

Исследование первичной структуры каталазы гриба *Penicillium vitale*. 2. Триптические пептиды модифицированной по остаткам лизина каталазы

Т. Л. Левитина, Н. М. Гусак, О. С. Мирошниченко, М. Т. Бобровская, Л. В. Гудкова¹, Н. В. Латышко¹, 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
252030, Киев, ул. Леонтовича, 9

*Выяснено строение 63 триптических пептидов каталазы *P. vitale*, модифицированной по остаткам лизина малеиновым ангидридом. 40 пептидов содержат неперекрывающиеся аминокислотные последовательности, включающие 650 остатков аминокислот, что составляет 93 % длины полипептидной цепи, установленной согласно данным рентгеноструктурного анализа.*

Введение. Данное сообщение представляет собой очередное из серии под общим заголовком, определяющим конечную цель публикации, и посвящено выяснению строения триптических пептидов, полученных расщеплением трипсином каталазы *P. vitale*, модифицированной малеиновым ангидридом. Как следует из первого сообщения [1], все полученные триптические пептиды из немодифицированной каталазы могли перекрыть 84 % длины полипептидной цепи белка. Поэтому целью настоящего исследования было не только выяснение строения более крупных пептидов, но и получение ранее неизвестных триптических пептидов, необходимых для перекрытия всей полипептидной цепи. Сообщение, посвященное малеилированию, расщеплению малеил-каталазы трипсином, разделению на фракции и выделению индивидуальных пептидов [2], опубликовано ранее. Опубликована также работа по выяснению строения триптических пептидов из малеил-каталазы [3]. Цель дополненной и окончательной публикации по этому вопросу обоснована в первом сообщении цикла [1].

В настоящей статье не приведены данные по

получению новых или дополнительной очистке ранее изученных фракций и Тm-пептидов, поскольку использованные при этом методы неоднократно нами описаны [4].

Материалы и методы. Малеилирование каталазы, расщепление трипсином, снятие защитных групп и разделение пептидов описаны ранее [2]. Использованные в работе реагенты и условия некоторых экспериментов (высоковольтный электрофорез, определение аминокислотного состава и N-концевой последовательности пептидов) приведены в предыдущем сообщении [1].

Пептиды, содержащие остатки лизина, расщепляли трипсином («Serva», Германия) в 0,2 н. бикарбонате аммония, pH 8,0, при 37 °C в течение 4 ч.

Результаты и обсуждение. В таблице приведены результаты исследований строения Тm-пептидов, полученные в данной и предыдущих работах. Пептиды, в которых не подчеркнуты стадии деградации, опубликованы ранее [3]. Подчеркнутые пептиды — новые или требовавшие коррекции. Общая стратегия выяснения строения Тm-пептидов следующая. N-концевую аминокислотную последовательность всех пептидов выясняли ручным методом Эдмана (до 10 стадий) и с помощью секвенатора (более 10 стадий). Пептиды, содержащие ос-

