

# Utjecaj glikozilacije, sinergističkog aniona i pH na vezanje željeza na humani serumski transferin

---

Saraga, Ria

Master's thesis / Diplomski rad

2020

*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:163:772009>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-10-20**



*Repository / Repozitorij:*

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



Ria Saraga

***Utjecaj glikozilacije, sinergističkog aniona i pH na vezanje željeza na humani serumski transferin***

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2020

*Ovaj diplomski rad izrađen je pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Tin Weitnera na Zavodu za opću i anorgansku kemiju na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu, Sveučilišta u Zagrebu.*

*Zahvaljujem se svim djelatnicima Zavoda za opću i anorgansku kemiju, a posebice mojem mentoru Tinu Weitneru i asistentici Valentini Borko na ukazanom povjerenju, pruženim savjetima i pomoći tijekom izrade ovog diplomskog rada te mojim roditeljima na potpori tijekom studija.*

## SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Transferin .....	1
1.1.2. Podjela transferina.....	1
1.1.3. Struktura i polimorfizam transferina .....	3
1.1.4. Vežanje željeza na transferin .....	4
1.1.5. Transferinski receptori.....	6
1.1.6. Transferinski ciklus i otpuštanje željeza s transferina .....	7
1.1.7. Kliničke primjene transferina .....	8
1.2. Željezo.....	10
1.2.1. Apsorpcija željeza .....	11
1.2.2. Cirkulacija željeza nakon apsorpcije u enterocit.....	14
1.2.3. Poremećaji homeostaze željeza .....	15
2. OBRAZLOŽENJE TEME.....	17
3. MATERIJALI I METODE.....	18
3.1. Korištene kemijske supstance .....	18
3.2. Priprema otopina.....	18
3.3. Korišteni pribor i instrumenti.....	25
3.4. Metode .....	26
3.4.1. Ultraljubičasta i vidljiva (UV-Vis) spektrofotometrija .....	26
3.4.2. Fluorescencija .....	29
3.4.3. Kemijska ravnoteža .....	33
3. REZULTATI I RASPRAVA.....	37
4. ZAKLJUČAK.....	48
5. LITERATURA .....	50
6. SAŽETAK/SUMMARY .....	53

# 1. UVOD

## 1.1. Transferin

Transferin je monomerni glikoprotein koji u krvnoj plazmi čvrsto ali reverzibilno veže trovalento željezo i na taj način kontrolira njegovu slobodnu razinu u biološkim tekućinama.

Molekula transferina ima dva vezna mjesta za željezo te može postojati kao diferični transferin (holotransferin), kao jedan od monoferičnih transferina ili kao apotransferin, oblik bez željeza. Diferični transferin učinkovitiji je od monoferičnog u isporuci željeza do stanica zbog većeg afiniteta vezanja na receptor i isporuke dvostruke količine željeza po molekuli transferina (Huebers i sur., 1985).

U čovjeku, osim u serumu, transferin nalazimo i u sluznicama probavnog sustava, središnjem živčanom sustavu, testisima, te u sekretima (mlijeku, suzama, slini, sekretu gušterače). Glavni izvor transferina su hepatociti, ali sintetiziraju ga i brojne druge stanice kao što je endotel moždanih kapilara, endodimske stanice koroidnoga spleta, astrociti, oligodendrociti, Sertolijeve stanice, makrofagi, limfociti, limfni čvorovi, mliječna žlijezda u vrijeme laktacije, citotrofoblast, te neke maligne stanice kao što su stanice melanoma, A431 stanice humanoga raka kože i sitnostaničnog raka pluća. Središnja uloga transferina je isporuka željeza iz duodenuma, mjesta apsorpcije u tankom crijevu, do mjesta pohrane, jetre, perifernih tkiva, cirkulirajućih eritrocita u krvi, eritrocitnih prekursora i svih tjelesnih elemenata koji su uključeni u proizvodnju eritrocita. Vezanjem za transferin sprječava se gubitak željeza iz tijela, te se koncentracije slobodnog željeza održavaju niskima. Tako se sprječava željezom posredovana toksičnost i rast mikroorganizama kojima je za rast nužno željezo (Belovari, Kibel i Kostović-Knežević, 2006).

### 1.1.2. Podjela transferina

Na temelju sekvence aminokiselina, putativne funkcije i njihove pojave u prirodi, transferini se mogu podijeliti na serumske transferine (siderofiline), laktoferine, ovotransferine, membranski vezane melanotransferine i transferinu slične proteine (Templeton, 2002)

Osim svoje uloge u transportu željeza, serumski transferin je uključen i u druge funkcije, uključujući mijelinizaciju (Templeton, 2002). Dostupnost transferina ključna je za sazrijevanje i funkcioniranje oligodendrocita koji su na nedostatak transferina najosjetljiviji tijekom faze

premielinizacije (Espinosa de los Monteros i sur., 1999). Serumski transferin također veže tubulin i cirkulirajući enzim butirilkolinesterazu, a sastavni je dio i aktivatora fagocitoze dobivenih iz trombocita (eng. *Macromolecular activators of phagocytosis from platelets, MAPPs*) (Templeton, 2002). Njegovo višestruko djelovanje iskorišteno je u različitim kliničkim primjenama te se brojne primjene još i istražuju.

Iako se ovotransferin nalazi u ptičjem jajetu, njegovi polipeptidni lanci kodirani su istim genom za serumski transferin. Ovotransferin se razlikuje od serumskog transferina samo po obrascu glikozilacije i po različitoj regulaciji transkripcije. Smatra se da ovotransferini igraju antimikrobnu ulogu u bjelanjcima tako što keliraju trovalentno željezo i time smanjuju dostupnost u količinama koje su potrebne za rast mikroba (Templeton, 2002).

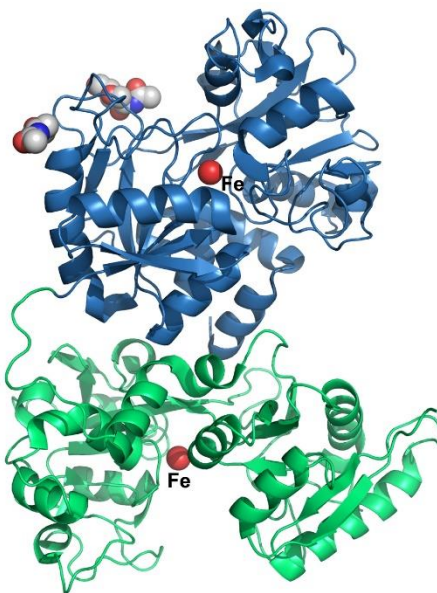
Laktoferin se nalazi u ljudskom mlijeku, suzama, slini, sjemenoj tekućini i drugim izlučevinama, gdje se smatra da također ima antimikrobnu ulogu. Smatra se da se molekula laktoferina prilagodila svojoj antimikrobnoj ulozi time što ima sposobnost čvršće vezati željezo u širem rasponu pH vrijednosti od ostalih transferina. Laktoferin je uključen u još nekoliko funkcija u organizmu, koje uključuju imunomodulaciju, regulaciju rasta stanica i antimikrobno djelovanje neovisno o željezu. Laktofericin, antimikrobni peptid dobiven probavom laktoferina posredovanom pepsinom, učinkovit je protiv širokog spektra gram-negativnih i gram pozitivnih bakterija, kvasaca i filamentnih gljivica. Laktoferin se koristi i kao antivirusno sredstvo za zaštitu od infekcije virusom herpes simpleksa tipa 1 i virusom hepatitisa C (Templeton, 2002).

Ljudski melanotransferin (poznat i kao p97) izvorno je izoliran sa stanične površine melanomskih stanica. U odnosu na normalna tkiva, visoko je eksprimiran u melanomima (Dunn i sur., 2006). Ispitivanja su pokazala da ljudski melanotransferin sadrži jedno mjesto vezanja željeza (u N režnju) i usidren je na površini stanične membrane pomoću glikozilfosfatidil inozitola (GPI). Melanotransferin je identificiran u mnogim različitim ljudskim tkivima, uključujući jetru, stanice epitela crijeva i tumore štitnjače. Pretpostavlja se da je melanotransferin uključen u mehanizam unosa željeza u stanice koji je neovisan o transferinu. Melanotransferin je također otkriven u endotelu ljudskog mozga te je opaženo da reaktivne mikroglije povezane s amiloidnim plakovima u moždanom tkivu osoba koje imaju Alzheimerovu bolest eksprimiraju gen za sintezu melanotransferina i da takvi pacijenti imaju povišenu razinu serumskog melanotransferina (Templeton, 2002).

### 1.1.3. Struktura i polimorfizam transferina

Humani serumski transferin je monomerni glikoprotein, oblika prolatnog elipsoida, koji sadrži dva slična, ali ne identična mjesta za vezanje metala smještena u njegovim N-terminalnim i C-terminalnim domenama (Slika 1.) (Ching-Ming Chung, 1984).

Sastoji se od polipeptidnog lanca od 679 aminokiselinskih ostataka i ima ukupnu molekulsku masu od ~ 79 kDa. Bilobalna terciarna struktura transferina učvršćena je s 19 disulfidnih veza te je zaštićena ugljikohidratnim lancima, od kojih su dva N-vezana i jedan O-vezani oligosaharidni lanac (Gomme i sur., 2005).



Slika 1. Kristalna struktura humanog transferina s vezanim željezom na obje domene (www.hku.hk).

N-domena (1-331 AK) i C-domena (331-679 AK) transferina povezane su kratkim peptidom. Svaka od domena podijeljena je u dvije subdomene (N-1, N-2 i C-1, C-2) koje su povezane dvjema antiparalelnim  $\beta$ -pločama (Templeton, 2002).

Različite vrste transferina imaju sličan sastav aminokiselina, a varijabilnost pokazuju kada se uspoređuje njihov ugljikohidratni sastav. Ugljikohidrati čine oko 6% mase transferina. Ugljikohidratni dio čine dva identična, razgranata N-vezana oligosaharidna lanca vezana na amidne skupine asparaginskih ostataka (Asn 432 i Asn 630) C-domene. Postoji i manja populacija transferina s tri razgranata oligosaharidna lanca. Svaki glikan sadrži dvije sijalinske kiseline, dvije

galaktoze, tri manoze i četiri N-acetilglukozamina. Sijalinske kiseline nalaze se na kraju lanaca i podložne su cijepanju neuraminidazom (Ching-Ming Chung, 1984).

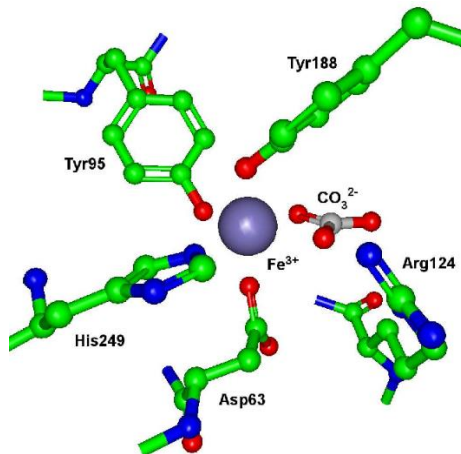
Postoji više transferinskih glikoformi ovisno o razinama sijalizacije. Najčešći oblik je tetrasijalotransferin koji sadrži četiri glikanska lanca sa sijalinskim kiselinama. Tetrasijalotransferin čini ~ 75–80% ukupnog transferina u ljudskom serumu. Ostale uobičajene glikoforme su pentasijalo- (~ 15%), trisijalo- (~ 5%), heksasijalo- (~ 2%) i disijalotransferin (~ 2%), dok se asijalo-, monosijalo-, heptasijalo- i oktasijalotransferin obično nalaze u tragovima ili se uopće ne mogu detektirati (Helander i Beck, 2008).

Transferin ima nekoliko polimorfizama koji variraju kod različitih vrsta. Postoje tri glavna izotipa koja uključuju B, C i D alel, dok većina vrsta nosi C alel. Nekoliko studija pokazalo je vezu između polimorfizma transferina i osjetljivosti na bolesti poput atransferinemije, ishemijsko-reperfuzijske ozljede, kardiovaskularne bolesti i Alzheimerove bolesti. Polimorfizam transferina ima također potencijalne uloge u antimikrobnoj aktivnosti i imunitetu te u kliničkim postupcima poput radioterapije, ciljane isporuke lijekova i terapije raka (Kennady i sur., 2019).

#### 1.1.4. Vežanje željeza na transferin

Prilikom vežanja željeza na transferin na sučelju subdomena u svakom režnju formira se hidrofilno heksakoordinatno mjesto za vežanje metala. U oba režnja četiri koordinatna mjesta čine aminokiseline transferinskog polipeptidnog lanca (asparaginska kiselina, dva tirozina i histidin), a preostala dva kisik iz sinergistički vežanog aniona - karbonata ( $\text{CO}_3^{2-}$ ). Anion se stabilizira vežanjem na bočne lance Thr-120 i Arg-124, dušikove atome Ala-126 te glavni lanac Gly-127 vodikovim vežama (Slika 2.). Iako dva vežna mjesta transferina sadrže iste ligande, vežanje i otpuštanje željeza na njima ne događa se istovremeno, već ovisi o različitim uvjetima, pri čemu se željezo lakše oslobađa s N-domene (Templeton, 2002).





Slika 2. Mjesto vezanja željeza na N-režnju humanog serumskog transferina  
([www.semanticscholar.org](http://www.semanticscholar.org)).

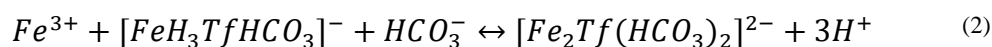
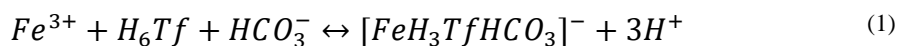
Navedena kombinacija liganada stvara povoljno mjesto za vezanje trovalentnog željeza, s obzirom na njegovu veličinu i naboj. Pozitivni naboj željeza privlače bočni ogranci lanaca asparaginske kiseline (Asp) i tirozina (Tyr), dok je naboj karbonata privučen pozitivnim nabojima bočnog lanca arginina (Arg) i N-kraja zavojnice. Rezultat je vrlo visoki afinitet za  $\text{Fe}^{3+}$  kation, s konstantom vezanja reda veličine  $\sim 10^{20}$  (Baker, 2003).

Na vezanje i otpuštanje željeza s transferina utječe nekoliko faktora poput pH, temperature, prisutnosti kelatora i ionske jakosti. Vezanje željeza za transferin je najefikasnije između pH 7,5-10. Pri pH 6,5 dolazi do parcijalne disocijacije željeza s transferina, dok do potpune disocijacije dolazi pri pH 4,35 (Ching-Ming Chung, 1984).

Kada se neutralna otopina apotransferina brzo pomiješa s neutralnom otopinom željezova (III) nitrilotriacetata (FeNTA) u prisutnosti bikarbonata dolazi do četiri kinetička procesa detektirana fluorescencijskom emisijom u području od 300 do 400 nm s eksitacijskom valnom duljinom  $\lambda_{\text{ex}} = 280$  nm. Iako se transferin u krvotoku može pronaći sa željezom vezanim za N-režanj i C-režnjem bez vezanog željeza, termodinamički i kinetički podaci pokazuju da je prvi proces pri vezanju željeza na transferin prijenos željeza s kelatora (NTA) na mjesto vezanja željeza u C-režnju transferina koji je u interakciji s bikarbonatom. Ovaj proces, osim vezanjem željeza, praćen je i gubitkom protona te vezanjem fenolne skupine jednog aminokiselinskog ostatka tirozina. Nakon vezanja željeza slijedi brza promjena konformacije C-režnja, koja dovodi do gubitka protona i vezanja fenolne skupine drugog tirozina i željeza. Tijekom ove konformacijske

promjene, dvije domene C-režnja ograđuju željezo i pokreće se druga konformacijska promjena praćena gubitkom protona što utječe na konformaciju čitavog proteina, uključujući i N-režanj koji vrlo brzo veže drugo željezo. Nakon toga slijedi konačna konformacijska promjena koja omogućuje ili transferinu s željezom vezanim samo na C-režanj ili holotransferinu da postigne svoje konačno stanje ravnoteže. Tijekom ova četiri procesa, konformacija transferina se mijenja iz otvorene (kod apotransferina) do zatvorene (kod holotransferina), pri čemu se željezo koordinira s četiri proteinska liganda i u potpunosti je zaštićeno od vanjskog medija (El Hage Chanine i sur., 2011).

Prema tome, ukupna reakcija između željeza i transferina može se prikazati sljedećim jednadžbama (Ching-Ming Chung, 1984):



#### 1.1.5. Transferinski receptori

Transferinski receptori (TfR) 1 i 2 su transmembranski glikoproteini uključeni u unos željeza iz krvi u unutarstanični odjeljak.

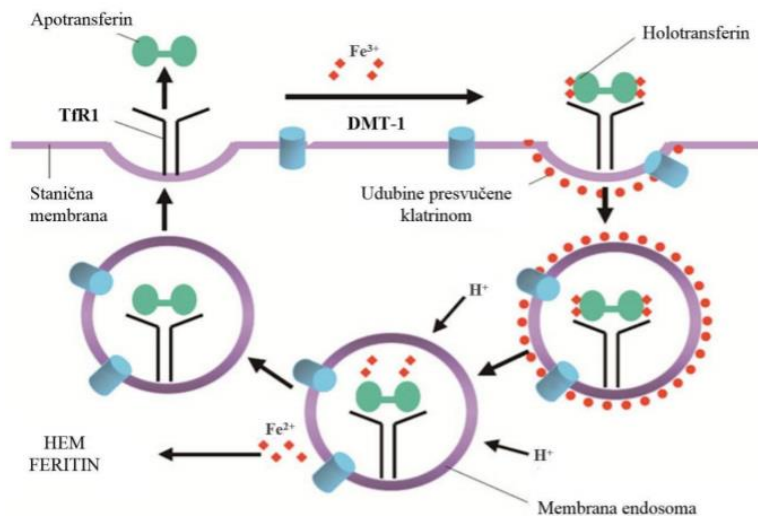
Ekspresiju TfR1 pokazuju sve ljudske stanice, pri čemu se razina ekspresije razlikuje ovisno o tipu stanice. Visoku razinu ekspresije TfR1 pokazuju hepatociti, nezrele eritroidne stanice i ostale stanice koje se brzo dijele. Ekspresija TfR1 na staničnoj površini povećana je kada je intracelularna koncentracija željeza niska. TfR2 ima niži afinitet za holotransferin, a eksprimiran je samo na hepatocitima, enterocitima tankog crijeva i eritroidnim stanicama. Ekspresija TfR2 neovisna je o unutarstaničnoj koncentraciji željeza, ali je umjesto toga modulirana brzinom rasta stanica.

