



УДК 577.12.083

ТРИПТИЧЕСКИЙ ГЕМПЕПТИД ЦИТОХРОМА *Candida valida*

© 1995 г. Д. В. Журавлева, М. А. Кулиш, А. Ф. Миронов

Московская академия тонкой химической технологии им. М.В. Ломоносова,
117571, Москва, просп. Вернадского, д. 86

Поступила в редакцию 14.07.93 г. После доработки 15.07.94 г.

Предложен метод прямого выделения гемсодержащего пептида из обогащенной цитохромом *s* биомассы дрожжей, дающий возможность получать гемпептид без дополнительных стадий очистки. Установлена аминокислотная последовательность тетрадекапептида цитохрома *s* *Candida valida*. Масс-спектрометрически определена молекулярная масса цитохрома *s* дрожжей *C. valida* и его гемсодержащего фрагмента.

Ключевые слова: цитохром *s* дрожжей, гемпептид, *Candida valida*, микропероксидаза.

Цитохром *s* содержится в клетках эукариотов и некоторых прокариотов и осуществляет функции переноса электронов в цепи окислительного фосфорилирования. Этот белок обладает высокой устойчивостью и находит все более широкое применение в медицине в качестве средства против инфаркта миокарда и препарата, тормозящего развитие катаракты. Источником цитохрома *s* обычно служит сердечная мышца лошади или крупного рогатого скота. Однако в ряде случаев эти цитохромы дают побочные аллергические реакции. Снижение аллергенности может быть достигнуто при использовании гемсодержащих фрагментов цитохрома *s*, образующихся в результате ферментативного расщепления белка протеиназами.

Альтернативным источником цитохрома *s* являются клетки дрожжей. Дрожжевые цитохромы *s* отличаются по аминокислотному составу и первичной структуре от цитохромов *s* животного происхождения и имеют иные медико-биологические свойства. Протеолиз дрожжевых цитохромов *s* приводит к гемсодержащим фрагментам, близким по свойствам к фрагментам цитохрома *s* животных. В связи с этим перспективно изучение гемсодержащих фрагментов цитохрома *s* дрожжей и разработка удобных и эффективных методов их получения.

Известные методы расщепления цитохрома *s* гидролитическими ферментами позволяют получить сравнительно короткие гемпептиды [1, 2]. Эти пептиды обладают рядом уникальных свойств: хорошей растворимостью в воде, высокой стабильностью, низкой токсичностью. Им свойственна значительно большая пероксидазная активность по сравнению с исходным белком.

Последнее свойство позволяет отнести гемпептиды к неспецифическим пероксидазам, что закрепило за этими веществами второе название – микропероксидазы. Наиболее известны из них гемоктапептид и гемнонапептид цитохромов *s* сердца лошади и быка (рис. 1).

Ранее нами был предложен способ выделения микропероксидазы из дрожжевого экстракта, обогащенного цитохромом *s* за счет ультрафильтрации, который основан на осаждении цитохрома *s* комплексной солью трехвалентного железа и иодида с последующим гидролизом осажденного белка трипсином в суспензии [3].

В данном исследовании мы продолжили работу по выяснению структуры гемпептида дрожжей *Candida valida*, полученного в результате триптического гидролиза цитохрома *s* в растворе и в суспензии.

Аминокислотную последовательность гемпептида определяли на образце, полученном по методике [1]. При выделении цитохрома *s* *C. valida* была использована ранее разработанная нами для цитохрома *s* из сердца быка методика, основанная на осаждении белка с помощью солей кадмия [4], что позволило существенно упростить процесс получения дрожжевого цитохрома *s*.

Молекулярная масса цитохрома *s* дрожжей *C. valida*, определенная методом времяпролетной масс-спектрометрии с ионизацией осколками деления калифорния (рис. 2), оказалась равной 12555 ± 10 (среднее значение масс одно-, двух- и трехзарядного ионов). Полученная величина очень близка к молекулярной массе белка дрожжей того же рода – *C. krusei* [5, 6], которая составляет 12553.

- (a) Cys-Ala-Gln-Cys-His-Thr-Val-Glu
└── гем ──┘
- (б) Cys-Ala-Gln-Cys-His-Thr-Val-Glu-Lys
└── гем ──┘
- (в) Cys-Ala-Gln-Cys-His-Thr-Ile-Glu-Ala-Gly-Gly-Pro-His-Lys
└── гем ──┘

Рис. 1. Аминокислотные последовательности гемокта- (а) и гемноапептида (б) из цитохрома с сердечной мышцы лошади и быка [7], а также гемтетрадекапептида из цитохрома с дрожжей *C. krusei* [5, 6] (в).

