

Ispitivanje razlike u hidrofobnosti nativnog i desijaliziranog transferina reakcijom sa 8-anilinonaftalensulfonskom kiselinom

Atelj, Tamara

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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:163:404231>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-05-18**



Repository / Repozitorij:

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



Tamara Atelj

**Ispitivanje razlike u hidrofobnosti nativnog i
desijaliziranog transferina reakcijom sa 8-
anilinonaftalensulfonskom kiselinom**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2022.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Opća kemija sa stehiometrijom i izrađen na Zavodu za opću i anorgansku kemiju na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Tina Weitnera.

Zahvaljujem svom mentoru, izv. prof. dr. sc. Tinu Weitneru, na pruženom znanju, vodstvu te savjetima. Velika hvala asistentici Valentini Borko na pruženoj pomoći u eksperimentalnom dijelu i tijekom pisanja rada. Zahvaljujem svojoj obitelji i bližnjima na podršci tijekom studija.

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1 Transferin	1
1.1.1. Struktura i polimorfizam transferina	3
1.1.2. Uloga i vezanje željeza.....	6
1.1.3. Receptori transferina (TfR) i transferinski ciklus	9
1.1.4. Kliničke primjene transferina.....	12
1.2 Fluorescentne boje.....	13
1.2.1. 8-anilinonaftalensulfonska kiselina	15
2. OBRAZLOŽENJE TEME	17
3. MATERIJALI I METODE	18
3.1. Materijali	18
3.1.1. Korištene tvari	18
3.1.2. Korišteni pribor i instrumenti.....	18
3.1.3. Priprema otopina	19
3.1.3.1. Priprema otopina za podešavanje pH i otopina pufera.....	19
3.1.3.2. Priprema matične otopine 8-anilinonaftalensulfonske kiseline za određivanje hidrofobnosti površine proteina	20
3.1.3.3. Priprema matične otopine 8-anilinonaftalensulfonske kiseline za određivanje stehiometrije vezanja na nativni apo-transferin	20
3.1.3.4. Priprema matične otopine apo-transferina za određivanje hidrofobnosti površine proteina	20
3.1.3.5. Priprema matične otopine apo-transferina za određivanje stehiometrije vezanja ANS na nativni apo-transferin.....	20
3.1.3.6. Priprema matične otopine asijalo-apo-transferina.....	21
3.1.3.7. Priprema uzoraka apo- i desijaliziranog transferina s vezanom ANS za određivanje hidrofobnosti površine proteina.....	21

3.1.3.8. Priprema uzoraka za određivanje stehiometrije vezanja ANS na nativni apo-transferin.....	22
3.2. Metode.....	23
3.2.1. Spektrofotometrija u UV-Vis području.....	23
3.2.2. Fluorescencijska spektrofotometrija	27
3.2.3. Određivanje razlike u hidrofobnosti Tf+s i Tf-s	28
3.2.4. Određivanje stehiometrije vezanja ANS na Tf+s prema Jobovoj metodi.....	29
4. REZULTATI I RASPRAVA	30
4.1. Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije matičnih otopina transferina i ANS	30
4.2. Određivanje razlike u hidrofobnosti Tf+s i Tf-s	33
4.3. Određivanje stehiometrije vezanja ANS na Tf+s prema Jobovoj metodi.....	39
6. LITERATURA.....	45
7. SAŽETAK.....	51
8. SUMMARY	52
Temeljna dokumentacijska kartica.....	53

1. UVOD

1.1 Transferin

Ljudski serumski transferin je najznačajniji transportni protein željeza u ljudskom organizmu. Pripada obitelji nehemskih glikoproteina približne molarne mase oko 79 kDa. (Silva i sur. 2021) Serumski transferin dostavlja željezo stanicama u pH-ovisnom procesu potpomognutom transferinskim receptorima. Osim u serumu, transferin nalazimo i u tjelesnim izlučevinama (slini, suzama, majčinu mlijeku), stanicama živčanog i gastrointestinalnog sustava te u testisima. Glavno mjesto sinteze transferina su hepatociti, ali stvaraju ga i Sertolijeve stanice, oligodendroglija, endotelne stanice kapilara u mozgu, makrofagi, limfociti, fibroblasti te tumorske stanice. Na sintezu transferina u stanicama testisa pozitivno utječe izlučivanje inzulina i folikulstimulirajućeg hormona, u stanicama živčanog sustava potaknuta je hidrokortizonom i serotoninom, a u stanicama raka dojke stvaranje transferina potiče estrogen. (Belovari i sur. 2006) Koncentracija ljudskog serumskog transferina u krvi iznosi 200 – 300 mg/dL i razmjerna je tjelesnoj masi, brzini metabolizma i zalihama željeza. Jetra je odgovorna za povećanje sinteze transferina tijekom deficijencije željeza, a hepatička disfunkcija izravno i negativno utječe na stvaranje proteina. Uz to, transferin je i protein akutne faze čija se koncentracija u cirkulaciji smanjuje tijekom upale.

Molekula transferina ima dva vezna mjesta za željezo i stoga se u plazmi nalazi u tri oblika: kao diferični transferin odnosno holo-transferin (holo-Tf) s dva vezana atoma željeza; monoferični transferin s jednim vezanim atomom željeza i apo-transferin (apo-Tf), na kojem nema vezanog atoma željeza. (Huebers i sur. 1981)

Transferin prenosi željezo u krvi vežući na sebe Fe^{3+} ione i dostavljajući ih stanicama u endocitnom reverzibilnom procesu posredovanom receptorima, pri čemu se kompleks Tf-receptor internalizira, željezo otpušta u endosom, a navedeni kompleks se vraća na površinu stanice te se transferin otpušta s receptora. (Wally, Buchanan, 2007)

Transferin je snažni kelator željeza u krvnoj plazmi, intersticijskoj tekućini, limfi i cerebrospinalnoj tekućini. Njegova glavna uloga je isporuka željeza iz mjesta apsorpcije u tankom crijevu do mjesta pohrane - perifernih tkiva, jetre, cirkulirajućih eritrocita u krvi i eritrocitnih prekursora. Osigurava da željezo ostane topljivo pri fiziološkim vodenim

uvjetima, regulira njegov unos u stanice i sprječava ga u sudjelovanju u redoks reakcijama koje bi generirale toksične slobodne radikale. Čini glavnu liniju obrane urođenog imunskog odgovora sekvstrirajući ione željeza od patogenih bakterija, međutim, neki patogeni razvili su sposobnost izražavanja specifičnih receptora pomoću kojih unose kompleks Tf-Fe. Željezo vezano na transferin jedan je od glavnih signala za regulaciju ekspresije hepcidina, hormona koji kontrolira apsorpciju i oslobađanje željeza u cirkulaciju. (Silva i sur. 2021)

Molekularni mehanizmi uključeni u regulaciju ekspresije transferina nisu još sasvim poznati, ali ključan događaj je transkripcija gena. Ekspresija transferina konstitutivno je visoka u hepatocitima, ali regulirana je zamršenom mrežom faktora u drugim tipovima stanica. Kao i kod ekspresije, katabolizam transferina korelira s tjelesnom masom i odvija se manjim dijelom u jetri, a većim u žuči. Promjene razine transferina u krvnoj plazmi pripisuju se smanjenoj ekspresiji proteina, a ne njegovoj razgradnji. Poluvijek proteina u cirkulaciji je oko osam dana, a željeza koje se reciklira samo dva sata, što znači da, iako transferin veže samo manji dio ukupnog željeza u organizmu (oko 3 mg), je odgovoran za recikliranje i distribuciju cjelokupnog željeza potrebnog za hematopoezu (oko 25 mg dnevno). (Silva i sur. 2021)

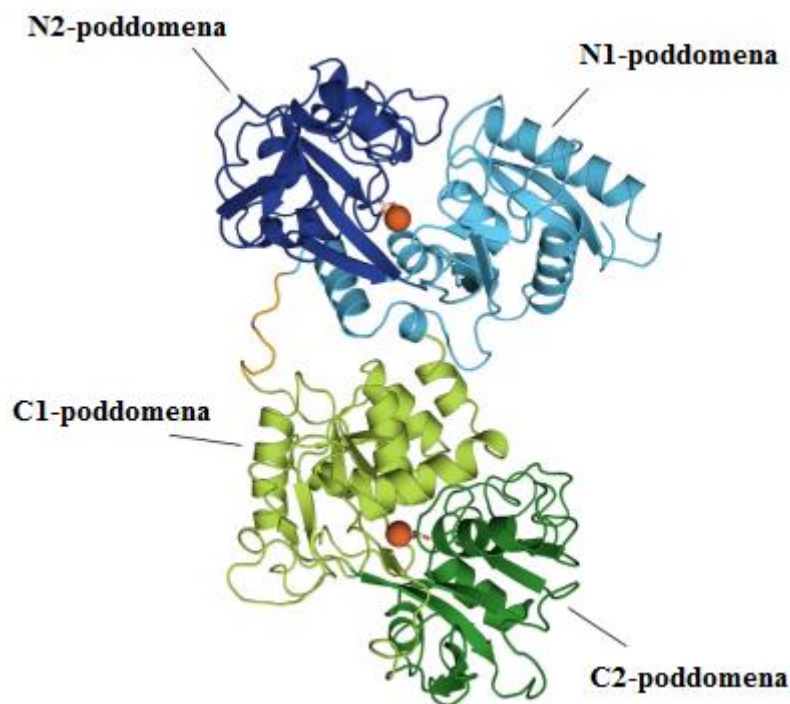
Razlikujemo tri pripadnika porodice ljudskih transferina: serumski transferin, laktoferin i melanotransferin. Laktoferin nalazimo u majčinu mlijeku i drugim izlučevinama, kao što su suze, slina, žuč i tekućine u dišnom sustavu. Ključan je protein urođenog imunskog odgovora zbog toga što veže željezo u širokom rasponu pH vrijednosti, onemogućavajući njegov unos u patogene bakterije. Ipak, neki patogeni, kao što je *Neisseria meningitidis*, razvili su sposobnost izravnog unosa željeza izražavanjem specifičnih laktoferinskih receptora na svojoj površini. (Silva i sur. 2021)

Melanotransferin je prvotno identificiran u ljudskim stanicama raka kože, ali je kasnije pronađen i u drugim tipovima stanica, prije svega u žlijezdama slinovnicama, koži i bubrezima. Primarno je integralni membranski protein, ali može biti izlučen u serum te, za razliku od drugih pripadnika porodice transferina, na sebe veže samo jedan Fe^{3+} ion. Nije vjerojatno da je značajan za pravilan metabolizam željeza u organizmu, ali sudjeluje u tumorigenezi i tumorskom metabolizmu željeza. (Silva i sur. 2021)

Ovotransferin ili konalbumin je jedini topljivi glikoprotein iz porodice transferina prisutan u pticama. Nalazimo ga u plazmi i bjelanjku ptica, u kojem čini oko 13% ukupnih proteina, a osim prijenosa željeza, djeluje antimikrobno i protuupalno. (Giansanti i sur. 2015)

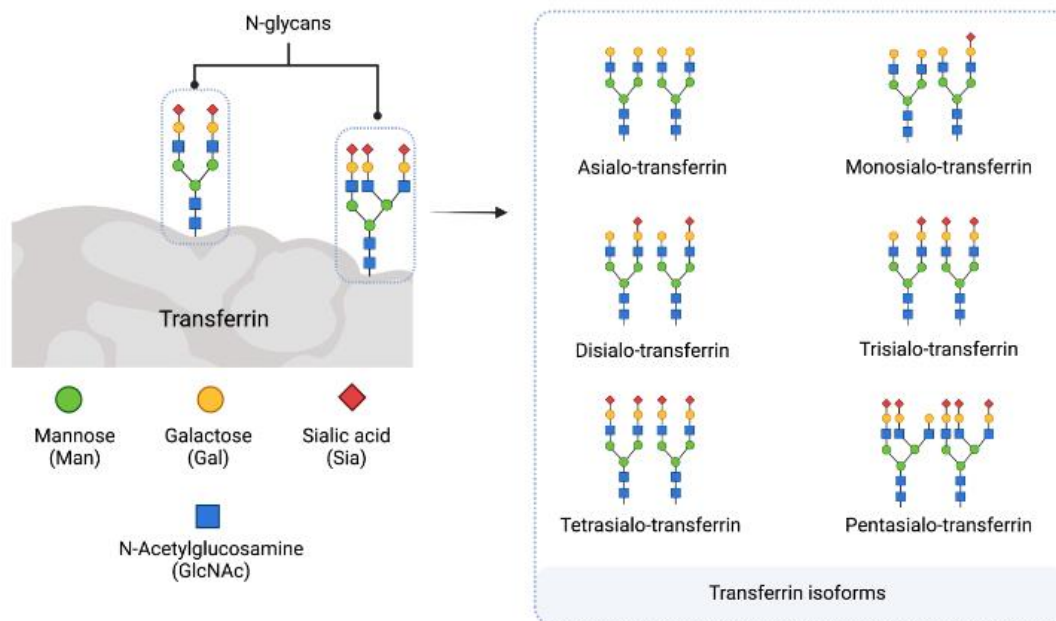
1.1.1. Struktura i polimorfizam transferina

Većina članova transferinske porodice su monomerni glikoproteini koji se smataju u dvije domene, svaka sa sposobnošću vezanja jednog Fe^{3+} iona. Domene ljudskog transferina su homologne te su nastale iz intragenskog rekombinacijskog događaja. Protein je β -globulin i translatican je kao pro-protein, s 19 aminokiselina pro-peptida koje se cijepaju kako bi nastao protein od 679 aminokiselina. Njegova primarna struktura je visoko konzervirana, posebno u aminokiselinskim ostacima veznog mjesta. Transferin je globularni protein s dvije domene, amino terminalnom domenom koju čine aminokiselinski ostatci slijeda 1-331 i karboksilatno terminalnom domenom koja uključuje ostatke slijeda 339-679. Svaka domena dijeli se na dvije podjedinice: N1 (1-92, 247-331), N2 (93-246), C1 (339-425 i 573-479) te C2 (426-572). Podjedinice su povezane zglobovom koji čini duboki rascjep u kojem se nalazi specifično vezno mjesto željeza (Slika 1.). Homologne domene povezane su veznim peptidom od 7 aminokiselina koji tvori vrlo hidrofoban dio proteina. Uz to, interakcija između dvije domene uključuje dva solna mosta između Asp240 i Arg308 u N-režnju i Asp376 u C-režnju. Analogno drugim proteinima plazme, struktura transferina bogata je disulfidnim mostovima, koji stabiliziraju strukturu veznih mjesta. Ljudski transferin ima 19 disulfidnih mostova, 8 u N-terminalnom režnju i 11 u C-terminalnom režnju. (Silva i sur. 2021)



Slika 1. Struktura ljudskog holo-transferina s dva vezana Fe^{3+} iona (prikazana narančastom bojom). N-terminalni režanj prikazan je plavom bojom, dok je C-terminalni režanj označen zelenom bojom. N1 i C1 podjedinice predstavljene su svijetlim nijansama, dok su N2 i C2 poddomene označene tamnim nijansama. (Preuzeto iz Silva i sur. 2021)

Ugljikohidratne skupine transferina čine 6% njegove mase. Različiti stupnjevi sijalinizacije i galaktozilacije ljudskog transferina pronađeni su u amnionskoj tekućini, sinovijalnoj tekućini i cerebrospinalnom likvoru. (De Jong i sur. 1990) Ugljikohidratni dio čine dva identična, razgranata N-vezana oligosaharidna lanca vezana na amidne skupine asparaginskih ostataka (Asn 630 i Asn 432) C-domene. Manji dio pripadnika skupine transferina ima tri razgranata oligosaharidna lanca. Sijalinske kiseline se nalaze na kraju lanaca i podložne su cijepanju enzimom neuraminidazom. (Chung, 1984)



Slika 2. Transferin sadrži dva N-glikana i ima različite glikoforme ovisno o broju vezanih sijalinskih kiselina na krajevima glikana. Tetrasijalo-transferin je najčešća izoforma u serumu zdravih pojedinaca. (preuzeto s <https://www.cdghub.com/about/>, pristupljeno 6.7.2022.)

