Glikozilacija serumskog transferina kao faktor u mehanizmu prijenosa željeza - GlyMech

FARMEBS 2019

Izlagač: Valentina Borko
Voditelj projekta: doc. dr. sc. Tin Weitner
Šifra projekta: UIP-2017-05-9537

Svojstva željeza

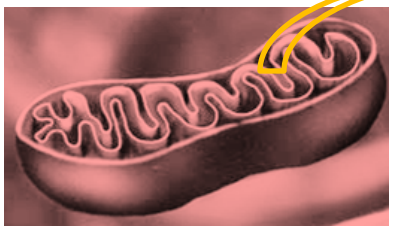
- najzastupljeniji metal u svemiru
- esencijalno je za gotovo sve žive organizme
- veliki broj staničnih redoks reakcija
- širok raspon dostupnih redoks potencijala:

$$Fe^{3+} + e^- \rightleftharpoons Fe^{2+}$$

- funkcije: prijenos i pohrana kisika, prijenos elektrona u staničnom metabolizmu

Toksičnost željeza

- kataliza konverzije vodikovog peroksida u slobodne radikale (Haber-Weissov ciklus):

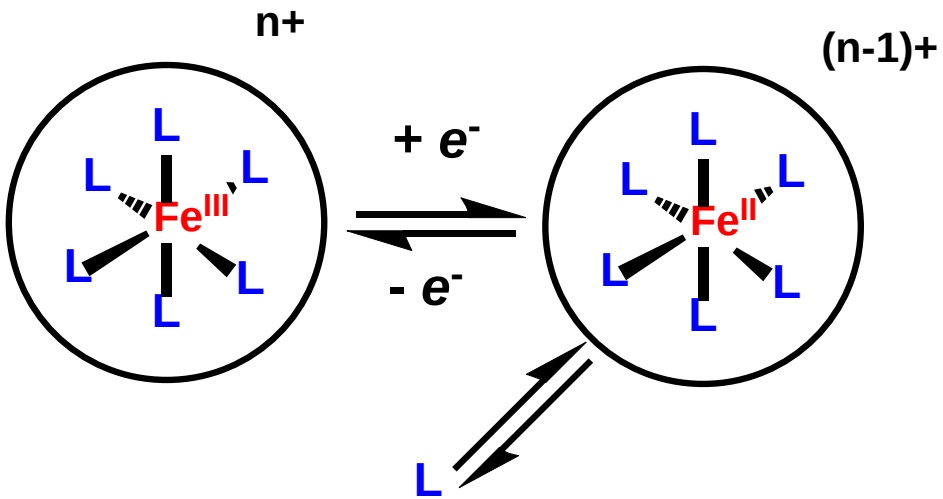


$$Fe^{3+} + \bullet O_2^- \longrightarrow Fe^{2+} + O_2$$

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \longrightarrow Fe^{3+} + OH^- + \bullet OH$$

- slobodni radikali oštećuju stanične strukture (membrane, proteine, DNK)
- suvišak željeza dovodi se u vezu s nastankom raka, srčanih oštećenja itd.

