

Ревизия структуры триптических пептидов и бромциановых фрагментов каталазы гриба *Penicillium vitale*

Э. А. Козлов, Т. Л. Левитина, М. Т. Бобровская, М. Н. Овандер, Л. В. Гудкова, Н. В. Латышко

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
Ул. Академика Заболотного, 150, Киев, 03143, Украина

*Повторно исследована аминокислотная последовательность некоторых ранее известных, а также дополнительно полученных триптических пептидов немодифицированной и модифицированной по остаткам лизина малеиновым ангидридом каталазы гриба *P. vitale*. Проверена аминокислотная последовательность двух ранее известных бромциановых фрагментов и установлена аминокислотная последовательность трех вновь выделенных бромциановых фрагментов.*

Введение. В 1998 г. нами была опубликована полная аминокислотная последовательность каталазы гриба *P. vitale*, выясненная химическими методами [1, 2] (в дальнейшем — «химическая» аминокислотная последовательность). Параллельно аминокислотную последовательность этой же каталазы изучали рентгеноструктурным методом в Институте кристаллографии АН России. Впервые аминокислотная последовательность каталазы *P. vitale* по данным рентгеноструктурного анализа опубликована в 1986 г. [3] (в дальнейшем — «рентгеноструктурная»). Через год после публикации «химической» аминокислотной последовательности мы получили персональное сообщение от авторов рентгеноструктурных исследований об обновленной «рентгеноструктурной» аминокислотной последовательности каталазы *P. vitale*. Сравнение новой «рентгеноструктурной» с «химической» последовательностью [1, 2] свидетельствует о серьезных расхождениях в нескольких участках полипептидной цепи, обусловленных, скорее, нашими ошибками: а) при реконструкции полипептидной цепи из фрагментов с помощью мостиковых пептидов [1] (перестановки нескольких участков), б) в идентификации отдельных аминокислотных остатков при определении аминокислотной последовательности отдельных пе-

птидов ручным методом деградации по Эдману [4, 5], в) недостаточной степенью очистки некоторых индивидуальных пептидов и фрагментов [6—9].

Анализ сравниваемых последовательностей позволил выяснить, какие конкретные пептиды и фрагменты подлежат ревизии, а также те триптические пептиды, которые были нами потеряны в процессе выделения. Зная из «рентгеноструктурной» последовательности аминокислотный состав этих пептидов, можно было целенаправленно и легко выделить их, используя разработанный нами метод препаративного картирования для высокомолекулярных белков [10]. Кроме этого, в работе использовали накопленный нами ранее материал [6—9]. Результаты этих повторных целенаправленных исследований аминокислотной последовательности пептидов и фрагментов опубликованы в настоящем сообщении.

Материалы и методы. Для исследований использовали в основном пептидный материал, накопленный за годы предыдущей работы. Условия дополнительной очистки триптических пептидов методом высоковольтного электрофореза и хроматографии на бумаге FN-17 («Filtrak», Германия) описаны ранее [9]. Для целенаправленного получения отдельных пептидов применяли разработанный нами ускоренный метод препаративного картирования [10]. Для разделения и дополнительной очистки крупных фрагментов применяли высоко-

эффективную жидкостную хроматографию (ВЖХ) в системах HPLC и FPLC («Pharmacia», Швеция) в условиях, описанных нами ранее [8, 9]. Используемые в работе реагенты, а также определение аминокислотного состава и N-концевой последовательности ручным методом Эдмана (до 10 стадий) описаны в сообщениях [8, 9, 11]. Для определения N-концевой последовательности свыше 10 стадий применяли секвенатор 890С («Beckman», США) с последующей идентификацией фенилтиогидантоин-аминокислот в системе HPLC. Аминокислотный состав определяли на анализаторе аминокислот BC200 («Bioscal», Германия)

Результаты и обсуждение. В таблице приведены результаты исследования аминокислотной последовательности триптических пептидов немодифицированной каталазы. Жирным шрифтом выделено число стадий, необходимых для проверки ранее установленной последовательности прежних или вновь полученных пептидов. Для некоторых крупных пептидов дано дополнительное описание

способа установления их аминокислотной последовательности.

Пептид T1. На пептиде проводили шесть стадий деградации (далее в тексте и таблице количество проведенных стадий деградации выделено жирным шрифтом). Пептид расщепляли химотрипсином и высоковольтным электрофорезом, выделяли только положительно заряженный пептид. Его строение: Gly-Ala-Lys.

Пептид T4. Строение N-концевой части пептида было выяснено ранее [4]. Пептид расщепляли химотрипсином. Высоковольтным электрофорезом получены два пептида: T4Ch1 — строение: His-Ser-Asn-Thr-Thr-Ala-His-Ile-Gly-Ala-Phe, T4Ch2 — строение: Gly-Glu-Lys.

Пептид T56. После расщепления химотрипсином высоковольтным электрофорезом были выделены три пептида. Пептид T56Ch1 — состав: Asp, Glu₄, Val, Ile, Leu, строение: Val-Glu-Glu-Ile-Glu-Gly-Gln-Leu. Пептид T56Ch2 — состав: Glu₄, Pro, Gly, Val, Ile, Leu, Arg, строение: Gln-Gln-Glu-Gly-

Триптические пептиды каталазы P. vitale.