Razlikujemo više glikoformi transferina ovisno o karakterističnim N-vezanim ugljikohidratnim skupinama. Glikanski lanci razlikuju se po razgranatosti i terminalnim ugljikohidratnim ostacima, mogu biti djelomično desijalinizirani ili uopće nemati galaktozu ili N-acetilglukozaminske ostatke. (De Jong i sur. 1990) Glikanski lanac najčešće se sastoji od dvije galaktoze, tri manoze i četiri N-acetilglukozamina. (Slika 2.) Najčešća glikoforma je tetrasijalotransferin koji sadrži četiri glikanska lanca sa sijalinskim kiselinama, a čini oko 75% ukupnog transferina u serumu čovjeka. Druge česte 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). Ljudski transferin odlikuje se visokom razinom mikroheterogenosti koja je rezultat genetskog polimorfizma. Opisano je više od dvadeset funkcionalnih varijanti proteina. One su uvjetovane višestrukim alelima na jedinstvenom transferinskom lokusu. Polimorfizmi transferina imenovani su na temelju svojih obrazaca putovanja u elektroforezi na agaroznom gelu ili izoelektričnom fokusiranju nakon saturacije željezom i tretmana neuraminidazom. Iako većina varijanti proizlazi iz promjene samo jedne aminokiseline, izoforme transferina imaju drukčije vrijednosti pI. Najčešća izoforma naziva se TfC. Izoforma

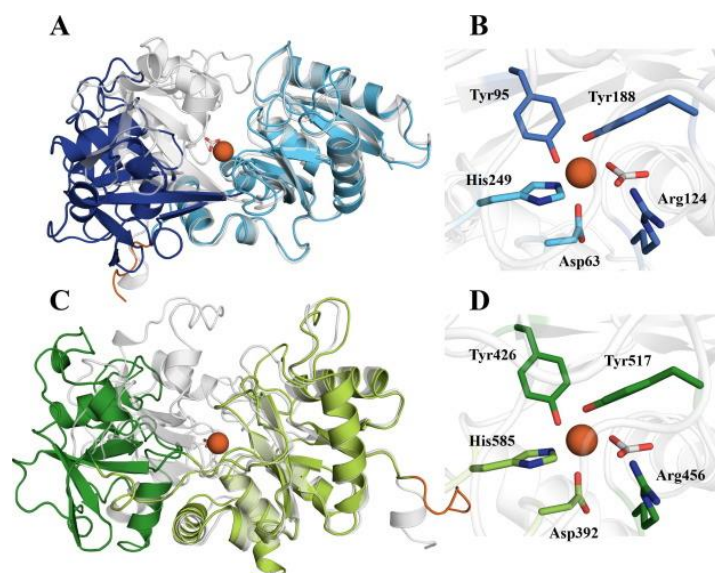
koja putuje brže pri bazičnim uvjetima naziva se TfB, a sporije TfD. Svaka od ovih frakcija transferina ima nekoliko podtipova. TfC1 je dominantan podtip, s učestalošću od 75% kod ljudske populacije. Drugi važni aleli su TfC2 (do 30% populacije) i TfC3 (do 7% populacije). Drugi podtipovi pokazuju snažnu etničku i geografsku distribuciju. Postoje naznake da se različite izoforme mogu razlikovati u kapacitetu vezanja željeza. (Silva i sur. 2021)

1.1.2. Uloga i vezanje željeza

Željezo je važan kemijski element za mnoge fiziološke i metaboličke putove. Ima jedinstvenu sposobnost kemijskog djelovanja kao elektron donor i akceptor te sudjeluje u prijenosu kisika, staničnoj proizvodnji energije i proliferaciji. Unatoč svojoj korisnosti pri normalnim koncentracijama u organizmu, njegov višak može prouzrokovati toksičnost kataliziranjem stvaranja slobodnih radikala zbog čega su proteini uključeni u regulaciju i prijenos željeza u cirkulaciji ključni za održavanje homeostaze. Tijelo odrasle osobe sadrži 3-5 g željeza (oko 55 mg i 44 mg po kilogramu tjelesne mase za muškarce i žene), a više od dvije trećine ukupne količine inkorporirano je u hemoglobinu razvijajućih eritroidnih prekursora i zrelih crvenih krvnih stanica. Ostatak zaliha željeza u tijelu smješten je u retikuloendotelnim makrofagima i hepatocitima u obliku skladišnog proteina feritina. Manju količinu željeza nalazimo i u mioglobinu u mišićima, a ono je i sastavni dio nekih enzima. (Gkouvatsos i sur. 2012)

Željezo je prijelazni kemijski element periodnog sustava koji ima mogućnost pojavljivanja u više oksidacijskih stanja. Pri biološkim uvjetima, najčešći oblici su divalentno i trovalentno željezo. Divalentno željezo prevladava u unutarstaničnom okolišu, dok trovalentno željezo nalazimo u cirkulaciji i izvanstaničnim odjeljcima. Trovalentno željezo je jedini oblik željeza poželjan u oksigeniranim tekućinama pri neutralnom pH, a sami fiziološki uvjeti otežavaju raspoloživost željeza stanicama. Kako bi se željezo dostavilo ciljnim stanicama, potrebno je savladati prepreke koje čine iznimno niska topljivost Fe^{3+} iona pri neutralnom pH i činjenica da su lipidne membrane stanica zapravo nepropusne za trovalentno željezo. (Jong i sur. 1990) U sisavaca je sve željezo koje ulazi u krvni optok iz enterocita ili makrofaga u Fe^{3+} obliku, kao ferroportin, jedini poznati izvoznik staničnog željeza, i zahtijeva udruženu feroksidaznu aktivnost enzima hefestina ili ceruloplazmina za svoje djelovanje. Nadalje, prisutnost ceruloplazmina u krvnoj plazmi osigurava da plazmatsko željezo ostane u svom oksidacijskom stanju.

Trovalentno željezo ima svojstvo stvaranja kompleksa koordinacijskog broja 6 sa kisikovim ligandima. Transferin veže trovalentno željezo koordinacijom s jednim karboksilatnim atomom kisika, dvama fenolatnim atomima kisika i jednim imidazolnim dušikovim ligandom. Kod ljudskog transferina, vezno mjesto N-režnja sastoji se od Asp63, Tyr95, Tyr188 i His249, a vezno mjesto C-režnja od Asp422, Tyr426, Tyr517 i His585 (Slika 3). Naboj Fe^{3+} iona neutraliziran je negativnim nabojem asparaginske kiseline odnosno aspartata i dvaju tirozinskih ostataka. Vezanjem za sinergistički bidentatni karbonatni anion na objema veznim mjestima za željezo osigurava koordinacijsku sferu potrebnu za učinkovito vezanje Fe^{3+} iona. Navedeni set liganada omogućuje iskrivljenu oktaedralnu geometriju Fe^{3+} iona i d5 visokospinsku elektronsku konfiguraciju. Karbonatni anion smješten je na N domeni proteina i stabiliziran je mrežom vodikovih veza s argininom (Arg124 u N režnju i Arg456 u C režnju), treoninom (Thr120 u N režnju i Thr452 u C režnju) i peptidnom okosnicom učvršćenom amidnim vezama proksimalnih aminokiselinskih ostataka. (Silva i sur. 2021) Bez sinergističnog aniona pozitivno nabijeni argininski ostatci i N-terminus zavojnice mogu inhibirati vezanje željeza na njegovo specifično vezno mjesto. Karbonat ima ulogu i u otpuštanju željeza. Protonacija aniona može poremetiti uzorak vodikovih veza i omogućiti razdvajanje veznog mjesta koje je potrebno zbog osiguranja reverzibilnosti procesa vezanja metala. Zajedničke osobine sinergističnog aniona su prisutnost karboksilatnog donora i, u udaljenosti od jednog ili dva ugljikova atoma, prisutnost druge proksimalne elektron-donorske skupine koja može biti potencijalni ligand za vezanje metalnog iona. Karbonat služi kao sinergistički anion *in vivo* i ima veći afinitet vezanja od ostalih aniona, međutim oksalat je također učinkovit u promicanju vezanja metala. (Sun i sur. 1999)



Slika 3. Prikaz reznjaste strukture ljudskog transferina u zatvorenoj konformaciji s vezanim atomom željeza (holo-transferin) i u otvorenoj konformaciji sa slobodnim željezom (apo-transferin). A) N-domena transferina; B) vezno mjesto na N-domeni; C) C-domena transferina; D) vezno mjesto na C-domeni. Zatvorena konformacija transferina s vezanim željeznim atomom prikazana je bijelom bojom, dok je slobodna N-domena označena plavom, a otvorena struktura C-domene zelenom bojom. Strukture apo- i holo-transferina prikazane su ispod N1-poddomene (A, svjetloplava) i C1-poddomene (C, svjetlozelena). Relativan smještaj N1 i C1 poddomena zadržava se tijekom vezanja željeza, dok se N2 i C2 poddomene zakreću u zatvorenu konformaciju. (Preuzeto iz Silva i sur. 2021)

Apsorpcija željeza iz hrane odvija se u tankom crijevu, točnije u duodenumu i gornjem dijelu jejunuma uz pomoć enterocita. Željezo iz prehrane nalazi se u hemsom i ne-hemskom obliku, a apsorbira se u Fe^{2+} obliku na apikalnoj površini duodenalnih enterocita. Jednom kada uđe u crijevnu epitelnu stanicu, željezo se može ondje zadržati bez da se ikada apsorbira, a može i biti preneseno preko bazolateralne membrane epitelnih stanica u cirkulaciju uz pomoć feroportina, a potom se oksidira do Fe^{3+} iona djelovanjem hefestina prije nego se veže na transferin. (Szóke i Panteghini, 2012)

Kiselost želuca podupire keliranje metala u topljive spojeve kao što su amini, ugljikohidrati i aminokiseline. Regulaciju apsorpcije željeza u ljudskom organizmu obavlja hepcidin, jetreni peptidni hormon koji se luči u odgovoru na dostupnost željeza, anemiju, upalne signale i hipoksiju. Hepcidin se veže za feroportin i potiče njegovu fosforilaciju, internalizaciju i lizosomalnu razgradnju. Kako je feroportin jedinstveni stanični eksporter kod sisavaca,

njegova ekspresija u enterocitima i makrofagima određuje stupanj crijevne apsorpcije željeza i njegovog retikuloendotelnog oslobađanja. Prema tome, fiziološka uloga hepcidina je negativna regulacija apsorpcije i otpuštanja željeza. (Gkouvatsos i sur. 2012)

Osim apsorpcijom iz hrane, željezo postaje dostupno organizmu u procesu razgradnje proteina i enzima koje ga sadrže, posebno hemoglobina, a odvija se u najvećoj mjeru u slezeni i koštanoj srži, ali i u drugim stanicama fagocitnog sustava kao što su Kupferove stanice u jetri. Nadalje, željezo se može dobiti izravno iz zaliha organizma, prvenstveno u obliku feritina i hemosiderina pohranjenih u koštanoj srži, slezeni i jetri. (Jong i sur. 1990)

Poremećaji homeostaze željeza uključuju deficijencije i preopterećenje željezom. Nedostatak željeza može biti posljedica nedovoljne apsorpcije iz prehrane, nedostatka hranjivih tvari, korištenja lijekova kao što su H₂ antagonisti ili inhibitori protonske pumpe, infekcije bakterijama, povećanih potreba za željezom tijekom trudnoće ili povećanog gubitka krvi. Najčešća klinička manifestacija deficijencije željeza je anemija. Osim nedostatkom željeza, anemija može biti uzrokovana i smanjenom razinom željeza u cirkulaciji koja ograničava eritropoezu unatoč odgovarajućim zalihama ukupnog željeza u organizmu, a karakteristična je posljedica kroničnih bolesti kao što su bubrežna insuficijencija, bolesti gastrointestinalnog sustava ili malignih bolesti. (Dev i Babitt, 2017)

1.1.3. Receptori transferina (TfR) i transferinski ciklus

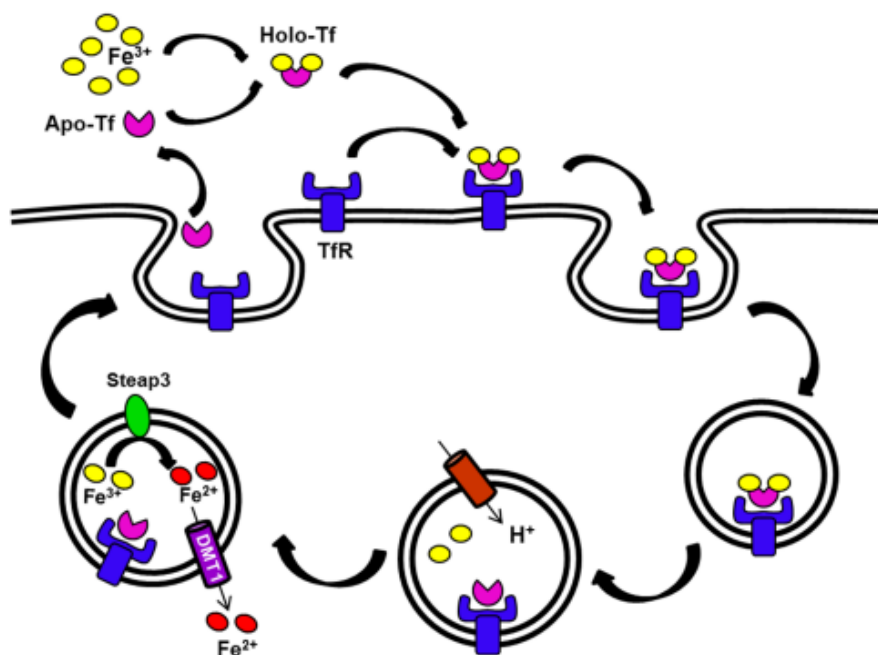
Transferinski receptori TfR1 i TfR2 su membranski glikoproteini čija je glavna uloga regulacija staničnog unosa željeza iz krvi.

Sve stanice u ljudskom tijelu na svojoj površini izražavaju TfR1, dok se razina ekspresije razlikuje ovisno o vrsti stanica. TfR1 je integralni protein molarne mase od 97 kDa izražen kao homodimer povezan disulfidnim vezama na staničnoj membrani i može vezati po jednu molekulu transferina na svakoj podjedinici. Visoku razinu ekspresije TfR1 pokazuju eritroblasti, hepatociti i ostale brzodijeleće stanice (npr. tumorske stanice i osteoklasti). Izražaj TfR1 na površini stanica povećan je pri niskoj koncentraciji unutarstaničnog željeza. TfR2 ima niži afinitet za holotransferin, a u organizmu ga nalazimo u dvije različite izoforme - TfR2- α i TfR2- β , koje se razlikuju u molarnoj masi i lokalizaciji. Dok je TfR2- α gotovo

isključivo eksprimiran u hepatocitima i prekursorima eritroidnih stanica, TfR2- β nalazimo u mnogim tkivima i stanicama, uključujući slezenu, jetru, srce, mozak, mijeloidne stanice i tumorske stanice. Za razliku od TfR1, ekspresija TfR2 nije ovisna o unutarstaničnoj koncentraciji željeza, već je uvjetovana brzinom staničnog rasta.

Tijekom svoga vijeka trajanja, transferin može sudjelovati u oko stotinu ciklusa stanične dostave željeznih iona. Transferinski ciklus unosa željeza u stanice (Slika 4.) dobro je poznat proces čiji mehanizam uključuje vezanje kompleksa transferina i željeza na transferinski receptor 1 (TfR1) na površini stanice, što dovodi do stvaranja dimernog TfR1 adukta s dvjema molekulama transferina. Sljedeći korak sastoji se od endosomalnog unosa Tf/TfR kompleksa stvaranjem jažica obloženih klatrinom koje se internaliziraju u citoplazmu stanice. Posljedično, endosomalna pH vrijednost snižena je do 5.6 djelovanjem ATP-ovisne protonske pumpe koja omogućava oslobađanje klatrinskog omotača i otpuštanje Fe^{3+} iona sa transferina. Navedeni proces je potaknut djelovanjem enzima ferireduktaze (Steap3). Štoviše, redukcija Fe^{3+} iona uvjet je za prijenos željeza u citosol, koji se odvija preko dvovalentnog metalnog prijenosnika 1 (DMT1). Nakon otpuštanja željeza, recikliranje apo-transferina (transferina slobodnog od željeza) se može nastaviti. Tf/TfR kompleks se vraća na plazmatsku membranu gdje neutralna pH vrijednost okoline potpomaže disocijaciju apo-transferina u izvanstaničnu tekućinu, koji potom postaje dostupan za vezanje dodatnog željeza i za sudjelovanje u novim ciklusima staničnog unosa feri iona. (Silva i sur. 2021)

Željezo se posljedično transportira u citoplazmu gdje se inkorporira u hem i mnoge druge citosolne enzime i proteine kao što je feritin, skladišni protein željeza. (Jong i sur. 1990)



Slika 4. Ciklus transferina. Apo-Tf veže trovalentni (feri) oblik željeza pri čemu prelazi u holo-Tf. Holo-Tf se veže na TfR na površini stanice. Kompleks TfR-Tf-Fe se potom internalizira. Željezo se otpušta unutar endocitoznih vezikula uz proces endosomske acidifikacije. Apo-Tf ostaje vezan na receptor u endosomu te se navedeni kompleks reciklira natrag na staničnu površinu. Feri oblik željeza reducira se u endosomu uz Steap3 metaloreduktazu, a potom se otpušta u citosol pomoću DMT1 prijenosnika. (Preuzeto iz Veuthey i Wessling-Resnick, 2014)

Regulacija ekspresije transferinskoga receptora izravno je povezana sa razinom željeza u stanicama. Povećanje koncentracije tog metala u citoplazmi stanica pozitivno utječe na sintezu feritina, proteina koji veže višak željeza i time smanjuje sintezu transferinskih receptora. U regulaciji ekspresije transferinskih receptora sudjeluje citosolni protein ovisan o željezu – *iron-responsive element-binding protein* (IRE-BP) – koji prepoznaje karakteristično zakrenute fragmente mRNA molekule na feritinskoj i na receptorskoj mRNA, a zovu se elementi na koje utječe željezo (*iron-responsive elements* ili IRE). Navedeni elementi se na feritinskoj glasničkoj RNA molekuli nalaze na 5'- kraju, a na receptorskoj mRNA na 3'-kraju molekule. Vezanjem IRE-BP na 3'-kraj povećava se molekularna stabilnost što dovodi do povećane sinteze transferinskog receptora, a vezanjem na 5'-kraj, sprječava se translacija i smanjuje stvaranje feritina. S druge strane, povišenjem koncentracije željeza, IRE-BP se odvajava od receptorske mRNA i veže atom željeza, što dovodi do razgradnje glasničke RNA. Time stanice koje imaju veću potražnju za željezom izražavaju znatno više receptora za

transferin od drugih stanica. Izuzev željeza, postoje i drugi faktori ekspresije transferinskog receptora, kao što su interleukini, dušikov oksid, oksidativni stres pa čak i neki virusi (SV 40). U hepatocitima etanol utječe na povećano stvaranje transferinskog receptora što dovodi do nakupljanja željeza povezanog s alkoholnom bolesti jetre. (Belovari i sur. 2006)

1.1.4. Kliničke primjene transferina

Koncentracija transferina karakteristično se mijenja tijekom života i bolesti, zbog čega je klinički značajna i koristi se kao parametar u procjeni statusa željeza. Povišene razine transferina ukazuju na deficijenciju željeza povezanu sa stanjima kao što su anemija i trudnoća. Terapija oralnim kontraceptivima uzrokuje povećanje plazmatske koncentracije transferina i željeza. U kliničkoj praksi se kao dijagnostički parametar koriste razina transferina u krvi kao i saturacija transferina. Saturacija se određuje pomoću TIBC (*total iron-binding capacity*) – kapaciteta plazmatskog proteina za vezanje željeza. Ugljikohidratom deficijentni transferin (CDT) ili asijalotransferin koji sadrži manje od tri sijalinske kiseline jedan je od najvažnijih markera za dijagnozu kroničnog alkoholizma. (Sanz-Nebot i sur. 2003)

Atransferinemija je rijetko stanje karakterizirano nedostatkom transferina, teškom hipokromnom anemijom i rekurentnim infekcijama uzrokovanim većinom Gram-negativnim bakterijama. Transferin i laktoferin pokazuju antimikrobno djelovanje protiv Gram-negativnih bakterija, ali mehanizam još nije pojašnjen. Pretpostavlja se da transferin, vežući na sebe željezo, onemogućava bakterijskim sideroforima pristup željezu te se stvara nedostatak tog esencijalnog nutrijenta u bakterijama, gljivicama i protozoama. Prateće povećanje koncentracije transferina i laktoferina kao proteina akutne faze u plazmi potiče stvaranje okoline s deficijencijom željeza za uzročnike bolesti.

