



УДК 577.152.111\*16'1

## ПОЛНАЯ АМИНОКИСЛОТНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ КАТАЛАЗЫ ГРИБА *Penicillium vitale*

© 1998 г. Э. А. Козлов<sup>#</sup>, Т. Л. Левитина, М. Т. Бобровская,  
Л. В. Гудкова\*, Н. В. Латышко\*, Н. Ф. Радомский

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины,  
252627, Киев-143, ул. Заболотного, 150;

\*Институт биохимии им. А.В. Палладина НАН Украины, Киев  
Поступила в редакцию 20.02.97 г. Принята к печати 05.11.97 г.

На основании строения 76 триптических пептидов немодифицированной каталазы *Penicillium vitale*, 63 триптических пептидов каталазы, модифицированной по остаткам лизина, 48 пептидов, полученных путем расщепления каталазы протеиназой из *Staphylococcus aureus* V8, 9 бромциановых фрагментов, а также путем сравнения со строением других каталаз реконструирована полипептидная цепь каталазы *P. vitale*, содержащая 696 остатков аминокислот.

*Ключевые слова:* каталаза, фрагменты полипептидной цепи, аминокислотная последовательность, гомология белков.

Каталаза (КФ 1.11.1.6) – фермент, катализирующий деградацию перекиси водорода, – обнаружена практически во всех микроорганизмах и тканях растительного и животного происхождения. Ряд уникальных каталитических и биологических свойств этого фермента объясняет не только научный, но и практический интерес к его структурно-функциональным исследованиям. Модификация методами генной инженерии каталаз с известными аминокислотными последовательностями может дать положительные результаты не только для исследования не полностью выясненного механизма действия ферментов этого класса, но и для изменения “протекторных” и других биохимических свойств каталаз, нашедших широкое применение в медицине [1].

Каталаза *Penicillium vitale* по сравнению с другими 20 каталазами с известными аминокислотными последовательностями [2] представляет особый научный интерес. Только три из этих каталаз, *P. vitale* [3], *Escherichia coli* [4] и *Mycobacterium avium* [5], содержат около 700 а. о. (соответственно 696, 753 и 706), в то время как остальные – около 500 а. о. Как показали рентгеноструктурные исследования каталаз печени быка *Bos primigenius* и *P. vitale* [3], последняя имеет дополнительный С-концевой “флаводоксинаподобный” домен, содержащий около 170 а. о., роль которого неясна.

Исследования первичной структуры *P. vitale* проводились параллельно в Институте молекулярной биологии и генетики, Институте биохимии НАН Украины (химические исследования) и Институте кристаллографии РАН и лабораториях молекулярной биологии (Гамбург, Германия) и Университете Purdue (Западный Лафайет, США) (рентгеноструктурный анализ). Наиболее вероятная аминокислотная последовательность каталазы *P. vitale*, установленная при помощи рентгеноструктурного анализа с разрешением 2 Å, была представлена в 1986 г. [3].

Ранее нами было опубликовано несколько работ по частичному строению триптических пептидов немодифицированной [6] (Т-пептиды) и модифицированной по остаткам лизина [7] (Тm-пептиды) каталазы *P. vitale*, ее бромциановых (BrCN) фрагментов [8] и Sp-пептидов, полученных путем расщепления каталазы протеиназой *Staphylococcus aureus* V8 [9]. Мы продолжили исследования по выделению и определению аминокислотной последовательности пептидов всех перечисленных групп.

В результате из триптического гидролизата немодифицированной каталазы было выделено 76 пептидов. Аминокислотные последовательности 13 из них перекрываются другими пептидами. 63 пептида с уникальными аминокислотными последовательностями насчитывают 584 а. о. Это составляет 83% длины полипептидной цепи белка, установленной согласно данным рентгеноструктурного анализа [3].

<sup>#</sup> Автор для переписки.