Koordinacijska kemija željeza



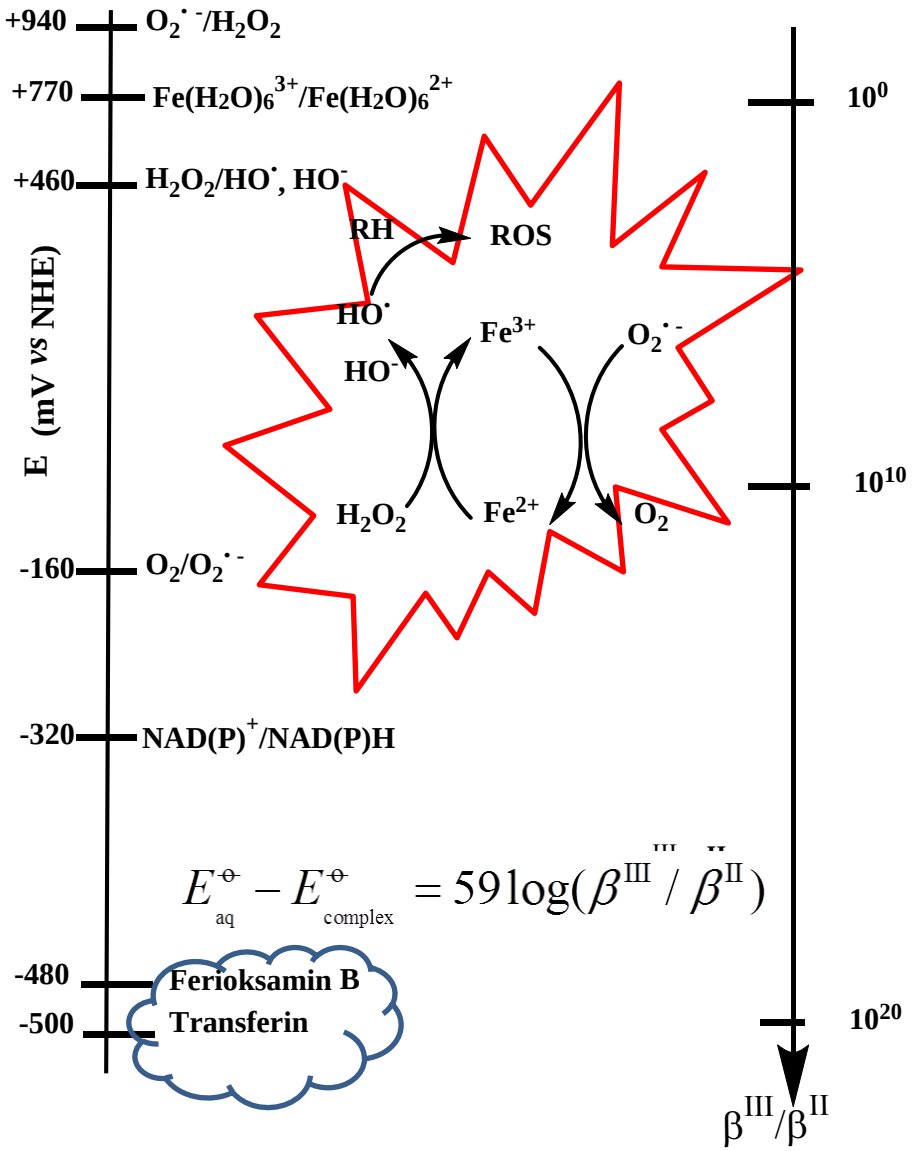
$$Fe(H_2O)_6^{3+} + L \rightleftharpoons Fe^{3+}L$$

$$E^{\ominus}_{aq} \qquad E^{\ominus}_{complex}$$

$$Fe(H_2O)_6^{2+} + L \rightleftharpoons Fe^{2+}L$$

$$E^{\ominus}_{aq} - E^{\ominus}_{complex} = 59\log(\beta^{III} / \beta^{II})$$

- redoks potencijal para Fe(III/II) značajno ovisi o vrsti liganda
- stabilnost kompleksa i redoks potencijal međusobno su povezani
- selektivnost kelatora za Fe(III) raste smanjenjem redoks potencijala

