

SUGGESTION AND OPTIMIZATION OF METHOD FOR STUDY OF STRUCTURAL CHANGES OF LACTOFERRIN

NAVRŽENÍ A OPTIMALIZACE METODY PRO STUDIUM STRUKTURNÍCH ZMĚN LAKTOFERINU

Zítka O.^{1,2)}, Horna A.³⁾, Stejskal K.^{1,2)}, Zehnálek J.¹⁾, Adam V.¹⁾, Havel L.⁴⁾, Zeman L.⁵⁾, Kizek R.¹⁾

¹Ústav chemie a biochemie, ⁴Ústav biologie rostlin, a ⁵Ústav výživy zvířat, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno; ²Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova Univerzita, Kotlářská 2, 611 37 Brno; ³Radanal s.r.o., Okružní 613, 530 03 Pardubice

E-mail: zitkao@seznam.cz, kizek@sci.muni.cz

ABSTRACT

Lactoferrin is considered a multifunctional or multi-tasking protein. It appears to play several biological roles, whereas its structure is very crucial. The aim of this work was to investigate basic electrochemical behaviour of lactoferrin by both stationary and flow electrochemical methods with respect to study of structural changes of the compound of interest. Based on the results obtained, we utilized flow injection analysis with electrochemical detection for determination of lactoferrin. Finally, we attempted to follow the changes of lactoferrin signal in the presence of chemical compounds or under the physical conditions leading to changes in its structure. As we have shown here, electrochemical analysis enables to distinguish a change of protein structure easily and rapidly.

Keywords: lactoferrin, milk protein, differential pulse voltammetry, flow injection analysis, carbon paste electrode, glassy carbon electrode, structural changes of protein.

ABSTRAKT

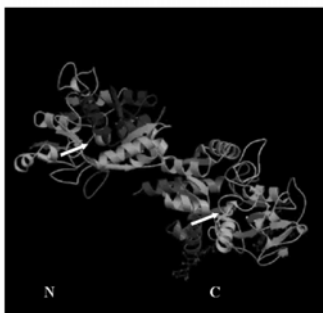
Laktoferin je považován za protein s mnoha funkcemi, který může díky své struktuře hrát mnoho důležitých biologických rolí. V této práci jsme studovali základní elektrochemické chování laktoferinu pomocí stacionární a průtokové elektrochemické metody se zaměřením na studium změny struktury proteinu. Na základě získaných výsledků jsme využili průtokovou injekční analýzu s elektrochemickou detekcí pro stanovení laktoferinu. Nakonec jsme se pokoušeli sledovat změnu signálu laktoferinu při vlivu chemických látek nebo při změně fyzikálních podmínek vedoucích ke změnám struktury. V práci je ukázáno že elektrochemická analýza umožňuje rychle a snadně rozlišit změny struktury proteinu.

Klíčová slova: laktoferin, mléčný protein, diferenční pulzní voltametrie, průtoková analýza, uhlíková pastová elektroda, elektroda ze skelného uhlíku, strukturní změny proteinu.

ÚVOD

Mléko představuje jednu ze základních potravin ve výživě člověka. Studiu obsahového složení je věnována stále pozornost[1-4]. Laktoferin, jenž je také nazýván laktotransferin, byl objeven v roce 1939 v kravském mléku. Jeho jméno je odvozeno podle dřívější klasifikace jako nejvýznamnější železo vázající bílkovina v mléce[5]. V roce 1960 byl poprvé izolován z lidského mateřského mléka[6]. V minulosti byl považován laktoferin pouze za bakteriostatický železo-transportní protein v mléku. Následně se také ukázal velmi významným železo vázajícím proteinem dalších exokrinních sekretů jako jsou žluč, pankreatická šťáva a střevní sekrety. Velikost a struktura laktoferinu úzce souvisí s podobností s ostatními železo vázajícími proteiny, transferiny. Díky těmto vlastnostem je laktoferin považován za právoplatného člena transferinové rodiny[7,8]. Plazmatický laktoferin je pravděpodobně syntetizován leukocyty. Nejvyšší hladina je pozorována v kolostru (až 7 g/l) a mléce (v průběhu laktace se sníží koncentrace oproti kolostru přibližně 7×), nižší hodnoty jsou v slzách, nosních tekutinách, slinách atd.[7,9-11]. Strukturně a chemicky je laktoferin glykoprotein skládající se z 703 aminokyselinových zbytků. Hololaktoferin je tvořen z jednoho lineárního polypeptidového řetězce včleněného do dvou kulovitých domén (C- a N-terminální), každá doména má jedno vazebné místo pro navázání železa (Obr. 1). Jeho molekulová hmotnost se pohybuje kolem 77000 Da.