Пептид	Аминокислотная последовательность
T1	Met-Phe-Gln-Thr-Phe-Ser-(Asp, Ser, Glu ₂ , Gly ₂ , Ala ₄ , Val ₃ , Leu, Tyr)-Gly-Ala-Lys
T3	Val-Gly-Leu-Leu-Ala-Ser-Val-Asn-Lys-Pro-Ala-Ser-Ile-Ala-Gln-Gly-Ala-Lys
T4	Ala-Ile-Gly-Val-Glu-Ala-Pro-Lys-Pro-Asn-Ser-Asn-Tyr-Phe-His-Ser-Asn-Thr-Thr-Ala-His-Ile-Gly-Ala-Phe-Gly-Glu-Lys
T5	His-Gly-Gly-Pro-Asn-Phe-Glu-Gln-Ile-Pro-Leu-Asn-Arg-Pro-Arg
T6 ¹	Asp-Gly-Ala-Gly-Gln-Met-Asn-Ile-Pro-Leu-Asp-Pro-Phe
T6 ²	Ala-Ser-Phe-Val-Trp-Glu-Glu-Thr-Gln-Glu- <u>Asn</u> Ala-Ala-Gly-Lys
T7	Gln-Ala-Asn-Glu-Thr-Val-Gly-Lys
T9	Phe-Ala-Val-Asp-Glu
T10	Gly-Ser-Asp-Ala-Leu-Glu-Ser-Gly-Gln-Ile-Glu-Ser-Ser-Arg
T11a	Glu-Val-Thr-Gln-Gly-Ile-Val-Pro-Leu-Val-Pro-Leu-Ile-Lys
T11	Phe-Val-Ala-Gln-Glu-Asp-Val-Pro-Leu-Thr-Ile-Leu-Gly-Lys
T13	Ala-Tyr-Ser-Pro-Asn-Thr-Glu-Asn-Lys
T15 ¹	Gly- <u>Ser</u> -Leu- <u>Ala</u> Thr-Ser-Ala-Gly-Pro-Arg
T17	Leu-Asp-Gly-Leu-Lys
T19	Thr-Gly-Val-Ala-Leu-Gly-Lys
T20	Phe-Glu-Thr-Ser-Asn-Val-Lys
T27	Phe-Gly-Phe-Asp-Leu-Leu-Asp-Pro-Thr-Lys
T28	Asn-Ala-Asp-Phe-Met-Arg
T29	Glu-Thr-Pro-Met-Phe-Thr-Arg
T32	Gln-Val-Leu- <u>Ser</u> Asp-Gly-Thr-Met-Ala-Met-Phe-Glu-Thr-Arg-Pro-Phe-Thr-Ser-Arg

Окончание таблицы

Пептид	Аминокислотная последовательность
T36	Met-Gln-Leu-Asn-Arg
T44	Phe-Asp-His-Glu-Arg
T47	His-Val-Asn-Gly-Phe-Gly-Val-His-Thr-Phe-Arg
T49	Phe-Leu-His-Pro-Arg
T50	Phe-His-Trp-Lys
T53	Gln-Gly-Val-Tyr-Thr-Gly-Ser-Asp-Lys
T56	Phe-Gln-Leu-Gln-Met-Asn-Val-Glu-Glu-Ile-Glu-Gly-Gln-Leu-Gln-Gln-Glu-Gly-Arg-Pro-Val-Gln-Ile-Leu-Leu-Asp-Ala-Phe-Arg
T56 ^{1a}	Phe-Gln-Leu-Gln-Met-Asn-Val-Glu-Glu-Ile-Glu-Asp-Gln-Leu-Gln-Gln-Glu-Gly-Arg
T56a	Phe-Gln-Leu-Gln-Met- $\frac{\text{Ser}}{\text{Asn}}$ $\frac{\text{Ala}}{\text{Val}}$ $\frac{\text{Asn}}{\text{Glu}}$ $\frac{\text{Val}}{\text{Glu}}$ -Ile-Glu-Gly-Gln-Leu-Gln-Gln-Glu-Gly-Arg-Pro-Val-Gln-Ile-Leu-Leu-Asp-Ala-Phe-Arg
T57	Asp-Ala-Ile-Leu-Gln-Pro-Thr- $\frac{\text{Leu}}{\text{Met}}$ -Ile-His-Ala-Gln- $\frac{\text{Lys}}{\text{Arg}}$ -Pro-Asn-Pro-Arg
T58	Ile-Ser-Asp-Asn-Leu-Ala-Thr-Arg
T62a	Thr-Gln-Gln-Phe-Leu-Ser-Gln-Phe-Tyr-Leu-Asn-Asp-Gln-Asp-Ala-Tyr-Leu-Thr-Ser-Asn-Val-Gly- $\frac{\text{Gly}}{\text{Ala}}$ -Pro- $\frac{\text{Ile}}{\text{Leu}}$ $\frac{\text{Gln}}{\text{Lys}}$ $\frac{\text{Asp}}{\text{Thr}}$ -Lys
T63	Trp-Asp-Phe-Phe-Ser-Gln-Gln-Pro-Ser-Val-Leu-His-Thr-Leu-(Leu, Trp)
T64	Ala-Asp-Gly-Ala-Phe-Asp-Ala-Lys
T65	Ala-Met-Ala-Gly-His-Gly-Ile-Pro-Arg
T66	Glu-Asp-Leu-Phe-Glu-Ser-Ile-Glu-Ala-Gly-Arg
T67	Ser-Val-Ser-Ser-Arg
T68	Leu-Phe-Trp-Asn-Ser-Leu-Val-Asn-Ala-Gln-Lys-
T69	Met-Phe-Ile-Val-Asp-Ala-Glu-Arg
T70	Asp-Asp-Val-Ile-Ile-Gln-Leu-Asn-Arg
T71	Leu-Gln-Val-Ala-Val-Ser-Ser-Asp-Gly-Val-Asp-Val-Val-Val-Val-Ala-Glu-Arg
T72	Ser-Pro-Glu-Thr-Thr-Phe-Lys
T73	Gln-Asn-Leu-Pro-Arg
T74	Ala-Val-Asp-Ala-Phe-Ala-Arg
T75	Phe-Pro-Glu-Trp-Glu-Leu- $\frac{\text{Gly}}{\text{Ala}}$ $\frac{\text{Val}}{\text{Tyr}}$ -Gln-Ile-Met- $\frac{\text{Ser}}{\text{Thr}}$ -Glu-Asp-Asp-Gln-Leu-Arg
Tn1	Asn-Ile-Glu- $\frac{\text{Asn}}{\text{Met}}$ -Leu-Phe- $\frac{\text{Ala}}{\text{Asn}}$ -Glu-Val- $\frac{\text{Glu}}{\text{Ile}}$ $\frac{\text{Gln}}{\text{Gly}}$ $\frac{\text{Val}}{\text{Ala}}$ -Met-Phe-Gln-Pro-Gly-(His, Ile, Val)-Arg

Arg-Pro-Val-Gln-Ile-Leu. Пептид T56Ch3 — состав: Asp, Ala, Leu, Phe, Arg, строение: Leu-Asp-Ala-Phe-Arg.

