



УДК 577.112.854.088.3

## ОСАЖДЕНИЕ ЦИТОХРОМОВ С КОМПЛЕКСНЫМ ИОДИДОМ КАДМИЯ

© 1996 г. Д. В. Журавлева, М. А. Кулиш, А. Ф. Миронов<sup>#</sup>Московская академия тонкой химической технологии им. М.В. Ломоносова,  
117571, Москва, просп. Вернадского, 86

Поступила в редакцию 26.03.96 г.

На примере цитохрома *c* из сердечной мышцы лошади и из дрожжей *Candida valida* показано, что комплексный анион – тетраиодид кадмия ( $\text{CdI}_4^{2-}$ ) осаждает белки из водных растворов при концентрации реагента ниже 50 мМ. Значительное влияние на осаждение оказывают состав и рН раствора, а также исходная концентрация белка. Экспериментальные данные позволяют предположить, что данный реагент воздействует на белок по механизму, сходному с процессом высаливания. Однако  $\text{CdI}_4^{2-}$  действует в малой концентрации, что дает ему преимущества перед традиционно используемыми агентами.

*Ключевые слова:* осаждение белков, тетраиодид кадмия, цитохром *c*, высаливание белков.

Одним из основоположников развития химии природных биологически активных соединений в России является Николай Алексеевич Преображенский. В начале 60-х годов под его руководством были начаты исследования таких природных белков, как родопсин, гемоглобин, цитохромы. Результаты детальных исследований структуры гемпротеинов [1, 2], а также потребность в получении этих белков в высокоочищенном виде поставили нас перед необходимостью изучения общих закономерностей взаимодействия белков с неорганическими солями в растворах.

За последние годы для большого количества нейтральных неорганических солей была установлена способность вызывать агрегирование и осаждение белков. Конформационная стабильность белков в присутствии солей во многом определяется концентрацией и природой находящихся в растворе катионов и анионов [3]. В значительных концентрациях любые простые соли могут являться высаливающими агентами, причем сила воздействия на белок определяется лиотропными свойствами анионов/катионов и создаваемым ими поверхностным натяжением [4, 5]. Для достижения высаливающего эффекта, однако, требуется создание высокой концентрации соли, что приводит к значительному повышению плотности раствора и выделению тепла. Кроме того, после осаждения возникает необходимость удалить избыток соли.

Таким образом, в ряде случаев было бы весьма желательным проводить осаждение при мини-

мальном возможном количестве соли. Ранее нами было обнаружено, что хлористый кадмий в присутствии иодида натрия вызывает осаждение цитохромов *c* при низких концентрациях этих солей [6]. Цель данной работы – дальнейшее исследование воздействия комплексных солей кадмия на растворимость цитохромов *c* и некоторых других белков при различных рН и составах раствора.

Прежде всего для нас представляла интерес структура осаждающего реагента. Полученные ранее данные [6] позволили предположить, что оптимальное молярное соотношение  $\text{Cd/I}$  при осаждении цитохрома *c* смесью соли кадмия и иодида составляет 1 : 4–5. Было выяснено, что в пределах концентрации 10–100 мМ ни одна простая соль кадмия, в том числе иодид кадмия, не обладает способностью осаждать цитохром *c*. Комплексный иодид кадмия, напротив, эффективно агрегирует белок.

В водных растворах существует несколько комплексов кадмия с иодом:  $\text{CdI}^{1+}$ ,  $\text{CdI}_2^0$ ,  $\text{CdI}_3^{1-}$ ,  $\text{CdI}_4^{2-}$  [7, 8]. Выполненная нами спектроскопия ЯМР на ядрах  $^{113}\text{Cd}$  согласуется с данными работы [8] и показывает, что доминирующим комплексным ионом при используемом соотношении  $\text{Cd/I}$  является тетраиодид кадмия  $\text{CdI}_4^{2-}$ . Поэтому мы предположили, что именно он является активным осаждающим белок компонентом.

Анион  $\text{CdI}_4^{2-}$  в водном растворе имеет форму тетраэдра [7], в котором расстояние между атомами  $\text{Cd}$  и  $\text{I}$  составляет 2.79 Å. Комплекс несет заряд (–2), и в его координационную сферу не

<sup>#</sup> Автор для переписки (тел.: (095) 437-60-31, факс: (095) 430-79-83, e-mail: mironov@httos.mitht.msk.ru).