Konvencionalni kemoterapeutici mogu uspješno uništiti tumor, ali isto tako mogu uzrokovati teške nuspojave za pacijenta, stoga su istraživanja usmjerena ka unaprjeđenju postojećih metoda liječenja. Transferinski receptor glavni je posrednik staničnog unosa željeza i zanimljiva molekula za ciljanu dostavu lijeka (konjugata transferina i citotoksičnih lijekova) s obzirom na to da je visoko eksprimiran upravo u stanicama raka i uspješno se internalizira u citoplazmu. Može biti korišten za dostavu terapijskih molekula u maligne stanice ili se

njegova prirodna funkcija receptora može blokirati što dovodi do apoptoze tumorske stanice. (Daniels i sur. 2011)

Abnormalna razina serumskog transferina povezuje se i s inzulinskom rezistencijom, kardiovaskularnim bolestima, hipoksijom i ishemijom. Povišene razine transferina u krvi predložene su kao rizični faktor za mnoga kronična stanja, što uključuje šećernu bolest tipa 2, karcinom, koronarne srčane bolesti i ukupnu smrtnost. (Szőke i Panteghini, 2012)

1.2 Fluorescentne boje

Fluorescentno označavanje je od iznimne važnosti za biološka istraživanja. Brojne kemijske boje se intenzivno koriste za označavanje bioloških uzoraka. Fluorescencija uključuje apsorpciju ultraljubičastog ili vidljivog zračenja i emisiju zračenja na većoj valnoj duljini. Fluorescencijska spektroskopija koristi se kao visokoosjetljiva metoda za analizu proteina. Intrinzična fluorescencija proteina nastaje zbog aminokiselina Trp i Tyr, a služi za praćenje konformacijskih promjena. Fluorescentne boje su spojevi koji apsorbiraju i snažno emitiraju zračenje u vidljivoj regiji elektromagnetskog spektra.

Neki proteini, kao što je zeleni fluorescentni protein iz luminescirajućih morskih organizama, autokataliziraju stvaranje vlastitog fluorofora, ali mu je primjena ograničena zbog relativne veličine molekule, koju čini polipeptidni lanac od 268 aminokiselina. (Katritzky i Narindoshvili, 2008)

Za analizu proteina u živim stanicama koriste se spojevi manje molekulske mase kao što su aminokiseline, peptidi, kumarini (benzopiranoni) i spojevi koji sadrže naftalenski prsten u svojoj strukturi.

Uvođenjem aminokiselinskih fluorofora koje organizam sam ne može sintetizirati na specifična mjesta u proteinu mutagenom postiže se detekcija liganada, antigena i inhibitora receptora, protutijela i enzima pri vrlo niskim koncentracijama. Inkorporirane fluorescirajuće aminokiseline moraju apsorbirati zračenje valne duljine veće od 320 nm kako bi se izbjegla interferencija s intrinzičnim triptofanom. Nadalje, trebaju biti visokoosjetljive na promjene u mikrookolišu uzrokovane vezanjem malih molekula na navedene proteine. Primjer takvih boja

su aminokiseline koje u svojoj strukturi sadrže fluorofore 7-metoksikumarinil, b-antraniloil, 3-N-(7-nitro-2,1,3-benzooksadiazol-4-il) i dansil (5-dimetilaminonaftalen-1-sulfonil). (Katritzky i Narindoshvili, 2008)

Kumarini (benzopirani) su najdostupnija kategorija fluorescentnih derivata koje karakterizira velika osjetljivost, prošireni raspon spektra, visoki kvantni prinos emisije, fotostabilnost i dobra topljivost u mnogim otapalima. Najčešće korištene aminokiseline u sintezi spojeva s kumarinima su aspartat, glutaminska kiselina i lizin.

Dok se mnoge primjene fluorescencije temelje na upotrebi intrinzičnih fluorofora, razvoj novih ekstrinzičnih fluorofora ključan je za pronalazak novih fluorescentnih boja. Fluorofori osjetljivi na svoj mikrookoliš posebna su kategorija kromofora čije spektroskopsko ponašanje ovisi o fizikalno-kemijskim osobinama okoline. Posebno korisni su solvatokromni fluorofori osjetljivi na polarnost otapala, kao što su 2-propionil-6-dimetilaminonaftalen (PRODAN), 4-dimetilaminoftalimid (4-DMAP) i derivati 4-amino-1,8-naftalimida. Ove molekule općenito pokazuju nizak kvantni prinos u vodenoj otopini, ali postaju fluorescentne u nepolarnim otapalima ili vezanjem na hidrofobna mjesta na proteinima ili membranama. (Katritzky i Narindoshvili, 2008)

Razne ekstrinzične fluorescentne boje omogućuju karakterizaciju proteina. Mogu biti kovalentno vezane za protein, npr. preko ϵ -amino skupine Lys, α -amino skupine N-kraja ili tiolne skupine Cys. Zanimljivije za analize farmaceutskih formulacija su ekstrinzične boje koje se nekovalentno vežu za proteine i produkte njihove degradacije, npr. hidrofobnim ili elektrostatskim interakcijama. (Hawe, Sutter i Jiskoot, 2008)

Hidrofobnost nije jednoliko raspoređena po površini proteina i često ovisi o ionskoj jakosti, pH i drugim osobinama otapala. Hidrofobne probe kao što su 8-anilinonaftalen-1-sulfonska kiselina (ANS), cis-parinarinska kiselina (CPA) i 6-propionil-1,2-dimetilaminonaftalen (PRODAN) se najčešće koriste za provjeru površinske hidrofobnosti proteina. ANS i CPA su anionske, a PRODAN je neutralna proba. Vežu se nekovalentno za hidrofobne šupljine koje se nalaze na površini proteina. Na određivanje površinske hidrofobnosti utječe aromatska priroda i naboj probe. (Deshpande i Sathe, 2018)

1.2.1. 8-anilinonaftalensulfonska kiselina

8-anilinonaftalensulfonska kiselina (ANS) je najčešće korištena proba za karakterizaciju proteina. Hidrofobnost površine proteina je važan parametar u održavanju stabilnosti i funkcionalne aktivnosti proteina. ANS je napolarna fluorescentna proba koja sama u vodenim otopinama ne pokazuje fluorescenciju. S druge strane, ANS vezana za hidrofobne regije proteina značajno povećava intenzitet fluorescencije pa se kao takva često koristi za karakterizaciju površinske hidrofobnosti. (Cheng i sur. 2019)

Osim za analizu površinske hidrofobnosti, ANS se koristi za provjeru agregacije proteina, karakterizaciju aktivnih mjesta na enzimima, praćenje odmatanja i zamatanja proteina, za otkrivanje rastopljenih globularnih intermedijera tijekom procesa odmatanja, za interakcije proteinskih surfaktanata i analizu proteinskih kristala. (Deshpande i Sathe, 2018)

Pretpostavlja se da se ANS veže na proteine i membrane hidrofobnim interakcijama potpomognutima svojim dvama aromatskim prstenovima, iako analize rentgenskom kristalografijom i NMR-om nisu potvrdile ovu hipotezu. S obzirom da je u pH vrijednostima bioloških sustava u anionskom obliku, elektrostatske interakcije također mogu imati bitnu ulogu u vezanju ANS na proteine. Moguće je da sulfonatna funkcionalna skupina, za koju se donedavno smatralo da služi samo kao sredstvo za otapanje inače netopljivog anilinonaftalena u vodi, isto potpomaže vezanje kiseline za protein. Takve interakcije ovise o kationskom naboju proteina i pH vrijednosti otapala, a mogu se odvijati stvaranjem ionskih parova između negativno nabijene sulfonatne skupine ANS i postraničnih lanaca Arg, Lys i His ostataka na površini proteina. (Deshpande i Sathe, 2018)

Fluorescencija ANS je osjetljiva na okolinu boje - polarnost, temperaturu, viskoznost. Hipsokromni pomak emisijskog maksimuma i povećanje kvantnog prinosa prati sniženje dielektrične konstante otapala.

Pri korištenju fluorescentnih boja potrebno je pomno odabrati odgovarajuće otapalo za temeljnu standardnu otopinu – najčešće se radi o vodi, etanolu, metanolu ili DMSO-u. Vodene temeljne standardne otopine, tzv. „stock“ otopine, mogu se pripremiti s pozitivno nabijenim tioflavinom T i s ANS/Bis-Ans koje su unutar širokog raspona pH negativno nabijene (pK_a sulfonatne skupine iznosi manje od 2). Nilsko crvena je loše topljiva u vodenim

medijima (topljivost u vodi joj je ispod 1 $\mu\text{g/ml}$) zbog čega se temelje standardne otopine pripremaju u organskim otapalima kao što su DMSO ili etanol. (Sackett i Wolff, 1987)

Pri korištenju organskih otapala treba provjeriti utječu li na integritet proteina. U mnogim su slučajevima interakcije fluorescentne boje s nativnim proteinima praćene povećanjem intenziteta fluorescencije. 8-anilinonaftalensulfonska kiselina pokazuje jak intenzitet fluorescencije u prisutnosti nativnog humanog serumskog albumina (HSA) zato što se molekule boje vežu na hidrofobna vezna mjesta na površini proteina. (Santra i sur. 2004)

Površinska hidrofobnost proteina utječe na njegovu fizikalnu stabilnost, topljivost, adsorpciju i sklonost agregiranju. Upotreba hidrofobnih fluorescentnih boja omogućuje spektroskopski pristup mjerenju hidrofobnosti površine nativnih i denaturiranih proteina. Osim hidrofobnih interakcija, postoje i drugi mehanizmi vezanja, npr. elektrostatske interakcije, koje je potrebno uzeti u obzir prilikom interpretacije rezultata. U usporedbi s drugim metodama kao što su teorijske kalkulacije temeljene na sljedovima aminokiselina, kromatografija ili diferencijalna pretražna kalorimetrija, upotreba fluorescentnih boja je relativno brza i jednostavna te se može koristiti i za proteine s neodređenim slijedom aminokiselina. (Hawe i sur. 2008)

Ulogu 8-anilinonaftalensulfonske kiseline kao glasničke skupine za hidrofobne interakcije proučavali su Yu i sur. (1996) vezanjem na CYP450 2B1, što je induciralo značajan skok intenziteta fluorescencije uz plavi pomak i ukazalo na snažno vezanje ANS za protein.

Hidrofobne džepove glikoformi ljudskog nativnog transferina istraživali su Nagae i sur. (2014). Koristeći fluorescencijski spektar ANS otkrili su da je dodatak pročišćene glikoforme transferina iz cerebrospinalne tekućine (koju su nazvali Tf-1, a koja na Asn630 ima vezan biantenarni agalakto-glikan s dva N-acetilglukozamina i sržnom fukozom, a Asn432 je modificiran kompleksnim manoznim glikanima uz jedan N-acetilglukozamin) u otopinu hidrofobne probe potaknuo vidljivo povećanje fluorescencije s maksimumom na 492 nm, dok je serumski transferin pokazao slabu fluorescenciju pri 504 nm, a sama otopina ANS je slabo fluorescirala pri 508 nm. Takvi rezultati ukazuju na razotkrivanje hidrofobnog džepa na Tf-1 polipeptidu koji je prikriven kod serumskog transferina, što upućuje na iznimnu važnost rasporeda glikana i dostupnost hidrofobnih džepova u proteinu.

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Glikozilacija je najčešća posttranslacijska modifikacija proteina. Ugljikohidrati sudjeluju u mnogim biološkim procesima i kodiraju informacije za molekularno prepoznavanje, smatanje proteina i farmakokinetiku. Čovjekov imunosni sustav temelji se, između ostaloga, i na interakcijama između proteina i glikana, što ih čini iznimno važnima u medicini i dijagnostici bolesti. Ugljikohidrati čine značajan dio strukture glikoproteina i na njih uvelike utječe mikrookoliš. Razlike u glikoformama utječu na afinitet manjih molekula prema veznim mjestima proteina te svaka promjena u glikanima može dovesti do promjena u interakciji proteina s ligandima.

Ljudski transferin je glikoprotein molekularne mase 79 kDa koji ima dva N-glikozilacijska mjesta. Oko 75% proteina u ljudskom serumu je u obliku tetrasijalotransferina koji se sastoji od četiriju glikanskih lanaca sa sijalinskim kiselinama (Helander i Beck, 2008).

ANS je fluorescentna boja koja se koristi za ispitivanje hidrofobnih mjesta u proteinima, kao i za analizu interakcija između proteina i supstrata, za analizu smatanja i konformacijskih promjena proteina. Vezanjem na hidrofobne površine proteina, intenzitet fluorescencijske emisije ANS snažno se povećava uz plavi pomak maksimalne emisijske valne duljine. (Deshpande i Sathe, 2018)

Cilj ovog rada je karakterizacija hidrofobnih regija humanog nativnog i asijalo-apo-transferina pomoću fluorescentne probe, 8-anilinonaftalensulfonske kiseline, te određivanje stehiometrije vezanja probe na nativni apo-transferin.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Korištene tvari

Tijekom provođenja eksperimenta korištene su sljedeće tvari:

- dvostruko destilirana voda
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ (natrijev dihidrogenfosfat dihidrat), Kemika, kat. br. 1406707
- nativni humani apo-transferin – Biorbyt, kat. br. orb80927
- NaOH (natrijev hidroksid, zrnca 2 – 5 mm) – Kemika, kat. br. 1452506
- HCl (37%-tna otopina klorovodične kiseline) – Carlo Erba Reagents, kat. br. 403871
- NaCl (natrijev klorid) – Kemika, kat. br. 1417506
- 8-anilino-1-naftalensulfonska kiselina, 98%, Acros Organics, kat.br. 401210050
- neuraminidaza (imobilizirani enzim) – GALAB Technologies GmbH, GlycoCleave®, kat. br. 2011 or 132012)

3.1.2. Korišteni pribor i instrumenti

- Za vaganje je korištena *Mettler Toledo AG245* analitička vaga s točnošću odvage 0,1 mg.
- Za mjerenje pH uzoraka korišten je *Mettler Toledo MP 220* pH-metar kalibriran standardnim otopinama pH = 4, pH = 7 i pH = 10.
- Za miješanje uzoraka korišten je mješač *Cole-Parmer Vortex Mixer*.
- Za pripremu otopina korištene su *Eppendorf* tubice.
- Za pipetiranje korištene su *Eppendorf Research plus* pipete.
- Za deionizaciju špatula i tubica korišten je deionizator *Benchtop Air Ionizer*.
- Za mjerenje spektrofotometrije u UV-Vis području korišten je *Varian Cary 50 Bio* UV-Vis spektrofotometar.
- Za mjerenje fluorescencije korišten je *Tecan Spark M10* multifunkcijski čitač mikrotitarskih pločica za detekciju fluorescencije.
- Mjerenje apsorbancije izvršeno je uz kvarcnu kivetu (optički put 1 cm), *Hellma*.

- Za čišćenje kivete korišten je ultrazvučna kupelj *Ultrasonic Cleaner, Sper Scientific Direct*, 42000 Hz.
- Za filtriranje otopina (ANS i transferina) korišteni su PES filter za šprice veličine pore 0,22 μm (*FilterBio[®]*).
- Za mjerenje fluorescencije korištene su *Greiner* mikrotitatske pločice s 96 jažica, crne s prozirnim dnom.
- Za automatiziranu titraciju otopina korišten je *Opentrons OT-2 Liquid Handler* robot.
- Za centrifugiranje mikrotitarskih pločica korištena je *VWR Compact Star cs4* centrifuga.
- Korištene su laboratorijske čaše, menzure i stalci za epruvete.
- Obrada podataka izvedena je na PC računalu uz pomoć softvera *Microsoft Excel*.

3.1.3. Priprema otopina

3.1.3.1. Priprema otopina za podešavanje pH i otopina pufera

1. Otopina 1 M natrijeva hidroksida pripremljena je otapanjem odgovarajuće mase NaOH u dvostruko destiliranoj vodi.
2. Otopina 1 M HCl pripremljena je miješanjem odgovarajućeg volumena 37%-tne kloridne kiseline s odgovarajućim volumenom dvostruko destilirane vode.
3. Otopina pufera koncentracije 50 mM pripremljena je otapanjem 1,56 g natrijeva dihidrogenfosfata dihidrata u 200 mL dvostruko destiliranoj vodi, a pH 7,4 postignut je dodatkom 8,25 mL 1 M otopine natrijeva hidroksida.
4. Otopina pufera koncentracije 170 mM pripremljena je otapanjem 7,80 g natrijeva dihidrogenfosfata dihidrata u 250 mL dvostruko destilirane vode, a pH 7,4 postignut je dodatkom 42 mL 1 M otopine natrijeva hidroksida.

3.1.3.2. Priprema matične otopine 8-anilinonaftalensulfonske kiseline za određivanje hidrofobnosti površine proteina

Matična otopina ANS pripremljena je otapanjem 0,001 g kiseline u 5 mL 1 M otopine NaOH, nakon čega je filtrirana koristeći PES filter za šprice. Pribor je prije vaganja kiseline deioniziran pomoću deionizatora. Ciljana koncentracija otopine ANS bila je $1,40 \times 10^{-3}$ M.

3.1.3.3. Priprema matične otopine 8-anilinonaftalensulfonske kiseline za određivanje stehiometrije vezanja na nativni apo-transferin

Matična otopina ANS pripremljena je razrjeđivanjem 300 μ L otopine ANS koncentracije $0,9 \times 10^{-3}$ M sa 300 μ L 1M otopine NaOH, nakon čega je 54 μ L dobivene otopine pomiješano s 546 μ L otopine NaOH koncentracije 1 M. Ciljana koncentracija otopine ANS bila je 8×10^{-5} M.

