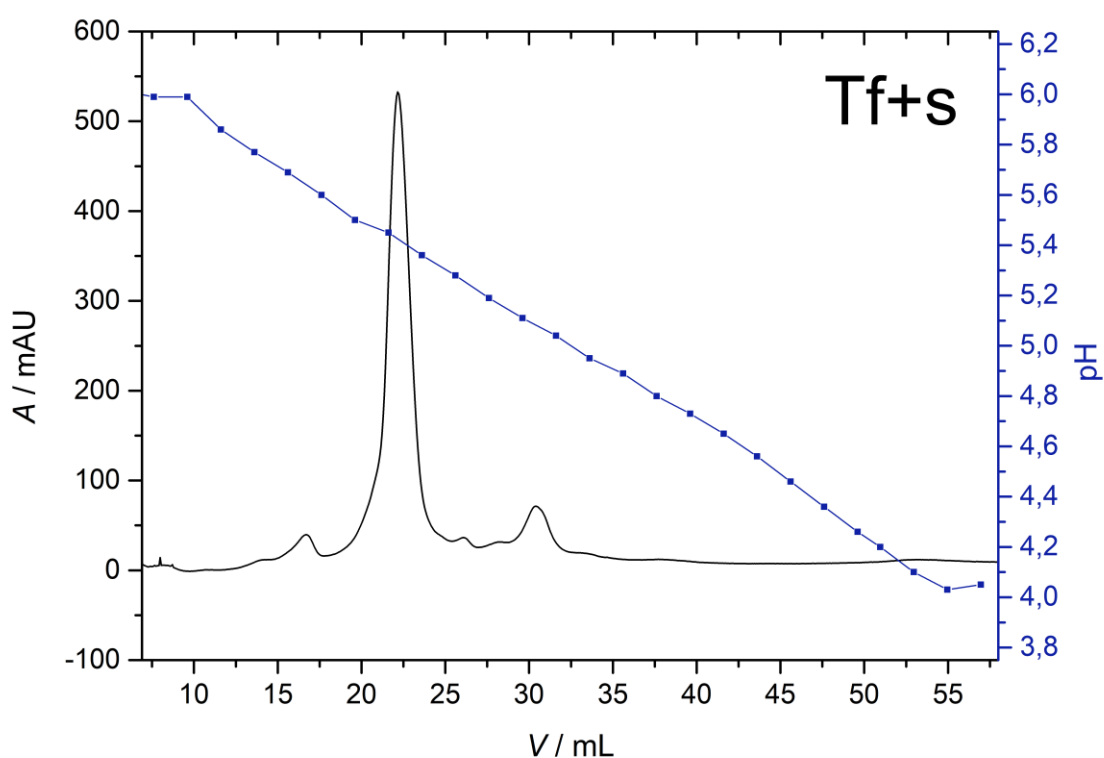
Tablica 4.1. Strukture i sadržaj N-glikana u nativnom i desijaliziranom apotransferinu određen pomoću UHPLC analize te asigniran prema prethodnim MS rezultatima (138). Sadržaj pojedinog N-glikana određen je iz pripadajućeg signala integriranog UHPLC fluorescencijskog signala. Vrijednost *IS* označava indeks sijalinizacije (138).

Sadržaj N-glikana*	Shematski prikaz strukture N-glikana**	Nativni apotransferin (Tf+s), <i>IS</i> = 127,79, <i>pI</i> = 5,4		Desijalizirani apotransferin (Tf-s), <i>IS</i> = 1,51, <i>pI</i> = 6,8	
		Retencijsko vrijeme / min	Sadržaj / %	Retention time/ min	Content/ %
FA2G1		/	/	7,70-7,95	0,25
A2G2		8,53-8,85	2,98	8,40-9,30	87,24
FA2G2		9,50-9,70	0,39	9,38-9,80	4,41
FA3G2		/	/	9,81-10,03	0,25
A2F1G2		/	/	10,18-10,71	1,76
A2G2S1		10,30-10,67	1,68	11,28-11,61	1,29
A2G2S1		11,13-11,68	24,15	/	/
A3G3		11,70-11,90	0,54	11,63-12,02	3,41
FA2G2S1		12,00-12,50	2,08	12,03-12,40	0,23
A3F1G3		/	/		
A2G2S2		12,96-13,35	6,28	/	/
A2G2S2		13,70-14,24	51,82	/	/
FA2G2S2		14,48-15,02	3,91	/	/
A3F1G3		/	/	12,82-13,15	0,74
Neasignirano			6,17		0,42

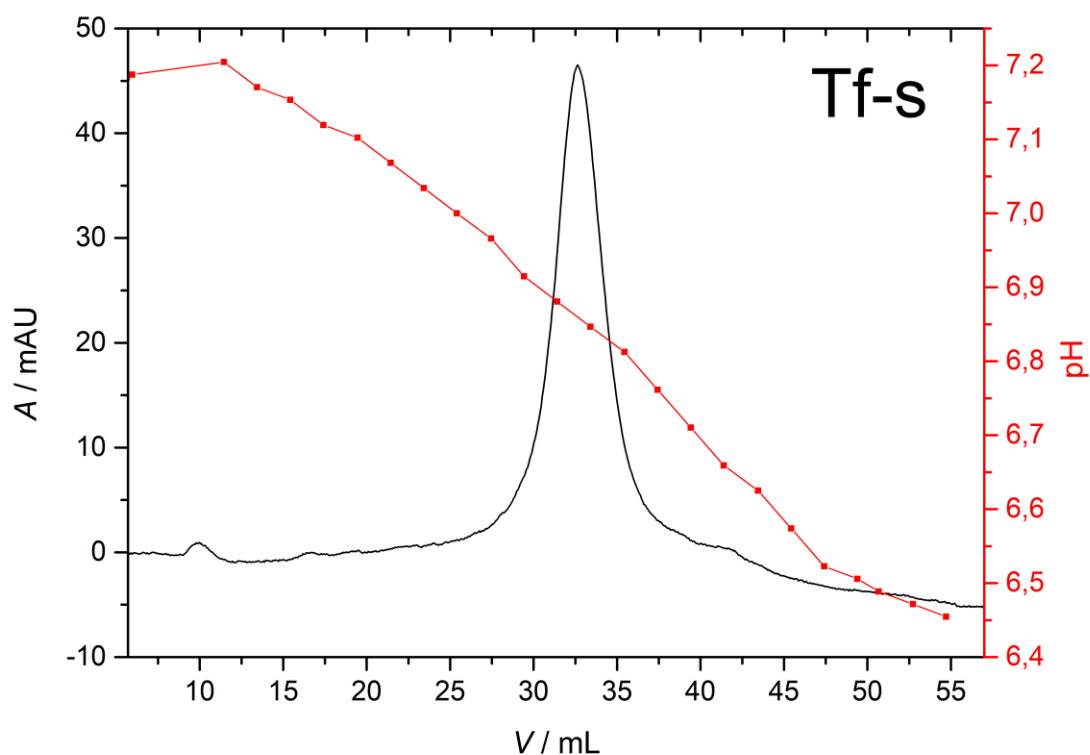
* Kratice struktura: svi N-glikani imaju dva bazna *N*-acetilglukozamina (GlcNAc); Ax, broj (x) antena (GlcNAc) na trimanoznoj bazi; A2, biantenarni sa oba GlcNAc vezana kao β 1,2; A3, triantenarni s dva GlcNAc vezana kao β 1,2 na manoze, a trećim GlcNAc vezanim kao β 1,4 na α 1,3 vezanu manozu; Gx, broj (x) β 1,4 vezanih galaktoza na antenama; F(x), broj (x) fukoza vezanih α 1,3 na antene GlcNAc; Sx, broj (x) sijalinskih kiselina vezanih na galaktoze.

** Shematski prikaz struktura N-glikana: *N*-acetilglukozamin (■), manoz (●), galaktoza (●), fukoza (▼), sijalinska kiselina (◆).

Rezultati kromatofokusiranja povrdili su uspješnost desijalinizacije. pI vrijednosti za nativni i desijalinizirani transferin razlikovale su se za više od jedne pH jedinice što je omogućavalo razlikovanje dviju formi ljudskog serumskog transferina. pI vrijednost za nativni transferin iznosila oko 5,4, a za desijalinizirani transferin oko 6,8. Kromatogram za nativni transferin prikazan je na slici 4.2., a za desijalinizirani transferin na slici 4.3. pI vrijednost za nativni transferin u dobrom je slaganju sa vrijednosti pI (5,5) koja je kromatofokusiranjem određena za tetrasijalotransferin kao najzastupljeniju glikoformu nativnog transferina (123). Isto tako, određena pI vrijednost za desijalinizirani transferin slična je vrijednosti pI (6,9) određenoj za asialoformu ljudskog serumskog transferina (152).



Slika 4.2. Kromatogram ionske izmjene nativnog apotransferina u gradijentu pH (tehnika FPLC). Određena pI vrijednost za nativni apotransferin iznosi $\approx 5,4$.



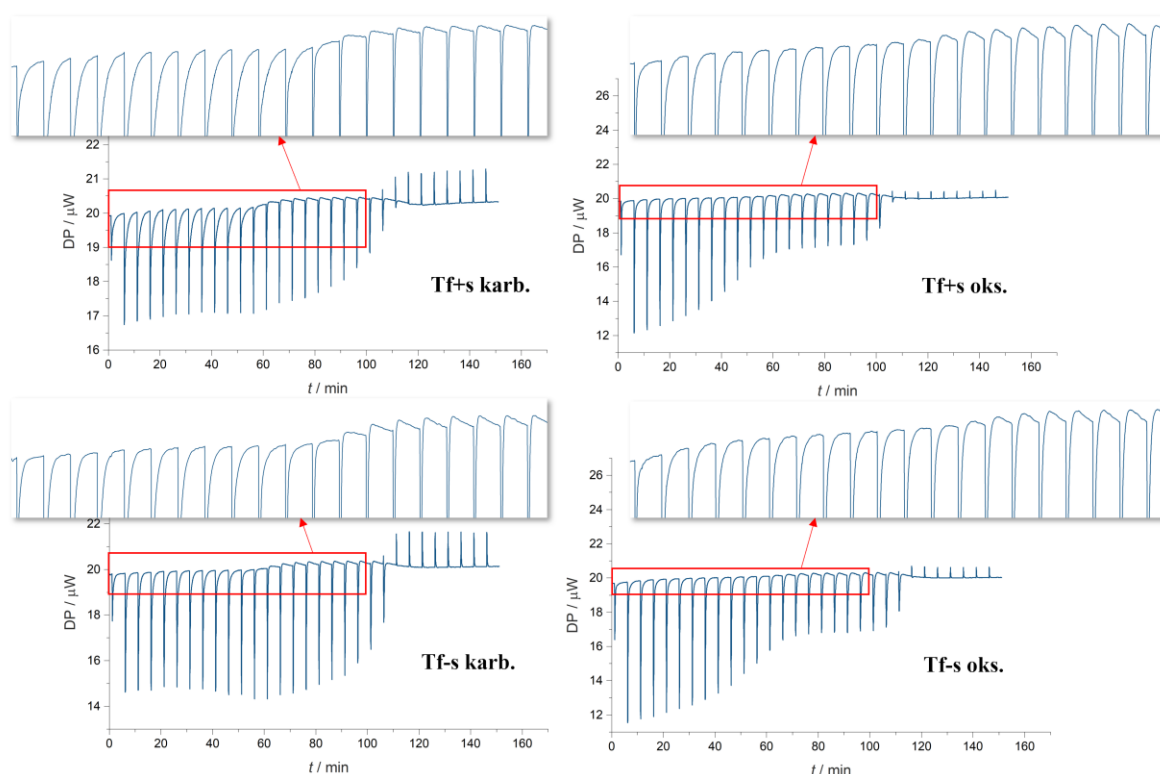
Slika 4.3. Kromatogram ionske izmjene desijaliniziranog apotransferina u gradijentu pH (tehnika FPLC). Određena pI vrijednost za desijalinizirani apotransferin iznosi $\approx 6,8$.

4.2. Rezultati termodinamike vezanja FeNTA na ljudski serumski transferin

4.2.1. Termodinamički parametri

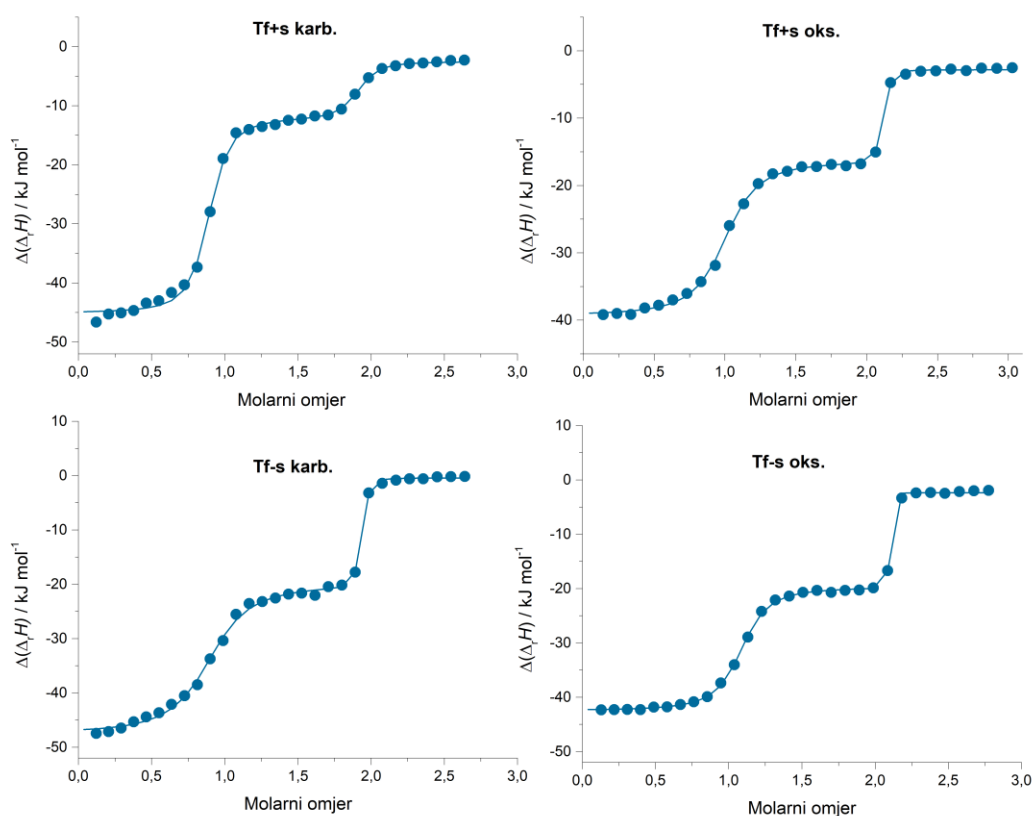
Termogrami kalorimetrijskih titracija Tf+s i Tf-s u prisutnosti karbonata ili oksalata prikazani su na slikama 7.3. do 7.6. u prilogu ovog rada. Na slici 4.4. prikazan je po jedan od multiplikata titracije za svaku od različitih kombinacija uvjeta sijalinizacije/aniona. Titracije su rezultirale sličnim profilima signala kao što su primijećeni kod Lina i suradnika na primjeru ljudskog serumskog transferina i ovotransferina (35, 130). Faze koje su oni primijetili (i) brza faza koja odgovara kontaktnom reverzibilnom vezanju FeNTA na vezno mjesto željeza te (ii) spora faza koja odgovara zamjeni NTA sinergijskim anionom, primijećene su i u provedenim titracijama. Prva serija injekcija stoga odgovara zasićenju C-kraja transferina te je odlikuju brzi egzotermni signali popraćeni sporim egzotermnim signalima. Sporu fazu na C-kraju transferina dosad su primijetili Lin i suradnici na primjer u ovotransferina, ali ne i ljudskog serumskog transferina (35, 130). Druga serija injekcija odgovara zasićenju N-kraja transferina te ju

karakteriziraju brzi egzotermni signali popraćeni sporim endotermnim signalima. Opisani signali koji karakteriziraju vezanje FeNTA na N-kraj transferina primijećeni su ranije kod vezanja na ovotransferin i ljudski serumski transferin (35, 130). Kontrolni eksperimenti (prikazani na slikama 7.3. do 7.6. u Prilogu ovog rada) koji su se sastojali od dodatka radne otopine FeNTA u radnu otopinu pufera rezultirali su brzim endotermnim signalima. Jednaki signali primijećeni su na kraju svakog eksperimenta što je bila potvrda kraja titracije. Pojava endotermnih prilika titracije transferina sa FeNTA popraćena je i molarnim omjerom $\text{Fe:Tf} \approx 2:1$, što je dodatna potvrda potpunog zasićenja transferina.



Slika 4.4. ITC termogrami koji su rezultat titracije nativnog (Tf+s) i desijaliniziranog (Tf-s) ljudskog serumskog apotransferina pomoću FeNTA pri 25 °C, u puferu sastava 0,1 M HEPES, 25 mM sinergijski anion: karbonat (karb.) ili oksalat (oks.), pH 7,4.

Integracijom signala termograma provedenih eksperimenata i oduzimanjem integriranih signala termograma pripadajućih kontrolnih eksperimenata od eksperimenatalnih dobivena je ovisnost promjene sukcesivne entalpije o množinskom omjeru titranta (FeNTA) i proteina. Slika 4.5. pokazuje promjenu sukcesivne entalpije o $n(\text{Fe})/n(\text{Tf})$ za titracije prikazane na slici 4.4. Ostatak grafova koji pokazuju istu ovisnost za preostale multiplikate titracija prikazan je na slikama 7.7. do 7.10. u prilogu ovog rada.



Slika 4.5. Ovisnost promjene sukcesivne entalpije o množinskom omjeru FeNTA i Tf nakon oduzimanja pripadajućih kontrolnih eksperimenata. Prikazani podaci proizlaze iz termograma prikazanih na slici 4.4. Kružići označavaju eksperimentalne toplinske promjene, dok linija označava izračunate vrijednosti dobivene uz izračunate termodinamičke parametre.

Iz ovisnosti sukcesivne entalpije o molarnom omjeru vidljivo je kako su sve provedene titracije rezultirale sličnim profilima iz kojih se mogu iščitati dva termodinamički različita koraka prilikom zasićenja transferina. Iz titracije koju su proveli Lin i suradnici (35) poznato je kako veću entalpiju vezanja ima C-kraj transferina, a manju N-kraj. Taj odnos je jednak među svim provedenim titracijama, odnosno među svim kombinacijama sijalinizacije/sinergijskog aniona (slika 4.5.). Ipak, već sa slike 4.5. vidljivo je kako je za očekivati različite vrijednosti entalpija vezanja za različite kombinacije sijalinizacije/sinergijskog aniona. To je i potvrđeno računanjem entalpije vezanja za reakciju.

Rezultati izračuna termodinamičkih parametara pomoću programa Malvern MicroCal PEAQ-ITC Analysis software (verzija 1,30) kao i detaljni eksperimentalni podaci za svaku pojedinu titraciju prikazani su u tablicama 7.1. i 7.2. u prilogu ovog rada. Termodinamički

parametri dobiveni iz ITC podataka na način kako je to opisano u poglavlju 3.4. prikazani su u tablici 4.2. Tablica 4.3. prikazuje rezultate dvosmjerne ANOVE za termodinamičke parametre $\Delta_r H^\circ$, $\Delta_r G^\circ$, $-T\Delta_r S^\circ$ i $\Delta_r S^\circ$, dok su u tablicama 4.4. i 4.5. prikazani rezultati jednosmjerne ANOVE za iste parametre.

Rezultati dvosmjerne ANOVE sugeriraju kako su oba faktora (sijalinizacija i sinergijski anion) statistički značajni za vrijednosti efektivnih entalpija vezanja na C-kraj ($p < 0,001$ i $\omega^2_p \geq 0,836$). Sijalinizacija je statistički značajna i za vrijednosti efektivnih entalpija vezanja na N-kraj ($p < 0,001$ i $\omega^2_p = 0,877$). Slika 4.6. (gore) pobliže prikazuje usporedbu efektivnih entalpija vezanja u provedenim titracijama ovisno o sijalinizaciji/sinergijskom anionu. Vidljivo je kako vezanje FeNTA na transferin postaje egzotermnije ako se radi o desijaliniziranom transferinu, a ne nativnom, i to neovisno o tome o kojem veznom mjestu je riječ te koji sinergijski anion je prisutan. Navedeno je potvrđeno i u rezultatima jednosmjerne ANOVE ($p \leq 0,003$ i $\omega^2 \geq 0,805$).

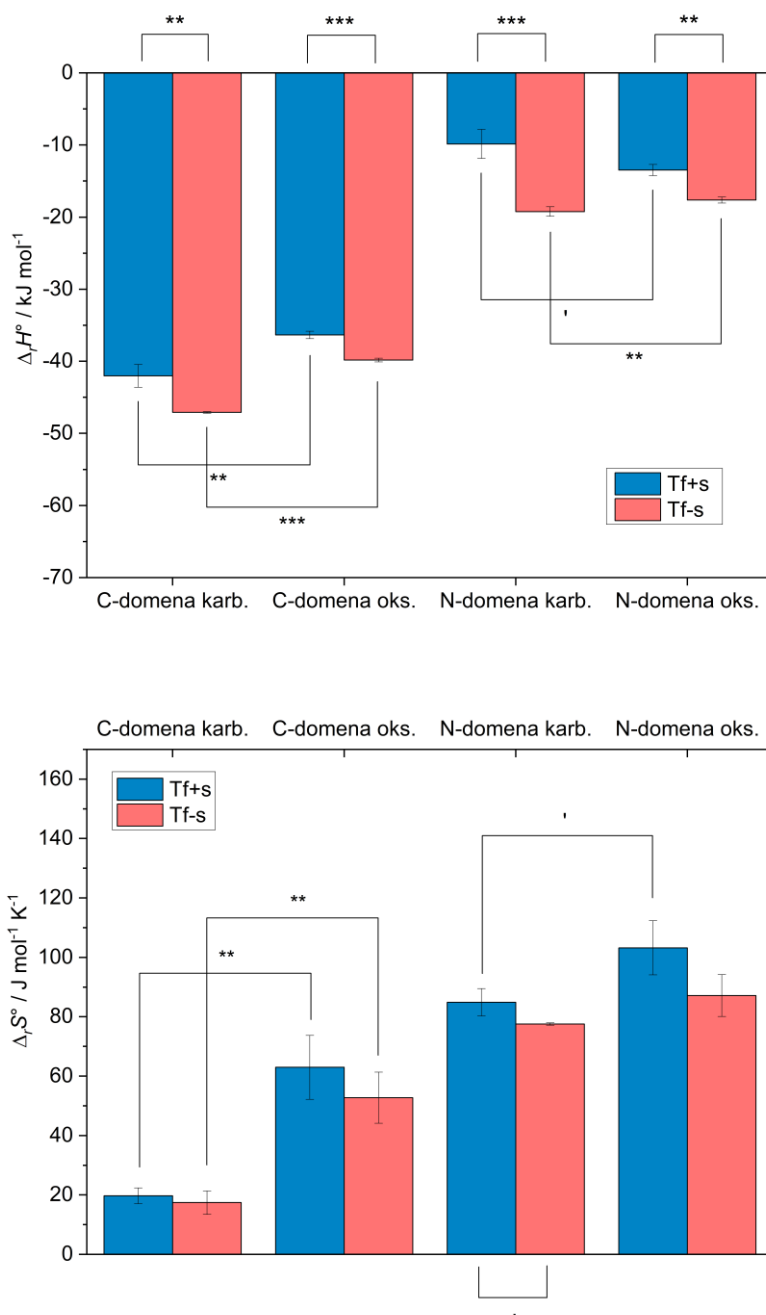
Kad se uspoređuju efektivne entalpije vezanja ovisno o tome u prisutnosti kojeg sinergijskog aniona se vezanje događa, vidljivo je kako je, neovisno o sijalinizaciji, vezanje na C-kraj egzotermnije u prisutnosti karbonata od oksalata ($p \leq 0,002$ i $\omega^2 \geq 0,829$). Na N-veznom mjestu efekt je jednak za desijalinizirani transferin: u prisutnosti karbonata vezanje je egzotermnije, nego u prisutnosti oksalata ($p = 0,009$, $\omega^2 = 0,785$).

Rezultati dvosmjerne ANOVE pokazali su kako je sinergijski anion signifikantan faktor za vrijednosti entropije vezanja za C-vezno mjesto transferina ($p < 0,001$, $\omega^2_p = 0,839$). Izračunate vrijednosti za efektivnu entropiju vezanja prikazane su u tablici 4.2. i na slici 4.6. (dolje) te je vidljivo kako je u prisutnosti oksalata na C-kraju veća entropija vezanja, nego u prisutnosti karbonata, neovisno o sijalinizaciji (obje vrijednosti $p \leq 0,006$, $\omega^2 \geq 0,817$). Taj efekt je signifikantan za C-kraj transferina, dok je za N-kraj manje izražen. Neovisno o sijalinizaciji i sinergijskom anionu, vrijednosti entropije vezanja veće su za N-kraj transferina od C-kraja. Razlika u sijalinizaciji nema signifikantan utjecaj na vrijednosti entropije vezanja.

Rezultati dodatne statističke analize koje su se temeljile na primjeni Welchova testa nisu pokazale velike razlike u odnosu na rezultate ANOVE. U nekim slučajevima, p vrijednosti dobivene Welchovim testom bile su veće od rezultata standardne ANOVE, što može ukazati na to su podaci manje prikladni za ANOVU, moguće zbog malog broja replikata. Isto tako, vrijednosti koje su bile ispod granice značajnosti za ANOVU bile su ispod granice značajnosti i za Welchov test. Navedeno se odnosi i na ostale podatke dobivene Welchovim testom u ovome radu, osim gdje je drugačije opisano. Drugi nepristrani statistički parametri poput ω^2 i ω^2_p mogu pomoći u određivanju značajnosti rezultata.

Tablica 4.2. Izračunati termodinamički parametri iz ITC podataka za vezanje FeNTA na nativni (Tf+s) ili desijalinizirani (Tf-s) apotransferin u puferu sastava: 0,1 M HEPES, 25 mM karbonat/oksalat, pH 7,4. Termodinamički parametri su izraženi kao srednje vrijednosti iz barem 3 replikata mjerenja sa standardnom devijacijom prikazanom u zagradi.

Vezno mjesto	Parametri	Tf+s		Tf-s	
		Karbonat	Oksalat	Karbonat	Oksalat
	t (°C)	25,15 (0,06)	25,20 (0,10)	25,17 (0,06)	25,23 (0,06)
	N (veznih mjesta)	0,89 (0,06)	0,97 (0,04)	0,86 (0,01)	1,02 (0,04)
	$\Delta_r H^\circ$ (kJ/mol)	-42,03 (1,56)	-36,37 (0,51)	-47,10 (0,10)	-39,83 (0,25)
C-kraj	$\Delta_r G^\circ$ (kJ/mol)	-47,91 (0,77)	-55,15 (3,72)	-52,29 (1,27)	-55,56 (2,82)
	$-T\Delta_r S^\circ$ (kJ/mol)	-5,89 (0,79)	-18,78 (3,21)	-5,19 (1,17)	-15,72 (2,56)
	$\Delta_r S^\circ$ (J/mol K)	19,74 (2,66)	62,95 (10,77)	17,41 (3,93)	52,70 (8,60)
	N (veznih mjesta)	1,08 (0,06)	1,06 (0,06)	1,05 (0,01)	1,02 (0,02)
	$\Delta_r H^\circ$ (kJ/mol)	-9,85 (2,03)	-13,47 (0,78)	-19,23 (0,67)	-17,63 (0,42)
N-kraj	Offset (kJ/mol)	-1,63 (1,21)	-2,25 (2,07)	0,47 (0,79)	-2,16 (0,26)
	$\Delta_r G^\circ$ (kJ/mol)	-35,17 (0,65)	-44,26 (3,48)	-42,37 (0,78)	-43,64 (2,52)
	$-T\Delta_r S^\circ$ (kJ/mol)	-25,32 (1,38)	-30,80 (2,71)	-23,14 (0,11)	-26,00 (2,10)
	$\Delta_r S^\circ$ (J/mol K)	84,88 (4,63)	103,23 (9,10)	77,56 (0,40)	87,14 (7,05)



Slika 4.6. Prikaz termodinamičkih parametara za vezanje FeNTA na nativni (Tf+s) i desijalinizirani (Tf-s) apotransferin u prisutnosti karbonata (karb.) i oksalata (oks.). **Gore:** efektivne entalpije vezanja ($\Delta_r H^\circ$), **dolje:** efektivne entropije vezanja ($\Delta_r S^\circ$). Stupci pogreške ukazuju na standardnu devijaciju izmjerenih vrijednosti. Statistička značajnost među izmjerenim vrijednostima označena je simbolima prema: $p < 0,001$ (***), $p < 0,01$ (**), $p < 0,025$ (*), $p < 0,1$ (').

Tablica 4.3. Rezultati dvosmjerne ANOVE za parametre $\Delta_r H^\circ$, $\Delta_r G^\circ$, $-T\Delta_r S^\circ$ i $\Delta_r S^\circ$.

Parametar	Vezno mjesto	Faktor	ANOVA ($\alpha = 0,05$)			Welch ($\alpha = 0,05$)	
			$\omega^2 p$	p^*	Signifikantnost**	p	Signifikantnost**
$\Delta_r H^\circ$	C-	Sijalinizacija	0,836	<0,001	***	<0,001	***
		Anion	0,920	<0,001	***	<0,001	***
		Interakcija	0,081	0,176		0,143	
	N-	Sijalinizacija	0,877	<0,001	***	<0,001	***
		Anion	0,087	0,169		0,130	
		Interakcija	0,489	0,005	**	0,006	**
$\Delta_r G^\circ$	C-	Sijalinizacija	0,089	0,166		0,232	
		Anion	0,433	0,009	**	0,034	*
		Interakcija	0,042	0,243		0,308	
	N-	Sijalinizacija	0,248	0,047	*	0,102	
		Anion	0,482	0,006	**	0,029	*
		Interakcija	0,333	0,023	*	0,066	‘
$-T\Delta_r S^\circ$	C-	Sijalinizacija	0,056	0,216		0,279	
		Anion	0,840	<0,001	***	0,001	***
		Interakcija	-0,024	0,424		0,477	
	N-	Sijalinizacija	0,356	0,019	*	0,045	*
		Anion	0,452	0,008	**	0,025	*
		Interakcija	0,011	0,311		0,356	
$\Delta_r S^\circ$	C-	Sijalinizacija	0,056	0,217		0,279	
		Anion	0,839	<0,001	***	<0,001	***
		Interakcija	-0,024	0,424		0,477	
	N-	Sijalinizacija	0,355	0,019	*	0,045	*
		Anion	0,449	0,008	**	0,026	*
		Interakcija	0,011	0,313		0,358	

* p vrijednosti manje od 0,001 prikazane su kao <0,001.

** Oznake signifikantnosti: 0 (***), 0,001 (**), 0,01 (*), 0,05 (‘), 0,1 (), 1.

Tablica 4.4. Rezultati jednosmjerne ANOVE za parametre $\Delta_r H^\circ$ i $\Delta_r G^\circ$.

