

Utjecaj promjene glikozilacije humanog serumskog transferina na otpuštanje željeza u prisutnosti kompetitivnog kelatora EDTA

Deriš, Helena

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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:163:525460>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-20**



Repository / Repozitorij:

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



Helena Deriš

**Utjecaj promjene glikozilacije humanog
serumskog transferina na otpuštanje željeza u
prisutnosti kompetitivnog kelatora EDTA**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2017.

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

Prvenstveno se zahvaljujem svojem mentoru Tinu Weitneru na pruženoj pomoći, mnogobrojnim savjetima, povjerenju i strpljenju tijekom izrade ovog diplomskog rada. Zahvaljujem se i ostatku Zavoda za opću i anorgansku kemiju, izv. prof. dr. sc. Mariju Gabričeviću na savjetima te dr. sc. Davoru Šakiću na pomoći. Također, zahvaljujem se mami i tati na izdašnoj financijskoj potpori za vrijeme studiranja.

Sadržaj

| | |
|---|----|
| 1. UVOD | 1 |
| 1.1. Transferin | 1 |
| 1.1.1. Struktura i polimorfizam transferina | 1 |
| 1.1.2. Karakteristike veznog mjesta i vezanje željeza | 3 |
| 1.1.3. Otpuštanje željeza | 5 |
| 1.1.4. Receptor transferina (TFR) i in vivo otpuštnje željeza | 6 |
| 1.1.5. Uloge transferina u organizmu | 7 |
| 1.1.6. Mogućnosti kliničke primjene transferina | 8 |
| 1.2. Željezo | 10 |
| 1.2.1. Cirkuliranje željeza u organizmu | 11 |
| 1.2.2. Željezo i bolesti | 11 |
| 2. OBRAZLOŽENJE TEME | 14 |
| 3. MATERIJALI I METODE | 15 |
| 3.1. Materijali | 15 |
| 3.1.1. Korištene tvari | 15 |
| 3.1.2. Priprema otopina | 15 |
| 3.1.3. Korišteni instrumenti: | 17 |
| 3.2. Metode | 17 |
| 3.2.1. Spektrofotometrija u UV-Vis području | 17 |
| 3.2.2. Kemijska ravnoteža | 20 |
| 3.2.3. Mjerenje i račun | 21 |
| 4. REZULTATI I RASPRAVA | 25 |
| 5. ZAKLJUČCI | 33 |
| 6. LITERATURA | 34 |
| 7. SAŽETAK / SUMMARY | 37 |
| TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/ BASIC DOCUMENTATION CARD | |

1. UVOD

1.1. Transferin

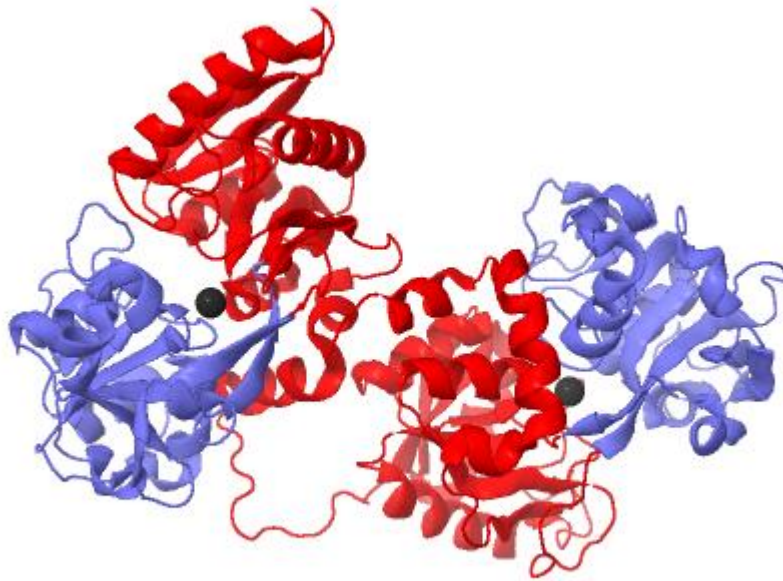
Humani serumski transferin (siderofilin, sTf) glavni je transportni protein željeza u organizmu. Pripada u $\beta 1$ globuline te je dio obitelji transferina, homolognih glikoproteina koji vežu željezo te time reguliraju razinu slobodnog željeza u organizmu. U obitelji transferina još se nalaze i laktoferin (Lf), ovotransferin (oTf) te membranski vezani melanotransferin (mTf) (Andrews i Schmidt, 2007; Lambert, 2012).

Primarno mjesto sinteze transferina su hepatociti, no moguća je sinteza i u drugim tkivima poput mozga (oligodendriti), testisa (Sertolijeve stanice) i nekih tumora (stanice karcinoma dojke i metastatskih melanoma). Tijelo odraslog čovjeka sadrži otprilike 14 g transferina, od čega je više od pola u serumu, gdje mu je vrijeme poluživota 8.8 dana. Osim u serumu, transferin je pronađen i u amnionskoj i cerebrospinalnoj tekućini, limfi, mlijeku, slini, suzama i žuči. Četvrti je najzastupljeniji protein plazme gdje se nalazi u koncentraciji od 2.5 g/L te zauzima 4% od ukupnog proteinskog sastava. Glavna uloga transferina je transport željeza od mjesta apsorpcije u duodenumu do svih ostalih tkiva (Macedo i Sousa, 2008; Welch, 1992).

1.1.1. Struktura i polimorfizam transferina

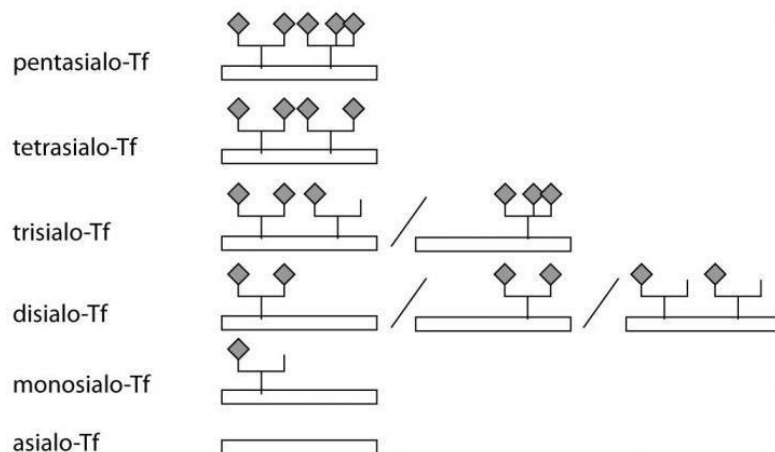
Transferin je monomerni glikoprotein molekulske mase oko 79 600 Da. Sastoji se od jednog polipeptidnog lanca od 679 aminokiselina i dva N-vezana oligosaharidna lanca, koji se nalaze na asparaginskim ostacima (Asn432 i Asn630) C-domene (Ghanbari i sur., 2016; Gruszevska i sur., 2016).

Polipeptidni lanac podijeljen je u dvije homologne domene, N-domenu (1 - 331 AK) i C-domenu (339 - 679 AK), koje su odvojene kratkom peptidnom poveznicom. Svaka od tih domena podijeljena je u dvije subdomene, N1(1 - 92 i 247 - 331 AK) i N2 (93 - 246 AK) te C1 (339 - 425 AK) i C2 (426-527 AK), koje se sastoje od niza α -heliksa, koji čine okosnicu β -ploče (Ghanbari i sur., 2016; Nagae i sur., 2014). Subdomene su povezane tako da čine zglob, što im omogućuje mobilnost kod vezanja željeza. Bilobalna tercijarna struktura transferina učvršćena je s 19 disulfidnih veza te zaštićena ugljikohidratnim lancima (Gruszevska i sur., 2016).



Slika 1. Bilobalna struktura transferina s vezanim željezom (crne sfere) na obje domene (www.chemtube3d.com).

Za transferin je karakteristična pojava mikroheterogenije, što znači da se transferin odlikuje većim brojem izoformi, koje su posljedica varijacija u glikozilaciji N-vezanih oligosaharidnih lanaca. N-vezani glikanski lanci razlikuju se u stupnju grananja te mogu tvoriti mono-, bi-, tri- i tetra-antelarne strukture, koje završavaju negativno nabijenom sijalinskom kiselinom. Serumski transferin se najčešće pojavuje u glikoformi s dvije biantelarne strukture. Ovisno o broju sijalinskih završetaka na ugljikohidratnom lancu, razlikujemo devet izoformi transferina, od asijalotransferina do oktasijalotransferina, od kojih svaka pokazuje različitu izoelektričnu točku, pI. U zdravih ljudi dominantna forma je tetrasijalotransferin (64 - 80%) s izoelektričnom točkom $pI = 5.4$ (Coddeville i sur., 1998; Gruszevska i sur., 2016). Kod nekih urođenih bolesti, poput kongenitalnog poremećaja glikozilacije (CDG) te kod hepatocelularnog karcinoma ili kronične konzumacije alkohola, često dolazi do nedostatne glikozilacije lanaca ili čak do potpunog izostanka N-glikana. Neefektivna glikozilacija dovodi do reduciranja ukupnog broja sijalinskih ostataka te posljedično smanjenja ukupnog negativnog naboja i porasta izoelektrične točke. Gubitkom jednog sijalinskog ostatka dolazi do porasta izoelektrične točke za 0.1 pH jedinicu. Pojava takvih struktura sa smanjenom glikozilacijom detektira se izoelektričnim fokusiranjem, kromatografijom ionske izmjene te masenom spektrometrijom (Nagae i sur., 2014; Van Campenhout, 2004).



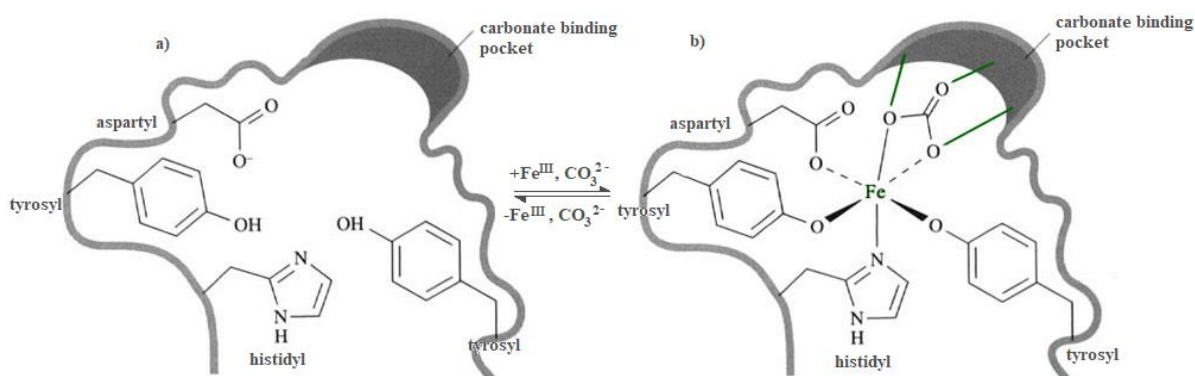
Slika 2. Shematski prikaz najčešćih glikoformi transferina. Najčešće prisutna forma u zdravih ljudi je biantenarna struktura s četiri sialinska završetka, tetrasijalotransferin (Goreta i sur., 2012).

1.1.2. Karakteristike veznog mjesta i vezanje željeza

Transferin sadrži po jedno vezno mjesto za željezo na svakoj domeni (N- i C-vezno mjesto). Iako je primarna struktura N- i C-domene homologna približno 40%, između domena postoji jasna razlika u stabilnosti te kinetici vezanja i otpuštanja željeza (Chung, 1984). Subdomene se međusobno postavljene tako da ograđuju pukotinu gdje se nalaze mjesta za vezanje željeza. Sa stražnje strane svake pukotine nalaze se dvije antiparalelne β ploče, koje sadrže zglobo mjesto gdje se povezuju dvije subdomene, što omogućuje približavanje i odmicanje subdomena tj. zatvaranje i otvaranje pukotine. Pukotina u koju se veže željezo je hidrofilna, sadrži puno polarnih ostataka aminokiselina i 10-20 molekula vode, što ju čini prikladnom za vezanje ionskog željeza (Baker i sur., 2003).