3.1.3.4. Priprema matične otopine apo-transferina za određivanje hidrofobnosti površine proteina

Matična otopina apo-transferina pripremljena je otapanjem nativnog apo-transferina u fosfatnom 50 mM puferu pH 7,4. Pribor je neposredno prije odvage humanog apo-transferina deioniziran pomoću deionizatora. Na analitičkoj vagi odvagano je 1,6 mg apo-Tf. Izvagani nativni humani apo-transferin otopljen je u 50 mM fosfatnom puferu volumena 2 mL, a potom je otopina promiješana na mješalici. Ciljana koncentracija apo-Tf iznosila je 1×10^{-5} M.

3.1.3.5. Priprema matične otopine apo-transferina za određivanje stehiometrije vezanja ANS na nativni apo-transferin

Matična otopina apo-transferina pripremljena je razrjeđivanjem 35 μ L otopine Tf+s koncentracije $10,3 \times 10^{-5}$ M u 465 μ L pufera koncentracije 170 mM, nakon čega je 103 μ L dobivene otopine pomiješano s 497 μ L pufera koncentracije 170 mM. Ciljana koncentracija apo-Tf iznosila je 8×10^{-5} M.

3.1.3.6. Priprema matične otopine asijalo-apo-transferina

Asijalo-apo-transferin pripremljen je djelovanjem neuraminidaze GlycoCleave® na nativni apo-transferin prema prethodno opisanom protokolu (Friganović i sur. 2020). Nakon provedene desijalinizacije protein je ispran vodom i pohranjen na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Prije pripreme matične otopine asijalo-apo-transferina, desijalinizirani uzorak je odmrznut i matična otopina asijalo-apo-transferina pripremljena je miješanjem otopine desijaliniziranog transferina sa 50 mM fosfatnim puferom pH 7,4 kako bi pripremili matičnu otopinu asijalo-apo-transferina koncentracije oko $1 \times 10^{-5}\text{ M}$.

3.1.3.7. Priprema uzoraka apo- i desijaliniziranog transferina s vezanom ANS za određivanje hidrofobnosti površine proteina

Kako bi fluorimetrijski ispitali hidrofobnost površine nativnog i desijaliniziranog apo-transferina pomoću 8-anilino-1-naftalensulfonske kiseline (ANS), fluorescentne boje, pripremljene su tri skupine uzoraka: 1) nativni apo-Tf s fluorescentnom bojom, 2) desijalizirani apo-Tf s fluorescentnom bojom i 3) fluorescentna boja. Sve skupine uzoraka pripremane su na jednak način: u otopinu ANS dodan je pufer, a potom i kiselina kako bi se pH ostao 7,4. U uzorke koji su konačno sadržavali transferin na kraju je dodan određen volumen iz matičnih otopina nativnog (Tf+s) ili desijaliziranog (Tf-s) transferina. Kako bi intenzitet fluorescencije bio direktan pokazatelj vezanja ANS na transferin, koncentracije transferina i ANS bile su jednake u svim uzorcima, kao i ukupni volumen uzoraka. Rađeni su duplikati svih skupina uzoraka te je nakon miješanja otopina provjeren i zabilježen pH otopina. Molarni omjer ANS i Tf+s i ANS i Tf-s u titraciji bio je 70:1. Tablica 1. prikazuje točne volumene pipetiranih otopina.

Titracija je provedena pomoću automatiziranog robota u tubice veličine 500 μL . Sve tubice potom su promiješane na mješaču. Nakon miješanja otopine su prebačene u mikrotitarske pločice i potom snimane na multifunkcijskom čitaču mikrotitarskih pločica. Metoda snimanja detaljnije je opisana u poglavlju 3.2.3. Određivanje razlike u hidrofobnosti Tf+s i Tf-s.

Tablica 1. Priprema uzoraka ANS te nativnog (Tf+s) i desijaliziranog (Tf-s) transferina uz ANS za određivanje vezanja ANS na različite glikoforme transferina. Koncentracije korištenih matičnih otopina iznose: $c(\text{ANS}) = 9,20 \times 10^{-4} \text{ M}$, $c(\text{Tf+s}) = 9,37 \times 10^{-6} \text{ M}$ i $c(\text{Tf-s}) = 1,33 \times 10^{-5} \text{ M}$, dok je korišten 50 mM fostaftni pufer pH 7,4.

Uzorak	V(ANS)/ μL	V(pufer)/ μL	V(HCl)/ μL	V(Tf+s)/ μL	V(Tf-s)/ μL	V(ukupno) / μL
ANS 1	76	413	121,5	/	/	610,5
ANS 2	76	411,5	123,0	/	/	610,5
Tf+s ANS 1	76	304	123,5	107,0	/	610,5
Tf+s ANS 2	76	300	127,5	107,0	/	610,5
Tf-s ANS 1	76	335	124,5	/	75	610,5
Tf-s ANS 2	76	335	124,5	/	75	610,5

3.1.3.8. Priprema uzoraka za određivanje stehiometrije vezanja ANS na nativni apo-transferin

Titracija nativnog apo-transferina osmišljena je prema kasnije opisanoj Jobovoj metodi (3.2.4. Određivanje stehiometrije vezanja ANS na Tf+s prema Jobovoj metodi) tako da pokrije cijeli raspon množinskog udjela ANS prema transferinu (od 0 do 1) i prikazana je u Tablici 2. Redoslijed dodavanja otopine bio je takav da je u pufer dodavana HCl koja ga je predzakiselila prije dodatka ANS. Budući da dodatci ANS nisu bili jednaki u svakoj točki, dodavana je i 1 M NaOH kako bi se održala ista ionska jakost otopine.

Titracija je provedena pomoću automatiziranog robota u tubice veličine 500 μL . Sve tubice potom su promiješane na mješaču. Nakon miješanja, otopine su prebačene u mikrotitarske pločice i snimane na multifunkcijskom čitaču mikrotitarskih pločica. Metoda snimanja detaljnije je opisana u poglavlju 3.2.3.

Tablica 2. Priprema uzoraka za određivanje stehiometrije vezanja ANS na nativni apo-transferin. Koncentracije korištenih matičnih otopina iznose: $c(\text{ANS}) = 7,89 \times 10^{-5} \text{ M}$, $c(\text{Tf+s}) = 8,31 \times 10^{-5} \text{ M}$, dok je korišten 170 mM fostaftni pufer pH 7,4 i 1 M otopine NaOH i HCl.

	$V(\text{Tf+s})/\mu\text{L}$	$V(\text{ANS})/\mu\text{L}$	$c(\text{ANS})/\text{M}$	$c(\text{Tf+s})/\text{M}$	$n(\text{Tf+s})/\text{mol}$	$n(\text{ANS})/\text{mol}$	$x(\text{ANS})$	$n(\text{ANS}):n(\text{Tf})$	$V(\text{pufer})/\mu\text{L}$	$V(\text{NaOH})/\mu\text{L}$	$V(\text{HCl})/\mu\text{L}$
1	0	51	1,00E-05	0,00E+00	0,00E+00	4,00E-03	1,00	#DIJ/0!	299	0	51
2	5	46	9,00E-06	1,00E-06	4,00E-04	3,60E-03	0,90	9,00	294	5	51
3	14	36	7,00E-06	3,00E-06	1,20E-03	2,80E-03	0,70	2,33	284	15	51
4	19	30	6,00E-06	4,00E-06	1,60E-03	2,40E-03	0,60	1,50	279	20	51
5	24	25	5,00E-06	5,00E-06	2,00E-03	2,00E-03	0,50	1,00	274	25	51
6	29	20	4,00E-06	6,00E-06	2,40E-03	1,60E-03	0,40	0,67	270	30	51
7	34	15	3,00E-06	7,00E-06	2,80E-03	1,20E-03	0,30	0,43	265	36	51
8	38	10	2,00E-06	8,00E-06	3,20E-03	8,00E-04	0,20	0,25	260	41	51
9	48	0	0,00E+00	1,00E-05	4,00E-03	0,00E+00	0,00	0,00	250	51	51

3.2. Metode

3.2.1. Spektrofotometrija u UV-Vis području

Ultraljubičasta i vidljiva (UV-Vis) spektroskopija je brza instrumentalna analitička tehnika kojom se mjeri apsorbanacija ili propusnost svjetla. Iako je valna duljina ultraljubičastog zračenja u rasponu od 100 do 380 nm, a vidljiva komponenta zračenja valne duljine do 800 nm, većina spektrofotometara mjeri valnu duljinu u rasponu od 200 do 1100 nm. Valne duljine iznad 800 nm označavaju infracrveno, a ispod 200 nm vakuumsko UV zračenje. Sposobnost tvari da apsorbira i emitira svjetlost definira njenu boju, a ljudsko oko može razlikovati do deset milijuna jedinstvenih boja. Svjetlost prolazi kroz medij u procesu transmisije, reflektira se o neprozirne i prozirne površine te se lomi prolaskom kroz kristale.

Kovalentno nezasićeni spojevi s razlikom energije elektronskog prijelaza jednakom energiji UV-Vis područja apsorbiraju svjetlost specifičnih valnih duljina, a zovu se kromofori. Kovalentno zasićeni spojevi koji ne apsorbiraju UV-Vis elektromagnetsko zračenje, ali utječu na apsorpciju kromofornih skupina nazivaju se auksokromi. Kada UV-Vis zračenje dođe do kromofora, elektroni u osnovnom stanju prelaze u pobuđeno stanje, proces koji nazivamo elektronskom ekscitacijom, dok auksokromi doniraju elektrone i imaju sposobnost utjecati na boju kromofora unatoč tomu što sami ne mijenjaju boju. Voda i alkoholi su uglavnom bezbojni i prozirni te ne apsorbiraju svjetlost u UV-Vis rasponu, što ih čini izvrsnim medijima za UV-Vis spektroskopiju. (Rocha i sur. 2018.)

UV-Vis spektrofotometri usmjeravaju izvor svjetlosti kroz uzorak, a detektor na suprotnoj strani zabilježava propuštenu svjetlost. Osnovni dijelovi spektrofotometra su izvor zračenja (živina ili vodikova lampa za UV područje i volframova lampa za Vis područje), monokromator, nosač uzorka i detektor zračenja.

Propusnost svjetla predstavlja količinu svjetlosti koja se apsorbira pri svakoj valnoj duljini. Kromofori imaju karakteristične linije apsorpcije. Mijenjanje njihove okoline dodavanjem drugog spoja ili mijenjanje temperature može promijeniti njihove energetske razine, a time i valnu duljinu i intenzitet apsorpcije. Kada se položaj signala u spektru pomakne prema većim valnim duljinama, tada govorimo o batokromnom pomaku, a kada se pomakne prema manjim valnim duljinama, govorimo o hipsokromnom pomaku. Povećanje intenziteta signala zovemo hiperkromni pomak, dok njegovo smanjenje zovemo hipokromni pomak. Otapala mogu utjecati na intenzitet apsorpcije i pomake u valnim duljinama.

UV-Vis spektroskopija temelji se na elektronskim prijelazima organskih molekula koje apsorbiraju svjetlost koja pobuđuje elektrone iz niže energetske orbitale (najviša zauzeta molekularna orbitala – HOMO) u višu energetske orbitalu (najniža nezauzeta molekularna orbitala – LUMO). Apsorbirana energija valne duljine svjetlosti mora biti jednaka razlici energije HOMO-LUMO razmaka. (Rocha i sur. 2018.)

Transmitancija odnosno propusnost (T) definirana je izrazom:

$$T = \frac{P}{P_0} \quad (1)$$

u kojem je P snaga snopa svjetlosti nakon prolaska kroz uzorak, a P_0 je početna snaga snopa. Ovaj odnos vrijedi i u kontekstu intenziteta svjetlosnog zračenja:

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (2)$$

gdje je I_0 intenzitet upadnog monokromatskog svjetla, a I označava intenzitet izlaznog monokromatskog svjetla. Postotak transmitancije jednostavno se računa kao:

$$(\% - T) = T \times 100\%. \quad (3)$$

Odnos apsorbancije (A) otopine i eksperimentalno izmjerene transmitancije (T) monokromatskog svjetla prikazuje izraz:

$$A = -\log T = -\log \frac{P}{P_0} = -\log \frac{I}{I_0} \quad (4)$$

u kojoj ni A ni T nemaju pripadajuću mjernu jedinicu.

Apsorbancija svjetla u uzorku izravno je razmjerna udaljenosti koju svjetlost prijeđe prolaskom kroz uzorak i koncentraciji otopljene tvari, a navedeni odnos poznat je kao Beer-Lambertov zakon i omogućuje mjerenje koncentracije otopljene tvari u uzorku.

Izmjerena apsorbancija (A) proporcionalna je duljini puta svjetlosti kroz otopinu (b) i koncentraciji (c) tvari u otopini, sukladno Beerovom zakonu:

$$A = \varepsilon \times c \times b \quad (5)$$

gdje je ε molarna apsorptivnost izražena u $M^{-1}cm^{-1}$, b je izražen u centimetrima, a c u mol/L.

Ako je u uzorku koji apsorbira svjetlost određene valne duljine prisutno više otopljenih tvari, ukupna apsorbanacija pri toj valnoj duljini je zbroj svih apsorbanacija:

$$A = (\varepsilon_1 \times b \times c_1) + (\varepsilon_2 \times b \times c_2) + \dots \quad (6)$$

Izraz $A_{1cm}^{1\%}$ predstavlja specifičnu apsorbanaciju otopljene tvari, a ona označava apsorbanaciju otopine koncentracije 10 g/L u kiveti debljine sloja 1 cm i mjerenu na propisanoj valnoj duljini, tako da vrijedi izraz:

$$A_{1cm}^{1\%} = \frac{10\varepsilon}{Mr} \quad (7)$$

Linearan odnos Beer-Lambertova zakona ovisi o nekoliko uvjeta. Upadno zračenje mora biti monokromatsko i oblikovano u paralelan snop koji prolazi kroz uzorak. Uzorci, kao i kalibracijski standardi, moraju biti homogeni. Za analite u matriksu kao što je otopina ili staklo, koncentracija tvari koja apsorbira zračenje mora biti dovoljno niska da ne dođe do interakcije između apsorbirajućih čestica. Dimerizacija ili grupiranje u klastere dovodi do devijacija u apsorpcijskom koeficijentu kao funkciji koncentracije. (Laqua i sur. 1988)

Koncentracija ANS u otopini određivana je mjerenjem UV-Vis apsorpcijskog spektra, uz korištenje molarnog apsorpcijskog koeficijenta koji iznosi $\varepsilon_{350nm} = 5\,000\, M^{-1}\, cm^{-1}$ (Qu i sur. 2009). Korekcija bazne linije (eng. *baseline correction*) određena je u kvarcnoj kiveti optičkog puta 1 cm *blank* uzorkom koji je sadržavao otopinu NaOH koncentracije 1 M. Raspon valnih duljina pri kojima je mjeren UV-Vis apsorpcijski spektar iznosio je 200 – 600 nm. Uzorak za mjerenje apsorbanacije koji je sadržavao 60 μ L matične otopine ANS za ispitivanje hidrofobnosti proteina razrijeđen je dodatkom 940 μ L 1M NaOH, što je razrjeđenje od 17 puta.

Koncentracija otopina Tf+s i Tf-s određena je mjerenjem UV-Vis apsorpcijskog spektra uz korištenje molarnog apsorpcijskog koeficijenta koji iznosi $\varepsilon_{280nm} = 84\,000\, M^{-1}\, cm^{-1}$ (James i Mason, 2008). Korekcija bazne linije (eng. *baseline correction*) određena je u kvarcnoj kiveti optičkog puta 1 cm *blank* uzorkom koji je sadržavao otopinu pufera koncentracije 50 mM. Raspon valnih duljina pri kojima je mjeren UV-Vis apsorpcijski spektar iznosio je 200 – 600 nm. Uzorak koji je sadržavao 250 μ L matične otopine Tf+s za ispitivanje hidrofobnosti proteina razrijeđen je s 250 μ L pufera, što je razrjeđenje u omjeru 1:1. Uzorak koji je

sadržavao 250 μL matične otopine Tf-s razrijeđen je s 500 μL pufera, što je razrjeđenje u omjeru od 1:1.

3.2.2. Fluorescencijska spektrofotometrija

Fluorescencijska spektrofotometrija je jedna od najčešće korištenih spektroskopskih tehnika u području biokemije i molekularne biofizike. Služi kao univerzalan alat za proučavanje interakcija između proteina i liganada.

Fluorescencija se temelji na elektronskim prijelazima u molekulama s konjugiranim vezama. Kada se fluorofor pobuđen fotonom vrati iz ekscitiranog singletnog elektronskog stanja u osnovno stanje, može emitirati svjetlost u obliku fluorescencije. Pobuđena zraka svjetlosti može inducirati prijelaz između dva elektronska stanja ako je energija kvanta svjetlosti jednaka razlici energijskih razina između dva stanja.

Intenzitet fluorescencije je veličina ovisna o valnoj duljini, a povezana je sa kvantnim prinosom i optičkom gustoćom. Pri valnoj duljini λ , koja je obično valna duljina apsorpcijskog maksimuma, za intenzitet fluorescencije I_f vrijedi izraz:

$$I_f = I_0 \varphi (1 - 10^{-\varepsilon c l}) \approx 2.303 I_0 \varphi \varepsilon c l \quad (8)$$

u kojem je I_0 intenzitet upadne zrake svjetlosti, ε je molarni koeficijent apsorpcije pri valnoj duljini upadnog zračenja, c je molarna koncentracija, a l je duljina optičkog puta (najčešće 1 cm). Jednadžba je izvedena iz Beer-Lambertova zakona o apsorpciji, a linearna ovisnost apsorpcije o koncentraciji uzorka implicira da će intenzitet ukupnog fluorescencijskog zračenja biti zbroj svih fluorescentnih specija. (Mocz i Ross, 2013)

Fluorescentni spektrometar sastoji se od izvora zračenja (volframova, živina ili ksenonova lampa), primarnog monokromatora s pukotinom, spremnika za uzorak, sekundarnog monokromatora s pukotinom i detektora zračenja. Pri mjerenju fluorescencije odabire se valna duljina upadnog zračenja pri kojoj ispitivana tvar ima maksimum apsorpcije. Spremnik za uzorak je kiveta sa četiri polirane strane, s obzirom da se intenzitet emitirane svjetlosti mjeri

po kutom od 90° u odnosu na upadnu zraku. Sekundarni monokromator propušta valne duljine fluorescirajućeg zračenja, a zadržava raspršeno upadno zračenje.