© Т. Л. ЛЕВИТИНА, Н. М. ГУСАК, О. С. МИРОШНИЧЕНКО,
М. Т. БОБРОВСКАЯ, Л. В. ГУДКОВА, Н. В. ЛАТЫШКО,
Э. А. КОЗЛОВ, 1998

Строение триптических пептидов малеил-каталазы *P. vitale*

№ п/п	Пептид	Строение	T-пептид [1]
1	Tm1	<u>Leu-Val-Thr-Asp-Asn-Gly-Lys-Gln-Phe-Gln-Cys-Ser-Asn-His-Trp-Gln-Pro-Leu-</u> <u>Gln-Gly-Phe-Ile-Asp-Leu-Gly-</u> (Glu ₂ ,Ala,Val,Trp)-Arg	T37, Tн2-1, Tн2-1 ¹
2	Tm1 ¹	<u>Leu-Val-Thr-Asp-Asn-Gly-Lys</u>	T37
3	Tm1 ²	<u>Gln-Phe-Gln-Cys-Ser-Asn-His-Trp-Arg-Pro-Leu-Gln-Gly-Phe-Ile-Asp-Leu-Gly-</u> (Glu ₂ ,Ala,Val,Trp)-Arg	Tн2-1
4	Tm2	<u>Met-Phe-Thr-Val-Val-Gly-Leu-Ser-Val-Asp-</u> (Asp ₂ ,Ser,Glu ₃ ,Gly,Ala-Val-Tyr)- Ala-Asp-Phe-Asp-Ala-Ala-Ala-Gly-Lys-Lys (Asp ₇ ,Thr ₄ ,Ser ₇ ,Glu ₁₀ ,Pro ₇ ,Gly ₁₁ , Ala ₁₃ ,Val ₁₁ ,Met,Ile ₆ ,Leu ₈ ,Tyr ₂ ,Phe ₅ ,His ₂ ,Lys ₁₀ ,Arg)-Thr-Phe-Arg	T1, T60, T31, T4, T53, T3, T62, T36, T11, T38, T17, T55
5	Tm2 ¹	<u>Met-Phe-Thr-Val-Val-Gly-Leu-Ser-Val-Asp-</u> (Asp ₂ ,Ser,Glu ₃ ,Gly,Ala,Val,Tyr)-Ala- Asp-Phe-Asp-Ala-Ala-Ala-Gly-Lys-Lys	T1
6	Tm2 ²	<u>Val-Ala-Lys-Ala-Ile-Gly-Val-Glu-Ala-Pro-Lys-Pro-Asn-Ser-Asn-Tyr-Phe-His-Pro-</u> <u>Thr-Asp-Val-</u> (Asp ₂ ,Thr ₂ ,Ser ₃ ,Glu ₃ ,Pro ₂ ,Gly ₆ ,Ala ₆ ,Val ₃ ,Ile ₂ ,Leu ₂ ,Tyr,Phe,His, Lys ₄)-Leu-Gln-Val-Val-Ala-Ser-Ser-Gly-Asp-Phe-(Ser,Glu,Ala ₂ ,Ile,Phe ₂)-Lys- Gln-Leu-Asn-Met-Arg	T31, T4, T53, T3, T36, T62
