

Received: 2013.10.12
Accepted: 2014.04.04
Published: 2014.06.30

Ceruloplazmina, hefajstyna i cyklopen: trzy multimiedziowe oksydazy uczestniczące w metabolizmie żelaza u człowieka*

Ceruloplasmin, hephaestin and zyklopen: the three
multicopper oxidases important for human iron metabolism

Diana Wierzbicka, Grażyna Gromadzka

Instytut Psychiatrii i Neurologii, Pracownia Neuroimmunologii II Kliniki Neurologii w Warszawie

Streszczenie

Oksydazy multimiedziowe to grupa białek o aktywności enzymatycznej, które są zdolne do utleniania substratów w reakcjach, którym towarzyszy czteroelektronowa redukcja tlenu cząsteczkowego do dwóch cząsteczek wody. Udowodniono, że niektóre multimiedziowe oksydazy wykazują aktywność ferroksoydazową związaną z ich swoistą strukturą charakteryzującą się obecnością centrów miedziowych, a także miejsc wiązania żelaza. Do grupy tej zalicza się: ceruloplazmina, hefajstyna oraz cyklopen.

Multimiedziowe ferroksoydazy ulegają ekspresji w wielu tkankach. Są zdolne do oksydacji szerokiej gamy substratów. Ceruloplazmina wykazuje również aktywność antyoksydacyjną, bierze też udział w wielu innych procesach biologicznych. Obserwacje dotyczące skutków fenotypowych związanych z brakiem bądź uszkodzeniem genów kodujących multimiedziowe ferroksoydazy, pozwalają przypuszczać, że najważniejszą rolą tych białek jest udział w metabolizmie żelaza. Główną funkcją ceruloplazminy w obrocie żelaza w organizmie jest utlenianie jonów Fe^{2+} do Fe^{3+} , co warunkuje wiązanie żelaza z transferyną (główne białko transportujące żelazo), jak i z ferrytyną (główne białko magazynujące żelazo). Funkcja hefajstyny jako ferroksoydazy warunkuje wiązanie żelaza z apotransferyną w błaszcze właściwej błony śluzowej jelita, co umożliwia dalszy transport żelaza żyłą wrotną do wątroby. Dostępne dane wskazują, że główna rola cykloperu polega na udziale w łóżyskowym transporcie żelaza. Obecność kilku multimiedziowych oksydaz cechujących się aktywnością ferroksoydazową wskazuje na istotność procesu utleniania w metabolizmie żelaza. Dystrybucja tych białek w wielu tkankach umożliwia prawidłowy przebieg obrotu żelaza w organizmie oraz pozwala zapobiec toksycznym następstwom związanym z występowaniem jonów Fe^{2+} . Jony te, uczestnicząc w reakcjach Fentona i Habera-Weissa, przyczyniają się do generowania wolnych rodników z najbardziej reaktywnym biologicznie rodnikiem hydroksylowym włącznie.

Słowa kluczowe:

ceruloplazmina • hefajstyna • cyklopen • oksydazy • metabolizm żelaza

Summary

Multi-copper oxidases are a group of proteins which demonstrate enzymatic activity and are capable of oxidizing their substrates with the concomitant reduction of dioxygen to two water molecules. For some multi-copper oxidases there has been demonstrated ferroxidase activity which is related to their specific structure characterized by the presence of copper centres and iron-binding sites. Three multi-copper oxidases have been included in this group: ceruloplasmin, hephaestin and zyklopen.

* Praca została sfinansowana ze środków przeznaczonych na realizację projektu badawczego MNiSW nr 4716/B/P01/2011/40.

Key words:	Multi-copper oxidases which are expressed in different tissues are capable of oxidizing a wide spectrum of substrates. Multi-copper oxidases are capable of oxidizing a wide spectrum of substrates. Ceruloplasmin exhibits antioxidant activity as well as being involved in many other biological processes. The observations of phenotypic effects of absence or low expression of multi-copper ferroxidase-coding genes suggest that the main role of these proteins is taking part in iron metabolism. The main role of ceruloplasmin in iron turnover is oxidizing Fe^{2+} into Fe^{3+}, a process which is essential for iron binding to transferrin (the main iron-transporting protein), as well as to ferritin (the main iron-storage protein). The function of hephaestin as ferroxidase is essential for iron binding to apotransferrin in the lamina propria of the intestinal mucosa, a process that is important for further transport of iron to the liver by the portal vein. Available data indicate that cyklopen is responsible for the placental iron transport. The presence of three multi-copper oxidases with ferroxidase activity emphasizes the significance of oxidation for iron metabolism. The distribution of multi-copper ferroxidases in many tissues ensures the proper iron turnover in the body as well as preventing toxic effects related to the presence of Fe^{2+} ions. These ions contribute to generation of free radicals, including the highly reactive hydroxyl radical, through the Fenton and Haber-Weiss reactions. ceruloplasmin • hephaestin • cyklopen • oxidases • iron metabolism
Full-text PDF: Word count: Tables: Figures: References:	http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1111136 4384 – 3 95

Adres autorki: Diana Wierzbicka, Instytut Psychiatrii i Neurologii, Pracownia Neuroimmunologii II Kliniki Neurologii, ul. Sobieskiego 9, 02-957 Warszawa; e-mail: diana816@wp.pl

Wykaz skrótów: **apoCp** - apoceruloplazmina; **Cu** - miedź; **DMT1** - transporter metali dwuwartościowych 1 (divalent metal transporter 1); **Fe** - żelazo; **GPI-Cp** - postać ceruloplazminy związanej z glikozylofosfatydyloinozytolem; **HoloCp** - holoceruloplazmina; **IRE** - elementy wiążące żelazo (iron-binding elements); **IRP** - białka regulujące obrót żelaza (iron regulatory proteins); **NTBI** - żelazo niezwiązane z transferyną (non-transferrin bound iron); **OMIM** - baza danych o chorobach uwarunkowanych genetycznie występujących u człowieka (Online Mendelian Inheritance in Man); **OUN** - ośrodkowy układ nerwowy; **TfR** - receptor transferynowy

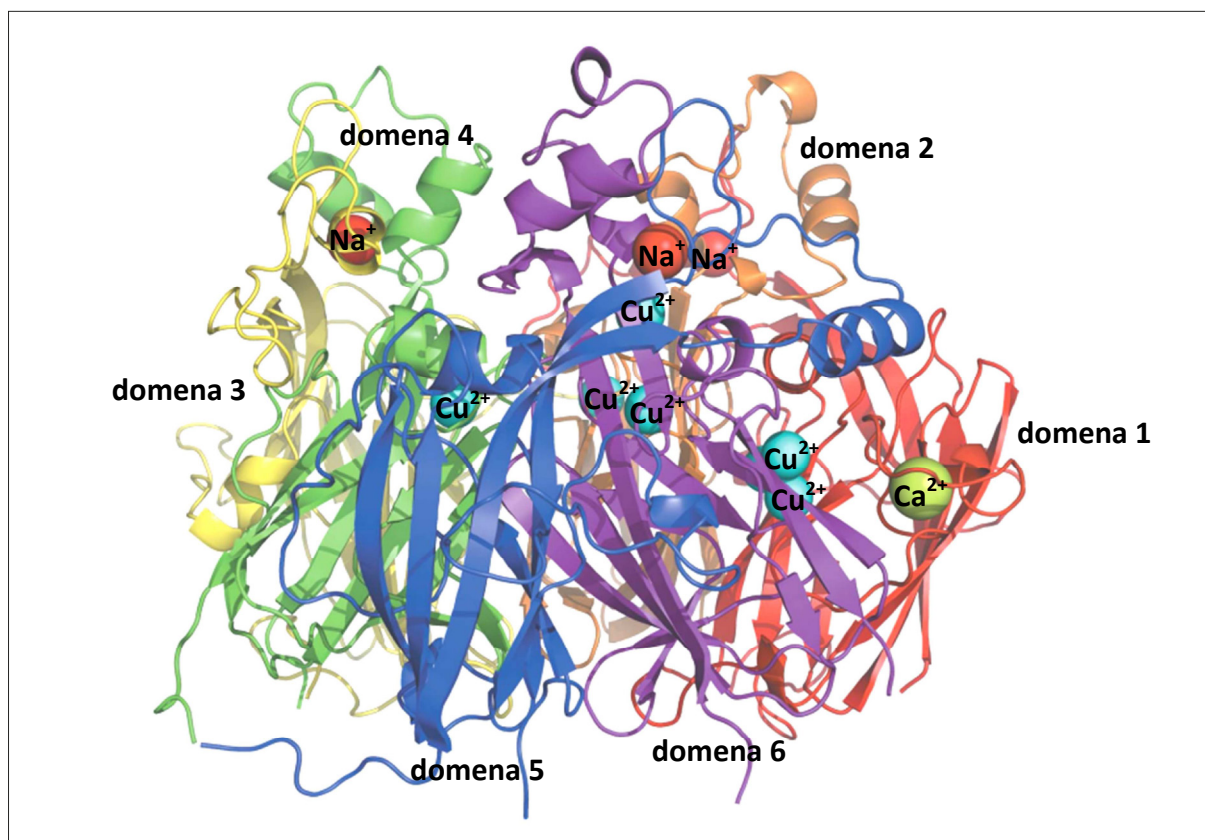
WSTĘP

Oksydazy miedziowe to nieliczna grupa białek o aktywności enzymatycznej, które są zdolne do utleniania substratów w reakcjach, którym towarzyszy czteroelektronowa redukcja tlenu cząsteczkowego do dwóch cząsteczek wody [38,88].

Wykazano, że niektóre multimiedziowe oksydazy wykazują aktywność ferroksoydazową związaną z ich swoją strukturą charakteryzującą się obecnością ligandów wiążących żelazo. Do 2010 r. znane były dwa białka z tej grupy: ceruloplazmina i hefajstyna [16,69]. Ceruloplazmina została po raz pierwszy opisana w 1948 r. przez Holmberga i Laurella jako białko zawierające w swojej strukturze 8 atomów miedzi (Cu), charakteryzujące się błękitnym zabarwieniem w roztworach (stąd wzięła się nazwa tego białka, która dosłownie oznacza „niebieska substancja osoczowa”).

