

STUDIES IN HYDRATION ENERGETICS OF NUCLEIC ACID COMPONENTS
BY THE DIFFERENTIAL UV-SPECTROSCOPIC METHOD

V. A. Sorokin, V. L. Galkin, V. A. Valeev, E. S. Arkhipova,
G. O. Gladchenko, Yu. P. Blagoi

Institute for Low Temperature Physics and Engineering,
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kharkov

Summary

Differential UV spectra of CMP, UMP, AMP, IMP, GMP and Guo are obtained, which are due to dehydration of these substances during heating of their aqueous solutions from 20 to 90°C. The enthalpies and entropies of hydration characterizing the interaction between water molecules and heteroatoms of the base rings are calculated. The entropy term greatly contributed to the variations of the free Gibbs energy for UMP, IMP, AMP, GMP and Guo. The enthalpy and entropy terms are comparable for CMP.

УДК 577.112.5

Т. Л. Левитина, Н. М. Гусак, Н. В. Роднин, М. Т. Кириленко,
О. С. Мирошниченко, С. А. Атепалихина, Л. В. Гудкова, Э. А. Козлов

БРОМЦИАНОВЫЕ ФРАГМЕНТЫ
КАТАЛАЗЫ ГРИБА *PENICILLIUM VITALE*

*Каталазу *P. vitale* расщепляли бромцианом. Гель-фильтрованием через сефадексы, ионообменной хроматографией на различных ионообменниках, экстракцией бутанолом и водным буфером, высоковольтным электрофорезом на бумаге выделены девять фрагментов, насчитывающих в сумме 387 аминокислотных остатков (50 % полипептидной цепи белка). Исследовали N-концевые аминокислотные последовательности, триптические и химотриптические пептиды этих фрагментов. В результате установлена полная аминокислотная последовательность фрагмента, включающего 61 остаток аминокислот, и частичная аминокислотная последовательность двух фрагментов, насчитывающих в сумме 37 остатков.*

Настоящее сообщение является продолжением серии публикаций, посвященных исследованию первичной структуры каталазы *P. vitale*. Первые три работы [1—3] освещают результаты изучения триптических пептидов.

Материалы и методы. Расщепление белка бромцианом осуществляли по методу Гросса и Виткопа [4]. 800 мг (~10 мкМ) каталазы и 100 мг триптофана растворяли в 50 мл 70 %-ной HCOOH. Добавляли бромциан (500 мг в 2 мл HCOOH), выдерживали 22 ч при комнатной температуре в темноте и лиофилизировали.

Обессоливание проводили на колонке (3×90 см) с сефадексом G-25 («Pharmacia», Швеция), уравновешенным аммиачной водой.

Гель-фильтрование через сефадекс G-75 (грубый) («Pharmacia»). Растворители: а) 0,2 М трис-HCl-буфер, pH 8,7, содержащий 6 М Gu-HCl; б) 20 %-ная HCOOH. Полученные фракции обессоливали.

Ионообменная хроматография. ДЭАЭ-сефадекс A-25 («Pharmacia»). Исходный буфер: 0,025 М трис-HCl, pH 7,4, содержащий 6 М мочевины. Линейный градиент: 150 мл исходного буфера и 150 мл этого же буфера с добавкой 0,4 М KCl. Сульфопропил (SP)-сефадекс C-50 («Pharmacia»). Исходный буфер: универсальная буферная смесь, pH 3,7 [5], содержащая 6 М мочевины. Вогнутый градиент: 75 мл универсальной буферной смеси, содержащей 6 М мочевины, и 75 мл этой же смеси с добавкой 0,5 М KCl. Фракции, полученные ионообменной хроматографией, обессоливали.

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЖХ). Применяли систему FPLC («Pharmacia»). Колонка моноQ. Исходный буфер: 0,02 М трис-HCl, pH 7,4, содержащий 6 М мочевины. Градиент создавали исходным буфером, содержащим 1 М KCl. Полученные фракции обессоливали.

Экстракция бутанолом. Материал фракции растворяли в 50 мл 20 %-ной

НСООН, насыщенного *n*-бутанолом. К раствору добавляли 25 мл *n*-бутанола, насыщенного 20 %-ной НСООН, и встряхивали. После разделения суспензии отбирали три фракции — бутанольную (Б), промежуточную (П) и водную (В). Полученные фракции упаривали на ротаторном испарителе.

Экстракция буфером. Лиофильно высушенный материал фракции экстрагировали 0,025 М Na-ацетатным буфером, pH 4,5, содержащим 0,1 М NaCl. Осадок отделяли центрифугированием. Супернатант обессоливали.

Высоковольтный электрофорез (В/В) на бумаге проводили в течение 1,5 ч при градиенте напряжения 40—60 В/см на приборе, сконструированном в Ин-те микробиологии и вирусологии АН УССР [6], в электролитах ЭФ1, pH 6,5 (пиридин : уксусная кислота : вода (100 : 4 : 896)), ЭФ2, pH 1,9 (муравьиная кислота : уксусная кислота : вода (41,2 : 10 : 948,8)). Бумага FN 17 («Filtrak», ГДР).

Хроматография на бумаге. Применяли систему БХ1 (пиридин : бутанол : уксусная кислота : вода (10 : 15 : 3 : 12)). Бумага та же, что и для электрофореза.

Электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ) проводили по методу, описанному в литературе [7].

Расщепление трипсином и химотрипсином осуществляли, как описано ранее [1, 3].

Последовательность аминокислот определяли ручным методом Эдмана в сочетании с дансильрованием [8] и на секвенаторе 890 С («Beckman», США) с последующей идентификацией РТН-аминокислот в системе HPLC («Pharmacia»).

Аминокислотный состав определяли на анализаторе аминокислот ААА-331 (ЧССР). Пробы гидролизовали 5,7 н. HCl, содержащей 0,1 % фенола, в течение 24 ч при 105—110 °С в вакууме.

