

Исследование первичной структуры каталазы гриба *Penicillium vitale*.

4. Бромциановые фрагменты

М. Т. Бобровская, Н. В. Роднин, Т. Л. Левитина, Н. В. Латышко¹, Л. В. Гудкова¹,
Э. А. Козлов

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
252143, Киев, ул. Академика Заболотного, 150

¹ Институт биохимии им. А. В. Палладина НАН Украины
250030, Киев, ул. Леонтовича, 9

Изучено строение девяти бромциановых фрагментов каталазы гриба P. vitale, включающих в сумме 477 остатков аминокислот, что составляет 68 % длины полипептидной цепи каталазы.

Введение. Данная публикация из цикла статей под общим названием посвящена исследованию строения бромциановых фрагментов. Ранее нами опубликованы две работы, в которых описано разделение смеси бромциановых фрагментов, выделение некоторых фрагментов и выяснение строения двух из них [1, 2]. Обоснование публикации цикла статей, дополненных новыми данными, приведено в первом сообщении [3].

Материалы и методы. Расщепление каталазы бромцианом, разделение фрагментов и частичное изучение аминокислотной последовательности некоторых из них представлены ранее [1, 2].

Использованные в работе реагенты и условия проведения экспериментов (определение аминокислотного состава, N-концевых аминокислот и последовательности фрагментов и пептидов ручным методом Эдмана) описаны в статье [3].

Хроматографию на бумаге FN-17 («Filtrak», ФРГ) проводили в системе изоамиловый спирт : пиридин : вода (35 : 35 : 30).

Высоковольтный электрофорез осуществляли при pH 6,5 и 1,9, как в работе [1].

Фрагменты расщепляли трипсином и химо-

трипсином, как описано в сообщениях [4] и [3] соответственно.

Результаты и обсуждение. Из девяти рассматриваемых в данной статье фрагментов только два (BrCN3 и BrCN10) выделены заново. Для этой цели продукт расщепления каталазы бромцианом подвергали высоковольтному электрофорезу на бумаге при pH 6,5. Всю движущуюся к катоду фракцию элюировали и подвергали высоковольтному электрофорезу на бумаге при pH 1,9. Зону наиболее подвижных фрагментов элюировали и трижды хроматографировали на бумаге.

Ранее полученный [1] фрагмент BrCN5 и вновь выделенные фрагменты BrCN3 и BrCN10 расщепляли трипсином и триптические пептиды разделяли высоковольтным электрофорезом и хроматографией на бумаге.

Первые этапы исследования триптических и химотриптических пептидов, полученных при расщеплении соответствующими протеазами смеси фрагментов BrCN6,7, приведены в работах [1, 2]. Мы продолжили анализ строения триптических и химотриптических пептидов фрагмента BrCN7.

У всех триптических пептидов, полученных из фрагментов BrCN5—BrCN7 и BrCN10 определяли аминокислотные составы и N-концевые остатки. Для пептидов, не содержащих остатков лизина и

аргинина, но содержащих остатки гомосерина или лактона гомосерина (С-концевые пептиды фрагментов), проводили несколько стадий деградации по Эдману.

Сравнивая полученные данные с аминокислотной последовательностью триптических пептидов немодифицированной каталазы [3], мы определили Т-пептиды, входящие в состав соответствующих бромциановых фрагментов. Это дало возможность установить, какие триптические пептиды модифицированной каталазы (Тм-пептиды) с известным строением [4] входят во фрагменты. Для реконструкции аминокислотных последовательностей бромциановых фрагментов использовали пептиды, полученные расщеплением каталазы протеазой V8 из *Staphylococcus aureus*.

Строение этих пептидов приведено в предыдущем сообщении цикла [5]. Ниже обсуждаются детали реконструкции отдельных бромциановых фрагментов.

Фрагмент BrCN1. Asp-Val-Ile-Ile-Glu-Pro-Thr-Leu-Met. Сопоставляя строение этого пептида с таковым триптических пептидов [3, 4], можно видеть, что он входит в состав пептидов T57, Tm28 и частично перекрывается с пептидом Sp17 [5].

