

Исследование первичной структуры каталазы гриба *Penicillium vitale*.

3. Пептиды, полученные расщеплением каталазы протеиназой из *Staphylococcus aureus* V8

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

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

¹Институт биохимии им. А. В. Палладина НАН Украины
252030, Киев, ул. Леонтовича, 9

Исследовано строение 48 пептидов, полученных расщеплением каталазы P. vitale протеиназой из S. aureus V8. 27 пептидов содержат неперекрывающиеся уникальные аминокислотные последовательности, насчитывающие 401 остаток аминокислот.

Введение. Настоящее сообщение из цикла статей по изучению первичной структуры каталазы *P. vitale* посвящено выяснению строения пептидов каталазы, расщепленной протеиназой V8. В первых двух описаны триптические пептиды немодифицированной [1] и модифицированной по остаткам лизина каталазы [2].

Ранее уже опубликованы результаты разделения и изучения строения некоторых пептидов, полученных после расщепления каталазы протеиназой из *S. aureus* V8 [3]. Публикация цикла статей, значительно дополненных новыми данными, обоснована в первом сообщении цикла [1].

Материалы и методы. Расщепление каталазы протеиназой из *S. aureus* V8 и разделение пептидов описаны ранее [3]. Используемые в работе реагенты, а также определение аминокислотного состава и N-концевой последовательности ручным методом Эдмана приведены в сообщении [1]. Расщепление пептидов, содержащих остатки основных аминокислот, проводили трипсином по методу [2].

Результаты и обсуждение. В таблице приведено строение ранее изученных [4] и новых пептидов. Принцип обозначения Sp-пептидов тот же, что

и для триптических пептидов немодифицированной [1] и модифицированной [2] каталазы. Некоторые ранее изученные Sp-пептиды подверглись проверке и скорректированы. Новые и скорректированные пептиды отмечены подчеркиванием стадий деградации по Эдману. Кроме определения N-концевой последовательности, общая для всех пептидов стратегия выяснения их строения заключалась в следующем. Пептиды, содержащие остатки лизина и аргинина, расщепляли трипсином и триптические гидролизаты разделяли высоковольтным электрофорезом на бумаге. У полученных триптических пептидов определяли N-концевые остатки и аминокислотные составы. У триптических пептидов, не содержащих остатка лизина или аргинина (пептиды, занимающие C-концевое положение в Sp), дополнительно определяли N-концевую аминокислотную последовательность. По этим показателям триптические пептиды, полученные из Sp, идентифицировали с таковыми из модифицированной (Tm-пептиды) [2] и немодифицированной (T-пептиды) [1] каталазы.

Идентифицированные Tm-пептиды и T-пептиды, составляющие Sp-пептид, приведены в 4-й колонке таблицы. Триптические пептиды из Sp, идентичные C- или N-концевым участкам Tm- или T-пептидов, обозначены в этой же колонке номе-

ЛЕВИТИНА Т. Л. И ДР.

Строение пептидов, полученных расщеплением каталазы *P. vitale* стафилококковой протеиназой