Željezo sadrži šest koordinatnih mjesta, za četiri mjesta ligandi su visoko konzervirane aminokiseline s transferinskog polipeptidnog lanca, a na peto i šesto koordinatno mjesto veže se sinergistički anion – karbonat (CO_3^{2-}). Četiri proteinska liganda su karboksilatni kisik, dva fenolna kisika i imidazolni dušik s postraničnih lanaca aminokiselina: Asp63, Tyr95, Tyr188 i His249 s N-subdomene te Asp392, Tyr426, Tyr517 i His585 s C-domene. Distorzirana oktaedralna koordinacija željeza upotpunjena je karbonatom, koji kao bidentatni ligand koordinira željezo svojim atomima kisika, a on sam je fiksiran na transferin preko dvije vodikove veze s argininskim ostacima (Arg124 iz N-domene i Arg456 iz C-domene), jednom vodikovom vezom s alaninskim ostacima (Ala126 / Ala458) te jednom vezom sa serinom (Ser125) iz N-domene, tj. tirozinom i glicinom (Tyr517, Gly459) iz C-domene (Baker i sur.,

2003; Ghanbari i sur., 2016; Harris, 2012; Steere i sur., 2012). U otvorenoj konformaciji apo-transferina, proteinski ligandi su u direktnom kontaktu s medijem, a prilikom koordiniranja željeza dolazi do „zatvaranja“ konformacije i željezo se nalazi 10 Å ispod površine transferina. Neto naboj proteinskih liganada iznosi -3, što odgovara naboju Fe^{3+} , dok je naboj s karbonata kompenziran pozitivno nabijenim postraničnim lancima arginina (Baker i sur., 2003). Karbonat kao sinergistički anion ne samo da sudjeluje u koordiniranju željeza, nego i u neutralizaciji pozitivnog naboja unutar veznog mjesta, čime ga čini pristupačnijim za vezanje željeza (Ghanbari i sur., 2016).



Slika 3. Shematski prikaz veznog mjesta željeza u transferinu s odgovarajućim proteinskim ligandima (a). Vezanje sinergističkog karbonata vodikovim vezama (zeleno) te vezanje liganada na 6 koordinativnih mjesta željeza (b) (www.open.edu).

Prilikom ispitivanja vezanja željeza, dodatkom otopine željezova (III) perklorata i bikarbonata u pH-neutralnu otopinu apo-transferina, zapažena su četiri kinetička procesa, detektirana fluorescencijskom emisijom u području od 300 do 400 nm s ekscitacijskom valnom duljinom od 280 nm. Prvi proces pripisan je prijenosu Fe^{3+} s kelatora (NTA) na C-vezno mjesto transferina povezanog s karbonatom. Potom dolazi do gubitka jednog protona s proteina te se željezo koordinacijski veže na fenolatni kisik jednog od dvaju raspoloživih tirozina. U drugom koraku smjesta dolazi do konformacijske promjene, otpuštanja drugog protona te povezivanja željeza s drugim tirozinskim fenolatom. Tijekom tog procesa dolazi do veće konformacijske promjene u C-domeni, dvije subdomene se približe i počinju zatvarati pukotinu oko željeza. Takva konformacijska promjena C-domene okida konformacijsku promjenu u N-domeni, što rezultira vrlo brzim vezanjem željeza i na N-domenu. Četvrti proces obuhvaća završnu konformacijsku promjenu, tijekom koje holo-transferin ($\text{Fe}_2\text{-Tf}$) ulazi u stanje ravnoteže. Protein prelazi iz otvorene konformacije apo-transferina u zatvorenu

konformaciju holo-transferina te veže željezo afinitetom 10^{21} M^{-1} na C-domeni i 10^{20} M^{-1} na N-domeni. Vezanje na C-domenu prethodi vezanju na N-domenu iz razloga što je u fiziološkom mediju 30% C-domene u već postojećoj interakciji s karbonatnim anionom, koji se u serumu nalazi u koncentraciji od 20-25 mM, što nije slučaj kod N-domene (El Hage Chahine i sur., 2012).

1.1.3. Otpuštanje željeza

Na otpuštanje željeza utječe velik broj faktora kao što su prisutnost receptora transferina (TFR) ili kelatora, pH, prisutnost soli te kooperativnost između domena. Kinetičke studije su pokazale kako se željezo iz $\text{Fe}_2\text{-Tf}$ u 96% slučajeva brže otpušta s N-domene, a zatim sporije s C-domene, u prisutnosti kelatora EDTA i bez prisutnosti TFR. Također, bez prisutnosti TFR do izražaja dolazi kooperativnost među domenama. Točnije, otpuštanje s N-domene je osjetljivo na C-domenu, dok C-domena ne ovisi o N-domeni. U slučaju kada je $\text{Fe}_2\text{-Tf}$ vezan na TFR, situacija je obrnuta, u 65% slučajeva se željezo najprije otpušta s C-domene (Eckenroth i sur., 2011).

Iako je vezno mjesto za željezo podjednako u obje domene, one ipak nisu kemijski ekvivalentne te se odlikuju različitim mehanizmom otpuštanja željeza. Razlog tome je u aminokiselinskim ostacima koji ne koordiniraju željezo direktno, već su vodikovim vezama povezani s aminokiselinskim ligandima (tzv. „second-shell“ ostaci). U N-domeni tu ulogu vrši „dilizinski okidač“ koji se sastoji od Lys296 u N1-subdomeni i Lys206 u N2-subdomeni te se nalazi nasuprot udubine u koju se veže željezo. Kada je apo-transferin u otvorenoj konformaciji, lizinski ostaci udaljeni su 9 Å. Postranični lanci lizina su usmjereni jedan prema drugom te su povezani vodikovom vezom kada je holo-transferin (ili monoferični $\text{Fe}_\text{N}\text{-Tf}$) u zatvorenoj konformaciji te su tada udaljeni 3.4 Å. U C-domeni dilizinski okidač zamjenjuje trijada ostataka – Lys534 iz C2, Arg632 i Asp634 iz C1-subdomene. Bez prisutnosti TFR, otpuštanje željeza s N-domene ovisi o protonaciji dilizinskog okidača (Lys206 i Lys296). Lizinski ostaci tvore vodikove veze u neutralnom pH, no čim se nađu u niskom pH, dolazi do brzog pucanja tih veza i otpuštanja željeza. Otpuštanje željeza s C-domene je izuzetno sporo i neosjetljivo na N-domenu. Takvo ponašanje pripisuje se "trijadi ostataka" koja ograničava brzinu otpuštanja.

Prisutnost soli također utječe na otpuštanje željeza s proteina, štoviše, da bi došlo do otpuštanja, nužno je vezanje nesinergističkog aniona, npr. Cl^- , na posebno mjesto proteina u zatvorenoj konformaciji. Pozitivno nabijeni „second-shell“ aminokiselinski ostaci (lizin,

arginin, histidin) koji sudjeluju u vezanju soli čine tzv. KISAB (kinetički značajno vezanje aniona) mjesto u svakoj domeni. Pri niskom pH medija (pH = 5.6) prisutnost aniona vezanih na KISAB ubrzava otpuštanje željeza s N-domene, dok u neutralnom pH (pH = 7.4) ubrzava otpuštanje željeza sa C-domene. Također se pretpostavlja da nakon otpuštanja željeza anioni igraju ulogu u stabiliziranju otvorene konformacije proteina (moguća interakcija sa sulfatnim veznim mjestima u N-domeni) (Baker i sur., 2003; Byrne i sur., 2010; Eckenroth i sur., 2011; Nagae i sur., 2014; Steere i sur., 2012).

1.1.4. Receptor transferina (TFR) i otpuštanje željeza in vivo

Specifični transferinski receptor, TFR, je homodimerni transmembranski glikoprotein tipa II koji veže po dvije molekule transferina. Sastoji se od kratkog intracelularnog N-terminusa (1 - 67 AK), transmembranske regije (68 - 88 AK), okosnice, (89 - 120 AK) koja dvjema disulfidnim vezama povezuje monomere te na koju se nastavlja velika ektodomena (121 - 760 AK) koja veže transferin.

Pri neutralnom pH, TFR preferencijalno veže Fe₂-Tf, dok se monomerne specije (Fe_C-Tf i Fe_N-Tf) vežu podjednakim afinitetom. S druge strane, pri kiselom pH, preferirano se veže apo-transferin (Eckenroth i sur., 2011; Macedo i Sousa, 2008).

Transferin se za receptor veže preko N-domene (N1 i N2-subdomena sudjeluju u interakciji) te preko C1-subdomene. Vezanjem na receptor dolazi do konformacijske promjene na samom mjestu vezanja i na mjestu spajanja dimera. Receptorom posredovanom endocitozom kompleks ulazi u stanicu, čemu prethodi stvaranje klatrinskih vezikula. U endosomu, gdje je vrijednost pH oko 5.6 uslijed djelovanja ATP-pumpi, dolazi do dodatnih konformacijskih promjena u strukturi kompleksa te posljedično otpuštanja željeza s transferin-TFR kompleksa na još neidentificiran kelator. S obzirom da pri niskom pH endosoma TFR preferira vezanje apo-transferina, transferin ostaje vezan na receptor nakon otpuštanja željeza, sve do izlaska iz stanice, što omogućuje cirkuliranje transferina. Transferin se oslobađa u plazmi, gdje ponovno može vezati željezo i krenuti u novi ciklus. Pretpostavlja se da jedna molekula transferina prođe oko 100 ciklusa, od kojih svaki traje oko 2 minute (Eckenroth i sur., 2011; Zhao i Enns, 2012).

Otpuštanje željeza iz Fe₂-Tf-TFR kompleksa posljedica je dva različita mehanizma. Prvi je protonacija i vezanje His349 iz C-domene na TFR, a drugi je konformacijska promjena N2-subdomene i aktivacija dilizinskog okidača (Nagae i sur., 2014).

Kada je holo-transferin vezan na svoj receptor, brzina otpuštanja s C-domene je 7 do 11 puta brža nego u odsutnosti receptora, što u tom slučaju omogućuje His349. Naime, hidrofobna regija receptora (Trp641 i Phe760) koja stupa u interakciju s His349, stimulira otpuštanje Fe i stabilizira novonastali apo-Tf-TFR kompleks. Kod vezanja transferina na receptor, dolazi do pomaka α -heliksa C-domene, His349 se tada smješta između dva monomera TFR i C1-subdomene Tf te stvara slabe hidrofobne veze s TFR (Phe760 i Asp757). Pri niskom pH endosoma (pH = 5.6) dolazi do protoniranja histidina te do jačanja π -interakcije s Phe760 i veze s Asp757, što dovodi do konformacijske promjene kompleksa i same C-domene Tf te posljedično do bržeg otpuštanja željeza. S druge strane, otpuštanje željeza s N-domene je u slučaju prisutnosti receptora sporije. Naime, N1-subdomena preko Arg50 čini „salt-bridge“ s Glu664 iz TFR, a N2-subdomena je s TFR povezana s dvije grupe ostataka, 139-145 AK i 154-167 AK, koje se visokim afinitetom vežu na TFR. Time se ograničava pristup aniona KISAB mjestu, otežava se otvaranje udubljenja sa željezom i time se za 6 do 15 puta smanji brzina otpuštanja željeza. Do otpuštanja željeza konačno dolazi nakon pH inducirane konformacijske promjene TFR i posljedično odmicanja N2-subdomene (Eckenroth i sur., 2011; Luck i Mason, 2013).

1.1.5. Uloge transferina u organizmu

Uz već opisanu ulogu transporta željeza, transferin pokazuje i antimikrobnu i citoprotktivnu aktivnost te ima ulogu u rastu i diferencijaciji stanica. Poznato je da visoke koncentracije slobodnog željeza u krvi mogu rezultirati učestalim pojavama bakterijskih infekcija. Bakterije do željeza dolaze preko siderofora, aktivnim preuzimanjem hema ili vezanjem holo-transferina na TFR-slične receptore na bakterijskim stanicama. Infekcije se povezuju s patološkim stanjima kod kojih je prisutna veća količina slobodnog željeza, poput hereditarnih i sekundarnih hemokromatoza, zatajenja jetre, kardiovaskularnih operacija, preranog rođenja i hematoloških malignih bolesti. Iz toga se razloga danas u terapiji takvih infekcija ispituje korištenje apo-transferina, ne samo kao prigodnog kelatora slobodnog željeza, već mu je dokazana i uloga u reduciranju adhezije gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija na organizam.

Između ostalog, prepoznata je uloga transferina u modulaciji staničnog rasta i diferencijaciji te mu se pripisuje miotropna, embrio-morfogena, proliferativna, mitogena, neurotropna i angiogena aktivnost, neovisno o vezanju željeza. Također, pripisuje mu se i autokrini i parakrini uloga. Parakrini uloga transferina ispoljava kod nekih tumorskih

linija, poput proliferacije melanomskih metastaza mozga koju promovira transferin sintetiziranim u moždanim stanicama. Stanični odgovor na transferin kao faktor rasta, ovisan je o stupnju diferencijacije stanice. Tako npr. izlaganje slabije diferenciranih humanih stanica tumora kolona transferinu dovodi do povećanog vezanja epidermalnog faktora rasta (EGF) na površinu tumorskih stanica, dok je kod stanica u višem stupnju diferencijacije učinak suprotan, dolazi do smanjenog vezanja EGF.

