

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Antonela Tomašić

**Kromatofokusiranje kao metoda razdvajanja različitih sijaloformi humanog  
serumskog transferina**

Zagreb, 2020.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za opću i anorgansku kemiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom doc. dr. sc. Tina Weitnera i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2019./2020.

## SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Transferin .....	1
1.1.1. Struktura transferina .....	1
1.1.2. Vežanje 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
2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA .....	6
3. MATERIJALI I METODE .....	7
3.1. Materijali .....	7
3.1.1. Kemikalije.....	7
3.1.2. Radni instrumenti i pribor .....	8
3.1.3. Priprema otopina za holotransferin i desijalilaciju transferina.....	8
3.1.3.1. Priprema koncentrata nativnog holotransferina .....	9
3.1.3.2. Priprema koncentrata desijaliziranog apotransferina .....	9
3.1.3.3. Priprema koncentrata desijaliziranog holotransferina .....	10
3.1.4. Priprema otopina za kromatofokusiranje.....	10
3.1.4.1. Priprema uzoraka za analizu kromatofokusiranjem .....	11
3.2. Metode .....	12
3.2.1. Kromatofokusiranje – pH gradijent metoda .....	12
3.2.1.1. Kromatofokusiranje nativnog apotransferina i holotransferina .....	14
3.2.1.2. Kromatofokusiranje desijaliziranog apotransferina.....	14
3.2.1.3. Kromatofokusiranje desijaliziranog holotransferina .....	14
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	15
4.1. Nativni apotransferin.....	15
4.2. Nativni holotransferin.....	16
4.3. Desijalizirani apotransferin .....	18
4.4. Desijalizirani holotransferin.....	19
5. ZAKLJUČAK .....	21
6. ZAHVALE.....	22
7. POPIS LITERATURE.....	23

8. SAŽETAK.....	25
9. SUMMARY.....	26

# 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 u maloj količini na površini membrana stanica (Palmour i Sutton, 1971).

### 1.1.1. Struktura transferina

Transferin je glikoprotein bilobalne strukture, molekulske mase oko 80 000 Da, građen od jednog polipeptidnog lanca i glikanskog djela.

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 pukotinu u kojoj je po jedno vezno mjesto za željezo. Obje domene podijeljene su na dvije subdomene : 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 više različitih varijanti ovih 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 0,1 pH jedinice. Većina molekula transferina (85%) u cirkulaciji zdravih ljudi ima dva biantenarna glikana, na čijim su krajevima ukupno četiri sijalinske kiseline (tetrasijalotransferin), vezane  $\alpha$ -2,6-glikozidnom vezom, a izoelektrična točka ove glavne forme iznosi 5,4. Glikozilacija nema 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 dva iona željeza i to čvrsto, ali reverzibilno. Ima dva vezna mjesta za željezo, jedno u N-domeni, a drugo u C-domeni te ona vežu  $\text{Fe}^{3+}$ . Željezo sadrži šest koordinacijskih mjesta – na oba vezna mjesta željezo je koordinirano monodentatnim: Asp, dva Tyr, His ligandima i 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  $\alpha$ -uzvojnica, tako tvoreći džep povoljan za vezanje tog aniona (Baker i sur., 2003). Vezna mjesta ipak se razlikuju u konstanti ravnoteže vezanja  $\text{Fe}^{3+}$ , koja je za vezno mjesto na N-domeni  $1 \times 10^{22} \text{ M}^{-1}$  te  $6 \times 10^{22} \text{ M}^{-1}$  na C-domeni (Evans i Williams, 1978). Izoelektrična točka (pI) transferina smanjuje se za 0.2 pH jedinice vezanjem svakog od dva  $\text{Fe}^{3+}$  (Arndt, 2001). Osim  $\text{Fe}^{3+}$ , transferin ima sposobnost vezanja velikog broja drugih dvovalentnih i trovalentnih prijelaznih metala, kao i nekoliko lantanoida, kao što su :  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$ ,  $\text{Mn}^{3+}$ ,  $\text{Co}^{3+}$ ,  $\text{Ga}^{3+}$ ,  $\text{Ho}^{3+}$ ,  $\text{Er}^{3+}$ ,  $\text{Tb}^{3+}$ ,  $\text{Nd}^{3+}$  i  $\text{Gd}^{3+}$ .

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  $\text{Fe}^{3+}$ ). Nakon vezanja na receptor, dolazi do endocitoze holotransferina te formiranja endosoma, u kojima se otpušta  $\text{Fe}^{3+}$  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<sup>3+</sup> (Baker i sur., 2003).

### **1.1.3. Bolesti i promjena glikozilacije transferina**

Transferin smanjenog stupnja sialilacije 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 sialilaciji transferina zabilježene su u mnogim malignim i prirođenim stanjima (npr. galaktozemija), kao i kod 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 koreliralo s aktivnošću bolesti, pogotovo kod anemije kronične bolesti (Feelders i sur., 1992). Povećano grananje i sialilacija transferinskih glikana zabilježeno je 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 retikuloendotelnog 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, hidroksilaze i oksidoreduktaze) (Crichton, 2016). Brojne biološke uloge željeza posljedica su njegovog sudjelovanja u oksido-redukcijskim (redoks) reakcijama, u kojima može davati ili primati 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.