Пептид T56^{1a} (прежний пептид T56 [4]). В связи с тем, что состав этого пептида отличается от состава T56 (см. выше) отсутствием остатка пролина, мы провели повторные исследования строения пептида T56 [4]. На пептиде проведены 18 стадий

деградации. Очевидно, что пептид T56^{1a} представляет собой N-концевую часть пептида T56. Происхождение его можно объяснить микрогетерогенностью, когда остаток Pro в пептиде T56 замещен любым другим, что позволяет химотрипсину расщеплять связь Arg-X.

Пептид T56a. Новый пептид получен пептидным картированием. Его аминокислотный состав

отличается от состава пептида T56 наличием «примесей» остатков Ser и Ala в количестве 0,3 моля и пониженным содержанием Met (0,3 моля). На пептиде проведены 10 стадий деградации. Начиная с 6-й стадии, обнаруживались по два остатка аминокислот. Ранее нами получен короткий цистин-содержащий пептид [12]. Мы проверили его строение: Gln-Cys-Ser-Ala-Asn.

Можно предположить, что этот пептид входит в состав пептида T56, а пептид T56a представляет собой смесь двух пептидов T56 и T56a из одного участка полипептидной цепи каталазы, происхождение которых можно объяснить микрогетерогенностью. Вероятно, в пептиде T56a остаток Met замещен на остаток Cys и этот пептид на два остатка (Ser и Ala) длиннее основного пептида T56 (в нем допускается делеция этих двух остатков). Таким предположением можно объяснить появление двух остатков, начиная с 6-го положения, при деградации пептида T56a. (Предполагаемое строение этого участка полипептидной цепи см. ниже — пептид Tm41.)

Пептид T62a получен пептидным картированием. Состав: Asp₅, Thr₂, Ser₂, Glu₅, Pro, Gly₂, Ala, Val, Ile, Leu₃, Tyr₂, Phe₂, Lys. На пептиде проведена 21 стадия деградации. После расщепления химотрипсином высоковольтным электрофорезом были выделены следующие пептиды: T62Ch1 — состав: Asp, Glu, Pro, Gly₂, Val, Ile, Lys, строение:

Val-Gly- $\frac{\text{Gly}}{\text{Ala}}$ -Pro- $\frac{\text{Ile}}{\text{Leu}}$ - $\frac{\text{Gln}}{\text{Lys}}$ - $\frac{\text{Asp}}{\text{Thr}}$ -Lys; T62aCh2 —

строение: Val-Gly- $\frac{\text{Gly}}{\text{Ala}}$ -Pro-Leu и свободный Lys.

Исходя из полученных данных можно предположить, что T62a представляет собой смесь двух пептидов, происходящих из одного N-концевого участка вследствие микрогетерогенности каталазы с заменами Gly \leftrightarrow Ala, Ile \leftrightarrow Leu, Gln \leftrightarrow Lys и Asp \leftrightarrow Thr. Пептид занимает N-концевое положение в белке, поскольку пять стадий деградации каталазы выявили N-концевую последовательность белка Thr-Gln-Gln-Phe-Leu.

Пептид T63. Пептидным картированием получен новый пептид T32 с составом: Asp, Thr, Ser₂, Glu₂, Pro, Val, Leu₃, Phe₂, Trp(+), His. На пептиде проведены шесть стадий деградации по Эдману. Расщепляли химотрипсином. Высоковольтным электрофорезом выделены два пептида: T32Ch1 — состав: Ser₂, Glu₂, Pro, Val, Leu, строение: Ser-Gln-Gln-Pro-Ser-Val-Leu и T32Ch2 — строение: His-Thr-Leu.

Пептид Tn1. На пептиде повторно проведены 17 стадий деградации. На стадиях 4, 7, 10, 11 и 12 обнаружено по два остатка аминокислот. Сопостав-

ляя строение ранее опубликованного [13] фрагмента BrCN9 со строением пептида Tn1, можно предположить, что они происходят из одного участка полипептидной цепи каталазы как следствие ее микрогетерогенности.

Триптические пептиды модифицированной по остатку лизина каталазы. Полученную ранее смесь пептидов Tm40, Tm52, Tm53 [8] после окисления надмуравьиной кислотой подвергали хроматографии на HPLC. Были выделены два пептида: Tm1 и Tm41.

Пептид Tm1. Состав: Asp₅, Thr₃, Ser, Glu₅, Gly₃, Ala₃, Val₃, Met, Leu₃, Phe₃, Trp(+), His, Lys₆, Arg. На пептиде проведены 25 стадий деградации. Пептид Tm1 расщепляли трипсином, высоковольтным электрофорезом были выделены восемь пептидов. Аминокислотные составы семи из них были идентичны составам известных пептидов: T6², T22, T28, T37, T41, T42, T50 (строение этих пептидов приведено ранее [4] или в этом сообщении). В минорных количествах получен новый пептид, обозначенный нами T50a. Его строение: Thr-Pro-Trp-Lys. Мы полагаем, что этот пептид гомологичен T50 и происходит из одного и того же участка полипептидной цепи (микрогетерогенность). На основании вышеперечисленных данных строение пептида Tm1 можно записать следующим образом: Leu-Val-Thr-Asp-Asp-Gly-Lys-Thr-Lys-Leu-Val-Lys- $\frac{\text{Thr}}{\text{Phe}}$ - $\frac{\text{Pro}}{\text{His}}$ -Trp-Lys-Gly-Leu-Gln-Gly-Lys-Ala-

Ser-Phe-Val-Trp-Glu-Glu-Thr-Gln-Glu- $\frac{\text{Asn}}{\text{Ala}}$ -Ala-Gly-Lys-Asn-Ala-Asp-Phe-Met-Arg.

