

Iskorištenje metode kromatofokusiranja za razdvajanje sijaloformi humanog serumskog transferina

Tomašić, Antonela

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:103179>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-06**



Repository / Repozitorij:

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



Antonela Tomašić

**Iskorištenje metode kromatofokusiranja za
razdvajanje sijaloformi humanog serumskog
transferina**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2021.

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

Zahvaljujem svima koji su mi bili pomoć i podrška za vrijeme studiranja. Također, zahvaljujem svom mentoru, doc. dr. sc. Tinu Weitneru, i ostalim djelatnicima Zavoda za opću i anorgansku kemiju, na svom pruženom vremenu, prenesenom znanju, pomoći i ugodnoj radnoj atmosferi u laboratoriju.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Transferin.....	1
1.1.1. Struktura transferina	1
1.1.2. Vezanje i otpuštanje željeza u organizmu	2
1.1.3. Bolesti i promjena glikozilacije transferina	3
1.2. Željezo	3
1.3. Kromatofokusiranje	4
1.3.1. Mehanizam razdvajanja proteina	4
1.4. Sažetak prethodnog istraživanja	5
2. OBRAZLOŽENJE TEME	7
3. MATERIJALI I METODE	8
3.1. Materijali	8
3.1.1. Kemikalije	8
3.1.2. Radni instrumenti i pribor	9
3.1.3. Priprema otopina za holotransferin i desijalilaciju transferina.....	9
3.1.3.1. Priprema koncentrata nativnog holotransferina.....	10
3.1.3.2. Priprema koncentrata desijaliziranog apotransferina.....	10
3.1.3.3. Priprema koncentrata desijaliziranog holotransferina	11
3.1.4. Priprema otopina za kromatofokusiranje	11
3.1.4.1. Priprema uzoraka za analizu kromatofokusiranjem	11
3.2. Metode	13
3.2.1. Kromatofokusiranje – pH gradijent metoda.....	13
4. REZULTATI I RASPRAVA	16
5. ZAKLJUČCI	20
6. LITERATURA	21
7. SAŽETAK/SUMMARY	23

1. UVOD

1.1. Transferin

Humani serumski transferin (siderofilin, serotransferin, TF) najvažniji je transportni protein željeza u organizmu i četvrti najzastupljeniji protein krvne plazme. Glavna mu je funkcija prijenos željeza između mjesta apsorpcije (npr. mukozne stanice u duodenumu), korištenja (npr. koštana srž), pohrane (npr. jetra) te razgradnje hemoglobina. Sudjeluje i u kontroli nakupljanja viška željeza koje može imati toksične učinke na organizam (N. Dennis Chasteen, 1977).

Dio je obitelji transferina, u koju spadaju nehemski glikoproteini koji vežu željezo. Osim serumskog transferina, koji se nalazi u krvi, ovdje spadaju i laktoferin (LF), ovotransferin (OTF) i melanotransferin (MTF). Laktoferin se nalazi u mlijeku, suzama, žuči, gušteračnom soku, mukoznoj tekućini i leukocitima. Ovotransferin je prisutan u bjelanjku ptičjih jaja, a melanotransferin je prisutan u maloj količini na površini membrana stanica (Palmour i Sutton, 1971).

1.1.1. Struktura transferina

Transferin je glikoprotein molekulske mase oko 80 kDa, sastavljen od dvije polutke, građen od jednog polipeptidnog lanca i od glikanskog dijela.

Polipeptidni lanac sastoji se od 679 aminokiselina, podijeljenih u dvije strukturno slične domene: N-domena (aminokiseline 1-331) i C-domena (aminokiseline 339-679), koje obje sadrže po jedno vezno mjesto za ion željeza. Objе domene podijeljene su na dvije poddomene: N1 (aminokiseline 1-95 i 247-331), N2 (aminokiseline 96-249), C1 (aminokiseline 339-425 i 573-679) i C2 (aminokiseline 426-572), koje su povezane kratkim peptidnim lancem (Wang i sur., 2015; Mujika i sur., 2012). Iako su N-domena i C-domena veoma homologne, razlikuju se u afinitetu prema ionima te kinetici vezanja i oslobađanja iona (Kumar i Mauk, 2012).

Glikanski dio transferina nalazi se na C-domeni, koja sadrži dva vrlo varijabilna N-vezana oligosaharidna lanca na Asn413 i Asn611. Mikroheterogenija transferina posljedica je postojanja više različitih varijanti navedenih oligosaharidnih lanaca. Glikani se mogu razlikovati prema stupnju grananja, a mogu biti: biantenarni, triantenarni i tetraantenarni. Na kraju lanaca nalazi se različit broj sijalinskih završetaka koji znatno utječu na izoelektričnu točku (pI) transferina – gubitkom jednog sijalinskog završetka dolazi do porasta pI za oko 0,1

pH jedinice. Većina molekula transferina (85%) u cirkulaciji zdravih ljudi ima dva biantenarna glikana, na čijim su završecima ukupno četiri sijalinske kiseline (tetrasijalotransferin). One su vezane α -2,6-glikozidnom vezom, a izoelektrična točka ove glavne forme iznosi 5,4. Glikozilacija nema značajan izravan učinak na vezanje transferina na stanične receptore, ali ima ulogu u održavanju njegove aktivne konformacije (Sun i sur., 1999).

1.1.2. Vezanje i otpuštanje željeza u organizmu

Transferin može vezati do dva iona željeza i to čvrsto, ali reverzibilno. On posjeduje dva vezna mjesta za željezo, jedno u N-domeni, a drugo u C-domeni. Transferin preferencijalno veže ione željeza(III), ali on može na sebe također vezati i željezo u 2+ oksidacijskom stanju, doduše uz znatno nižu konstantu ravnoteže formiranja kompleksa. Željezo sadrži šest koordinacijskih mjesta – na objema veznim mjestima željezo je koordinirano monodentatnim: Asp, dva Tyr, His ligandima i jednim sinergističkim bidentatnim karbonatnim anionom. Sinergistički anion nužan je za vezanje željeza(III) u stabilni transferinski kompleks (Luck i Mason, 2012). Bidentatni karbonatni anion zauzima preostala dva koordinacijska mjesta, a njegov naboj smanjuju pozitivno nabijeni bočni lanac Arg i pozitivan naboj N-kraja jedne od α -uzvojnica, tako tvoreći džep povoljan za vezanje tog aniona (Baker i sur., 2003). Vezna mjesta ipak se razlikuju u konstanti ravnoteže vezanja Fe^{3+} , koja je za vezno mjesto na N-domeni $1 \times 10^{22} M^{-1}$ te $6 \times 10^{22} M^{-1}$ na C-domeni (Evans i Williams, 1978). Izoelektrična točka (pI) transferina smanjuje se za približno 0,2 pH jedinice vezanjem svakog od dva Fe^{3+} (Arndt, 2001). Osim Fe^{3+} , transferin ima sposobnost vezanja velikog broja drugih dvovalentnih i trovalentnih prijelaznih metala, kao i nekoliko lantanoida, primjerice: Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cr^{3+} , Mn^{3+} , Co^{3+} , Ga^{3+} , Ho^{3+} , Er^{3+} , Tb^{3+} , Nd^{3+} i Gd^{3+} .