Ipak, ovakva kemijska svojstva dopuštaju željezu stupanje u štetne reakcije, kao što je Fentonova reakcija, u kojoj  $\text{Fe}^{2+}$  reagira s vodikovim peroksidom ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) te nastaje veoma reaktivni hidroksilni radikal ( $\text{HO}^\cdot$ ), 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 najčešće koristi za odvajanje i pročišćavanje proteina na temelju njihove razlike u izoelektričnoj točki (pI), koja označava pH pri kojem je neto naboj proteina jednak nuli. Ovom tehnikom moguće je razdvajati čak i molekule čija se pI vrijednost razlikuje za samo 0,02 pH jedinice.

#### **1.3.1. Mehanizam razdvajanja proteina**

Za odvajanje proteina temeljem njihove razlike u izoelektričnoj točki, medij za kromatofokusiranje podešen je početnim puferom na pH koji je nešto viši od potrebnog pH. Drugi, elucijski pufer podešen je na najniži potrebnih pH te prolaskom kroz kolonu (koja sadrži smolu za anionsku ionsku izmjenu) počinje snižavati pH i generira padajući pH gradijent.

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 na pH ispod svoje pI kreću zajedno s puferom prema kraju kolone i neće se vezati do zone pH iznad svoje pI.

Kako pH na vrhu kolone nastavlja padati, svaki protein koji padne ispod svog pI postaje pozitivno nabijen i time odbijen pozitivno nabijenim amino skupinama kolone, što uzrokuje njihovo kretanje elucijskim puferom prema kraju kolone, putujući brzinom većom od one kojom se niz kolonu smanjuje iznos pH gradijenta. Ipak, spuštanjem 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, kada protein ponovno pada ispod svog  $pI$ , postaje pozitivno nabijen, i putuje prema kraju kolone. Ovaj proces ponavlja se sve dok protein ne bude eluiran iz kolone na pH približnom  $pI$ , kad nema gotovo nikakav neto naboj.

Dakle, dok 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  $pI$  (Anderson, 2005).

## 2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA

Humani serumski transferin je glikoprotein čija je primarna uloga u ljudskom organizmu prijenos  $\text{Fe}^{3+}$  iona, a promjena u njegovoj glikozilaciji može ukazivati na pojedine akutne i kronične bolesti te služiti kao pokazatelj stupnja oboljenja. Bolesti koje obuhvaćaju promjene u glikozilaciji su sepsa, akutni pankreatitis, ulcerozni kolitis, kronična opstruktivna bolest pluća i druge (Gornik i Lauc, 2008).

Određivanje promjena glikozilacije transferina često zahtijeva primjenu skupih analitičkih metoda, kao što je masena spektroskopija, stoga je cilj ovog rada pronalazak jeftinije metode razdvajanja sijaloformi transferina, koja, između ostalog, može služiti za dijagnozu i praćenje različitih oboljenja. Uz to, cilj je pronaći praktičnu metodu kojom se može pratiti enzimska desijalizacija te razdvajanje i pročišćavanje sijaloformi za daljnje studije mehanizma vezanja željeza.

Izabrana je tehnika kromatofokusiranja, koja je sposobna razdvojiti proteine temeljem njihove razlike u izoelektričnoj točki, čak i ako ta razlika iznosi svega 0,02 pH jedinice, što ukazuje na potencijalnu mogućnost razdvajanja vrlo sličnih molekula, kao što su različito glikozilirane forme transferina.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Materijali

##### 3.1.1. Kemikalije

U izradi ovog rada korištene su sljedeće kemikalije:

- Nativni humani apotransferin, >97%,  $M_r = 42000$  (Sigma-Aldrich)
- pISep koncentrat A (CryoBioPhysica)
- pISep koncentrat B (CryoBioPhysica)
- PIPES (piperazin-N,N'-bis(2-etansulfonska kiselina)),  $M_r = 378,6$  (Amresco)
- NTA (trinatrijeva sol nitrilotrioctene kiseline; N,N-bis(karboksimetil)glicin),  $M_r = 257,1$  (Sigma-Aldrich)
- $\text{Na}_2\text{EDTA}$  (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  $\text{HClO}_4$ ,  $c = 1 \text{ M}$
- Otopina  $\text{HCl}$ ,  $c = 5 \text{ M}$
- Otopina  $\text{NaOH}$ ,  $c = 2 \text{ M}$
- $\text{NaOAc}$  (natrij acetat),  $M_r = 136,08$  (Kemika)
- $\text{CaCl}_2$  (kalcijev klorid),  $M_r = 110,99$  (Lach-Ner)
- $\text{NaCl}$  (natrijev klorid),  $M_r = 58,44$  (Gram-Mol)
- $\text{KCl}$  (kalijev klorid),  $M_r = 74,56$  (Alkaloid)
- $\text{NaHCO}_3$  (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 od vage 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 Rainin (Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska)
- 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  $\text{HClO}_4$ .
- 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 ( $\text{NaHCO}_3$ ) pripravljena je otapanjem potrebne mase  $\text{NaHCO}_3$  u PIPES puferu.
- 2 mM otopina NTA priređena je otapanjem određene mase NTA u PIPES puferu.

