

# Analiza funkcije i strukture proteina ceruloplazmina

---

Poljanić, Leon

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:192348>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-28**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
Kemijski odsjek

Leon Poljanić

Student 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

# **ANALIZA FUNKCIJE I STRUKTURE PROTEINA CERULOPLAZMINA**

**Završni rad**

Rad je izrađen u Zavodu za opću i anorgansku kemiju

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Ivica Đilović

Zagreb, 2020.

Datum predaje prve verzije Završnog rada:

4. svibnja 2020.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

30. rujna 2020.

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Ivica Đilović

Potpis:



# Sadržaj

<b>§ SAŽETAK.....</b>	<b>VI</b>
<b>§ 1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME .....</b>	<b>2</b>
<b>2.1. Evolucijski značaj kuproproteina.....</b>	<b>2</b>
2.1.1. Pojava i inkorporacija bakrovih iona u feroproteine .....	2
2.1.2. Evolucijska pojava ceruloplazmina .....	4
<b>2.2. Klasifikacija bakrovih centara u višebakrenim oksidazama .....</b>	<b>5</b>
2.2.1. Koordinacijski aspekti metala.....	5
2.2.2. Koordinacijski aspekti liganada .....	6
2.2.3. Kuproproteini tipa I.....	7
2.2.4. Ostali tipovi kuproproteina.....	10
<b>2.3. Strukturna analiza ceruloplazmina.....</b>	<b>13</b>
2.3.1. Određivanje aminokiselinskog slijeda ceruloplazmina.....	13
2.3.2. Određivanje kristalne strukture ceruloplazmina.....	15
2.3.3. Mehanizam redukcije kisika na trinuklearnom klusteru .....	16
2.3.4. Mononuklearni centri i njihova elektron-transferna uloga.....	19
<b>2.4. Sinteza ceruloplazmina in vivo .....</b>	<b>22</b>
2.4.1. Unos bakra u jetru .....	22
2.4.2. Inkorporacija bakrovih iona u ceruloplazmin .....	23
<b>2.5. Analiza funkcijâ ceruloplazmina.....</b>	<b>25</b>
2.5.1. Feroksidazna aktivnost ceruloplazmina.....	25
2.5.2. Aceruloplazminemija: simptomi, posljedice, liječenje.....	28
2.5.3. Oksidacija (a)biogenih amina.....	29
2.5.4. Ceruloplazmin kao transporter bakrovih iona.....	30
2.5.5. Antioksidansna uloga ceruloplazmina .....	31
2.5.6. Ceruloplazmin – što sve može raditi? .....	32
<b>§ 3. LITERATURNI IZVORI.....</b>	<b>XXXIV</b>



## § Sažetak

Ovaj završni rad problematizira strukturnu i funkcionalnu karakterizaciju proteina ceruloplazmina te njihov međuodnos. Napravljen je pregled obitelji proteina višebakrenih oksidaza, a zatim i ceruloplazmina, člana te obitelji proteina. Opisan je proces *in vivo* sinteze ceruloplazmina u hepatocitima te nekoliko dugo proučavanih funkcija proteina.

## § 1. UVOD

Ceruloplazmin (EC 1.16.3.1.) plavi\* je  $\alpha$ -2-glikoprotein prisutan u kralježnjacima. Prvi puta opisan 1948. od strane Holmberga i Laurella, postao je predmet istraživanja znanstvene zajednice u nadolazećim desetljećima. Protein je svrstan u obitelj oksidoreduktaza, specifičnije feroksidaza. Zajedno s lakazom i askorbat-oksidadom čini skupinu višebakrenih oksidaza, često nazivanim i „plavim proteinima“ zbog svoje karakteristične plave boje otopine. Svim proteinima ove obitelji pridružena su barem četiri bakrova iona, podijeljenih u trinuklearni kluster i mononuklearni centar. Uz najopširnije opisanu feroksidaznu funkciju, kroz godine istraživanja ceruloplazminu su pripisivane brojne druge funkcije poput oksidacije biogenih aromatskih amina, kontrole metabolizma i transporta željezovih i bakrovih iona u organizmu, antioksidanske aktivnosti, sudjelovanja u imunološkoj reakciji organizma na upale i infekcije, superoksid-dismutazne aktivnosti te mnogih drugih. Time je ceruloplazmin svrstan u skupinu proteina s višestrukim funkcijama.

Smještanje proteina u tu skupinu otvara niz pitanja. Mehanizmi reakcija, međuproteinska komunikacija, regulacija ceruloplazmina i poremećaji u istoj, samo su neke od tema koje su postale predmet istraživanja u posljednjih 50 godina. Svrha je ovog rada napraviti pregled odgovora na ova, ali i neka druga pitanja te pokazati na još jednom primjeru ispreplitanje strukturnih karakteristika s funkcijama proteina. Spomenut će se i pitanja o još neistraženim i mogućim funkcijama ovog proteina.

---

\* Atribut „plavi“ dolazi od karakteristične plave boje otopine koja je prisutna samo kod ceruloplazmina, dok ostali predstavnici višebakrenih oksidaza stvaraju bezbojne otopine.



## § 2. PRIKAZ ODABRANE TEME

### 2.1. Evolucijski značaj kuproproteina

#### 2.1.1. Pojava i inkorporacija bakrovih iona u feroproteine

Teorije nastanka života na Zemlji bavile su se problemima sinteze organskih molekula i prekursora za sintezu molekula koje danas nazivamo biološke makromolekule (ugljikohidrati, proteini, nukleinske kiseline). Međutim, kako se teorije razvijaju u obzir se počinju uzimati i druge tvari u okolišu, poput metala i njihove uloge u evoluciji života na Zemlji.

Za vrijeme abiogeneze, evolucije živih organizama iz anorganskih tvari, bakar nije bio dostupan. Zemljini su oceani tada bili bogati molekulama sumporovodika,  $H_2S$ , čiji je stupanj disocijacije u vodi, iako malen, bio dovoljan za vezanje prisutnih bakrovih iona u netopljive sulfide. U tablici 1 vidljivo je da se malen broj metalnih iona mogao iskoristiti za razvoj života prilikom stvaranja metaloproteina. Prvi su enzimi najvjerojatnije iskoristili tada najdostupnije manganove i željezove ione. Upravo iskorištavanje  $Mn(II)$  iona u proteinima omogućilo je fotosintetskim cijanobakterijama masovnu produkciju kisika prije 2,7 milijarda godina.

Tablica 1. Produkti topljivosti biološki važnih sulfida i hidroksida pri 25 °C.

Tvar	Formula	Produkt topljivosti (brojčane vrijednosti)
manganov(II) sulfid	$MnS$	$3 \cdot 10^{-15}$
željezov(II) sulfid	$FeS$	$6 \cdot 10^{-16}$
kobaltov(II) sulfid	$CoS$	$8 \cdot 10^{-23}$
bakrov(II) sulfid	$CuS$	$6 \cdot 10^{-36}$
bakrov(I) sulfid	$Cu_2S$	$2 \cdot 10^{-47}$
cinkov(II) sulfid	$ZnS$	$4,5 \cdot 10^{-24}$
željezov(II) hidroksid	$Fe(OH)_2$	$3 \cdot 10^{-15}$
željezov(III) hidroksid	$Fe(OH)_3$	$4 \cdot 10^{-38}$

Vjeruje se kako je u prvih 200-300 milijuna godina kisik dobiven aktivnošću cijanobakterija korišten za oksidaciju Fe(II) u Fe(III), što je za direktnu posljedicu imalo njegovo taloženje u obliku hidroksida (tablica 1). Kako je kisik dalje nastajao radom fotosintetskih cijanobakterija, došlo je do stratifikacije oceana na kisikom bogatiji i kisikom siromašniji pojas. Kisikom siromašniji pojas bio je bogatiji sulfidima, ne samo zahvaljujući djelovanju cijanobakterija, već i djelovanjem sumpornih bakterija. Povećani udio sulfida potaknuo je vezanje oceanskog željeza u pirit ( $\text{FeS}_2$ ). Taj proces, zajedno s taloženjem željeza u obliku hidroksida, rezultira masovnim gubitkom dostupnog otopljenog željeza. Paralelno s time, bakarove(II) vrste se reduciraju u mnogo topljivije bakrove(I) vrste.<sup>1</sup>

Masovna proizvodnja kisika, taloženje željeza i oslobađanje bakra tri su procesa koji su zajednički promijenili kemiju ranog života na Zemlji. Proteini koji su za svoju funkcionalnost zahtijevali željezove ione razvili su mehanizme njihova uklapanja u svoju strukturu, no smanjenjem dostupnosti željeza, pojavila se potreba za pronalaskom odgovarajuće zamjene ili novog mehanizma integriranja. Prve takve prilagodbe vidljive su kod feritina (protein koji skladišti Fe(III) ione), čime prestaje biti ovisan o konstantnoj dostupnosti iona iz okoline. Drugi način očuvanja dosadašnjih mehanizama temeljio se na pojačanoj proizvodnji spojeva koji se ponašaju kao kelatni agensi za željezove ione te organskih kiselina čija je uloga bila povećanje topljivosti i/ili kompleksiranje metala. Ovakvi uvjeti pogodovali su evoluciji prvih kuproproteina. Prisustvo kisika promijenilo je kemiju okoliša, pomakom gornje granice redukcijskog potencijala od 0,0 V na 0,8 V, čime se omogućila oksidacija i razgradnja niza organskih i staničnih komponenti vitalnih za život. Otopljeni bakar isprva se pokazuje kao toksičnim elementom, budući da se zamjena s esencijalnim metalnim kofaktorima poput željeza ili cinka povezuje sa sintezom reaktivnih kisikovih vrsta koje djeluju razarajuće na proteine, lipide i nukleinske kiseline. Međutim, evolucijski, priroda se prilagođava na sveprisutnost bakra što se najbolje vidi u redukcijskim potencijalima proteina (tablica 2). Ovakvo saznanje upućuje i na činjenicu da je jako malen broj anaerobnih organizama uspješno iskoristilo bakrove ione.

Dodatna potvrda ove teorije nalazi se u filogenetskim istraživanjima struktura proteina, koji tvrde da su tercijarne strukture proteina koji koriste željezove, manganove i molibdenove ione evoluirali prije globalne ekspanzije proizvodnje kisika, dok su se strukture za bakrove i cinkove ione razvile kasnije.<sup>2</sup> Kako je postotak veznih mjesta za metalni ion u

proteasomu ostao jednak u obje strukture, ovakvo saznanje potiče ideju zamjene jednog iona drugim.

Tablica 2. Redukcijski potencijali nekih kuproproteina i feroproteina pri pH = 7,0 relativno prema standardnoj vodikovoj elektrodi.

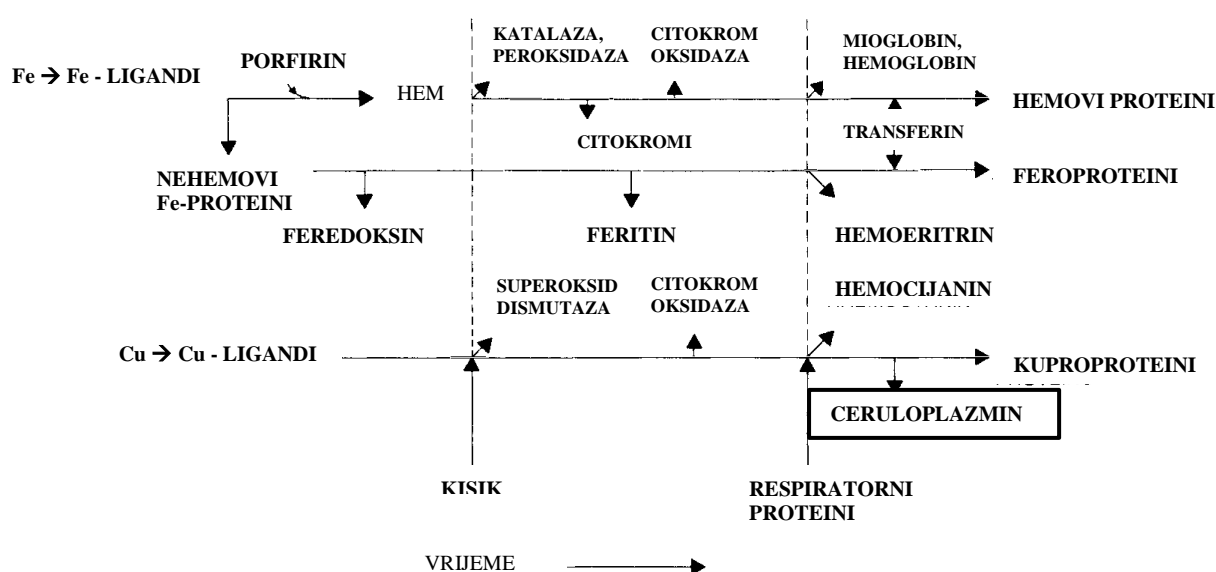
tip proteina	protein	$E^\circ / V$
kuproprotein	lakaza	0,34 – 0,78
	hemocijanin, ceruloplazmin	0,54
	Cu/Zn superoksid dismutaza	0,40
	plastocijanin	0,37
kisik-ovisan feroprotein	citokrom c oksidaza	0,24
	hemoglobin	0,14
kisik-neovisan feroprotein	feredoksin	-0,39 – (+0,42)
	transferin	-0,50

### 2.1.2. Evolucijska pojava ceruloplazmina

Ceruloplazmin predstavlja završnu točku paralelnog razvoja biokemije željeza i bakra tijekom evolucije aerobnih organizama kroz posljednje tri milijarde godina. Zanimljivo je kako bakar i željezo nisu dominirali samo posljednjim tisućljećima ljudske civilizacije, već njihova upotreba seže puno dublje u prošlost. Frieden<sup>3</sup> ističe nekolicinu bliskih svojstava koje imaju bakar i željezo inkorporirani u aerobnim organizmima. Vremenska lenta koja pokazuje sličnost evolucije kuproproteina i feroproteina nalazi se na slici 1. Ključan je događaj bila pojava kisika, koja je omogućila stvaranje nekolicine oksidaza koje su funkcionalno jednake, dok se strukturno razlikuju samo u metalnom centru (npr. citokrom-oksidaža). Daljnjom evolucijom dolazimo do stvaranja skupine proteina čija je funkcionalnost vrlo slična (transport kisika), dok je ponovno jedina razlika u strukturi tj. u metalnom centru koji se u proteinu nalazi. Ovaj prikaz može poslužiti kao odličan primjer konvergentne evolucije, gdje je priroda našla dva strukturno različita rješenja za isti problem, najprije upotreba kisika u proteinskoj aktivnosti, a zatim i njegov prijenos između stanica.