Parametar	Vezno mjesto	Faktor	Uzorak	ANOVA ($\alpha = 0,025$)			Welch ($\alpha = 0,025$)		Komentar	
				ω^2	p	Signifikantnost	p	Signifikantnost		
$\Delta_r H^\circ$	C	Sijalinizacija	Karbonat	0,805	0,003	**	0,007	**	Tf-s egzotermniji	
			Oksalat	0,955	<0,001	***	0,004	**	Tf-s egzotermniji	
		Anion	Tf+s	0,829	0,002	**	0,003	**	Karbonat egzotermniji	
			Tf-s	0,998	<0,001	***	<0,001	***	Karbonat egzotermniji	
		Sijalinizacija	Karbonat	0,889	<0,001	***	0,001	**	Tf-s egzotermniji	
			Oksalat	0,924	0,001	**	0,012	**	Tf-s egzotermniji	
	N	Anion	Tf+s	0,510	0,035	‘	0,030	‘	Oksalat egzotermniji (granični p)	
			Tf-s	0,785	0,009	**	0,037	‘	Karbonat egzotermniji (granični p)	
	$\Delta_r G^\circ$	C	Sijalinizacija	Karbonat	0,755	0,005	**	0,023	*	Tf-s egzergoniji
				Oksalat	-0,196	0,908		0,908		
Anion			Tf+s	0,568	0,024	*	0,107		Oksalat egzergoniji	
		Tf-s	0,171	0,209		0,239				
N		Sijalinizacija	Karbonat	0,947	<0,001	***	0,001	***	Tf-s egzergoniji	
			Oksalat	-0,190	0,846		0,847			
	Anion	Tf+s	0,715	0,008	**	0,063	‘	Oksalat egzergoniji		
Tf-s		-0,099	0,535		0,558					

* p vrijednosti manje od 0,001 prikazane su kao <0,001.

** Oznake signifikantnosti: 0 (***) 0,001 (**) 0,01 (*) 0,025 (‘) 0,1 () 1.

Tablica 4.5. Rezultati jednosmjerne ANOVE za parametre $-T\Delta_r S^\circ$ i $\Delta_r S^\circ$.

Parametar	Vezno mjesto	Faktor	Uzorak	ANOVA ($\alpha = 0,025$)			Welch ($\alpha = 0,025$)		Komentar
				ω^2	p	Signifikantnost	p	Signifikantnost	
$-T\Delta_r S^\circ$	C	Sijalinizacija	Karbonat	-0,057	0,466		0,514		
			Oksalat	0,017	0,352		0,355		
		Anion	Tf+s	0,856	0,001	**	0,026	‘	Oksalat pozitivnija entropija
			Tf-s	0,818	0,006	**	0,016	*	Oksalat pozitivnija entropija
	N	Sijalinizacija	Karbonat	0,384	0,069	‘	0,070	‘	
			Oksalat	0,328	0,119		0,123		
		Anion	Tf+s	0,524	0,032	‘	0,087	‘	Oksalat pozitivnija entropija (granični p)
			Tf-s	0,313	0,126		0,192		
$\Delta_r S^\circ$	C	Sijalinizacija	Karbonat	-0,057	0,466		0,514		
			Oksalat	0,017	0,352		0,355		
		Anion	Tf+s	0,856	0,001	**	0,026	‘	Oksalat pozitivnija entropija
			Tf-s	0,817	0,006	**	0,016	*	Oksalat pozitivnija entropija
	N	Sijalinizacija	Karbonat	0,382	0,069	‘	0,071	‘	
			Oksalat	0,326	0,119		0,124		
		Anion	Tf+s	0,522	0,032	‘	0,087	‘	Oksalat pozitivnija entropija (granični p)
			Tf-s	0,309	0,127		0,194		

* p vrijednosti manje od 0,001 prikazane su kao <0,001.

** Oznake signifikantnosti: 0 (***) 0,001 (**) 0,01 (*) 0,025 (‘) 0,1 () 1.

4.2.2. Ravnotežne konstante

Srednje vrijednosti izračunatih ravnotežnih konstanti zajedno s njihovim standardnim devijacijama u zagradi prikazane su u tablici 4.6. Efektivne konstante vezanja (K_{app}) za vezanje slobodnog željeza za C- i N-kraj transferina izračunate su iz vrijednosti konstanti disocijacije i kondicionalnih konstanti za FeNTA ($\log K'_{110} = 15,30(0,01)$ pri pH 7,4) (142) prema jednadžbama 3.5.24. i 3.5.32. Makroskopske konstante računane su prema modelu za dva neidentična mjesta prema jednadžbama 3.5.44. i 3.5.45., dok je frakcijska zasićenost računata prema jednadžbi 3.5.46. Standardne devijacije za navedene ravnotežne konstante računane su prema propagacijama pogreške opisanim u poglavljima 3.5.2. i 3.5.3. Za iste ravnotežne parametre kao i frakcijsku zasićenost jednosmjerna i dvosmjerna ANOVA prikazane su u tablicama 4.7. i 4.8.

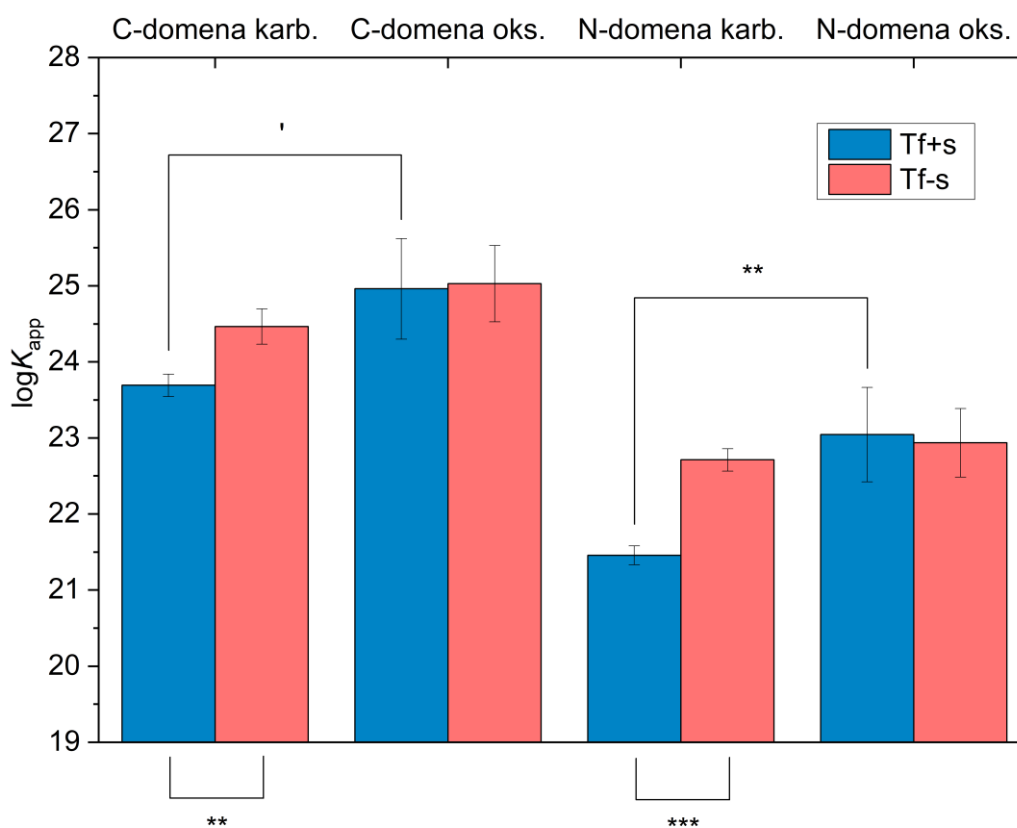
Vrijednosti efektivnih konstanti vezanja za vezanje Fe^{3+} na različito sijalinizirani ljudski serumski transferin za različita vezna mjesta, kao i u prisutnosti različitih aniona, uspoređene su na slici 4.7. Efektivne konstante vezanja za C-kraj otprilike su 100x veće od efektivnih konstanti vezanja za N-kraj. Pokazalo se kako signifikantnu razliku u vrijednostima efektivnih konstanti vezanja za oba vezna mjesta transferina u prisutnosti karbonata uzrokuje različita sijalinizacija ($p \leq 0,006$, $\omega^2 \geq 0,736$ za oba vezna mjesta), pri čemu je efekt izraženiji na N-kraju transferina ($\omega^2 = 0,939$ za N-kraj, $\omega^2 = 0,736$ C-kraj transferina). Prema izračunatim podacima u prisutnosti oksalata nema signifikantne razlike u vrijednostima efektivnih konstanti vezanja, no uz navedeno treba uzeti u obzir i veću nepouzdanost izraženih ravnotežnih konstanti u prisutnosti oksalata. Prema jednosmjernoj ANOVI vrijednosti konstanti vezanja željeza na nativni transferin su signifikantno veće u prisutnosti oksalata za razliku od karbonata za N-kraj ($p = 0,008$, $\omega^2 = 0,708$).

Makroskopske konstante potvrdile su kako je prilikom vezanja željeza (u kompleksu s NTA) na transferin vezanje prvog željeza jače, nego vezanje drugog. Navedeno proizlazi iz oko dva reda veličine veće makroskopske konstante $\log K_1$ od $\log K_2$ za sve uzorke, odnosno kombinacije sijalinizacije/sinergijskog aniona. Desijalinizirani transferin u prisutnosti karbonata veže prvo i drugo željezo za jedan red veličine jače od sijaliniziranog transferina (za K'_1 $p = 0,006$ i $\omega^2 = 0,745$, za K'_2 $p < 0,001$ i $\omega^2 = 0,936$). Promjena sijalinizacije u prisutnosti oksalata ne utječe na vrijednosti makroskopskih konstanti vezanja. Prema jednosmjernoj ANOVI makroskopske konstante za vezanje prvog i drugog željeza na nativni transferin veće su u prisutnosti oksalata od karbonata (za K'_2 $p = 0,008$ i $\omega^2 = 0,705$, za K'_1 $p = 0,025$ i $\omega^2 = 0,563$).

Vrijednosti frakcijske zasićenosti kompleksa FeTf pri polovici popunjenosti svih veznih mjesta na transferinu $F(\text{FeTf})$ nisu se signifikantno razlikovale ovisno o sijalinizaciji i sinergijskom anionu (tablice 4.7. i 4.8.). Vrijednosti $F(\text{FeTf})$ iznosile su oko 0,8 do 0,9 što (tablica 4.6.) potvrđuje kako se prilikom titracije ne popunjava isključivo jedno pa drugo vezno mjesto transferina, već je postoji neki udio Fe_2Tf frakcije u trenutnu kad je popunjeno pola veznih mjesta u transferinu.

Tablica 4.6. Izračunate srednje vrijednosti ravnotežnih konstanti za reakciju FeNTA sa apotransferinom određene kako je opisano u poglavlju 3.4. i 3.5. Vrijednosti konstanti disocijacije dobivene su iz ITC podataka utočnjavanjem termodinamičkih parametara pomoću simpleks i Levenberg-Marquardt algoritama pronalaska minimuma, dok se ostale ravnotežne konstante mogu izvesti iz konstanti disocijacije. Sve konstante prikazane su u logaritamskom obliku, a u zagradama su prikazane njihove standardne devijacije.

Vezno mjesto	Parametar	Tf+s		Tf-s	
		Karbonat	Oksalat	Karbonat	Oksalat
C-kraj	$\log K_D$	-8,39 (0,14)	-9,66 (0,65)	-9,16 (0,22)	-9,73 (0,49)
	$\log K_{\text{app}}$	23,69 (0,15)	24,96 (0,66)	24,46 (0,23)	25,03 (0,50)
N-kraj	$\log K_D$	-6,16 (0,11)	-7,75 (0,61)	-7,42 (0,14)	-7,64 (0,44)
	$\log K_{\text{app}}$	21,46 (0,12)	23,05 (0,62)	22,72 (0,15)	22,94 (0,45)
Makroskopske konstante	$\log K'_1$	23,69 (0,15)	24,96 (0,66)	24,46 (0,23)	25,03 (0,50)
	$\log K'_2$	21,46 (0,12)	23,04 (0,62)	22,71 (0,15)	22,94 (0,45)
	$F(\text{FeTf})$	0,87 (0,02)	0,82 (0,11)	0,79 (0,04)	0,85 (0,07)



Slika 4.7. Izračunate efektivne konstante vezanja ($\log K_{app}$) za vezanja željezovih(III) iona na nativni (Tf+s) i desijalinizirani(Tf-s) apotransferin. Vrijednosti odgovaraju onima u Tablici 4.6., a stupci pogreške prikazuju standardne devijacije. Statistička značajnost među izmjerenim vrijednostima označena je simbolima prema: $p < 0,001$ (***), $p < 0,01$ (**), $p < 0,025$ (*), $p < 0,1$ (').

Tablica 4.7. Rezultati dvosmjerne ANOVE za parametre $\log K_{\text{app}}$, $\log K'_1$, $\log K'_2$ i $F(\text{FeTf})$.

Parametar	Vezno mjesto	Faktor	ANOVA ($\alpha = 0,05$)			Welch ($\alpha = 0,05$)	
			$\omega^2 p$	p^*	Signifikantnost**	p	Signifikantnost*
$\log K_{\text{app}}$	C	Sijalinizacija	0,084	0,173		0,237	
		Anion	0,424	0,010	*	0,035	*
		Interakcija	0,039	0,249		0,313	
	N	Sijalinizacija	0,233	0,053	‘	0,109	
		Anion	0,470	0,006	**	0,030	*
		Interakcija	0,323	0,025	*	0,068	‘
$\log K'_1$	N/A	Sijalinizacija	0,085	0,172		0,237	
		Anion	0,423	0,010	*	0,035	*
		Interakcija	0,043	0,240		0,305	
$\log K'_2$	N/A	Sijalinizacija	0,236	0,052	‘	0,107	
		Anion	0,470	0,006	**	0,030	*
		Interakcija	0,318	0,026	*	0,070	‘
$F(\text{FeTf})$		Sijalinizacija	-0,053	0,570		0,102	
		Anion	-0,082	0,895		0,029	*
		Interakcija	0,015	0,301		0,066	‘

* p vrijednosti manje od 0,001 prikazane su kao <0,001.

** Oznake signifikantnosti: 0 (***) 0,001 (**) 0,01 (*) 0,05 (‘) 0,1 () 1.

Tablica 4.8. Rezultati jednosmjerne ANOVE za parametre $\log K'_1$, $\log K'_2$ i $F(\text{FeTf})$.

Parametar	Vezno mjesto	Faktor	Uzorak	ANOVA ($\alpha=0,025$)			Welch ($\alpha=0,025$)		Komentar
				ω^2	p	Signifikantnost	p	Signifikantnost	
$\log K_{\text{app}}$	C	Sijalinizacija	Karbonat	0,736	0,006	**	0,024	*	Tf-s veći K_{app}
			Oksalat	-0,197	0,910		0,911		
		Anion	Tf+s	0,561	0,025	‘	0,108		Oksalat veći K_{app} (granični p)
			Tf-s	0,160	0,217		0,245		
	N	Sijalinizacija	Karbonat	0,939	<0,001	***	0,001	***	Tf-s veći K_{app}
			Oksalat	-0,189	0,840		0,841		
	Anion	Tf+s	0,708	0,008	**	0,064	‘	Oksalat veći K_{app}	
		Tf-s	-0,105	0,548		0,569			
$\log K'_1$	N/A	Sijalinizacija	Karbonat	0,745	0,006	**	0,023	*	Tf-s veći K'_1
			Oksalat	-0,197	0,919		0,919		
		Anion	Tf+s	0,563	0,025	‘	0,108		Oksalat veći K'_1
			Tf-s	0,150	0,225		0,253		
$\log K'_2$	N/A	Sijalinizacija	Karbonat	0,936	<0,001	***	0,001	***	Tf-s veći K'_2
			Oksalat	-0,191	0,853		0,854		
		Anion	Tf+s	0,705	0,008	**	0,065	‘	Oksalat veći K'_2
			Tf-s	-0,099	0,535		0,557		
$F(\text{FeTf})$	N/A	Sijalinizacija	Karbonat	0,490	0,039	‘	0,110		Tf+s veći $F(\text{FeTf})$ (granični p)
			Oksalat	-0,186	0,818		0,820		
		Anion	Tf+s	-0,087	0,537		0,631		
			Tf-s	-0,026	0,409		0,422		

* p vrijednosti manje od 0,001 prikazane su kao <0,001.

** Oznake signifikantnosti: 0 (***) 0,001 (**) 0,01 (*) 0,025 (‘) 0,1 () 1.

4.3. Parametri l_x i FWHM

Detaljna analiza parametara l_x i FWHM prema postupku opisanom u poglavlju 3.6. nalazi se u tablici 7.3. u prilogu ovog rada. U tablici 4.9. prikazane su vrijednosti parametara l_x i FWHM dok slike 4.8. i 4.9. prikazuju grafičku usporedbu vrijednosti navedenih parametara ovisno o sijalinizaciji/sinergijskom anionu te veznom mjestu. Tablica 4.10. prikazuje rezultate dvosmjerne ANOVE za parametre, dok su u tablici 4.11. prikazani rezultati jednosmjerne ANOVE za iste parametre.

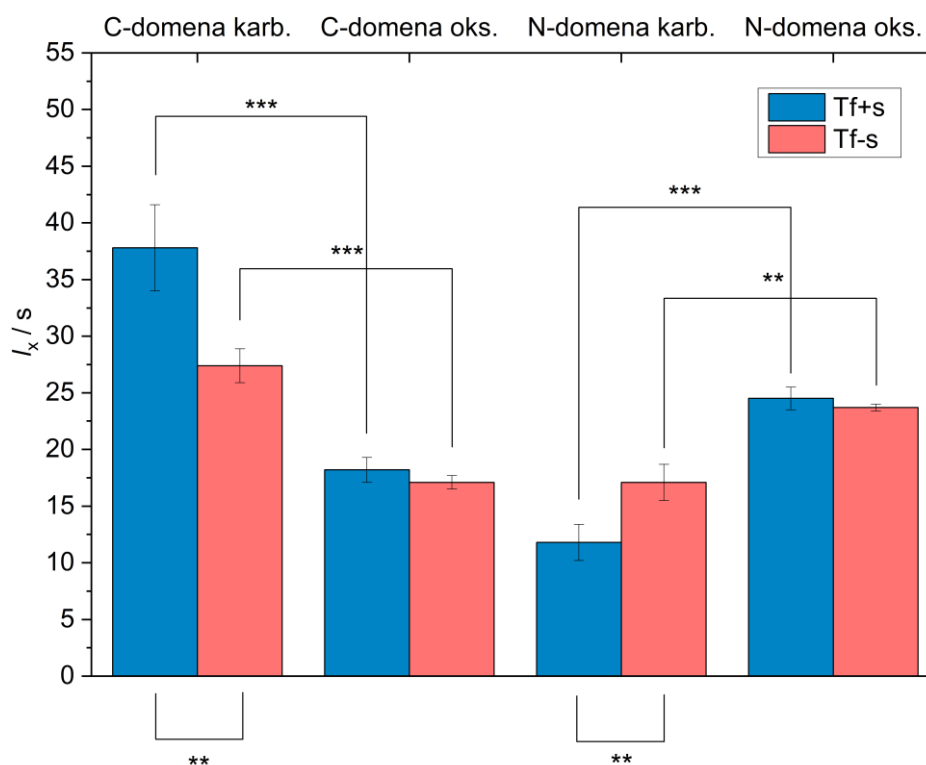
Vrijednosti parametra FWHM razlikuju se u provedenim titracijama ovisno o sinergijskom anionu. Dvosmjerna ANOVA potvrdila je signifikantnu razliku u vrijednostima FWHM ovisno o sinergijskom anionu (za C-vezno mjesto $p = 0,012$, $\omega_p^2 = 0,518$, za N-vezno mjesto $p < 0,001$, $\omega_p^2 = 0,928$), dok signifikantna razlika u vrijednostima FWHM ovisno o sijalinizaciji nije primijećena na temelju statističkih testova.

Za parametar l_x dvosmjerna ANOVA ukazala je na signifikantne razlike kod svih faktora: sijalinizacije, sinergijskog aniona, ali i interakcije s p vrijednostima $\leq 0,011$. Daljnja usporedba parametara l_x uz pomoć jednosmjerne ANOVE ukazala je na signifikantni utjecaj sijalinizacije samo u slučaju kad je karbonat korišten kao sinergijski anion. Toplinske promjene na C-kraju kod nativnog transferina u prisutnosti karbonata tako su signifikantno sporije, nego kod desijaliniziranog ($p = 0,007$, $\omega^2 = 0,792$), dok su na N-kraju signifikantno brže kod nativnog od desijaliniziranog transferina ($p = 0,007$, $\omega^2 = 0,791$). U prisutnosti oksalata kao sinergijskog aniona nije primijećen utjecaj sijalinizacije na brzinu toplinskih promjena.

Jednak utjecaj sinergijskog aniona na brzinu toplinskih promjena koji je uočen pomoću parametra FWHM uočen je i pomoću parametra l_x : neovisno o sijalinizaciji, na C-veznom mjestu oksalat ima veću brzinu toplinskih promjena od karbonata ($p < 0,001$, $\omega^2 \geq 0,935$), dok na N-veznom mjestu karbonat ima veću brzinu toplinskih promjena od oksalata ($p \leq 0,002$, $\omega^2 \geq 0,927$).

Tablica 4.9. Vrijednosti parametara l_x i FWHM korištene za procjenu brzina toplinskih promjena za reakciju vezanja FeNTA na transferin pri pH 7,4. Vrijednosti su uspoređene za dva vezna mjesta transferina ovisno o sijalinizaciji (Tf+s nativni transferin, Tf-s desijalinizirani transferin) i vrsti prisutnog sinergijskog aniona.

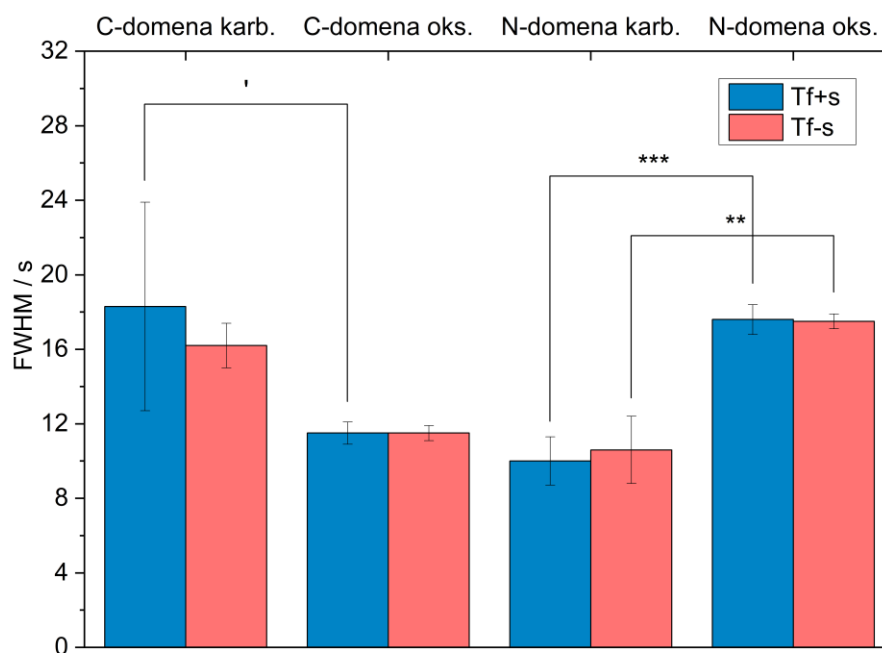
Parametar	Vezno mjesto	Tf+s		Tf-s	
		Karbonat	Oksalat	Karbonat	Oksalat
l_x (s)	C	37,8 (3,8)	18,2 (1,1)	27,4 (1,5)	17,1 (0,6)
	N	11,8 (1,6)	24,5 (1,0)	17,1 (1,6)	23,7 (0,3)
FWHM (s)	C	18,3 (5,6)	11,5 (0,6)	16,2 (1,2)	11,5 (0,4)
	N	10,0 (1,3)	17,6 (0,8)	10,6 (1,8)	17,5 (0,4)



Slika 4.8. Vrijednosti parametra l_x za reakciju vezanja FeNTA na nativni (Tf+s) i desijalinizirani (Tf-s) transferin u prisutnosti karbonata i oksalata pri pH 7,4. Manje vrijednosti sugeriraju brže toplinske promjene, a stupci pogreške prikazuju standardne devijacije. Statistička značajnost među izmjenjenim vrijednostima označena je simbolima prema: $p < 0,001$ (***), $p < 0,01$ (**), $p < 0,025$ (*), $p < 0,1$ (').

Prilikom razmatranja razlika u vrijednostima parametra l_x za C- i N-vezno mjesto treba uzeti u obzir da su integrirani samo egzotermni dijelovi signala. Za C-vezno mjesto egzotermni dio signala sačinjavaju brzi i spori korak, a za N-vezno mjesto samo brzi korak. Postojanje sporog koraka prilikom vezanja na C-kraj transferina može objasniti otprilike dvostruko sporiji proces vezanja na C-kraju transferina, nego na N-kraju. Ipak, u prisutnosti oksalata to nije tako te je vezanje na N-kraju brže od onog na C-kraju što sugerira nejednak utjecaj sinergijskog aniona na vezanja na dva vezna mjesta.

Pomoću parametra l_x uočena razlika u signalima detaljnije je opisana te je uočeno više signifikantnih razlika u brzini toplinskih promjena, ali i morfoloiji signala. Razlog tome je nesimetrični oblik signala i postojanje dugih „repova“ signala koji nisu uočeni parametrom FWHM.



Slika 4.9. Vrijednosti parametra FWHM za reakciju vezanja FeNTA na nativni (Tf+s) i desijalizirani (Tf-s) transferin u prisutnosti karbonata i oksalata pri pH 7,4. Manje vrijednosti sugeriraju brže toplinske promjene, a stupci pogreške prikazuju standardne devijacije. Statistička značajnost među izmjerenim vrijednostima označena je simbolima prema: $p < 0,001$ (***), $p < 0,01$ (**), $p < 0,025$ (*), $p < 0,1$ (').

Tablica 4.10. Rezultati dvosmjerne ANOVE za parametre l_x i FWHM.

Parametar	Vezno mjesto	Faktor	ANOVA ($\alpha = 0,05$)			Welch ($\alpha = 0,05$)	
			$\omega^2 p$	p^*	Signifikantnost**	p	Signifikantnost**
l_x	C-	Sijalinizacija	0,668	0,002	**	0,004	**
		Anion	0,933	<0,001	***	<0,001	***
		Interakcija	0,576	0,007	**	0,008	**
	N-	Sijalinizacija	0,527	0,011	*	0,015	*
		Anion	0,952	<0,001	***	<0,001	***
		Interakcija	0,665	0,002	**	0,004	**
FWHM	C-	Sijalinizacija	0,032	0,596		0,530	
		Anion	0,518	0,012	*	0,022	*
		Interakcija	0,034	0,586		0,519	
	N-	Sijalinizacija	0,016	0,711		0,716	
		Anion	0,928	<0,001	***	<0,001	***
		Interakcija	0,038	0,564		0,573	

* p vrijednosti manje od 0,001 prikazane su kao <0,001.

** Oznake signifikantnosti: 0 (***) 0,001 (**) 0,01 (*) 0,05 (‘) 0,1 () .

Tablica 4.11. Rezultati jednosmjerne ANOVE za parametre l_x i FWHM.

Parametar	Vezno mjesto	Faktor	Uzorak	ANOVA ($\alpha=0,025$)			Welch ($\alpha=0,025$)		Komentar	
				ω^2	p	Signifikantnost	p	Signifikantnost		
l_x	C	Sijalinizacija	Karbonat	0,792	0,007	**	0,007	**	Tf-s veća brzina	
			Oksalat	0,345	0,220		0,236			
		Anion	Tf+s	0,935	<0,001	***	0,001	**		Oksalat veća brzina
			Tf-s	0,966	<0,001	***	0,003	**		Oksalat veća brzina
	N	Sijalinizacija	Karbonat	0,791	0,007	**	0,009	**	Tf+s veća brzina	
			Oksalat	0,294	0,266		0,312			
		Anion	Tf+s	0,966	<0,001	***	<0,001	***		Karbonat veća brzina
			Tf-s	0,927	0,002	**	0,017	*		Karbonat veća brzina
FWHM	C	Sijalinizacija	Karbonat	0,069	0,568		0,523			
			Oksalat	0,001	0,947		0,948			
		Anion	Tf+s	0,455	0,097	‘	0,093	‘		
			Tf-s	0,909	0,003	**	0,015	*		Oksalat veća brzina
	N	Sijalinizacija	Karbonat	0,061	0,595		0,625			
			Oksalat	0,022	0,780		0,786			
		Anion	Tf+s	0,943	<0,001	***	<0,001	***		Karbonat veća brzina
			Tf-s	0,911	0,003	**	0,019	*		Karbonat veća brzina

* p vrijednosti manje od 0,001 prikazane su kao <0,001.

** Oznake signifikantnosti: 0 (***) 0,001 (**) 0,01 (*) 0,025 (‘) 0,1 () .

4.4. Ograničenja i interpretacija rezultata

4.4.1. Efektivne entalpije vezanja

Entalpije vezanja određene u ovom radu odnose se na efektivne entalpije vezanja budući da su mjerenja provedena u samo jednom puferu te entalpije ionizacije pufera nisu oduzete od efektivnih entalpija vezanja (129, 153). Određene entalpije stoga nisu intrinzične entalpije koje bi bile odraz samo vezanja željeza na ljudski serumski transferin, već su odraz cjelokupnog procesa koji uključuje: kontaktno vezanje FeNTA na apotransferin, otpuštanje i protonaciju NTA iz kompleksa sa željezom, vezanje sinergijskog aniona i izmjenu protona s puferom (127).

Važan doprinos entalpiji vezanja promatranog procesa zasigurno je i entalpija ionizacije pufera budući da je kao pufer korišten HEPES koji ima nezanemarivu entalpiju ionizacije (20,5 kJ / mol) (154). HEPES je korišten iz razloga jer drugi puferi sa istim radnim pH područjem i sa značajno manjom entalpijom ionizacije poput fosfata vežu na sebe željezo ili druge metalne ione pa nisu pogodni za ovakve titracije (154). Isto tako, dosadašnja istraživanja koja su uključivala vezanje željeza (u formi FeNTA) na ljudski serumski transferin, kao i ostale proteine iz porodice transferina, rađena su u HEPES-u kao puferu (detaljno opisano u poglavlju 1.5.1. ovog rada). U spomenutoj literaturi opisani su spori i brzi koraci koji se javljaju kod vezanja FeNTA na transferin specifično u HEPES-u kao puferu (35, 130).

Entalpije vezanja bez utjecaja entalpija ionizacije pufera računaju se tako da se ITC mjerenja provedu u nekoliko pufera s različitom entalpijom ionizacije te se napravi ekstrapolacija na nultu entalpiju ionizacije. Kao rezultat opisane metode dobiju se intrinzične entalpije za jednostavnije sustave (155). Ipak, za kompeticijski sustav kao što je ovaj gdje je više doprinosa efektivnoj entalpiji, takva metoda otklonila bi utjecaj samo entalpije ionizacije pufera, ali ne bi rezultirala intrinzičnom entalpijom vezanja željeza na ljudski serumski transferin.