- 1 mM otopina Fe(NTA)<sub>2</sub> 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 Na<sub>2</sub>EDTA 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 desijalizaciju priređen je otapanjem potrebne mase NaOAc, NaCl i CaCl<sub>2</sub> u destiliranoj vodi, da bi konačne množinske koncentracije tvari u puferu iznosile 0,2 M NaOAc, 0,15 M NaCl i 0,009 M CaCl<sub>2</sub>. pH pufera 2 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-u. Dobivena je otopina koja je sadržavala određenu koncentraciju nativnog apotransferina te deset puta veću koncentraciju 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  $\gamma = 6,25$  mg / mL otopina apotransferina vaganjem potrebne mase nativnog apotransferina i otapanjem u puferu za desijalizaciju. Uzeto je 800  $\mu$ L otopine, dodano 200  $\mu$ L suspenzije neuraminidaze (enzima koji uklanja sijalinsku kiselinu) adsorbirane na sitne kuglice te se otopina inkubira 48 h na 37°C. Nakon toga se otopina 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, stavljanjem po 0,5 mL prikupljenog supernatanta na centrifugiranje 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  $\lambda = 280$  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 deset puta veću koncentraciju 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 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. 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. 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 dobiven 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 pH pISep pufera A.
- Uzorak nativnog holotransferina dobiven je razrjeđivanjem 20  $\mu$ L koncentrata holotransferina u 800  $\mu$ L 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 kromatofokusiranje korištenjem ÄKTA start FPLC uređaja podešene su UNICORN start 1.1 softverom (Slika 1.).

Phase	Variable	Value	Range
Method Settings	ColumnVolume {CV}	1.924	[0.100 - 999999.0]
	Column	Any <input type="button" value="v"/>	
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="button" value="v"/>	
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 1.** UNICORN start 1.1. postavke za kromatofokusiranje transferina.

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

Korištene su dvije HiTrap Q HP 1 mL kromatografske kolone spojene 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 određen pH za provjeru linearnosti pH gradijenta i određivanje pl vrijednosti proteinskih frakcija.

Puferi pISep A i B za kromatofokusiranje pripremljeni su miješanjem ishodnih pufera pISep 1 i 2, čiji je udio određen korištenjem pISep pH gradient maker version 2.0 softvera (Slika 2. i Slika 3.).



ENTER DATA FILE NAME, FILE EXTENSION WILL BE SET AUTOMATICALLY TO .CSV
  WIDTH OF PLOT

HEIGHT OF PLOT

CALCULATE pH STEP:
  STEP NUMBER
  INITIAL pH
 A%=81.31 B%=18.68
  A% pISep

ULTIMATE pH

STEP SLOPE OF LINEAR pH GRADIENT [pH UNITS/COLUMN VOLUME]

STEP STARTING pH
  POINTS PER LINEAR STEP

STEP FINAL pH
  POINTS PER NONLINEAR STEP

STORED FILES WITH LOT DEFAULT COEFFICIENTS

SHOW ONLY LINEAR FILES
  SHOW ONLY NONLINEAR FILES

NaCl
  NO [ISOCRATIC ADDITIVE]

MINI/COL VOL (FOR TIME BASED GRADIENTS) =
  ENTER FLOW RATE ml/min
  EQUILIBRATION TIME

COLUMN VOLUME ml
  A%;B% (col vols)

LOT DEFAULT COEFFICIENTS	
LOT DEFAULT COEFFICIENTS	A=0
CUSTOM DEFAULT COEFFICIENTS	B=0
	C=-8.937592951494E-4
	D=-4.97396047964603E-2
CLEAR COEFFICIENTS	E=-1.12234441179440
	F=13.3443876114996
	G=-90.3756679200694
	H=348.226925117256
SAVE CUSTOM TITRATION COEFFICIENTS	I=-714.706045363102
	J=696.577733937402

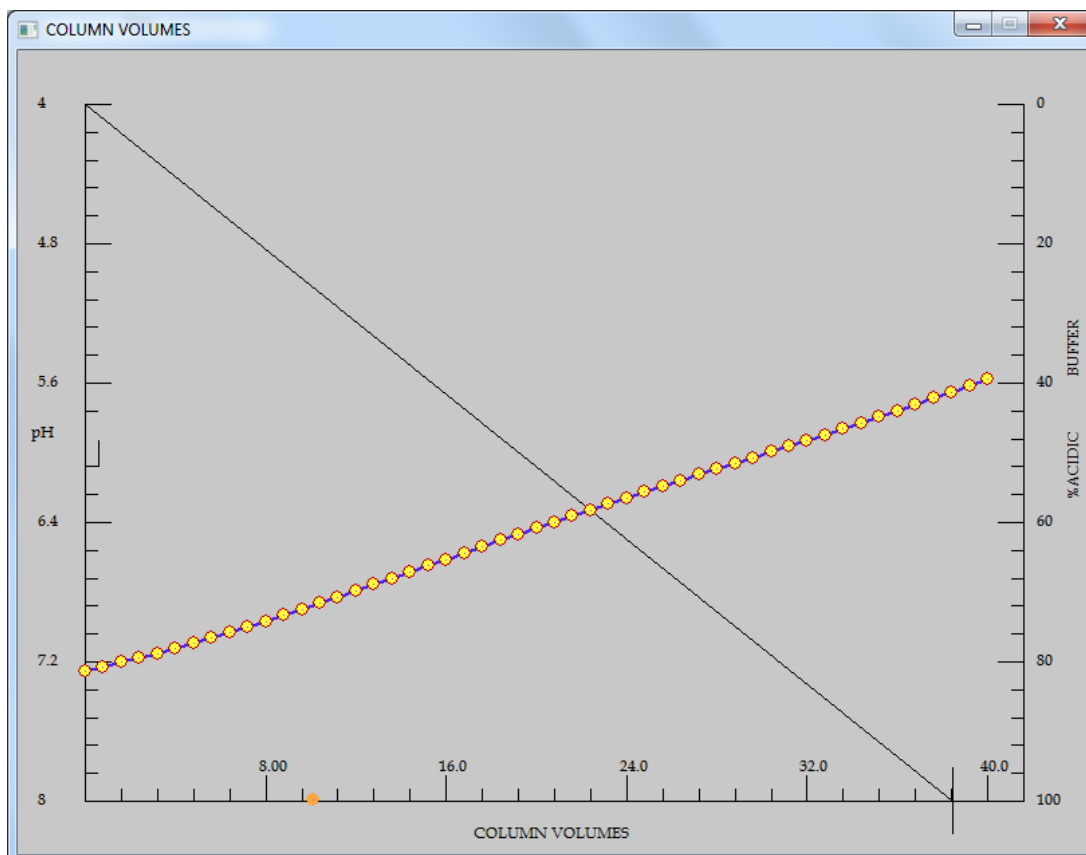
CUSTOM COEFFICIENTS FOR %ACID BUFFER VS pH:  
 SEPARATED BY COMMAS: A TO J  
 $A \cdot pH^9 + B \cdot pH^8 + C \cdot pH^7 + D \cdot pH^6 + E \cdot pH^5 + F \cdot pH^4 + G \cdot pH^3 + H \cdot pH^2 + I \cdot pH + J$

