

ВЛИЯНИЕ ЛАКТОФЕРРИНА НА ФЕРРОКСИДАЗНУЮ АКТИВНОСТЬ ЦЕРУЛОПЛАЗМИНА*

© 2005 г. А.В. Соколов**, М.О. Пулина,
Е.Т. Захарова, М.М. Шавловский, В.Б. Васильев

Отдел молекулярной генетики ГУ НИИ экспериментальной
медицины РАМН, 197376 Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12,
факс: (812) 234-9489, электронная почта: biochem@nm.ru

Поступила в редакцию 21.09.04

После доработки 19.11.04

Изучено влияние различных форм лактоферрина (ЛФ), взаимодействующих с церулоплазмином (ЦП, ферро- O_2 -оксидоредуктаза, КФ 1.16.3.1), на его ферроксидазную активность. Сравнение встраивания окисленных ЦП ионов Fe^{3+} в ЛФ и сывороточный трансферрин (ТФ) показало, что апо-ЛФ связывал окисленное железо при pH 5,5 в 7 раз, а при pH 7,4 в 4 раза быстрее, чем апо-ТФ в тех же условиях. При окислении Fe^{2+} , катализируемом ЦП, апо-ЛФ в 1,25 раза увеличивал скорость окисления Fe^{2+} при ЦП : ЛФ = 1 : 1. ЛФ, насыщенный Fe^{3+} или Cu^{2+} , увеличивал скорость окисления железа в 1,6 и 2 раза при молярном соотношении ЦП и холо-ЛФ, равном 1 : 1 и 1 : 2 соответственно. При добавлении к ЦП избытка апо-ЛФ (ЦП : апо-ЛФ < 1 : 1) или холо-ЛФ (ЦП : холо-ЛФ < 1 : 2) скорость окисления железа более не изменялась. В грудном молоке обнаружен комплекс ЦП–ЛФ, проявляющий ферроксидазную активность.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: церулоплазмин, ферроксидаза, лактоферрин, трансферрин.

Церулоплазмин (ЦП, ферро- O_2 -оксидоредуктаза, КФ 1.16.3.1) – основной медь-протеид плазмы крови с $M_r \sim 132\ 000$. Благодаря наличию в составе молекулы шести прочно связанных ионов меди ЦП проявляет активность в отношении ряда субстратов. Катализируемая ЦП диаминооксидазная реакция была описана с момента открытия этого белка в 1948 г. [1] и широко используется для определения содержания ЦП в сыворотке крови [2]. В 1966 г. было доказано наличие у ЦП ферроксидазной активности [3]. Катализируя окисление Fe^{2+} до Fe^{3+} , фермент поддерживает в плазме крови соотношение $Fe^{2+} : O_2$ равным 4 : 1, обеспечивая четырехэлектронный перенос на O_2 с образованием воды и предотвращая неферментативную реакцию, в результате которой образуется супероксидный анион-радикал $O_2^{\cdot -}$ [3].

Fe^{2+} , окисленное в результате ферроксидазной реакции, может быть встроено в сывороточный трансферрин (ТФ) и транспортировано в организме в составе комплекса $(Fe^{3+})_2$ –ТФ [3]. В присутствии восстановленного глутатиона ЦП

проявляет пероксидазную активность [4]. Наряду с ферроксидазной реакцией ЦП катализирует окисление ионов Cu^+ [5].

Широкий спектр ферментативных активностей позволяет назвать ЦП универсальным антиоксидантом. Окисление Fe^{2+} препятствует реакции Фентона – образованию OH^{\cdot} при реакции Fe^{2+} с H_2O_2 [6]. При наследственном дефекте гена ЦП (больные ацерулоплазминемией и мыши, нокаутированные по гену ЦП) отмечается нарушение метаболизма железа и связанный с его накоплением окислительный стресс [7, 8].

