

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko – biokemijski fakultet

**Helena Deriš**

Spektroelektrokemijsko određivanje redukcijskog potencijala  
holo-transferina

Zagreb, 2017.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za opću i anorgansku kemiju Farmaceutsko - biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom doc. dr. sc. Tina Weitnera i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2016./2017.

## SADRŽAJ

1. Uvod .....	1
1.1. Transferin .....	1
1.1.1. Struktura transferina.....	1
1.1.2. Karakteristike veznog mjesta i vezanje željeza .....	2
1.1.3. Receptor transferina (TFR) i vezanje transferina .....	2
1.1.4. Otpuštanje željeza.....	3
1.2. Željezo.....	4
1.2.1 Cirkuliranje željeza u organizmu .....	5
2. Hipoteza (Opći i specifični ciljevi rada) .....	7
3. Materijali i metode .....	8
3.1. Materijali.....	8
3.2. Instrumenti.....	9
3.3. Metode .....	10
3.4. Mjerenja.....	10
3.5. Račun .....	11
4. Rezultati.....	13
4.1. Spektroelektrokemija medijatora .....	13
4.2. Spektroelektrokemija holo-transferina .....	14
5. Rasprava .....	17
6. Zaključak .....	18
7. Zahvala.....	19
8. Popis literature.....	20
9. Sažetak.....	22
10. Summary .....	23

## 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 obitelj transferina još spadaju i laktoferin (Lf), ovotransferin (oTf) i membranski vezani melano-transferin (mTf).<sup>1,3</sup>

Primarno mjesto sinteze transferina su hepatociti, no moguća je sinteza i u drugim tkivima poput mozga (oligodendriti), testisa (Sertolijeve stanice) i nekih tumora. Glavna uloga transferina je transport željeza od mjesta apsorpcije u duodenumu do svih ostalih tkiva.<sup>2,3</sup>

#### 1.1.1. Struktura 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.<sup>4,5</sup>

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  $\alpha$ -heliksa, koji čine okosnicu  $\beta$ -ploče.<sup>5,6</sup> Subdomene su povezane tako da čine zglob, što im omogućuje mobilnost kod vezanja željeza. Bilobalna tercijarna struktura transferina učvršćena je disulfidnim vezama te zaštićena ugljikohidratnim lancima.<sup>4</sup>

Transferin se 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-antenne strukture, koje završavaju negativno nabijenom sialinskom kiselinom. Ovisno o broju sialinskih završetaka na ugljikohidratnom lancu, razlikujemo devet izoformi transferina, od asijalotransferina do oktasijalotransferina, od kojih svaka pokazuje različitu

izoelektričnu točku, pl. U zdravih ljudi dominantna forma je tetrasijalotransferin (64 - 80%) s izoelektričnom točkom pl = 5.4. <sup>4</sup>

### 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). Subdomene se međusobno postavljene tako da ograđuju pukotinu gdje se nalaze mjesta za vezanje željeza. Sa stražnje strane svake pukotine nalaze se dvije antiparalelne  $\beta$  ploče, koje sadrže zglobno 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.<sup>7</sup>

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 ( $\text{CO}_3^{2-}$ ). Aminokiseline koje djeluju kao ligandi su aspartat s N1/C1 subdomene, tirozin sa zglobnog kraja N2/C2 subdomene, drugi tirozin s N2/C2 te histidin sa zglobnog kraja N1/C1. Karbonat kao bidentatni ligand koordinira željezo sa svojim atomima kisika, a on sam je fiksiran na transferin preko dva argininska ostatka.<sup>7</sup>

Iako su domene slične, one nisu ipak kemijski ekvivalentne. U N-domeni prisutan je tzv. „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. Postranični lanci lizina su usmjereni jedan prema drugom te su povezani vodikovom vezom kada je transferin u zatvorenoj konformaciji, tj. kad je vezano željezo. U C-domeni dilizinski okidač zamjenjuje trijada ostataka – Lys534 u C2, Arg632 i Asp634 u C1.<sup>6,7,8</sup>

### 1.1.3. Receptor transferina (TFR) i vezanje transferina

Specifični transferinski receptor, TFR, je tip II transmembranski glikoprotein, homodimer, 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 holo-transferin ( $\text{Fe}_2\text{-Tf}$ ), dok se monomerne specije ( $\text{Fe}_\text{C}\text{-Tf}$  i  $\text{Fe}_\text{N}\text{-Tf}$ ) vežu podjednakim srednjim afinitetom. S druge strane, pri kiselom pH, preferirano se veže apo-transferin.<sup>3,8</sup>

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. S obzirom da pri niskom pH endosoma TFR preferira vezanje holo-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.<sup>8,18</sup>

#### 1.1.4. Otpuštanje željeza

Na otpuštanje željeza utječe velik broj faktora kao što su prisutnost receptora transferina ili kelatora te soli, endosomalni pH 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-domeni, 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.<sup>8</sup>

Otpuštanje željeza s  $\text{Fe}_2\text{-Tf-TFR}$  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.<sup>6,7,8</sup>

Otpuštanje željeza s C-domene u odsutnosti TFR je izuzetno sporo i neosjetljivo na N-domeni. takvo ponašanje pripisuje se "trijadi ostataka" (Lys534 -

Arg632 - Asp634), koja ograničava brzinu otpuštanja. Kada je holo-transferin vezan na svoj receptor, brzina otpuštanja je 7 do 11 puta brža, 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  $\alpha$ -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  $\pi$  interakcije s Phe760 i veze s Asp757, što dovodi do konformacijske promjene kompleksa i same C-domene Tf te posljedično do bržeg otpuštanja željeza.<sup>8</sup>

