

УДК 547.962

ОБНАРУЖЕНИЕ И ВЫДЕЛЕНИЕ ИЗ ГРУДНОГО МОЛОКА КОМПЛЕКСА ЦЕРУЛОПЛАЗМИНА И ЛАКТОФЕРРИНА

© 2006 г. А.В. Соколов^{1*}, М.О. Пулина¹, Е.Т. Захарова¹,
А.С. Сусорова¹, О.Л. Рунова¹, Н.И. Колодкин², В.Б. Васильев¹

¹ Отдел молекулярной генетики, ГУ НИИ экспериментальной
медицины РАМН, 197376 Санкт-Петербург, ул. Акад. Павлова, 12;
факс: (812)234-9489, электронная почта: biochem@nt.ru

² Государственный НИИ особо чистых биопрепаратов,
197110 Санкт-Петербург, ул. Пудожская, 7;
факс: (812)235-5504

Поступила в редакцию 29.12.04
После доработки 20.04.05

Впервые доказано существование в грудном молоке (ГМ) комплекса медьпротеида—церулоплазмина (ЦП, ферро- O_2 -оксидоредуктаза, КФ 1.16.3.1) и лактоферрина (ЛФ). Электрофоретическая подвижность ЦП в ГМ при ПААГ-электрофорезе в неденатурирующих условиях меньше, чем у ЦП из плазмы крови, и идентична подвижности комплекса, образующегося при смешивании очищенных препаратов ЦП и ЛФ. При аффинной хроматографии делипидированного ГМ на ЦП-сефарозе сорбировался ЛФ. В элюате 0,3 М NaCl с помощью Ds-Na-ПААГ-электрофореза выявлена единственная 78 кДа зона, которая иммунологически и по определению N-концевой аминокислотной последовательности соответствует ЛФ. Синтетические пептиды R-R-R-R (N-концевой пептид ЛФ (2–5)) и K-R-Y-K-Q-R-V-K-N-K (C-концевой пептид RASAP 38 (29–38)) эффективно элюировали ЛФ с ЦП-сефарозы. Хроматографические смолы, применяемые для выделения ЦП (АЕ-Агароза) и ЛФ (СМ-Сефадекс), не сорбируют комплекс ЦП–ЛФ из снятого ГМ. Анионные пептиды ЦП (586–597), (721–734) и (905–914) эффективно элюировали ЦП с АЕ-Агарозы, но не диссоциировали комплекс ЦП–ЛФ. При добавлении к ГМ, пропущенному через СМ-Сефадекс, антител к ЛФ вместе с ЛФ коиммунопреципитировал ЦП. Выделение комплекса ЦП–ЛФ из ГМ включало хроматографию на СМ-Сефадексе, спиртовое осаждение и аффинную хроматографию на АЕ-Агарозе, что позволило добиться чистоты комплекса 98%. Полученный комплекс ЦП–ЛФ (1 : 1) был разделен на компоненты при хроматографии на гепарин-сефарозе. При ограниченном триптическом гидролизе препаратов ЦП из ГМ и плазмы крови выявлены идентичные протеолитические фрагменты.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: церулоплазмин, лактоферрин, белок-белковые взаимодействия, грудное молоко.

Комплекс церулоплазмина (ЦП, ферро- O_2 -оксидоредуктаза, КФ 1.16.3.1) и лактоферрина (ЛФ) был впервые охарактеризован нами *in vitro* [1, 2]. Было показано существование комплекса ЦП–ЛФ *in vivo* при введении ЛФ человека в кровяное русло крысы [1]. Учитывая избирательность взаимодействия экзогенного ЛФ с ЦП крысы, конкурирующим с белками плазмы крови, мы предположили, что комплекс ЦП–ЛФ мог бы существовать в организме при наличии обоих белков в биологических жидкостях.

Как ЦП, так и ЛФ присутствуют в грудном молоке (ГМ), секрете молочных желез, обеспечивающем вскармливание и защиту растущего организма [3]. Одной из вероятных функций комплекса ЦП–ЛФ в ГМ может быть его учас-

тие в метаболизме железа. Наши последние исследования показали, что в ГМ только ЦП и его комплекс с ЛФ обладают ферроксидазной активностью [4]. В свете этого образование комплекса ферроксидазы (ЦП) и белка из семейства трансферриновых (ЛФ) едва ли является случайным, учитывая способность ЛФ усиливать ферроксидазную активность ЦП. Вероятно, комплекс ЦП–ЛФ способен выполнять свои функции во время кормления на ранних сроках лактации, когда рН в желудке новорожденного находится в пределах 5–6, что не препятствует образованию комплекса ЦП–ЛФ.

ЛФ – гликопротеин семейства трансферриновых с $M_r \sim 78\ 000$ Да, способный эффективно связывать ионы железа, меди и др. Концентрация ЛФ в ГМ 0,3–0,6 г %, что составляет ~25–43% от общего содержания белка в молоке в зависимости от срока лактации [3, 5]. Кроме молока, ЛФ присутствует в нейтрофильных гра-

Принятые сокращения: ГМ – грудное молоко, ЛФ – лактоферрин, ЦП – церулоплазмин.

* Адресат для корреспонденции и запросов оттисков.

нулах лейкоцитов и в таких секретах, как слюна, семенная и слезная жидкость. При грудном вскармливании ЛФ подавляет рост патогенных микроорганизмов (*Helicobacter pylori*), кроме того, в желудочно-кишечном тракте новорожденных происходит гидролиз ЛФ пепсином, продукт которого – лактоферрицин – обладает большей бактерицидной активностью, чем интактный ЛФ. Также доказано, что ЛФ является ростовым фактором для клеток желудочно-кишечного тракта новорожденных [5].