Взаимодействие ЦП с различными белками по-разному влияет на его ферментативную активность. Авторы, изучавшие взаимодействие ЦП с протеином С, сообщают о пятикратном усилении диаминооксидазной активности ЦП [9]. При взаимодействии ЦП с ферритином происходит увеличение скорости окисления железа, катализируемого ЦП [10]. Изученное нами взаимодействие ЦП с протамином увеличивает ферроксидазную активность ЦП в 1,5 раза [11]. Однако взаимодействие с миелопероксидазой не влияет ни на ферроксидазную, ни на пероксидазную активность ЦП [12].

Ранее нами был обнаружен и охарактеризован комплекс ЦП и лактоферрина (ЛФ) *in vitro* и *in vivo* [13, 14]. ЛФ – Гликопротеин семейства трансферриновых с $M_r \sim 78\ 000$. ЛФ обнаружен в

Принятые сокращения: ЦП – церулоплазмин, ЛФ – лактоферрин, ТФ – трансферрин.

* Первоначально английский вариант рукописи был опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow), Papers in Press, ВМ (04-271), 26.11.2004.

** Адресат для корреспонденции и запросов оттисков.

экзокринных секретах: молоке, слюне, слезах и семенной жидкости, а также в секреторных гранулах нейтрофильных лейкоцитов. Благодаря способности к высокоаффинному хелатированию Fe^{3+} , Cu^{2+} и других ионов ЛФ подавляет рост микроорганизмов. Спектр антимикробных свойств ЛФ включает в себя также его способность связываться с ДНК и липополисахаридами, протеолиз белковых факторов колонизации бактерий, образование дефенсинаподобных производных [15].

Молекулы трансферринов состоят из двух доменов, каждый из которых способен связывать Fe^{3+} и синергичный анион (обычно CO_3^{2-}). Последний обеспечивает стабильность комплекса трансферрина и Fe^{3+} , окрашенного в красный цвет ($\lambda_{\text{max}} = 450\text{--}470$). Это свойство трансферринов использовалось для спектрофотометрического определения ферроксидазной активности ЦП с помощью трансферрина сыворотки или овотрансферрина [3, 16]. Константа связывания Fe^{3+} для ЛФ в 300 раз выше, чем для ТФ. ЛФ теряет половину связанных с ним ионов Fe^{3+} при pH 3,0, тогда как ТФ – при pH 5,7 [17].

В данной работе исследуется влияние ЛФ на ферроксидазную активность ЦП.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использованы Chelex 100 («BioRad», США), соль Мора ($\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$, KSCN , FeCl_3 , CuCl_2 , EDTA («Merck», Германия), сефароза 4В, DEAE-Sephadex A-50, QAE-Sephadex A-50, CM-сефароза («Pharmacia», Швеция), акриламид, аргинин, метиленбисакриламид, тетраметилэтилендиамин («Медиген», Россия), азид натрия (NaN_3), глицерин, кумасси R-250, персульфат аммония, трис («Serva», Германия), глицин, протамин кеты, фенилметилсульфонилфторид («Sigma», США), гепарин («СПОФА», Польша). PBS (phosphate buffer saline) представлял собой 0,15 М NaCl, pH 7,4, 1,9 мМ Na_2HPO_4 , 8,1 мМ NaH_2PO_4 , 0,1 М натрий-ацетатный буфер (для pH 5,5–0,089 М AcONa /0,011 М AcOH , для pH 6,0–0,0948 М AcONa /0,0052 М AcOH , для pH 7,4–0,09977 М AcONa /0,000023 М AcOH).

ЛФ выделяли из грудного молока согласно способу, описанному в работе [13]. Пробы грудного молока делипидировали центрифугированием в течение 30 мин при 15 000 г. ТФ выделяли из сыворотки крови [18].