Obr. 1 Strukturní model laktoferinu. Šipkou je vyznačeno vázané železo (podle www.expasy.ch)



Laktoferin je schopný do stejného místa vázat i další kovy, ale s nižší afinitou. Je známo, že váže např.: Ga^{3+} , Al^{3+} , VO^{2+} , Mn^{3+} , Co^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , trivalentní lanthanoidy. Mezi doposud známé biologické funkce laktoferinu patří regulace homeostázy železa. Regulace homeostázy železa se odehrává převážně v tenkém střevě, kde je přijímáno z potravy. Zajímavý je vztah k regulaci buněčného růstu, diferenciaci buněk a protizánětlivé aktivitě [12-14]. Z toho také vyplývá možný vztah ke zhoubným nádorům a procesu metastazování [15].

Obsah laktoferinu v mléce je ovlivněn stářím krávy. Experimenty byly provedeny od mlezivového období až po stání na sucho. Bylo zjištěno, že nejvyšší obsah laktoferinu byl v době stání na sucho. Navíc se podařilo zjistit, že vliv plemena nemá žádný vliv na obsah laktoferinu. Avšak stáří krávy hrálo významnou roli v obsahu laktoferinu. Krávy nad čtyři roky měly po celou dobu (3 let) o 14% vyšší obsah laktoferinu než krávy tříleté.

Elektrochemické metody představují alternativní nástroj pro detekci biologicky aktivních látek především pro svoji jednoduchost, rychlost a spolehlivost [16-25]. Cílem naší práce bylo základní elektrochemické studium laktoferrinu pomocí stacionárních a průtokových elektrochemických technik s aplikací na rozlišení strukturních změn.

MATERIÁL A METODIKA

Chemikálie

Acetonitril a methanol (HPLC-čistota) byly získány od firmy Merck (Darmstadt, Německo). DMW lactoferin byl získán z NUTRA ingrediens (Holandsko). Všechny další chemikálie byly zakoupeny u firmy Sigma-Aldrich (USA) pokud není uvedeno jinak. Zásobní roztoky standardů (koncentrace 1 mg.ml⁻¹) byly připraveny v ACS vodě (Aldrich, USA) a uchovány ve tmě při 4 °C.

Elektrochemická analýza ve stacionárním uspořádání

Elektrochemické měření bylo prováděno na AUTOLABu (EcoChemie, Holandsko) ve spojení s VA-Stand 663 (Metrohm, Švýcarsko) v tříelektrodovém zapojení. Jako pracovní elektroda byla použita uhlíková pastová elektroda (poměr uhlíkového prášku a minerálního oleje 70/30; w/w), referentní elektroda (Ag/AgCl, 3M KCl) a uhlíková tyčinka jako pomocná elektroda. Všechna elektrochemická měření byla provedena v acetátovém pufru pH = 4. Analyzované vzorky byly deoxygenovány pro měření pomocí probublávání argonem (99.999%) nasyceného vodou po dobu 120 s. Všechny experimenty byly prováděny při pokojové teplotě. Voltametrické parametry byly následující: LSV počáteční potenciál 0 V, konečný potenciál 1.5 V, potenciálový krok 5 mV; DPV: počáteční potenciál 0 V, konečný potenciál 1.5 V, potenciálový krok 5 mV; SWV: počáteční potenciál 0 V, konečný potenciál 1.5 V, frekvence 240 Hz.

Elektrochemická analýza v průtočném systému

Průtočný systém byl složen z chromatografické pumpy (Model 583 ESA Inc., Chelmsford, MA, USA), Guard cely (Model 5020 ESA, USA), reakční smyčky (1 m) pro průtokovou injekční analýzu (FIA) a elektrochemického detektoru. Detektor je složen z průtočné amperometrické analytické cely (Model 5040, ESA, USA) obsahující referentní (hydrogen-paládiová), pomocnou uhlíkovou a pracovní elektrodu ze skelného uhlíku a kontrolního modulu Coulochem III, který slouží k ovládní detektoru. Vzorek (5 µl) byl injektován manuálně. Data z detektoru byla zpracována pomocí software CSW 32.