Iako su izražene entalpije vezanja efektivne, usporedbom njihovih vrijednosti moguće je doći do zaključka ima li ili nema utjecaja pojedinog faktora (sijalinizacije ili sinergijskog aniona) na vezanje željeza na ljudski serumski transferin budući da su svi ostali eksperimentalni parametri (poput pH, koncentracije sinergijskog aniona, pufera i svih sudionika reakcije) jednaki. Prilikom interpretacije rezultata važno je imati na umu da se u takvoj usporedbi promatra se cjelokupni toplinski proces koji uključuje više doprinosa (navedenih gore u tekstu).

Profili termograma kao i zasebnih signala dobiveni u ovom istraživanju konzistentni su s onima dobivenim u ranijoj studiji Lina i suradnika (35) s nativnim ljudskim serumskim transferinom i pri jednakoj koncentraciji karbonata. Vrijednosti efektivnih entalpija vezanja u toj studiji određena pri 27 °C razlikuju se od vrijednosti određenih u ovome radu (pri 25 °C) pri čemu je razlika manja za C-kraj (-44,77 kJ/mol prema -42,10(0,71) kJ/mol u ovoj studiji), a veća za N-kraj (-17,57 kJ/mol prema -9,90(0,97) kJ/mol). Razliku u vrijednostima efektivnih entalpija vezanja na N-kraju mogla bi objasniti razlika u dizajnu eksperimenta, točnije omjeru između razmaka među injekcijama i volumena injekcije. Navedena vrijednost za ovu studiju je 5,6 min/μL, a za studiju Lina i suradnika (35) 2,4 min/μL. Duže trajanje injekcije s manjim dodatkom rezultira većim doprinosom endotermnog dijela signala na N-veznom mjestu.

4.4.2. Ravnotežne konstante i ostali izvedeni termodinamički parametri

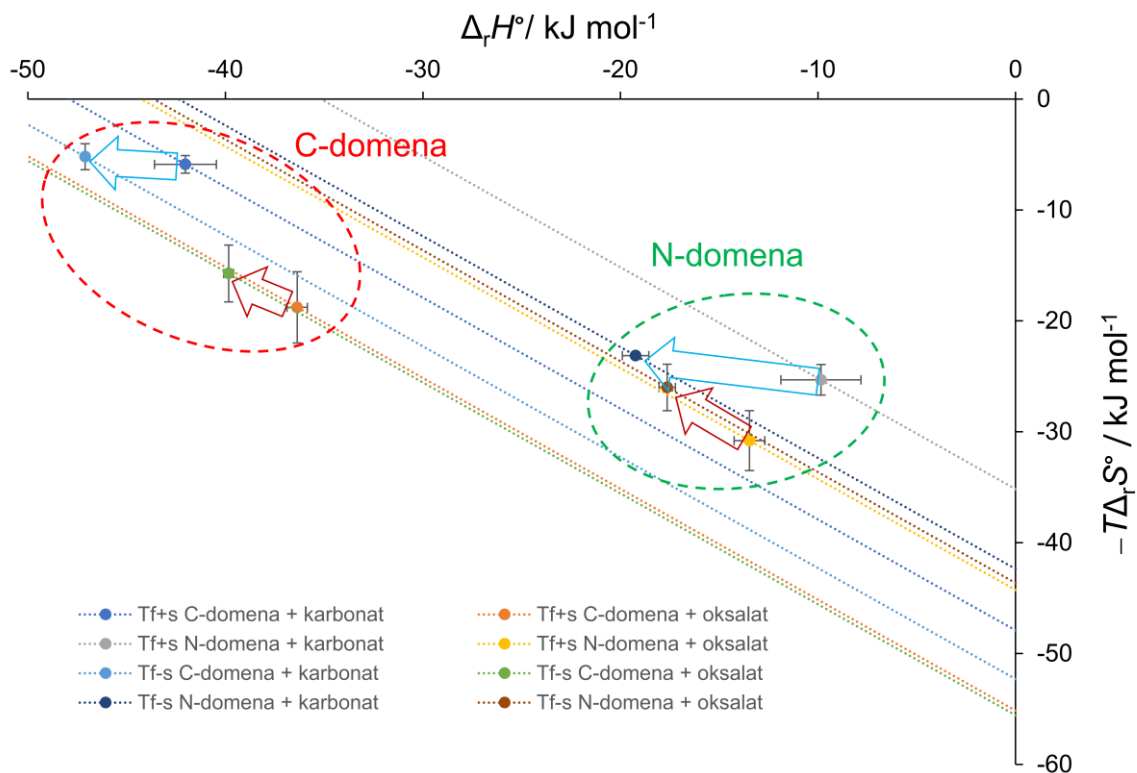
Za optimizaciju ITC eksperimenta često se definira faktor c kao omjer ukupne koncentracije analita (u ovom slučaju transferina, $c(\text{Tf}) \approx 0,2$ mM) i konstante disocijacije. U slučajevima u kojima je vrijednost c puno veća od 1000 iz ITC eksperimenta se pouzdano mogu odrediti broj veznih mjesta i promjena reakcijske entalpije, ali ne i konstanta disocijacije (156). Razlog tome je nagli „skok“ između dva platoa na izotermi koji određuje konstantu vezanja. Vrijednosti konstanti disocijacija pouzdano određenih uz pomoć danas dostupnih ITC uređaja kreću se od milimolarnih do nanomolarnih vrijednosti ($K_d \geq 10^{-9}$) (157). Ipak, pojedine izražene konstante disocijacije u tablici 4.6. reda su veličine 10^{-10} . Nesigurnost u određivanju tih vrijednosti stoga je zasigurno veća od onih izraženih njihovom standardnom devijacijom, no same vrijednosti nisu u potpunosti zanemarive, već se mogu interpretirati kao vrijednosti koje su ispod praga osjetljivosti instrumenta.

Navedeno se odražava na izračun ostalih termodinamičkih parametara poput $\Delta_r S^\circ$ i $\Delta_r G^\circ$, kao i makroskopskih konstanti te frakcijske zasićenosti, odnosno svih parametara koji su računati iz K_d . Procjena K_d na vrijednost manju od granice osjetljivosti instrumenta ($K_d < 10^{-9}$), za posljedicu ima procjenu $\Delta_r G^\circ$ također na niže vrijednosti, a $-T\Delta_r S^\circ$ na više od onih koje bi bile granične za pojedini slučaj. Umjesto apsolutnih vrijednosti konstante disocijacije, Lin i suradnici (35) su za vezanje FeNTA na ljudski serumski transferin grubo procijenili relativni omjer konstanti disocijacije za dva vezna mjesta K_C/K_N koji je za vezanje pri 27 °C iznosio ≈ 150 . Za usporedbu, isti taj omjer za vezanje FeNTA na ljudski serumski transferin u prisutnosti jednake količine karbonata u ovome istraživanju iznosio je ≈ 170 , dok se omjer konstanti u ostalim mjerenjima s drukčijom kombinacijom sijalinizacije/sinergijskog aniona

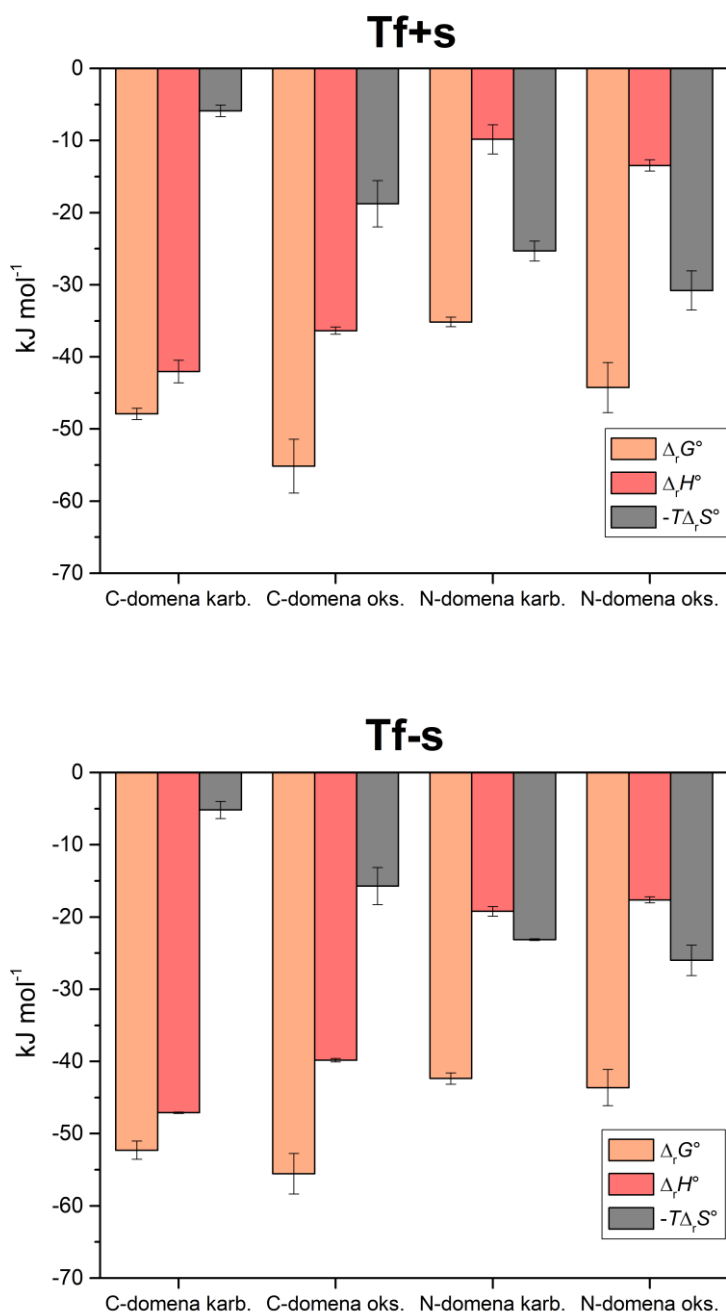
kretao od 50-200. Vrijednosti omjera K_C/K_N za sve provedene titracije prikazani su u prilogu ovog rada u tablicama 7.1. i 7.2. Omjer K_C/K_N između kondicionalnih konstanti za vezanje Fe^{3+} iona na transferin koje su odredili Aisen i suradnici (44) pri pH 7,4 i uz citrat kao kelator iznosio je ≈ 130 . Konstante dobivene korekcijom tih vrijednosti obzirom na koncentraciju karbonata (47) bliže su vrijednostima određenim u ovome radu (22,5 prema 23,6 za C-kraj i 21,5 prema 21,4 za N-kraj).

4.4.3. Efekt desijalinizacije

Utjecaj desijalinizacije i sinergijskog aniona na termodinamičke parametre za reakciju FeNTA s ljudskim serumskim transferinom prikazan je na slici 4.10. Generalno vrijedi kako je promjena u entalpiji vezanja primarno rezultat jakosti interakcija metalnog iona i proteina u usporedbi s jakosti interakcija metalnog iona i otapala. Promjena u entropiji vezanja najčešće je odraz entropije solvatacije kao rezultat desolvatacije metalnog iona te smanjenja gubitka konformacijske entropije proteina zbog vezanja metalnog iona (158). Iz slike 4.11. vidljivo je kako je vezanje željeza u formi FeNTA kontrolirano entalpijski i entropijski pri čemu je na C-veznom mjestu transferina veći entalpijski doprinos ($\Delta_r H^\circ$), a na N-veznom mjestu entropijski ($-T\Delta_r S^\circ$). Pozitivan utjecaj sijalinskih kiselina na ljudskom serumskom transferinu na konformacijsku stabilnost prije se pripisivao solnim mostovima na površini proteina koji nastaju između sijalinskih kiselina i okolnih bazičnih bočnih ogranaka ili drugih dipolnih elemenata (159). Pretpostavlja se da je jedna od takvih mogućih interakcija između sijalinske kiseline i dilizinskog para (Lys206 i Lys296). Interakcija ta dva lizina javlja se u zatvorenoj konformaciji i stabilizira N-kraj transferina. Navedeni lizini zbog pozitivnog naboja na sebe mogu vezati anione, pa tako i sijalinsku kiselinu. Cijepanje dilizinskog para dovodi do otpuštanja metala s transferina (160).



Slika 4.10. Grafički prikaz utjecaja desijalinizacije i sinergijskog aniona na termodinamičke parametre vezanja FeNTA na nativni (Tf+s) i desijalinizirani transferin (Tf-s). Vrijednosti $\Delta_r H^\circ$ i $-T\Delta_r S^\circ$ (pri 25°C) odgovaraju onima u tablici 4.2. Dijagonalne točkaste linije označavaju procese s jednakim vrijednostima $\Delta_r G^\circ$ i dobivene su iz jednakosti $\Delta_r H^\circ = 0$ i $-T\Delta_r S^\circ = \Delta_r G^\circ$ prema tablici 4.2. Stupci pogreške prikazuju standardne devijacije izračunatih vrijednosti. Plave strelice prikazuju efekt desijalinizacije u prisutnosti karbonata, a crvene efekt desijalinizacije u prisutnosti oksalata.



Slika 4.11. Gibbsova slobodna energija te entalpijski, i entropijski doprinosi za reakciju FeNTA s nativnim (Tf+s) i desijaliniziranim transferinom (Tf-s) u prisutnosti karbonata (karb.) i oksalata (oks.) pri pH 7,4. Stupci pogreške prikazuju standardne devijacije izmjerenih vrijednosti.

4.4.4. Efekt sinergijskog aniona

Poznato je kako apotransferin na sebe veže sinergijske anione i prije, nego se na njega veže metalni ion. Navedeni proces događa se u predravnoteži (32). Harris i suradnici pokazali su kako je vezanje oksalata u predravnoteži ($\log K_{1A} = 4,6$, $\log K_{2A} = 4,0$) gotovo dva reda veličine veće od vezanja karbonata ($\log K_{1A} = 2,73$, $\log K_{2A} = 2,2$) na ljudski serumski transferin u predravnoteži (161, 162). Vrijednosti K_{1A} i K_{2A} označavaju ravnotežne konstante za vezanje prvog i drugog aniona na ljudski serumski transferin. Pritom je važno imati na umu kako je zbog mnoštva bočnih ogranaka proteina koji mogu vezati anione moguće postojanje više od jednog veznog mjesta za vezanje sinergijskog aniona na pojedinoj domeni proteina (32). Uzevši u obzir navedene konstante vezanja karbonata i oksalata u predravnoteži te koncentracije transferina i sinergijskih aniona koje su korištene u ovome radu, može se zaključiti kako je prije vezanja FeNTA oko 20% molekula transferina imalo jedan vezan karbonat, dok je oko 100% molekula transferina imalo dva vezana oksalata po molekuli transferina. Jače vezanje oksalata u predravnoteži moglo bi objasniti brži proces vezanja oksalata na C-kraju transferina u usporedbi s karbonatom. Iako prema Harrisu i suradnicima (161, 162) postoji razlika u vezanju sinergijskih iona na oba vezna mjesta, isto nije primijećeno na N-kraju transferina. Velika stabilnost ternarnog kompleksa holotransferina s oksalatom usporediva sa stabilnosti ternarnog kompleksa holotransferina s karbonatom potvrđena je ovom studijom. Sijalinizacija nije pokazala utjecaj na konstantu ravnoteže niti brzine vezanja u prisutnosti oksalata što može dodatno potvrditi stabilnost oksalatnog kompleksa.

§ 5. ZAKLJUČAK

U ovome radu pokazano je kako nativni i desijalinizirani transferin pri pH 7,4 vežu željezo(III) u formi FeNTA u dva uzastopna koraka pri čemu se u prvome koraku željezo veže na C-vezno mjesto proteina, a u drugome koraku na N-vezno mjesto. Potvrđena je preferencija željeza u kompleksu s NTA prema C-veznom mjestu transferina, kao i veće efektivne entalpije i konstanta vezanja na C-vezno mjesto što je u skladu s dosadašnjim eksperimentima. Razlika u vezanju na dva režnja transferina uočena je u entalpijsko/entropijskom doprinosu pri čemu je za C-vezno mjesto veći entalpijski doprinos, a za N-vezno mjesto entropijski. Veći entropijski doprinos vidljiv je u prisutnosti oksalata kao sinergijskog aniona u usporedbi s karbonatom (osobito za C-domenu), što ide u prilog pretpostavci da oksalat zbog svoje veličine prilikom vezanja u vezno mjesto istiskuje molekulu otapala, a naprezanje u nastalom prstenu je manje, nego kod karbonata.

Iako se sijalinske kiseline na ljudskom serumskom transferinu nalaze na C-domenu proteina, rezultati ovog rada za mjerenja provedena pri pH 7,4 i koncentraciji karbonata koja odgovara onoj u ljudskom serumu upućuju na razliku u vezanju željeza u formi FeNTA na oba režnja proteina ovisno o indeksu sijalinizacije. Isto tako, egzotermnija entalpija vezanja na oba vezna mjesta uočena je kada su mjerenja rađena sa desijaliniziranim transferinom. Osim povoljnije entalpije vezanja, konstante vezanja za oba vezna mjesta veće su kod transferina s manjim indeksom sijalinizacije. Navedeno sugerira postojanje veće sposobnosti desijaliniziranog transferina za vezanje željeza, te može objasniti desijalinizaciju transferina prilikom sepse i drugih upalnih procesa kao odgovora organizma prilikom kompeticije s bakterijama za željezo. Povećane koncentracije transferina sa smanjenim indeksom sijalinizacije tijekom infekcija također bi mogle objasniti uočene povećane količine uskladištenog željeza u organizmu koje se povezuju s oksidativnim stresom, ferroptozom i propadanjem stanica. Prilikom razmatranja jačine takvog učinka trebalo bi odrediti indeks sijalinizacije transferina u takvim stanjima te usporediti ga s onim dobivenim u ovome radu.

Vezanje FeNTA na transferin u prisutnosti oksalata razlikovalo se termodinamički i kinetički od vezanja u prisutnosti karbonata što je dodatan pokazatelj uloge oksalata kao sinergijskog aniona. Pri vezanju FeNTA na transferin u prisutnosti oksalata u usporedbi s vezanjem pri jednakim koncentracijama karbonata određeno je kako je veća konstanta vezanja željeza na transferin kad je oksalat prisutan kao sinergijski anion. Da bi se odredilo ima li

uočena razlika u konstanti vezanja fiziološko značenje treba uzeti u obzir nekoliko faktora. Ono što ide u prilog karbonatu kao dominantnom sinergijskom ionu u *in vivo* uvjetima je koncentracija u serumu koja kod karbonata iznosi oko 27 mmol/L, dok kod oksalata ne može premašiti vrijednost od 45 μ mol/L. Ipak, jače vezanje oksalata na transferin u predravnoteži, kao i veće konstante vezanja te egzergonije vezanje u prisutnosti oksalata, uočeno u eksperimentima s FeNTA, upućuju na postojanje oksalata kao sinergijskog iona u *in vivo* uvjetima, osobito u stanjima s povećanom koncentracijom oksalata u organizmu. Osim konstante vezanja oksalata u predravnoteži, čimbenici koji bi odredili koliko je značajan oksalat kao sinergijski anion mogli bi biti konstanta vezanja oksalata (jednom kad je željezo u veznom mjestu transferina), kao i kinetika vezanja. Razlika u brzini toplinskih promjena uočena u ITC eksperimentima prilikom vezanja na dva vezna mjesta transferina (na C-kraju brže u prisutnosti oksalata, na N-kraju brže u prisutnosti karbonata) indikacija je kako je utjecaj sinergijskog aniona na kinetiku vezanja na dva vezna mjesta različit.

Osim utjecaja sijalinizacije i različitog sinergijskog aniona na vezanje željeza na transferin pri fiziološkim uvjetima, važan korak u dostavi željeza u stanice je i afinitet transferina prema željezu pri nižem pH, kao i afinitet transferinskog receptora prema holotransferinu. Testiranje navedenih svojstava s transferinom sa smanjenim indeksom sijalinizacije ili oksalatom kao sinergijskim anionom kao nastavak istraživanja može pružiti uvid u stvarni značaj desijalinizacije i oksalata za isporuku i pohranu željeza u stanicama.

§ 6. POPIS LITERATURE

1. Aisen P. Chemistry and biology of eukaryotic iron metabolism. *Int J Biochem Cell Biol* 2001;33:940–59.
2. Abbaspour N, Hurrell R, Kelishadi R. Review on iron and its importance for human health. *J Res Med Sci* 2014;19:164–74.
3. Puig S, Ramos-Alonso L, Romero AM, Martínez-Pastor MT. The elemental role of iron in DNA synthesis and repair. *Metallomics* 2017;9:1483–500.
4. Panel on Micronutrients, Subcommittees on Upper Reference Levels of Nutrients and of Interpretation. *Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc*. Washington, D.C.: National Academies Press, 2001:290–378.
5. Gkouvatso K, Papanikolaou G, Pantopoulos K. Regulation of iron transport and the role of transferrin. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 2012;1820:188–202.
6. Wallace DF. The Regulation of Iron Absorption and Homeostasis. *Clin Biochem Rev* 2016;37:51–62.
7. Hurrell R, Egli I. Iron bioavailability and dietary reference values. *Am J Clin Nutr* 2010;91:1461S-1467S.
8. Shayeghi M, Latunde-Dada GO, Oakhill JS, Laftah AH, Takeuchi K, Halliday N, et al. Identification of an Intestinal Heme Transporter. *Cell* 2005;122:789–801.
9. Turgut S, Polat A, Inan M, Turgut G, Emmungil G, Bican M, et al. Interaction between anemia and blood levels of iron, zinc, copper, cadmium and lead in children. *Indian J Pediatr* 2007;74:827–30.
10. Andrews NC. Disorders of Iron Metabolism. *N Engl J Med* 1999;341:1986–95.
11. Ward RJ, Zucca FA, Duyn JH, Crichton RR, Zecca L. The role of iron in brain ageing and neurodegenerative disorders. *Lancet Neurol* 2014;13:1045–60.
12. Zecca L, Youdim MBH, Riederer P, Connor JR, Crichton RR. Iron, brain ageing and neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurosci* 2004;5:863–73.
13. Wessling-Resnick M. Biochemistry of Iron Uptake. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1999;34:285–314.
14. Meneghini R. Iron Homeostasis, Oxidative Stress, and DNA Damage. *Free Radic Biol Med* 1997;23:783–92.
15. Li J, Cao F, Yin H, Huang Z, Lin Z, Mao N, et al. Ferroptosis: past, present and future. *Cell Death Dis* 2020;11:88.

16. Hangauer MJ, Viswanathan VS, Ryan MJ, Bole D, Eaton JK, Matov A, et al. Drug-tolerant persister cancer cells are vulnerable to GPX4 inhibition. *Nature* 2017;551:247–50.
17. Viswanathan VS, Ryan MJ, Dhruv HD, Gill S, Eichhoff OM, Seashore-Ludlow B, et al. Dependency of a therapy-resistant state of cancer cells on a lipid peroxidase pathway. *Nature* 2017;547:453–7.
18. Chung MC-M. Structure and function of transferrin. *Biochem Educ* 1984;12:146–54.
19. Ling JML, Schryvers AB. Perspectives on interactions between lactoferrin and bacteria. *Biochem Cell Biol* 2006;84:275–81.
20. Berlutti F, Pantanella F, Natalizi T, Frioni A, Paesano R, Polimeni A, et al. Antiviral Properties of Lactoferrin—A Natural Immunity Molecule. *Molecules* 2011;16:6992–7018.
21. Suryo Rahmanto Y, Dunn LL, Richardson DR. The melanoma tumor antigen, melanotransferrin (p97): a 25-year hallmark – from iron metabolism to tumorigenesis. *Oncogene* 2007;26:6113–24.
22. Giansanti F, Leboffe L, Pitari G, Ippoliti R, Antonini G. Physiological roles of ovotransferrin. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 2012;1820:218–25.
23. Iatsenko I, Marra A, Boquete J-P, Peña J, Lemaitre B. Iron sequestration by transferrin 1 mediates nutritional immunity in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2020;117:7317–25.
24. Silva AMN, Moniz T, de Castro B, Rangel M. Human transferrin: An inorganic biochemistry perspective. *Coord Chem Rev* 2021;449:214186.
25. Gabay C, Kushner I. Acute-Phase Proteins and Other Systemic Responses to Inflammation. Epstein FH, editor. *N Engl J Med* 1999;340:448–54.
26. Andrews NC, Schmidt PJ. Iron Homeostasis. *Annu Rev Physiol* 2007;69:69–85.
27. Kim B-J, Zhou J, Martin B, Carlson OD, Maudsley S, Greig NH, et al. Transferrin Fusion Technology: A Novel Approach to Prolonging Biological Half-Life of Insulinotropic Peptides. *J Pharmacol Exp Ther* 2010;334:682–92.
28. Clark AJ, Davis ME. Increased brain uptake of targeted nanoparticles by adding an acid-cleavable linkage between transferrin and the nanoparticle core. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015;112:12486–91.
29. Gomme PT, McCann KB, Bertolini J. Transferrin: structure, function and potential therapeutic actions. *Drug Discov Today* 2005;10:267–73.
30. Cheng Y, Zak O, Aisen P, Harrison SC, Walz T. Structure of the human transferrin receptor-transferrin complex. *Cell* 2004;116:565–76.
31. Yang N, Zhang H, Wang M, Hao Q, Sun H. Iron and bismuth bound human serum transferrin reveals a partially-opened conformation in the N-lobe. *Sci Rep* 2012;2:999.

32. Harris WR. Anion binding properties of the transferrins. Implications for function. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 2012;1820:348–61.
33. He Q-Y, Mason AB, Tam BM, MacGillivray RTA, Woodworth RC. Dual Role of Lys206–Lys296 Interaction in Human Transferrin N-Lobe: Iron-Release Trigger and Anion-Binding Site. *Biochemistry* 1999;38:9704–11.
34. Sun H, Li H, Sadler PJ. Transferrin as a Metal Ion Mediator. *Chem Rev* 1999;99:2817–42.
35. Lin LN, Mason AB, Woodworth RC, Brandts JF. Calorimetric studies of the binding of ferric ions to human serum transferrin. *Biochemistry* 1993;32:9398–406.
36. Bates GW, Billups C, Saltman P. The Kinetics and Mechanism of Iron(III) Exchange between Chelates and Transferrin. *J Biol Chem* 1967;242:2810–5.
37. He Q-Y, Mason BA, Woodworth CR. Iron release from recombinant N-lobe and single point Asp63 mutants of human transferrin by EDTA. *Biochem J* 1997;328:439–45.
38. Tang S, MacColl R, Parsons PJ. Spectroscopic study of the interaction of aluminum ions with human transferrin. *J Inorg Biochem* 1995;60:175–85.
39. Baldwin DA, Egan TJ. Fluorescence studies on human serum transferrin. *S Afr J Chem* 1986;39:197–200.
40. Dubach J, Gaffney BJ, More K, Eaton GR, Eaton SS. Effect of the synergistic anion on electron paramagnetic resonance spectra of iron-transferrin anion complexes is consistent with bidentate binding of the anion. *Biophys J* 1991;59:1091–100.
41. Mathies G, Gast P, Chasteen ND, Luck AN, Mason AB, Groenen EJJ. Exploring the Fe(III) binding sites of human serum transferrin with EPR at 275 GHz. *J Biol Inorg Chem* 2015;20:487–96.
42. Vincent JB, Love S. The binding and transport of alternative metals by transferrin. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 2012;1820:362–78.
43. Harris WR. Estimation of the ferrous-transferrin binding constants based on thermodynamic studies of nickel(II)-transferrin. *J Inorg Biochem* 1986;27:41–52.
44. Aisen P, Leibman A, Zweier J. Stoichiometric and site characteristics of the binding of iron to human transferrin. *J Biol Chem* 1978;253:1930–7.
45. Chasteen ND, Williams J. The influence of pH on the equilibrium distribution of iron between the metal-binding sites of human transferrin. *Biochem J* 1981;193:717–27.
46. Nezafati N, Moztarzadeh F, Hesarakhi S. Surface reactivity and in vitro biological evaluation of sol gel derived silver/calcium silicophosphate bioactive glass. *Biotechnol Bioprocess Eng* 2012;17:746–54.
47. Martin BR, Savory J, Brown S, Bertholf LR, Wills MR. Transferrin Binding of Al³⁺ and Fe³⁺. *Clin Chem* 1987;33:405–7.

48. Lee DA, Goodfellow JM. The pH-Induced Release of Iron from Transferrin Investigated with a Continuum Electrostatic Model. *Biophys J* 1998;74:2747–59.
49. Bali PK, Aisen P. Receptor-modulated iron release from transferrin: differential effects on N- and C-terminal sites. *Biochemistry* 1991;30:9947–52.
50. Hamilton DH, Turcot I, Stintzi A, Raymond KN. Large cooperativity in the removal of iron from transferrin at physiological temperature and chloride ion concentration. *J Biol Inorg Chem* 2004;9:936–44.
51. Byrne SL, Mason AB. Human serum transferrin: a tale of two lobes. Urea gel and steady state fluorescence analysis of recombinant transferrins as a function of pH, time, and the soluble portion of the transferrin receptor. *J Biol Inorg Chem* 2009;14:771–81.
52. Byrne SL, Chasteen ND, Steere AN, Mason AB. The Unique Kinetics of Iron Release from Transferrin: The Role of Receptor, Lobe–Lobe Interactions, and Salt at Endosomal pH. *J Mol Biol* 2010;396:130–40.
53. Makey DG, Seal US. The detection of four molecular forms of human transferrin during the iron binding process. *Biochim Biophys Acta* 1976;453:250–6.
54. Evans RW, Williams J. The electrophoresis of transferrins in urea/polyacrylamide gels. *Biochem J* 1980;189:541–6.
55. Williams J, Moreton K. The distribution of iron between the metal-binding sites of transferrin in human serum. *Biochem J* 1980;185:483–8.
56. Parrow NL, Li Y, Feola M, Guerra A, Casu C, Prasad P, et al. Lobe specificity of iron binding to transferrin modulates murine erythropoiesis and iron homeostasis. *Blood* 2019;134:1373–84.
57. Williams J, Chasteen ND, Moreton K. The effect of salt concentration on the iron-binding properties of human transferrin. *Biochem J* 1982;201:527–32.
58. Evans RW, Williams J. Studies of the binding of different iron donors to human serum transferrin and isolation of iron-binding fragments from the N- and C-terminal regions of the protein. *Biochem J* 1978;173:543–52.
59. Hider RC. Nature of nontransferrin-bound iron: Nature of nontransferrin-bound iron. *Eur J Clin Invest* 2002;32:50–4.
60. Evans RW, Rafique R, Zarea A, Rapisarda C, Cammack R, Evans PJ, et al. Nature of non-transferrin-bound iron: studies on iron citrate complexes and thalassemic sera. *J Biol Inorg Chem* 2007;13:57–74.
61. Aisen P, Leibman A. Citrate-mediated exchange of Fe³⁺ among transferrin molecules. *Biochem Biophys Res Commun* 1968;32:220–6.
62. Ha-Duong N-T, Eid C, Hémadi M, El Hage Chahine J-M. In Vitro Interaction between Ceruloplasmin and Human Serum Transferrin. *Biochemistry* 2010;49:10261–3.