7	Tm2 ³	<u>Leu-Gln-Val-Val-Ala-Ser-Ser-Gly-Asp-Phe-</u> (Ser,Glu,Ala ₂ ,Ile,Phe ₂)-Lys-Gln-Leu- Asn-Met-Arg	T62, T36
8	Tm3	<u>Gly-Ser-Pro-Lys-Ala-Tyr-Ser-Asn-Thr-Glu-Pro-Asn-Lys-His-Arg</u>	T13, T21, T40
9	Tm3 ¹	<u>Gly-Ser-Pro-Lys-Ala-Tyr-Ser-Asn-Thr-Glu-Pro-Asn-Lys</u>	T13, T21
10	Tm4	<u>Gly-Asp-Ser-Leu-Ala-Gln-Gly-Ser-Gln-Ile-Ser-Ser-Glu-Arg</u>	T10
11	Tm5 _a	<u>Gly-Thr-Gly-Ala-His-Gly-Thr-Phe-Leu-Ser-Tyr-Glu-Asp-Trp-Ser-Asn-Leu-Thr-</u> Ala-Ala-Ser-Phe-Leu-Ser-Ala-Glu-Gly-Lys	T2
12	Tm6	<u>Gly-Val-Asp-Phe-Thr-Glu-Asp-Pro-Leu-Leu-Gln-Gly-Arg</u>	T8
13	Tm7	<u>Phe-Ala-Val-Gln-Asp</u>	T9
14	Tm8	<u>Gly-Phe-Phe-Thr-Ala-Pro-Glu-Arg</u>	T30
15	Tm9	<u>Phe-Pro-Glu-Glu-Gly-Glu-Gly-Tyr-Val-Ala-Glu-Asn-Leu-Phe-Glu-Ser-Ile-Glu-</u> Leu-Leu-Thr-Val-Gly-Asp-Glu-Glu- (Glu ₂ ,Ile,Leu)-Ser-Met-Ser-Phe-Asn-Asn-Asp- Leu-Arg-Glu-Arg	Tн3
16	Tm9 _a ¹	<u>Phe-Pro-Glu-Glu-Gly-Glu-Ser-Val-Lys</u>	Tн3 _a ¹
17	Tm10	<u>Asp-Gly-Ala-Gly-Glu-Met-Ile-Asp-Leu-Pro-Pro-Phe-Ala-Ser-Phe-Val-Glu-Thr-</u> Gln-Glu-Trp-Gly-Ala-Lys	T6
18	Tm10 ¹	<u>Asp-Gly-Ala-Gly-Glu-Met-Ile-Asp-Leu-Pro-Pro-Phe</u>	T6 ¹
19	Tm10 ²	<u>Ala-Ser-Phe-Val-Glu-Thr-Gln-Glu-Trp-Gly-Ala-Lys</u>	T6 ²
20	Tm10 ³	<u>Asp-Gly-Ala-Gly-Glu-Met</u>	—
21	Tm11	<u>Phe-Asn-Ser-Ser-Glu-Val-Thr-Lys-Ser-Ser-Val-Val-Arg</u>	T20, T33
22	Tm11 ¹	<u>Phe-Asn-Ser-Ser-Glu-Val-Thr-Lys</u>	T20
23	Tm11 ²	<u>Ser-Ser-Val-Val-Arg</u>	T33