Bez pristunosti TFR, otpuštanje željeza s N-domene ovisi o protonaciji dilizinskog okidača (Lys206 i Lys296). Lizinski ostaci nalaze se nasuprot udubine u kojoj je vezano željezo te tvore vodikove veze u neutralnom pH, no čim se nađu u niskom pH endosoma, dolazi do brzog pucanja tih veza i otpuštanja željeza. Otpuštanje željeza s N-domene također je ubrzano i zbog vezanja aniona na Arg143, tzv. KISAB (kinetički značajno vezanje aniona) mjesto N2 subdomene. Kada je holo-transferin vezan na TFR, N1 i N2 subdomena se povežu s TFR, čime se ograniči pristup aniona KISAB mjestu, ometa 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.<sup>8</sup>

## 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. Ujedno, zbog svojih redoks svojstava predstavlja i ogroman problem za biološke sustave. Prijenosom jednog elektrona između  $\text{Fe}^{\text{II}}$  i  $\text{Fe}^{\text{III}}$ , dolazi do stvaranja toksičnih i destruktivnih kisikovih radikala. Također, u aerobnim organizmima termodinamički preferirana forma je  $\text{Fe}^{3+}$ , što dovodi do problema solubilizacije jer se pri pH 7  $\text{Fe}^{3+}$  nalazi u obliku teško topljivih hidroksida.

Iz tih razloga živi organizmi su razvili sofisticirane molekulske sustave, kao što je transferin, za solubilizaciju, prihvaćanje, transport i otpuštanje željeza. Transferin veže željezo čvrsto, ali reverzibilno ( $K = 10^{23}$  M) te omogućuje željezu da bude topljivo u fiziološkim uvjetima i održava ga u redoks-inertnom stanju, čime onemogućuje stvaranje toksičnih slobodnih radikala.<sup>7</sup>

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 kinetički gledano, transferin je najaktivnije spremište željeza.<sup>9</sup>

### 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.<sup>9</sup>

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 feroportin, 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 mukoze. Hem



se zatim može eksportirati preko bazolateralne membrane u krvotok pomoću FLVCR hemskog transportera ili se djelovanjem hem-oksidaze (HO), oslobađa  $\text{Fe}^{2+}$  iz hema, koje zatim prelazi bazolateralnu membranu pomoću feroportina.<sup>10</sup>

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  $\text{Fe}^{2+}$ .  $\text{Fe}^{2+}$  se iz makrofaga eksportira pomoću transmembranskog transportera feroportina (FPN1), dok se simultano događa oksidacija željeza u  $\text{Fe}^{3+}$  pomoću ceruloplazmina. Tako oslobođeno trivalentno željezo se zatim veže na transferin.<sup>9</sup>

## 2. Hipoteza (Opći i specifični ciljevi rada)

Mehanizmi vezanja željeza na transferin i otpuštanja s transferina posredovani su redoks reakcijom.<sup>11</sup> Iz tog razloga bitno je ustvrditi utjecaj glikozilacije transferina na njegov redukcijski potencijal. Iako već postoji teoretska podloga za određivanje  $Fe_n^{III}$  - Tf redukcijskog potencijala, ona nije zadovoljavajuća zbog kompleksnosti procedure i uređaja za mjerenje, što uvelike otežava provođenje eksperimenta.<sup>12,13</sup> Cilj ovog rada je pronaći prikladnu spektroelektrokemijsku metodu za određivanje redukcijskog potencijala  $Fe_n^{III}$  - Tf uz pomoć komercijalno dostupnog materijala. Konkretno, odabrana je spektroelektrokemijska protočna ćelija, koja zahtijeva mali volumen uzorka, jednostavno punjenje uzorka te omogućuje održavanje anaerobnih uvjeta za vrijeme izvođenja eksperimenta. Najboljim kandidatom za elektrodu pokazala se jednokratna tiskana elektroda od indij-kositar oksida (ITO) zbog svoje transparentnosti, brze priprave te jednostavne i jeftine zamjene. Svrha primjene ove metode je prvenstveno za proučavanje redukcijskog potencijala glikoformi transferina, no uz jednostavne preinake, može se primijeniti i na druge redoks – aktivne biomolekule.

### 3. Materijali i metode

#### 3.1. Materijali

Priprema otopina:

1. Otopina pufera pripravljena 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  $\text{Fe}(\text{ClO}_4)_3$  u 1 M  $\text{HClO}_4$ .
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 pripravljene otopine željezova (III) perklorata te je dobivena 0.001 M otopina  $\text{Fe}(\text{NTA})_2$ . Tako pripravljena otopina željezova dinitrilotriacetata korištena je kasnije za dobivanje holo-transferina.
5. 0.01 M otopina natrijeva hidrogenkarbonata pripravljena je otapanjem odgovarajuće mase  $\text{NaHCO}_3$  u puferu.
6. 1.25 mM otopina metil viologen diklorida ( $\text{MV}^{2+}$ ) pripravljena je otapanjem odgovarajuće mase metil viologena u puferu.