ЦП представляет собой полифункциональный медьпротеид плазмы крови, где он содержится в концентрации 35–50 мг %. Его содержание в ГМ существенно ниже – на ранних сроках лактации оно составляет 0,5–5 мг % [6]. ЦП относится к белкам острой фазы воспаления, он обладает ферроксидазной активностью, действует как антиоксидант. ЦП человека чрезвычайно чувствителен к протеолизу, например при гидролизе трипсином молекула ЦП с $M_r \sim 132\ 000$ Да расщепляется с образованием фрагментов со следующими молекулярными массами: 110, 92, 67, 52, 49, 28, 25, 19 и 18 кДа [7].

Изучение ЦП в ГМ осложнено тем, что низкая концентрация этого белка затрудняет получение достаточного количества материала для исследований. Экстраполяция результатов исследования ЦП молока других млекопитающих на свойства белка человека не всегда корректна из-за серьезных видовых различий в составе молока. Известно, что ЦП, содержащийся в ГМ, синтезируется клетками молочной железы, а не поступает из кровотока материнского организма [8]. ЦП в ГМ не отличается от ЦП крови по данным Вестерн-блоттинга и по результатам исследования мРНК [9]. Были получены данные о том, что ЦП в ГМ и ЦП крови различны по характеру взаимодействия с лектинами и по чувствительности к действию ЭДТА [10].

Исследования, о которых пойдет речь в данной работе, были направлены на выявление комплекса ЦП–ЛФ в ГМ, разработку метода его выделения и определение некоторых его характеристик.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали окрашенные маркеры молекулярной массы («Bio-Rad», США), бромциан («Fluka», Швейцария), триэтиламин, хлорэтиламин, ЭДТА, эпихлоргидрин («Merck», Германия), Сефароза 4В, Сефароза 6В, СМ-Сефадекс С-50, СМ-Сефароза, Сефадекс G-75 Superfine («Pharmacia», Швеция), акриламид, аргинин, метиленбисакриламид, тетраметилэти-

лендиамин, мединал, веронал («Reanal», Венгрия), полный и неполный адьюванты Фрейнда, азид натрия, глицерин, кумасси R-250, меркаптоэтанол, маркеры молекулярной массы для гель-фильтрации (2000, 450, 240, 160, 67 кДа), персульфат аммония, Tris («Serva», Германия), фенилметилсульфонилфторид (PMSF), глицин, *o*-дианизидин, протамин, Ds-Na («Sigma», США), гепарин («Spofa», Польша), Toyopearl HW-55 Fine («Toyo Soda», Япония). PBS (phosphate buffer saline) – 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, pH 5,5, (0,089 М AcONa/0,011 М AcOH).

Пептиды R-R-R-R, R-K-V-R, K-R-Y-K-Q-R-V-K-N-K, H-A-G-M-E-T-T-Y-T-V, D-Q-V-D-K-E-D-E-D-F-Q-E, E-V-E-W-D-Y-S-P-Q-R-E-W-E и D-E-N-E-S-W-Y-L-D-D синтезированы твердофазным методом (НИИ особо чистых биопрепаратов, Санкт-Петербург) чистотой 99,5%, по данным ВЭЖХ и аминокислотного анализа.

Для выделения ЦП и выявления комплекса ЦП–ЛФ использовали ГМ от 32 женщин (1–7 сут. лактации), образцы которого были любезно предоставлены родильным домом № 6 г. Санкт-Петербурга. Пробы ГМ делипидировали следующим образом: подвергали центрифугированию при 500 г (4°) в течение 10 мин, отбрасывали осадок и верхний слой липидов, а надосадочную жидкость центрифугировали при 15 000 г (4°) в течение 10 мин, верхний слой липидов отбрасывали.

ЛФ выделяли из грудного молока с помощью ионообменной хроматографии на СМ-Сефарозе и гель-фильтрации на Сефадексе G-75 Superfine [1]. Препарат ЦП выделен из плазмы крови с помощью аффинной хроматографии на протамин-сефарозе [11]. ЦП, гепарин и протамин иммобилизовали на BrCN-активированной Сефарозе 4В [11]. АЕ-Агарозу получали обработкой Сефарозы 6В эпихлоргидрином и 2-хлорэтиламином [12].

Концентрацию очищенных белковых препаратов определяли спектрофотометрически, используя для ЦП коэффициенты $a_{280} = 1,61$ мл/мг на 1 см и $a_{610} = 0,0741$ мл/мг на 1 см [13, 14], а для ЛФ – $a_{280} = 1,46$ мл/мг на 1 см [15].

Определение молекулярной массы белков и протеолитических фрагментов ЦП производили методом Ds-Na-ПААГ-электрофореза [16]. ЦП выявляли в геле после электрофореза в ПААГ в неденатурирующих условиях [17] путем специфического окрашивания *o*-дианизидином [18] и реакции с $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ на наличие ферроксидазной активности [4]. Антитела к ЦП, ЛФ и сывороточному альбумину получали 3-кратной иммунизацией кролика соответствующими белка-

ми [19]. Белки концентрировали в ячейке Amicon на фильтре Diaflo PM 10.

Количество ЦП и ЛФ оценивали методом ракетного иммуноэлектрофореза с тремя параллельными пробами [20]. Содержание общего белка в пробах определяли по методу Лоури–Фолина с тремя параллельными пробами [21].