W publikacji, w której po raz pierwszy opisano i scharakteryzowano ceruloplazminę, wysunięto przypuszczenie, że prawdopodobnie większość miedzi zawartej w surowicy ma postać związaną z tym białkiem [11,39,52]. Hipoteza została potwierdzona w późniejszych badaniach – obecnie uważa się, że ceruloplazmina przenosi około 95% miedzi zawartej we krwi [71]. Inna multimiedziowa proteina została opisana w 1999 r. przez Vulpego; jej nazwa: hefajstyna pochodzi od imienia greckiego boga Hefajstosa zajmującego się obróbką metali [20]. W 2010 r. scharakteryzowany został cyklopen – białko multimiedziowe, którego nazwa ma również związek z mitologią grecką i pochodzi od cyklopów – jednookich olbrzymów, którzy w kuźni Hefajstosa kuli pioruny dla Zeusa [87].

Unikalną cechą multimiedziowych ferroksoydaz, wyróżniającą je spośród innych białek miedziolależnych, jest obecność centrów miedziowych typu T1, T2 lub T3, klasyfikowanych w oparciu o cechy spektroskopowe i magnetyczne.



Ryc. 1. Schemat struktury przestrzennej cząsteczki ceruloplazminy (zaznaczono obszary stanowiące poszczególne domeny wiązania miedzi i miejsca wiązania jonów Cu^{2+} , Ca^{2+} i Na^{+}) (wg [7] zmodyfikowano)

tyczne, które odzwierciedlają strukturę miejsc wiązania miedzi [16,68]. Zarówno ceruloplazmina, jak i dwie pozostałe miedziowe ferrokasydazy, mają unikalne centrum aktywne - grupę prostetyczną złożoną z 3 typów centrów miedziowych. Jak wynika z informacji dostępnych w literaturze, centrum T1 służy jako akceptor elektronów, podczas gdy klastery obejmujące centra T2 i T3 jest obszarem, w którym zachodzi wiązanie i redukcja tlenu cząsteczkowego do wody. Za najważniejszą cechę centrów miedziowych T1 jest uważana intensywna absorpcja przy długości fali 610 nm. Jednak wielu badaczy wykazywało nierówności spektroskopowe i kinetyczne między jonami miedzi zlokalizowanymi w centrach T1, np. jeden z podtypów T1a ulega szybkiej reoksydacji, podczas gdy podtyp T1b wykazuje zdolność do reoksydacji trwającej kilka minut. Podtypy te różnią się także położeniem szczytów w widmach spektroskopii elektronowego rezonansu paramagnetycznego oraz wartościami potencjałów redoks. Centrum miedziowe T2 nie wykazuje optycznej absorpcji, ale ma właściwości paramagnetyczne, a zatem charakterystyczne widmo w elektronowym rezonansie paramagnetycznym. Centrum miedziowe T3 jest diamagnetyczne, ma najwyższy potencjał redoks, działa jako dwuelektronowy akceptor lub donor i jest niezbędne do redukcji cząsteczki tlenu. Ligandami wiążącymi jony miedzi w centrach T2 i T3 są cztery pary reszt histydyny, a ligandami miedzi w centrum T1 są: cysteina, dwie histydyny i metionina [10,51,71,82,87,89].

CHARAKTERYSTYKA OGÓLNA MULTIMIEDZIOWYCH FERROKASYDAZ

Ceruloplazmina

Ceruloplazmina jest uważana za główną miedzioproteinę osocza. Po odkryciu aktywności ceruloplazminy jako katalizatora reakcji utleniania Fe^{2+} do Fe^{3+} proponowano zmianę jej nazwy na ferrokasydazę (ferrokasydazę I, ferro: O2 oksydoreduktazę) [37,40,85].

Gen *CPN* jest umiejscowiony na długim ramieniu chromosomu 3q23-q24 i składa się z 29 eksonów o długości około 65 par zasad. Ekspresja tego genu występuje głównie w wątrobie (choć niską ekspresję ceruloplazminy stwierdzono również m.in. w jelicie grubym, w nerkach, nadnerczach, płucach i w mózgu) [1,34,45]. Syntetyzowane białko ma postać nieaktywną (nazywaną apoceruloplazminą, apoCp), która charakteryzuje się krótkim czasem półtrwania wynoszącym około 5 godzin i brakiem aktywności oksydazowej. Wbudowanie 6-8 atomów miedzi do cząsteczki apoCp warunkuje powstanie dojrzałej, w pełni aktywnej, cząsteczki ceruloplazminy (nazywanej holoceruloplazminą, holoCp). Proces odbywa się w aparacie Golgiego i jest uwarunkowany prawidłową aktywnością białka ATP-azy 7B, która pełni funkcję transportera miedzi w komórce. Holoceruloplazmina ma znacznie dłuższy okres półtrwania (5,5 dnia) niż apoceruloplazmina i jest przenoszona do osocza, gdzie pełni

wiele różnorodnych funkcji, które będą omówione w dalszej części pracy [53,75,89,92].

Ceruloplazmina jest zbudowana z 6 β -bocznych domen, rozmieszczonych na kształt trójkąta (rycina 1). Trzy atomy miedzi, wbudowane do cząsteczki tego białka, tworzą grupę w domenę 1, a trzy inne atomy są rozmieszczone w domenach: 2, 4 i 6. Domena 1 zawierająca 3 atomy miedzi oraz domena 6 tworzą kłaster przypominający swą aktywnością oksydazę askorbinianową. Kłaster jest niezwykle ważny nie tylko dla katalitycznej aktywności ceruloplazminy, ale też dla strukturalnej stabilności białka, ponieważ łączy N-końców i C-końców domenę ceruloplazminy nadając temu białku globularny kształt [11,75].

Hefajstyna

Gen hefajstyny jest umiejscowiony na długim ramieniu chromosomu X (Xq12) i składa się z 20 eksonów o długości około 100 pz [4,13,17,34,47,58]. Ekspresja genu *HEPH* odbywa się głównie w jelicie cienkim, choć jest wykrywana również w łożysku, sercu, mózgu, trzustce. Oksydaza zawiera 1158 reszt aminokwasowych formujących pojedynczy łańcuch polipeptydowy o masie cząsteczkowej 127,8 kDa. Udowodniono, że podobnie, jak to jest w przypadku ceruloplazminy, wbudowanie miedzi do cząsteczki hefajstyny warunkuje powstanie dojrzałego, stabilnego białka (nieodjrzałe białko, niezawierające miedzi jest ubikwitynowane i degradowane w proteasomie). Obecność miedzi w strukturze cząsteczki hefajstyny warunkuje również aktywność ferooksydazową tego białka [47,64]. Analiza predykcyjna dotycząca możliwej sekwencji aminokwasowej hefajstyny wskazuje, że sekwencja ta jest w 50% identyczna do sekwencji aminokwasowej ceruloplazminy [2,12,76]. Hefajstyna jest uważana za blony homolog ceruloplazminy. Podobnie jak ceruloplazmina, hefajstyna jest zbudowana z sześciu domen ułożonych na kształt trójkąta. Oprócz dużej ektodomeny ceruloplazminopodobnej białko to zawiera na C-końcu 86 aminokwasów wchodzących w skład domeny transmembranowej i krótkiego cytosolowego łańcucha [4,40,65].

Cyklopen

Nie określono jeszcze umiejscowienia genu cykloпенu. Wiadomo, że podobnie jak ceruloplazmina i hefajstyna, cyklopen jest 6-domenową multimiedziową oksydazą. Białko jest wytwarzane w wielu tkankach, np. w mózgu, siatkówce oka, nerkach. Jednak głównym miejscem syntezy cykloпенu jest łożysko. Strukturalnie cyklopen wykazuje większą homologię do hefajstyny niż do ceruloplazminy. Podobnie jak hefajstyna, cyklopen zawiera transbłonowy region na C-końcu oraz identyczne miedziowe ligandy [16,68,87].

FUNKCJE MULTIMIEDZIOWYCH OKSYDAZ W ORGANIZMIE CZŁOWIEKA

Ceruloplazmina

Jak wspomniano we wstępie, prawie 95% miedzi zawartej w surowicy ma postać związaną z ceruloplazminą.

Miedź jest zaliczana do mikroelementów, niezbędnych do prawidłowego wzrostu, rozwoju oraz funkcjonowania żywych organizmów. Charakteryzuje się łatwością pobierania i oddawania elektronu (występuje na stopniach utlenienia Cu^+ i Cu^{2+}), dzięki czemu ma zasadnicze znaczenie w wielu procesach biochemicznych [6,52]. W organizmie człowieka miedź wchodzi w skład centrów aktywnych wielu enzymów o różnorodnej ekspresji tkankowej i zróżnicowanych funkcjach [30]. Do enzymów, których aktywność jest uzależniona od jonów miedzi należą m.in.: miedziowo-cynkowa dysmutaza nadutlenkowa (Cu , Zn-SOD, superoxide dismutase), tyrozinaza, oksydaza lizylova, beta-hydroksylaza dopaminy, oksydaza cytochromu c. Enzymy te odgrywają ważną rolę w wielu procesach życiowych, takich jak ochrona antyoksydacyjna, synteza melaniny, tworzenie tkanki łącznej, metabolizm dopaminy, oddychanie mitochondrialne [21,52].

Jednak nadmierne stężenie „wolnych” jonów Cu w komórce (termin „wolna” miedź jest używany w odniesieniu do miedzi niezwiązanej z ceruloplazminą [12]) sprzyja wolnorodnikowemu uszkodzeniu białek, lipidów i kwasów nukleinowych. W obecności anionu nadutlenkowego ($^{\bullet}\text{O}_2^-$) lub innych czynników redukujących (kwas askorbinowy, glutation), jon Cu^{2+} może zostać zredukowany do Cu^+ , który katalizuje reakcję tworzenia rodników hydroksylowych ($\text{OH}^{\bullet}$) z nadutlenku wodoru (H_2O_2) w reakcji Habera-Weissa [21,24]. Miedź może się bezpośrednio wiązać do wolnych grup tiolowych cysteiny, prowadząc do utleniania i wytworzenia wiązań krzyżowych między białkami i w konsekwencji do inaktywacji enzymów czy uszkodzenia białek strukturalnych komórki [25]. Dlatego w komórkach pierwiastek ten pozostaje w postaci związanej z wewnątrzkomórkowymi białkami bogatymi w grupy tiolowe wykazujące duże powinowactwo do jonów Cu (metalotioneiny, glutation). Wewnątrzkomórkowy transport Cu i wbudowywanie tego pierwiastka w cząsteczki enzymów również odbywa się z udziałem wyspecjalizowanych białek [23,80].

