

## Ревизия аминокислотной последовательности каталазы гриба *Penicillium vitale*. Реконструкция полипептидной цепи

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

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

*Из 45 пептидов и фрагментов, строение которых опубликовано ранее, реконструирована полная аминокислотная последовательность каталазы P. vitale, включающая 689 остатков аминокислот. Участки 1—162 и 314—573 реконструированы перекрытием некоторых пептидов и фрагментов, а 163—313 и 574—689 — сравнением остальных пептидов и фрагментов с аминокислотной последовательностью этой же каталазы, установленной рентгеноструктурным методом (персональное сообщение В. Р. Мелик-Адамяна). Сопоставляются первичные структуры шести длинных каталаз (около 700 остатков) — представителей двух таксономических групп (грибы, бактерии), содержащих по сравнению с короткими каталазами (около 500 остатков) других организмов дополнительный С-концевой домен. Построена матрица «степеней родства» каталаз и их дополнительных доменов.*

В предыдущем сообщении [1] описаны результаты повторных экспериментальных исследований аминокислотных последовательностей некоторых триптических пептидов и бромциановых фрагментов каталазы. В настоящей работе приведена реконструкция всей полипептидной цепи фермента *P. vitale* с использованием этих пептидов и фрагментов, а также некоторых пептидов, строение которых выяснено ранее [2—4].

Для реконструкции полипептидной цепи использовали 45 пептидов и фрагментов, 28 из них (Т6, Т7, Т9, Т11, Т11а, Т27, Т32, Т36, Т47, Т49, Т49', Т62а, Т63—Т69, Т73, Т75, Тн1, Тм1, Тм41, Тш44, ВrCN4, ВrCN7, ВrCN11) взяты из работы [1], восемь пептидов (Т12, Т16, Т21, Т30, Т43, Т48, Т48а, Т75) — из работы [2], по два пептида и фрагмента (Sp7, Sp26 и ВrCN6, ВrCN9) — из работ [3] и [4] соответственно.

При реконструкции полипептидной цепи не удастся выписать всю аминокислотную последова-

тельность классическим методом перекрытия аминокислотных последовательностей пептидов и фрагментов. Таким образом возможно установить структуру только двух крупных участков, включающих последовательности 1—162 и 314—573. Строение участков 163—313 и 574—689 выявлено сравнением строения триптических пептидов с аминокислотной последовательностью каталазы *P. vitale*, установленной рентгеноструктурным методом (далее «рентгеноструктурная» последовательность) (персональное сообщение В. Р. Мелик-Адамяна). Установленная таким способом полная аминокислотная последовательность каталазы гриба *P. vitale* (в дальнейшем «химическая» последовательность) и схема ее реконструкции представлены на рис. 1, а сравнение с «рентгеноструктурной» последовательностью — на рис. 2. Аминокислотные остатки, находящиеся над последовательностью на рис. 1 и между последовательностями на рис. 2, отражают микрогетерогенность препаратов каталазы, использованных в работе. Микрогетерогенность обнаруживали в виде пар гомологичных пептидов и фрагментов, содержащих замены аминокислотных остатков [1]. И только для одного пептида Т32

© Э. А. КОЗЛОВ, Т. Л. ЛЕВИТИНА, М. Т. БОБРОВСКАЯ,  
М. Н. ОВАНДЕР, Л. В. ГУДКОВА, Н. В. ЛАТЫШКО,  
Н. Ф. РАДОМСКИЙ, 2001

10 Arg-Phe-Ala-  
 Thr-Gln-Gln-Phe-Leu-Ser-Gln-Phe-Tyr-Leu-Asn-Asp-Gln-Asp-Ala-Tyr-----  
 /-----T62a-----/-----

Ile-Ser-Met-Gly-Arg Ala Leu-Lys-Thr-Tyr Thr Ser  
 Leu-Thr-Ser-Asn-Val-Gly-Gly-Pro-Ile-Gln-Asp-Lys-Gly-Ser-Leu-Ala-Ala-  
 /-----/  
 -----/  
 -----Tm39-----/

40 50  
 Gly-Pro-Arg-Gly-Ala-Thr-Leu-Leu-Gln-Asp-Phe-Ile-Phe-Arg-Glu-Lys-Ile-  
 -----BrCN4-----

60  
 Gln-Arg-Phe-Asp-His-Glu-Arg-Val-Pro-Glu-Arg-Ala-Val-His-Ala-Arg-Gly-  
 -----

70 80 Val  
 Thr-Gly-Ala-His-Gly-Thr-Phe-Leu-Ser-Tyr-Glu-Asp-Trp-Ser-Asn-Leu-Thr-  
 -----

90 100  
 Ala-Ala-Ser-Phe-Leu-Ser-Ala-Glu-Gly-Lys-Glu-Thr-Pro-Met-Phe-Thr-Arg-  
 -----/  
 /---Sp7-----

Gln Thr 110  
 Phe-Ser-Thr-Val-Ala-Gly-Ser-Arg-Gly-Ser-Ala-Asp-Thr-Ala-Arg-Asp-Val-  
 /-----T12-----/  
 -----/