Для выделения стабильного препарата ЦП аргинин, гепарин и протамин иммобилизовали на ВrCN-активированной сефарозе 4В (3 мг на 1 мл смолы) [13]. Стабильный мономерный ЦП

выделяли с помощью аффинной хроматографии на протамин-сефарозе [11]. К 2000 мл плазмы крови (0,9% цитрата натрия) добавляли EDTA (10 мМ) и фенилметилсульфонилфторид (0,1 мМ) и центрифугировали 30 мин при 450 г (4°). Полученную плазму разбавляли в 2 раза, добавляли натрий-ацетатный буфер, pH 5,5, до конечной концентрации 0,05 М и перемешивали с 10 г DEAE-Sephadex A-50 в течение 2 ч при 4°. Смолу, приобретающей зеленый цвет, набивали колонку (5 × 15 см). ЦП элюировали линейным градиентом по 1000 мл 0,05 М и 0,5 М натрий-ацетатного буфера, pH 5,5. Фракции, содержавшие ЦП, объединяли, разбавляли в 2 раза 0,01 М натрий-фосфатным буфером, pH 7,4, наносили на колонку с QAE-Sephadex A-50 (5 × 10 см), промывали 500 мл PBS и элюировали 0,4 М NaCl на основе 0,01 М натрий-фосфатного буфера, pH 7,4.

На следующей стадии ЦП подвергали спиртовому осаждению. При охлаждении во льду к раствору ЦП добавляли равный объем смеси $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH} : \text{CHCl}_3$ (9 : 1 – v/v). Осажденные примеси отделяли центрифугированием при 1000 г в течение 30 мин (4°). К надосадочной жидкости добавляли половину объема смеси $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH} : \text{CHCl}_3$ (9 : 1 – v/v) и центрифугировали 30 мин при 1000 г (4°). Осадок, содержащий ЦП, растворяли в 10 мл PBS. Нерастворившиеся примеси удаляли центрифугированием в течение 30 мин при 1000 г (4°).

Надосадочную жидкость пропускали через колонку с аргинин-сефарозой (3 × 10 см). Обработанный таким образом ЦП наносили на колонку с протамин-сефарозой (2 × 10 см), уравновешенную PBS, и промывали 200 мл 0,075 М NaCl (pH 7,4). Элюцию с колонки проводили 0,33 М NaCl (pH 7,4) при высокой скорости (1 мл/мин на 1 см² сечения колонки). Элюат 0,33 М NaCl диализовали против PBS и пропускали через колонку с гепарин-сефарозой (2 × 4 см). Препарат мономера ЦП (выход 42%) характеризовался соотношением $A_{610}/A_{280} = 0,052$ и был стабилен при хранении.

ЦП выявляли в ПААГ после ЭФ без детергентов [19] по окислению *o*-дианизидина [20]. При инкубации геля в 0,01%-ном растворе $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ в 0,4 М натрий-ацетатном буфере (pH 5,5) в течение 1 ч при 25° и последующей окраске 25 мМ $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ в месте проявления ферроксидазной активности на светло-зеленом фоне выявлялись синие пятна.

Холоформы трансферринов получали при диализе апотрансферринов с 10-молярным избытком FeCl_3 или CuCl_2 и NaHCO_3 против 0,1 М натрий-цитратного буфера, pH 8,0. Полученные металлосодержащие трансферрины пропускали через колонку с Chelex-100.

Для сравнения скорости встраивания окисленного железа в апотрансферрины наблюдали за изменением A_{460} во времени в смеси, содержащей 0,55 мкМ ЦП, 0,5 мМ NaHCO_3 , 0,34 мМ $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,13 мМ апо-ЛФ или апо-ТФ в 0,1 М натрий-ацетатном буфере (рН 5,5 и 7,4). Контролем при измерении A_{460} служила смесь, не содержащая ЦП. С использованием коэффициентов поглощения для $(\text{Fe}^{3+})_2 - \text{ЛФ}$ и $(\text{Fe}^{3+})_2 - \text{ТФ}$ строили график зависимости $[\text{Fe}^{3+}]$ от времени и по тангенсу угла наклона линейного участка графика рассчитывали скорость встраивания Fe^{3+} в трансферрины. При пятикратной повторности среднее отклонение составляло не более 1,5%. Все белковые растворы были обработаны на Chelex-100. Буферы были приготовлены на деионизованной воде. Растворы $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ использовали в течение 5 мин после приготовления.