63. Eid C, Hémadi M, Ha-Duong N-T, El Hage Chahine J-M. Iron uptake and transfer from ceruloplasmin to transferrin. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 2014;1840:1771–81.
64. Schlabach MR, Bates GW. The synergistic binding of anions and Fe³⁺ by transferrin. Implications for the interlocking sites hypothesis. *J Biol Chem* 1975;250:2182–8.
65. Anderson BF, Baker HM, Norris GE, Rice-f DW, Baker EN. Structure of Human Lactoferrin: Crystallographic Structure Analysis and Refinement at 243 Å Resolution. *J Mol Biol* 1989;209:711–34.
66. MacGillivray RTA, Moore SA, Chen J, Anderson BF, Baker H, Luo Y, et al. Two High-Resolution Crystal Structures of the Recombinant N-Lobe of Human Transferrin Reveal a Structural Change Implicated in Iron Release. *Biochemistry* 1998;37:7919–28.
67. Halbrooks PJ, Mason AB, Adams TE, Briggs SK, Everse SJ. The Oxalate Effect on Release of Iron from Human Serum Transferrin Explained. *J Mol Biol* 2004;339:217–26.
68. Smith RM, Martell AE. *Critical Stability Constants: Second Supplement*. Boston: Springer US, 1989:325–437.
69. Konstantynowicz J, Porowski T, Zoch-Zwierz W, Wasilewska J, Kadziela-Olech H, Kulak W, et al. A potential pathogenic role of oxalate in autism. *Eur J Paediatr Neurol* 2012;16:485–91.
70. Raphael KL, Wei G, Baird BC, Greene T, Beddhu S. Higher serum bicarbonate levels within the normal range are associated with better survival and renal outcomes in African Americans. *Kidney Int* 2011;79:356–62.
71. Luck AN, Bobst CE, Kaltashov IA, Mason AB. Human Serum Transferrin: Is There a Link among Autism, High Oxalate Levels, and Iron Deficiency Anemia? *Biochemistry* 2013;52:8333–41.
72. Egan TJ, Zak O, Aisen P. The anion requirement for iron release from transferrin is preserved in the receptor-transferrin complex. *Biochemistry* 1993;32:8162–7.
73. Kretchmar SA, Raymond KN. Effects of ionic strength on iron removal from the monoferric transferrins. *Inorg Chem* 1988;27:1436–41.
74. Amin EA, Harris WR, Welsh WJ. Identification of possible kinetically significant anion-binding sites in human serum transferrin using molecular modeling strategies. *Biopolymers* 2004;73:205–15.
75. Byrne SL, Steere AN, Chasteen ND, Mason AB. Identification of a Kinetically Significant Anion Binding (KISAB) Site in the N-Lobe of Human Serum Transferrin. *Biochemistry* 2010;49:4200–7.
76. Zak O, Tam B, MacGillivray RTA, Aisen P. A Kinetically Active Site in the C-Lobe of Human Transferrin. *Biochemistry* 1997;36:11036–43.
77. Folajtar DA, Chasteen ND. Measurement of nonsynergistic anion binding to transferrin by EPR difference spectroscopy. *J Am Chem Soc* 1982;104:5775–80.

78. Abdizadeh H, Atilgan AR, Atilgan C. Mechanisms by Which Salt Concentration Moderates the Dynamics of Human Serum Transferrin. *J Phys Chem B* 2017;121:4778–89.
79. Bruhn KW, Spellberg B. Transferrin-mediated iron sequestration as a novel therapy for bacterial and fungal infections. *Curr Opin Microbiol* 2015;27:57–61.
80. McCleverty JA, Meyer TJ, editors. *Comprehensive coordination chemistry II: from biology to nanotechnology*, 1st ed. Boston: Elsevier Pergamon, 2004:141–168.
81. Pogoutse AK, Moraes TF. Iron acquisition through the bacterial transferrin receptor. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2017;52:314–26.
82. Schryvers AB, Gonzalez GC. Receptors for transferrin in pathogenic bacteria are specific for the host's protein. *Can J Microbiol* 1990;36:145–7.
83. Cornelissen CN. Transferrin-iron uptake by gram-negative bacteria. *Front Biosci* 2003;8:d836-847.
84. Tomson CRV. The Clinical Significance of Hyperoxalaemia. *Int J Artif Organs* 1988;11:329–34.
85. Demoulin N, Aydin S, Gillion V, Morelle J, Jadoul M. Pathophysiology and Management of Hyperoxaluria and Oxalate Nephropathy: A Review. *Am J Kidney Dis* 2022;79:717–27.
86. Williams HE, Smith LH. Disorders of oxalate metabolism. *Am J Med* 1968;45:715–35.
87. Mitwalli A, Oreopoulos DG. Hyperoxaluria and Hyperoxalemia: One More Concern for the Nephrologist. *Int J Artif Organs* 1985;8:71–4.
88. Bhasin B. Primary and secondary hyperoxaluria: Understanding the enigma. *World J Nephrol* 2015;4:235–44.
89. Spiro RG. Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. *Glycobiology* 2002;12:43R-56R.
90. Lauc G, Zoldoš V. Protein glycosylation—an evolutionary crossroad between genes and environment. *Mol BioSyst* 2010;6:2373–9.
91. Nelson DL, Cox MM, Lehninger AL. *Lehninger principles of biochemistry*, 6th ed. New York: Freeman, 2013:238–269.
92. Schjoldager KT, Narimatsu Y, Joshi HJ, Clausen H. Global view of human protein glycosylation pathways and functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2020;21:729–49.
93. Reily C, Stewart TJ, Renfrow MB, Novak J. Glycosylation in health and disease. *Nat Rev Nephrol* 2019;15:346–66.
94. Matsui T, Takita E, Sato T, Kinjo S, Aizawa M, Sugiura Y, et al. N-glycosylation at noncanonical Asn-X-Cys sequences in plant cells. *Glycobiology* 2011;21:994–9.

95. Apweiler R. On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 1999;1473:4–8.
96. Varki A, Cummings RD, Esko JD, Stanley P, Hart GW, Aebi M, et al., editors. *Essentials of Glycobiology*, 4th ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2022.
97. Holst S, Wilding J, Koprowska K, Rombouts Y, Wuhrer M. N-Glycomic and Transcriptomic Changes Associated with CDX1 mRNA Expression in Colorectal Cancer Cell Lines. *Cells* 2019;8:273.
98. Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, et al., editors. *Essentials of Glycobiology*, 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009.
99. Pinho SS, Reis CA. Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications. *Nat Rev Cancer* 2015;15:540–55.
100. Adamczyk B, Tharmalingam T, Rudd PM. Glycans as cancer biomarkers. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 2012;1820:1347–53.
101. Lan Y, Hao C, Zeng X, He Y, Zeng P, Guo Z, et al. Serum glycoprotein-derived N- and O-linked glycans as cancer biomarkers. *Am J Cancer Res* 2016;6:2390–415.
102. Krištić J, Vučković F, Menni C, Klarić L, Keser T, Beceheli I, et al. Glycans Are a Novel Biomarker of Chronological and Biological Ages. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2014;69:779–89.
103. Miura Y, Endo T. Glycomics and glycoproteomics focused on aging and age-related diseases — Glycans as a potential biomarker for physiological alterations. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 2016;1860:1608–14.
104. Schedin-Weiss S, Winblad B, Tjernberg LO. The role of protein glycosylation in Alzheimer disease. *FEBS J* 2014;281:46–62.
105. Satomi Y, Shimonishi Y, Takao T. N-glycosylation at Asn⁴⁹¹ in the Asn-Xaa-Cys motif of human transferrin. *FESB Lett* 2004;576:51–6.
106. Satomi Y, Shimonishi Y, Hase T, Takao T. Site-specific carbohydrate profiling of human transferrin by nano-flow liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2004;18:2983–8.
107. Fu D, van Halbeek H. N-glycosylation site mapping of human serotransferrin by serial lectin affinity chromatography, fast atom bombardment-mass spectrometry, and ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Anal Biochem* 1992;206:53–63.
108. Landberg E, Pahlsson P, Lundblad A, Arnetorp A, Jeppsson JO. Carbohydrate Composition of Serum Transferrin Isoforms from Patients with High Alcohol Consumption. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;210:267–74.
109. Arndt T. Carbohydrate-deficient Transferrin as a Marker of Chronic Alcohol Abuse: A Critical Review of Preanalysis, Analysis, and Interpretation. *Clin Chem* 2001;47:13–27.

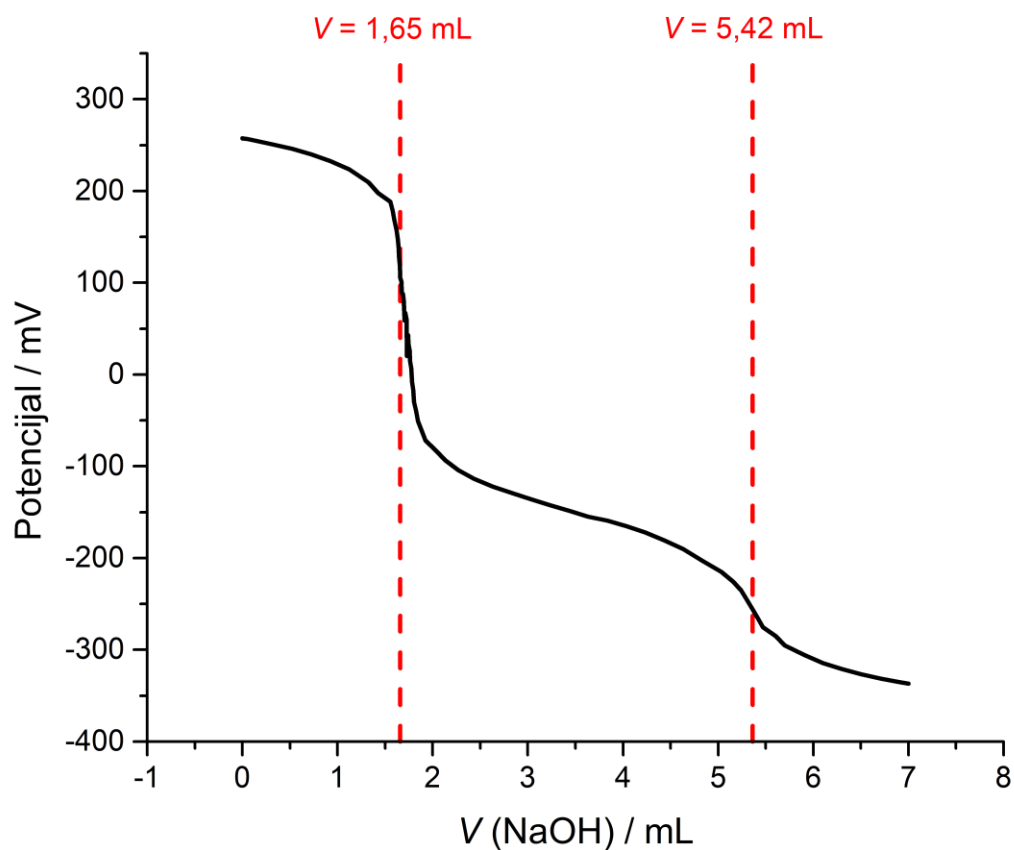
110. Mårtensson O, Härlin A, Brandt R, Seppä K, Sillanaukee P. Transferrin isoform distribution: gender and alcohol consumption. *Alcohol Clin Exp Res* 1997;21:1710–5.
111. Gordon N. Carbohydrate-deficient glycoprotein syndromes. *Postgrad Med J* 2000;76:145–9.
112. Carchon H, Van Schaftingen E, Matthijs G, Jaeken J. Carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type IA (phosphomannomutase-deficiency). *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 1999;1455:155–65.
113. Nihlén U, Montnémery P, Lindholm LH, Löfdahl CG. Increased serum levels of carbohydrate-deficient transferrin in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Scand J Clin Lab Invest* 2001;61:341–7.
114. Blomme B, Van Steenkiste C, Callewaert N, Van Vlierberghe H. Alteration of protein glycosylation in liver diseases. *J Hepatol* 2009;50:592–603.
115. Piagnerelli M, Boudjeltia KZ, Nuyens V, De Backer D, Su F, Wang Z, et al. Rapid alterations in transferrin sialylation during sepsis. *Shock* 2005;24:48–52.
116. Gornik O, Gornik I, Zagorec Kolednjak I, Lauc G. Change of Transferrin Sialylation Differs between Mild Sepsis and Severe Sepsis and Septic Shock. *Intern Med* 2011;50:861–9.
117. Gornik O, Gornik I, Gašparović V, Lauc G. Change in transferrin sialylation is a potential prognostic marker for severity of acute pancreatitis. *Clin Biochem* 2008;41:504–10.
118. Gornik O, Lauc G. Glycosylation of serum proteins in inflammatory diseases. *Dis Markers* 2008;25:267–78.
119. Ashwell G, Morell AG. *Advances in Enzymology - and Related Areas of Molecular Biology*. Meister A, editor. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 1974.
120. David L. Williams VM. *Scientific Foundations of Biochemistry in Clinical Practice*. Bristol: The Bath Press Ltd, 1994.
121. Rudolph JR, Regoezi E, Chindemi PA, Debanne MT. Preferential hepatic uptake of iron from rat asialotransferrin: possible engagement of two receptors. *Am J Physiol* 1986;251:G398-404.
122. Dekker CJ, Kroos MJ, Van Der Heul C, Van Eijk HG. Uptake of sialo and asialo transferrins by isolated rat hepatocytes. comparison of a heterologous and a homologous system. *Int J Biochem* 1985;17:701–6.
123. De Jong G, Feelders R, Van Noort WL, Van Eijk HG. Transferrin microheterogeneity as a probe in normal and disease states. *Glycoconj J* 1995;12:219–26.
124. Sturiale L, Barone R, Fiumara A, Perez M, Zaffanello M, Sorge G, et al. Hypoglycosylation with increased fucosylation and branching of serum transferrin N-glycans in untreated galactosemia. *Glycobiology* 2005;15:1268–76.

125. Feelders RA, Vreugdenhil G, de Jong G, Swaak AJ, van Eijk HG. Transferrin microheterogeneity in rheumatoid arthritis. Relation with disease activity and anemia of chronic disease. *Rheumatol Int* 1992;12:195–9.
126. Grzymisławski M, Derc K, Sobieska M, Wiktorowicz K. Microheterogeneity of acute phase proteins in patients with ulcerative colitis. *World J Gastroenterol* 2006;12:5191–5.
127. Quinn CF, Carpenter MC, Croteau ML, Wilcox DE. Isothermal Titration Calorimetry Measurements of Metal Ions Binding to Proteins. In: *Methods in Enzymology* Elsevier, 2016:3–21.
128. Krainer G, Keller S. Single-experiment displacement assay for quantifying high-affinity binding by isothermal titration calorimetry. *Methods* 2015;76:116–23.
129. Leavitt S, Freire E. Direct measurement of protein binding energetics by isothermal titration calorimetry. *Curr Opin Struct Biol* 2001;11:560–6.
130. Lin LN, Mason AB, Woodworth RC, Brandts JF. Calorimetric studies of the binding of ferric ions to ovotransferrin and interactions between binding sites. *Biochemistry* 1991;30:11660–9.
131. Binford JS, Foster JC. Calorimetry of the Transfer of Fe(III) from Nitritotriacetate to Apotransferrin in the Presence and in the Absence of Bicarbonate. *J Biol Chem* 1974;249:407–12.
132. Creagh AL, Tiong JWC, Tian MM, Haynes CA, Jefferies WA. Calorimetric Studies of Melanotransferrin (p97) and Its Interaction with Iron. *J Biol Chem* 2005;280:15735–41.
133. Tinoco AD, Valentine AM. Ti(IV) Binds to Human Serum Transferrin More Tightly Than Does Fe(III). *J Am Chem Soc* 2005;127:11218–9.
134. Bordbar A-K, Creagh AL, Mohammadi F, Haynes CA, Orvig C. Calorimetric studies of the interaction between the insulin-enhancing drug candidate bis(maltolato)oxovanadium(IV) (BMOV) and human serum apo-transferrin. *J Inorg Biochem* 2009;103:643–7.
135. Mason AB, Byrne SL, Everse SJ, Roberts SE, Chasteen ND, Smith VC, et al. A loop in the N-lobe of human serum transferrin is critical for binding to the transferrin receptor as revealed by mutagenesis, isothermal titration calorimetry, and epitope mapping. *J Mol Recognit* 2009;22:521–9.
136. Hirsh AG, Tsonev LI. Multiple, simultaneous, independent gradients for a versatile multidimensional liquid chromatography. Part II: Application 2: Computer controlled pH gradients in the presence of urea provide improved separation of proteins: Stability influenced anion and cation exchange chromatography. *J Chromatogr A* 2017;1495:22–30.
137. Štambuk, Tamara, Cvetko, Ana, Weitner, Tin. Protocol for ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry N-glycan analysis of the native and desialylated human apo-transferrin. Zenodo, 2020.

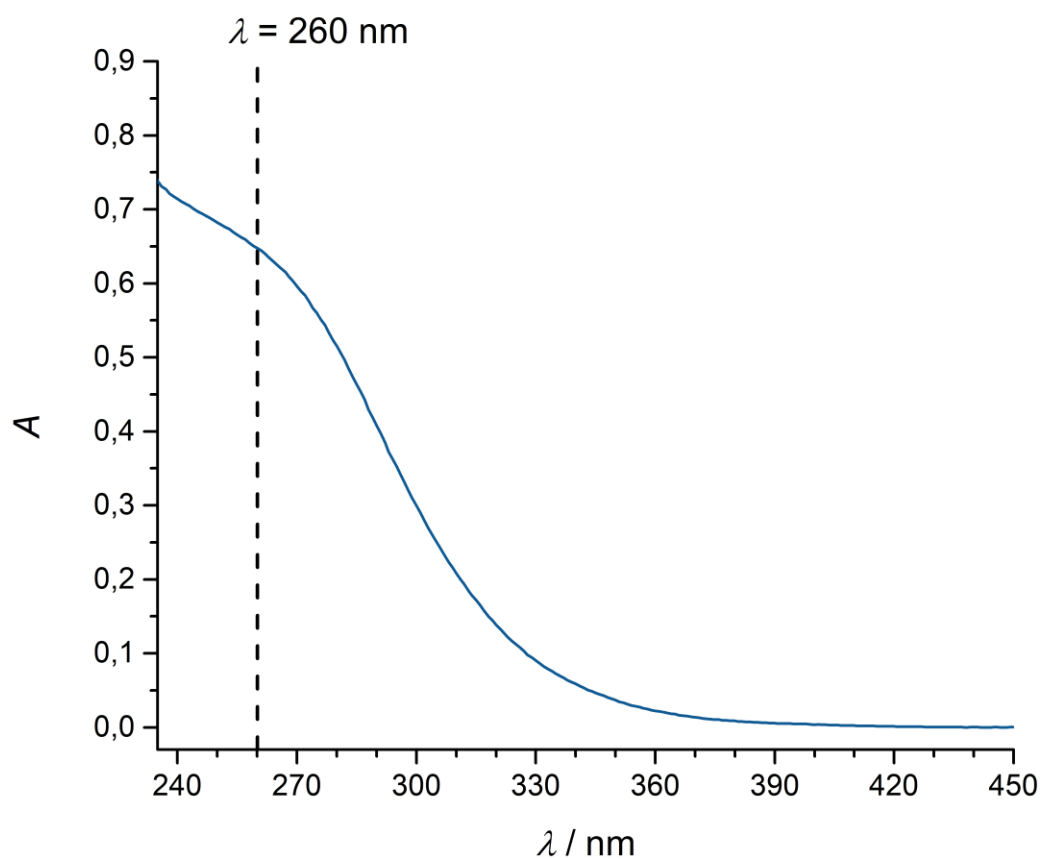
138. Friganović T, Tomašić A, Šeba T, Biruš I, Kerep R, Borko V, et al. Low-pressure chromatographic separation and UV/Vis spectrophotometric characterization of the native and desialylated human apo-transferrin. *Heliyon* 2021;7:e08030.
139. Bunescu A, Besse-Hoggan P, Sancelme M, Mailhot G, Delort A-M. Fate of the Nitrilotriacetic Acid-Fe(III) Complex during Photodegradation and Biodegradation by *Rhodococcus rhodochrous*. *Appl Environ Microbiol* 2008;74:6320–6.
140. James NG, Mason AB. Protocol to determine accurate absorption coefficients for iron-containing transferrins. *Anal Biochem* 2008;378:202–7.
141. Thordarson P. Determining association constants from titration experiments in supramolecular chemistry. *Chem Soc Rev* 2011;40:1305–23.
142. Motekaitis RJ, Martell AE. The iron(III) and iron(II) complexes of nitrilotriacetic acid. *J Coord Chem* 1994;31:67–78.
143. Hegenuer J, Saltman P, Nace G. Iron(III)-phosphoprotein chelates: stoichiometric equilibrium constant for interaction of iron(III) and phosphorylserine residues of phosvitin and casein. *Biochemistry* 1979;18:3865–79.
144. Freire E, Schön A, Velazquez-Campoy A. Chapter 5 Isothermal Titration Calorimetry. In: *Methods in Enzymology* Elsevier, 2009:127–55.
145. Zaiontz C. *Real Statistics Using Excel*. 2013. (<https://www.real-statistics.com/>).
146. Larson DA. Analysis of Variance with Just Summary Statistics as Input. *Am Stat* 1992;46:151–2.
147. Lakens D. Calculating and reporting effect sizes to facilitate cumulative science: a practical primer for t-tests and ANOVAs. *Front Psychol* 2013;4.
148. Olejnik S, Algina J. Generalized Eta and Omega Squared Statistics: Measures of Effect Size for Some Common Research Designs. *Psychol Methods* 2003;8:434–47.
149. Frane AV. Experiment-Wise Type I Error Control: A Focus on 2×2 Designs. *Adv Meth Pract Psychol Sci* 2021;4:251524592098513.
150. Kirk RE. Practical Significance: A Concept Whose Time Has Come. *Educ Psychol Meas* 1996;56:746–59.
151. Villacorta P J. The welchADF Package for Robust Hypothesis Testing in Unbalanced Multivariate Mixed Models with Heteroscedastic and Non-normal Data. *R J* 2017;9:309.
152. Van Campenhout A. Effects of in Vitro Glycation on Fe³⁺ Binding and Fe³⁺ Isoforms of Transferrin. *Clin Chem* 2004;50:1640–9.
153. Jelesarov I, Bosshard HR. Isothermal titration calorimetry and differential scanning calorimetry as complementary tools to investigate the energetics of biomolecular recognition. *J Mol Recognit* 1999;12:3–18.

154. Cooper A, Johnson CM. Introduction to Microcalorimetry and Biomolecular Energetics. In: *Microscopy, Optical Spectroscopy, and Macroscopic Techniques* New Jersey: Humana Press, 1993:109–24.
155. Bianconi ML. Avoiding Buffer Interference in ITC Experiments. In: *Methods in Enzymology* Elsevier, 2016:237–56.
156. Broecker J, Vargas C, Keller S. Revisiting the optimal cvalue for isothermal titration calorimetry. *Anal Biochem* 2011;418:307–9.
157. Velazquez-Campoy A, Freire E. Isothermal titration calorimetry to determine association constants for high-affinity ligands. *Nat Protoc* 2006;1:186–91.
158. Chao Y, Fu D. Thermodynamic Studies of the Mechanism of Metal Binding to the Escherichia coli Zinc Transporter YiiP. *J Biol Chem* 2004;279:17173–80.
159. Li G, Phetsanthad A, Ma M, Yu Q, Nair A, Zheng Z, et al. Native Ion Mobility–Mass Spectrometry-Enabled Fast Structural Interrogation of Labile Protein Surface Modifications at the Intact Protein Level. *Anal Chem* 2022;94:2142–2153.
160. Hamano Nagaoka M, Maitani T. Effects of sialic acid residues of transferrin on the binding with aluminum and iron studied by HPLC/high-resolution ICP-MS. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 2001;1526:175–82.
161. Harris WR, Nessel-Tollefson D, Stenback JZ, Mohamed-Hani N. Site selectivity in the binding of inorganic anions to serum transferrin. *J Inorg Biochem* 1990;38:175–83.
162. Harris WR, Brook CE, Spilling CD, Elleppan S, Peng W, Xin M, et al. Release of iron from transferrin by phosphonocarboxylate and diphosphonate chelating agents. *J Inorg Biochem* 2004;98:1824–36.

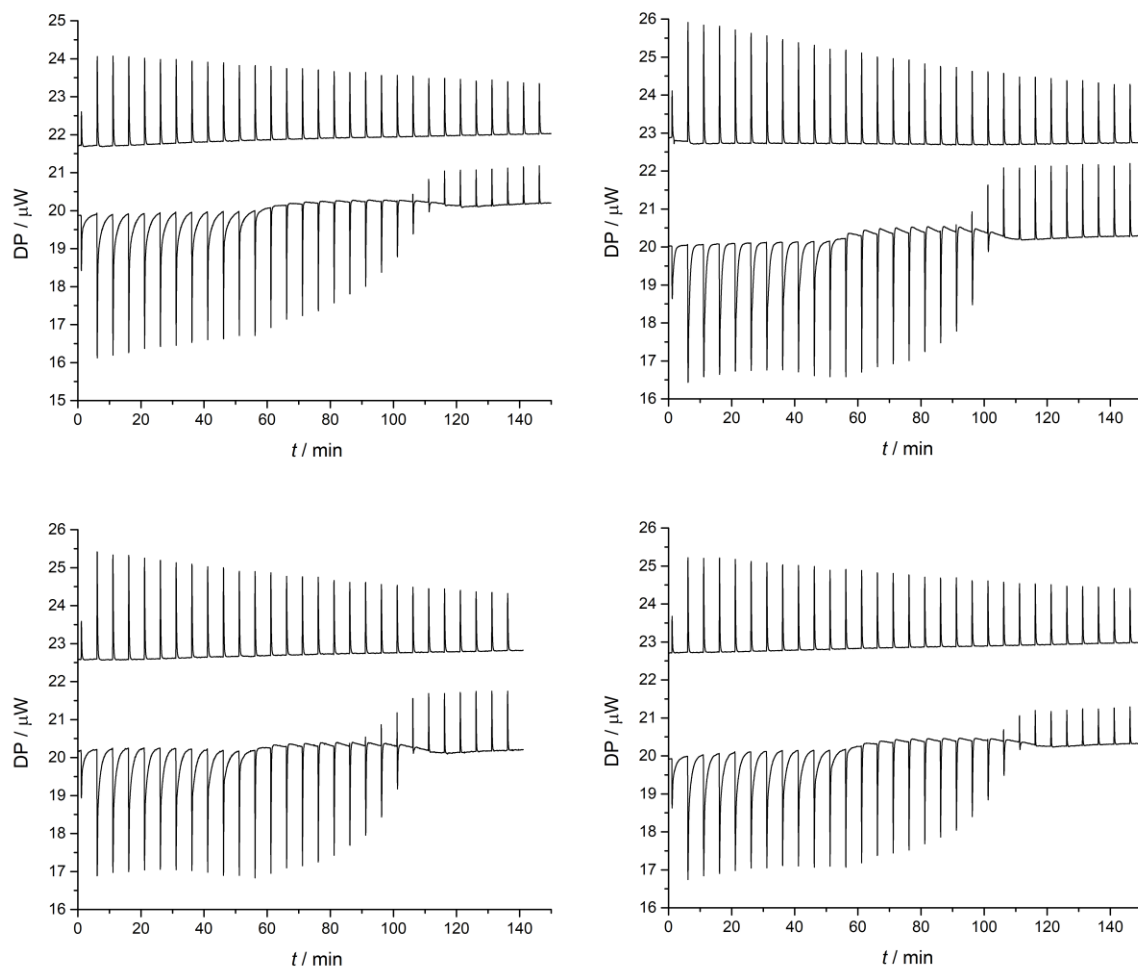
§ 7. PRILOZI



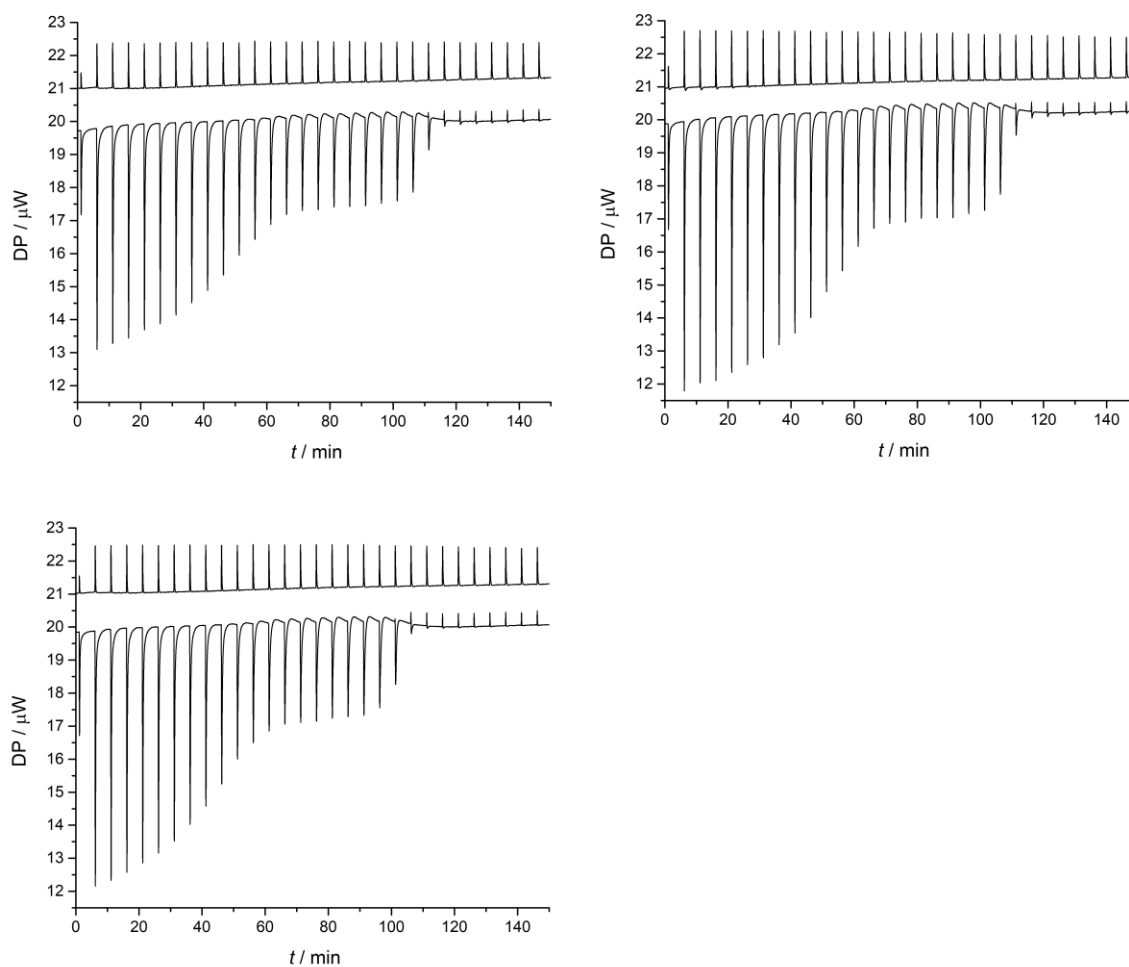
Slika 7.1. Primjer potenciometrijske titracije zakiseljene otopine Na_3NTA standardnom otopinom NaOH (1 M) u svrhu određivanja koncentracije NTA. Iz razlike volumena u točkama infleksije moguće je izračunati koncentraciju titrirane otopine Na_3NTA .