pH RANGE of LIMITED pISep

INITIAL COLUMN VOLUMES
  FINAL COLUMN VOLUMES

RECALL SAVED CUSTOM COEFFICIENTS
  ADJUSTABLE LOWER pISep pH LIMIT
  ADJUSTABLE HIGHER pISep pH LIMIT

Slika 2. Primjer postavki u pISep pH gradijent maker version 2.0. softveru.



Slika 3. Grafički prikaz linearnog gradijenta dobivenog pISep pH gradijent maker version 2.0. softverom.

### **3.2.1.1. Kromatofokusiranje nativnog apotransferina i holotransferina**

Korišten je pH gradijent :

$$\text{pISep A} = 57,54\% \text{ pISep 1} + 42,46\% \text{ pISep 2, pH} = 6,30$$

$$\text{pISep B} = 77,13\% \text{ pISep 1} + 22,87\% \text{ pISep 2, pH} = 4,48$$

### **3.2.1.2. Kromatofokusiranje desijaliziranog apotransferina**

Korišten je pH gradijent :

$$\text{pISep A} = 51,74\% \text{ pISep 1} + 48,26\% \text{ pISep 2, pH} = 6,94$$

$$\text{pISep B} = 60,80\% \text{ pISep 1} + 39,20\% \text{ pISep 2, pH} = 6,06$$

### **3.2.1.3. Kromatofokusiranje desijaliziranog holotransferina**

Korišten je pH gradijent :

$$\text{pISep A} = 52,34\% \text{ pISep 1} + 47,66\% \text{ pISep 2, pH} = 6,81$$

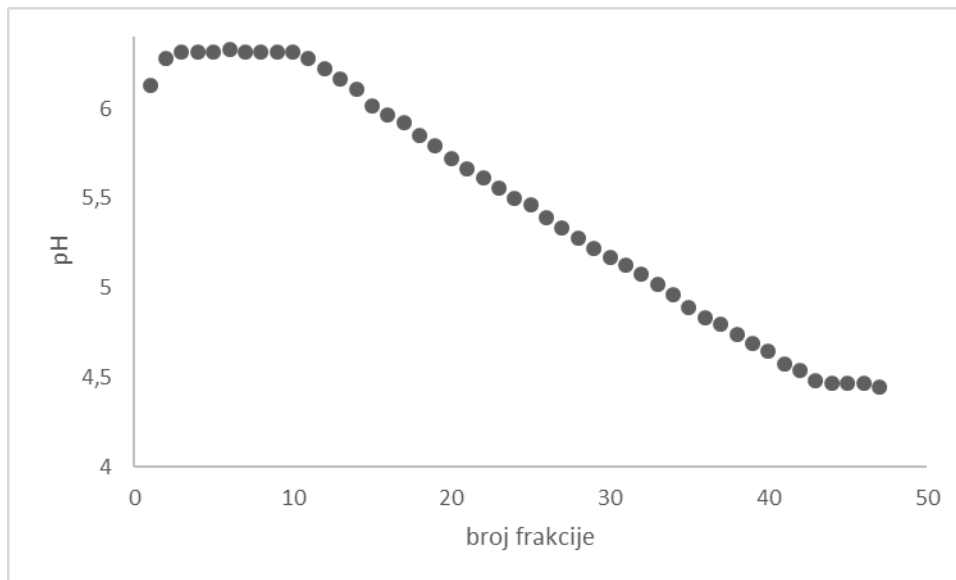
$$\text{pISep B} = 60,80\% \text{ pISep 1} + 39,20\% \text{ pISep 2, pH} = 6,08$$