Ljudski transferinski receptor je homodimer koji se sastoji od dviju identičnih transmembranskih podjedinica povezanih disulfidnom vezom. Svaka podjedinica ima molekulsku masu od 84,9 kDa, sadrži 760 aminokiselinskih ostataka, posjeduje jedno vezno mjesto za transferin i sastoji se od tri domene: izvanstanične C-terminalne domene od 671 aminokiseline, intramembranske domene od 28 aminokiselina i unutarstanične N-terminalne domene od 61 aminokiseline. Izvanstanična domena sadrži tri N-vezana oligosaharida na tri ostataka asparagina

i jedan O-vezani oligosaharidni lanac na ostatku treonina. Mutirani receptor, kojemu nedostaju vezani oligosaharidni lanci, ima oslabljenu aktivnost vezanja transferina, a gubitak O-vezanog oligosaharida na treoninu povezan je s povećanom osjetljivošću receptora na proteolitičko cijepanje (Ponka i sur., 1999).

#### 1.1.6. Transferinski ciklus i otpuštanje željeza s transferina

Željezo ulazi u krvotok iz crijeva ili raspadom hemoglobina u retikuloendotelnim stanicama. Apotransferin veže željezo čime dolazi do promjene u zatvorenu konformaciju transferina. Pritom nastali monoferični ili diferični transferin veže se za transferinski receptor pri čemu se, stvaraju klatrinske vezikule te se Tf-TfR kompleks internalizira u endosom. ATP-ovisne protonske pumpe transportiraju  $H^+$  ione u endosom, reducirajući tako pH na 5,5 i potičući oslobađanje željeza. U uvjetima niskog pH, TfR mijenja konformaciju kako bi apotransferin ostao vezan u kompleksu. Apotransferin iz kompleksa apo-Tf-TfR otpušta se tek kada kompleks dosegne staničnu površinu, pri neutralnom pH. Molekula transferina tada cirkulira sve dok ponovno ne dođe u kontakt sa slobodnim željezom u crijevima ili mjestima hemoglobinskog raspada (Slika3.).



Slika 3. Transferinski ciklus (preuzeto iz: Tandara, 2016).

Procijenjeno je da jedna molekula transferina može sudjelovati u ovom transportnom ciklusu čak 100 puta. Kada se željezo pri niskom pH oslobodi u endosomu, veže se za molekulu nosača, niske molekularne mase, te se tako prenosi prema različitim unutarstaničnim odjeljcima, uključujući

mitohondrije, gdje se odvija biosinteza hema, ili se pohranjuje u obliku feritina (Gomme i sur.,2005).

Kada se neutralna otopina holotransferina ( $\text{Fe}_2\text{Tf}$ ) i transferinskog receptora (TfR) pomiješa s blago kiselim puferom do konačnog pH od 4,5 do 6, dolazi do tri kinetička procesa detektirana fluorescencijskom emisijom. Prvi proces je otpuštanje željeza s N-režnja, praćen protoniranjem i posljedičnom promjenom konformacije transferina. Zatim slijedi otpuštanje željeza s C-režnja što je također praćeno protoniranjem i konformacijskom promjenom. U usporedbi s gubitkom željeza u nedostatku transferinskog receptora, interakcija s receptorom ubrzava oslobađanje željeza u kiselom mediju, čak i u odsutnosti kompetitivnog liganda kao što je citrat. Vezanjem za TfR, transferin podliježe protonima izazvanim konformacijskim promjenama tijekom kojih svaki režanj prelazi iz svoje zatvorene u otvorenu konformaciju. Prvi korak u ovom procesu je otpuštanje karbonata s veznog mjesta N-režnja, zatim slijedi protoniranje aminokiselina u veznom mjestu što dovodi do kidanja vodikovih veza između domena. Nakon toga slijedi sekvencijalna protonacija proteinskih liganada i kidanje koordinacijskih veza, čime se oslobađa željezo. Ukupna protonska dobit tijekom otpuštanja željeza pri pH 4,5 do 6 iznosi 3 protona po mjestu vezanja medija (El Hage Chanine i sur., 2011).

Smatra se da ostaci aminokiselina oko veznog mjesta (Gly-65, Glu-83, Tyr-85, Arg-124, Lys-206, Ser-248 i Lys-296 na N-terminalnoj domeni) dodatno stabiliziraju vezanje metala i imaju presudnu ulogu u oslobađanju željeza. Dva lizina, Lys-206 i Lys-296 nalaze se na suprotnim subdomenama N-terminalnog režnja. Kako je normalan  $\text{pK}_a$  amino skupine bočnog lanca lizina 10, sugerirano je da jedan ili oba lizina mogu imati neouobičajeno nizak  $\text{pK}_a$ , tako da ta dva ostatka tvore dilizinski par povezan vodikovom vezom. Kako se pH smanjuje ispod 6, oba ostatka mogu se protonirati što dovodi do odbijanja naboja i otvaranja "pukotine" stoga ovaj proces predstavlja okidač za otpuštanje željeza s transferina. Međutim, dilizinski par nije pronađen u C-režnju transferina te se smatra da tamo njegovu ulogu obavlja trijada ostataka Lys-Asp-Arg (Templeton, 2002).

#### 1.1.7. Kliničke primjene transferina

TIBC (eng. *Total iron binding capacity*), ukupna sposobnost vezivanja željeza, mjera je koncentracije transferina. S obzirom da je pri  $\text{pH} > 6,5$  samo 1/3 transferina zasićena željezom,

razlikujemo i UIBC (eng. *Unsaturated Iron Binding Capacity*), nezasićeni kapacitet vezanja željeza.

#### *Atransferinemija*

Atransferinemija je rijetka nasljedna bolest uzrokovana odsustvom ili, u slučaju hipotransferinemije, ozbiljnim nedostatkom transferina. Karakterizirana je anemijom, prekomjernom količinom željeza u parenhimskim stanicama jetre, miokarda, gušterače i endokrinih žlijezda, usporenim rastom i povećanom učestalosti infekcije. Prijavljeni su i ne-nasljedni oblici koji uključuju anti-Tf imunoglobulin G (IgG), nefrotski sindrom i eritroleukemiju. Za liječenje se koristi infuzija apotransferina (Kennady i sur., 2019).

#### *Ishemijsko-reperfuzijska ozljeda*

Ishemijsko-reperfuzijska ozljeda (IR) stanje je koje potiče oksidativni stres što rezultira upalom i, u konačnici, staničnom smrću (apoptozom) te posljedično nekrozom. IR ozljeda povezana je sa stanjima kao što su moždani udar, kardiovaskularne bolesti (KVB), zatajenje bubrega i transplantacija organa. Budući da slobodno željezo može katalizirati stvaranje kisikovih slobodnih radikala, prisutnost povećanih koncentracija željeza može dovesti do IR-a. Dokazi koji potvrđuju ovu hipotezu su studije koje pokazuju da upotreba kelatora željeza, deferoksamina, poboljšava stanje pacijenata s IR-om. Stoga bi potencijalna terapija bila upotreba apotransferina za uklanjanje slobodnog redoks-reaktivnog željeza (Kennady i sur., 2019).

#### *Kardiovaskularne bolesti*

Nedavne studije pokazale su da su niske razine transferina (55%) u kombinaciji s povišenom razinom lipoproteina niske gustoće (LDL) povezane s progresijom KVB. Transferin u kombinaciji s drugim terapijama za snižavanje LDL-a može se koristiti u terapiji za održavanje niske razine zasićenja transferina željezom, čime se minimalizira sposobnost slobodnog željeza da potakne oksidaciju LDL-a i ograničava napredovanje KVB-a (Kennady i sur., 2019).

#### *Radioterapija*

Tijekom liječenja radioterapijom razine transferina se smanjuju. Smatra se da sama terapija potiče oksidativni stres povećanjem razine reaktivnog željeza u cirkulaciji. Stoga, infuzija apotransferina može vezati željezo koje se oslobađa tijekom zračenja i tako minimalizirati oksidativna oštećenja (Kennady i sur., 2019).

### *Antimikrobna aktivnost*

Bakterijske infekcije često su odgovorne za smrt pacijenata koji su podvrgnuti transplantaciji koštane srži ili kemoterapiji zbog hematoloških zloćudnih bolesti. Ti pacijenti obično imaju visoku razinu slobodnog željeza prisutnog u cirkulaciji, što često premašuje sposobnost vezanja željeza (TIBC). Dokazano je da je rast patogena *Staphylococcus epidermidis* moguće inhibirati normalnim serumom te da je dodavanjem slobodnog željeza ukinut inhibitorni učinak seruma. Stoga se smatra da je smanjenje razine slobodnog željeza važno za sprječavanje rasta patogena. Jedan od mogućih načina liječenja je intravenska infuzija apotransferina (Kennady i sur., 2019).

### *Ciljana isporuka lijekova*

Mehanizam transporta i unosa željeza putem Tf-TfR transportnog sustava može se iskoristiti za specifičnu isporuku različitih terapijskih metalnih iona, lijekova, proteina i gena. Posebno su zanimljive stanice koje prekomjerno ekspimiraju TfR. Osim željeza, najmanje 30 drugih metalnih iona može se također vezati na transferin, stoga je moguće koristiti transferin za prijenos tih metala u tijelu, posebice galija ( $\text{Ga}^{3+}$ ) i indija ( $\text{In}^{3+}$ ). Stanični unos  $\text{Ga}^{3+}$  odvija se uglavnom putem Tf-TfR mehanizma, pa se tako koncentrira u tkivima koja ekspimiraju visoku razinu TfR, poput tumora. Iz tog razloga se  $^{67}\text{Ga}^{3+}$ , niskoenergetski radionuklid koji emitira gama zrake, široko koristi kao dijagnostičku sredstvo za mnoge zloćudne bolesti. Radionuklid  $^{111}\text{In}^{3+}$  je korišten u kombinaciji s kemoterapijom za liječenje neoplazmi ili kao radioaktivna oznaka za određivanje vitalnosti tumorskih stanica (Kennady i sur., 2019).

## 1.2. Željezo

Željezo u obliku različitih kombiniranih ruda jedan je od najčešćih elemenata koji čini oko 5% zemljine kore. Za život je ključan ponajviše zbog njegove sposobnosti da lako prihvati i oslobađa elektrone prebacujući se tako između fero ( $\text{Fe}^{2+}$ ) i feri ( $\text{Fe}^{3+}$ ) oblika. Ovaj prijenos elektrona između željeza i molekule donora/primatelja dovodi do nekoliko vitalnih funkcija u tijelu: služi kao nosač kisika tkivima, kao transportni medij elektrona unutar stanice, kao sastavni dio mnogih važnih enzima u raznim tkivima (citokroma, katalaza, peroksidaza, NO sintaza).

Ukupna količina željeza u muškarcu mase 70 kg iznosi oko 3500–4000 mg, što odgovara prosječnoj koncentraciji od 50 do 60 mg/kg. Velika većina (2300mg, 65%) željeza u tijelu se nalazi

u hemoglobinu cirkulirajućih eritrocita. Otprilike desetina ukupnog željeza (350 mg) prisutna je u mioglobinu mišića, enzimima i citokromima drugih tkiva. Od ostatka, otprilike 500 mg nalazi se u makrofagima retikuloendotelnog sustava (RES), oko 200-1000 mg pohranjeno je u hepatocitima u obliku feritina, dok se 150 mg željeza nalazi u koštanoj srži (Yiannikourides i sur., 2019).

Za plazmatski transportni protein transferin vezano je oko 3 mg željeza, ali zbog dinamike prijenosa željeza dolazi do desetak izmjena u 24 sata (Tandara, 2016).

Optimalna količina dnevnog unosa željeza prehranom je 10-20 mg od čega se kod zdravih ljudi u crijevima apsorbira 1-2 mg. Također se prosječno 1-2 mg željeza dnevno izgubi iz tijela ljuštenjem epitela, krvarenjem ili parazitskim infestacijama. Ne postoji aktivni mehanizam izlučivanja željeza stoga je za homeostazu željeza potrebna dnevna apsorpcija željeza od 1-2 mg. Ta se potreba povećava u fiziološkim uvjetima poput rasta, trudnoće i menstruacije (Abbaspour i sur., 2014).

Osim prehrane bogate željezom, većinu dnevnih potreba za željezom osiguravaju makrofagi retikuloendotelnog sustava koji recikliraju 10-20 puta veću količinu željeza od one koja se apsorbira u crijevima. Makrofagi fagocitiraju eritrocite u slezeni, jetri i koštanoj srži te degradiraju hemoglobin i kataboliziraju hem, pri čemu se oslobađa  $Fe^{2+}$ .  $Fe^{2+}$  se zatim eksportira iz makrofaga pomoću transmembranskog transportera feroportina (FPN1), dok se simultano događa oksidacija željeza u  $Fe^{3+}$  pomoću ceruloplazmina. Tako oslobođeno trovalentno željezo se zatim veže na transferin (Gkouvatsos i sur., 2012).

### 1.2.1. Apsorpcija željeza

Željezo u hrani je prisutno u dva oblika, kao hemsko i ne-hemsko. Hemsko željezo, koje se nalazi prije svega u crvenom mesu, oblik je koji se najviše apsorbira. Ne-hemsko željezo se nalazi u mesnoj i biljnoj hrani i većinom postoji u feri obliku. Ne-hemski oblici željeza vežu se za neki drugi organski sastojak hrane. Kuhanje ima tendenciju da prekine ove interakcije i poveća dostupnost željeza. Apsorpcija željeza se u najvećem dijelu odvija u tankom crijevu, odnosno u duodenumu i donjem dijelu jejunuma.

Na apsorpciju željeza utječu brojni prehrambeni faktori. Askorbat i citrat povećavaju unos željeza zbog njihove sposobnosti reduciranja željeza, ali također i zbog potencijala za keliranje željeza. Pokazan je i učinak mesa, ribe, peradi i nekih aminokiselina na povećanje apsorpcije

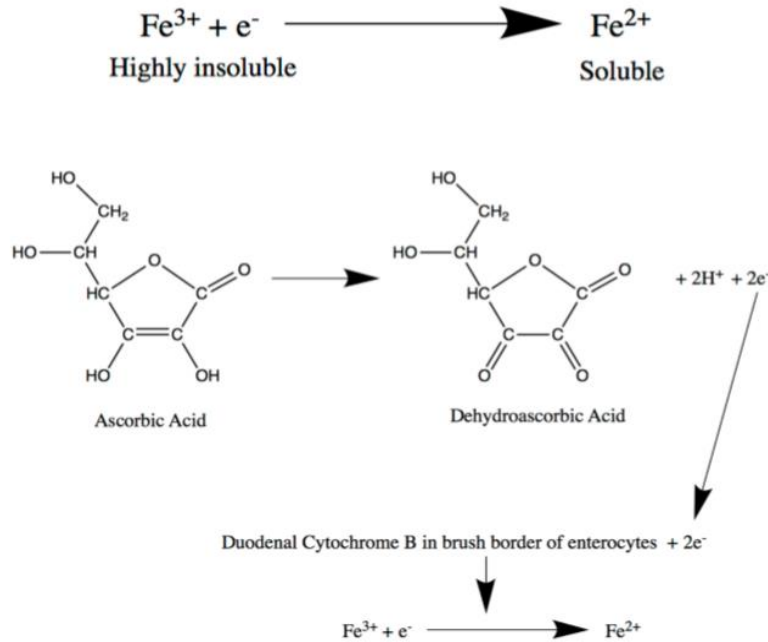
željeza. S druge strane, na apsorpciju djeluju inhibitorno fitati, polifenoli, kalcij i neki proteini poput mliječnih proteina, bjelančevina jaja i albumina (Abbaspour i sur., 2014).

Među najvažnijim fiziološkim signalima za povećanu potrebu za željezom su hipoksija i anemija (Tandara, 2016).

#### *Apsorpcija ne-hemskog željeza*

U hrani se željezo nalazi u dvovalentnom (fero-oblik) ili trovalentnom obliku (feri-oblik). U lumenu crijeva netopljivi trovalentni oblik željeza reducira se u topljiviji dvovalentni oblik, jer kao takav može proći apikalnu membranu enterocita. Do redukcije dolazi djelovanjem kiseline u želucu, reducirajućih agensa poput askorbinske kiseline, cisteina i sulfhidrilnih skupina proteina (Slika 4.). Apsorpciji posreduju dva proteina koja se nalaze s luminalne strane apikalne membrane enterocita. Ferireduktaza, duodenalni citokrom B (DyctB), reducira trovalentni u dvovalentni oblik željeza koji se zatim preko transportera dvovalentnih metala 1 (engl. *divalent metal transporter 1*, *DMT-1*) transportira kroz apikalnu membranu enterocita u citoplazmu. Ferireduktaza prihvaća elektrone oslobođene oksidacijom askorbinske kiseline u dehidroaskorbinsku kiselinu te ih koristi za redukciju željeza, dok je DMT-1 ovisan o prisutnosti luminalnih  $H^+$  iona za što je bitan Na/H izmjenjivač koji omogućava recikliranje protona preko duodenalne luminalne membrane (Yiannikourides et al., 2019).

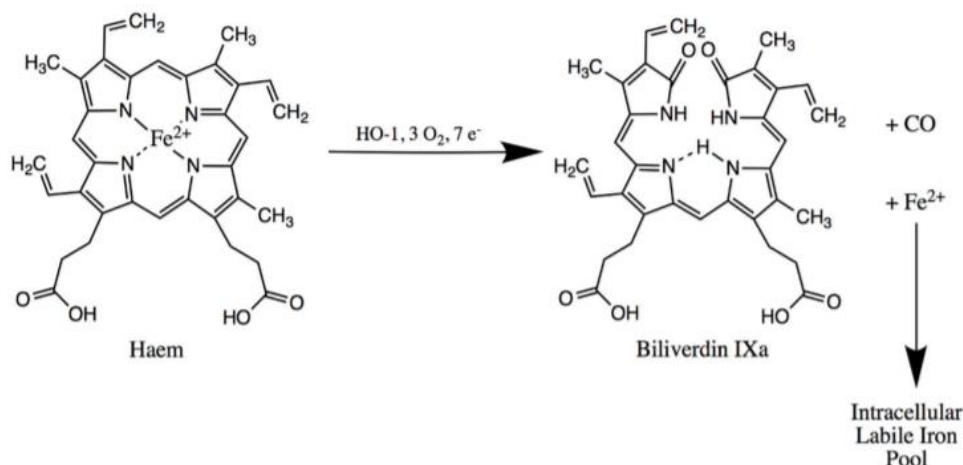




Slika 4. Nizak pH u želucu i prehrambena askorbinska kiselina reduciraju nehemsko željezo iz visoko netopljivog Fe<sup>3+</sup> oblika u Fe<sup>2+</sup>, koji se lakše apsorbira. Duodenalni citokrom B prihvaća elektrone oslobođene oksidacijom askorbinske kiseline u dehidroaskorbinsku kiselinu i koristi ih za kataliziranje redukcije željeza (preuzeto iz: Yiannikourides, 2019).