Иммунопреципитация ЦП и ЛФ из ГМ. К 100 мкл делипидированного ГМ, пропущенного через СМ-Сефадекс, добавляли 50, 100, 500, 1000 мкг антител к ЛФ или сывороточному альбумину в 100 мкл PBS и инкубировали в течение 2 ч при 37°. Затем добавляли 100 мкг антител осли к IgG кролика в 50 мкл PBS и инкубировали 12 ч при 37°. Иммуные комплексы осаждали центрифугированием в течение 1 ч при 15 000 g (4°). В надосадочной жидкости определяли содержание ЦП и ЛФ с помощью ракетного иммуноэлектрофореза. Отсутствие неспецифической преципитации ЦП антителами к ЛФ и к сывороточному альбумину проверяли, добавляя эти антитела к раствору ЦП в PBS (0,05 мг/мл) и к плазме крови.

Аффинная хроматография ГМ на ЦП-сефарозе. На колонку с 1 мл ЦП-сефарозы, уравновешенную PBS, наносили 5 мл делипидированного ГМ и промывали PBS, пока A_{280} в элюате не становилось менее 0,01. Затем колонку элюировали 2 мл 0,3 М NaCl и диализовали полученную пробу против PBS. В опытах по конкурентной диссоциации комплекса ЦП–ЛФ синтетическими пептидами на колонки, каждая из которых содержала 1 мл ЦП-сефарозы, наносили 1 мг ЛФ в PBS или 5 мл делипидированного ГМ и промывали PBS, пока A_{280} в элюате не становилось менее 0,01. Элюировали 1 мл 0,1 М раствора пептида (или PBS без пептида в контрольном опыте), а затем – 1 мл 0,3 М NaCl.

N-концевой аминокислотный анализ по Эдману проведен в Институте биоорганической химии РАН (Москва). Белок после Ds-Na-ПААГ-

электрофореза был перенесен на мембрану Immobilon P [22].

Ограниченный гидролиз трипсином проводили при весовом соотношении белок : протеиназа = 100 : 1 при 37°. Реакцию останавливали добавлением PMSF до концентрации 0,1 мМ и кипячением с буфером для Ds-Na-ПААГ-электрофореза параллельных проб через 5 мин и через 1 ч инкубации.

Выделение комплекса ЦП–ЛФ из ГМ. Комплекс ЦП–ЛФ выделяли из 100 мл ГМ (1–7 сут лактации). Избыток ЛФ удаляли при помощи хроматографии на СМ-Сефадексе (2,5 × 10 см). Согласно данным ракетного электрофореза, около 1/8 от общего количества ЛФ не сорбировалось на смоле. Обработанное таким образом ГМ подвергали осаждению 96%-ным спиртом. При 4° к ГМ добавляли равный объем спирта и после 30 мин инкубации центрифугировали в течение 1 ч при 10 000 g (4°). К надосадочной жидкости добавляли еще один объем спирта и повторяли инкубацию и центрифугирование. Осадок растворяли в 10 мл PBS, нерастворившиеся белки удаляли центрифугированием в течение 30 мин при 10 000 g (4°). На следующей стадии белки надосадочной жидкости подвергали аффинной хроматографии на колонке с АЕ-Агарозой (1 × 2 см), уравновешенной PBS. Колонку промывали PBS, пока величина A_{280} в элюате не становилась менее 0,01, а затем элюировали 0,5 М NaCl (рН 7,4). Итоговые данные о выделении комплекса ЦП–ЛФ представлены в таблице.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Электрофоретическая подвижность ЦП в составе ГМ выявлялась с помощью окрашивания *o*-диганизидином и была меньше, чем у очищенного ЦП или ЦП в составе сыворотки крови (рис. 1;

Постадийная очистка комплекса ЦП–ЛФ из грудного молока

Стадия и фракция	Общее количество во фракции			Степень очистки ЦП	Выход ЦП, %
	ЦП, мг	ЛФ, мг	белка, мг		
Делипидированное ГМ	1,05 ± 0,01	280 ± 5	1120 ± 20	1	100
Элюат PBS с СМ-Сефадекса	0,80 ± 0,01	32 ± 4	650 ± 5	1,3	76
После осаждения этанолом	0,70 ± 0,01	0,58 ± 0,01	120 ± 5	6,2	67
Элюат 0,5 М NaCl с АЕ-Агарозы	0,65 ± 0,01	0,38 ± 0,01	1,05 ± 0,01	660	62

1, 4, 7). Она совпадает с подвижностью ЦП в комплексе с ЛФ, который образуется при смешивании очищенных белков (рис. 1; 2). Изменение подвижности ЦП, свидетельствующее о его взаимодействии с ЛФ, происходило также при добавлении ЦП к ГМ, ЛФ к сыворотке крови и при смешивании сыворотки крови с ГМ (рис. 1; 3, 5, 6). При окрашивании гелей, содержащих те же пробы, с помощью $K_4[Fe(CN)_6]$ для выявления ферроксидазной активности подвижность окрашиваемых полос ЦП совпадала с таковой в геле, представленном на рис. 1. Мы проанализировали этим же методом 32 образца ГМ (1–7 сут лактации) и обнаружили комплекс ЦП–ЛФ во всех образцах.