120 130  
 His-Gly-Phe-Ala-Thr-Arg-Phe-Tyr-Val-Asp-Glu-Gly-Asn-Phe-Asp-Ile-Val-  
 /-----/  
 -----Sp26-----/

140 150  
 Gly-Asn-Asn-Ile-Pro-Val-Phe-Phe-Ile-Trp-Asp-Ala-Ile-Leu-Gln-Pro-Thr-  
 -----Tm28-----

Met Arg 160  
 Leu-Ile-His-Ala-Gln-Lys-Pro-Asn-Pro-Arg-Gln-Asn-Leu-Pro-Arg-Ala-Asp-  
 -----T73-----/-----

170 180  
 Gly-Ala-Phe-Asp-Ala-Lys-Trp-Asp-Phe-Phe-Ser-Gln-Gln-Pro-Ser-Val-Leu-  
 -----

```

                210                                220
His-Val-Asn-Gly-Phe-Gly-Val-His-Thr-Phe-Arg-Leu-Val-Thr-Asp-Asp-Gly-
-----T47-----/-----

                Thr Pro          230
Lys-Thr-Lys-Leu-Val-Lys-Phe-His-Trp-Lys-Gly-Leu-Gln-Gly-Lys-Ala-Ser-
-----Tml-----

                240                                Ala                                250
Phe-Val-Trp-Glu-Glu-Thr-Gln-Glu-Asn-Ala-Gly-Lys-Asn-Ala-Asp-Phe-Met-
-----

                260                                270
Arg-Glu-Asp-Leu-Phe-Glu-Ser-Ile-Glu-Ala-Gly-Arg-Phe-Pro-Glu-Trp-Glu-
-----T66-----/-----

                Ala-Tyr                Thr          280
Leu-Gly-Val-Gln-Ile-Met-Ser-Glu-Asp-Asp-Gln-Leu-Arg-Phe-Gly-Phe-Asp-
-----T75-----/-----

                290                Glu          Thr          Gly-Ile                Val-Pro
Leu-Leu-Asp-Pro-Thr-Lys-Phe-Val-Ala-Gln-Glu-Asp-Val-Pro-Leu-Thr-Ile-
-----T27-----/-----T11-----
                /-----T11a-----

                Ile                310                Met                Asn
Leu-Gly-Lys-Met-Gln-Leu-Asn-Arg-Asn-Ile-Glu-Asn-Leu-Phe-Ala-Glu-Val-
-----T36-----/-----/-----
                /-----

Ile-Gly-Ala                330
Glu-Gln-Val-Met-Phe-Gln-Pro-Gly-His-Ile-Val-Arg-Gly-Val-Asp-Phe-Thr-
--BrCN9-----/-----
--Th1-----/-----

340                                350          Pro          Ala          Gly
Glu-Asp-Pro-Leu-Leu-Gln-Gly-Arg-Leu-Phe-Ser-Tyr-Leu-Asp-Thr-Gln-Leu-
-----

                360                Arg                370
Asn-Arg-His-Gly-Gly-Pro-Asn-Phe-Glu-Gln-Ile-Pro-Leu-Asn-Arg-Pro-Arg-
-----BrCN6-----

                Arg                380                390
Ala-Pro-Ile-His-Asn-Asn-Asn-Arg-Asp-Gly-Ala-Gly-Gln-Met-Asn-Ile-Pro-
-----/-----T6'-----

                400
Leu-Asp-Pro-Phe-Ala-Tyr-Ser-Pro-Asn-Thr-Glu-Asn-Lys-Gly-Ser-Pro-Lys-
-----/-----T21-----/

```

410 420  
 Gln-Ala-Asn-Glu-Thr-Val-Gly-Lys-Gly-Phe-Phe-Thr-Ala-Pro-Glu-Arg-Thr-  
 -----T7-----/-----T30-----/  
 Asp Arg-Phe  
 Ala-Ser-Gly-Lys-Leu-Gln-Arg-Ser-Val-Ser-Ser-Arg-Asn-Asp-Asp-Asn-Val-  
 -----BrCN11-----  
 -----Tm19-----/-----T66-----/-----Tm32-----  
 Leu Pro 450  
 Ser-His-Ala-Arg-Leu-Phe-Trp-Asn-Ser-Leu-Val-Asn-Ala-Gln-Lys-Met-Phe-  
 -----/  
 -----/-----T67-----/  
 460 470  
 Ile-Val-Asp-Ala-Glu-Arg-Phe-Glu-Thr-Ser-Asn-Val-Lys-Ser-Ser-Val-Val-  
 -----T69-----/  
 Met 480 Thr-Met-Ala 490  
 Arg-Asp-Asp-Val-Ile-Ile-Gln-Leu-Asn-Arg-Ile-Ser-Asp-Asn-leu-Ala-Thr-  
 -----  
 500 Asp  
 Arg-Val-Ala-Lys-Ala-Ile-Gly-Val-Glu-Ala-Pro-Lys-Pro-Asn-Ser-Asn-Tyr-  
 -----BrCN7-----  
 510 520 Asp  
 Phe-His-Ser-Asn-Thr-Thr-Ala-His-Ile-Gly-Ala-Phe-Gly-Glu-Lys-Leu-Ala-  
 -----  
 530 540  
 Lys-Leu-Asp-Gly-Leu-Lys-Val-Gly-Leu-Leu-Ala-Ser-Val-Asn-Lys-Pro-Ala-  
 -----  
 550 560  
 Ser-Ile-Ala-Gln-Gly-Ala-Lys-Leu-Gln-Val-Ala-Val-Ser-Ser-Asp-Gly-Val-  
 -----  
 570  
 Asp-Val-Val-Val-Val-Ala-Glu-Arg-Phe-Ala-Asp-Arg-Met-Phe-Gln-Thr-Phe-  
 -----/  
 -----/  
 580 590  
 Ser-Ala-Ser-Asp-Ala-Val-Gln-Asn-Asp-Ala-Val-Val-Val-Ala-Asp-Gly-Gly-  
 -----