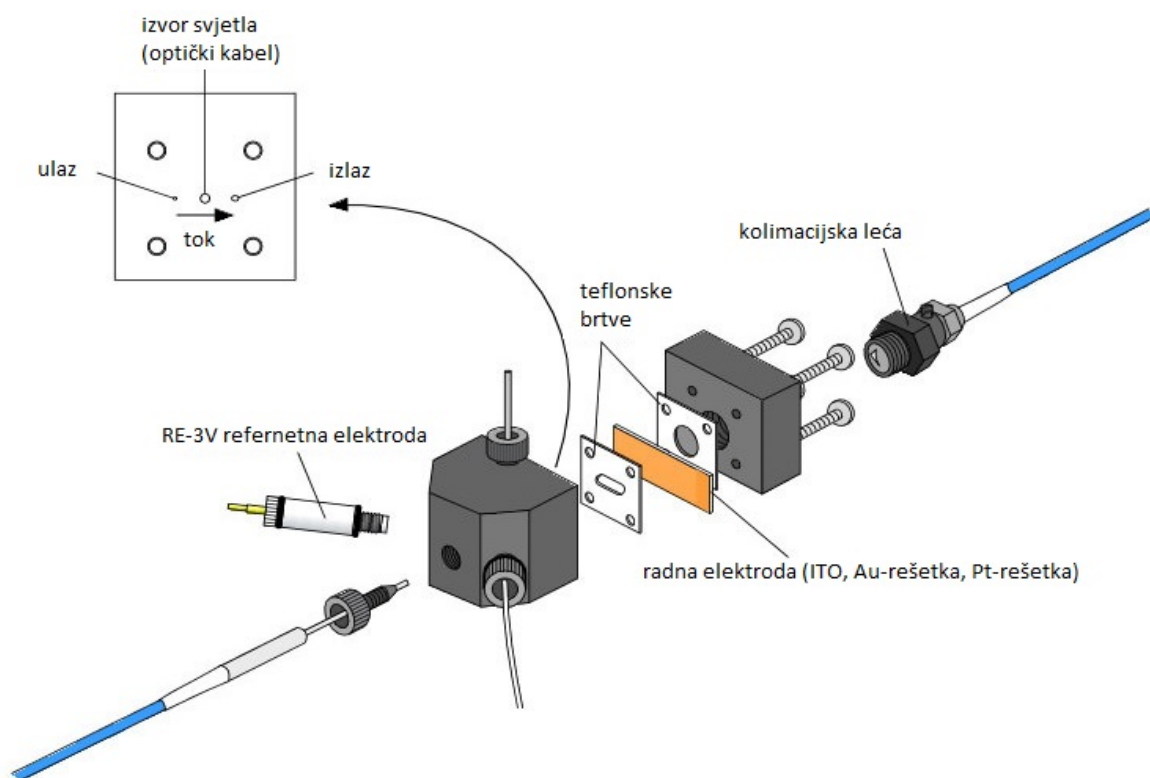
Priprema uzorka:

Nativni humani apo-transferin je najprije otopljen u destiliranoj vodi, a zatim ispran puferom u Amicon Ultra centrifugalnom filteru pri 10000 MWCO. Matična otopina holo-transferina ( $\text{Fe}_2^{\text{III}}\text{-Tf}$ ) 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. Konačna radna otopina sastojala se od 0.35 mM  $\text{Fe}_2^{\text{III}}\text{-Tf}$  i 0.7 mM  $\text{MV}^{2+}$ .

### 3.2. Instrumenti

Za vaganje je korištena Sartorius LA 310 S analitička vaga s točnošću odvage 0,1mg, dok je za određivanje pH otopina korištena Mettler toledo MP 220 pH-metar uz standardne otopine pH 4 i pH 7.

Za spektroelektrokemijska mjerenja korišteni su potencijostat CH Instruments CHI-660D i BASi SEC-F spektroelektrokemijska protočna ćelija s Avantes 400  $\mu\text{m}$  optičkim vlaknom. Kao elektrokemijsko sučelje korištena je Dropsens DRP-ITO10 jednokratna tiskana elektroda sastojala se od radne ITO elektrode, pomoćne ugljikove elektrode i referentne srebrne elektrode. Spektri su snimani pomoću Ocean Optics S2000 spektrofotometra s deuterijevim/volframovim izvorom zračenja. Korištena je BASi 0.015" (0.381 mm) teflonska brtva za fiksiranje optičkog puta te je odgovarajući volumen ćelije iznosio otprilike 20  $\mu\text{L}$  (Slika 1).



Slika 1. Shematski prikaz modificirane BASi spektroelektrokemijske ćelije.

### 3.3. Metode

Spektroelektrokemija (SEC) je tehnika koja kombinira elektrokemijska i spektroskopska mjerenja te na taj način doprinosi nedvosmislenom identificiranju elektroaktivnih specija ili produkata redoks reakcija. Konvencionalna analitička elektrokemija nudi zadovoljavajuće metode za određivanje koncentracija, no u kombinaciji sa spektroskopijom moguće je dobiti i informacije o energiji u obliku redoks potencijala. Spektroelektrokemijske tehnike primjenjuju se u različitim područjima, od anorganske kemije do biokemije. Koriste se za proučavanje redoks procesa, elektrokatalitičkih reakcija, viševalentnih kompleksa, organometalnih spojeva ili prijenosa elektrona u proteinima i biomolekulama.

Kontroliranom primjenom potencijala na željeni uzorak (ciklička voltometrija, CV), moguće je istovremeno spektroskopski pratiti do kojih promjena dolazi u uzorku: apsorpcije elektrona, promjena vibracije, emisije ili raspršivanja svjetla, magnetske rezonancije ili cirkularnog dikroizma.

U ovom radu se uz primjenu spektroelektrokemijske protočne ćelije pratila promjena apsorpcije vidljivog svjetla. Iz tog razloga odabrana je ITO radna elektroda, koja propušta vidljivu svjetlost, valne duljine 390-700 nm. S obzirom da je odnos između apsorpcije i primijenjenog potencijala teoretski objašnjen, moguće je provesti kvantitativnu analizu.