#### *Apsorpcija henskog željeza*

Apsorpcija intaktne skupine hema najvjerojatnije je posredovana transporterom HCP-1 (engl. *heme-carrier protein 1*) koji se nalazi na apikalnoj membrane enterocita i čija je značajna ekspresija dokazana u duodenumu. Novije studije pokazale su da je supstrat za ovaj transportni protein i folat stoga se ponekad koristi akronim PCFT/HCP1 (engl. *proton-coupled folate transporter, PCFT*). Po ulasku u enterocit, hem se razgrađuje djelovanjem hem oksigenaze (HO-1) čime se željezo otpušta iz protoporfirinskog prstena i pridružuje se unutarstaničnom "labilnom odjeljku željeza" (engl. *labile iron pool, LIP*) (Slika 5.). Nadalje, netaknuti hem se također može apsorbirati u cirkulaciju putem dvaju proteina koji se nalaze na bazolateralnoj membrani enterocita: BCRP (engl. *breast cancer resistant protein*) i FLVCR (engl. *feline leukaemia virus subgroup C*) (Yiannikourides et al., 2019).



Slika 5. U enterocitima se hem može razgraditi do slobodnog željeza koji ulazi u unutarstanični "labilni odjeljak željeza" (preuzeto iz: Yiannikourides, 2019).

### 1.2.2. Cirkulacija željeza nakon apsorpcije u enterocit

Nakon apsorpcije, slobodno i vrlo reaktivno dvovalentno željezo je kelirano organskim kiselinama niske molekularne mase, aminokiselinama i proteinima, što čini labilni odjeljak željeza. Nedavno istraživanje je ustanovilo da je glavna komponenta ovog odjeljka dvovalentno željezo vezano za glutation. Kada postoji mala potražnja za željezom u tijelu, apsorbirano željezo se pohranjuje unutar enterocita u obliku feritina, unutarstaničnog proteina za skladištenje željeza. Osim što ima ulogu pohranjivanja, feritin također štiti stanice od potencijalno toksičnih reakcija kataliziranih željezom. Enterociti imaju kratak životni vijek, s obzirom da se oljušte i zamjenjuju svakih nekoliko dana stoga se željezo pohranjeno u feritinu gubi nakon raspadanja enterocita ukoliko nije transportirano iz enterocita u cirkulaciju. Transport željeza preko bazolateralne membrane enterocita u cirkulaciju kontrolira transmembranski protein feroportin 1 (FPN1). Ekspresija feroportina 1 je čvrsto regulirana jetrenim hormonom hepcidinom. Kako bi se željezo transportiralo kroz bazolateralnu membranu potrebna je oksidacija dvovalentnog u trovalentno željezo što je posredovano feroskidazom hefestinom u duodenumu ili ceruloplazminom, cirkulirajućim proteinom koji je sintetiziran u jetri, u drugim tkivima. Hefestin je usidren na bazolateralnu membranu enterocita i povezan s feroportinom 1. Trovalentno željezo se zatim veže na transferin koji ima visoki afinitet za Fe<sup>3+</sup> i omogućava prijenos željeza u ljudskom tijelu (Yiannikourides et al., 2019).

### 1.2.3. Poremećaji homeostaze željeza

#### *Preopterećenje željezom*

Primarni uzroci sistemskog preopterećenja željezom su nasljedna hemokromatoza, anemije nastale zbog neadekvatne sinteze i/ili povećane razgradnje eritrocita te posljedično povećane apsorpcije željeza u organizam (talasemija, kongenitalne diseritropoetičke anemije, sideroblastična anemija, mijelodisplastična anemija), i transfuzijski ili drugi sekundarni oblici preopterećenja željezom. U tim poremećajima prekoračuje se kapacitet vezanja željeza za transferin što dovodi do stvaranja visoko reaktivnih oblika željeza koje nije vezano za transferin (eng. *non-transferrin-bound iron, NTBI*) koji se odlažu u jetri, srcu i endokrinim žlijezdama, gdje višak željeza potiče oksidativna oštećenja i disfunkcije organa, što dovodi do ciroze, kardiomiopatije, dijabetesa melitusa i drugih endokrinopatija (Dev i Babitt, 2017).

Nasljedna hemokromatoza nastaje zbog mutacija u genima koji kodiraju hepcidin (HAMP) ili mutacije u genima koji su glavni induktori ekspresije hepcidina u odgovoru na željezo: HFE, transferin receptor 2 (TFR2) ili hemojuvelin (HFE2, poznat i kao HJV). Mutacije u tim genima smanjuju sposobnost hepatocita da detektiraju povećanje razine željeza i aktiviraju signalnu kaskadu BMP/SMAD (engl. *bone morphogenic protein/sons of mothers against decapentaplegic*) kako bi potaknuli transkripciju hepcidina. To rezultira neprimjereno niskim razinama hepcidina, neuređenom aktivnošću ferroportina i nemogućnošću suzbijanja dijetalne apsorpcija željeza i oslobađanje željeza iz makrofaga, što dovodi do nakupljanja željeza u ostalim tkivima (Dev i Babitt, 2017).

Anemije su poremećaji koje karakterizira neučinkovita eritropoeza, što rezultira supresijom hepcidina, prehrambenom hiperapsorpcijom željeza i sekundarnim preopterećenjem željezom. Prototipni primjer je  $\beta$ -talasemija, gdje abnormalnosti u sintezi  $\beta$ -globina dovode do toksičnosti i apoptoze zrelih eritroblasta, što rezultira anemijom. To potiče proizvodnju eritropoetina i širenje nezrelih prekursora eritroida, ali eritropoeza ostaje neučinkovita i anemija ostaje. Proširena populacija prekursora eritroida izlučuje višak eritroidnih regulatora koji normalno suzbijaju hepcidin kako bi povećali dostupnost željeza za proizvodnju crvenih krvnih stanica, što rezultira pretjeranom apsorpcijom željeza i preopterećenjem željezom. Jedan od takvih eritroidnih regulatora hepcidina nedavno je identificiran kao eritroferon (Dev i Babitt, 2017).

### *Deficijencija željeza*

Manjak željeza može biti posljedica nedovoljne apsorpcije željeza iz prehrane, nedostatka hranjivih tvari, malapsorpcije (npr. zbog celijakije, resekcije želuca ili crijeva, kolonizacije *Helicobacter pylori*, inhibitora proteinskih pumpi ili antagonista H<sub>2</sub>), povećanih potreba za željezom tijekom trudnoće i brzog rasta djece ili povećanog gubitka krvi (npr. zbog ginekoloških gubitaka ili gastrointestinalnih gubitaka zbog djelovanja parazita, čira, malignosti, aspirina ili nesteroidnih protuupalnih lijekova). Najpoznatija klinička manifestacija nedostatka željeza je anemija. Glavne zdravstvene posljedice anemije uključuju povećan rizik od smrtnosti majki i djece, oslabljen kognitivni i tjelesni razvoj djece, smanjenu tjelesnu učinkovitost i radnu produktivnost kod odraslih te pad kognitivnih sposobnosti kod starijih osoba. Osim nedostatkom željeza, kada je ukupna razina željeza u tijelu smanjena, anemija može biti uzrokovana i funkcionalnim nedostatkom željeza, karakteriziranim smanjenom razinom željeza u cirkulaciji koja ograničava eritropoezu, unatoč odgovarajućim ili visokim zalihama ukupnog željeza u tijelu. Ovo je karakteristično za anemiju kronične bolesti koja prati različite upalne bolesti uključujući autoimune poremećaje, malignosti i kroničnu bolest bubrega. Kod ovih poremećaja, upalni citokini poput interleukina6 aktiviraju JAK/STAT3 signalni put inducirajući tako transkripciju hepcidina, malog peptidnog hormona, koji smanjuje ekspresiju feroportina te se tako inhibira apsorpciju željeza iz hrane i recikliranje željeza u makrofagu (Dev i Babitt, 2017).

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Transferin je glikoprotein čija su građa i funkcije proteinskog djela već detaljno istraženi. S druge strane, glikobiologija, grana biologije koja proučava glikokonjugate naglo se razvila u posljednjih desetak godina.

Genom čovjeka sačinjen je od svega 25000 gena pri čemu se postavlja pitanje kako tako relativno maleni genom može objasniti kompleksnost ljudskog života. Jedan od potencijalnih odgovora leži u post-translacijskim modifikacijama koje mijenjaju aktivnost proteina. Na primjer, vrsta i opseg glikozilacije mogu različito regulirati aktivnost jednog genskog proizvoda i igrati važnu ulogu u protein-protein interakcijama.

Glikozilacija definira adhezivna svojstva proteina i stanica. Imunološki sustav uvelike funkcionira putem interakcija glikan-protein, što naglašava važnost glikana u fiziologiji, prepoznavanju patogena, karcinomima i autoimunim bolestima. Molekule glikana moduliraju mnoge druge procese važne za diferencijaciju stanica i tkiva, metaboličku i gensku regulaciju, aktivnost i klirens proteina, transport i drugo. S obzirom na središnju ulogu koju glikani igraju u imunološkim interakcijama, glikoproteini i ugljikohidrati postaju ciljevi terapija, cjepiva i dijagnostike sljedeće generacije.

Prvi cilj ovog rada bio je utvrditi kako desijalizacija, odnosno promjena glikoforme transferina utječe na vezanje i otpuštanje željeza s transferina.

Drugi cilj rada bio je utvrditi utjecaj promjene pH te sinergističkog aniona na vezanje i otpuštanje željeza s transferina. Osim što sudjeluje u neutralizaciji pozitivnog naboja unutar veznog mjesta, karbonat služi i kao ligand za stabiliziranje željeza. Iako je karbonatni ion ključan za stabilizaciju mjesta vezanja željeza, druge anionske vrste poput oksalata također će olakšati vezanje željeza.

U eksperimentalnom dijelu izvedene su četiri titracije transferina sa željezom:

- 1) Titracija sijaliziranog transferina s željezom, pri čemu je pufer sadržavao karbonatni ligand
- 2) Titracija sijaliziranog transferina s željezom, pri čemu je pufer sadržavao oksalatni ligand
- 3) Titracija desijaliziranog transferina s željezom, pri čemu je pufer sadržavao karbonatni ligand
- 4) Titracija desijaliziranog transferina s željezom, pri čemu je pufer sadržavao oksalatni ligand.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Korištene kemijske supstance

U eksperimentu su korištene sljedeće kemijske supstance:

- Dvostruko destilirana voda
- $K_2C_2O_4$  (kalijev oksalat) - Mallinckrodt, Mr= 184,23
- $FeCl_3$  (željezov klorid) - Riedel-de Haën, Mr= 162,2
- HCl (klorovodična kiselina), c =1 M
- Humani apotransferin (Biorbyt Ltd, kat. br. orb80927)
- KCl (kalijev klorid) - Alkaloid AD Skopje, Mr= 74,56
- MES (2-(N-morfolino)-etansulfonska kiselina) - Sigma, Mr= 195,24
- $NaHCO_3$  (natrijev hidrogenkarbonat) - Kemika, Mr= 84,01
- $Na_3NTA$  (natrijev nitrilotriacetat) – Sigma, Mr= 260,11
- NaOH (natrijev hidroksid), c = 0,5 M
- Neuraminidaza (GlycoCleave® imobilizirani enzimi za glikoanalizu) – GALAB Technologies GmbH
- Radni pufer (0,2 M  $CH_3COONa$ , 0,001 M  $CaCl_2$ )
- Skladišni pufer (0,05 M  $CH_3COONa$ , 0,009 M  $CaCl_2$ , 0,15 M NaCl)

#### 3.2. Priprema otopina

##### 1. Priprema otopina pufera:

Za izvedbu svih četiri titracija u ovom radu pripremili smo ukupno dva pufera. Otopina prvog pufera pripremljena je otapanjem 1,220 g MES-a (0,025 M), 3,728 g KCl-a (0,2 M) i 0,210 g  $NaHCO_3$  (0,01 M) u 250 ml dvostruko destilirane vode. pH otopine podešen je na 5,6 pomoću 0,5 M NaOH. Druga otopina pufera pripremljena je otapanjem 1,220 g MES-a (0,025 M), 3,728 g KCl-a (0,2 M) i 0,461 g oksalata u 250 ml dvostruko destilirane vode. pH otopine podešen je na 5,6 pomoću 0,5 M NaOH.

##### 2. Priprema otopine FeNTA:

Prethodno standardizirana otopina  $Na_3NTA$  pomiješana je s  $\approx 30$  ml dvostruko destilirane vode te je pH otopine podešen na  $\approx 3$  pomoću 1 M HCl, tijekom čega se otopina miješala na magnetskoj miješalici. Podešavanje pH je važno kako nebi došlo do stvaranja željezova hidroksida kao posljedice dodavanja kationa željeza u bazičnu vodenu otopinu  $Na_3NTA$ . U vodenu otopinu

Na<sub>3</sub>N<sub>3</sub>TA dodane su odgovarajuće količine 0,1 M otopine FeCl<sub>3</sub> pri čemu je količina Na<sub>3</sub>N<sub>3</sub>TA u otopini trebala biti u stehiometrijskom suvišku oko 10% u odnosu na dodano željezo kako bi se osigurala stabilnost budući da je slobodno željezo podložno hidrolizi. FeCl<sub>3</sub> otopina dodana je polagano mikropipetom u središte vrtloga nastalog djelovanjem magnetske mješalice. Budući da se pH otopine snizi dodatkom FeCl<sub>3</sub>, morao se podesiti na ≈ 3 postupnim dodavanjem 0,5 M NaOH u središte vrtoga. Brzo dodavanje NaOH (aq), nedovoljno miješanje otopine ili dodavanje koncentriranog NaOH može rezultirati značajnom tvorbom željezova hidroksida.

Nakon podešenog pH, otopini se dodao ostatak dvostruko destilirane vode do 50 ml u odmjerne tikvici. U slučaju promjene pH dodatkom vode, dodane su male količine HCl ili NaOH uz miješanje. Tako pripremljena otopina FeNTA profiltrirana je pomoću šprice i priključnim filterom veličine pora 0,22 μm, zbog malih količina nastalog željezova hidroksida i/ili drugih čestica koje se mogu stvoriti tijekom postupka.

Za snimanje UV-Vis spektra FeNTA, otopina FeNTA razrijeđena je 20-25 puta dvostruko destiliranom vodom. Mjerenje se izvelo na *Varian Cary 50 Bio UV-Vis spektrofotometru* u rasponu valnih duljina od 200 do 800 nm, te su se za mjerenje koristile kvarcne kivete (*Hellma 105.253-QS 100 μL Ultra-Micro Fluorescence Cell*) promjera 1 cm. Za određivanje bazne linije koristila se dvostruko destilirana voda. Koncentracija FeNTA određena je pomoću molarnog apsorpcijskog koeficijenta FeNTA  $\epsilon = 600 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (za  $\lambda = 260 \text{ nm}$ ) i molarnog apsorpcijskog koeficijenta Na<sub>3</sub>N<sub>3</sub>TA  $\epsilon = 64.4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (za  $\lambda = 260 \text{ nm}$ ), pri čemu je ukupna apsorbanca na  $\lambda = 260 \text{ nm}$  linearna kombinacija apsorbanca FeNTA i Na<sub>3</sub>N<sub>3</sub>TA pri 260 nm (Bunescu, A., Besse-Hoggan, P., Sancelme, M., Mailhot, G., Delort, A. (2008) Fate of the Nitritoltriactic Acid-Fe(III) Complex during Photodegradation and Biodegradation by *Rhodococcus rhodochrus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(20), 6320-6326.).

### 3. Priprema uzoraka apotranserina:

Prije odvage humanog apotranserina deioniziran je pribor, uključujući i spremnik u koji se važe apotranserin pomoću deionizatora *Benchtop Air Ionizer*. Na analitičkoj vagi *Sartorius LA 310 S* odvagano je 10-13 mg apotranserina (masa apotranserina dobivena uzimajući u obzir potrebnu količinu transferina za titraciju te gubitak tijekom filtracije u filteru za centrifugu *Amicon ultra-0.5*). Izvagani apotranserin otopljen je u MES puferu i pročišćen pomoću *Amicon ultra-0.5* filtera.

Dobiveni koncentrat razrijeđen je dodatkom MES pufera na željenu koncentraciju za dobivanje matične otopine transferina.

#### 4. Desijalizacija nativnog apotransferina:

Prije upotrebe, suspenzija imobilizirane neuraminidaze resuspendirana je okretanjem epruvete nekoliko puta. Neposredno zatim dodano je po 400  $\mu\text{L}$  te suspenzije u dvije 1,5 mililitarske *Eppendorf* epruvete. Otprilike polovicu (200  $\mu\text{L}$ ) od ukupnog volumena suspenzije trebaju sačinjavati zrna neuraminidaze, a ostatak skladišni pufer.

Za svaku *Eppendorf* epruvetu, koja sadrži 200  $\mu\text{L}$  zrna neuraminidaze, pripremljeno je 800  $\mu\text{L}$  otopine apotransferina tako što se transferin otopio u prethodno napravljenom radnom puferu. Zrna neuraminidaze ispirana su tako što su se *Eppendorf* epruvete centrifugirale 1 minutu brzinom od 1200 RPM (broj okretaja u minuti), te se supernatant koji sadrži skladišni pufer uklonio mikropipetom i zamjenio se s 800  $\mu\text{L}$  radnog pufera. Ovaj postupak ponovljen je tri puta, te je prije svakog centrifugiranja bilo potrebno resuspendirati zrna okrećući epruvete nekoliko puta. Pri uklanjanju supernatanta poželjno je bilo ostaviti dio kako nebi došlo do gubitka neuraminidaza.