Primjer takve sličnosti je svakako enzimska zaštita od reaktivnih kisikovih vrsta (superoksidni anion, vodikov peroksid, singletni kisik) što rezultira nastankom (Cu,Zn)-superoksidne dismutaze, ali i enzima koji sadrže hem, poput katalaze i peroksidaze. Uspješna

upotreba bakra i željeza omogućuje razvoj kompleksnijih proteina specifičnijih funkcija, poput citokrom *c* oksidaze i drugih elektron-trasfernih proteina te proteina koji prenose kisik, poput hemoglobina, hemocijanina i hemoeritrina. Ovakva adaptacija zahtijeva od proteina da mogu skladištiti i prenositi bakrove i željezove ione, što rezultira pojavom transferina, feritina, a naposljetku i ceruloplazmina. Upravo ceruloplazmin postaje najbolji primjer međudjelovanja željezovih i bakrovih iona u proteinima kralježnjaka budući da mu je jedna od osnovnih funkcija feroksidazna, odnosno oksidacija iz Fe(II) u Fe(III) te transport takvog iona do transferina za daljnju distribuciju željezovih iona.<sup>4</sup>



Slika 1. Evolucija kuproproteina i feroproteina u životinjskim stanicama. Ilustracija je preuzeta i prilagođena iz ref. 4.

## 2.2. Klasifikacija bakrovih centara u višebakrenim oksidazama

### 2.2.1. Koordinacijski aspekti metala

Prema HSAB (eng. *Hard and Soft Acids and Bases*) teoriji, Cu(I) definira se kao slaba kiselina, dok je Cu(II) granično jaka kiselina. Slabe kiseline karakterizira veliki radijus iona, mali naboj i velika polarizabilnost. Budući da se prema HSAB teoriji energetske povoljnijim interakcijama međusobno povezuju slabi parovi i jaki parovi, očekuje se da se sa slabom kiselinom ili granično jakim kiselinom povezuju slabe baze ili granično jake baze. Uzmemo li u obzir da ligandi koji sudjeluju u vezanju bakrovih iona mogu biti bočni ogranci

aminokiselina iz proteina ili molekule otapala, najčešće u obzir dolaze atomi dušika iz imidazolnog prstena histidina te atom sumpora iz cisteina i metionina. Manje je vjerojatno povezivanje s atomima kisika iz hidroksilnih ili karboksilnih skupina ili atomima dušika iz amino-skupine (koja sudjeluje u peptidnoj vezi).<sup>5</sup>

Ukoliko se u raspravu uključi i teorija ligandnog polja, LFT (eng. *Ligand Field Theory*), čija je osnovna značajka da upravo broj elektrona smještenih u *d*-orbitalama govori o geometrijskog preferenciji koordinacije metala, dobiva se saznanje da će geometrije Cu(I) kompleksa biti različite u odnosu na geometrije Cu(II) kompleksa. Cu(I) je metalni centar  $[Ar]d^{10}$  sustava, što znači da stabilizacijska energija ligandnog polja kod njega ne rezultira pokazivanjem geometrijskih preferencija. Takav sustav najčešće je prisutan u okruženju dvaju do četiriju liganda u linearnoj, planarnoj-trigonskoj ili tetraedarskoj geometriji. Međutim, Cu(II) je  $[Ar]d^9$  sustav što mijenja njegovu stabilizacijsku energiju ligandnog polja tako da energija utječe na preferiranu geometriju kompleksa. Cu(II) centri tako su najčešće, kao i ostali članovi  $[Ar]d^9$  sustava, koordinirani s četiri do šest liganada u tetraedarskoj, kvadratno-piramidalnoj ili oktaedarskoj geometriji. Oktaedarska geometrija nerijetko je karakterizirana distorzijom koja se opisuje kao posljedica Jahn-Tellerove deformacije.<sup>6</sup>

### 2.2.2. Koordinacijski aspekti liganada

Ligandi koji su najčešće prisutni u primarnoj koordinacijskog sferi bakra u kuproproteinima jesu bočni organci aminokiselina histidina, cisteina i metionina. Priroda je pronašla zanimljiv način da osigura stvaranje veza bez obzira na vanjske uvjete obzirom na odabir samog liganada:

- Imidazolni prsten bočnog ogranka histidina sadržava dva atoma dušika koji se mogu protonirati, s  $pK_a$  vrijednostima od oko 6 i 14. Gubitak prvog protona daje neutralni imidazol, dok gubitak drugog protona daje negativno nabijeni imidazolatni ion. S obzirom na strukturu imidazolnog prstena, najčešće se ponaša kao premošćujući monodentatni ligand, povezujući tako dva metalna centra, dok se u rijetkim slučajevima može ponašati i didentatno. Ovakva svojstva upućuju na ponašanje jake baze i preferetno vezanje na Cu(II).
- Cisteinski bočni ogranak tiolna je skupina, čija se deprotonacija odvija pri  $pK_a$  vrijednosti od oko 8,5. Deprotoniranjem se dobiva anion koji se ponaša kao Lewisova baza tj. kao elektron donor. Slično kao i imidazolni atomi dušika, tiolni atom sumpora može premostiti dva metalna centra. Posebno svojstvo cisteina je redoksna aktivnost,

tako da je moguća oksidacija tiolnih sumpora pri čemu nastaje cistin u kojem su sumporovi atomi povezani disulfidnom vezom. Ovakva svojstva upućuju na ponašanje slabe baze i preferetno vezanje na Cu(I).

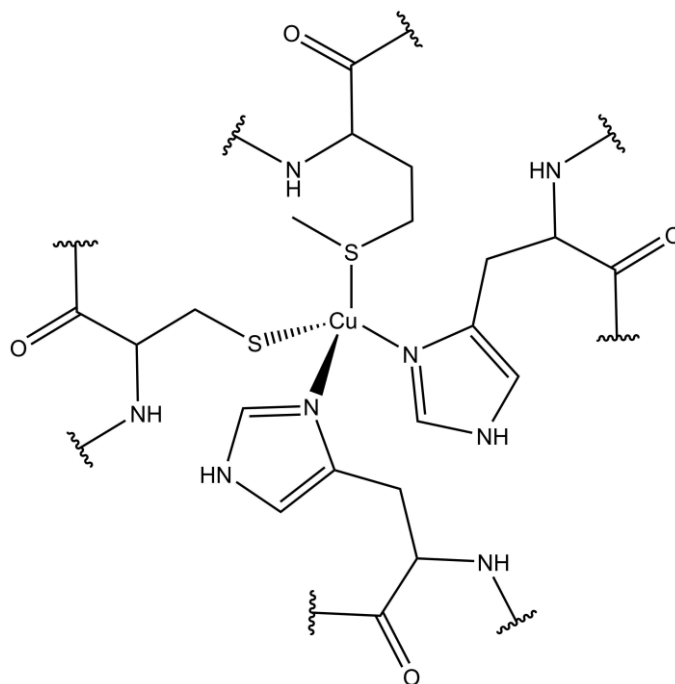
- Metionin nema mogućnost oksidacije, kao što nema niti protonirani bočni ogranak, već je metioninski sumpor vezan eterski. Takva tioeterska skupina daje neutralni sumporov donor koji nije ovisan o pH vrijednosti za razliku od prethodna dva. Uz navedeno, zbog eterskog vezanja, atom sumpora u metioninskom bočnom ogranku manje je polaran zbog čega je cijeli bočni ogranak hidrofobniji. To je svojstvo korisno u samoj stanici obzirom na dostupnost otapala te interakcije proteina s drugim proteinima stanice, staničnom membranom i drugim staničnim tvorevinama.

Utjecaj liganada na redukcijski potencijal bakrovih iona u kuproproteinima ključan je za katalitičko djelovanje. Kod transportnih proteina koji sadrže bakar, taj je aspekt jednako važan, ali iz suprotnih razloga: želi se spriječiti kruženje bakrovih iona u svoja dva oksidacijska stanja. Naime, koordinacijska sfera utječe na redukcijski potencijal bakrovih vrsta, čime utječe na njegovo oksidacijsko stanje, tako da pozitivnija vrijednost potencijala favorizira Cu(I), a negativnija vrijednost Cu(II). U ovom redoks-procesu problematično je granično područje dva stanja bakra, u kojem glutation ili askorbat iz okoline mogu lako poslužiti kao reducensi bakra, nakon čega će se bakar ponovno oksidirati, no ovoga puta uz utrošak molekulskog kisika. Česti produkti takve reakcije su reaktivne kisikove vrste – brojni radikali te vodikov peroksid. Ukoliko koordinacijska sfera favorizira bakar u stanju Cu(I), vezanjem na ligande čije molekule sadrže atome sumpora može se izbjeći potencijalno toksična aktivnost. Kuproproteini su klasificirani u skupine ovisno o geometriji metalnog iona i tipu liganda.

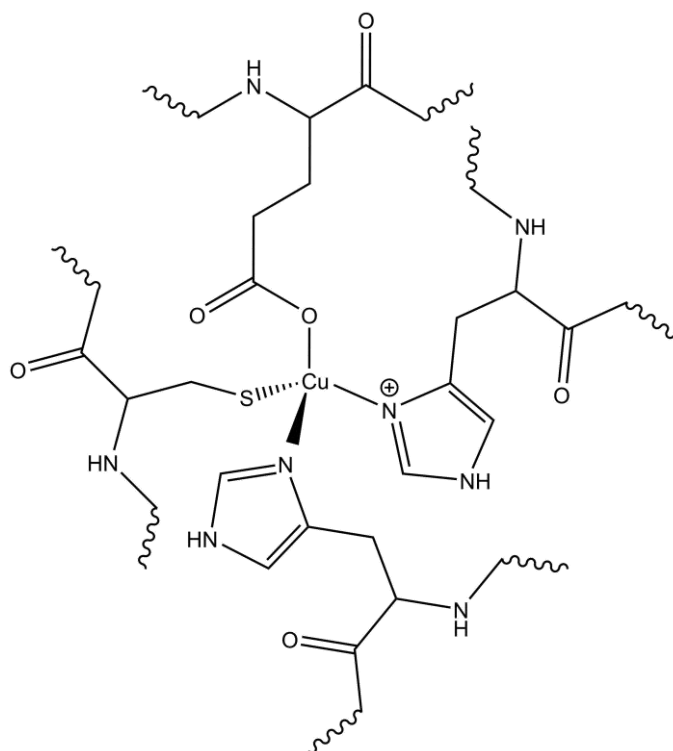
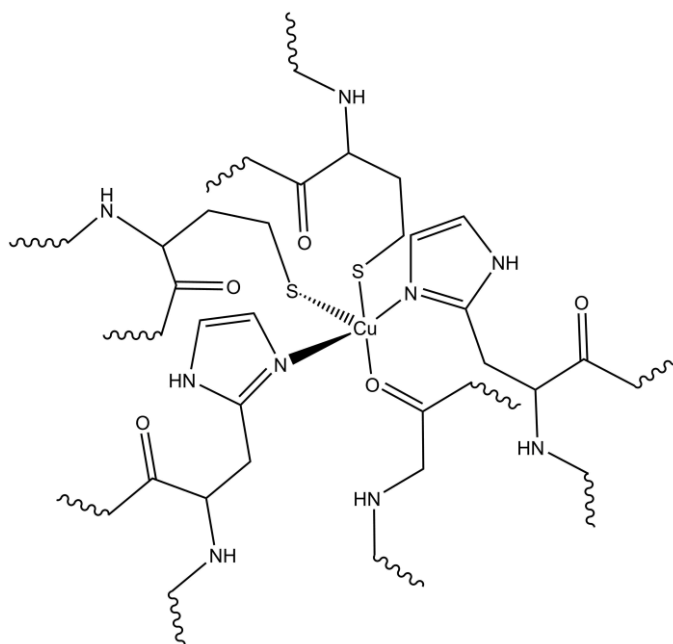
### 2.2.3. Kuproproteini tipa I

Bakrovi proteini tipa I dosad su najkvalitetnije i najpodrobnije istraženi. Radi se o obitelji kupredoksina, proteina čija je osnovna funkcija prijenos elektrona. Zajednička im je karakteristika prisustvo jednog iona bakra koji se u trigonsko-planarnoj geometriji koordiniran dvama atomima dušika iz imidazolnog prstena histidina i jednim atomom sumpora iz cisteina. Aksijalni ligandi se mogu razlikovati, pri čemu se bakrovi proteini tipa I dijele na tri klase.