Klinicznie zdefiniowane niedobory miedzi występują bardzo rzadko i objawiają się m.in. brakiem apetytu, anemią, parestezjami kończyn, pękaniem naczyń krwionośnych, zaburzeniami metabolizmu glukozy oraz cholesterolu, obniżoną pigmentacją włosów, spadkiem odporności związanym ze zwiększoną podatnością na zakażenia [67]. Znać jest genetycznie uwarunkowane zaburzenie związane z niedoborem miedzi w organizmie. Jest to tak zwany zespół Menkesa [Online, Mendelian Inheritance in Man' (OMIM) # 309400] spowodowany mutacjami genu *ATP7A* umiejscowionego na chromosomie X (Xq21). Mutacje *ATP7A* powodują zaburzenia funkcji ATP-azy 7A, enzymu niezbędnego do prawidłowej jelitowej absorpcji miedzi. Objawy kliniczne tego zespołu są następstwem zaburzeń funkcji wielu enzymów, których aktywność jest uzależniona od jonów miedzi. Do charakterystycznych cech fenotypowych zespołu Menkesa należą: kręte włosy, uchyłki pęcherza moczowego, rozrzedzenie struktur kostnych oraz postępujące zmiany w ośrodkowym układzie nerwowym objawiające się obniżonym napięciem mięśniowym, drgawkami, opóźnieniem rozwoju psychoruchowego.

wego. Większość chorych umiera przed ukończeniem 4 roku życia [6,7,9,44].

Kliniczne skutki akumulacji miedzi w organizmie najlepiej obrazuje choroba Wilsona (chW) – genetycznie uwarunkowane zaburzenie metabolizmu miedzi spowodowane mutacjami genu *ATP7B* [OMIM #277900]. Obraz kliniczny chW jest bardzo różnorodny. Pierwsze objawy występują zwykle między 10 a 40 rokiem życia. U prawie 40% chorych ChW objawia się zaburzeniami funkcji wątroby, u 40% zaburzeniami neurologicznymi, u 15% chorych pierwszym objawem są zaburzenia psychiatryczne. U 5% chorych występują zaburzenia kostno-stawowe, niewydolność nerek, spontaniczne poronienia. Spowodowane mutacjami genu *ATP7B* zaburzenia funkcji ATP-azy 7B powodują, że miedź nie jest wbudowywana do cząsteczki ceruloplazminy, co jest warunkiem powstania dojrzałej cząsteczki tego białka. Ceruloplazmina niezawierająca w cząsteczce miedzi jest nietrwała i nie wykazuje aktywności oksydazowej [22,26].

Mimo że około 95% miedzi w surowicy jest związane z ceruloplazminą wydaje się, że białko to nie pełni funkcji transportera miedzi, ponieważ chorzy z aceruloplazminemią (choroba uwarunkowana genetycznie, spowodowana mutacjami genu *CPN*; [OMIM #604290]) mają prawidłowe stężenie miedzi w tkankach [32,39].

Ceruloplazmina spełnia wiele funkcji katalitycznych, wykazuje aktywność oksydazy tlenu azotu i peroksydazy glutationu [54]. Jest też zdolna do utleniania dużej grupy substratów organicznych, w tym ksenobiotyków (aminy organiczne), amin biogennych, do których należą hormony (adrenalina, noradrenalina) oraz neuroprzekaźniki (dopamina, serotonina) [55,62,94,95]. Funkcja ceruloplazminy jako oksydazy miedziowej pozwala zapobiegać toksycznym skutkom nadmiaru miedzi w komórce, gdyż utleniona postać Cu^{2+} jest mniej toksyczna niż zredukowana Cu^+ . Wykazano, że ceruloplazmina bierze również udział w oksydacji lipoprotein o niewielkiej gęstości (low-density lipoproteins, LDL) [14,27,58,74].

Shokeir i Shreffler wysunęli hipotezę, że ceruloplazmina odgrywa rolę w enzymatycznym transferze miedzi do kuproprotein (enzymów miedziozależnych), takich jak oksydaza cytochromowa czy dysmutaza ponadtlenkowa. Hipoteza znalazła potwierdzenie w obserwacjach dotyczących spadku aktywności oksydazy cytochromowej u chorych z chW [77].

Udowodniono, że ceruloplazmina pełni też funkcje antyoksydacyjne wobec szerokiej grupy związków (uważa się, że ceruloplazmina odpowiada za około 80% właściwości antyoksydacyjnych osocza) [90].

Ceruloplazmina jest zaliczana do grupy dodatnich białek ostrej fazy, gdyż jej wytwarzanie wzrasta w wyniku infekcji i stanów zapalnych, co jest prawdopodobnie związane z odpowiedzią organizmu na towarzyszący tym procesom stres oksydacyjny [74,87].

Pośród funkcji ceruloplazminy niezwiązanych z jej aktywnością oksydazową, warto wymienić wpływ tego białka na procesy krzepnięcia krwi [16,19] oraz angiogenezę [54]. Jak zostało udowodnione ceruloplazmina transportuje również wapń oraz sód [10].

Na podstawie obserwacji dotyczących chorych z aceruloplazminemią wydaje się, że główną rolą ceruloplazminy jest udział w metabolizmie żelaza. Aceruloplazminemia (numer w bazie OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim]: #604290) to choroba uwarunkowana genetycznie charakteryzująca się defektem genu ceruloplazminy *CPN*. Większość mutacji tego genu prowadzi do przedwczesnej terminacji translacji, chociaż opisano także mutacje prowadzące do nieprawidłowego przemieszczania się ceruloplazminy w komórce, a także do zaburzeń w procesie wbudowywania miedzi do cząsteczki apoceruloplazminy. Mutacje genu *CPN* powodują zaburzenia prawidłowej aktywności enzymatycznej ceruloplazminy. U chorych z aceruloplazminemią dochodzi do masywnej akumulacji żelaza w wielu narządach: w mózgu, wątrobie i trzustce. Klinicznie aceruloplazminemia ujawnia się łagodną anemią, uszkodzeniem wątroby, cukrzycą i retinopatią. U chorych obserwuje się również neurodegenerację, która dotyczy głównie pnia mózgu i mózdzku, lecz także jądra ogoniastego i skorupy, a klinicznie ujawnia się w postaci objawów pozapiramidowych, dysartrii, ataksji mózdkowej czy demencji w wieku 45-50 lat. Dlatego aceruloplazminemię zaliczono do grupy chorób neurodegeneracyjnych związanych z akumulacją żelaza (neurodegeneration with brain iron accumulation, NBIA) [1,20,25,37,38,59,63,82,83].

Hefajstyna

Podobnie jak ceruloplazmina, hefajstyna również pełni funkcję oksydazową wobec substratów organicznych. Jednak, w przeciwieństwie do ceruloplazminy, hefajstyna jest niezdolna do utlenienia amin biogennych, takich jak adrenalina i dopamina, co wskazuje na różnice w specyficzności substratowej między tymi dwiema homologicznymi oksydazami [65,72].

Obserwacje dotyczące zwierząt z genetycznie uwarunkowanym niedoborem hefajstyny sugerują, że główna rola tego białka polega na udziale w metabolizmie żelaza. Defekty genu hefajstyny u zwierząt powodują jelitową akumulację żelaza oraz spadek stężenia żelaza w ustroju. U myszy szczepu *sla* (sex-linked anemia), u których występuje mutacja polegająca na delecji fragmentu mRNA o długości 582 zasad i wytwarzaniu białka o nieprawidłowej długości (skrótowego o 194 aminokwasy) [17], proces pobierania żelaza z kosmków jelitowych do dojrzałych komórek nabłonka jelitowego przebiega prawidłowo, natomiast żelazo nie jest transportowane do innych komórek i tkanek. Brak funkcjonalnej hefajstyny skutkuje hipochromatyczną (niedobarwliwą) anemią mikrocytową i akumulacją żelaza w nabłonku jelitowym [25,33,46].

U człowieka mutacje genu *HFE*, związane z wytwarzaniem nieprawidłowej cząsteczki hefajstyny, wywołują

gromadzenie się żelaza w organizmie. Wykazano, że brak funkcjonalnej hefajstyny obniża ekspresję genu hepcydyny (jest to ważne białko uczestniczące w regulacji metabolizmu żelaza). Skutkuje to nadmiernym, niekontrolowanym wchłanianiem żelaza z jelita i progresywną akumulacją tego pierwiastka w wątrobie, w trzustce, w sercu i w innych narządach i wielonarządową patologią, znaną pod nazwą hemochromatozy [OMIM #235200], a wyrażającą się marskością wątroby, rakiem wątroby, cukrzycą, impotencją, kardiomiopatią, uogólnioną artropatią [29].

Wydaje się więc, że w większości tkanek główną funkcją hefajstyny jest funkcja ferooksydazowa pozwalająca zapobiegać toksyczności jonów Fe^{2+} [12,65].

Cyklopen

Funkcje cykloпенu w organizmie nie zostały w pełni poznane. Dotychczas wiadomo jedynie, że białko to uczestniczy w metabolizmie żelaza.

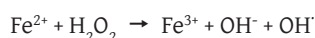
Podsumowując tę część artykułu można stwierdzić, że trzy dotychczas poznane multimiedziowe oksydazy charakteryzują się podobną strukturą, obecnością centrów miedziowych, jak też miejsc wiązania żelaza. Ulegają ekspresji w wielu tkankach. Pełnią rolę oksydazową wobec szerokiej gamy substratów. Ceruloplazmina wykazuje również aktywność antyoksydacyjną, a także pełni wiele innych funkcji w organizmie. Obserwacje dotyczące skutków fenotypowych związanych z brakiem bądź uszkodzeniem genów kodujących multimiedziowe ferooksydazy, pozwalają przypuszczać, że główna rola tych białek polega na udziale w metabolizmie żelaza.