Podatci dobiveni primjenom fluorescencijske spektrofotometrije prikazuju se u obliku emisijskih spektara koji prikazuju krivulju intenziteta fluorescencije kao funkciju valne duljine. Pozicija emisijskog spektra reflektira promjene u energiji osnovnog i pobuđenog stanja fotona. Ukupni intenzitet emisije pri svim valnim duljinama povezan je s kvantnim prinosom fluorescencije. Definiran je kao omjer broja emitiranih i apsorbiranih fotona te govori o vjerojatnosti fotokemijskih i fotofizikalnih procesa koji dovode do deaktivacije pobuđenog stanja. (Ladokhin, 2006)

Fluorescencijska spektroskopija ima glavnu ulogu u analizi smatanja proteina. Odmatanje proteina dovodi do povećanog izlaganja triptofanskih ostataka vodenom okolišu, što se na fluorescentnom emisijskom spektru prikazuje kao crveni pomak.

Vezanje liganda na protein može izravno utjecati na fluorescenciju triptofanskih ostataka gašenjem fluorescencije ili fizikalnim interakcijama s fluoroforom, pri čemu se promijeni polarnost okoline i dostupnost fluorofora otapalu. Nadalje, ligand se može vezati na mjesto na proteinu koje je udaljeno od Trp ostataka i generaliziranim mehanizmom uzrokovati konformacijsku promjenu proteina, što zatim mijenja i mikrookoliš triptofana. (Ladokhin, 2006)

Jedna od mnogih prednosti fluorescencijske spektroskopije je mogućnost ispitivanja utjecaja okolišnih uvjeta na različite interakcije proteina pri kemijskoj ravnoteži. U usporedbi s drugim spektroskopskim tehnikama, jednostavna je, brza, iznimno osjetljiva te omogućuje rutinsku detekciju fluorescentnih tvari u uzorcima.

3.2.3. Određivanje razlike u hidrofobnosti Tf+s i Tf-s

Interakcije hidrofobne probe te nativnog i desijaliziranog transferina praćene su fluorescencijskom emisijskom spektrofotometrijom. Za mjerenje intenziteta fluorescencije uzoraka otopina ANS, nativnog transferina i ANS te desijaliniziranog transferina i ANS korištene su crne mikrotitarske pločice prozirnog dna s 96 jažica i multifunkcijski čitač

pločica. U jažice je pipetirano 200 μL uzorka. Valna duljina pobude iznosila je $\lambda_{\text{ex}} = 390 \text{ nm}$, valna duljina emisije $\lambda_{\text{em}} = 440 - 600 \text{ nm}$, širina vrpce pobude i emisije (eng. *bandwidth*) bila je 20 nm, pojačanje (eng. *gain*) bilo je 75, dikroično ogledalo (eng. *mirror*) bilo je postavljeno na 50%, dok je Z-pozicija iznosila 17564 za sva mjerenja.

3.2.4. Određivanje stehiometrije vezanja ANS na Tf+s prema Jobovoj metodi

Metoda kontinuirane varijacije ili Jobova metoda je često korištena metoda određivanja stehiometrije dvaju reaktanata u uzorku. Točan omjer vezanja se obično dobiva kada je ukupna koncentracija reaktanata mnogo veća od konstanti disocijacije analiziranih spojeva. Stehiometrija vezanja određuje se iz omjera molarnih frakcija dvaju reaktanata pri maksimumu krivulje. (Huang i sur. 2002)

Jobova metoda koristi se za određivanje omjera reakcijskih koeficijenata n i m :



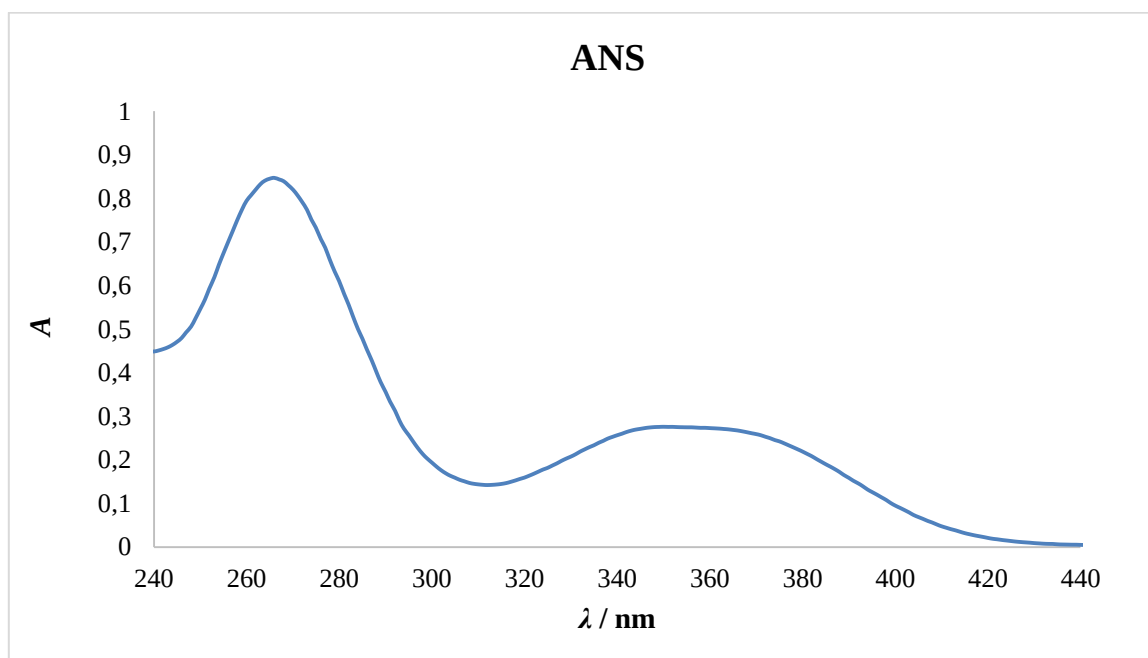
gdje A i B predstavljaju slobodne specije pri ravnoteži (npr. ligand i supstrat), a A_nB_m predstavlja molekularni kompleks A i B.

U metodi kontinuirane varijacije izmjerena koncentracija kompleksa A_nB_m (ili parametra linearno proporcionalnog koncentraciji kompleksa, kao što je UV-Vis apsorbanacija) stavlja se u odnos sa molarnom frakcijom jednog reaktanta dok se ukupna koncentracija održava konstantnom. (Olson i Bühlmann, 2012)

Interakcije hidrofobne probe i transferina u svrhu određivanja stehiometrije vezanja praćene su fluorescencijskom emisijskom spektrofotometrijom. Za mjerenje intenziteta fluorescencije uzoraka otopina ANS te nativnog transferina i ANS korištene su crne mikrotitarske pločice prozirnog dna s 96 jažica i multifunkcijski čitač pločica. Valna duljina pobude iznosila je $\lambda_{\text{ex}} = 350 \text{ nm}$, valna duljina emisije $\lambda_{\text{em}} = 400 - 600 \text{ nm}$, širina vrpce pobude i emisije (eng. *bandwidth*) bila je 20 nm, pojačanje (eng. *gain*) bilo je 100, dikroično ogledalo (eng. *mirror*) bilo je postavljeno na 50%, dok je Z-pozicija iznosila 16947.

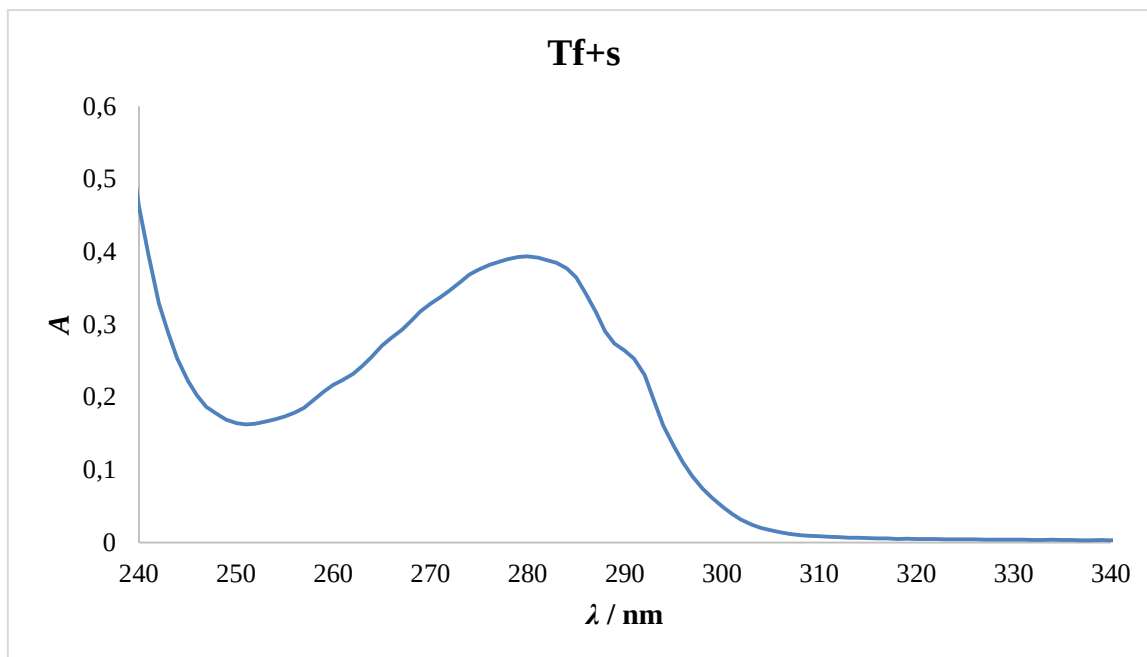
4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije matičnih otopina transferina i ANS



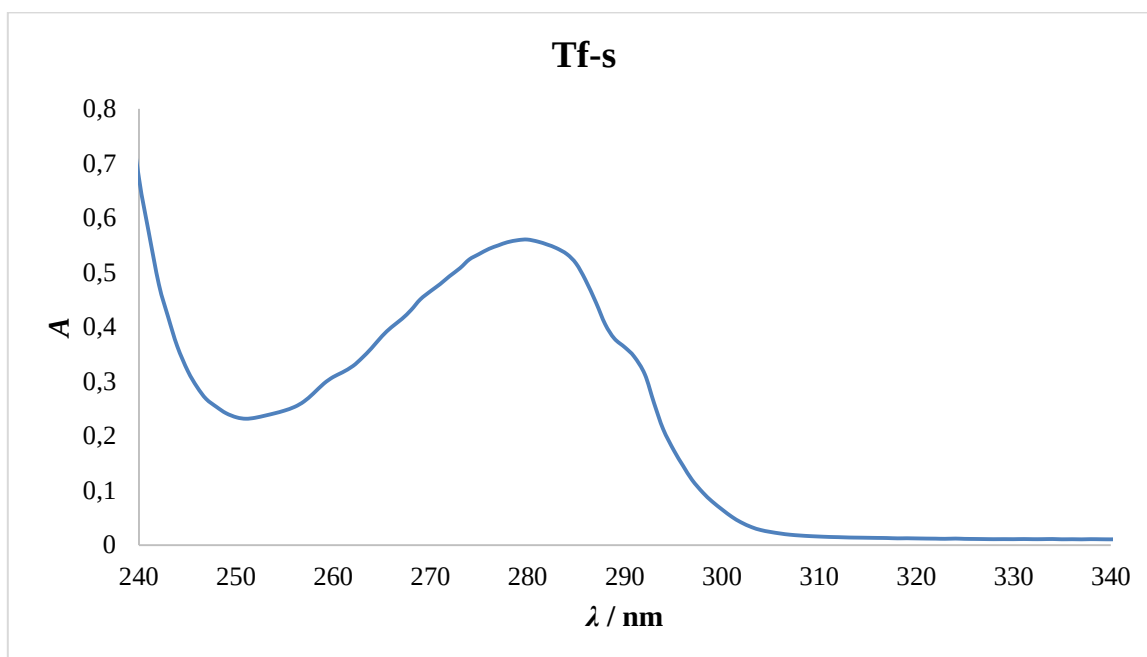
Slika 5. UV-Vis spektar matične otopine 8-anilinonaftalensufonske kiseline za ispitivanje razlike u hidrofobnosti uz razrjeđenje ≈ 17 puta.

Koncentracija matične otopine ANS za ispitivanje razlike u hidrofobnosti (Slika 5.) određena je mjerenjem UV-Vis apsorpcijskog spektra, uz korištenje molarnog apsorpcijskog koeficijenta koji iznosi $\epsilon_{350\text{nm}} = 5\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ (Qu i sur. 2009), a iznosila je $9,20 \times 10^{-4}\text{ M}$.



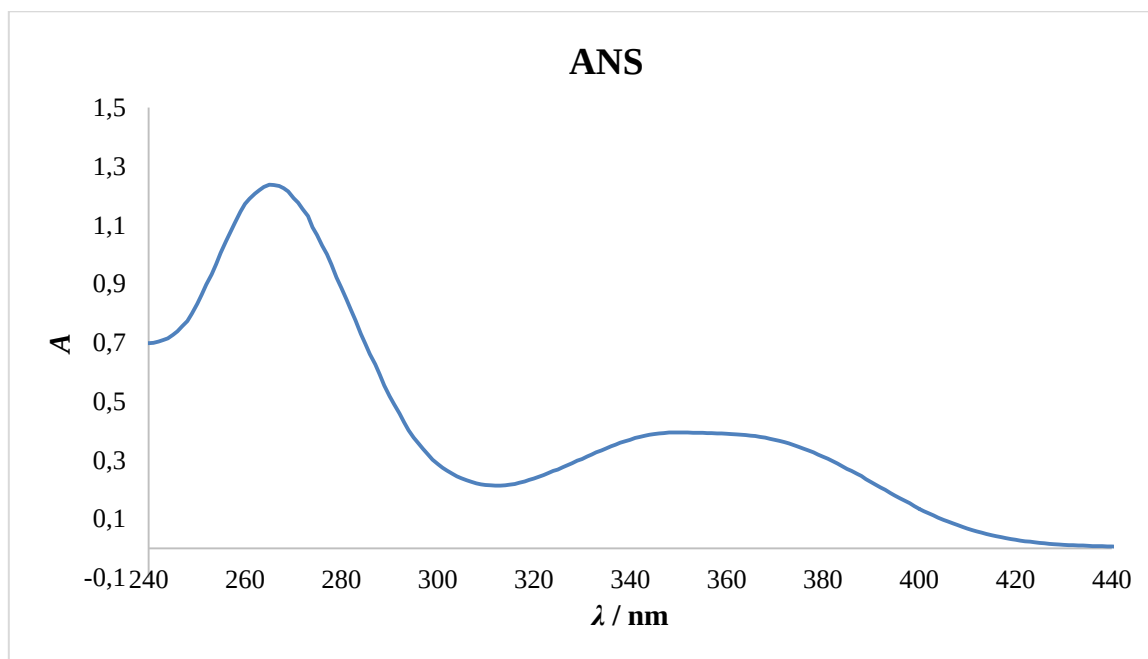
Slika 6. UV-Vis spektar matične otopine nativnog apo-transferina za ispitivanje razlike u hidrofobnosti uz razrjeđenje 1:1.

Koncentracija matične otopine apo-transferina za ispitivanje razlike u hidrofobnosti proteina (Slika 6.) određena je mjerenjem UV-Vis apsorpcijskog spektra uz korištenje molarnog apsorpcijskog koeficijenta koji iznosi $\varepsilon_{280\text{nm}} = 84\,000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (James i Mason, 2008), a iznosila je $9,37 \times 10^{-6}\text{ M}$.



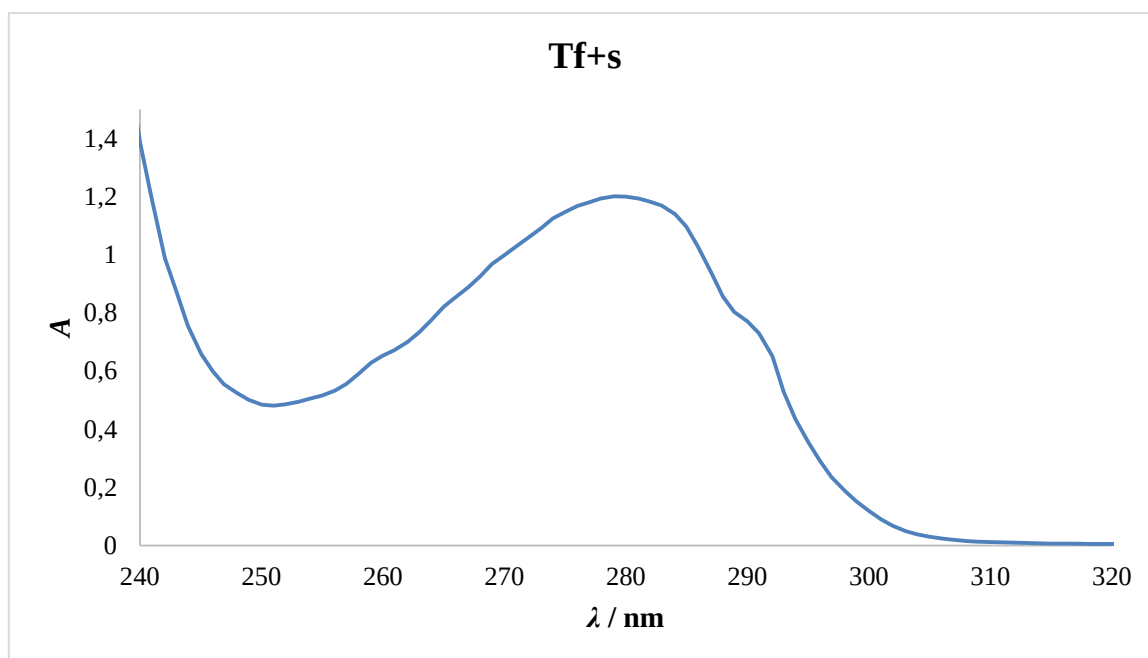
Slika 7. UV-Vis spektar matične otopine desijaliniziranog transferina za ispitivanje razlike u hidrofobnosti uz razrjeđenje 1:1.

Koncentracija matične otopine asijalo-apo-transferina za ispitivanje razlike u hidrofobnosti (Slika 7.) određena je mjerenjem UV-Vis apsorpcijskog spektra uz korištenje molarnog apsorpcijskog koeficijenta koji iznosi $\varepsilon_{280\text{nm}} = 84\,000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (James i Mason, 2008), a iznosila je $1,33 \times 10^{-5}\text{ M}$.