Возникновение пептидов с перекрывающимися последовательностями обусловлено двумя причинами. Во-первых, имело место либо предварительное расщепление каталазы химотрипсиноподобной протеиназой в процессе выделения или хранения (как правило, выходы неспецифических Т-пептидов из предварительно расщепленной каталазы были сопоставимы с выходами специфических Т-пептидов), либо расщепление примесью химотрипсина в препаратах трипсина (выходы этих Т-пептидов очень низки). На основании очень низкого выхода специфического пептида Т6 (384–407) и очень высокого выхода (даже выше выхода некоторых специфических триптических пептидов) двух пептидов (Т6<sup>1</sup> и Т6<sup>2</sup>), перекрывающихся пептидом Т6, была установлена наиболее уязвимая для химотрипсиноподобной протеиназы связь Phe395–Ala396 (обозначена стрелкой на рис. 1), расщепляемая в процессе выделения или хранения каталазы. Такое расщепление было подтверждено электрофорезом препаратов каталазы в полиакриламидном геле (данные не иллюстрированы).

Во-вторых, появление перекрывающихся триптических пептидов объясняется микрогетерогенностью препаратов каталазы, получаемых нами из культуральной жидкости промышленного производства [10]. Микрогетерогенность была нами обнаружена в результате выделения пар идентичных Т-пептидов, содержащих аминокислотные замены (Т1 (469–496), Т23 (376–383), Т36 (576–580), Т47 (430–439)). Мажорным специфическим Т-пептидам, не содержащим остатки лизина при аргинина внутри цепи (Т1, Т23, Т47), соответствовали по два минорных специфических Т-пептида (Т1<sup>1</sup> и Т1<sup>2</sup>, Т23<sup>1</sup> и Т23<sup>2</sup>, Т47<sup>1</sup> и Т47<sup>2</sup>), образовавшихся благодаря заменам соответственно А488R, Р377R и V432K. Пары пептидов, содержащих аминокислотные замены, были обнаружены нами и среди Тm-пептидов (Тm1 (217–247), Тm5 (67–94), Тm9 (248–288), Тm12 (95–101), Тm13 (411–418), Тm15 (21–36), Тm16 (102–109), Тm19 (1–8), Тm23 (376–383), Тm24 (361–375), Тm34 (350–360), Тm38 (165–176)) и Sp-пептидов (Sp3 (186–220), Sp8 (1–9), Sp11 (273–293), Sp14 (404–420), Sp21 (484–489), Sp22 (317–323)).

Из триптического гидролизата каталазы, модифицированной малеиновым ангидридом по остаткам лизина, было выделено 63 пептида, 40 из которых содержали уникальные неперекрывающиеся аминокислотные последовательности, насчитывающие в сумме 650 остатков (93% длины полипептидной цепи, реконструированной по данным рентгеноструктурного анализа [3]). Большое количество Тm-пептидов с перекрывающимися последовательностями объясняется не только предварительным расщеплением белка и его микрогетерогенностью, но и неполнотой малеилирования (в 12 Тm-пептидах С-концевым ос-

татком является лизин). Следует отметить, что и среди Тm-пептидов было выделено с выходом, сравнимым с выходами специфических пептидов, два пептида: Тm10<sup>1</sup> (384–395) и Тm10<sup>2</sup> (396–407), образующихся в результате расщепления в пептиде Тm10 (384–407) неспецифической для трипсина связи Phe395–Ala396.

После расщепления каталазы протеиназой V8 было выделено 48 пептидов, 28 из которых имеют уникальные неперекрывающиеся аминокислотные последовательности, содержащие 405 а.о. (61% длины полипептидной цепи, полученной по данным рентгеноструктурного анализа [3]). В основном протеиназа V8 расщепляла специфические для нее связи Glu–Xaa. Достаточно эффективно она воздействовала также на некоторые связи, образованные остатками аспарагиновой кислоты и гидрофобных аминокислот. Среди них один пептид Sp20 (388–395) (рис. 1) образовался путем неспецифического расщепления связи Phe395–Ala396 с очень высоким выходом для Sp-пептидов (50%). Таким образом, на пептидах трех типов было доказано существование в каталазе одной наиболее доступной для ферментов и гидролизующейся с высокой эффективностью связи – Phe395–Ala396. Интерес вызывает локализация этой связи на пространственной модели каталазы, построенной по данным рентгеноструктурного анализа [3].