Результаты и обсуждение. Смесь бромциановых фрагментов разделяли на четыре фракции гель-фильтрованием через сефадекс G-75 (рис. 1). Для дальнейшего разделения каждой из фракций мы апробировали комбинации различных методов. В результате была выбрана схема, приводящая к оптимальным результатам (рис. 2). Цифрами или буквами в квадратных рамках обозначены фракции, полученные на каждом этапе и подвергнутые дальнейшему разделению, подчеркнутыми цифрами — фракции, содержащие минорные количества материала; дальнейшему разделению их не подвергали; латинскими буквами в рамках — N-концевые остатки аминокислот фракций, включающих от двух до пяти фрагментов (по числу N-концевых остатков). Эти девять фракций содержали такое количество материала, которое при

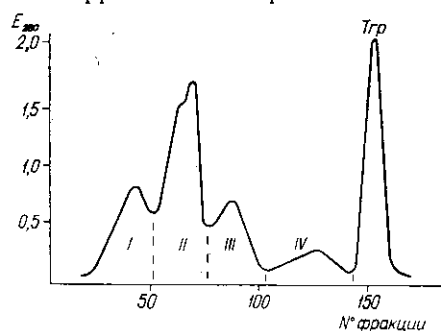


Рис. 1. Разделение продукта (180 мг) расщепления бромцианом каталазы *P. vitale* на колонке (2,2×90 см) с сефадексом G-75, уравновешенным растворителем «а» («Материалы и методы»). Скорость элюции 15 мл/ч, объем фракции 2,5 мл

Fig. 1. Separation of *P. vitale* catalase cyanogen bromide fragments on a column (2.2×90 cm) with Sephadex G-75 equilibrated by 0.2 M tris. HCl, pH 8.7 containing 6 M Gu. HCl. Flow rate — 15 ml/h, fraction volume — 2.5 ml

последующем разделении не давало бы высоких выходов индивидуальных фрагментов, необходимых для выяснения аминокислотной последовательности имеющейся техникой. Поэтому эти фракции далее не разделяли.

На рис. 3—6 представлены результаты разделения некоторых фракций на отдельных этапах схемы. В табл. 1 приведены аминокислотные составы полученных фрагментов. Лактон гомосерина на анализаторе аминокислот ААА-331 выходит одним пиком с гистидином. Поэтому в табл. 1 под гистидином понимается либо сам гистидин, либо лактон, либо их смесь. Гомосерин на анализаторе может элюироваться либо вместе с глутаминовой кислотой или с серином, либо самостоя-

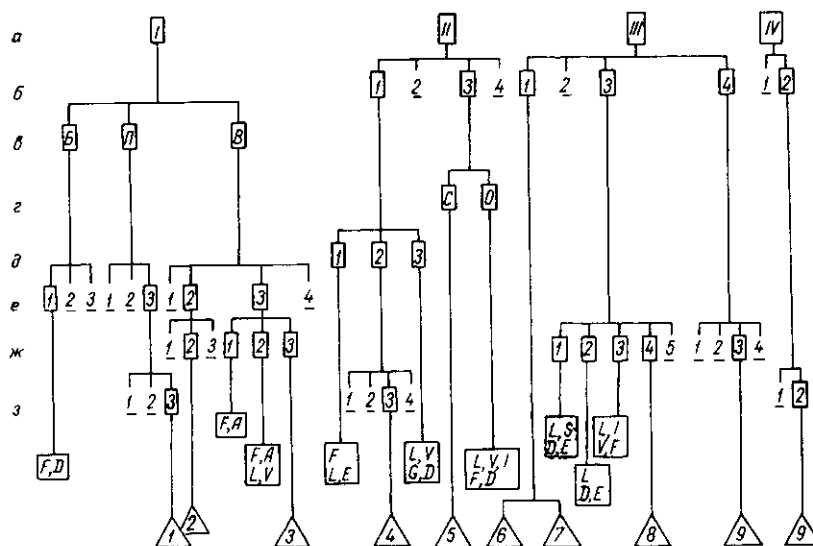


Рис. 2. Схема разделения бромциановых фрагментов каталазы *P. vitale*: G-75, 6 M мочевины (а); ДЭАЭ-сефадекс, 6 M мочевины (б); экстракция бутанолом (в); экстракция буфером, pH 4,5 (г); SP-сефадекс, 6 M мочевины (д); G-75, 20 %-ная HCOOH (е); FPLC, моноQ, 6 M мочевины (ж); В/В электрофорез, pH 6,5 (з)

Fig. 2. Scheme of isolation of *P. vitale* catalase cyanogen bromide fragments: G-75, 6 M urea (a); DEAE-sephadex, 6 M urea (b); butanol extraction (в); buffer extraction, pH 4.5 (г); SP-sephadex, 6 M urea (d); G-75, 20% HCOOH (e); FPLC, monoQ, 6 M urea (ж); B/B electrophoresis, pH 6.5 (з)