Klasa I u aksijalnoj poziciji ima atom sumpora iz metionina (slika 2).<sup>7</sup> Klasa II karakterizirana je nemetioninskim aksijalnim ligandom, zbog čega geometrija kompleksa zauzima izgled iskrivljenog tetraedra (slika 3). U trećoj klasi ove skupine proteina, bakrovi ioni su u aksijalnom položaju koordinirani atomima sumpora iz metionina te karbonilnim atomom kisika iz glicina (slika 4).<sup>8</sup> Svi predstavnici ovog tipa proteina karakterizirani su redukcijskim potencijalom od oko 0,25 V te snažnom apsorpcijskom vrpcom u području od oko 600 nm.



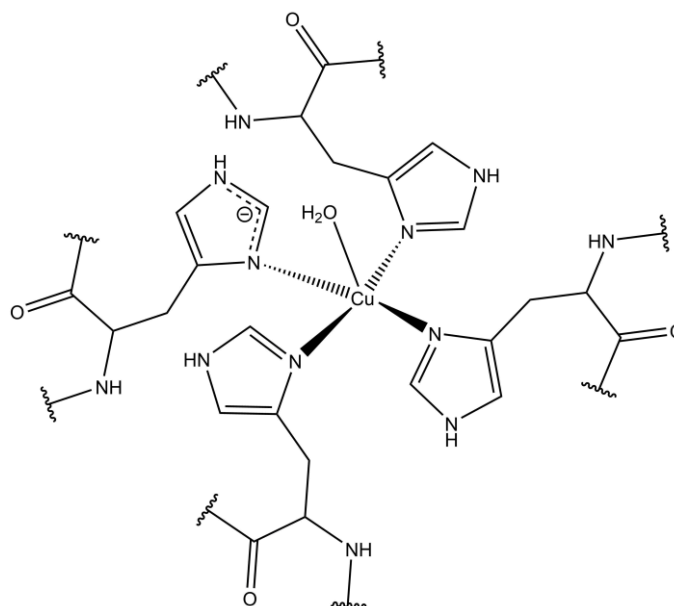
Slika 2. Prva koordinacijska sfera plastocijaninskog bakrovog centra (napravljena je u programu ChemDraw Professional, 18.2.0.48).<sup>1</sup>

Slika 3. Prva koordinacijska sfera umecijaninskog bakrovog centra (klasa II).<sup>1</sup>Slika 4. Prva koordinacijska sfera azurinskog bakrovog centra (klasa III).<sup>1</sup>



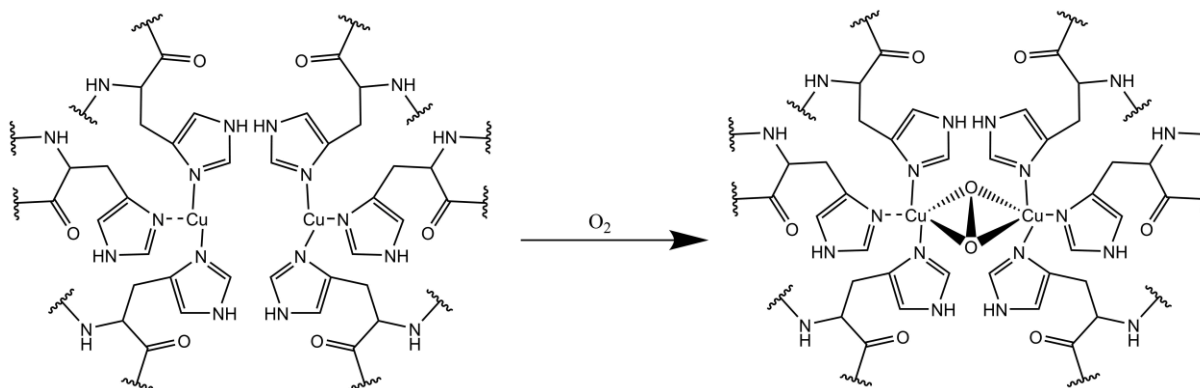
#### 2.2.4. Ostali tipovi kuproproteina

Kuproproteini tipa II su oksidoreduktaze. Metalni centar najčešće je koordiniran atomima dušika iz bočnih ogranaka histidina, ali nerijetko su prisutni i kisikom bogati ligandi. Najpoznatiji predstavnik je (Cu,Zn) superoksidna dismutaza (slika 5). Osnovna uloga proteina je pretvorba superoksidnih radikala manje toksičan vodikov peroksid.<sup>9</sup> Za taj protein, kao i čitavu skupinu, karakterističan aksijalni ligand je molekula vode.



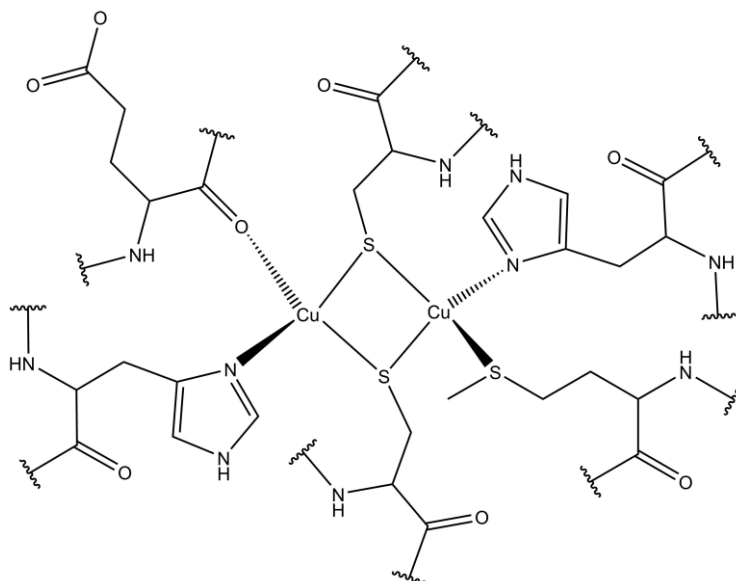
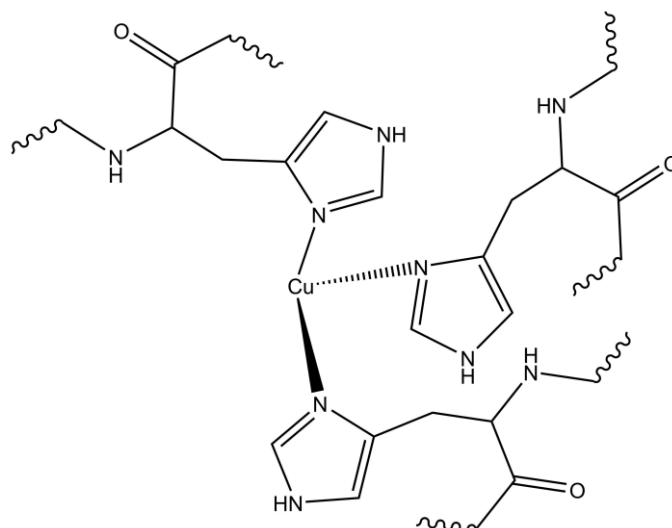
Slika 5. Prva koordinacijska sfera Cu/Zn SOD bakrovog centra.<sup>1</sup>

U aktivnim mjestima proteini tipa III su binuklearni centri. Svaki je metalni centar koordiniran s tri atoma dušika iz bočnih ogranaka histidina. U odsutstvu molekuskog kisika, svaki metalni centar koordiniran je atomima dušika u trigonsko-planarnoj geometriji, no u njegovom prisustvu do izražaja dolazi i primarna oksidazna uloga gdje se molekula kisika ponaša premošćujuće između dva bakrova centra koji se približavaju i koordiniraju se u distorziranu trigonsku bipiramidu. Primjer takvog proteina je hemocijanin (slici 6), a koji je analogan hemoglobinu, ali se radi o proteinu koji prenosi kisik u hemolimfi, tjelesnoj tekućini karakterističnoj za člankonošce poput rakova, mekušaca i klijestara.<sup>10</sup> Prilikom vezanja molekule kisika dolazi do promjene oksidacijskog stanja bakrovih iona, no to ne mijenja magnetska svojstva bakrovog centra, budući da je u obje forme (deoksi- i oksid-) dijamagnetičan.

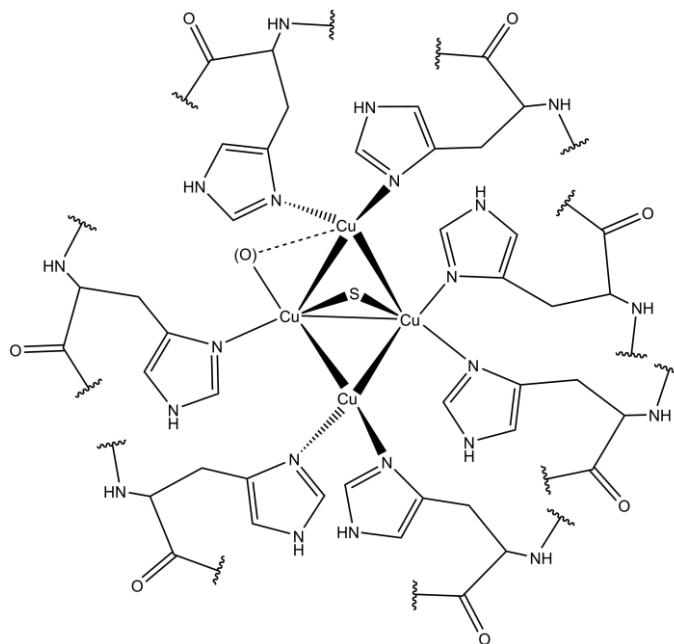


Slika 6. Prva koordinacijska sfera hemocijanskog bakrovog centra prije i nakon inkorporacije molekuskog kisika.<sup>1</sup>

Kuproproteini imaju još tri skupine bakrovih centara, nazvanih  $\text{Cu}_A$ ,  $\text{Cu}_B$  i  $\text{Cu}_Z$ .  $\text{Cu}_A$  i  $\text{Cu}_B$  pronađene su u citokrom *c* oksidazi, posljednjem proteinu lanca prijenosa elektrona.  $\text{Cu}_A$  centar miješane valencije dinuklearni je centar premošten dvjema cisteinskim podjedinicama u tetraedarskoj geometriji (slika 7). Prvi je bakrov ion koordiniran dodatno na histidinski te metioninski bočni ogranak, dok je drugi bakrov ion koordiniran na  $\alpha$ -karboksilnu skupinu glutamata te histidinski bočni ogranak. Upravo se za ovaj bakrov centar pretpostavlja da je elektron-akceptor ranijeg puta prijenosa elektrona u transportnom lancu, koji zatim elektrone prosljeđuje hemu.  $\text{Cu}_B$  centar koordiniran je trigonski piramidalno s tri atoma dušika bočnog ogranka histidina. Takva geometrija nije slučajna, već je svojevrsna priprema bakrovog centra na primanje molekuskog kisika kao konačnog akceptora elektrona u lancu prijenosa elektrona, čime dolazi do redukcije molekule kisika u molekulu vode. Struktura prve koordinacijske sfere nalazi se na slici 8.

Slika 7. Prva koordinacijska sfera Cu<sub>A</sub> bakrovog centra citokrom *c* oksidaze.<sup>1</sup>Slika 8. Prva koordinacijska sfera Cu<sub>B</sub> bakrovog centra citokrom *c* oksidaze.<sup>1</sup>

Cu<sub>Z</sub> bakrovi centri karakteristični su za skupinu dušik(I) oksid-reduktazi. Radi se o tetranuklearnom klusteru geometrije trigonske bipiramide u kojoj je jedan vrh najvjerojatnije sulfidni anion. Tetranuklearni kluster koordiniran je na sedam histidinskih bočnih ogranaka, a četvrti ion bakra koordiniran je dodatno i na kisik nepoznatog podrijetla, zbog čega se pretpostavlja da je upravo taj ion bakra lokacija vezanja supstrata, dušikovog(I) oksida, N<sub>2</sub>O.<sup>1</sup>



Slika 9. Prva koordinacijska sfera  $\text{Cu}_Z$  bakrovog centra  $\text{N}_2\text{O}$  reduktaze.<sup>1</sup>

## 2.3. Strukturna analiza ceruloplazmina

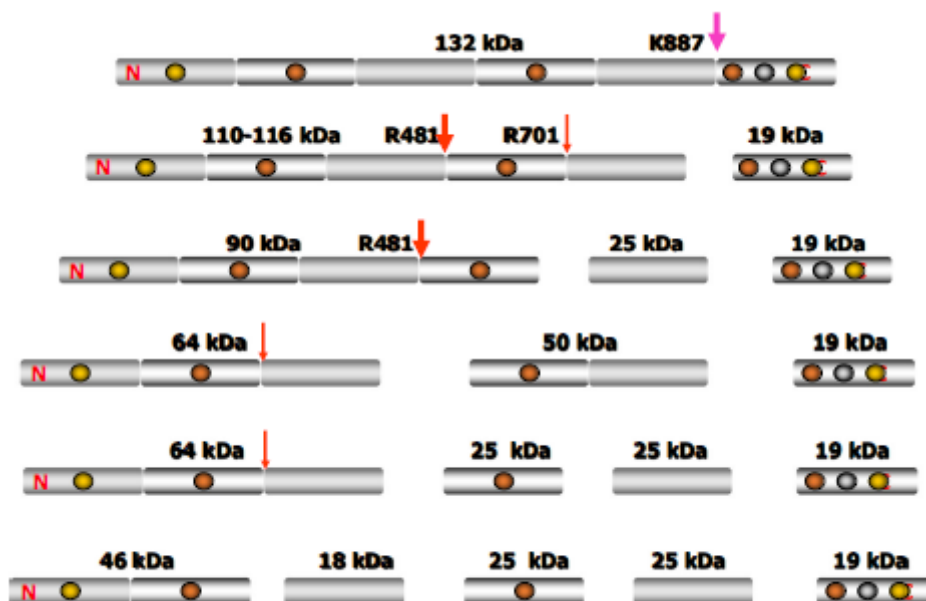
### 2.3.1. Određivanje aminokiselinskog slijeda ceruloplazmina

Sredinom 20. stoljeća pojavio se čitav niz istraživanja u kojima su strukture ceruloplazmina bile opisane kao dimerne<sup>30</sup>, tetramerne<sup>31</sup> te oktamerne<sup>32</sup>. Međutim, razvojem tehnika i metoda, pojavile su se prve hipoteze o monomernoj, jednolančanoj strukturi proteina. Pretpostavku Rydena iz 1972. potvrdio je Takahashi 1984. Ljudski ceruloplazmin tako je definiran kao jednolančani protein sastavljen od 1046 aminokiselinskih podjedinica podijeljenih u tri cjeline.