Ранее были высказаны предположения, что измененная подвижность ЦП связана с микрогетерогенностью ЦП молока, наличием его изоформ, присутствием в ГМ липидов или изменением заряда молекулы за счет дополнительных ионов меди, связанных с ЦП [23, 24]. При добавлении ЦП, выделенного из сыворотки крови, к ГМ наблюдалось усиление окраски только оксидазной полосы с меньшей электрофоретической подвижностью, но не формирование новой полосы с ферментативной активностью ЦП. Наиболее вероятным объяснением этого является образование новых порций комплекса ЦП–ЛФ (рис. 1). Таким образом, полоса, содержащая ЦП и имеющая меньшую подвижность в ПААГ, является не изоформой ЦП, а его комплексом с ЛФ.

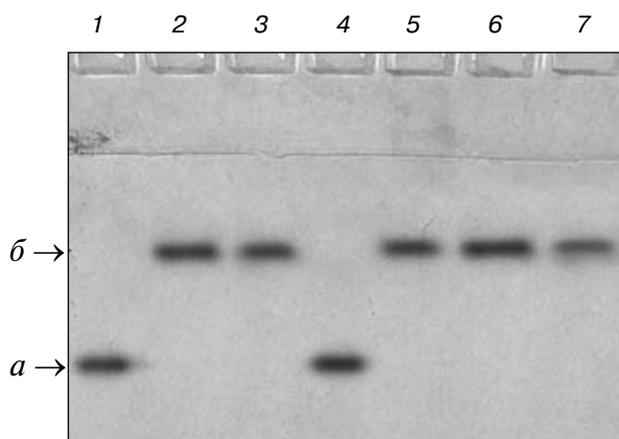


Рис. 1. Образование комплексов ЦП–ЛФ по данным ПААГ-электрофореза в неденатурирующих условиях, окрашивание *o*-дианизидином: 1 – ЦП, 1 мкг (подвижность *a*); 2 – ЦП, 1 мкг + ЛФ, 1,2 мкг (подвижность *б*); 3 – ЦП, 1 мкг + 5 мкл ГМ; 4 – сыворотка крови, 5 мкл; 5 – сыворотка крови, 5 мкл + ЛФ, 1,2 мкг; 6 – сыворотка крови, 5 мкл + 5 мкл ГМ; 7 – 40 мкл ГМ

Аффинная хроматография делипидированного ГМ на ЦП-сефарозе показала, что ЛФ взаимодействует со смолой и элюируется 0,3 М NaCl. Присутствие ЛФ в элюате доказано с помощью ракетного иммуноэлектрофореза в антителах к ЛФ (рис. 2, *б*). Методом Ds-Na-ПААГ-электрофореза в элюате обнаружена единственная зона с молекулярной массой 78 кДа (рис. 2, *а*). N-концевая аминокислотная последовательность белка, содержащегося в выявленной зоне ($^1G-R-R-R-R-S-V^7$) оказалась идентична последовательности (1–7) в ЛФ.

Действительно, при аффинной хроматографии на ЦП-сефарозе из ГМ избирательно сорбировался ЛФ. Описан целый ряд комплексов ЛФ с белками ГМ: с лизоцимом [25], секреторным IgA [26], казеином, α -лактальбумином и альбумином [27]. Однако присутствие этих белков не мешало ЛФ взаимодействовать с добавленным ЦП и с ЦП-сефарозой.

Мы использовали синтетические тетрапептиды R-R-R-R и R-K-V-R, соответствующие N-концевым участкам последовательности ЛФ (2–5) и (28–31), и декапептид H-A-G-M-E-T-T-Y-T-V, соответствующий участку последовательности ЦП (1028–1037), для конкурентного вытеснения ЛФ с ЦП-сефарозы. Колонку, на которой был сорбирован ЛФ, элюировали 0,1 мМ растворами пептидов в PBS. Эффективная десорбция ЛФ происходила только при элюции раствором R-R-R-R (рис. 2, *в*). Декапептид K-R-Y-K-Q-R-V-K-N-K, представляющий собой фрагмент (29–38) нейропептида PACAP 38 и ответственный за избирательное взаимодействие PACAP 38 с ЦП [22], также эффективно вытеснял ЛФ с ЦП-сефарозы (рис. 2, *е*).

Ранее мы показали, что комплекс ЦП–ЛФ диссоциирует под действием гепарина *in vitro* [2]. Гепарин взаимодействует в ЛФ с N-концевым аргининовым кластером $^2R-R-R-R^5$ [29], хотя участок $^{28}R-K-V-R^{31}$ также вовлечен во взаимодействие [30]. В данной работе мы показали, что пептид R-R-R-R эффективно диссоциирует комплекс ЦП–ЛФ. Взятый отдельно R-K-V-R диссоциирующим действием не обладал. Можно предположить, что диссоциация комплекса пептидом R-R-R-R происходила благодаря его конкуренции как с $^2R-R-R-R^5$, так и с $^{28}R-K-V-R^{31}$, учитывая пространственную близость фрагментов последовательности (2–5) и (28–31) в ЛФ. Скорее всего, R-K-V-R не является столь же эффективным конкурентом за связь с последовательностью (2–5) в ЛФ.