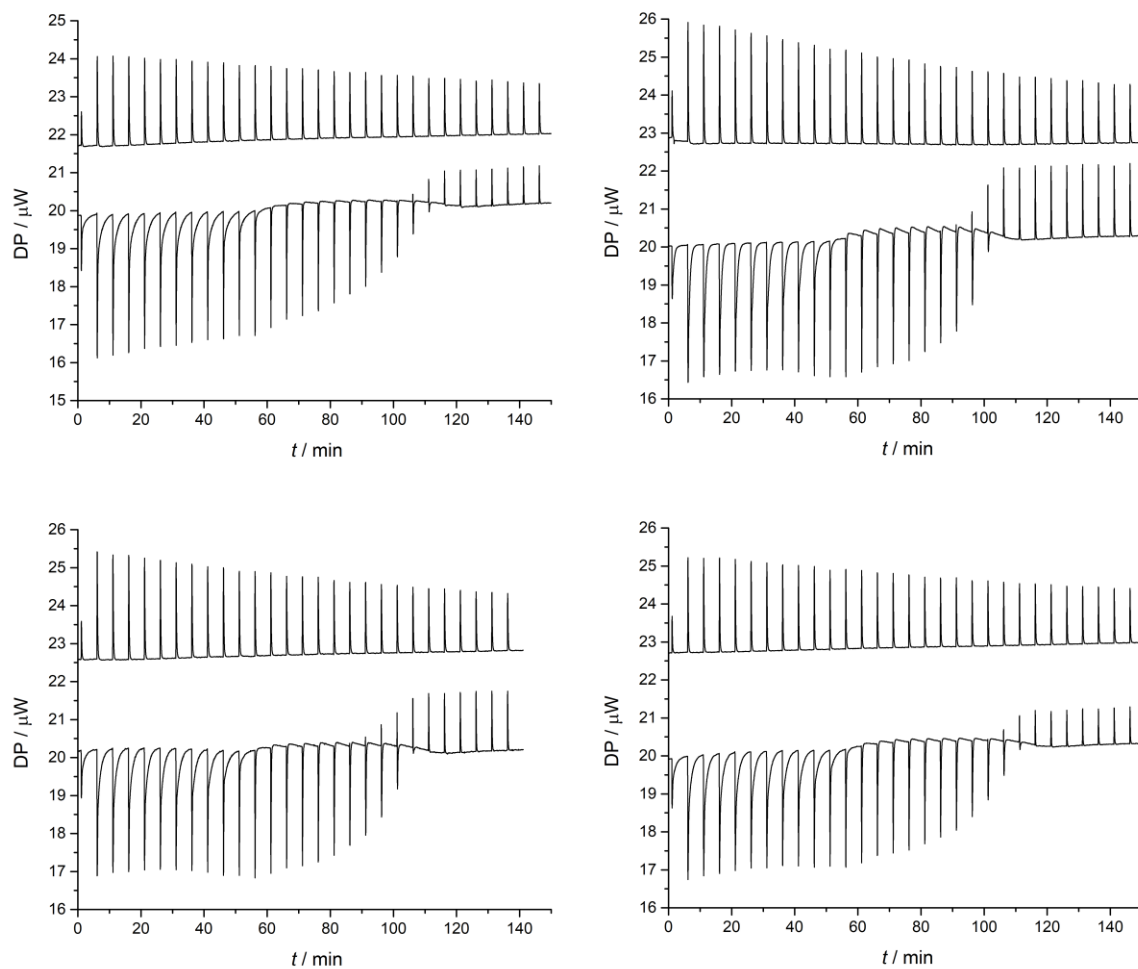
Slika 7.2. Primjer UV/VIS spektra radne otopine FeNTA razrijeđene 40x (pufer: 0,1 M HEPES, 25 mM karbonat, pH 7,4). Optički put iznosio je 1 cm, a vrijednost apsorbancije na 260 nm korištena je za određivanje koncentracije radne otopine FeNTA prije ITC eksperimenata.



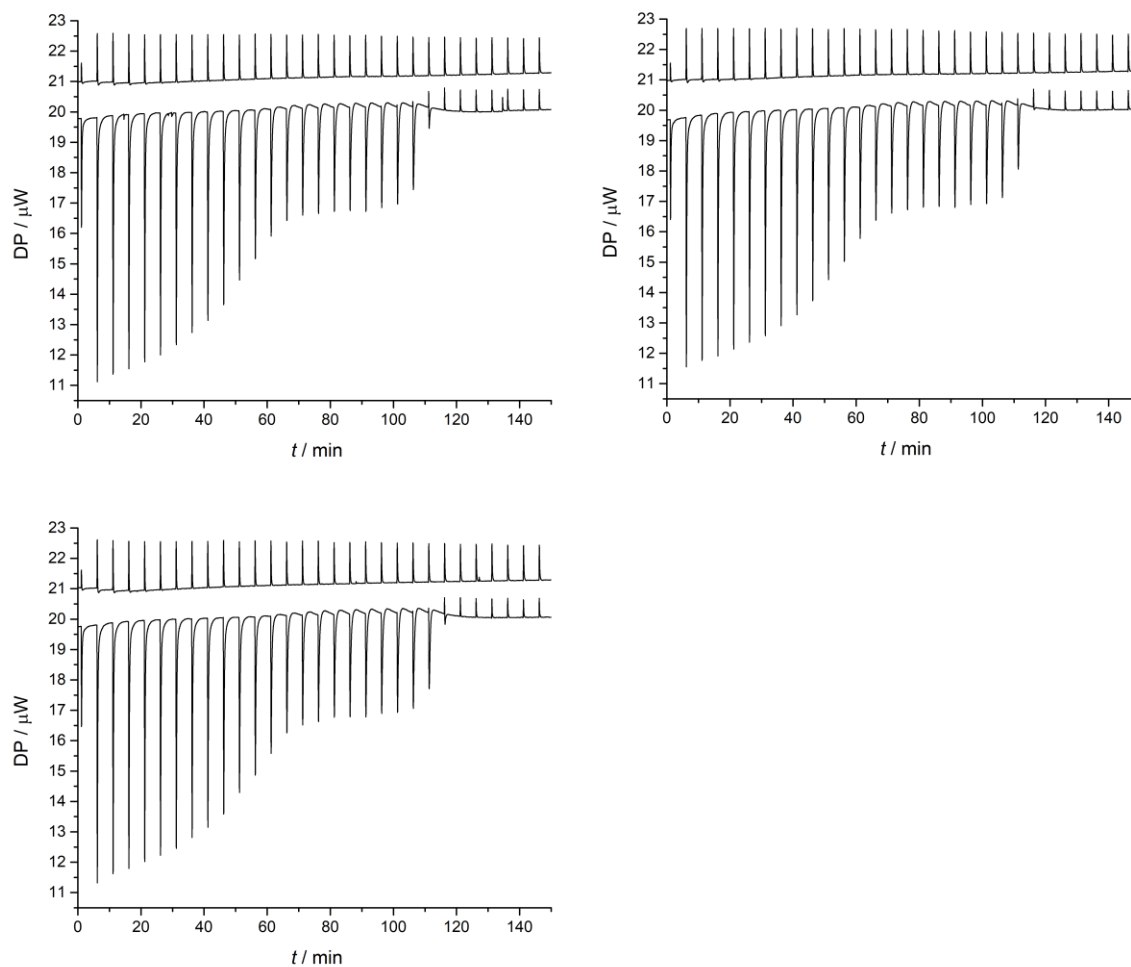
Slika 7.3. ITC termogrami titracije nativnog apotransferina sa FeNTA pri 25 °C u 0,1 M HEPES-u, 25 mM karbonatu, pH 7,4, mjereni u kvadruplikatu. Termogrami kontrolnih titracija prikazani su iznad svakog eksperimenta i odnose se na injekcije dodatka FeNTA u ćeliju koja je sadržavala samo radni pufer.



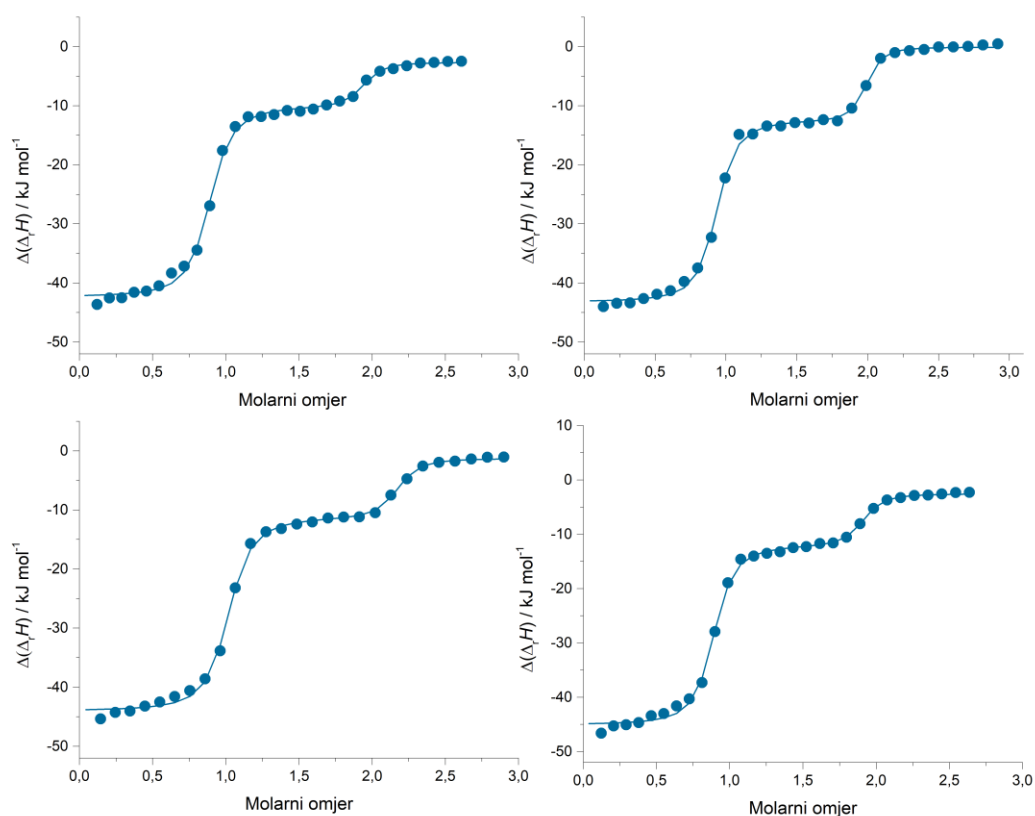
Slika 7.4. ITC termogrami titracije nativnog apotransferina sa FeNTA pri 25 °C u 0,1 M HEPES-u, 25 mM oksalatu, pH 7,4, mjereni u triplikatu. Termogrami kontrolnih titracija prikazani su iznad svakog eksperimenta i odnose se na injekcije dodatka FeNTA u ćeliju koja je sadržavala samo radni pufer.



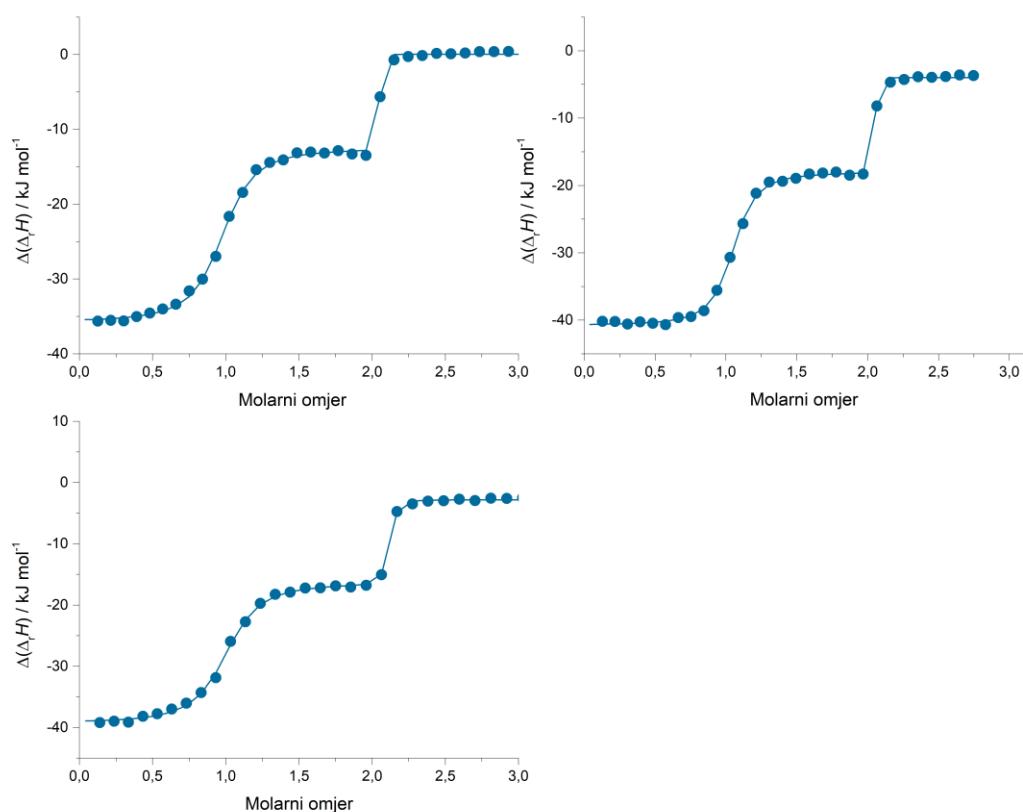
Slika 7.5. ITC termogrami titracije desijaliniziranog apotransferina sa FeNTA pri 25 °C u 0,1 M HEPES-u, 25 mM karbonatu, pH 7,4, mjereni u triplikatu. Termogrami kontrolnih titracija prikazani su iznad svakog eksperimenta i odnose se na injekcije dodatka FeNTA u ćeliju koja je sadržavala samo radni pufer.



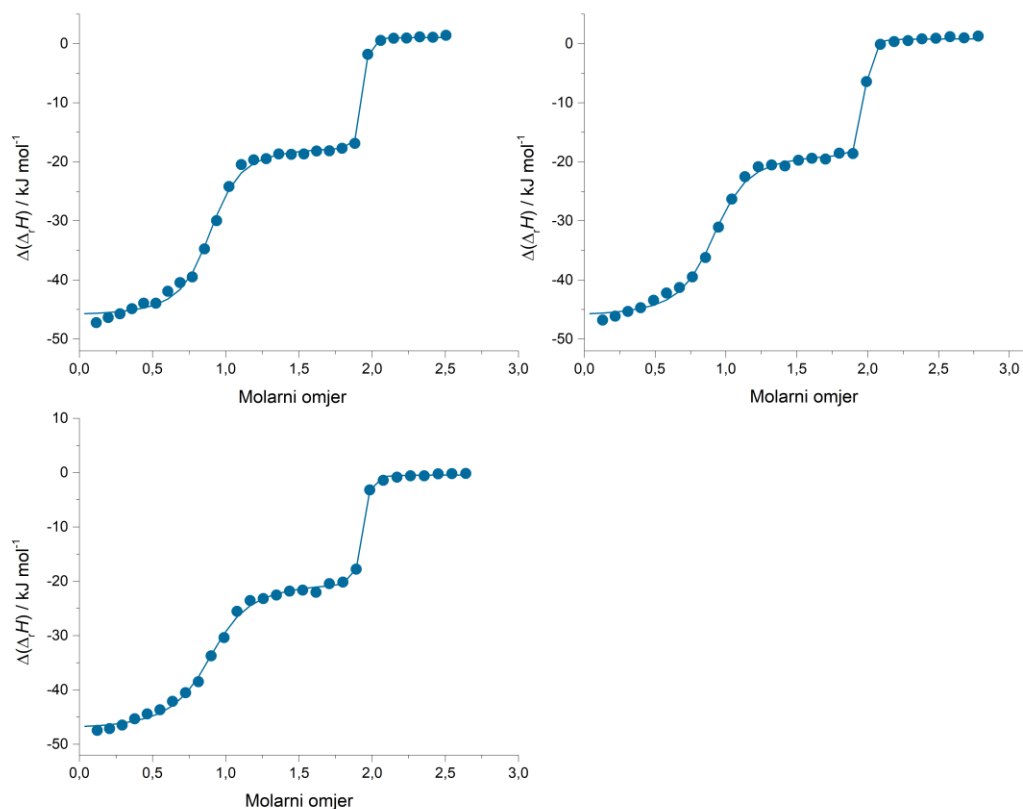
Slika 7.6. ITC termogrami titracije desijaliniziranog apotransferina sa FeNTA pri 25 °C u 0,1 M HEPES-u, 25 mM oksalatu, pH 7,4, mjereni u triplikatu. Termogrami kontrolnih titracija prikazani su iznad svakog eksperimenta i odnose se na injekcije dodatka FeNTA u ćeliju koja je sadržavala samo radni pufer.



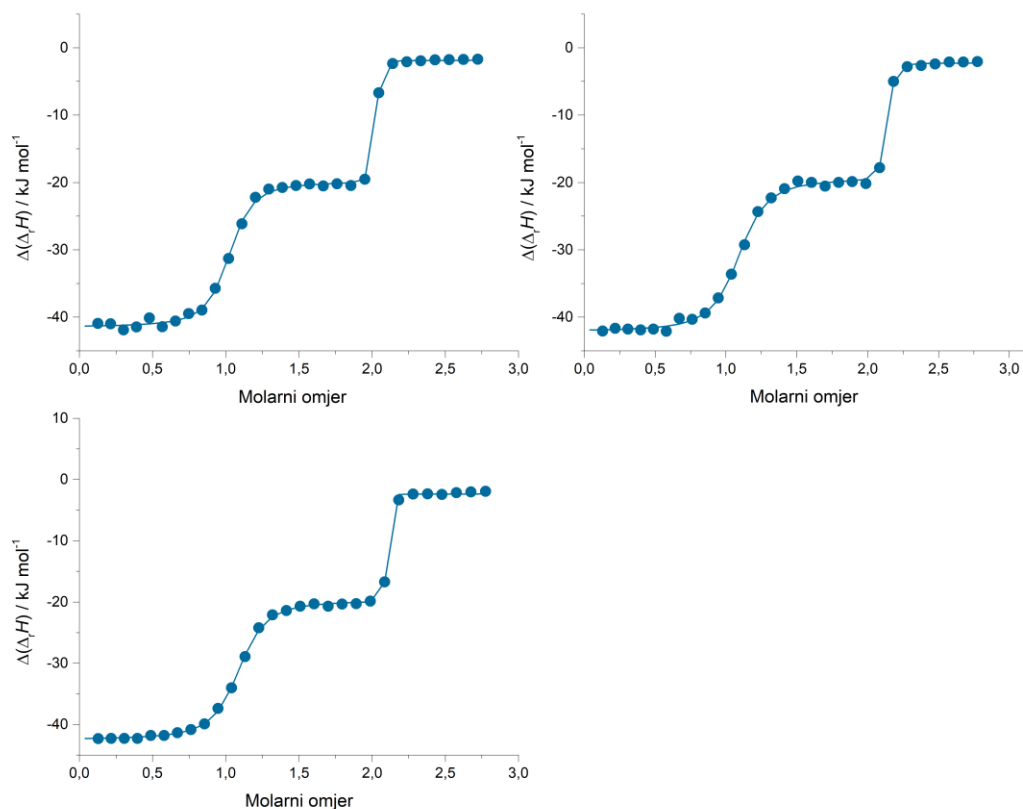
Slika 7.7. Ovisnost sukcesivne promjene entalpije o množinskom omjeru titranta (FeNTA) i transferina za titracije prikazane na slici 7.3. (nativni transferin, karbonat). Vrijednosti sukcesivne entalpije dobivene su oduzimanjem kontrolnih titracija (dodatak FeNTA u radni pufer) od eksperimentalnih. Kružići označavaju eksperimentom dobivene vrijednosti, dok su linijom označene vrijednosti dobivene utočnjavanjem termodinamičkih parametara.



Slika 7.8. Ovisnost sukcesivne promjene entalpije o množinskom omjeru titranta (FeNTA) i transferina za titracije prikazane na slici 7.4. (nativni transferin, oksalat). Vrijednosti sukcesivne entalpije dobivene su oduzimanjem kontrolnih titracija (dodatak FeNTA u radni pufer) od eksperimentalnih. Kružići označavaju eksperimentom dobivene vrijednosti, dok su linijom označene vrijednosti dobivene utočnjavanjem termodinamičkih parametara.



Slika 7.9. Ovisnost sukcesivne promjene entalpije o množinskom omjeru titranta (FeNTA) i transferina za titracije prikazane na slici 7.5. (desijalinizirani transferin, karbonat). Vrijednosti sukcesivne entalpije dobivene su oduzimanjem kontrolnih titracija (dodatak FeNTA u radni pufer) od eksperimentalnih. Kružići označavaju eksperimentom dobivene vrijednosti, dok su linijom označene vrijednosti dobivene utočnjavanjem termodinamičkih parametara.



Slika 7.10. Ovisnost sukcesivne promjene entalpije o množinskom omjeru titranta (FeNTA) i transferina za titracije prikazane na slici 7.6. (desijalinizirani transferin, oksalat). Vrijednosti sukcesivne entalpije dobivene su oduzimanjem kontrolnih titracija (dodatak FeNTA u radni pufer) od eksperimentalnih. Kružići označavaju eksperimentom dobivene vrijednosti, dok su linijom označene vrijednosti dobivene utočnjavanjem termodinamičkih parametara.

Tablica 7.1. Rezultati izračuna termodinamičkih parametara pomoću programa *Malvern MicroCal PEAQ-ITC Analysis software* (verzija 1,30) za titraciju ljudskog serumskog transferina sa FeNTA u prisutnosti karbonata kao sinergijskog aniona u puferu sastava 0,1 M HEPES, 0,025 M NaHCO₃, pH 7,4. K_C/K_N predstavlja omjer asocijacijskih konstanti za vezanje FeNTA na apotransferin.

Uzorak	Tf+s				Tf-s		
Temperatura (°C)	25,2	25,2	25,1	25,1	25,1	25,2	25,2
[Titrant] (M)	0,00398	0,00409	0,00406	0,00385	0,00418	0,00391	0,00393
[Protein] (M)	0,00021	0,000193	0,000179	0,000201	0,000207	0,000215	0,000205
Ligand in ćeliji	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne
Vrsta kontrole	Jedinična	Jedinična	Jedinična	Jedinična	Jedinična	Jedinična	Jedinična
N_1 (veznih mjesta)	0,847	0,886	0,967	0,848	0,872	0,854	0,855
$K_{D1} \cdot 10^9$	5,23	2,27	4,22	4,56	0,741	0,319	1,03
$\Delta_r H^\circ_1$ (kJ/mol)	-39,7	-43,1	-42,7	-42,6	-47,1	-47,2	-47
$\Delta_r G^\circ_1$ (kJ/mol)	-47,3	-49,4	-47,9	-47,7	-52,2	-54,3	-51,4
$-T\Delta_r S^\circ_1$ (kJ/mol)	-7,59	-6,26	-5,12	-5,10	-5,10	-7,08	-4,38
N_2 (veznih mjesta)	1,06	1,06	1,16	1,03	1,06	1,04	1,04
$K_{D2} \cdot 10^7$	7,98	4,25	7,42	8,14	0,432	0,244	0,467
$\Delta_r H^\circ_2$ (kJ/mol)	-7,46	-12,4	-10	-9,53	-19,4	-18,5	-19,8
“Offset” (kJ/mol)	-2,63	-0,071	-1,28	-2,53	0,811	1,04	-0,437
$\Delta_r G^\circ_2$ (kJ/mol)	-34,9	-36,4	-35	-34,8	-41,1	-43,5	-41,9
$-T\Delta_r S^\circ_2$ (kJ/mol)	-27,4	-24	-25	-25,3	-22,7	-25	-22,1
Red, Chi-Sqr (kJ/mol) ²	0,511	0,4	0,432	0,457	0,388	0,565	0,391
K_C/K_N	152,58	187,22	175,83	178,51	58,3	76,49	45,34

Tablica 7.2. Rezultati izračuna termodinamičkih parametara pomoću programa *Malvern MicroCal PEAQ-ITC Analysis software* (verzija 1,30) za titraciju ljudskog serumskog transferina sa FeNTA u prisutnosti oksalata kao sinergijskog aniona u puferu sastava 0,1 M HEPES, 0,025 M $K_2C_2O_4$, pH 7,4. K_C/K_N predstavlja omjer asocijacijskih konstanti za vezanje FeNTA na apotransferin.

Uzorak	Tf+s			Tf-s		
Temperatura (°C)	25,2	25,1	25,3	25,3	25,2	25,2
[Titrant] (M)	0,00399	0,0042	0,00423	0,00413	0,00405	0,00409
[Protein] (M)	0,000201	0,000191	0,000212	0,000209	0,000201	0,000203
Ligand in ćeliji	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne
Vrsta kontrole	Jedinična	Jedinična	Jedinična	Jedinična	Jedinična	Jedinična
N_1 (veznih mjesta)	0,932	0,954	1,01	0,978	1,04	1,05
$K_{D1} \cdot 10^{10}$	0,322	6,04	0,268	1,23	0,145	4,26
$\Delta_r H^\circ_1$ (kJ/mol)	-35,8	-36,5	-36,8	-39,6	-40,1	-39,8
$\Delta_r G^\circ_1$ (kJ/mol)	-60	-52,7	-60,4	-56,7	-61,9	-53,6
$-T\Delta_r S^\circ_1$ (kJ/mol)	-24,1	-16,2	-23,7	-17,1	-21,8	-13,7
N_2 (vezanih mjesta)	1,07	1,11	0,991	0,994	1,03	1,04
$K_{D2} \cdot 10^8$	0,26	4,66	0,414	1,92	0,178	4,79
$\Delta_r H^\circ_2$ (kJ/mol)	-12,6	-13,7	-14,1	-18,1	-17,5	-17,3
“Offset” (kJ/mol)	0,049	-2,81	-3,98	-1,86	-2,36	-2,26
$\Delta_r G^\circ_2$ (kJ/mol)	-49,1	-41,9	-47,9	-44,1	-50	-41,8
$-T\Delta_r S^\circ_2$ (kJ/mol)	-36,4	-28,2	-33,8	-26	-32,5	-24,6
Red, Chi-Sqr, (kJ/mol) ²	0,159	0,127	0,123	0,167	0,094	0,175
K_C/K_N	81	77	154	156	123	112

Tablica 7.3. Procjena parametra l_x i FWHM za oba vezna mjesta ljudskog serumskog transferina (prema postupku opisanom u poglavlju 3.6.). Vrijednosti računane za drugu injekciju (prvi integrirani signal) korištene su za opis C-veznog mjesta. Egzotermni signal pri molarnom omjeru FeNTA : Tf \approx 1,6 : 1 korišten je za opis N-veznog mjesta. Standardne devijacije prikazane su u zagradama.

C-vezno mjesto													
	Tf+s karb.				Tf+s oks.			Tf-s karb.			Tf-s oks.		
dP (bazne linije)/ μ W	19,87	20,02	20,17	19,91	19,70	19,84	19,87	19,54	19,76	19,79	19,78	19,68	19,76
dP (signala)/ μ W	16,12	16,45	16,90	16,74	13,10	12,16	11,79	15,09	14,75	14,63	11,12	11,55	11,32
$l_{y,max}$ (signala)/ μ W	3,75	3,57	3,27	3,17	6,60	7,69	8,08	4,45	5,01	5,17	8,66	8,12	8,44
$\Delta Q/\mu$ J	127,96	124,56	131,32	132,64	127,88	135,52	141,23	128,98	136,85	133,82	142,38	143,09	146,68
l_x/s	34,17	34,86	40,15	41,83	19,37	17,63	17,49	28,99	27,32	25,91	16,44	17,61	17,38
Prosjek l_x/s	37,8(3,8)				18,2(1,1)			27,4(1,5)			17,1(0,6)		
Prosjek FWHM/s	18,3(5,6)				11,5(0,6)			16,2(1,2)			11,5(0,4)		
N-vezno mjesto													
	Tf+s karb.				Tf+s oks.			Tf-s karb.			Tf-s oks.		
dP (bazne linije)/ μ W	20,23	20,39	20,29	20,39	20,11	20,15	20,33	20,15	20,14	20,22	20,15	20,15	20,17
dP (signala)/ μ W	18,01	17,24	17,25	18,05	17,43	17,24	17,03	15,91	15,19	15,35	16,75	16,84	16,79
$l_{y,max}$ (signala)/ μ W	2,23	3,15	3,04	2,35	2,68	2,91	3,30	4,24	4,94	4,87	3,40	3,31	3,38
$\Delta Q/\mu$ J	23,01	41,71	32,05	30,89	68,31	71,17	77,52	60,13	69,12	71,31	80,22	79,55	79,47
x (FeNTA)	1,60	1,59	1,59	1,61	1,58	1,65	1,59	1,62	1,59	1,62	1,57	1,60	1,60
Broj injekcije	19	17	16	19	18	17	18	20	18	19	18	18	18
l_x/s	10,34	13,26	10,55	13,17	25,44	24,45	23,48	18,94	16,10	16,32	23,59	24,00	23,51
Prosjek l_x/s	11,8(1,6)				24,5(1,0)			17,1(1,6)			23,7(0,3)		
Prosjek FWHM/s	10,0(1,3)				17,6(0,8)			10,6(1,8)			17,5(0,4)		

Prilog sadrži i originalni znanstveni rad objavljen u časopisu koji je zastupljen u bazi *Web of Science Core Collection*, a koji obrađuje problematiku iznesenu u ovom doktorskom radu:

Borko V, Friganović T, Weitner T. Glycoproteomics meets thermodynamics: A calorimetric study of the effect of sialylation and synergistic anion on the binding of iron to human serum transferrin. *J Inorg Biochem* 2023;244:112207.



Glycoproteomics meets thermodynamics: A calorimetric study of the effect of sialylation and synergistic anion on the binding of iron to human serum transferrin

Valentina Borko, Tomislav Friganović, Tin Weitner*

Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb, Ante Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

ARTICLE INFO

Keywords:

Human serum transferrin
Sialic acid
Synergistic anion
Glycoproteomics
Isothermal titration calorimetry
Thermodynamics

ABSTRACT

The thermodynamic parameters for the binding of ferric ions to human serum transferrin (hTf) as the major mediator of iron transport in blood plasma were determined by isothermal titration calorimetry in the presence of carbonate and oxalate as synergistic anions at pH 7.4. The results indicate that the binding of ferric ions to the two binding sites of hTf is driven both enthalpically and entropically in a lobe-dependent manner: binding to the C-site is mainly enthalpically driven, whereas binding to the N-site is mainly entropically driven. Lower sialic acid content of hTf leads to more exothermic apparent binding enthalpies for both lobes, while the increased apparent binding constants for both sites were found in the presence of carbonate. Sialylation also unequally affected the heat change rates for both sites only in the presence of carbonate, but not in the presence of oxalate. Overall, the results suggest that the desialylated hTf has a higher iron sequestering ability, which may have implications for iron metabolism.

1. Introduction

1.1. Transferrin as an iron transport protein

Iron is an irreplaceable cofactor for various physiological and metabolic processes such as oxygen transport, energy production, and cell proliferation [1]. Mammals have evolved a unique system for binding, transporting and storing iron through various proteins such as transferrin or ferritin [2,3]. Human serum transferrin (hTf) plays an important role in transporting iron from the digestive tract to cells, which indicate their iron requirement by expressing transferrin receptors on the cell surface [4]. Excess iron levels lead to increased possibility of the formation of reactive hydroxyl radicals, which can cause oxidative stress and have harmful consequences at the cellular level, ultimately leading to oxidative cell death [5,6]. Another recently discovered type of cell death is ferroptosis, which also depends on iron homeostasis and is associated with iron accumulation [7]. Ferroptosis, as an iron-dependent regulated necrosis associated with lipid peroxidation, is highlighted as a potential cancer therapy for some of the most drug-resistant and aggressive cancer cells [8,9]. Iron concentration has been found to increase with age in some body regions affected by degenerative diseases [10]. To understand the impaired iron

metabolism that leads to iron accumulation, more information is needed about the proteins and other molecules involved in iron metabolism.