Продолжение таблицы

№ п/п	Пептид	Строение	T-пептид [1]
24	Tm12	<u>Phe-Thr-Pro-Glu-Met-Thr-Arg</u>	T29
25	Tm13 _a	<u>Gln-Thr-Ala-Val-Gly-Ser-Asn-Lys</u>	T7
26	Tm14	<u>Phe-Gln-Leu-Met-Gln-Val-Gly-Asn-Ile-Glu-Glu-Leu-Glu-Arg</u>	T56
27	Tm15,15 _a	<u>Gly-Val-Ala-Leu-Gly-Lys-Thr-Tyr-Gly-Thr-Leu-Gly-Ala-Ala-Ser-Arg</u>	T15, T19
28	Tm15 ¹	<u>Thr-Val-Gly-Thr-Leu-Gly-Ala-Gly-Ser-Arg</u>	T15
29	Tm15 _a ¹	<u>Thr-Tyr-Gly-Pro-Leu-Gly-Ala-Ala-Ser-Arg</u>	T15
30	Tm16 _a	<u>Phe-Ser-Thr-Val-Gln-Gly-Thr-Arg</u>	T34
31	Tm17	<u>Glu-Lys-Ile-Gln-Arg</u>	T24, T46
32	Tm18	<u>Lys-Phe-Leu-Asp-Arg</u>	T43, T60
33	Tm18 ¹	<u>Phe-Leu-Asp-Arg</u>	T43
34	Tm19	<u>Thr-Ala-Ser-Gly-Lys-Leu-Gln-Arg</u>	T18, T45
35	Tm19 _a	<u>Thr-Ala-Ser-Gly-Lys-Asp-Gln-Arg</u>	T18, T63
36	Tm20	<u>Glu-Arg</u>	T64
37	Tm21	<u>Gly-Ser-Ala-Asp-Thr-Ala-Arg</u>	T12
38	Tm22	<u>Ile-Ser-Asp-Asn-Leu-Thr-Ala-Arg</u>	T58
39	Tm23	<u>Ala-Pro-Ile-His-Asn-Asn-Asn-Arg</u>	T23
40	Tm23 _a ¹	<u>Ala-Arg</u>	T23 _a ¹
41	Tm23 ²	<u>Ile-His-Asn-Asn-Asn-Arg</u>	T23 ²
42	Tm24	<u>His-Gly-Pro-Asn-Ile-Gln-Gln-Leu-Gly-Phe-Asn-Arg-Pro-Pro-Arg</u>	T5
43	Tm24 _a ¹	<u>His-Gly-Pro-Asn-Phe-Arg</u>	—
44	Tm25	<u>Phe-Asp-Gln-Glu-His-Arg</u>	T44
45	Tm26	<u>Val-Pro-Glu-Arg</u>	T26
46	Tm27	<u>Phe-Gly-Phe-Asp-Leu-Pro-Asp-Leu-Thr-Asp-Lys</u>	T27
47	Tm28	<u>Phe-Tyr-Val-Asp-Glu-Gly-Asn-Phe-Asp-Ile-Val-Gly-Asn-Asn-Ile-Pro-Val-Phe- Phe-Ile-Trp-Asp-Val-Ile-Ile-Glu-Pro-Thr-Leu-Met-Ala-Leu-His-(Asp,Glu,Pro₂, Ala,Lys,Arg)</u>	T65, T57
48	Tm29	<u>Val-Ala-Ala-Phe-Asp-Arg</u>	T66
49	Tm30	<u>Asp-Val-His-Gly-Phe-Ala-Thr-Arg</u>	T39
50	Tm31	<u>Ala-Val-His-Ala-Arg</u>	T54
51	Tm32	<u>Asn-Asp-Asp-Asn-Val-Thr-His-Ala-Arg</u>	T67
52	Tm33	<u>Gly-Ala-Thr-Leu-Leu-Gln-Asp-Leu-Leu-Phe-Thr-Glu-Ile-Ile-(Asp,Ala,Phe₂)-Arg</u>	T68
53	Tm34	<u>Leu-Phe-Ser-Tyr-Leu-Asp-Thr-Gln-Leu-Asn-Arg</u>	T35
54	Tm34 _a	<u>Leu-Phe-Ser-Ala-Pro-Asp-Thr-Gln-Gly-Asn-Arg</u>	T35
55	Tm35	<u>Leu-Val-Pro-Leu-Ile-Thr-Gln-Gly-Lys-Leu-Val-Phe-Asn-Lys-Asn-Ile-Gln-Met- Leu-Phe-Asn-Glu-Val-Ile-(Glu,Pro,Gly₂,Ala,Val,Met,Ile,Phe,His)-Arg</u>	T69, T70, Tm1
56	Tm35 ¹	<u>Leu-Val-Pro-Leu-Ile-(Thr,Gly,Gln)-Lys</u>	T69
57	Tm35 ²	<u>Leu-Val-Phe-Asn-Lys-Asn-Ile-Gln-Met-Leu-Phe-Asn-Glu-Val-Ile- (Glu,Pro,Gly₂,Ala,Val,Met,Ile,Phe,His)-Arg</u>	Tm1, T70
58	Tm36	<u>Ala-Ala-Gln-Phe-Glu-Gln-Gly-Lys-Thr-Lys-Leu-Val-Lys-Gly-Leu-Gln-Gly-Lys- Asn-Ala-Phe-Met-Asp-Arg</u>	T22, T28, T41, T42, T52

Окончание таблицы

№ п/п	Пептид	Строение	T-пептид [1]
59	Tm37	<u>Ala-Leu-Lys-Gln</u> -Pro-Ser-Asn-Asn-Arg	T25, T71
60	Tm37 ¹	<u>Gln-Pro-Ser-Asn-Asn</u> -Arg	T71
61	Tm38a	<u>Phe-His-Leu-Pro-Asp-Gly-Gln-Gln-Asp-Pro-Asn</u> -Arg	T49, T59
62	Tm39	<u>Phe-Ala-Ile-Ser-Met-Gly</u> -Arg	T72
63	Tm40	<u>Phe-Ala-Asp</u> -Arg	T73