Nakon ispiranja uklonjen je preostali supernatant i epruvetama je dodana prethodno pripremljena otopina apotransferina. Tako pripremljene dvije suspenzije, od kojih svaka sadrži otprilike 200  $\mu\text{L}$  zrna neuraminidaze i 800  $\mu\text{L}$  apotransferina, stavljene su u inkubator prethodno zagrijan na 37 °C. Epruvete u inkubatoru rotirane su brzinom 10 RPM. Nakon 24 sata inkubacije epruvete su uklonjene iz inkubatora i centrifugirane 1 minutu brzinom od 1200 RPM. Supernatant koji sadrži desijalizirani transferin stavljen je u novu 1.5 mililitarsku *Eppendorf* epruvetu i centrifugiran je kako bi se uklonili eventualno zaostali ostaci zrna te je pohranjen za daljnju upotrebu.

Zrna neuraminidaze ispirana su 3 puta dodavanjem 800  $\mu\text{L}$  skladišnog pufera, centrifugiranjem 1 minutu brzinom od 1200 okretaja u minuti i uklanjanjem supernatanta. Bilo je potrebno okrenuti epruvete nekoliko puta prije svakog centrifugiranja. Poželjno je bilo sačuvati supernatant nakon prvog ispiranja sa skladišnim puferom zbog mogućeg sadržavanja znatne količinu desijaliziranog transferina. Tako ispiranim zrnima dodano je 800  $\mu\text{L}$  skladišnog pufera te se ova suspenzija skladištila na temperaturi od 2-8 °C. Volumen od 0,5 ml otopine desijaliziranog transferina dodalo se u *Amicon* ultra-0.5 filter za filtriranje otopina i koncentriralo se 5 minuta



brzinom od 12000 RPM u *Amicon* centrifugalnom koncentratoru. Nakon svakog centrifugiranja uklonjen je filtrat i dodano je dodatnih 0,5 ml otopine proteina.

Kada se otopina u potpunosti ukoncentrirala, uzorak se isprao 3 puta s 0,5 ml MES pufera pri svakom ciklusu centrifuge. Tako ukoncentrirana i isprana otopina proteina razrijeđena je dodavanjem MES pufera i određen joj se UV-Vis spektar pomoću *Varian Cary 50 Bio UV-Vis* spektrofotometra u rasponu valnih duljina od 200 do 800 nm. Za određivanje spektra korištene su kvarcne kivete (*Hellma 105.253-QS 100 µL Ultra-Micro Fluorescence Cell*) promjera 1 cm, a za određivanje bazne linije korišten je MES pufer. Koncentracija proteina određena je pomoću molarog apsorpcijskog koeficijenta  $\epsilon = 84000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (za  $\lambda = 280 \text{ nm}$ ) (James, N.G., Mason, A.B. (2008) Protocol to determine accurate absorption coefficients for iron-containing transferrins. *Analytical Biochemistry*, 378(2008), 202-207).

#### 5. Zasićenje transferina željezom (titracije):

Otopine transferina s različitim stupnjem zasićenja željezom pripremljene su titracijom otopine apotransferina s nizom otopina FeNTA i dvostruko destiliranom vodom različitih volumena. Korištene su otopine FeNTA dobivene razrjeđenjem matične otopine FeNTA dvostruko destiliranom vodom 5, 15 i 20 puta. Slijepa proba pripremljena je otapanjem MES pufera i dvostruko destilirane vode tako da sadrži istu količinu pufera i vode kao i ostale točke titracije. Dvije titracije izvedene su ručno, dok su dvije izvedene pomoću *Opentrons OT-2 Liquid Handler* robota za automatiziranu titraciju otopina. Volumeni i koncentracije titranata navedeni su u tablicama 1., 2., 3. i 4.

Tablica 1. Titracija sijaliziranog transferina sa željezom, pri čemu je pufer sadržavao karbonatni ion.

	V(apoTf)/ μL	c(apoTf)/ M	V(FeNTA)/ μL	c(FeNTA)/ M	V(vode)/ μL	$n(\text{FeNTA}) / n(\text{apoTf})$	
0	260	1,09E-05	0,0	0,00E+00	29,0	-	c(stock)/ 20
1	260	1,09E-05	0,0	0,00E+00	29,0	-	
2	260	1,09E-05	5,0	1,91E-06	24,0	0,17	
3	260	1,09E-05	6,0	2,29E-06	23,0	0,21	
4	260	1,09E-05	7,0	2,67E-06	22,0	0,24	
5	260	1,09E-05	8,0	3,06E-06	21,0	0,28	
6	260	1,09E-05	10,0	3,82E-06	19,0	0,35	
7	260	1,09E-05	12,0	4,58E-06	17,0	0,42	
8	260	1,09E-05	14,0	5,35E-06	15,0	0,49	
9	260	1,09E-05	16,0	6,11E-06	13,0	0,56	
10	260	1,09E-05	18,0	6,88E-06	11,0	0,63	
11	260	1,09E-05	20,0	7,64E-06	9,0	0,70	
12	260	1,09E-05	22,0	8,40E-06	7,0	0,77	
13	260	1,09E-05	25,0	9,55E-06	4,0	0,87	
14	260	1,09E-05	27,0	1,03E-05	2,0	0,94	
15	260	1,09E-05	29,0	1,11E-05	0,0	1,01	c(stock)/ 5
16	260	1,09E-05	9,0	1,38E-05	20,0	1,26	
17	260	1,09E-05	10,0	1,53E-05	19,0	1,40	
18	260	1,09E-05	11,0	1,68E-05	18,0	1,54	
19	260	1,09E-05	13,0	1,99E-05	16,0	1,82	
20	260	1,09E-05	15,0	2,29E-05	14,0	2,10	
21	260	1,09E-05	17,0	2,60E-05	12,0	2,38	

Tablica 2. Titracija sijaliziranog transferina sa željezom, pri čemu je pufer sadržavao oksalatni ion.

	V(apoTf)/ μL	c(apoTf)/ M	V(FeNTA)/ μL	c(FeNTA)/ M	V(vode)/ μL	n(FeNTA)/n(apoTf)	
0	260	1,14E-05	0,0	0,00E+00	29,0	-	c(stock)/ 20
1	260	1,14E-05	2,0	8,18E-07	27,0	0,07	
2	260	1,14E-05	4,0	1,64E-06	25,0	0,14	
3	260	1,14E-05	6,0	2,45E-06	23,0	0,21	
4	260	1,14E-05	8,0	3,27E-06	21,0	0,29	
5	260	1,14E-05	10,0	4,09E-06	19,0	0,36	
6	260	1,14E-05	12,0	4,91E-06	17,0	0,43	
7	260	1,14E-05	14,0	5,72E-06	15,0	0,50	
8	260	1,14E-05	16,0	6,54E-06	13,0	0,57	
9	260	1,14E-05	18,0	7,36E-06	11,0	0,64	
10	260	1,14E-05	20,0	8,18E-06	9,0	0,71	
11	260	1,14E-05	22,0	9,00E-06	7,0	0,79	
12	260	1,14E-05	25,0	1,02E-05	4,0	0,89	
13	260	1,14E-05	27,0	1,10E-05	2,0	0,97	
14	260	1,14E-05	29,0	1,19E-05	0,0	1,04	
15	260	1,14E-05	16,0	8,72E-06	13,0	0,76	c(stock)/ 15
16	260	1,14E-05	17,0	9,27E-06	12,0	0,81	
17	260	1,14E-05	18,0	9,81E-06	11,0	0,86	
18	260	1,14E-05	19,0	1,04E-05	10,0	0,91	
19	260	1,14E-05	20,0	1,09E-05	9,0	0,95	
20	260	1,14E-05	21,0	1,14E-05	8,0	1,00	
21	260	1,14E-05	22,0	1,20E-05	7,0	1,05	
22	260	1,14E-05	23,0	1,25E-05	6,0	1,10	
23	260	1,14E-05	24,0	1,31E-05	5,0	1,14	
24	260	1,14E-05	25,0	1,36E-05	4,0	1,19	
25	260	1,14E-05	26,0	1,42E-05	3,0	1,24	
26	260	1,14E-05	27,0	1,47E-05	2,0	1,29	
27	260	1,14E-05	28,0	1,53E-05	1,0	1,33	
28	260	1,14E-05	10,0	1,64E-05	19,0	1,43	c(stock)/ 5
29	260	1,14E-05	11,0	1,80E-05	18,0	1,57	
30	260	1,14E-05	12,0	1,96E-05	17,0	1,72	
31	260	1,14E-05	16,0	2,62E-05	13,0	2,29	
32	260	1,14E-05	18,0	2,94E-05	11,0	2,57	
33	260	1,14E-05	20,0	3,27E-05	9,0	2,86	
34	260	1,14E-05	25,0	4,09E-05	4,0	3,57	

Tablica 3. Titracija desijaliziranog transferina sa željezom, pri čemu je pufer sadržavao karbonatni ion.

	V(apoTf)/ μL	c(apoTf)/ M	V(FeNTA)/ μL	c(FeNTA)/ M	V(vode)/ μL	$n(\text{FeNTA})/n(\text{apoTf})$	
0	240	1,0471E-05	0,0	0,00E+00	25,0	0,00	c(stock)/ 20
1	240	1,05E-05	0,0	0,00E+00	25,0	0,00	
2	240	1,05E-05	2,0	8,33E-07	23,0	0,08	
3	240	1,05E-05	4,0	1,67E-06	21,0	0,16	
4	240	1,05E-05	6,0	2,50E-06	19,0	0,24	
5	240	1,05E-05	8,0	3,33E-06	17,0	0,32	
6	240	1,05E-05	10,0	4,17E-06	15,0	0,40	
7	240	1,05E-05	12,0	5,00E-06	13,0	0,48	
8	240	1,05E-05	14,0	5,83E-06	11,0	0,56	
9	240	1,05E-05	16,0	6,67E-06	9,0	0,64	
10	240	1,05E-05	18,0	7,50E-06	7,0	0,72	
11	240	1,05E-05	20,0	8,33E-06	5,0	0,80	
12	240	1,05E-05	21,0	8,75E-06	4,0	0,84	
13	240	1,05E-05	23,0	9,58E-06	2,0	0,92	
14	240	1,05E-05	24,0	1,00E-05	1,0	0,96	
15	240	1,05E-05	13,0	7,22E-06	12,0	0,69	c(stock)/ 15
16	240	1,05E-05	14,0	7,78E-06	11,0	0,74	
17	240	1,05E-05	15,0	8,33E-06	10,0	0,80	
18	240	1,05E-05	17,0	9,44E-06	8,0	0,90	
19	240	1,05E-05	18,0	1,00E-05	7,0	0,96	
20	240	1,05E-05	19,0	1,06E-05	6,0	1,01	
21	240	1,05E-05	20,0	1,11E-05	5,0	1,06	
22	240	1,05E-05	22,0	1,22E-05	3,0	1,17	
23	240	1,05E-05	23,0	1,28E-05	2,0	1,22	
24	240	1,05E-05	24,0	1,33E-05	1,0	1,27	
25	240	1,05E-05	25,0	1,39E-05	0,0	1,33	c(stock)/ 5
26	240	1,05E-05	8,0	1,33E-05	17,0	1,27	
27	240	1,05E-05	9,0	1,50E-05	16,0	1,43	
28	240	1,05E-05	10,0	1,67E-05	15,0	1,59	
29	240	1,05E-05	12,0	2,00E-05	13,0	1,91	

Tablica 4. Titracija desijaliziranog transferina sa željezom, pri čemu je pufer sadržavao oksalatni ion.

	V(apoTf)/ μL	c(apoTf)/ M	V(FeNTA)/ μL	c(FeNTA)/ M	V(vode)/ μL	n(FeNTA)/n(apoTf)	
0	250	1,11E-05	0,0	0,00E+00	28,0	0,00	c(stock)/ 20
1	250	1,11E-05	0,0	0,00E+00	28,0	0,00	
2	250	1,11E-05	5,0	2,05E-06	23,0	0,18	
3	250	1,11E-05	7,0	2,86E-06	21,0	0,26	
4	250	1,11E-05	9,0	3,68E-06	19,0	0,33	
5	250	1,11E-05	10,0	4,09E-06	18,0	0,37	
6	250	1,11E-05	12,0	4,91E-06	16,0	0,44	
7	250	1,11E-05	14,0	5,73E-06	14,0	0,52	
8	250	1,11E-05	16,0	6,55E-06	12,0	0,59	
9	250	1,11E-05	18,0	7,37E-06	10,0	0,66	
10	250	1,11E-05	20,0	8,18E-06	8,0	0,74	
11	250	1,11E-05	22,0	9,00E-06	6,0	0,81	
12	250	1,11E-05	24,0	9,82E-06	4,0	0,88	
13	250	1,11E-05	26,0	1,06E-05	2,0	0,96	
14	250	1,11E-05	28,0	1,15E-05	0,0	1,03	
15	250	1,11E-05	9,0	1,47E-05	19,0	1,33	c(stock)/ 5
16	250	1,11E-05	10,0	1,64E-05	18,0	1,47	
17	250	1,11E-05	11,0	1,80E-05	17,0	1,62	
18	250	1,11E-05	13,0	2,13E-05	15,0	1,92	
19	250	1,11E-05	15,0	2,46E-05	13,0	2,21	
20	250	1,11E-05	17,0	2,78E-05	11,0	2,51	

### 3.3. Korišteni pribor i instrumenti

- *Amicon* ultra-0.5 centrifugalni filter
- *Benchtop Air Ionizer* ionizator za deionizaciju pribora
- *Cole-Parmer Vortex Mixer* za miješanje otopina
- *Eppendorf Research plus* mikropipete
- *Eppendorf* epruvete od 1,5 mL
- *Greiner* mikrotitatske pločice s 96 jažica, crne s prozirnim dnom
- *Hellma*® kvarcne kivete za fluorescenciju
- *VWR INCU-Line* inkubator s rotatorom cjevčica na 37 °C za desijalizaciju
- Laboratorijske čaše
- Magnetska mješalica s prikladnim magnetima
- Menzure
- Odmjerne tikvice

- *Opentrons OT-2 Liquid Handler* robot za automatiziranu titraciju otopina
- *Mettler toledo MP 220* pH-metar kalibriran standardnim otopinama pH=4 i pH=7
- Računalo, *Microsoft Excel* za obradu podataka i *ReactLab™ EQUILIBRIA* program
- Stalci za epruvete
- *Tecan Spark M10* multifunkcijski čitač mikrotitarskih pločica za detekciju fluorescencije
- *Sartorius LA 310 S* analitička vaga s točnošću odvage 0.1 mg
- *Varian Cary 50 Bio UV-Vis* spektrofotometar
- *VWR compact star cs4* centrifuga

### 3.4. Metode

#### 3.4.1 Ultraljubičasta i vidljiva (UV-Vis) spektrofotometrija

Spektroskopija u ultraljubičastom i vidljivom području (UV-Vis) je instrumentalna tehnika kojom se mjeri količina apsorbirane svjetlosti u UV (190-380 nm) i vidljivom području (Vis, 380-800 nm). Apsorpcijom UV i Vis zračenja dolazi do prijelaza elektrona iz osnovnog u jednu od vibracijskih i rotacijskih razina pobuđenog elektronskog energijskog stanja. Ova metoda koristi se za kvantitativno određivanje prijelaznih metala i organskih komponenti u otopini te za određivanje njihovih fizikalno-kemijskih svojstava. Najčešće se mjere tekućine, iako se mogu mjeriti i kruti i plinoviti uzorci. Prije mjerenja, otopine se razrjeđuju kako nebi došlo do zasićenja pri visokim koncentracijama i kako bi se osiguralo područje linearne ovisnosti apsorbancije o koncentraciji. Također, bitan je odabir otapala kako ono ne bi apsorbiralo zračenje u istom području kao i uzorak čiji se spektar snima te kako nebi došlo do pomaka apsorpcijskih maksimuma prema većim ili manjim valnim duljinama. Instrument koji se koristi u UV/Vis spektroskopiji zove se UV/Vis spektrofotometar. Spektrofotometar mjeri intenzitet svjetla koje je prošlo kroz analizirani uzorak ( $I$ ) te ga uspoređuje s intenzitetom upadnog svjetla ( $I_0$ ). Što više analizirani uzorak apsorbira svjetlost na određenoj valnoj duljini, veća je koncentracija poznate tvari. Osnovni djelovi spektrofotometra su izvor zračenja (vodikova ili živina lampa za UV područje i volframova lampa za Vis područje), monokromator, nosač uzorka i detektor zračenja.

Ako se energija pobuđivanja podudara s energijom fotona ( $\Delta E = h\nu$ ), uzorak može apsorbirati elektromagnetsko zračenje. Ukupnu energiju molekule ( $E_{uk}$ ) čine elektronska i kinetička energija jezgara koju čine energija vibracije i rotacije (Bajt, 2018.):

$$E_{uk} = E_{el} + E_{vib} + E_{rot} \quad (3)$$

UV-Vis spektrofotometrija se temelji na Beer-Lambertovom zakonu koji daje odnos između apsorbancije i koncentracije. Međudjelovanjem fotona i čestica koje apsorbiraju elektromagnetsko zračenje dolazi do smanjenja intenziteta upadnog snopa. Ovaj zakon vrijedi samo za otopine s niskim koncentracijama i za izvore monokromatske svjetlosti i može se prikazati formulom:

$$\log_{10} \frac{I_0}{I} = \varepsilon cl = A \quad (4)$$

pri čemu je  $I$  intenzitet upadnog snopa,  $I_0$  intenzitet snopa nakon prolaza kroz otopinu,  $\varepsilon$  je molarni apsorpcijski (ekstinkcijski) koeficijent svojstven svakoj molekulskoj vrsti i ovisan o valnoj duljini svjetlosti,  $c$  je koncentracija tvari u otopini,  $l$  je duljina puta svjetlosti kroz uzorak te  $A$  je apsorbancija ili optička gustoća.

Količina zračenja koju apsorbira molekula može se izraziti i pomoću transmitancije, odnosno udjela upadnog zračenja koje je otopina propustila:

$$T = \frac{P}{P_0} \quad (5)$$

pri čemu je  $T$  transmitancija,  $P$  snaga snopa nakon prolaza kroz otopinu i  $P_0$  je snaga upadnog snopa.