Otpuštanje željeza započinje vezanjem transferina s transferinskim receptorom (TFR) na površini stanica. Primarno se veže apotransferin (transferin bez vezanog željeza) koji ima znatno veći afinitet u odnosu na holotransferin (zasićeni transferin na kojem su vezana dva iona Fe^{3+}). Nakon vezanja na receptor, dolazi do endocitoze holotransferina te formiranja endosoma, u kojima se otpušta Fe^{3+} s holotransferina zbog kiselog pH endosoma, koji iznosi oko 5,5. Apotransferin ostaje vezan na svome receptoru zbog visokog afiniteta prema receptoru pri kiselom pH te bude recikliran nazad na površinu stanice. Zbog ekstracelularnog fiziološkog pH koji smanji afinitet apotransferina prema receptoru, apotransferin se otpušta u cirkulaciju i ponovno koristi u prijenosu Fe^{3+} (Baker i sur., 2003).

1.1.3. Bolesti i promjena glikozilacije transferina

Transferin smanjenog stupnja sijaalilacije povezan je s poremećajima u glikozilacijskoj aktivnosti i koristi se kod dijagnoze kroničnog alkoholizma (Anton, 2001; Konig i sur., 1995) i prirođenog poremećaja glikozilacije (Edwards i sur., 2006).

Promjene u grananju, fukozilaciji ili sijaalilaciji transferina zabilježene su u mnogim malignim i prirođenim stanjima (npr. galaktozemija), kao i kod raznih upalnih bolesti. Proučavanje mikroheterogenije transferina u serumu neanemičnih pacijenata oboljelih od reumatoidnog artritisa, reumatoidnog artritisa s deficitom željeza i onih oboljelih od anemije kronične bolesti pokazalo je povećano grananje transferinskih glikana u svim skupinama pacijenata oboljelih od reumatoidnog artritisa, što je korelirano s aktivnošću bolesti, pogotovo kod anemije kronične bolesti (Feelders i sur., 1992). Povećano grananje i sijaalilacija transferinskih glikana zabilježeni su i kod pacijenata oboljelih od ulceroznog kolitisa (M. Grzymislawski i sur., 2006).

1.2. Željezo

Željezo je esencijalan element u ljudskom organizmu. Otprilike 65% željeza u organizmu nalazi se vezano u hemoglobinu (Hb) eritrocita, 10% prisutno je u mioglobinu, enzimima i citokromima. Ostatak željeza pohranjen je u jetri, makrofagima retikuloendotelno sustava i koštanoj srži (Andrews, 1999a; Munoz i sur., 2009).

Ono je važno za aktivnost proteina i enzima različitih bioloških funkcija. Primjerice, nalazi se u proteinima uključenim u: proces staničnog disanja (npr. citokrom c oksidaza, citokromi), prijenos i metabolizam kisika (npr. hemoglobin, peroksidaza, katalaza, citokrom P450), sintezu i popravak DNA (npr. ribonukleotid reduktaza i DNA helikaza) te signalizaciju (npr. NO sintaza, hidrosilaze i oksidoreduktaze) (Crichton, 2016). Brojne biološke uloge željeza posljedica su njegovog sudjelovanja u oksido-redukcijskim (redoks) reakcijama, u kojima može predati ili primiti elektrone. Ono postiže širok raspon oksidacijskih stanja, od -2 do +7, a u biološkim se sustavima primarno nalazi u +2, +3 i +4 stanju, što mu omogućava vezanje na velik broj liganada (Torti i sur., 2018).

Ipak, ovakva kemijska svojstva dopuštaju željezu stupanje u štetne reakcije, kao što je Fentonova reakcija, u kojoj Fe^{2+} reagira s vodikovim peroksidom (H_2O_2) te nastaje veoma reaktivni hidrosilni radikal ($HO\cdot$), koji oksidira proteine, masne kiseline i nukleinske kiseline, što dovodi do disfunkcije i oštećenja stanica (Aruoma i sur., 1989). Kako bi se izbjegli štetni

utjecaji slobodnog željeza uslijed oksidativnog stresa, ono se veže za proteine kao što su unutarstanični feritin, koji služi za pohranu, te transferin, koji se nalazi u cirkulaciji i služi za transport željeza.

1.3. Kromatofokusiranje

Kromatofokusiranje je tehnika koja koristi kromatografiju ionske izmjene uz pH gradijent te se koristi za razdvajanje i pročišćavanje proteina na temelju njihove razlike u izoelektričnoj točki (pI), koja predstavlja pH pri kojem je neto naboj proteina jednak nuli. Ovom tehnikom u pravilu je moguće razdvajati čak i molekule čija se pI vrijednost razlikuje za samo 0,02 pH jedinice.

1.3.1. Mehanizam razdvajanja proteina

Za razdvajanje proteina temeljem njihove razlike u izoelektričnoj točki, primjenom kolone za anionsku izmjenu, medij za kromatofokusiranje podešen je početnim puferom na pH koji je nešto viši od potrebnog pH. Drugi, elucijski pufer podešen je na najniži potrebni pH te prolaskom kroz kolonu (koja sadrži smolu za anionsku ionsku izmjenu) počinje snižavati pH i generira padajući pH gradijent. U slučaju da se koristi kolona za kationsku izmjenu, kreće se s puferom nižeg (kiselijeg) pH prema puferu višeg (bazičnijeg) pH.

Nakon što prođe predgradijentni volumen elucijskog pufera, uzorak proteina (koji je prethodno otopljen u početnom puferu) nanosi se na kolonu. Proteini u uzorku koji su na pH iznad svoje pI, negativno su nabijeni i zadržani na vrhu kolone jer su vezani na pozitivno nabijene amino skupine kolone, dok se proteini pri $\text{pH} \leq \text{pI}$ kreću zajedno s puferom prema kraju kolone i neće se vezati do zone pH iznad svoje pI.

Kako pH pri vrhu kolone nastavlja padati, svaki protein, čija je pH vrijednost niža od pripadajuće pI vrijednosti, postaje pozitivno nabijen i time odbijen pozitivno nabijenim amino skupinama kolone, što uzrokuje njegovo kretanje elucijskim puferom prema donjem kraju kolone, putujući brzinom većom od one kojom se niz kolonu smanjuje iznos pH gradijenta. Ipak, prolaskom proteina niz kolonu raste okolni pH te kad protein dosegne zonu pH iznad pI, postaje negativno nabijen i ponovno se veže na kolonu. Protein ostaje vezan dok razvijajući pH gradijent ne snizi lokalni pH, tada protein ponovno postiže vrijednosti $\text{pH} \leq \text{pI}$, postaje pozitivno nabijen, i putuje prema kraju kolone. Ovaj proces ponavlja se sve dok protein ne bude eluiran iz kolone na pH približnom pI, pritom ne imajući gotovo nikakav rezultatni naboj.

Dakle, dok god se razvija gradijent tijekom kromatofokusiranja, proteini različitih izoelektričnih točki putuju kroz kolonu različitim brzinama, neprestalno se vežu i disociraju, nakupljaju se u uske trake te u konačnici eluiraju s kolone. Proteini s najvišim pI eluiraju se prvi, a posljednji oni s najnižim pI vrijednostima (Anderson, 2005).