татки лизина, расщепляли трипсином и триптические гидролизаты разделяли высоковольтным электрофорезом и хроматографией на бумаге. У триптических пептидов, полученных из Tm-пептидов, определяли N-концевые остатки и аминокислотные составы (данные не приведены). По этим показателям отыскивали аналоги среди известных T-пептидов немодифицированной каталазы [5]. В таблице в 4-й колонке указаны T-пептиды, аналогичные триптическим пептидам, полученным из Tm. Строение этих пептидов не исследовалось. Исследовали строение только тех триптических пептидов из Tm, аналогов которым не было найдено среди T-пептидов немодифицированной каталазы. Эти новые T-пептиды в 4-й колонке таблицы подчеркнуты. Данные по исследованию их строения приводятся ниже при обсуждении индивидуальных Tm-пептидов. Принцип обозначения Tm-пептидов тот же, что и для T-пептидов немодифицированной каталазы [6].

Пептиды Tm1. Смесь пептидов Tm40, Tm52, Tm53 [5], ранее полученную из нерастворимого материала триптического гидролизата малеил-каталазы, окисляли и разделяли высоковольтным электрофорезом и хроматографией на бумаге. Выделены два цистеинсодержащих пептида Tm1 и Tm1_a² с составами: Tm1 — CysSO₃H, Asp₄, Thr, Ser, Glu₆, Pro, Gly₃, Ala, Val₂, Ile, Leu₃, Phe₂, Trp(+), His, Lys, Arg; Tm1_a² — CysSO₃H, Asp₂, Ser, Glu₅, Pro, Gly₂, Ala, Val, Ile, Leu₂, Phe₂, Trp(+), His, Arg₂. На пептиде Tm1_a² N-концевую последовательность определяли ручным методом Дансил-Эдман, поэтому на восьмой стадии остаток триптофана идентифицирован не был. Из сопоставления N-концевых последовательностей Tm1 и Tm1_a² видно, что второй пептид образовался из первого вследствие расщепления связи Lys-Gln. Очевидно,

в этом и других случаях (см. таблицу) образование Tm-пептидов с C-концевым остатком лизина можно объяснить неполнотой малселирования каталазы.

Сравнивая N-концевые последовательности Tm1 и Tm1_a², можно видеть, что остаток глутамина в Tm1 (положение 16) заменен в Tm1_a² на остаток аргинина (положение 9). Эта замена подтверждается и сопоставлением пептидов Tm1_a² и Tm2-1¹ [1]. В сообщении [1] уже обсуждалась возможная причина появления гомологичных пептидов с аминокислотными заменами (обозначены буквой «а») после расщепления каталазы трипсином и протеиназой из *Staphylococcus aureus* V8. Можно только добавить, что препараты каталазы выделяли из культуральной среды, получаемой каждый раз заново. По-видимому, этим можно объяснить появление гомологичных пептидов в разных типах протеолиза. Например, пептиды T2 [1] и Tm5 отличаются единственной заменой валина на лейцин в положении 17.

Пептиды Tm2. После расщепления трипсином Tm2, Tm2², Tm2³ был выделен триптический пептид, не имеющий аналогов среди T-пептидов немодифицированной каталазы [1]: T62 — Leu-(Asp, Ser₃, Glu₂, Gly, Ala₃, Val₂, Ile, Phe₃)-Lys. Сопоставляя состав триптических пептидов, полученных из Tm2² и Tm2³ (таблица, колонка 4), можно предположить, что пептид Tm2³ занимает C-концевое положение в пептиде Tm2². Таким же путем можно прийти к заключению, что пептид Tm2² входит во вторую скобку пептида Tm2. Поскольку в состав пептида Tm2 входят два аргининсодержащих пептида T55 и T62, а последний входит в Tm2³, то мы предположили, что пептид T55 (Phe-Thr-Arg [1]) занимает C-концевое положение в Tm2. Это предположение подтверждается исследованием пепти-

дов, полученных расщеплением каталазы протеиназой V8. Из N-концевых последовательностей Tm2 и Tm2¹ ясно, что Tm2¹ занимает N-концевое положение в Tm2.