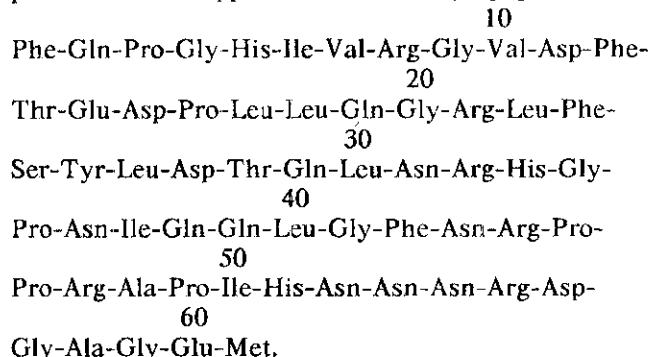
Фрагмент BrCN3. В состав этого фрагмента входят пептиды Tm18, Tm19, С-концевая часть пептида Tm39 и пептид Sp8_a. Схема реконструкции фрагмента представлена на рис. 1.

Фрагмент BrCN4. Этот фрагмент состоит из С-концевой части пептида Tm39 и пептидов Tm15, Tm33, Tm20, Tm26, Tm31, Tm5, N-концевой части Tm12, а также пептида Sp4. Схема реконструкции фрагмента представлена на рис. 2.

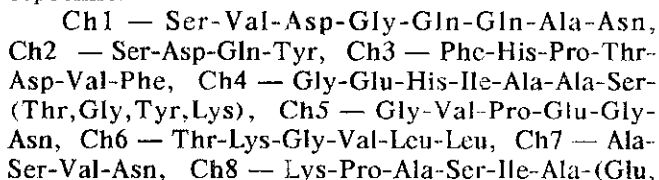
Фрагмент BrCN5. В состав этого фрагмента входят С-концевая часть пептидов T57, Tm28 и Sp17, пептиды Tm1, Tm3, Tm4, Tm22, T48, T49, T59, Sp3, Sp9, Sp10, Sp18 и N-концевая часть пептидов Tm9 и Sp11,11_a. Схема реконструкции фрагмента BrCN5 представлена на рис. 3. Аминокислотный состав реконструированной таким обра-

зом полипептидной цепи согласуется с таковым фрагмента BrCN5.

Фрагмент BrCN6. Строение его было выяснено ранее на смеси фрагментов BrCN6,7 [1]:



Фрагмент BrCN7. Первые результаты изучения строения этого фрагмента на смеси BrCN6,7 приведены ранее [2]. Мы продолжили его исследование. Аминокислотный состав этого фрагмента равен сумме аминокислотных составов триптических пептидов модифицированной каталазы [4] Tm2¹ (без N-концевого метионина) и Tm2² (без С-концевого аргинина). Так как BrCN7 содержит на N-конце остаток фенилаланина, ясно, что пептид Tm2¹ занимает N-концевое, а Tm2² — С-концевое положения в этом фрагменте. В состав BrCN7 входят пептиды немодифицированной каталазы [3] T1 (без N-концевого метионина), T3, T4, T31, T36, T53 и Sp19, Sp21, Sp28 (пептиды, полученные расщеплением каталазы протеиназой V8 [5]). Из химотриптического гидролизата смеси фрагментов BrCN6,7 выделены 10 пептидов, принадлежащих фрагменту BrCN7. Установлено их строение:



10

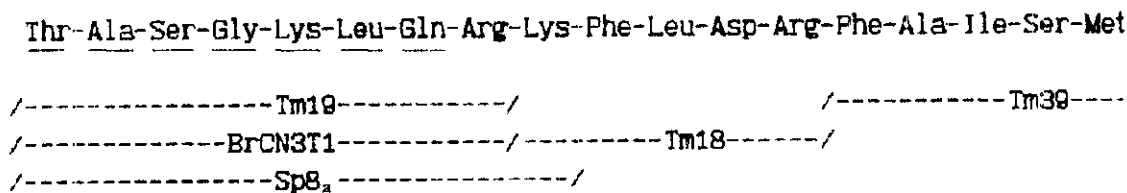


Рис. 1. Схема реконструкции фрагмента BrCN3. Здесь и на последующих рисунках подчеркнутые в последовательности остатки аминокислот обозначают стадии деградации по Эдману, пройденные на фрагменте