включены молекулы воды. Таким образом, осаждающий реагент представляет собой сравнительно большой, отрицательно заряженный симметричный ион.

Получаемый под воздействием  $\text{CdI}_4^{2-}$  осадок белка легко может быть переведен в раствор добавлением слабого водного раствора аммиака либо при перемешивании в дистиллированной воде. Мы провели сравнительное исследование цитохрома с сердечной мышцы лошади и цитохрома с дрожжей *Candida valida*, полученных осаждением сульфатом аммония и  $\text{CdI}_4^{2-}$ . Анализ электронных спектров в УФ и видимом диапазонах, электрофоретической подвижности при электрофорезе в ПААГ и скорости поглощения кислорода при взаимодействии цитохрома с и цитохром-с-оксидазы показал, что в функциональной активности и структуре активного центра цитохромов, выделенных с использованием  $\text{CdI}_4^{2-}$ , не происходит существенных изменений.

Важным вопросом с технологической точки зрения является содержание ионов Cd и I в осажденном белке. Мы определили содержание Cd в ряде образцов осадков, полученных в разных начальных условиях, с помощью атомно-адсорбционной спектрометрии. Концентрация белка в образцах определялась по содержанию атомов железа, поскольку на каждую молекулу цитохрома с приходится один ковалентно присоединенный гем, включающий атом железа. Полученные соотношения Cd и цитохрома с в осадке колебались в пределах 5–50 моль/моль. Столь низкое содержание солей не препятствует дальнейшей хроматографической очистке цитохромов на ионообменнике. Образцы цитохрома с после хроматографической очистки имели содержание Cd менее  $1 \times 10^{-8}$  М. При использовании сульфата аммония было бы необходимо вводить дополнительную ступень обессоливания.

Мы предположили, что  $\text{CdI}_4^{2-}$  может вызывать осаждение цитохромов в соответствии со следующими механизмами:

неорганический комплекс связывается с белком и инициирует процесс агрегации, либо вызывая изменение общего заряда, либо запуская процесс самоассоциации белка [9, 10];

тетраиодид кадмия изменяет сольватационную оболочку белка, что приводит к высаливанию.

Для того чтобы уточнить, какой из предложенных путей реализуется, мы попытались вначале обнаружить какое-либо специфическое взаимодействие между цитохромом с и анионом  $\text{CdI}_4^{2-}$ . Процесс агрегации на начальной стадии был изучен методами спектрофотометрии (видимая и УФ-области), КД и электрофореза в ПААГ в присутствии и в отсутствие SDS.

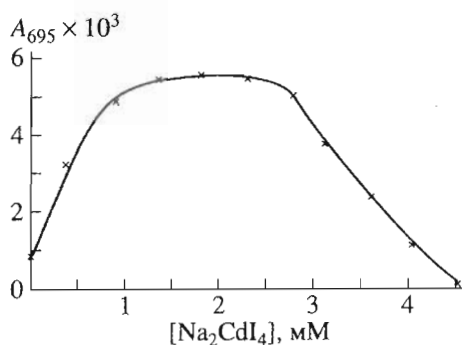


Рис. 1. Зависимость величины  $A_{695}$  для 0.1% раствора цитохрома с в 0.13 М ацетатном буфере, pH 5.6, от концентрации  $\text{CdI}_4^{2-}$ .

Для обнаружения специфического воздействия тетраиодида кадмия на цитохром с из сердечной мышцы крупного рогатого скота были изучены спектральные характеристики данного белка в присутствии  $\text{CdI}_4^{2-}$ . Исследования проводились в диапазоне концентраций  $\text{CdI}_4^{2-}$ , не вызывающих заметного осаждения (1–8 мМ). В видимой и УФ-областях цитохром с имеет характерный спектр поглощения, который отражает состояние и окружение гема, а также поглощение аминокислотных остатков [10, 11]. Спектральные характеристики данного белка в присутствии  $\text{CdI}_4^{2-}$  оказались практически идентичными исходным, за исключением небольшого роста и последующего падения интенсивности поглощения феррицитохрома на минорной полосе 695 нм при изменении концентрации  $\text{CdI}_4^{2-}$  (рис. 1).