Пептиды Tm9. Аминокислотная последовательность Tm9 реконструируется из совокупности данных по его секвенированию и пептидов, полученных при расщеплении химотрипсином пептида Tn3 [1]. Такая реконструкция подтверждается исследованием пептидов, полученных в результате расщепления каталазы протеиназой V8. Из сопоставления строения пептидов Tm9 и Tm9^a следует, что второй гомологичен N-концевой последовательности первого и имеет три замены остатков: глицина на серин, тирозина на валин и валина на лизин. Выход Tm9^a не превышает 1%. Очевидно, что Tm9^a образовался вследствие расщепления связи Lys-Ala.

Пептиды Tm10. Выход пептида Tm10 не превышает 1%, в то время как выходы Tm10¹, Tm10² и Tm10³ составляют 20—40%. Аналогичная ситуация отмечена нами для соответствующих пептидов T6, T6¹ и T6² [1]. Среди T-пептидов немодифицированной каталазы насчитывали пять пептидов, образовавшихся в результате расщепления неспецифических для трипсина связей [1]. В случае Tm-пептидов пептиды Tm10¹—Tm10³ были единственными, образовавшимися таким образом. В работе [1] сделано предположение о том, что только связь Phe-Ala в пептиде T6 (и соответственно в Tm10) наиболее доступна для расщепления каталазы протеазой (протеазами) в процессе ее выделения или хранения. Исследование пептидов Tm подтвердило это предположение. Однако, по-видимому, только небольшая область в районе связи Phe-Ala доступна для протеаз, поскольку вторая расщепляемая связь находится рядом (пептид T10), в то время как подобные связи Phe-Val и Trp-Gly, также рядом расположенные, не расщепляются.

Пептид Tm13_a. При сравнении этого пептида с пептидом T7 немодифицированной каталазы [1] видно, что это гомологичные пептиды, содержащие замену остатка глутамина на серин.

Пептид Tm14. Идентификацию N-концевых остатков начинали с восьмой стадии деградации.

Пептиды Tm15. Аминокислотные составы: Tm15,15_a — Thr_{1,3}, Ser_{0,8}, Pro_{0,6}, Gly_{4,5}, Ala_{2,5}, Val_{1,3}, Leu₂, Tyr_{0,6}, Lys, Arg; Tm15¹ — Thr, Ser, Pro, Gly₂, Ala₂, Leu, Arg; Tm15¹ — Thr₂, Ser, Gly₃, Ala, Val, Leu, Arg. Из сопоставления аминокислотных составов и последовательностей Tm15¹ и Tm15_a¹ видно, что эти пептиды гомологичны и содержат замены тирозина на валин, пролина на треонин и аланина

на глицин. Сравнивая аминокислотный состав Tm15,15_a с аминокислотными составами Tm15¹ и Tm15_a¹, мы пришли к выводу, что Tm15,15_a представляет собой смесь гомологичных пептидов Tm15¹ и Tm15_a¹. Из триптического гидролизата Tm15,15_a не удалось разделить высоковольтным электрофорезом и хроматографией на бумаге пептиды, соответствующие Tm15¹ и Tm15_a¹, которые были получены из разных фракций предварительного разделения триптического гидролизата малеил-каталазы [2].

Пептид Tm16_a. Этот пептид гомологичен пептиду T34 немодифицированной каталазы и отличается от него заменами серина на глутамин и аланина на треонин.

Пептиды Tm19. Сопоставление этих пептидов свидетельствует о том, что они гомологичны и отличаются заменой лейцина на аспарагиновую кислоту.