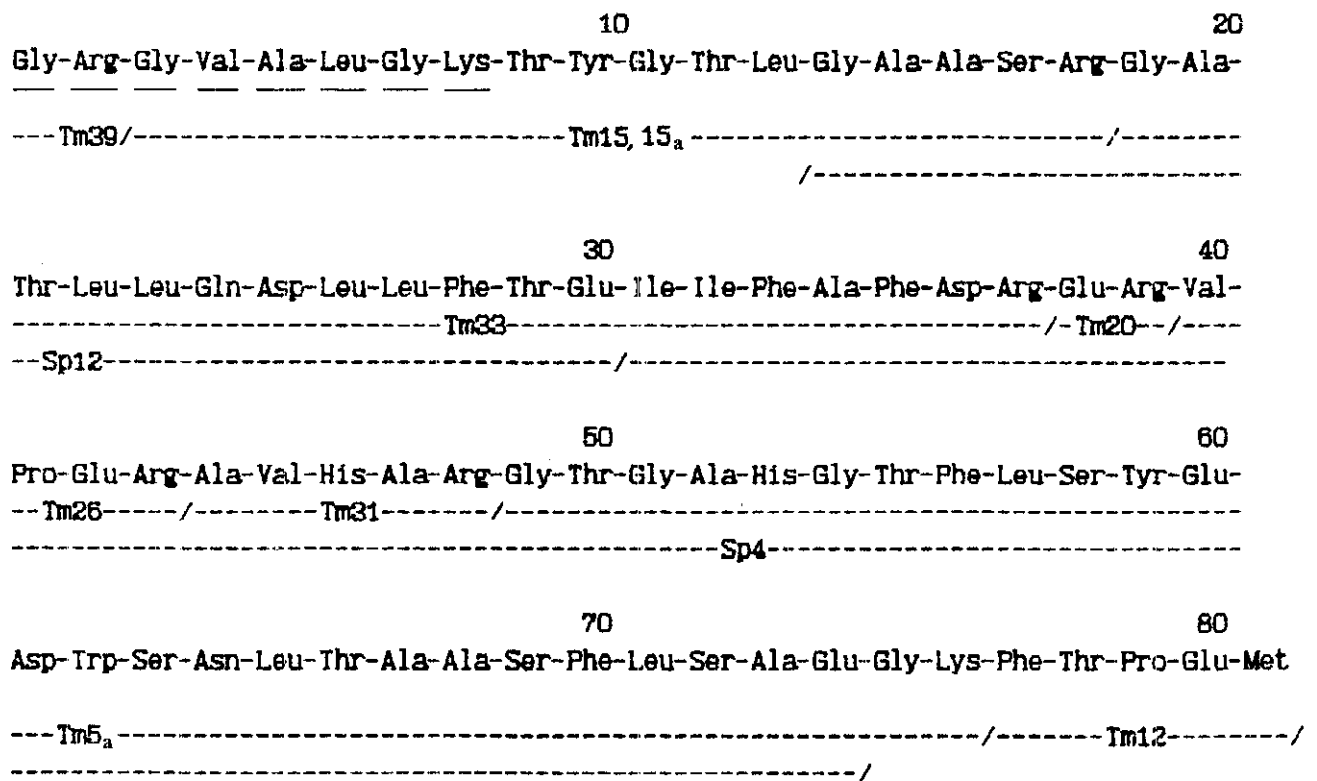


Рис. 2. Схема реконструкции фрагмента BrCN4

Gly, Ala, Leu, Lys), Ch9 — Ala-Glu-Phe-Phe, Ch10 — Ile-Ser-Ala-Lys-Gln-Leu.

Из сопоставления строения пептидов Ch1 и Ch2 с пептидами Sp19 и Sp21 [5] видно, что последние входят в состав фрагмента BrCN7. Схема реконструкции фрагмента BrCN7 представлена на рис. 4.