### 3.4. Mjerenja

Prije mjerenja radne otopine su deaerirane pomoću čistog argona tijekom 15 minuta te zatim prenesene na SEC ćeliju pomoću plinonepropusne injekcije. Ćelija je prije punjenja uzorkom proteina temeljito isprana deaeriranim puferom. Tiskana elektroda je prije svakog mjerenja prekondicionirana cikličkom voltametrijom u rasponu potencijala od 0 do 900 mV prema Ag elektrodi, dok nije dobiven reproducibilan voltamogram (bazna linija CV). Također je snimljena spektrofotometrijska bazna linija u deaeriranom puferu prije izvođenja svakog eksperimenta. Kada su tijekom snimanja bazne linije uočene optičke ili elektrokemijske nečistoće na radnoj elektrodi ili je uočen povećani otpor ćelije, elektrode su jednostavno zamijenjene novima.

### 3.5. Račun

Teorija spektroelektrokemijskog određivanja reduksijskog potencijala ( $\text{Fe}_n^{\text{III}}\text{-Tf}$ ) već je utvrđena.<sup>12,13</sup> Kada se primijeni potencijal na otopinu koja sadrži holo-transferin ( $\text{Fe}_n^{\text{III}}\text{-Tf}$ ) i elektrokemijski medijator metilviologen ( $\text{MV}^{2+}$ ), dolazi do sljedećih reakcija:



Najprije na elektrodi dolazi do redukcije bezbojnog  $\text{MV}^{2+}$  u plavo obojeni radikal  $\text{MV}^{\bullet+}$  ( $\lambda_{\text{max}} = 600\text{nm}$ ) (reakcija 1). Radikal metilviologena zatim reducira  $\text{Fe}_n^{\text{III}}\text{-Tf}$  ( $\lambda_{\text{max}} = 465\text{nm}$ ) u  $\text{Fe}_n^{\text{II}}\text{-Tf}$  (reakcija 2,  $n=1$  ili 2, ovisno o speciji Fe-Tf). S obzirom da je afinitet transferina za  $\text{Fe}^{\text{II}}$  nekoliko redova veličine manji od afiniteta prema  $\text{Fe}^{\text{III}}$ , stvoreni  $\text{Fe}_n^{\text{II}}\text{-Tf}$  disocira u otopini na  $\text{Fe}^{\text{II}}$  i apo-Tf (reakcija 3,  $K_D = 10^{-5.7} \text{M}^{-2}$ )<sup>14</sup>. Ukupna reakcija se može prikazati:



U ovom radu praćeno je opadanje koncentracije  $\text{Fe}_2^{\text{III}}\text{-Tf}$  od početne vrijednosti  $[\text{Fe}_2^{\text{III}}\text{-Tf}]_0$  mjerenjem apsorbancije na 465 nm (molarne apsorbancije ostalih specija,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}_2^{\text{II}}\text{-Tf}$ , apo-Tf na toj valnoj duljini su zanemarive)<sup>11</sup> uslijed promjene potencijala prema negativnijim vrijednostima. Iz dobivenih apsorbancija izračuna se omjer koncentracija oksidiranih i reduciranih specija,  $[\text{O}]/[\text{R}]$ , prema formuli:

$$\frac{[\text{O}]}{[\text{R}]} = \frac{A_E}{A_0 - A_E} \quad (5)$$

gdje je  $A_E$  apsorbancija pri bilo kojem primijenjenom potencijalu,  $E_{\text{cell}}$ ,  $A_0$  apsorbancija početne otopine koja sadrži isključivo oksidiranu formu  $\text{Fe}_2^{\text{III}}\text{-Tf}$ ,  $[\text{O}] = [\text{Fe}_2^{\text{III}}\text{-Tf}]$ , a koncentracije reducirane specije se izračuna iz početne koncentracije oksidirane

forme i oksidirane forme pri bilo kojem primijenjenom potencijalu,  $[R] = [Fe_2^{III}-Tf]_0 - [O]$ .

S obzirom da apsorbancija reduciranog radikala medijatora,  $MV^{+}$ , na 465 nm nije zanemariva, paralelno se morao izvesti identičan eksperiment s otopinom koja je sadržavala samo medijator  $MV^{2+}$ , kako bi se provela korekcija apsorbancije  $Fe_2^{III}-Tf$ .<sup>12,13,15</sup>

Za svaku dobivenu vrijedost  $A_{465}$  u ovisnosti o  $E_{cell}$ , izračunate su vrijednosti prema jednadžbi<sup>13,16</sup>:

$$x^{(n+1)} + \frac{K_D}{n^n} x - [R] \frac{K_D}{n^n} = 0 \quad (6)$$

gdje je  $n = 2$  za  $Fe_2^{III}-Tf$ ,  $x = [apo-Tf]$ ,  $[Fe^{2+}] = nx$  i  $[Fe_2^{II}-Tf] = [R] - x$ .

Uy pretpostavku da je ćelija u svakom trenu u ravnoteži, standardni redukcijski potencijal  $E^0$  ( $Fe_2^{III/II}-Tf$ ), te broj izmijenjenih elektrona,  $z$ , izračunaju se iz Nernstove jednadžbe:

$$E_{cell} = E^0(Fe_2^{III/II}-Tf) - \frac{RT}{zF \log e} \log \frac{[Fe_2^{III}-Tf]}{[Fe_2^{II}-Tf]} \quad (7)$$