Для сравнения влияния различных форм ЛФ на ферроксидазную активность ЦП определяли количество окисленного железа в реакции с изотиоцианатом (KSCN) в кислой среде. Реакционная смесь содержала 0,1 М натрий-ацетатный буфер, рН 6,0, 150 мкг/мл ЦП и 50 мМ $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, а также количество ЛФ или ТФ, обеспечивающее требуемый молярный избыток. Через каждые 2 мин из реакционной смеси отбирали по 1/6 объема, в который добавляли равные объемы 0,5 М KSCN и 6М H_2SO_4 . Fe^{3+} определяли спектрофотометрически ($a_{450} = 107$ мл/мг на 1 см). Контролем служили пробы, которые отбирали из смеси, не содержащей ЦП. При четырехкратной повторности среднее отклонение составляло не более 2%. По тангенсу угла наклона линейного участка графика зависимости $[\text{Fe}^{3+}]$ от времени рассчитывали скорость ферроксидазной реакции, катализируемой ЦП.

Для определения концентраций гомогенных препаратов белков использовали следующие коэффициенты: для ЦП $a_{280} = 1,61$ мл/мг на 1 см и $a_{610} = 0,0741$ мл/мг на 1 см [21, 22], для апо-ЛФ $a_{280} = 1,46$ мл/мг на 1 см, для апо-ТФ $a_{280} = 1,49$ мл/мг на 1 см. Степень насыщения трансферринов ионами металлов оценивали с помощью коэффициентов для $(\text{Fe}^{3+})_2 - \text{ЛФ}$ ($a_{460} = 0,0547$ мл/мг на 1 см), для $(\text{Cu}^{2+})_2 - \text{ЛФ}$ ($a_{435} = 0,0616$ мл/мг на 1 см), для $(\text{Fe}^{3+})_2 - \text{ТФ}$ ($a_{460} = 0,057$ мл/мг на 1 см), для $(\text{Cu}^{2+})_2 - \text{ТФ}$ ($a_{435} = 0,0525$ мл/мг на 1 см) [23].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Встраивание Fe^{3+} в апо-ЛФ и апо-ТФ в процессе окисления Fe^{2+} до Fe^{3+} , катализируемого ЦП. В системе $\text{Fe}^{2+} - \text{ЦП} - \text{апотрансферрины} - \text{HCO}_3^-$ в

результате окисления Fe^{2+} , катализируемого ЦП, происходило образование окрашенного комплекса $\text{Fe}^{3+} - \text{трансферрин}$. Процесс встраивания в трансферрины ионов железа, окисленных в присутствии ЦП, происходил быстрее при рН 7,4, чем при рН 5,5. Встраивание Fe^{3+} в апо-ЛФ происходило в 7 раз (при рН 5,5) и в 4 (при рН 7,4) раза быстрее, чем в системе $\text{Fe}^{2+} - \text{апо-ТФ} - \text{ЦП} - \text{HCO}_3^-$ (рис. 1).

Наличие ферроксидазной активности у комплекса ЦП-ЛФ. При ЭФ в ПААГ без детергентов ЦП комплекс ЦП-ЛФ (1 : 2, *in vitro*) и комплекс ЦП-ЛФ в пробе грудного молока на шестой день лактации выявляются как при окраске о-данизидином, так и при анализе ферроксидазной активности. Окрашиваемый кумасси очищенный ЛФ и его избыток в грудном молоке не обладают ни ферроксидазной, ни диаминоксидазной активностями (рис. 2).

Влияние различных форм ЛФ на ферроксидазную реакцию. При окислении Fe^{2+} , катализируемом ЦП, апо-ЛФ в 1,25 раза увеличивал скорость реакции при соотношении ЦП : ЛФ = 1 : 1. Холо-ЛФ : $(\text{Fe}^{3+})_2\text{ЛФ}$ или ЛФ, в который была встроена медь ($(\text{Cu}^{2+})_2 - \text{ЛФ}$), увеличивали в 1,6 и 2 раза скорость окисления Fe^{2+} при молярном соотношении ЦП : ЛФ = 1 : 1 и 1 : 2 соответственно (таблица). При добавлении к ЦП избытка апо-ЛФ (ЦП : апо-ЛФ < 1 : 1) или холо-ЛФ (ЦП : холо-ЛФ < 1 : 2) скорость окисления железа более не изменялась. Апо-ТФ и холо-ТФ не оказывали влияния на ферроксидазную активность ЦП. В контрольных опытах ни одна из форм ТФ и ЛФ не обладала собственной ферроксидазной активностью.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В наших опытах мы наблюдали различия в скорости встраивания Fe^{3+} в ЛФ и ТФ, которое происходило при окислении Fe^{2+} , катализируемом ЦП (рис. 1). Увеличение скорости встраивания Fe^{3+} в ЛФ по сравнению с таковой в ТФ можно объяснить по крайней мере тремя различными механизмами.