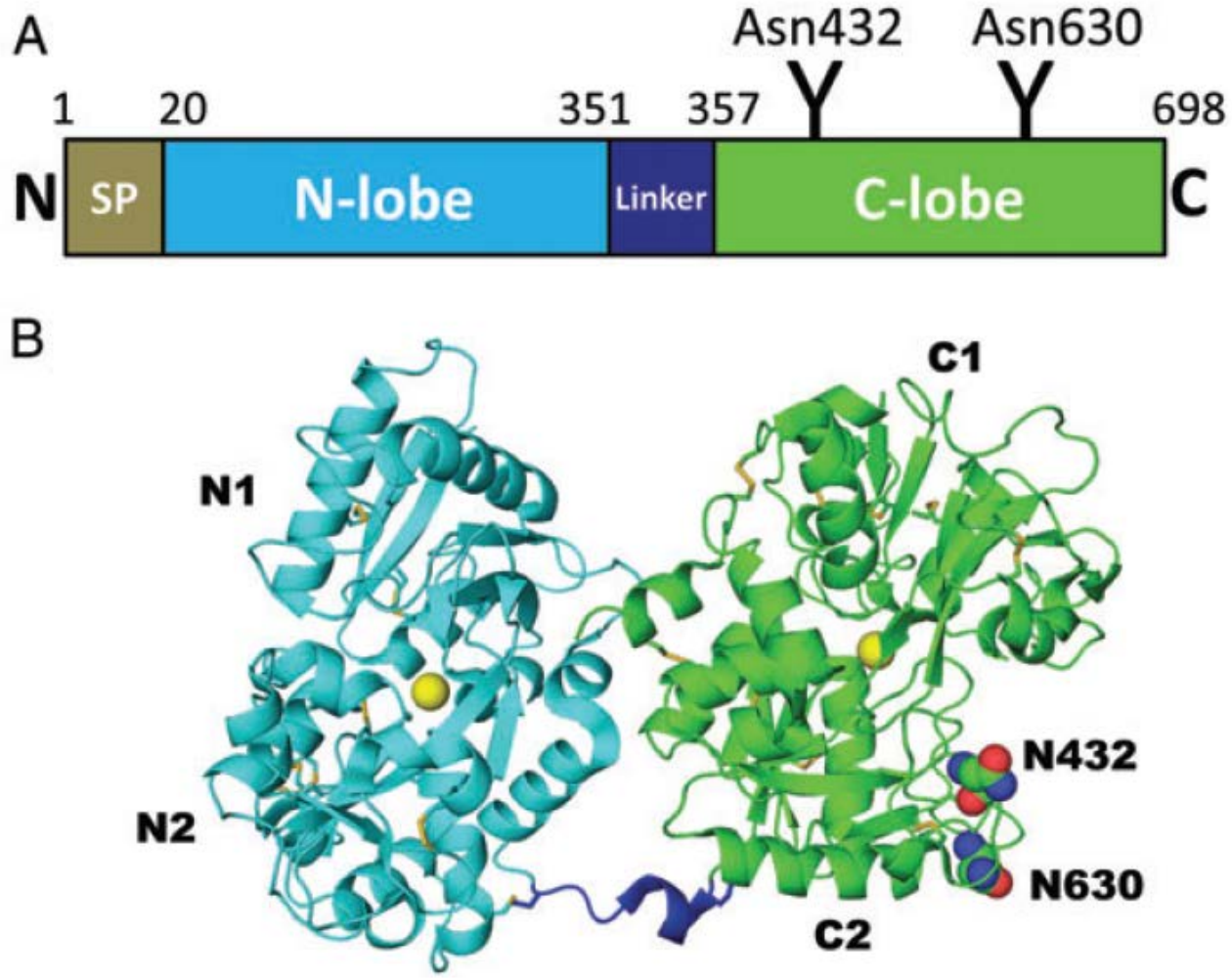


- kontrola redoks potencijala omogućuje:
  - sprečavanje nastanka reaktivnih specija
  - selektivnost za Fe(III) odnosno Fe(II)
  - kontrolu stabilnosti kompleksa
  - kontrolu kinetike izmjene liganda
  - kontrolu osjetljivosti redoks ‘prekidača’