METABOLIZM ŻELAZA W ORGANIZMIE CZŁOWIEKA

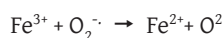
Żelazo odgrywa istotną rolę w wielu procesach biologicznych, jest kofaktorem wielu enzymów, w tym hydroksylazy dopaminy i hydroksylazy tryptofanu [7,29,94]. Jest też zasadniczo ważne dla prawidłowego przebiegu procesów biochemicznych zachodzących w mitochondriach: od dostępności żelaza uzależniona jest funkcja akonitazy (główny enzym w cyklu kwasu cytrynowego), jak też funkcje kompleksów I-IV mitochondrialnego łańcucha oddechowego. Jako składnik hemu, żelazo uczestniczy w procesie transportu tlenu przez hemoglobinę [61].

Żelazo jest metalem przejściowym, zdolnym do przyjmowania różnych stopni utlenienia (jony żelaza mogą występować w postaci utlenionej (Fe^{3+}) lub zredukowanej (Fe^{2+})). Ta cecha predysponuje żelazo do wywoływania działań cytotoksycznych. Jony żelaza mogą uczestniczyć w powstawaniu reaktywnych rodników tlenowych (reactive oxygen species, ROS). W obecności jonów nadtlennokowych (O_2^-) lub innych czynników redukujących jon Fe^{3+} może zostać zredukowany do Fe^{2+} , który jest zdolny do katalizowania procesów powstawania rodników hydroksylowych ($\text{OH}^\cdot$) z nadtlenu wodoru (H_2O_2) w reakcjach Fentona i Habera-Weissa [58,91,92]:

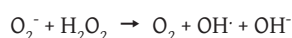
- W reakcji Fentona w obecności jonów metali przejściowych, tj. Fe^{2+} , Cu^+ następuje redukcja nadtlenu wodoru na rodnik wodorotlenkowy i anion wodorotlenkowy:



- Utleniony jon metalu ulega redukcji, a anion rodnika nadtlennokowego utlenieniu do tlenu cząsteczkowego:



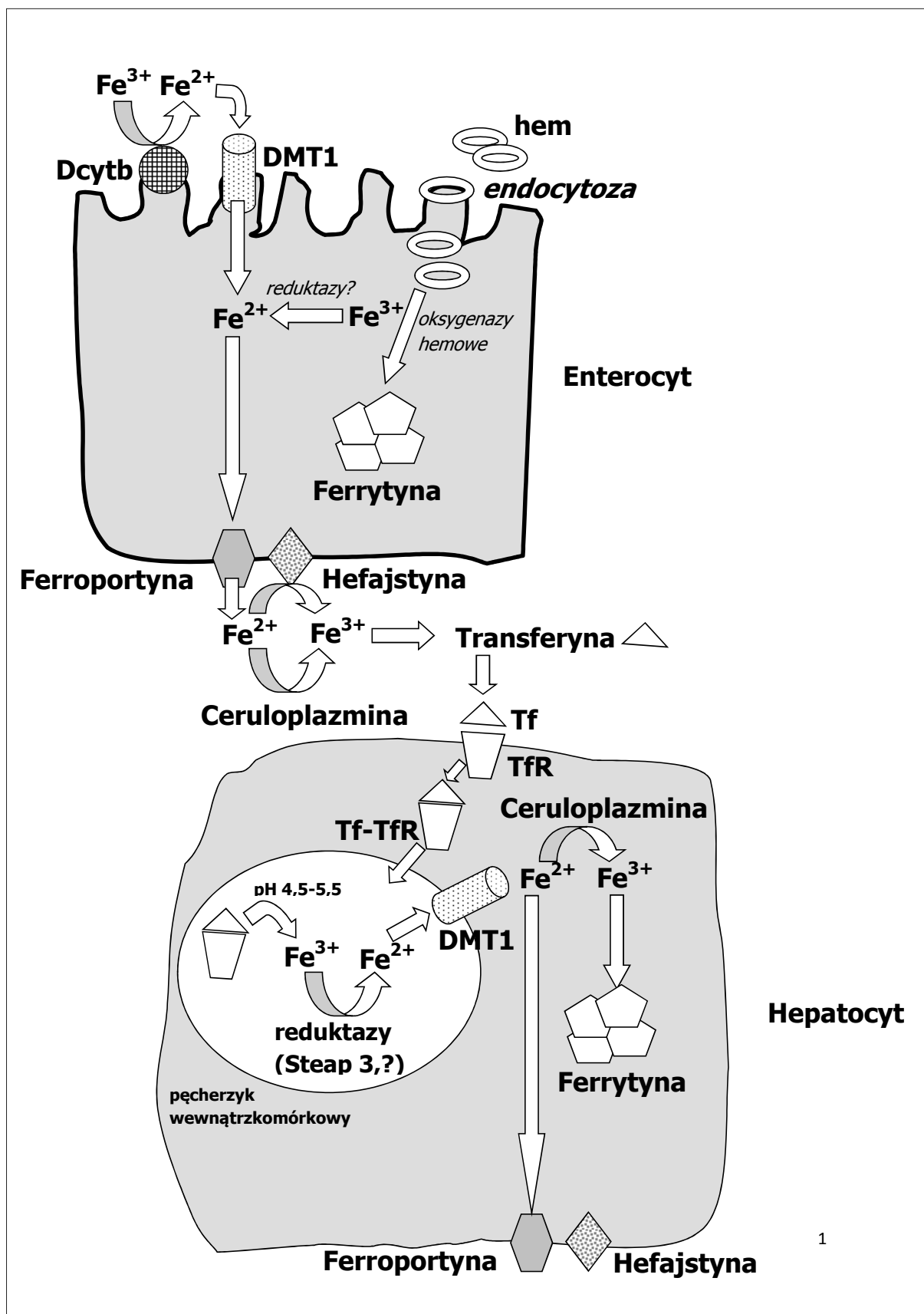
Powstały jon żelaza Fe^{2+} może ponownie wchodzić w reakcję z nadtlennikiem wodoru inicjując powstawanie coraz większych ilości rodnika wodorotlenkowego. Reakcja Fentona i reakcja redukcji jonów Fe^{3+} przez anion rodnika nadtlennokowego stanowią składowe reakcje Habera-Weissa:



Rodnik hydroksylowy jest najsilniej oddziałującym rodnikiem utleniającym w systemach biologicznych [57,59]. Jest zdolny do reagowania z każdą cząsteczką biologiczną. Peroksydacja lipidów zawartych w błonach biologicznych upośledza ich funkcje, zmniejsza płynność, inaktywuje związane z błoną receptory i enzymy, a także zwiększa przepuszczalność dla jonów, w tym jonów Ca^{2+} . Proces ten może dotyczyć błon mitochondrialnych, a następstwem ich uszkodzenia mogą być zaburzenia metabolizmu energetycznego i apoptoza komórek [58]. Dlatego metabolizm żelaza przebiega w taki sposób, by ograniczyć możliwość udziału jonów Fe^{2+} w procesach wolnorodnikowych. Jest to możliwe dzięki aktywności wielu białek, uczestniczących w poszczególnych etapach obrotu żelaza w organizmie (rycina 2). Ponieważ u ssaków nie istnieją mechanizmy regulujące wydalanie żelaza, procesem podlegającym złożonemu mechanizmowi regulacyjnemu jest absorpcja tego pierwiastka [5,34].

Wchłanianie jonów żelaza odbywa się w enterocytach dwunastnicy i górnego odcinka jelita czczego [55].

Żelazo dostarczane do organizmu z dietą ma postać związaną bądź niezwiązaną z cząsteczką hemu. U człowieka żelazo związane z hemem (w postaci hemoglobiny czy mioglobiny, zawartych w pokarmie mięsnym) jest absorbowane bardziej efektywnie niż w postaci niezwiązanej. Dlatego, chociaż w diecie przeważa postać żelaza niezwiązana z hemem, postać związana jest źródłem większej puli żelaza. Żelazo niezwiązane z hemem (w postaci soli czy chelatów) ma głównie postać Fe^{2+} , które przy neutralnym pH w warunkach fizjologicznego ciśnienia parcjalego tlenu może ulegać oksydacji z wytworzeniem jonów Fe^{3+} . Jony te mają tendencję do tworzenia nierozpuszczalnych kompleksów $\text{Fe}(\text{OH})_3$. Żelazo związane z hemem przenika do komórek nabłonka jelit przez błonę komórkową, prawdopodobnie w wyniku endocytozy. Metaboliczną biodostępność żelaza zawartego w hemie zapewnia aktywność oksygenaz hemowych, które katalizują degradację hemu z uwolnieniem żelaza [55,62,76].



Ryc. 2. Schemat metabolizmu żelaza w organizmie człowieka

Głównym transporterem zaangażowanym w proces absorpcji żelaza jest transporter metali dwuwartościowych DMT1 (Divalent Metal Transporter 1), znany również jako: Nramp2, DCT1 oraz SLC11A2 [3,60]. Jest to białko odpowiedzialne za import żelaza ze światła jelita do wnętrza enterocytów oraz za transport żelaza z endosomów do cytosolu w różnych typach komórek. Aby transport ten był możliwy, żelazo w postaci Fe^{3+} musi zostać zredukowane do postaci Fe^{2+} , co dzieje się z udziałem białka błonowego reduktazy Dcytb. Proteina ta wykorzystuje askorbinian jako dawcę elektronów używanych do redukcji Fe^{3+} [5,30].

Przejście żelaza z enterocytów do krążenia jest możliwe dzięki białku błonowemu: ferroportynie. Jest to jedyny poznany eksporter żelaza, którego substratem jest Fe^{2+} . Ferroportyna to duże białko transmembranowe, które poza dwunastnicą występuje również w komórkach wątroby, śledziony, nerek i w komórkach Kupffera [37]. Jeden z podstawowych mechanizmów regulacji metabolizmu żelaza w organizmie dotyczy etapu transferu żelaza z udziałem ferroportyny. W odpowiedzi na nadmiar żelaza komórki wątrobowe wytwarzają białko: hepcydynę, która może się wiązać z ferroportyną i indukować jej internalizację i degradację, przyczyniając się w ten sposób do zablokowania przenoszenia żelaza z enterocytów do krążenia [76,78,79].