Iz dobivene transmitancije, može se izračunati apsorbancija pri čemu se dobiva apsorpcijski spektar spoja pri različitim valnim duljinama. Apsorpcija nastaje pri valnim duljinama ultraljubičastoga i vidljivoga područja karakterističnima za ispitivanu tvar.

$$A = -\log(T) \quad (6)$$

$$A = -\log \frac{P}{P_0} \quad (7)$$

Koncentracija analita u otopini određuje se pomoću otopina poznatih koncentracija i izrade baždarnog dijagrama ovisnosti apsorbancije o koncentraciji.

### *Određivanje količine željeza u otopini FeNTA*

Inicijalna koncentracija  $\text{Na}_3\text{NTA}$  u pripremljenoj otopini FeNTA je 10 % veća od koncentracije dodanog  $\text{FeCl}_3$ . Molarni apsorpcijski koeficijent  $\text{Na}_3\text{NTA}$  otopine određen je na valnoj duljini od 260 nm i iznosi  $\varepsilon(\text{Na}_3\text{NTA}, 260 \text{ nm}) = 62,4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Molarni apsorpcijski koeficijent FeNTA otopine dobiven je literaturno i iznosi  $\varepsilon(\text{FeNTA}, 260 \text{ nm}) = 6000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Ukupna apsorbanacija na  $\lambda = 260 \text{ nm}$  je linearna kombinacija apsorbanacija  $\text{NTA}^{3-}$  i FeNTA na 260 nm i iznosi:

$$A_{\text{ukupno}} = A_{\text{NTA}^{3-}} + A_{\text{FeNTA}} \quad (8)$$

$$A_{\text{ukupno}} = \varepsilon(\text{NTA}^{3-}) \times c(\text{NTA}^{3-}) \times l + \varepsilon(\text{FeNTA}) \times c(\text{FeNTA}) \times l \quad (9)$$

Budući da nam je poznata početna koncentracija dodane  $\text{Na}_3\text{NTA}$ , a vrsta  $\text{NTA}^{3-}$  u otopini sa  $\text{Fe}^{3+}$  ionima postoji kao slobodni ion i kao FeNTA možemo napisati jednadžbu:

$$c_0(\text{NTA}^{3-}) = c(\text{NTA}^{3-}) + c(\text{FeNTA}) \quad (10)$$

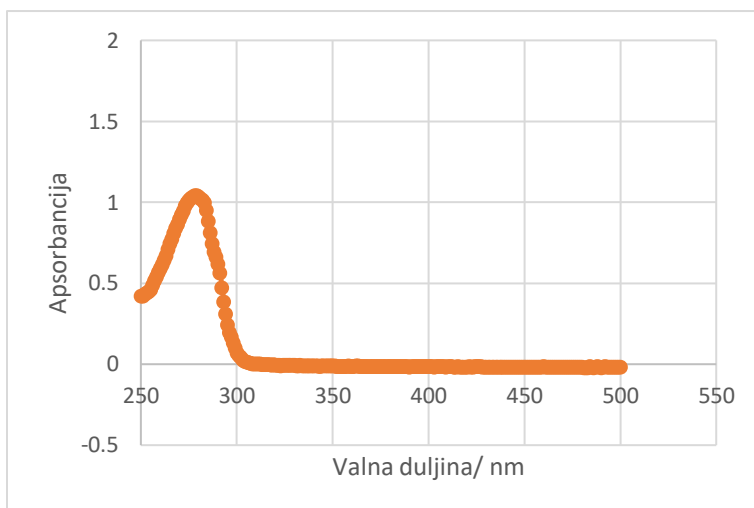
Poznavajući molarne apsorpcijske koeficijente i duljinu puta svjetlosti kroz uzorak, koncentracija FeNTA se može supstitucijom jednadžbe (10) u jednadžbu (9) izraziti kao:

$$c(\text{FeNTA}) = \frac{A/l - c_0(\text{NTA}^{3-}) \varepsilon(\text{NTA}^{3-})}{\varepsilon(\text{FeNTA}) + \varepsilon(\text{NTA}^{3-})} \quad (11)$$

Količina željeza vezana u obliku FeNTA može se odrediti iz poznate inicijalne koncentracije  $\text{Na}_3\text{NTA}$  u otopini prije dodavanja željeza i izmjerene apsorbanacije na 280 nm. Željezo koje se nije vezalo u obliku FeNTA zbog nestabilnosti i postupka pripreme FeNTA može se odrediti iz razlike željeza dodanog tijekom pripreme otopine i količine željeza i dalje vezanog u obliku FeNTA.



### Određivanje koncentracije apotransferina



Slika 6. Apsorpcijski spektar apotransferina.

Za apsorpciju EM zračenja pri 280 nm su odgovorni  $\pi$ -elektroni dvostrukih veza u bočnim ograncima aromatskih aminokiselina tirozina (Tyr), triptofana (Trp) i fenilalanina (Phe) (Strelec i Kovač, 2013.) . Molarni apsorpcijski koeficijent transferina pri valnoj duljini od 280 nm iznosi  $84000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , a promjer korištene kivete bio je 1 cm (James, N.G., Mason, A.B. (2008) Protocol to determine accurate absorption coefficients for iron-containing transferrins. *Analytical Biochemistry*, 378(2008), 202-207).

Za određivanje koncentracije apotransferina u otopini koristi se Beer-Lambertov zakon:

$$c = \frac{A}{\epsilon l} \quad (12)$$

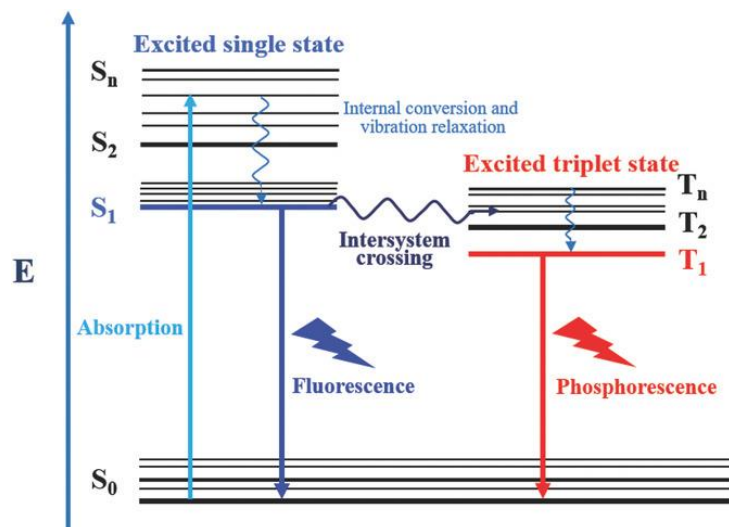
Za razliku od apotransferina koji ima jedan maksimum apsorpcije, holo-transferin ima dodatni maksimum apsorpcije na 465 nm.

#### 3.4.2. Fluorescencija

Fluorescencija je jedan od mehanizama kojim se molekula vraća u osnovno stanje nakon pobuđivanja apsorpcijom zračenja. Molekule koje fluoresciraju uglavnom imaju rigidnu strukturu i više kromofora (aromatski prsteni, konjugirane dvostruke veze i slično). Intenzitet fluorescencije proporcionalan je snazi pobudnog zračenja koje se apsorbira, a ovisi o koncentraciji analita, temperaturi, viskoznosti otapala i o stvaranju kompleksnih struktura s drugim molekulama u otopini. U otopinama visoke koncentracije nepobuđene molekule mogu apsorbirati emitirano

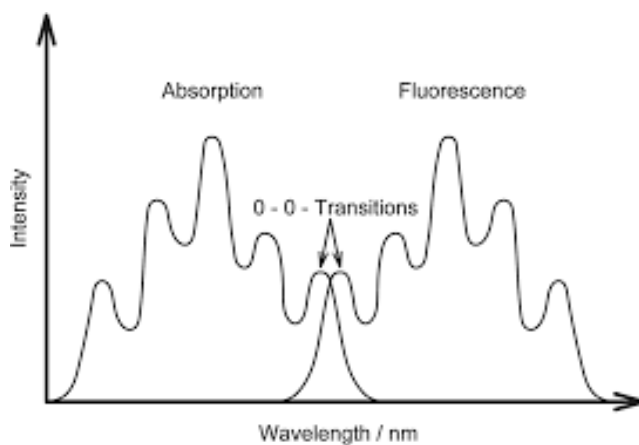
zračenje te će se tako intenzitet fluorescencije smanjiti. Povećanjem temperature pojačava se vibracijska relaksacija, a smanjuje se fluorescencija. U viskoznijim otapalima manja je vjerojatnost kinetičkih sudara i vibracijske relaksacije, pa se povećava intenzitet fluorescencije.

Molekula apsorbiranjem UV-Vis zračenja prelazi iz osnovnog u pobuđeno elektronsko stanje pri čemu joj se mijenjaju i vibracijska stanja. Da bi se vratila iz pobuđenog elektronskog u osnovno elektronsko stanje, molekula prvo mora prijeći iz pobuđenog u osnovno vibracijsko stanje pobuđenog elektronskog stanja u procesu koji se zove vibracijska relaksacija, a zatim prelazi iz pobuđenog u osnovno elektronsko stanje (pri čemu ne mora nužno prijeći i u osnovno vibracijsko stanje osnovnog elektronskog stanja) u procesu koji se zove fluorescencija. Fluorescencija traje reda veličine nanosekunde. Budući da se dio energije apsorbiranog zračenja emitirao tijekom vibracijske relaksacije, zračenje emitirano tijekom fluorescencije imaće manju energiju od apsorbiranog zračenja i to je ono zračenje koje se mjeri. Zato što emitirano zračenje ima manju energiju od apsorbiranog, fluorescencijski (emisijski) spektar će biti pomaknut prema većim valnim duljinama u odnosu na apsorpcijski spektar. Ova pojava poznata je kao Stokesov pomak. Različite energetske razine koje su uključene u apsorpciju i emisiju svjetlosti fluoroforom klasično su predstavljene Jablonskijevim energetskim dijagramom (Slika 7.).



Slika 7. Jablonskijev dijagram: S<sub>0</sub>, S<sub>1</sub> i S<sub>2</sub> označavaju osnovno, prvo i drugo ekscitirano singletno stanje. Unutar svake od tih elektronskih energetske razina fluorofori mogu postojati u raznim vibracijskim energetske nivoima. T<sub>1</sub> je ekscitirano tripletno stanje (www.onlinelibrary.wiley.com).

Za pojave apsorpcije i emisije zajednički je prijelaz 0 – 0, odnosno prijelaz između osnovnih vibracijskih stanja osnovnog i ekscitiranog singletnog stanja. Svi ostali prijelazi apsorpcije zahtijevaju više energije od onih emisijskih, stoga možemo očekivati da će se emisijski spektar preklapati s apsorpcijskim spektrom na valnoj duljini koja odgovara prijelazu 0 – 0, a ostatak emisijskog spektra biti će pomaknut prema nižim valnim duljinama (Slika 8.) (Lakowicz, 1999.).



Slika 8. Apsorpcijski i emisijski spektar (preuzeto iz: Walla, 2014).

Fluorescencijska spektrofotometrija je vrlo osjetljiva metoda koja se široko koristi u biotehnologiji, protočnoj citometriji, medicinskoj dijagnostici, sekvenciranju DNA, forenzici, genetskoj analizi itd. Ova metoda koristi se i za praćenje vezanja lijekova za proteine i određivanje konstanti vezanja (Lakowicz, 2006.).

Intenzitet emitirane svjetlosti je proporcionalan koncentraciji u dijelu raspona koncentracija otopina. Određivanje sadržaja može se postići na dva načina: izradom kalibracijske krivulje i uspoređivanjem intenziteta fluorescencije ispitivane tvari s intenzitetom fluorescencije poredbne tvari. Ako povećamo snagu pobudnog zračenja, povećat ćemo i emisiju stoga je za ovu metodu karakteristična visoka osjetljivost detekcije i mogućnost određivanja niskih koncentracija fluorescentnih molekula.

Udio paralelne zrake svjetlosti koju apsorbira uzorak neovisan je o intenzitetu upadne zrake i povezan je s koncentracijom tvari koje apsorbiraju prema poznatom Beer-Lambertovom zakonu:

$$\log_{10} \frac{I_0}{I} = \epsilon cl = A \quad (13)$$

Za intenzitet fluorescencije razrijeđenih uzoraka koji slabo apsorbiraju, vrijedi relacija:

$$F_f = I_0(2,303 \times \epsilon cl)\Phi f \quad (14)$$

pri čemu je  $\Phi_f$  kvantno iskorištenje. Koncentracija ( $c_{max}$ ) iznad koje se opaža nelinearnost:

$$c_{max} = \frac{0,05}{\epsilon l} \quad (15)$$

Izravna interpolacija koncentracija izvan ove granice dati će netočne rezultate.

Intrizična fluorescencija potječe od tri aromatske aminokiseline, fenilalanina (Phe), tirozina (Tyr) i triptofana (Trp) pri čemu ukupnoj fluorescenciji najznačajnije doprinosi triptofan. Uklanjanjem željeza iz transferina dolazi do pojave intrizične fluorescencije za što su odgovorna tri Trp ostataka u N-režnju i pet Trp ostataka u C-režnju. Koordinacija željeza s dva tirozinska liganda rezultira stvaranjem LMCT (eng. *Ligand to metal charge transfer*) vrpce u vidljivom djelu spektra ( $\lambda=470$  nm). Koordiniranjem željeza također se narušava  $\pi - \pi^*$  veza tirozinskih liganda što dovodi do povećanja UV apsorbcije i preklapanja s intrizičnim fluorescencijskim signalom koji dolazi od triptofana. Gašenje fluorescencije objašnjeno je fluorescentnim rezonantnim prijenosom energije (FRET) između Trp ostataka i interakcijom Tyr liganada s željezom i posljedičnim formiranjem vrpce u UV spektru. FRET podrazumijeva prijenos energije s molekule donora na

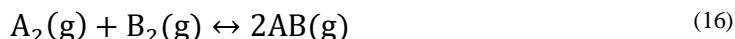
molekulu akceptora te je moguć samo ako su emisijski i apsorpcijski spektri molekula međusobno komplementarni i udaljenost između donora i akceptora je u rasponu od 1 do 10 nm (James i sur., 2009).

#### *Praćenje interakcije transferina i željeza*

Za mjerenje fluorescencije uzoraka holotransferina korištene su mikrotitarske pločice s 96 jažica (crne s prozirnim dnom) koje su umetnute u multifunkcijski čitač *Tecan*. Uvjeti snimanja bili su sljedeći: valna duljina pobude  $\lambda_{\text{ex}} = 280$  nm, valna duljina emisije  $\lambda_{\text{em}} = 335$  nm, širina vrpce pobude i emisije (engl. bandwidth) bila je 20 nm, pojačanje (eng. gain) bilo je na optimalnoj vrijednosti (oko 55), dikroično ogledalo (eng. mirror) na 50%, dok je Z-pozicija određena softverskim mjerenjem jažice u kojoj se nalazio apotransferin i iznosila je oko 17000 za sva mjerenja.

#### 3.4.3. Kemijska ravnoteža

Kemijska ravnoteža odnosi se na stanje sustava u kojem se koncentracija reaktanta i koncentracija produkta ne mijenjaju s vremenom. Sustav je u stanju dinamičke ravnoteže kada je postignuta jednaka brzina polazne i povratne reakcije te ne dolazi do promjena koncentracija reaktanata i produkata. Općenito se povratna reakcija može prikazati kao:



Prema zakonu brzine reakcije, brzina reakcije proporcionalna je koncentracijama reaktanata. Stoga za navedenu hipotetsku reakciju vrijedi:

$$v_1 = k_1 \times [A_2] \times [B_2] \quad (17)$$

$$v_2 = k_2 \times [AB]^2 \quad (18)$$

U stanju dinamičke ravnoteže brzine su izjednačene:

$$v_1 = v_2 \quad (19)$$

$$k_1 \times [A_2] \times [B_2] = k_2 \times [AB]^2 \quad (20)$$

$$k_1 \div k_2 = [AB]^2 \div ([A_2] \times [B_2]) \quad (21)$$

Iz omjera konstante brzine polazne i konstante brzine povratne reakcije dobiva se konstanta kemijske ravnoteže (K):

$$K = k_1 \div k_2 = [AB]^2 \div ([A_2] \times [B_2]) \quad (22)$$

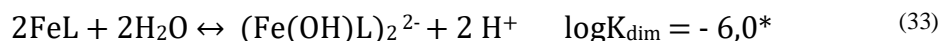
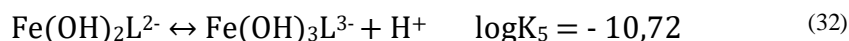
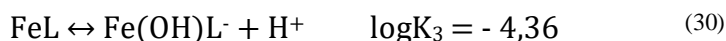
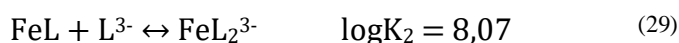
Ravnoteže koje uključuju disocijaciju  $H_4NTA^+$  u otopini su sljedeće (Motekaitis et al., J. Coord. Chem. 31, 1994, 67-78):



Suma svih postojećih vrsta NTA u otopini prikazuje se kao:

$$[NTA]_{total} = [NTA^{3-}] + [HNTA^{2-}] + [H_2NTA^-] + [H_3NTA] + [H_4NTA^+] \quad (27)$$

Ravnoteže koje uključuju željezo ( $Fe^{3+}$ ) i NTA (Motekaitis et al., J. Coord. Chem. 31, 1994, 67-78):

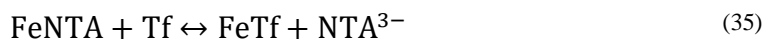


\*(Hegenauer et al., Biochemistry 18, 1979, 3865-3879)

Ukupna koncentracija kompleksa željeza s NTA ( $[Fe-NTA]_{total}$ ) prikazuje se kao suma svih postojećih oblika:

$$[FeNTA]_{total} = [FeL] + [FeL_2^{3-}] + [Fe(OH)L^-] + [Fe(OH)_2L^{2-}] + [Fe(OH)_3L^{3-}] + 2[(Fe(OH)L)_2^{2-}] \quad (34)$$

Ovaj rad bavi se kemijskim reakcijama između transferina i FeNTA pri čemu uzastopno nastaju monoferični i diferični transferin, što se može prikazati jednadžbama:





pri čemu FeNTA, Tf i FeTf predstavljaju slobodne molekule, a FeTf i Fe<sub>2</sub>Tf novonastali kompleks između transferina i željeza.