И наконец, из продуктов расщепления каталазы бромцианом было выделено 9 фрагментов, насчитывающих в сумме 477 а.о. (68% длины полипептидной цепи [3]).

Таким образом, совокупность всех данных по строению пептидов и фрагментов четырех типов расщепления каталазы (Т, Тm, Sp, Bc) и их субфрагментов позволила нам в основном с оптимальным перекрытием (не менее четырех остатков) реконструировать три фрагмента полипептидной цепи каталазы: 1 – 301, 302–468, 469–696. Только в семи местах этих фрагментов получено перекрытие меньшего числа остатков: в N-концевом фрагменте из 301 а.о. в двух местах имеется перекрытие только трех остатков и еще в одном месте – двух; во фрагменте 302–468 в двух местах достигнуто перекрытие только двух остатков и в одном месте – одного; в третьем, С-концевом фрагменте только в одном положении достигнуто перекрытие двух остатков.

На основании сравнения со структурами других гомологичных каталаз [2, 5, 11–13] реконструирована полная аминокислотная последовательность исследуемого фермента, содержащая в своем составе 696 остатков (рис. 1), что на 26 остатков превышает длину полипептидной цепи, полученной по данным рентгеноструктурного анализа [3]. Три фрагмента занимают на поли-

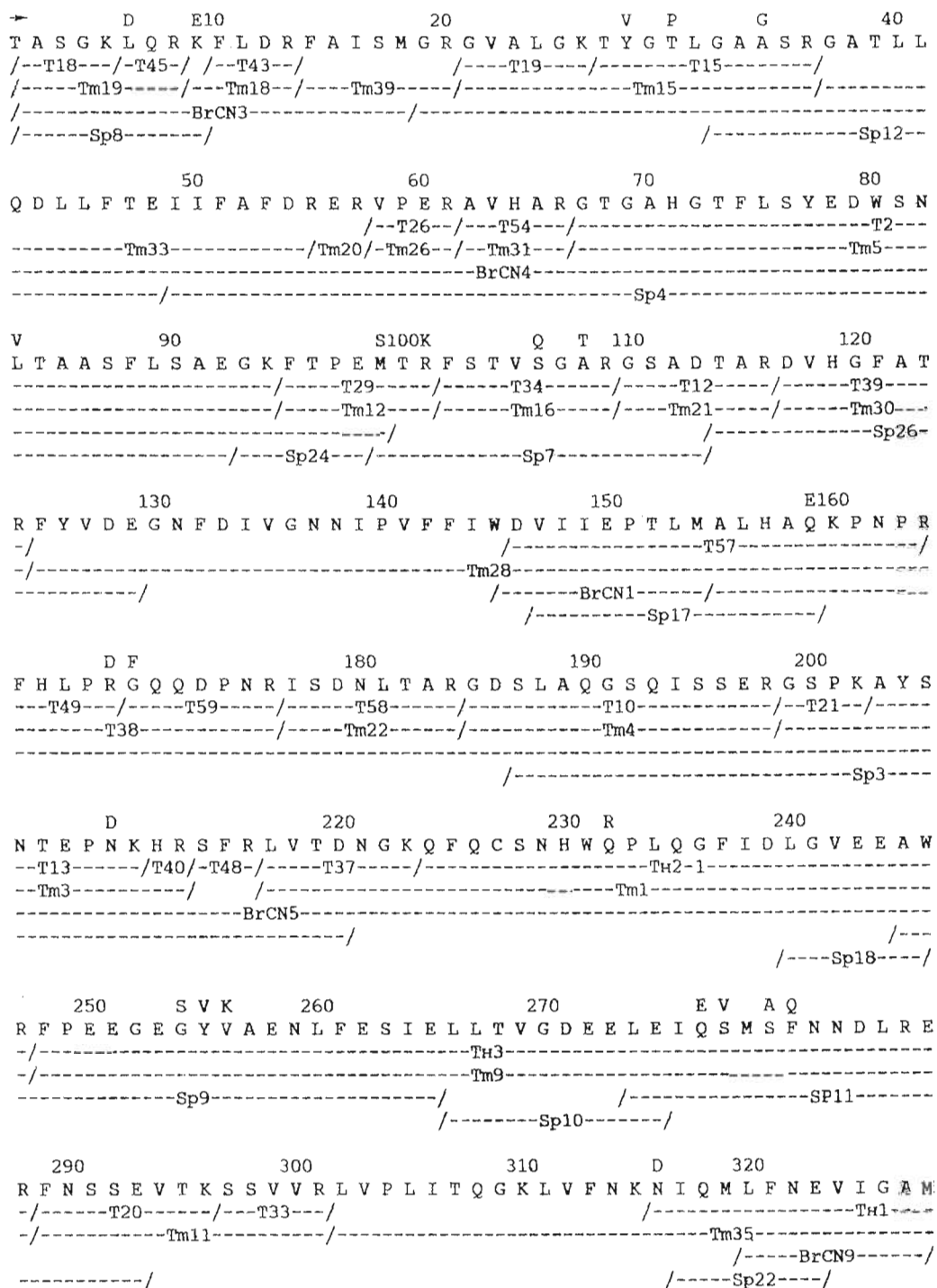


Рис. 1. Схема реконструкции полипептидной цепи каталазы *P. vitale*. Вертикальной стрелкой показана наиболее уязвимая для протеиназ связь (395–396). Остатки над последовательностью отражают микрогетерогенность белка.

пептидной цепи положения 1–301, 302–469, 470–696.

На схеме реконструкции приведены только пептиды и фрагменты всех четырех типов расщепления, содержащие уникальные последова-

тельности. Пептиды Тн1 (316–336), Тн2-1 (224–247), Тн3 (247–288) получены из нерастворимой фракции триптического гидролизата немодифицированной каталазы. Все пептиды и субфрагменты с перекрывающимися последовательностями не приводятся, хотя они были очень важны