Титрование раствора цитохрома с  $\text{CdI}_4^{2-}$  в том же интервале концентраций (1–8 мМ) не привело к изменениям в КД-спектрах, что свидетельствует об отсутствии изменений во вторичной структуре белка.

Данные электрофореза цитохрома с в присутствии малых количеств  $\text{CdI}_4^{2-}$  были идентичны стандартным электрофограммам для данного очищенного белка как с SDS, так и без него.

Таким образом, перечисленными выше методами нам не удалось зафиксировать признаков связывания белка и  $\text{CdI}_4^{2-}$  с образованием стабильного комплекса.

Мы провели исследование действия  $\text{CdI}_4^{2-}$  на ряд белков с различными физико-химическими свойствами в одинаковых условиях при pH растворов 4.0 и 5.6, а также на плазму крови (табл. 1). Все исследованные белки осаждались  $\text{CdI}_4^{2-}$  в диапазоне концентраций 2–40 мМ.

Белки плазмы крови полностью осаждались  $\text{CdI}_4^{2-}$  в концентрации 40 мМ. Белки также успешно

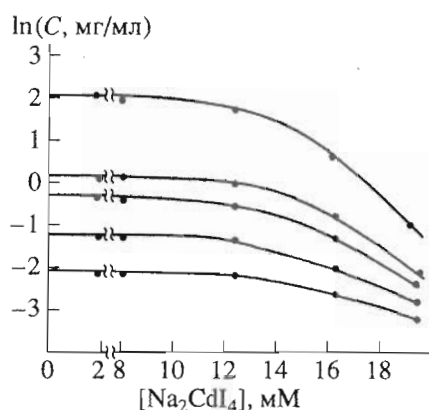


Рис. 2. Зависимость остаточной концентрации цитохрома с из сердечной мышцы крупного рогатого скота (С, мг/мл) после осаждения CdI<sub>4</sub><sup>2-</sup> в 0.13 М ацетатном буфере (рН 5.6) от концентрации CdI<sub>4</sub><sup>2-</sup>. Начальные концентрации C<sub>0</sub> для кривых (сверху вниз): 8, 1, 2, 0.64, 0.27, 0.125 мг/мл

осаждались из разбавленной плазмы, с которой обычно работают фармакологи.

Мы предположили, что осаждение цитохрома с CdI<sub>4</sub><sup>2-</sup> проходит без образования стабильного промежуточного комплекса белок-соль и сходно с явлением высаливания белков. Была сделана попытка выяснить, насколько характер и параметры осаждения данным реагентом соответствуют закономерностям, характерным для процесса высаливания в работах, опубликованных по этому вопросу [4, 5].

Таблица 1. Концентрация CdI<sub>4</sub><sup>2-</sup>, необходимая для осаждения 90% белка из его 0.1% раствора в 0.13 М ацетатном буфере, рН 4.0 и 5.6.

Белок	рН	рI*	[CdI <sub>4</sub> <sup>2-</sup> ], мМ
Цитохром с из сердечной мышцы лошади	5.6	9.6	18
»	4.0	9.6	12
крупного рогатого скота	5.6	9.6	18
Цитохром с <i>C. valida</i>	5.6	—	16
Миоглобин	5.6	7.0	10
»	4.0	7.0	18
Бычий сывороточный альбумин	5.6	5.4	28
То же	4.0	5.4	19
Химотрипсиноген	5.6	—	24
Ферритин	5.6	4.5	6
Белки плазмы крови человека	5-6	—	35
разбавление 1 : 8	5-6	—	16

\* Прочерк означает отсутствие данных.

На основании теории высаливания [4] нам удалось объяснить изменения в поглощении цитохрома с при длине волны 695 нм (рис. 1). Авторы этой работы установили, что при низкой концентрации соли растворимость белка растет благодаря значительному вкладу электростатического “всаливающего” эффекта. При более высоких концентрациях соли начинают действовать гидрофобные силы, вызывающие высаливание (агрегацию) белка. По-видимому, при низкой концентрации CdI<sub>4</sub><sup>2-</sup> димерные формы цитохрома с, существующие в равновесии с мономером и не имеющие поглощения при длине волны 695 нм [11, 12], переходят в мономерную форму и лишь затем начинается процесс агрегирования белка (рис. 1). За счет увеличения количества мономерных форм в растворе и происходит рост адсорбции при малых концентрациях CdI<sub>4</sub><sup>2-</sup>. Затем с увеличением концентрации соли начинается агрегирование белка и образуются ассоциаты, что приводит к уменьшению адсорбции.