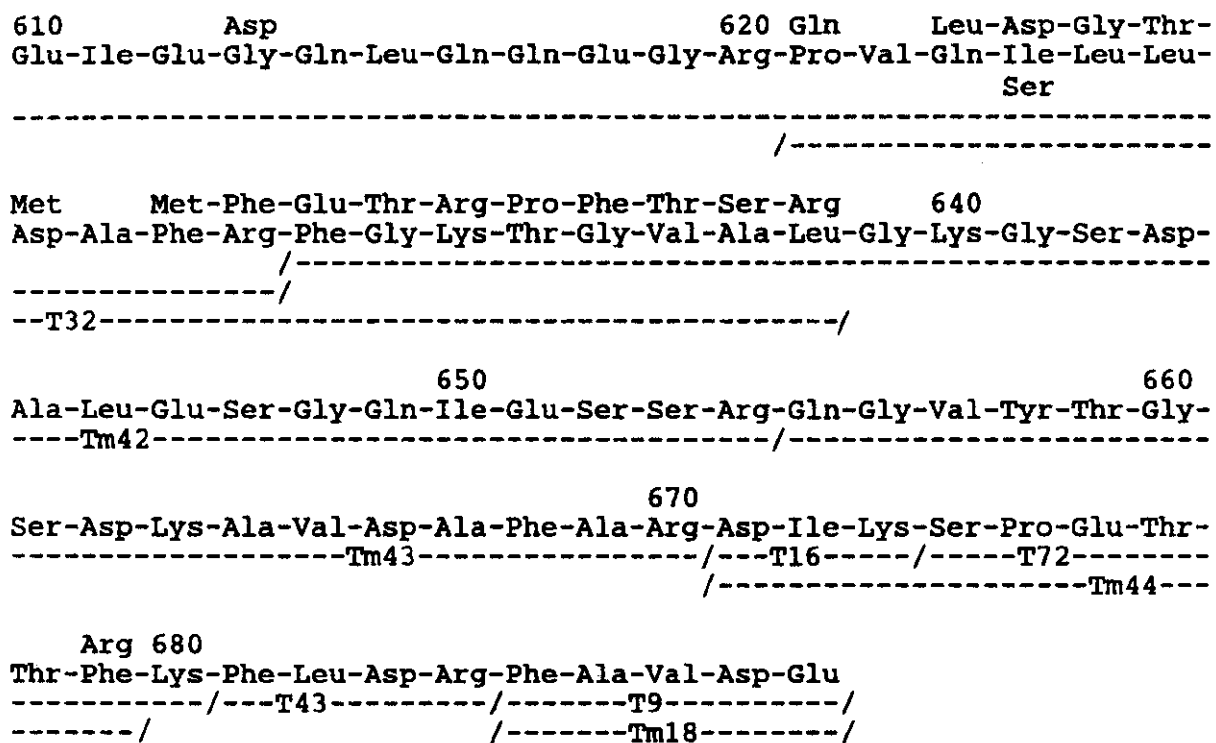


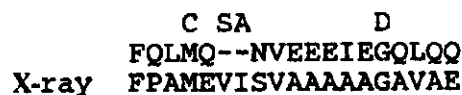
Рис. 1. Полная аминокислотная последовательность каталазы гриба *P. vitale* и схема ее реконструкции. В некоторых положениях над последовательностью (в положении 624 и под последовательностью) приведены аминокислотные последовательности и отдельные остатки аминокислот гомологичных участков этой же каталазы (подробности см. в тексте)

(последовательность 621—638) трудно найти гомологическую последовательность в реконструированной полипептидной цепи. Пептид T32 располагается в указанном месте полипептидной цепи на основании того, что его последовательность очень сходна с таковой на этом участке полипептидной цепи по ранее опубликованным данным «рентгеноструктурной» последовательности (в X-ray последовательности A — неидентифицированный остаток) [5]:



Необходимо отметить, что основная последовательность на этом участке совпадает с «рентгеноструктурной» на основании персонального сообщения В. Р. Мелик-Адамяна, а «микроретерогенная» — по публикации [5]. «Микроретерогенный» остаток Thr в положении 278 и остаток Met(19)