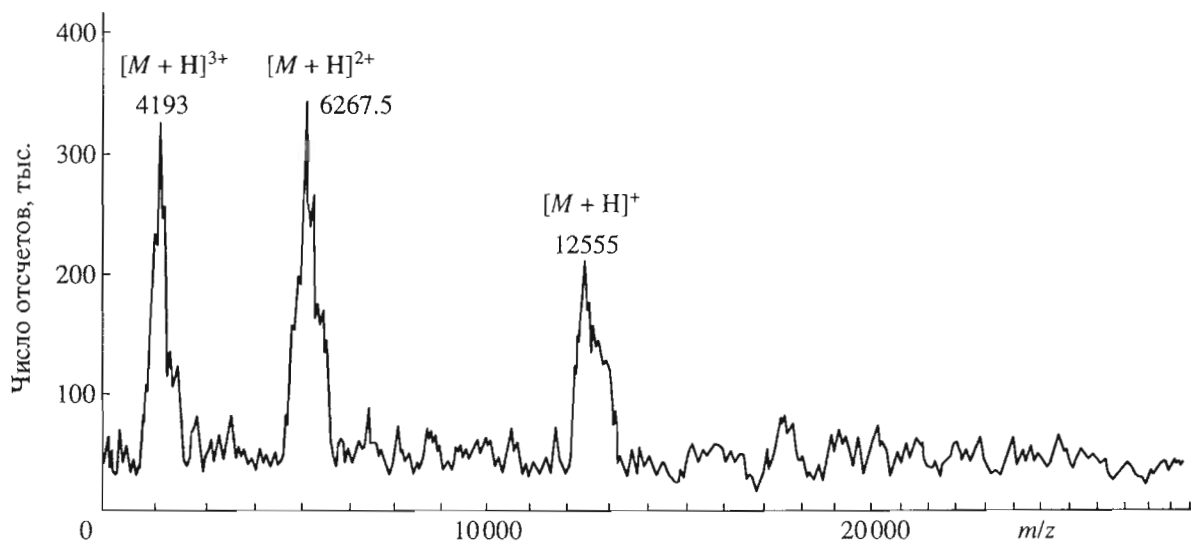


Рис. 2. Масс-спектр цитохрома с дрожжей *C. valida*.

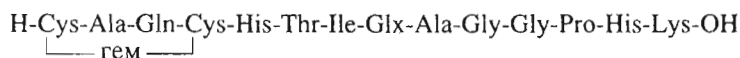
Получив величину молекулярной массы, мы смогли определить молярные коэффициенты поглощения (ϵ , $M^{-1} \text{ см}^{-1}$) данного цитохрома, которые составили для восстановленной формы при 520 нм – 15480, при 548.3 нм – 28260, а для окисленной формы при 528.7 нм – 10930.

Молекулярная масса гемпептида цитохрома с *C. valida*, по данным масс-спектрометрии, составила 2066 ± 2 (рис. 3а), что предполагает наличие в пептиде наряду с гемом (молекулярная масса 618) 12 - 14 аминокислотных остатков. Гемсодержащий фрагмент цитохрома с из сердечной мышцы крупного рогатого скота имеет, по данным масс-спектрометрии, молекулярную массу 1637 ± 2 (рис. 3б), что согласуется с его аминокислотной последовательностью [7].

Данные аминокислотного анализа (таблица) и ТСХ на бумаге и целлюлозе позволили устано-

вить состав дрожжевого гемпептида. Данные по числу остатков Cys и Thr занижены по сравнению со стехиометрическими значениями, что является следствием разрушения их при кислотном гидролизе. Присутствие в пептиде пролина установлено по результатам ТСХ.

Аминокислотная последовательность известных цитохромов с [7] включает два консервативных ковалентно связанных с гемом цистеина и не менее одного гистидина. Инвариантен также остаток глутамина, расположенный между ковалентно связанными с гемом цистеинами (положение 3 в данном пептиде). На основании аналогий в структуре цитохромов из разных источников [7] и результатов аминокислотного анализа мы предполагаем, что гемпептид из дрожжей *C. valida*, полученный трипсиновым гидролизом, имеет следующую первичную структуру:



В таком случае молекулярная масса гемпептида должна составлять 2068, что находится в хорошем соответствии с данными масс-спектрометрии.