Сравнивая строение фрагмента BrCN7 с частичным строением пептида Tm2 [4], можно прийти к выводу о том, что фрагмент BrCN7 представляет собой N-концевую часть (без N-концевого метионина) фрагмента Tm2. С-концевую часть пептида Tm2 можно реконструировать по входящим в его состав пептидам T11, T17, T38, T55, Sp6 и Sp27 [3, 5].

Таким образом, фрагмент BrCN7 позволяет выписать полную аминокислотную последовательность пептида Tm2. Схема реконструкции полипептидной цепи Tm2 приведена на рис. 5. Из этого рисунка видно, что пептид Tm2 мог образоваться в результате неполного расщепления трипсином связи 113—114 (Arg-Glu) в каталазе, а пептид Sp6 —

вследствие расщепления с высоким выходом связи Leu-lys. Ранее отмечено расщепление с аналогичным выходом связи Leu-Gly [5].

Фрагмент BrCN8. Частичное строение этого фрагмента было установлено ранее [2]. Для выяснения полной аминокислотной последовательности на фрагменте пройдено 10 стадий деградации:

10
Gln-Val-Gly-Asn-Ile-Glu-Glu-Leu-Glu-Arg-
Phe-Gly-Phe-Asp-Leu-Pro-Asp-Leu-Thr-Asp-
 20
 Lys-Gln-Val-Asp-Leu-Ser-Ala-Met

Фрагмент BrCN9. Его строение: Leu-Phe-Asn-Glu-Val-Ile-Gly-Ala-Met.

Сопоставляя строение фрагмента BrCN9, а также N-концевой части фрагмента BrCN6 с частичным строением пептида Tn1 немодифицированной каталазы [3] или пептида Tm35 модифицированной каталазы [4], можно заключить, что BrCN9 полностью, а BrCN6 N-концевой частью входят в С-концевую часть пептида Tn1, а следовательно и пептида Tm35, что позволяет выписать