Из данных рис. 2 можно заметить, что интенсивность осаждения выше для концентрированных растворов. При работе с разбавленными растворами требовалось создание более высокой концентрации реагента для достижения той же степени осаждения белка.

Значительное влияние на интенсивность осаждения белков оказывает величина рН раствора. При более низком значении рН требуется меньшая концентрация CdI<sub>4</sub><sup>2-</sup> (рис. 3). По-видимому, это свидетельствует о значительном вкладе ионных взаимодействий в процесс осаждения. Кроме того, это влияние различно для разных белков.

Присутствие дополнительных солей и их характер также оказывают значительное влияние на ход процесса осаждения. Наиболее интенсивное осаждение происходит в отсутствие солей. Наличие соли снижает интенсивность осаждения (рис. 4).

Исследования, проведенные при различных температурах (8, 18 и 38°C), показали, что степень осаждения цитохрома с при определенной концентрации CdI<sub>4</sub><sup>2-</sup> не меняется в зависимости от температуры после 24 ч инкубирования. Однако интенсивность процесса осаждения значительно возросла с увеличением температуры.

Для выяснения роли электростатических факторов мы провели ацетилирование поверхностных остатков лизина в цитохроме с из сердечной мышцы крупного рогатого скота. Ранее было показано, что ε-аминогруппы лизина могут быть селективно проацетилированы и полученные производные разделены на несколько групп [13]. Нами были приготовлены три группы ацетилированных цитохромов с, содержащих 3, 6 и 12 ацетилированных остатков лизина, что проявлялось в изменении электрофоретической подвижности белков

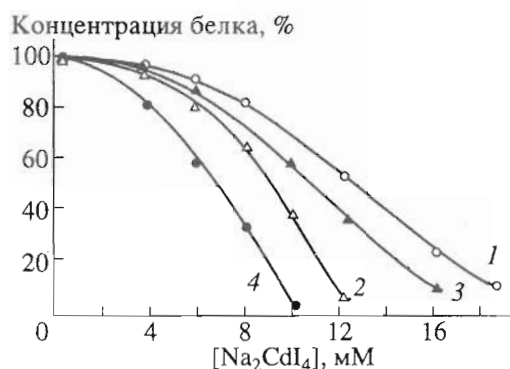


Рис. 3. Кривые осаждения цитохрома с (1, 2) и миоглобина (3, 4) из сердечной мышцы крупного рогатого скота CdI<sub>4</sub><sup>2-</sup> в 0.13 М ацетатном буфере при pH 5.6 (1, 4) и 4.0 (2, 3). Начальная концентрация белка 1 мг/мл.

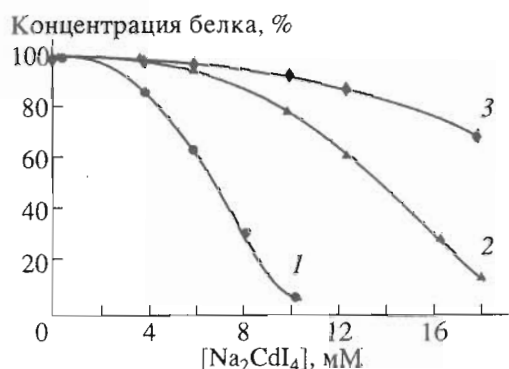


Рис. 4. Кривые осаждения цитохрома с из сердечной мышцы крупного рогатого скота CdI<sub>4</sub><sup>2-</sup> в дистиллированной воде (1); 0.13 М ацетатном буфере, pH 5.6 (2) и 0.13 М растворе KCl (3). Начальная концентрация белка 1 мг/мл.

(табл. 2). Ацетилированные цитохромы также осаждались CdI<sub>4</sub><sup>2-</sup>, но степень их осаждения при концентрации реагента, достаточной для практически полного осаждения нативного белка, была значительно ниже (табл. 2).