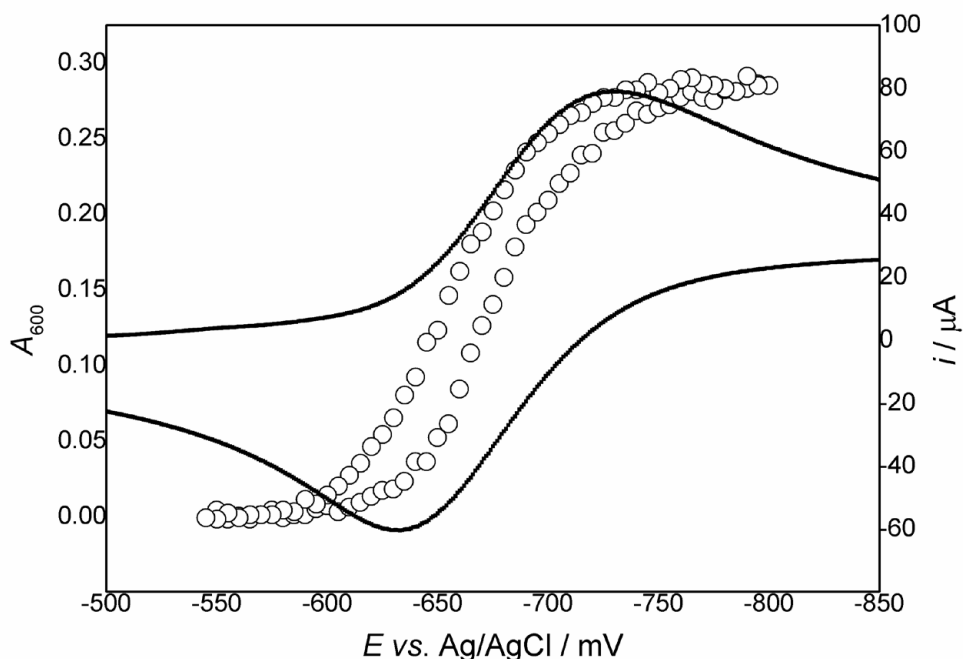
## 4. Rezultati

### 4.1. Spektroelektrokemija medijatora

Za procjenu svojstava tiskane ITO elektrode kao pogodnog elektrokemijskog sučelja za redukciju  $MV^{2+}$  tj. redukciju  $Fe_2^{III}-Tf$ , provedena je ciklička voltometrija u 5 mM otopini  $MV^{2+}$  u deaeriranom puferu pri brzini  $v = 0.2 \text{ Vs}^{-1}$ . Rezultati su ukazali na kvazi-reverzibilan proces prijenosa jednog elektrona pri potencijalu od  $E_{1/2} = -681 \text{ mV}$  prema Ag elektrodi. Iz poznatog standardnog elektrodnog potencijala  $E^0 (MV^{2+}/MV^{+}) = -449 \text{ mV}$  prema NHE (standardna vodikova elektroda)<sup>17</sup>, dobiven je potencijal referentne Ag elektrode  $E = 232 \text{ mV}$  prema NHE.

Također, u svrhu procjene spektroelektrokemijskih svojstava ćelije te za dobivanje korigiranih vrijednosti apsorbancije radnih otopina, snimani su spektri samog  $MV^{2+}$  tijekom spore promjene potencijala od 550 mV do -800 mV prema Ag elektrodi pri brzini  $v = 2 \times 10^{-5} \text{ Vs}^{-1}$ . Opažen je porast apsorbancije na 600 nm, što odgovara jednadžbi (1) te je zabilježeno stvaranje  $MV^{+}$  promjenom potencijala prema negativnijim vrijednostima. Kompletna oksidacija  $MV^{+}$  zabilježena je na kraju povratnog koraka, tj. promjenom potencijala prema početnoj vrijednosti  $MV^{+}$  je oksidiran u  $MV^{2+}$ . Tijekom 25000 sekundi (otprilike 7 sati) trajanja ciklusa snimljeno je sveukupno 100 spektara. Veoma spora brzina promjene potencijala bila je dostatna kako bi se ćelija uravnotežila, što je dokazano podjednakom apsorbancijom opaženom pri upola sporijem ciklusu ( $v = 1 \times 10^{-5} \text{ Vs}^{-1}$ ). Rezultati mjerenja samog  $MV^{2+}$  prikazani su na Slici 2.