Izrazi za konstante kemijske ravnoteže K računaju se prema jednadžama:

$$K_1 = \frac{[\text{FeTf}][\text{NTA}^{3-}]}{[\text{FeNTA}][\text{Tf}]} \quad (37)$$

$$K_2 = \frac{[\text{Fe}_2\text{Tf}][\text{NTA}^{3-}]}{[\text{TfFe}][\text{FeNTA}]} \quad (38)$$

### *ReactLab™ EQUILIBRIA izračuni*

Za izračun konstanti  $K_1$  i  $K_2$  koje opisuju nastanak monoferičnog i diferičnog transferina korišten je program *ReactLab™ EQUILIBRIA*. U program su početno unesene koncentracije NTA, Fe i Tf u otopini te pripadajuće konstante ravnoteže navedene u prethodnom odjeljku. Isto tako su uneseni početni procijenjeni parametri za  $K_1$  i  $K_2$  (jednadžbe 37 i 38). Program je korišten za izračun teorijskog fluorescencijskog signala koji bi najbolje odgovarao eksperimentalnom uz pomoć metode najmanjih kvadrata. Najbolje slaganje između tih podataka dobiveno je iterativno koristeći Marquardt-Levenberg algoritam. Osim izračuna konstanti  $K_1$  i  $K_2$  program je izračunao i koncentracije svih vrsta koje daju doprinos ukupnoj fluorescenciji (Tf, FeTf i Fe<sub>2</sub>Tf) te koncentracije svih ostalih vrsta u otopini u svakoj točki titracije.

Na signal uočen u fluorescencijskoj spektroskopiji utječu brojne varijable što se može prikazati jednadžbom (Wenzel, 2020):

$$I = 2,303K'\epsilon bcP_0 \quad (39)$$

pri čemu I predstavlja intenzitet fluorescencije,  $\epsilon$  molarni apsopijski koeficijent,  $K'$  konstantu ovisnu o geometriji i ostalim faktorima,  $b$  duljinu puta svjetlosti kroz uzorak i  $P_0$  snagu izvora. Ovaj izraz se može pisati u pojednostavljenom obliku kao:

$$I = kc \quad (40)$$

Za dobivanje parametra  $K_1$  i  $K_2$ , u program su ručno upisane vrijednosti  $k$  koje su se odnosile kao  $k(\text{apoTf}) : k(\text{FeTf}) : k(\text{Fe}_2\text{Tf}) = 1 : 0,6 : 0,2$ , odnosno kažemo da vrsta FeTf gasi fluorescenciju 40 %, a Fe<sub>2</sub>Tf vrsta 80 % prema apotransferinu. Vrijednost za FeTf odnosi se na prosjek monoferičnih

transferina sa željezom vezanim na N-režanj ili na C-režanj. Za titraciju desijaliziranog transferina s karbonatom kao sinergističkim anionom nije bilo moguće izračunati konstante s tim fiksnim vrijednostima  $k$  pa su osim konstanti  $K_1$  i  $K_2$  za tu titraciju izračunate i vrijednosti  $k$  u programu. Dobiven je odnos  $k(\text{apoTf}) : k(\text{FeTf}) : k(\text{Fe}_2\text{Tf}) = 1 : 0,76 : 0,42$ .



### 3. REZULTATI I RASPRAVA

Rezultati obrade podataka dobivenih mjerenjem fluorescencije prema postupku opisanom u poglavlju 3.4.2. prikazani su u tablicama 5., 6., 7. i 8. Za prikaz relativne fluorescencije sve titracije normalizirane su na početnu vrijednost 50000.

Tablica 5. Prikaz rezultata titracije sijaliziranog transferina s FeNTA uz karbonat kao sinergistički anion pri pH 5,6: množinski omjeri FeNTA i apotransferina, koncentracije dodanog željeza, izmjerene fluorescencije te relativne fluorescencije u svim točkama titracije.

$n(\text{FeNTA}) / n(\text{apoTf})$	$c(\text{Fe}) \times 10^{-5} / \text{M}$	$F$	$RF$
0	0	41701	50000
0,17	0,191	37399	44842
0,21	0,229	35795	42919
0,24	0,267	35790	42913
0,28	0,306	33950	40707
0,35	0,382	34575	41456
0,42	0,458	31628	37922
0,49	0,535	31343	37581
0,56	0,611	31043	37221
0,63	0,688	30764	36886
0,70	0,764	29481	35348
0,77	0,840	28876	34623
0,88	0,955	27733	33252
0,95	1,031	27698	33210
1,02	1,108	26343	31586
1,26	1,375	24715	29634
1,40	1,528	24847	29792
1,54	1,681	24168	28978
1,82	1,986	23319	27960
2,10	2,292	22908	27467
2,38	2,597	22498	26975

Tablica 6. Prikaz rezultata titracije desijaliziranog transferina s FeNTA uz karbonat kao sinergistički anion pri pH 5,6: množinski omjeri FeNTA i apotransferina, koncentracije dodanog željeza, izmjerene fluorescencije te relativne fluorescencije u svim točkama titracije.

$n(\text{FeNTA}) / n(\text{apoTf})$	$c(\text{Fe}) \times 10^{-5} / \text{M}$	$F$	$RF$
0	0	51593	50000
0,08	0,0833	52653	51027
0,16	0,167	52498	50877
0,24	0,250	49740	48204
0,32	0,333	50468	48910
0,40	0,417	46903	45455
0,48	0,500	47679	46207
0,56	0,583	46776	45332
0,64	0,667	45424	44022
0,69	0,722	43506	42163
0,72	0,750	44131	42768
0,74	0,778	44210	42845
0,80	0,833	42664	41347
0,80	0,833	44149	42786
0,84	0,875	42409	41100
0,90	0,944	43082	41752
0,92	0,958	41984	40688
0,96	1,000	41788	40498
0,96	1,000	41999	40702
1,01	1,056	40640	39385
1,06	1,111	41521	40239
1,17	1,222	42196	40893
1,22	1,278	40826	39565
1,27	1,333	40149	38909
1,27	1,333	39267	38055
1,33	1,389	39442	38224
1,43	1,500	36587	35457
1,59	1,667	39026	37821
1,91	2,000	36983	35841

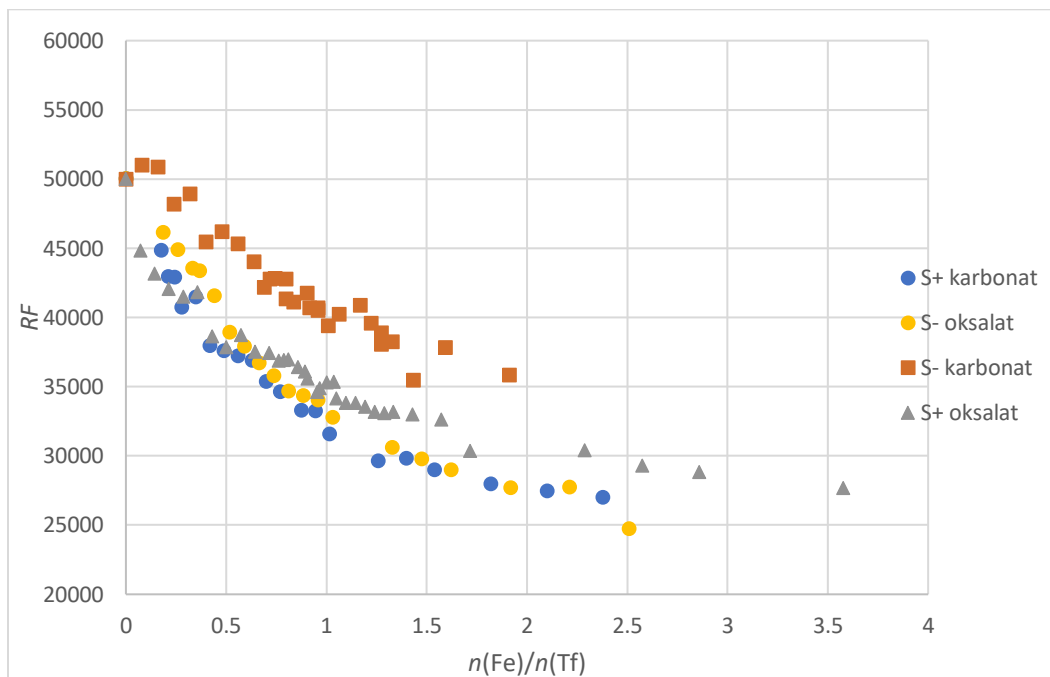
Tablica 7. Prikaz rezultata titracije sijaliziranog transferina s FeNTA uz oksalat kao sinergistički anion pri pH 5,6: množinski omjeri FeNTA i apotransferina, koncentracije dodanog željeza, izmjerene fluorescencije te relativne fluorescencije u svim točkama titracije.

$n(\text{FeNTA}) / n(\text{apoTf})$	$c(\text{Fe}) \times 10^{-5} / \text{M}$	$F$	$RF$
0	0	53176	50000
0,07	0,0818	47642	44797
0,14	0,164	45869	43129
0,21	0,245	44703	42033
0,29	0,327	44118	41483
0,36	0,409	44440	41786
0,43	0,491	41074	38621
0,50	0,572	40250	37846
0,57	0,654	41180	38721
0,64	0,736	39887	37505
0,72	0,818	39806	37429
0,76	0,872	39175	36835
0,79	0,900	39262	36917
0,81	0,927	39312	36964
0,86	0,981	38703	36391
0,89	1,022	38368	36076
0,91	1,036	37840	35580
0,95	1,090	36808	34610
0,97	1,104	37101	34885
1,00	1,145	37504	35264
1,04	1,186	37563	35320
1,05	1,199	36278	34111
1,10	1,254	35951	33804
1,14	1,308	35963	33815
1,19	1,363	35671	33541
1,24	1,417	35289	33181
1,29	1,472	35159	33059
1,33	1,526	35258	33152
1,43	1,635	35068	32974
1,57	1,799	34666	32596
1,72	1,963	32280	30352
2,29	2,617	32328	30397
2,57	2,944	31119	29260
2,86	3,271	30636	28806
3,58	4,089	29431	27673

Tablica 8. Prikaz rezultata titracije desijaliziranog transferina s FeNTA uz oksalat kao sinergistički anion pri pH 5,6: množinski omjeri FeNTA i apotransferina, koncentracije dodanog željeza, izmjerene fluorescencije te relativne fluorescencije u svim točkama titracije.

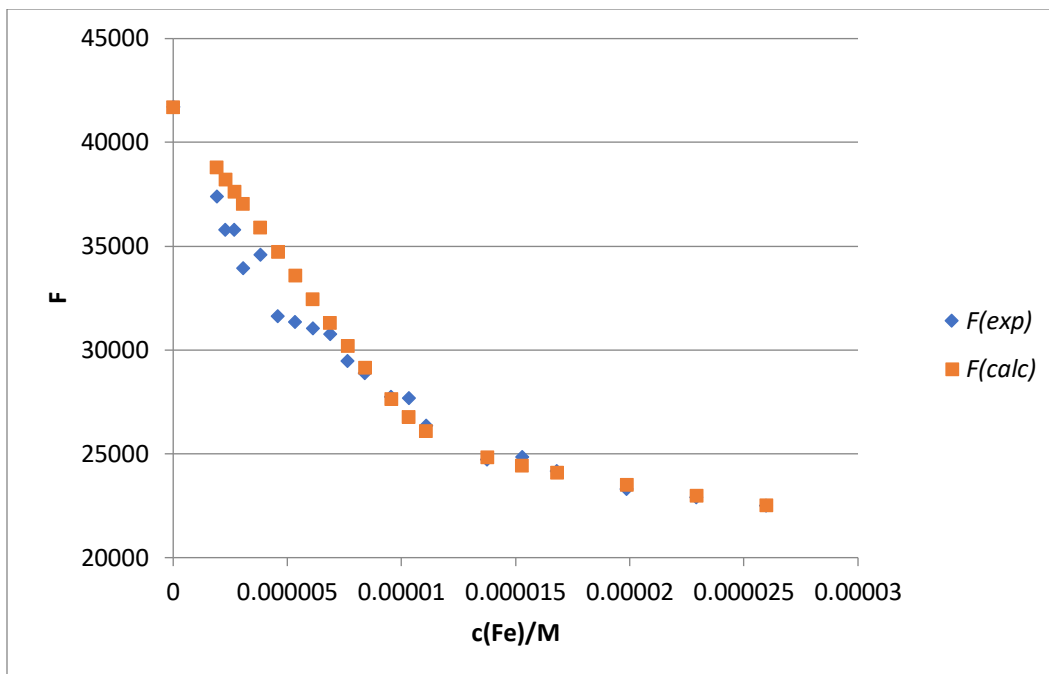
$n(\text{FeNTA}) / n(\text{apoTf})$	$c(\text{Fe}) \times 10^{-5} / \text{M}$	$F$	$RF$
0	0	52646	50000
0,18	0,205	48582	46140
0,26	0,286	47264	44889
0,33	0,368	45851	43547
0,37	0,409	45657	43362
0,44	0,491	43767	41567
0,52	0,573	40962	38903
0,59	0,655	39928	37921
0,66	0,737	38642	36700
0,74	0,818	37649	35757
0,81	0,900	36484	34650
0,89	0,982	36176	34358
0,96	1,064	35823	34023
1,03	1,146	34522	32787
1,33	1,473	32191	30573
1,48	1,637	31330	29755
1,62	1,800	30532	28998
1,92	2,128	29131	27667
2,21	2,455	29213	27745
2,51	2,782	26029	24721

Vežanjem željeza na transferin dolazi do gašenja intrinzične fluorescencije koja potječe od tri Trp ostataka u N-režnju i pet Trp ostataka u C-režnju. Specije Tf, FeTf i Fe<sub>2</sub>Tf različito doprinose ukupnoj fluorescenciji, stoga je smanjenje fluorescencije opisano nelinearnom krivuljom. Veći nagib krivulje na početku titracije sugerira da FeTf pridonosi većem gašenju fluorescencije u odnosu na Fe<sub>2</sub>Tf (Slika 9.).

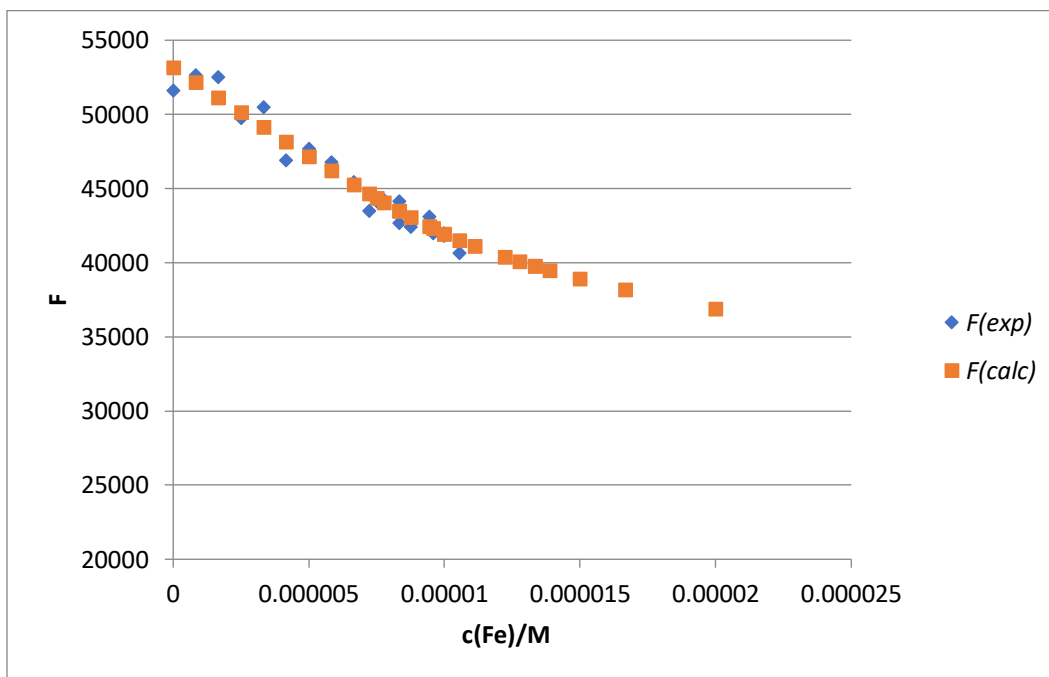


Slika 9. Ovisnost relativne fluorescencije o udjelu željeza vezanog na transferin za sve četiri titracije pri pH 5,6.

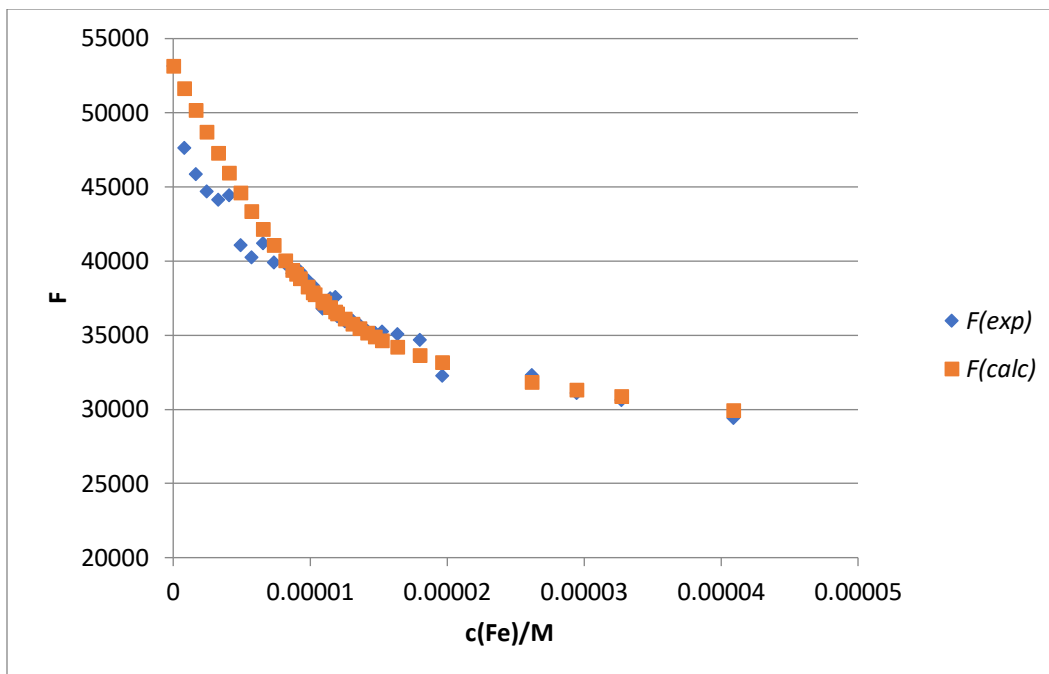
Slaganje dobivenih eksperimentalnih vrijednosti fluorescencije i onih izračunatih programom *ReactLab™ EQUILIBRIA*, pri čemu je izračunat intenzitet fluorescencije zapravo suma doprinosa svih fluorescirajućih vrsta transferina u svakoj točki titracije, prikazano je na slikama 10., 11., 12. i 13.