In healthy individuals, transferrin is usually only partially saturated. The average distribution of Tf iron isoforms is: 39.2% apoTf, 11.2% Fe_CTf, 22.9% Fe_NTf, and 26.7% Fe₂Tf, indicating a clear in vivo preference for iron binding to the N-lobe of the protein [11]. In a recent study, Parrow et al. reported that iron occupancy of the N-lobe confers functionally distinct properties compared with the C-lobe of transferrin: Fe_CTf has been shown to promote greater iron deposition in the liver, whereas Fe_NTf is a more effective signal for enhanced erythropoiesis [12]. The binding of iron(III) ions to the two sites on the C- and N-lobes of the iron-free apo-transferrin (apoTf) depends on the presence of the synergistic anion. The usual synergistic anion in serum is carbonate, but other stable iron-transferrin complexes with anions bearing a carboxylate group, such as oxalate, are also known [13,14]. The normal serum oxalate level is about 4 orders of magnitude lower than the carbonate level (27 mM for carbonate as HCO₃⁻ and 1.8 μM for oxalate) [15,16]. In humans, oxalate levels depend on food intake and the breakdown of amino acids, glycerol, and ascorbic acid. There is no excretory pathway for oxalate other than through the kidneys. Renal insufficiency therefore leads to hyperoxalemia with potential clinical significance [17,18]. Protonation of the synergistic anion is a critical step in endosomal iron

* Corresponding author.

E-mail address: tweitner@pharma.unizg.hr (T. Weitner).

<https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2023.112207>

Received 18 January 2023; Received in revised form 20 March 2023; Accepted 2 April 2023

Available online 6 April 2023

0162-0134/© 2023 Elsevier Inc. All rights reserved.

release, and oxalate is protonated to a lesser extent than carbonate at endosomal pH ($pK_{a1}(\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4) = 1.25$, $pK_{a2}(\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4) = 4.14$, $pK_{a1}(\text{H}_2\text{CO}_3) = 6.35$, $pK_{a2}(\text{H}_2\text{CO}_3) = 10.33$; all values at 25 °C) [17,19,20]. Substitution of carbonate by oxalate could effectively trap iron in each lobe of hTf and disrupt interfering with iron uptake by cells and thus normal iron metabolism [19].

1.2. Transferrin glycosylation

Glycosylation is one of the most common posttranslational modifications of serum proteins. Glycosylated proteins play critical biological and physiological roles, e.g., in protein folding and biological recognition [21]. hTf is a highly glycosylated protein with two potential sites for N-glycans (Fig. 1) located on Asn-413 and Asn-611 residues of the C-lobe (Fig. 1) [22]. Different combinations of the two N-glycans result in a range of asialo to hexasialo variants of hTf [23]. Many pathological conditions are correlated with the glycan composition of glycoproteins [24–26]. The absence of carbohydrates on hTf may be associated with liver disease [27], cystic fibrosis [28], acute pancreatitis [29] or sepsis [30,31]. The most common application of hTf glycan analysis is the detection of CDT (Carbohydrate-Deficient Transferrin) as a biomarker for chronic alcohol consumption [32].

The terminal sialic acid residues on hTf may be of particular interest for the mechanism of iron binding and/or release. Sialic acids are negatively charged at physiological pH and may affect protein conformation and oligomerization, as well as protein interactions with other proteins and the extracellular matrix [33]. Changes in the microheterogeneity of the hTf sialoforms appear to be related to changes in iron metabolism. For example, during pregnancy there is a gradual and progressive change toward highly sialylated hTf that is rapidly reversed after pregnancy [34]. In addition, the decrease in transferrin sialylation is part of the acute phase response in septic patients and can be used to predict sequelae such as severe sepsis and septic shock. Desialylated hTf has a shorter half-life and also contributes to increased iron turnover and more rapid delivery of iron to hepatic stores [31].

1.3. Isothermal titration calorimetry of transferrin

In recent decades, isothermal titration calorimetry (ITC) has emerged as the most direct method for measuring the heat change in complexation reactions at constant temperature [39]. ITC is applicable to many biological systems, and calorimetric studies have been performed on the binding of iron in the form of an iron nitrilotriacetic acid complex (FeNTA) to hTf. Binford et al. found that the binding enthalpies for the C- and N-sites of hTf were nearly identical at 25 °C in the presence of bicarbonate and that the two binding sites of hTf were equivalent and independent [40]. In contrast, Lin et al. later found that the two sites were thermodynamically and kinetically distinct [41] and exhibited domain interactions [42]. A more recent ITC study showed strong binding of iron-loaded hTf (either diferric or monoferric) and the transferrin receptor with favorable changes in enthalpy and entropy [43]. They also found that the affinity of diferric hTf for the transferrin receptor is about 10-fold higher than that of monoferric transferrins and that the enthalpy of binding reflects the contributions of the individual lobes of the transferrin. Another ITC study demonstrated the presence of a class of strong Fe^{2+} binding sites with partial occupancy ($\approx 0.7 \text{ Fe}^{2+}$ per hTf molecule) and a second class of weak Fe^{2+} binding sites that did not allow accurate determination of binding parameters by ITC [44].

1.4. Objective and limitations

In the literature, there is only one study that investigated the influence of the sialic acid content of hTf glycans on metal binding [45]. In that study, the affinity of Al(III) and Fe(III) for hTf was compared between native and asialo hTf using on-line high-performance liquid chromatography/high-resolution inductively coupled plasma mass spectrometry (HPLC/ICP-MS). The results showed that Fe(III) added as ferric citrate in the presence of bicarbonate preferred the N-site and the binding affinity between native and asialo hTf was similar. However, the authors noted that the observed lack of difference could be due to the extremely high affinity of Fe for Tf. This study also reported that the absence of sialic acid in glycans and the presence of oxalate increased the binding affinity of Al(III) to Tf. It is known that Al(III) has about 7

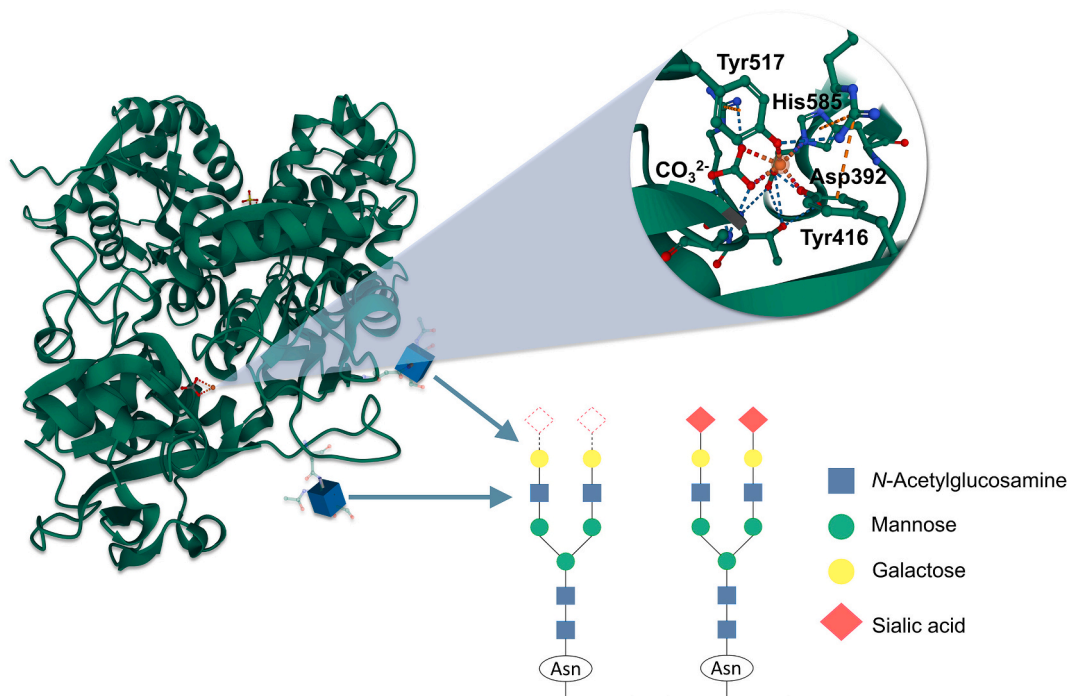


Fig. 1. Schematic representation of hTf showing a magnified view of the iron-binding site on the C-lobe of hTf with carbonate as the synergistic anion and the most abundant glycans in desialylated hTf (left) and native hTf (right) [35–38].

orders of magnitude lower affinity to Tf compared to Fe(III) [46], and this may have been more suitable for measurement by HPLC/ICP-MS.

Given the extensive cellular framework devoted to protein glycosylation [33], the aforementioned dynamics of microheterogeneity of hTf sialoforms, and the potential importance of iron and hTf in cellular management of oxidative stress associated with cancer or ferroptosis [47], an investigation of the effects of sialylation on the primary function of hTf as an iron carrier seems highly warranted. Therefore, the objective of this study is to determine possible differences in the thermodynamics of iron binding to native sialylated hTf (Tf+s) and enzymatically desialylated hTf (Tf-s). First, we established a baseline for evaluating a possible effect of sialic acid content on iron binding thermodynamics by independently repeating measurements on Tf+s performed by Lin et al. nearly 30 years ago [41]. After successfully benchmarking the iron binding of Tf+s, we performed enzymatic cleavage of the terminal sialic acids of Tf+s and characterized the glycan content of both Tf+s and the obtained Tf-s in detail. We then repeated the measurements of iron binding to Tf-s under the same experimental conditions and performed statistical analysis of the results for Tf+s and Tf-s. We also investigated the influence of the synergistic anions carbonate and oxalate on the thermodynamic parameters of iron binding to gain further insight into the reaction mechanism. A rough estimate of the influence of sialylation and synergistic anions on the peak morphology and iron binding rates was also performed.

2. Materials and methods

2.1. Reagents

Native human serum apo-transferrin (Sigma-Aldrich, Germany, cat. no. T2036), sodium hydrogen carbonate (Kemika, Croatia), HEPES (2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethane-1-sulfonic acid; BDH Pro-labo, UK), potassium oxalate monohydrate (Sigma-Aldrich, Germany), nitrilotriacetic acid trisodium salt (Sigma-Aldrich, Germany), iron(III) chloride (Riedel-de Haën, Honeywell, USA), hydrogen chloride solution (37%; Carlo Erba Reagents, Italy), sialidase (Immobilized SialEXO® Smart Enzymes™ Genovis, Sweden, cat. no. G1-SM6-050), and Tris (tris (hydroxymethyl)aminomethane; Amresco, USA) were used without further purification. Water used for the experiments was double distilled in an all-glass apparatus.

2.2. Methods

2.2.1. Preparation and characterization of native and desialylated hTf

Desialylated apoTf (Tf-s) was prepared by incubating the buffered solution of native human serum apoTf (2.5 mg/mL Tf+s in 20 mM Tris buffer, pH = 6.8) in SialEXO® columns containing immobilized sialidase enzyme at room temperature. The columns were rotated at 10 RPM for 24 h on a tube revolver rotator (Thermo Fisher Scientific, USA). After the incubation period, the desialylated samples were recovered by removing the bottom cap of the SialEXO® column and centrifuging (3 min at 1 k RCF). One cycle of incubation yielded \approx 2 mg of Tf-s. After verification of enzymatic desialylation (using chromatofocusing described in the next paragraph), samples from multiple cycles were pooled and concentrated by centrifugal filtration (14 k RCF). The concentrate was washed with water at least 5 times (single centrifugation step for 5 min at 14 k RCF), aliquoted, and stored at -20 °C until use. Centrifugal filters (Amicon® Ultra, 0.5 mL, 30 kDa MWCO, Merck, Germany, cat. no. UFC503096) were used to concentrate and wash desialylated samples.

To verify the results of enzymatic desialylation, the native and desialylated hTf samples were analyzed using the ÄKTA Start protein purification system (Cytiva, USA), as recently reported [48]. Briefly, the separation of transferrin sialoforms was performed using pH gradient ion exchange chromatography buffers (pIsep, Cryobiophysica, USA). The protein sample was dissolved in the starting buffer pIsep A (pH \approx 8) and injected onto the HiTrap Q HP anion exchange chromatography

column (Cytiva, USA). Two 1 mL columns were connected serially for improved separation. Elution was performed in a one-step linear gradient (0–100% pIsep B, pH \approx 4). After separation, the pH of each fraction containing the eluted protein was measured, corresponding to the approximate isoelectric point (pI) of the protein. To fully describe the glycan composition of the samples, the Tf+s and Tf-s samples were analyzed by UHPLC, as previously reported [48]. N-glycans were assigned based on known retention times, and the content of individual glycans was determined by integrating the obtained UHPLC chromatograms using a custom Python script (Supplementary information, Section 2).

2.2.2. ITC experiments

Working solutions were prepared independently for each ITC titration before the start of the experiment. Each test experiment required 0.2 mM apoTf and 4 mM FeNTA working solutions, while control experiments also required a working buffer solution. The buffer used in the titrations was either 0.1 M HEPES, pH 7.4, with 25 mM NaHCO₃ or 0.1 M HEPES, pH 7.4, with 25 mM K₂C₂O₄. For more details on the preparation of the working solutions, see Supplementary information, Section 1.

ITC titrations of Tf+s and Tf-s with FeNTA in the presence of carbonate or oxalate were performed on the PEAQ-ITC MicroCal calorimeter with a cell volume of 204.9 μ L (Malvern Panalytical Ltd., UK). Prior to titrations, all working solutions were filtered using syringe filters (FilterBio, China; pore size 0.22 μ m) and deaerated in two cycles using ultrasonication (30 s at 42000 Hz), centrifugation (3 min at 14 k RCF), and partial vacuum (3 min at -80 kPa) in each cycle. Titrations were performed at 25 °C in 30 injections with an added volume of 0.9 μ L per injection (1st injection 0.4 μ L), a stirring speed of 750 RPM, and a reference power of 20 μ W. The interval between injections was 300 s, and the duration of each injection was 4 s (1st injection 2 s). Titrations for all four combinations with two different transferrin sialoforms (Tf+s and Tf-s) and two synergistic anions were repeated three or more times, with working solutions prepared independently for each titration and control experiment.

Control experiments were performed for each titration experiment, using the same ITC method and working solutions as in the test experiments. Only the control experiment with FeNTA added to the cell containing buffer without the protein resulted in a significant heat change (>10 μ J/injection). The other control experiments with buffer added to the buffer or buffer added to the protein solution did not produce significant heat changes (± 0.5 μ J/injection). The injection peaks in all titrations and their control experiments were integrated and the point-to-point method was used to subtract the control experiments (FeNTA added to the buffer) from the test experiments. Data were analyzed using a model for two non-identical binding sites available in MicroCal PEAQ-ITC Analysis Software (version 1.30) and by refining a total of 7 parameters, shown in bold in Tables 2 and 3 (values of the dissociation constant, K_D , are shown as $\log K_D$ for clarity). The offset parameter represents the constant control heat for the point-to-point control subtraction and mainly accounts for the heat of dilution. Full details of the calculations and error propagation are shown in Supplementary information, Section 3. An attempt was also made to fit the data using a model for two sequential binding sites, but this gave poorer results (Fig. S16).

2.2.3. Statistical analyses

All results are expressed as means of at least 3 replicate measurements, with standard deviations in parentheses. The statistical significance of the differences was evaluated using the Real Statistics Resource Pack for Microsoft Excel [49]. Briefly, two-way ANOVA ($\alpha = 0.05$) was performed to evaluate the effects of sialylation, anion, and their interaction on the obtained parameters. Additionally, one-way ANOVA ($\alpha = 0.025$) was performed to evaluate the effects of each factor, i.e., the differences between the native and desialylated protein for each anion and vice versa. Data were tested for normal distribution using the

Shapiro-Wilk test, and homogeneity of variances was tested using the Brown-Forsythe test. To account for the possible effects of the observed heterogeneous variances, an additional analysis was performed based on the more robust Welch-James statistic with approximate degrees of freedom (for two-way ANOVA, the `welchADF` package for R was used [50,51]). The differences between the means of the obtained parameters are also reported as Hedges' *d* with a 95% confidence interval (CI), i.e., the estimated range of values that covers the true parameter value with 95% probability [52]. For more details on the statistical analyses, see Supplementary information, Section 5.

3. Results

3.1. Results of enzymatic desialylation of native hTf

The most abundant glycoforms in Tf+s are biantennary sialylated glycoforms (A2G2S2 and A2G2S1), which account for >70% of the total

glycans. Conversely, Tf-s contains >90% biantennary glycoforms without sialic acid (A2G2 and FA2G2), as shown in Table 1. The assigned peaks from UHPLC analysis (Fig. S2) correspond to >93% of the total integral for Tf+s and > 99% for Tf-s. The remaining UHPLC signals (about 6.17% of the total integral for Tf+s and about 0.42% for Tf-s) were not assigned since their retention times did not correspond to the retention times of the previously determined glycans using UHPLC-MS [48], so the structure of those glycans remains unknown. The index of sialylation (*IS*) for the hTf sialoforms was calculated according to Eq. (1), where *IS* is the index of sialylation, *n* is the number of the N-glycan fraction, *f_i* is the percent content of the particular N-glycan fraction and *s_i* is the number of sialic acids in the structure of the same N-glycan fraction [48].

$$IS = \sum_{i=1}^n f_i \cdot s_i \quad (1)$$

The *IS* values for Tf+s and Tf-s confirmed the 99% reduction in sialic

Table 1

Structures and content of N-glycans in native and desialylated apo-transferrin determined by UHPLC and assigned in comparison with previous MS results [48]. The percent content of each structure was calculated from the integrals of corresponding UHPLC fluorescence signals. The value *IS* corresponds to the previously defined index of sialylation [48]. For details on UHPLC peak integration, see Supplementary information, Section 2.1.

N-glycan composition*	Schematic N-glycan structure**	Native apo-transferrin (Tf+s), <i>IS</i> = 127.79, <i>pI</i> = 5.4		Desialylated apo-transferrin (Tf-s), <i>IS</i> = 1.51, <i>pI</i> = 6.8	
		Retention time/ min	Content/ %	Retention time/ min	Content/ %
FA2G1		/	/	7.70-7.95	0.25
A2G2		8.53-8.85	2.98	8.40-9.30	87.24
FA2G2		9.50-9.70	0.39	9.38-9.80	4.41
FA3G2		/	/	9.81-10.03	0.25
A2F1G2		/	/	10.18-10.71	1.76
A2G2S1		10.30-10.67	1.68	11.28-11.61	1.29
A2G2S1		11.13-11.68	24.15	/	/
A3G3		11.70-11.90	0.54	11.63-12.02	3.41
FA2G2S1		12.00-12.50	2.08	12.03-12.40	0.23
A3F1G3		/	/		
A2G2S2		12.96-13.35	6.28	/	/
A2G2S2		13.70-14.24	51.82	/	/
FA2G2S2		14.48-15.02	3.91	/	/
A3F1G3		/	/	12.82-13.15	0.74
Unassigned			6.17		0.42

* Structure abbreviations: all N-glycans have two core N-acetylglucosamines (GlcNAc); Ax, number of antennae (GlcNAc) on trimannosyl core; A2, biantennary with both GlcNAcs as β 1,2-linked; A3, triantennary with a GlcNAc linked β 1,2 to both mannose and the third GlcNAc linked β 1,4 to the α 1,3 linked mannose; A4, GlcNAcs linked as A3 with additional GlcNAc β 1,6 linked to α 1,6 mannose; Gx, number (x) of β 1,4 linked galactose on antenna; F(x), number (x) of fucose linked α 1,3 to antenna GlcNAc; Sx, number (x) of sialic acids linked to galactose.

** Schematic N-glycan structures: N-acetylglucosamine (■), mannose (●), galactose (●), fucose (▼), sialic acid (◆).

acid content for the enzymatically desialylated protein. The content of individual glycans and the corresponding values of *IS* for Tf+s and Tf-s are shown in Table 1.

The obtained glycan profiles are remarkably similar to our previous study performed with a different native protein sample (Biorbyt, UK, cat. no. orb80927) and enzyme (GlycoCleave® Neuraminidase Kit, GALAB Technologies, Germany, cat. no. 132011) [48]. However, the enzyme used in this study seems to be more effective with approximately <1% remaining sialylated N-glycan fractions compared to 10% with the enzyme used in the previous study. The results of pH chromatofocusing (Fig. S3) also confirmed successful desialylation, resulting in the expected difference in pI values of Tf+s (pI ≈ 5.4) and Tf-s (pI ≈ 6.8). These pI values are in very good agreement with known values determined by isoelectric focusing for tetrasialo hTf as the most abundant fraction in normal serum (pI = 5.5 [34]) and asialo hTf using a calibration line generated with pI markers (pI = 6.9 [54]).

3.2. Thermodynamics of the reaction of FeNTA with native or desialylated hTf

3.2.1. Iron binding equilibria

Calorimetric titrations of different hTf sialoforms and different synergistic anions (Fig. 2) yielded peak profiles similar to those reported by Lin et al. [41,55]. It is known that there are 2 phases in the binding of FeNTA to transferrin: (i) a fast phase called contact binding caused by the weak and reversible binding of FeNTA to the binding site, and (ii) a slow phase due to the incorporation of the synergistic anion into the binding site and the replacement of NTA [41,55]. Therefore, the first series of injections corresponds to the saturation of the C-site of

transferrin and shows a fast exothermic process followed by a slow exothermic process, while the second series of injections corresponds to the saturation of the N-site and shows a fast exothermic process followed by a slow endothermic process. The slow phase for the C-lobe has been described previously for ovotransferrin, but not for hTf [41,55]. Control experiments (Figs. S4-S7) and binding stoichiometry confirmed that the final endothermic injections, i.e., addition of FeNTA in excess over the Fe:hTf = 2:1 ratio, corresponded to complete saturation of transferrin.

3.2.1.1. Thermodynamic profiles. For all titrations, there is a similar change in enthalpy for the two iron binding sites, with the binding enthalpies for the C-site being more exothermic than for the N-site, regardless of sialylation or synergistic anion. Fig. 3 shows the integrated heat changes for the titrations shown in Fig. 2, and the binding enthalpies are shown schematically in Fig. 4 (Top). Desialylation results in more exothermic binding of iron(III) to both sites, regardless of the synergistic anion. We also found that the binding enthalpy at the C-site of hTf, both native and desialylated, is more exothermic in the presence of carbonate compared to oxalate. At the N-site, the effect is somewhat different: for Tf+s, binding is more exothermic in the presence of oxalate, whereas binding for Tf-s is more exothermic in the presence of carbonate. The binding entropies shown schematically in Fig. 4 (Bottom) indicate more positive values for the N-lobe, regardless of sialylation or synergistic anion. Desialylation apparently has no effect on the binding entropy, but the effect of the synergistic anion is twofold: in the presence of oxalate, more positive values were observed for the C-site, while the same difference is much less pronounced for the N-site. For a detailed summary of the statistical analyses reflecting these results, see

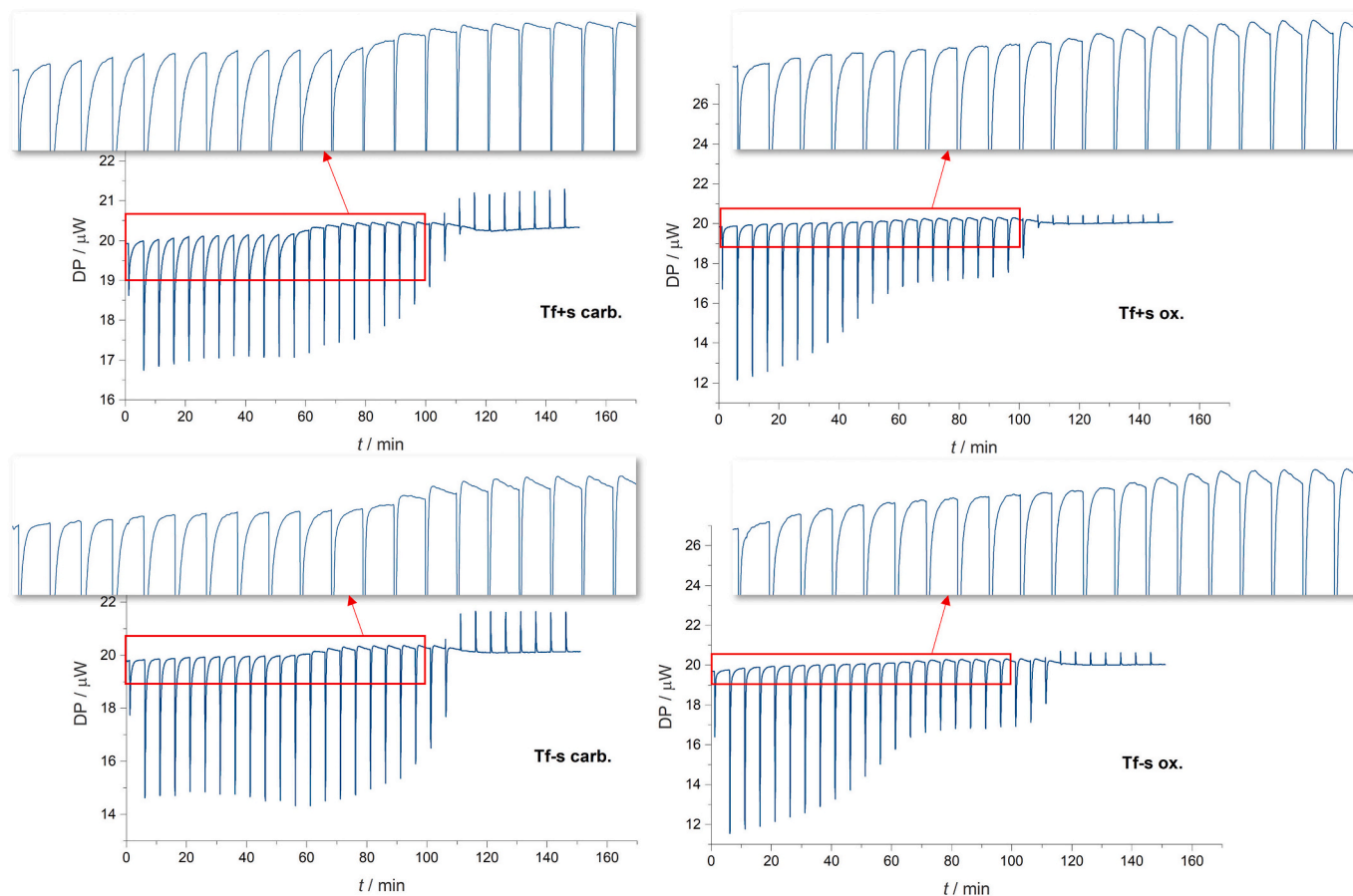


Fig. 2. Raw ITC data for the reaction of FeNTA with apoTf at 25 °C in 0.1 M HEPES, pH 7.4, and 25 mM synergistic anion: carbonate (carb.) or oxalate (ox.). 1 injection of 0.4 μ L and 29 injections of 0.9 μ L of 4 mM FeNTA were added to 0.2 mM native (Tf+s) or desialylated (Tf-s) apo-transferrin. Only a single test titration from each multiplicate is shown and all titration experiments are shown in Figs. S4-S7.

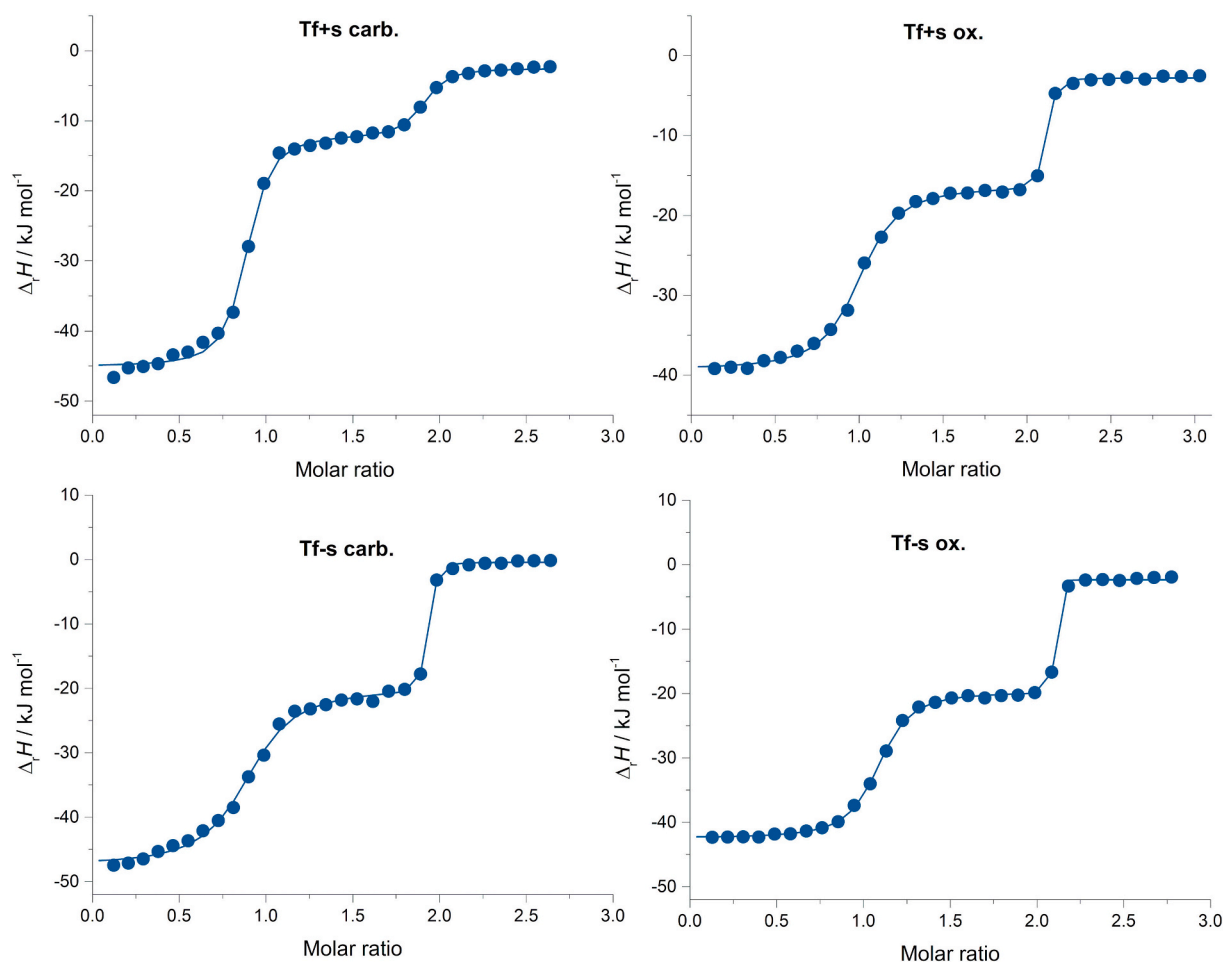


Fig. 3. Integrated heat changes for the titrations shown in Fig. 2, after subtracting the respective control experiments. The circles symbolize the experimental heat values for each injection, while the solid line shows the calculated heat values using the parameters listed in Table 2. The values on the x-axis are the molar ratios of FeNTA to apoTf.