1.4. Sažetak prethodnog istraživanja

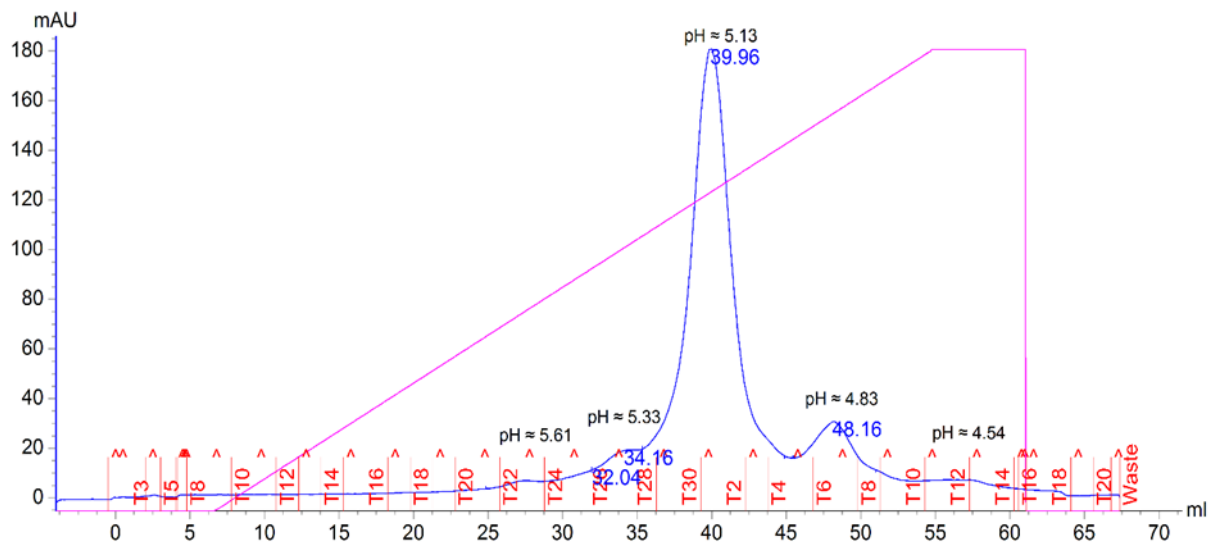
U prethodnom istraživanju, koje je opisano u radu pod naslovom: „Kromatofokusiranje kao metoda razdvajanja različitih sijaloformi humanog serumskog transferina“ (Tomašić, 2020), primarni cilj bio je utvrditi mogućnost razdvajanja transferina različitih sijaloformi, kao i različitog stupnja zasićenosti željezom, korištenjem metode kromatofokusiranja uz linearni pH gradijent.

Temeljem dobivenih rezultata istraživanja dokazano je da je odabranom metodom moguće razdvojiti navedene oblike transferina, na osnovi njihovih različitih izoelektričnih točaka. Međutim, uočeno je slabije razlučivanje metode, koje je poboljšano korištenjem užeg pH gradijenta.

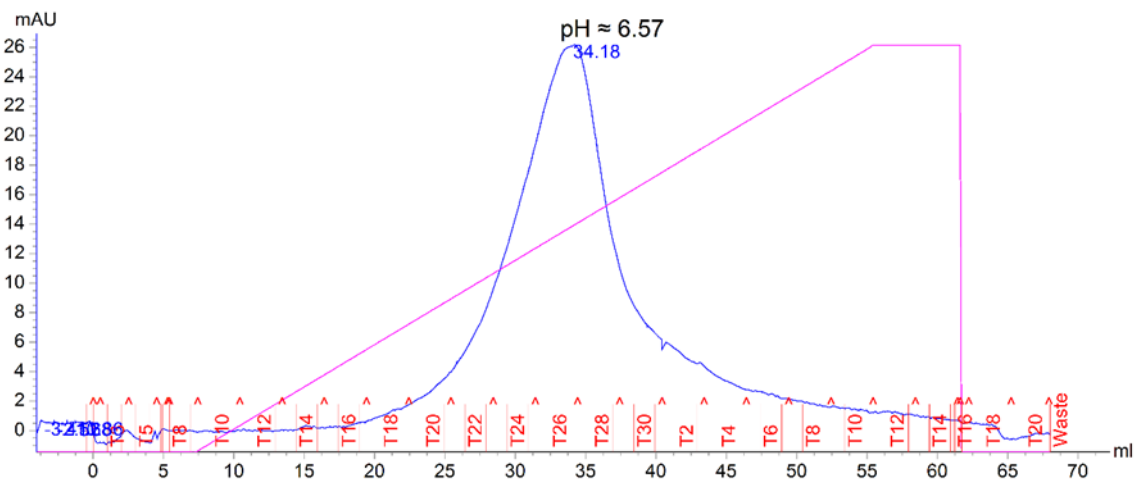
Linearni pH gradijent dobiven je korištenjem pISep pufera, koji je primjenjiv u širokom rasponu pH vrijednost, što je omogućilo nesmetano variranje linearog pH gradijenta potrebnog za pojedinu analizu.

Pojedine sijaloforme i različito zasićenje transferina željezom očitovat će se kao kromatogramski pikovi na različitim pH vrijednostima unutar linearnog pH gradijenta, a pH maksimumi tih pikova približno odgovaraju njihovim izoelektričnim točkama (pI).

Utvrđeno je da desijalilacijom dolazi do porasta pI vrijednosti transferina, budući da se uklanjanjem sijalinske kiseline smanjuje kiselost proteina jer je karboksilna skupina na sijalinskoj kiselinu razmjerno kisela. Navedeno zapažanje potkrijepljeno je kromatogramima nativnog apotransferina (Slika 1.) te desijaliziranog apotransferina (Slika 2.), na kojima je vidljivo da su pI vrijednosti svih frakcija nativnog apotransferina niže od pI vrijednosti desijaliziranog apotransferina.



Slika 1. Kromatogram nativnog apotransferina dobiven kromatofokusiranjem; prikaz ovisnosti apsorbancije ($\lambda = 280 \text{ nm}$) o broju frakcije.



Slika 2. Kromatogram desijaliziranog apotransferina dobiven kromatofokusiranjem; prikaz ovisnosti apsorbancije ($\lambda = 280 \text{ nm}$) o broju frakcije.

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Ovdje je naveden nastavak istraživanja, koje je prikazano u radu pod nazivom „Kromatofokusiranje kao metoda razdvajanja različitih sijaloformi humanog serumskog transferina“, nagrađenom Dekaničinom nagradom. Dodatni specifični ciljevi ovog diplomskog rada su provjera učinkovitosti kromatofokusiranja humanog serumskog transferina i njegovih sijaloformi kroz analizu iskorištenja metode.

Iskorištenje metode određeno je prikupljanjem podataka o integralima površina ispod kromatografskih UV-Vis signala, koji se računaju u računalnom programu UNICORN start 1.1., preko kojih se korištenjem Beer-Lambertovog zakona doznaje koncentracija, a potom množina i masa izlaznog transferina, dok se približna masa korištenog uzorka transferina procjenjuje iz odvage. Poznavanjem masa uzorka i izlaznog transferina zatim se izračuna iskorištenje metode.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije

U izradi ovog rada korištene su sljedeće kemikalije:

- Nativni humani apotransferin, > 97 %, $M_r = 80000$ (Sigma-Aldrich)
- pISep koncentrat A (CryoBioPhysica)
- pISep koncentrat B (CryoBioPhysica)
- PIPES (piperazin-*N,N'*-bis(2-etansulfonska kiselina)), $M_r = 378,6$ (Amresco)
- Na_3NTA (trinatrijeva sol nitrilotrioctene kiseline; *N,N*-bis(karboksimetil)glicin), $M_r = 257,1$ (Sigma-Aldrich)
- Na_2EDTA (dinatrijeva sol etilendiamintetraoctene kiseline), $M_r = 372,24$ (Amresco)
- Neuraminidaza (GlycoCleave® Neuraminidase Kit) (GALAB Technologies GmbH)
- $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_3$ (željezov(III) perklorat), $M_r = 354,19$ (Sigma-Aldrich)
- Otopina HClO_4 , $c = 1 \text{ M}$
- Otopina HCl , $c = 5 \text{ M}$
- Otopina NaOH , $c = 2 \text{ M}$
- NaOAc (natrijev acetat), $M_r = 136,08$ (Kemika)
- CaCl_2 (kalcijev klorid), $M_r = 110,99$ (Lach-Ner)
- NaCl (natrijev klorid), $M_r = 58,44$ (Gram-Mol)
- KCl (kalijev klorid), $M_r = 74,56$ (Alkaloid)
- NaHCO_3 (natrijev hidrogenkarbonat), $M_r = 84,01$ (Kemika)
- Redestilirana voda

3.1.2. Radni instrumenti i pribor

- ÄKTA start FPLC uređaj (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Švedska)
- Dvije HiTrap Q HP 1 mL kromatografske kolone spojene u seriju (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Švedska)
- Analitička vaga, Sartorius LA 310 S, točnost odvage 0,1 mg
- pH-metar Mettler Toledo MP 220, uz kalibraciju standardnim otopinama pH = 4, pH = 7 i pH = 10
- Inkubator VWR, INCU-Line IL 115
- Vortex miješalica, Cole-Parmer Vortex Mixer
- PC računalo, softveri: Microsoft Excel, UNICORN start 1.1, pISep pH gradient maker version 2.0 softver
- Centrifuga Eppendorf 5424
- Centrifugalni filteri, Vivaspin 500 MWCO 30 kDa
- Amicon Ultra centrifugalni filter
- Varian Cary 50 Bio UV-Vis spektrofotometar
- Mikropipete Rainin Pipet-Lite L-10 XLS, L-20 LTS, L-200 LTS i L-1000 XLS (Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska)
- Nastavci za mikropipete Eppendorf
- Plastične epruvete od 1,5 mL i 2 mL (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- Kivete za mjerenje apsorbancije, $l = 1$ cm (Hellma QS)
- Metalna špatula

3.1.3. Priprema otopina za holotransferin i desijalilaciju transferina

- 0,1 M otopina željezovog(III) perklorata dobivena je otapanjem potrebne mase $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_3$ u odgovarajućem volumenu 1 M HClO_4 .
- Otopina PIPES pufera priređena je otapanjem potrebne mase PIPES-a i kalijevog klorida (KCl) u destiliranoj vodi te je pH pufera podešen na 7,4 korištenjem pH-metra i otopine HCl, $c = 5$ M.
- 0,01 M otopina natrijevog hidrogenkarbonata (NaHCO_3) pripravljena je otapanjem potrebne mase NaHCO_3 u PIPES puferu.
- 2 mM otopina Na_3NTA priređena je otapanjem određene mase Na_3NTA u PIPES puferu.

- 1 mM otopina Fe(NTA)₂ dobivena je polaganim dodavanjem 1 mL 0,1 M otopine željezovog (III) perklorata u 2 mM otopinu NTA, uz neprekidno miješanje magnetnim mješačem, u sredinu vrtloga tekućine, kako ne bi nastao neželjeni talog željezovog hidroksida.
- 0,1 M otopina EDTA dobivena je otapanjem potrebne mase Na₂EDTA u PIPES puferu.
- 0,01 M otopina EDTA pripremljena je korištenjem određenog volumena priređene 0,1 M otopine EDTA, koja je potom razrijeđena PIPES puferom.
- Pufer za desijalilaciju priređen je otapanjem potrebne mase: NaOAc, NaCl i CaCl₂ u destiliranoj vodi, da bi konačne množinske koncentracije tvari u puferu iznosile: 0,2 M NaOAc, 0,15 M NaCl i 0,009 M CaCl₂. pH pufera podešen je na 5,5.

3.1.3.1. Priprema koncentrata nativnog holotransferina

Izvagana je potrebna količina nativnog apotransferina, koji se otopi u 0,01 M otopini natrijevog hidrogenkarbonata u PIPES puferu. Dobivena je otopina koja je sadržavala određenu koncentraciju nativnog apotransferina te 10 mM otopinu natrijevog hidrogenkarbonata. Toj otopini dodana je otopina željezovog dinitrilotriacetata u suvišku te je ostavljena preko noći, nakon čega je tri puta isprana puferom pISep A za kromatofokusiranje u Amicon Ultra filteru, kako bi se dobio koncentrat nativnog holotransferina, kojem je konačna koncentracija određena UV-Vis spektrofotometrijom.

3.1.3.2. Priprema koncentrata desijaliziranog apotransferina

Priredi se otopina apotransferina približne masene koncentracije $\gamma = 6,25 \text{ mg / mL}$ vaganjem potrebne mase nativnog apotransferina i otapanjem u puferu za desijalilaciju. Uzeto je 800 μL takve otopine, dodano u 200 μL suspenzije neuraminidaze (enzima koji uklanja sijalinsku kiselinu) adsorbirane na sitne kuglice. Otopina se inkubira 48 h na 37 °C. Nakon perioda inkubacije, otopina se centrifugira jednu minutu (1200 RCF) te odvoji supernatant koji sadrži samo desijalizirani apotransferin. Desijalizirani apotransferin ukoncentrira se u Vivaspin 500 MWCO 30 kDa centrifugalnom filteru, dodatkom po oko 0,5 mL prikupljenog supernatanta na centrifugiranje u periodima u iznosu od 5 minuta (12000 RCF), dok se ne iskoristi cijeli prikupljeni supernatant. Nakon toga se, centrifugiranjem na isti način, prikupljeni koncentrat tri puta ispere puferom pISep A za kromatofokusiranje. Koncentracija nastalog koncentrata desijaliziranog transferina određena je UV-Vis spektrofotometrijom, mjerenjem apsorbancije na $\lambda = 280 \text{ nm}$.

3.1.3.3. Priprema koncentrata desijaliziranog holotransferina

Iz koncentrata desijaliziranog apotransferina i 0,01 M otopine natrijevog hidrogenkarbonata u PIPES-u dobivena je otopina koja je sadržavala određenu koncentraciju desijaliziranog apotransferina te 10 mM otopinu natrijevog hidrogenkarbonata. Toj otopini dodana je otopina željezovog dinitrilotriacetata u suvišku te je ostavljena preko noći u frižideru na temperaturi 2°C – 8°C, nakon čega je tri puta isprana puferom pISep A za kromatofokusiranje u Amicon Ultra filteru, kako bi se dobio koncentrat desijaliziranog holotransferina, kojem je konačna koncentracija određena UV-Vis spektrofotometrijom.

3.1.4. Priprema otopina za kromatofokusiranje

- Otopina ishodnog pISep pufera 1 dobivena je miješanjem određenog volumena pISep koncentrata A, pISep koncentrata B i destilirane vode. Potrebne volumene računa se računalnim programom pISep pH gradient maker version 2.0. Pufer je podešen na pH 2,4 korištenjem pH-metra i 5 M otopine HCl-a.
- Otopina ishodnog pISep pufera 2 dobivena je miješanjem određenog volumena pISep koncentrata B i destilirane vode. Potrebne volumene računa se u računalnom programu pISep pH gradient maker version 2.0. Pufer je podešen na pH 10,8 korištenjem pH-metra i 2 M otopine NaOH.
- pISep pufer A (početnog pH) za kromatofokusiranje priređen je miješanjem različitih omjera volumena ishodnih pISep pufera 1 i 2 ovisno o potrebnom početnom pH za linearni pH gradijent. Taj omjer računa pISep pH gradient maker version 2.0 softver.
- pISep pufer B (završnog pH) za kromatofokusiranje pripremljen je miješanjem različitih omjera volumena ishodnih pISep pufera 1 i 2 ovisno o potrebnom završnom pH za linearni pH gradijent. Taj omjer računa pISep pH gradient maker version 2.0 softver.