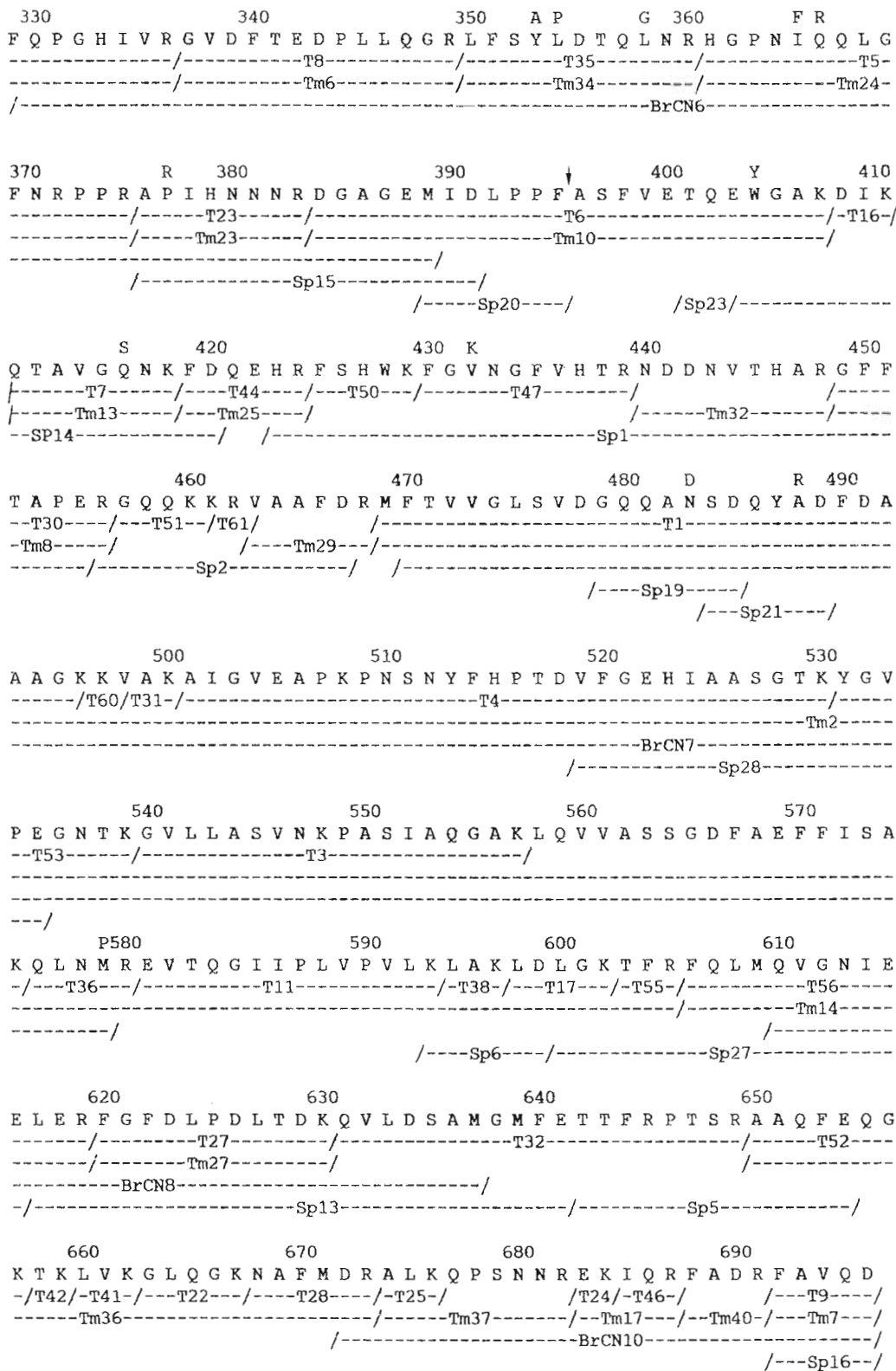


Рис. 1. Окончание.

для установления полной аминокислотной последовательности каталазы. N-Концевым остатком каталазы определен треонин. Остатки аминокислот в 34 положениях над аминокислотной последовательностью отражают микрогетерогенность препаратов каталазы, использованных в исследованиях. Как сказано выше, наличие микрогетерогенности следовало из обнаружения замен в некоторых парах аминокислот соответствующих пептидов. Замены остатков Asp и Gln на остатки Asp и Glu в положениях 159, 211, 277, 316, 483 были обнаружены при исследовании соответствующих Sp-пептидов. Однако нельзя исключить, что в процессе выделения пептидов возможен гидролиз амидов, и поэтому нельзя утверждать, что замены в этих положениях обусловлены именно микрогетерогенностью белка.

Исходя из реконструированной аминокислотной последовательности каталазы *P. vitale* нами получен ее аминокислотный состав: Asp (40), Asp (38), Thr (38), Ser (41), Glu (41), Gln (41), Pro (32), Gly (60), Ala (59), Cys (1), Val (45), Met (13), Ile (29), Leu (53), Tyr (9), Phe (54), Trp (6), His (16), Lys (36), Arg (44). Молекулярная масса, подсчитанная на основании последнего, составляет 77309, что совпадает с молекулярной массой, полученной по данным электрофореза в полиакриламидном геле (75–80 кДа) [10].

В настоящее время в мире известна первичная структура 25 каталаз различного происхождения [2, 5, 11–13]. Первичная структура только одной из них (печени быка) установлена, как и для каталазы *P. vitale*, химическими методами [14]. Для этих двух каталаз по данным рентгеноструктурного анализа при разрешении 2 Å построена пространственная модель [3]. Для каталазы *P. vitale* “выписана” также наиболее вероятная “рентгеноструктурная” аминокислотная последовательность [3]. Как сказано выше, согласно этим данным, каталаза *P. vitale* имеет дополнительный по сравнению с *B. primigenius* C-концевой домен, сходный по пространственной структуре с флаводоксином.