Таким образом, выполненные исследования показали, что CdI<sub>4</sub><sup>2-</sup> обладает способностью осаждать цитохромы с и ряд других белков при концентрации реагента в растворе до 40 мМ и слабощелочном значении pH. Процесс осаждения, по-видимому, проходит по механизму, сходному с высаливанием. Детальное изучение осаждения белков CdI<sub>4</sub><sup>2-</sup>, и особенно причин столь низкой концентрации реагента, приводящей к осаждению белка, может внести большой вклад в исследование высаливания белков солями в целом. Вместе с тем мы полагаем, что данный реагент может быть успешно применен в ряде технологических процессов, целью которых является очистка белковых препаратов [6, 14].

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали реактивы фирм Serva и Merck (Германия), сорбенты фирмы Pharmacia (Швеция) и отечественного производства. Очищенные белки – препараты фирмы Serva, за исключением цитохромов с из сердечной мышцы крупного рогатого скота и дрожжей *C. valida*, которые выделяли по описанной методике [6, 14]. Электронные спектры растворов солей кадмия в деионизованной воде были записаны на спектрофотометре Beckman DU-8, спектры кругового дихроизма – на спектрофотометре Jasco J500с. ЯМР-исследования иодидов кадмия проводились на приборе Bruker MSL-200.

Для очистки цитохрома с методом осаждения CdI<sub>4</sub><sup>2-</sup> к 100 мл раствора белка концентрацией

1 мг/мл добавляли при перемешивании 2 мл раствора реагента CdI<sub>4</sub><sup>2-</sup>. Раствор содержал 0.16 М CdI<sub>2</sub> и 0.5 М NaI. Образующийся осадок отделяли от бесцветного супернатанта центрифугированием (8000g, 20 мин), промывали 10 мл 1% раствора NaI и растворяли в 20 мл 0.05% водного аммиака, где растворение происходит очень легко, либо в дистиллированной воде при перемешивании. После растворения цитохром с наносили на колонку (6 × 50 мм) с катионитом К-6 отечественного производства, уравновешенную 0.5% водным раствором аммиака. Колонку промывали 1 л дистиллированной воды, затем белок элюировали 1.5% водным раствором аммиака и лиофилизовали.

Перед экспериментами по построению кривых осаждения и по определению спектральных характеристик смеси цитохром с – CdI<sub>4</sub><sup>2-</sup> белок очищали от димеров и олигомеров на колонке (18 × 350 мм) с сефадексом G-75 (Pharmacia, Швеция). Концентрацию цитохромов с определяли по поглощению полностью восстановленного белка при 550 нм, используя величину молярного коэффициента

Таблица 2. Осаждение цитохрома с из сердечной мышцы крупного рогатого скота и его ацетилированных производных в 18 мМ растворе CdI<sub>4</sub><sup>2-</sup>. Концентрация белка в образцах 1 мг/мл

Содержание остатков Lys(Ac) в цитохроме с, моль/моль	E <sub>f</sub> , см*	Степень осаждения, %
0	-2.0	90
3	-0.4	70
6	1.5	18
12	3.0	17

\* Условия электрофореза приведены в "Экспер. части", значение E<sub>f</sub> с минусом – подвижность по направлению к катоду.

ε 29000 М<sup>-1</sup> см<sup>-1</sup>. Концентрацию прочих белков определяли по методу Лоури [3].

Для построения кривых зависимости степени осаждения белка от концентрации CdI<sub>4</sub><sup>2-</sup> провели несколько серий экспериментов с различными начальными концентрациями цитохрома с. Из исходного образца цитохрома с отбирали ряд равных аликвот и к каждой из них добавляли при перемешивании такое количество реагента, чтобы получить ряд образцов равного объема с возрастающей концентрацией CdI<sub>4</sub><sup>2-</sup>.

Образцы перемешивали 3 ч, затем оставляли на 21 ч, чтобы прошло полное осаждение. Осадок отделяли центрифугированием (8000g, 20 мин). Концентрацию цитохрома с в супернатанте определяли спектрофотометрически. Степень осаждения вычисляли исходя из начальной концентрации белка с учетом разбавления образца реагентом.

Влияние температуры изучали путем проведения экспериментов при 8, 18 и 38°C. Концентрация цитохрома с составляла 1 мг/мл, осаждение проводили в 0.13 М ацетатном буфере, pH 5.6.