Во-первых, окисление Fe^{2+} мог катализировать сам ЛФ при условии наличия у него ферроксидазной активности. Такие гипотезы высказывались рядом авторов на основании гомологии ЛФ с медьсодержащими оксидазами: диаминооксидазой [24] и ЦП [25]. Однако при окраске ПААГ по окончании электрофореза ЦП, ЛФ, их комплекса *in vitro* и естественного комплекса ЦП-ЛФ грудного молока для определения ферроксидазной активности, таковая была обнаружена только у ЦП (рис. 2, 1) и его комп-

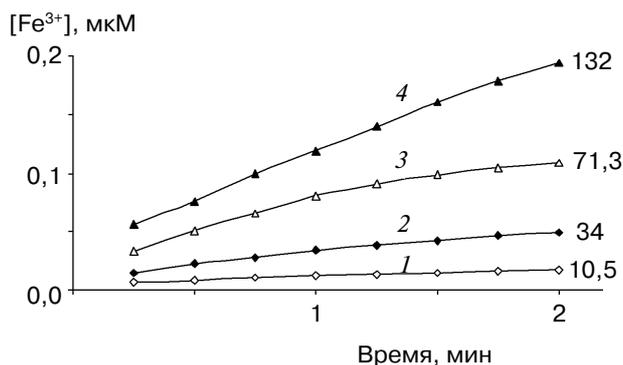


Рис. 1. Встраивание Fe^{3+} в сывороточный ТФ (1, 2) и в ЛФ (3, 4) в системах Fe^{2+} -апо-ТФ-ЦП- HCO_3^- при рН 5,5 (1, 3) и рН 7,4 (2, 4). У прямых указана скорость встраивания Fe^{3+} в нмоль на 1 мг ЦП в 1 мин

лексов с ЛФ (рис. 2, II). Чистый препарат ЛФ и его избыток вне комплекса с ЦП в грудном молоке при данной окраске не выявлялись. Кроме того, в контрольных экспериментах мы не наблюдали собственной ферроксидазной активности ни у холо-ЛФ, ни у его апоформы.

Во-вторых, объяснением наших наблюдений могло быть большее сродство ЛФ к ионам железа и устойчивость к рН среды комплекса ЛФ с железом по сравнению с таковым с ТФ. Однако и при рН 7,4, когда апо-ТФ не теряет связанные им ионы Fe^{3+} , мы наблюдали различие в скорости встраивания окисленного железа. Кроме того, в случае справедливости второй гипотезы добавление к ЦП количеств ЛФ, превышающих стехиометрическое соотношение (ЦП : ЛФ = 1 : 2), должно было привести к еще большему увеличению скорости реакции. Однако в наших опытах увеличение скорости окисления железа под действием ЦП наблюдалось только при соотношении ЦП : ЛФ, отражающем стехиометрию комплекса (1 : 1 — по данным гель-фильтрации и 1 : 2 — по данным ЭФ в ПААГ без детергентов [13]).

В-третьих, в предыдущих работах мы показали, что комплекс ЦП с ЛФ разобщается гепарином и ДНК [14], которые взаимодействуют с N-концевым аргининовым кластером ($^2RRRR^5$) в ЛФ [26]. Мы предположили, что именно этот кластер отвечает за взаимодействие ЛФ с ЦП. Протамин кеты — полипептид, содержащий полиаргининовые кластеры и взаимодействующий с ЦП, — также увеличивал ферроксидазную активность ЦП при соотношении ЦП : протамин = 1 : 2 [11].