| № п/п | Пептид | Строение |
|-------|--------------------------------------|---|
| 1 | Sp1 | His-Arg-Phe-Ser-His-Trp-Lys-Phe-Gly-Val-Asn-Gly-Phe-Val-His-Thr-Arg-Asn-Asp-Asp-Asn-Val-Thr-His-Ala-Arg-Gly-Phe-Phe-Thr-Ala-Pro-Glu |
| 2 | Sp2 | Arg-Gly-Gln-Gln-Lys-Lys-Arg-Val-Ala-Ala-Phe-Asp |
| 3 | Sp3a | Ser-Leu-Ala-Gln-Gly-Ser-Gln-Ile-Ser-Ser-Glu-Arg-Gly-Ser-Pro-Lys-Ala-Tyr-Ser-Asn-Thr-Glu-Pro-Asp-Lys-His-Arg-Ser-Phe-Arg-Leu-Val-Thr-Asp |
| 4 | Sp3a ¹ | Gly-Ser-Pro-Lys-Ala-Tyr-Ser-Asn-Thr-Glu-Pro-Asp |
| 5 | Sp3 ² | Lys-His-Arg-Ser-Phe-Arg-Leu-Val-Thr-Asp |
| 6 | Sp4 | Ile-Ile-Phe-Ala-Phe-Asp-Arg-Glu-Arg-Val-Pro-Glu-Arg-Ala-Val-His-Ala-Arg-Gly-Thr-Gly-Ala-His-Gly-Thr-Phe-Leu-Ser-Tyr-Glu-Asp-Trp-Ser-Asn-Leu-Thr-Ala-Ala-Ser-Phe-Leu-Ser-Ala-Glu |
| 7 | Sp4 ¹ | Ile-Ile-Phe-Ala-Phe-Asp-Arg-Glu |
| 8 | Sp4 ² | Arg-Val-Pro-Glu |
| 9 | Sp4 ³ | Arg-Ala-Val-His-Ala-Arg-Gly-Thr-Gly-Ala-His-Gly-Thr-Phe-Leu-Ser-Tyr-Glu-Asp-Trp-Ser-Asn-Leu-Thr-Ala-Ala-Ser-Phe-Leu-Ser-Ala-Glu |
| 10 | Sp5 | Thr-Thr-Phe-Arg-Pro-Thr-Ser-Arg-Ala-Ala-Gln-Phe-Glu |
| 11 | Sp6 | Lys-Leu-Ala-Lys-Leu-Asp |
| 12 | Sp7 | Met-Thr-Arg-Phe-Ser-Thr-Val-Ser-Gly-Ala-Arg-Gly-Ser-Ala-Asp |
| 13 | Sp8a | Thr-Ala-Ser-Gly-Glu-Leu-Gln-Arg-Glu |
| 14 | Sp9, 9a | Ser-Val-Ala-Trp-Arg-Phe-Pro-Glu-Glu-Gly-Glu-Gly-Tyr-Val-Ala-Glu-Asn-Leu-Phe-Glu-Ser-Ile-Glu |
| 15 | Sp9 ¹ | Ala-Trp-Arg-Phe-Pro-Glu-Glu-Gly-Glu |
| 16 | Sp9 ² , 9a ² | Ser-Val-Lys-Ala-Glu-Asn-Leu-Phe-Glu-Ser-Ile-Glu |
| 17 | Sp9a ³ | Ser-Val-Lys-Ala-Glu |
| 18 | Sp9 ⁴ | Asn-Leu-Phe-Glu-Ser-Ile-Glu |
| 19 | Sp9 ⁵ | Asn-Leu-Phe-Glu |
| 20 | Sp9 ^b | Ser-Ile-Glu |
| 21 | Sp10 | Leu-Leu-Thr-Val-Gly-Asp-Glu-Glu-Leu-Glu |
| 22 | Sp11, 11a | Leu-Glu-Ile-Gln-Ser-Met-Ser-Phe-Asn-Asn-Asp-Leu-Arg-Glu-Arg-Phe-Asn-Ser-Ser-Glu |
| 23 | Sp11 ¹ , 11a ¹ | Leu-Glu-Ile-Gln-Ser-Met-Ser-Phe-Asn-Asn-Asp-Leu-Arg-Glu |
| 24 | Sp11 ² , 11a ² | Glu-Ile-Gln-Ser-Met-Ser-Phe-Asn-Asn-Asp |
| 25 | Sp11 ³ , 11a ³ | Val-Met-Ala-Gln-Asn-Asn-Asp |
| 26 | Sp12 | Gly-Ala-Ala-Ser-Arg-Gly-Ala-Thr-Leu-Leu-Gln-Asp-Leu-Leu-Phe-Thr-Glu |
| 27 | Sp13 | Leu-Glu-Arg-Phe-Gly-Phe-Asp-Leu-Pro-Asp-Leu-Thr-Asp-Lys-Gln-Val-Asp-Leu-Ser-Ala-Met-Gly-Met-Phe-Glu |