Antiapoptotička uloga transferina uočena je kod tumorskih stanica ovarija. Ovaj efekt pripisuje se holo-transferinu jer se temelji na dostavi slobodnog željeza u pre-apoptotičke stanice s visokom aktivnošću feritina i niskom razinom željeza, gdje povećanje koncentracije slobodnog željeza ima mogućnost zaustavljanja daljnjeg napredovanja apoptoze (Gomme i sur., 2005).

1.1.6. Mogućnosti kliničke primjene transferina

Atransferinemija i hipotransferinemija

Jedna od bolesti koju je moguće liječiti infuzijom apo-transferina je atransferinemija. Atransferinemija je rijetka autosomno recesivna bolest okarakterizirana anemijom, hemokromatozom, smanjenim rastom i povećanim rizikom od infekcija. Intravenozna primjena čistog apo-transferina svaka tri do četiri mjeseca tijekom sedam godina, dovela je do smanjenja koncentracije slobodnog željeza i povlačenja nuspojava kod dvoje pacijenata s hipotransferinemijom (Hayashi i sur., 1993).

Ishemija uzrokovana ozljedom

Potencijalna terapijska primjena apo-transferina pokazana je i kod ishemije uzrokovane stresom (zatajenjem bubrega, transplantacijom organa, moždanim udarom, kardiovaskularnim bolestima itd.), stanjem koje promovira oksidacijski stres te u konačnici upalu, apoptozu i nekrozu tkiva. S obzirom da redoks-aktivno slobodno željezo katalizira nastajanje slobodnih radikala kisika, visoka razina slobodnog željeza doprinosi nastajanju oksidativnog stresa kod ishemije. Kod miševa s renalnom ishemijom reperfuzijom je dokazano da primjena apo-transferina smanjuje razinu slobodnog željeza, inhibira neutrofilnu kemotaksiju i aktivaciju komplementa te smanjuje gubitak renalne funkcije, dok je kod ljudi dokazano da primjena drugog kelatora željeza, desferoksamina, djeluje protektivno na ishemiju. Štoviše, iz istog je istraživanja zaključeno kako bi se terapija apo-transferinom mogla koristiti i kod akutnog zatajenja bubrega te kod transplantacije organa, gdje oksidativni stres također predstavlja rizik (De Vries i sur., 2004).

Transplantacija koštane srži i antimikrobna aktivnost

Kod transplantacije koštane srži, uslijed visokih razina slobodnog željeza također često dolazi i do infekcija oportunističkim patogenom *Staphylococcus epidermidis*, što se može liječiti intravenoznom infuzijom apo-transferina (Bonsdorff i sur., 2003).

Radioterapija

Apliciranje injekcija apo-transferina prije davanja radioterapije također pokazuje pozitivne rezultate. S obzirom da se radioterapijom smanjuje razina transferina, posljedično dolazi do velike koncentracije redoks-aktivnog željeza u krvi te do razvijanja oksidativnog stresa. No, pozitivan učinak transferina ne temelji se samo na reduciranju razine slobodnog željeza, već se pretpostavlja da također djeluje protektivno i na stanice koštane srži, modulirajući aktivnost citokina.

Tumori

Potencijalna primjena transferina u liječenju tumora temelji se na stimuliranju citotoksičnosti i proliferacije prirodnih stanica ubojica (NK) limfokinom-aktiviranih stanica ubojica (LAK), u kombinaciji s inzulinu sličnom faktorom rasta-1 (IGF-1) te interleukinom-2 (Gomme i sur., 2005).

Kardiovaskularne bolesti

Pacijenti s visokom razinom zasićenosti transferina (>55%) u kombinaciji s povišenom razinom lipoproteina niske gustoće (LDL) pokazuju izrazito visok rizik od razvijanja kardiovaskularnih bolesti. Terapija apo-transferinom i nekim lijekom za sniženje razine LDL-a potencijalno bi mogla smanjiti oksidaciju LDL-a kataliziranu redoks-aktivnim željezom, te smanjiti rizik od nastanka kardiovaskularnih komplikacija (Wells i sur., 2004).

Dijabetes i kardiovaskularne bolesti

S obzirom da je transferin negativan protein akutne faze (smanjuje mu se koncentracija u organizmu kod upala), njegova je razina u dijabetesu niska. Također, zbog povišene razine glukoze u dijabetesu, dolazi do povećane glikozilacije transferina što utječe na njegovu mogućnost vezanja željeza (Gomme i sur., 2005). Niska razina transferina ($< 2 \text{ g L}^{-1}$) kod dijabetičara i glikoziliranje aminokiselinskih ostataka na transferinu pozitivno utječu na pro-oksidativni efekt željeza, što dovodi do povećane lipidne peroksidacije i rizika od nastanka kardiovaskularnih bolesti. Ovdje se kao rješenje ponovno predlaže intravenozna primjena apo-transferina (Campenhout i sur., 2003).

Ciljana dostava lijekova

Uzevši u obzir da je u cirkulaciji samo 30% transferina zasićeno željezom, postoji potencijal vezanja ostalih metalnih iona koji ulaze u organizam. Transferin veže još najmanje 30 drugih

metala, no smanjenim afinitetom u usporedbi sa željezom. To se svojstvo može iskoristiti za ciljanu dostavu nekih dijagnostičkih radioizotopa, poput $^{67}\text{Ga}^{3+}$ i $^{111}\text{In}^{3+}$ i terapijski značajnih metalnih iona, npr. Bi^{3+} (liječenje sifilisa, hipertenzije, infekcija i nekih kožnih oboljenja) i Ti^{4+} (antitumorska aktivnost). Stanične mete za dostavu takvih kombiniranih lijekova su one koje imaju pojačanu ekspresiju receptora transferina (TFR), kao što su tumorske stanice. Ciljana dostava lijekova putem Tf-TFR nije ograničena samo na prijenos metalnih iona, već su mogući i konjugati s proteinima, genima ili lijekovima (Qian i sur., 2002). U terapiji malignih moždanih tumora uspješnom se pokazala primjena tioeterskog konjugata transferina i mutanta difterijskog toksina, koji zbog slabe selektivnosti i nuspojava pokazanih u trećoj fazi kliničkih istraživanja još uvijek nije dobio odobrenje za komercijalnu primjenu (Zhou i sur., 2017).

1.2. Željezo

Željezo je četvrti najzastupljeniji element u zemljinoj kori te, kao prijelazni metal, ima neizmjereno korisna koordinativna i redoks svojstva. Stoga ne čudi što je esencijalan element za skoro sva živa bića, kojima služi kao kofaktor za brojne proteine širokog raspona funkcija. Međutim, zbog svojih redoks svojstava predstavlja i ogroman problem za biološke sustave. Prijenosom jednog elektrona između Fe^{II} i Fe^{III} , dolazi do stvaranja toksičnih i destruktivnih kisikovih radikala. Također, u aerobnim organizmima termodinamički preferirana forma je Fe^{3+} , što dovodi do problema solubilizacije jer se pri $\text{pH} = 7$ Fe^{3+} nalazi u obliku teško topljivih hidroksida. Iz tih razloga živi organizmi su razvili sofisticirane molekulske sustave poput transferina za solubilizaciju, prihvaćanje, transport i otpuštanje željeza. Transferin veže željezo čvrsto, ali reverzibilno te omogućuje željezu da bude topljivo u fiziološkim uvjetima i održava ga u redoks-inertnom stanju, čime onemogućuje stvaranje toksičnih slobodnih radikala (Baker et al., 2003).

Tijelo odraslog čovjeka sadrži otprilike 3 - 5 g željeza, od čega je više od 2 grama inkorporirano u hemoglobin. Oko 600 mg se nalazi u makrofagima retikuloendotelnog sustava, 1000 mg pohranjeno u jetri tj. feritinu, 300 mg u mioglobinu te je 8 mg konstitutivno prisutno u svim ostalim proteinima i enzimima koji sadrže željezo. Željezo vezano na transferin čini svega 0.1% ukupnog željeza (oko 3 mg), no transferin je kinetički najaktivnije spremište željeza (Gkouvatsos et al., 2012).

1.2.1 Cirkuliranje željeza u organizmu

Željezo se iz probavnog sustava apsorbira u duodenumu i gornjem djelu jejunuma. Dnevno se apsorbira oko 1 - 2 mg, čime se nadomješta željezo izgubljeno znojem, ljuštenjem epitela ili krvarenjem. Homeostaza željeza regulirana je prvenstveno kontrolom apsorpcije, s obzirom da ne postoji fiziološki put izlučivanja viška željeza. Kako bi dospjelo u sistemsku cirkulaciju, željezo iz hrane prvo mora proći kroz apikalnu i bazolateralnu membranu enterocita. To omogućuje želučana kiselina, koja promovira keliranje željeza aminima, aminokiselinama i šećerima do topljivih kompleksa (Gkouvatsos et al., 2012).

Željezo iz hrane može biti hemsko i ne-hemsko. Ne-hemsko, ionizirano željezo ne prolazi slobodno kroz lipidnu membranu zbog svoje veličine i naboja. S luminalne strane apikalne membrane nalaze se dva proteina koja posreduju apsorpciju ne-hemskog željeza. Feri-reduktaza, Dcytb, najprije reducira Fe^{3+} u Fe^{2+} , koji se zatim internalizira u stanice mukoze pomoću transportera divalentnih metala (DMT1). Na bazolateralnoj membrani nalazi se transporter ferroportin, koji prenosi Fe^{2+} u krvotok, dok se simultano događa reoksidacija u Fe^{3+} , pomoću hepaestina, oksidaze homologne ceruloplazminu. Tako oksidirano željezo se zatim veže na transferin.

Hemsko željezo životinjskog porijekla puno je dostupnije za apsorpciju od anorganskog željeza. Apsorpcija hemskog željeza se najvjerojatnije odvija preko posebnog nosača hema (HCP1), koji se nalazi na apikalnoj membrani crijevne mukoze. Hem se zatim može eksportirati preko bazolateralne membrane u krvotok pomoću FLVCR hemskog transportera ili se djelovanjem hem-oksidaze (HO), oslobađa Fe^{2+} iz hema, koje zatim prelazi bazolateralnu membranu pomoću ferroportina (Cairo et al., 2006).

S obzirom da se dnevno apsorbira svega 1 - 2 mg, glavni izvor željeza za transferin su retikuloendotelni makrofagi. Makrofagi fagocitiraju eritrocite u jetri, slezeni i koštanoj srži, degradiraju hemoglobin i kataboliziraju hem, čime se oslobađa Fe^{2+} . Fe^{2+} se iz makrofaga eksportira pomoću transmembranskog transportera ferroportina (FPN1), dok se simultano događa oksidacija željeza u Fe^{3+} pomoću ceruloplazmina. Tako oslobođeno trivalentno željezo se zatim veže na transferin (Gkouvatsos et al., 2012).

1.2.2. Željezo i bolesti

Primarna (hereditarna) hemokromatoza

Nasljedna hemokromatoza je jedan od najčešćih autosomno-recesivnih poremećaja kod bijelaca, posebice u Sjevernoj Europi. Uzrok hemokromatoze su mutacije u genima koji

kodiraju proteine uključene u apsorpciju ili regulaciju apsorpcije željeza iz hrane. Do sada su otkrivena četiri gena čije mutacije dovode do istog fenotipa, a najčešća je mutacija HFE gena. Postoje 4 tipa hemokromatoza: klasična, juvenilna, TFR-2-deficijentna te ferroportin-deficijentna. Bolest se odlikuje nakupljanjem željeza u stanicama jetre, gušterače, srca i drugih organa, gdje oštećuje strukturu i ometa normalnu funkciju tih organa. Takvo stanje dovodi to razvijanja ciroze ili raka jetre, bolesti srca te dijabetesa. Terapija hemokromatoza zasniva se na uklanjanju suviška akumuliranog željeza flebotomijom ili keliranjem deferoksaminom (Cairo i sur., 2006).