Ljudski ceruloplazmin vrlo je osjetljiv na proteolitičku aktivnost enzima zbog čega se dugo smatralo da su fragmenti dobiveni proteolizom njegove podjedinice, što nije slučaj. Unatoč toj, suštinski pogrešnoj pretpostavci, dobivene su informacije o strukturi ceruloplazmina bez kojih daljnja istraživanja ne bi bila moguća. Tako su cjeline dobivene proteolitičkom aktivacijom podijeljene obzirom na svoje molekulske mase na cjeline od 67 kDa, 50 kDa i 19 kDa. Fragment mase 67 kDa određen je kao N-kraj proteina, sastavljen od 480 aminokiselinskih podjedinica s tri vezna mjesta za glikozaminske oligosaharide. Cjeline dobivene proteaznom aktivnošću međusobno se preklapaju, tako da cjeline mase 67 i 50 kDa zajednički dijele aminokiselinski slijed od Gly<sup>469</sup> do Glu<sup>494</sup>. Na sličan se način

preklapa i cjelina mase 50 kDa s domenom mase 19 kDa na području od Leu<sup>870</sup> do Glu<sup>896</sup>. Potpuni aminokiselinski slijed pokazuje kako se cjelina mase 50 kDa sastoji od 405 aminokiselinskih podjedinica te četiri vezna mjesta za glikozaminske oligosaharide, dok cjelina od 19 kDa sadrži 159 aminokiselinskih podjedinica. Na temelju određenog aminokiselinskog slijeda, uzimajući u obzir mogućnost vezanja četiri glikozaminska oligosaharida, dobivena je molekulska masa proteina od 132 kDa. Ta je vrijednost suglasna sa starijim istraživanjima, čija je pretpostavka bila rezultat većinom elektroforetskih istraživanja te kao takva davala molekulsku masu od oko 130 kDa.<sup>11</sup> Isto istraživanje pokazalo je kako ceruloplazmin pokazuje i varijacije u strukturi kao posljedicu zamjene Gly<sup>79</sup> s Lys<sup>449</sup>. Trodimenzijska struktura proteina ukazuje da su oba mjesta nasuprotna β-okretima između dvije β-ploče, što upućuje da su aminokiseline na tim pozicijama izložene okolini i s njom mogu interagirati.

Ovakvo otkriće ceruloplazmina kao jednolančanog monomernog proteina koji se proteaznom aktivnošću cijepa na tri podjedinice zahtijeva poznavanje enzima koji bi tu aktivnost obavljao *in vivo*, što mogu raditi tripsinu slični enzimi. Prilikom daljnjeg spontanog cijepanja, kao samostalne aminokiseline izdvajaju se Arg<sup>481</sup> i Lys<sup>887</sup>, što upućuje na aktivnost sličnu karboksipeptidazama. Tripsinu slični enzimi i karboksipeptidaze prisutni su u velikim koncentracijama u krvnoj plazmi, gdje se ceruloplazmin i nalazi, stoga nije nemoguće da se i *in vivo* odvija ovakva proteolitička degradacija proteina. Fragmentacija proteina tu ne prestaje (slika 10). Donedavno, nije bila poznata proteaza koja bi se pokazala specifičnom za proteolitičko cijepanje ceruloplazmina, no najnovija istraživanja upućuju da tu ulogu preuzima trombin. Njegovim djelovanjem, dolazi do inhibicije djelovanja ceruloplazmina na niz enzima prisutnih za vrijeme infekcije i upale poput mijeloperoksidaza ili 5-lipoksigenaza.<sup>12</sup>



Slika 10. Shema proteolize ljudskog ceruloplazmina. Strelice označavaju mjesta djelovanja proteaza.<sup>12</sup>

### 2.3.2. Određivanje kristalne strukture ceruloplazmina

Kristalna struktura proteina je određena 1996. uporabom podataka dobivenih difrakcijom rendgenskog zračenja na jediničnom kristalu. Rezultati su pokazali da je protein sastavljen od šest cjelina te da svaka molekula ceruloplazmina sadrži šest iona bakra. Ti su ioni posloženi u trinuklearni kluster na zajedničkoj površini cjelina 1 i 6 te u tri mononuklearna centra u cjelinama 2, 4 i 6.<sup>13</sup> Trinuklearni kluster te mononuklearni centar cjeline 6 prisutan je uzorak i kod askorbat-oksidade, što sugerira sličnu funkcionalnu ulogu. Svaki od mononuklearnih centara koordiniran je dvama atomima dušika iz bočnog ogranka histidina te atomom sumpora iz cisteina, svaki na 2,0 Å udaljenosti. Dodatno, bakrovi centri cjelina 4 i 6 koordinirani su atomom sumpora iz metionina na 3,0 Å. U cjelini 2, metionin je zamijenjen leucinom koji je udaljen od bakrovog centra 3,5 Å. Zamjenom metionina leucinom gubi se dio katalitičke aktivnosti bakrovog centra, no nije poznato je li ova zamjena aminokiselina evolucijski relik, čime je dobiven esencijalno nefunkcionalan bakrov centar ili sam centar ima još nama nepoznatu ulogu.<sup>14</sup>

Ljudski ceruloplazmin poznat je po svojoj heterogenosti – ranije je navedeno postojanje četiriju veznih mjesta za glikozaminske oligosaharide. Sami oligosaharidi

karakteristično završavaju sijaličnom kiselinom koja je usmjerena izvanstanično, upućujući na komunikacijsku ulogu s drugim proteinima u stanici. Difrakcijom je određeno da se provodi N-glikozilacija na asparaginskim podjedinicama 119, 339 i 378, koje odgovaraju podjedinicama na proteolitičkom fragmentu od 67 kDa, dok se četvrto glikolizirano mjesto nalazi na Asn<sup>743</sup>, koji odgovara proteolitičkom fragmentu od 50 kDa.

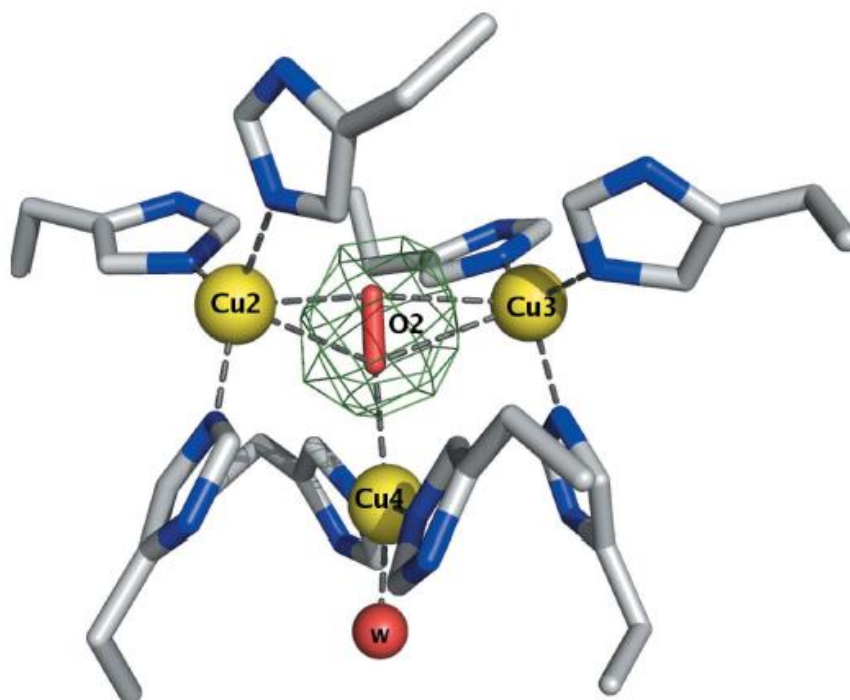


Slika 11. Struktura ceruloplazmina, šest kupredoksinških cjelina prikazano je crvenom, narančastom, žutom, zelenom, plavom i ljubičastom bojom. Vezna mjesta za bakrove ione označena su plavim, za kalcijeve zelenim, a za natrijeve ione crvenim kuglicama.<sup>14</sup>

### 2.3.3. *Mehanizam redukcije kisika na trinuklearnom klusteru*

Trinuklearni kluster sadrži dva kationa bakra tipa III te jedan kation tipa II orijentiranih tako da se unutar klustera nalazi vezno mjesto za dvoatomnu molekulu, koja prema dimenzijama slobodnog prostora unutar klustera odgovara molekuli kisika. Redukcija molekula kisika u molekulu vode očigledno se odvija na trinuklearnom klusteru. Čitava mreža molekula otapala pronađena je na ulazu u trinuklearni kluster. Jedan dio molekula otapala služi za stvaranje vodikovih veza kako bi se omogućio pravilan mehanizam dolaska molekule kisika do trinuklearnog klustera. Uz molekule otapala, niz aminokiselinskih podjedinica stabilizira taj kanal sustavom elektrostatskih interakcija te već spomenutih vodikovih veza. Dolaskom do

klustera (slika 12), molekula kisika simetrično se smješta između dva bakrova iona tipa III (tzv.  $\mu\text{-}\eta^2\text{:}\eta^2$  način vezanja) te interagira s bakrom tipa II ( $\eta^1$  način vezanja).



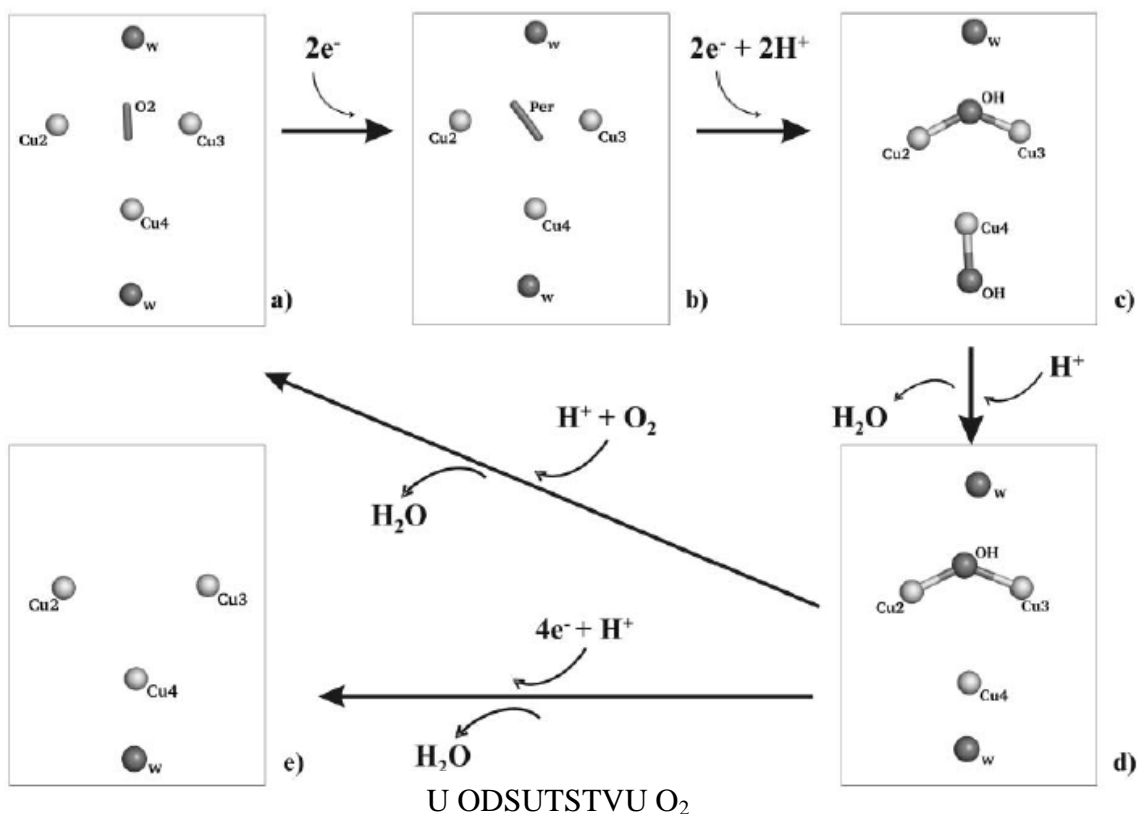
Slika 12. Trinuklearni kluster između cjelina 1 i 6 s prikazanom molekulom kisika vezanom unutar klustera. Cu2 i Cu3 označavaju bakrove ione tipa III, Cu4 bakrov ion tipa II.<sup>14</sup>