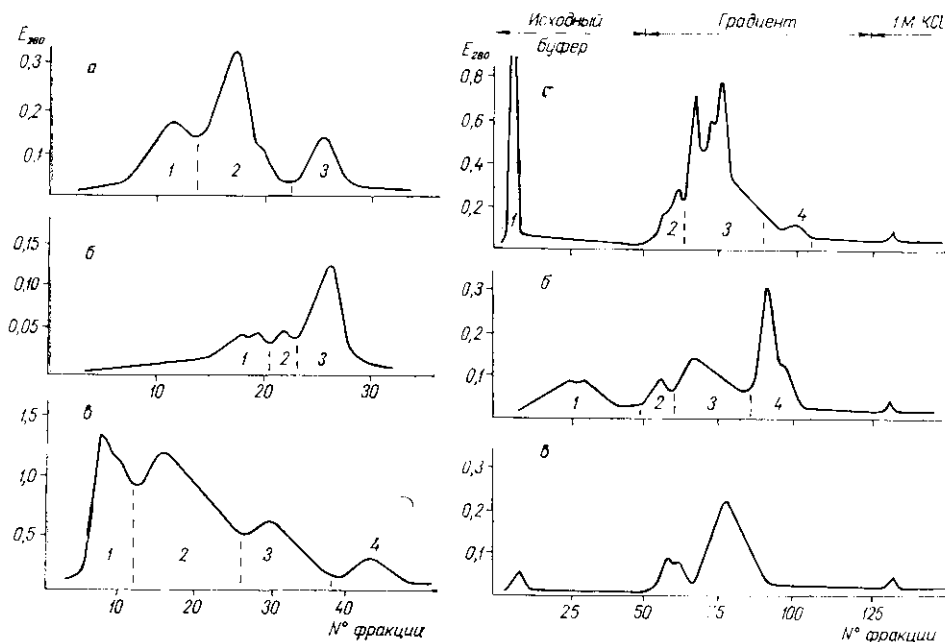


Рис. 3. Разделение фракций I-B (а), I-II (б) и I-V (в) рис. 2) на колонке (2,2×90 см) с сефадексом G-75, уравновешенным растворителем «б». Скорость элюции 20 мл/ч, объем фракции 3 мл

Fig. 3. Separation of I-B (a), I-II (б) and I-V (в) fractions (Fig. 2) on a column (2.2×90 cm) with Sephadex G-75 equilibrated by 20% HCOOH. Flow rate—20 ml/h, fraction volume—3 ml

Рис. 4. Разделение фракций II (а), III (б) и IV (в) (рис. 1) на колонке (1,4×18 см) с ДЭАЭ-сефадексом А-25. Буфер и градиент см. «Материалы и методы». Скорость элюции 20 мл/ч, объем фракции 5 мл

Fig. 4. Separation of fraction II (a), III (б) and IV (в) (Fig. 1) on a column (1.4×18 cm) with DEAE-sephadex A-25. Start-buffer: 0.025 M tris. HCl, pH 7.4, containing 6 M urea. Linear gradient—150 ml start-buffer and 150 ml start-buffer containing 0.4 M KCl. Flow rate—20 ml/h, fraction volume—5 ml

тельно между ними. В приведенных фрагментах мы не смогли однозначно идентифицировать гомосерин. Так как фрагменты BгCN6 и BгCN7 получены в смеси, аминокислотный состав BгCN6 выписан в табл. 1 на основании структуры этого фрагмента [9], установленной на смеси двух фрагментов. Зная аминокислотный состав фракции III-I,

соотношение фрагментов BгCN6 и BгCN7 во фракции, нетрудно было ориентировочно подсчитать аминокислотный состав фрагмента BгCN7, который и приведен в табл. 1. Аминокислотный состав фракций III-4-3 и IV-2-2 различается только по содержанию гистидина. Поэтому мы предполагаем, что эти фракции включают один фрагмент BгCN9, содержащий гомосерин (III-4-3), и лактон гомосерина (IV-2-2). В табл. 1 приведен состав последнего.

С максимальным выходом (25 %) получен фрагмент BгCN6

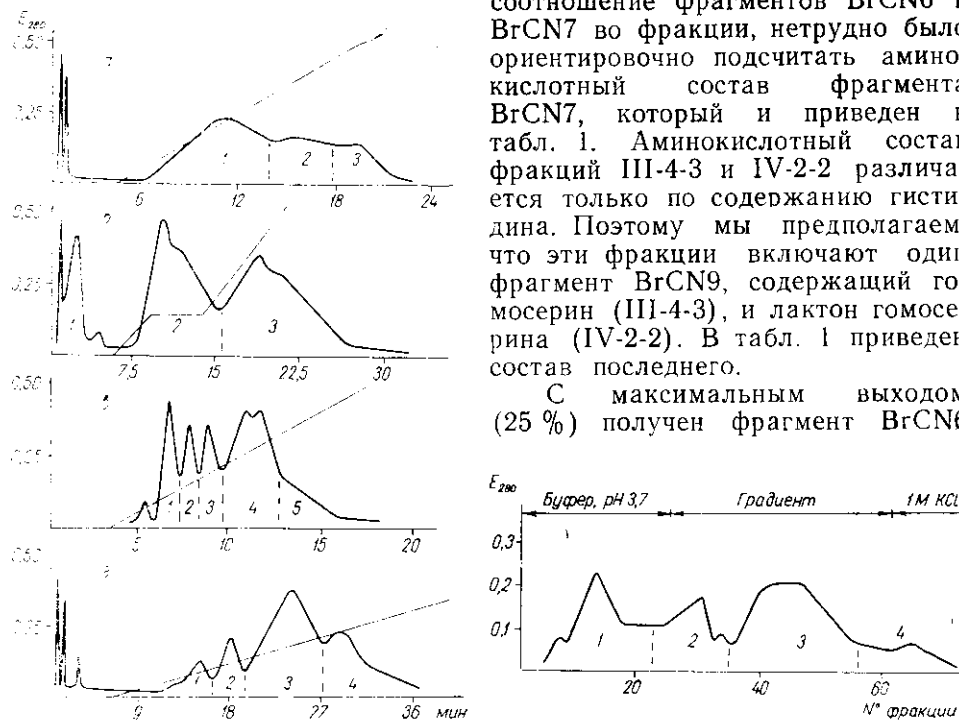


Рис. 5. ВЖХ в системе FPLC фракций I-B-2 (а), I-B-3 (б) (рис. 3, в) и III-3 (в), III-4 (г) (рис. 4, б). Колонка моноQ. Буфер и градиент см. «Материалы и методы»
 Fig. 5. FPLC — chromatography of fractions I-B-2 (a), I-B-3 (b) (Fig. 3, v) and III-3 (v), III-4 (g) (Fig. 4, b). Start-buffer 0.02 M tris. HCl, pH 7.4, containing 6 M urea. Linear gradient — start-buffer containing 1 M KCl. Column monoQ

Рис. 6. Разделение фракции II-1 (рис. 4, а) на колонке (1×22 см) с SP-сефадексом С-50. Буфер и градиент см. «Материалы и методы». Скорость элюции 12 мл/ч, объем фракции 5 мл