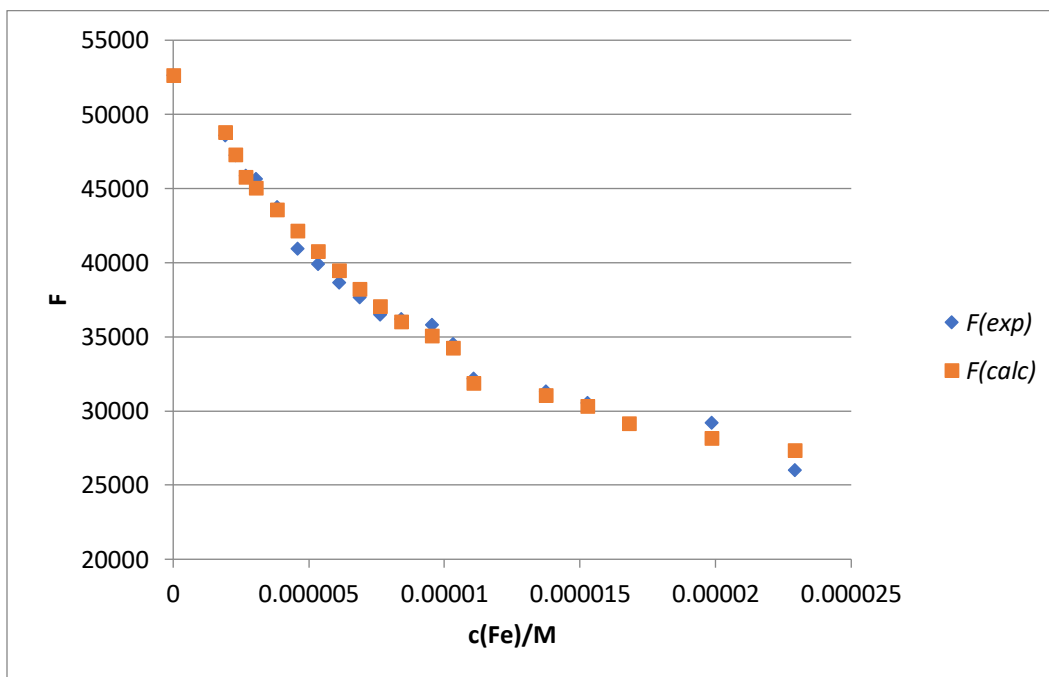
Slika 10. Prikaz dobivenih eksperimentalnih vrijednosti fluorescencije ( $F(\text{exp})$ ) i onih izračunatih ( $F(\text{calc})$ ) za titraciju sijaliziranog transferina s FeNTA uz karbonat kao synergistički ion pri pH 5,6.



Slika 11. Prikaz dobivenih eksperimentalnih vrijednosti fluorescencije ( $F(\text{exp})$ ) i onih izračunatih ( $F(\text{calc})$ ) za titraciju desijaliziranog transferina s FeNTA uz karbonat kao synergistički ion pri pH 5,6.

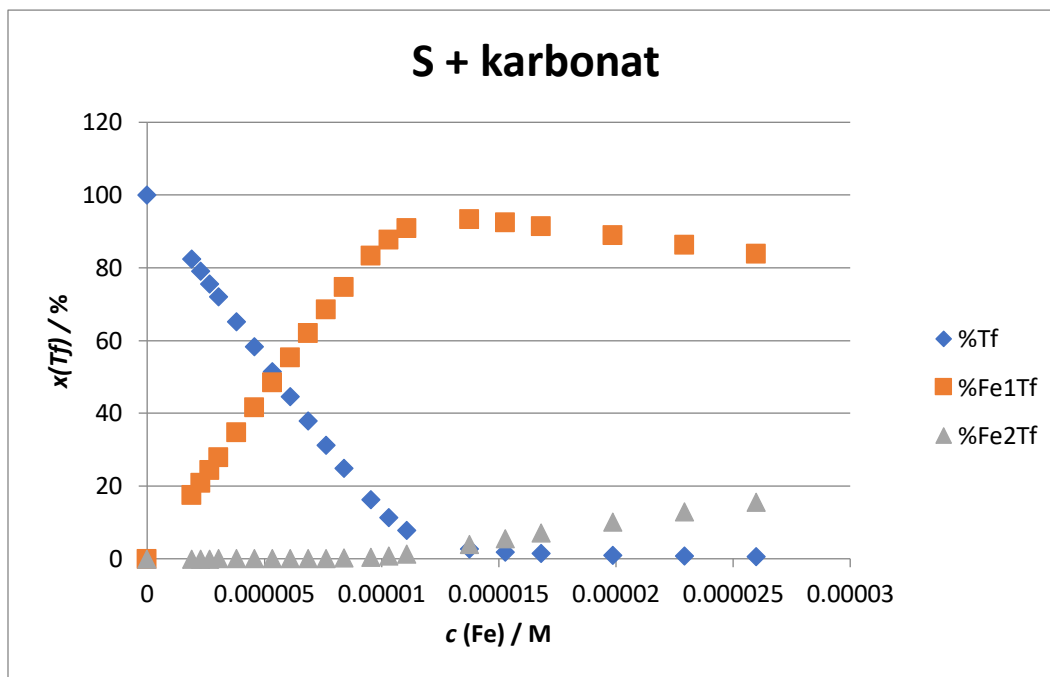


Slika 12. Prikaz dobivenih eksperimentalnih vrijednosti fluorescencije ( $F(\text{exp})$ ) i onih izračunatih ( $F(\text{calc})$ ) za titraciju sijaliziranog transferina s FeNTA uz oksalat kao synergistički ion pri pH 5,6.



Slika 13. Prikaz dobivenih eksperimentalnih vrijednosti fluorescencije ( $F(\text{exp})$ ) i onih izračunatih ( $F(\text{calc})$ ) za titraciju desijaliziranog transferina s FeNTA uz oksalat kao synergistički ion pri pH 5,6.

Prema grafovima ovisnosti postotka pojedine specije transferina o koncentraciji dodanog željeza može se vidjeti da je u prvim točkama svih četiriju titracija dominantna vrsta monoferični transferin. To se može pretpostaviti i iz odnosa konstanti  $K_1 > K_2$ , kao i to da diferični transferin nastaje kasnije u titraciji i u manjem postotku (Slika 14.,15.,16. i 17.).



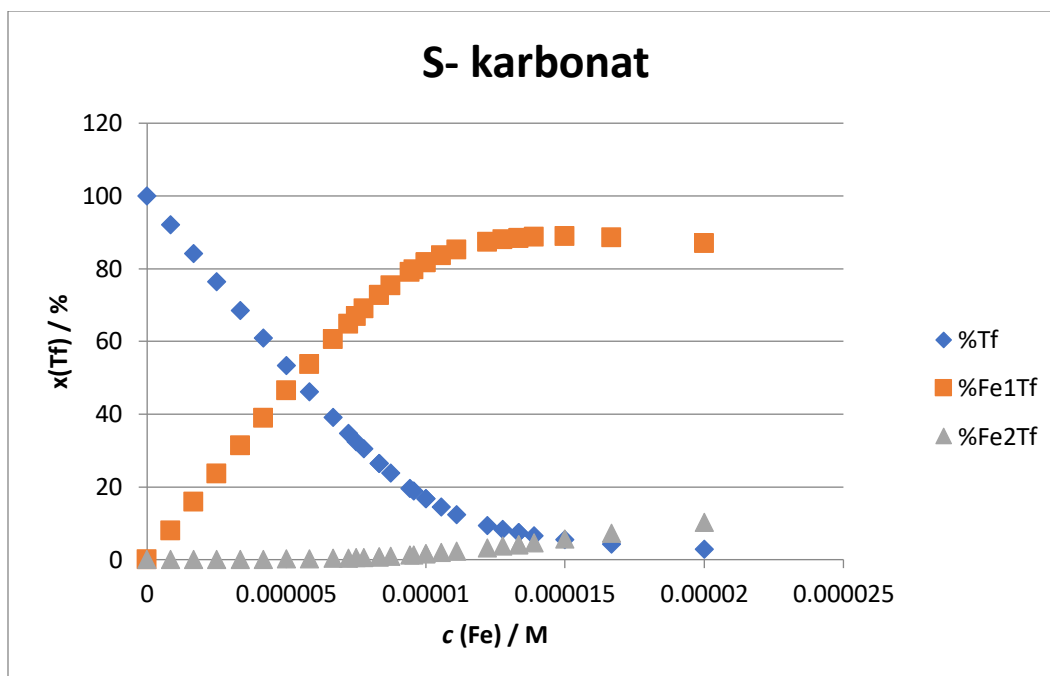
Slika 14. Graf ovisnosti udjela pojedine specije transferina o koncentraciji dodanog željeza dobiven programom *ReactLab™ EQUILIBRIA* za titraciju sijaliziranog transferina s FeNTA uz karbonat kao sinergistički anion, pri pH 5,6.

Vrijednosti  $K_1$ ,  $K_2$  i standardne devijacije dobivene *ReactLab™ EQUILIBRIA* programom s omjerom konstanta  $k(\text{apoTf}) : k(\text{FeTf}) : k(\text{Fe}_2\text{Tf}) = 1 : 0,6 : 0,2$  za sijalizirani transferin s karbonatom kao sinergističkim anionom su sljedeće:

$$\log K_1 = 14,14 \pm 0,64$$

$$\log K_2 = 11,24 \pm 0,24$$



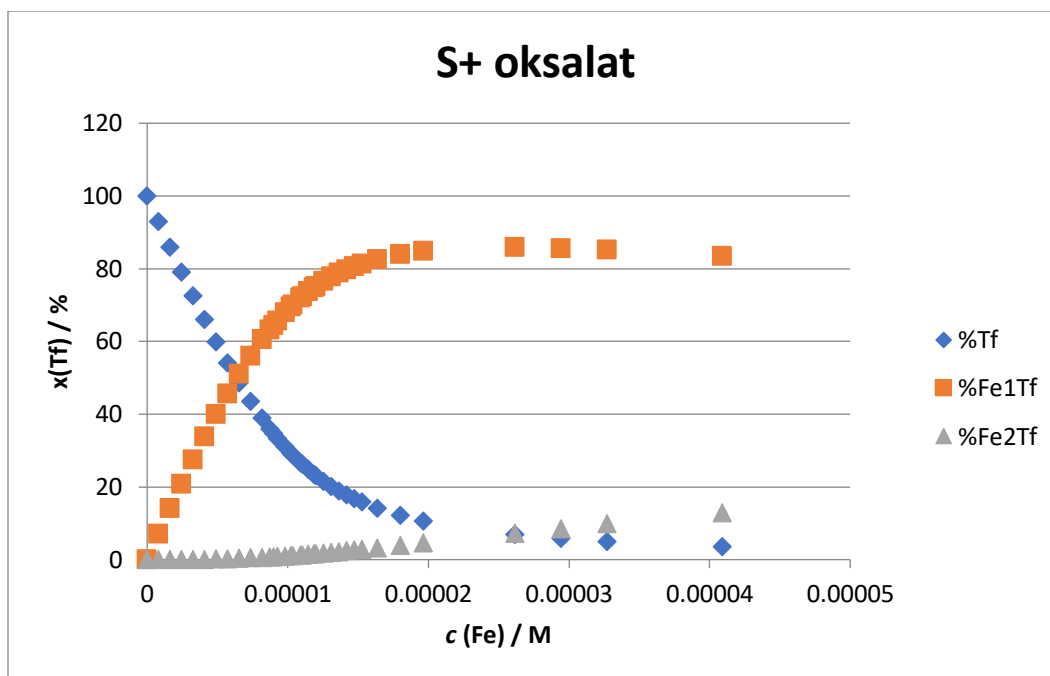


Slika 15. Graf ovisnosti udjela pojedine specije transferina o koncentraciji dodanog željeza dobiven programom ReactLab™ EQUILIBRIA za titraciju desijaliziranog transferina s FeNTA uz karbonat kao synergistički anion, pri pH 5,6.

Vrijednosti  $K_1$ ,  $K_2$  i standardne devijacije dobivene *ReactLab™ EQUILIBRIA* programom s omjerom konstanta  $k(\text{apoTf}) : k(\text{Fe}_1\text{Tf}) : k(\text{Fe}_2\text{Tf}) = 1 : 0,6 : 0,2$  za desijalizirani transferin s karbonatom kao synergističkim anionom su sljedeće:

$$\log K_1 = 13,58 \pm 1,23$$

$$\log K_2 = 11,18 \pm 3,52$$

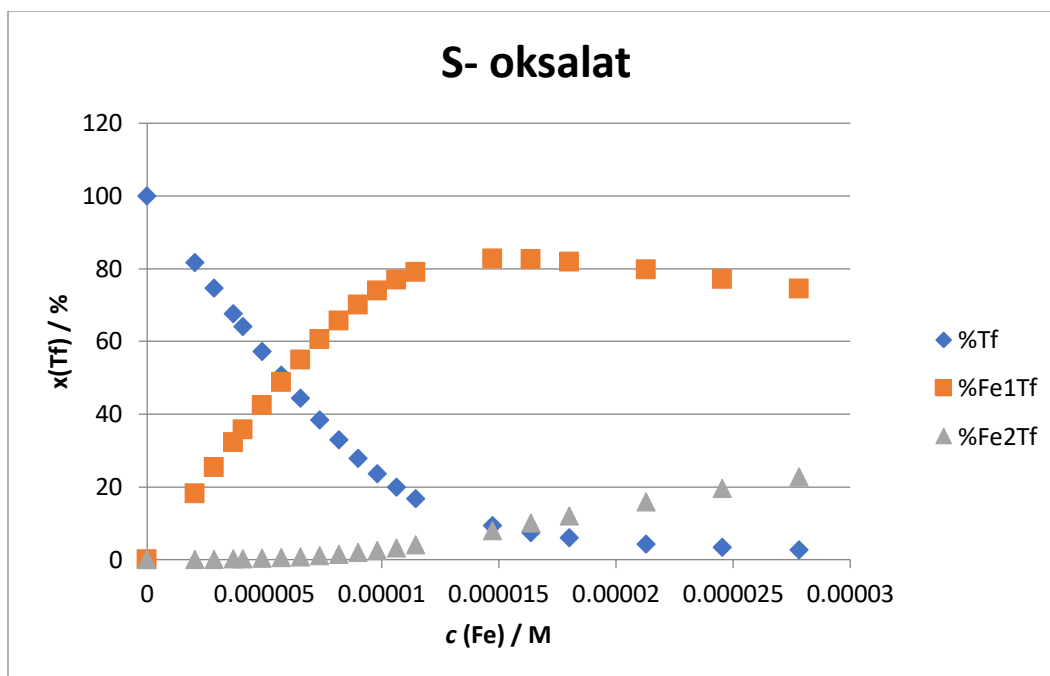


Slika 16. Graf ovisnosti udjela pojedine specije transferina o koncentraciji dodanog željeza dobiven programom *ReactLab™ EQUILIBRIA* za titraciju sijaliziranog transferina s FeNTA uz oksalat kao sinergistički anion, pri pH 5,6.

Vrijednosti  $K_1$ ,  $K_2$  i standardne devijacije dobivene *ReactLab™ EQUILIBRIA* programom s omjerom konstanta  $k(\text{apoTf}) : k(\text{Fe}_1\text{Tf}) : k(\text{Fe}_2\text{Tf}) = 1 : 0,6 : 0,2$  za sijalizirani transferin s oksalatom kao sinergističkim anionom su sljedeće:

$$\log K_1 = 12,99 \pm 0,10$$

$$\log K_2 = 10,82 \pm 0,24$$



Slika 17. Graf ovisnosti udjela pojedine specije transferina o koncentraciji dodanog željeza dobiven programom ReactLab™ EQUILIBRIA za titraciju desijaliziranog transferina s FeNTA uz oksalat kao sinergistički anion, pri pH 5,6.

Vrijednosti  $K_1$ ,  $K_2$  i standardne devijacije dobivene *ReactLab™ EQUILIBRIA* programom s omjerom konstanta  $k(\text{apoTf}) : k(\text{Fe}_1\text{Tf}) : k(\text{Fe}_2\text{Tf}) = 1 : 0,6 : 0,2$  za desijalizirani transferin s oksalatom kao sinergističkim anionom su sljedeće:

$$\log K_1 = 13,41 \pm 0,11$$

$$\log K_2 = 11,45 \pm 0,07$$

Tablica 9. Pregled konstanta vezanja željeza na humani serumski transferin, ovisno o stupnju sijalizacije i sinergijskom anionu

Transferin	anion	$\log K_1$	$\log K_2$
S+	karbonat	14,14±0,64	11,24±0,24
	oksalat	12,99±0,10	10,82±0,24
S-	karbonat	13,58±1,23	11,18±3,52
	oksalat	13,41±0,11	11,45±0,07

## 4. ZAKLJUČAK

Dobiveni rezultati sugeriraju različito vezanje željeza na transferin ovisno o glikoformi proteina, odnosno sadržaju sijalinskih kiselina. Prema spektrima ovisnosti postotka pojedine specije transferina o koncentraciji željeza možemo zaključiti da je u prvim točkama svih četiriju titracija dominantna vrsta monoferični transferin te da diferični transferin nastaje pri višim koncentracijama FeNTA. S obzirom na to da niti u jednoj titracijskoj krivulji nije dostignuto izravnanje krivulje, možemo zaključiti kako transferin nije potpuno zasićen željezom pri pH 5,6.