Elektrochemické stanovení ve stacionárním systému

Stacionární elektrochemické stanovení kapsaicinu bylo provedeno pomocí přístroje AUTOLAB analyzátor (EcoChemie, Nizozemí) ve spojení s VA-Stand 663 (Metrohm, Švýcarsko) v klasickém tříelektrodovém uspořádání. Pracovní elektrodou byla uhlíková pastová elektroda. Referentní elektroda byla Ag/AgCl/3M KCl a pomocná elektroda byla

uhlíková tyčinka. Základním elektrolytem byl acetátový pufr 0.1 M CH_3COOH + 0.1 M CH_3COONa , pH 4.0. Parametry CV byly následující: iniciační potenciál -0.5 V, potenciál prvního bodu obratu 1.2 V, potenciál druhého bodu obratu -0.5 V, teplota 20°C.

Denaturační experimenty

Teplotní působení: 1 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ laktoferinu v Britton-Robinson pufru byl umístěn na thermomixer Eppendor za konstatní teploty 65 °C a míchání 400 rpm. Po 30 minutách byl odebírán vzorek FIA analýzu.

Působení methanolu: 1 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ laktoferinu byl navážen (váhy Sartorius) přímo do mikrozkušavky a přidán 1 ml methanolu (99.8%, Sigma Aldrich, HPLC čistota) a umístěn na Vortex (Genie, USA) za konstantního míchání 400 rpm. Po 30 minutách byl odebírán vzorek FIA analýzu.

Působení močoviny: 1 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ laktoferinu byl přidán do 6 M močoviny a umístěna na thermomixer Eppendor za konstatní teploty 65 °C a míchání 400 rpm. Po 30 minutách byl odebírán vzorek FIA analýzu.

VÝSLEDKY A DISKUZE

Elektrochemické chování laktoferinu na uhlíkové pastové elektrodě

Proto, abychom mohli posoudit vhodnost elektrochemické detekce pro analýzu laktoferinu a případně jeho konformačních změn byla provedena jednoduchá studie ve stacionárním elektrochemickém uspořádání. Pro tento náš účel jsme využili tříelektrodového zapojení (uhlíková pastová elektroda (CPE) jako pracovní, uhlíková tyčinka jako pomocná a Ag/AgCl 3M KCl jako referentní). Základní elektrochemické chování laktoferinu (1 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) na CPE v acetátovém pufru (pH 5.0) bylo provedeno pomocí tří rozdílných voltametrických elektrochemických technik (cyklické, diferenční pulzní a square wave voltametrie). Na elektrochemických záznamech byly pozorovány oxidační signály laktoferinu kolem potenciálu 0.8 až 0.85 V v závislosti na použité voltametrické technice. Všechny signály laktoferinu byly dobře rozlišitelné a detekovatelné.

Elektrochemické chování laktoferinu na elektrodě ze skelného uhlíku v průtokovém uspořádání

Na základě získaných experimentálních výsledků bylo provedeno studium chování laktoferinu v průtokové systému. Pomocí Coulochem III bylo studováno chování laktoferinu na glassy carbon electrode jako pracovní elektrodě. Při prvních experimentech byly testovány rozdílné elektrolyty (acetátový, fosfátový a Britton Robinson) při aplikovaném potenciálu 700 mV a průtoku mobilní fáze 0.5 ml/min. Z experimentálních výsledků jsme zjistili, že asi o 20-30% vyšší odezva byla pozorována v acetátovém pufru v porovnání s pufrem fosfátovým. Nejvyšší elektrochemickou odezvu laktoferinu bylo možné zjistit pokud byl použit Britton-