Пептиды Tm2² и Tm2³ дополнительно очищали хроматографией на HPLC. Состав пептида Tm2²: Asp₇, Thr₂, Ser₆, Glu₅, Pro₃, Gly₇, Ala₁₂, Val₉, Ile₃, Leu₆, Tyr, Phe₂, His₂, Lys₇, Arg. На пептиде проведены пять стадий деградации. Пептид Tm2² расщепляли трипсином. Высоковольтным электрофорезом были выделены только шесть пептидов, составы которых были идентичны пептидам T3, T17, T31, T38 и T71. Их строение описано ранее [4] или в настоящем сообщении (таблица). Для реконструкции пептида Tm2² был привлечен пептид Sp6 [14]. Схема реконструкции показана на рис. 1. Аминокислотный состав пептида Tm23 идентичен составу пептида T71, строение которого представлено в таблице.

Пептид Tm28. Частичное строение его приведено ранее [5]. Пептид расщепляли химотрипсином. Высоковольтным электрофорезом и хроматографией выделен и исследован только один положительно заряженный пептид Tm28Ch1. Его состав: Asp, Glu, Pro₂, Ala, Ile, His, Lys_{0,5}, Arg_{1,5}, строение:

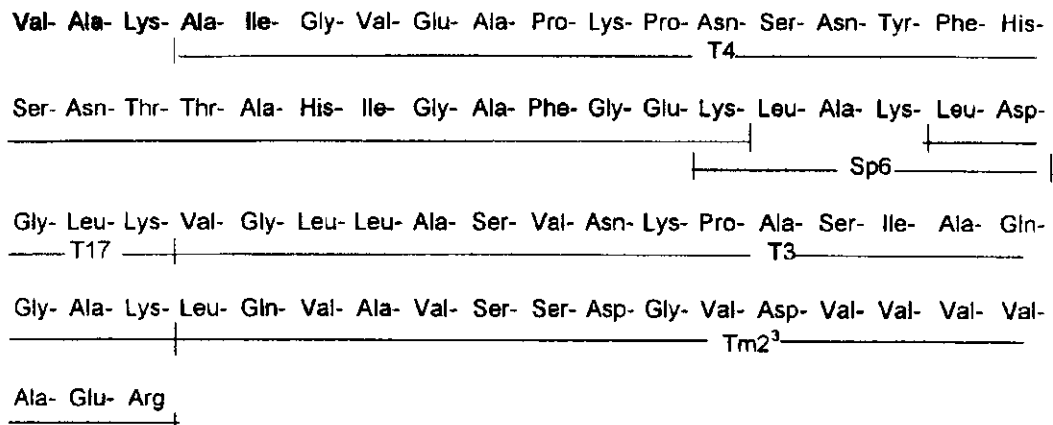
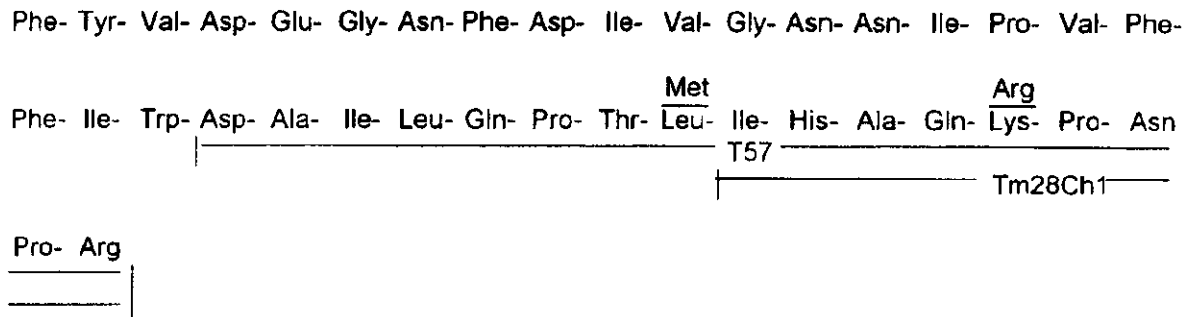
Рис. 1. Схема реконструкции пептида Tm2²

Рис. 2. Аминокислотная последовательность пептида Tm28 и схема реконструкции его С-концевого участка

Ile-His-Ala-Gln-^{Lys}Arg-Pro-(Asp, Pro)-Arg. Этот пептид представляет собой С-концевую часть пептида T57, строение которого приведено в таблице. Сопоставляя строение пептида T57 с частичным строением пептида Tm28, опубликованным ранее [5], можно сделать вывод о том, что пептид T57 входит в состав пептида Tm28. Реконструкция пептида Tm28 показана на рис. 2.

Пептиды Tm32, Tm33 и Tm34a. Их строение исследовали повторно. Tm32 — Asn-Asp-Asp-Asn-Val-Ser-His-Ala-Arg. Tm33 — Gly-Ala-Thr-Leu-Leu-Gln-Asp-Phe-Ile-Phe-Arg. Tm34a — Leu-Phe-Ser-Tyr-Pro-Asp-Ala-Gln-Gly-Asn-Arg.

Пептид Tm41. Состав: (CysSO₃H)_{0,4}, Asp₇, Thr, Ser₂, Glu₁₃, Pro, Gly₅, Ala₆, Val₄, Met₂, Ile₂, Leu₅, Tyr, Phe₄, Lys, Arg₂. На пептиде проведены 26 стадий деградации. Пептид расщепляли трипсином. Высоковольтным электрофорезом выделены два пептида (Tm41T1 и Tm41T2). Состав пептида Tm41T1 идентичен таковому пептида T1 (см. таб-

лицу). Состав пептида Tm41T2 отличался от состава пептида T56a (см. выше) только содержанием цистеиновой кислоты в количестве 0,3 моля. Строение пептидов T56 и T56a приведено в таблице. Совокупность всех данных позволяет выписать строение Tm41: Met-Phe-Gln-Thr-Phe-Ser-Ala-Ser-Asp-Ala-Val-Gln-Asn-Asp-Ala-Val-Val-Val-Ala-Asp-Gly-Gly-Glu-Asn-Leu-Tyr-Gly-Ala-Lys-Phe-Gln-Leu-Gln-^{Cys Ser Ala}Met-Asn-Val-Glu-

Glu-Ile-Glu-^{Asp}Gly-Gln-Leu-Cln-Gln-Glu-Gly-Arg-Pro-Val-Gln-Ile-Leu-Leu-Asp-Ala-Phe-Arg. Микрорегетерогенность в пептиде Tm41 записана на основании данных, приведенных в описании пептида T56a (см. выше).