Supplementary information, Sections 5.2 and 5.3.

3.2.1.2. Equilibrium constants. The apparent binding constants for the binding of the free iron(III) ion to hTf were calculated from the $\log K_D$ values constants shown in Table 3 and the conditional constant for FeNTA ($\log K'_{110} = 15.30(0.01)$, pH 7.4 [56],) using Eq. (2) (explained in detail in the Supplementary information, Sections 6 and 7.1).

$$\log K_{app} = -\log K_D + \log K'_{110} \quad (2)$$

A similar calculation was used to determine the iron(III) binding constants for the bacterial ferric binding protein in competition experiments with EDTA [57]. The results in Table 3 show approximately 100-fold higher apparent binding constants for binding to the C-site compared to the N-site and slightly higher binding constants for both lobes of Tf+s in the presence of oxalate. Desialylation seems to have no effect on the apparent binding constants in the presence of oxalate but results in higher values for both sites in the presence of carbonate. For a detailed summary of the statistical analyses reflecting these results, see the Supplementary information, Sections 7.4 and 7.5.

To investigate the effects on the total iron saturation of hTf, the macroscopic binding constants were calculated according to the model for two nonidentical binding sites for the binding of the first and second iron(III) ions to hTf (Table 3) [58]. For more details on the calculation, see Supplementary information, Sections 7.2 and 7.3. The binding of the first iron(III) ion is generally stronger than the binding of the second iron(III) ion, as indicated by a difference of about two orders of magnitude in

the values of the macroscopic constants $\log K_1$ and $\log K_2$ for all samples. Desialylation was found to increase the binding of the first iron(III) ion by about 10-fold in the presence of carbonate, while the effect on the binding of the second iron(III) ion was about 20-fold. Conversely, desialylation had virtually no effect on the overall saturation of hTf in the presence of oxalate.

These results are expected based on the observed differences in the apparent binding constants for individual binding sites. However, no statistically significant effect ($\alpha = 0.025$) on the fractional population of the intermediate complex at half saturation ($F(\text{FeTf})$) was found for either sialylation or the synergistic anion. This was somewhat surprising since an approximately 10% lower $F(\text{FeTf})$ was calculated for Tf-s in the presence of carbonate, indicating an increased fraction of Fe_2Tf species due to the increased value of $\log K_2$. This would be consistent with the seemingly significant effect of sialylation on the value of $\log K_2$ in the presence of carbonate. In this case, the lack of statistical significance ($p \leq 0.039$ and $\omega^2 \geq 0.490$, Table S7) can probably be attributed to the relatively large scatter caused by the very high K_{app} values for the FeNTA + hTf system.

3.2.2. ITC peak morphology and heat change rates

To study the morphology of the ITC peaks, we defined the “weighted width” parameter, l_x , as the amount of heat released per specific peak (ΔQ) divided by the height of the peak ($l_{y,max}$) according to Eq. (3).

$$l_x = \frac{\Delta Q}{l_{y,max}} \quad (3)$$

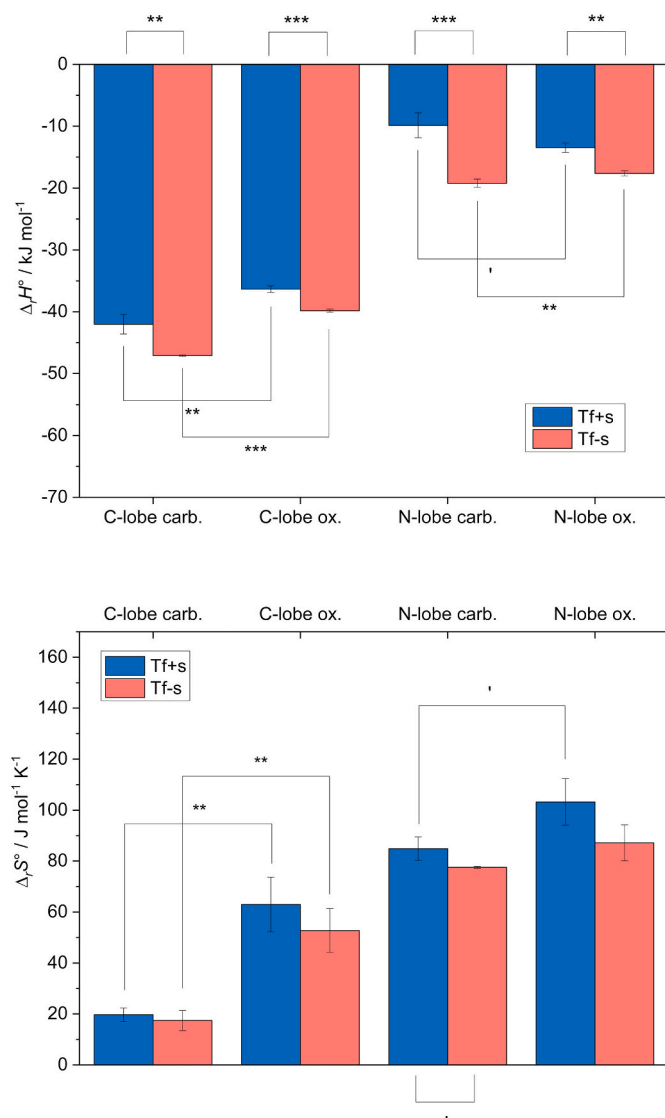


Fig. 4. Thermodynamic parameters for binding of FeNTA to native (Tf+s) and desialylated (Tf-s) apoTf in the presence of carbonate and oxalate at pH 7.4. Top: Apparent binding enthalpies ($\Delta_r H^{\circ}$). Bottom: Apparent binding entropies ($\Delta_r S^{\circ}$). The error bars indicate the standard deviations of the measured values. Statistical significance of the observed differences is encoded as: $p < 0.001$ (***), $p < 0.01$ (**), $p < 0.025$ (*), $p < 0.1$ (').

The mathematical representation of l_x would be the width of a rectangle whose area is equal to the area of the integrated peak and has the same height as the integrated peak (Fig. 5). When examining ITC data, l_x corresponds to the amount of heat released per unit of applied differential power, and its value can indicate differences in the kinetics of heat change. Conveniently, the parameter l_x has a time dimension (Table 4) and higher values of l_x mean a slower heat change and thus a slower response. Conversely, lower values of l_x indicate a faster heat change and thus a faster response. Heat changes measured in an ITC experiment can have multiple contributions, such as: (a) dissociation of the buffer (and/or solvent and/or another chelator in competition experiments like in this study) from the metal ion; (b) metal ion binding to the protein, often accompanied with displacement of one or more protons; (c) protons binding to the buffer etc. [59] Therefore, it is important to note that l_x may not be a general measure of reaction kinetics, but can be used as a comparison factor between peaks of the same system where similar contributions are expected (in this case FeNTA and hTf) [60,61].

In addition to l_x , a more conventional parameter FWHM (Full Width

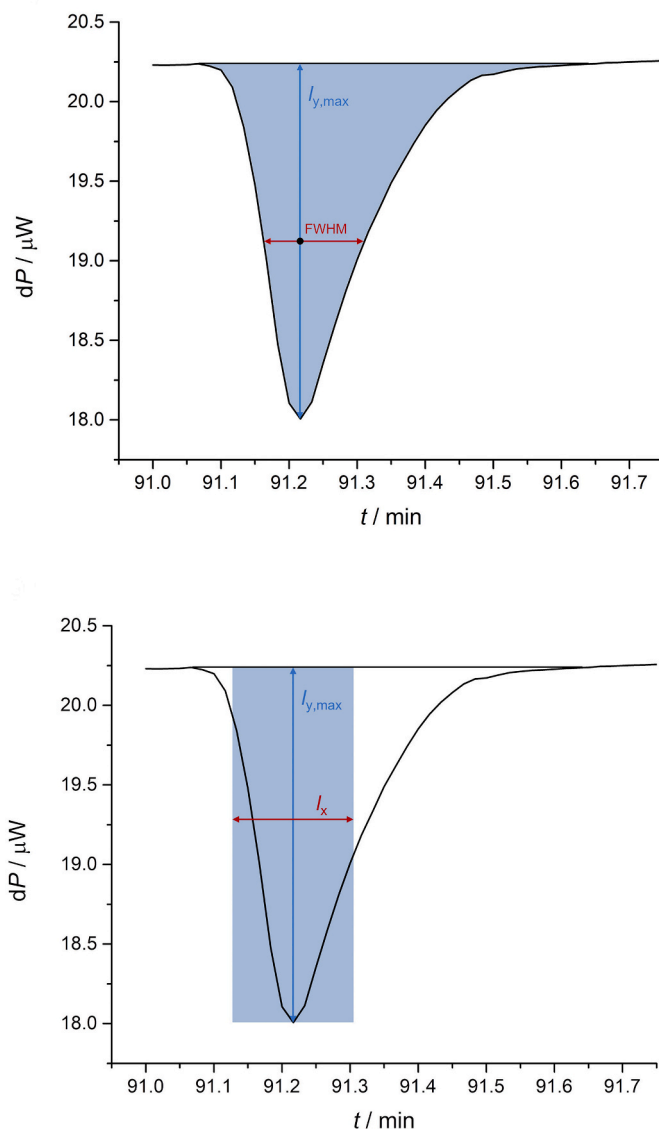


Fig. 5. Schematic representation for the 19th injection of the titration of native apoTf (Tf+s) with FeNTA in the presence of carbonate (molar ratio FeNTA:hTf \approx 1.6:1). The blue shaded areas are equal in both figures and correspond to the peak integral. Top: full width half maximum (FWHM). Bottom: weighted width (l_x). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Half Maximum, defined as width of the peak at half maximum of the peak size) was also estimated for the same injections. A graphical comparison between l_x and FWHM is shown in Fig. 5, while the calculated values of l_x and FWHM are listed in Table 4 and shown in Figs. 6 and S13. All results of the ITC peak morphology analysis are listed in the Supplementary information, Table S3.

The results in Table 4 reflect the observed differences in the height and width of individual peaks depending on the synergistic anion used and the sialylation of hTf. Based on the values of l_x , the reaction of FeNTA with apoTf in the presence of carbonate is about twice as fast at the N-site compared to the C-site, for both Tf+s and Tf-s. Conversely, the reaction in the presence of oxalate is faster at the C-site than at the N-site for both Tf+s and Tf-s, but the difference between sites is much smaller (about 30%). Desialylation in the presence of oxalate does not appear to affect the rates of either lobe, but desialylated transferrin in the presence of carbonate reacts with FeNTA more rapidly at the C-site and more

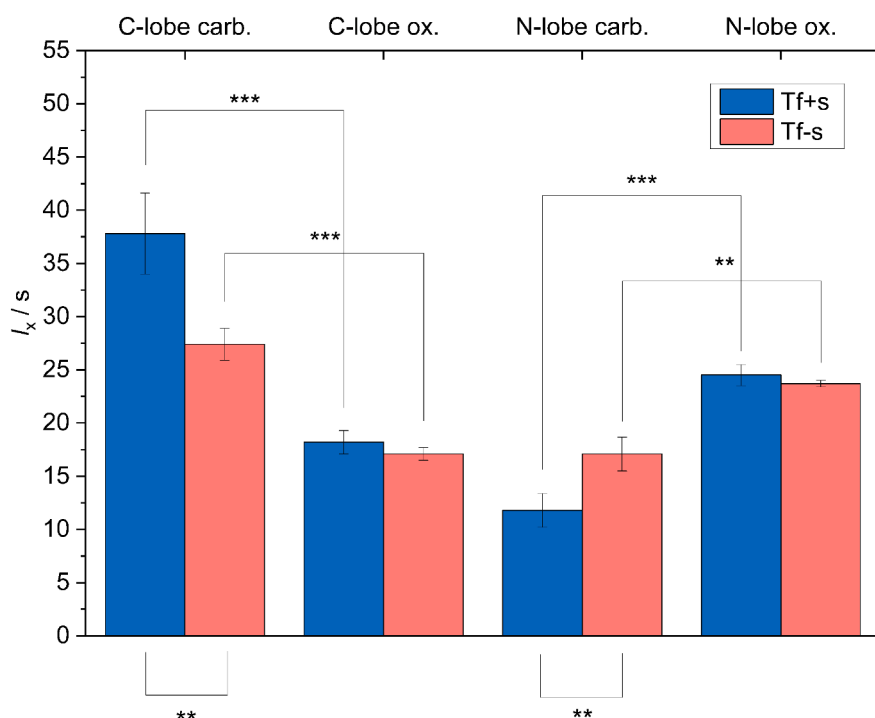


Fig. 6. Values of the weighted width parameter, l_x , as a measure of heat change rates for the reaction of FeNTA with native (Tf+s) and desialylated (Tf-s) apoTf in the presence of carbonate and oxalate at pH 7.4. Lower values mean higher rates and the error bars indicate the standard deviations of the measured values. Statistical significance of the observed differences is encoded as $p < 0.001$ (***), $p < 0.01$ (**), $p < 0.025$ (*), $p < 0.1$ (.). The corresponding values of FWHM are shown in Supplementary information, Fig. S13.

slowly at the N-site compared with the same lobes of native transferrin. We also found that for asymmetric peaks resulting from a slow kinetic step and manifesting in long peak tails, as observed in our experiments, FWHM is less suitable to sufficiently describe the full peak profiles and observed peak morphology than the proposed parameter l_x , as shown by statistical analyses summarized in Supplementary information, Sections 5.2 and 5.4.

4. Discussion

4.1. Binding enthalpies and equilibrium constants

The binding enthalpies in this study refer to the apparent binding enthalpies because the experiments were performed in one buffer only and the ionization enthalpy of the buffer was not subtracted from the apparent binding enthalpies [39,62]. Therefore, the calculated thermodynamic parameters reflect not only the binding of the iron(III) ion to apoTf, but the overall process: the contact binding of FeNTA to apoTf, the removal of NTA from the FeNTA complex and its protonation, the binding of the synergistic anion, and the exchange of protons with the buffer [59]. Since the buffer ionization enthalpy is not negligible (20.5 kJ/mol [63]) and the process is pH dependent, with protons being exchanged at the binding site [64], the calculated thermodynamic parameters are likely to differ in different buffers, with enthalpy values increasing/decreasing in proportion to the ionization enthalpy of HEPES.

Although the peak profiles obtained for Tf+s are consistent with those of native hTf in previous ITC studies, the apparent binding enthalpies calculated by Lin et al. [41] at 27 °C differ from our values at 25 °C in the presence of the same amount of carbonate. The values for the C-site differ slightly (−44.77 kJ/mol vs. −42.10(0.71) kJ/mol in this study), while a greater difference is observed for the N-site (−17.57 kJ/mol vs. −9.90(0.97) kJ/mol in this study). The differences in binding enthalpy at the N-site could be due to the larger spacing/injection volume ratios between injections (5.6 min/ μ L vs. 2.4 min/ μ L), which could increase the endothermic contribution of the slow step.

The evaluated thermodynamic parameters for high-affinity binding should be considered less reliable than indicated by the respective

standard deviations because the shape of the binding isotherms is a step change with minimal data between the two plateaus (Fig. 3 and Supplementary information, Figs. S8-S11) [65]. We consider that the several obtained values of $\log K_D < -9$ in Table 3 are not completely meaningless, as they can at least be considered to be below the threshold of the instrument (otherwise they would have been more accurately determined), and therefore we show these values as obtained from measurements. Importantly, the observed effects for the corresponding values of $\Delta_r G^\circ$, $-T\Delta_r S^\circ$, and $\Delta_r S^\circ$ in Table 2 and $\log K_1$, $\log K_2$, and F (FeTf) in Table 3 should also be treated with caution. To illustrate, a threshold value for the measured constants at the declared lower limit of the instrument ($\log K_D = -9$) would increase the effect on the values of $-T\Delta_r S^\circ$ and $\Delta_r S^\circ$ due to the lower estimate of the binding constants and consequently less negative values of $\Delta_r G^\circ$. Considering that the real values of K_D indeed seem to be below the threshold (admittedly with lower accuracy), the observed effects resulting from these values presented in this work are rather conservative. Moreover, depending on the sialoform and/or anion, the ratio of K_1/K_2 values was in an approximate range of 50–180 (Table 3), which is in agreement with the values determined by Lin et al. [41]

4.2. Effect of desialylation

The overall effect of desialylation and synergistic anion on the thermodynamic parameters for the reaction of FeNTA with native (Tf+s) and desialylated (Tf-s) hTf is shown in Fig. 7. In general, the change in binding enthalpy primarily reflects the strength of metal ion-protein interactions compared to metal ion-solvent interactions, while the change in binding entropy depends primarily on the gain in solvation entropy due to desolvation of the metal ion compared to the loss in conformational entropy of the protein upon binding of the metal ion [66]. It is evident from Figs. 7 and S12 that binding of the iron(III) ion to hTf appears to be driven both enthalpically and entropically in a lobe-dependent manner: binding to the C-site is driven primarily by the enthalpy contribution ($\Delta_r H^\circ$), whereas binding to the N-site is driven primarily by the entropy contribution ($-T\Delta_r S^\circ$).

Recently, a conformational stabilizing effect of sialic acids on hTf has been reported and tentatively attributed to the surface-type salt bridges

Table 2

Calculated parameters for the reaction of FeNTA with apoTf in 0.1 M HEPES, pH 7.4, and 25 mM synergistic anion (carbonate or oxalate). The values are expressed as means of at least 3 replicate measurements, with standard deviations in parentheses. Parameters determined directly from measurements by Marquardt fit in MicroCal PEAQ-ITC Analysis Software are shown in bold. The values of the corresponding dissociation constants, K_D , for each lobe are shown in Table 3.

Lobe	Parameters	Tf + s				Tf-s			
		Carbonate		Oxalate		Carbonate		Oxalate	
	t (°C)	25.15	(0.06)	25.20	(0.10)	25.17	(0.06)	25.23	(0.06)
C-lobe	N(sites)	0.89	(0.06)	0.97	(0.04)	0.86	(0.01)	1.02	(0.04)
	$\Delta_r H^\circ$ (kJ/mol)	-42.03	(1.56)	-36.37	(0.51)	-47.10	(0.10)	-39.83	(0.25)
	$\Delta_r G^\circ$ (kJ/mol)	-47.91	(0.77)	-55.15	(3.72)	-52.29	(1.27)	-55.56	(2.82)
	$-T\Delta_r S^\circ$ (kJ/mol)	-5.89	(0.79)	-18.78	(3.21)	-5.19	(1.17)	-15.72	(2.56)
	$\Delta_r S^\circ$ (J/mol K)	19.74	(2.66)	62.95	(10.77)	17.41	(3.93)	52.70	(8.60)
N-lobe	N(sites)	1.08	(0.06)	1.06	(0.06)	1.05	(0.01)	1.02	(0.02)
	$\Delta_r H^\circ$ (kJ/mol)	-9.85	(2.03)	-13.47	(0.78)	-19.23	(0.67)	-17.63	(0.42)
	Offset (kJ/mol)	-1.63	(1.21)	-2.25	(2.07)	0.47	(0.79)	-2.16	(0.26)
	$\Delta_r G^\circ$ (kJ/mol)	-35.17	(0.65)	-44.26	(3.48)	-42.37	(0.78)	-43.64	(2.52)
	$-T\Delta_r S^\circ$ (kJ/mol)	-25.32	(1.38)	-30.80	(2.71)	-23.14	(0.11)	-26.00	(2.10)
	$\Delta_r S^\circ$ (J/mol K)	84.88	(4.63)	103.23	(9.10)	77.56	(0.40)	87.14	(7.05)

Table 3

Dissociation constants for the reaction of FeNTA with apoTf, $\log K_D$, are shown in bold and were determined directly from measurements by Marquardt fit in MicroCal PEAQ-ITC Analysis Software. Other values (apparent binding constants for the binding of the free iron(III) ion to hTf, $\log K_{app}$; macroscopic binding constants, $\log K_1$ and $\log K_2$; and the fractional population of the intermediate at half saturation, $F(FeTf)$) were calculated as described in Supplementary information, Section 7. All constants are presented as logarithms for clarity and are given as means with standard deviations in parentheses.

Lobe	Parameter	Tf + s				Tf-s			
		Carbonate		Oxalate		Carbonate		Oxalate	
C-lobe	$\log K_D$	-8.39	(0.14)	-9.66	(0.65)	-9.16	(0.22)	-9.73	(0.49)
	$\log K_{app}$	23.69	(0.15)	24.96	(0.66)	24.46	(0.23)	25.03	(0.50)
N-lobe	$\log K_D$	-6.16	(0.11)	-7.75	(0.61)	-7.42	(0.14)	-7.64	(0.44)
	$\log K_{app}$	21.46	(0.12)	23.05	(0.62)	22.72	(0.15)	22.94	(0.45)
Macroscopic constants	$\log K_1$	23.69	(0.15)	24.96	(0.66)	24.46	(0.23)	25.03	(0.50)
	$\log K_2$	21.46	(0.12)	23.04	(0.62)	22.71	(0.15)	22.94	(0.45)
	$F(FeTf)$	0.87	(0.02)	0.82	(0.11)	0.79	(0.04)	0.85	(0.07)

Table 4

The values of the weighted width parameter (l_x) and full width half maximum (FWHM) as a measure of heat change rates for the reaction of FeNTA with apo-transferrin at pH 7.4. Both parameters are shown in seconds with higher values indicating a slower heat change rate. All measurements and details of the calculation are shown in the Supplementary information, Section 4.

Parameter	Lobe	Tf+s				Tf-s			
		Carbonate		Oxalate		Carbonate		Oxalate	
l_x (s)	C-lobe	37.8	(3.8)	18.2	(1.1)	27.4	(1.5)	17.1	(0.6)
	N-lobe	11.8	(1.6)	24.5	(1.0)	17.1	(1.6)	23.7	(0.3)
FWHM (s)	C-lobe	18.3	(5.6)	11.5	(0.6)	16.2	(1.2)	11.5	(0.4)
	N-lobe	10.0	(1.3)	17.6	(0.8)	10.6	(1.8)	17.5	(0.4)

between sialic acids and surrounding basic residues or other dipole elements [67]. This seems to be consistent with the proposed interaction of anionic sialic acid residues with the cationic lysine residues in the N-lobe (Lys206 and Lys296). These residues are involved in the dilysine interaction that contributes to the stability of the N-site, and it has been reported that the breaking of this dilysine pair triggers the release of Fe from the N-site [45].

4.3. Effect of the synergistic anion

In the absence of iron, binary anion-hTf species form in a process known as prebinding [68]. Harris et al. have shown that the prebinding of oxalate to hTf ($\log K_{1A} = 4.6$, $\log K_{2A} = 4.0$) is nearly two orders of magnitude greater than the prebinding of carbonate to hTf ($\log K_{1A} = 2.73$, $\log K_{2A} = 2.2$) [69,70]. The values of K_{1A} and K_{2A} denote the equilibrium constants for the binding of the first and second anion, respectively, to the native apoTf in the absence of metal. However, it may be incorrect to consider only a single anion binding site for each lobe of apoTf, since a variety of apoTf side chains may be involved in

anion binding, and different anions may use different subsets of these residues to bind to the protein [68]. Higher prebinding of oxalate could be the reason for the different kinetic contributions at the C-site compared to binding in the presence of carbonate. We did not observe the same for the N-site, as binding appeared to occur more slowly in the presence of oxalate than in the presence of carbonate, which could indicate a possible influence of oxalate prebinding only for the C-site.

As indicated by Lin et al., the sites without pre-bound bicarbonate could first bind FeNTA in a fast process and then replace the NTA with bicarbonate from solution in a slower process, in contrast to the sites with pre-bound carbonate (under experimental conditions in this work, about 20% of the hTf has only one occupied site) [41]. In the case of oxalate, both sites are virtually 100% occupied by hTf at the same concentration. Therefore, the higher prebinding of oxalate could be the reason for the different kinetic contributions at the C-site compared to binding in the presence of carbonate.

Our results also seem to confirm that oxalate is particularly effective as a synergistic anion, exhibiting stability comparable to that of the native carbonate complex. This high stability of the hTf-Fe-oxalate

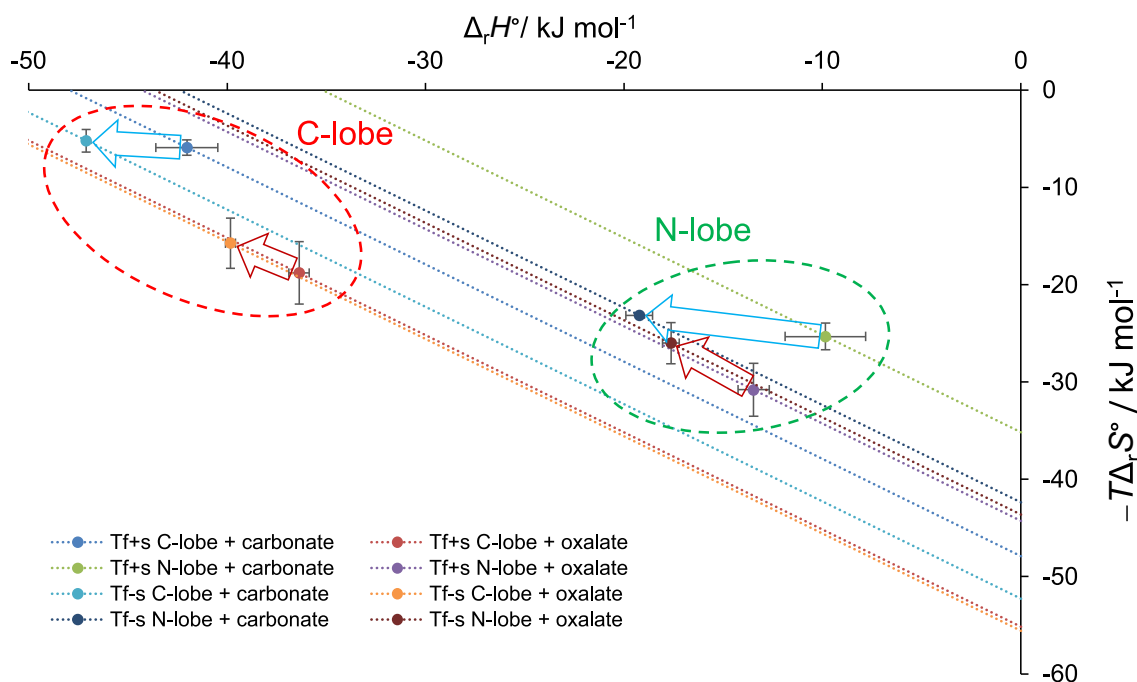


Fig. 7. The overall effect of desialylation and the synergistic anion on the thermodynamic parameters for the reaction of FeNTA with native (Tf+s) and desialylated (Tf-s) hTf. The values of $\Delta_r H^\circ$ and $-T\Delta_r S^\circ$ (at 25 °C) are taken from Table 2. The diagonal dotted lines represent processes with identical $\Delta_r G^\circ$ values and were constructed with $\Delta_r H^\circ = 0$ and $-T\Delta_r S^\circ = \Delta_r G^\circ$ values from Table 2. Error bars represent the standard deviations of the measured values. Blue arrows show the effect of desialylation in the presence of carbonate, and red arrows show the effect of desialylation in the presence of oxalate. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

complexes has been attributed to the additional stability of the less strained five-membered chelate ring, compared to the four-membered chelate ring of the hTf-Fe-carbonate complexes [68]. This also seems to be confirmed by our observation that sialylation has no effect on the binding constants or heat change rates in the presence of oxalate. Possible physiological implication is that hyperoxalemia caused by renal insufficiency (or by another cause) may additionally be associated with iron deficiency, especially given the impaired cellular iron uptake of hTf-Fe-oxalate complexes [19].

4.4. Application of Welch-James statistic

In general, the additional analyses based on the more robust WJ statistic showed little difference compared with the standard ANOVA (Supplementary information, Tables S4-S7). In some cases, the p values obtained with the WJ statistic are higher than the p values obtained with the standard ANOVA statistic, which may indicate that the respective data are less consistent with the assumptions of ANOVA, most likely due to the small number of replicates. However, most of the p values below the significance level in the standard ANOVA are also below the significance level when the WJ statistic is used. The most notable exceptions are the p values for the effect of the synergistic anion on the $\log K_{app}$, $\log K_1'$ and $\log K_2'$ parameters, which are all above the significance level when using the WJ statistic. Therefore, the use of additional unbiased parameters such as ω^2 (or $\omega^2 p$ for two-way ANOVA) and Hedges' d to assess significance seems reasonable.

5. Conclusions

Native or desialylated hTf binds iron(III) in the form of FeNTA in a consecutive manner with the C-site being saturated first and both carbonate and oxalate acting as synergistic anions. Our data show that a lower sialylation index of hTf (i.e., a lower sialic acid content) leads to more exothermic apparent binding enthalpies for both lobes, regardless of the synergistic anion. There seems to be enough evidence to support

the anion-dependent effect of sialylation for the N-lobe with a stronger exothermic effect in the presence of carbonate. This is additionally confirmed by the increased values of apparent binding constants for both lobes of Tf-s in the presence of carbonate, while virtually no effect was observed in the presence of oxalate. The effect of sialylation on the overall iron(III) saturation of Tf-s indicated an increased proportion of Fe_2Tf species compared to the native protein but statistical analysis was inconclusive.

The analysis of heat change rates using the proposed parameter weighted width (l_x) confirmed a stronger prebinding of oxalate to the C-site of hTf compared to carbonate, in agreement with results by Harris et al. [69,70] This translates into the faster contact binding on the C-site in the presence of oxalate. Conversely, the reaction for the N-site was faster in the presence of carbonate for both Tf+s and Tf-s, which could explain the observed preferential loading of the hTf N-site in vivo, despite the higher iron-binding affinity of the C-site. Sialylation affected the rates of heat change for both sites only in the presence of carbonate, but not in the presence of oxalate. Desialylated protein showed a greater increase in heat change rate for the C-site and a smaller decrease in heat change rate for the N-site. This effect could also contribute to the increased proportion of Fe_2Tf species for Tf-s, which may have implications for binding to the hTf receptor because of its higher affinity for the diferric hTf.

CRedit authorship contribution statement

Valentina Borko: Investigation, Methodology, Formal analysis, Writing – original draft, Visualization, Data curation. **Tomislav Friganović:** Investigation, Methodology, Formal analysis, Writing – original draft, Software, Visualization, Data curation. **Tin Weitzer:** Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Data curation, Writing – review & editing, Supervision, Funding acquisition, Project administration.

Declaration of Competing Interest

Tin Weitner reports financial support was provided by Croatian Science Foundation. Valentina Borko reports financial support was provided by Croatian Science Foundation. Tomislav Friganovic reports financial support was provided by Croatian Science Foundation.

Data availability

All measurements, fitting results and statistical analyses, were archived and are available for reference at <https://doi.org/10.5281/zenodo.6535310>. Separate files are provided for titrations of native (Tf+s) and desialylated (Tf-s) apotransferrin with FeNTA in the presence of carbonate or oxalate. Raw data are in .apj file format, which can be opened with MicroCal PEAQ-ITC Analysis Software, and in ASCII (.csv) format for other processing options.