Zasadniczą rolę w dalszym transporcie żelaza do komórek odgrywa transferyna – główne białko przenoszące żelazo w krążeniu. Proteina ta składa się z dwóch globularnych płatów, z których każdy łączy się z jedną cząsteczką żelaza. Transferyna niewysyciona żelazem ma okres półtrwania 7-10 dni, natomiast dla transferyny z przyłączonym żelazem czas ten wynosi 2 godziny. Warunkiem włączenia żelaza do cząsteczki transferyny jest zmiana stopnia utlenienia z Fe^{2+} do Fe^{3+} . Za proces odpowiedzialne są dwie opisywane oksydazy multimiedziowe: hefajstyna i ceruloplazmina [13,35,66,87].

Wiązanie żelaza przez transferynę jest zależne od pH, przy czym proces ten przebiega najefektywniej w osoczu o odczynie neutralnym. Transferyna dostarcza żelazo do komórek, wiążąc się na ich powierzchni do receptora transferyny (TfR) [76]. Kompleksy transferyna-TfR są internalizowane do pęcherzyków wewnątrzkomórkowych. W wewnątrz-pęcherzykowym środowisku o niskim pH żelazo jest uwalniane z cząsteczki transferyny, redukowane do Fe^{2+} przez reduktazy (Steap3 w komórkach erytroidalnych i przez nieznanne jeszcze reduktazy w innych typach komórek), a następnie transportowane przez błonę endosomalną do cytosolu za pośrednictwem receptora DMT1 [47].

Wewnątrz komórek żelazo może być magazynowane w postaci związanej z ferrytyną, która jest głównym białkiem magazynującym żelazo w organizmie. Proces wiązania żelaza z ferrytyną jest uwarunkowany zmianą stopnia utleniania Fe (z Fe^{2+} na Fe^{3+}), w czym uczestniczy ceruloplazmina [31,51].

Proces metabolizmu żelaza podlega wielu mechanizmom regulacyjnym. Poza opisaną wcześniej regulacją funkcji

ferroportyny z udziałem hepcydyny, opisano mechanizmy regulacyjne na poziomie komórkowym, które są związane ze zmianami w wytwarzaniu białek uczestniczących w transporcie żelaza. Mechanizmy te dotyczą zmian w stabilności mRNA, translacji i modyfikacji posttranslacyjnych [55]. Jeden z najlepiej opisanych mechanizmów regulujących metabolizm żelaza na poziomie komórkowym, dotyczy syntezy ferrytyny, enzymu mitochondrialnego: akonitazy i ferroportyny. Mechanizm ten polega na wiązaniu się białek nazywanych białkami regulującymi obrót żelaza (iron regulatory proteins, IRP) do sekwencji mRNA nazywanych elementami wiążącymi żelazo (iron-binding elements, IRE). Utworzenie kompleksu IRE/IRP na końcu 5'UTR (untranslated region; region nieulegający translacji) powoduje zahamowanie wczesnych etapów translacji. Związanie IRP na końcu 3' UTR stabilizuje RNA i nasila translację (mechanizm taki opisano dla jednego z TfR (TfR1) i dla DMT1). Wiązanie IRP jest uwarunkowane wewnątrzkomórkowym stężeniem żelaza [37,86,87,93].

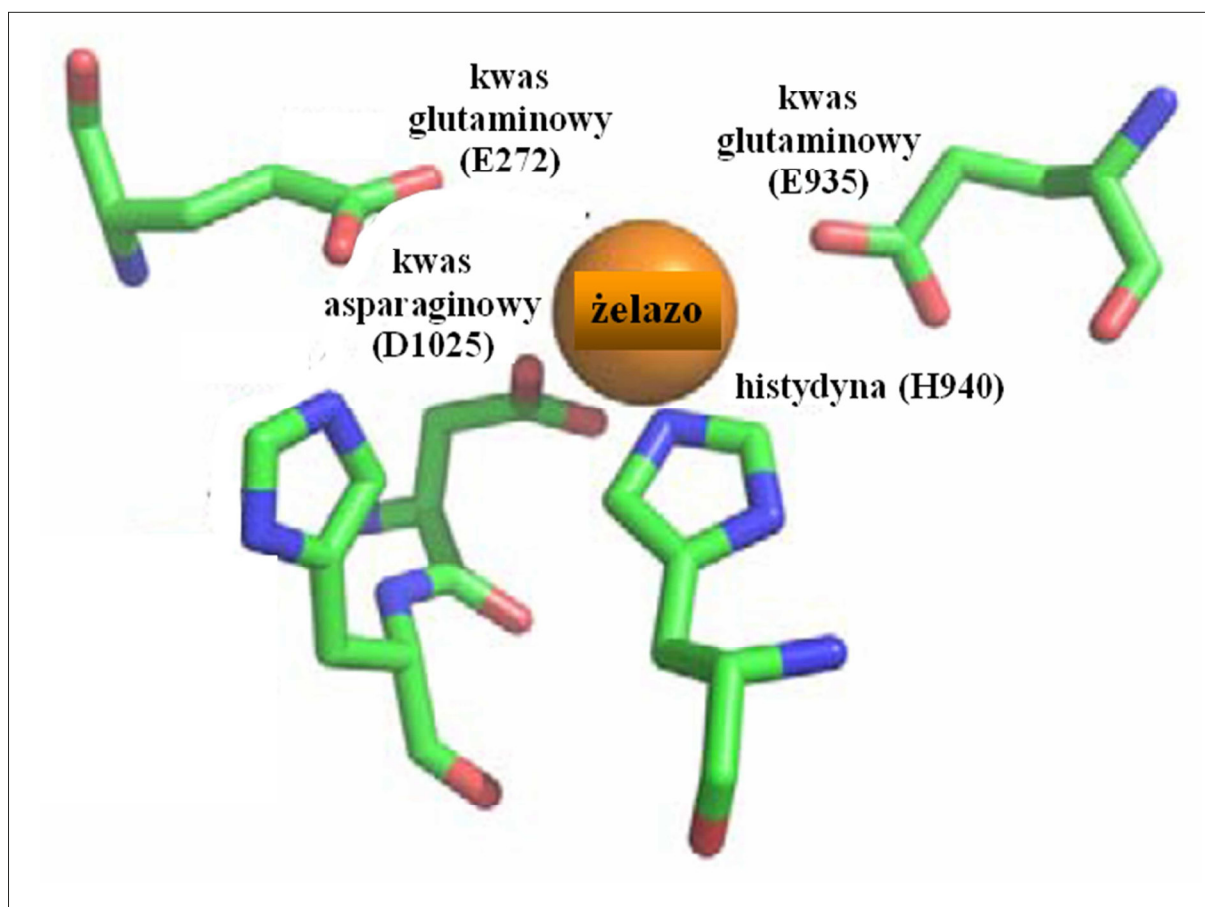
ROLA MULTIMIEDZIOWYCH OKSYDAZ W METABOLIZMIE ŻELAZA U CZŁOWIEKA

Rola ceruloplazminy w metabolizmie żelaza

Na udział ceruloplazminy w metabolizmie żelaza wskazywały obserwacje dotyczące występowania niedokrwistości i akumulacji żelaza w narządach w następstwie spożywania diety bogatej w żelazo, ale ubogiej w miedź. Okazało się, że odpowiednio wysoka podaż miedzi z dietą warunkowała syntezę ceruloplazminy, co zapobiegało wystąpieniu niedokrwistości [82].

Udowodniono, że w cząsteczce ceruloplazminy w pobliżu centrum miedziowego T1 w domenie 4 i 6 są miejsca wiążące żelazo (rycina 3). Oba te miejsca są złożone z dwóch cząsteczek kwasu glutaminowego, jednej cząsteczki kwasu asparaginowego oraz jednej histydyny. Oprócz tego w domenie 2 stwierdzono występowanie obszarów podobnych do ligandów żelazowych w domenach 4 i 6, składających się z dwóch cząsteczek kwasu glutaminowego, jednej cząsteczki kwasu asparaginowego oraz jednej tyrozyny. Jednak wydaje się, że obszar ten nie tworzy miejsca wiązania żelaza, a jego udział w aktywności ferroksoydazowej ceruloplazminy nie został potwierdzony [48,71].

Jak to opisano w części prezentującej przebieg metabolizmu żelaza w organizmie człowieka, ceruloplazmina, utleniając Fe^{2+} do Fe^{3+} , umożliwia wiązania żelaza do transferyny – proces ten jest zasadniczo ważny dla prawidłowego transportu żelaza z krążenia do komórek, odbywającego się za pośrednictwem TfR. Mimo że Fe^{2+} łatwo ulega utlenieniu pod wpływem tlenu, którego ciśnienie parcjalne we krwi tętniczej wynosi 65-100 mmHg, to jednak reakcja ta nie odgrywa znaczącej roli fizjologicznej, ponieważ 98,5% tlenu zawartego we krwi ma postać związaną z hemoglobina. Poza tym osocze ma właściwości redukujące, związane m.in. z dużą zawar-



Ryc. 3. Miejsca wiązania żelaza w domenie 6 cząsteczki ceruloplazminy (wg [74] zmodyfikowano)

tością askorbinianu, który hamuje proces nieenzymatycznego utleniania Fe^{2+} . Wolne jony Fe^{2+} przez udział w reakcjach Fentona i Habera-Weissa mogą uczestniczyć w generowaniu wolnych rodników, w tym bardzo toksycznego rodnika hydroksylowego. Dlatego enzymatyczna reakcja utleniania Fe^{2+} z udziałem ceruloplazminy zapobiega wolnorodnikowemu uszkodzeniu białek, lipidów i DNA [10,55,56]. Proces enzymatycznego utleniania żelaza jest bardziej korzystny również z tego względu, że reakcji nieenzymatycznej towarzyszy wytwarzanie reaktywnych form tlenu, co naraża komórki na uszkodzenie oksydacyjne [81].