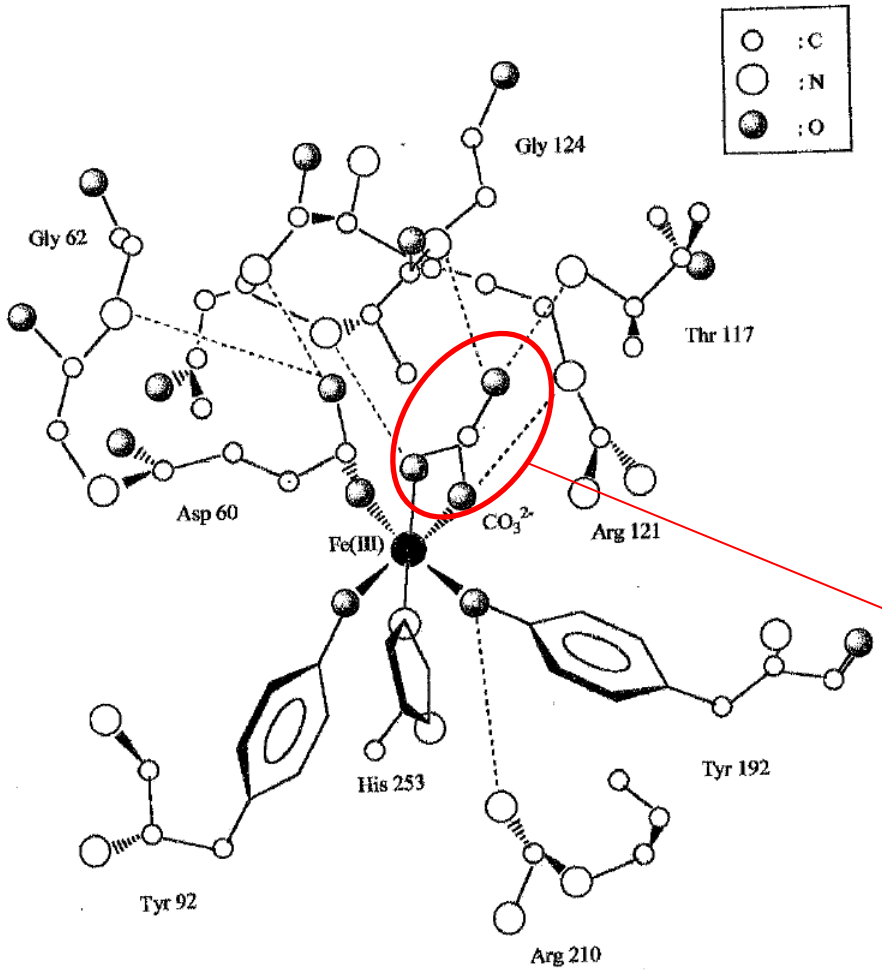
Transferin

- glikoprotein mase oko 80 kDa
- sintetizira se u jetri
- normalna razina u serumu 25-45 µmol / L
- svaka molekula transferina veže do dva iona Fe^{3+}
- 95% serumskog željeza vezano je u transferinu
- u zdravih pojedinaca željezom je zasićeno 30% transferina – efikasan puferski sustav