Robinson pufr. Z tohoto důvodu byly další experimenty provedeny v základním elektrolytu (mobilní fázi) složeném z Britton-Robinson pufru. Z našich předešlých prací je známo, že kromě složení základního elektrolytu ovlivňuje výšku pozorovaného signálu také pH. Testovali jsme vliv pH Britton-Robinson pufru na výšku signálu laktoferinu v rozsahu 3.5 až 6.5. Maximální výška signálu laktoferinu byla pozorována v rozmezí pH 4-5 u univerzálního Britton Robinson pufru. Dále vzrůstající hodnota pH vedla k poměrně rychlému poklesu signálu laktoferinu. Aby bylo možné analyzovat laktoferin aperometrickým způsobem detekce bylo potřebné ověřit nejvhodnější detekční potenciál. Z výsledků získaných pomocí voltametrie bylo očekáváno maximum kolem potenciálu 800 mV. V experimentech byly sledovány změny signálu laktoferinu při aplikovaném potenciálu 400 až 900 mV. Pozorovaný elektrochemický signál laktoferinu s narůstajícím aplikovaným potenciálem postupně vzrůstal. Nejprve poměrně strmě asi do aplikovaného potenciálu mezi 500-600 mV. Od 600 mV signál vzrůstal pozvolněji a pro maximální odezvu byl nejvhodnější aplikovaný potenciál okolo 900 mV. Proto byl pro další analýzu vybrán jako vhodný potenciál 900 mV, kdy se variabilita stanovení pohybovala kolem 3-5%. Rozdíl mezi potenciálem píku laktoferinu zjištěným na CPE na AUTOLAB a na GC na CoulochemIII je pravděpodobně způsoben a) rozdílnou pracovní elektrodou a b) rozdílnými referenčními elektrodami (Ag/AgCl 3M KCl proti hydrogenpaládiové elektrodě). Při takto nastavených experimentálních podmínkách byla sledována odpověď laktoferinu na jeho koncentraci. Byla sestrojena kalibrační křivka, která byla v rozsahu 0 – 60 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ lineární ($y = 0.4689x + 1.0096$; $R^2 = 0.9939$).

Vliv teploty na signál laktoferinu

V experimentech byl sledován vliv teploty mobilní fáze a okolí elektrochemického detektoru na elektrochemické stanovení laktoferinu. V doposud předběžném experimentu bylo zjištěno, že s klesající teplotou mobilní fáze a detektoru se signál laktoferinu snižuje asi o 4 μA na 5°C. Bylo však také pozorováno, že v případě nízké teploty mobilní fáze dochází k menší vazbě proteinu na povrch kapilár či filtrů začleněných do přístroje.

Rozlišení nativní a denaturované formy laktoferinu

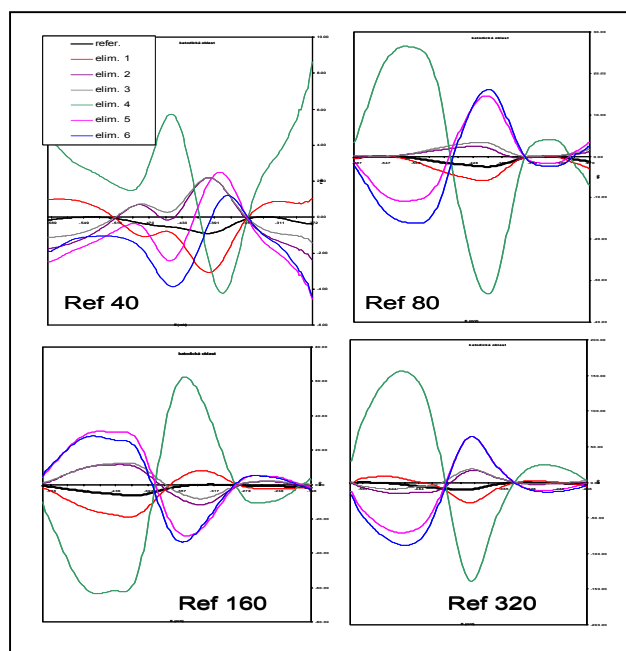
V dalších experimentech byla sledována změna signálu laktoferinu (1 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) v přítomnosti různých fyzikálních nebo chemických činitelů vedoucích ke změně struktury za využití průtokové injekční analýzy. Byla sledována dynamika změny po dobu 3 hodin. Změna signálu nativního laktoferinu během sledovaného období nabyla pozorovatelná (změny výšky píků byly v rámci chyby analýzy a kolísaly kolem 5-6 %). V případě, že byl laktoferin vystaven působení tepla (65 °C) byl nejdříve pozorovatelný pozvolný nárůst signálu asi do 2 h působení, po té signál laktoferinu začal velmi strmě narůstat. Lze tedy předpokládat, že po 2 h dochází k výrazné změně struktury laktoferinu. V případě běžně používaného denaturačního činidla (6 M močoviny při 37 °C) byl pozorován prakticky lineární nárůst signálu laktoferinu. To ukazuje na postupné rozvolnění poměrně složité struktury tohoto proteinu. V přítomnosti methanolu docházelo nejdříve k nárůstu signálu asi do 1 h působení, po té se již signál

laktoferinu měnil velmi zvolna. Navíc však docházelo k srážení proteinu a tím byla také ovlivněna jeho koncentrace přímo v roztoku.

