

Alojzy Zgierski

STABILNOŚĆ CERULOPLAZMINY OSOCZA KRWI CZŁOWIEKA I ŚWINI
W ROZTWORACH MOCZNIKA

Badano wpływ denaturacji mocznikowej na absorpcję światła przy długości fali 610 nm oraz na aktywność oksydazową ceruloplazminy osocza krwi człowieka i świni. Stwierdzono istnienie heterogenności w preparatach ceruloplazminy człowieka i świni pod względem oporności na działanie mocznika. Otrzymane dane sugerują, że w analizowanych preparatach występują dwa rodzaje cząsteczek białka, jedno - odporne na działanie mocznika, a drugie - łatwo ulegające denaturacji pod jego wpływem. Opracowano metodę otrzymywania "moczniko-opornej" ceruloplazminy.

WSTĘP

Ceruloplazmina (Cp, ferooksydaza I, nazwa systematyczna: oksydoreduktaza żelazo(II): tlen, EC 1.16.3.1) jest miedzioproteiną, występującą w osoczu krwi różnych gatunków zwierząt, gdzie pełni szereg różnych funkcji o podstawowym znaczeniu fizjologicznym. W cząsteczce tego enzymu występuje 6-7 atomów miedzi, w specyficzny sposób związanych z częścią białkową. Jest to bezpośrednią przyczyną, że białko to posiada zdolność silnego absorbowania światła przy długości fali 610 nm, a jego roztwory są zabarwione na kolor intensywnie niebieski.

Od czasu wyizolowania ceruloplazminy przez Holmberga i Laurella [3] podejmowano wiele badań w celu wyjaśnienia budowy tego enzymu, m. in. przy użyciu mocznika. Związek ten należy do grupy czynników denaturujących i efekt jego dzia-

łania na białka jest powszechnie znany. Niemniej jednak jest stosunkowo mało prac traktujących o wpływie mocznika na ceruloplazminę. Jedną z ważniejszych jest praca Witwickiego i Zakrzewskiego [12] dotycząca badania zmian konformacyjnych cząsteczki ceruloplazminy człowieka. Badacze ci stwierdzili, że tylko w obecności wysokich stężeń mocznika następowało odmaskowanie 3 grup -SH, nie dających się oznaczyć bezpośrednio w preparatach. Również Broman i wsp. [1] oraz Marriott i Perkins [6] obserwowali znaczny wpływ mocznika na barwę, aktywność, charakter widm absorpcyjnych i widm EPR Cp człowieka.

Analogiczne badania dotyczące Cp świni przeprowadzili Mukasa i wsp. [7-9]. Wykryli oni, że w roztworach 4,5 M mocznika następowała dysocjacja cząsteczki na dwie podjednostki, a po dializie obserwowano rekonstytucję cząsteczki o identycznych parametrach biochemicznych jak białko natywne, przed denaturacją mocznikową. Przy wyższych stężeniach mocznika powstawały nieodwracalne zmiany w strukturze cząsteczki, prowadzące do całkowitej utraty zarówno barwy, jak i aktywności oksydazowej.

Pomimo wieloletnich badań nad ceruloplazminą w dalszym ciągu istnieje szereg problemów do rozwiązania i wiele kwestii do wyjaśnienia, m. in. heterogenność cząsteczek tego enzymu. Badania prowadzone w ostatnich latach w Zakładzie Biochemii UŁ pozwoliły ustalić istnienie heterogenności w populacji cząsteczek Cp człowieka i świni w odniesieniu do zachowania się tego białka w środowisku alkalicznym. Stwierdzono mianowicie, że istnieje w takich warunkach frakcja cząsteczek całkowicie stabilnych [14]. Podjęcie analogicznych badań z zastosowaniem mocznika wydawało się więc w tym kontekście celowe i interesujące. W pierwszym etapie postanowiono przeprowadzić badania kinetyki spadku barwy i aktywności, połączone z próbami wyizolowania ewentualnej frakcji "moczniko-opornej". Pozwoliłoby to uzyskać dalsze dowody na istnienie heterogenności wśród cząsteczek Cp identycznych pod względem wielu innych parametrów takich jak: barwa, aktywność, zawartość miedzi czy charakter widm absorpcyjnych i EPR.

MATERIAŁ I METODY

Do badań używano preparaty Cp człowieka otrzymane z Wytwórni Surowic i Szczepionek w Warszawie, po ich uprzednim oczyszczeniu za pomocą filtracji żelowej na żelu Sephadex G-200 oraz preparaty Cp świni izolowane z osocza krwi według metody własnej [13]. Stopień czystości preparatów Cp sprawdzano wyznaczając: 1) wartość tzw. wskaźnika barwnego, tj. stosunku $A_{610 \text{ nm}} / A_{280 \text{ nm}}$ (uzyskano 0,044 dla Cp człowieka i 0,050 dla Cp świni), 2) procentową zawartość miedzi związanej (odpowiednio 0,272% i 0,310%), 3) aktywność właściwą w stosunku do p-fenylendwuaniny (1,90 U/mg Cp człowieka i 7,72 U/mg Cp świni) oraz 4) przeprowadzając rozdziały elektroforetyczne w żelu poliakryloamidowym według Marcea u i Aspin [5] i uzyskując wyłącznie pasma barwiące się zarówno na białko z Coomassie Brilliant Blue, jak i na aktywność oksydazową z o-dwuanizydyną według Owena i Smitha [10]. Uzyskane rezultaty wskazują, że preparaty Cp posiadały bardzo wysoki stopień czystości chemicznej i aktywności biologicznej.

Stężenie białka w roztworach Cp oznaczano metodą biuretową oraz używając współczynnika $A_{280 \text{ nm}}^{1\%} = 14,9$ [4]. Zawartość miedzi całkowitej otrzymywano metodą Gublera i wsp. [2], a miedź "wolną", tj. reagującą bezpośrednio z dwuetylodwutiokarbaminianem sodu, oznaczano analogicznie, lecz bez uprzedniej denaturacji kwasowej za pomocą HCl i kwasu trójchlorooctowego, niezbędnej w przypadku oznaczania miedzi całkowitej. Ilość miedzi integralnie związanej z cząsteczką białka obliczano z różnicy zawartości miedzi całkowitej i "wolnej".

Aktywność oksydazową w stosunku do p-fenylendwuaniny określano według Ravina [11]. W celu dokładnego wyznaczenia wskaźnika barwnego przeprowadzano pomiary spektrofotometryczne dla roztworów Cp o stężeniu 0,10-0,15% przy 280 nm w kuwecie 0,5 cm na spektrofotometrze VSU-2P oraz przy 610 nm w kuwecie 5 cm na spektrokolorymetrze Spekol z przystawką EK-5.

Do analiz używano odczynników o najwyższej czystości chemicznej oraz wodę potrójnie destylowaną z aparatu szklanego.