3.1.4.1. Priprema uzoraka za analizu kromatofokusiranjem

- Uzorak nativnog apotransferina priređen je vaganjem određene količine nativnog humanog apotransferina, koji je zatim otopljen u pISep puferu A miješanjem na vortex miješalici te je tako priređenom uzorku, u slučaju blage promjene pH zbog otapanja proteina u puferu, pH podešen na željenu pH vrijednost pISep pufera A.
- Uzorak nativnog holotransferina dobiven je razrjeđivanjem malog volumena koncentrata holotransferina u 800 µL pISep A pufera te mu je pH podešen na ishodni pH tog pufera.

- Uzorci desijaliziranog apotransferina i desijaliziranog holotransferina priređeni su iz svojih koncentrata istim načinom kao i uzorak nativnog holotransferina, ali iz pripadajućih koncentrata.

3.2. Metode

3.2.1. Kromatofokusiranje – pH gradijent metoda

Postavke za izvedbu eksperimenta kromatofokusiranja korištenjem ÄKTA start FPLC uređaja zadane su UNICORN start 1.1 softverom (Slika 3.).

Phase	Variable	Value	Range
Method Settings	ColumnVolume {CV}	1.924	[0.100 - 999999.0]
	Column	Any <input type="text"/>	
Method Settings	D HighPressureValue {MPa}	0.30	[0.00 - 0.50]
Method Settings,...	FlowRate {ml/min}	1.0	[0.5 - 5.0]
Prime and Equilibration	D Equilibration B Concentration {%B}	0.0	[0.0 - 100.0]
Prime and Equilibration	Equilibration Volume {CV}	2.00	[0.00 - 999999.0]
Sample Application,...	D Last tube filled action	Pause <input type="text"/>	
Sample Application	D Fractionation volume (Sample Appl) {ml}	1.0	[0.5 - 15.0]
Sample Application	Loop Sample Volume {ml}	4.00	[0.00 - 999999.0]
Elution and Fractionation	D Elution Prime B Concentration_(10) {%B}	0.0	[0.0 - 100.0]
Elution and Fractionation	Elution Start at B Concentration {%B}	0.0	[0.0 - 100.0]
Elution and Fractionation	Elution Fixed Fractionation Volume {ml}	1.5	[0.5 - 15.0]
Elution and Fractionation	Target B concentration for elution segment_(1) {%B}	0.0	[0.0 - 100.0]
	volume of elution gradient segment_(1) {ml}	0.0	[0.0 - 10000.0]
	D Length of elution segment_(1) {CV}	1.00	[0.00 - 999999.0]
Elution and Fractionation	Target B concentration for elution segment_(2) {%B}	100.0	[0.0 - 100.0]

Slika 3. UNICORN start 1.1. postavke za provedbu eksperimenta kromatofokusiranja transferina.

Provedeno je nekoliko eksperimenata korištenjem različitih koncentracija pojedinog uzorka transferina, priređenih na način koji je opisan u poglavlju 3.1.4.1. Za analize kromatofokusiranjem korišteno je oko 650 µL uzoraka.

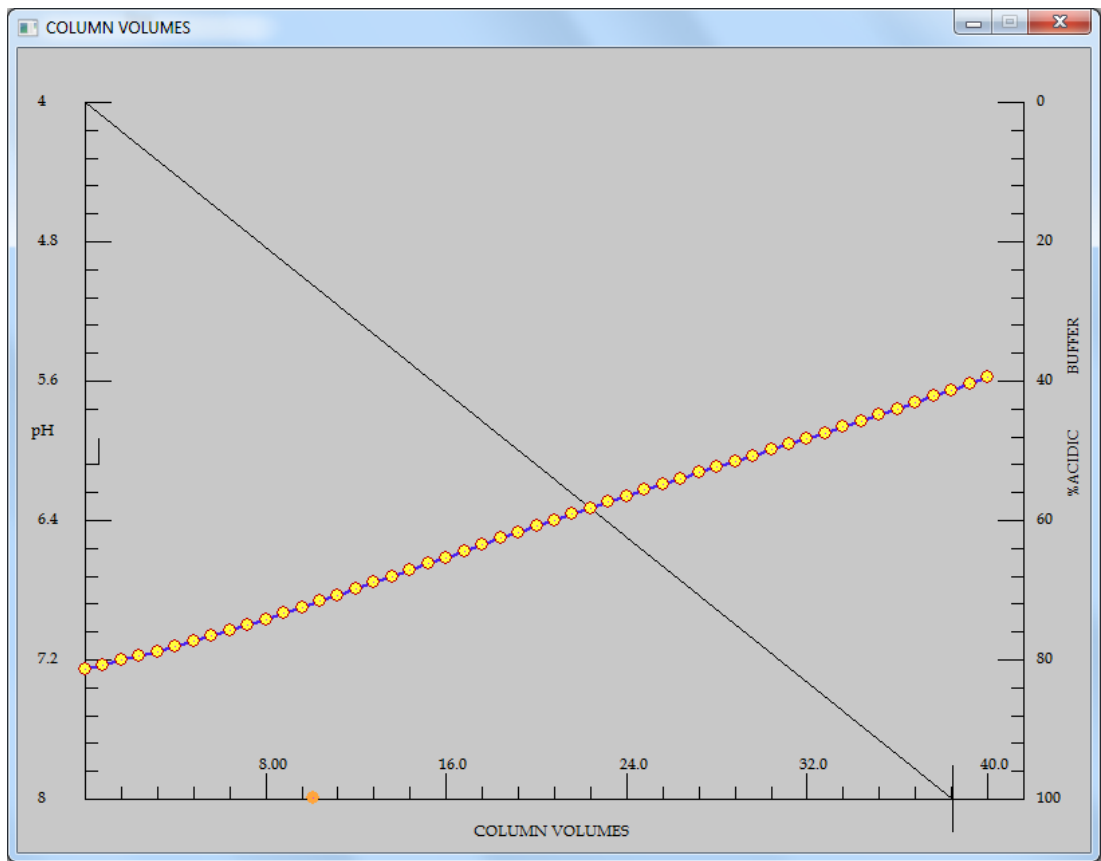
Korištene su dvije HiTrap Q HP kolone, radnog volumena 0,962 mL svaka. Kromatografske kolone spojene su u seriju, radi boljeg razlučivanja različitih proteinskih frakcija. Nakon nanošenja uzorka transferina na kolonu i pokretanja uređaja, prikupljene su frakcije u plastične epruvete od 2 mL te im je pH-metrom naknadno određen pH za provjeru linearnosti pH gradijenta i određivanje pI vrijednosti proteinskih frakcija.

Puferi pISep A i B za kromatofokusiranje pripremljeni su miješanjem ishodnih pufera pISep 1 i 2, čiji su udjeli određeni korištenjem pISep pH gradient maker version 2.0 softvera (Slika 4. i Slika 5.).