также совпадают с Thr и Met соответственно в «рентгеноструктурной» последовательности по публикации [5]. Интересно, что и в некоторых положениях (32, 429, 444, 504, 524) «микроретерогенные» остатки (соответственно Ser, Asp, Pro, Asp, Asp) совпадают с «рентгеноструктурной» последовательностью (рис. 2). Всего насчитывается 127 различий между «химической» и «рентгеноструктурной» последовательностями (обозначены звездочкой на рис. 2), что составляет 19 % всей полипептидной цепи. В положениях 412—414 и 594—618 «рентгеноструктурной» последовательности аминокислотные остатки не идентифицированы (персональное сообщение В. Р. Мелик-Адамяна), хотя некоторые остатки на участке 602—618 совпадают по ранним данным рентгеноструктурного анализа [5]:



```

Chem.      TQQFLSQFYLNDDQDAY-LTSNVGGPIQDKGSLAAGPRGATLLQDFIFREKIQRFDHERVPERAVHARGT
           RFAISMGR A LKTY T S
X-ray      NKFLSQFYLNDEDVY-LTSNVGGPIEDENSLSAGERGATLLEDIFYREKIERFDHERVPERAVHARGV
           **      **      *** ** * *      * *      *
70         80         90         100        110        120        130        140
GAHGTFLSYEDWSNLTAASFLSAEGKETPMFTRFSTVAGSRGSADTARDVHGFATRFYVDEGNFNDIVGNNIPVFFIWD
           V           Q T
GAHGTFTSYGDWSNLTAASFLSAEGKETPMFTRFSTVAGSRGSADTARDVHGFVAVRFYTNENGNFNDIVGNNIPVFFIQD
           * *           * **
150        160        170        180        190        200        210        220
AILQPTLIHAQKPNPRQNLPRADGAFDAKWDFFSQQPSVLHTLLWAMAGHGIPRSFRHVNGFGVHTFRLVTDDGKTKL
           M R           T
AILFPNLIHAVKPRGDNQIPEATAHDSAWOFFSEEPSVLHTLLWAMAGHGIPRSFRHVNGFGVHTFRLVTNDGKTKL
           * *      * ** ** * ** * **      **
230        240        250        260        270        280        290        300
VKFHWKGLQGKASVWEETQENAGKNADFMREDLFESIEAGRFPEWELGVQIMSEDDQLRFGFDLLDPTKFAQEDVP
           TP      A           AY T           E T GI
VKFHWKGLQGKASLVWEEAEETAGKDADFEREDLFQSIAGRFPEWELGVQIMEEEDQLRFGFNLLNPTKIVPEELVP
           *      * ** * * * *      *
310        320        330        340        350        360        370        380
LTILGKMQLNRNIENLFAEVEQVMFQPGHIVRGVDFTEPLLQGRLEFSYLDTQLNRHGPNFEQIPLNRPRAPIHNNN
           VP I      M N IGA           P A G           R           R
VTILGKMLNRNPNENYFAETEQVMFEPGHIVRGVDFTEPLLQGRLEFSYLDTQLNRHGPNFEELPIDRPRAPIHNDN
           *      * * * * * * *      * ** ** *
390        400        410        420        430        440        450
RDGAGQMNIPLDPFAYSPTENKGSQPKQANETVKGFFTAPERTASGKLQRSVSSRNDDNVSHARLFWNSLVNAQKMF
           D           RFL P
RDGAGQMFIPLDPNAYSPTNTEDEGSPKQANE      EGFFTAPERTATGKDERTLSTTFEDNWSQPRLFWNSLVNAQKEF
           *      *      **      *      * ** ** * ** * **
460        470        480        490        500        510        520        530
IVDAERFETSNVKSSVRRDDVIIQLNRI SDNLATRVAKAIGVEAPKPNSENYFHSNTTAHIGAFGEKLA KL DGLKVGLL
           M      TMA           D           D
IVDAMRFETSNSVSTTVRRDDVIIQLNRI SDDLATRVASAIGVSAPDPDSSFYHDNTTAHIGAFGEDLAKLLGLKVGLL
           *      * **      *      *      * ** ** * *      *
540        550        560        570        580        590        600        610
ASVNKPASIAQGAQLQVAVSSDGVVVVAERFADRMFQTFSSASDAVQNDAVVVADGGENLYGAKFQLQM--NVEEIE
           CSA
ASTDKPASIAEGARLQALSSVGVVVVAERADNVNQTYSASDAVQFDVVVADG
           **      * * * * *      * ** * *
620 S 630 640 650 660 670 680
GQLQEQGRPVQILLDAFRFGKTGVALGKGSDALESGQIESSRQGVYTGSDKAVDAFARDIKSPETTFKFLDRFAVDE
D      Q LDGTM MFETRPFSTR
GRPLNILLDAFRFGKTVGALGSGSDALESGQITE-REGVYTGSN-AGEAFASNIKSGLTTFKFLDRFAVDA
           **      ** *      *** *      ** **      * **

```

Рис. 2. Сравнение «химической» (chem.) и «рентгеноструктурной» (X-ray) аминокислотной последовательности каталазы *P. vitale*. Между ними размещены аминокислотные последовательности или отдельные остатки аминокислот гомологичных участков этой же каталазы, установленные химическими методами [1]. «Рентгеноструктурная» последовательность приведена на основании персонального сообщения В. Р. Мелик-Адамяна. Звездочкой обозначены различия между двумя основными последовательностями