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

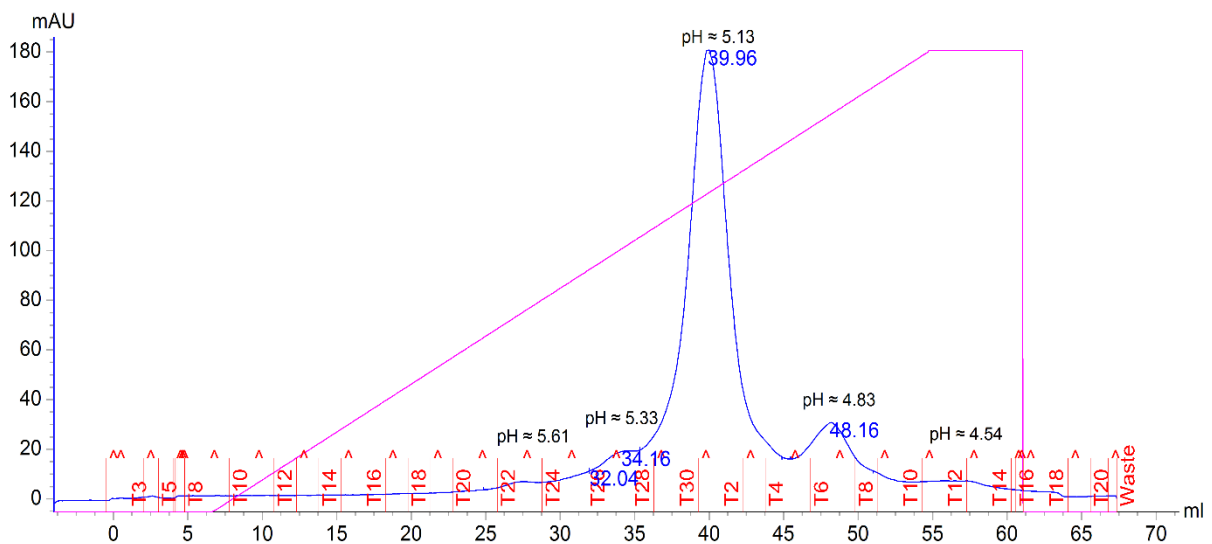
### 4.1. Nativni apotransferin

Početni pH = 6,30

Konačni pH = 4,48



**Slika 4.** Grafički prikaz linearnog gradijenta; ovisnost pH o broju frakcije.



**Slika 5.** Kromatogram nativnog apotransferina, dobiven kromatofokusiranjem; prikaz ovisnosti apsorbancije ( $\lambda = 280 \text{ nm}$ ) o broju frakcije.

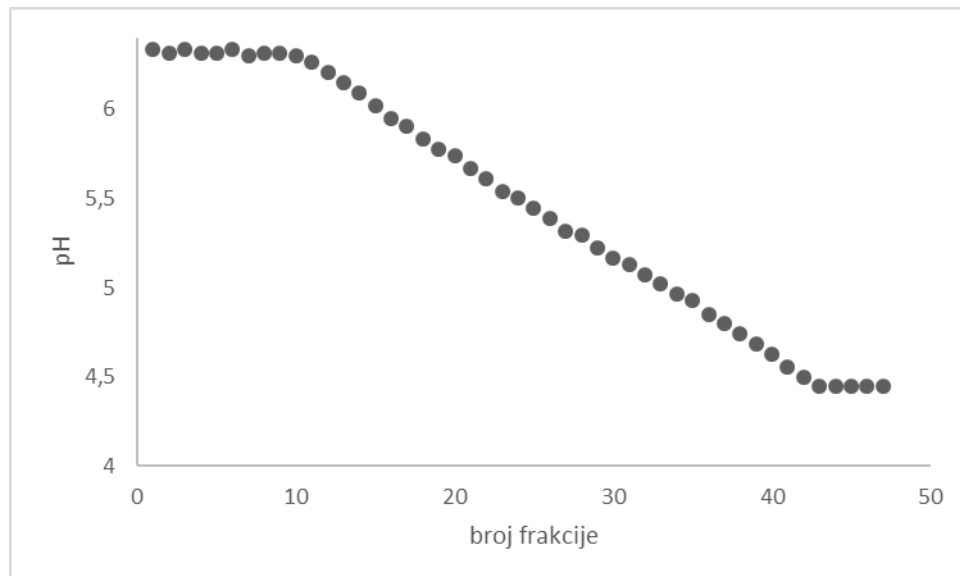
Iz priloženog kromatograma vidljivo je više pikova pri različitim pH vrijednostima linearnog pH gradijenta, što upućuje na postojanje različitih sijaloformi proteina u uzorku nativnog apotransferina i mogućnost razdvajanja na temelju njihovih različitih pI vrijednosti, koje su odraz različitog stupnja sijalilacije. Modifikacijama postavki primijenjene metode kromatofokusiranja moguće je postići bolje razlučivanje pikova za daljnju analizu.

Prva dva pika unutar pH gradijenta slabog su intenziteta, odnosno niske koncentracije te izlaze na najvišem pH (pH  $\approx$  5,61 i pH  $\approx$  5,33), što znači da imaju najvišu pI vrijednost i najmanje su sijalizirani. Slijedi pik najjačeg intenziteta, koji predstavlja najzastupljeniju sijaloformu u uzorku nativnog apotransferina te ima maksimum na pH  $\approx$  5,13. Slijede dva manja pika čiji su maksimumi na pH  $\approx$  4,83 i pH  $\approx$  4,54, odnosno na nižem pH, što znači da imaju nižu pI vrijednost i povećan broj sijalinske kiseline u svojoj strukturi.