Využití eliminační voltametrie pro studium laktoferinu

Kromě běžných elektrochemických technik bylo pro studium laktoferinu využito eliminační voltametrie.

Obr. 2 Změny signálu laktoferinu sledované pomocí eliminační voltametrie s lineárním skenem. Pracovní elektroda: HMDE a potenciostat/galvanostat AUTOLAB30. Referenční rychlosti polarizace 40, 80, 160 a 320 mV/s, acetátový pufr pH 5.0, počátek analýzy -0.2V a konec -0.7 V.



Tato elektrochemická metoda přináší poznatky o elektrodových dějích probíhajících na povrchu pracovní elektrody [23,26-31]. Ze získaných výsledků je velmi dobře patrný doposud velmi obtížně vysvětlitelný průběh elektrodové reakce laktoferinu na povrchu jak rtuťové, tak uhlíkové pracovní elektrody (Obr.2). Navíc bylo vyzkoušeno stanovení laktoferinu na miniaturizovaných tištěných elektrodách v kombinaci s eliminační voltametrií.

ZÁVĚR

Rozlišení nativní a denaturované formy proteinů je stále velmi obtížné. Jak bylo ukázáno, elektrochemická analýza umožňuje poměrně velmi jednoduché a rychlé rozlišení změny struktury proteinu. Tato změna nejpravděpodobněji zpřístupní aminokyselinové zbytky, které mohou interagovat s povrchem detekční elektrody. Navíc spojení elektrochemické detekce a injekční analýzy přináší další možnosti pro běžnou analýzu.

LITERATURA

- [1] P. Hodbod and L. Zeman Changes in milk composition of sows during 28 days of lactation, *Czech Journal of Animal Science* 46 (2001) 509-513.
- [2] S. Kracmar, S. Gajdusek, P. Jelinek, L. Zeman, V. Kozel, M. Kozlova and E. Kracmarova Changes in amino acid composition of goat's colostrum during the first 72 hours after birth, *Czech Journal of Animal Science* 44 (1999) 541-545.
- [3] S. Kracmar, S. Gajdusek, J. Kuchtik, L. Zeman, F. Horak, G. Doupovcova, R. Matejkova and E. Kracmarova Changes in amino acid composition of ewe's milk during the first month of lactation, *Czech Journal of Animal Science* 43 (1998) 369-374.
- [4] S. Kracmar, S. Gajdusek, J. Kuchtik, L. Zeman, F. Horak, G. Doupovcova and E. Kracmarova Changes in amino acid composition of goat's milk during the first month of lactation, *Czech Journal of Animal Science* 43 (1998) 251-255.
- [5] L. Sanchez, M. Calvo and J.H. Brock Biological Role of Lactoferrin, *Archives of Disease in Childhood* 67 (1992) 657-661.
- [6] A. Bezkorovainy Human milk and colostrum proteins - review, *Journal of Dairy Science* 60 (1977) 1977.
- [7] P.F. Levay and M. Viljoen Lactoferrin - a General-Review, *Haematologica* 80 (1995) 252-267.
- [8] Y.A. Suzuki, V. Lopez and B. Lonnerdal Mammalian lactoferrin receptors: structure and function, *Cellular and Molecular Life Sciences* 62 (2005) 2560-2575.
- [9] L.H. Vorland Lactoferrin: A multifunctional glycoprotein, *Apmis* 107 (1999) 971-981.
- [10] J.M. Steijns and A.C.M. van Hooijdonk Occurrence, structure, biochemical properties and technological characteristics of lactoferrin, *British Journal of Nutrition* 84 (2000) S11-S17.
- [11] V. Bernal and P. Jelen Thermal-Stability of Whey Proteins - a Calorimetric Study, *Journal of Dairy Science* 68 (1985) 2847-2852.
- [12] B.W.A. van der Strate, L. Beljaars, G. Molema, M.C. Harmsen and D.K.F. Meijer Antiviral activities of lactoferrin, *Antiviral Research* 52 (2001) 225-239.
- [13] D. Legrand, E. Ellass, M. Carpentier and J. Mazurier Lactoferrin: a modulator of immune and inflammatory responses, *Cellular and Molecular Life Sciences* 62 (2005) 2549-2559.
- [14] Y. Pan, J. Wan, H. Roginski, A. Lee, B. Shiell, W.P. Michalski and J. Coventry Effect of chemical modification on anti-microbial and anti-viral properties of milk proteins, *Australian Journal of Dairy Technology* 60 (2005) 149-151.
- [15] P.P. Ward, E. Paz and O.M. Conneely Multifunctional roles of lactoferrin: a critical overview, *Cellular and Molecular Life Sciences* 62 (2005) 2540-2548.