Struktura transferina



Aktivno mjesto transferina



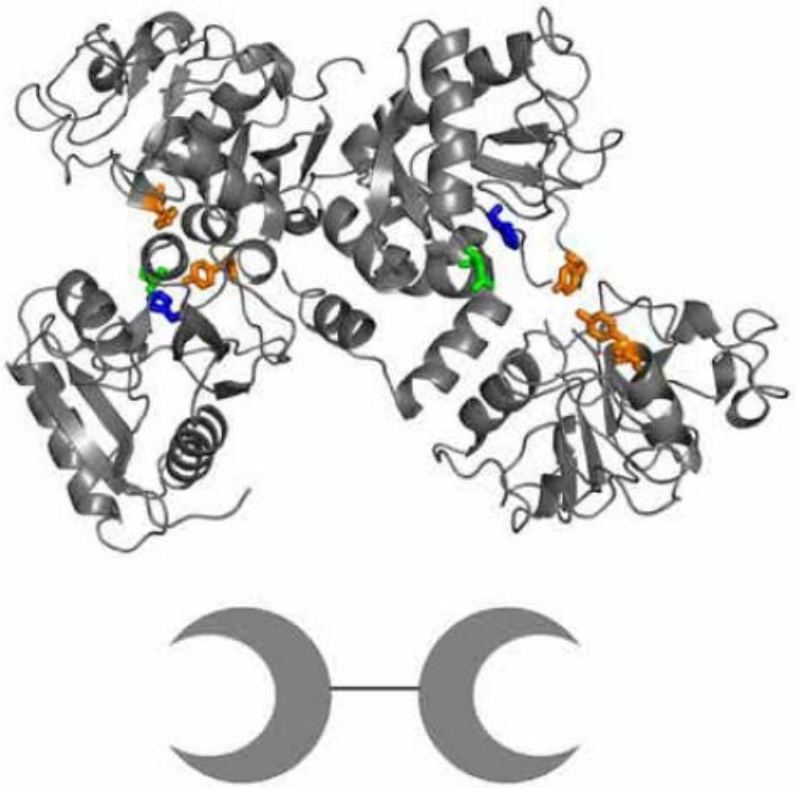
$$Fe^{3+} + \text{apo-Tf} + CO_3^{2-}$$

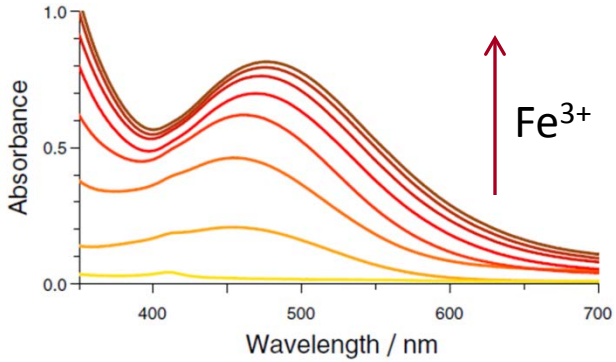
$$\downarrow K_b \sim 10^{20}\ M^{-1}$$

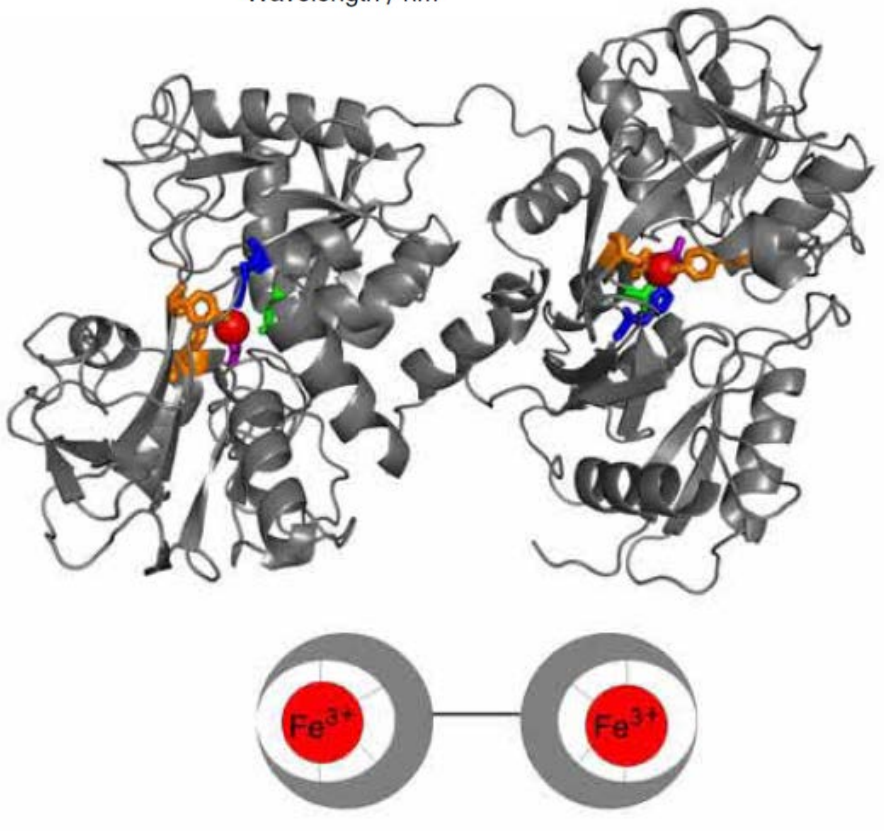
$$Fe^{III}Tf(CO_3^{2-})$$

sinergistički anion

Vezanje železja za transferin







Postotak zasićenja Fe_xTf

$$A_{280} = \varepsilon_{a280} \cdot l \cdot c_a + \varepsilon_{h280} \cdot l \cdot c_h$$

$$A_{462} = \varepsilon_{h462} \cdot l \cdot c_h$$

$$\%_{zas} = c_h / (c_a + c_h)$$

$$\%_{zas} = (A_{462} \cdot \varepsilon_{a280}) / (A_{280} \cdot \varepsilon_{h462} - 0.24 \cdot A_{462} \cdot \varepsilon_{a280})$$

GlyMech

- promjena u razmjerno velikom glikanskom dijelu transferina - značajan utjecaj na konstantu vezanja željeza i konstantu vezanja na Tf receptor
- promjena glikozilacije transferina - promjena redoks potencijala vezanog željeza
- jedan od ciljeva projekta je pružiti dublje razumijevanje zašto u organizmu dolazi do promjene glikozilacije transferina, osobito tijekom infekcije