Пептиды Tm42, Tm43 и Tm44 получены разделением фракции 4—6 (рис. 5) [8] высоковольтным электрофорезом и хроматографией на бумаге.

Пептид Tm42. Состав: Asp, Thr, Ser₄, Glu₃, Gly₅, Ala₂, Val, Ile, Leu₂, Phe, Lys₂, Arg. На пептиде проведены восемь стадий деградации. Пептид расщепляли трипсином. Высоковольтным электрофорезом на бумаге выделены три пептида, их аминокислотный состав идентичен составам пептидов T10, T19, и T47a, строение которых опубликовано ранее и в настоящем исследовании (таблица). На этом основании можно выписать строение пептида Tm42: Phe-Gly-Lys-Thr-Gly-Val-Ala-Leu-Gly-Lys-Gly-Ser-Asp-Ala-Leu-Glu-Ser-Gly-Gln-Ile-Glu-Ser-Ser-Arg.

Пептид Tm43. Состав: Asp₂, Thr, Ser, Glu, Gly₂, Ala₃, Val₂, Tyr, Phe, Lys, Arg. На пептиде проведены пять стадий деградации. После расщепления пептида трипсином высоковольтным электрофорезом были выделены два пептида с аминокислотными составами, идентичными составам пептидов T53 и T74, строение которых приведено в таблице. На этом основании выписывается строение пептида Tm43: Gln-Gly-Val-Tyr-Thr-Gly-Ser-Asp-Lys-Ala-Val-Asp-Ala-Phe-Ala-Arg.

Пептид Tm44. Состав: Asp, Thr₂, Ser, Glu, Pro, Ile, Lys, Arg. Строение: Asp-Ile-Lys-Ser-Pro-Glu-Thr-Thr-Arg. На основании совпадения аминокислотной последовательности Ser-Pro-Glu-Thr-Thr с N-концевой последовательностью пептида T72 (таблица) можно предположить, что пептиды Tm44 и T72 произошли из одного участка полипептидной цепи как следствие микрогетерогенности каталазы (замена Phe в T73 на Arg в Tm44).

Бромциановые фрагменты каталазы. Фрагмент BrCN-1 [9]. Строение установлено повторно: Asp-Val-Ile-Ile-Gln-Leu-Thr-Met.

Фрагмент BrCN-4 [13]. На фрагменте повторно провели 13 стадий деградации. На стадиях 4, 6—9, 11, 13 обнаружено по два остатка аминокислот. Фрагмент расщепляли трипсином. Высоковольтным электрофорезом выделены 11 пептидов. Аминокислотный состав восьми из них был идентичен пептидам T2, T15¹, T24, T26, Tm33, T44, T46, T54, строение которых опубликовано ранее [4, 5] или в настоящем сообщении (см. выше), а четыре пептида выделены с оригинальным составом.

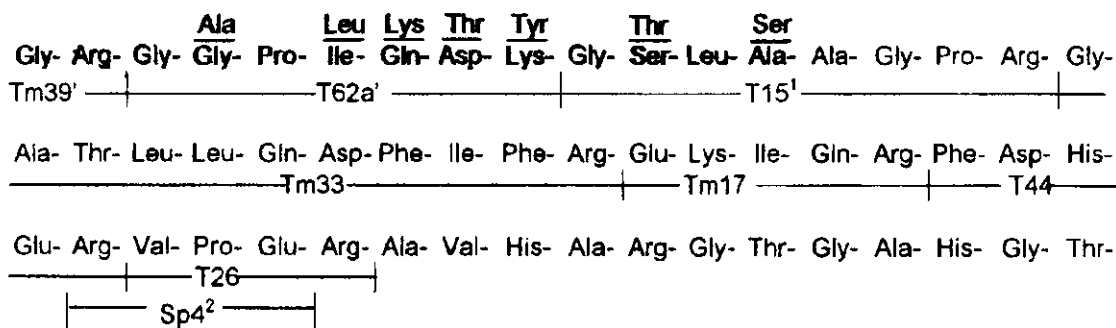
Пептид BrCN4T62a¹. Его состав и строение:

Gly- $\frac{\text{Gly}}{\text{Ala}}$ -(Pro, Ile_{0,5}, Leu_{0,5})-Lys. Из строения этого пептида очевидно, что он представляет собой часть пептида T62a (таблица).

Пептид BrCN4Tm39¹. Его строение: Gly-Arg. Пептид представляет собой C-концевую часть пептида Tm39 [5]. Очевидно, что пептиды T62a и Tm39 происходят из одного участка полипептидной цепи как следствие микрогетерогенности. Такое же происхождение фрагмента BrCN4.

Пептид BrCN4T29¹ с составом Thr, Glu, Pro, HSer, очевидно, занимает C-концевую часть BrCN4 и представляет собой N-концевую часть пептида T29 (таблица), его строение: Glu-Thr-Pro-Met.