E.col.				10	20	30		
				MSQHNEKNPHQHQSPLHDSSEAKPGMDSI				
	50	60	70	RFAISMGR	A LKTY	T S		
P.vit.				TQQFLSQ-FYLND--QDAY-LTSNVGGPIQDK-GSLAAGPRG				
A.nig.				TEQPIDNTLVND--TGSY-MTDFGTPISDQ-TSLKAGPRG				
A.fum.				ATEEFLSQ-YLND--NDAF-MTSDVGGPIEDQ-NSLSAGERG				
A.nid.				ATEEFLE-YLDD--TDSY-LTTDVGPIEDQ-QSLKAGARG				
M.avi.				ATDHTSDAPDPKQDL-ESARF-RRDTG-Y-LTTQQGVRVDHTDDALTVGERG				
E.col.				TPPGAQPTAPGSLKAPDTRNEKL-NSLEDVRKGSENYALTINQGVRIADDQNSLRAGSRG				
	120	130	140	V	160	170	Q T	
P.vit.	QRFDHERVPERAVHARGTGAHGTFLSYED-WSNLTAASFLSAEGKETPMFTRFSTVAGSR							
A.nig.	QRFDHERVPERVVHARGAGAYGTFKSYAD-WSVVTAAFDLSANDKETPMFCRFSTVVGF							
A.fum.	QRFDHERVPERAVHARGAGAHGVFTSYGV-FSNITAASFLAKEGKQTPVVFVRFSTVAGSR							
A.nid.	QRFDHERVPERAVHARGAGAHGVFTSYGD-FSNITAASFLSAESKETPVVRFVRFSTVAGSR							
M.avi.	THFDHERIPERVVHARGAGAYGYFEPYDORLAQYTAQFLTSPGTRTPVVFVRFSTVAGSR							
E.col.	THFDHERIPERIVHARGSAAHGYFQPYK-SLSDITKADFLSDPNKITPVVFVRFSTVQGG							
	190	200	210	M	R	230	240	250
P.vit.	TRFYVDEGNFDIVGNNIPVFFIWDAILQPTLIHAQKPNPRQNLPRADGAFDAKWDFFSQQ							
A.nig.	CRFYTDEGNVDIVGINFAPFFIQDAIQFPDLVHAIKPMNNEIPQAATAHTSAWDFFSQQ							
A.fum.	TRFVIDEGNFDIVGNNIPVFFIQDAILFPDLIHAVKPRGDNEIPQAATAHDSAWDFFSQQ							
A.nid.	TRFYTDEGNFDIVGNNIPVFFIQDAIQFPDLIHAVKPKGDREIPQAATAHDAWDFFSQQ							
M.avi.	TKFYTEQGNVDIVGNNIPVFFIQDGIKFPVLVHAVKPEPHNEIPQAQSAHDTLWDFVSNQ							
E.col.	TKFYTEEGIFDLVGNNTPIFFIQDAHKFPDFVHAVKPEPHWAIPOGQSAHDTFWDYVSLQ							
	T	280	290	TP	300	310	A	320
P.vit.	HGIPRSFRHVNFGVHTFRLVTDGKTKLVKFWKGLQKASVWEEETQENAGKNADFMR							
A.nig.	NGIPRSFRHMNGYGVHSFRFVAANGTSKVVRTPWKSQQGVASLVWDEAQAAGKNSDYHR							
A.fum.	HGIPRSFRHVDGFGVHTFRTVTDGASKLVKFWKSLQKASMVWEEAQQTSGKNPDFMR							
A.nid.	HGIPRSERHVDGFGVHTFRLVTEGSKLVKFWKTLQGLASMVWEEAQQISGKNPDYMR							
M.avi.	RALPRSRYRMQGFVHTFRLVNARGRTFVKFWKPRLVGHSIWDCEQKLAGKDPDYNR							
E.col.	RGIPRSYRMEGFGIHTFRLINARGKATFVRFWKPLAGKASLVWDEAQLTGRDPDFHR							
	AY	T	350	E T GI	VP I	380	M N	IGA
P.vit.	EWELGVQIMS EDDQLRF GFDLLDPTK FVAQEDVPLTILGKMQLNRNRIENLFAEVEQVMFQ							
A.nig.	KYELQAQIMDEADMLRF GFDLLDPTKLVPEEVVPTPLGMMELNANPTNYFAEVEQAGFQ							
A.fum.	EWELGVQIMDEEDQLRF GFDLLDPTKIVPEEFVPTIKLGMQLNRNPRNYFAETE QVMFQ							
A.nid.	EWELNVQIMDEEDQLRF GFDLFDPTKIVPEEYVPLTILGKMTLNRNPRNYFAETE QVMFQ							
M.avi.	EWELGVQLVAEDDEF SFDLDDATKI IPEEQVPLVPGKMLNRNPDNFFAETE QVAFH							
E.col.	EYELGFQLIPEDEFKDFD LLDPTKLIPEELVFPVQRVGKMLNRNPDNFFAENEQA AFH							
	410	P A G	R	R	450	460		
P.vit.	PLLQGR LFSYLD TQLNRHGGPNFEQIPLNRPRAPIHNNNRD GAGQMNIPLDPFA YSPNTE							
A.nig.	PLLQGR LFSYLD TQLTRHGGPNFEQIPVNRPRKPVHNNNRD GFGQQQIPTNNWAYTPNSM							
A.fum.	PLLQGR LFSYLD TQLNRPHGGPNFEQLPINQPRVPHNNNRD GAGQMF IPLNPHAYS PKTS							
A.nid.	PLLQGR LFSYLD TQLNRNGGPNFEQLPINQPRVAIHNNNRD GAGQMF IPLNPDAYS PNTL							
M.avi.	PLLQFR NFSYLD TQLIRLGGPNFAQNPVHRPVAQVRTNQHDGYAQHAI PQGRSSYFKNSI							
E.col.	PLLQGR LFSYTP TQISRLGGPNFHEIPINRPTCPYHNFQRDGMHRMGIDTNPANYEPNSI							