Пептид H-A-G-M-E-T-T-Y-T-V, соответствующий участку последовательности ЦП (1028–1037), препятствующий взаимодействию ЦП как с протеином С [31], так и с фер-

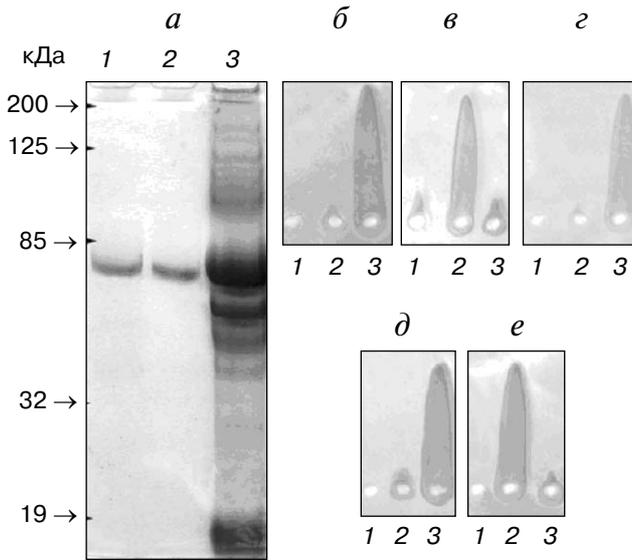


Рис 2. Результаты хроматографии ГМ на ЦП-сефарозе. *a* – Ds-Na-ПААГ-электрофорез (окрашивание кумасси R-250): 1 – элюат 0,3 М NaCl при хроматографии ГМ на ЦП-сефарозе; 2 – ЛФ, 5 мкг; 3 – ГМ, 5 мкл. *б–е* – Ракетный иммуноэлектрофорез против антител к ЛФ (0,4 мкг на 1 мл агарозы, окрашивание кумасси R-250): 1 – элюат PBS с ЦП-сефарозы, 2 – элюат PBS без пептида (*б*), 0,1 мМ растворами R-R-R-R (*в*), R-K-V-R (*г*), H-A-G-M-E-T-T-Y-T-V (*д*), K-R-Y-K-Q-R-V-K-N-K (*е*), 3 – элюат 0,3 М NaCl

ритином [32], не вызывал диссоциацию комплекса ЦП–ЛФ. Это позволяет считать, что ЛФ взаимодействует в ЦП с другим участком последовательности, отличным от контактной области для протеина С и ферритина.

Фрагмент нейропептида RАСАР 38 (29–38) K-R-Y-K-Q-R-V-K-N-K эффективно препятствовал взаимодействию ЦП с ЛФ ($K_d = 1,8$ мкМ [1]), что указывает на возможную конкуренцию между этим фрагментом и ЛФ за контактную область в ЦП. Способность фрагмента RАСАР 38 препятствовать взаимодействию ЦП с ЛФ, по-видимому, обусловлена более низким значением константы диссоциации ($K_d = 3,4$ нМ) для взаимодействия ЦП с последовательностью (29–38) в RАСАР 38. Ранее было показано, что из всех белков плазмы крови RАСАР 38 избирательно взаимодействует с ЦП [22].

Анионные пептиды ЦП D-Q-V-D-K-E-D-E-D-F-Q-E (586–597), E-V-E-W-D-Y-S-P-Q-R-E-W-E (721–734) и D-E-N-E-S-W-Y-L-D-D (905–914) не вызывали диссоциации комплекса ЦП–ЛФ. Однако 0,1 мМ растворы в PBS каждого из этих пептидов эффективно элюировали ЦП с АЕ-Агарозы – аффинного сорбента для выделения ЦП из плазмы крови (данные не

приводятся). Вероятно, последовательности ЦП для взаимодействия с АЕ-Агарозой и для взаимодействия с ЛФ не перекрываются, что и делает возможным сорбцию комплекса на АЕ-Агарозе без его диссоциации.

Коиммунопреципитация комплекса ЦП–ЛФ в ГМ. Концентрация ЛФ в ГМ в 300 раз выше, чем концентрация ЦП. АЕ-Агароза не сорбирует ЦП из снятого ГМ (по данным ракетного иммуноэлектрофореза и ПААГ-электрофореза в неденатурирующих условиях). При хроматографии ГМ на СМ-Сефадексе большая часть ЛФ сорбируется на колонке, тогда как ЦП практически не взаимодействует со смолой. Во фракции, не взаимодействующей с СМ-Сефадексом, концентрации ЦП и ЛФ становятся более близкими (0,015 и 0,60 мг/мл соответственно). Добавление к этой фракции антител к ЛФ вызывало полную преципитацию ЛФ и коиммунопреципитацию ЦП. Увеличение количества антител к ЛФ, добавленного к пробе, при полном осаж-

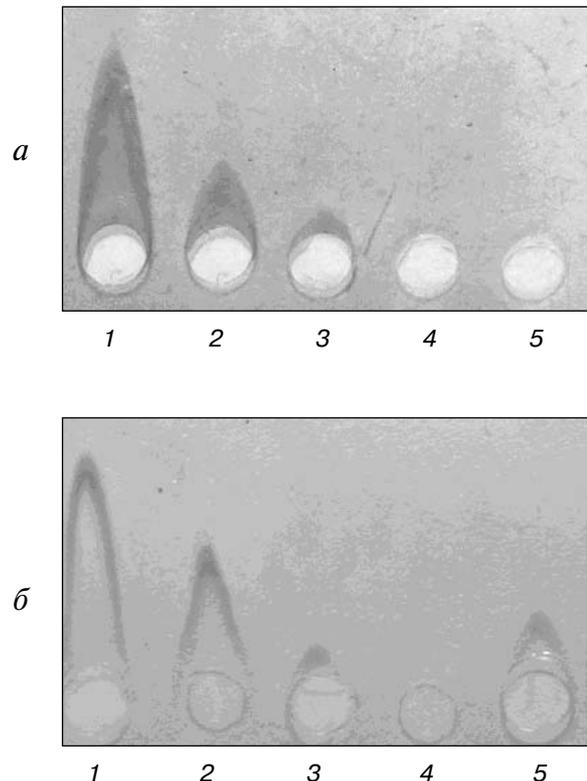


Рис 3. Преципитация ЦП и ЛФ из ГМ, пропущенного через СМ-Сефадекс. Ракетный иммуноэлектрофорез против антител к ЛФ (*a*, 0,4 мкг на 1 мл агарозы, окрашивание кумасси R-250) и антител к ЦП (*б*, 0,2 мкг на 1 мл агарозы, окрашивание *o*-дианизидином). ГМ после добавления: 1 – 50 мкг, 2 – 100 мкг, 3 – 500 мкг, 4 – 1 мг антител к ЛФ, 5 – ГМ (вместо антител добавлен PBS)