U idućem koraku mehanizma, potrebno je molekuli kisika dovesti elektrone, vidljivo na slici 13. kao prijelaz iz **a**) u **b**). Elektroni su rezultat oksidacije supstrata na mononuklearnim centrima, nakon čega se lancem prijenosa elektrona na aminokiselinama koje imaju nabijene bočne ogranke elektroni efektivno dovode do bakrovog iona tipa III u trinuklearnom klusteru. Svaki ion tipa III prima po jedan elektron, čime se formira peroksidni anion. Doniranje elektrona stabilizira  $\text{Cu}\cdots\text{O}$  interakciju: dolazi do smanjenja udaljenosti između atoma s 2,6 Å na 2,0 Å. Na sličan način u sustav se dovode još dva elektrona te dva protona, prikazano reakcijom iz **b**) u **c**) na slici 13. Smatra se da je jedna od aminokiselina odgovornih za doniranje protona, koji mrežom vodikovih veza putuje do kisika, Glu<sup>1032</sup>. Ovakvim nizom reakcija bakrovi centri ostaju u svojim oksidiranim formama te protein zadržava svoju karakterističnu plavu boju. Sumarno, doniranje dvaju protona i četiriju elektrona molekuli kisika rezultira stvaranjem dviju hidrosilnih skupina. Jedna od te dvije skupine ponaša se premošćujuće između dva bakrova iona tipa III, dok će druga migrirati prema bakrovom ionu tipa II stvarajući strukturu „mirujućeg“ stanja. Na prvi pogled, čini se



teško objašnjivim kako je moguća migracija čitave skupine unutar klustera, gdje je udaljenost između bakrovih iona svega 12 Å. Odgovor na ovo pitanje treba tražiti u migraciji samog bakrovog iona. Naime, bakar tipa II vezan je za ceruloplazmin jedino preko dva histidinska atoma dušika, što ga čini pokretljivijim od ostalih bakrovih iona u klusteru. Bakar se mora izdići iz ravnine definirane histidinima kako bi vezao hidroksidni ion.<sup>15</sup>

Posljednji korak mehanizma, prikazanog na slici 13. kao prijelaz strukture iz **c)** u **d)**, zahtijeva protoniranje hidroksidnog iona, pri čemu nastaje molekula vode koja migrira u kanal, odlazeći van iz trinuklearnog klustera. Tako nastala molekula vode dodatno se stabilizira vodikovom vezom na blisku hidroksilnu skupinu bočnog ogranka tirozina. Prvo se protonira hidroksidni ion vezan za bakar tipa II te nastala molekula vode migrira u kanal, nakon čega bakar tipa II ponovno omogućuje migraciju hidroksidne skupine na svoj centar, protoniranje i odlazak nastale molekule vode. Trinuklearni centar, ali i čitavi protein, tako se vraća u svoje početno stanje u kojem može primiti novu molekulu kisika, prikazano prijelazom iz **d)** u **a)** na slici 13. Ovakav mehanizam pokazuje dvostruku ulogu bakrovog centra tipa II: ne samo da potpomaže vezanje molekule kisika u sustav, već privremeno veže nastale hidroksidne ione kako bi protoniranjem istih nastala voda. Bakrovi centri tipa III služe kao elektron-donori molekuli kisika kako bi uopće započela njegova redukcija. Iz ovakvog mehanizma, postaje jasno da nepravilno smatanje proteina u kojem se bakar tipa II ne veže na odgovarajuće vezno mjesto u klusteru, ili se ne veže uopće, rezultira proteinom izgubljene oksidazne aktivnosti, budući da nije moguće provesti redukciju molekule kisika do molekule vode u potpunosti. Treba uzeti u obzir činjenicu da situacija u kojoj se bakrov ion tipa II veže labilno ili ne veže uopće nije nemoguća, što je vidljivo iz njegove pokretljivosti u samom mehanizmu te vezanjem na dva histidinska liganda. Ukoliko molekula kisika nije prisutna, molekula voda izlazi putem kanala dok vezno mjesto za molekulu kisika ostaje prazno, kao što je prikazano prijelazom iz **d)** u **e)** na slici 13.

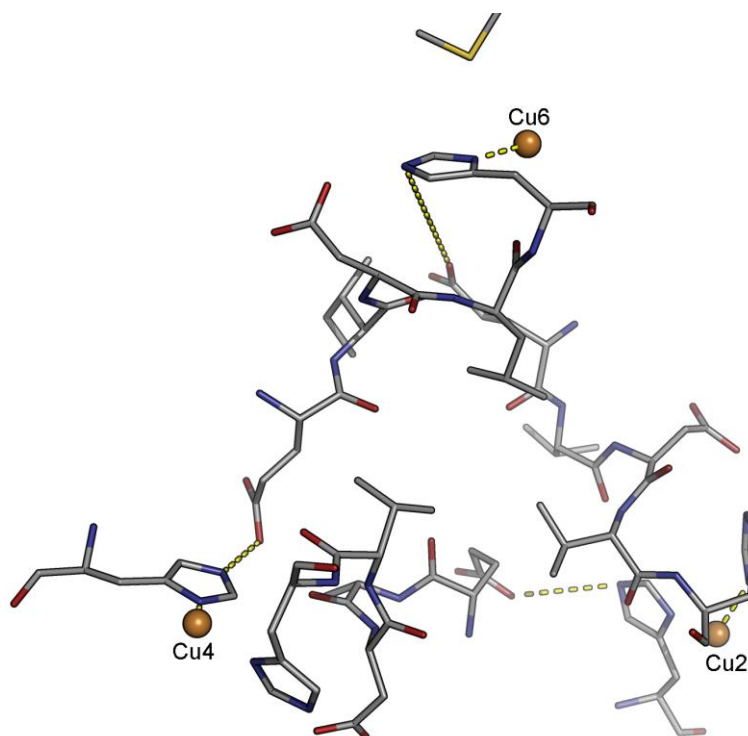


Slika 13. Predloženi mehanizam redukcije molekule kisika u trinuklearnom klusteru ceruloplazmina. Bakrovi ioni označeni Cu2 i Cu3 označavaju bakrove atome tipa III, Cu4 bakrov ion tipa II.<sup>15</sup>

#### 2.3.4. Mononuklearni centri i njihova elektron-transferna uloga

U askrobat-oksidazi, višebakrenoj oksidazi strukturno sličnoj ceruloplazminu, supstrat donira elektron ili elektrone nakon vezanja za aktivno mjesto u blizini mononuklearnog bakrovog centra. Transfer elektrona ostvaruje se putem tiolne skupine cisteina te jednim od dvaju histidina vezanih za trinuklearni bakrov kluster, nakon čega slijedi mehanizam redukcije molekule kisika opisan ranije. Sličnost askrobat oksidaze i ceruloplazmina velika je, budući da obje sadržavaju trinuklearni kluster bakrovih iona te mononuklearni centar na cjelini 6. Ceruloplazmin dodatno ima mononuklearne centre na cjelinama 2 i 4. Udaljenost između tih cjelina iznosi oko 18 Å, što je i više nego dovoljno za ostvarivanje efektivnog transfera elektrona prema trinuklearnom klusteru. Naime, tri mononuklearna bakrova centra mogu se povezati vodikovim vezama i stabilizirati elektrostatskim interakcijama, pri čemu su

imidazolni prsten histidina te karboksilna skupina bočnog ogranka aspartata ključni medijatori tih interakcija (slika 14).

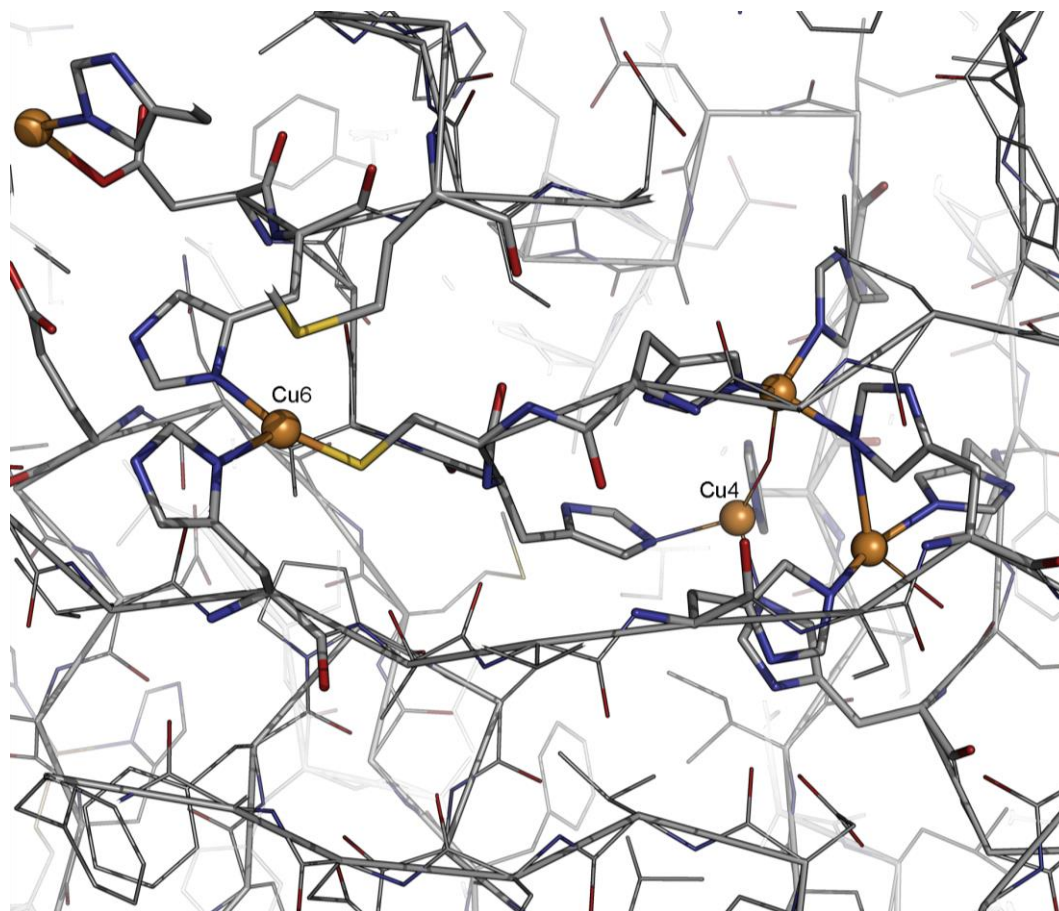


Slika 14. Transfer elektrona između mononuklearnih centara.<sup>16</sup>

Lindley je uvidio kako put u transferu elektrona s različitih cjelina nije jednak. Naime, put elektrona koji uključuje bakrove ione u cjelini 6, 0,9 Å je kraći od puta elektrona između bakra cjeline 2 i cjeline 4. Upravo kraći put prijenosa elektrona do trinuklearnog klustera implicira važnost cjeline 6 i bakrovog iona vezanog za tu domenu u katalitičkoj aktivnosti enzima. Nadalje, različite brzine prijenosa elektrona ostavljaju mogućnost enzimu da dovode elektrone u trinuklearni kluster u različitim vremenima, čime se ostvaruje mogućnost oksidacije više od jedne molekule supstrata u jedinici vremena.

U strukturi ceruloplazmina, mononuklearni bakrovi centri smješteni su u cjelinama 2, 4 i 6. Obzirom na veličinu kationa i terciarnu strukturu proteina, negativno nabijeni dijelovi proteina sterički su zahtjevni i pristup pozitivnog naboja otežan je, zbog čega se bakrovi ioni vežu na te cjeline s vanjske strane molekule. Bakrovi centri u cjelinama 4 i 6 pokazuju se kao „labilni“: vezna mjesta za metal popunjena su u samo 50 % proteina, čime su vezna mjesta dostupna i drugim metalima. Ekvivalentnog labilnog veznog mjesta u cjelini 2 nema, budući da je metioninska podjedinica zamijenjena leucinskom, histidinska tirozinom, a bakar mononuklearnog centra u reduciranoj je formi. Na slici 15 vidljivo je kako je labilno vezno

mjesto za bakar u cjelini 6 okruženo trima negativno nabijenim aminokiselinama te histidinom koji mogu potpomognuti vezanje više od jednog kationa, ali i pomoći u transferu elektrona na trinuklearni kluster ili na novo vezani kation.