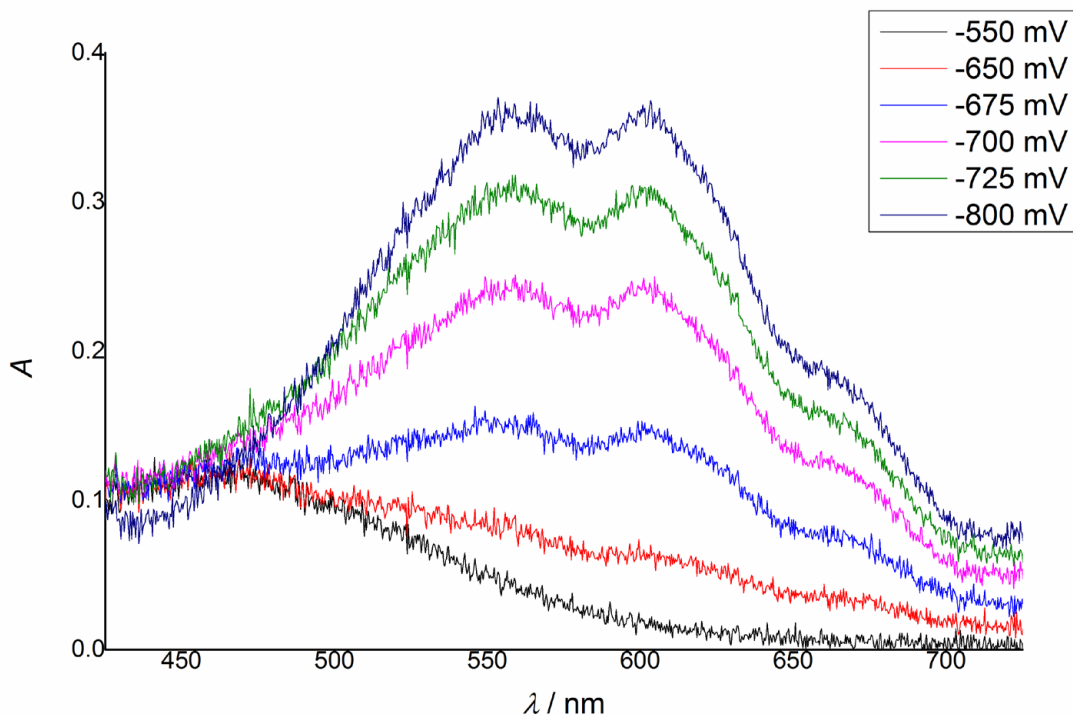




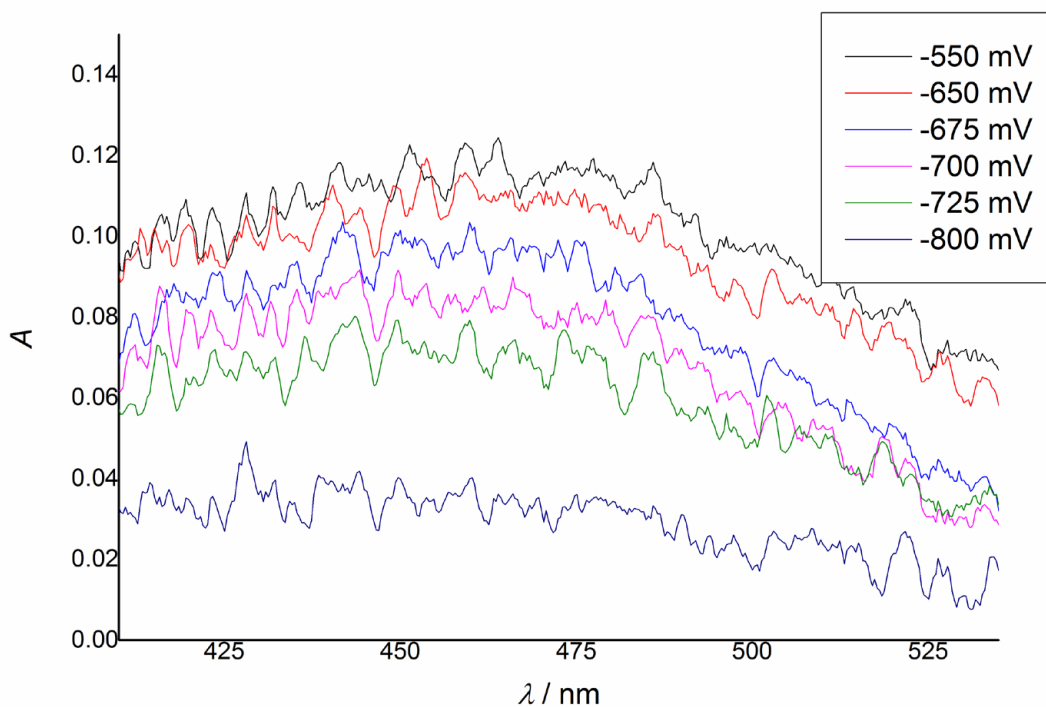
**Slika 2. Elektrokemijska i spektroelektrokemijska procjena  $MV^{2+}$ : punom crtom (-) prikazan je ciklički voltamogram 5 mM otopine  $MV^{2+}$  (0.1 M PIPES, pH 7.4, 0.5 M KCl,  $v = 0.2 \text{ Vs}^{-1}$ ) u spektroelektrokemijskoj ćeliji; kružićima ( $\circ$ ) je prikazana apsorbancija na 600 nm 0.7 mM otopine  $MV^{2+}$  tijekom promjene potencijala (0.1 M PIPES, pH 7.4, 0.5 M KCl,  $v = 2 \times 10^{-5} \text{ Vs}^{-1}$ ), svaka vrijednost snimana je nakon 250 s.**

#### 4.2. Spektroelektrokemija holo-transferina

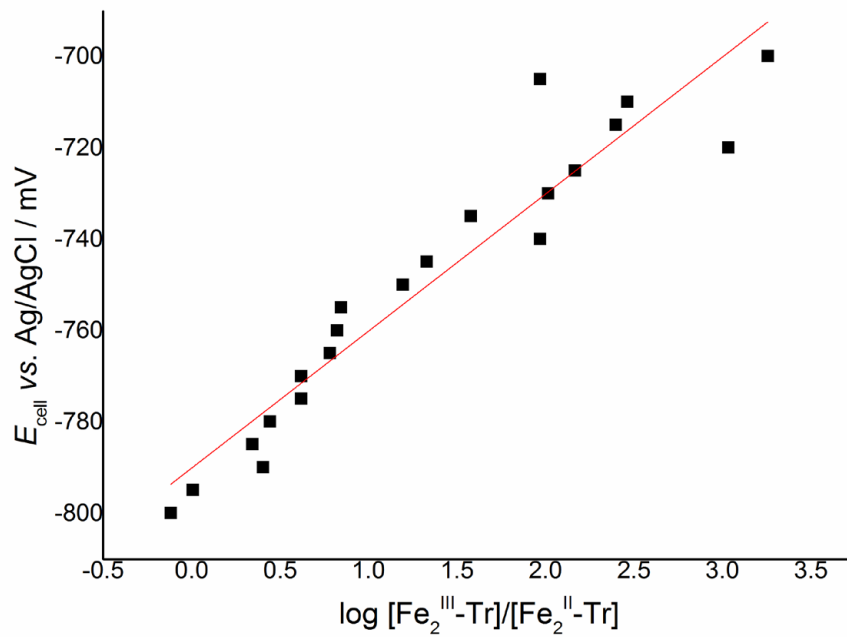
Otopina koja je sadržavala  $\text{Fe}_2^{\text{III}}\text{-Tf}$  i  $MV^{2+}$  također je podvrgnuta sporoj promjeni potencijala, što je rezultiralo porastom koncentracije  $MV^{+}$  te smanjenjem koncentracije  $\text{Fe}_2^{\text{III}}\text{-Tf}$  promjenom potencijala prema negativnijim vrijednostima. Opažena spektralna promjena pri redukcije  $\text{Fe}_2^{\text{III}}\text{-Tf}$  u prisutnosti medijatora opisana jednadžbama 1-3, te spektralna promjena nakon pozadinske korekcije prikazane su na slikama 3 i 4. Vrijednost standardnog redukcijskog potencijala i broj izmijenjenih elektrona dobiveni su iz grafa na slici 5 i odgovarajuće jednadžbe (7) te iznose  $E^0(\text{Fe}_2^{\text{III/II}}\text{-Tf}) = -790 \pm 4 \text{ mV}$  prema Ag elektrodi., odnosno  $z = 1.9 \pm 0.1$ , Uzimajući u obzir potencijal referentne elektrode, vrijednost standardnog redukcijskog potencijala iznosi  $E^0(\text{Fe}_2^{\text{III/II}}\text{-Tf}) = -558 \text{ mV}$  prema NHE.