The screenshot shows the 'pISep pH Profile and Scale-Up Calculator' software interface. Key elements include:

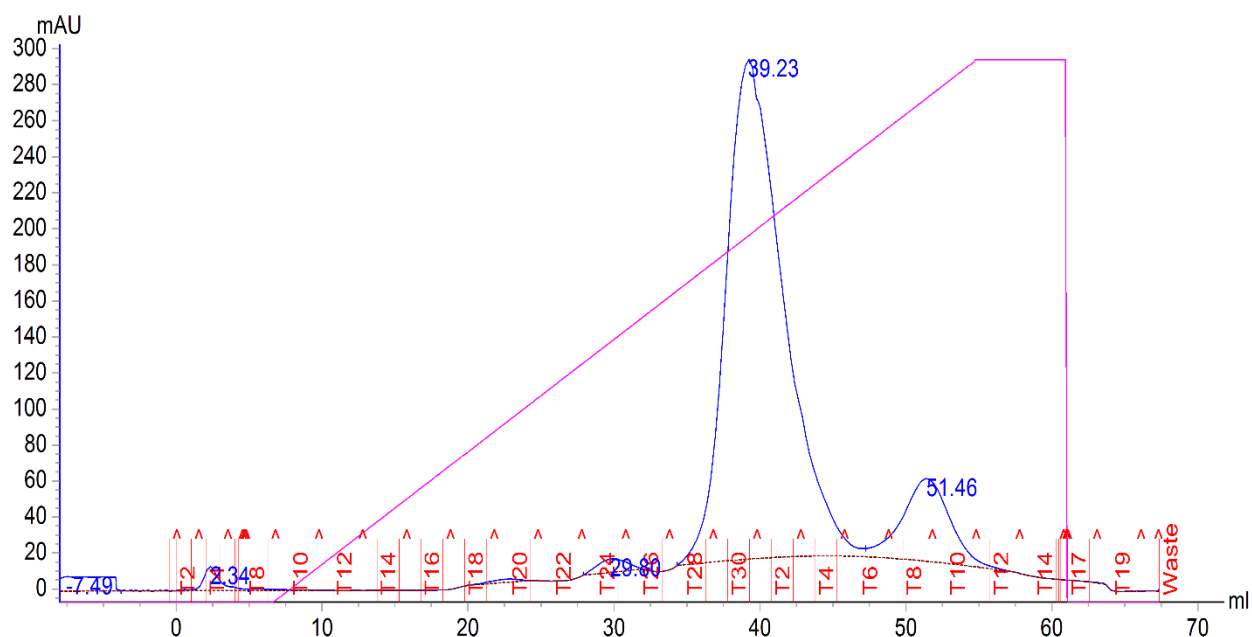
- File and Plot Settings:** 'ENTER DATA FILE NAME, FILE EXTENSION WILL BE SET AUTOMATICALLY TO .CSV' with 'transferrin.csv' entered. 'WIDTH OF PLOT' is 800 and 'HEIGHT OF PLOT' is 600. A 'SHOW HELP' button is highlighted in green.
- Calculation Parameters:** 'CALCULATE pH STEP' is set to 1. 'STEP NUMBER' is 4. 'INITIAL pH' is 8 and 'ULTIMATE pH' is 8. 'STEP SLOPE OF LINEAR pH GRADIENT [pH UNITS/COLUMN VOLUME]' is 0.1. 'STEP STARTING pH' is 4 and 'STEP FINAL pH' is 8. 'POINTS PER LINEAR STEP' is 50. 'POINTS PER NONLINEAR STEP' is 50. 'LOAD PREVIOUSLY SAVED DATA FILE' and 'STORED FILES WITH LOT DEFAULT COEFFICIENTS' are also visible.
- Buttons:** 'EXIT PROGRAM', 'PLOT LINEAR GRAPH', 'PLOT NONLINEAR GRAPH', 'RESET ALL VALUES', 'CLEAR THIS pH STEP', 'CLEAR ALL pH STEPS', 'RESCALE GRAPH', 'ACTIVATE SCALE UP ANALYSIS', 'CALCULATE COLUMN VOLUME', and 'SAVE COMMENTS'.
- Lot and Custom Coefficients:** 'LOT DEFAULT COEFFICIENTS' and 'CUSTOM COEFFICIENTS FOR %ACID BUFFER VS pH: SEPARATED BY COMMAS: A TO J' are listed. 'pH RANGE of LIMITED pISep' is checked.
- Flow and Volume Settings:** 'MIN/COL VOL (FOR TIME BASED GRADIENTS) =', 'ENTER FLOW RATE ml/min', 'EQUILIBRATION TIME', and 'COLUMN VOLUME ml' (24.3848; 15.6152) are present.
- Adjustable Limits:** 'RECALL SAVED CUSTOM COEFFICIENTS', 'ADJUSTABLE LOWER pISep pH LIMIT' (2.4), and 'ADJUSTABLE HIGHER pISep pH LIMIT' (10.848) are shown at the bottom.

Slika 4. Primjer postavki u pISep pH gradijent maker version 2.0. računalnom programu.

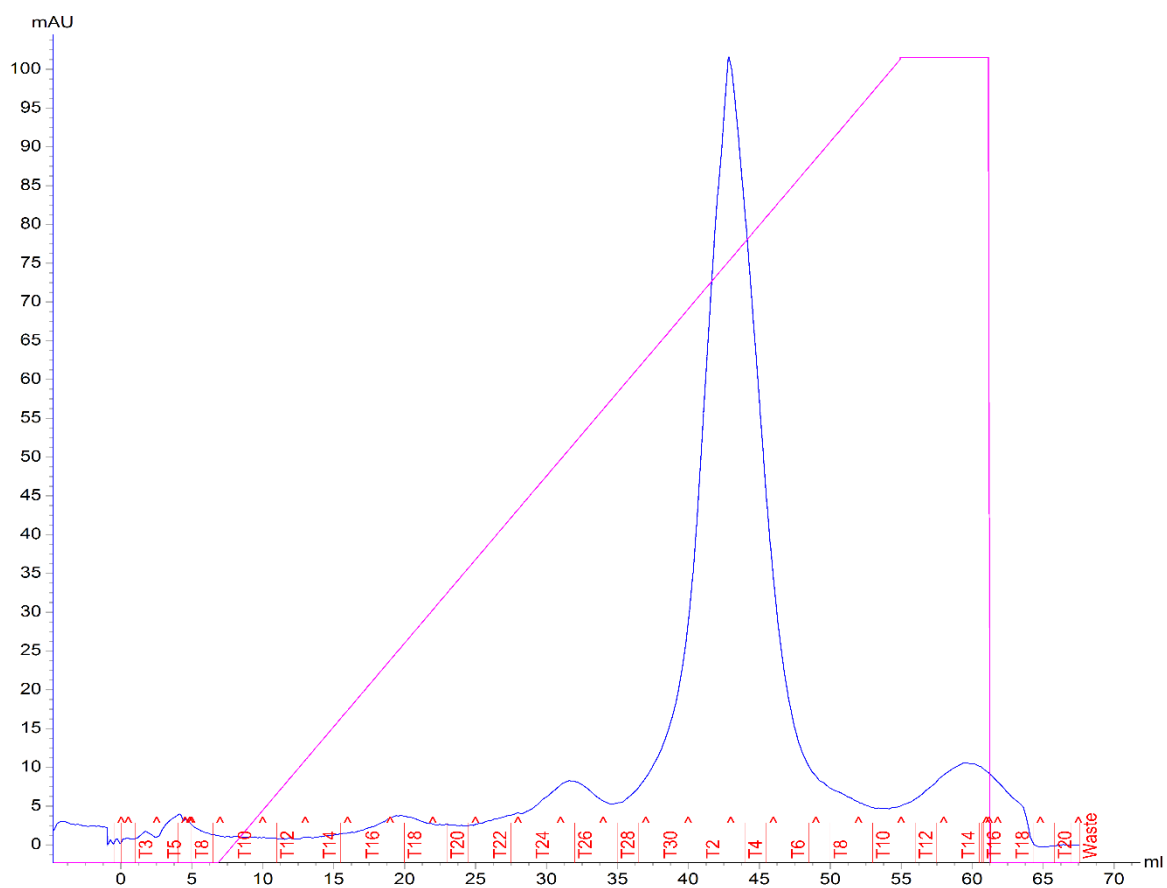


Slika 5. Grafički prikaz linearnog gradijenta dobivenog pISep pH gradijent maker version 2.0. računalnim programom.