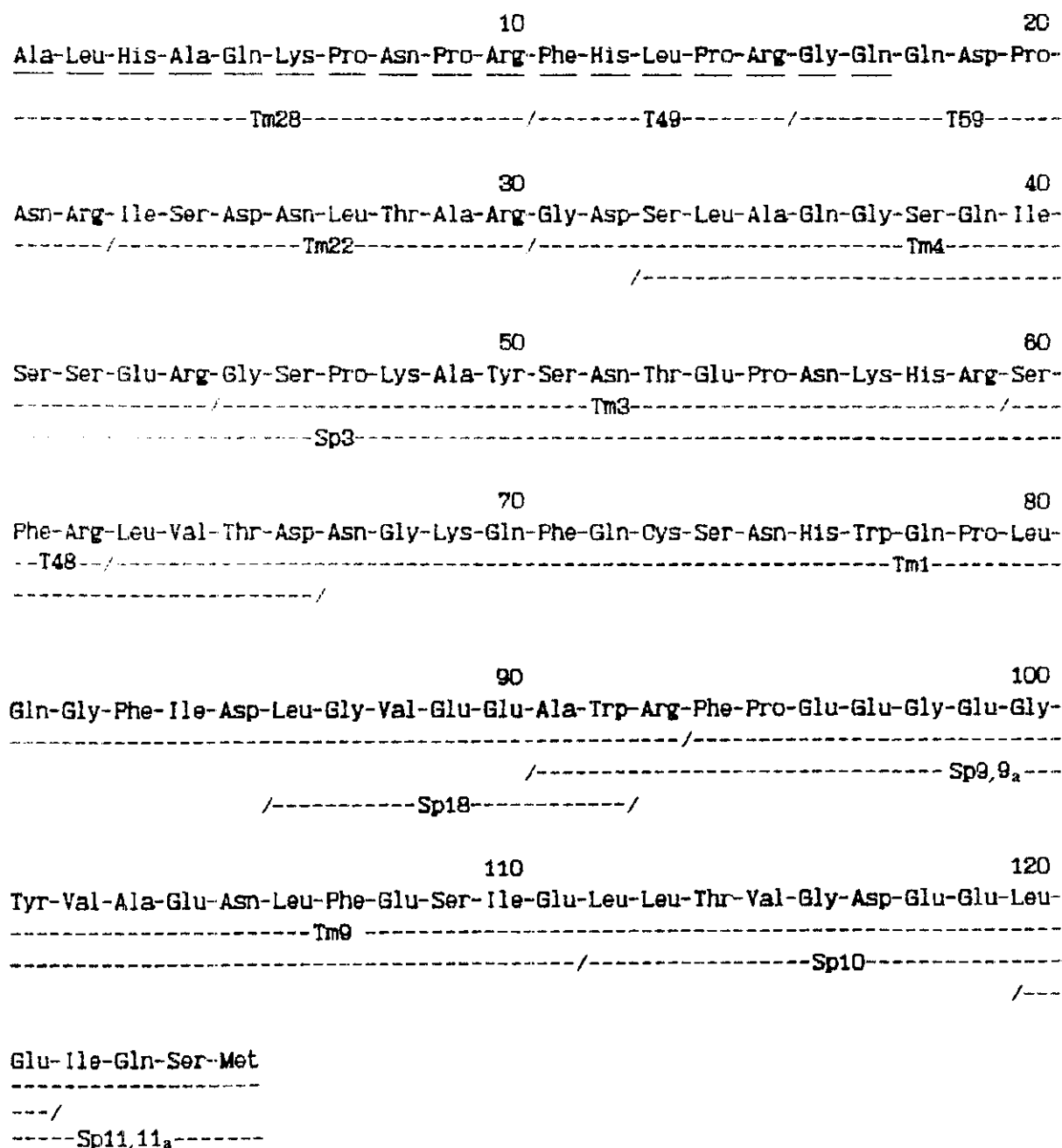


Рис. 3. Схема реконструкции фрагмента BrCN5

полную аминокислотную последовательность пептида Tm35 (рис. 6).

Фрагмент BrCN10. Этот фрагмент, по данным аминокислотного анализа (данные не приведены),

не содержит ни гомосерина, ни его лактона. Следовательно, можно полагать, что фрагмент BrCN10 занимает С-концевое положение в каталазе. В состав фрагмента входят: С-концевая часть пепти-