Određivanje konstante ravnoteže

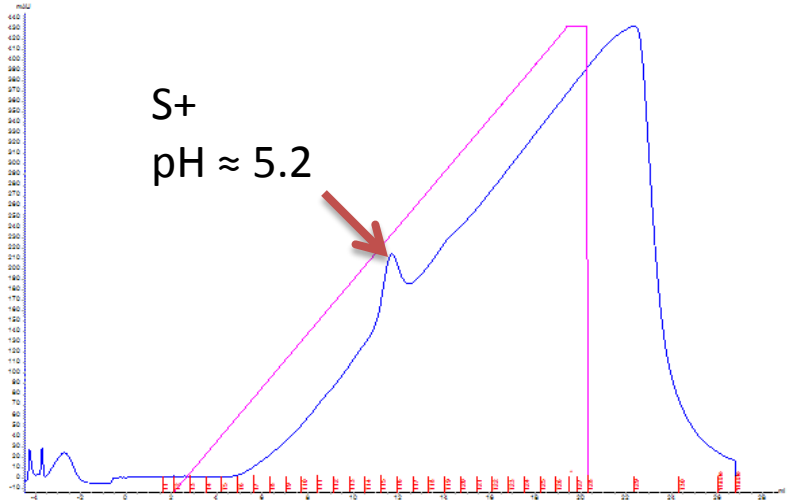
$$Fe^{3+} + Tf^{n} + HCO_3^- \rightleftharpoons (Fe\text{-}Tf\text{-}HCO_3)^{n-1} + 3H^+$$

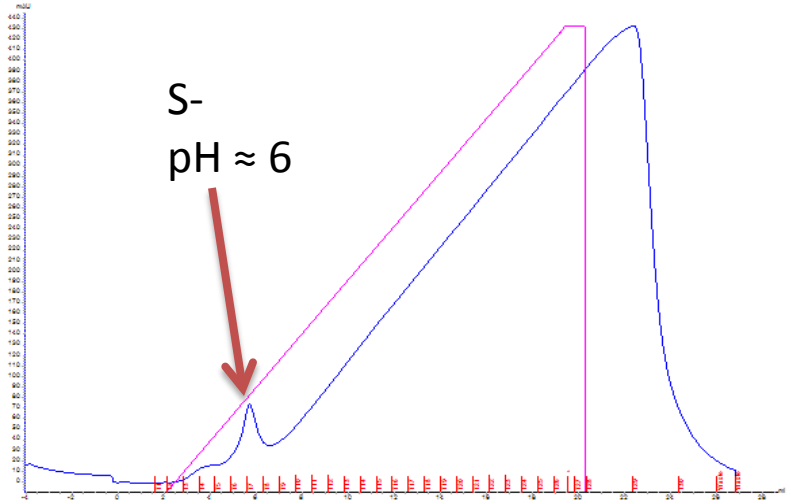
$$K_{a1} = \frac{[(Fe\text{-}Tf\text{-}HCO_3)^{n-1}][H^+]^3}{[Fe^{3+}][Tf^{n}][HCO_3^-]}$$

- izniman afinitet vezanja transferina na Fe^{3+}
- kompetitivna reakcija Fe_xTf s EDTA
- ovisi o pH – potrebno dobro puferiranje
- konstantna ionska jakost - stalna konc. KCl
- posredno određivanje [Fe^{3+}]
- apoTf i Fe_xTf preko A_{462} i A_{280}
- vezanje željeza djelomično gasi fluorescenciju apoTf

pH gradijent - kromatofokusiranje

- uklanjanje sijalinske kis. ΔpI ≈ 0.1 po ostatku
- dobar puf. kapacitet
- biološki puferi
- razdvajanje glikoformi





Literatura

[1] M. C.-M. Chung, Structure and function of transferrin, Biochemical Education 12 (1984) 146-154.

[2] P. Hoelkens, Synthesis and properties of aglyco transferrin, University of Rotterdam, PhD thesis, 1996.

[3] S. Supraha Goreta, S. Dabelic, J. Dumic, Insights into complexity of congenital disorders of glycosylation, Biochemia Medica 22 (2012) 156-170.

[4] P. Aisen, I. Listowsky, Iron transport and storage proteins, Ann. Rev. Biochem. 49 (1980) 357-393.

[5] K. Gkouvatsos, G. Papanikolaou, K. Pantopoulos, Regulation of iron transport and role of transferrin, Biochimica et Biophysica Acta 1820 (2012) 188-202.

[6] A. Crumbliss, Iron chelation in biology, Virtual Free Radical School of the Oxygen Society, G.R. Buettner, F.Q. Schafer, eds, http://www.medicine.uiowa.edu/FRRB/VirtualSchool/Virtual.html, 2002.

[7] G. Jones, Iron Metabolism and Storage, St. Vincent's Hospital, Sydney, UNSW Lecture, 2005.

[8] H.M. Baker, B.F. Anderson, E.N. Baker, Dealing with iron: Common structural principles in proteins that transport iron and heme, PNAS 100 (2003) 3579-3583.

Zahvaljujem Vam na pozornosti!