Utleniająca funkcja ceruloplazminy wobec jonów Fe^{2+} jest też istotna dla procesu wiązania żelaza z ferrytyną – głównym białkiem magazynującym żelazo w komórce, gdyż proces ten jest uwarunkowany zmianą stopnia utlenienia żelaza z Fe^{2+} do Fe^{3+} [73].

Udział ceruloplazminy w metabolizmie żelaza w mózgu

Do ośrodkowego układu nerwowego (OUN) żelazo jest dostarczane z krążenia w postaci związanej z transferyną. Wychwyt żelaza w mózgu odbywa się głównie za pośrednictwem TfR umiejscowionych na komórkach śródbłonna

naczyń mózgowych (prawdopodobnie istnieje też mechanizm wychwytu żelaza bez udziału TfR) [70].

Po związaniu do TfR, kompleks transferyna-TfR ulega internalizacji do endosomu, gdzie żelazo jest uwalniane z transferyny, redukowane do Fe^{2+} (przez reduktazę Dctyb), przenoszone do cytosolu przez DMT1 i eksportowane na zewnątrz prawdopodobnie za pośrednictwem ferroportyny.

Po przekroczeniu bariery krew-mózg żelazo jest wiązane do transferyny wytwarzanej przez oligodendrocyty i komórki epitelialne spłotu naczyń mózgowych. Głównie w tej postaci żelazo krąży w płynie śródmiąższowym dostarczając ten pierwiastek do komórek OUN [38,70].

Ceruloplazmina, wytwarzana przez hepatocyty, znajdująca się w postaci rozpuszczalnej w surowicy, nie przedostaje się przez barierę krew-mózg. Uważa się, że głównym źródłem ceruloplazminy w mózgu są astrocyty, które wytwarzają postać tego białka związaną z glikozylofosfatydyloinozytolem (GPI-Cp). Ta postać ceruloplazminy odgrywa rolę w metabolizmie żelaza w mózgu. W sytuacji, gdy w OUN nie ma prawidłowo funkcjonującej GPI-Cp, proces utleniania żelaza nie zachodzi z wystarczającą efektywnością. Wskutek tego spada ilość jonów Fe^{3+} , które mogą być związane

przez transferynę, a wzrasta ilość Fe^{2+} niezwiązanych z transferyną (jest to tzw. pula NTBI (non-transferrin bound iron)). Brak GPI-Cp w obrębie OUN skutkuje również akumulacją jonów Fe^{2+} w komórkach, gdyż ferrytyna (główne białko magazynujące żelazo w komórkach) potrafi wiązać wyłącznie Fe^{3+} . Wskutek tego dochodzi do wytworzenia warunków stresu oksydacyjnego spowodowanego generowaniem wolnych rodników w reakcjach Fentona i Habera-Weissa, w których uczestniczą jony Fe^{2+} [20,42,64,68].

W kontekście znaczenia GPI-Cp w mózgowym metabolizmie żelaza istotna wydaje się obserwacja dotycząca intensywnej akumulacji żelaza w astrocytach powodująca utratę 57% tych komórek w 24-miesięcznym okresie obserwacji zwierząt doświadczalnych z aceruloplazminemią. Astrocyty pozostają w bezpośrednim kontakcie z przestrzenią włósnickową w OUN i są zdolne do wychwytu żelaza za pośrednictwem DMT1 (bez udziału TfR1) oraz z udziałem TfR1. W astrocytach ulegają również ekspresji ferroportyna i GPI-Cp – białka wymagane do transportu żelaza na zewnątrz komórki. Dlatego uważa się, że prawdopodobnie to astrocyty pośredniczą w wychwycie żelaza z krążenia i dostarczaniu go do neuronów [3,8,42,70].

Uszkodzenie astrocytów w przebiegu aceruloplazminemii jest prawdopodobnie spowodowane brakiem ferroportyny – błonowego eksportera żelaza, ulegającego ekspresji w komórkach śródbłonkowych bariery krew-mózg, na neuronach, oligodendrocytach, astrocytach, splocie naczyniówkowym i komórkach ependymalnych. Wykazano, że ceruloplazmina warunkuje stabilizację ferroportyny na powierzchni błony podstawnej. W sytuacji niedoboru ceruloplazminy brak funkcjonalnej ferroportyny powoduje zmniejszone wydalenie żelaza i gromadzenie się tego pierwiastka wewnątrz komórek. To może wywoływać depriację neuronów w żelazo [43,61].

Wydaje się też prawdopodobne, że wolne rodniki, generowane w obciążonych żelazem astrocytach, mogą powodować uszkodzenie blisko zlokalizowanych neuronów. Jednak to, że w aceruloplazminemii występuje masywna utrata astrocytów, sugeruje, że neurodegeneracja związana z deficytem GPI-Cp w OUN może być wtórna do utraty wsparcia metabolicznego dostarczanego neuronom przez astrocyty. Astrocyty pozwalają na zachowanie równowagi jonowej i odpowiedniego pH w OUN, dostarczają glukozę i inne substraty metaboliczne dla neuronów, a także usuwają neuroprzekazniki, takie jak glutaminian, uwalniane z synaps oraz inne cząsteczki, które mogą być toksyczne dla komórek nerwowych. Dlatego wydaje się prawdopodobne, że astrocyty giną z powodu toksyczności żelaza akumulującego się w tych komórkach, podczas gdy neurodegeneracja może być wtórna do utraty wsparcia metabolicznego dostarczanego neuronom przez astrocyty [42,45,70].

Rola hefajstyny w metabolizmie żelaza

Podobnie, jak ceruloplazmina, hefajstyna ma miejsca wiążące żelazo w swojej strukturze i wykazuje aktywność ferroksozydazową [86,87].

Miejsce wiązania żelaza w cząsteczce hefajstyny, które znajduje się w domenie 6 jest zbudowane z kilku ligandów: kwasu glutaminowego (E960), histydyny (H965) i kwasu asparaginowego (D996), umiejscowionych w domenie 6 tego białka.

Funkcja hefajstyny jako ferroksozydazy warunkuje wiązanie żelaza z apotransferyną w blaszce właściwej błony śluzowej jelita, co umożliwia dalszy transport żelaza żyłą wrotną do wątroby. Chociaż głównym miejscem syntezy hefajstyny jest jelito, ekspresja tego białka jest również wykrywalna w spłotach nerwowych przewodu pokarmowego, komórkach beta trzustki oraz w oddźwiernikowej części żołądka, w nerkach, śledzionie, płucach, sercu, mózgu oraz łożysku [20]. Dotychczas rola hefajstyny w tych narządach nie została określona. Przypuszcza się jednak, że białko to może pełnić funkcję ochronną zapobiegającą toksycznemu oddziaływaniu reaktywnych form tlenu, wytwarzanych z udziałem jonów Fe^{2+} . Ekspresja hefajstyny w łożysku wskazuje na jej prawdopodobny udział w transporcie żelaza z organizmu matki do płodu [49].

Rola cykloпенu w metabolizmie żelaza

Trzecia poznana dotychczas ludzka oksydaza miedziowa: cyklopen również ma miejsce wiążące żelazo, umiejscowione w domenie 6. Dotychczas ukazała się jedyna praca, w której białko to zostało opisane. Dostępne dane wskazują, że główna funkcja cykloпенu polega na udziale w pobieraniu żelaza przez płód z komórek łożyska [16].

Regulacja ekspresji multimiedziowych ferroksoydaz

Ekspresja multimiedziowych ferroksoydaz jest regulowana przez stężenie miedzi i/lub żelaza w środowisku. Udowodniono, że transkrypcja genu ceruloplazminy jest nasilana w sytuacji niedoboru żelaza, a także w warunkach związanych ze stresem oksydacyjnym [57,60]. W jelicie ekspresja hefajstyny jest regulowana przez stężenie żelaza [18,48], natomiast stężenie żelaza nie wpływa na nasilenie syntezy hefajstyny w sercu [68]. Ekspresja hefajstyny i cykloпенu jest regulowana przez miedź [15,16,60].

PODSUMOWANIE

Obecność kilku multimiedziowych oksydaz cechujących się aktywnością ferroksoydazową podkreśla istotność procesu utleniania w metabolizmie żelaza. Dystrybucja wszystkich trzech multimiedziowych ferroksoydaz w wielu tkankach w organizmie zapewnia ich stały nadmiar, co umożliwia prawidłowy przebieg obrotów żelaza w organizmie, a także pozwala zapobiec toksycznym skutkom związanym z występowaniem jonów Fe^{2+} , które uczestnicząc w reakcjach Fentona i Habera-Weissa przyczyniają się do generowania wolnych rodników, z najbardziej reaktywnym biologicznie rodnikiem hydroksylowym włącznie.