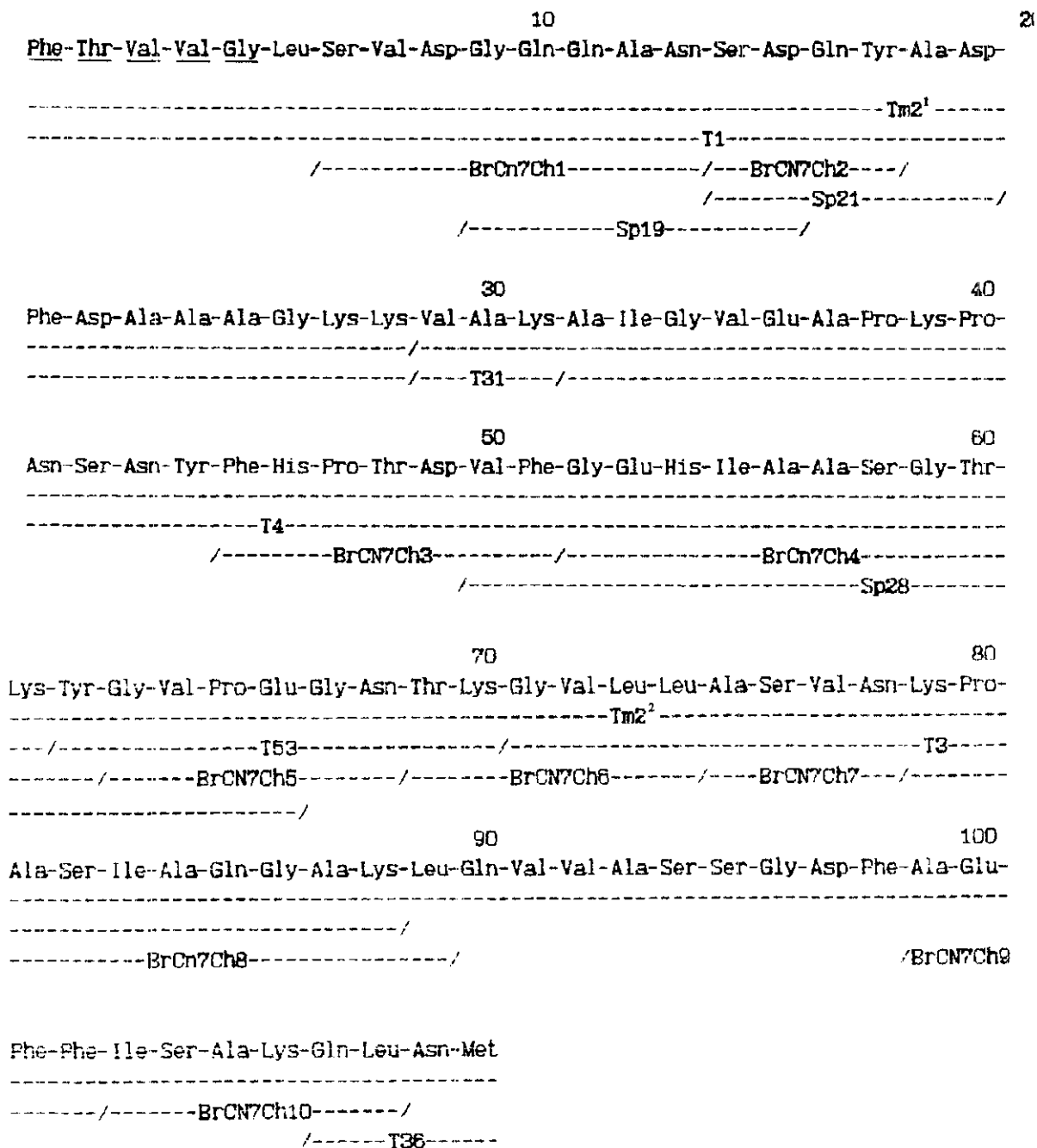


Рис. 4. Схема реконструкции фрагмента BrCN7

да T28, пептиды Tm7, Tm17, Tm37, Tm40. Схема реконструкции фрагмента BrCN10 представлена на рис. 7. Из этого рисунка видно, что пептид Tm7

может занимать во фрагменте BrCN10 только C-концевое положение. Аминокислотный состав реконструированной таким образом полипептидной

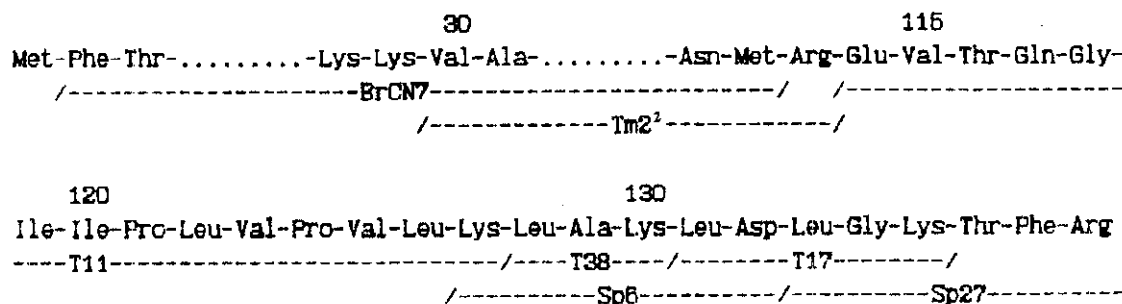


Рис. 5. Схема реконструкции фрагмента Tm2 [4]

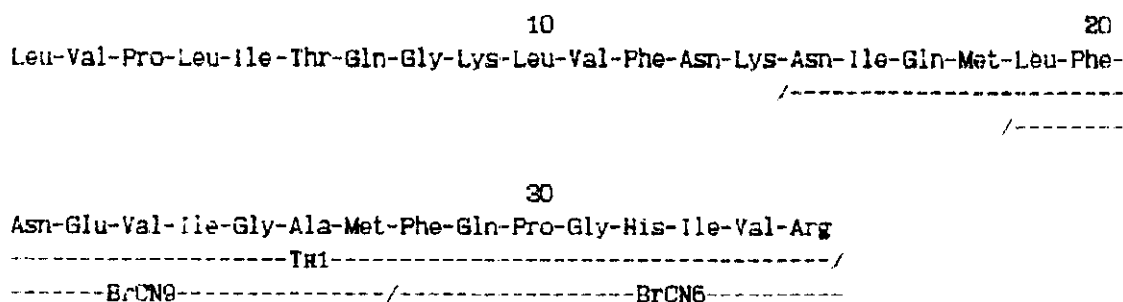


Рис. 6. Схема реконструкции фрагмента Tm35 [4]