В силу громоздкости рисунка мы не можем привести сравнение аминокислотной последовательности каталазы *P. vitale* с аминокислотными последовательностями всех 25 каталаз. 20 из них сравниваются в работе [2]. Мы же на рис. 2 приводим сравнение каталазы *P. vitale* только с тремя каталазами. Выбор каталаз для сравнения не случаен: с первичной структурой каталазы печени быка (*B. primigenius*) сравнивается “наиболее вероятная рентгеноструктурная” аминокислотная последовательность каталазы *P. vitale* [3], а каталазы из *E. coli* и *M. avium* имеют, по-видимому, так же как и каталаза из *P. vitale*, дополнительный “флаводоксиноподобный” C-концевой домен, так как они, согласно рис. 2, тоже с C-конца

соответственно на 181 и 187 а. о. длиннее, чем каталаза из печени быка (каталаза *P. vitale* длиннее на 184 остатка).

Для расчета степени родства первичной структуры каталазы *P. vitale* с аминокислотными последовательностями сравниваемых каталаз мы применили метод Хабера и Кошланда [16], разбив гомологичные аминокислоты на следующие группы: Val, Met, Ile, Leu (гидрофобные); Phe, Tyr, Trp (ароматические), Lys, Arg (основные); Asp, Glu (кислые), Asp, Gln (амиды); Ser, Thr (окси). Для максимизации степени родства в сравниваемых на рис. 2 последовательностях допущены делеции (обозначены черточками). Степень родства (таблица) выражена в процентах числа соответствий от общего числа сравниваемых остатков. Число соответствий равно сумме идентичных и гомологичных остатков.

В таблице приведены степени родства не только полипептидных цепей (колонка P) различных пар из четырех сравниваемых на рис. 2 каталаз, но и их отдельных участков: C-концевых (колонка C), равных по величине дополнительному C-концевому домену каталаз *P. vitale*, *E. coli* и *M. avium*, и равных по величине C-концевым фрагментам участков в N-концевом домене (колонка N) (расположение их показано знаками < и >). C-Концевой участок “короткой” каталазы *B. primigenius* сравнивался с соответствующими ему по рис. 2 участками трех других каталаз. Как видно из таблицы, степень родства полипептидных цепей (P) колеблется в значительном диапазоне (37–59%).

Число идентичных и гомологичных остатков для всех четырех сравниваемых белков (обозначены на рис. 2 плюсом и звездочкой соответственно) составляет 28%. Очевидно, что каталазы нельзя отнести к консервативным белкам. И тем не менее в полипептидных цепях определенно можно выделить более консервативный участок в N-концевом домене (N) и вариабельный (C) (см. таблицу). Если степень родства N-участков колеблется от 55 до 78%, то C-участков – от 21 до 42%. Для группы из четырех белков степень родства N-участков равна 42%, а C-участков – 16%. Как видим, N- и C-участки различаются по степени родства вдвое. Если высокая степень родства N-участков может быть объяснена наличием аминокислот, входящих в активный центр, то низкая степень родства первичных структур дополнительных C-концевых доменов “длинных” каталаз (или C-концевых участков “коротких” каталаз), вероятно, отражает их незначительную роль в функционировании белков. Однако известно, что флаводоксины не обладают высокой степенью родства первичной структуры. Очевидно, в этом случае важно сходство структур высшего порядка. С этой точки зрения интересно было выяснить пространственную структуру



Степени родства полипептидных цепей (P) каталазы и их N- и C-участков\*

Каталаза	Степень родства, %								
	<i>M. avium</i>			<i>E. coli</i>			<i>B. primigenius</i>		
	P	N	C	P	N	C	P	N	C
<i>E. coli</i>	59	78	26						
<i>B. primigenius</i>	50	62	28	52	66	38			
<i>P. vitale</i>	37	56	21	42	55	32	48	57	42

\* Приведена степень родства пар каталаз для полипептидных цепей (P) и их участков из C-концевых (C) и N-концевых (N) доменов, равных по величине дополнительному C-концевому домену "длинных" каталаз.

каталазы *E. coli* и *M. avium* (особенно их дополнительных C-концевых доменов).

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Очистка каталазы, получение апофермента, расщепление его трипсином и разделение пептидов описаны нами ранее [10, 17, 18]. Малеилирование каталазы, расщепление малеилкаталазы трипсином, снятие защитных групп и разделение пептидов описаны ранее [19]. Расщепление каталазы протеиназой из *S. aureus* V8 и разделение пептидов описаны нами в [20], расщепление пептидов бромцианом и разделение фрагментов – в статье [21].