Окончание таблицы

| № п/п | Пептид | Строение | Tm- и T-пептиды [1, 2] |
|-------|-------------------|---|------------------------|
| 31 | Sp14 ¹ | Lys-Phe-Asp | Tm13C, Tm25N |
| 32 | Sp15 | Ala-Pro-Ile-His-Asn-Asn-Asn-Arg-Asp-Gly-Ala-Gly-Glu-Met-Ile-Asp | Tm23, Tm10N |
| 33 | Sp15 ¹ | Met-Ile-Asp | Tm10M |
| 34 | Sp16 | Phe-Ala-Val-Gln-Asp | Tm7 |
| 35 | Sp16 ¹ | Ala-Val-Gln-Asp | Tm7C |
| 36 | Sp17 _a | Val-Ile-Ile-Glu-Pro-Thr-Leu-Met-Ala-Leu-His-Ala-Glu | Tm28M |
| 37 | Sp18 | Leu-Gly-Val-Glu-Glu-Ala-Trp | Tm1M |
| 38 | Sp18 ¹ | Leu-Gly-Val-Glu-Glu | Tm1M |
| 39 | Sp19 | Gly-Gln-Gln-Ala-Asn-Ser-Asp | Tm2M |
| 40 | Sp20 | Met-Ile-Asp-Leu-Pro-Pro-Phe | Tm10M |
| 41 | Sp21 | Ser-Asn-Gln-Tyr-Ala-Asp | Tm2M |
| 42 | Sp22 | Ile-Gln-Met-Ile-Phe-Asn-Glu | Tm1N (Tm35M) |
| 43 | Sp23 | Thr-Gln-Glu | Tm10M |
| 44 | Sp24 | Gly-Lys-Phe-Thr-Pro-Glu | Tm5C, Tm12N |
| 45 | Sp26 | Thr-Ala-Arg-Asp-Val-His-Gly-Phe-Ala-Thr-Arg-Phe-Tyr-Val-Asp-Glu | Tm21C, Tm30, Tm28N |
| 46 | Sp27 | Leu-Gly-Lys-Thr-Phe-Arg-Phe-Gln-Leu-Met-Gln-Val-Gly-Asn-Ile-Glu-Glu | Tm2C, Tm14N |
| 47 | Sp28 | Val-Phe-Gly-Glu-His-Ile-Ala-Ala-Ser-Gly-Thr-Lys-Tyr-Gly-Val-Pro-Glu | T4C, T53N, (Tm2M) |
| 48 | Sp28 ¹ | His-Ile-Ala-Ala-Ser-Gly-Thr-Lys-Tyr-Gly-Val-Pro-Glu | T4C, T53N (Tm2M) |

ром с дополнительными буквами С и N соответственно. Sp-пептид, входящий полностью в Tm- или T-пептид, обозначен соответствующим номером с буквой М. Реконструкцию Sp-пептидов проводили из идентифицированных Tm- и T-пептидов с установленным ранее строением [1, 2]. Детали реконструкции некоторых индивидуальных пептидов обсуждаются ниже.

Пептиды Sp3. Из таблицы видно, что пептид Sp3 легко реконструируется из пептидов Sp3_a¹ (его строение установлено ранее [4]), Sp3² и Tm3 [2].

Пептиды Sp4. Этот пептид легко реконструируется из Sp4¹—Sp4³. Строение Sp4 опубликовано ранее [4]. Благодаря пептиду Sp4 раскрывается скобка в Tm3 [2].

Пептид Sp6. Из триптического гидролизата Sp6 выделен пептид T38 (Leu-Ala-Lys) немодифицированной каталазы, входящий в состав пептида Tm2 [2]. Следовательно, пептид Sp6 также входит в состав Tm2.

Пептид Sp8_a. Из сравнения N-концевой последовательности пептида Sp8_a с аминокислотной последовательностью пептида Tm19 [2] видно, что

это гомологичные последовательности, у которых лизин заменен на глутаминовую кислоту. Происхождение гомологичных последовательностей в каталазе обсуждалось в первых двух сообщениях [1, 2].

Пептиды Sp9. Аминокислотные составы: Sp9,9_a — Asp, Ser_{1,2}, Glu₆, Pro, Gly_{1,5}, Ala₂, Val, Ile, Leu, Tyr_{0,5}, Phe₂, Trp(+), Lys_{0,3}, Arg; Sp9¹ — Glu₃, Pro, Gly, Ala, Phe, Trp(+), Arg; Sp9²,9_a² — Asp, Ser_{1,2}, Glu₃, Gly_{0,6}, Ala, Val, Ile, Leu, Tyr_{0,5}, Phe, Lys_{0,3}. Триптофан в пептидах Sp9,9_a и Sp9¹ определяли только по окраске реактивом Эрлиха; N-концевую аминокислотную последовательность в этих пептидах — ручным методом Эдмана. На пептидах пройдено семь и девять стадий соответственно, и только на второй стадии каждого не был идентифицирован N-концевой остаток аминокислоты. Аминокислотная последовательность Phe-Pro-Glu-Gly-Glu в Sp совпадает с N-концевой последовательностью пептидов Tm3 [1] и Tm9 [2], не содержащих остатков триптофана. Поэтому мы предположили, что остаток триптофана в Sp9,9_a и Sp9¹ расположен на втором месте от N-конца.