PÍSMIENICTWO

- [1] Abdou M., Shaban H., Gohary M.: Changes in serum zinc, copper and ceruloplasmin levels of whole body gamma irradiated rats. Tenth Radiation Physics & Protection Conference. 27-30 November, Nasr City - Cairo, Egypt- Conference Proceedings, 2010; 17-26
- [2] Amaravadi R., Glerum D.M., Tzagoloff A.: Isolation of a cDNA encoding the human homolog of COX17, a yeast gene essential for mitochondrial copper recruitment. *Hum. Genet.*, 1997; 99: 329-333
- [3] Anderson C.P., Shen M., Eisenstein R.S., Leibold E.A.: Mammalian iron metabolism and its control by iron regulatory proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 2012; 1823: 1468-1483
- [4] Anderson G.J., Frazer D., McKie A., Vulpe C.: The ceruloplasmin homolog hephaestin and the control of intestinal iron asorption. *Blood Cells Mol. Dis.*, 2002; 29: 367-375
- [5] Andrews N.: Forging a field: the golden age of iron biology. *Blood*, 2008; 112: 219-230
- [6] Angelova M., Asenova S., Nedkova V., Kolarova-Koleva R.: Copper in the human organism. *TJS*, 2011; 9: 88-98
- [7] Arredondo M., Martinez R., Nunez M., Ruz M., Olivares M.: Inhibition of iron and copper uptake by iron, copper and zinc. *Biol. Res.*, 2006; 39: 95-102
- [8] Banha J., Marques L., Oliveira R., Martins M., Paixao E., Pereira D., Malho R., Penque D., Costa L.: Ceruloplasmin expression by human peripheral blood lymphocytes: A new link between immunity and iron metabolism. *Free Radic. Biol. Med.*, 2008; 44: 483-492
- [9] Bartee M.Y., Lutsenko S.: Hepatic copper-transporting ATPase ATP7B: function and inactivation at the molecular and cellular level. *Biometals*, 2007; 20: 627-637
- [10] Bento I., Peixoto C., Zaitsev V.N., Lindley P.F.: Ceruloplasmin revisited: structural and functional roles of various metal cation-binding sites. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, 2007; 63: 240-248
- [11] Bielli P., Calabrese L.: Structure to function relationships in ceruloplasmin: a 'moonlighting' protein. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2002; 59: 1413-1427
- [12] Brewer G.J.: Iron and copper toxicity in diseases of aging, particularly atherosclerosis and Alzheimer's disease. *Exp. Biol. Med.*, 2007; 232: 323-335
- [13] Brookes M.J., Hughes S., Turner F.E., Reynolds G., Sharma N., Ismail T., Berx G., McKie A.T., Hotchin N., Anderson G.J., Iqbal T., Tselepis C.: Modulation of iron transport proteins in human colorectal carcinogenesis. *Gut*, 2006; 55: 1449-1460
- [14] Buffone G.J., Brett E.M., Lewis S.A., Iosefsohn M., Hicks J.M.: Limitations of immunochemical measurement of ceruloplasmin. *Clin. Chem.*, 1979; 25: 749-751
- [15] Chen H., Attieh Z.K., Dang T., Huang G., van der Hee R.M., Vulpe C.: Decreased hephaestin expression and activity leads to decreased iron efflux from differentiated Caco2 cells. *J. Cell. Biochem.*, 2009; 107: 803-808
- [16] Chen H., Attieh Z.K., Syed B.A., Kuo Y.M., Stevens V., Fuqua B.K., Andersen H.S., Naylor C.E., Evans W.R., Gambling L., Danzeisen R., Haidar M.B., Usta J., Vylpe C.D., McArdle H.J.: Identification of zyklopen, a new member of the vertebrate multicopper ferroxidase family, and characterization in rodents and human cells. *J. Nutr.*, 2010; 140: 1728-1735
- [17] Chen H., Huang G., Gao H., Attieh Z., McKie A., Anderson G., Vulpe C.: Decreased hephaestin activity in the intestine of copper-deficient mice causes systematic iron deficiency. *J. Nutr.*, 2006; 136: 1236-1241
- [18] Chen H., Su T., Attieh Z., Fox T., McKie A., Anderson G., Vulpe C.: Systematic regulation of hephaestin and Ireg1 revealed in studies of genetic and nutritional iron deficiency. *Blood*, 2013; 102: 1893-1899
- [19] Church W.R., Jernigan R.L., Tolle J., Hewick R.M., Knopf J., Knutson G.J., Nesheim M.E., Mann K.G., Fass D.N.: Coagulation factors V and VIII and ceruloplasmin constitute a family of structurally related proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984; 81: 6934-6937
- [20] Cui R., Duan X.L., Anderson G.J., Qiao Y.P., Yu P., Qian Z.N., Yoshida K., Takeda S., Guo P., Yang Z.L., Chang Y.Z.: Age-dependent expression of hephaestin in the brain of ceruloplasmin-deficient mice. *J. Trace Elem. Med. Biol.*, 2009; 23: 290-299
- [21] Culotta V.C., Klomp L.W., Strain J., Casareno R.L., Krems B., Gitlin J.D.: The copper chaperone for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.*, 1997; 272: 23469-23472
- [22] Członkowska A., Gromadzka G., Szpak G.M., Chabik G.: Choroba Wilsona, Choroba Parkinsona i inne zaburzenia, t.2, red: Sławek J., Friedman A., Bogucki A., Opali G. Via Medica, Gdańsk 2012, 403-420
- [23] Dameron C.T., Harrison M.D.: Mechanisms for protection against copper toxicity. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1998; 67 (5 Suppl.): 1091S-1097S
- [24] de Bie P., van de Sluis B., Klomp L., Wijmenga C.: The many faces of the copper metabolism protein MURR1/COMMD1. *J. Hered.*, 2005; 96: 803-811
- [25] Dusek P., Jankovic J., Le W.: Iron dysregulation in movement disorders. *Neurobiol. Dis.*, 2012; 46: 1-18
- [26] Flora S.J., Mittal M., Mehta A.: Heavy metal induced oxidative stress & its possible reversal by chelation therapy. *Indian J. Med. Res.*, 2008; 128: 501-523
- [27] Friedan E.: Ceruloplasmin: a multi-functional cupro- protein of vertebrate plasma. *Exp. Biol. Med.*, 1982; 2: 159-169
- [28] Gaetke L.M., Chow C.K.: Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology*, 2003; 189: 147-163
- [29] Ganz T.: Hepcidin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation. *Blood*, 2003; 102: 783-788
- [30] Garrick M.D., Golan K.G., Horbinski C., Ghio A.J., Higgins D., Porubcin M., Moore E.G., Hainsworth L.N., Umbreit J.N., Conrad M.E., Feng L., Lis A., Roth J., Singleton S., Garrick L.M.: DMT1: A mammalian transporter for multiple metals. *Biometals*, 2003; 16: 41-54
- [31] Gicquel V., Soriano N., Ferran H., Wojcik F., Palierne E., Tamim S., Jovelin T., McKie A., Gall J., David V., Mosser J.: Identification of 96 single nucleotide polymorphisms in eight genes involved in iron metabolism: efficiency of bioinformatic extraction compared with a systematic sequencing approach. *Hum. Genet.*, 2001; 109: 393-401
- [32] Graf W.D., Noetzel M.J.: Radical reactions from missing ceruloplasmin. The importance of a ferroxidase as an endogenous antioxidant. *Neurology*, 1999; 53: 446-447
- [33] Hahn P., Qian Y., Dentchew T., Chen L., Beard J., Harris Z.L., Dunaief J.L.: Disruption of ceruloplasmin and hephaestin in mice causes retinal iron overload and retinal degeneration with features of age-related macular degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004; 101: 13850-13855
- [34] Hahn P., Ying G., Beard J., Dunaief J.: Iron levels in human retina: sex difference and increase with age. *Neuroreport*, 2006; 17: 1803-1806
- [35] Harris L., Davis-Kaplan S., Gitlin J., Kaplan J.: A fungal multicopper oxidase restores iron homeostasis in aceruloplasminemia. *Blood*, 2004; 103: 4672-4673
- [36] Hasan H.R., Ghadban J.M., Abudal Kadhum Z.I.: Salivary ceruloplasmin ferroxidase & oxidase activities in celiac patients. *Int. J. Biomed. Sci.*, 2012; 8: 163-170
- [37] He X., Hahn P., Iacovelli J., Wong R., King C., Bhisitkul R., Massaro-Giordano M., Dunaief J.L.: Iron homeostasis and toxicity in retinal degeneration. *Prog. Retin Eye Res.*, 2007; 26: 649-673