Sekundarna hemokromatoza

Uzroci sekundarne hemokromatoze mogu biti različiti, od urođenih (talasemija, nedostatak piruvat kinaze, nasljedna sferocitoza, sideroblastična anemija) do stečenih (različite anemije koje iziskuju transfuzije krvi), a zajednička im je nedostatna eritropoeza i pretjerana intestinalna apsorpcija željeza, što u konačnici dovodi do nakupljanja željeza u tkivima. Terapija sekundarne hemokromatoze uključuje keliranje željeza desferoksaminom i deferipronom (Beutler i sur., 2003; Cairo i sur., 2006)

Akutno otrovanje željezom

Najčešće se događa kod djece. Kod ingestije od 20 mg elementarnog željeza po kilogramu tjelesne mase, dolazi do gastrotoksičnosti, dok kod apsorpcije od 60 mg po kilogramu tjelesne mase dolazi do razvijanja sistemske toksičnosti. Sistemska toksičnost nastupa kada se premaši sposobnost transferina da veže slobodno željezo u cirkulaciji, što dovodi do nastanka slobodnih radikala, koji zatim napadaju mitohondrije, blokiraju oksidativnu fosforilaciju, izazivaju lipidnu peroksidaciju te oštećuju bubrege i jetru. Također, slobodno željezo oštećuje krvne žile i dovodi do vazodilatacije, povećane vaskularne permeabilnosti, hipotenzije i metaboličke acidoze (Beutler i sur., 2003; Cairo i sur., 2006).

Anemija uzrokovana manjkom željeza

Nedostatak željeza je jedan od najčešćih hematoloških i dijetalnih poremećaja na svijetu. Češće pogađa djecu u razvitku te žene u reproduktivnoj dobi, tijekom trudnoće i za vrijeme menstruacije jer je u tim stanjima potreba za željezom povećana. Što se tiče patoloških uzroka gubitka željeza, na prvom mjestu je smanjena apsorpcija ili krvarenje iz gastrointestinalnog sustava te hemoragije kao posljedica traume. U konačnici, nedostatan unos ili apsorpcija željeza te gubitak krvi, mogu dovesti do razvitka hipokromne mikrocitne anemije. Kod terapije se preferira oralna primjena preparata željeza pred parenteralnom, koja se daje tek u težim slučajevima (Beutler i sur., 2003).

Anemija kronične bolesti

Anemija kronične bolesti najčešća je kod hospitaliziranih bolesnika kod kojih dolazi do neproporcionalnog iskorištavanja željeza u odnosu na apsorpciju i pohranu. Uzrok je citokinima posredovana blokada prijenosa željeza od mjesta pohrane do eritroidnih prekursora u koštanoj srži. Tijekom infekcija i upale dolazi do pojačanog otpuštanja citokina, interleukina-6, koji povećava sintezu i otpuštanje proteina akutne faze, hepcidina. Hecpidin se zatim veže na ferroportin, uzrokuje internalizaciju i degradaciju ferroportina (najvažnijeg eksportera željeza na stanicama), čime se željezo zadržava u stanicama duodenuma, makrofaga te hepatocitama. Posljedično je niska koncentracija ukupnog željeza u krvi i niska je zasićenost transferina. Takvo je stanje pozitivno kod infekcija jer se smanjuje količina slobodnog željeza potencijalno dostupnog patogenima, no smanjuje se i stupanj eritropoeze te se razvija normokromna i normocitna anemija. Terapija anemije kronične bolesti se bazira na liječenju kronične bolesti i upale koja je dovela do takvog stanja (Beutler i sur., 2003; Cairo i sur., 2006).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Ispitivanje svojstava transferina kao središnje molekule u transportu željeza traje već nekoliko desetljeća, no ispitivanje glikanskog dijela molekule tek je u uzletu. Posljednjih nekoliko godina traje ubrzan razvoj glikobiologije, što je dovelo do važnosti prepoznavanja utjecaja šećera na funkciju glikoproteina. S obzirom da glikani često zauzimaju veći dio strukture glikoproteina i da se nalaze s vanjske strane, tj. u kontaktu su s okolinom, pretpostavlja se da promjene u glikanima mogu dovesti do promjena u interakciji proteina s ligandima. Konkretno na primjeru transferina, pitanje je dovodi li promjena u sastavu šećera ili pak potpuni gubitak glikanskog dijela strukture do promjena u vezanju i otpuštanju željeza ili vezanju transferina na receptor na površini stanica. Poznato je da kod pacijenata s npr. dijabetesom dolazi do povećane glikozilacije transferina. Kod nekih karcinoma dolazi do pojava karakterističnih glikoformi, dok kod nekih infekcija dolazi do djelomičnog ili čak potpunog gubitka glikanske strukture. Iz tog razloga nužno je utvrditi utjecaj takvih promjena na fiziološki odnos transferina i željeza.

Ovim radom se htjelo ustvrditi postoji li razlika u otpuštanju željeza s transferina i asijalo-transferina. Asijalo-transferin je glikoforma serumskog transferina kojoj su skinute terminalne sijalinske skupine pomoću enzima neuraminidaze. Mjerene su konstante kemijske ravnoteže prilikom otpuštanja željeza s C-kraja transferina i asijalo-transferina u prisutnosti kompetitivnog kelatora EDTA. Konstante kemijske ravnoteže dobivene su računski, a metoda mjerenja bila je UV-Vis spektrofotometrija.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Korištene tvari

U eksperimentu su korištenje sljedeće tvari:

- PIPES (piperazin-N,N'-bis(2-etansulfonska kiselina)) - Amresco, M=378.6
- KCl (kalijev klorid) - Alkaloid, M=74.56
- dvostruko destilirana voda
- Nativni humani apo-transferin - Sigma-Aldrich, >97%, M=42000
- FeClO₄ (željezov perklorat) - Sigma-Aldrich, M=354.19
- otopina HClO₄, c=1M
- NTA (trinatrijeva sol nitrilotrioctene kiseline; N,N-bis(karboksimetil)glicin) - Sigma-Aldrich, M=257.1
- NaHCO₃ (natrijev hidrogenkarbonat) - Kemika, M=84.01
- Na₂EDTA (dinatrijeva sol etilendiamintetraoctene kiseline) - Amresco, M=372.24
- NaOAc (natrij acetat) - Kemika, M=136.08
- CaCl₂ (kalcijev klorid) - Lach-Ner, M=110.99
- NaCl (natrijev klorid) - Gram-Mol, M=58.44
- Neuraminidaza (GlycoCleave[®] Neuraminidase Kit) - GALAB Technologies GmbH

3.1.2. Priprema otopina

1. Otopina pufera pripremljena je otapanjem odgovarajućih masa PIPES-a (0.1 M) i KCl-a (0.5 M) u dvostruko destiliranoj vodi, a pH je podešen na 7.4 pomoću pH-metra i 5 M HCl.
2. 0.1 M otopina željezova (III) perklorata dobivena je otapanjem odgovarajuće mase Fe(ClO₄)₃ u 1 M HClO₄.
3. 0.002 M otopina nitrilotriacetata dobivena je otapanjem odgovarajuće mase NTA u puferu.
4. U dobivenu otopinu NTA polako i uz konstantno miješanje, kako ne bi došlo do neželjenog taloženja željezova hidroksida, dokapavan je 1 mL prethodno pripremljene otopine željezova (III) perklorata te je dobivena 0.001 M otopina Fe(NTA)₂. Tako pripremljena otopina željezova dinitrilotriacetata korištena je kasnije za dobivanje holo-transferina.

5. 0.01 M otopina natrijeva hidrogenkarbonata pripravljena je otapanjem odgovarajuće mase NaHCO_3 u puferu.
6. 0.1 M otopina EDTA pripravljena je otapanjem odgovarajuće mase Na_2EDTA u prethodno dobivenom puferu. Zatim je pripravljena 0.01 M otopina EDTA razrjeđivanjem odgovarajućeg volumena 0.1 M otopine EDTA.
7. Pufer 1 za desijalinizaciju dobiven je otapanjem odgovarajuće mase NaOAc i CaCl_2 u dvostruko destiliranoj vodi. Konačna otopina sadržavala je 0.05 M natrijev acetat i 0.001 M kalcijev klorid, a pH je podešen na 5.5.
8. Pufer 2 za desijalinizaciju dobiven je otapanjem odgovarajućih masa NaOAc , CaCl_2 i NaCl u dvostruko destiliranoj vodi. Konačna otopina sastojala se od 0.05 M natrijeva acetata, 0.009 M kalcijeva klorida i 0.154 M natrijeva klorida, a pH je podešen na 5.5.
9. *Desijalinizacija apo-transferina*: 0.33 M otopina apo-transferina u PIPES/KCl puferu (pH = 7.4) dijalizira se preko noći s prethodno pripremljenim puferom 1 (pH = 5.5). Kada je dijaliza završena u otopinu se dodaje neuraminidaza i smjesa se inkubira preko noći na 37°C . Nakon inkubacije, smjesa se profiltrira i ispiri s puferom 1 te se odvaja neuraminidaza od asijalo-transferina, koji se zatim dijalizira u puferu 1. 100 mg tako dobivenog asijalo-transferina se ponovno dijalizira u puferu 1, ali ovaj put uz dodatak 0.1 M otopine EDTA. Sljedeća dijaliza je u puferu PIPES (pH = 7.4).

Priprema uzoraka holo-transferina:

Nativni humani apo-transferin je najprije otopljen u destiliranoj vodi, a zatim ispran puferom u Amicon Ultra centrifugalnom filteru (10000 MWCO). Matična otopina holo-transferina (Fe_2^{III} -Tf) pripravljena je dodatkom otopine željezovog dinitrilotriacetata u suvišku u otopinu koja je sadržavala 0.5 mM apo-Tf i 5 mM natrijeva hidrogenkarbonata. Smjesa je ostavljena preko noći te je zatim isprana dva puta s puferom u Amicon Ultra filteru. Niz radnih otopina pripravljen je pipetiranjem određenih volumena pufera i otopina EDTA te 10 μL matične otopine holo-transferina, tako da je u svakoj radnoj otopini početna koncentracija holo-transferina bila 0.05 mM. Otopine su ostavljene preko noći kako bi se uspostavila ravnoteža.

Priprema uzoraka asijalo-holo-transferina:

Matična otopina i radne otopine asijalo-holo-transferina (Fe_2^{III} -Tf-sia) pripravljene su na jednak način kao za uzorke holo-transferina.

3.1.3. Korišteni instrumenti:

- Za vaganje je korištena Sartorius LA 310 S analitička vaga s točnošću odvage 0,1 mg.
- Za određivanje pH otopina korišten je Mettler toledo MP 220 pH-metar uz kalibraciju standardnim otopinama pH = 4 i pH = 7.
- Za fino usitnjavanje PIPES-a kod otapanja korišten je Ultrasonic Cleaner, Sper Scientific.
- Otopine su pripremane u Eppendorf cjevčicama.
- Za miješanje otopina korišten je Cole-Parmer Vortex Mixer.
- Kivete korištene kod mjerenja apsorpcije bile su Hellma QS, l = 1 cm.
- Mjerenja su obavljena na Varian Cary 50 Bio UV-Vis spektrofotometru.
- Za filtriranje otopina korišten je Amicon Ultra centrifugalni filter.
- Za desijalinizaciju je korišten rotator cjevčica u inkubatoru na 37°C.
- Za obradu podataka korišteno je PC računalo i softver Microsoft Excel.

3.2. Metode

3.2.1. Spektrofotometrija u UV-Vis području

UV-Vis spektrofotometrija jedna je od spektroskopskih optičkih metoda kemijske analize. Tehnike optičke spektrofotometrije obuhvaćaju mjerenja u ultraljubičastom, vidljivom i infracrvenom dijelu elektromagnetskog spektra. UV-Vis spektrofotometrija se još naziva i molekulska apsorpcijska spektrofotometrija jer se temelji na mjerenju količine apsorbirane svjetlosti u UV (190-380 nm) i vidljivom (380-800 nm) području. Tijekom apsorbiranja elektromagnetskog zračenja tj. odgovarajućeg kvanta energije ($h\nu$) dolazi do prijelaza elektrona iz osnovnog stanja (E_0) u jednu od vibracijskih i rotacijskih razina pobuđenog elektronskog energijskog stanja (E) i ta se promjena bilježi u spektru (Tomljanović, 2000):

$$E = E_0 + h\nu.$$

Na apsorpciju u UV-Vis području utječu valna duljina svjetlosti te struktura molekule. Valna duljina pri kojoj molekula apsorbira svjetlost ovisi o jakosti kojom su vezani njezini elektroni u dijelu molekule odgovornom za apsorpciju. Većina apsorpcije organskih molekula rezultat je prisutnosti π veza, a takve nezasićene organske funkcionalne skupine nazivaju se

kromoforima. Na kromofore su vezani auktokromi, funkcionalne skupine s jednim ili više nesparenih elektrona, koji utječu na položaj apsorpcijskih maksimuma i intenzitet apsorpcije. UV-Vis spektrofotometrija najčešće se primjenjuje za kvalitativna ispitivanja potvrde identiteta i ispitivanja onečišćenja organskih i anorganskih tvari i lijekova te kvantitativna ispitivanja poput određivanja sadržaja. Također se koristi i kao rutinska metoda za određivanje fizikalno - kemijskih svojstava lijekova (određivanje topljivosti, koeficijenta raspodjele, ispitivanje stabilnosti, određivanje pKa vrijednosti te oslobađanja lijeka iz formulacije). Prednosti ove metode su jednostavnost, prihvatljiva cijena, robusnost i preciznost kod kvantitativnog određivanja. Ograničenja metode su nedovoljna selektivnost koja ovisi o kromoforu te neprimjenjivost u analizi smjesa (Nigović 2016).