- [16] E. Palecek, M. Masarik, R. Kizek, D. Kuhlmeier, J. Hassmann and J. Schulein Sensitive electrochemical determination of unlabeled MutS protein and detection of point mutations in DNA, *Analytical Chemistry* 76 (2004) 5930-5936.
- [17] M. Masarik, A. Stobiecka, R. Kizek, F. Jelen, Z. Pechan, W. Hoyer, T.M. Jovin, V. Subramaniam and E. Palecek Sensitive electrochemical detection of native and aggregated alpha-synuclein protein involved in Parkinson's disease, *Electroanalysis* 16 (2004) 1172-1181.
- [18] R. Kizek, J. Vacek, L. Trnkova, B. Klejduš and L. Havel Application of catalytic reactions on a mercury electrode for electrochemical detection of metallothioneins, *Chemické Listy* 98 (2004) 166-173.
- [19] M. Masarik, R. Kizek, K.J. Kramer, S. Billova, M. Brazdova, J. Vacek, M. Bailey, F. Jelen and J.A. Howard Application of avidin-biotin technology and adsorptive transfer stripping square-wave voltammetry for detection of DNA hybridization and avidin in transgenic avidin maize, *Analytical Chemistry* 75 (2003) 2663-2669.
- [20] S. Billova, R. Kizek and E. Palecek Differential pulse adsorptive stripping voltammetry of osmium-modified peptides, *Bioelectrochemistry* 56 (2002) 63-66.
- [21] R. Kizek, L. Trnkova, S. Sevcikova, J. Smarda and F. Jelen Silver electrode as a sensor for determination of zinc in cell cultivation medium, *Analytical Biochemistry* 301 (2002) 8-13.
- [22] R. Kizek, L. Trnkova and E. Palecek Determination of metallothionein at the femtomole level by constant current stripping chronopotentiometry, *Analytical Chemistry* 73 (2001) 4801-4807.
- [23] L. Trnkova, F. Jelen, J. Petrlova, V. Adam, D. Potesil and R. Kizek Elimination voltammetry with linear scan as a new detection method for DNA sensors, *Sensors* 5 (2005) 448-464.
- [24] J. Vacek, Z. Andrysik, L. Trnkova and R. Kizek Determination of azidothymidine - an antiproliferative and virostatic drug by square-wave voltammetry, *Electroanalysis* 16 (2004) 224-230.
- [25] S. Billova, R. Kizek, F. Jelen and P. Novotna Square-wave voltammetric determination of cefoperazone in a bacterial culture, pharmaceutical drug, milk, and urine, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 377 (2003) 362-369.
- [26] R. Rozik and L. Trnkova Cadmium reduction process on paraffin impregnated graphite electrode studied by elimination voltammetry with linear scan, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 593 (2006) 247-257.
- [27] R. Orinakova, L. Trnkova, M. Galova and M. Supicova Application of elimination voltammetry in the study of electroplating processes on the graphite electrode, *Electrochimica Acta* 49 (2004) 3587-3594.

- [28] L. Trnkova, R. Kizek and J. Vacek Square wave and elimination voltammetric analysis of azidothymidine in the presence of oligonucleotides and chromosomal DNA, *Bioelectrochemistry* 63 (2004) 31-36.
- [29] L. Trnkova Electrochemical elimination methods, *Chemicke Listy* 95 (2001) 518-527.
- [30] L. Trnkova, R. Kizek and O. Dracka Application of elimination voltammetry to adsorptive stripping of DNA, *Electroanalysis* 12 (2000) 905-911.
- [31] L. Trnkova and O. Dracka Elimination voltammetry. Experimental verification and extension of theoretical results, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 413 (1996) 123-129.

Poděkování: Práce na tomto projektu byla podporována granty: Radanal 1/2006, LPR 2006 a 1M06030.