4. REZULTATI I RASPRAVA



Slika 6. Kromatogram smjese nativnog transferina i Fe^{3+} u omjeru 1:1; primjer kromatograma visokog iskorištenja (Iskorištenje = 98,12 %)



Slika 7. Kromatogram nativnog apotransferina; primjer kromatograma niskog iskorištenja (Iskorištenje = 63,84 %)

Tablica 1. Prikaz rezultata iskorištenja metode kromatofokusiranja za transferin.

broj pokusa	ukupna površina ispod kromatografskog UV-Vis signala (mL·mAU)	procijenjena masa uzorka transferina (mg)	procijenjena masa izlaznog transferina (mg)	iskorištenje (%)
1	25,01	0,150	0,125	83,33
2	28,95	0,150	0,145	96,67
3	29,42	0,150	0,147	98,00
4	19,22	0,150	0,096	64,07
5	40,44	0,209	0,202	96,65
6	64,59	0,660	0,323	48,92
7	144,84	0,848	0,724	85,40
8	142,98	1,000	0,715	71,50
9	189,23	1,406	0,946	67,28
10	255,50	1,684	1,278	75,86
11	188,28	1,790	0,941	52,59
12	195,18	1,790	0,976	54,53
13	315,42	2,000	1,577	78,85
14	552,67	3,400	2,763	81,26
15	516,65	3,980	2,583	64,90
16	518,31	4,060	2,592	63,84
17	572,88	4,550	2,864	62,95
18	1970,22	10,040	9,851	98,12
19	2764,38	16,250	13,822	85,06

Račun za masu izlaznog transferina :

Množina izlaznog transferina računa se preko izraza za Beer-Lambertov zakon:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

$$A = \varepsilon \cdot \frac{n}{V} \cdot l$$

$$n = \frac{A \cdot V}{10^6 \cdot \varepsilon \cdot l}$$

gdje je A apsorbancija izmjerena pri 280 nm izražena u miliapsorbancijskim jedinicama, mAU (engl. milli-Absorbance Unit); ε je molarni apsorpcijski koeficijent izražen u $\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$, za transferin na 280 nm iznosi otprilike $81000 \text{ L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$; l je duljina puta svjetlosti kroz uzorak izražena u cm, u ovom slučaju iznosi 0,2 cm; c je množinska koncentracija izlaznog transferina izražena u mol L^{-1} , n je množina izlaznog transferina izražena u molovima, a V je volumen izlaznog transferina izražen u mL. Broj 10^6 brojčani je faktor koji čini to da konačna množina bude izražena u molovima.

U konačnici se pomoću izračunate množine dobije masa izlaznog transferina, preko izraza za množinu tvari :

$$n = \frac{m}{M}$$

Iz čega slijedi :

$$m = n \cdot M$$

gdje je m masa izlaznog transferina izražena u gramima, poslije preračunata u miligrame; n je množina izlaznog transferina izražena u molovima, a M je molarna masa transferina, koja iznosi 81000 g mol^{-1} .

Račun za iskorištenje metode:

$$\text{Iskorištenje (\%)} = \frac{\text{masa izlaznog transferina (mg)}}{\text{masa uzorka transferina (mg)}} \cdot 100$$

Iz priloženih rezultata, prikazanih u Tablici 1., vidljiv je vrlo širok raspon iskorištenja metode kromatofokusiranja transferina i njegovih sijaloformi, koja se kreću između $\approx 49\%$ i $\approx 98\%$. Postoji više varijabli koje utječu na iskorištenje ove metode, kao što su preciznost injektiranja uzorka transferina i čistoća same kolone na koju se taj uzorak nanosi. Također je moguće da se dio proteina zadrži na koloni i/ili stijenkama kolone.

Lošija iskorištenja kod pojedinih pokusa mogla bi biti pripisana nepreciznom injektiranju uzorka, odnosno smanjenoj količini transferina u uzorku, u odnosu na zabilježene vrijednosti. Kada bi postojao precizniji način određivanja injektirane količine transferina iz uzorka, dobili bismo stvarniji prikaz iskorištenja.

Moguće objašnjenje lošijih iskorištenja metode i varijacija u rezultatima moglo bi se pripisati i načinu na koji računalo integrira same površine ispod pikova na kromatogramu; budući da je u većini pokusa bazna linija bila blago nepravilna ili je postojalo preklapanje pojedinih pikova, bilo je otežano određivanje ukupne površine pikova, koja u računu za iskorištenje metode služi za određivanje ukupne mase izlaznog transferina.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju dobivenih eksperimentalnih podataka o iskorištenju kromatofokusiranja humanog serumskog transferina i njegovih sijaloformi, zaključuje se da učinkovitost ove metode, promatrana kroz analizu iskorištenja, veoma varira. Također, postoji više faktora koji utječu na tijek i ishod same analize, kao što su čistoća kolone, interakcije između kolone i transferina, način pripreme te preciznost injektiranja uzorka.

Unatoč tome, većina dobivenih rezultata iskorištenja veća je od 70 %, što ukazuje na velik potencijal za daljnji razvoj ove metode, osobito uzimajući u obzir relativno učinkovitu mogućnost razdvajanja sijaloformi transferina, kao i činjenicu da je ova metoda znatno jeftinija od, primjerice, HPLC-a (engl. High-Performance Liquid Chromatography). Pri tome je važno obratiti pozornost na potencijalne uzroke odstupanja u mjerenjima, kako bi se oni regulirali s ciljem dobivanja što boljih rezultata iskorištenja.

6. LITERATURA

Anderson David; Garfin D. and Ahuja S., editors. Handbook of Isoelectric Focusing and Proteomics . Elsevier Inc., 2005, 130-131.

Andrews N. C. (1999a). Disorders of iron metabolism. The New England Journal of Medicine, 341, 1986–1995.

Anton R.F. Carbohydrate-deficient transferrin for detection and monitoring of sustained heavy drinking. What have we learned? Where do we go from here? Alcohol 25 ,2001, 185–188.

Aruoma O. I., Halliwell B., Laughton M. J., Quinlan G. J. & Gutteridge J. M. The mechanism of initiation of lipid peroxidation. Evidence against a requirement for an iron(II)-iron(III) complex. Biochemical Journal, 1989, 258, 617–620.

Baker H.M., Anderson B.F., Baker E.N. Dealing with iron: common structural principles in proteins that transport iron and heme. Proc. Natl. Acad. Sci., 2003, 100, 3579–3583.

Chasteen N. Dennis: HUMAN SEROTRANSFERRIN: STRUCTURE AND FUNCTION, Coordination Chemistry Reviews, 1977, 22, 1-36.