Slika 8. UV-Vis spektar matične otopine ANS za određivanje stehiometrije vezanja bez razrjeđenja.

Koncentracija matične otopine ANS za određivanje stehiometrije vezanja (Slika 8.) određena je mjerenjem UV-Vis apsorpcijskog spektra, uz korištenje molarnog apsorpcijskog koeficijenta koji iznosi $\varepsilon_{350\text{nm}} = 5\,000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Qu i sur. 2009), a iznosila je $7,89 \times 10^{-5}\text{ M}$.



Slika 9. UV-Vis spektar matične otopine nativnog apo-transferina za određivanje stehiometrije vezanja uz razrjeđenje ≈ 6 puta.

Koncentracija matične otopine apo-Tf za određivanje stehiometrije vezanja (Slika 9.) određena je mjerenjem UV-Vis apsorpcijskog spektra uz korištenje molarnog apsorpcijskog koeficijenta koji iznosi $\epsilon_{280\text{nm}} = 84\,000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (James i Mason, 2008), a iznosila je $8,31 \times 10^{-5}\text{ M}$.

4.2. Određivanje razlike u hidrofobnosti Tf+s i Tf-s

Vrijednosti dobivene mjerenjem intenziteta fluorescencije otopina nativnog apo- i desijaliniziranog transferina s vezanom ANS iskazane su u fluorescencijskim jedinicama (f.u.) i prikazane u Tablici 3.

Tablica 3. Prikaz ovisnosti intenziteta fluorescencije F o valnoj duljini otopine ANS i otopina nativnog apo- te desijaliniziranog transferina s vezanom ANS. pH vrijednosti uzoraka izmjerene prije mjerenja pojedinog uzorka prikazane su u zagradama.

	Uzorak (pH); $F/\text{f.u.}$					
λ/nm	ANS 1 (7,40)	ANS 2 (7,42)	Tf+s ANS 1 (7,35)	Tf+s ANS 2 (7,44)	Tf-s ANS 1 (7,40)	Tf-s ANS 2 (7,38)
440	2127	2275	7738	6565	2950	2965
441	2213	2345	8066	6854	2979	3054
442	2262	2387	8251	7098	3072	3166

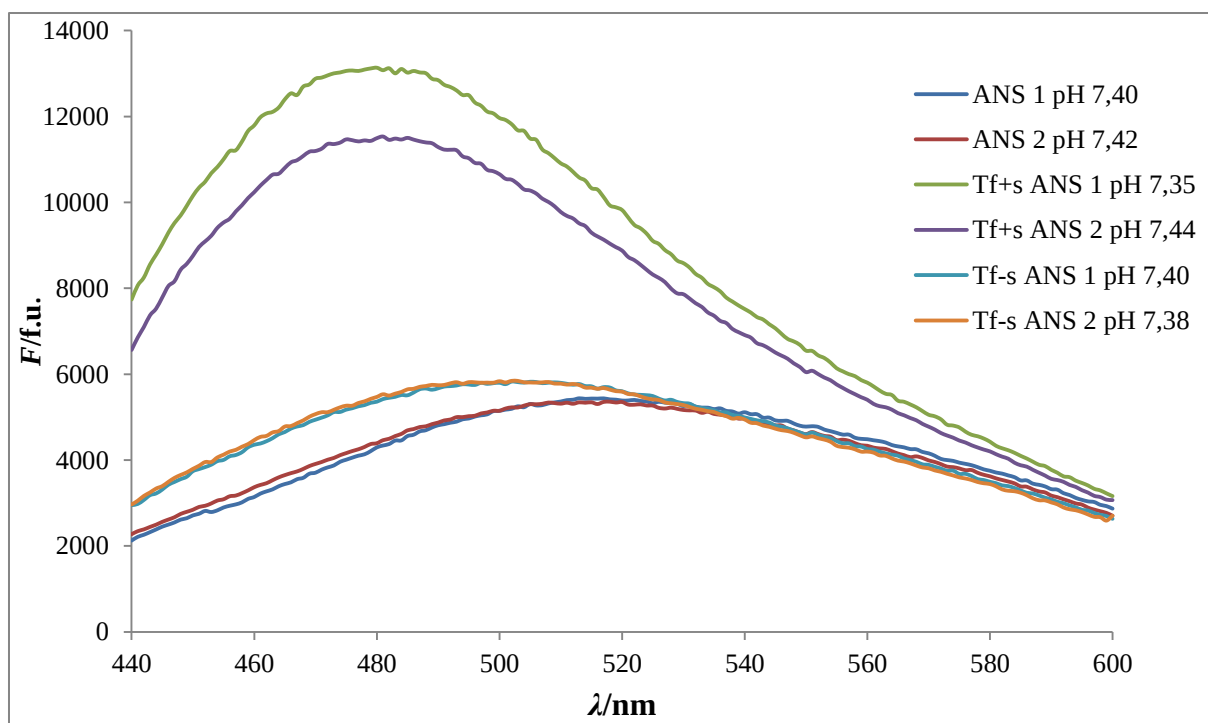
443	2323	2444	8553	7370	3183	3246
444	2386	2497	8783	7527	3224	3338
445	2450	2562	9025	7787	3314	3394
446	2499	2616	9295	8052	3426	3493
447	2549	2670	9521	8166	3492	3586
448	2614	2747	9697	8432	3557	3654
449	2647	2796	9920	8570	3613	3714
450	2713	2844	10152	8755	3742	3796
451	2751	2910	10344	8963	3791	3869
452	2816	2937	10482	9093	3838	3955
453	2791	2991	10680	9224	3893	3956
454	2831	3059	10825	9409	3976	4063
455	2897	3089	11005	9532	4005	4126
456	2937	3158	11195	9620	4089	4199
457	2969	3175	11214	9789	4119	4239
458	3016	3230	11415	9934	4184	4312
459	3097	3295	11664	10101	4298	4373
460	3141	3369	11793	10238	4358	4465
461	3220	3422	11981	10390	4386	4540
462	3272	3462	12071	10522	4440	4564
463	3319	3532	12108	10646	4511	4645
464	3392	3599	12210	10668	4601	4677
465	3443	3651	12400	10804	4654	4782
466	3483	3697	12539	10934	4735	4793
467	3556	3737	12501	10983	4783	4861
468	3588	3795	12698	11082	4815	4925
469	3683	3862	12747	11181	4891	5010
470	3707	3911	12881	11197	4941	5071
471	3778	3956	12906	11250	4989	5115
472	3831	4010	12958	11362	5042	5116
473	3876	4051	13005	11358	5118	5172
474	3961	4114	13025	11392	5121	5228
475	4009	4163	13061	11467	5175	5267
476	4058	4211	13071	11448	5208	5267
477	4103	4253	13060	11420	5253	5330
478	4136	4307	13093	11443	5281	5368
479	4209	4374	13119	11432	5334	5426
480	4296	4393	13136	11495	5360	5471
481	4340	4463	13078	11534	5421	5533
482	4374	4497	13123	11456	5451	5503
483	4455	4560	13005	11486	5474	5548
484	4459	4610	13106	11464	5516	5586
485	4560	4693	13022	11502	5509	5647
486	4591	4723	13060	11462	5574	5661
487	4669	4770	13026	11424	5651	5706

488	4696	4787	13007	11396	5667	5725
489	4760	4838	12878	11377	5639	5752
490	4811	4874	12846	11288	5672	5743
491	4837	4924	12737	11229	5713	5750
492	4871	4945	12687	11226	5723	5788
493	4895	5000	12607	11214	5737	5813
494	4951	5001	12500	11071	5767	5777
495	4969	5023	12495	11028	5760	5815
496	5014	5033	12325	10919	5750	5811
497	5043	5086	12251	10899	5799	5801
498	5065	5109	12115	10758	5776	5804
499	5139	5149	12072	10725	5791	5802
500	5147	5149	11965	10657	5801	5836
501	5176	5201	11919	10549	5769	5808
502	5195	5228	11820	10527	5829	5845
503	5253	5225	11678	10429	5816	5844
504	5231	5268	11665	10303	5804	5812
505	5308	5302	11488	10277	5824	5808
506	5273	5300	11456	10206	5817	5804
507	5280	5312	11231	10087	5791	5810
508	5320	5341	11145	10010	5803	5818
509	5344	5328	11029	9908	5810	5782
510	5364	5314	10910	9777	5799	5781
511	5396	5336	10835	9686	5777	5758
512	5406	5312	10712	9626	5755	5772
513	5439	5345	10580	9512	5771	5748
514	5426	5336	10508	9449	5724	5689
515	5433	5346	10332	9296	5718	5686
516	5431	5306	10298	9208	5664	5661
517	5437	5355	10123	9132	5699	5678
518	5414	5360	9931	9041	5690	5641
519	5407	5341	9885	8957	5623	5605
520	5387	5353	9823	8879	5603	5594
521	5388	5293	9649	8729	5553	5539
522	5401	5290	9475	8655	5528	5531
523	5377	5299	9398	8549	5519	5483
524	5365	5272	9274	8432	5511	5439
525	5324	5270	9105	8321	5492	5414
526	5358	5217	9032	8242	5431	5400
527	5337	5201	8889	8144	5388	5344
528	5327	5221	8793	7991	5404	5321
529	5311	5193	8645	7882	5354	5305
530	5259	5167	8586	7862	5326	5281
531	5298	5158	8484	7763	5314	5239
532	5246	5154	8335	7652	5244	5196

533	5223	5101	8246	7568	5215	5172
534	5221	5126	8102	7437	5191	5139
535	5188	5075	8024	7361	5158	5119
536	5205	5058	7930	7243	5111	5063
537	5147	5036	7783	7191	5112	5023
538	5132	5019	7692	7054	5050	4965
539	5083	4965	7600	6979	5029	4983
540	5114	4976	7517	6912	4994	4945
541	5069	4932	7435	6852	4959	4871
542	5068	4915	7330	6722	4926	4859
543	4988	4876	7274	6674	4905	4804
544	4990	4852	7163	6596	4875	4776
545	4925	4810	7069	6505	4805	4732
546	4914	4807	6940	6433	4779	4697
547	4914	4731	6822	6361	4741	4677
548	4852	4694	6763	6253	4687	4636
549	4801	4640	6684	6168	4645	4578
550	4780	4605	6549	6049	4597	4530
551	4789	4653	6542	6080	4640	4552
552	4773	4604	6437	6001	4589	4509
553	4710	4563	6376	5921	4545	4477
554	4674	4545	6270	5859	4511	4427
555	4634	4466	6138	5761	4443	4334
556	4594	4475	6067	5681	4392	4303
557	4593	4450	6001	5603	4391	4289
558	4520	4394	5954	5534	4325	4251
559	4495	4346	5862	5464	4315	4197
560	4486	4334	5803	5405	4259	4198
561	4462	4292	5717	5310	4244	4175
562	4442	4272	5621	5256	4196	4110
563	4409	4260	5544	5230	4158	4100
564	4351	4208	5516	5175	4127	4040
565	4320	4153	5383	5094	4103	3989
566	4296	4115	5358	5043	4036	3966
567	4257	4069	5296	4980	4000	3925
568	4251	4087	5229	4927	3960	3873
569	4190	4050	5141	4843	3902	3829
570	4158	3994	5056	4779	3889	3810
571	4101	3957	5020	4712	3845	3760
572	4028	3907	4950	4631	3804	3728
573	4001	3849	4825	4573	3750	3682
574	3982	3836	4804	4522	3755	3643
575	3941	3807	4761	4456	3679	3598
576	3913	3765	4663	4410	3681	3572
577	3882	3769	4590	4346	3630	3537

578	3836	3705	4555	4294	3558	3490
579	3784	3658	4502	4245	3536	3461
580	3752	3623	4429	4203	3495	3443
581	3711	3575	4332	4137	3462	3390
582	3685	3537	4275	4080	3411	3318
583	3643	3501	4229	4032	3395	3287
584	3603	3459	4170	3940	3350	3275
585	3528	3388	4100	3881	3295	3241
586	3527	3381	4037	3848	3239	3184
587	3452	3318	3964	3774	3223	3112
588	3425	3271	3892	3706	3177	3066
589	3387	3247	3861	3640	3125	3062
590	3324	3174	3774	3564	3085	3015
591	3312	3137	3706	3536	3030	2971
592	3230	3087	3622	3494	2996	2897
593	3186	3042	3602	3422	2945	2855
594	3120	2991	3522	3376	2900	2832
595	3075	2965	3468	3300	2844	2790
596	3039	2893	3410	3244	2825	2735
597	3024	2848	3332	3168	2767	2680
598	2959	2810	3294	3140	2727	2670
599	2929	2770	3226	3080	2698	2592
600	2870	2705	3162	3069	2633	2705

Rezultati iz tablice 3. grafički su prikazani krivuljom intenziteta fluorescencije kao funkcija valne duljine na slici 10.



Slika 10. Prikaz fluorescencijskih spektara otopina ANS, otopina nativnog apo-transferina s vezanom ANS (Tf+s ANS) te otopina desijaliniziranog transferina s vezanom ANS (Tf-s ANS).

Tablica 4. Vrijednosti maksimuma intenziteta fluorescencije F analiziranih uzoraka ANS i transferina s pripadajućim valnim duljinama.

Uzorak	Intenzitet fluorescencije (f.u.)	$\lambda_{\text{max, em}}$
ANS 1	5439	513
ANS 2	5360	518
Tf+s ANS 1	13136	480
Tf+s ANS 2	11534	481
Tf-s ANS 1	5829	502
Tf-s ANS 2	5845	502

Otopljena u vodi, ANS pokazuje slabu fluorescenciju. Dodatkom otopine nativnog apo-transferina dolazi do dramatičnog povećanja fluorescencije (povećanje oko 2-3 puta) koju prati promjena boje (maksimum emisije pomiče se s ≈ 515 nm na ≈ 480 nm). Porast emisije temelji se na prijelazu molekule ANS iz polarnog otapala u hidrofobnu okolinu na površini transferina. Molekule vode smanjuju energiju pobuđenog stanja ANS i uzrokuju gašenje

fluorescencije. Kod ANS dolazi do snažnog povećanja kvantnog prinosa koji je u vodenoj otopini jako nizak, a vezanjem za protein se znatno poveća.

Iz grafičkog prikaza rezultata na slici 10. uočava se značajna ovisnost intenziteta fluorescencije pri vezanju ANS na nativni apo-transferin o vrijednosti pH otopine, zbog čega je važno održavati pH vrijednost svih uzoraka jednakim prilikom mjerenja i prije donošenja zaključka o vezanju ANS na transferin.

Desijalizirani transferin s vezanom ANS pokazuje manje povećanje intenziteta fluorescencije u odnosu na nativni apotransferin s vezanim ANS (povećanje intenziteta fluorescencije za oko 8%) i pomak maksimuma prema 502 nm.

4.3. Određivanje stehiometrije vezanja ANS na Tf+s prema Jobovoj metodi

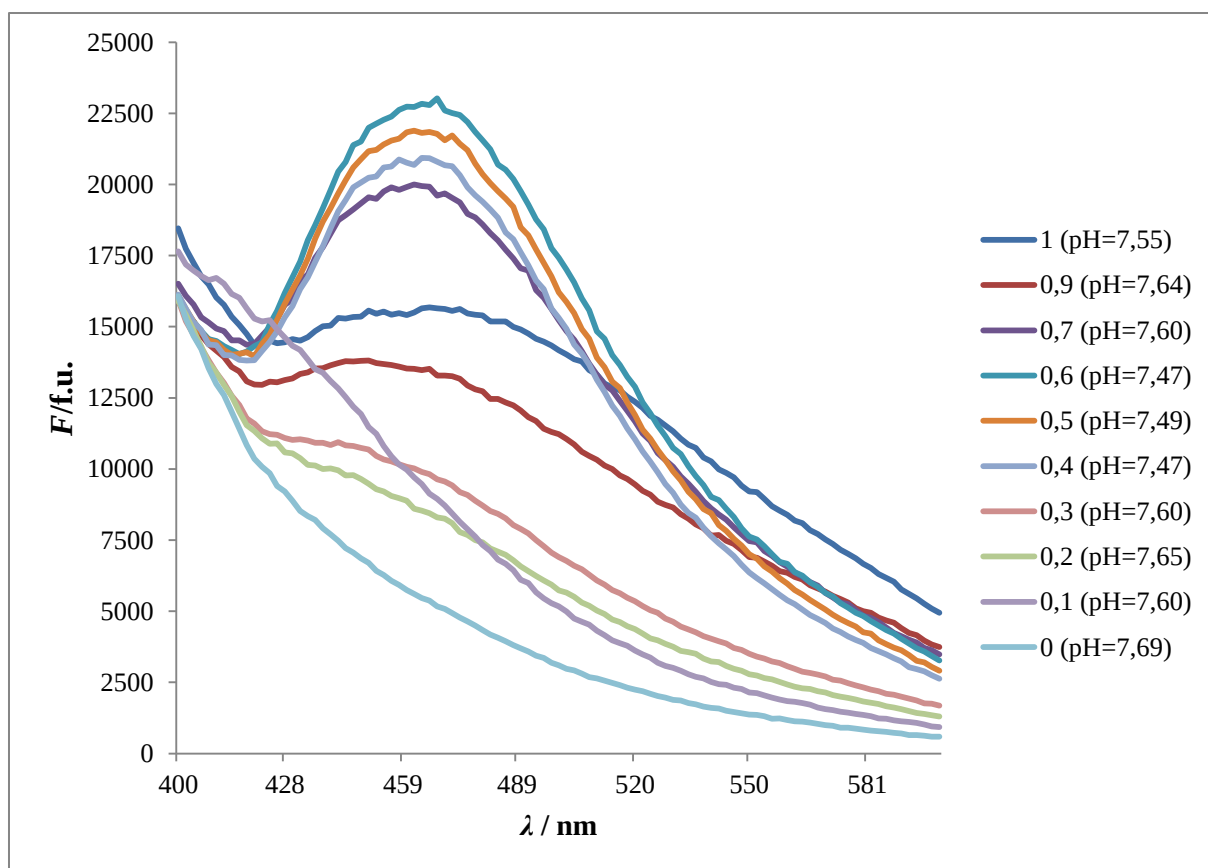
Rezultati određivanja stehiometrije vezanja ANS na humani apo-transferin prikazani su u tablici 5.