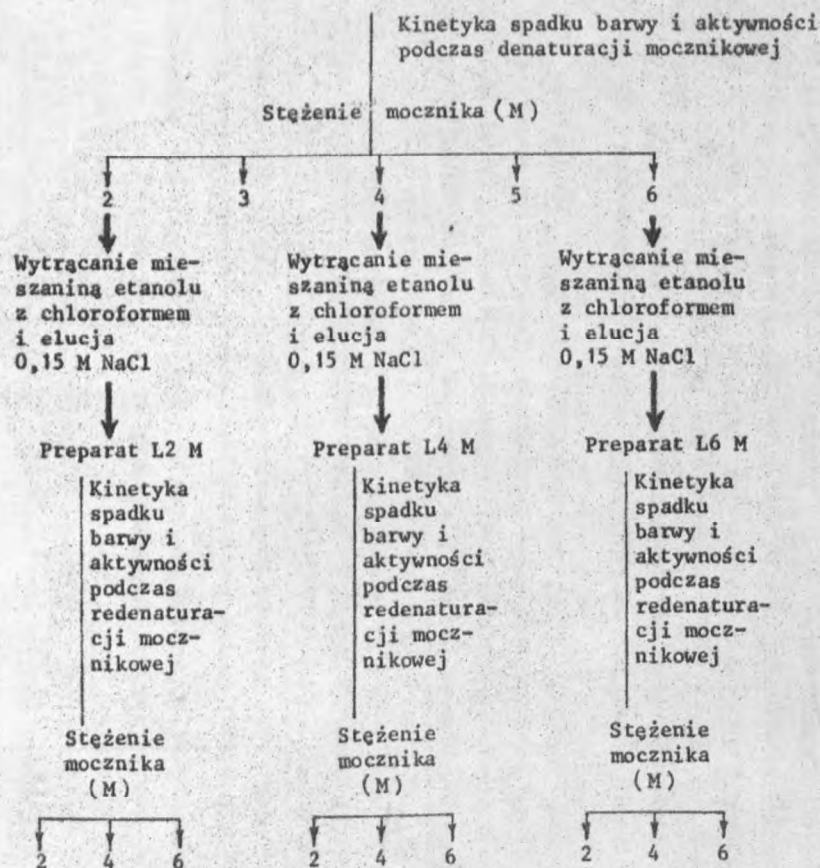
W celu oznaczenia wpływu mocznika na katalityczne i chromoforowe właściwości Cp stosowano następujący schemat postępowania:

Roztwory Cp o stężeniu ok. 1% denaturowano w temperaturze pokojowej, w roztworach mocznika o końcowych stężeniach 2, 3, 4, 5 i 6 M, przy pH 7,5. W celu uzyskania żądanych stężeń mocznika do odpowiednich objętości 7 M roztworu mocznika o pH 7,5 dodawano 0,15 M roztwór NaCl i jako ostatni roztwór Cp. Proces denaturacji śledzono przez 2 h, badając zmiany wartości absorbancji przy 610 nm i aktywności enzymatycznej (podczas oznaczania aktywności roztwór Cp ulega rozcieńczeniu 200-300 razy, a jak wynika z pracy Witwickiego i Zakrzewskiego [12], minimalne stężenia mocznika nie mają wpływu na oznaczanie aktywności enzymatycznej).

Po upływie 60 min mieszaninę reakcyjną rozcieńczano 0,15 M roztworem NaCl do 1 M stężenia mocznika, po 15 min dodawano 1/9 objętości 2 M buforu octanowego o pH 5,5 i wytrącano białko z roztworu potrójną objętością mieszaniny etanol:chloroform (9:1) w ciągu 1 h. Po 30 min całość odwirowywano i po dekantacji osad ekstrahowano kilkoma ml 0,15 M roztworu NaCl. Ceruloplazmina, która nie uległa denaturacji, rozpuszczała się w roztworze NaCl, natomiast Cp zdenaturowana mocznikiem utraciła tę zdolność i pozostawała w postaci szarego osadu. Otrzymywano w ten sposób roztwory preparatów Cp człowieka i świni po 60-minutowej denaturacji w roztworach mocznika o stężeniach 2, 4 i 6 M i oznakowano je odpowiednio: L2 M, L4 M i L6 M oraz S2 M i S4 M. Preparaty te analizowano następnie pod względem ruchliwości elektroforetycznej, wartości wskaźnika barwnego A_{610}/A_{280} , zawartości miedzi i aktywności oksydazowej oraz przeprowadzano z nimi ponownie analogiczną denaturację w roztworach mocznika o różnych stężeniach, podobnie jak z Cp wyjściową (patrz również schemat eksperymentu).

Schemat eksperymentu

Ceruloplazmina ludzka



WYNIKI I DYKUSJA

W niniejszej pracy badano wpływ różnych stężeń mocznika (2-6 M) na katalityczne i chromoforowe właściwości preparatów ceruloplazminy człowieka i świni.

Z uzyskanych danych doświadczalnych (tab. 1-4 oraz rys. 1 i 2) wynika, że w miarę przebiegu inkubacji w roztworach mocznika następuje stopniowy spadek barwy i aktywności oksydazowej. Przy niższych stężeniach mocznika (2-3 M), bez względu na czas pomiaru, zmiany powyższych parametrów są bardzo małe i Cp wykazuje

T a b e l a 1

Dane eksperymentalne dotyczące spadku barwy (A_{610} nm) podczas denaturacji mocznikowej dla ceruloplazminy człowieka niedenaturowanej ($n = 7$) oraz wyizolowanej z mieszaniny reakcyjnej po 60-minutowej denaturacji w roztworze mocznika o stężeniu 2 M - preparat oznaczony jako L2 M ($n = 3$), o stężeniu 4 M - L4 M ($n = 5$) i o stężeniu 6 M - L6 M ($n = 5$).

Liczby w tabeli odpowiadają wartościom średnim dla procentów względnych (wartość A_{610} nm w czasie 0 przyjęto za 100%); (+) odchylenie standardowe

Experimental data concerning the changes of the absorbance value at A_{610} nm during urea denaturation of undenatured ($n = 7$) and isolated human ceruloplasmin from reaction mixture after 60 min denaturation in 2 M urea solution - preparation is designated as L2 M ($n = 3$), in 4 M urea - L4 M ($n = 5$) and in 6 M urea - L6 M ($n = 5$). Figures in the Table correspond to the mean values of relative percent (value of A_{610} nm at time 0 is assumed as 100%); (+) standard deviation

Czas (min)	c mocznika = 2 M				c mocznika = 4 M				c mocznika = 6 M			
	L	L2 M	L4 M	L6 M	L	L2 M	L4 M	L6 M	L	L2 M	L4 M	L6 M
20	93,5 +0,53	100 +	99,0 +0,12	100 +	76,6 +2,82	96,6 +1,42	97,7 +0,90	97,6 +0,74	49,0 +2,98	84,5 +1,44	90,0 +0,93	91,5 +0,73
60	91,4 +0,83	100 +	98,8 +0,26	99,1 +0,23	70,7 +3,15	94,0 +2,32	95,0 +0,93	96,2 +1,32	37,7 +3,48	74,2 +2,43	82,0 +1,92	86,0 +1,20
120	91,2 +1,82	98,8 +0,26	98,7 +0,22	98,8 +0,17	65,3 +3,33	92,0 +2,62	94,0 +1,08	95,5 +1,21	33,5 +3,72	70,0 +2,20	80,0 +1,82	84,3 +1,33