Таким образом, наиболее вероятным механизмом влияния является аллостерическое взаимодействие N-концевого участка ЛФ, обладающего катионными свойствами, с отрицательно заряженным C-концевым доменом ЦП, содержащим три из четырех ионов меди активного центра.

В предыдущих исследованиях мы не наблюдали различий при сравнении сродства к ЦП у апо- и холо-ЛФ при хроматографии, электрофорезе и иммуноэлектрофорезе [13, 14]. Полученные нами данные показывают, что увеличение активности ЦП под действием апо- и холо-ЛФ связано с изменением стехиометрического соотношения в комплексе ЦП-ЛФ. Известно, что эти формы ЛФ различаются по конформации доменов [17].

Комплекс ЦП-ЛФ, обнаруженный нами в грудном молоке, вероятно, играет важную роль в окислении Fe^{2+} молока и встраивании его в ЛФ, который на 75–88% представлен апоформой [27]. Действительно, в пробе грудного молока после ЭФ в ПААГ только зона, соответствовавшая комплексу ЦП-ЛФ, проявила ферроксидазную активность. Логично предположить, что комплекс ЦП-ЛФ в грудном молоке будет обладать ферроксидазной активностью. ЛФ

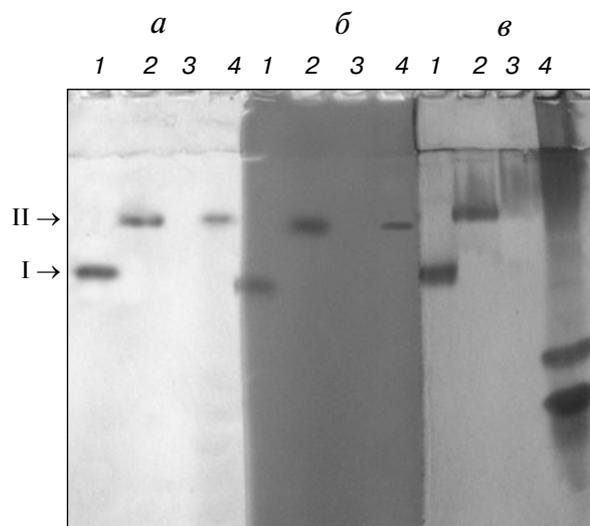


Рис. 2. Ферроксидазная активность комплексов ЦП-ЛФ. ПААГ-электрофорез без Ds-Na. 1 — ЦП, 5 мкг; 2 — ЦП-ЛФ, 5 мкг + 6 мкг; 3 — ЛФ, 6 мкг; 4 — 40 мкл делипидированного грудного молока (шестой день лактации). Панель а — окраска о-дианизидином, б — выявление ферроксидазной активности, в — окраска кумасси R-250. I — Электрофоретическая подвижность ЦП, II — подвижность комплекса ЦП-ЛФ

Влияние разных форм ЛФ на ферроксидазную активность ЦП

ЦП-форма ЛФ (моль : моль)	Скорость ферроксидазной реакции, мкмоль Fe ²⁺ на 1 мг ЦП в 1 мин
ЦП (без ЛФ)	0,119 ± 0,002
ЦП-апо-ЛФ (1 : 1)	0,149 ± 0,003
ЦП-апо-ЛФ (1 : 2)	0,151 ± 0,003
ЦП-(Fe ³⁺) ₂ -ЛФ (1 : 1)	0,190 ± 0,004
ЦП-(Cu ²⁺) ₂ -ЛФ (1 : 1)	0,192 ± 0,004
ЦП-(Fe ³⁺) ₂ -ЛФ (1 : 2)	0,242 ± 0,004
ЦП-(Cu ²⁺) ₂ -ЛФ (1 : 2)	0,248 ± 0,004

содержится в грудном молоке в более чем 100-кратном избытке относительно ЦП. Вероятно, большая ферроксидазная активность комплекса ЦП-ЛФ не могла не повлиять на результаты определения содержания ЦП в грудном молоке по его ферроксидазной активности [28], которые несколько завышены относительно концентраций ЦП, рассчитанных по данным ракетного иммуноэлектрофореза и диаминоксидазной активности [29].