Пептиды Tm23. Мы полагаем, что существует аминокислотная последовательность, гомологичная последовательности Tm23 с заменой остатка пролина на аргинин, и пептиды Tm23_a¹ и Tm23² образовались в результате расщепления связи Arg-Ile, что обнаружено ранее на немодифицированной каталазе (пептиды T23) [1].

Пептиды Tm24. Аминокислотная последовательность Tm24_a¹ гомологична N-концевой последовательности Tm24_a и содержит две замены: изолейцина на фенилаланин и глутамина на аргинин. Мы полагаем, что пептид Tm24_a образовался в результате расщепления связи Arg-Gln в последовательности, гомологичной Tm24_a.

Пептид Tm28. Трипсин на пептид не действует. На основании этого можно предположить, что в Tm28 имеется связь Lys/Arg-Pro. Среди T-пептидов немодифицированной каталазы имеется пептид T57 с частично известной структурой [1], у которого аминокислотная последовательность пяти остатков с N-конца перекрывается с последовательностью 22—26 пептида Tm28. Очевидно, что пептид T57 образовался вследствие расщепления связи Trp-Asp в каталазе. Этот факт обсуждался в сообщении [1].

Пептид Tm33. Ранее определена N-концевая аминокислотная последовательность шести остатков. Поэтому идентификацию N-концевых остатков начинали с седьмой стадии деградации.

Пептиды Tm34. Из сравнения строения этих пептидов видно, что пептиды Tm34 и Tm34_a гомологичны и содержат три замены: тирозина на аланин, лейцина на пролин и лейцина на глицин.

Пептиды Tm35. Аминокислотные составы: Tm35 — Asp₃, Thr, Glu₄, Pro₂, Gly₃, Ala, Val₄, Met₂,

Ile₄, Leu₄, Phe₃, His, Lys₂, Arg; Tm35¹ — Thr, Glu, Pro, Gly, Val, Ile, Leu₂, Lys; Tm35² — Asp₃, Glu₃, Pro, Gly₂, Ala, Val₃, Met₂, Ile₃, Phe₃, His, Lys, Arg. Из сопоставления аминокислотных составов и последовательностей этих пептидов следует, что Tm35 состоит из Tm35¹ и Tm35², причем Tm35¹ занимает N-концевое положение. После расщепления Tm35 и Tm35² трипсином из триптических гидролизатов выделены два пептида, не имеющих аналогов среди Т-пептидов немодифицированной каталазы: T69 — Leu-Val-Pro-Leu-(Thr, Glu, Gly, Ile)-Lys и T70 — Leu-Val-Phe-Asn-Lys.

Пептид Tm37. После расщепления трипсином был выделен пептид, аналогов которому нет среди Т-пептидов немодифицированной каталазы: T71 — Gln-Pro-Ser-Asn-Asn-Arg.

Пептид Tm38. Аналога среди Т-пептидов немодифицированной каталазы не найдено, однако его аминокислотная последовательность гомологична таковой, состоящей из пептидов T49 и T59 [1]: Phe-His-Leu-Pro-Arg-Phe-Gln-Gln-Asp-Pro-Asn-Arg. Гомологичные последовательности содержат две замены: аспарагиновой кислоты на аргинин и глицина на фенилаланин.

Пептид Tm39. После расщепления трипсином был выделен пептид T72, не имеющий аналогов среди Т-пептидов немодифицированной каталазы: Phe-Ala-Ile-Ser-Met-Gly-Arg.