T a b e l a 2

Dane eksperymentalne dotyczące spadku aktywności oksydazowej podczas denaturacji mocznikowej dla ceruloplazminy człowieka niedenaturowanej ($n = 7$) oraz wyizolowanej z mieszaniny reakcyjnej po 60-minutowej denaturacji w roztworze mocznika o stężeniu 2 M - preparat oznaczony jako L2 M ($n = 3$), o stężeniu 4 M - L4 M ($n = 5$) i o stężeniu 6 M - L6 M ($n = 5$). Liczby w tabeli odpowiadają wartościom średnim dla procentów względnych

(wartość dla aktywności właściwej oznaczonej w czasie 0 przyjęto za 100%); (+) odchylenie standardowe

Experimental data concerning the changes of the oxidase activity during urea denaturation of undenatured ($n = 7$) and isolated human ceruloplasmin from reaction mixture after 60 min denaturation in 2 M urea solution - preparation is designated as L2 M ($n = 3$), in 4 M urea - L4 M ($n = 5$) and in 6 M urea - L6 M ($n = 5$). Figures in the Table correspond to the mean values of relative percent (value of oxidase activity estimated at time 0 is assumed as 100%); (+) standard deviation

Czas (min)	c mocznika = 2 M				c mocznika = 4 M				c mocznika = 6 M			
	L	L2 M	L4 M	L6 M	L	L2 M	L4 M	L6 M	L	L2 M	L4 M	L6 M
20	97,1 +1,12	100 +	99,0 +0,16	99,5 +0,12	77,5 +2,12	94,0 +0,76	96,0 +0,62	98,3 +0,28	46,3 +2,93	77,6 +2,02	91,0 +1,12	93,2 +1,36
60	93,2 +2,08	99,2 +0,13	98,4 +0,33	98,6 +0,45	59,5 +2,83	91,8 +1,42	94,6 +0,73	97,6 +0,52	29,0 +3,53	60,6 +2,73	88,6 +1,25	90,4 +1,76
120	93,2 +2,00	98,0 +0,32	98,3 +0,30	98,5 +0,38	52,0 +3,12	91,2 +1,28	93,6 +0,92	95,8 +0,45	23,5 +3,30	51,0 +2,92	86,0 +1,43	89,6 +1,46

T a b e l a 3

Dane eksperymentalne dotyczące spadku barwy (A_{610}) podczas denaturacji mocznikowej dla ceruloplazminy świni niedenaturowanej ($n = 12$) oraz wyizolowanej z mieszaniny reakcyjnej po 60-minutowej denaturacji w roztworze mocznika o stężeniu 2 M - preparat oznaczony jako S2 M ($n = 4$) i o stężeniu 4 M - S4 M ($n = 7$). Liczby w tabeli odpowiadają wartościom dla procentów względnych (wartość A_{610} w czasie 0 przyjęto za 100%); (—) odchylenie standardowe

Experimental data concerning the changes of the absorbance value at A_{610} nm during urea denaturation of undenatured ($n = 12$) and isolated porcine ceruloplasmin from reaction mixture after 60 min denaturation in 2 M urea solution - preparation is designated as S2 M ($n = 3$) and in 4 M - S4 M ($n = 7$).

Figures in the Table correspond to the mean values of relative percent (value of A_{610} at time 0 is assumed as 100%); (—) standard deviation

Czas (min)	c mocznika = 2 M			c mocznika = 4 M			c mocznika = 6 M		
	S	S2 M	S4 M	S	S2 M	S4 M	S	S2 M	S4 M
20	97,9 +1,52 —	98,0 +0,38 —	97,8 +1,15 —	85,0 +2,22 —	93,4 +0,94 —	94,2 +1,13 —	59,0 +3,42 —	81,0 +2,73 —	83,5 +2,06 —
60	95,2 +1,91 —	95,5 +0,63 —	96,2 +0,91 —	76,4 +1,98 —	86,2 +1,45 —	90,0 +1,72 —	45,5 +3,06 —	67,0 +2,83 —	79,2 +1,86 —
120	94,0 +1,76 —	94,0 +1,02 —	96,0 +0,73 —	72,3 +2,44 —	80,0 +1,93 —	87,5 +2,30 —	37,5 +3,53 —	60,0 +3,16 —	74,7 +2,46 —

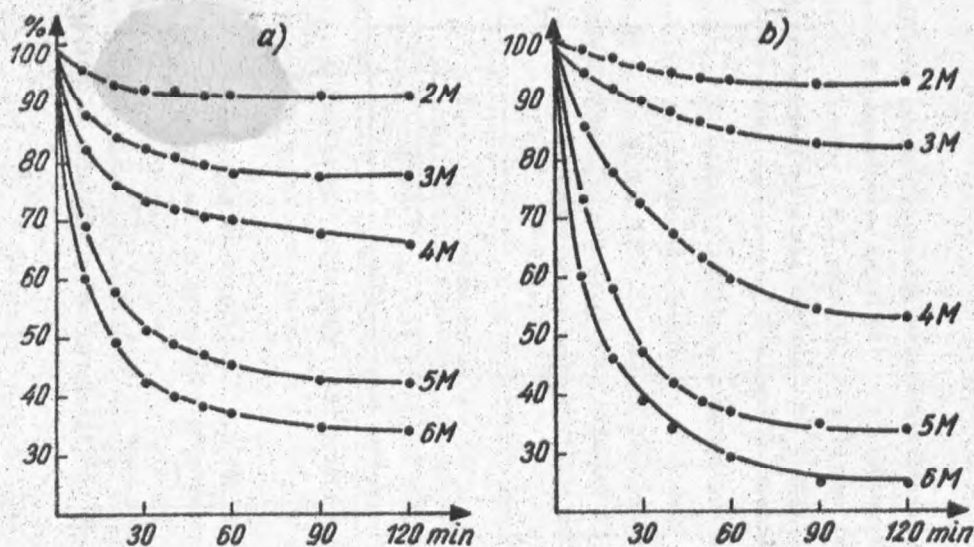
T a b e l a 4

Dane eksperymentalne dotyczące spadku aktywności oksydazowej podczas denaturacji mocznikowej dla ceruloplazminy świni niedenaturowanej ($n = 12$) oraz wyizolowanej z mieszaniny reakcyjnej po 60-minutowej denaturacji w roztworze mocznika o stężeniu 2 M - preparat oznaczony jako S2 M ($n = 4$) i o stężeniu 4 M - S4 M ($n = 7$). Liczby w tabeli odpowiadają wartościom dla procentów względnych (wartość dla aktywności właściwej oznaczonej w czasie 0 przyjęto za 100%); (+) odchylenie standardowe