Tablica 5. Fluorescencijski spektri otopina različitog molarnog udjela ANS u otopini ANS i nativnog apo-transferina u rasponu valnih duljina od 400 do 600 nm. pH vrijednosti uzoraka izmjerene prije mjerenja pojedinog uzorka prikazane su u zagradama.

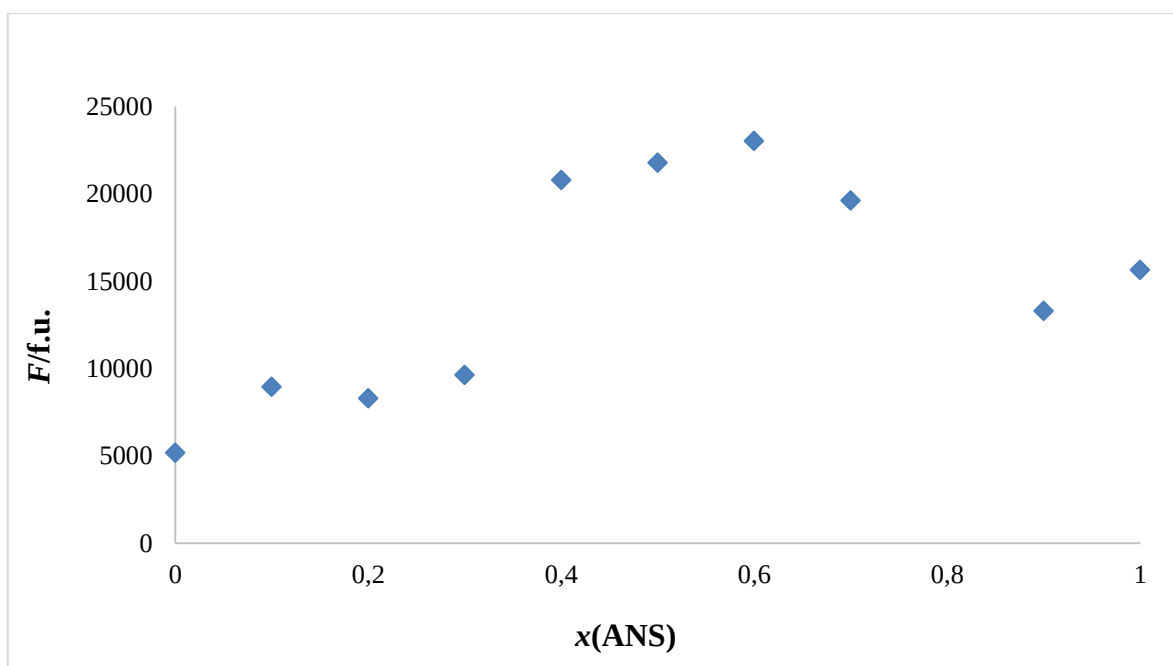
x(ANS); F/f.u. (pH)										
λ/nm	1 (7,55)	0,9 (7,64)	0,7 (7,60)	0,6 (7,47)	0,5 (7,49)	0,4 (7,47)	0,3 (7,60)	0,2 (7,65)	0,1 (7,60)	0 (7,69)
400	18464	15882	16514	15909	16101	16125	15950	15904	17653	16077
402	17738	15519	16080	15433	15623	15637	15192	15418	17189	15279
404	17246	15186	15786	15180	15181	15164	14723	14868	16974	14679
406	16772	14698	15331	14846	14808	14882	14261	14303	16780	14214
408	16485	14387	15157	14571	14520	14380	13829	13732	16638	13545
410	16029	14167	14940	14499	14457	14351	13384	13381	16714	12992
412	15773	13935	14853	14323	14179	14001	13023	12954	16511	12600
414	15357	13585	14525	14179	14019	13988	12571	12565	16158	12012
416	15058	13427	14526	14036	14051	13838	12254	12018	16014	11412
418	14752	13085	14359	14131	14106	13816	11780	11539	15642	10847
420	14368	12967	14393	14316	13963	13827	11599	11343	15287	10359
422	14414	12957	14695	14458	14397	14146	11322	11080	15189	10074
424	14510	13074	14985	15086	14726	14470	11222	10885	15225	9852

426	14417	13051	15276	15556	15236	14839	11197	10898	14905	9406
428	14450	13123	15771	16190	15808	15333	11094	10583	14618	9210
430	14572	13184	15965	16740	16309	15721	11019	10548	14334	8880
432	14513	13340	16648	17288	16805	16326	11040	10384	14181	8520
434	14635	13397	16823	18046	17390	16739	11003	10149	13842	8346
436	14852	13530	17426	18572	18099	17283	10924	10118	13506	8213
438	15016	13537	17795	19163	18696	17829	10919	10003	13384	7912
440	15040	13647	18266	19797	19166	18457	10844	10018	13088	7700
442	15306	13720	18737	20450	19685	19061	10946	9952	12839	7474
444	15283	13795	18923	20790	20148	19446	10835	9778	12533	7214
446	15346	13777	19127	21380	20601	19903	10813	9786	12192	7062
448	15350	13803	19336	21509	20884	20066	10740	9645	11930	6862
450	15566	13815	19550	21988	21174	20240	10687	9480	11472	6706
452	15452	13719	19500	22136	21220	20282	10461	9289	11234	6421
454	15538	13693	19756	22274	21404	20595	10335	9211	10810	6278
456	15419	13651	19900	22387	21542	20632	10273	9054	10446	6076
458	15475	13600	19807	22618	21612	20880	10166	8974	10153	5929
460	15411	13535	19909	22737	21831	20766	10079	8886	9972	5749
462	15501	13518	19999	22719	21891	20688	10022	8599	9702	5615
464	15641	13477	19950	22831	21807	20935	9901	8541	9474	5463
466	15675	13520	19919	22786	21841	20922	9814	8444	9133	5371
468	15648	13288	19611	23025	21780	20799	9635	8296	8947	5168
470	15620	13285	19683	22604	21555	20674	9561	8249	8711	5083
472	15560	13261	19527	22515	21720	20637	9427	8092	8429	4941
474	15625	13166	19370	22437	21426	20331	9185	7777	8144	4783
476	15471	12932	18967	22197	21206	19895	9090	7679	7880	4643
478	15420	12805	18839	21847	20736	19614	8880	7500	7620	4495
480	15394	12728	18591	21556	20365	19395	8718	7417	7332	4340
482	15183	12462	18286	21242	20048	19127	8519	7210	7115	4184
484	15181	12460	18032	20697	19760	18836	8419	7096	6812	4072
486	15182	12336	17710	20517	19511	18318	8263	6988	6664	3945
488	14999	12234	17402	20197	19209	18080	8031	6788	6446	3814
490	14909	12059	17057	19767	18490	17617	7896	6582	6111	3693
492	14762	11825	16971	19291	18208	17155	7735	6404	5990	3583
494	14576	11691	16286	18779	17712	16630	7500	6244	5669	3439
496	14477	11412	16014	18425	17248	16319	7283	6081	5456	3357
498	14341	11305	15622	17760	16773	15636	7063	5941	5285	3190
500	14169	11226	15235	17423	16207	15308	6908	5732	5168	3106
502	14032	11056	14845	17007	15873	14928	6773	5661	4995	2974
504	13855	10867	14548	16556	15479	14376	6597	5510	4748	2921
506	13782	10607	14142	15990	14911	14056	6481	5312	4631	2811
508	13478	10465	13700	15577	14574	13663	6290	5199	4533	2687
510	13314	10321	13316	14842	13914	13135	6085	5025	4313	2644
512	13004	10120	12954	14579	13577	12715	5936	4898	4156	2566
514	12868	9998	12767	14006	13071	12226	5746	4714	3978	2481

516	12762	9776	12399	13655	12844	11868	5631	4618	3879	2408
518	12546	9653	12049	13234	12340	11428	5476	4469	3787	2319
520	12360	9461	11673	12893	11902	11045	5351	4376	3618	2247
522	12147	9236	11250	12342	11382	10615	5183	4217	3482	2191
524	11869	9101	10984	11956	11072	10253	5033	4047	3369	2103
526	11729	8846	10565	11528	10672	9885	4951	3977	3192	2027
528	11534	8734	10315	11156	10316	9475	4746	3853	3082	1965
530	11329	8645	10072	10740	9916	9165	4632	3758	3014	1891
532	11070	8416	9742	10530	9602	8746	4467	3611	2915	1863
534	10855	8255	9481	10095	9205	8455	4361	3561	2792	1774
536	10736	8049	9204	9752	8945	8283	4261	3502	2691	1731
538	10408	7916	8871	9439	8592	7939	4122	3340	2643	1653
540	10268	7655	8614	9023	8446	7637	4037	3242	2522	1605
542	9990	7679	8400	8908	8024	7388	3951	3209	2442	1585
544	9865	7477	8222	8604	7822	7178	3871	3076	2414	1503
546	9705	7363	7951	8310	7546	6936	3709	2975	2315	1461
548	9412	7154	7708	7913	7311	6634	3636	2905	2267	1409
550	9206	6905	7462	7630	7004	6364	3507	2784	2145	1365
552	9185	6879	7420	7528	6846	6167	3407	2747	2127	1353
554	8957	6747	7116	7282	6574	5987	3337	2656	2041	1312
556	8688	6598	6948	7004	6397	5783	3232	2603	1962	1223
558	8541	6413	6722	6732	6161	5574	3183	2515	1902	1237
560	8386	6355	6567	6669	5976	5383	3069	2431	1837	1176
562	8188	6202	6363	6377	5740	5248	2980	2348	1817	1127
564	8098	6121	6202	6247	5593	5056	2875	2294	1775	1120
566	7853	5919	6027	6012	5394	4867	2830	2264	1715	1083
568	7716	5798	5900	5862	5233	4737	2778	2186	1613	1038
570	7528	5687	5642	5647	5063	4586	2708	2143	1563	996
572	7369	5542	5488	5515	4877	4391	2592	2060	1524	974
574	7164	5434	5303	5281	4719	4274	2565	2003	1475	909
576	7020	5306	5246	5124	4585	4110	2476	1959	1434	909
578	6862	5103	5034	4947	4468	3992	2396	1902	1394	870
580	6670	5003	4851	4829	4255	3889	2323	1831	1354	843
582	6520	4949	4770	4654	4212	3705	2246	1786	1318	811
584	6306	4778	4622	4494	3981	3594	2195	1736	1237	783
586	6171	4672	4431	4339	3840	3486	2095	1660	1219	758
588	6037	4601	4234	4213	3722	3347	2061	1614	1170	722
590	5773	4404	4127	4034	3626	3232	1997	1556	1138	701
592	5616	4241	4004	3863	3458	3035	1932	1490	1108	651
594	5453	4155	3902	3701	3264	2964	1859	1430	1073	646
596	5257	3972	3709	3580	3203	2888	1759	1396	1022	630
598	5094	3829	3625	3424	3042	2756	1746	1350	954	588
600	4948	3738	3483	3271	2911	2626	1687	1300	926	587



Slika 11. Fluorencijski spektar dobiven mjerenjem vezanja ANS na nativni apo-transferin (Tf+s) prema Jobovoj metodi. Brojevi u legendi označavaju množinski udio ANS u otopini s Tf+s.



Slika 12. Intenzitet fluorescencije pri $\lambda_{em} = 468$ nm dobiven mjerenjem vezanja ANS na Tf+s prema Jobovoj metodi.

Titracija otopina nativnog apo-transferina ANS-om prema Jobovoj metodi pokazala je najveći intenzitet fluorescencije za uzorak u kojem je množinski udio ANS prema transferinu bio 0,6 (Slika 11.). Iz navedenog se zaključuje da ANS i nativni apo-transferin stvaraju smjesu kompleksa u omjeru 1:1 i 2:1, gdje se jedna ili dvije molekule ANS mogu vezati na jednu molekulu transferina. Najveći intenzitet fluorescencije pri $\lambda_{em} = 468$ nm pokazuju i uzorci s množinskim udjelom ANS od 0,4 do 0,7 (Slika 12.). Za preciznije određivanje stehiometrije vezanja Jobovu metodu trebalo bi ponoviti u navedenom užem rasponu. Nadalje, s obzirom na ograničenja Jobove metode prema Ulatowski i sur. (2016), za validaciju dobivenih rezultata trebalo bi provesti analizu distribucije ostataka u pokusima titracije otopine Tf otopinom ANS.

5. ZAKLJUČCI

U ovom diplomskom radu proučavan je odnos između glikanske strukture i biokemijskih karakteristika humanog nativnog transferina. Glikozilacija stabilizira proteine stvarajući površinsku ovojnici koja se sastoji od intramolekularnih interakcija sijalinske kiseline i polipeptida. Promjena glikanske strukture proteina, točnije desijalinizacija nativnog transferina, dovodi do razotkrivanja površine proteina i potiče konformacijske promjene polipeptidnog lanca. Hidrofobnost površine ispitivana je 8-anilino-1-naftalensulfonskom kiselinom koja se koristi kao proba za ispitivanje konformacijskih prijelaza zbog njenog afiniteta prema parcijalno razotkrivenim hidrofobnim regijama na površini proteina.

Dodavanje ANS otopini nativnog apo-transferina potaknulo je značajan porast intenziteta fluorescencije, s maksimumom pri 480 nm. ANS u otopini desijaliniziranog transferina pokazala je slab porast fluorescencije u odnosu na samu otopinu ANS, koju karakterizira slab intenzitet fluorescencije pri 513 nm. Snažan, crveni pomak fluorescencije ANS u prisutnosti ljudskog nativnog apo-transferina sugerira da se proba veže za izloženi hidrofobni džep polipeptida, dok nedostatak skoka fluorescencije u otopini asijalo-apo-transferina ukazuje na manjak interakcija hidrofobne probe s proteinom. Dobiveni rezultati potvrđuju hipotezu različitog fluorescencijskog odziva fluorescentne probe ANS prilikom vezanja na različite glikoforme ljudskog serumskog transferina. (Nagae i sur. 2014)

Analiza stehiometrije vezanja nativnog apo-transferina i 8-anilino-1-naftalensulfonske kiseline koristeći Jobovu metodu pokazala je da se ANS i nativni apo-transferin vežu u omjerima 1:1 i 2:1, odnosno da jedna ili dvije molekule ANS mogu stvarati komplekse s jednom molekulom transferina. Prilikom određivanja stehiometrije vezanja treba imati na umu i neaktivnost proteina koja može dovesti do pogrešnog zaključka o stehiometriji vezanja, kao i heterogenu strukturu glikana nativnog apo-transferina. Prisutnost ili izostanak sijalinskih kiselina na krajevima glikanskih lanaca je tu posebno bitna jer, kao što je u ovome radu prikazano, asijalo- i nativni apo-transferin mogu pokazivati značajne razlike u sposobnosti vezanja ANS.

6. LITERATURA

1. Amani, S, Naeem, A. Transition of transferrin from native to fibrillar state: An implication for amyloid-linked diseases. *Biochemical Engineering Journal*, 2014, 91, 120–128.
2. Ardite, E, Egea, M.A, Haro, I, Reig, F, Alsina, M.A. Conformational changes and physicochemical properties of transferrin upon derivatization with cholesterol. *Analytica Chimica Acta*, 1994, 290, 75-85.
3. Belovari, T, Kibel, A, Kostović-Knežević, Lj. Transferin u zdravlju i bolesti. *Med. Vjesn*, 2006, 38(1-4): 21-24.
4. Brown, MP, Royer, C. Fluorescence spectroscopy as a tool to investigate protein interactions. *Current Opinion in Biotechnology*. 1997, 8, 45–49.
5. Cheng, Y, Zak, O, Aisen, P, Harrison, SC, Walz, T. Structure of the Human Transferrin Receptor-Transferrin Complex. *Cell*, 2004, 116, 565–576.
6. Cheng, D, Wang, X, Tang, J, Zhang, X, Wang, C, Li, H. Characterization of the binding and conformational changes of bovine serum albumin upon interaction with aluminum-maltol: a spectroscopic and molecular docking study. *Metallomics*, 2019, 11, 1625-1634.
7. Croney, JC, Jameson, DM, Learmonth, RP. Fluorescence spectroscopy in biochemistry: teaching basic principles with visual demonstrations. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 2001, 29, 60–65.
8. Daniels, TR, Bernabeu, E, Rodríguez, JA., Patel, S, Kozman, M, Chiappetta, DA, Holler, E, Ljubimova, JY, Helguera, G, Penichet, ML. The transferrin receptor and the targeted delivery of therapeutic agents against cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, 2012, 1820, 291–317.
9. De Jong, G, van Dijk, JP, van Eijk, HG. The biology of transferrin. *Clinica Chimica Acta*, 1999, 190, 1–46.
10. Deshpande, M, Sathe, SK. Interactions with 8-Anilino-naphthalene-1-sulfonic Acid (ANS) and Surface Hydrophobicity of Black Gram (*Vigna mungo*) Phaseolin. *Journal of Food Science*, 2018, 83, 1847–1855.
11. Drug, E, Fadeev, L, Gozin, M. The impact of highly hydrophobic material on the structure of transferrin and its ability to bind iron. *Toxicology Letters*, 2011, 203, 33–39.
12. Dufès, C, Al Robaian, M, Somani, S. Transferrin and the transferrin receptor for the