Elektromagnetsko zračenje je kombinacija naizmjeničnog električnog i magnetskog polja koja putuju kroz prostor u obliku vala. S obzirom na svojstva vala, elektromagnetsko se zračenje može objasniti pomoću valne duljine (λ) i frekvencije (ν):

$$\nu = \frac{c}{\lambda},$$

gdje c predstavlja brzinu svjetlosti u vakuumu, a iznosi $3 \times 10^8 \text{ ms}^{-1}$. U UV-Vis spektroskopiji, valna duljina obično je izražena u nanometrima, dok je frekvencija izražena u s^{-1} . Iz gornje je jednadžbe vidljivo da ultraljubičasto svjetlo niže valne duljine ima veću frekvenciju i energiju od vidljivog svjetla. Energija elektromagnetskog zračenja jednaka je umnošku frekvencije i Planckove konstante ($h = 6.626 \times 10^{-34} \text{ J s}$):

$$E = h\nu.$$

Prilikom apsorpcije svjetlosti dolazi do porasta ukupne energije molekula (ili atoma). Ukupna potencijalna energija molekule (E_{total}) prikazuje se kao zbroj elektronske (E_{el}), vibracijske (E_{vib}) i rotacijske energije (E_{rot}):

$$E_{total} = E_{el} + E_{vib} + E_{rot}$$

$$E_{el} > E_{vib} > E_{rot}$$

Energija pohranjena u tim stanjima nije kontinuirana, već se nalazi u obliku diskretnih energetske stanja. Kada molekula apsorbira svjetlost, dolazi do porasta elektronske, vibracijske i/ili rotacijske energije za količinu energije apsorbiranog fotona, tijekom čega dolazi do prijelaza između diskretnih energetske razina. S obzirom da su ultraljubičasto i vidljivo zračenje većih frekvencija od npr. infracrvenog zračenja, sadrže dovoljno energije za elektronske prijelaze koji odgovaraju apsorpcijskim maksimumima. Također dolazi i do

mnogih prijelaza unutar vibracijskih i rotacijskih energetske stanja, no ona se preklapaju te uzrokuju širenje pikova u spektru (Owen, 1996).

Prolaskom monokromatskog svjetla kroz homogeni optički medij raspršenje svjetlosti je zanemarivo te je apsorpcija zračenja glavni uzrok smanjenja njegova intenziteta. Omjer intenziteta propuštenog (I) i ulaznog (I_0) zračenja naziva se transmitancija (T):

$$T = \frac{I}{I_0}.$$

Beer – Lambertov zakon objašnjava kako je intenzitet prolaznog zračenja ovisi o intenzitetu ulaznog zračenja, koncentraciji apsorbirajuće tvari (c) te putu koji svjetlost prođe od izvora do mjesta apsorpcije (l):

$$I = I_0 \times 10^{-\epsilon cl}.$$

Veličina ϵ zove se molarni apsorpcijski koeficijent i karakterističan je za svaku tvar, a ovisi o frekvenciji upadnog zračenja.

Kako bi pojednostavili gornju jednadžbu, uveden je pojam apsorbanije (A), koji se definira kao negativni logaritam transmitancije, odnosno logaritam omjera ulaznog i propuštenog zračenja:

$$A = -\log T,$$

odnosno:

$$A = \log \frac{I_0}{I}.$$

Apsorbancija tvari proporcionalna je koncentraciji tvari i duljini puta svjetlosti:

$$A = \epsilon cl.$$

Iz toga proizlazi da je mjerenjem apsorbanije moguće odrediti koncentraciju apsorbirajuće tvari, koja ima poznat molarni apsorpcijski koeficijent (Atkins i De Paula, 2005).

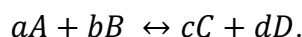
Praćenje interakcije transferina i željeza

Apo-transferin je bezbojan protein koji pokazuje intenzivnu ultraljubičastu apsorpciju s maksimumom apsorpcije na 278 nm i molarnom apsorptivnošću $93,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, dok je holo-transferin crvenkasto obojan i ima dodatni maksimum apsorpcije na 465 nm. Interakcija transferina i željeza može se još pratiti i mjerenjem intrinzične fluorescencije triptofana u vidljivom djelu spektra. Osam triptofanskih ostataka transferina, 5 iz C-domene i 3 iz N-domene, utječu na pojavu fluorescencijskog signala. Vezanjem željeza na transferin gasi se intrinzična fluorescencija triptofanskih ostataka u obje domene. Ovdje je nužno spomenuti pojam LMCT (*ligand - metal charge transfer*), koji opisuje prijenos energije dobivene vanjskim elektromagnetnim zračenjem s liganada (tirozinskih ostataka transferina) na željezo,

preko apsorpcijske vrpce na 470 nm. Vezanjem željeza na transferin dolazi do remećenja π - π^* tranzicijske energije tirozinskih ostataka, što rezultira porastom apsorpcije zračenja u UV području i prikrivanjem intrinzične fluorescencije triptofana (James i Mason, 2008; Ross i sur., 1995). Koncentracija transferina koja daje linearnu ovisnost apsorpcije je u području od 5×10^{-3} - 1×10^2 μg (Hage i Cazes, 2005).

3.2.2. Kemijska ravnoteža

Kako bismo razumjeli eksperiment, nužno je najprije definirati pojam kemijske ravnoteže. Većina kemijskih reakcija je reverzibilna, što znači da se uz polaznu reakciju, tijekom koje iz reaktanata nastaju produkti, istovremeno zbiva i povratna, tj. nastali produkti ponovno daju reaktante. Ukupna reakcija općenito se prikazuje jednadžbom:



To znači da iz a molekula reaktanta A i b molekula reaktanta B nastaje c molekula reaktanta C i d molekula reaktanta D, dok u povratnoj reakciji iz c molekula tvari C i d molekula tvari D nastaje a molekula tvari A i b molekula tvari B.

U početku reakcije, kada se u sustavu nalaze samo reaktanti A i B, odvija se samo polazna reakcija te nastaju produkti C i D. S vremenom se koncentracija reaktanata smanjuje te se smanjuje i brzina polazne reakcije (v_1), dok brzina povratne reakcije (v_2) raste jer se povećava koncentracija produkata.

$$v_1 = k_1[A]^a[B]^b,$$

$$v_2 = k_2[C]^c[D]^d.$$

U trenu kada se te dvije brzine izjednače, sustav ulazi u stanje dinamičke ravnoteže te više ne dolazi do neto prijenosa tvari, tj. iz reaktanata A i B nastaje jednaka količina molekula produkata C i D, koliko povratnom reakcijom iz produkata nastaje molekula reaktanata A i B. Kažemo da se produkti i reaktanti tada nalaze u stanju kemijske ravnoteže.

$$v_1 = v_2.$$

U stanju kemijske ravnoteže vrijedi:

$$k_1[A]^a[B]^b = k_2[C]^c[D]^d,$$

$$\frac{k_1}{k_2} = \frac{[C]^c[D]^d}{[A]^a[B]^b}.$$

Vrijednosti k_1 i k_2 označuju konstante brzine reakcije karakteristične za pojedinu reakciju na određenoj temperaturi. Budući da je omjer dviju konstanti (k_1/k_2) također konstanta, gornji se izraz još piše kao:

$$K = \frac{[C]^c [D]^d}{[A]^a [B]^b},$$

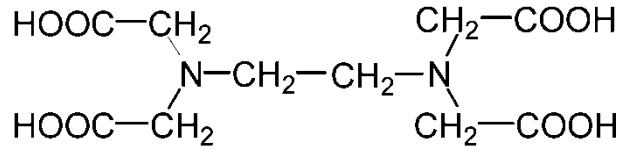
gdje K predstavlja konstantu kemijske ravnoteže. Ovaj izraz poznat je još kao zakon o djelovanju masa ili zakon kemijske ravnoteže, odnosno Guldberg – Waageov zakon. Brojčana vrijednost konstante kemijske ravnoteže opisuje smjer odvijanja kemijske reakcije, odnosno hoće li nakon uspostavljanja ravnoteže u smjesi prevladavati reaktanti ili produkti. Neovisna je o mehanizmu reakcije i apsolutnim koncentracijama tvari uključenih u reakciju, ali ovisi o prirodi reagirajućih tvari, temperaturi i tlaku. Mjerna jedinica konstante ovisi o broju molekula koje sudjeluju u reakciji, a ako je ona izražena u jedinicama mol dm^{-3} , tada red veličine konstante iznosi od oko 10^{-50} do 10^{50} . Kada je brojčana vrijednost $K > 10^3$ znači da su favorizirani produkti reakcije, ako je između 10^{-3} i 10^3 ukazuje da su u ravnoteži u smjesi reaktanti i produkti prisutni u podjednakim količinama, a ako je $K < 10^{-3}$ znači da u ravnoteži prevladavaju reaktanti.

Osim zakona o djelovanju masa nužno je još spomenuti i Le Chatelierovo načelo ili zakon akcije i reakcije koji kaže da ravnotežno stanje ostaje nepromijenjeno ukoliko se ne mijenjaju uvjeti pri kojima je ta ravnoteža uspostavljena (temperatura, tlak i koncentracija). Promjenom jednog od ta tri uvjeta dolazi do pomaka ravnoteže u smjeru kojim se ta promjena neutralizira. Drugim riječima, ako se promijene vanjski uvjeti uravnoteženog sustava, ravnoteža se pomiče u smjeru ponovnog uspostavljanja primarnih uvjeta (Filipović i Lipanović, 1995).

3.2.3. Mjerenje i račun

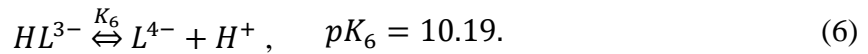
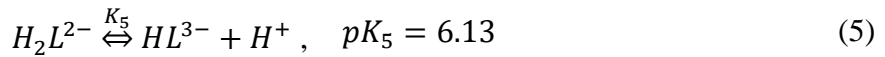
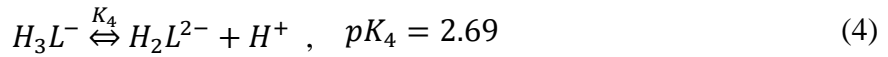
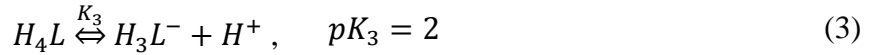
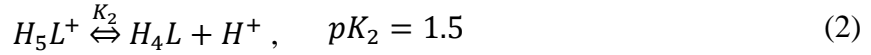
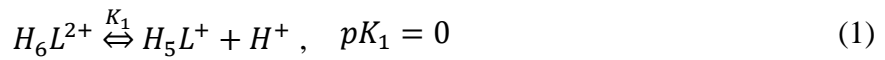
Otpuštanja željeza s transferina i asijalo-transferina u ovom radu praćeno je mjerenjem promjene apsorbancije holo-transferina ($c = 0.05 \text{ mM}$) u vidljivom dijelu spektra (450 nm) nakon dodatka rastućih koncentracija EDTA u nizu od 20 radnih otopina ($c_{\text{max}} = 6 \text{ mM}$ za nativni transferin, odnosno 10 mM za desijalinizirani transferin). Nakon uspostavljanja ravnoteže na 25°C nakon 24h za nativni transferin, odnosno 48 h za, praćeno je smanjenje apsorbancije u odnosu na početne otopine holo-transferina, bez dodane EDTA. Kao slijepa proba korištena je otopina pufera.

Za uklanjanje željeza iz kompleksa s transferinom korištena je etilendiamin tetraoctena kiselina (EDTA) kao kompetitivni ionski ligand koji reagira sa željezom u omjeru 1:1.



Slika 4. Struktura EDTA.