Experimental data concerning the changes of the oxidase activity during urea denaturation of undenatured ($n = 12$) and isolated porcine ceruloplasmin from reaction mixture after 60 min denaturation in 2 M urea solution - preparation is designated as S2 M ($n = 3$) and in 4 M - S4 M ($n = 7$). Figures in the Table correspond to the mean values of relative percent (value oxidase activity estimated at time 0 is assumed as 100%); (+) standard deviation

Czas (min)	c mocznika = 2 M				c mocznika = 4 M				c mocznika = 6 M			
	S	S2 M	S4 M		S	S2 M	S4 M		S	S2 M	S4 M	
20	97,0 +1,13	100 +0	100 +0		86,2 +1,17	98,0 +0,46	98,2 +0,33		49,0 +3,22	86,5 +1,48	90,0 +0,94	
60	94,4 +1,27	97,5 +0,83	98,8 +0,23		72,0 +2,73	91,0 +0,93	96,5 +1,12		34,5 +2,84	78,0 +2,06	84,0 +1,36	
120	93,0 +1,50	96,8 +0,96	98,0 +0,40		64,0 +2,43	86,0 +1,37	93,4 +1,46		30,0 +3,12	73,0 +1,83	80,0 +2,04	

względnie dużą stabilność (od kilku do kilkunastu procent spadku). Wyższe stężenia mocznika (4–6 M) powodują radykalniejsze zmiany we właściwościach ceruloplazminy, a mianowicie obserwuje się szybkie odbarwianie niebieskiego roztworu Cp oraz wyraźnie malejącą aktywność oksydazową. I tak np. Cp człowieka w 6 M roztworze mocznika po 20 i 120 minutach wykazywała odpowiednio spadek do 49,0 i 33,5% barwy, a aktywności do 46,3 i 23,5%. Odpowiednie dane dla Cp świni wynosiły: 59,0 i 37,5% barwy oraz 49,0 i 30,0% aktywności.



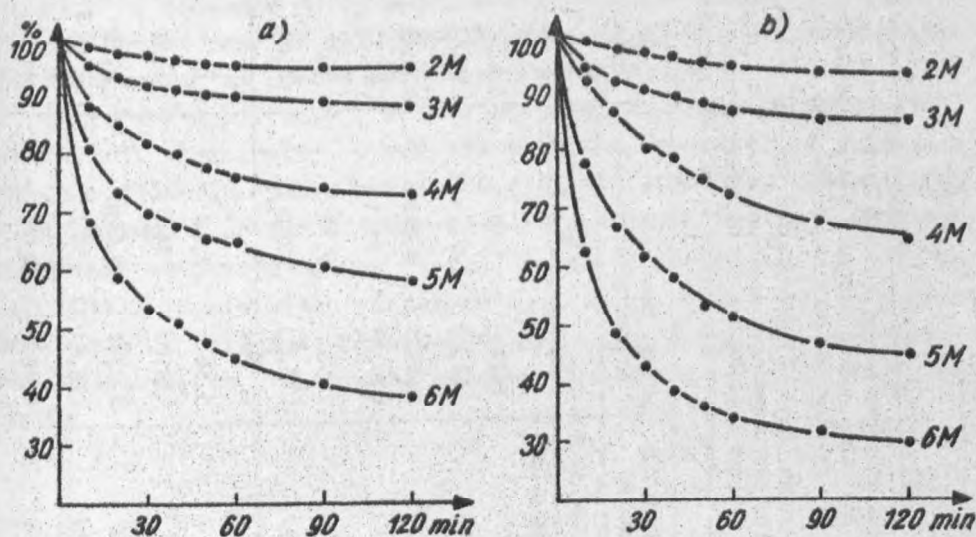
Rys. 1

Kinetyka spadku barwy (a) i aktywności oksydazowej (b) preparatów ceruloplazminy człowieka w roztworach mocznika o różnych stężeniach (wartości stężeń mocznika podane przy każdej krzywej)

The time course of loss of the color (a) and oxidase activity (b) of human ceruloplasmin preparations in urea solutions at various concentrations (values of urea concentration are given at each curve)

Jak widać z przebiegu krzywych przedstawionych na rys. 1 i 2, zmiany denaturacyjne w przeważającej mierze następują już po upływie 1 godziny. Dlatego, po tym właśnie czasie przeprowadzano izolowanie Cp pozostałej po denaturacji (szczegóły procedury w rozdz.: Materiał i metody). Po wytrąceniu białek mieszaniną etanolu i chloroformu oraz po ekstrakcji osadu roztworem NaCl część Cp zawarta w osadzie ulegała rozpuszczeniu, dając niebiesko za-

barwiony roztwór, a pozostała część pozostawała w postaci białoszarego osadu. Oznaczało to, że w osadzie znajdowała się zdenaturowana przez mocznik Cp, ponieważ w przypadku niedenaturowanej Cp, osad po precypitacji mieszaniną etanolu i chloroformu rozpuszczał się w NaCl całkowicie.



Rys. 2

Kinetyka spadku barwy (a) i aktywności oksydazowej (b) preparatów ceruloplazminy świni w roztworach mocznika o różnych stężeniach (wartości stężeń mocznika podane przy każdej krzywej)

The time course of loss of the color (a) and oxidase activity (b) of porcine ceruloplasmin preparations in urea solutions at various concentrations (values of urea concentration are given at each curve)

Otrzymane preparaty ceruloplazminy (która ekstrahowała się do roztworu NaCl) analizowano następnie pod względem wartości wskaźnika barwnego, zawartości miedzi i aktywności właściwej w porównaniu do natywnego (wyjściowego) preparatu Cp. W tab. 5 zestawiono dane charakteryzujące powyższe właściwości Cp człowieka i świni: 1) natywnej i 2) po 60-minutowej denaturacji w różnych stężeniach mocznika: a) bezpośrednio w mieszaninie reakcyjnej, b) po wyizolowaniu Cp z tej mieszaniny, czyli dla preparatów L2 M, L4 M, L6 M oraz S2 M i S4 M (patrz również schemat eksperymentu).

Tabela 5

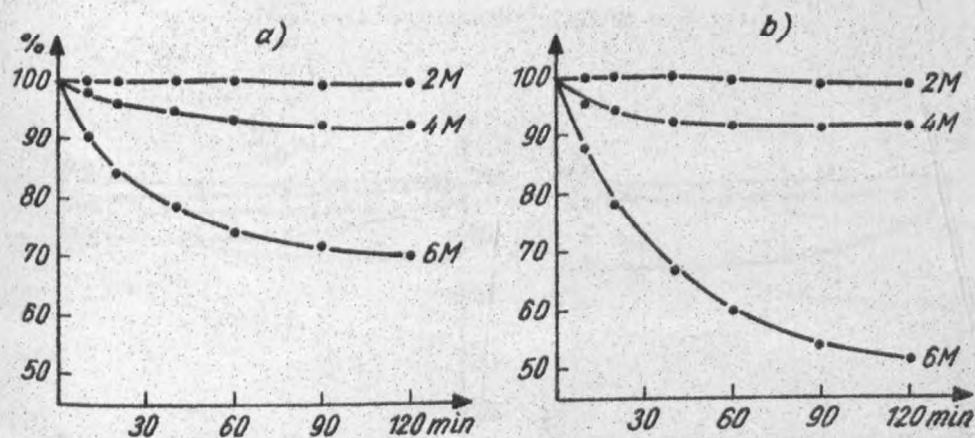
Niektóre właściwości ceruloplazminy (Cp) człowieka i świni: 1) niedenaturowanej oraz 2) po 60-minutowej denaturacji w roztworach mocznika o różnym stężeniu, mierzone bezpośrednio w mieszaninie reakcyjnej (a) i po jej wyizolowaniu z tej mieszaniny (b). W nawiasach podano wartości dla procentów względnych po przyjęciu wartości badanego parametru dla ceruloplazminy niedenaturowanej za 100%