**Slika 3. Nekorrigirana spektralna promjena pri redukciji  $\text{Fe}_2^{\text{III}}\text{-Tf}$  u prisutnosti medijatora  $\text{MV}^{2+}$  :  $\text{Fe}_2^{\text{III}}\text{-Tf} = 0.35 \text{ mM}$ ,  $\text{MV}^{2+} = 0.7 \text{ mM}$ ,  $0.1 \text{ M PIPES}$ ,  $\text{pH } 7.4$ ,  $0.5 \text{ M KCl}$ ,  $v = 2 \times 10^{-5} \text{ V s}^{-1}$ . Odgovarajuće vrijednosti  $E_{\text{cell}}$  nalaze se u legendi.**



**Slika 4. Spektralna promjena nakon pozadinske korekcije za redukciju  $\text{Fe}_2^{\text{III}}\text{-Tf}$  u prisutnosti medijatora  $\text{MV}^{2+}$ :  $\text{Fe}_2^{\text{III}}\text{-Tf} = 0.35 \text{ mM}$ ,  $\text{MV}^{2+} = 0.7 \text{ mM}$ ,  $0.1 \text{ M PIPES}$ ,  $\text{pH } 7.4$ ,  $0.5 \text{ M KCl}$ ,  $v = 2 \times 10^{-5} \text{ V s}^{-1}$ . Odgovarajuće vrijednosti  $E_{\text{cell}}$  nalaze se u legendi.**



**Slika 5. Grafički prikaz Nernstove jednadžbe za redukciju Fe<sub>2</sub><sup>III</sup>-Tf u prisutnosti medijatora MV<sup>2+</sup> : Fe<sub>2</sub><sup>III</sup>-Tf = 0.35 mM, MV<sup>2+</sup> = 0.7 mM, 0.1 M PIPES, pH 7.4, 0.5 M KCl. Izračunata vrijednost nagiba pravca je 30 ± 2, a vrijednost odsječka na ordinati iznosi -790 ± 4 (R<sup>2</sup> = 0.90165).**

## 5. Rasprava

Dobiveni parametri elektrokemijske redukcije  $\text{Fe}_2^{\text{III}}\text{-Tf}$  razmjerno dobro se podudaraju s poznatim rezultatima,  $E_0'(\text{Fe}_2^{\text{III/II}}\text{-Tf}) = -526 \text{ mV}$  prema NHE i  $z = 2.1$ .<sup>13</sup> Vrijednost  $E_0'(\text{Fe}_2^{\text{III/II}}\text{-Tf})$  u ovom radu negativnija je za 32 mV od prethodno objavljene vrijednosti, no predložena metoda pruža puno više raspoloživih podataka za procjenu parametara (21 mjerenje tijekom 1.5 h u istoj otopini), dok su prijašnji rezultati procijenjeni na osnovi svega 6 mjerenja u različitim otopinama tijekom nekoliko dana. Nadalje, značajna odstupanja od ravnoteže u ćeliji rezultirala bi u odstupanju od Nernstove jednadžbe, što nije opaženo. Jednaki rezultati dobiveni dvostruko sporijim mjerenjem također ukazuju da je predložena metoda optimalna.

## 6. Zaključak

Nedostatak željeza u organizmu jedan je od najčešćih poremećaja u svijetu. S druge strane, previsoke se koncentracije željeza povezuju s podložnošću infekcijama te sve češće s kardiotoksičnošću i razvojem neurodegenerativnih bolesti. Do poremećaja u razini željeza u organizmu često dolazi i kod pacijenata s karcinomom, posebice kod primanja kemoterapije. Stoga je razumijevanje homeostaze željeza od izuzetne važnosti. Transferin, kao glavni transporter željeza u organizmu, igra važnu ulogu u održavanju homeostaze. Poznato je da kod pacijenata s karcinomom dolazi do promjena u glikozilaciji transferina te je iz tog razloga potrebno utvrditi utjecaj glikozilacije na njegovu funkciju. Ovdje opisana metoda omogućuje jednostavnije i brže mjerenje redukcijskog potencijala različitih glikoformi transferina, a moguća je i njena šira primjena, npr. u glikoproteomici za karakterizaciju izoformi različitih redoks-aktivnih proteina.