- targeted delivery of therapeutic agents to the brain and cancer cells. *Therapeutic Delivery*, 2013, 4, 629–640.
13. Eckenroth, BE, Mason, AB, McDevitt, ME, Lambert, LA, Everse, SJ. The structure and evolution of the murine inhibitor of carbonic anhydrase: A member of the transferrin superfamily: Crystal Structure and Evolution of mICA. *Protein Science*, 2010, 19, 1616–1626.
 14. Gasymov, OK, Glasgow, BJ. ANS fluorescence: Potential to augment the identification of the external binding sites of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, 2007, 1774, 403–411.
 15. Giansanti, F, Leboffe, L, Angelucci, F, Antonini, G. The Nutraceutical Properties of Ovotransferrin and Its Potential Utilization as a Functional Food. *Nutrients*, 2015, 7, 9105–9115.
 16. Gkouvatsos, K, Papanikolaou, G, Pantopoulos, K. Regulation of iron transport and the role of transferrin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, 2012, 1820, 188–202.
 17. Gomme, PT, McCann, KB, Bertolini, J. Transferrin: structure, function and potential therapeutic actions. *Drug Discovery Today*, 2005, 10, 267–273.
 18. Guliyeva, AJ, Gasymov, OK. ANS fluorescence: Potential to discriminate hydrophobic sites of proteins in solid states. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 2020, 24, 100843.
 19. Gussakovsky, E. Circularly Polarized Luminescence (CPL) of Proteins and Protein Complexes. U: Reviews in Fluorescence 2008. Geddes, C.D urednik, Springer New York, New York, 425–459.
 20. Guyett, PJ, Gloss, LM. Intermediates in Protein Folding. *Comprehensive Biophysics*, 2012, 43–71.
 21. Hawe, A, Sutter, M, Jiskoot, W. Extrinsic Fluorescent Dyes as Tools for Protein Characterization. *Pharm Res*, 2008, 25, 1487–1499.
 22. Helander, A, Beck, O. Analytical markers of acute and chronic alcohol consumption. U: Forensic Science Handbook of Analytical Separations, Vol. 6. Bogusz, M.J., urednik, Elsevier, 567–588.
 23. Huang, CY, Zhou, R, Yang DCH, Chock, PB. Application of the continuous variation method to cooperative interactions: mechanism of Fe(II)-ferrozine chelation and conditions leading to anomalous binding ratios. *Biophysical Chemistry*, 2003, 100, 143–149.
 24. James, NG, Mason, AB. Protocol to determine accurate absorption coefficients for

- iron-containing transferrins. *Analytical Biochemistry*, 2008, 378, 202–207
25. Jana, S, Dalapati, S, Ghosh, S, Guchhait, N. Study of microheterogeneous environment of protein Human Serum Albumin by an extrinsic fluorescent reporter: A spectroscopic study in combination with Molecular Docking and Molecular Dynamics Simulation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2012, 112, 48–58.
 26. Katritzky, A.R, Narindoshvili, T. Fluorescent amino acids: advances in protein-extrinsic fluorophores. *Org. Biomol. Chem.*, 2009, 7, 627–634.
 27. Kawabata, H. Transferrin and transferrin receptors update. *Free Radical Biology and Medicine*, 2019, 133, 46–54.
 28. Kleven, MD, Jue, S, Enns, CA. Transferrin Receptors TfR1 and TfR2 Bind Transferrin through Differing Mechanisms. *Biochemistry*, 2018, 57, 1552–1559.
 29. Klimtchuk, E, Venyaminov, S, Kurian, E, Wessels, W, Kirk, W, Prendergast, FG. Photophysics of ANS. I. Protein–ANS complexes: Intestinal fatty acid binding protein and single-trp mutants. *Biophysical Chemistry*, 2007, 125, 1–12.
 30. Klymchenko, AS, Mely, Y. Fluorescent Environment-Sensitive Dyes as Reporters of Biomolecular Interactions. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 2013, 113, 35–58.
 31. Ladokhin, AS. Fluorescence Spectroscopy in Peptide and Protein Analysis, in: Encyclopedia of Analytical Chemistry. Meyers, R.A. (Ed.), John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, pp. 5762-5779.
 32. Lakowicz, JR. Principles of Fluorescence Spectroscopy. Springer Science+Business Media, New York, 1999, 1-23.
 33. Lambert, LA. Molecular evolution of the transferrin family and associated receptors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, 2012, 1820, 244–255.
 34. Lambert, LA, Perri, H, Halbrooks, PJ, Mason, AB. Evolution of the transferrin family: Conservation of residues associated with iron and anion binding. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2005, 142, 129–141.
 35. Larive, CK, Lunte, SM, Zhong, M, Perkins, MD, Wilson, GS, Gokulrangan, G, Williams, T, Afroz, F, Schöneich, C, Derrick, TS, Middaugh, CR, Bogdanowich-Knipp, S. Separation and Analysis of Peptides and Proteins. *Anal. Chem.*, 1999, 71, 389–423. Macedo, M, Sousa, M. Transferrin and the Transferrin Receptor: Of Magic Bullets and Other Concerns. *Inflammation & Allergy - Drug Targets*, 2008, 7, 41-52.

36. Milman, N, Paszkowski, T, Cetin, I, Castelo-Branco, C. Supplementation during pregnancy: beliefs and science. *Gynecological Endocrinology*, 2016, 32, 509–516.
37. Morgan, EH. Transferrin, biochemistry, physiology and clinical significance. *Molecular Aspects of Medicine*, 1981, 4, 1–123.
38. Murakami, Y, Saito, K, Ito, H, Hashimoto, Y. Transferrin isoforms in cerebrospinal fluid and their relation to neurological diseases. *Proc. Jpn. Acad., Ser. B*, 2019, 95, 198–210.
39. Nagae, M, Morita-Matsumoto, K, Arai, S, Wada, I, Matsumoto, Y, Saito, K, Hashimoto, Y, Yamaguchi, Y. Structural change of N-glycan exposes hydrophobic surface of human transferrin. *Glycobiology*, 2014, 24, 693–702.
40. Nigović, B, Mornar Turk, A, Sertić, M, Jurišić Grubešić, R, Vuković Rodriguez, J. Vježbe iz analitike lijekova – priručnik za studente. Zagreb, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, 2019.
41. Odak, I, Škorić, I. Organska fotokemija – principi i primjena. Zagreb, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, 2017, 44-51.
42. Olson, EJ, Bühlmann, P. Getting More out of a Job Plot: Determination of Reactant to Product Stoichiometry in Cases of Displacement Reactions and n:n Complex Formation. *The Journal of Organic Chemistry*. 2011, 76, 8406–8412.
43. Ota, C, Takano, K. Spectroscopic Analysis of Protein-Crowded Environments Using the Charge-Transfer Fluorescence Probe 8-Anilino-1-Naphthalenesulfonic Acid. *ChemPhysChem*, 2019, 20, 1456-1466.
44. Ponka, P, Lok, CN. The transferrin receptor: role in health and disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 1999, 31, 1111–1137.
45. Qadeer, A, Rabbani, G, Zaidi, N, Ahmad, E, Khan, JM, Khan, RH. 1-Anilino-8-Naphthalene Sulfonate (ANS) Is Not a Desirable Probe for Determining the Molten Globule State of Chymopapain. *PLoS ONE*, 2012, 7, e50633.
46. Qu, P, Lu, H, Yan, S, Zhou, D, Lu, Z. Investigations of effects of environmental factors in unfolding/refolding pathway of proteins on 8-anilino-1-naphthalene-sulfonic acid (ANS) fluorescence. *Journal of Molecular Structure*, 2009, 936, 187–193.
47. Renny, JS, Tomasevich, LL, Tallmadge, EH, Collum, DB. Method of Continuous Variations: Applications of Job Plots to the Study of Molecular Associations in Organometallic Chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2013, 52, 2–18.
48. Rocha, FS, Gomes, AJ, Lunardi, CN, Kaliaguine, S, Patience, GS. Experimental methods in chemical engineering: Ultraviolet visible spectroscopy-UV-Vis. *Can. J.*

- Chem. Eng.*, 2018, 96, 2512–2517.
49. Royer, CA. Fluorescence Spectroscopy. *Methods Mol Biol*, 1995, 40, 65-89.
50. Royer, CA. Approaches to teaching fluorescence spectroscopy. *Biophysical Journal*, 1995, 68, 1191–1195.
51. Sanz-Nebot, V, Balaguer, E, Benavente, F, Neusüß, C, Barbosa, J. Characterization of transferrin glycoforms in human serum by CE-UV and CE-ESI-MS. *Electrophoresis*, 2007, 28, 1949–1957.
52. Saraga, R. Utjecaj glikozilacije, sinergističkog aniona i pH na vezanje željeza na humani serumski transferin. 2020. diplomski rad
53. Silva, AMN, Moniz, T, de Castro, B, Rangel, M. Human transferrin: An inorganic biochemistry perspective. *Coordination Chemistry Reviews*, 2021, 449, 214186.
54. Sreedhara, A, Flengsrud, R., Langsrud, T, Kaul, P, Prakash, V, Vegarud, GE. Structural characteristic, pH and thermal stabilities of apo and holo forms of caprine and bovine lactoferrins. *Biometals*, 2009, 23, 1159–1170.
55. Steere, AN, Byrne, SL, Chasteen, ND, Mason, AB. Kinetics of iron release from transferrin bound to the transferrin receptor at endosomal pH. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, 2012, 1820, 326–333.
56. Sun, H, Li, H, Sadler, PJ. Transferrin as a Metal Ion Mediator. *Chem. Rev.*, 1999, 99, 2817–2842.
57. Szőke, D, Panteghini, M. Diagnostic value of transferrin. *Clinica Chimica Acta*, 2012, 413, 1184–1189.
58. Tandara, L, Salamunic, I. Iron metabolism: current facts and future directions. *Biochemia Medica*, 2012, 22, 311-328.
59. Thordarson, P, Brynn Hibbert, D. The death of the Job plot, transparency, open science and online tools, uncertainty estimation methods and other developments in supramolecular chemistry data analysis. *Chem. Commun.*, 2016, 52, 12792-12805.
60. Tissue, BM. Ultraviolet and visible absorption spectroscopy. *Characterization of Materials*, 2002, 2, 688-698.
61. Toljanić, B. Hepcidin kao ključni regulator homeostaze željeza. 2012, završni rad
62. Ulatowski, F, Bałakier, T, Dąbrowa, K, Jurczak, J. Recognizing the Limited Applicability of Job Plots in Studying Host–Guest Interactions in Supramolecular Chemistry. *J. Org. Chem*, 2016, 81, 1746–1756. Vincent, JB, Love, S. The binding and transport of alternative metals by transferrin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, 2012, 1820, 362–378.

63. Vincent, JB, Love, S. The binding and transport of alternative metals by transferrin. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2012, 1820, 362–378.
64. Wally, J, Buchanan, SK. A structural comparison of human serum transferrin and human lactoferrin. *Biometals*, 2007, 20, 249–262.
65. Walters, J, Milam, SL, Clark, AC. Practical Approaches to Protein Folding and Assembly: Spectroscopic Strategies in Thermodynamics and Kinetics. *Methods in Enzymology*, 2009, 455. 1–39.
66. Weidmann, H, Bannasch, JH, Waldeyer, C, Shrivastava, A, Appelbaum, S, Ojeda-Echevarria, FM, Schnabel, R, Lackner, KJ, Blankenberg, S, Zeller, T, Karakas, M. Iron Metabolism Contributes to Prognosis in Coronary Artery Disease: Prognostic Value of the Soluble Transferrin Receptor Within the AtheroGene Study. *JAHA*, 2020, 9, 1-14.
- Yan, X, He, B, Liu, L, Qu, G, Shi, J, Hu, L, Jiang, G. Antibacterial mechanism of silver nanoparticles in *Pseudomonas aeruginosa*: proteomics approach. *Metallomics*, 2018, 10, 557–564.
67. Yu, XC, Strobel, HW. Interactions of 8-anilino-1-naphthalenesulfonic acid (ANS) and cytochrome P450 2B1: Role of ANS as an effector as well as a reporter group. *Mol Cell Biochem*, 1996, 162, 89-95.

7. SAŽETAK

U sklopu ovoga diplomskog rada proučavan je utjecaj vezanja hidrofozne probe, 8-anilino-1-naftalensulfonske kiseline, na intenzitet fluorescencije humanog nativnog apo-transferina i desijaliziranog transferina, kao i stehiometrija vezanja kiseline na nativni protein. Ispitivanje hidrofnosti provedeno je u fosfatnom puferu koncentracije 50 mM, dok je analiza stehiometrije vezanja hidrofozne probe na ljudski apo-transferin provedena u fosfatnom puferu koncentracije 170 mM, a oba ispitivanja provedena su pri fiziološkom pH i temperaturi od 25°C. Tehnike koje su korištene u eksperimentalnom dijelu rada su UV-Vis spektrofotometrija i fluorescencijska spektrofotometrija. Rezultati su obrađeni u programu Microsoft Excel.

Dodatak 8-anilino-1-naftalensulfonske kiseline otopini ljudskog nativnog apo-transferina uzrokovao je primjetan porast intenziteta fluorescencije (za oko 130%), što pokazuje da se proba veže za izloženi džep na površini polipeptidnog lanca. Analizom otopine probe i desijaliziranog ljudskog apo-transferina primjećen je manji porast intenziteta fluorescencije (za oko 8%), što znači da nije došlo do značajnih hidrofnih interakcija kao u slučaju nativnog apo-transferina.

Ispitivanje stehiometrije vezanja 8-anilinonaftalensulfonske kiseline i ljudskog nativnog apo-transferina uz pomoć Jobove metode ukazuje na to da postoje dvije vrste vezanja, točnije da se proba i protein vežu u omjeru 1:1 i 2:1, gdje se jedna molekula ANS veže na jednu molekulu transferina odnosno gdje se dvije molekule ANS vežu na jednu molekulu ljudskog nativnog apo transferina.

8. SUMMARY

The aim of this thesis was to study the influence of binding of the hydrophobic probe, 8-anilino-1-naphthalenesulfonic acid, on the fluorescence intensity of human native apo-transferrin and desialylated transferrin, as well as the stoichiometry of ANS binding to the native protein. The hydrophobicity test was performed in a phosphate buffer with a concentration of 50 mM, while the analysis of the stoichiometry of binding of the hydrophobic probe to human apo-transferrin was performed in a phosphate buffer with a concentration of 170 mM, and both tests were performed at physiological pH and temperature of 25°C. The techniques used in the experimental part of the thesis are UV-Vis spectrophotometry and fluorescence spectrophotometry. The results were processed in Microsoft Excel.

Addition of 8-anilino-1-naphthalenesulfonic acid to a solution of human native apo-transferrin caused a marked increase in fluorescence intensity (around 130% increase), indicating that the probe binds to an exposed pocket on the surface of the polypeptide chain. Analysis of the solution containing the probe and desialylated human apo-transferrin did not show a major increase in fluorescence intensity (around 8% increase), which indicates that no significant hydrophobic interactions occurred as was the case with native apo-transferrin solution.

Analysis of the stoichiometry of binding of 8-anilinonaphthalenesulfonic acid and human native apo-transferrin using Job's plot indicates that there are two types of binding, more precisely, that the hydrophobic probe and protein bind in a ratio of 1:1 and 2:1, meaning that one or two molecules of ANS can bind to one molecule of human native apo transferrin

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

ISPITIVANJE RAZLIKE U HIDROFOBNOСТИ NATIVNOG I DESIJALINIZIRANOG TRANSFERINA REAKCIJOM SA 8-ANILINONAFTALENSULFONSKOM KISELINOM

Tamara Atelj

SAŽETAK

U sklopu ovoga diplomskog rada proučavan je utjecaj vezanja hidrofobne probe, 8-anilino-1-naftalensulfonske kiseline, na fluorescenciju humanog nativnog apo-transferina i desijaliniziranog transferina, kao i stehiometrija vezanja kiseline na nativni protein. Ispitivanje hidrofobnosti provedeno je u fosfatnom puferu koncentracije 50 mM, dok je analiza stehiometrije vezanja hidrofobne probe na ljudski apo-transferin provedena u fosfatnom puferu koncentracije 200 mM, a ispitivanja provedena su pri neutralnoj vrijednosti pH i temperaturi od 25°C. Tehnike koje su korištene u eksperimentalnom dijelu rada su UV-Vis spektrofotometrija i fluorescencijska spektroskopija. Rezultati su obrađeni u programu Microsoft Excel. Dodatak ANS otopini ljudskog nativnog apo-transferina uzrokovao je primjetan porast intenziteta fluorescencije, što ukazuje na to da se proba veže za izloženi džep na površini polipeptidnog lanca. Analizom otopine ANS i desijaliziranog ljudskog apo-transferina nije primjećen porast intenziteta fluorescencije, što znači da nije došlo do hidrofobnih interakcija kao u slučaju nativnog apo-transferina. Ispitivanje stehiometrije vezanja ANS i ljudskog nativnog apo-transferina korištenjem Jobove metode ukazuje na to da se proba i protein vežu u omjeru 1:1 i 2:1.

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

Rad sadrži: 50 stranica, 12 grafičkih prikaza, 5 tablica i 67 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: transferin, 8-anilinaftalensulfonska kiselina, fluorescencija, stehiometrija vezanja, Jobova metoda

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

Ocjenjivači: **izv. prof. dr. sc. Tin Weitner**, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.
prof. dr. sc. Mario Gabričević, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.
doc. dr. sc. Davor Šakić, docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: rujan 2022.

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

ANALYSIS OF THE DIFFERENCE IN HYDROPHOBICITY OF NATIVE AND DESIALYLATED TRANSFERRIN BY REACTION WITH 8- ANILINONAPHTHALENESULFONIC ACID

Tamara Atelj

SUMMARY

As part of this thesis, the influence of binding of the hydrophobic probe, 8-anilino-1-naphthalenesulfonic acid, on the fluorescence of human native apo-transferrin and desialylated transferrin, as well as the stoichiometry of ANS binding to the native protein, were studied. The hydrophobicity test was performed in a phosphate buffer with a concentration of 50 mM, while the analysis of the stoichiometry of binding of the hydrophobic probe to human apo-transferrin was performed in a phosphate buffer with a concentration of 200 mM, and both tests were performed at a neutral value pH and temperature of 25°C. The techniques used in the experimental part of the thesis are UV-Vis spectrophotometry and fluorescence spectroscopy. The results were processed in Microsoft Excel. Addition of ANS to a solution of human native apo-transferrin caused a marked increase in fluorescence intensity, indicating that the probe binds to an exposed pocket on the surface of the polypeptide chain. Analysis of the solution containing the probe and desialylated human apo-transferrin did not show an increase in fluorescence intensity, which indicates that no hydrophobic interactions occurred as was the case with native apo-transferrin solution. Analysis of the stoichiometry of binding of ANS and human native apo-transferrin using Job's plot indicates that the hydrophobic probe and protein bind in a ratio of 1:1 and 2:1.

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

Thesis includes: 50 pages, 12 figures, 5 tables and 67 references. Original is in Croatian language.

Keywords: transferrin, 8-anilinonaphthalenesulfonic acid, fluorescence, stoichiometry of binding, Job's plot

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

Reviewers: **Tin Weitner, Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Mario Gabričević, Ph.D. *Full 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 2022.