Fig. 6. Separation of fraction II-1 (Fig. 4, a) on a column (1×22 cm) with SP-sephadex C-50. Start-buffer pH 3.7 containing 6 M urea. Concave gradient — 75 ml of start-buffer and 75 ml of start-buffer containing 0.5 M KCl. Flow rate — 12 ml/h, fraction volume — 5 ml

(фракция III-I, рис. 2). Эта фракция содержала фрагменты BгCN6 и BгCN7 в соотношении 4 : 1 соответственно, как было установлено электрофорезом в ПААГ (данные не приведены). BгCN6 имел молекулярную массу 7000, а BгCN7 — около 11 000. Выход фрагмента BгCN5 (фракция П-3-с, рис. 2) составил 10 %. Молекулярная масса его, по данным электрофореза в ПААГ, ~8000. Выход фрагментов BгCN4 и BгCN8 не превышал 3 %. Этого количества хватило для расщепления трипсином, разделения полученных пептидов В/В электрофорезом на бумаге в одном электролите и определения аминокислотного состава триптических пептидов. Выход фрагментов BгCN1 — BгCN3 и BгCN9 составил менее 1 %, что оказалось достаточным лишь для деградации по Эдману.

Ниже приведены результаты исследования первичной структуры каждого фрагмента. Аминокислотные составы пептидов, полученных при расщеплении BгCN4 — BгCN8 трипсином (Т) и химотрипсином (Сh), сведены в табл. 2. Стадии деградации по Эдману обозначены стрелкой под последовательностью.

Таблица 1

Аминокислотный состав бромциановых фрагментов каталазы *P. vitale*The amino acid composition of cyanogen bromide fragments of *P. vitale* catalase

Аминокислота	Состав фрагментов (фракций)									Сумма
	BrCN1 (I-П-3-3)	BrCN2 (I-B-2-2)	BrCN3 (I-B-3-3)	BrCN4 (II-1-2-3)	BrCN5 (II-3-с)	BrCN6 (II-1-1)	BrCN7 (II-1-1)	BrCN8 (III-3-4)	BrCN9 (IV-2-2)	
Lys	—	1,0(1)	2,0(2)	1,5(2)	1,1(1)	—	5,9(6)	1,0(1)	—	13
His	—	0,7(1)	0,7(1)	—	—	3	2,0(2)	0,9(1)	1,4(2)	10
Arg	—	1,0(1)	1,3(1)	1,0(1)	2,9(3)	6	3,5(4)	0,8(1)	—	17
Asp	1,0(1)	3,8(4)	3,6(4)	5,0(5)	10,0(10)	10	12,3(12)	3,9(4)	1,8(2)	52
Thr	0,7(1)	1,9(2)	1,8(2)	2,1(2)	3,0(3)	2	7,0(7)	1,6(2)	—	21
Ser	—	2,0(2)	1,6(2)	3,7(4)	7,0(7)	1	6,7(7)	0,7(1)	1,0(1)	25
Glu	1,1(1)	3,0(3)	4,0(4)	2,2(2)	10,6(11)	7	13,4(13)	5,0(5)	2,1(2)	48
Pro	—	1,2(1)	1,0(1)	6,0(6)	6,0(6)	6	3,5(4)	2,0(2)	—	26
Gly	—	2,0(2)	2,6(3)	2,9(3)	4,8(5)	7	9,0(9)	2,0(2)	1,0(1)	32
Ala	—	2,7(3)	2,6(3)	3,9(4)	4,9(5)	2	13,8(14)	1,3(1)	1,3(1)	33
Val	0,8(1)	2,0(2)	2,3(3)	1,6(2)	4,6(5)	2	5,0(5)	2,5(3)	0,8(1)	24
Ile	1,9(2)	1,0(1)	2,0(2)	1,4(2)	2,8(3)	3	2,5(3)	1,2(1)	0,8(1)	18
Leu	1,2(1)	2,1(2)	2,5(3)	4,8(5)	7,1(7)	6	8,0(8)	4,0(4)	1,7(2)	38
Tyr	—	0,5(1)	0,7(1)	1,7(2)	2,0(2)	1	1,3(2)	—	—	9
Phe	—	1,9(2)	0,9(1)	1,0(1)	4,7(5)	4	2,9(3)	1,6(2)	0,9(1)	19
H. Ser	—	—	—	—	—	1	(1)	—	—	2
Всего	7	28	33	41	73	61	100	30	14	387
N-конец	Asp	Tyr	Leu	H. o.	Asp	Phe	H. o.	H. o.	H. o.	

Примечание. Н. о. — N-конец не определяется.

Фрагмент BrCN1. Asp-Val-Ile-Ile-Glu-(Thr, Leu). Очевидно, что фрагмент получен в результате неспецифического по C-концу расщепления каталазы, скорее всего, до обработки ее бромцианом, так как известно, что при хранении каталаза подвергается частичной деградации [10].

Фрагмент BrCN2. Tyr-(Lys, Arg, Asx₄, Thr₂, Ser₂, Glx₃, Pro, Gly₂, Ala₃, Val₂, Ile, Leu₂, Phe₂)-H. Ser.

Таблица 2

Аминокислотный состав триптических и химотриптических пептидов бромциановых фрагментов каталазы

Amino acid composition of tryptic and chymotryptic peptides of *P. vitale* catalase cyanogen bromide fragments