Таким образом, из триптического гидролизата малеил-каталазы выделено и определено строение 63 пептидов, содержащих в сумме 985 остатков аминокислот. 40 пептидов содержат уникальные неперекрывающиеся аминокислотные последовательности, насчитывающие в сумме 650 остатков, способных перекрыть 93 % длины полипептидной цепи каталазы, установленной по данным рентгеноструктурного анализа [6]. Очевидно, какие-то пептиды, как и в случае Т-пептидов немодифицированной каталазы, не были получены. Однако из триптических гидролизатов малеил-каталазы и Тm-пептидов были выделены 12 пептидов (T62-T73), не имеющих аналогов среди Т-пептидов немодифицированной каталазы (T1-T61) [1]. Эти дополнительные 12 пептидов содержат уникальные аминокислотные последовательности, насчитывающие 106 остатков аминокислот. Неперекрывающиеся последовательности Т-пептидов немодифицированной каталазы содержат всего 590 аминокислотных остатков. Уникальные аминокислотные последовательности Т-пептидов насчитывают всего 696 остатков аминокислот. С другой стороны, среди всех Тm-пептидов не обнаружено семи пептидов немодифицированной каталазы (T16, T32, T47, T48, T50, T51, T61), содержащих неперекрываю-

щиеся последовательности и насчитывающих в сумме 46 остатков аминокислот. Вместе с неперекрывающимися последовательностями Тm-пептидов (650 остатков) это составляет также 696 аминокислотных остатков. Очевидно, что, по данным для триптических пептидов, каталаза *P. vitale* содержит не менее 696 остатков аминокислот. Это превышает длину полипептидной цепи, установленную по результатам рентгеноструктурного анализа [6], на 26 остатков.

Т. Л. Левитина, Н. М. Гусак, О. С. Мирошниченко, М. Т. Бобровская, Л. В. Гудкова, Н. В. Латышко, Е. А. Козлов

Дослідження первинної структури каталази гриба *Penicillium vitale*. 2. Триптичні пептиди модифікованої за залишками лізину каталази

Резюме

З'ясовано побудову 63 триптичних пептидів каталази *P. vitale*, модифікованої за залишками лізину малеїновим ангідридом. 40 пептидів містять амінокислотні послідовності, які не перекриваються та включають 650 залишків амінокислот, що складає 93 % довжини поліпептидного ланцюга, встановленої згідно з даними рентгеноструктурного аналізу.

T. L. Levitina, N. M. Gusak, O. S. Miroshnichenko, M. T. Bobrovskaya, L. V. Gudkova, N. V. Latyshko, E. A. Kozlov

Investigation of the primary structure of *Penicillium vitale* catalase. 2. Tryptic peptides of maleilated catalase

Summary

The amino acid sequence of 63 maleilated *P. vitale* catalase tryptic peptides was determined. 40 peptides have non-overlapping amino acid sequences, comprising 650 amino acid residues, which make up 93 % of the polypeptide chain based on the X-ray analysis data.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Гусак Н. М., Левитина Т. Л., Бобровская М. Т. и др. Исследование первичной структуры каталазы гриба *Penicillium vitale*. 1. Триптические пептиды немодифицированной каталазы // Биополимеры и клетка.—1998.—14, № 1.—С. 62—67.
2. Левитина Т. Л., Мирошниченко О. С., Гудкова Л. В. и др. Триптические пептиды малеил-каталазы гриба *Penicillium vitale*. 1. Выделение и аминокислотный состав // Биополимеры и клетка.—1993.—9, № 2.—С. 3—8.
3. Левитина Т. Л., Бобровская М. Т., Гусак Н. М. и др. Триптические пептиды малеил-каталазы гриба *Penicillium vitale*. 2. Строение пептидов // Там же.—№ 3.—С. 42—45.
4. Левитина Т. Л., Гусак Н. М., Роднин Н. В. и др. Бромциановые фрагменты каталазы гриба *Penicillium vitale* // Там же.—1989.—5, № 5.—С. 55—63.
5. Козлов Э. А., Гудкова Л. В., Левитина Т. Л. и др. Дополнительное исследование триптических пептидов каталазы гриба *Penicillium vitale* // Там же.—1993.—9, № 1.—С. 22—25.
6. Vainshtein B. K., Melik-Adamyanyan W. R., Borinin V. V. et al. Threedimensional structure of catalase from *Penicillium vitale* at 2.0 Å resolution // J. Mol. Biol.—1986.—188.—P. 49—61.

Поступила в редакцию 25.03.97