Acknowledgements

For critical suggestions and discussions, the authors would like to thank Prof. Davor Šakić, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb, Croatia. This work was supported by funding from the Croatian Science Foundation grant UIP-2017-05-9537 – Glycosylation as a factor in the iron transport mechanism of human serum transferrin (GlyMech). Valentina Borko was additionally financed by the Croatian Science Foundation grant DOK-2018-09-1042. Additional support was provided by the European Regional Development Fund grants for ‘Strengthening of Scientific Research and Innovation Capacities of the Faculty of Pharmacy and Biochemistry at the University of Zagreb’ (KK.01.1.1.02.0021), ‘Development of methods for production and labelling of glycan standards for molecular diagnostics’ (KK.01.1.1.07.0055) and ‘Scientific center of excellence for personalized health care’ (KK.01.1.1.01.0010). The N-glycan profiling by UHPLC-MS was provided by the Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb, Croatia.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2023.112207>.

References

- G. Papanikolaou, K. Pantopoulos, Iron metabolism and toxicity, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 202 (2005) 199–211, <https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.06.021>.
- J. Wang, K. Pantopoulos, Regulation of cellular iron metabolism, *Biochem. J.* 434 (2011) 365–381, <https://doi.org/10.1042/BJ20101825>.
- N.C. Andrews, P.J. Schmidt, Iron Homeostasis, *Annu. Rev. Physiol.* 69 (2007) 69–85, <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.69.031905.164337>.
- K. Gkoutas, G. Papanikolaou, K. Pantopoulos, Regulation of iron transport and the role of transferrin, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* 1820 (2012) 188–202, <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.10.013>.
- L. Zecca, M.B.H. Youdim, P. Riederer, J.R. Connor, R.R. Crichton, Iron, brain ageing and neurodegenerative disorders, *Nat. Rev. Neurosci.* 5 (2004) 863–873, <https://doi.org/10.1038/nrn1537>.
- R. Meneghini, Iron homeostasis, oxidative stress, and DNA damage, *Free Radic. Biol. Med.* 23 (1997) 783–792, [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(97\)00016-6](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(97)00016-6).
- J. Li, F. Cao, H. Yin, Z. Huang, Z. Lin, N. Mao, B. Sun, G. Wang, Ferroptosis: past, present and future, *Cell Death Dis.* 11 (2020) 88, <https://doi.org/10.1038/s41419-020-2298-2>.
- M.J. Hangauer, V.S. Viswanathan, M.J. Ryan, D. Bole, J.K. Eaton, A. Matov, J. Galeas, H.D. Dhruv, M.E. Berens, S.L. Schreiber, F. McCormick, M.T. McManus, Drug-tolerant persister cancer cells are vulnerable to GPX4 inhibition, *Nature.* 551 (2017) 247–250, <https://doi.org/10.1038/nature24297>.
- V.S. Viswanathan, M.J. Ryan, H.D. Dhruv, S. Gill, O.M. Eichhoff, B. Seashore-Ludlow, S.D. Kaffenberger, J.K. Eaton, K. Shimada, A.J. Aguirre, S.R. Viswanathan, S. Chattopadhyay, P. Tamayo, W.S. Yang, M.G. Rees, S. Chen, Z.V. Boskovic, S. Javaid, C. Huang, X. Wu, Y.-Y. Tseng, E.M. Roider, D. Gao, J.M. Cleary, B. M. Wolpin, J.P. Mesirov, D.A. Haber, J.A. Engelman, J.S. Boehm, J.D. Kotz, C. S. Hon, Y. Chen, W.C. Hahn, M.P. Levesque, J.G. Doench, M.E. Berens, A.F. Shamji, P.A. Clemons, B.R. Stockwell, S.L. Schreiber, Dependency of a therapy-resistant state of cancer cells on a lipid peroxidase pathway, *Nature.* 547 (2017) 453–457, <https://doi.org/10.1038/nature23007>.
- R.J. Ward, F.A. Zucca, J.H. Dujyn, R.R. Crichton, L. Zecca, The role of iron in brain ageing and neurodegenerative disorders, *Lancet Neurol.* 13 (2014) 1045–1060, [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(14\)70117-6](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70117-6).
- A.M.N. Silva, T. Moniz, B. de Castro, M. Rangel, Human transferrin: an inorganic biochemistry perspective, *Coord. Chem. Rev.* 449 (2021), 214186, <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2021.214186>.
- N.L. Parrow, Y. Li, M. Feola, A. Guerra, C. Casu, P. Prasad, L. Mammen, F. Ali, E. Vaicikauskas, S. Rivella, Y.Z. Ginzburg, R.E. Fleming, Lobe specificity of iron binding to transferrin modulates murine erythropoiesis and iron homeostasis, *Blood.* 134 (2019) 1373–1384, <https://doi.org/10.1182/blood.2018893099>.
- J. Dubach, B.J. Gaffney, K. More, G.R. Eaton, S.S. Eaton, Effect of the synergistic anion on electron paramagnetic resonance spectra of iron-transferrin anion complexes is consistent with bidentate binding of the anion, *Biophys. J.* 59 (1991) 1091–1100, [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(91\)82324-4](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(91)82324-4).
- M. Schlabach, G. Bates, The synergistic binding of anions and Fe³⁺ by transferrin. Implications for the interlocking sites hypothesis, *J. Biol. Chem.* 250 (1975) 2182–2188, [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)41699-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)41699-2).
- J. Konstantynowicz, T. Porowski, W. Zoch-Zwiercz, J. Wasilewska, H. Kadziela-Olech, W. Kulak, S.C. Owens, J. Piotrowska-Jastrzebska, M. Kaczmarek, A potential pathogenic role of oxalate in autism, *Eur. J. Paediatr. Neurol.* 16 (2012) 485–491, <https://doi.org/10.1016/j.ejpn.2011.08.004>.
- K.L. Raphael, G. Wei, B.C. Baird, T. Greene, S. Beddhu, Higher serum bicarbonate levels within the normal range are associated with better survival and renal outcomes in African Americans, *Kidney Int.* 79 (2011) 356–362, <https://doi.org/10.1038/ki.2010.388>.
- A.N. Luck, C.E. Bobst, I.A. Kaltashov, A.B. Mason, Human serum transferrin: is there a link among autism, high oxalate levels, and Iron deficiency Anemia? *Biochemistry.* 52 (2013) 8333–8341, <https://doi.org/10.1021/bi401190m>.
- C.R.V. Tomson, The clinical significance of Hyperoxalaemia, *Int. J. Artif. Organs* 11 (1988) 329–334, <https://doi.org/10.1177/03913988801100504>.
- P.J. Halbrooks, A.B. Mason, T.E. Adams, S.K. Briggs, S.J. Everse, The oxalate effect on release of iron from human serum transferrin explained, *J. Mol. Biol.* 339 (2004) 217–226, <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.03.049>.
- R.M. Smith, A.E. Martell, *Critical Stability Constants*, Springer US, Boston, MA, 1989, <https://doi.org/10.1007/978-1-4615-6764-6>.
- K.W. Moremen, M. Tiemeyer, A.V. Nairn, Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13 (2012) 448–462, <https://doi.org/10.1038/nrm3383>.
- D. Fu, H. van Halbeek, N-glycosylation site mapping of human serotransferrin by serial lectin affinity chromatography, fast atom bombardment-mass spectrometry, and ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy, *Anal. Biochem.* 206 (1992) 53–63, [https://doi.org/10.1016/S0003-2697\(05\)80010-7](https://doi.org/10.1016/S0003-2697(05)80010-7).
- G. de Jong, J.P. van Dijk, H.G. van Eijk, The biology of transferrin, *Clin. Chim. Acta* 190 (1990) 1–46, [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(90\)90278-Z](https://doi.org/10.1016/0009-8981(90)90278-Z).
- C.A. Reis, H. Osorio, L. Silva, C. Gomes, L. David, Alterations in glycosylation as biomarkers for cancer detection, *J. Clin. Pathol.* 63 (2010) 322–329, <https://doi.org/10.1136/jcp.2009.071035>.
- S. Schedin-Weiss, B. Winblad, L.O. Tjernberg, The role of protein glycosylation in Alzheimer disease, *FEBS J.* 281 (2014) 46–62, <https://doi.org/10.1111/febs.12590>.
- I.J. Chang, M. He, C.T. Lam, Congenital disorders of glycosylation, *Ann. Transl. Med.* 6 (2018) 477, <https://doi.org/10.21037/atm.2018.10.45>.
- B. Blomme, C. Van Steenkiste, N. Callewaert, H. Van Vlierberghe, Alteration of protein glycosylation in liver diseases, *J. Hepatol.* 50 (2009) 592–603, <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2008.12.010>.
- A. Larsson, M. Flodin, H. Kollberg, Increased serum concentrations of carbohydrate-deficient transferrin (CDT) in patients with cystic fibrosis, *Ups. J. Med. Sci.* 103 (1998) 231–236, <https://doi.org/10.3109/03009739809178952>.
- O. Gornik, I. Gornik, V. Gašparović, G. Lauc, Change in transferrin sialylation is a potential prognostic marker for severity of acute pancreatitis, *Clin. Biochem.* 41 (2008) 504–510, <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2008.01.026>.
- M. Piagnerelli, K.Z. Boudjeltia, V. Nuyens, D. De Backer, F. Su, Z. Wang, J.-L. Vincent, M. Vanhaeverbeek, Rapid alterations in transferrin sialylation during sepsis, *Shock* 24 (2005) 48–52, <https://doi.org/10.1097/01.shk.0000168524.20588.67>.
- O. Gornik, I. Gornik, I. Zagorec Kolednjak, G. Lauc, Change of transferrin sialylation differs between mild Sepsis and severe Sepsis and septic shock, *Intern. Med.* 50 (2011) 861–869, <https://doi.org/10.2169/internalmedicine.50.4704>.
- E. Landberg, P. Pahlsson, A. Lundblad, A. Arnetorp, J.O. Jeppsson, Carbohydrate composition of serum transferrin isoforms from patients with high alcohol consumption, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 210 (1995) 267–274, <https://doi.org/10.1006/bbrc.1995.1656>.
- G.P. Bhide, K.J. Colley, Sialylation of N-glycans: mechanism, cellular compartmentalization and function, *Histochem. Cell Biol.* 147 (2017) 149–174, <https://doi.org/10.1007/s00418-016-1520-x>.
- G. De Jong, R. Feelders, W.L. Van Noort, H.G. Van Eijk, Transferrin microheterogeneity as a probe in normal and disease states, *Glycoconj. J.* 12 (1995) 219–226, <https://doi.org/10.1007/BF00731323>.
- N. Yang, H. Zhang, M. Wang, Q. Hao, H. Sun, Iron and bismuth bound human serum transferrin reveals a partially-opened conformation in the N-lobe, *Sci. Rep.* 2 (2012) 999, <https://doi.org/10.1038/srep00999>.
- D. Sehnal, S. Bittrich, M. Deshpande, R. Svobodová, K. Berka, V. Bazgier, S. Velankar, S.K. Burley, J. Koča, A.S. Rose, Mol* viewer: modern web app for 3D

- visualization and analysis of large biomolecular structures, *Nucleic Acids Res.* 49 (2021) W431–W437, <https://doi.org/10.1093/nar/gkab314>.
- [37] N. Yang, H. Zhang, M. Wang, Q. Hao, H. Sun, Iron and bismuth bound human serum transferrin reveals a partially-opened conformation in the N-lobe, *Sci. Rep.* 2 (2012) 999, <https://doi.org/10.2210/pdb3qyt/pdb>.
- [38] H.M. Berman, The protein data bank, *Nucleic Acids Res.* 28 (2000) 235–242, <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.235>.
- [39] I. Jelesarov, H.R. Bosshard, Isothermal titration calorimetry and differential scanning calorimetry as complementary tools to investigate the energetics of biomolecular recognition, *J. Mol. Recognit.* 12 (1999) 3–18, [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1352\(199901/02\)12:1<3::AID-JMR441>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1352(199901/02)12:1<3::AID-JMR441>3.0.CO;2-6).
- [40] J.S. Binford, J.C. Foster, Calorimetry of the transfer of Fe(III) from nitrilotriacetate to apotransferrin in the presence and in the absence of bicarbonate, *J. Biol. Chem.* 249 (1974) 407–412, [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)43045-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)43045-7).
- [41] L.N. Lin, A.B. Mason, R.C. Woodworth, J.F. Brandts, Calorimetric studies of the binding of ferric ions to human serum transferrin, *Biochemistry.* 32 (1993) 9398–9406, <https://doi.org/10.1021/bi00087a019>.
- [42] L.N. Lin, A.B. Mason, R.C. Woodworth, J.F. Brandts, Calorimetric studies of serum transferrin and ovotransferrin. Estimates of domain interactions, and study of the kinetic complexities of ferric ion binding, *Biochemistry* 33 (1994) 1881–1888, <https://doi.org/10.1021/bi00173a035>.
- [43] A.B. Mason, S.L. Byrne, S.J. Everse, S.E. Roberts, N.D. Chasteen, V.C. Smith, R.T. A. MacGillivray, B. Kandemir, F. Bou-Abdallah, A loop in the N-lobe of human serum transferrin is critical for binding to the transferrin receptor as revealed by mutagenesis, isothermal titration calorimetry, and epitope mapping, *J. Mol. Recognit.* 22 (2009) 521–529, <https://doi.org/10.1002/jmr.979>.
- [44] T. Terpstra, J. McNally, T.-H.-L. Han, N.-T. Ha-Duong, J.-M. El-Hage-Chahine, F. Bou-Abdallah, Direct thermodynamic and kinetic measurements of Fe²⁺ and Zn²⁺ binding to human serum transferrin, *J. Inorg. Biochem.* 136 (2014) 24–32, <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2014.03.007>.
- [45] M. Hamano Nagaoka, T. Maitani, Effects of sialic acid residues of transferrin on the binding with aluminum and iron studied by HPLC/high-resolution ICP-MS, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* 1526 (2001) 175–182, [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(01\)00124-6](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(01)00124-6).
- [46] W.R. Harris, J. Sheldon, Equilibrium constants for the binding of aluminum to human serum transferrin, *Inorg. Chem.* 29 (1990) 119–124, <https://doi.org/10.1021/ic00326a024>.
- [47] H. Yan, T. Zou, Q. Tuo, S. Xu, H. Li, A.A. Belaidi, P. Lei, Ferroptosis: mechanisms and links with diseases, *Sig. Transduct. Target Ther.* 6 (2021) 49, <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00428-9>.
- [48] T. Friganović, A. Tomašić, T. Seba, I. Birus, R. Kerep, V. Borko, D. Šakić, M. Gabričević, T. Weitner, Low-pressure chromatographic separation and UV/Vis spectrophotometric characterization of the native and desialylated human apotransferrin, *Heliyon.* 7 (2021), e08030, <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e08030>.
- [49] C. Zaiontz, Real Statistics Resource Pack. <https://www.real-statistics.com/>, 2013.
- [50] P. Villacorta, The welchADF package for robust hypothesis testing in unbalanced multivariate mixed models with heteroscedastic and non-normal data, *R Journal* 9 (2017) 309, <https://doi.org/10.32614/RJ-2017-049>.
- [51] R Core Team, R: A Language and Environment for Statistical Computing. <https://www.R-project.org/>, 2022.
- [52] S. Nakagawa, I.C. Cuthill, Effect size, confidence interval and statistical significance: a practical guide for biologists, *Biol. Rev.* 82 (2007) 591–605, <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2007.00027.x>.
- [54] A. Van Campenhout, C. Van Campenhout, A.R. Lagrou, B. Manuel-y-Keenoy, Effects of in vitro glycation on Fe³⁺ binding and Fe³⁺ isoforms of transferrin, *Clin. Chem.* 50 (2004) 1640–1649, <https://doi.org/10.1373/clinchem.2004.033811>.
- [55] L.-N. Lin, A.B. Mason, R.C. Woodworth, J.F. Brandts, Calorimetric studies of the binding of ferric ions to ovotransferrin and interactions between binding sites, *Biochemistry* 10 (1991) 11660–11669, <https://doi.org/10.1021/bi00114a008>.
- [56] R.J. Motekaitis, A.E. Martell, The IRON(iii) and IRON(ii) complexes of NITRILOTRIACETIC acid, *J. Coord. Chem.* 31 (1994) 67–78, <https://doi.org/10.1080/00958979408022546>.
- [57] S. Dhungana, C.H. Taboy, D.S. Anderson, K.G. Vaughan, P. Aisen, T.A. Mietzner, A. L. Crumbliss, The influence of the synergistic anion on iron chelation by ferric binding protein, a bacterial transferrin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 (2003) 3659–3664, <https://doi.org/10.1073/pnas.0536897100>.
- [58] E. Freire, A. Schön, A. Velazquez-Campoy, Chapter 5 isothermal titration calorimetry, in: *Methods in Enzymology*, Elsevier, 2009, pp. 127–155, [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(08\)04205-5](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(08)04205-5).
- [59] C.F. Quinn, M.C. Carpenter, M.L. Croteau, D.E. Wilcox, Isothermal titration calorimetry measurements of metal ions binding to proteins, in: *Methods in Enzymology*, Elsevier, 2016, pp. 3–21, <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2015.08.021>.
- [60] J.M. Di Trani, S. De Cesco, R. O'Leary, J. Plescia, C.J. Nascimento, N. Moitessier, A. K. Mittermaier, Rapid measurement of inhibitor binding kinetics by isothermal titration calorimetry, *Nat. Commun.* 9 (2018) 893, <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03263-3>.
- [61] J.M. Di Trani, N. Moitessier, A.K. Mittermaier, Measuring rapid time-scale reaction kinetics using isothermal titration calorimetry, *Anal. Chem.* 89 (2017) 7022–7030, <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b00693>.
- [62] S. Leavitt, E. Freire, Direct measurement of protein binding energetics by isothermal titration calorimetry, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 11 (2001) 560–566, [https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(00\)00248-7](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(00)00248-7).
- [63] A. Cooper, C.M. Johnson, Introduction to Microcalorimetry and Biomolecular Energetics, in: *Microscopy, Optical Spectroscopy, and Macroscopic Techniques*, Humana Press, New Jersey, 1993, pp. 109–124, <https://doi.org/10.1385/0-89603-232-9:109>.
- [64] P. Aisen, A. Leibman, J. Zweier, Stoichiometric and site characteristics of the binding of iron to human transferrin, *J. Biol. Chem.* 253 (1978) 1930–1937, [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)62337-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)62337-9).
- [65] J.W. Chang, A. Armaou, R.M. Rioux, Continuous injection isothermal titration calorimetry for *Situ* evaluation of thermodynamic binding properties of ligand–receptor binding models, *J. Phys. Chem. B* 125 (2021) 8075–8087, <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.1c01821>.
- [66] Y. Chao, D. Fu, Thermodynamic studies of the mechanism of metal binding to the *Escherichia coli* zinc transporter YjiP, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 17173–17180, <https://doi.org/10.1074/jbc.M400208200>.
- [67] G. Li, A. Phetsanthad, M. Ma, Q. Yu, A. Nair, Z. Zheng, F. Ma, K. DeLaney, S. Hong, L. Li, Native ion mobility–mass spectrometry-enabled fast structural interrogation of labile protein surface modifications at the intact protein level, *Anal. Chem.* 94 (2022) 2142–2153, <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c04503>.
- [68] W.R. Harris, Anion binding properties of the transferrins. Implications for function, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* 1820 (2012) 348–361, <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.07.017>.
- [69] W.R. Harris, D. Nessel-Tollefson, J.Z. Stenback, N. Mohamed-Hani, Site selectivity in the binding of inorganic anions to serum transferrin, *J. Inorg. Biochem.* 38 (1990) 175–183, [https://doi.org/10.1016/0162-0134\(90\)84011-D](https://doi.org/10.1016/0162-0134(90)84011-D).
- [70] W.R. Harris, C.E. Brook, C.D. Spilling, S. Ellepwan, W. Peng, M. Xin, J.V. Wyk, Release of iron from transferrin by phosphonocarboxylate and diphosphonate chelating agents, *J. Inorg. Biochem.* 98 (2004) 1824–1836, <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2004.08.008>.

§ 8. POPIS KRATICA

apoTf	ljudski serumski apotransferin
ANOVA	analiza varijancije, engl. <i>analysis of variances</i>
CDG	kongenitalni poremećaj glikozilacije
CDT	izoforne ljudskog serumskog transferina koje karakterizira izostanak oligosaharidnih lanaca, engl. <i>carbohydrate-deficient transferrin</i>
CI	interval pouzdanosti, engl. <i>confidence interval</i>
DMT1	divalentni metalni transporter 1
$F(\text{FeTf})$	vrijednost frakcijske zasićenosti kompleksa FeTf pri polovici popunjenosti svih veznih mjesta na transferinu
FecTf	ljudski serumski transferin s popunjenim samo C-veznim mjestom
FeNTA	željezov(III) nitrilotriacetat
Fe _N Tf	ljudski serumski transferin s popunjenim samo N-veznim mjestom
FWHM	širina signala na pola visine signala, engl. <i>full width half maximum</i>
holoTf	ljudski serumski holotransferin
ICP-MS	induktivno spregnuta plazma s masenom spektrometrijom, engl. <i>inductively coupled plasma mass spectrometry</i>
IS	indeks sijalinizacije
ITC	izotermna titracijska kalorimetrija
K_1	makroskopska konstanta za vezanje prvog željeza na ljudski serumski transferin
K_2	makroskopska konstanta za vezanje drugog željeza na ljudski serumski transferin
K_{app}	efektivna konstanta vezanja za vezanje željeza na ljudski serumski transferin
K_C	konstanta vezanja željeza na C-kraj ljudskog serumskog transferina
K_N	konstanta vezanja željeza na N-kraj ljudskog serumskog transferina
KISAB	alosterička vezna mjesta na transferinu na koja se vežu nesinergijski anioni, engl. <i>kinetically significant anion binding sites</i>
l_x	vagana širina, parametar koji opisuje brzinu toplinskih promjena i morfologiju signala
NTA	nitrilotriacetat
RCF	relativna centrifugalna sila, engl. <i>relative centrifugal force</i>
RPM	okretaji po minuti, engl. <i>revolutions per minute</i>
STEAP3	ferireduktaza, enzim koji kodira gen naziva <i>STEAP3</i>
Tf+s	nativni ljudski serumski transferin
TfR1	transferinski receptor 1
Tf-s	desijalinizirani ljudski serumski transferin
UHPLC	tekućinska kromatografija ultra-visoke razlučivosti, engl. <i>ultra high performance liquid chromatography</i>
UHPLC-ESI-qTOF-MS	tekućinska kromatografija ultra-visoke razlučivosti sa spregnutim kvadrupolnim spektrometrom masa i ionizacijom elektroraspršenjem

§ 9. ŽIVOTOPIS

Valentina Borko rođena je 1994. godine u Zagrebu. Srednju školu u Vrbovcu (smjer opća gimnazija) završila je 2012. godine te je iste godine upisala Prirodoslovno-matematički fakultet u Zagrebu, istraživački smjer kemija. Titulu sveučilišne prvostupnice kemije stekla je 2015. godine, a titulu magistre kemije (smjer fizikalna i anorganska kemija) 2018. godine. Dobila je nagradu Kemijskog odsjeka za znanstveno-istraživački rad studenata u akademskoj godini 2015./2016. za rad *Kvantno-kemijsko istraživanje stabilnosti steroidne jezgre i njenih prekursora*. Diplomski rad pod naslovom *Fazni razvoj u sustavu ZrO₂-CaO* izradila je na Institutu Ruđer Bošković u Laboratoriju za fiziku materijala. Od 2018. do 2019. godine radila je kao analitičar u Laboratoriju za kromatografske tehnike u Hospiri Zagreb d.o.o. Od 2019. godine zaposlena je na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu, Zavodu za opću i anorgansku kemiju, kao doktorand na projektu koji financira Hrvatska zaklada za znanost. Naziv projekta je *Glikozilacija serumskog transferina kao faktor u mehanizmu prijenosa željeza*, a voditelj izv. prof. dr. sc. Tin Weitner. Za vrijeme rada na Fakultetu sudjeluje u izvođenju kolegija Opća kemija sa stehiometrijom, kao i kolegija Metaloproteini: struktura i mehanizam, integriranog preddiplomskog i diplomskog studija, smjera Farmacija i Medicinska biokemija. Bila je neposredni voditelj dva diplomatska rada. 2019. godine upisuje poslijediplomski doktorski studij Farmaceutsko-biokemijske znanosti na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu. Dosad je sudjelovala na desetak inozemnih i stranih znanstvenih skupova. U koautorstvu je objavila 4 znanstvenih radova u časopisima zastupljenim u bazi *Web of Science Core Collection*, od kojih je na 2 rada prvi autor, te 1 rad u ostalim časopisima.

Znanstveni radovi (WoSCC):

1. **Borko V**, Friganović T, Weitner T. Glycoproteomics meets thermodynamics: A calorimetric study of the effect of sialylation and synergistic anion on the binding of iron to human serum transferrin. *J Inorg Biochem* 2023;244:112207.
2. **Borko V**, Friganović T, Weitner T. Preparation and characterization of iron(III) nitrilotriacetate complex in aqueous solutions for quantitative protein binding experiments. *Anal Methods* 2023;

3. Kerep R, Šeba T, **Borko V**, Weitner T, Keser T, Lauc G, Gabričević M. Potential Clinically Relevant Effects of Sialylation on Human Serum AAG-Drug Interactions Assessed by Isothermal Titration Calorimetry: Insight into Pharmacoglycomics?. *Int J Mol Sci* 2023;24:8472.
4. Friganović T, Tomašić A, Šeba T, Biruš I, Kerep R, **Borko V**, Šakić D, Gabričević M, Weitner T. Low-pressure chromatographic separation and UV/Vis spectrophotometric characterization of the native and desialylated human apo-transferrin. *Heliyon* 2021;7:e08030.

Ostali radovi:

1. Friganović T, **Borko V**, Weitner T. Optimization of enzymatic desialylation of human serum transferrin. *Maced Pharm Bull* 2022;68:415–6.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Zavod za opću i anorgansku kemiju
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Doktorski rad

KALORIMETRIJSKO ODREĐIVANJE UTJECAJA SINERGIJSKOG ANIONA I SIJALINIZACIJE NA TERMODINAMIKU VEZANJA ŽELJEZA NA LJUDSKI SERUMSKI TRANSFERIN

Valentina Borko

SAŽETAK

Ljudski serumski transferin glavni je prenosioč željeza u organizmu. Željezo vezano na transferin doprema se iz probavnog sustava do stanica kojima je ono potrebno i otpušta s transferina promjenom pH. Transferin ima dva mjesta za vezanje željeza u kojem sudjeluje i sinergijski anion. Kod zdravih pojedinaca najčešća glikoforma transferina je glikoforma s dva biantenarna oligosaharidna lanca s ukupno četiri sijalinske kiseline, a sinergijski anion je karbonat. U *in vitro* uvjetima pokazano je kako drugi strukturno slični karboksilni ioni poput oksalata mogu biti sinergijski anioni. Desijalinizacija transferina primijećena je kod pacijenata s dijagnozom kroničnog alkoholizma, ali i raznih upalnih bolesti te sepse, dok su povećane serumske koncentracije oksalata često rezultat hiperoksalurije ili gastrointestinalnih bolesti. Cilj ovog doktorskog rada bio je odrediti termodinamičke parametre vezanja željeza u formi FeNTA na transferin s različitim indeksom sijalinizacije, u prisutnosti karbonata i oksalata kao sinergijskih aniona. U mjerenjima sa sijaliniziranim transferinom korišten je komercijalno dostupan nativni serumski transferin, dok je desijalinizirani transferin pripremljen djelovanjem enzima neuraminidaze u *in vitro* uvjetima. Nakon što je desijalinizacija proteina potvrđena i udio sijalinskih kiselina je smanjen za oko 99%, termodinamički parametri određeni su korištenjem izotermne titracijske kalorimetrije. Potvrđeno je kako se dva vezna mjesta razlikuju kinetički i termodinamički te je otkriveno kako desijalinizacija utječe na termodinamičke parametre vezanja željeza u formi FeNTA na transferin tako da efektivne entalpije vezanja postaju egzotermije, a u prisutnosti karbonata pri koncentracijama koje odgovaraj onima u serumu, konstanta vezanja se povećava. Navedeno ide u prilog mogućoj povezanosti desijalinizacije i sekvencijalnog odgovora organizma na infekcije patogenom. Osim desijalinizacije, i oksalat kao sinergijski anion u *in vitro* uvjetima povećava konstantu vezanja željeza na transferin, a vezanje je egzergonije. Uz jače vezanje oksalata na transferin, navedeno daje osnovu za mogući nastanak ternarnog kompleksa Fe-okalat-Tf u *in vivo* uvjetima, pogotovo u stanjima s povećanim koncentracijama oksalata.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 114 stranica, 27 grafičkih prikaza, 14 tablica i 162 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: ljudski serumski transferin, sijalinska kiselina, sinergijski anion, glikoproteomika, izotermna titracijska kalorimetrija, termodinamika

Mentor: **Dr. sc. Tin Weitner**, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Toma Keser**, docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Mario Gabričević, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Branimir Bertoša, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Prirodoslovno-matematičkog fakulteta.

Rad prihvaćen: 20. prosinca 2023.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Department of General and Inorganic Chemistry
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Doctoral thesis

CALORIMETRIC STUDY OF THE EFFECT OF SYNERGISTIC ANION AND SIALYLATION ON THE THERMODYNAMICS OF THE IRON BINDING TO HUMAN SERUM TRANSFERRIN

Valentina Borko

SUMMARY

Human serum transferrin is the major iron transport protein in human organisms. Iron bound to transferrin is transported from the digestive system to cells that require iron. A change in the pH causes the release of iron from transferrin. Transferrin has two iron binding sites that require the presence of the synergistic anion. The most common glycoform of transferrin in healthy humans consists of two biantennary oligosaccharide chains that together contain four sialic acids with carbonate as synergistic anion. Other structurally similar carboxylic ions such as oxalate have shown to act as synergistic anions *in vitro*. Chronic alcoholic disease, inflammatory diseases and sepsis can cause desialylation of transferrin, and hyperoxaluria or gastrointestinal diseases can lead to higher serum oxalate levels. The aim of this thesis was to determine thermodynamic parameters for the binding of Fe in the form of FeNTA to transferrin with different sialylation index, and in the presence of carbonate and oxalate as synergistic anions. Commercially available native human serum transferrin was used as sialylated transferrin, while the desialylated transferrin was prepared in *in vitro* using neuraminidase enzyme. After 99% reduction in sialic acid content was confirmed, thermodynamic parameters were determined using isothermal titration calorimetry. Our data have shown that in binding sites differ in both kinetics and thermodynamics of the binding. Moreover, it was discovered that desialylation affects thermodynamic parameters of the iron binding in the form of FeNTA to transferrin, leading to a shift towards exothermic binding enthalpies. Furthermore, in the presence of carbonate at concentrations corresponding to those in human serum, the binding constant increases. These findings are in support of the possible connection between the desialylation and sequestration as an organism's response to pathogen infections. In addition to desialylation, oxalate as a synergistic anion in *in vitro* conditions also increases the binding constant of iron to transferrin, and the binding becomes more exergonic. Together with the stronger prebinding constants of oxalate to human serum transferrin, the above provides the basis for the possible formation of the Fe-oxalate-Tf ternary complex in *in vivo* conditions, especially in conditions with increased concentration of oxalate.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 114 pages, 27 figures, 14 tables and 162 references. Original is in Croatian language.

Keywords: human serum transferrin, sialic acid, synergistic anion, glycoproteomics, isothermal titration calorimetry, thermodynamics

Mentor: **Tin Weitner, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Toma Keser, Ph.D.** Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Mario Gabričević, Ph.D. Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Branimir Bertoša, Ph.D. Full Professor, University of Zagreb Faculty of Science

The thesis was accepted: 20th December 2023