Аминокислота	BrCN4	BrCN4	BrCN5	BrCN5	BrCN5	BrCN5	BrCN5	BrCN5	BrCN5	BrCN6-7
	T ₁	T ₂	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆	T ₁	
Lys	1,3(1)	—	—	—	1,2(1)	—	—	—	—	—
His	—	—	—	0,5(1)	—	—	—	—	—	1,0(1)
Arg	—	—	1,0(1)	—	—	1,0(1)	—	—	—	1,0(1)
Asp	2,1(2)	—	0,9(1)	5,8(6)	—	2,3(2)	1,6(2)	1,0(1)	—	—
Thr	1,0(1)	—	—	1,6(2)	—	1,1(1)	—	—	—	—
Ser	0,8(1)	1,0(1)	0,9(1)	2,1(2)	0,8(1)	1,0(1)	1,4(2)	—	—	—
Glu	0,8(1)	—	1,1(1)	5,1(5)	—	2,6(3)	2,0(2)	1,0(1)	1,2(1)	—
Pro	+(1)	—	—	1,0(4)	+(1)	+(1)	2,0(2)	—	+(1)	—
Gly	—	1,0(1)	1,2(1)	2,3(2)	1,1(1)	1,7(2)	2,3(2)	—	1,4(1)	—
Ala	0,8(1)	—	1,0(1)	3,1(3)	—	1,7(2)	1,1(1)	1,0(1)	—	—
Val	—	—	—	2,7(3)	—	0,5(1)	0,8(1)	0,9(1)	0,7(1)	—
Ile	—	—	—	1,3(2)	—	1,0(1)	0,7(1)	0,8(1)	0,7(1)	—
Leu	—	—	2,1(2)	2,0(2)	—	2,0(2)	0,8(1)	2,2(2)	—	—
Tyr	1,0(1)	—	—	1,3(2)	—	—	—	—	—	—
Phe	—	—	2,0(2)	2,0(2)	—	1,7(2)	—	1,0(1)	0,8(1)	—
H. Ser	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Всего	9	2	10	36	4	19	14	8	8	

Амино-кислота	BrCN6-7 T ₂	BrCN6-7 T ₃	BrCN6-7 T ₄	BrCN6-7 T ₅	BrCN6-7 T ₆	BrCN6-7 T ₇	BrCN6-7 T ₈	BrCN6-7 T ₉	BrCN6-7 T ₁₀
Lys	—	—	—	—	—	—	—	—	—
His	—	—	0,7(1)	0,9(1)	0,4	—	1,2(1)	1,1(1)	—
Arg	1,1(1)	1,0(1)	1,9(2)	0,9(1)	—	1,2(1)	—	—	—
Asp	2,1(2)	1,9(2)	2,1(2)	3,3(3)	1,0(1)	0,7(1)	0,9(1)	1,0(1)	1,0(1)
Thr	0,7(1)	0,9(1)	—	—	—	—	1,1(1)	—	1,0(1)
Ser	—	0,9(1)	—	—	—	—	—	—	0,9(1)
Glu	2,0(2)	1,1(1)	1,9(2)	—	1,2(1)	—	1,6(2)	—	1,4(1)
Pro	0,8(1)	—	3,2(3)	0,8(1)	—	+(1)	+(1)	—	—
Gly	1,9(2)	—	1,7(2)	—	1,8(2)	—	3,0(3)	—	1,0(1)
Ala	—	—	—	0,9(1)	1,0(1)	—	—	—	0,8(1)
Val	0,8(1)	—	—	—	—	—	1,0(1)	—	0,7(1)
Ile	—	—	0,9(1)	0,9(1)	—	1,0(1)	—	1,0(1)	—
Leu	1,7(2)	2,5(3)	1,1(1)	—	—	—	—	—	0,8(1)
Tyr	—	1,0(1)	—	—	—	—	0,7(1)	—	—
Phe	0,8(1)	0,9(1)	1,0(1)	—	—	—	—	—	—
H. Ser	—	—	—	—	0,3(1)	0,9(1)	—	—	0,5(1)
Всего	13	11	15	8	6	5	11	3	9

Амино-кислота	BrCN6-7 Ch ₁	BrCN6-7 Ch ₂	BrCN6-7 Ch ₂ '	BrCN6-7 Ch ₃	BrCN6-7 Ch ₃ '	BrCN6-7 Ch ₄	BrCN6-7 Ch ₅	BrCN8 T ₁	BrCN8 T ₂
Lys	—	—	—	—	—	—	—	0,8(1)	—
His	0,8(1)	0,8(1)	1,0(1)	1,1(1)	0,5(1)	—	—	—	—
Arg	1,0(1)	1,9(2)	2,0(2)	3,1(3)	1,0(1)	—	—	—	—
Asp	1,3(1)	1,0(1)	1,0(1)	4,9(5)	3,8(4)	2,0(2)	2,0(2)	2,4(2)	0,4
Thr	—	—	—	—	—	0,8(1)	—	1,2(2)	0,6(1)
Ser	—	—	—	—	—	0,6(1)	0,8(1)	1,3(1)	1,3(1)
Glu	2,0(2)	—	—	1,0(1)	1,1(1)	1,3(1)	2,1(2)	0,7(1)	0,8(1)
Pro	1,2(1)	3,2(3)	2,8(3)	2,5(3)	—	—	—	+(1)	—
Gly	2,0(2)	1,0(1)	—	2,0(2)	2,1(2)	—	1,0(1)	2,1(2)	1,2(1)
Ala	—	1,0(1)	1,1(1)	2,0(2)	1,0(1)	—	1,1(1)	0,8(1)	0,7(1)
Val	—	—	—	—	—	—	1,0(1)	0,6(1)	0,5(1)
Ile	1,1(1)	1,0(1)	1,0(1)	0,8(1)	—	—	—	—	—
Leu	1,0(1)	—	—	—	—	2,0(2)	—	2,6(3)	0,5(1)
Tyr	—	—	—	—	—	0,7(1)	—	—	—
Phe	1,0(1)	1,0(1)	—	—	—	—	—	2,0(2)	—
H. Ser	—	—	—	0,5(1)	0,5(1)	—	—	0,3(1)	0,5(1)
Всего	11	11	9	19	11	8	8	18	8

Фрагмент BrCN3. $\text{Leu} \rightarrow \text{Val} \rightarrow \text{Asp} \rightarrow (\text{Lys}_2, \text{Arg}, \text{Asx}_3, \text{Thr}_2, \text{Ser}_2, \text{Glx}_4, \text{Pro}, \text{Gly}_3, \text{Ala}_3, \text{Val}_2, \text{Ile}_2, \text{Leu}_2, \text{Tyr}, \text{Phe})\text{-H. Ser}$.