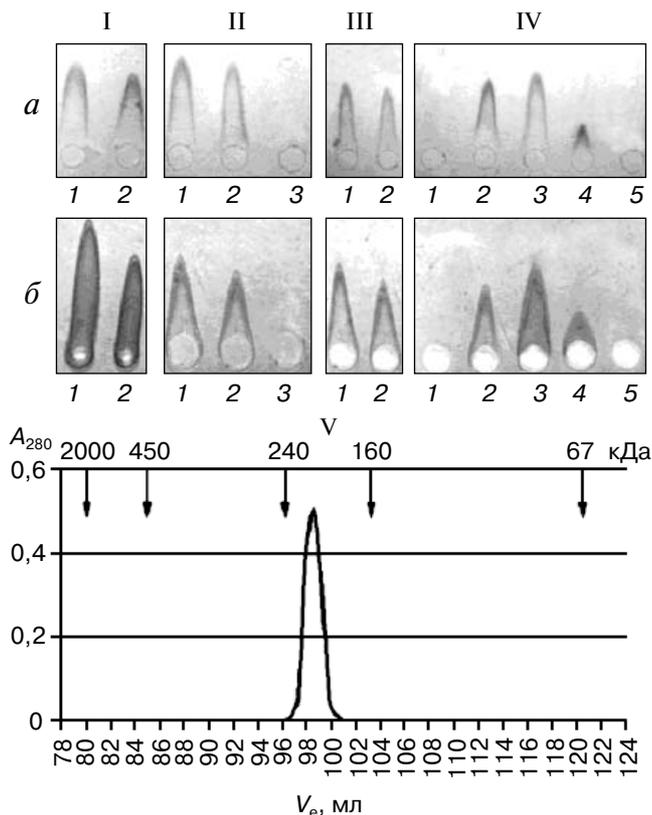


Рис. 4. Идентификация ЦП и ЛФ в пробах на стадиях выделения комплекса ЦП–ЛФ из ГМ. Ракетный иммуноэлектрофорез против антител к ЦП (а, 0,2 мкг на мл агарозы, окрашивание *o*-дианизидином) и к ЛФ (б, 0,4 мкг на 1 мл агарозы, окрашивание кумасси R-250). Панель I: 1 – 5 мкл ГМ до CM-Сефарозы (б, разбавлено в 5 раз), 2 – 5 мкл ГМ после CM-Сефарозы. Панель II: 1 – 40 мкл надосадочной жидкости при осаждении спиртом в соотношении (1 : 1), 2 – 5 мкл раствора осадка при осаждении спиртом в соотношении (1 : 2), 3 – 40 мкл надосадочной жидкости при осаждении спиртом в соотношении (1 : 2). Панель III: 1 – элюат 0,5 М NaCl с АЕ-Агарозы, 2 – 0,1 мкг ЦП и 0,06 мкг ЛФ (ЦП : ЛФ = 1 : 1). Панель IV: 1, 2, 3, 4 и 5 – по 40 мкл из фракций, соответствующих объему 96, 97, 98, 99 и 100 мл элюата при гель-фильтрации комплекса ЦП–ЛФ на Тоуорепарл НW-55. Панель V: профиль элюции при гель-фильтрации комплекса ЦП–ЛФ на Тоуорепарл НW-55 (1 × 150 см), максимум пика элюции $V_e = 98$ мл, стрелками указаны V_e маркеров молекулярных масс

дении ЛФ не приводило к полному осаждению ЦП из ГМ (рис. 3). Добавление к исследуемой фракции антител против сывороточного альбумина не приводило к осаждению ЦП или ЛФ.

Преципитация ЦП из ГМ антителами к ЛФ ясно указывает на наличие в ГМ комплекса ЦП–ЛФ. В предыдущих исследованиях мы наблюдали, что комплекс *in vitro* диссоциирует под действием антител к ЦП и ЛФ при ПААГ-электрофорезе в неденатурирующих условиях и при

ракетном иммуноэлектрофорезе [2]. Это можно объяснить частичным совпадением антигенных детерминант белков с участками их белок-белкового контакта. Поэтому, вероятно, избыток антител к ЛФ не осаждал ЦП из ГМ полностью.

Характеристики комплекса ЦП–ЛФ, выделенного из ГМ. В ходе выделения комплекс ЦП–ЛФ не сорбировался на CM-Сефадексе (рис. 4, I), при осаждении белков хаотропным агентом – этанолом – взаимодействие ЦП и ЛФ не нарушалось (рис. 4, II). В элюате с АЕ-Агарозы ЦП и ЛФ присутствовали в соотношении 1 : 1, по данным ракетного иммуноэлектрофореза (рис. 4, III). Мы добились чистоты комплекса 98% и выхода ЦП – 62% от его содержания в исходном ГМ (таблица).