	490	D	500	RFL P	520	530	540	M	TMA	
P.vit.	KGFFTAPERTASGKLQ	RSVSSRNDDNVSHARLF	WNSLVNAQKMF	IVDAERFETS	SNVKSSVVRDDV	IIQLNRIS				
A.nig.	HGFFTAPYRYASGHLV	RQTSPTFNDHWSQPAM	FWNSLIPAEQQMVVNA	IVFENSKVNSPHVR	KNVVNQ	LNLMVN				
A.fum.	DGFFTAPGRITSGKLV	RAVSSSFEDVWSQPR	LFYNSLVPAEKQF	VIDAIRFENANVK	SPVVKNNV	IIQLNRID				
A.nid.	RGFFTAPDRTANGNLV	RAKSSTFDDAWSQPR	LFWNSLLPAEKQF	VVNAIRFENANVK	SDVVKNNV	IVQLNRIS				
M.avi.	EDVFRHYTQRVDGQT	IGKRAEAFQNHYGQ	ARMFFKSMSPVEAE	HIVAAFAFELGKV	EMPE	IRSAVVAQLARVD				
E.col.	RGGFESYQERVEGNK	VRERSPSFGEYYSH	PRFLFWLSQTPFE	QRHIVDGF	SFELSKVVRPY	IRERVVDQLAHID				
	560	D	580	D	600	610	620			
P.vit.	DNLATRVAKAIGVEAP	KPNSNYFHSNTTAH	IGAFGEKLA	KLDGLKVGLLASV	NKPASIAQ	GAKLQ--	VAVSSD			
A.nig.	NNLAVRVARGLGLDE	PSPNPTYTYSNKTS	SNVGTFGKPLLS	IEGLQVGF	LASNHPESIK	QOQAMA--	AQFSAA			
A.fum.	NDLARRVARAIGVAE	PEPDPTFYHNNKT	ADVGTGFKLKL	DGLKVGVLG	SVQHPGS	VEGASTLR--	DRLKDD			
A.nid.	DNLATRVAKAIGVDA	PEPDNTTYHDNTT	SNIGAFGHR	LQSLAGLKI	AVLASVDAE	ESFSAATALK--	AELSND			
M.avi.	DQLAAQVAAKGLGL	PEPPEEQVDESAP	VS-----	PALSQVTDG-	GDTIASRRI	AVLAADGVDV	VVGTQRFT			
E.col.	LTLAQAVAKNLGI-	ELTDDQLNITPP	PDVNGLK	KDPSLSLYAI	PDGDVKG-	RVVAILLN	DEVRSAD			
	630	640	650	660	670	CSA	D	690	Q	LDGTM
P.vit.	GVDVV-VVAERFADR	MFQTF	SASDAVQND	AVVVADG	GENLYGAKF	QLQ--	NVEE	IEGQLQ	QOEGRP	VOILLDA
A.nig.	GVDLN-IVTEAYAD	GVNTTYALS	DAIDFDALI	IADGVQSL	FASPALANQ--	MNSTAT	STLYPP	PARPFQ	ILVDS	
A.fum.	GVDVV-LVAERLAD	GVDQTYSTSD	AIQFD	AVVAA	GAESLFA	ASSFTGGS	SANSAS	GASSLY	PTGRPL	QILIDG
A.nid.	NLDVI-VVAERF	SNGVNTY	SASDAI	QFD	AVVAPGA	EKLFGAKS----	AANS---	SSTLY	PAGRPLE	ILVDA
M.avi.	MEQRGAVVE	VLPVAGG	TLAGGSG	GELRVDR	SFTT	MASVLY	DAVVVAC	GRSV	STLSDD	DGYAVHFVTEAYKHL
E.col.	LKAKG-VHAKLLY	SRMGEVT	ADDGTVLP	IAATFAG	APSLTV	DAVIV	PCG--	NIADI	ADNGD	ANYYLMEAYKHL
	MFETRPFTSR	720	730	740	750	760	R	770		
P.vit.	FRFGKTGVALGKGS	DALESGQI-ESS----	RQGVYT---	GSDKA	VD	AFARDIKSPE---	TTFKFLDR-	FAVDE		
A.nig.	FRYGKPVAAVGS	GSVALKNAGI-DSS----	RSGVYT---	GSSETTE	KIAKEV	LEGL---	YTFRFVDR-	FALDE		
A.fum.	FRFGKTGVALGSG	TAAALR								
A.nid.	FRFGKPVAAALG	SGSTAFDNA								
M.avi.	KPIGAYGAGVDLL	RRKAGIDNRLA	EDTDV	LNDQAV	VTTKAA	ADELPERFAEE	FAAALAQ	HRCWQR--	RTDAVPA	
E.col.	KPIALAGDA----	RKFKATIKI	ADQG----	EEGIV----	EADSAD	GSFMD	ELLTLM	AAHRVWS	RIPKIDKIPA	