Сравнение данной последовательности с известной структурой гемпептида дрожжей *C. krusei* [5, 7], равно как и близость молекулярных масс

цитохромов с, дает возможность говорить о сходстве исследуемых белков из этих двух штаммов.

Наряду с получением гемпептида дрожжей *C. valida* триптическим гидролизом цитохрома с в растворе нами был проведен трипсинолиз дрожжевого экстракта, осажденного комплексной

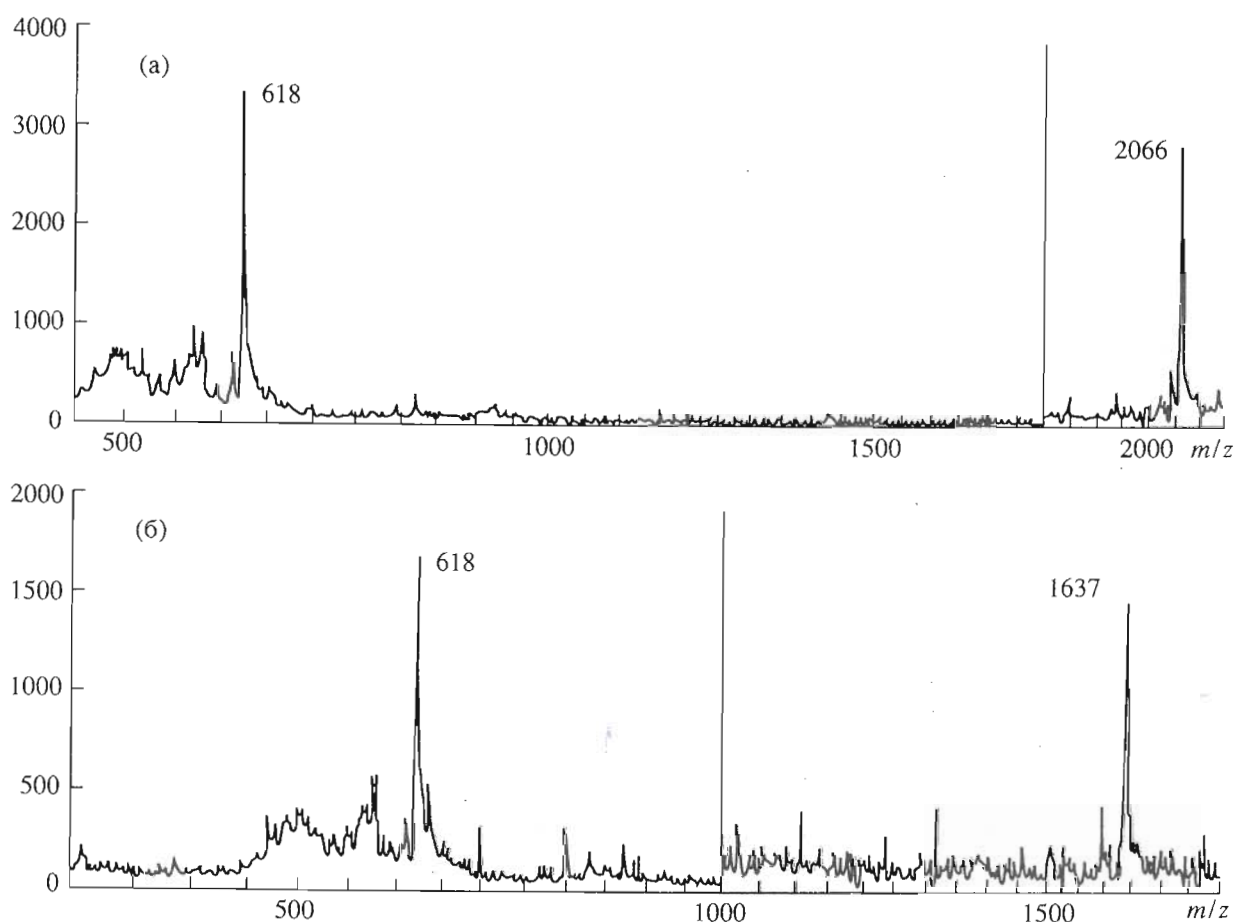


Рис. 3. Масс-спектр гемпептида цитохрома с из сердечной мышцы крупного рогатого скота (б) и гемпептида цитохрома с дрожжей *C. valida* (а).

солью железа и иода [3]. Полученные двумя способами гемпептиды обладали одинаковыми свойствами, что было подтверждено идентичностью масс-спектров и аминокислотного состава.