Фрагмент BrCN4. После расщепления трипсином и разделения В/В электрофорезом в электролите ЭФ2 были получены только два пептида. BrCN4T₁ аналогичен по аминокислотному составу пептиду T₁₄, строение которого установлено ранее [3]: Ala-Tyr-Ser-Asn-Thr-Glu-Pro-Asn-Lys. BrCN4T₂. На основании данных по аминокислотному составу (табл. 2) можно предположить, что пептид содержит не серин, а гомосерин, который иногда элюируется с колонки анализатора на месте серина. По-видимому, BrCN4T₂ является С-концевым во фрагменте BrCN4.

Фрагмент BrCN5. После расщепления трипсином и разделения В/В электрофорезом в электролитах ЭФ1 и ЭФ2 были получены шесть пептидов, BrCN5T₁. $\text{Leu} \rightarrow \text{Phe} \rightarrow (\text{Asp}, \text{Ser}, \text{Glu}, \text{Gly}, \text{Ala}, \text{Leu}, \text{Phe})\text{-Arg}$. BrCN5T₂ выделен в двух формах — с гистидином и без него. Можно предположить, что в пептиде содержится не гистидин, а лактон гомосерина. В этом случае BrCN5T₂ представляет собой С-концевой пептид фрагмента BrCN5. Из аминокислотных составов BrCN5T₅ и

BrCN5T6 (табл. 2) очевидно, что эти пептиды образовались в результате расщепления неспецифических для трипсина связей.

Фрагменты BrCN6 и BrCN7. Как описано выше, эти фрагменты были получены в смеси и представлены во фракции III-I в соотношении 4:1 соответственно. Фракцию III-I расщепляли трипсином. Смесь пептидов разделяли В/В электрофорезом в электролитах ЭФ1 и ЭФ2 и хроматографией на бумаге. Были получены шесть пептидов (BrCN6-7T1—BrCN6-7T6) с выходом 10—25% и четыре пептида (BrCN6-7T7—BrCN6-7T10) с выходом 1—7%. BrCN6-7T1. Phe-Gln-Pro-Gly-(His, Val, Ile)-Arg. BrCN6-7T2. Gly-Val-Asx-Phe-(Asx, Thr, Glx₂, Pro, Gly, Leu₂)-Arg. BrCN6-7T2 идентичен пептиду T9, строение которого выяснено ранее [3]. BrCN6-7T3. Leu-Phe-Ser-Tyr-Leu-Asx-Thr-Glx-(Leu, Asx)-Arg. BrCN6-7T3 идентичен пептиду T39, строение которого известно [3]. BrCN6-7T4. His-Gly-(Asn, Gln, Pro, Ile, Leu)-Gly-Phe-Arg-Pro-(Pro, Asn)-Arg. Строение предложено на том основании, что этот пептид отличается по аминокислотному составу от пептида T5 (частичное строение которого установлено ранее [3]) только остатком гистидина. Возможно, пептид T5 образовался в результате расщепления каталазы по остатку гистидина при обработке трипсином или в процессе хранения [10]. BrCN6-7T5. Ala-Pro-Ile-His-Asx-Asx-Asx-Arg. BrCN6-7T6. Asx-Gly-Ala-Gly-Glx-H. Ser. Очевидно, пептид содержит лактон гомосерина, а не остаток гистидина (табл. 2) и занимает С-концевое положение в одном из бромциановых фрагментов фракции III-I. BrCN6-7T8. Glx-Gly-Val-(Asx, Thr, Glx, Pro, Gly₂, Tyr)-Lys. Из аминокислотного состава (табл. 2) ясно, что пептид BrCN6-7T10 представляет собой С-концевой участок второго бромцианового фрагмента, содержащегося во фракции III-I.

В результате расщепления смеси BrCN6-7 химотрипсином были получены семь пептидов. BrCN6-7Ch1 и BrCN6-7Ch4 выделены с выходом около 20%, остальные — ~5%. BrCN6-7Ch1. Arg-His-Gly-(Asx, Glx₂, Pro, Gly, Ile, Leu, Phe), BrCN6-7Ch1' отличается от BrCN6-7Ch1 наличием дополнительного остатка Asx, занимающего в нем N-концевое положение. BrCN6-7Ch2. Gly-Phe-Arg-Pro-Pro-(Arg, His, Asx, Pro, Ala, Ile). Первые пять остатков перекрываются с С-концевой последовательностью пептида BrCN6-7T4. Сравнивая составы и строение BrCN6-7Ch2 и BrCN6-7Ch2' (табл. 2) можно заключить, что меньший из них образовался при расщеплении связи Phe-Arg. BrCN6-7Ch3'. Asx-(Arg, His, Asx₃, Glx, Gly₂, Ala)-H. Ser. Поскольку в пептиде имеется гомосерин, то он является С-концевым одним из бромциановых фрагментов фракции III-I. Исходя из некоторого сходства аминокислотных составов BrCN6-7Ch3' и BrCN6-7Ch3 (табл. 2), можно предположить, что они образовались из одного и того же участка белка. BrCN6-7Ch4. Ser-(Asx₂, Thr, Glx, Leu₂, Tyr).

Мы предполагаем, что пептиды BrCN6-7T2, BrCN6-7T3, BrCN6-7T6, BrCN6-7Ch1, BrCN6-7Ch4, выделенные с максимальным выходом 20—25%, получены из одного мажорного фрагмента фракции III-I, обозначенного нами BrCN6.

На смеси BrCN6-7 провели 38 стадий деградации на секвенаторе. На каждой из стадий, начиная с 1-й по 32-ю, было идентифицировано по одному остатку аминокислоты. Следовательно, ступенчатой деградации подвергается один из фрагментов фракции III-I. У другого фрагмента N-конец, по-видимому, блокирован. В установленную последовательность входят пептиды BrCN6T2 и BrCN6T3. На этом основании мы считаем, что выясненная последовательность 32 остатков аминокислот принадлежит фрагменту BrCN6. Так как первые пять остатков пептида BrCN6-7Ch2 перекрываются с С-концевой последовательностью

BrCN6-7T4, а пептиды BrCN6-7Ch3 и BrCN6-7Ch3', исходя из их аминокислотного состава (табл. 2), перекрывают последовательность BrCN6-7T4, BrCN6-7T5 и BrCN6-7T6, ясно, что все перечисленные пептиды также принадлежат фрагменту BrCN6.