Crichton R. The essential role of iron in biology. Iron Metabolism: From Molecular Mechanisms to Clinical Consequences. Chichester, UK:Wiley. 4th ed., 2016, pp. 22–70.

Edwards M., McKenzie F., O’Callaghan S., Somerset D., Woodford P., Spilsbury J., Fietz M. and Fletcher J., Prenatal diagnosis of congenital disorder of glycosylation type Ia (CDG1a) by cordocentesis and transferrin isoelectric focussing of serum of a 27-week fetus with non-immune hydrops, Prenat Diagn 26, 2006, 985–988.

Evans R.W. and Williams J. Studies of the binding of different iron donors to human serum transferrin and isolation of iron-binding fragments from the N- and C-terminal regions of the protein. Biochem. J., 1978, 173, pp 543-552.

Feelders R.A., Vreugdenhil G., de Jong G., Swaak A.J. and van Eijk H.G.. Transferrin microheterogeneity in rheumatoid arthritis. Relation with disease activity and anemia of chronic disease, Rheumatol Int 12, 1992, 195–199.

Gornik O. and Lauc G.: Glycosylation of serum proteins in inflammatory diseases, 2008, 271-272.

Grzymislowski M., Derc K., Sobieska M. And Wiktorowicz K., Microheterogeneity of acute phase proteins in patients with ulcerative colitis, *World J Gastroenterol* 12, 2006, 5191–5195.

Hongzhe Sun, Hongyan Li, and Sadler Peter J. Transferrin as a Metal Ion Mediator, *Chem. Rev.* 1999, 99, 2817-2842.

Konig P., Niederhofer H., Steurer H., Haller R., Wolfle R., Fritzsche H. and Weiss P.. Changes of carbohydrate-deficient transferrin in chronic alcoholism, *Neuropsychobiology*, 1995, 32, 192–196.

Kumar R., Mauk A.G. Protonation and anion binding control the kinetics of iron release from human transferrin. *J.Phys.Chem.B*, 2012, 116, 3795–3807.

Luck A.N., Mason A.B. Transferrin-mediated cellular iron delivery. *Curr.Top. Membr.* 2012, 69, 3–35.

Mujika J.I., Escribano B., Akhmatskaya E., Ugalde J.M., Lopez X. Molecular dynamics simulations of iron-and aluminum-loaded serum transferrin: protonation of Tyr188 is necessary to prompt metal release. *Biochemistry*, 2012, 51, 7017–7027.

Munoz M., Villar I. & Garcia-Erce J. A.. An update on iron physiology. *World Journal of Gastroenterology*, 2009, 15, 4617–4626.

Palmour R. P.; Sutton H. E. *Biochemistry* 1971, 10, 4026.

Tomašić A. Kromatofokusiranje kao metoda razdvajanja različitih sijaloformi humanog serumskog transferina, 2020., <https://www.bib.irb.hr/1116515>.

Torsten Arndt. Carbohydrate-deficient Transferrin as a Marker of Chronic Alcohol Abuse: A Critical Review of Preanalysis, Analysis, and Interpretation. *Clinical Chemistry* 47:1, 2001, 13–27.

Torti et al. Iron and Cancer Iron and Cancer. *Annual Review of Nutrition*, 2018, Vol. 38, 97-125.

Wang M., Lai T.P., Wang L., Zhang H., Yang N., Sadler P.J. et al. Anion clamp allows flexible protein to impose coordination geometry on metal ions. *Chem. Commun.*, 2015, 51, 7867–7870.

7. SAŽETAK/SUMMARY

Promjene u glikozilaciji, odnosno sialilaciji humanog serumskog transferina događaju se kod brojnih akutnih i kroničnih bolesti te mogu biti jedan od pokazatelja stanja oboljenja. Razdvajanje različitih sialoformi transferina korisno je za brojna znanstvena istraživanja i u dijagnostičke svrhe, ali često zahtijeva korištenje skupih analitičkih metoda. Cilj ovog rada bio je testirati kromatofokusiranje kao jeftiniju i jednostavniju metodu razdvajanja sialoformi transferina za daljnje analize, uz naglasak na iskorištenje metode. Kromatofokusiranje uz linearni pH gradijent pokazalo se kao metoda koja ima velik potencijal postati učinkovita i praktična metoda za analizu transferina i sličnih proteina, koja pritom ima zadovoljavajuće iskorištenje i razdvajanje sialoformi transferina.

Changes in glycosylation or sialylation of human serum transferrin occur in a number of acute and chronic diseases. Separation of various transferrin sialoforms is useful for numerous scientific studies and for diagnostic purposes but often requires the use of expensive analytical methods. The goal of this study was to test chromatofocusing as a cheaper and simpler method of separating transferrin sialoforms for further analysis, with emphasis on recovery. Chromatofocusing with a linear pH gradient has proven to be a method that has great potential in becoming an efficient and practical method for the analysis of transferrin and other glycoproteins, with sufficient recovery and satisfactory separation of protein sialoforms.

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

ISKORIŠTENJE METODE KROMATOFOKUSIRANJA ZA RAZDVAJANJE SIJALOFORMI HUMANOG SERUMSKOG TRANSFERINA

Antonela Tomašić

SAŽETAK

Promjene u glikozilaciji, odnosno sijalilaciji humanog serumskog transferina događaju se kod brojnih akutnih i kroničnih bolesti te mogu biti jedan od pokazatelja stanja oboljenja. Razdvajanje različitih sijaloformi transferina korisno je za brojna znanstvena istraživanja i u dijagnostičke svrhe, ali često zahtijeva korištenje skupih analitičkih metoda. Ideja ovog rada bila je testirati kromatofokusiranje kao jeftiniju i jednostavniju metodu razdvajanja sijaloformi transferina za daljnje analize, uz naglasak na iskorištenje metode. Kromatofokusiranje s linearnim pH gradijentom pokazalo se kao metoda koja ima velik potencijal postati učinkovita i praktična metoda za analizu transferina i sličnih proteina, koja ima zadovoljavajuće iskorištenje i razdvajanje sijaloformi transferina.

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

Rad sadrži: 24 stranice, 7 grafičkih prikaza, 1 tablicu i 23 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: transferin, sijalilacija, kromatofokusiranje, iskorištenje

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

Ocjenjivači: **izv. prof. dr. sc. Mario Gabričević**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
izv. prof. dr. sc. Ana Budimir, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
doc. dr. sc. Miranda Sertić, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: srpanj 2021.

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

RECOVERY OF CHROMATOFOCUSING FOR SEPARATION OF HUMAN SERUM TRANSFERRIN SIALOPHORMS

Antonela Tomašić

SUMMARY

Changes in glycosylation or sialylation of human serum transferrin occur in a number of acute and chronic diseases. Separation of various transferrin sialoforms is useful for numerous scientific studies and for diagnostic purposes but often requires the use of expensive analytical methods. The goal of this study was to test chromatofocusing as a cheaper and simpler method of separating transferrin sialoforms for further analysis, with emphasis on recovery. Chromatofocusing with a linear pH gradient has proven to be a method that has great potential in becoming an efficient and practical method for the analysis of transferrin and other glycoproteins, with sufficient recovery and satisfactory separation of protein sialoforms.

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

Thesis includes: 24 pages, 7 figures, 1 table and 23 references. Original is in Croatian language.

Keywords: transferrin, sialylation, chromatofocusing, recovery

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

Reviewers: **Mario Gabričević, Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Ana Budimir, Ph.D. *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Miranda Sertić, Ph.D. *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July 2021.