Усиление ферроксидазной активности ЦП в кровяном русле, по-видимому, возможно во

время острой фазы воспаления, когда нейтрофилы секретируют до 30 г ЛФ в день, из которых 10 г ЛФ остается в кровотоке. При таком количестве ЛФ будет способен связать более половины поступающего в кровотоки железа. При снижении рН в очаге воспаления Fe³⁺ из комплекса с ТФ перейдет к ЛФ [30]. Вероятно, в очаге воспаления именно ЛФ будет способен связывать ионы Fe³⁺, лимитирующие рост микроорганизмов. Косвенно это предположение подтверждается сообщениями о частых случаях гипоферремии при воспалении [30]. В сообщении о бактерицидном действии ЦП при рН 5,0 в присутствии Fe²⁺ и фосфата [31] показано, что процесс окисления Fe²⁺, катализируемый ЦП и фосфатом, играет ключевую роль в подавлении роста микроорганизмов. Если учесть, что ЛФ увеличивает ферроксидазную активность ЦП и сам обладает бактерицидными свойствами, можно предположить, что комплекс ЦП-ЛФ участвует в защитных реакциях организма против патогенных микроорганизмов.

Исследование проведено при финансовой поддержке РФФИ (гранты 03-04-49201, 02-04-49698), МАС (грант 03-04-06960) и гранта Президента Российской Федерации для поддержки ведущих научных школ Российской Федерации (грант НШ-1730.2003.4).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Holmberg, C.G., and Laurell, C.B. (1948) *Acta Chem. Scand.*, **2**, 550–556.
- Ravin, H.A. (1961) *J. Lab. Clin. Med.*, **58**, 161.
- Osaki, S. (1966) *J. Biol. Chem.*, **241**, 5053–5059.
- Park, Y.S., Suzuki, K., Taniguchi, N., and Gutteridge, J.M.C. (1999) *FEBS Lett.*, **458**, 133–136.
- Stoj, C., and Kosman, D.J. (2003) *FEBS Lett.*, **554**, 422–426.
- Gutteridge, J.M. (1985) *Chem. Biol. Interact.*, **56**, 113–120.
- Harris, Z.L., Durley, A.P., Man, Tsz.K., and Gitlin, J.D. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 10812–10817.
- Harris, Z.L., Klomp, L.W.J., and Gitlin, J.D. (1998) *Am. J. Clin. Nutr.*, **67**, 972–977.
- Walker, F.J., and Fay, P.J. (1990) *J. Biol. Chem.*, **265**, 1834–1836.
- Van Eden, M.E., and Aust, S.D. (2000) *Arch. Biochem. Biophys.*, **381**, 119–126.
- Соколов А.В., Захарова Е.Т., Шавловский М.М., Васильев В.Б. (2005) *Биоорганическая химия*, **31**, 269–279.
- Park, Y.S., Suzuki, K., Mumby, S., Taniguchi, N., and Gutteridge, J.M.C. (2000) *Free Rad. Res.*, **33**, 261–265.
- Zakharova, E.T., Shavlovski, M.M., Bass, M.G., Gridasova, A.A., Pulina, M.O., De Filippis, V., Beltramini, M., Di Muro, P., Salvato, B., Fontana, A., Vasilyev, V.B., and Gaitskhoki, V.S. (2000) *Arch. Biochem. Biophys.*, **374**, 222–228.
- Pulina, M.O., Zakharova, E.T., Sokolov, A.V., Shavlovski, M.M., Bass, M.G., Solovyov, K.V., Kokryakov, V.N., and Vasilyev, V.B. (2002) *Biochem. Cell. Biol.*, **80**, 35–39.
- Farnaud, S., and Evans, R.W. (2003) *Mol. Immunol.*, **40**, 395–405.
- Roxborough, H.E., Millar, C.A., McEneny, J., and Young, I.S. (1995) *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **214**, 1073–1078.
- Peterson, N.A., Anderson, B.F., Jameson, G.B., Tweedie, J.W., and Baker, E.N. (2000) *Biochemistry*, **39**, 6625–6633.
- Guerin, G., Vreeman, H., and Nguyen, T.C. (1976) *Eur. J. Biochem.*, **67**, 433–445.
- Davis, B.J. (1964) *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **121**, 404–427.
- Owen, C.A., and Smith, H. (1961) *Clin. Chim. Acta.*, **6**, 441–444.
- De Filippis, V., Vassiliev, V.B., Beltramini, M., Fontana, A., Salvato, B., and Gaitskhoki, V.S. (1996) *Biochim. Biophys. Acta.*, **1297**, 119–123.
- Noyer, M., Dwulet, F.E., Hao, Y.L., and Putnam, F.W. (1980) *Anal. Biochem.*, **102**, 450–458.
- Masson, P.L. (1970) in *La Lactoferrine. Proteine des Secretions Externes et des Leucocytes Neutrophiles*, (Masson P.L., ed.), Arscia, Bruxelles, 65.
- Houen, G., Hogdall, E.V., Barkholt, V., and Nørskov, L. (1996) *Eur. J. Biochem.*, **241**, 303–308.