Рис. 3. Сравнение аминокислотных последовательностей «длинных» (см. текст) каталаз *Penicillium vitale* (*P. vit.*), *Aspergillus niger* (*A. nig.*), *A. fumigatus* (*A. fum.*), *A. nidulans* (*A. nid.*), *Micobacterium avium* (*M. avi.*) и *Escherichia coli* (*E. col.*). Сверху в некоторых местах указаны гомологичные последовательности или остатки аминокислот каталазы *P. vitale*

Из 127 различий имеются такие, которые могут быть объяснены особенностями методов исследования аминокислотной последовательности. Так, например, различия в остатках Asp, Asn, Glu, Gln (всего 34) можно объяснить не только трудностью идентификации их рентгеноструктурным методом, но и возможным дезаминированием остатков амидов в процессе выделения и исследования пептидов. К трудноидентифицированным рентгеноструктурным методом относятся пары остатков Val/Thr, Asp/Leu и Phe/His [5] (10 различий). Еще восемь различий могут быть объяснены инверсией при их идентификации рентгеноструктурным методом. Это пары остатков Gln, Asn (положения 163, 164), Tyr, Phe (509, 510), Gly, Val (635, 636) и Thr/Ser-Glu (651—652). Всего 52 легкообъяснимых различий.

Среди оставшихся 75 действительными могут быть различия между «химической» и «рентгеноструктурной» последовательностями, обусловленные микрогетерогенностью препаратов каталазы, использованных для исследований как химическими, так и рентгеноструктурными методами.

Реконструированная таким образом полипептидная цепь каталазы гриба *P. vitale* содержит 689—692 остатка аминокислот (по прежним данным [6] — 696). Интересно отметить, что «микрогетерогенная» последовательность на три остатка больше по данным химического метода (в положениях 17 и 607—608 в основной последовательности надо допустить делеции по сравнению с «микрогетерогенной»).

Интересно, что в «рентгеноструктурной» по-



	P. vit.	A. nig.	A. fum.	A. nid.	M. avi.	P. vit.	A. nig.	A. fum.	A. nid.	M. avi.
A. nig.	66					55				
A. fum.	76	71				59	57			
A. nid.	75	71	84			56	55	64		
M. avi.	46	48	49	50		20	21	26	25	
E. col.	49	48	52	51	59	23	20	23	23	41

а

б

Рис. 4. Матрицы «степеней родства» первичных структур сравниваемых на рис. 3 каталаз (а) и их С-концевых доменов 599—774 (б) грибов (*P. vit.*, *A. nig.*, *A. fum.*, *A. nid.*) и бактерий (*M. avi.*, *E. col.*)

следовательности (персональное сообщение В. Р. Мелик-Адамяна) также обнаруживаются две делеции (653 и 663) по сравнению с «химической». Мы не исключаем, что это могут быть действительные различия, а не ошибка методов. В связи с обнаружением нами химическими методами микрогетерогенности (75 на 692 остатка — 11 % и, возможно, выше) возникает вопрос: идентичны ли по первичной структуре четыре субъединицы каталазы, как это предполагается по данным рентгеноструктурных исследований [5]? К тому же авторы этих исследований считают, что «четыре субъединицы близки к идентичным в пределах экспериментальной ошибки». Возможно, четыре цепи в одной молекуле высокоомологичны, а, возможно, они идентичны в одной молекуле, однако разные молекулы каталазы содержат высокоомологичные полипептидные цепи. Поэтому на основании наших данных можно предположить, что каталаза *P. vitale* представляет собой гетеротетрамерную молекулу со степенью идентичности четырех мономеров около 90 %.

На рис. 3 приведено сравнение «химической» аминокислотной последовательности каталазы *P. vitale* с пятью каталазами, длина полипептидных цепей которых превышает 600—700 остатков (длинные каталазы).

Короткие каталазы других организмов содержат около 500 остатков [6]. Как известно, длинная каталаза *P. vitale* по сравнению с короткими каталазами содержит дополнительный С-концевой «флаводоксиподобный» домен, включающий около 160 остатков аминокислот [5]. По-видимому, пять остальных длинных каталаз также содержат дополнительный С-концевой домен, подобный таковому каталазы *P. vitale*.