EDTA (L) je heksaprotonska kiselina i u otopini egzistira u više različitih ionskih oblika, a stupanj deprotonacije je ovisan o pH otopine (Smith i Martell, 1989):



Ukupna koncentracija EDTA (L_{total}) prikazuje se kao suma svih slobodnih ionskih oblika prisutnih u otopini:

$$[L]_{total} = [L^{4-}] + [HL^{3-}] + [H_2L^{2-}] + [H_3L^-] + [H_4L] + [H_5L^+] + [H_6L^{2+}]. \quad (7)$$

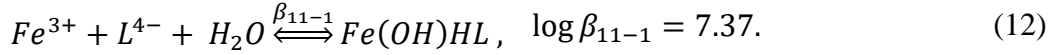
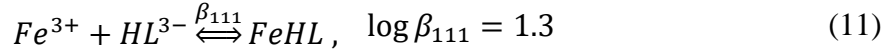
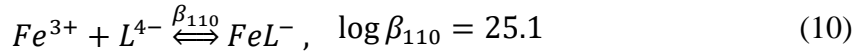
Koncentracija liganda raspoloživog za kompleksaciju metala opisuje se veličinom α_L , koja ovisi o koncentraciji H_3O^+ iona (pH) te o konstantama disocijacije sukcesivnih koraka deprotonacije:

$$\alpha_L = 1 + \frac{[H^+]}{K_6} + \frac{[H^+]^2}{K_6K_5} + \frac{[H^+]^3}{K_6K_5K_4} + \frac{[H^+]^4}{K_6K_5K_4K_3} + \frac{[H^+]^5}{K_6K_5K_4K_3K_2} + \frac{[H^+]^6}{K_6K_5K_4K_3K_2K_1}. \quad (8)$$

Kod pH = 7.4 na 25°C, jednadžba (8) može se pojednostaviti:

$$\alpha_L = 1 + \frac{[H^+]}{K_6} + \frac{[H^+]^2}{K_6K_5} + \frac{[H^+]^3}{K_6K_5K_4}. \quad (9)$$

EDTA sa željezom može tvoriti tri kompleksa s pripadajućim kumulativnim konstantama stabilnosti pojedinog kompleksa (Smith i Martell, 1989):



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

$$[Fe - EDTA]_{total} = [FeL]_T = [FeL^{-}] + [FeHL] + [Fe(OH)HL]. \quad (13)$$

Vrijednost α_{FeL} za monokompleks željeza i EDTA (jednadžba (10)) izračuna se iz pH i poznatih β vrijednosti:

$$\alpha_{FeL} = 1 + [H^+] \beta_{111} + \frac{1}{[H^+] \beta_{11-1}}. \quad (14)$$

Kondicionalna konstanta nastanka kompleksa $[FeL]$ potom se može izraziti kao:

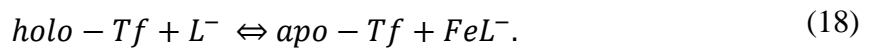
$$\beta_{FeL} = \beta_{110} * \frac{\alpha_{FeL}}{\alpha_L}. \quad (15)$$

Koncentracije slobodnog liganda i monokompleksa željeza i EDTA u radnim otopinama dobivene su iz izraza:

$$[L] = \frac{[L]_T}{\alpha_L} \quad (16)$$

$$[FeL] = \frac{[FeL]_T}{\alpha_{FeL}}. \quad (17)$$

Dodatkom EDTA u otopinu holo-transferina dolazi do sljedeće reakcije:



Točne koncentracije holo-transferina u radnim otopinama dobivene su iz poznatog molarnog apsorpcijskog koeficijenta ($\epsilon_{450} = 2170 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) i izmjerenih apsorbanacija na 450 nm, dok su koncentracije nastalog apo-transferina dobivene kao razlika početne koncentracije holo-transferina i koncentracije holo-transferina u pojedinoj otopini:

$$[apo - Tf] = [holo - Tf]_0 - [holo - Tf] \quad (19)$$

$$[holo - Tf] = \frac{A_{450}}{\epsilon l}. \quad (20)$$

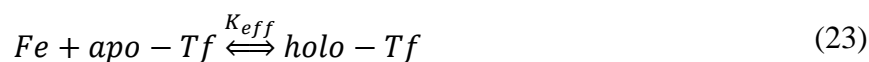
Koncentracija slobodne EDTA nakon postizanja ravnoteže odgovara razlici početne koncentracije EDTA i koncentracije nastalog apo-transferina:

$$[L]_T = [EDTA]_0 - [apo - Tf] \quad (21)$$

Konačna jednačba za izračunavanje koncentracije slobodnog željeza glasila je:

$$[Fe] = \frac{\alpha_L}{[L]_T} * \frac{[FeL]_T}{\alpha_{FeL}} * \frac{1}{\beta_{FeL}}. \quad (22)$$

Slobodno željezo koje ulazi u kompleks s EDTA ekvivalentno je koncentraciji željeza koje se otpušta s transferina te je taj podatak iskorišten za izračunavanje konstanti ravnoteže vezanja željeza za transferin, K_{eff} :



$$K_{eff} = \frac{1}{[Fe]} * \frac{[holo - Tf]}{[apo - Tf]}. \quad (24)$$

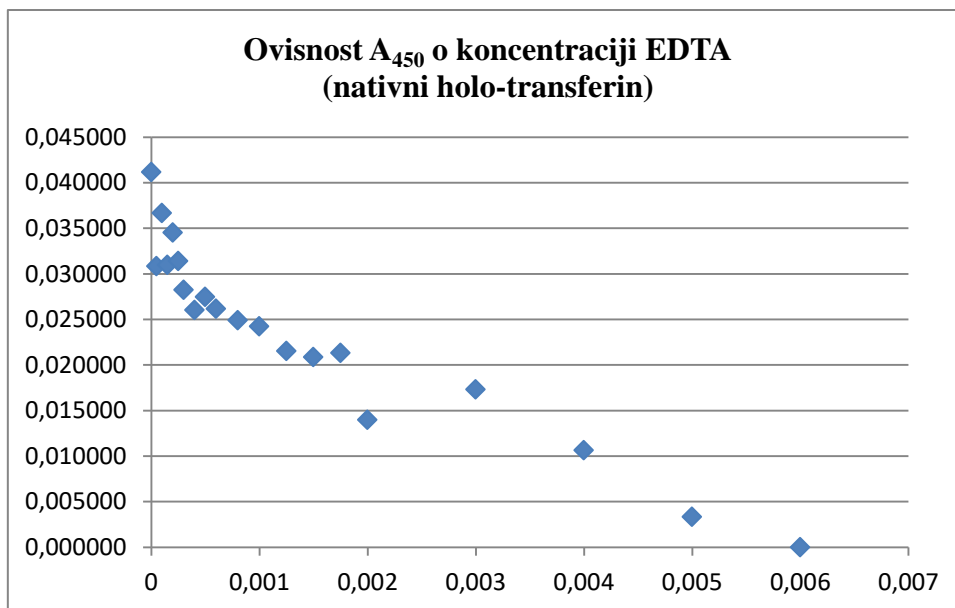
4. REZULTATI I RASPRAVA

Tablica 1. Prikaz ovisnosti izmjerene apsorbancije na 450 nm o koncentracijama EDTA dodanih u uzorke 0.05 mM holo-transferina.

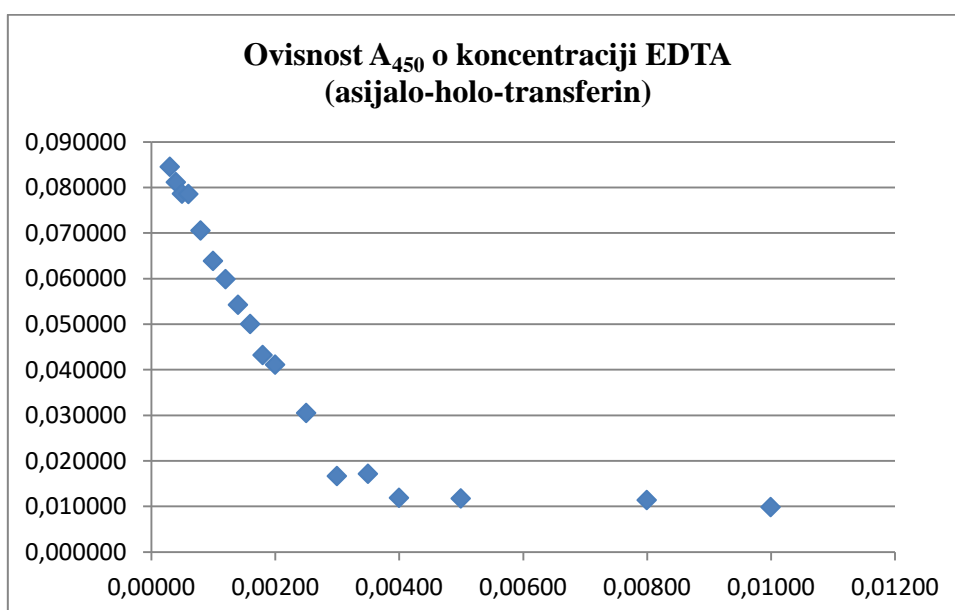
| Uzorak | EDTA/ M | A ₄₅₀ |
|--------|---------|------------------|
| 1 | 0 | 0,041159 |
| 2 | 0,00005 | 0,030840 |
| 3 | 0,00010 | 0,036682 |
| 4 | 0,00015 | 0,030971 |
| 5 | 0,00020 | 0,034520 |
| 6 | 0,00025 | 0,031425 |
| 7 | 0,00030 | 0,028242 |
| 8 | 0,00040 | 0,026019 |
| 9 | 0,00050 | 0,027477 |
| 10 | 0,00060 | 0,026168 |
| 11 | 0,00080 | 0,024920 |
| 12 | 0,00100 | 0,024245 |
| 13 | 0,00125 | 0,021532 |
| 14 | 0,00150 | 0,020867 |
| 15 | 0,00175 | 0,021330 |
| 16 | 0,00200 | 0,013981 |
| 17 | 0,00300 | 0,017308 |
| 18 | 0,00400 | 0,010633 |
| 19 | 0,00500 | 0,003346 |
| 20 | 0,00600 | 0 |

Tablica 2. Prikaz ovisnosti izmjerene apsorbancije na 450 nm o koncentracijama EDTA dodanih u uzorke 0.05 mM asijalo-holo-transferina.

| Uzorak | EDTA/ M | A ₄₅₀ (48h) |
|--------|---------|------------------------|
| 1 | 0,00030 | 0,084520 |
| 2 | 0,00040 | 0,081129 |
| 3 | 0,00050 | 0,078602 |
| 4 | 0,00060 | 0,078577 |
| 5 | 0,00080 | 0,070551 |
| 6 | 0,00100 | 0,063864 |
| 7 | 0,00120 | 0,059874 |
| 8 | 0,00140 | 0,054217 |
| 9 | 0,00160 | 0,050035 |
| 10 | 0,00180 | 0,043212 |
| 11 | 0,00200 | 0,041131 |
| 12 | 0,00250 | 0,030475 |
| 13 | 0,00300 | 0,016667 |
| 14 | 0,00350 | 0,017125 |
| 15 | 0,00400 | 0,011883 |
| 16 | 0,00500 | 0,011767 |
| 17 | 0,00800 | 0,011406 |
| 18 | 0,01000 | 0,009852 |



Slika 5. Grafički prikaz ovisnosti izmjerenih apsorbancija holo-transferina na 450 nm o koncentraciji dodane EDTA nakon 24h.



Slika 6. Grafički prikaz ovisnosti izmjerenih apsorbancija asijalo-holo-transferina na 450 nm o koncentraciji dodane EDTA nakon 48h.

Apsorbancija holo-transferina i asijalo-holo-transferina smanjuje se povećanjem koncentracije EDTA, što implicira da u oba slučaja dolazi do izvlačenja željeza iz kompleksa s transferinom u kompleks s EDTA (jednadžba (18)). Usporedbom dva dobivena grafa, ukazuje da je pad apsorbancije holo-transferina koji odgovara otpuštanju željeza brži kod asijalo-transferina.