Схема реконструкции фрагмента из фракции III-I приведена на рис. 7. Триптические и химотриптические пептиды, не вошедшие в состав фрагмента BrCN6, мы относим к фрагменту BrCN7.

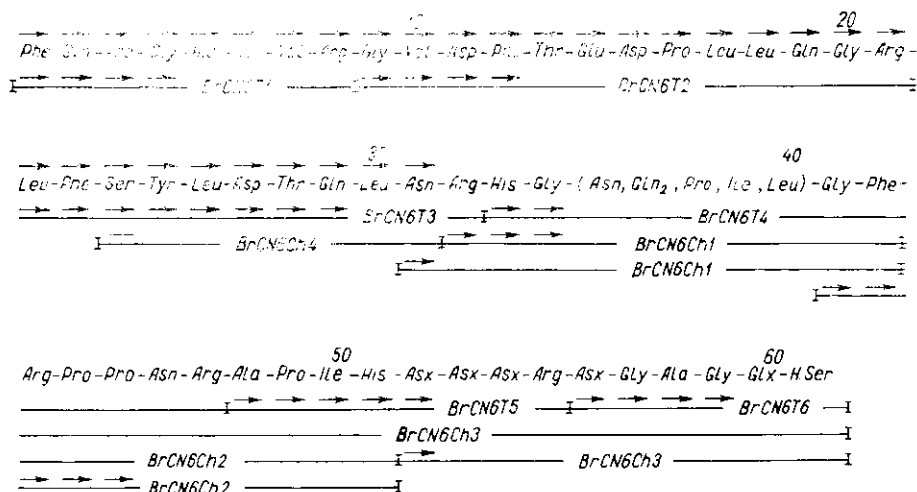


Рис. 7. Схема реконструкции полипептидной цепи фрагмента BrCN6 каталазы гриба *P. vitale*. Стрелками над последовательностью указаны стадии деградации по Эдману, проведенные на секвенаторе. Стрелками под последовательностью — деградация соответствующих пептидов по Эдману ручным методом

Fig. 7. Reconstruction of polypeptide chain of *P. vitale* catalase BrCN6 fragment. Arrows over amino acid sequence show Edman degradation steps estimated by the automatic sequencer. Arrows under amino acid sequence show Edman manual degradation of the corresponding peptides

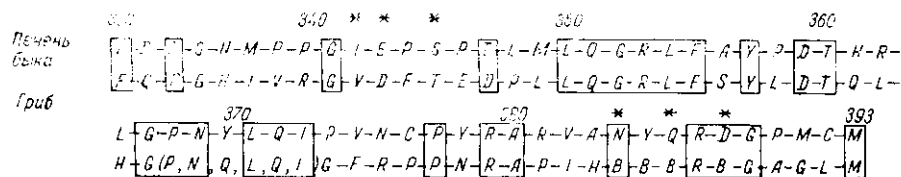
Фрагмент BrCN8. После расщепления трипсином и разделения В/В электрофорезом в электролите ЭФ2 получены два пептида. Увеличенное содержание серина в них (табл. 2) можно объяснить наличием в одном пике остатков Ser и H. Ser. Присутствие в BrCN8T1 и BrCN8T2 остатка H. Ser свидетельствует о том, что оба пептида являются частью С-концевого участка фрагмента BrCN8. Вычитая из аминокислотного состава BrCN8T1 состав BrCN8T2, получим аминокислотный состав пептида T31, строение которого установлено ранее [3]: Phe-Gly-Phe-Asp-(Pro, Leu)-Leu-Thr-Asp-Lys. Интересно отметить, что состав BrCN8T2 очень сходен с таковым BrCN7T10 (см. выше). Можно полагать, что фрагмент BrCN8 входит в состав фрагмента BrCN7 и представляет собой его С-концевую часть.

Фрагмент BrCN9. Gln-(His, Asx, Ser, Glx₂, Gly, Ala, Val, Ile, Leu₂, Phe)-H. Ser. Этот фрагмент не подвергается ступенчатой деградации. Можно полагать, что на N-конце BrCN9 расположен остаток Gln, зациклизовавшийся в пирролидонкарбоновую кислоту в процессе выделения фрагмента.

Таким образом, из продукта расщепления каталазы бромцианом выделены девять фрагментов, насчитывающих в сумме 387 остатков аминокислот. Установлена полная аминокислотная последовательность участка полипептидной цепи каталазы, включающего 61 остаток аминокислот, и частичная аминокислотная последовательность двух участков, включающих в сумме 37 остатков.

Сравнивая первичную структуру фрагмента BrCN6 с аминокислотной последовательностью каталазы печени быка [11], мы обнаружили в этом белке участок 333—393, гомологичный фрагменту (степень го-

мологии 54 %). Ниже приведено сравнение участков двух каталаз в однобуквенном обозначении:



При расчете степени гомологии, кроме идентичных остатков аминокислот (28 остатков, взятых в рамки), мы учитывали и нейтральные замены Val → Ile, Asp → Glu, Thr → Ser, Asn → Gln (шесть замен, обозначенных звездочкой). В последовательности каталазы гриба остатки аминокислот внутри скобки расставлены по принципу наибольшей гомологии, а в положениях 384, 386 и 388 неидентифицированные остатки Asx условно приняты за Asn, Asp и Asp соответственно.