С этой точки зрения вызывает интерес степень гомологии полипептидных цепей длинных каталаз и их С-концевых доменов. Среди сравниваемых на рис. 3 каталаз две принадлежат к бактериям — *Escherichia coli* (*E. col.*) и *Micobacterium avium* (*M. avi.*) [6], а четыре — грибам: *P. vitale* (*P. vit.*), *Aspergillus niger* (*A. nig.*) [7], *A. fumigatus* (*A. fum.*) (EMBL/GENBANK/DD BJ. DATA BANK) и *A. nidulans* (*A. nid.*) [8]. На рис. 4, а, представлена

матрица «степеней родства» сравниваемых на рис. 3 каталаз, подсчитанных по методу [9]. «Степень родства» всех шести каталаз лежит в пределах 46—84 %. «Степень родства» каталаз грибов — 66—84 %, а каталаз двух бактерий равна 59 %. «Степень родства» каталаз грибов с каталазами бактерий лежит в пределах 46—51 %. Как видно, «степень родства» представителей внутри каждого таксона выше, чем между таксонами. Эта закономерность отмечена нами ранее для большого числа таксонов [6]. В представленной работе показано, что «степень родства» для большого числа каталаз бактерий колеблется в пределах 47—67 %. Со времени публикации [6] коллекция «длинных» каталаз с дополнительным С-концевым «флаводоксиподобным» доменом пополнилась еще тремя представителями грибов. Это дало возможность рассчитать «степень родства» не только всех «длинных» каталаз, но и их «дополнительных» доменов. Матрица представлена на рис. 4, б. Закономерность филогенетических взаимоотношений С-концевых доменов каталаз внутри каждого таксона и между таксонами такая же, как и для целых белков — внутри таксонов 55—64 % (грибы) и 41 % (бактерии), между таксонами — 20—26 %. Следовательно, «флаводоксиподобные» домены отличаются низкой степенью консервативности, особенно между таксономическими группами. В этой связи правомочно ли применение термина «флаводоксиподобный» домен для остальных каталаз, кроме каталазы *P. vitale*, для которой и было показано его подобие по пространственной структуре флаводоксинам [5]? Интересно, сохраняется ли эта структура дополнительного С-концевого домена и у других «длинных» каталаз? Решение этих вопросов требует дальнейших исследований.

E. A. Kozlov, T. L. Levitina, M. T. Bobrovskaja, M. N. Ovander, L. V. Gudkova, N. V. Latishko, N. F. Radomskiy

Revision of *Penicillium vitale* catalase amino acid sequence. Reconstruction of polypeptide chain

Summary

The complete amino acid sequence of *P. vitale* catalase comprised of 689 amino acid residues was reconstructed from 45 peptides and fragments published earlier. The sequences 1—162 and 314—573

were reconstructed by means of overlapping of peptides and fragments sequences. The sequences 163–313 and 574–689 were reconstructed by means of comparison of the peptides and fragments sequences with the *P. vitale* amino acid sequence established by X-ray method. The primary structures of 6 long catalases from two taxonomic groups (fungus, bacteria) containing additional C-terminal domain have been compared. The matrix of the catalases and their C-terminal domains «alliance» was constructed.

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

Ревізія амінокислотної послідовності каталази гриба *Penicillium vitale*. Реконструкція поліпептидного ланцюга

#### Резюме

Із 45 пептидів, будову яких опубліковано раніше, реконструйовано повну амінокислотну послідовність каталази *P. vitale*, яка налічує 689 залишків амінокислот. Ділянки 1–162 та 314–573 реконструйовано перекриванням деяких пептидів та фрагментів, а 163–313 та 574–689 — порівнянням решти пептидів та фрагментів з амінокислотою послідовністю цієї ж каталази, встановленої рентгеноструктурним методом (персональне повідомлення В. Р. Мелік-Адамяна). Порівнюються первинні структури шести довгих каталаз (700 залишків) — представників двох таксономічних груп (гриби, бактерії), які мають додатковий С-домен, з короткими каталазами (біля 500 залишків) інших організмів. Побудовано матрицю «ступенів спорідненості» каталаз та їхніх додаткових доменів.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Козлов Э. А., Левитина Т. Л., Бобровская М. Т., Овандер М. Н., Гудкова Л. В., Латышко Н. В. Ревизия структуры триптических пептидов и бромциановых фрагментов каталазы гриба *Penicillium vitale* // Биополимеры и клетка.—2001.—17, № 4.—Р. 283–291.
2. 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.
3. 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 протеиназой из *Staphylococcus aureus* V8 // Биополимеры и клетка.—1998.—14, № 3.—С. 191–195.
4. 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. 196–204.
5. Vainstain B. K., Melik-Adamyant W. R., Barinin V. V., Vagin A. A., Grebenko A. I., Borisov V. V., Bartels K. S., Fita J., Rossman M. S. Three-dimensional structure of catalase from *Penicillium vitale* at 2.0 Å resolution // J. Mol. Biol.—1986.—188, N 4.—Р. 49–61.
6. 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.
7. Towler T., Rey M. W., Vaha-Vahe P., Power S. D., Berka The catR gene encoding a catalase from *Aspergillus niger*: primary structure and elevated expression through increased gene copy number and use of a strong promoter // Mol. Biol.—1993.—9, N 5.—Р. 989–998.
8. Kawasaki L., Wysong D., Diamond R., Aguirre J. Two divergent catalase genes are differentially regulated during *Aspergillus nidulans* development and oxidative stress // J. Bacteriol.—1997.—179, N 10.—Р. 3284–3292.
9. Haber J. E., Koshland D. E. An evolution of the relatedness of proteins based on comparison of amino acid sequences // J. Mol. Biol.—1970.—50.—Р. 617–639.

УДК 577.112.5

Надійшла до редакції 06.07.2000