Для выяснения кинетики трипсинового расщепления были осуществлены два параллельных

Данные аминокислотного анализа гемпептида цитохрома с *C. valida*

Аминокислотные остатки	Результаты аминокислотного анализа	Предположительный состав*
Cys	0.26	2*
Ala	2.0	2
His	1.94	2
Glx	1.8	2*
Thr	0.32	1
Ile	0.96	1
Pro	—	1
Lys	0.84	1
Gly	1.88	2

* Предположено исходя из анализа структур известных цитохромов с [5 - 7].

опыта – в растворе и суспензии – при одинаковом соотношении цитохрома с и трипсина (рис. 4). Осажденный по методике [3] белок, практически не растворяющийся в воде или буферных растворах, был перед трипсиновым гидролизом тщательно отмыт дистиллированной водой для удаления избытка осаждающего реагента. Ход гидролиза контролировали на основании данных ВЭЖХ по площади пика гемпептида при 405 нм.

Полученные зависимости показывают, что на первом этапе гидролиз цитохрома с в суспензии идет быстрее, чем в растворе, по-видимому, за счет относительного избытка фермента над субстратом, находящимся в твердой фазе. Затем скорость трипсинолиза замедляется, и общий выход гемпептида после 24 ч составляет около 80%, причем ни дополнительное прибавление трипсина к суспензии, ни увеличение времени реакции не влияют значительно на выход целевого продукта.

Анализ трипсиновых гидролизатов методом ВЭЖХ на обращенной фазе показал, что гемтетрадекапептид оказался единственным гемсодержащим продуктом гидролиза, полученным в гетерогенных условиях (рис. 5). Кроме того, надосадочная жидкость совсем не содержит исходного

цитохрома. После обработки трипсином раствора цитохрома *c* в смеси содержалось 5 - 6% примесных пептидов, содержащих гем, очистка от которых требовала дополнительных процедур. Гидролиз цитохрома *c* в гетерогенной фазе позволяет проводить выделение гемпептида в одну стадию методом гель-фильтрации раствора гидролизата на сефадексе G-25 в 0.4 М растворе бикарбоната аммония. Содержание гемпептида в продукте, полученном этим способом, составило 96%.

Таким образом, нами определена структура гемпептида цитохрома *c*, показано близкое сходство цитохромов *c* из дрожжей *C. valida* и *C. krusei* и предложен метод выделения гемсодержащего тетрадекапептида из биомассы дрожжей в одну стадию.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали реактивы фирм Merck, Serva, сорбенты фирмы Pharmacia. Источником цитохрома *c* являлся концентрат из дрожжей *C. valida*, полученный ступенчатой ультрафильтрацией*.

Молекулярную массу определяли с помощью масс-спектрометра МСБХ (г. Сумы), электронные спектры снимали с помощью спектрофотометра Beckman DU-8 (США). Аминокислотный состав был определен на аминокислотном анализаторе Biotronic 7000. Высокоэффективная жидкостная хроматография проводилась на приборе Knauer, на колонке (4 × 100 мм) Separon SGX C-18 (Tessek).

Цитохром *c* выделяли по методике, основанной на осаждении этого белка иодидом кадмия [4].

Трипсиновый гидролизат. Цитохром *c* обрабатывали 24 ч ТРСК-трипсином (Serva) в 0.1 М бикарбонате аммония (рН 8.0) при 37°C. Соотношение цитохром *c*-трипсин составляло 1 : 50. Для получения гемпептида из осадка цитохрома *c*, полученного под действием солей железа, 3 мМ раствор белка обрабатывали реагентом, содержащим 0.16 М нитрат железа(III) и 0.7 М иодид натрия, в количестве 200 мкл реагента на 1 мл раствора белка. Выпавший осадок отделяли центрифугированием, отмывали 3 раза водой, переносили в бикарбонатный буфер и проводили трипсинолиз при перемешивании, как описано ранее [3]. Для контроля за ходом гидролиза каждые 60 мин отбирали пробы (20 мкл) надосадочного раствора, которые хранили замороженными в жидком азоте для последующего анализа.