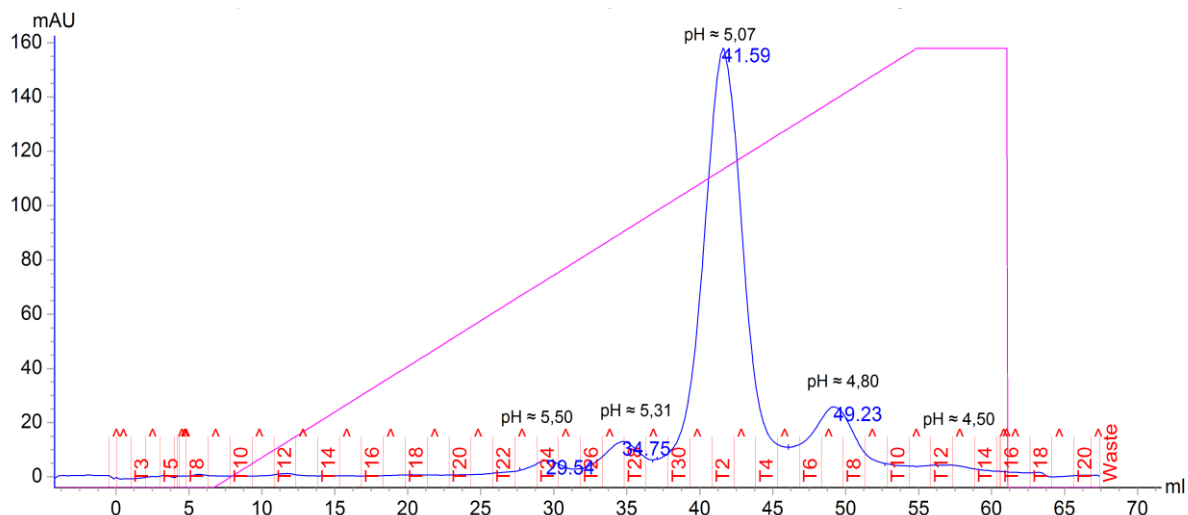
#### 4.2. Nativni holotransferin

Početni pH = 6,30

Konačni pH = 4,48



**Slika 6.** Grafički prikaz linearnog gradijenta; ovisnost pH o broju frakcije.



**Slika 7.** Kromatogram nativnog holotransferina, dobiven kromatofokusiranjem; prikaz ovisnosti apsorbancije ( $\lambda = 280 \text{ nm}$ ) o broju frakcije.

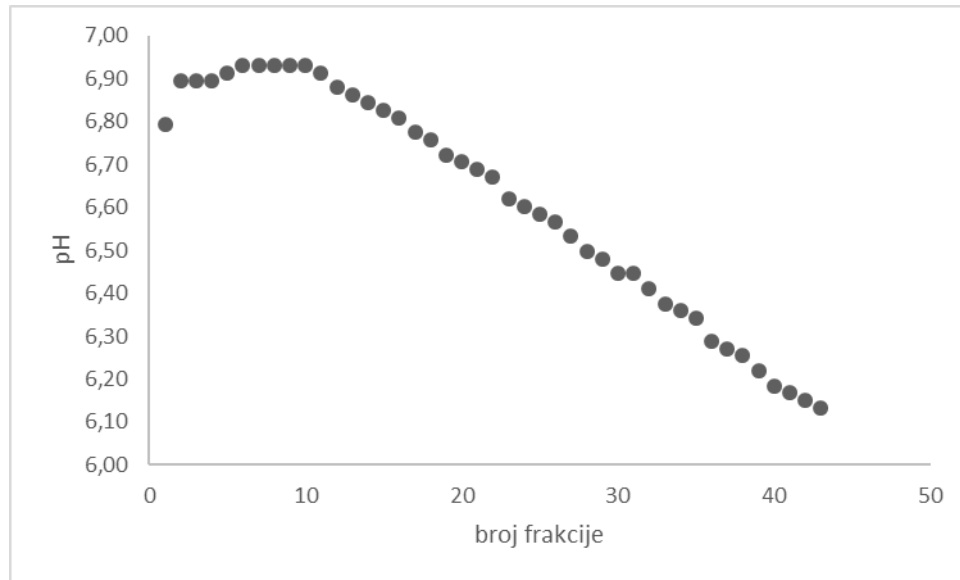
Kromatogram nativnog holotransferina izgleda jednako kao kromatogram nativnog apotransferina (Slika 5.) : jednak je broj pikova, pikovi su gotovo jednakog intenziteta, odnosno jednak je omjer pojedinih sijaloformi u oba uzorka te se pikovi nalaze na gotovo istim pH vrijednostima. Ovakav rezultat nije bio očekivan, budući da se vezanjem željeza na transferin pl vrijednost transferina snižava za oko 0,2 pH jedinice po vezanom željezu, što znači da bi za holotransferin trebala biti uočljiva promjena pl vrijednosti za oko 0,4 pH jedinice jer na sebi ima vezana dva  $\text{Fe}^{3+}$  iona.

Dobiveni rezultat upućuje na pretpostavku da je nativni apotransferin, budući da ima visok afinitet prema željezu, povukao na sebe nečistoće, odnosno zaostatke željeza u korištenim puferima, zbog čega je nastao nativni holotransferin, što je rezultiralo jednakim kromatogramom, bez promjena u pl vrijednostima pojedinih sijaloformi transferina. Iako smo zapravo u oba slučaja dobili kromatogram nativnog holotransferina, vidljivo je da je prisutan jednak broj sijaloformi u oba uzorka, u jednakim omjerima i da je razlučivanje pikova zadovoljavajuće.