В работе использовали трипсин (Worthington, США), химотрипсин (Spofa, Чехо-Словакия), термолизин (Serva, Германия), протеиназу V8 (Miles, Англия), дансилхлорид (Serva, Германия), бумагу FN17 (Filtrak, Германия), реактивы отечественного производства квалификации х.ч. и ос.ч. без очистки или с дополнительной очисткой по стандартным методикам. Расщепление пептидов ферментами проводили в 0.2 н. бикарбонате аммония, pH 8.0, при 37°C в течение 4–6 ч. Окисление некоторых пептидов осуществляли по методу Хирса [22].

Высокомолекулярные пептиды и фрагменты дополнительно субфрагментировали химотрипсином (T-пептиды и Bc-фрагменты), термолизинном (T-пептиды), трипсином (Tm-, Sp-пептиды, Bc-фрагменты). Субфрагменты разделяли высоковольтным электрофорезом и хроматографией на бумаге.

Хроматографию на бумаге проводили в системе изоамиловый спирт – пиридин – вода (35 : 35 : 30). Высоковольтный электрофорез на бумаге осуществляли в электролитах с pH 6.5 и 1.9, как описано в работе [21].

N-Концевую последовательность пептидов (более 10 остатков) определяли с помощью секвенатора 890 C (Beckman, США) с последующей идентификацией фенилтиогидантоинов аминокислот в системе ВЭЖХ (Pharmacia, Швеция), а

также ручным методом Эдмана [23] с идентификацией аминокислот в виде Dns-производных.

N-Концевую аминокислоту в пептидах определяли Dns-методом [24]. Dns-аминокислоты идентифицировали на пластинках с полиамидом [25]. В некоторых случаях для раскрытия пирролидон-карбонового кольца N-концевого остатка пироглутаминовой кислоты в пептидах применяли методику, предложенную Мурановой [26]. Для предотвращения циклизации остатка глутамина в середине пептида при деградации использовали методику, описанную Винтер [27]. Аминокислотный состав определяли на анализаторах аминокислот BC 200 (Biocal, Германия) и ААА 339 (Чехо-Словакия). Остатки глутаминовой, аспарагиновой аминокислот и их амидов идентифицировали в виде фенилтиогидантоинов по методу, описанному в работе [28], или по подвижности пептида при высоковольтном электрофорезе при pH 6.5. Триптофан определяли по реакции Эрлиха [29].

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Мирошниченко О.С. // Биополимеры и клетка. 1992. Т. 8. С 3–25.
2. Ossovski I., Hausner G., Loewan P.C. // J. Mol. Evol. 1993. V. 37. P. 71–76.
3. Vainshtein B.K., Melik-Adamyany W.R., Barynin V.V., Vagin A.A., Grebenko A.I., Borisov V.V., Bartels K.S., Fita I., Rossman M.G. // J. Mol. Biol. 1986. V. 188. P. 49–61.
4. Ossovski I., Mulvey M.R., Leco P.A., Borys A., Loewan P.C. // J. Bacteriol. 1991. V. 173. P. 514–520.
5. Milano A., De Rossi E., Gusherty L., Heym B., Marone P., Riccardi G. // Mol. Microbiol. 1996. V. 19. P. 113–123.
6. Козлов Э.А., Гудкова Л.В., Левитина Т.Л., Кириленко М.Т., Мирошниченко О.С. // Биополимеры и клетка. 1993. Т. 9. С. 22–25.
7. Левитина Т.Л., Бобровская М.Т., Гусак Н.М., Мирошниченко О.С., Гудкова Л.В., Латышко Н.В., Козлов Э.А. // Биополимеры и клетка. 1993. Т. 9. С. 42–45.