Tablica 3. Prikaz točnih koncentracija holo-transferina i apo-transferina te njihov omjer u uzorcima, izračunati iz izmjerenih apsorbancija prema jednadžbama (19) i (20).

| Uzorak | c (holo-transferin)/ M | c (apo-transferin)/ M | holo/apo |
|--------|------------------------|-----------------------|-------------|
| 1 | 1,93234E-05 | 0 | - |
| 2 | 1,4479E-05 | 4,84438E-06 | 2,988831174 |
| 3 | 1,72214E-05 | 2,10202E-06 | 8,192769929 |
| 4 | 1,45405E-05 | 4,78292E-06 | 3,040086011 |
| 5 | 1,62065E-05 | 3,11686E-06 | 5,199636343 |
| 6 | 1,47536E-05 | 4,56985E-06 | 3,228458133 |
| 7 | 1,3259E-05 | 6,06437E-06 | 2,18638108 |
| 8 | 1,22157E-05 | 7,10772E-06 | 1,718651409 |
| 9 | 1,28998E-05 | 6,42363E-06 | 2,008176269 |
| 10 | 1,22855E-05 | 7,03794E-06 | 1,74560643 |
| 11 | 1,16994E-05 | 7,62402E-06 | 1,534542367 |
| 12 | 1,13827E-05 | 7,94074E-06 | 1,433450058 |
| 13 | 1,0109E-05 | 9,21441E-06 | 1,097085693 |
| 14 | 9,79656E-06 | 9,52684E-06 | 1,028311372 |
| 15 | 1,00141E-05 | 9,30933E-06 | 1,075703412 |
| 16 | 6,56387E-06 | 1,27595E-05 | 0,514428231 |
| 17 | 8,12567E-06 | 1,11977E-05 | 0,725653413 |
| 18 | 4,99219E-06 | 1,43312E-05 | 0,348343436 |
| 19 | 1,57082E-06 | 1,77526E-05 | 0,08848381 |
| 20 | 0 | 1,93234E-05 | 0 |

Tablica 4. Prikaz točnih koncentracija asijalo-holo-transferina i asijalo-apo-transferina te njihov omjer u uzorcima, izračunati iz izmjerenih apsorbancija prema jednadžbama (19) i (20).

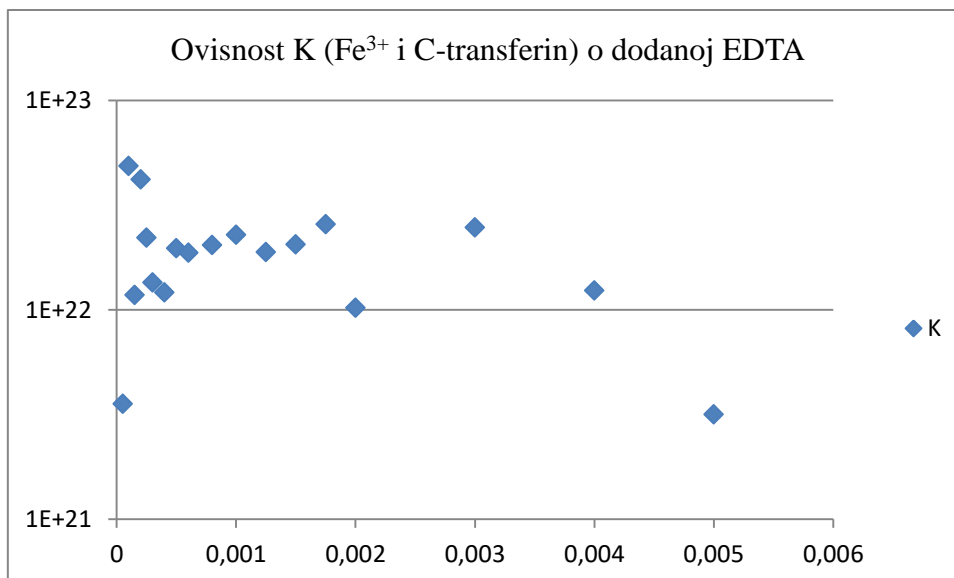
| Uzorak | c (asijalo-holo-transferin)/ M | c (asijalo-apo-transferin)/ M | holo/apo |
|--------|--------------------------------|-------------------------------|-------------|
| 1 | 3,89492E-05 | 1,19738E-05 | 3,252877218 |
| 2 | 3,73867E-05 | 1,35363E-05 | 2,761961613 |
| 3 | 3,62223E-05 | 1,47007E-05 | 2,463985306 |
| 4 | 3,62107E-05 | 1,47123E-05 | 2,461258573 |
| 5 | 3,25119E-05 | 1,84111E-05 | 1,765882965 |
| 6 | 2,94306E-05 | 2,14925E-05 | 1,369342446 |
| 7 | 2,75916E-05 | 2,33314E-05 | 1,182596203 |
| 8 | 2,49846E-05 | 2,59385E-05 | 0,963224744 |
| 9 | 2,30578E-05 | 2,78653E-05 | 0,827473871 |
| 10 | 1,99135E-05 | 3,10095E-05 | 0,642175115 |
| 11 | 1,89544E-05 | 3,19686E-05 | 0,59290612 |
| 12 | 1,40438E-05 | 3,68792E-05 | 0,380805989 |
| 13 | 7,68057E-06 | 4,32425E-05 | 0,177616406 |
| 14 | 7,89167E-06 | 4,30314E-05 | 0,18339343 |
| 15 | 5,4761E-06 | 4,54469E-05 | 0,120494506 |
| 16 | 5,42249E-06 | 4,55005E-05 | 0,119174121 |
| 17 | 5,25632E-06 | 4,56667E-05 | 0,115101766 |
| 18 | 4,54012E-06 | 4,63829E-05 | 0,097883425 |

Tablica 5. Prikaz koncentracija slobodne EDTA i koncentracija slobodnog Fe^{3+} te odgovarajućih konstanti vezanja željeza za transferin K_{eff} , izračunatih prema jednadžbama (21), (22) i (24).

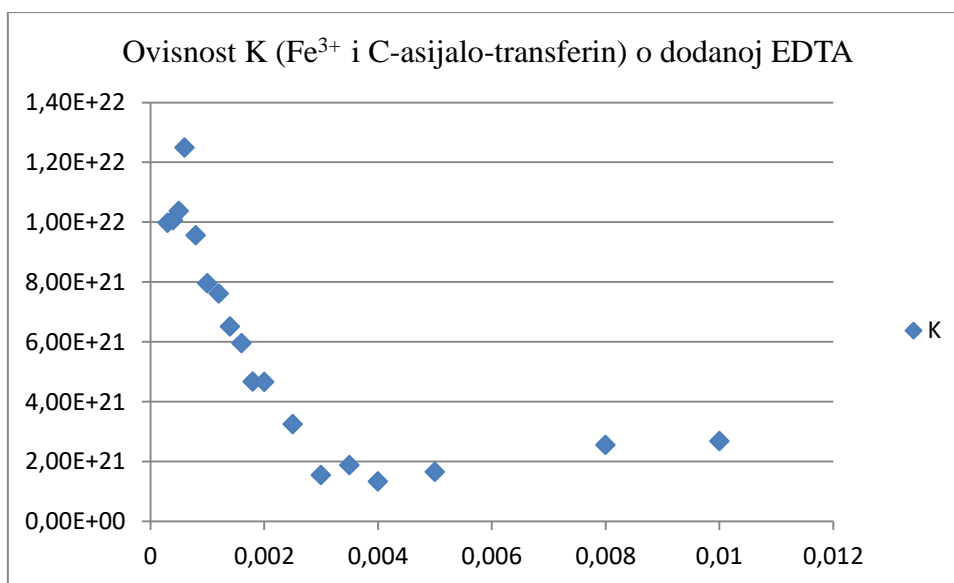
| Uzorak | EDTA/ M | Fe^{3+} / M | K |
|--------|-------------|----------------------|-------------|
| 1 | 0 | - | - |
| 2 | 4,51556E-05 | 8,40855E-22 | 3,55451E+21 |
| 3 | 9,7898E-05 | 1,6829E-22 | 4,86824E+22 |
| 4 | 0,000145217 | 2,58149E-22 | 1,17765E+22 |
| 5 | 0,000196883 | 1,24081E-22 | 4,19053E+22 |
| 6 | 0,00024543 | 1,45938E-22 | 2,21221E+22 |
| 7 | 0,000293936 | 1,61707E-22 | 1,35206E+22 |
| 8 | 0,000392892 | 1,41792E-22 | 1,21209E+22 |
| 9 | 0,000493576 | 1,02005E-22 | 1,96871E+22 |
| 10 | 0,000592962 | 9,3028E-23 | 1,87643E+22 |
| 11 | 0,000792376 | 7,54133E-23 | 2,03484E+22 |
| 12 | 0,000992059 | 6,27363E-23 | 2,28488E+22 |
| 13 | 0,001240786 | 5,82057E-23 | 1,88484E+22 |
| 14 | 0,001490473 | 5,00979E-23 | 2,0526E+22 |
| 15 | 0,001740691 | 4,19172E-23 | 2,56626E+22 |
| 16 | 0,00198724 | 5,03245E-23 | 1,02222E+22 |
| 17 | 0,002988802 | 2,93649E-23 | 2,47116E+22 |
| 18 | 0,003985669 | 2,81823E-23 | 1,23603E+22 |
| 19 | 0,004982247 | 2,79275E-23 | 3,16834E+21 |
| 20 | 0,005980677 | 2,53238E-23 | 0 |

Tablica 6. Prikaz koncentracija slobodne EDTA i koncentracija slobodnog Fe^{3+} te odgovarajućih konstanti vezanja željeza za asijalo-transferin K_{eff} , izračunatih prema jednadžbama (21), (22) i (24).

| Uzorak | EDTA/ M | Fe^{3+} / M | K |
|--------|-------------|----------------------|-------------|
| 1 | 0,000288026 | 3,25832E-22 | 9,98328E+21 |
| 2 | 0,000386464 | 2,74528E-22 | 1,00608E+22 |
| 3 | 0,000485299 | 2,37423E-22 | 1,0378E+22 |
| 4 | 0,000585288 | 1,97018E-22 | 1,24926E+22 |
| 5 | 0,000781589 | 1,84628E-22 | 9,56456E+21 |
| 6 | 0,000978508 | 1,72154E-22 | 7,95417E+21 |
| 7 | 0,001176669 | 1,55411E-22 | 7,60948E+21 |
| 8 | 0,001374062 | 1,47956E-22 | 6,5102E+21 |
| 9 | 0,001572135 | 1,38921E-22 | 5,95643E+21 |
| 10 | 0,001768991 | 1,37393E-22 | 4,67401E+21 |
| 11 | 0,001968031 | 1,27317E-22 | 4,65692E+21 |
| 12 | 0,002463121 | 1,17352E-22 | 3,24499E+21 |
| 13 | 0,002956758 | 1,14628E-22 | 1,54951E+21 |
| 14 | 0,003456969 | 9,75629E-23 | 1,87975E+21 |
| 15 | 0,003954553 | 9,00745E-23 | 1,33772E+21 |
| 16 | 0,004954499 | 7,198E-23 | 1,65566E+21 |
| 17 | 0,007954333 | 4,49978E-23 | 2,55794E+21 |
| 18 | 0,009953617 | 3,65235E-23 | 2,68001E+21 |



Slika 7. Prikaz dobivenih konstanti ravnoteže između željeza i C-kraja transferina u ovisnosti o koncentraciji EDTA dodanoj u radne otopine. Srednja vrijednost konstante vezanja željeza na transferin: $K = 1.95 \cdot 10^{22} \pm 1.20 \cdot 10^{22}$, odnosno $\log K = 22.29 \pm 0.62$.



Slika 8. Prikaz dobivenih konstanti ravnoteže između željeza i C-kraja transferina u ovisnosti o dodanoj EDTA u radne otopine. Srednja vrijednost konstante vezanja željeza na asijalo-transferin: $K = 5.82 \cdot 10^{21} \pm 3.63 \cdot 10^{21}$, odnosno $\log K = 21.76 \pm 0.62$.

Prosječne vrijednosti dobivenih konstanta vezanja su za red veličine manje kod asijalo-transferina u odnosu na sijalinizirani transferin. Veće konstante vezanja ukazuju na jače vezanje željeza na transferin.

5. ZAKLJUČCI

Provedenim mjerenjima dokazano je da promjena u glikozilaciji transferina dovodi do promjene u konstanti vezanja željeza. Izračunate konstante vezanja su za red veličine veće kod nativnog transferina ($K = 1.95 * 10^{22} \pm 1.20 * 10^{22}$), u odnosu na asijalo-transferin ($K = 5.82 * 10^{21} \pm 3.63 * 10^{21}$), što znači da se željezo čvršće veže na nativnu formu transferina.