Some properties of human and porcine ceruloplasmins (Cp): 1) undenatured and 2) after 60 min denaturation in urea solution at various concentrations, measured immediately in reaction mixture (a) and after isolation of this protein from the mixture (b). Values for relative percent after assumption of the values for examined parameters of undenatured ceruloplasmin as 100% are given in brackets

Badany parametr	Cp niedenaturowana	Cp po inkubacji w 2 M roztworze mocznika		Cp po inkubacji w 4 M roztworze mocznika		Cp po inkubacji w 6 M roztworze mocznika	
		a	b(L2 M, S2 M)	a	b(L4 M, S4 M)	a	b(L6 M)
Aktywność (U/mg Cp)	1,90 (100)	1,77 (93,2)	Cp człowieka 1,86 (97,9)	1,13 (59,6)	1,85 (97,4)	0,55 (29,0)	1,87 (98,4)
Wskaźnik barwny (A_{610}/A_{280})	0,0440 (100)	0,0402 (91,4)	0,0425 (96,6)	0,0311 (70,7)	0,0436 (99,1)	0,0166 (37,7)	0,0431 (98,0)
Miedź związana ($\mu\text{g}/\text{mg Cp}$)	2,72 (100)	2,67 (98,2)	2,71 (99,6)	2,41 (88,6)	2,71 (99,6)	1,71 (62,8)	2,71 (99,6)
Aktywność (U/mg Cp)	7,72 (100)	7,29 (94,4)	Cp świni 7,65 (99,1)	5,56 (72,0)	7,47 (96,8)	2,66 (34,5)	-
Wskaźnik barwny (A_{610}/A_{280})	0,0500 (100)	0,0476 (95,2)	0,0492 (98,4)	0,0382 (76,4)	0,0490 (98,0)	0,0228 (45,6)	-
Miedź związana ($\mu\text{g}/\text{mg Cp}$)	3,10 (100)	3,05 (98,4)	3,09 (99,7)	2,78 (89,7)	3,08 (99,4)	1,93 (62,2)	-

Jak widać z zamieszczonych danych, preparaty wyizolowane z mieszaniny reakcyjnej (pkt b) charakteryzują się bardzo zbliżonymi wartościami wskaźnika barwnego, aktywności właściwej i zawartości miedzi, do analogicznych wartości charakteryzujących białko wyjściowe, niedenaturowane (96,6-99,7% wartości powyższych parametrów w stosunku do Cp wyjściowej). Również podczas analitycznej elektroforezy w żelu poliakryloamidowym zachowywały się one identycznie jak preparaty Cp niedenaturowanej.

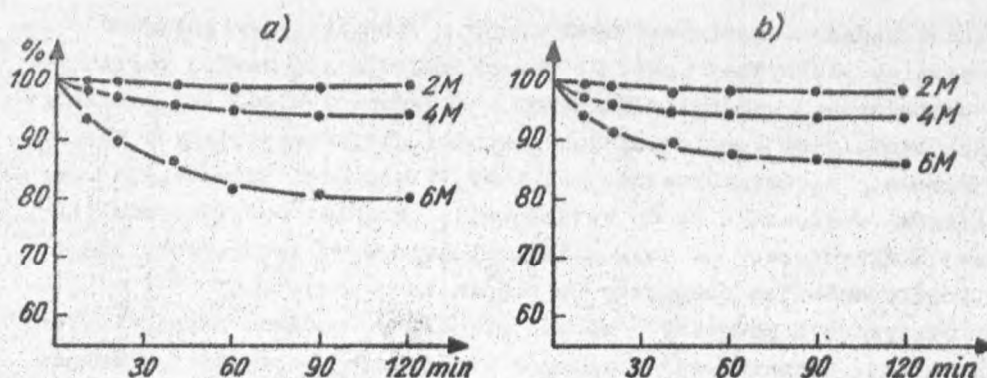
Otrzymane w powyższy sposób preparaty poddano następnie re-denaturacji mocznikowej w różnych stężeniach mocznika podobnie jak Cp wyjściową (patrz schemat eksperymentu). Dane dotyczące spadku barwy i aktywności oksydazowej uzyskane podczas tych doświadczeń są przedstawione w tab. 1-4 i zilustrowane na rys. 3-13. Jak z nich wynika, kinetyka tych zmian różni się w sposób zasadniczy od kinetyki przeprowadzonej dla preparatu wyjściowego. Preparaty te wykazywały znaczną stabilność w roztworach mocznika.



Rys. 3

Kinetyka spadku barwy (a) i aktywności oksydazowej (b) podczas denaturacji mocznikowej w preparatach ceruloplasminy człowieka wyizolowanych z mieszaniny reakcyjnej po 60-minutowej denaturacji w 2 M roztworze mocznika (L2 M). Wartości stężeń mocznika podane przy każdej krzywej

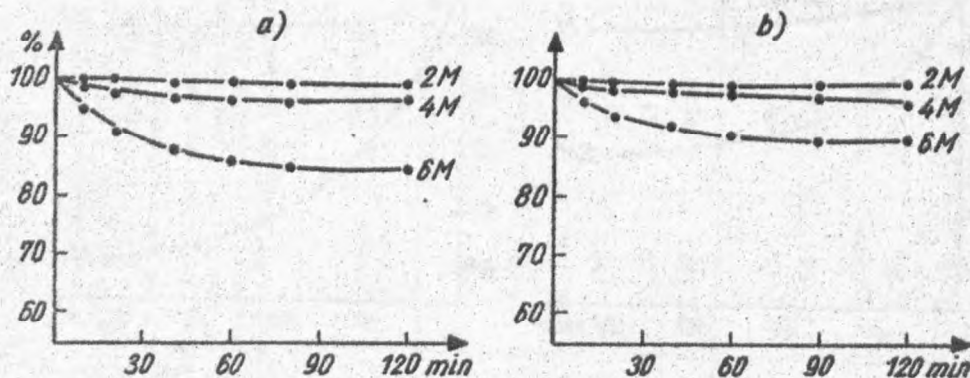
The time course of loss of the color (a) and oxidase activity (b) during urea denaturation of human ceruloplasmin preparations isolated from reaction mixture after 60 min denaturation in 2 M urea solution (L2 M). Values of urea concentration are given at each curve