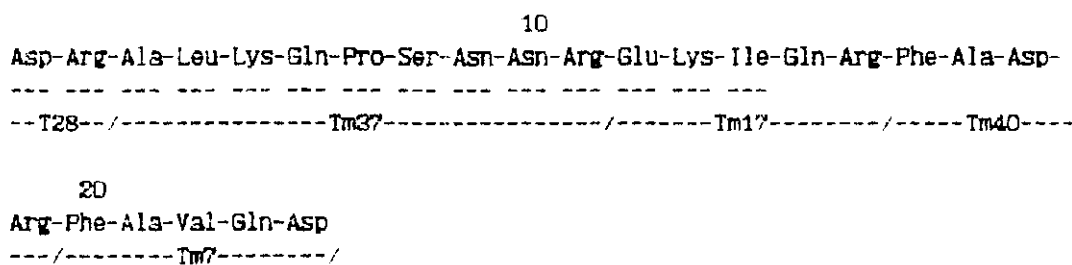


Рис. 7. Схема реконструкции фрагмента BrCN10

цепи соответствует аминокислотному составу фрагмента BrCN10.

Все девять бромциановых фрагментов содержат в сумме 477 остатков аминокислот, что составляет

68 % длины полипептидной цепи каталазы, которая, по данным для триптических пептидов немодифицированной и модифицированной каталазы [3, 4], включает 696 остатков аминокислот.

М. Т. Бобровська, М. В. Роднін, Т. Л. Левітіна, Н. В. Латишко,
Л. В. Гудкова, Е. А. Козлов

Дослідження первинної структури каталази гриба *Penicillium vitale*. 4. Бромціанові фрагменти

Резюме

Вивчено будову дев'яти бромціанових фрагментів каталази гриба *P. vitale*, які нараховують в сумі 477 залишків амінокислот. Це дорівнює 68 % довжини поліпептидного ланцюга каталази.

M. T. Bobrovskaya, N. V. Rodnin, T. L. Levitina, N. V. Latyshko,
L. V. Gudkova, E. A. Kozlov

Investigation of the primary structure of *Penicillium vitale* catalase.
4. Cyanogen bromide fragments

Summary

The amino acid sequence of 9 *Penicillium vitale* catalase cyanogen bromide fragments was studied. These fragments comprise 477 amino acid residues what makes up 68 % of the catalase polypeptide chain.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Левітіна Т. Л., Гусак Н. М., Роднін Н. В. и др. Бромціановые фрагменты каталазы гриба *Penicillium vitale* // Биополимеры и клетка.—1989.—5, № 5.—С. 55—64.
2. Козлов Э. А., Левітіна Т. Л., Бобровская М. Т. и др. Дополнительное исследование бромціановых фрагментов каталазы гриба *Penicillium vitale* // Там же.—1994.—10, № 2.—С. 45—48.
3. Гусак Н. М., Левітіна Т. Л., Бобровская М. Т. и др. Исследование первичной структуры каталазы гриба *Penicillium vitale*. 1. Триптические пептиды немодифицированной каталазы // Там же.—1997.—14, № 1.—С. 62—67.
4. Левітіна Т. Л., Гусак Н. М., Мирошниченко О. С. и др. Исследование первичной структуры каталазы гриба *Penicillium vitale*. 2. Триптические пептиды модифицированной по остаткам лизина каталазы // Там же.—№ 2.—С. 105—110.
5. Левітіна Т. Л., Латишко Н. В., Бобровская М. Т. и др. Исследование первичной структуры каталазы гриба *Penicillium vitale*. 3. Пептиды, полученные расщеплением каталазы протеиназой из *Staphylococcus aureus* V8 // Там же.—№ 3.—С. 191—195.

Поступила в редакцию 01.07.97