Usporedbom titracijskih krivulja i konstanti zaključujemo da se pri pH 5,6 prvo željezo veže s najvećim afinitetom na sijalizirani transferin u prisutnosti karbonata. U prisutnosti oksalata kao sinergističkog aniona pri pH 5,6 željezo se jače veže na desijalizirani, nego na sijalizirani transferin. Konstante  $K_1$  i  $K_2$  veće su u slučaju karbonata kao sinergističkog aniona u odnosu na oksalat te možemo zaključiti da se željezo veže većim afinitetom na sijalizirani transferin kada je sinergistički anion karbonat.

Dobivene vrijednosti za desijalizirani transferin s karbonatom kao sinergističkim anionom nisu u potpunosti usporedive s ostalim titracijama budući da su konstante  $K_1$  i  $K_2$  računane s pretpostavkom da je nastankom monoferičnog i diferičnog transferina manje gašenje fluorescencije u odnosu na ostale titracije.

U patološkim stanjima poput karcinoma debelog crijeva i prostate, dokazana je povećana aktivnost sijalidaza, enzima koji hidroliziraju terminalnu  $\alpha$ -vezanu sijalinsku kiselinu iz različitih sijaloglikokonjugata, u serumu. Reduciranjem ukupnog broja sijalinskih ostataka smanjuje se i ukupni negativni naboj te se mijenja afinitet vezanja i otpuštanja željeza s transferina.

Usporedbom konstanti vezanja dobivenih pri pH 5,6 s literaturnim vrijednostima za sijalizirani transferin s karbonatom pri pH 7,4 koje iznose  $K_1 = 4,7 \times 10^{20} \text{ M}^{-1}$  ( $\log K_1 = 20,67$ ) i  $K_2 = 2,4 \times 10^{19} \text{ M}^{-1}$  ( $\log K_2 = 19,38$ ) (Aisen, P., Leibman, A., Zweier, J. (1977). Stoichiometric and Site Characteristics of the Binding of Iron to Human Transferrin. The Journal of Biological Chemistry, 253(6), 1930-1937.) možemo vidjeti da su obje konstante veće pri fiziološkom pH stoga je i afinitet vezanja željeza na transferin veći. Ovo slijedi i iz činjenice da vezanjem kompleksa transferin-željezo na transferinski receptor dolazi do internalizacije kompleksa u

endosom gdje nizak pH (5,5) potiče oslobađanje željeza. Apotransferin tek pri dosezanju stanične površine i neutralnom pH može ponovno cirkulirati i vezati se s željezom. Također treba uzeti u obzir da pri pH manjem od izoelektrične točke tetrasijalotransferina,  $pI = 5,4$  (Marquardt, 2003), transferin ima pozitivan ukupni naboj što doprinosi smanjenu vezanja željeza na transferin.

Određena stanja poput dijabetičke ketoacidoze, metaboličke i respiratorne acidoze prati nizak pH krvi. Padanjem pH krvi ispod fiziološkog, smanjuje se i afinitet vezanja željeza na transferin te se povećava koncentracija slobodnog željeza u krvi. Slobodno željezo potrebno je mnogim patogenima za njihov rast te može katalizirati stvaranje kisikovih slobodnih radikala i tako naštetiti organizmu. Također, studije pokazuju povezanost visoke koncentracije slobodnog željeza s nekim vrstama karcinoma.

Potreban je nastavak istraživanja utjecaja glikozilacije, pH i sinergističkog aniona na vezanje željeza kako bi se bolje razumjela uloga transferina u spomenutim stanjima koja karakterizira primjerice smanjeni broj sijalinskih ostataka kod serumskih glikoproteina ili sniženje pH krvi.

## 5. LITERATURA

1. Abbaspour N, Hurrell R, Kelishadi R. Review on iron and its importance for human health. *Journal of Research in Medical Sciences*, 2014, 19, 164-174.
2. Aisen P, Leibman A, Zweier J. Stoichiometric and Site Characteristics of the Binding of Iron to Human Transferrin. *The Journal of Biological Chemistry*, 1977, 253, 1930-1937.
3. Arora S, Kapoor RK. Iron Metabolism: Iron Metabolism in Humans: An Overview. Rijeka, InTech, 2012.
4. A Tour of Transferrin, 2017., <https://sites.chem.utoronto.ca>, pristupljeno 23. 08. 2020.
5. Bajt P. Lambert-Beerov zakon, Završni rad, Sveučilište J. J. Strossmayera, Osijek, 2017.
6. Bailey S, Evans RW, Garratt RC, Gorinsky B, Hasnain S, Horsburgh C, Jhoti H, Lindley PF, Mydin A, Sarra R, Watson JL. Molecular Structure of Serum Transferrin at 3.3-Å Resolution. *Biochemistry*, 1988, 27, 5804-5812.
7. Baker HM, He QY, Briggs SK, Mason AB, Baker EN. Structural and Functional Consequences of Binding Site Mutations in Transferrin: Crystal Structures of the Asp63Glu and Arg124Ala Mutants of the N-Lobe of Human Transferrin. *Biochemistry*, 2003, 42, 7084-7089.
8. Belovari T, Kibel A, Kostović-Knežević Lj. Transferin u zdravlju i bolesti. *Medicinski vjesnik*, 2006, 38, 21-24.
9. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. Biokemija. Zagreb, Školska knjiga, 2013, str. 1002-1003.
10. Bunescu A, Besse-Hoggan P, Sancelme M, Mailhot G, Delort A. Fate of the Nitrotriacetic Acid-Fe(III) Complex during Photodegradation and Biodegradation by *Rhodococcus rhodochrous*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74, 6320-6326.
11. Chahine JM, Hémadi M, Thanh HD. Uptake and release of metal ions by transferrin and interaction with receptor 1. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2011, 1820, 334-347.
12. Cheng Y, Zak O, Aisen P, Harrison SC, Walz T. Structure of the Human Transferrin Receptor-Transferrin Complex. *Cell*, 2004, 116, 565-576.
13. Ching-Ming C. Structure and Function of Transferrin. U: *Biochemistry and Molecular Biology Education*. Oritz P, urednik, Taiwan, UBMB Journal, 1984, str. 146-154.
14. de los Monteros AE, Kumar S, Zhao P, Huang CJ, Nazarian R, Pan T, Scully S, Chang R, de Vellis J. Transferrin Is an Essential Factor for Myelination. *Neurochem Res*, 1999, 24, 235-248.
15. Deriš H. Utjecaj promjene glikozilacije humanog serumskog transferina na otpuštanje željeza u prisutnosti kompetitivnog kelatora EDTA, Diplomski rad, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zagreb, 2017.
16. Dev S, Babitt JL. Overview of Iron Metabolism in Health and Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, 17, 130.
17. Electronic Spectroscopy: Interpretation, 2020., <https://chem.libretexts.org>, pristupljeno 24. 08. 2020.
18. Ghanbari Z, Housaindokht MR, Bozorgmehr MR, Izadyar M. The effect of glycosylation on the transferrin structure: A molecular dynamic simulation analysis. *Journal of Theoretical Biology*, 2017, 404, 73-81

19. Ghisaidoobe ABT, Chung SJ. Intrinsic Tryptophan Fluorescence in the Detection and Analysis of Proteins: A Focus on Förster Resonance Energy Transfer Techniques. *International Journal of Molecular Sciences*, 2014, 15, 22518-22538.
20. Glycobiology, 2020., <https://www.bio-techn.com>, pristupljeno 22. 09. 2020.
21. Gkouvatsos K, Papanikolaou G, Pantopoulos K. Regulation of iron transport and the role of transferrin. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2012, 1820, 188-202.
22. Gomme PT, McCann KB. Transferrin: structure, function and potential therapeutic actions. *Drug discovery today*, 2005, 10, 267-273.
23. Harris WR. Iron Chemistry. U: Molecular and Cellular Iron Transport. Douglas T, urednik, Florida, CRC Press, 2002, str. 1-35.
24. Hegenauer 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, 3865-3879.
25. Helander A, Beck O. Chapter 17 Analytical markers of acute and chronic alcohol consumption: Carbohydrate-deficient transferrin (CDT). U: Handbook of Analytical Separations. Bogusz MJ, urednik, Amsterdam, Elsevier, 1981, str. 567-588.
26. Hirose M. The Structural Mechanism for Iron Uptake and Release by Transferrins. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2000, 64, 1328-1336.
27. Huebers H, Josephson B, Huebers E, Csiba E, Finch C. Uptake and release of iron from human transferrin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1981, 78, 2572-2576.
28. Iron Transport and Cellular Uptake, 2001., <https://sickle.bwh.harvard.edu>, 22. 08. 2020.
29. James NG, Byrne SL, Steere AN, Smith VC, MacGillivray RTA, Mason AB. Inequivalent Contribution of the Five Tryptophan Residues in the C-lobe of Human Serum Transferrin to the Fluorescence Increase when Iron is Released. *Biochemistry*, 2009, 48, 2858-2867.
30. James NG, Mason AB. Protocol to determine accurate absorption coefficients for iron-containing transferrins. *Analytical Biochemistry*, 2008, 378, 202-207
31. Kennady V, Meenakshi V, Manimegalai J, Upendra L, Ranjeet V, Vikas C. Transferrin polymorphism and its clinical applications. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 2019, 7, 442-444.
32. Kuhanec A. Proteini za prijenos i pohranu željeza, Završni rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb, 2013.
33. Lakowicz JR. Principles of Fluorescence Spectroscopy, 3rd edition. New York, Springer, 2006.
34. Leida T. Utjecaj sistemske upale na homeostazu željeza u egzacerbaciji i stabilnoj fazi kronične opstruktivske plućne bolesti, Disertacija, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zagreb, 2016.
35. Luck AN, Mason AB. Transferrin-Mediated Cellular Iron Delivery. *Current Topics in Membranes*, 2012, 69, 3-35.
36. MacGillivray RTA, Mason AB. Transferrins. U: Molecular and Cellular Iron Transport. Douglas T, urednik, Florida, CRC Press, 2002, str. 41-69.
37. Marquardt T, Denecke J. Congenital disorders of glycosylation: Review of their molecular bases, clinical presentations and specific therapies. *European journal of pediatrics*, 2003, 162, 359-79.

38. Martel P, Kim SM, Powell BM. Physical characteristics of human transferrin from small angle neutron scattering. *Biophysical Journal*, 1980, 31, 371-380.
39. Mayle KM, Le AM, Kamei DT. The Intracellular Trafficking Pathway of Transferrin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 2012, 1820, 264-281.
40. Möller M, Denicola A. Study of protein-ligand binding by fluorescence. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 2002, 30, 309-312.
41. Motekaitis RJ, Martell AE. The iron (iii) and iron (ii) complexes of nitrilotriacetic acid, *Journal of Coordination Chemistry*, 1994, 31, 67-78.
42. Moura IC, Hermine O, Lacombe C, Mayeux P. Erythropoiesis and transferrin receptors. *Current Opinion in Hematology*, 2015, 22, 193–198.
43. Ponka P, Lok CN. The transferrin receptor: role in health and disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 1999, 31, 1111-1137.
44. Roje B. Usporedba fluorescentnih probi u ORAC metodi, Diplomski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Split, 2015.
45. Stefanini S, Chiancone E, Antonini E. Iron binding to apoferritin: A fluorescence spectroscopy study. *FEBS Letters*, 1976, 69, 90–94.
46. The Beer-Lambert Law, 2020., <https://chem.libretexts.org>, pristupljeno 23. 08. 2020.
47. Transferrin and transferrin receptor, 2017., <http://www.turkupertcentre.net>, pristupljeno 23. 08. 2020.
48. Variables that Influence Fluorescence Measurements, 2020., <https://chem.libretexts.org>, pristupljeno 22. 09. 2020.
49. Veena A. Comparison of serum iron, TIBC, transferrin saturation and serum ferritin in iron deficiency anemia and anemia of chronic renal diseases, Disertacija, Univesity of Health Sciences, Bangalore, 2012.
50. Ward LD. Measurement of ligand binding to proteins by fluorescence spectroscopy. U: *Methods in Enzymology*. Hirs CHW, Timasheff SN , urednici, Amsterdam, Elsevier,1985, str. 400–414.
51. Yiannikourides A, Latunde-Dada GO. A Short Review of Iron Metabolism and Pathophysiology of Iron Disorders. *Medicines*, 2019, 6, 85.



## 6. SAŽETAK/SUMMARY

U sklopu ovog diplomskog rada proučavan je utjecaj promjene glikozilacije transferina, sinergističkog aniona te pH pufera na konstantu vezanja željeza. Ispitivanja su se provodila u MES puferu pri pH 5,6 i temperaturi 25°C uz dodatak karbonata ili oksalata kao sinergijskih aniona. Korištene su tehnike UV-Vis spektrofotometrije i fluorescencije. Za izračun konstanti  $K_1$  i  $K_2$ , koje opisuju nastanak monoferičnog i diferičnog transferina, korišten je program *ReactLab*<sup>TM</sup> *EQUILIBRIA*. Dobivene konstante i titracijske krivulje ukazuju na to da se prvo željezo veže s najvećim afinitetom na sijalizirani transferin u prisutnosti karbonata. Također, željezo se veže većim afinitetom na sijalizirani transferin s karbonatom kao sinergističkim anionom u odnosu na sijalizirani transferin s oksalatom. U prisutnosti oksalata kao sinergističkog aniona željezo se jače veže na desijalizirani transferin. Usporedbom konstanti ravnoteže pri pH 5,6 i pH 7,4 zaključujemo da se željezo jače veže na transferin pri fiziološkom pH. Promjenom glikozilacije, sinergističkog iona te pH, mijena se afinitet vezanja željeza na transferin, a time i koncentracija slobodnog i potencijalno toksičnog željeza u krvi.

As part of this thesis, the influence of changes in the glycosylation of transferrin, synergistic anion and pH buffer on the iron binding constant was studied. All experiments were performed in MES buffer at pH 5.6 and 25 ° C with the addition of carbonate or oxalate as synergistic anions. UV-Vis spectrophotometry and fluorescence techniques were used. The *ReactLab*<sup>TM</sup> *EQUILIBRIA* program was used to calculate the equilibrium constants  $K_1$  and  $K_2$ , which describe the formation of monoferric and diferric transferrin. The obtained constants and titration curves indicate that the first iron binds with the highest affinity to sialylated transferrin with carbonate. Additionally, iron binds with higher affinity to sialylated transferrin with carbonate as a synergistic anion compared to sialylated transferrin with oxalate. In the presence of oxalate as a synergistic anion, iron binds more strongly to desialylated transferrin. By comparing the equilibrium constants at pH 5.6 and pH 7.4, we conclude that iron binds more strongly to transferrin at physiological pH. By changing glycosylation, synergistic ion and pH, the binding affinity of iron to transferrin changes, and thus changes the concentration of free and potentially toxic iron in the blood.

## Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

### UTJECAJ GLIKOZILACIJE, SINERGISTIČKOG ANIONA I pH NA VEZANJE ŽELJEZA NA HUMANI SERUMSKI TRANSFERIN

**Ria Saraga**

#### SAŽETAK

U sklopu ovog diplomskog rada proučavan je utjecaj promjene glikozilacije transferina, sinergističkog aniona te pH pufera na konstantu vezanja željeza. Ispitivanja su se provodila u MES puferu pri pH 5,6 i temperaturi 25°C uz dodatak karbonata ili oksalata kao sinergijskih aniona. Korištene su tehnike UV-Vis spektrofotometrije i fluorescencije. Za izračun konstanti K1 i K2, koje opisuju nastanak monoferičnog i diferičnog transferina, korišten je program ReactLab™ EQUILIBRIA. Dobivene konstante i titracijske krivulje ukazuju na to da se prvo željezo veže s najvećim afinitetom na sijalizirani transferin u prisutnosti karbonata. Također, željezo se veže većim afinitetom na sijalizirani transferin s karbonatom kao sinergističkim anionom u odnosu na sijalizirani transferin s oksalatom. U prisutnosti oksalata kao sinergističkog aniona željezo se jače veže na desijalizirani transferin. Usporedbom konstanti ravnoteže pri pH 5,6 i pH 7,4 zaključujemo da se željezo jače veže na transferin pri fiziološkom pH. Promjenom glikozilacije, sinergističkog iona te pH, mijena se afinitet vezanja željeza na transferin, a time i koncentracija slobodnog i potencijalno toksičnog željeza u krvi.

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

Rad sadrži: 53 stranice, 17 grafičkih prikaza, 9 tablica i 51 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Transferin, željezo, fluorescencija, UV-Vis spektrofotometrija, konstanta vezanja

Mentor: **Dr. sc. Tin Weitner**, viši asistent-znanstveni novak Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Tin Weitner**, viši asistent-znanstveni novak Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Izv. prof. dr. sc. Mario Gabričević**, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Dr. sc. Davor Šakić**, viši asistent-znanstveni novak Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: rujan 2020.

## Basic documentation card

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

Diploma thesis

### INFLUENCE OF GLYCOSYLATION, SYNERGISTIC ANION AND pH ON IRON BINDING TO HUMAN SERUM TRANSFERRIN

**Ria Saraga**

#### SUMMARY

As part of this thesis, it was investigated how does the change in glycosylation pattern, synergistic anion and pH of a buffer effect iron binding constant. All experiments were carried out by UV-Vis and fluorescence spectroscopy in MES buffer, with carbonate or oxalate, at pH 7.4 and 25° C. The ReactLab™ EQUILIBRIA program was used to calculate the constants  $K_1$  and  $K_2$ , which describe the formation of monoferric and diferric transferrin. The obtained constants and titration curves indicate that the first iron binds with the highest affinity to sialylated transferrin with carbonate. Also, iron binds with higher affinity to sialylated transferrin with carbonate as a synergistic anion compared to sialylated transferrin with oxalate, and in the presence of oxalate as a synergistic anion, iron binds more strongly to desialylated transferrin. By comparing the equilibrium constants at pH 5.6 and pH 7.4, we conclude that iron is more strongly bound to transferrin at physiological pH. By changing glycosylation, synergistic ion and pH, the binding affinity of iron to transferrin changes and thus the concentration of free, potentially toxic, iron in the blood.

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

Thesis includes: 53 pages, 17 figures, 9 tables i 51 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Transferrin, iron, fluorescence, UV-Vis spectroscopy, binding constant

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

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

**Mario Gabričević, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

**Davor Šakić, Ph.D.** Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: september 2020.