При последующей гель-фильтрации на колонке Тоуорепарл НW-55 Fine (1 × 150 см) комплекс ЦП–ЛФ выходил одним пиком (рис. 4, IV и V) и имел по данным калибровки $M_r 220\ 000 \pm 10\ 000$ Да. При Ds-Na-ПААГ-электрофорезе комплекса выявлялись 130 и 110 кДа зоны ЦП и 78 кДа зона ЛФ (рис. 5, 4). В предыдущих исследованиях мы наблюдали образование *in vitro* комплексов ЦП–ЛФ с различными стехиометрическими соотношениями. Так, например, при

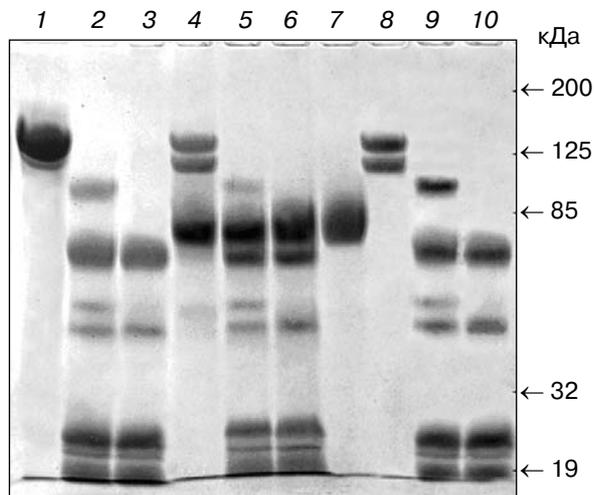


Рис. 5. Ds-Na-ПААГ-электрофорез продуктов ограниченного протеолиза препаратов ЦП трипсином (протеиназа : белок = 1 : 100), окрашивание кумасси R-250. 1 – ЦП плазмы крови, 25 мкг; 2 – ЦП плазмы крови, 25 мкг после 5 мин протеолиза; 3 – ЦП плазмы крови, 25 мкг после 1 ч протеолиза; 4 – ЦП–ЛФ из ГМ, 25 мкг; 5 – ЦП–ЛФ из ГМ, 25 мкг после 5 мин протеолиза; 6 – ЦП–ЛФ из ГМ, 25 мкг после 1 ч протеолиза; 7 – ЛФ, 25 мкг после 1 ч протеолиза; 8 – ЦП из ГМ (свободный объем с гепарин-сефарозы), 25 мкг; 9 – ЦП из ГМ, 25 мкг после 5 мин протеолиза; 10 – ЦП из ГМ, 25 мкг после 1 ч протеолиза

ПААГ-электрофорезе в неденатурирующих условиях мы наблюдали образование комплексов с соотношениями ЦП : ЛФ = 1 : 2 и 1 : 4 [1], а при гель-фильтрации на Sephacryl S-300 белки формировали единственный комплекс с соотношением ЦП : ЛФ = 1 : 1 [32]. Комплекс ЦП–ЛФ (1 : 1), выделенный из ГМ, разделялся при хроматографии на гепарин-сефарозе, при этом ЦП выходил в свободном объеме.

При денатурирующем электрофорезе в ПААГ (с добавлением Ds-Na) обнаружено, что фрагменты триптического гидролиза ЦП из ГМ идентичны фрагментам триптического гидролиза ЦП из плазмы крови. При гидролизе трипсином комплекса ЦП–ЛФ из ГМ сохранялась 78 кДа зона ЛФ, но были выявлены протеолитические фрагменты ЦП (рис. 5). Это говорит в пользу идентичности полипептидных цепей ЦП из ГМ и плазмы крови. Большая устойчивость ЦП из ГМ к протеолизу при хранении [24], скорее всего, вызвана отсутствием в препарате примесных протеиназ, специфичных для плазмы крови и расщепляющих недостаточно очищенные препараты ЦП крови при хранении [11].

Полученные результаты убедительно доказывают существование комплекса ЦП–ЛФ в ГМ на ранних сроках лактации. В настоящее время вопрос о его функции остается открытым. Из приведенных данных ясно, что ЦП в составе комплекса сохраняет оксидазную активность. В образовании комплекса играют роль электростатические взаимодействия, а гепарин и фрагмент РАСАР, специфически связывающиеся соответственно с ЛФ и ЦП, вызывают его диссоциацию. Однако в отсутствие диссоциирующих реагентов комплекс достаточно прочен и может быть получен из ГМ в виде высокоочищенного препарата (со стехиометрическим соотношением ЦП : ЛФ = 1 : 1), пригодного для дальнейших исследований.

Выражаем благодарность В.Н. Кокрякову и М.М. Шавловскому (ГУ НИИ экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург) за ценные советы и полезное обсуждение результатов.