Također, kod nižih koncentracija dodanog kompetitivnog kelatora EDTA dolazi do pojave trenda prilikom otpuštanja željeza s asijalo-transferina, što znači da pri nižim koncentracijama EDTA niti nakon 48h nije dostignuta ravnoteža. Prema tome, može se zaključiti da je otpuštanje željeza iz kompleksa s asijalo-transferinom značajno sporije u usporedbi s nativnim transferinom (ravnoteža je postignuta za 24h).

Sobzirom da u mnogim patološkim stanjima dolazi do promjene u glikozilaciji transferina, posljedično dolazi i do promjena u vezanju i otpuštanju željeza s transferina. Takva promjena u ravnoteži i kinetici otpuštanja željeza može rezultirati povećanom koncentracijom slobodnog željeza u krvi te uzrokovati dodatno pogoršanje stanja. Primjerice, neki patogeni eksprimiraju neuraminidazu na svojoj površini, čime mogu katalizirati cijepanje sialinskih kiselina s transferina i olakšati vlastiti pristup slobodnom željezu.

Dobiveni rezultati ovog eksperimenta upućuju na potrebu za daljnjim istraživanjem utjecaja glikozilacije na funkciju transferina te ulogu glikoformi transferina u patološkim stanjima.

6. LITERATURA

- Andrews NC, Schmidt PJ. Iron homeostasis. *Annu Rev Physiol*, 2007, 69, 69–85.
- Atkins P, De Paula J. Thermodynamics and kinetics. New York, W.H. Freeman and Co., 2005, str. 431-432.
- Baker HM, Anderson BF, Baker EN. Dealing with iron: common structural principles in proteins that transport iron and heme. *Proc Natl Acad Sci*, 2003, 100, 3579–3583.
- Beutler E, Hoffbrand AV, Cook JD. Iron deficiency and overload. ASH Educ Program Book, 2003, 40–61.
- Bonsdorff L, Sahlstedt L, Ebeling F, Ruutu T, Parkkinen J. Apotransferrin administration prevents growth of *Staphylococcus epidermidis* in serum of stem cell transplant patients by binding of free iron. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2003, 37, 45–51.
- Byrne SL, Chasteen ND, Steere AN, Mason AB. The unique kinetics of iron release from transferrin: the role of receptor, lobe-lobe interactions, and salt at endosomal pH. *J Mol Biol*, 2010, 396, 130–140.
- Cairo G, Bernuzzi F, Recalcati S. A precious metal: Iron, an essential nutrient for all cells. *Genes Nutr*, 2006, 1, 25–39.
- Chung MCM. Structure and function of transferrin. *Biochem Educ*, 1984, 12, 146–154.
- Coddeville B, Carchon H, Jaeken J, Briand G, Spik G. Determination of glycan structures and molecular masses of the glycovariants of serum transferrin from a patient with carbohydrate deficient syndrome type II. *Glycoconj J*, 1998, 15, 265–273.
- De Vries B, Walter SJ, von Bonsdorff L, Wolfs TG, van Heurn LE, Parkkinen J, Buurman WA. Reduction of circulating redox-active iron by apotransferrin protects against renal ischemia-reperfusion injury. *Transplantation*, 2004, 77, 669–675.
- Eckenroth BE, Steere AN, Chasteen ND, Everse SJ, Mason AB. How the binding of human transferrin primes the transferrin receptor potentiating iron release at endosomal pH. *Proc Natl Acad Sci*, 2011, 108, 13089–13094.
- El Hage Chahine JM, Hémadi M, Ha-Duong NT. Uptake and release of metal ions by transferrin and interaction with receptor 1. *Biochim Biophys Acta BBA - Gen Subj*, 2012, 1820, 334–347.
- Filipović, I., Lipanović, S. Opća i Anorganska Kemija. Zagreb, Školska knjiga, 1995, str. 394-395, 481-483.

Ghanbari Z, Housaindokht MR, Bozorgmehr MR, Izadyar M. The effect of glycosylation on the transferrin structure: A molecular dynamic simulation analysis. *J Theor Biol*, 2016, 404, 73–81.

Gkouvatsos K, Papanikolaou G, Pantopoulos K. Regulation of iron transport and the role of transferrin. *Biochim Biophys Acta BBA - Gen Subj*, 2012, 1820, 188–202.

Gomme PT, McCann KB, Bertolini J. Transferrin: structure, function and potential therapeutic actions. *Drug Discov Today*, 2005, 10, 267–273.

Gruszevska E, Cylwik B, Gudowska M, Kedra B, Szmitkowski M, Chrostek L. Changes in Transferrin Isoforms in Pancreatic Cancer. *Ann Clin Lab Sci*, 2016, 46, 286–290.

Hage DS, Cazes J. Handbook of Affinity Chromatography, Second Edition. Boca Raton, CRC Press, 2005, str 803.

Harris WR. Anion binding properties of the transferrins. Implications for function. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1820, 348–361.

Hayashi A, Wada Y, Suzuki T, Shimizu A. Studies on familial hypotransferrinemia: unique clinical course and molecular pathology. *Am J Hum Genet*, 1993, 53, 201.

James NG, Mason AB. Protocol to determine accurate absorption coefficients for iron containing transferrins. *Anal Biochem*, 2008, 378, 202–207.

Lambert LA. Molecular evolution of the transferrin family and associated receptors. *Biochim Biophys Acta BBA - Gen Subj*, 2012, 1820, 244–255.

Luck AN, Mason AB. Structure and dynamics of drug carriers and their interaction with cellular receptors: Focus on serum transferrin. *Adv Drug Deliv Rev*, 2013, 65, 1012–1019.

Macedo MF, Sousa Md. Transferrin and the transferrin receptor: of magic bullets and other concerns. *Inflamm Allergy-Drug Targets Former Cur. Drug Targets-Inflamm Allergy*, 2008, 7, 41–52.

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.

Nigović B. Ultraljubičasta i vidljiva (UV-Vis) spektrofotometrija. Predavanje iz kolegija Analitika lijekova. Zagreb, 2016.

Qian ZM, Li H, Sun H, Ho K. Targeted drug delivery via the transferrin receptor-mediated endocytosis pathway. *Pharmacol Rev*, 2002, 54, 561–587.

Ross DC, Egan TJ, Purves LR. Periodate modification of human serum transferrin Fe(III)-binding sites. Inhibition of carbonate insertion into Fe(III)- and Cu(II)-chelator-transferrin ternary complexes. *J Biol Chem*, 1995, 270, 12404–12410.

- Smith RM, Martell AE. *Critical Stability Constants*. Boston, MA, Springer US, 1989, str. 96.
- Steere AN, Byrne SL, Chasteen ND, Mason AB. Kinetics of iron release from transferrin bound to the transferrin receptor at endosomal pH. *Biochim. Biophys Acta BBA - Gen Subj*, 2012, 1820, 326–333.
- Šupraha Goreta S, Dabelic S, Dumic J. Insights into complexity of congenital disorders of glycosylation. *Biochem Medica*, 2012, 22, 156–170.
- Tomljanović M. *Instrumentalne kemijske metode*. Zenica, Hijatus, 2000, str. 41-45.
- Van Campenhout A. Effects of in Vitro Glycation on Fe³⁺ Binding and Fe³⁺ Isoforms of Transferrin. *Clin Chem*, 2004, 50, 1640–1649.
- Welch S, *Transferrin: The Iron Carrier*. Boca Raton, CRC Press., 1992, str.47.
- Wells BJ, Mainous A, 3rd King DE , Gill JM, Carek PJ, Geesey ME. The Combined Effect of Transferrin Saturation and Low-density Lipoprotein on Mortality. *Fam Med-Kans CITY*, 2004, 36, 324–329.
- Zhao N, Enns CA. Iron Transport Machinery of Human Cells. *Current Topics in Membranes. Elsevier*, 2012, pp. 67–93.
- Zhou Z, Singh R, Souweidane MM. Convection-Enhanced Delivery for Diffuse Intrinsic Pontine Glioma Treatment. *Curr Neuropharmacol*, 2017, 15, 116–128.
- Transferin, <http://www.chemtube3d.com>, pristupljeno 25.10.2017.
- Iron transport and storage, <http://www.open.edu>, pristupljeno 25.10.2017.

7. SAŽETAK

U ovom radu proučavan je utjecaj promjene glikozilacije transferina na konstantu vezanja željeza. Svrha rada bila je dokazati utjecaj glikanskog dijela strukture transferina na njegovu funkciju, točnije, na jačinu vezanja željeza. Sva ispitivanja su se provodila u PIPES puferu pri pH 7.4, na temperaturi 25°C, a kompleksirajući kompetitivni agens bila je EDTA. Korištena tehnika bila je spektroskopija u UV-Vis području. Iz podataka o apsorbanciji na 450 nm i koncentraciji dodane EDTA, izračunate su najprije pripadajuće koncentracije apo-transferina i holo-transferina te koncentracija otpuštenog željeza, a zatim i odgovarajuće konstante ravnoteže. Dobivene konstante ravnoteže veće su za red veličine kod vezanja željeza za nativni transferin u odnosu na asijalo-transferin. Također, kinetika otpuštanja željeza s asijalo-transferina je promijenjena u odnosu na nativnu sijaliniziranu formu.

SUMMARY

This work investigates the effect of change of transferrin glycosylation on the iron binding constant. The purpose of this study was to demonstrate the influence of the glycan part of the transferrin structure on its function, specifically on the iron binding strength. All experiments were carried out by UV-Vis spectroscopy in PIPES buffer (pH = 7.4) at 25° C and EDTA was used as a competitive chelator. Based on the absorbance data at 450 nm and the concentration of the added EDTA, concentrations of apo-transferrin, holo-transferrin and free iron were first obtained and then the corresponding equilibrium constants were calculated. The obtained equilibrium constants are an order of magnitude higher for the iron binding to the native transferrin, compared to asialo-transferrin. Additionally, the iron release kinetics from asialo-transferrin has been altered relative to the native sialylated protein form.

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

UTJECAJ PROMJENE GLIKOZILACIJE HUMANOG SERUMSKOG TRANSFERINA NA OTPUŠTANJE ŽELJEZA U PRISUTNOSTI KOMPETITIVNOG KELATORA EDTA

Helena Deriš

SAŽETAK

U ovom radu proučavan je utjecaj promjene glikozilacije transferina na konstantu vezanja željeza. Svrha rada bila je dokazati utjecaj glikanskog dijela strukture transferina na njegovu funkciju, točnije, na jačinu vezanja željeza. Sva ispitivanja su se provodila u PIPES puferu pri pH 7.4, na temperaturi 25°C, a kompleksirajući kompetitivni agens bila je EDTA. Korištena tehnika bila je spektroskopija u UV-Vis području. Iz podataka o apsorbanciji na 450 nm i koncentraciji dodane EDTA, izračunate su najprije pripadajuće koncentracije apo-transferina i holo-transferina te koncentracija otpuštenog željeza, a zatim i odgovarajuće konstante ravnoteže. Dobivene konstante ravnoteže veće su za red veličine kod vezanja željeza za nativni transferin u odnosu na asijalo-transferin. Također, kinetika otpuštanja željeza s asijalo-transferina je promijenjena u odnosu na nativnu sijaliniziranu formu.

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

Rad sadrži: 38 stranica, 7 grafičkih prikaza, 6 tablica i 39 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: transferin, željezo, glikozilacija, desijalinizacija, EDTA

Mentor: **Doc. dr. sc. Tin Weitner**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Doc. dr. sc. Tin Weitner**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Izv. prof. dr. sc. Mario Gabričević, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Davor Šakić, *asistent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: studeni, 2017.

Basic documentation card

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

Diploma thesis

EFFECT OF CHANGE IN GLYCOSYLATION OF HUMAN SERUM TRANSFERRIN ON IRON RELEASE TO COMPETING CHELATOR EDTA

Helena Deriš

SUMMARY

This work investigates the effect of change of transferrin glycosylation on the iron binding constant. The purpose of this study was to demonstrate the influence of the glycan part of the transferrin structure on its function, specifically on the iron binding strength. All experiments were carried out by UV-Vis spectroscopy in PIPES buffer (pH = 7.4) at 25° C and EDTA was used as a competitive chelator. Based on the absorbance data at 450 nm and the concentration of the added EDTA, concentrations of apo-transferrin, holo-transferrin and free iron were first obtained and then the corresponding equilibrium constants were calculated. The obtained equilibrium constants are an order of magnitude higher for the iron binding to the native transferrin, compared to asialo-transferrin. Additionally, the iron release kinetics from asialo-transferrin has been altered relative to the native sialylated protein form.

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

Thesis includes: 38 pages, 7 figures, 6 tables and 39 references. Original is in Croatian language.

Keywords: transferrin, iron, glycosylation, desialylation, EDTA

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

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

The thesis was accepted: November, 2017.