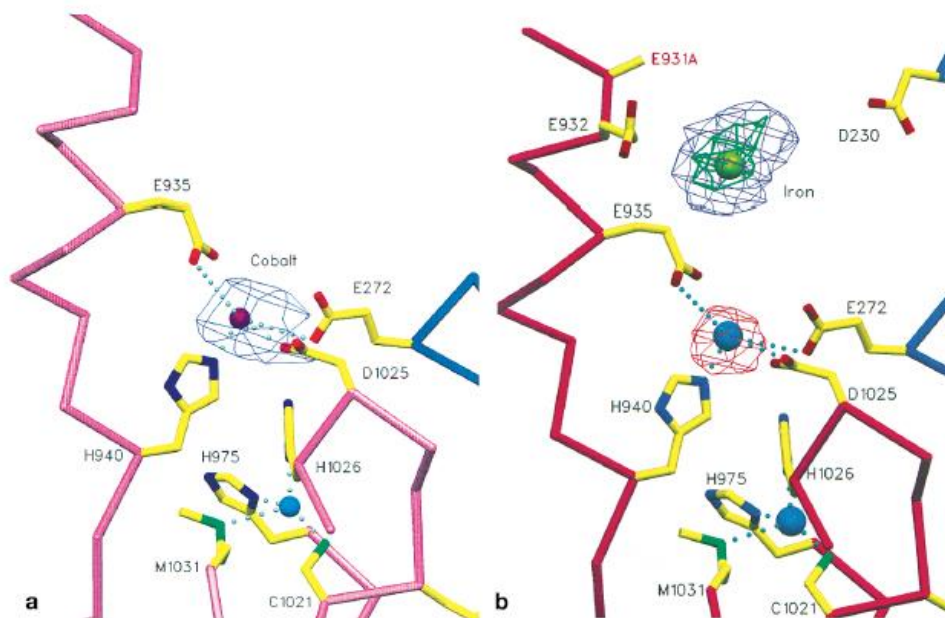


Slika 15. Labilno vezno mjesto za bakar u cjelini 6.<sup>16</sup>

U istraživanjima s različitim metalnim ionima (slika 16) puno je zanimljivije rezultate dalo istraživanje sa željezovim(II) ionima. Rezultati pokazuju da ti ioni zauzimaju ne samo slobodne pozicije na cjelinama 4 i 6, već i zamjenjuje bakrove u tim cjelinama. Zamjena kationa praćena je oksidacijom željezovih iona. Oslobođeni elektron prenosi se do trinuklearnog klastera gdje se koristi za redukciju molekule kisika. Taj postupak odvija se različitim brzinama u cjelinama 4 i 6, ali se ponavlja iterativno, što omogućuje oksidaciju više molekula supstrata. Zna se da se tako oksidirani željezov(III) ion prenosi na feritin, nakon čega se dalje metabolizira, no nije poznat mehanizam kojim se prenosi.<sup>16</sup>

Iz ovih se eksperimenata izvodi zaključak da u cjelinama 4 i 6 postoje slobodna vezna mjesta na koje se mogu vezati i drugi ioni metala, a da su u radijusu transfera elektrona na trinuklearni kluster. Analiza kristalne strukture podupire tu tvrdnju, uz dodatak da je moguće

vezanje čak 5 različitih liganada na slobodno vezno mjesto, koji bi bili konzistentni s oksidaznom ulogom, uz Glu<sup>935</sup> kao ključni medijator izmještanja metalnog iona na površinu proteina.<sup>14</sup>



Slika 16. Vežanje **a)** Co<sup>2+</sup> iona; **b)** Fe<sup>2+</sup> iona na ceruloplazmin. U **b)** crveno osjenčani Fe<sup>2+</sup> ion je onaj koji je zamijenio Cu<sup>2+</sup> ion, dok je plavo osjenčani Fe<sup>2+</sup> zauzeo slobodno vezno mjesto.<sup>16</sup>

## 2.4. Sinteza ceruloplazmina *in vivo*

### 2.4.1. Unos bakra u jetru

Kao i sve višebakrene oksidaze, ceruloplazminska aktivnost nemoguća je bez bakrovih iona u proteinu. Međutim, sinteza proteina pokazala se kao proces neovisan o koncentraciji bakrovih iona što je otvorilo novo pitanje znanstvenoj zajednici, a to je pitanje mehanizma ugradnje bakrovih iona u novo sintetizirani ceruloplazmin.

Istraživanja su provedena na kvascu *Saccharomyces cerevisiae*. Ustanovljeno je kako bakrovi ioni putuju preko plazmatske membrane pomoću specifičnog transportera Ctr1p. Dolaskom u stanicu, bakrovi ioni imaju nekoliko metaboličkih puteva koje mogu odabrati:

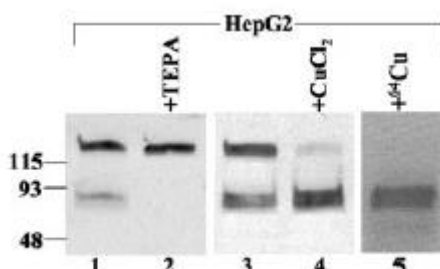
- odlazak u jezgru

- odlazak u mitohondrij (gdje će biti umetnut u citokrom *c* oksidazu odgovarajućim šaperonom)
- vezanje za odgovarajući šaperon koji ga odvodi prema Cu/Zn SOD (Cu/Zn superoksidna dismutaza)
- vezanje za Ccc2p.

Ccc2p je kvašćev homolog Wilsonove ATPaze, tzv. „bakrove pumpe“, enzima odgovornog za pravilnu funkcionalnu aktivaciju ceruloplazmina, a čije su mutacije odgovorne za pojavu Wilsonove bolesti. Kvasac i čovjek do ove točke dijele jednaki evolucijski put.<sup>24</sup> Bakrovi ioni uneseni prehranom se uvode u hepatocit jetre gdje se veže za Wilsonovu ATPazu unutar *trans*-Golgijevog kompleksa.<sup>23</sup>

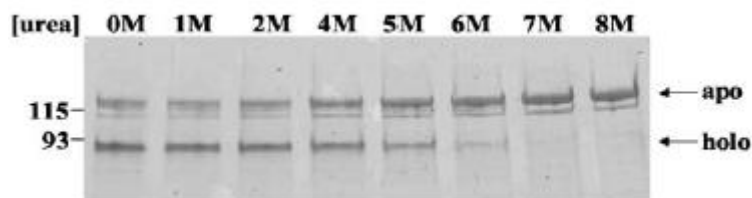
#### 2.4.2. Inkorporacija bakrovih iona u ceruloplazmin

Kao i većina poznatih kuproenzima, ceruloplazmin se sintetizira u hepatocitima, nakon čega se bakrov ion umeće u sekrecijskom putu. Ranije je spomenuto da koncentracija bakrovih iona ne utječe na brzinu sinteze ceruloplazmina, kao niti na brzinu umetanja bakrovog iona u protein, što upućuje na postojanje dva odvojena procesa. Imunoblotna analiza ceruloplazmina u HepG2 stanicama u sprezi sa SDS PAGE elektroforezom pokazuje prisutnost dvije vrpce na 135 kDa i 85 kDa koje odgovaraju apo i holo formi proteina. Autoradiografska analiza nakon izotopnog obilježavanja bakra i analiza kompleksiranja s tetraetilenpentaaminom (TEPA) otkrivaju da je apoceruloplazmin molekulske mase 135 kDa, a holoceruloplazmin 85 kDa (slika 17). Budući da se radi o jedine dvije vrpce, pretpostavljeno je da se radi o konformacijskoj promjeni apo u holo formu u jednom koraku, što je potvrđeno drugim analizama (slika 18).<sup>25</sup>



Slika 17. Inkorporacija bakra u ceruloplazmin. Vrpce 1 i 3 pokazuju nativni ceruloplazmin, vrpca 2 ceruloplazmin tretiran TEPA-om, vrpca 4 ceruloplazmin tretiran suviškom

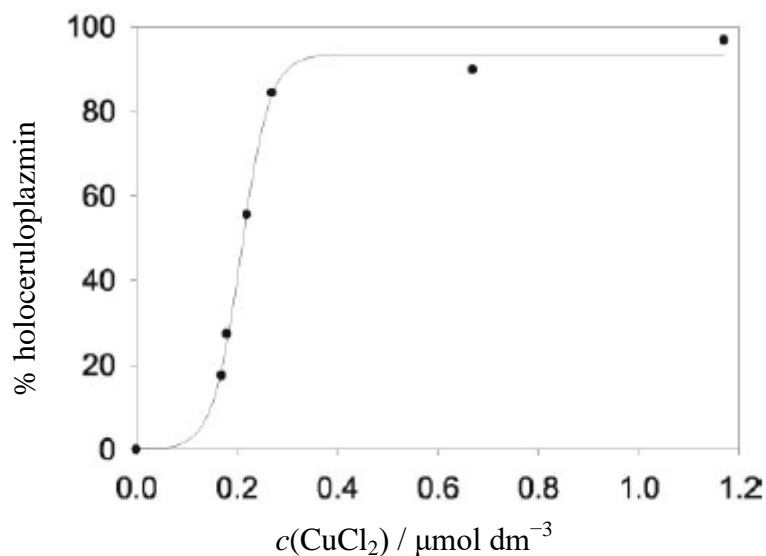
CuCl<sub>2</sub>, vrpca 5 ceruloplazmin tretiran radioaktivno obilženim bakrom <sup>64</sup>Cu. Vrpca pri 135 kDa odgovara apoceruloplazminu, a pri 85 kDa holoceruloplazminu.<sup>25</sup>



Slika 18. Tretiranje ceruloplazmina u gradijentu ureje. Vidljiv je gubitak aktivnog holoceruloplazmina u prisutstvu denaturirajućeg agensa.<sup>25</sup>

Da bi se istražila konformacijska promjena koja dovodi do stvaranja aktivne forme enzima, napravljene su mutacije na svakom od 6 veznih mjesta za bakrove ione, gdje su odgovarajući histidini zamijenjeni glutaminima, a na veznim mjestima za bakrove ione tipa I napravljene su dodatne zamjene cisteina serinom. Ustanovljeno je kako vezna mjesta ne utječu na smatanje proteina. Kako bi se dodatno potvrdila ta hipoteza, provedena je mutacija Gly<sup>631</sup> za arginin. Gly<sup>631</sup> ključan je za stabilizaciju His<sup>637</sup> koji je koordiniran na bakrov centar tipa I (slika 19). To se i potvrdilo, budući da se kao rezultat mutacije izlučuje se nefunkcionalni apoceruloplazmin. I mutirani i zdravi protein stoga se mogu slobodno prevesti u sekretorni put, no uklapanje bakrovih iona je ta koja će odrediti je li protein dobro smotan za prijevod u aktivnu formu.

Iduće pitanje koje se nameće jest vrijednost koncentracije bakrovih iona potrebne za uspješnu inkorporaciju u sintetizirani ceruloplazmin. Kvantitativna analiza inkorporacije bakrovih iona u apoceruloplazmin pomoću atomske apsorpcijske spektroskopije pokazuje sigmoidalnu ovisnost aktivnog holoceruloplazmina u ovisnosti o koncentraciji dodanog bakra, koja odgovara kooperativnom vezanju bakrovih iona u protein (slika 19).



Slika 19. Brojevni udio (u %) holoceruloplazmina u ceruloplazminu.<sup>25</sup>

## 2.5. Analiza funkcijâ ceruloplazmina

### 2.5.1. Feroksidazna aktivnost ceruloplazmina

Jedno od najzanimljivijih svojstava ovog proteina jest mogućnost oksidacije niza organskih i anorganskih supstrata. Kinetička istraživanja pokazala su da je  $V_{\max}$  sličan za organske i anorganske supstrate, što dovodi do zaključka da brzinu redoks reakcije ne definira specifičnost supstrata, već je redukcija bakrovih iona ta koja određuje brzinu reakcije. Frieden i Hsieh predlažu podjelu supstrata ceruloplazmina u tri osnovne skupine:

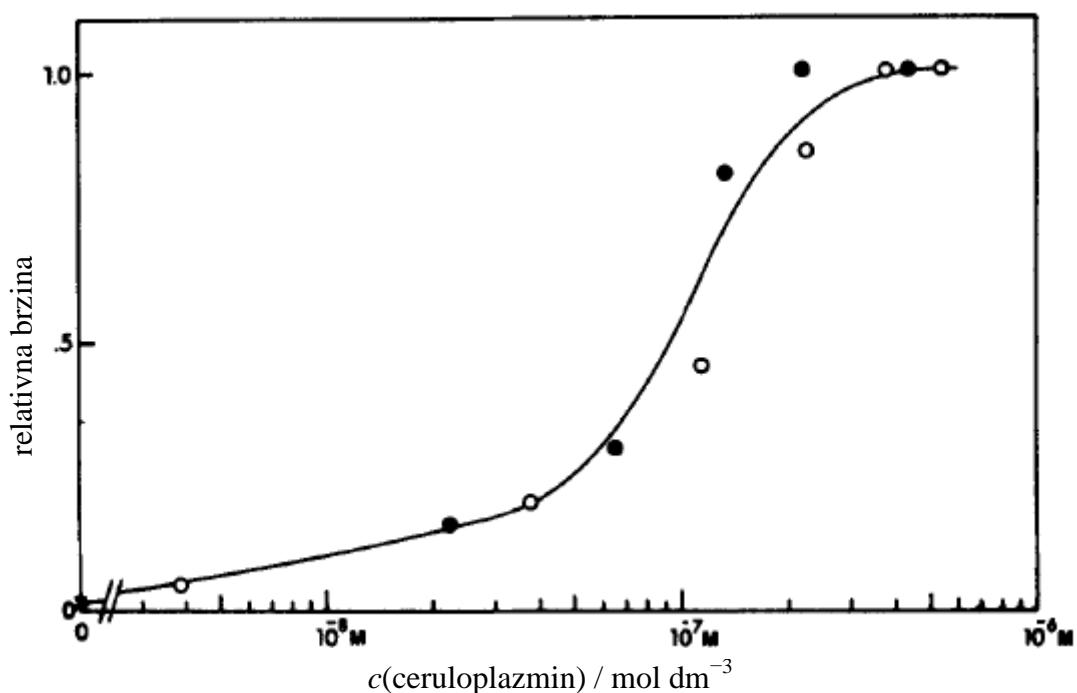
1. Fe(II), kao supstrat najvećeg  $V_{\max}$  i najnižeg  $K_m$ ,
2. široka skupina biogenih i abiogenih aromatskih amina i fenola,
3. skupina pseudosupstrata čija je osnovna funkcija redukcija parcijalno oksidiranih supstrata iz skupine 2 ili oksidiranog željezovog iona.