Очистка гемпептида, полученного из раствора цитохрома *c*. Трипсиновый гидролизат разбавляли водой в соотношении 1 : 10, наносили на ко-

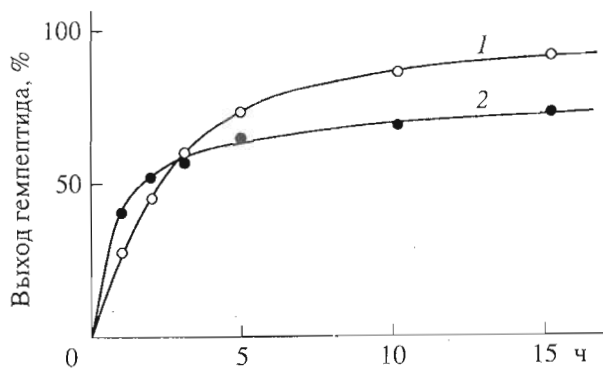


Рис. 4. Зависимость выхода гемпептида от времени трипсинолиза растворенного цитохрома *c* (1) и цитохрома *c* в суспензии (2). За 100% принят выход гемпептида при гидролизе (1) за 24 ч.

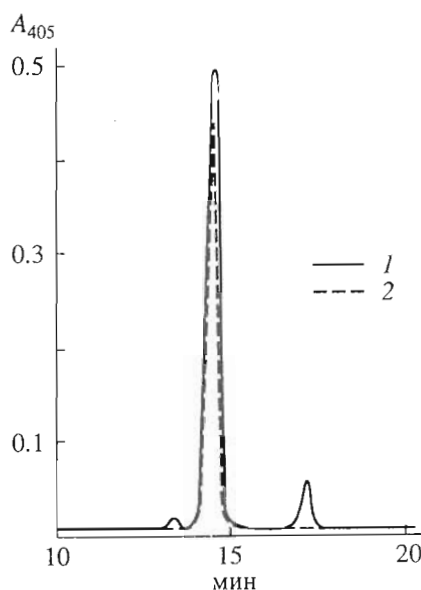


Рис. 5. ВЭЖХ продуктов трипсинового гидролиза дрожжевого цитохрома *c*, проведенного в растворе (1) и в гетерогенной фазе (2).

лонку (20 × 300 мм) со смолой IRC-50 и отмывали четырьмя объемами дистиллированной воды. Окрашенную фракцию смывали 1% раствором аммиака, концентрировали лиофилизацией и подвергали гель-фильтрации на сефадексе G-25 в 0.4 М бикарбонате аммония.

Аминокислотный анализ. Гемпептид для анализа гидролизовали 4 ч в 6 н. HCl при 145°C.

Тонкослойная хроматография. Определение аминокислотного состава гемпептидов методом ТСХ выполняли на бумаге Whatman и на целлюлозе (Merck) в системе *n*-бутанол-уксусная кислота-вода (4 : 1 : 5). Проявитель - раствор нингидрина в ацетоне.

ВЭЖХ на обращенной фазе проводили в градиенте концентрации ацетонитрила (0 - 80% за

* Авторы выражают благодарность Е.Р. Давидову и В.И. Козлову за предоставленный концентрат цитохрома *c*.

20 мин при 25°C, скорость потока 1 мл/мин), в качестве модификатора подвижной фазы использовали трифторуксусную кислоту (0.1%).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Евстигнеева Р.П., Миронов А.Ф., Васильева Г.А. Способ выделения гемнапептида фрагмента 14-22 цитохрома с: А. с. 578 305 СССР // Б. И. 1977. № 40.
2. Plattner H., Wachter E., Grobner P. // Histochem. 1977. V. 53. P. 223 - 242.
3. Журавлева Д.В., Кулиш М.А., Миронов А.Ф. Способ получения гемпептида цитохрома с: А. с. 1768613 СССР // Б. И. 1992. № 38.
4. Журавлева Д.В., Кулиш М.А., Миронов А.Ф., Козлов В.И., Давидов Е.Р. Способ получения цитохрома с дрожжей вида *Candida valida*: А. с. 1663024 СССР // Б. И. 1991. № 26.
5. Narita K., Titani K. // J. Biochem. 1968. V. 63. P. 226 - 241.
6. Lederer F. // Eur. J. Biochem. 1972. V. 31. P. 144 - 147.
7. Dayhoff M. // Atlas of Protein Sequence and Structure. V. 5 / Ed. M. Dayhoff. N.Y.: Acad. Press, 1976. P. 25 - 49.

Isolation and Characterization of Tryptic Hemepeptide from *Candida valida* Cytochrome c

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

Lomonosov Moscow Institute of Fine Chemical Technology

Abstract – Method for direct isolation of hemepeptide from enriched yeast biomass have been developed. This method makes it possible to eliminate the process of cytochrome c purification. Amino acid sequence for the *Candida valida* hemepeptide is proposed. Exact molecular masses for both cytochrome c and its hemepeptide are determined by mass-spectrometry.

Key words: yeast cytochrome c, *Candida valida*, hemepeptide, microperoxidase.