Rys. 4

Kinetyka spadku barwy (a) i aktywności oksydazowej (b) podczas denaturacji mocznikowej w preparatach ceruloplazminy człowieka wyizolowanych z mieszaniny reakcyjnej po 60-minutowej denaturacji w 4 M roztworze mocznika (L4 M). Wartości stężeń mocznika podane przy każdej krzywej

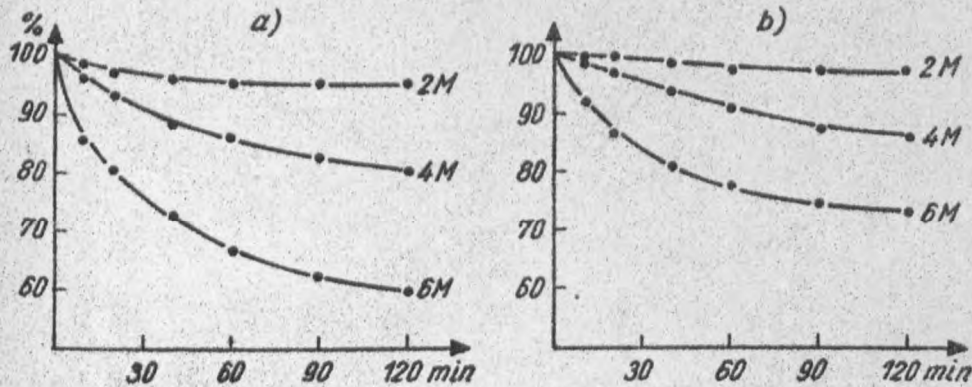
The time course of loss of the color (a) and oxidase activity (b) during urea denaturation of human ceruloplasmin preparations isolated from reaction mixture after 60 min denaturation in 4 M urea solution (L4 M). Values of urea concentration are given at each curve



Rys. 5

Kinetyka spadku barwy (a) i aktywności oksydazowej (b) podczas denaturacji mocznikowej w preparatach ceruloplazminy człowieka wyizolowanych z mieszaniny reakcyjnej po 60-minutowej denaturacji w 6 M roztworze mocznika (L6 M). Wartości stężeń mocznika podane przy każdej krzywej

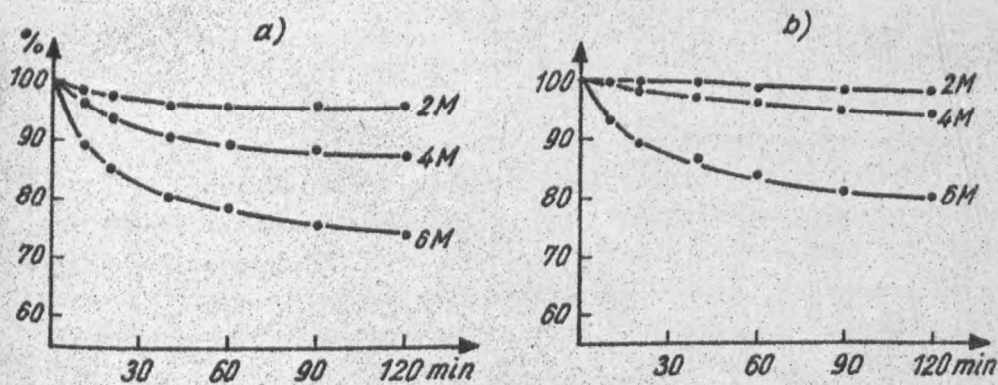
The time course of loss of the color (a) and oxidase activity (b) during urea denaturation of human ceruloplasmin preparations isolated from reaction mixture after 60 min denaturation in 6 M urea solution (L6 M). Values of urea concentration are given at each curve



Rys. 6

Kinetyka spadku barwy (a) i aktywności oksydazowej (b) podczas denaturacji mocznikowej w preparatach ceruloplazminy świni wyizolowanych z mieszaniny reakcyjnej po 60-minutowej denaturacji w 2 M roztworze mocznika (S2 M). Wartości stężeń mocznika podane przy każdej krzywej

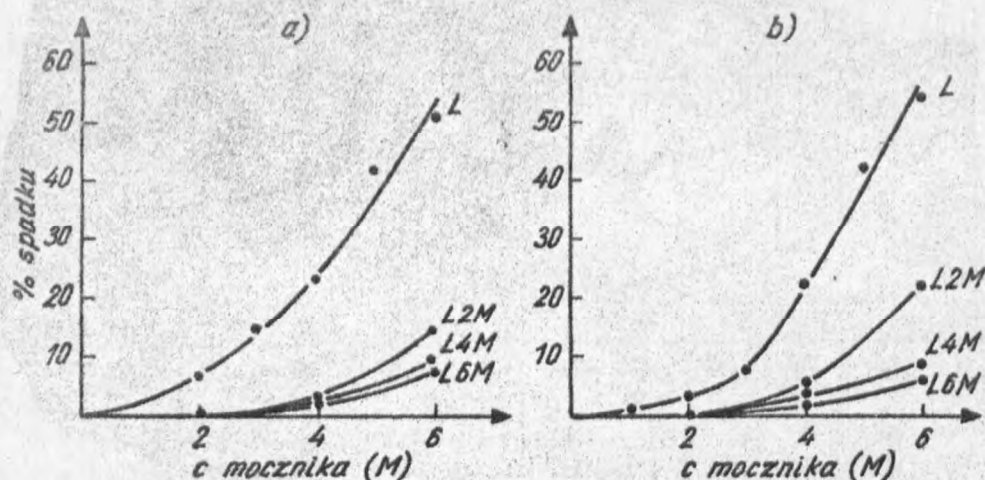
The time course of loss of the color (a) and oxidase activity (b) during urea denaturation of porcine ceruloplasmin preparations isolated from reaction mixture after 60 min denaturation in 2 M urea solution (S2 M). Values of urea concentration are given at each curve



Rys. 7

Kinetyka spadku barwy (a) i aktywności oksydazowej (b) podczas denaturacji mocznikowej w preparatach ceruloplazminy świni wyizolowanych z mieszaniny reakcyjnej po 60-minutowej denaturacji w 4 M roztworze mocznika (S4 M). Wartości stężeń mocznika podane przy każdej krzywej

The time course of loss of the color (a) and oxidase activity (b) during urea denaturation of porcine ceruloplasmin preparations isolated from reaction mixture after 60 min denaturation in 4 M urea solution (S4 M). Values of urea concentration are given at each curve