Young i Curzon 1972. rade istraživanje u kojem čitav niz supstrata oksidiraju ceruloplazminom te zaključuju kako priroda supstrata ne utječe na brzinu oksidazne aktivnosti proteina, što Vasiljev proširuje u tvrdnju da se bilo koji reducens može ponašati kao supstrat za ceruloplazmin ukoliko mu je omogućena vlastita oksidacija.<sup>12</sup>

Jedno od najvažnijih pitanja tijekom proučavanja aktivnosti ceruloplazmina bilo je definiranje njegove osnovne aktivnosti te se kroz godine feroksidazna aktivnost pokazala kao najvažnijom. Već 1968., Lee sa suradnicima zaključuje kako svinje čija je prehrana regulirana



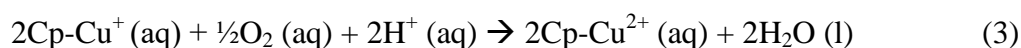
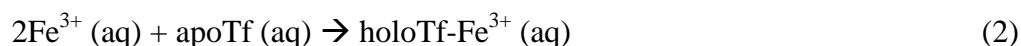
reduciranim unosom bakra pokazuju niske razine ceruloplazmina te nemogućnost otpuštanja željezovih iona u krvnu plazmu.<sup>4</sup> Ceruloplazmin oksidira željezove(II) ione i reducira bakrove(II) ione u proteinu. Tom se reakcijom uspostavlja kontrola nad stvaranjem ROS te otpuštanjem željezovih iona u krvnu plazmu, gdje se uklapa u apotransferin. Takvom kontrolom omogućuje se nesmetani transport željezovih iona u organizmu. Pritom je ustanovljena je sigmoidalna ovisnost relativne brzine feroksidazne aktivnosti u ovisnosti o koncentraciji dostupnog ceruloplazmina (slika 20).<sup>17</sup>



Slika 20. Relativna brzina feroksidazne aktivnosti ceruloplazmina, ilustracija preuzeta i dorađena iz ref. 17.

Proveden je niz *in vivo* i *in vitro* istraživanja koji problematiziraju ovisnost feroksidazne aktivnosti i koncentracije ceruloplazmina u krvnoj plazmi i svi dolaze do sličnog zaključka: u odsustvu odgovarajuće feroksidaze, željezovi(II) ioni se nemaju na što vezati. Upravo će vezanje željezovih iona na ceruloplazmin biti reakcija koja određuje brzinu procesa mobilizacije željezovih ion u transferin. Zasad je nepoznato mjesto vezanja željezova(II) iona, ali je ustanovljena sinteza intermedijera  $\text{Fe}^{2+}$ -ceruloplazmin koji prolazi kroz odgovarajuću redoks reakciju prikazanu jednačbom (1). Nastali željezov(III) ion ima veći afinitet za vezanje na apotransferin, čime se upućuje u daljnju mobilizaciju. Obzirom na konformacijsku

promjenu kroz koju protein prolazi, apsorpcijski spektri pokazuju snažnu vrpču pri 460 nm koja odgovara vezanju željezova(III) iona na protein, čime se potvrđuje transfer željezovog iona s ceruloplazmina, prikazano jednadžbom (2). Naposljetku, dolazi do već spomenute redukcije molekule kisika na trinuklearnom klusteru ceruloplazmina, čime se omogućuje primanje novog supstrata na protein.<sup>12</sup>



Druge komponente krvnog seruma također mogu oksidirati željezove(II) ione. Citratni anion, hidrogenkarbonatni anion, apotransferin, samo su neki od spojeva koji omogućuju taj proces. Albumin na te spojeve djeluje inhibirajuće, čime aktivira ceruloplazmin. Može se pretpostaviti postojanje protein-protein interakcija između albumina i ceruloplazmina obzirom da ceruloplazmin pokazuje takve interakcije s drugim proteinima, poput laktoferina ili transferina. Budući da je koncentracija albumina u krvnom serumu i krvnoj plazmi povećana, feroksidazna aktivnost svakako je centralizirana na ceruloplazminu.<sup>4</sup>

Najbolji pokazatelj značajnosti feroksidazne aktivnosti proteina vidljiv je u poremećajima same aktivnosti proteina. Mutacija ceruloplazminskog gena i aceruloplazminemija kao posljedica te mutacije usko je povezan s poremećenom feroksidaznom aktivnošću. Mutacija gena za rezultira proteinom skraćenim s originalnih 1046 aminokiselina na 991 aminokiselinu. Posljedica skraćenog peptida je gubitak liganada koji djeluju stabilizirajuće na mononuklearni centar bakra cjeline 6. U odsustvu tih liganada, malo je vjerojatno da će cjelina 6 pokazivati svoju katalitičku aktivnost. Uz to, skraćenjem polipeptidnog lanca gube se dvije histidinske podjedinice koje stabiliziraju trinuklearni kluster. Takav gubitak utječe na oksidaznu aktivnost proteina te uopće na vezanje bakrovih iona u protein. Sve ovo rezultira promjenom konformacije proteina i gubitkom native strukture, koji kao takav postaje podložniji proteaznoj aktivnosti te gubi oksidaznu aktivnost.<sup>18,19</sup> Ovakav vrlo nestabilan protein ima vrlo kratko vrijeme poluživota od svega nekoliko sati, zbog čega se lako detektira manjak stabilne forme proteina u dijagnostici aceruloplazminemije. Gubitak ili smanjena koncentracija proteina rezultira nepostojecom ili

smanjenom feroksidaznom aktivnošću, zbog čega dolazi do akumulacije željezovih iona u krvnoj plazmi, ali i drugim organima.

### 2.5.2. Aceruloplazminemija: simptomi, posljedice, liječenje

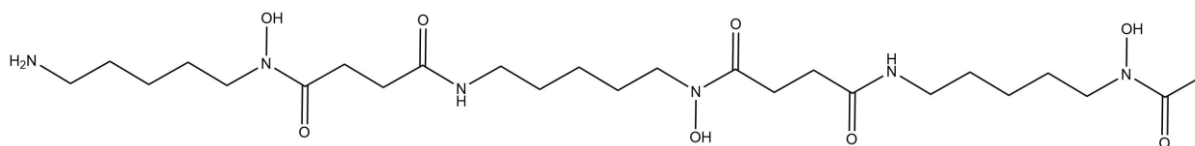
Miyajima 1987. prvi puta povezuje utjecaj ceruloplazmina na metabolizam željeza, opisujući neurološki poremećaj kod pacijentice koja je imala simptome Parkinsonove bolesti praćene blefarospazmima (nekontrolirano treptanje), degeneracijom retine te *diabetesom mellitusom*. Pacijentica, kao i dva njezina rođaka, imali su niske razine ceruloplazmina u krvnoj plazmi. Biopsija jetre sugerirala je visoke razine serumskog željeza i serumskog feritina. Upravo je ta pacijentica prvi dokumentirani slučaj aceruloplazminemije, koja je postala predmet istraživanja znanstvene zajednice u posljednjih 30 godina.<sup>20</sup>

Simptomi aceruloplazminemije razlikuju se od pacijenta do pacijenta, čak i unutar iste obitelji, no nekoliko simptoma je svim pacijentima zajedničko – degeneracija mrežnice (retine), neurološki poremećaji i dijabetes. Rjeđi simptom je anemija, koja se pojavljuje zbog akumulacije željezovih iona u tkivima i organima, što za posljedicu ima smanjenu koncentraciju željezovih iona u krvi. Anemija za sobom dovodi i česte vrtoglavice, slabost, nesvjestice, ubrzano disanje zbog nedostatka kisika te blijedu kožu.

Akumulacija željezovih iona u gušterači vodi prema dijabetesu, poremećaju u proizvodnji inzulina, hormona koji regulira metabolizam glukoze i drugih nutrijenata. Akumulacija željezovih iona moguća je i u mozgu gdje uzrokuje čitav niz neuroloških problema. Ističu se poremećaji kretanja i koordinacije pokreta, otežan govor, promjene u ponašanju, poremećaji pamćenja koji prerastu u demenciju. Pojedinci koji pate od netretirane aceruloplazminemije počinju pokazivati znakove demencije oko 50. godine života. Poremećaji kretanja koji se pojavljuju su tremor, drhtanje i distonija, ponajprije mišića glave i vrata. Nerijetko se ovaj poremećaj miješa s Parkinsonovim zbog sličnih neuroloških simptoma.<sup>21</sup>

Liječenje je specifično za svakog pacijenta, no čest pristup jest korištenje kelatnih agenasa koji kompleksiraju željezove ione, poput desferioksamina, defirprnoma i defsiroksoma. U posljednjih nekoliko godina, popularna terapija je presađivanje krvne plazme zdravih pojedinaca kako bi se omogućila homeostatička koncentracija ceruloplazmina u krvi. U većini slučajeva, transplantacija rezultira smanjenjem koncentracije željezovih iona u krvi, a u nekim slučajevima i u mozgu. Uz kelatne agense, preporuča se i unos antioksidansa poput

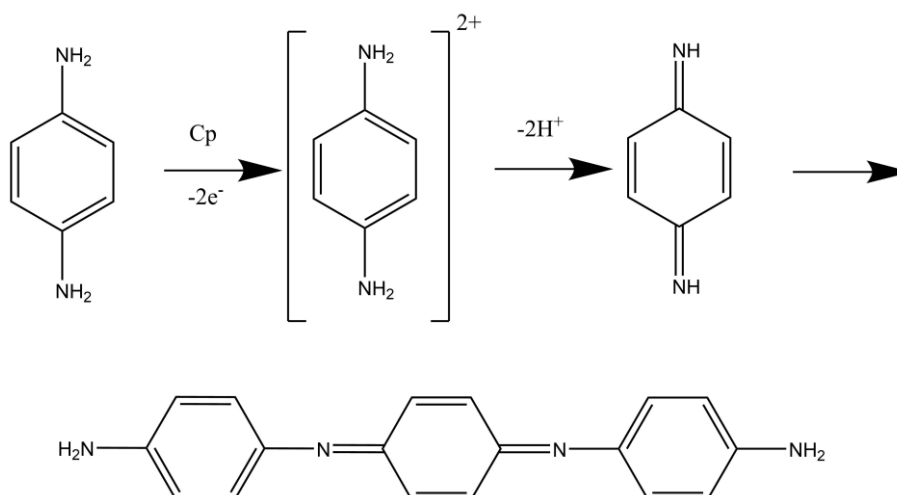
vitamina E ili cinkovog sulfata, kako bi se onemogućila degradacija tkiva uzrokovana stvaranjem slobodnih radikala uslijed povećane koncentracije željezovih(II) iona.<sup>22</sup>



Slika 21. Struktura molekule desferioksamina.

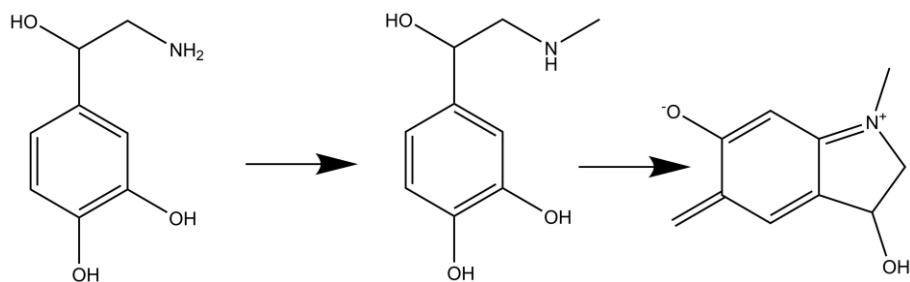
### 2.5.3. Oksidacija (*a*)biogenih amina

Tijekom proučavanja vezanja *p*-fenildiamina kao primjera abiogenog aromatskog amina, Zaitsev zaključuje da se vežu u blizini triptofana, metionina i histidina, karakteristične aminokiselinske trijade na dnu cjeline 4. Vezanjem na domenu 4 udaljava se mononuklearni bakrov centar i stabilizira stvaranje kvinondiiminskog međuprodukta (slika 22).