В пептиде $Sp9^2,9_a^2$ на 1, 2 и 3-й стадиях обнаружено по два остатка аминокислот: Gly + Ser, Tyr + Val и Val + Lys соответственно. Сопоставляя эти данные с аминокислотным составом, мы пришли к выводу о том, что $Sp9,9_a^2$ представляет собой смесь гомологичных пептидов $Sp9$ и $Sp9_a$, содержащих замены глицина на серин, тирозина на валин и валина на лизин. К аналогичному выводу можно прийти, рассматривая аминокислотный состав $Sp9,9_a$. Указанные замены ранее были обнаружены на пептидах Tm9 и Tm9_a [2].

Пептиды Sp11. Аминокислотные составы: $Sp11,11_a$ — Asp₄, Ser₃, Glu_{3,3}, Ala_{0,4}, Val_{0,3}, Met, Ile, Leu₂, Phe_{1,5}, Arg₂; $Sp11^1,11_a^1$ — Asp₃, Ser_{1,3}, Glu_{2,4}, Ala_{0,4}, Val_{0,3}, Met, Ile, Leu₂, Phe_{0,5}; $Sp11^3,11_a^3$ — Asp₃, Ser_{0,5}, Glu_{0,6}, Ala_{0,6}, Val_{0,3}, Met. При определении N-концевой аминокислотной последовательности у всех Sp11-пептидов на некоторых стадиях было обнаружено по два N-концевых остатка аминокислот. Вместе с данными по аминокислотным составам эти результаты позволяют предположить, что все пептиды Sp11 представляют собой смеси гомологичных пептидов с заменами глутамина на глутаминовую кислоту, серина на валин, серина на аланин и фенилаланина на глутамин. Данные по пептидам Sp10 и Sp11 позволили раскрыть скобку в пептиде Tm9 [2].

Пептиды Sp14. Аминокислотный состав пептида Tm14,14_a — Asp₃, Thr, Glu₂, Gly₂, Ala₂, Val, Ile, Tyr_{0,3}, Phe, Trp(+), Lys₃. На N-конце Sp14,14_a определен только остаток тирозина (при сквенировании ручным методом Эдмана остаток триптофана не определяли). Однако мы полагаем, что на N-конце расположен еще остаток триптофана (гомологичные пептиды с заменой триптофана на тирозин) на том основании, что пептиды T16, Tm13, Tm25, составляющие $Sp14,14_a$ (см. таблицу), остатка триптофана не содержат [1] (это подтверждено и на триптических пептидах из $Sp14,14_a$), но остаток триптофана имеется в C-концевой последовательности Tm10 [2]. Остатки триптофана и тирозина обнаружены и в N-концевом триптическом пептиде из $Sp14,14_a$ (данные аминокислотного состава не приведены). В то же время пептид Tm10 остатка тирозина не содержит.

Пептид Sp18. Пептид получен с выходом менее 1 %. Аминокислотный состав (Glu₂, Gly, Ala, Val, Leu, Trp(+)) этого пептида идентичен таковому плюс остатки Leu и Gly внутри скобки в пептиде Tm1 [2]. На этом основании можно раскрыть скобку в Tm1. Очевидно, что Tm18 мог образоваться в результате расщепления связи Trp-Arg в каталазе до расщепления ее протеиназой V8. Этот вопрос обсуждался в предыдущем сообщении

[2]. Видимо, и пептид Sp16, полученный также с выходом менее 1 %, имеет подобное происхождение. Однако пептид Sp20, образовавшийся таким же путем, получен с очень высоким выходом (более 50 %). Это подтверждает ранее сделанное предположение о причине расщепления со столь высоким выходом связи Phe-Ala в Tm10 [2] или T6 [1], в состав которых входит пептид Sp20.

Пептиды Sp28. Из триптической переварки этих пептидов был выделен пептид со строением, идентичным N-концевой последовательности пептида T53 немодифицированной каталазы (см. таблицу). Триптический пептид, идентичный T53, выделен также из триптического гидролизата Tm2 [2]. Отсюда ясно, что пептиды Sp28 входят в состав Tm2. Сопоставляя строение N-концевого триптического пептида, полученного из триптической переварки Sp28 (см. таблицу), с T-пептидами немодифицированной каталазы [1], входящими в состав Tm2 [2], можно прийти к выводу о том, что N-концевой триптический пептид из Sp28 (а также из Sp28¹) представляет собой C-концевую часть пептида T4 немодифицированной каталазы [1].