25. Metz-Boutigue, M.-H., Jolles, J., Mazurier, J., Spik, G., Montreuil, J., and Jolles, P. (1981) *FEBS Lett.*, **132**, 239–242.
26. Van Berkel, P.H., Geerts, M.E., van Veen, H.A., Mericskay, M., de Boer, H.A., and Nuijens, J.H. (1997) *Biochem. J.*, **328**, 145–151.
27. Bezwoda, W.R., and Mansoor, N. (1989) *Biomed. Chromatogr.*, **3**, 121–126.
28. Kiyosawa, I., Matsuyama, J., Nyui, S., and Fukuda, A. (1995) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **59**, 713–714.
29. Пучкова Л.В., Захарова Е.Т., Алейникова Т.Д., Мокшина С.В., Цымбаленко Н.В., Сасина Л.К., Ширманова М.Р., Рогачева Н.П., Гайцхоки В.С. (1997) *Биохимия*, **62**, 1082–1085.
30. Sawatzki, G. (1987) in *Iron Transport in microbes, plants and animals*, (Winkelman, G., van der Helm, D., Neilands, J.B., eds) Weinheim, Verlagsgesellschaft, 477–489.
31. Klebanoff, S.J. (1992) *Arch. Biochem. Biophys.*, **295**, 302–308.

EFFECT OF LACTOFERRIN ON THE FERROXIDASE ACTIVITY OF CERULOPLASMIN

A. V. Sokolov, M. O. Pulina, E. T. Zakharova,
M. M. Shavlovski, V. B. Vasilyev

*Institute for Experimental Medicine of the Russian Academy
of Medical Sciences, ul. Acad. Pavlova 12, Saint-Petersburg 197376,
Russia; fax: (812) 234-9489, E-mail: biochem@nm.ru*

Received September 21, 2004
Revision received November 19, 2004

The effects of various forms of lactoferrin (Lf) interacting with ceruloplasmin (Cp, ferro-O₂-oxidoreductase, EC 1.16.3.1) on oxidase activity of the latter was studied. Comparing the incorporation of Fe³⁺ oxidized by Cp into Lf and serum transferrin (Tf) showed that at pH 5.5 apo-Lf binds the oxidized iron seven times and at pH 7.4 four times faster than apo-Tf under the same conditions. Apo-Lf increased the oxidation rate of Fe²⁺ by Cp 1.25 times when Cp/Lf ratio was 1 : 1. Lf saturated with Fe³⁺ or Cu²⁺ increased the oxidation rate of iron 1.6 and 2 times when Cp to holo-Lf ratios were 1 : 1 and 1 : 2, respectively. Upon adding to Cp the excess amounts of apo-Lf (Cp/apo-Lf < 1 : 1) or of holo-Lf (Cp/holo-Lf < 1 : 2) the oxidation rate of iron no longer changed. Complex Cp–Lf demonstrating ferroxidase activity was discovered in breast milk.

Key words: ceruloplasmin, ferroxidase, lactoferrin, transferrin