Пептиды T24 и T46 составляют пептид Tm17 [5]. По сравнению с ранее опубликованной аминокислотной последовательностью BrCN-4 [13] в настоящем исследовании обнаружены два новых пептида T44 и Tm17, составляющих в сумме 10 остатков аминокислот. На это же количество аминокислот сократился пептид Tm33 (см. выше и



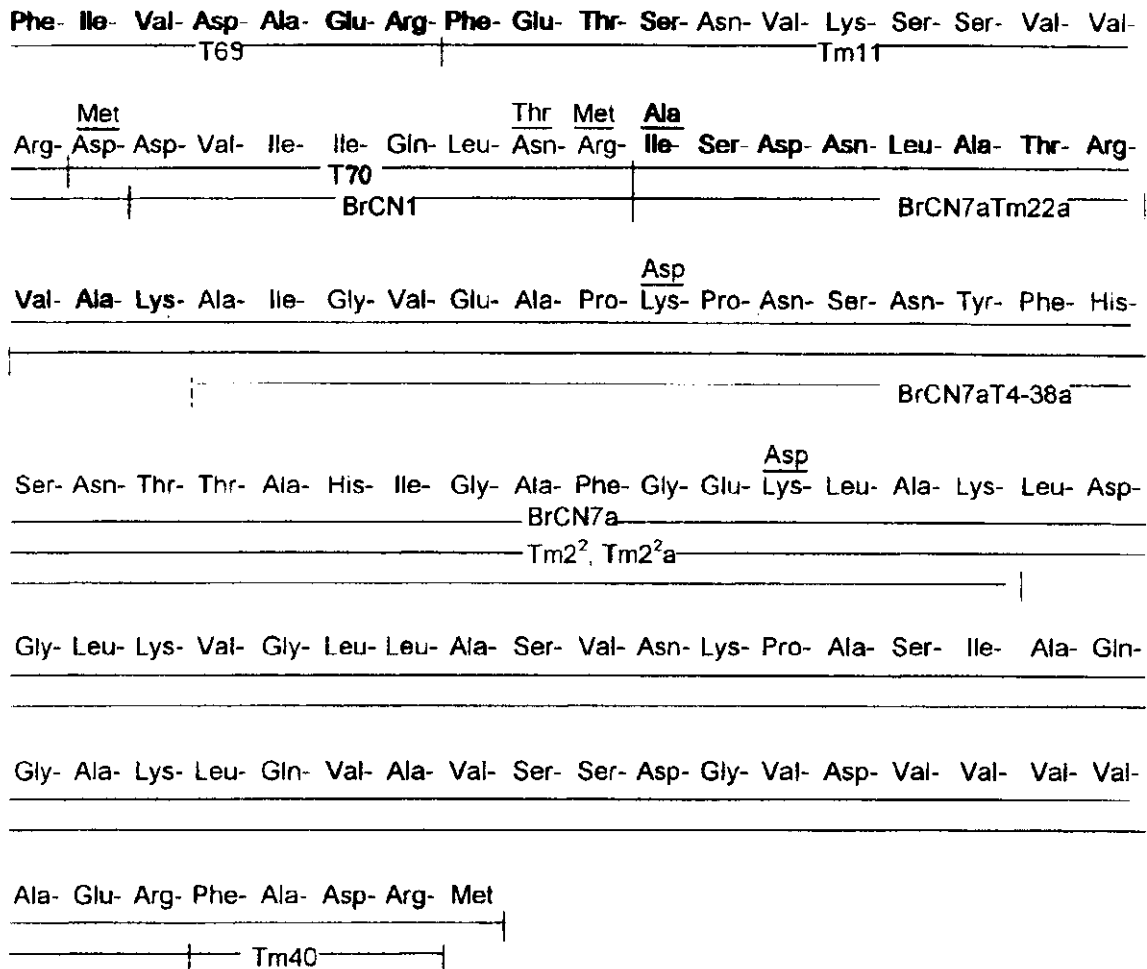


Рис. 4. Схема реконструкции фрагмента BrCN7

[5]). Очевидно, они локализируются на месте С-концевой части прежнего пептида Tm33. Используя пептид Sp42 с известным строением [14], можно реконструировать новую N-концевую последовательность BrCN4 (рис. 3).

Фрагменты BrCN7 и BrCN7a. Как было опубликовано ранее [13], структуру фрагмента BrCN7 исследовали на смеси BrCN6,7. Мы разделили эту смесь на FPLC и выделили фрагменты BrCN6, BrCN7 и BrCN7^{1a}. Аминокислотный состав BrCN6 был идентичен прежнему, BrCN7 отличался незначительно, а BrCN7a имел следующий состав: Asp₁₂, Thr₂, HSer, Glu₅, Pro₃, Gly₇, Ala₁₅, Val₁₉, Ile₃, Leu₇, Tyr, Phe₃, His₂, Lys₅, Arg₃. Этот состав очень близок по составу пептиду Tm2² (см. выше). По количеству он на 12 остатков больше. Качественно же он содержит больше на пять остатков Asp, на один остаток HSer, на три — Ala, один — Leu,

один — Phe, два — Arg и на два остатка Lys меньше. На фрагменте BrCN7a проведены 11 стадий деградации. На N-конце обнаружены два остатка — Ala, Ile. Фрагмент расщепляли трипсином и высоковольтным электрофорезом получены пять пептидов с аминокислотными составами, идентичными пептидам T3, T17, T31, T71 и Tm40, строение которых опубликовано ранее [4, 5] или в настоящем сообщении (см. выше). Кроме этого, были получены свободный HSer и новые пептиды BrCN7aTm22a и BrCN7aT4-38a.

Пептид BrCN7aTm22a. Состав: Asp₂, Thr, Ser, Ala_{1,5}, Ile_{0,5}, Leu, Arg, строение: $\frac{\text{Ala}}{\text{Ile}}\text{-Ser-Asp-Asn-Leu-Ala-Thr-Arg}$. Очевидно, что это смесь гомологичных пептидов, отличающихся N-концевыми остатками (микрорегетерогенность). Пептиды занимают N-концевое положение в BrCN7a.