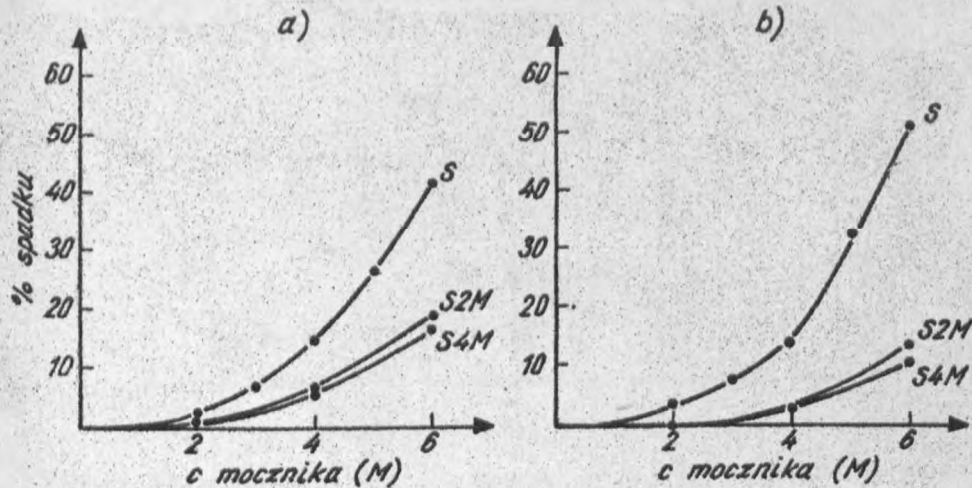


Rys. 8

Wpływ stężenia mocznika na wartość absorbancji przy 610 nm (a) i aktywność oksydazową (b) ceruloplazminy człowieka po 20 minutach inkubacji w roztworach mocznika. L - ceruloplazmina wyjściowa, niedenaturowana. L2 M, L4 M, L6 M - ceruloplazminy wyizolowane z mieszaniny reakcyjnej po 60-minutowej denaturacji w roztworach mocznika o stężeniach odpowiednio: 2, 4 i 6 M

The effect of urea concentration on absorbance value at 610 nm (a) and oxidase activity (b) of human ceruloplasmin after 20 min incubation in urea solutions. L - undenatured ceruloplasmin. L2 M, L4 M, L6 M - ceruloplasmins isolated from reaction mixture after 60 min denaturation in urea solutions at concentration: 2, 4 and 6 M, respectively

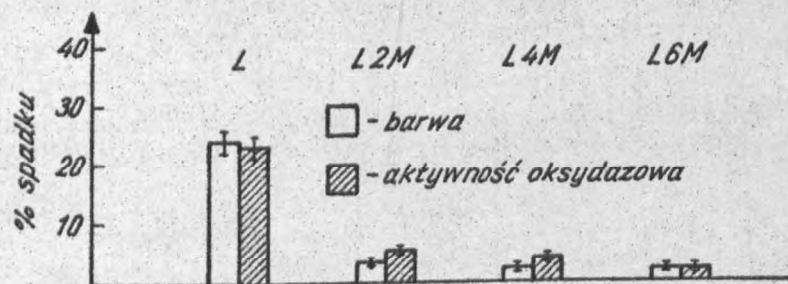
Stosunkowo najmniej stabilne okazały się preparaty Cp człowieka izolowane po inkubacji w 2 M roztworze mocznika (L2 M), podczas ponownej denaturacji w 6 M roztworze mocznika. Po 20 min inkubacji obserwowano w tym przypadku 15,5% spadku barwy i 22,4% spadku aktywności (dla ceruloplazminy wyjściowej, czyli L, wartości procentowe spadku dla tych parametrów były jednak znacznie większe: 51% spadku barwy i 53,7% spadku aktywności). Dla preparatu L2 M wykazano natomiast stosunkowo dużą stabilność podczas inkubacji zarówno w 2 M, jak i w 4 M roztworze mocznika. Po 20 min inkubacji w 4 M roztworze mocznika obserwowano tylko 3,4% spadku barwy i 6% - aktywności (dla preparatu wyjściowego odpowiednio: 23,4% oraz 22,5%), a po 120 min - 8,0% i 8,8% (podczas gdy dla preparatu wyjściowego odpowiednio: 34,7% oraz 48,0%).



Rys. 9

Wpływ stężenia mocznika na wartość absorbancji przy 610 nm (a) i aktywność oksydazową (b) ceruloplazminy świni po 20 minutach inkubacji w roztworach mocznika. S - ceruloplazmina wyjściowa, niedenaturowana. S2 M, S4 M - ceruloplazminy wyizolowane z mieszaniny reakcyjnej po 60-minutowej denaturacji w roztworach mocznika o stężeniach odpowiednio: 2 i 4 M

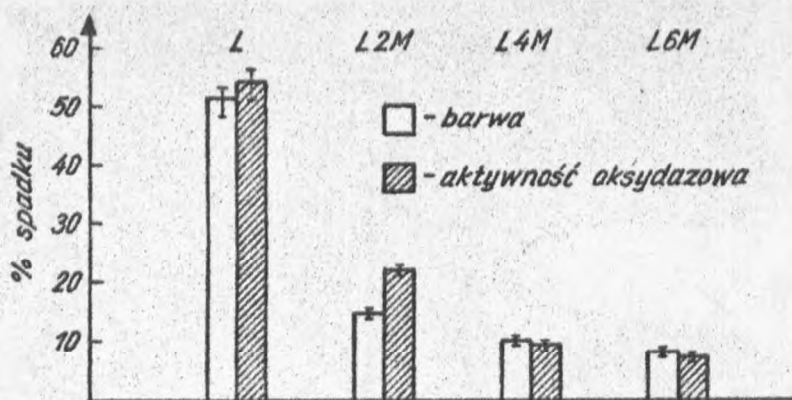
The effect of urea concentration on absorbance value at 610 nm (a) and oxidase activity (b) of porcine ceruloplasmin after 20 min incubation in urea solutions. S - undenatured ceruloplasmin, S2 M, S4 M - ceruloplasmins isolated from reaction mixture after 60 min denaturation in urea solutions at concentration: 2 and 4 M, respectively



Rys. 10

Zmiany intensywności barwy i aktywności oksydazowej po 20-minutowej denaturacji w 4 M roztworze mocznika preparatów ceruloplazminy człowieka. Oznaczenia preparatów jak na rys. 8

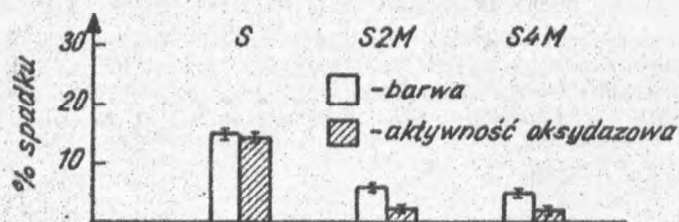
The changes of the intensity of color and oxidase activity after 20 min denaturation in 4 M urea solution of human ceruloplasmin preparations. Designation of preparations as in Fig. 8



Rys. 11

Zmiany intensywności barwy i aktywności oksydazowej po 20-minutowej denaturacji w 6 M roztworze mocznika preparatów ceruloplazminy człowieka. Oznaczenia preparatów jak na rys. 8

The changes of the color intensity and oxidase activity after 20 min denaturation in 6 M urea solution of human ceruloplasmin preparations. Designation of preparations as in Fig. 8