Исследование выполнено при поддержке грантов РФФИ (03-04-49201 и 05-04-48765), МАС (03-04-06960) и НШ (1730.2003.4).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 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.
- Каньшкова Т.Г., Бунева В.Н., Невинский Г.А. (2002) *Успехи соврем. биологии*, **122**, 260–272.
- Соколов А.В., Пулина М.О., Захарова Е.Т., Шавловский М.М., Васильев В.Б. (2005) *Биохимия*, **70**, 1231–1236.
- Farnaud, S., and Evans, R.W. (2003) *Mol. Immunol.*, **40**, 395–405.
- Пучкова Л.В., Алейникова Т.Д., Захарова Е.Т., Цымбаленко Н.В., Ширманова М.Р., Гайцхоки В.С. (1997) *Вопр. питания*, **4**, 19–22.
- Ortel, T.L., Takahashi, N., and Putnam, F.W. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 4761–4765.
- Jaeger, J.L., Shimizu, N., and Gitlin, J.D. (1991) *J. Biochem.*, **28**, 671–677.
- Cerveza, P.J., Mehrbod, F., Cotton, S.J., Lomeli, N., Linder, M.C., Fonda, E.G., and Wickler, S.J. (2000) *Arch. Biochem. Biophys.*, **373**, 451–461.
- 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.
- Соколов А.В., Захарова Е.Т., Шавловский М.М., Васильев В.Б. (2005) *Биоорганическая химия*, **31**, 1–11.
- Musci G., Bonaccorsi di Patti M.C., Fagiolo, U., and Calabrese, L. (1993) *J. Biol. Chem.*, **268**, 13388–13395.
- 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* (Arscia, S.A., ed.), Brussels.
- Laemmli, U.K. (1970) *Nature*, **227**, 680–686.
- 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.
- Захарова Е.Т., Васильев В.Б., Горбунова В.Б., Шавловский М.М. (1983) *Биохимия*, **48**, 1709–1720.
- Laurell, C.B. (1967) in *Protides of the biological fluids* (Peeters, H., ed.), Elsevier, Amsterdam, 499–502.
- Thorne, C.J.R. (1978) in *Techniques in Protein and Enzyme Biochemistry*, Elsevier – North Holland, 104.
- Tams, J.W., Johnsen, A.H., and Fahrenkrug, J. (1999) *Biochem. J.*, **341**, 271–276.
- Набухотный Т.К., Маркевич В.Э., Павлюк В.П., Костыря Е.Т. (1986) *Вопр. охраны материнства и детства*, **6**, 15–18.
- Мокшина С.В. (1998) *Роль церулоплазмينا молока как источника ионов меди для новорожденных*. Дисс. канд. биол. наук, НИИЭМ РАМН, Санкт-Петербург.
- Jorieux, S., Mazurier, J., Montreuil, J., and Spik, G. (1984) *Protides Biol. Fluids*, **32**, 115.
- Watanabe, T., Nagura, H., Watanabe, K., and Brown, W.R. (1984) *FEBS Lett.*, **168**, 203.
- Hekman, A. (1971) *Biochim. Biophys. Acta*, **251**, 380.
- 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.

29. Wu, H.M., and Church, F.C. (2003) *Arch. Biochem. Biophys.*, **412**, 121–125.
30. Walker, F.J., and Fay, P.J. (1990) *J. Biol. Chem.*, **265**, 1834–1836.
31. Juan, S.H., and Aust, S.D. (1998) *Arch. Biochem. Biophys.*, **355**, 56–62.
32. Пулина М.О. (2004) *Образование комплекса при взаимодействии церулоплазмينا и лактоферрина*. Дисс. канд. биол. наук, НИИЭМ РАМН, Санкт-Петербург.

IDENTIFICATION AND ISOLATION OF CERULOPLASMIN–LACTOFERRIN COMPLEX FROM BREAST MILK

A. V. Sokolov¹, M. O. Pulina¹, E. T. Zakharova¹,
A. S. Susorova¹, O. L. Runova¹, N. I. Kolodkin², V. B. Vasilyev¹

¹ *Institute for Experimental Medicine, Russian Academy
of Medical Sciences, Acad. Pavlov ul. 12, Saint-Petersburg 197376, Russia;
fax: (812)234-9489, E-mail: biochem@nm.ru*

² *State Research Institute for Highly Pure Biopreparations,
Pudozhskaya ul. 7, Saint-Petersburg 197110, Russia;
fax: (812)235-5504*

Received December 29, 2004
Revision received April 20, 2005

The presence of a complex of the copper protein ceruloplasmin (Cp, ferro-O₂-oxidoreductase, EC 1.16.3.1) with lactoferrin (Lf) from breast milk (BM) is shown for the first time. In SDS-free PAGE, the electrophoretic mobility of Cp in BM was lower than that of plasma Cp coinciding with the mobility of the complex obtained upon mixing the purified Cp and Lf. Affinity chromatography of delipidated BM on Cp-Sepharose resulted in Lf retention. SDS-PAGE of 0.3 M NaCl eluate revealed a single band with M_r ~78 000 that had N-terminal amino acid sequence of Lf and reacted with antibodies to that protein. Synthetic peptides R-R-R-R (the N-terminal amino acid stretch 2–5 in Lf) and K-R-Y-K-Q-R-V-K-N-K (the C-terminal stretch 29–38 in PACAP 38) caused efficient elution of Lf from Cp-Sepharose. Cp–Lf complex from delipidated BM is not retained on the resins used for isolation of Cp (AE-Agarose) and of Lf (CM-Sephadex). Anionic peptides from Cp (586–597), (721–734), and (905–914) provided efficient elution of Cp from AE-Agarose, but would not cause dissociation of Cp–Lf complex. When anti-Lf was added to the BM flown through CM-Sephadex, Cp co-precipitated with Lf. Isolation of Cp–Lf complex from BM included chromatography on CM-Sephadex, ethanol precipitation, and affinity chromatography on AE-Agarose, which resulted in 98% pure complex. The resulting complex Cp–Lf (1 : 1) was separated into components by chromatography on heparin-Sepharose. Limited tryptic hydrolysis of Cp obtained from BM and from blood plasma revealed identical proteolytic fragments.

Key words: ceruloplasmin, lactoferrin, protein–protein interactions, breast milk