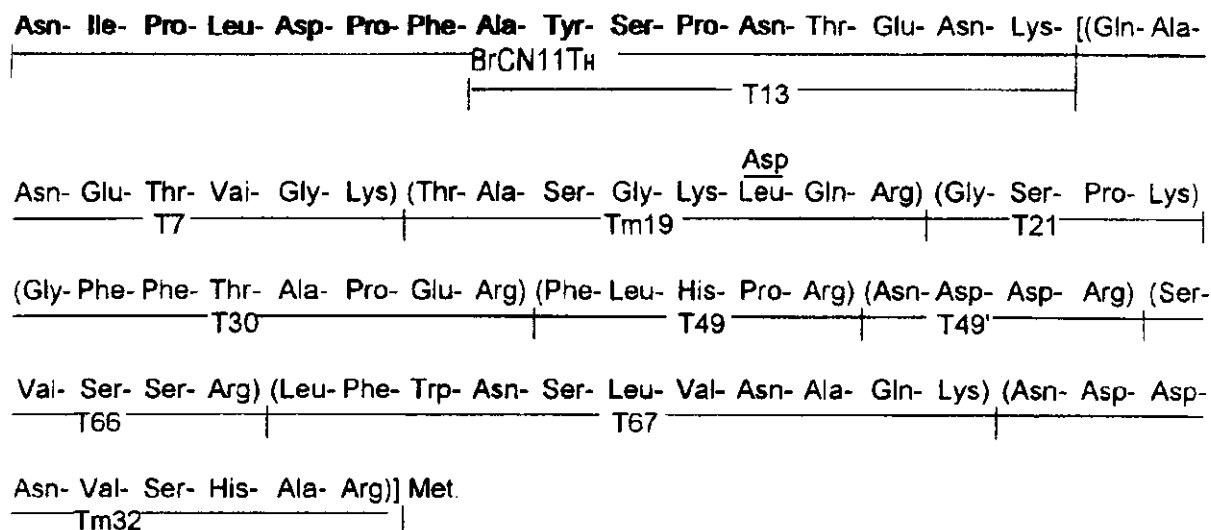


Рис. 5. Частичная аминокислотная последовательность фрагмента BrCN11. Схема реконструкции

Пептид BrCN7aT4-38a. Его состав: Asp₅, Thr₂, Ser₂, Glu₂, Pro₂, Gly₃, Ala₅, Val, Ile₂, Leu, Tyr, Phe₂, His₂, Lys. На N-конце этот пептид содержит Ala. Пептиды T3, T17, T31 и T71 входят в состав пептида Tm2². Отсюда следует, что последний входит в состав пептида BrCN7a. Однако в составе BrCN7a не обнаружены пептиды T4 и T38, входящие в состав Tm2². Но пептид BrCN7aT4-38a содержит по своему аминокислотному составу на два остатка Asp, а также по одному остатку Ala и Leu больше и на два остатка Lys меньше, чем сумма аминокислотных составов T4 и T38. Отсюда можно полагать, что новый пептид — это спаренный T4-T38 с заменой двух остатков Lys на остатки Asp, т. е. в состав фрагмента BrCN7a входит гомологичный пептид Tm2²a с этими заменами. Таким образом, фрагмент BrCN7a реконструируется из трех пептидов, расположенных последовательно Tm22a-Tm2²a-Tm40HSer. Ниже эта последовательность расписывается в составе фрагмента BrCN7.

На фрагменте BrCN7 проводили 11 стадий деградации. После расщепления фрагмента трипсином высоковольтным электрофорезом были выделены все пептиды, входящие, по данным аминокислотного состава, в состав пептида Tm2². Совершенно ясно, что в состав BrCN7 входит этот пептид (см. выше). Кроме этого, выделены еще четыре пептида, аминокислотные составы которых приведены ранее [4, 5] или же в этом сообщении (таблица). Получены также свободный HSer и

пептид BrCN7T69 с составом: Asp, Glu, Ala, Val, Ile, Phe, Arg и строением: Phe-Ile-Val-(Asp, Glu, Ala)-Arg. Этот пептид занимает N-концевое положение в BrCN7. Пептиды T20 и T33 входят в состав пептида Tm11 [5]. Интересно отметить, что аминокислотная последовательность фрагмента BrCN1 (см. выше) совпадает с таковой пептида T70 (таблица), у которого N-концевой остаток Asp и C-концевой Arg заменены на Met. Можно предположить, что фрагменты BrCN1, BrCN7 и BrCN7a произошли из одного участка полипептидной цепи вследствие микрогетерогенности каталазы. Схема реконструкции этого участка (фрагмент BrCN7) показана на рис. 4.

Фрагмент BrCN11. Новый фрагмент получен разделением фракции 1-Б-1 (рис. 2 [9]) с помощью ВЖХ. Аминокислотный состав фрагмента: Asp₁₁, Thr₄, Ser₈, Glu₆, Pro₅, Gly₄, Ala₆, Val₄, Ile, Leu₃, Tyr, Phe₄, Trp(+), His, Lys₅, Arg. На фрагменте проведены 12 стадий деградации. Фрагмент расщепляли трипсином и смесь пептидов разделяли высоковольтным электрофорезом. Получены девять пептидов, аминокислотные составы которых идентичны составам пептидов T7, T18, T21, T30, T45, T49, T66, T67, Tm32. Пептиды T18 и T45 входят в состав пептида Tm19 [5]. Пептид T49 получен со значительно более низким выходом, чем остальные. С таким же низким выходом получен новый пептид с составом: Asp₃, Arg (T49'). Строение перечисленных пептидов приведено ранее [4, 5] или в настоящем сообщении (таблица). Получен

также свободный HSer и новый пептид BrCN11Th с составом: Asp₄, Thr, Ser, Glu, Pro₃, Ala, Ile, Leu, Tyr, Phe, Lys. На пептиде проведены три стадии деградации — Asn-Ile-Pro. Из этого следует, что пептид занимает N-концевое положение во фрагменте BrCN11. Из N-концевой последовательности фрагмента следует, что в состав BrCN11 входит пептид T13 (таблица). На основании полученных данных можно выписать частичную аминокислотную последовательность (рис. 5). Заключенные в круглые скобки триптические пептиды расставлены внутри квадратной скобки в порядке увеличения их номера. Однозначно они могут быть локализованы только при сравнении аминокислотной последовательности BrCN11 с аминокислотной последовательностью соответствующего ему участка в «рентгеноструктурной» последовательности каталазы *P. vitale* (данные не опубликованы).