Анализируя Sp-пептиды вместе с триптическими пептидами немодифицированной [1] и модифицированной [2] каталазы, можно выписать все связи, расщепляемые протеиназой V8. В соответствии со специфичностью фермента наиболее эффективно расщепляются связи Glu-X, где X — остаток любой аминокислоты, кроме глутаминовой. Достаточно эффективно расщепляются связи Asp-Leu/Ile/Val/Phe/Trp (остатки гидрофобных аминокислот) и в единичных случаях с незначительным выходом (около 1 %) — связи Asp-Thr/Ser/Gly/Ala/Asn/Lys/Arg. Известно, что остатки гидрофобных аминокислот облегчают расщепление связи по остатку аспарагиновой кислоты [5, 6]. В одном случае произошло расщепление связи Leu-Gly (Sp12¹) с достаточно высоким выходом.

Однако в нашем варианте трудно объяснить расщепление протеиназой V8 связей Arg-Phe (Sp16), Arg-Gly (Sp3¹) и Arg-Ala (Sp15). Выход этих пептидов очень низок (менее 1 %). Мы полагаем, что эти связи расщепились протеазой (протеазами) в процессе выделения или хранения каталазы. Подобное расщепление связей, неспецифических для трипсина, уже обсуждалось в первых двух сообщениях при анализе триптических пептидов немодифицированной [1] и модифицированной [2] каталазы. Естественно, при таком анализе мы не могли обнаружить связей, расщепляемых трипсиноподобной протеазой. При анализе Sp-пептидов обнаруживаются связи, расщепляемые химотрип-

сино- (Sp16¹, Sp18, Sp20) и трипсиноподобной (Sp3¹, Sp15, Sp16) протеазами. Причем со значительным выходом при выделении или хранении разных препаратов каталазы расщепляется одна и та же связь Phe-Ala, что становится очевидным при расщеплении каталазы и трипсином, и протеиназой V8 (пептиды T6 [1], Tm10 [2] и Sp20 (см. таблицу)).

На примере Sp-пептидов мы находим еще одно подтверждение сделанному ранее [1] предположению о том, что эта связь в каталазе *P. vitale* является наиболее уязвимой для протеаз.

Таким образом, после расщепления каталазы протеиназой V8 мы выделили и изучили строение 48 пептидов, насчитывающих в сумме 596 остатков аминокислот. 27 пептидов имеют уникальные неперекрывающиеся аминокислотные последовательности, включающие 401 остаток, что составляет 59 % длины полипептидной цепи, состоящей из 696 остатков аминокислот (по данным триптических пептидов немодифицированной и модифицированной каталазы [1, 2]).

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

Дослідження первинної структури каталази гриба *Penicillium vitale*. 3. Пептиди, отримані розщепленням каталази протеїназою із *Staphylococcus aureus* V8

Резюме

Досліджено будову 48 пептидів, отриманих розщепленням каталази *P. vitale* протеїназою із *S. aureus* V8. 27 пептидів містять унікальні амінокислотні послідовності, які не перекриваються і нараховують 401 залишок амінокислот.

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

Investigation of the primary structure of *Penicillium vitale* catalase. 3. Peptides obtained by cleavage of the catalase by *Staphylococcus aureus* V8 proteinase

Summary

The amino acid sequence of 48 *Penicillium vitale* catalase peptides obtained by cleavage of the catalase by *Staphylococcus aureus* proteinase V8 was determined. 27 peptides have non-overlapping amino acid sequences comprising 401 amino acid residues.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

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. 105—110.
2. Левитина 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.—1998.—14, № 2.—С.
3. Латышко Н. В., Левитина Т. Л., Мирошниченко О. С. и др. Выделение и аминокислотный состав пептидов, образующихся при расщеплении каталазы гриба *Penicillium vitale* стафилококковой протеиназой // Там же.—1993.—9, № 3.—С. 38—41.
4. Бобровская М. Т., Латышко Н. В., Левитина Т. Л. и др. Строение некоторых пептидов, полученных расщеплением каталазы гриба *Penicillium vitale* стафилококковой протеиназой // Там же.—1994.—10, № 2.—С. 49—51.
5. Липкин В. М., Макарова И. А., Гринкевич В. А. и др. Первичная структура β-субъединицы ДНК-зависимой РНК-полимеразы *E. coli*. Гидролиз протеиназой из *Staphylococcus aureus* // Биоорг. химия.—1982.—8, № 6.—С. 747—775.
6. Липкин В. М., Модянов Н. Н., Смирнов Ю. В. и др. Первичная структура α-субъединицы ДНК-зависимой РНК-полимеразы *E. coli* // Там же.—1978.—4, № 2.—С. 180—196.

Поступила в редакцию 25.03.97