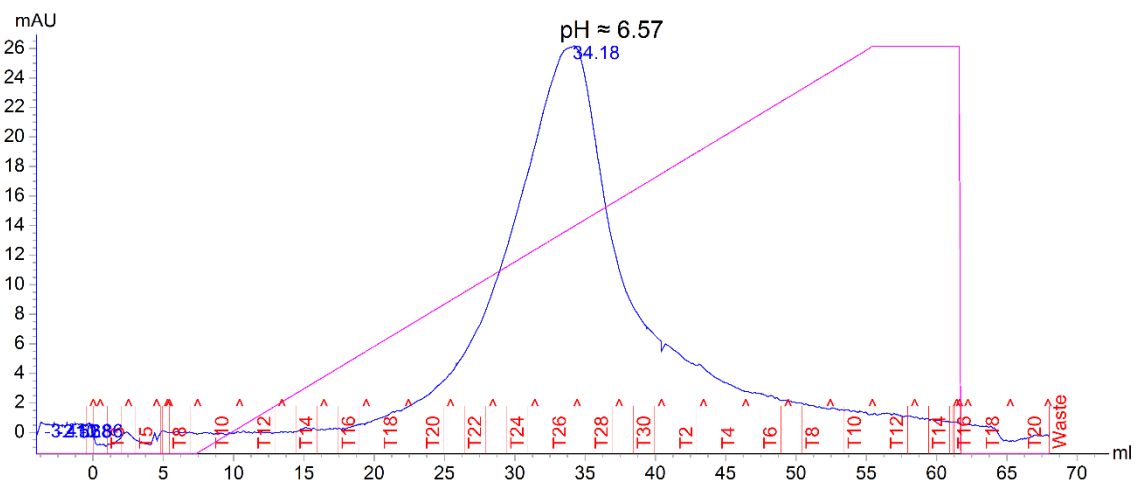
### 4.3. Desijalizirani apotransferin

Početni pH = 6,94

Konačni pH = 6,06



**Slika 8.** Grafički prikaz linearnog gradijenta; ovisnost pH o broju frakcije.



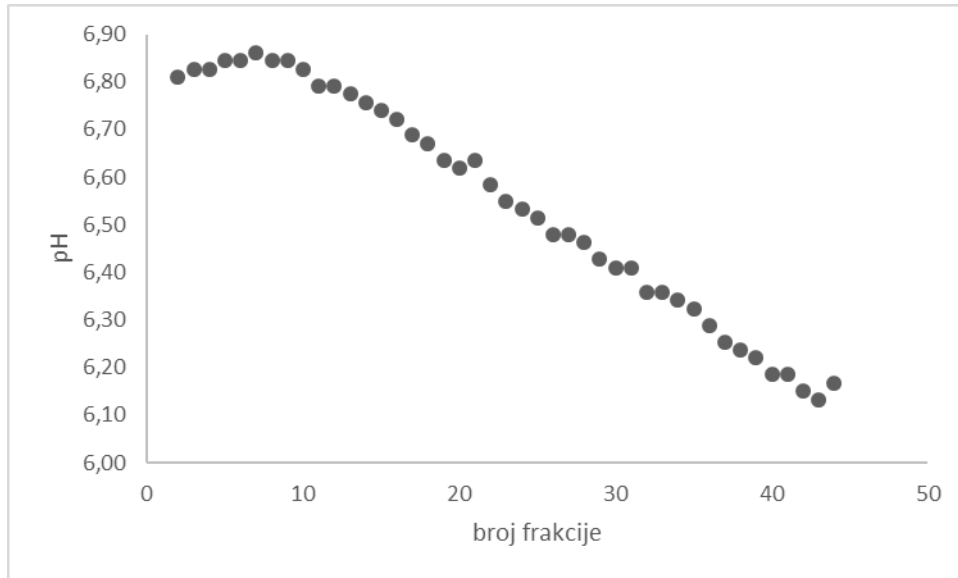
**Slika 9.** Kromatogram desijaliziranog apotransferina, dobiven kromatofokusiranjem; prikaz ovisnosti apsorbancije ( $\lambda = 280 \text{ nm}$ ) o broju frakcije.

Kromatogram desijaliziranog apotransferina prikazuje samo jedan pik, koji ima maksimum na  $\text{pH} \approx 6,57$ . Dobiven je samo jedan veliki pik, što upućuje na odsutstvo različitih sijaloformi, odnosno potpunu desijalilaciju apotransferina.