- [38] Hellman N.E., Kono S., Miyajima H., Gitlin J.D.: Biochemical analysis of missense mutation in aceruloplasminemia. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 1375-1380
- [39] Holmberg C.G., Laurel C.B.: Investigations in serum copper. *Acta Chem. Scand.*, 1948; 2: 550-556
- [40] Hudson D., Curtis S., Smith V., Griffiths T., Wong A., Scudamore C., Buchan A., MacGillivray T.: Human hephaestin expression is not limited to enterocytes of the gastrointestinal tract but is also found in the antrum, the enteric nervous system, and pancreatic β cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 2010; 298: 425-432
- [41] Jacob R.A., Skala J.H., Omaye S.T., Turnlund J.R.: Effect of varying ascorbic acid intakes on copper absorption and ceruloplasmin levels of young men. *J. Nutr.*, 1987; 117: 2109-2115
- [42] Jeong S.Y., Dvaid S.: Glycosylphosphatidylinositol- anchored ceruloplasmin is required for iron efflux from cells in the central nervous system. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 27144-27148
- [43] Klomp L.W., Lin S.J., Yuan D.S., Klausner R.D., Culotta V.C., Gitlin J.D.: Identification and functional expression of *HAH1*, a novel human gene involved in copper homeostasis. *J. Biol. Chem.*, 1997; 272: 9221-9226
- [44] Kochanowska I., Hampel-Osipowicz E., Waloszczyk P.: Choroba Menkesa - genetyczny defekt metabolizmu miedzi. *Neurol. Dziec.*, 2008; 17: 63-68
- [45] Kristinsson J., Snaedal J., Tórsdóttir G., Jóhannesson T.: Ceruloplasmin and iron in Alzheimer's disease and Parkinson's disease: a synopsis of recent studies. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.*, 2012; 8: 515-521
- [46] Kuo Y.M., Su T., Chen H., Attieh Z., Syed B.A., McKie A.T., Anderson G.J., Gitschier J., Vulpe C.D.: Mislocalisation of hephaestin, a multicopper ferroxidase involved in basolateral intestinal iron transport, in the sex linked anaemia mouse. *Gut*, 2004; 53: 201-206
- [47] Lee D.A., Goodfellow J.M.: The p-H induced release of iron from transferrin investigated with cintinum electrostatic model. *Biophys. J.*, 1998; 74: 2747-2759
- [48] Lee S.M., Attieh Z.K., Son H.S., Chen H., Bacouri-Haidar M., Vulpe C.D.: Iron repletion relocalizes hephaestin to a proximal basolateral compartment in polarized MDCK and Caco2 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2012; 421: 449-455
- [49] Li Y., Bai B., Cao X., Yan H., Zhuang G.: Ferroportin 1 and hephaestin expression in BeWo cell line with different iron treatment. *Cell. Biochem. Funct.*, 2012; 30: 249-255
- [50] Linder M.C., Hazegh-Azam M.: Copper biochemistry and molecular biology. *Am. J. Clin. Nutr.*, 1996; 63: 797S-811S
- [51] Machonkin T.E., Zhang H.H., Hedman B., Hodgson K.O., Solomon E.I.: Spectroscopic and magnetic studies of human ceruloplasmin: identification of a redox-inactive reduced type 1 copper site. *Biochemistry*, 1998; 37: 9570-9578
- [52] Maltais D., Desroches D., Aouffen M., Mateescu M.A., Wang R., Paquin J.: The blue copper ceruloplasmin induces aggregation of newly differentiated neurons: a potential modulator of nervous system organization. *Neuroscience*, 2013; 121: 73-82
- [53] Merle U., Tuma S., Herrmann T., Muntean V., Volkmann M., Gehrke S.G., Stremmel W.: Evidence for a critical role of ceruloplasmin oxidase activity in iron metabolism of Wilson disease gene knockout mice. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 2010; 25: 1144-1150
- [54] Mordak-Domagala M., Kuliszkiwicz-Janus M.: Angiogenesis in multiple myeloma - clinical implications., *Acta Haematol. Pol.*, 2007; 38: 177-186
- [55] Morgan E.H., Oates P.S.: Mechanisms and regulation of intestinal iron absorption. *Blood Cells Mol. Dis.*, 2002; 29: 384-399
- [56] Morris C.J., Earl J.R., Trenam C.W., Blake D.R.: Reactive oxygen species and iron - a dangerous partnership in inflammation. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 1995; 27: 109-122
- [57] Mukhopadhyay C.K., Mazumder B., Fox P.L.: Role of hypoxia-inducible factor-1 in transcriptional activation of ceruloplasmin by iron deficiency. *J. Biol. Chem.*, 2000; 275: 21048-21054
- [58] Mukhopadhyay C.K., Mazumder B., Lindley P.F., Fox P.L.: Identification of the prooxidant site of human ceruloplasmin: a model for oxidative damage by copper bound to protein surfaces. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997; 94: 11546-11551
- [59] Mzhel'skaya T.I.: Biological functions of ceruloplasmin and their deficiency caused by mutation in genes regulating copper and iron metabolism. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2000; 130: 719-727
- [60] Nittis T., Gitlin J.: Role of copper in proteasome-mediated degradation of the multicopper oxidase hephaestin. *J. Biol. Chem.*, 2004; 279: 25696-25702
- [61] Oide T., Yoshida K., Kaneko K., Ohta M., Arima K.: Iron overload and antioxidative role of perivascular astrocytes in aceruloplasminemia. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, 2006; 32: 170-176
- [62] Papanikolau G., Pantopoulos K.: Iron metabolism and toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2005; 202: 199-211
- [63] Patel B.N., Dunn R.J., Jeong S.Y., Zhu Q., Julien J.P., David S.: Ceruloplasmin regulates iron levels in the CNS and prevents free radical injury. *J. Neurosci.*, 2002; 22: 6578-6586
- [64] Patel M., Ramavataram D.V.: Non transferrin bound iron: nature, manifestations and analytical approaches for estimation. *Indian J. Clin. Biochem.*, 2012; 27: 322-332
- [65] Petrak J., Vyoral D.: Hephaestin - a ferroxidase of cellular iron export. *Inst. J. Biochem. Cell Biol.*, 2005; 37: 1173-1178
- [66] Pribyl T.: Serum polyphenol oxidase activity (ceruloplasmin) in conventional laboratory animals and man. *Folia Biol.*, 1978; 24: 136-141
- [67] Prohaska J.R.: Impact of copper deficiency in humans. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 2014; 1314: 1-5
- [68] Prohaska J.R.: Impact of copper limitation on expression and function of multicopper oxidases (ferroxidases). *Adv. Nutr.*, 2011; 2: 89-95
- [69] Qian M.Z., Chang Z.Y., Leung G., Du R.J., Zhu L., Wang Q., Niu L., Xu Y.J., Yang L., Ho K.P., Ke Y.: Expression of ferroportin hephaestin and ceruloplasmin in rat heart. *Biochim. Biophys. Acta*, 2007; 1772: 527-532
- [70] Qian Z.M., Shen X.: Brain iron transport and neurodegeneration. *Trends Mol. Med.*, 2001; 7: 103-108
- [71] Quintanar L., Gebhard M., Wang T.P., Kosman D.J., Solomon E.I.: Ferrous binding to the multicopper oxidases *Saccharomyces cerevisiae* Fet3p and human ceruloplasmin: contributions to ferroxidase activity. *J. Am. Chem. Soc.*, 2004; 126: 6579-6589
- [72] Ranganathan P.N., Lu Y., Fuqua B.K., Collins F.J.: Immunoreactive hephaestin and ferroxidase activity are present in the cytosolic fraction of rat enterocytes. *Biomaterials*, 2012; 25: 687-695
- [73] Roeser H.P., Lee G.R., Nacht S., Cartwright G.E.: The role of ceruloplasmin in iron metabolism. *J. Clin. Invest.*, 1970; 49: 2408-2417
- [74] Salih A.M.: Serum ceruloplasmin, copper and iron levels as a risk factors for coronary heart diseases (CHD). *Bahdad Sci. J.*, 2010; 7: 372-381
- [75] Sedlak E., Wittung-Stafshede P.: Discrete roles of copper ions in chemical unfolding of human ceruloplasmin. *Biochemistry*, 2007; 46: 9638-9644
- [76] Sharp P.: The molecular basis of copper and iron metabolism. *Proc. Nutr. Soc.*, 2004; 63: 563-569
- [77] Shokeir M.H., Shreffler D.C.: Cytochrome oxidase deficiency in Wilson's disease: a suggested ceruloplasmin function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1969; 62: 867-872

- [78] Song D., Dunaief J.L.: Retinal iron homeostasis in health and disease. *Front Aging Neurosci.*, 2013; 5: 24
- [79] Song N., Wang J., Jiang H., Xie J.: Ferroportin 1 but not hephaestin contributes to iron accumulation in a cell model of Parkinson's disease. *Free Radic. Biol. Med.*, 2010; 48: 332-341
- [80] Stern B.R., Solioz M., Krewski D., Aggett P., Aw T.C., Baker S., Crump K., Dourson M., Haber L., Hertzberg R., Keen C., Meek B., Rudenko L., Schoeny R., Slob W., Starr T.: Copper and human health: biochemistry, genetics and strategies for modeling dose-response relationships. *J. Toxicol. Environ. Health*, 2007; 10: 157-222
- [81] Suzuki Y., Yoshida K., Aburakawa Y., Kuroda K., Kimura T., Terada T., Kono S., Miyajima H., Yahara O.: Effectiveness of oral iron chelator treatment with deferrioxamine in an aceruloplasminemia patient with a novel ceruloplasmin gene mutation. *Intern. Med.*, 2013; 52: 1527-1530
- [82] Syed B., Beamont J., Patel A., Naylor C., Bayele H., Joannou C., Rowe P., Evans R., Srai K.: Analysis of the human hephaestin gene and protein: comparative modeling of the N-terminus ecto-domain based upon ceruloplasmin. *Protein Eng.*, 2002; 15: 205-214
- [83] Tapryal N., Mukhopadhyay C., Das D., Fox P.L., Mukhopadhyay C.K.: Reactive oxygen species regulate ceruloplasmin by a novel mRNA decay mechanism involving its 3'-untranslated region: implications in neurodegenerative diseases. *J. Biol. Chem.*, 2009; 284: 1873-1883
- [84] Terada K., Schilsky M.L., Miura N., Sugiyama T.: ATP7B (WND) protein. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 1998; 30: 1063-1067
- [85] Texel S., Zhang J., Camandola S., Unger E., Taub D., Koehler R., Harris Z., Mattson M.: Ceruloplasmin deficiency reduces levels of iron and BDNF in the cortex and striatum of young mice and increases their vulnerability to stroke. *PLoS One*, 2011; 6: e25077
- [86] Umbreit J.: Iron deficiency: a concise review. *J. Hematol.*, 2005; 78: 225-231
- [87] Vaschenko G., Bleackley M., Griffiths T., MacGillivray R.: Oxidation of organic and biogenic amines by recombinant human hephaestin expressed in *Pichia pastoris*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2011; 514: 50-56
- [88] Vaschenko G., Ross T., MacGillivray A.: Multi-copper oxidases and human iron metabolism. *Nutrients*, 2013; 5: 2289-2313
- [89] Vassiliev V., Harris Z.L., Zatta P.: Ceruloplasmin in neurodegenerative diseases. *Brain Res. Brain Res. Rev.*, 2005; 49: 633-640
- [90] Verma V.K., Ramesh V., Tewari S., Gupta R.K., Sinha N., Pandey C.M.: Role of bilirubin, vitamin C and ceruloplasmin as antioxidants in coronary artery disease [CAD]. *Indian J. Clin. Biochem.*, 2005; 20: 68-74
- [91] Wang J., Pantopoulos K.: Regulation of cellular iron metabolism. *Biochem. J.*, 2011; 434: 365-381
- [92] Yamaguchi Y., Aoki T., Asashima S., Ooura T., Takada G., Kitagawa T., Shigematsu Y., Shimada M., Kobayashi M., Itou M., Endo F.: Mass screening for Wilson's disease: results and recommendations. *Pediatr. Int.*, 1999; 41: 405-408
- [93] Yamamoto K., Yoshida K., Miyagoe Y., Ishikawa A., Hanaoka K., Nomoto S., Kaneko K., Ikeda S., Takeda S.: Quantitative evaluation of expression of iron-metabolism genes in ceruloplasmin-deficient mice. *Biochim. Biophys. Acta*, 2002; 1588: 195-202
- [94] Young S.N., Curzon G.: A method for obtaining linear reciprocal plots with ceruloplasmin and its application in a study of the kinetic parameters of ceruloplasmin substrates. *Biochem. J.*, 1972; 129: 273-283
- [95] Zaitsev V.N., Zaitseva I., Papiz M., Lindley P.F.: An X-ray crystallographic study of the binding sites of the azide inhibitor and organic substrates to ceruloplasmin, a multi-copper oxidase in the plasma. *J. Biol. Inorg. Chem.*, 1999; 4: 579-587

Autorki deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.