## **7. Zahvala**

Prvenstveno se zahvaljujem mentoru, doc. dr. sc. Tinu Weitneru, na pomoći, strpljenju, prenesenom znanju i dosjetljivosti. Također, zahvaljujem se i ostatku Zavoda za opću i anorgansku kemiju, izv. prof. dr. sc. Mariju Gabričeviću na savjetima te dr. sc. Ivanu Birušu i dr. sc. Davoru Šakiću na pomoći.

## 8. Popis literature

1. Lambert, L.A. (2012): Molecular evolution of the transferrin family and associated receptors, *Biochim. Biophys. Acta*, 1820, 242-253
2. Andrews N.C., Schmidt P.J., (2007): *Iron homeostasis*, *Annu Rev Physiol*, 69, 69-85.
3. M.F.Macedo, M. de Sousa (2008): *Transferrin and the transferrin receptor: Of magic bullets and other concerns*, *Inflammation & Allergy - Drug Targets*, 7, 41-52
4. Gruszewska E., Cylwik B., Gudowska M., Kedra B., Szmitowski M., Chrostek L. (2016): Changes in transferrin isoforms in pancreatic cancer, *Annals of Clinical and Laboratory Science*, 46:3, 286-290.
5. Ghanbari Z., Housaindokht M.R., Bozorgmehr M.R., Izadyar M. (2016): The effect of glycosylation on the transferrin structure: A molecular dynamic simulation analysis, *Journal of Theoretical Biology*, 404, 73-81.
6. M. Nagae et al. (2014): Structural change of N-glycan exposes hydrophobic surface of human transferrin, *Glycobiology*, 24, 693-702.
7. H. M. Baker, B. F. Anderson, E. N. Baker (2003): Dealing with iron: Common structural principles in proteins that transport iron and heme, *PNAS*, 100:7, 3579-3583
8. B.E. Eckenroth, A.N. Steere, N.D.Chasteen, S.J. Everse, A.B. Mason (2011): How the binding of human transferrin primes the transferrin receptor potentiating iron release at endosomal pH, *PNAS*, 108:32, 13089 – 13094
9. K. Gkouvatsos, G. Papanikolaou, K. Pantopoulos (2012): Regulation of iron transport and the role of transferrin, *Biochimica et Biophysica Acta* 1820, 188 – 202
10. G.Cairo, F. Bernuzzi, S. Recalcati (2006): A precious metal: Iron, an essential nutrient for all cells, *Genes and nutrition*, 1:1, 25-40

11. E. C. Theil, P. Aisen (1987): The storage and transport of iron in animal cells, In iron transport in Microbes, Planst and Animals, VCH, 491-520
12. K. N. Raymond et al. (1988): Spectroelectrochemical determination of the reduction potential of diferric serum transferrin, *Biochimica et Biophysica acta*, 956, 85-94
13. A. L. Crumbliss et al. (1998): A determination of the reduction potentials for diferric and C- and N- lobe monoferric transferrins at endosomal pH (5.8), *Inorganic Chemistry*, 37, 964-968
14. W. R. Harris (1986): Estimation of the ferrous – transferrin binding constants based on thermodynamic studies of nickel (II)- transferrin, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 27, 41-52
15. K. D. Weaver: Thermodynamic and kinetic investigations of structure-function relationships in ferric binding protein, transferrin and hemoglobin, Ph.D Thesis, Duke University, 2007, 361-366
16. C.H. Taboy: Spectroelectrochemical investigations of iron redox behavior in selected metalloproteins and metallo-protein/receptor complexes, Ph.D Thesis, Duke University, 2001, 213-218
17. M.L. Fultz, R. A. Durst (1982): Mediator compounds for the electrochemical study of biological redox systems: A compilation, *Analytica Chimica Acta*, 140, 1-18
18. N. Zhao, C. A. Enns (2012): Iron transport machinery of human cells: players and their interactions, *Current topics in Membranes*, 69, ISSN, 67-93



## 9. Sažetak

Mehanizmi vezanja željeza na transferin i otpuštanja s transferina posredovani su redoks reakcijom. Iako već postoji teoretska podloga za određivanje redukcijskog potencijala  $Fe_n^{III}$ -Tf, ona nije zadovoljavajuća zbog kompleksnosti procedure i uređaja za mjerenje, što uvelike otežava provođenje eksperimenta. Cilj ovog rada bio je pronaći prikladnu spektroelektrokemijsku metodu za određivanje redukcijskog potencijala  $Fe_n^{III}$ -Tf uz pomoć komercijalno dostupnog materijala. Dobiveni parametri elektrokemijske redukcije  $Fe_2^{III}$ -Tf razmjerno dobro se podudaraju s prethodno objavljenim rezultatima, dok predložena metoda pruža puno više raspoloživih podataka za izračun parametara.

ključne riječi:

transferin, redukcijski potencijal, spektroelektrokemija

## 10. Summary

The mechanism of transferrin iron binding and release are mediated by redox reaction. Although the theoretical basis for determination of the  $\text{Fe}_n^{\text{III}}\text{-Tf}$  reduction potential is established, the complexity of procedures and devices for measurement greatly complicate the implementation of the experiment. The aim of this study was to find a suitable spectroelectrochemical method for the determination of the  $\text{Fe}_n^{\text{III}}\text{-Tf}$  reduction potential with commercially available materials. The parameters of electrochemical reduction  $\text{Fe}_2^{\text{III}}\text{-Tf}$  are in good agreement with previously published results, while the proposed method provides much more data available to calculate the parameters.

key words:

transferrin, reduction potential, spectroelectrochemistry