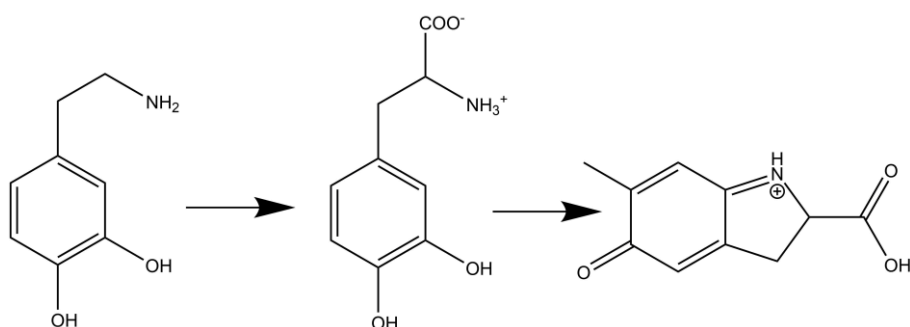


Slika 22. Reakcija oksidacije *p*-fenildiamina pomoću ceruloplazmina.

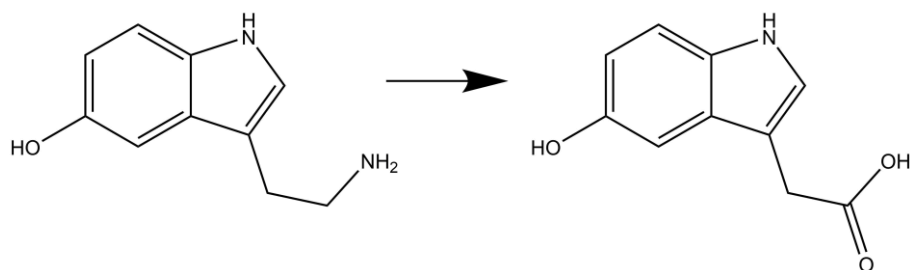
U istom istraživanju, Zaitsev se bavi interakcijom ceruloplazmina s nizom biogenih amina poput serotonina, epinefrina, norepinefrina i dopamina, za koje primijećuje vezanje na cjelinu 6, u blizini labilnog bakrovog centra.



Slika 23. Reakcija oksidacija norepinefrina i epinefrina u adrenokrom koja se odvija na ceruloplazminu.



Slika 24. Reakcija oksidacije dopamina u aminokrom koja se odvija na ceruloplazminu.



Slika 25. Reakcija oksidacije serotonina u 5-hidroksiindol-3-etansku kiselinu koja se odvija na ceruloplazminu.

#### 2.5.4. Ceruloplazmin kao transporter bakrovih iona

Uloga ceruloplazmina kao transportnog proteina za bakar istakla se budući da je 90 do 95 % bakra u krvnom serumu vezano na ceruloplazmin, čime je omogućen prijenos bakra iz krvi u druge organe i tkiva gdje je potreban drugim metaloproteinima. Preostalih 5 do 10 % su kompleksi bakra sa serumskim albuminom i histidinom, koji se mogu lako dijalizirati. Oni se smatraju ključnima u prijenosu bakrovih vrsta iz probavnog sustava do jetre prilikom apsorpcije bakrovih iona iz prehrane. Razlika u koncentracijama bakrovih iona u eritrocitima i

krvnoj plazmi vrlo je mala, no bakrovi ioni su u eritrocitima većinom vezani na Cu/Zn SOD. Takvi su ioni metabolički inertni, čime krvna plazma dobiva dodatnu važnost.

Jednom kada ceruloplazmin dođe u krv, ima vrijeme poluživota od 54 sati, dok bakar unesen prehranom ima vrijeme poluživota od 12 sati. Takav vremenski razmak daje dovoljno vremena proteinu da inkorporira bakrove ione, koji god protein pokazivao potrebu za uklapanjem istoga. Istraživanja s radioaktivno obilježenim bakrovim ionima pokazala su kako nije primjetna radioaktivnost izvan jetre sve dok se ne sintetizira novi ceruloplazmin koji na sebi nosi radioaktivno obilježene bakrove ione, što potvrđuje pretpostavku da je sinteza ceruloplazmina ključan korak u prijenosu bakrovih iona među tkivima. Kako se bakrovi ioni prenose u druga tkiva, radioaktivnost u jetri je opadala. Radioaktivnost je tako pronađena u jetrenoj i moždanoj citokrom *c* oksidazi, u jetrenoj superoksidnoj dismutazi, ali i u albuminima te pojedinačnim aminokiselinama, što ne isključuje mogućnost da je radioaktivni bakar prisutan i u dismutazi i citokrom *c* oksidazi podrijetlom iz izvora koji nije ceruloplazmin.

Transport bakrovih iona ceruloplazminom zahtijeva specifične receptore u mehanizmu prijenosa. Prvi korak u mehanizmu je redukcija bakrovih iona na ceruloplazminu na temelju oksidacije nekog od mogućih supstrata. Ukoliko se taj proces odvija na membrani stanice, bakrov(I) ion se kao vrlo pokretna vrsta lako veže na odgovarajući receptor, a ako je ceruloplazmin već unutar stanice, receptor nije niti potreban. Reducirani bakrovi ioni se vežu na apoenzim, čijim vezanjem dolazi do aktivacije u holoenzim praćeno oksidacijom bakrovih(I) iona. Naravno, oksidacija bakrovih(I) iona zahtijeva i redukciju molekule kisika u molekulu vode. Ovakav mehanizam transporta bakrovih iona na proteine tj. apoenzime uzima u obzir i koliko je bakrov(I) ion podložan izmjenama i koliko je bakrov(II) ion stabilan u proteinima, kada se jednom na njih veže. Time ceruloplazmin pokazuje još jednu ulogu kao kuproksidaza i transporter bakrovih iona.

#### 2.5.5. Antioksidantsna uloga ceruloplazmina

Ceruloplazmin može djelovati i antioksidantsno, sprječavajući sintezu slobodnih radikalskih intermedijera tijekom oksidacije željezovih iona. Naime, tijekom reakcije s hidrogenkarbonatom ili citratom, ranije spomenutim spojevima koji mogu provoditi oksidaciju željezovih iona, omjer Fe(II) i O<sub>2</sub> je 3:1. Takav omjer ostavlja mogućnost stvaranja radikala, dok je u reakciji koju kontrolira ceruloplazmin takav omjer 4:1 što onemogućuje

sintezu radikala poput superoksidnih ili peroksidnih iona direktnim utjecajem na stehiometriju reakcije. Ceruloplazmin može biti korišten i kao pretraživač superoksidnih radikal-aniona, čime se funkcionalno približava (Cu/Zn)-SOD, no njezina je aktivnost 3000 puta veća, a predloženo je i da su mehanizmi kojim rade ta dva enzima različiti. Inhibicijom stvaranja radikala i njihovom pretvorbom u, za stanicu sigurne, metaboličke produkte, ceruloplazmin inhibira i dvije reakcije koje su ovisne o radikalima nastalih djelovanjem ksantin-oksidge na hipoksantin, a to su redukcija citokrom c oksidge te tetrazola. Uz navedene aktivnosti, ceruloplazmin može inhibirati peroksidaciju lipida, aktivirati glutation-ovisnu peroksidaznu aktivnost te poticati ekspresiju NO sintaze kako bi se sintetizirao dušikov(II) oksid koji reagira s radikalskim vrstama iz okoline. Tako ceruloplazmin postaje efektivan antioksidans koji sprječava oksidativnu štetu na lipide i proteine.

Povezano s antioksidansnom funkcijom, ceruloplazmin se ponaša i kao modulator odgovora organizma na infekciju ili upalu. Povećanjem koncentracije dva do tri puta u odnosu na uobičajenu, stvarajući interakcije s nizom neutrofilnih proteina (mijeloperoksidaza, lipogenaza, itd.), obavlja svoju imunomodulatornu funkciju i tako postaje važan dio imunološkog odgovora. Inhibicija ovih medijatora upalnih procesa ne utječu na ceruloplazminsku oksidaznu aktivnost čak ni nakon stvaranja kompleksa.

#### 2.5.6. Ceruloplazmin – što sve može raditi?

Može se zaključiti kako ceruloplazmin pokazuje čitav niz funkcija:

- feroksidazna aktivnost
- oksidacija (a)biogenih amina
- transport bakrovih iona
- antioksidansna aktivnost
- interakcija s laktoferinom.<sup>26-29</sup>

U posljednjih nekoliko godina, znanstvena zajednica fokusirala se na utjecaj ceruloplazmina na neurodegenerativne bolesti poput Parkinsonove i Alzheimerove bolesti. Nije sporan utjecaj poremećaja metabolizma bakra i željeza na homeostazu u mozgu te neurološke posljedice narušene homeostaze, no predmet istraživanja postaje upravo utjecaj povećane koncentracije željezovih i bakrovih iona na rad mozga. Niz znanstvenih radova to problematizira, no bez sporazumnog odgovora na pitanje povezanosti poremećaja u radu ceruloplazmina s neurodegenerativnim bolestima. Kao primjer proteina s mnogim funkcijama,

mogućnost postojanja ovakve funkcije nije zanemariva i ne treba čuditi, no istraživanja te funkcije tek su započeta, što ostavlja ceruloplazmin kao protein od posebnog zanimanja znanstvene zajednice.



## § 3. LITERATURNI IZVORI

1. J. T. Rubino, K. J. Franz, *J. Biol. Inorg. Chem.* **107** (2012) 129-143.
2. C.L. Dupont, A. Butcher, R.E. Valas, P.E. Bourne, G. Caetano-Anollés, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107** (2010) 10567–10572.
3. E. Frieden, *Adv. Exp. Med. Biol.* **48** (1974) 1-29.
4. E. Frieden, *Caeruloplasmin: a multi-functional metalloprotein of vertebrate plasma*, Biological roles of copper. Ciba Foundation Symposium No. 79, London, 1980., zbornik radova str. 93-124.
5. R. G. Pearson, *J. Am. Chem. Soc.* **85** (1963) 3533-3539.
6. J. S. Griffith, L. E. Orgel, *Q. Rev. Chem. Soc.* **11** (1957) 381-393.
7. <http://hyperphysics.phy-astr.gsu.edu/hbase/Organic/Pc.html> (datum pristupa 29. travnja 2020.)
8. <https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/azurin> (datum pristupa 29. travnja 2020.)
9. <https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/copper-zinc-superoxide-dismutase> (datum pristupa 29. travnja 2020.)
10. <https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/hemocyanin> (datum pristupa 29. travnja 2020.)
11. N. Takahashi, T. L. Ortel, F. W. Putnam, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81** (1984) 390-394.
12. V. B. Vasilyev, *Biometals* **32** (2019) 195-210.
13. I. Zaitseva, V. N. Zaitsev, G. Card, K. Moshkov, B. Bax, A. Ralph, P. F. Lindley, *J. Biol. Inorg. Chem.* **1** (1996) 15-23.
14. I. Bento, C. Peixoto, V. N. Zaitsev, P. F. Lindley, *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **63** (2007) 240-248.
15. I. Bento, L. O. Martins, G. G. Lopez, M. A. Carrondo, P. F. Lindley, *Dalton Trans.* **21** (2005) 3507-3513.
16. P. F. Lindley, G. Card, I. Zaitseva, V. N. Zaitsev, B. Reinhammar, E. Selin-Lindgren, K. Yoshida, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2** (1997) 454-463.

17. E. Frieden, H. S. Hsieh, *Ceruloplasmin: the copper transport protein with essential oxidase activity*, Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology, Volume 44, Tallahassee, 1976., Zbornik radova str. 187-236.
18. Y. Takahashi, S. Miyajima, S. Shirabe, S. Nagataki, A. Suenaga, J. D. Gitlin, *Hum. Mol. Genet.* **5** (1996) 81-84.
19. K. Yoshida, K. Furihata, S. Takeda, A. Nakamura, K. Yamamoto, H. Morita, S. Hiyamuta, S. Ikeda, N. Shimizu, N. Yanagisawa, *Nat. Genet.* **9** (1995) 267-272.
20. H. Miyajima, Y. Nishimura, K. Sakamoto Mizoguchi, T. Shimizu, N. Honda, *Neurology* **37** (1987) 761-767.
21. <https://rarediseases.org/rare-diseases/aceruloplasminemia/> (datum pristupa 1.svibnja 2020.)
22. <https://ghr.nlm.nih.gov/condition/aceruloplasminemia> (datum pristupa 1. svibnja 2020.)
23. <https://en.wikipedia.org/wiki/Deferoxamine> (datum pristupa 1. svibnja 2020.)
24. N. Kerkar, E. A. Roberts, *Clinical and Translational Perspectives on WILSON DISEASE*, Elsevier Inc., London, 2019., str. 77-84.
25. N. E. Hellman, S. Kono, G. M. Mancini, A. J. Hoogebom, G. J. De Jong, J. D. Gitlin, *J. Biol. Chem.* **277** (2002) 46632-46638.
26. N. J. Blackburn, M. Ralle, R. Hassett, D. J. Kosman, *Biochemistry* **39** (2000) 2316-2324.
27. A. Shimizu, J.-H. Kwon, T. Sasaki, T. Satoh, N. Sakurai, T. Sakurai, S. Yamaguchi, T. Samejima, *Biochemistry* **37** (1999) 3034-3042.
28. M. Sato, J. D. Gitlin, *J. Biol. Chem.* **266** (1991) 5128-5134.
29. B. F. Anderson, H. M. Baker, G. E. Nomis, S. V. Rumball, E. N. Baker, *Nature* **344** (1990) 784-787.
30. M. H. K. Shokeir, *Clin. Biochem.* **6** (1973) 9-14.
31. K. Simons, A. G. Bearn, *Biochim. Biophys. Acta* **175** (1969) 260-270.
32. M. D. Poulik, A. G. Bearn, *Clin. Chim. Acta* **7** (1962) 374-382