Количество ионов Cd<sup>2+</sup> в осадке измеряли методом атомной адсорбции на спектрофотометре Zeiss AAS3 (Германия). Для подготовки осадков использовали высокоочищенную воду (MilliQ, Millipore, США), чтобы снизить фоновый уровень ионов данного металла при исследовании. Осадок тщательно отмывали и растворяли в 5 н. H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> для уменьшения влияния белка на результаты измерений. Количество цитохрома с рассчитывали по количеству Fe в образце.

Активность цитохром-с-оксидазы в присутствии цитохромов с и аскорбата определяли полярографически.

Ацетилирование боковых цепей лизина в цитохроме с из сердечной мышцы крупного рогатого скота проводили по методике [13]. Полученные производные разделяли на колонке (35 × 150 мм) с DEAE-целлюлозой, уравновешенной 0.02 М натрий-фосфатным буфером, pH 7.4. Электрофоре-

тическую подвижность ацетилированных цитохромов с определяли на бумаге Whatman (Англия) в 0.025 М калий-фосфатном буфере, pH 6.8 (300 В, 3 ч).

Электрофорез в ПААГ с SDS проводили в стандартных условиях (концентрация акриламида 12.5%) [3, 11].

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Филатов И.А., Кулиш М.А., Миронов А.Ф. // Биоорганическая химия. 1988. Т. 14. С. 725–745.
2. Филатов И.А., Кулиш М.А., Миронов А.Ф., Ножевикова Е.В., Нейман Л.А. // Биоорганическая химия. 1987. Т. 13. С. 623–627.
3. Dabre A. Practical Protein Chemistry. A Handbook. N. Y.: Wiley, 1986. P. 29, 48.
4. Melander W., Horvath C. // Arch. Biochem. Biophys. 1977. V. 183. P. 200–215.
5. Przybycien T.M., Bailey J.E. // Enzyme Microb. Technol. 1989. V. 11. P. 264–276.
6. Миронов А.Ф., Швец В.И., Адров А.Ф., Гриднев А.А., Евстигнеева Р.П., Сенников Г.П., Петров В.И., Гольбец И.И. Способ получения цитохрома с: А. с. 811528 СССР // Б. И. 1980. № 12.
7. Wilkinson G. // Comprehensive Coordinational Chemistry. V. 5 / Ed. G. Wilkinson. N. Y.: Pergamon Press, 1987. P. 989–992.
8. Ackerman J.J.H., Orr T.V., Bratuska V.J., Maciel G.E. // J. Am. Chem. Soc. 1979. V. 101. P. 341–347.
9. Hutchens T.W., Yip T.T. // J. Inorg. Biochem. 1991. V. 42. P. 105–118.
10. Whitford D., Concar D.W., Williams R.J.P. // Eur. J. Biochem. 1991. V. 199. P. 561–568.
11. Moore G.R., Pettigrew G.W. Cytochromes c: Evolutionary, Structural and Physico-Chemical Aspects. N. Y.: Springer-Verlag, 1990.
12. Dolphin D. The Porphyrins. V. 7. N. Y.: Acad. Press, 1979. P. 286.
13. Wada K., Okunuki K.J. // Biochemistry. 1968. V. 64. P. 667–681.
14. Журавлева Д.В., Кулиш М.А., Миронов А.Ф., Козлов В.И., Давидов Е.П. Способ получения цитохрома с дрожжей вида *Candida valida*: А. с. 1663024 СССР // Б. И. 1991. № 21.

## Precipitation of Cytochromes c with Na<sub>2</sub>CdI<sub>4</sub>

D. V. Zhuravleva, M. A. Kulish, and A. F. Mironov

Lomonosov State Academy of Fine Chemical Technology, pr. Vernadskogo 86, Moscow, 117571 Russia

**Abstract**—Using cytochrome c from horse heart and the yeast *Candida valida* as examples, it was shown that a complex anion, cadmium tetraiodide (CdI<sub>4</sub><sup>2-</sup>), precipitated proteins from aqueous solutions at the reagent concentrations below 50 mM. The composition and pH value of the solution, as well as the starting protein concentration, considerably influenced the precipitation. The results suggest that this reagent acts on the protein by a mechanism similar to the salting-out process. The ability to act at small concentrations is the advantage of CdI<sub>4</sub><sup>2-</sup> over conventional agents.

**Key words:** protein precipitation, cadmium tetraiodide, cytochrome c, protein salting-out.