E. A. Kozlov, T. L. Levitina, M. T. Bobrovskaja, M. N. Ovander, L. V. Gudkova, N. V. Latyshko

Revision of tryptic peptides and cyanogen bromide fragments structure of *Penicillium vitale* catalase

Summary

Revision of amino acid sequence of unmodified and maleilate *Penicillium vitale* catalase tryptic and cyanogen bromide peptides was made.

E. A. Kozlov, T. L. Levitina, M. T. Bobrovskaja, M. N. Ovander, L. V. Gudkova, N. V. Latyshko

Ревізія структури триптичних пептидів і бромціанових фрагментів каталази гриба *Penicillium vitale*

Резюме

Повторно досліджено амінокислотну послідовність деяких раніше відомих, а також додатково одержаних триптичних пептидів немодифікованої та модифікованої за залишками лізину малеїновим ангідридом каталази гриба *P. vitale*. Перевірено амінокислотну послідовність двох раніше відомих бромціанових фрагментів та встановлено амінокислотну послідовність трьох виділених вперше фрагментів.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Козлов Э. А., Левитина Т. Л., Бобровская М. Т., Гудкова Л. В., Латышко Н. В., Радомский Н. Ф. Полная аминокислотная последовательность каталазы гриба *Penicillium vitale* // Биоорг. химия.—1998.—24, № 3.—С. 163—170.
2. Козлов Э. А., Левитина Т. Л., Бобровская М. Т., Гудкова Л. В., Радомский Н. Ф. Исследование первичной структуры каталазы гриба *Penicillium vitale*. 5. Реконструкция полипептидной цепи и сравнение ее с другими каталазами // Биополимеры и клетка.—1998.—14, № 4.—С. 320—331.
3. Vainshtein B. K., Melik-Adamyan W. R., Barinin V. V., Vagin A. A., Grebenko A. I., Borisov V. V., Bartels K. S., Fita J.,

Rossmann M. S. Three-dimensional structure of catalase from *Penicillium vitale* at 2.0 Å resolution // J. Mol. Biol.—1986.—188, N 4.—P. 49—61.

4. Гусак Н. М., Левитина Т. Л., Бобровская М. Т., Гудкова Л. В., Козлов Э. А. Выяснение первичной структуры каталазы гриба *Penicillium vitale*. 1. Триптические пептиды немодифицированной каталазы // Биополимеры и клетка.—1998.—14, № 1.—С. 62—67.
5. Левитина Т. Л., Гусак Н. М., Мирошниченко О. С., Бобровская М. Т., Гудкова Л. В., Латышко Н. В., Козлов Э. А. Исследование первичной структуры каталазы гриба *Penicillium vitale*. 2. Триптические пептиды модифицированной по остаткам лизина каталазы // Биополимеры и клетка.—1998.—14, № 2.—С. 105—110.
6. Козлов Э. А., Кириленко М. Т., Левитина Т. Л., Гудкова Л. В., Дегтярь Р. Г., Солодова Е. В. Триптические пептиды каталазы гриба *Penicillium vitale*. 1. Разделение и аминокислотный состав растворимых пептидов // Биополимеры и клетка.—1987.—3, № 5.—С. 240—245.
7. Кириленко М. Т., Левитина Т. Л., Гудкова Л. В., Дегтярь Р. Г., Козлов Э. А. Триптические пептиды каталазы гриба *Penicillium vitale*. 2. Разделение и аминокислотный состав нерастворимых пептидов // Биополимеры и клетка.—1988.—4, № 1.—С. 40—43.
8. Левитина Т. Л., Мирошниченко О. С., Гудкова Л. В., Бобровская М. Т., Латышко Н. В., Козлов Э. А. Триптические пептиды малеил-каталазы гриба *Penicillium vitale*. 1. Выделение и аминокислотный состав // Биополимеры и клетка.—1993.—9, № 2.—С. 3—8.
9. Левитина Т. Л., Гусак Н. М., Роднин Н. В., Кириленко М. Т., Мирошниченко О. С., Атепалихина С. А., Гудкова Л. В., Козлов Э. А. Бромциановые фрагменты каталазы гриба *Penicillium vitale* // Биополимеры и клетка.—1989.—5, № 5.—С. 55—63.
10. Пальчиковская Л. И., Левитина Т. Л., Бобровская М. Т., Овандер М. Н., Кацман М. С., Козлов Э. А. Ускоренный метод определения первичной структуры высокомолекулярных белков. Полная аминокислотная последовательность полиэдрина вируса ядерного полиэдроза (ВЯП) капустной совки, *Mamestra brassicae* // Биополимеры и клетка.—1993.—9, № 4.—С. 44—49.
11. Гусак Н. М., Овандер М. Н., Дробот Л. Б., Серебряный С. Б. Определение структуры пептидов комбинированным методом дансил-Эдман // Методы молекуляр. биологии.—Киев: Наук. думка, 1979.—С. 142—153.
12. Мирошниченко О. С., Левитина Т. Л., Бобровская М. Т., Козлов Э. А. Аминокислотная последовательность вокруг остатка цистеина каталазы гриба *Penicillium vitale* // Биополимеры и клетка.—1996.—12, № 5.—С. 46—49.
13. Бобровская М. Т., Роднин Н. В., Левитина Т. Л., Латышко Н. В., Гудкова Л. В., Козлов Э. А. Исследование первичной структуры каталазы гриба *Penicillium vitale*. 4. Бромциановые фрагменты // Биополимеры и клетка.—1998.—14, № 3.—С. 196—202.
14. Левитина Т. Л., Латышко Н. В., Бобровская М. Т., Гудкова Л. В., Козлов Э. А. Исследование первичной структуры каталазы гриба *Penicillium vitale*. 3. Пептиды, полученные расщеплением каталазы протеазой из *Staphylococcus aureus* V8 // Биополимеры и клетка.—1998.—14, № 3.—С. 191—195.

УДК 577.112.5

Надійшла до редакції 03.04.2000