8. Козлов Э.А., Левитина Т.Л., Бобровская М.Т., Роднин Н.В., Мирошниченко О.С., Латышко Н.В., Гудкова Л.В. // Биополимеры и клетка. 1994. Т. 10. С. 45–48.
9. Бобровская М.Т., Латышко Н.В., Левитина Т.Л., Мирошниченко О.С., Гудкова Л.В., Козлов Э.А. // Биополимеры и клетка. 1994. Т. 10. С. 49–51.
10. Гудкова Л.В., Кириленко М.Т., Левитина Т.Л., Козлов Э.А. // Укр. биохим. журн. 1985. Т. 57. С. 29–33.
11. Bethards L.A., Skadsen R.W., Scandalios J.G. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1987. V. 84. P. 6830–6834.
12. Redinlaugh M.G., Wadsworth G.J., Scandalios J.G. // Biochim. Biophys. Acta. 1988. V. 951. P. 104–116.
13. Bishai W.R., Smith H.O., Barcak G.J. // J. Bacteriol. 1994. V. 176. P. 2914–2921.
14. Schroeder W.A., Shelton J.R., Shelton J.B., Robberston B., Apell G., Fang R.S., Bonaventura J. // Arch. Biochem. Biophys. 1982. V. 214. P. 397–421.
15. Fita I., Rossman M.G. // J. Mol. Biol. 1985. V. 85. P. 21–37.
16. Haber J.E., Koschland D.E. // J. Mol. Biol. 1970. V. 50. P. 617–639.
17. Козлов Э.А., Кириленко М.Т., Левитина Т.Л., Гудкова Л.В., Дегтярь Р.Г., Солодова Е.В. // Биополимеры и клетка. 1987. Т. 3. С. 240–245.
18. Кириленко М.Т., Левитина Т.Л., Гудкова Л.В., Дегтярь Р.Г., Козлов Э.А. // Биополимеры и клетка. 1988. Т. 4. С. 40–43.
19. Левитина Т.Л., Мирошниченко О.С., Гудкова Л.В., Бобровская М.Т., Латышко Н.В., Козлов Э.А. // Биополимеры и клетка. 1993. Т. 9. С. 3–8.
20. Латышко Н.В., Левитина Т.Л., Мирошниченко О.С., Гудкова Л.В., Козлов Э.А. // Биополимеры и клетка. 1993. Т. 9. С. 38–41.
21. Левитина Т.Л., Гусак Н.М., Роднин Н.В., Кириленко М.Т., Мирошниченко О.С., Атепалихина С.А., Гудкова Л.В., Козлов Э.А. // Биополимеры и клетка. 1989. Т. 5. С. 55–63.
22. Hirs C.H.W. // Methods Enzymol. 1967. V. 11. P. 59–62.
23. Gray W.R. // Methods Enzymol. 1967. V. 2. P. 469–475.
24. Gray W.R. // Methods Enzymol. 1972. V. 25. P. 121–128.
25. Решетов П.Д., Честухина Т.Г., Махмудов С., Пышкина А.С. // Химия природн. соединений. 1971. С. 66–68.
26. Муранова Т.А., Муранов А.В. // Биоорган. химия. 1979. Т. 5. С. 1007–1010.
27. Практическая химия белка: Пер. с англ. М.: Мир, 1989. С. 621.
28. Kulbe K.D. // Anal. Biochem. 1974. V. 59. P. 564–573.
29. Easley C.E. // Biochim. Biophys. Acta. 1965. V. 107. P. 386–388.

### The Complete Amino Acid Sequence of the Catalase from *Penicillium vitale*

**E. A. Kozlov\***, **T. L. Levitina\***, **M. T. Bobrovskaya\***, **L. V. Gudkova\*\***,  
**N. V. Latyshko\*\***, and **N. F. Radomskii\***

\**Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine,  
ul. Zabolotnogo 150, Kiev 143, 252627 Ukraine*

\*\**Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev*

The polypeptide sequence of the unmodified catalase from *Penicillium vitale* containing 696 amino acid residues was deduced. The sequences of 76 tryptic peptides of the unmodified catalase, 63 tryptic peptides of the catalase with modified Lys residues, 48 peptides resulting from catalase cleavage by the *Staphylococcus aureus* V8 protease, and 9 fragments obtained by BrCN-treatment were considered, and a comparison with the sequences of other catalases was made.

*Key words: catalase, polypeptide chain fragments, amino acid sequence; protein homology*