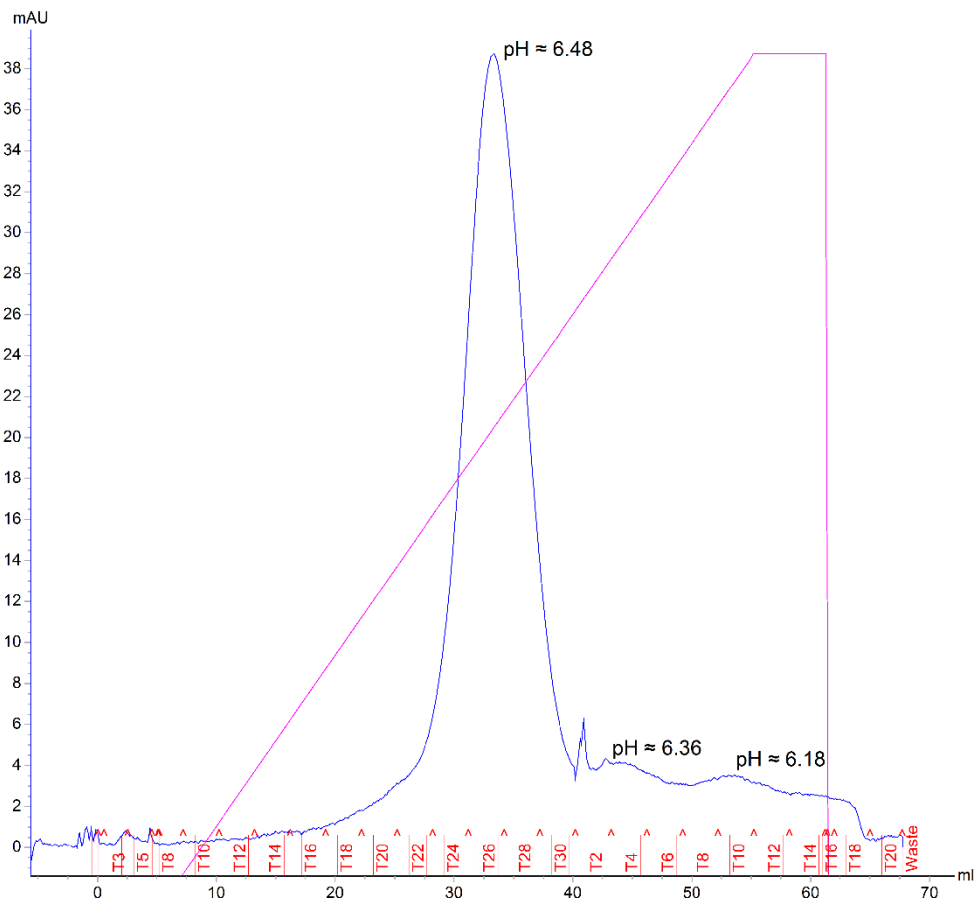
#### 4.4. Desijalizirani holotransferin

Početni pH = 6,81

Konačni pH = 6,08



Slika 10. Grafički prikaz linearnog gradijenta; ovisnost pH o broju frakcije.



Slika 11. Kromatogram desijaliziranog holotransferina, dobiven kromatofokusiranjem; prikaz ovisnosti apsorbancije ( $\lambda = 280 \text{ nm}$ ) o broju frakcije.

Dobiveni kromatogram desijaliziranog holotransferina prikazuje jedan pik snažnog intenziteta, maksimuma na  $\text{pH} \approx 6,48$ , koji ima sličnu  $\text{pH}$  vrijednosti maksimuma (odnosno  $\text{pI}$ ) kao pik na kromatogramu desijaliziranog apotransferina (Slika 9.). Rezultat je neočekivan jer ponovno nije došlo do znatnije promjene  $\text{pI}$  vrijednosti između apotransferina i holotransferina, dakle opet je došlo do zasićenja apotransferina željezom iz pufera ili nekog drugog izvora, odnosno oba uzorka su zapravo desijalizirani holotransferin. Velik intenzitet glavnog pika upućuje na gotovo potpunu desijalizaciju proteina. Iza glavnog pika vidljivi su manji signali, koji su vjerojatno posljedica prisutnosti nepotpuno desijaliziranih formi transferina, koje zbog sadržaja sijalinske kiseline imaju  $\text{pI}$  na nižim  $\text{pH}$  vrijednostima u odnosu na glavni pik, koji je u potpunosti desijaliziran. Oštri, uski pik odmah iza glavnog pika nastao je zbog kratkog zaustavljanja uređaja za mjerenje.

Iz kromatograma desijaliziranog apotransferina, odnosno holotransferina, vidljiv je pomak  $\text{pI}$  vrijednosti na viši  $\text{pH}$  u odnosu na kromatogram nativnog (sijaliziranog) transferina ( $\text{pI} \approx 5,1$  za najveću frakciju nativnog transferina, odnosno  $\text{pI} \approx 6,5$  za desijalizirani transferin), što je posljedica uklanjanja sijalinske kiseline pri čemu raste  $\text{pI}$  vrijednost proteina.



## 5. ZAKLJUČAK

Na temelju dobivenih eksperimentalnih podataka zaključuje se da se metodom kromatofokusiranja uz linearni pH gradijent mogu razdvojiti pojedine sijaloforme pa čak i različito zasićeni humani serumski transferin, na osnovu razlike u njihovim izoelektričnim točkama. Ova metoda pokazala se kao dobar kandidat za ovakvu analizu, uz velik potencijal primjene i na drugim biološki značajnim glikoproteinima.

Slabije razlučivanje glavni je nedostatak ove analitičke metode. Jedan od načina na koji se može poboljšati razlučivanje pojedinih sastavnica uzorka transferina primjena je užeg pH gradijenta na frakcije koje imaju slabije međusobno razlučivanje ili uvođenjem dulje kromatografske kolone.

Sijaloforme i različit stupanj zasićenosti transferina željezom vide 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 kiselini razmjerno kisela.

Linearni pH gradijent postignut je upotrebom pISep pufera koji se pokazao idealnim puferskim sustavom za ovu metodu analize te djeluje u širokom pH rasponu što znači da se može koristiti i za analizu brojnih drugih analita.

## **6. ZAHVALE**

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.

## 7. POPIS LITERATURE

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

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

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

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

Evans R.W. and Williams J. (1978) 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.*, 173, pp 543-552.

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

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

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

M. Edwards, F. McKenzie, S. O'Callaghan, D. Somerset, P. Woodford, J. Spilsbury, M. Fietz and J. Fletcher, 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.

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

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

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

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

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

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

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

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

R.F. Anton, 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.

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.

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

## 8. 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. Kromatofokusiranje s linearnim pH gradijentom pokazalo se kao metoda koja pruža zadovoljavajuće razdvajanje sijaloformi transferina na temelju njihovih različitih izoelektričnih točki te ima velik potencijal postati alternativa skupljim separacijskim tehnikama, kao što su HPLC ili masena spektrometrija.

Ključne riječi : transferin, sijalilacija, kromatofokusiranje, izoelektrična točka

## **9. SUMMARY**

Changes in glycosylation or sialylation of human serum transferrin occur in a number of acute and chronic diseases and can be one of the indicators of the state of disease. 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 idea of this study was to test chromatofocusing as a cheaper and simpler method of separating transferrin sialoforms for further analysis. Chromatofocusing with a linear pH gradient has proven to be a method that provides satisfactory separation of transferrin sialoforms based on their different isoelectric points and has great potential in becoming an alternative to more expensive separation techniques, such as HPLC or mass spectroscopy.

Keywords : transferrin, sialylation, chromatofocusing, isoelectric point