Авторы благодарят Э. Л. Ким (Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН УССР) за техническую помощь при разделении смеси фрагментов в системе FPLC и В. М. Харченко (ИМБиГ АН УССР) — за проведение анализов аминокислотного состава.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Триптические пептиды каталазы гриба *Penicillium vitale*. 1. Разделение и аминокислотный состав растворимых пептидов / Э. А. Козлов, М. Т. Кириленко, Т. Л. Левитина и др. // Биополимеры и клетка.— 1987.—3, № 5.— С. 240—245.
2. Триптические пептиды каталазы гриба *Penicillium vitale*. 2. Разделение и аминокислотный состав нерастворимых пептидов / М. Т. Кириленко, Т. Л. Левитина, Л. В. Гудкова и др. // Там же.— 1988.—4, № 1.— С. 40—43.
3. Триптические пептиды каталазы гриба *Penicillium vitale*. 3. Строение некоторых пептидов / Н. М. Гусак, Т. Л. Левитина, С. А. Атепалихина и др. // Биополимеры и клетка.— 1989.—5, № 1.— С. 45—52.
4. Gross K., Wilkop B. Nonenzymatic cleavage of peptide bonds: the methionine residues in bovine pancreatic ribonuclease // J. Biol. Chem.— 1962.—237, N 6.— P. 1856—1865.
5. Лурье Ю. Ю. Справочник по аналитической химии.— М.: Химия, 1971.—454 с.
6. Кавсан В. М., Мороз Л. В., Серебряный С. Б. Приспособление для горизонтального электрофореза на бумаге упрощенной конструкции // Укр. биохим. журн.— 1968.—40, № 1.— С. 104—106.
7. Swank R. T., Munkers K. D. Molecular weight analysis of oligopeptides by electrophoresis in polyacrylamide gel with sodium dodecyl-sulfate // Anal. Biochem.— 1971.—39, N 2.— P. 462—477.
8. Определение структуры пептидов комбинированным методом дансил-Эдман / Н. М. Гусак, М. Н. Овандер, Л. Б. Дробот, С. Б. Серебряный // Методы молекуляр. биологии.— Киев: Наук. думка.— 1979.— С. 142—154.
9. Фрагменты полипептидной цепи каталазы гриба *Penicillium vitale* / Э. А. Козлов, Т. Л. Левитина, Н. М. Гусак и др. // Биополимеры и клетка.— 1987.—3, № 6.— С. 318—320.
10. Denis C., Roger H., Colin M. Proteolytic modification of mouse liver catalase // Biochem. and Biophys. Res. Commun.— 1982.—104, N 4.— P. 1567—1572.
11. The complete amino acid sequence of bovine liver catalase and partial sequence of bovine erythrocyte catalase / W. A. Schroeder, J. R. Shelton, L. B. Shelton et al. // Arch. Biochem. Biophys.— 1982.—214, N 1.— P. 397—421.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН УССР, Киев
Ин-т биохимии им. А. В. Палладина АН УССР, Киев

Получено 13.05.88

CYANOGEN BROMIDE FRAGMENTS OF *PENICILLIUM VITALE* CATALASE

*T. L. Levitina, N. M. Gusak, N. V. Rodnin, M. T. Kirilenko,
O. S. Miroshnichenko, S. A. Atepalikhina, L. V. Gudkova, E. A. Kozlov*
Institute of Molecular Biology and Genetics,
A. V. Palladin Institute of Biochemistry,
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

Summary

Nine fragments containing 387 amino acid residues were isolated from product of cyanogen bromide treatment of *P. vitale* catalase by Sephadex gel-filtration, ion-exchange chromatography, butanol extraction and high-voltage paper electrophoresis. Tryptic, chymotryptic peptides and N-terminal sequence of some *P. vitale* catalase cyanogen bromide fragments were investigated. Complete and partial amino acid sequences of fragments including 61 and 37 amino acid residues, respectively, were determined.

УДК 577.113.4

Ю. В. Пацковский, Т. П. Волощук, А. И. Потопальский

НЕКОТОРЫЕ ОСОБЕННОСТИ РЕАКЦИИ ПОЛИНУКЛЕОТИДОВ С ТИОФОСФАМИДОМ

В работе проводили изучение направлений алкилирования нуклеиновых кислот противоопухолевым агентом тиофосфамидом, а также этиленимином и моноазиридиндиэтилфосфатом. Показано, что степень алкилирования гомополирибонуклеотидов определяется природой гетероциклических оснований в их составе, что свидетельствует о преимущественном алкилировании остатков азотистых оснований. Методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии выделены продукты алкилирования и показано, что алкилирование рибонуклеозидов в свободном виде и в составе полинуклеотидов производными этиленимина происходит в основном по N7 положению гуанозина, по N1 — аденозина и по N3 — пиримидиновых нуклеозидов. Уменьшение значений рН и ионной силы среды приводит к увеличению скорости алкилирования ДНК.

Введение. Тиофосфамид, или тиотэф,— трифункциональный алкилирующий агент, обладающий противоопухолевым действием [1]. Противоопухолевая активность обнаружена также у ДНК, алкилированной тиотэфом [2]. Предполагается, что биологическая активность тиотэфа, как и других электрофильных алкилирующих агентов, обусловлена его взаимодействием с клеточной ДНК [3]. Однако доказательства, полученные к настоящему времени, достаточно противоречивы и носят, в основном, косвенный характер. На примере реакции алкилирования этиленимином и тиотэфом мононуклеотидов показано, что алкилирование происходит в основном по остаткам фосфорной кислоты [4]. С другой стороны, результаты, полученные авторами работы [5], свидетельствуют об алкилировании метилированных аналогов оснований нуклеиновых кислот тиотэфом в водной среде. Изменение физико-химических свойств ДНК вследствие алкилирования (денатурация, фрагментация, изменение плотности отрицательного заряда, изменение спектральных характеристик) подтверждает возможность модификации нуклеофильных центров в ДНК [2, 6, 7]. Однако при этом неясно, какие нуклеофильные центры в составе нуклеиновых кислот и в каких условиях оказываются предпочтительными в реакции алкилирования — остатки гетероциклических оснований или остатки фосфорной кислоты. В связи с этим мы решили выяснить основные направления алкилирования нуклеозидов и полинуклеотидов производными этиленимина — тиотэфом и моноазиридиндиэтилфосфатом.

Материалы и методы. N,N',N''-триэтиленимид тиофосфорной кислоты (тиотэф, I) синтезирован по методу [8], моноэтиленимид диэтилового эфира фосфорной кислоты