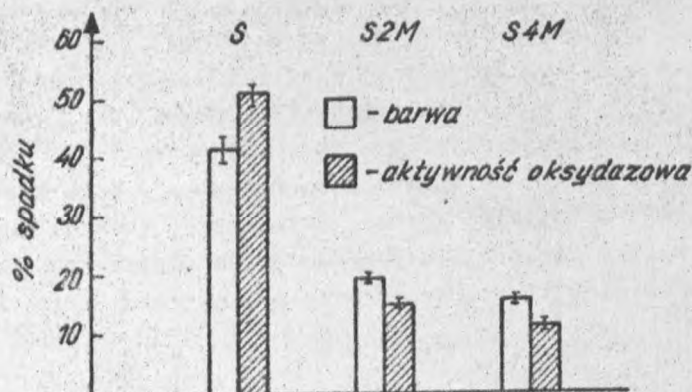
Rys. 12

Zmiany intensywności barwy i aktywności oksydazowej po 20-minutowej denaturacji w 4 M roztworze mocznika preparatów ceruloplazminy świni. Oznaczenie preparatów jak na rys. 9

The changes of the color intensity and oxidase activity after 20 min denaturation in 4 M urea solution of porcine ceruloplasmin preparations. Designation of preparations as in Fig. 9

Znacznie większą stabilność wykazywały preparaty izolowane z mieszaniny reakcyjnej po inkubacji w 4 M roztworze mocznika (L4 M), a szczególnie izolowane po inkubacji w 6 M (L6 M). Preparaty L6 M były stabilne nie tylko podczas ponownej inkubacji w roztworach mocznika o stężeniach 2 M i 4 M, ale nawet i w 6 M roztworze mocznika wykazywały tylko nieznaczny spadek barwy i

aktywności (po 20 min: 8,5% spadku barwy i 6,8% - aktywności, podczas gdy dla preparatu wyjściowego odpowiednio 51,0% i 53,7% spadku) (patrz również tab. 1 i 2 oraz rys. 3-5, 8, 10 i 11).



Rys. 13

Zmiany intensywności barwy i aktywności oksydazowej po 20-minutowej denaturacji w 6 M roztworze mocznika preparatów ceruloplazminy świni. Oznaczenie preparatów jak na rys. 9

The changes of the color intensity and oxidase activity after 20 min denaturation in 6 M urea solution of porcine ceruloplasmin preparations. Designation of preparations as in Fig. 9

Analogiczne preparaty otrzymane dla ceruloplazminy świni (S2 M i S4 M) zachowywały się podobnie jak preparaty Cp człowieka podczas redenaturacji w roztworach mocznika o stężeniach 2-6 M (tab. 3 i 4 oraz rys. 6, 7, 9, 12 i 13). Otrzymane dane wskazują, że szczególnie preparat S4 M odznaczał się stosunkowo dużą stabilnością podczas redenaturacji. W tym przypadku nie izolowano ceruloplazminy z mieszaniny reakcyjnej po denaturacji w 6 M roztworze mocznika, ponieważ - jak podaje M u k a s a i wsp. [8] - już w 4,5 M roztworze mocznika następowała dysocjacja cząsteczek ceruloplazminy świni, a przy wyższych stężeniach powstawały nieodwracalne zmiany w strukturze cząsteczki.

Przeprowadzone doświadczenia rzucają nowe światło na zagadnienie homogenności ceruloplazminy. Uzyskane dane doświadczalne pozwalają na wyciągnięcie wniosku, że jednorodny fizykochemicznie roztwór ceruloplazminy stanowi heterogenną populację cząsteczek różniącą się odpornością na denaturujące działanie mocznika. Stwierdzono istnienie w roztworze dwu rodzajów cząsteczek:

1) odbarwiające się, tracące własności katalityczne pod wpływem mocznika i 2) cząsteczki odporne na to działanie.

Ceruloplazmina ulegająca denaturacji w roztworach mocznika wytrąca się, podobnie jak niedenaturowana, mieszaniną alkoholu i chloroformu, ale w odróżnieniu od tej ostatniej, nie eluuje się z osadu roztworem NaCl. Można więc tym sposobem izolować ceruloplazminę zawierającą wyłącznie cząsteczki odporne na działanie mocznika. Taki typ ceruloplazminy "moczniko-opornej", homogennej pod względem stabilności w stosunku do mocznika, może okazać się pomocnym modelem do dalszych badań struktury i funkcji tego białka. Uzyskane wyniki otwierają zatem drogę do dalszych badań nad poszukiwaniem korelacji między strukturą cząsteczek i ich stabilnością.

LITERATURA

- [1] Broman L., Malmstrom B. G., Aasa R., Vann-gard T., J. Mol. Biol., 1962, 5, 301.
- [2] Gubler C. I., Lahey M. E., Ashenbrucker H., Cartwright G. N., Wintrobe M. M., J. Biol. Chem., 1952, 196, 209.
- [3] Holmberg C. G., Laurell C. B., Acta Chem. Scand., 1948, 2, 550.
- [4] Kasper C. B., Deutsch H. F., J. Biol. Chem., 1963, 238, 2325.
- [5] Marceau N., Aspin N., Biochim. Biophys. Acta, 1973, 328, 351.
- [6] Mariott I., Perkins D. I., Biochim. Biophys. Acta, 1966, 117, 395.
- [7] Mukasa H., Kajama S., Sugijama K., Funakubo K., Itoh M., Nosoh Y., Sato T., Biochim. Biophys. Acta, 1968, 168, 132.
- [8] Mukasa H., Nosoh Y., Sato T., Biochim. Biophys. Acta, 1968, 168, 483.
- [9] Mukasa H., Nosoh Y., Sato T., J. Biochem. (Tokio), 1969, 65, 649.
- [10] Owen J. A., Smith H., Clin. Chim. Acta, 1961, 6, 441.

- [11] R a v i n H. A., J. Lab. Clin. Med., 1961, 58, 161.
- [12] W i t w i c k i J., Z a k r z e w s k i K., Eur. J. Biochem., 1969, 10, 284.
- [13] Z g i r s k i A., W i t w i c k i J., H i l e w i c z - G r a b s k a M., W i t a s H., Acta Biochim. Pol., 1978, 25, 361.
- [14] Z g i r s k i A., W i t w i c k i J., H i l e w i c z - G r a b s k a M., Acta Biochim. Pol., 1983, 30, 33.

Zakład Biochemii
Instytut Biochemii i Biofizyki UŁ

Alojzy Zgirski

STABILITY OF HUMAN AND PORCINE BLOOD PLASMA CERULOPLASMINS
IN UREA SOLUTIONS

The effect of urea denaturation on the visible absorption at 610 nm and oxidase activity of human and porcine ceruloplasmins has been investigated. The existence of heterogeneity in human and porcine ceruloplasmin preparations in respect of resistance on the influence of urea has been stated. Experimental data which have been obtained make it possible to suggest that two kinds of molecules exist in these preparations: one kind seems to be "urea-resistant" and the second one is easily denatured in urea solution. The method for isolation of "urea-resistant" ceruloplasmin has been elaborated.