

Аминокислотная последовательность вокруг остатка цистеина каталазы гриба *Penicillium vitale*

О. С. Мирошниченко, Т. Л. Левитина, М. Т. Бобровская, Э. А. Козлов

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

*В работе показано, что полипептидная цепь субъединицы каталазы гриба *P. vitale* содержит один остаток цистеина. Получены пять пептидов из участка белка, включающего цистеин. Выяснено строение этих пептидов. Реконструирована аминокислотная последовательность участка белка, насчитывающая 31 аминокислотный остаток и содержащая остаток цистеина.*

Введение. Ранее нами был определен аминокислотный состав каталазы [1] и частично изучены пептиды, полученные расщеплением ее трипсином [2—5], стафилококковой протеазой [6] и бромцианом [7]. Однако ни в одном из исследованных фрагментов остаток цистеина идентифицирован не был, так как выяснение аминокислотного состава белка и аминокислотной последовательности пептидов проводилось на белке, не модифицированном по цистеину. Для определения содержания цистеина, выявления цистеинсодержащего фрагмента и определения аминокислотной последовательности вокруг остатка цистеина мы применили метод ковалентной хроматографии каталазы [8] с последующим расщеплением белка химотрипсином.

Материалы и методы. Каталазу получали по методу [1]. Носитель для ковалентной хроматографии и иммобилизации белка активировали, как описано в работе [9]. К 2,2 г пористого стекла CPG/Thiol («Pierce», США) добавляли 10 мл 0,1 М аммоний-бикарбонатного буферного раствора, pH 8,0, содержащего 50 мМ дитиотреитол («Sigma», США) и 3 мМ EDTA. NaCl, выдерживали 4 ч при 40 °С, после чего носитель промывали на фильтре водой, содержащей 3 мМ ЭДТА.NaCl, затем 50 и 100 %-м метанолом. К влажному стеклу добавляли 10 мл раствора 2,2'-дипиридилдисульфида («Aldrich», США). Для приготовления этого раствора к 100 мг реагента приливали 5 мл абсолютного этанола, затем по каплям при перемешивании добавляли 5 мл 0,2 М аммоний-бикарбонатного буферного раствора, pH 8,0, содержащего 3 мМ EDTA.NaCl. Носитель с добавленным к нему раствором выдерживали при комнатной температуре при встряхивании в течение 30 ч. Активированный носитель промывали 100 %-м метанолом и высушивали на воздухе.

Все растворы, необходимые для активации носителя, а также для иммобилизации и расщепления белка, дегазировали и насыщали гелием.

Для иммобилизации к активированному носителю добавляли 4 мл 0,1 М трис-HCl-буферного раствора, pH 8,0, содержащего 6 М мочевины,

*Correspondence address.

затем 100 мг каталазы, растворенной в том же буфере. Иммунизацию проводили при встряхивании (4 ч) при комнатной температуре. Носитель с иммобилизованным белком промывали несколькими порциями буфера для иммобилизации, водой, 50 и 100 %-м метанолом, высушивали на воздухе.

Иммобилизованную каталазу расщепляли химотрипсином («Serpa», ФРГ) в растворе 0,1 М NH_4HCO_3 , pH 8,0. Химотрипсин (1 мг) добавляли в два приема, выдерживали при 37 °С в течение 6 ч, после чего конъюгат промывали 0,1 М NH_4HCO_3 , pH 8,0, с 6 М мочевиной, затем тем же раствором без мочевины.

«Снятие» цистеинсодержащих пептидов проводили в 6 мл 0,1 М раствора NH_4HCO_3 , содержащего 20 мМ β -меркаптоэтанола, при комнатной температуре в течение 30 мин, затем носитель промывали еще 4 мл того же раствора. «Снятые» пептиды лиофилизировали.

Цистеинсодержащие пептиды разделяли высоковольтным электрофорезом на бумаге при pH 1,9, как описано в [10]. Триптические пептиды получали по [2, 4, 10].

Окисление белка и пептидов осуществляли по методу Хирса [11].

Аминокислотный состав определяли на анализаторе аминокислот Biothronik LC-7000 («Biothronik», ФРГ), как описано [2].

Аминокислотную последовательность определяли ручным методом дансил-Эдман с идентификацией ДНС-аминокислот на полиамидных пластинках [13] или с помощью секвенатора.

Результаты и обсуждение. В результате определения аминокислотного состава окисленной каталазы было выявлено 0,3 остатка цистеиновой кислоты на субъединицу белка. Отсюда можно предположить, что субъединица каталазы с молекулярной массой (м. м.) 75000 [1] содержит не более одного остатка цистеина. Для доказательства этого предположения мы предприняли попытку выделить цистеинсодержащий химотриптический пептид. Немодифицированный белок иммобилизовали на активированном носителе, расщепляли химотрипсином, свободные пептиды удаляли промыванием, а затем «снимали» иммобилизованный цистеинсодержащий материал, как описано в методической части. Этот материал окисляли и разделяли высоковольтным электрофорезом при pH 1,9. В результате химотриптического гидролиза получены два пептида, содержащих цистеиновую кислоту. Определены аминокислотный состав и аминокислотная последовательность этих пептидов.

ChC1: состав — CysSO_3H , Asp, Ser, Glu, His, Trp;
строение — ChC1. Gln-Cys-Ser-Asn-His-Trp;

ChC2: состав — CysSO_3H , Asp, Ser, Glu;
строение — ChC2. Gln-Cys-Ser-Asn.

Исходя из полученных данных можно заключить, что ChC1 и ChC2 образовались из одного и того же участка полипептидной цепи каталазы. Очевидно, субъединица каталазы содержит один остаток цистеина.

Для получения большего фрагмента белка, содержащего остаток цистеина, мы подвергли окислению три триптических пептида (Тн1—Тн3) [3], полученные ранее из нерастворимого материала [2]. Цистеиновая кислота обнаружена только в пептиде Тн2. После дополнительной очистки Тн2 высоковольтным электрофорезом при pH 1,9 были получены два пептида со следующими аминокислотными составами:

Тн2-1. CysSO_3H , Asp₂, Ser, Glu₆, Pro, Gly₂, Ala, Val, Ile, Leu₂, Phe₂, Trp^(*), His, Arg;

Тн2-1'. Asp, Glu₄, Pro, Gly₂, Ala, Val, Ile, Leu₂, Phe, Trp^(*), Arg.

Оба пептида были секвенированы. На пептиде Тн2-1 пройдено семь стадий: Gln-Phe-Gln-Cys-Ser-Asn-His-, на пептиде Тн2-1' — 10: Glu-Pro-Leu-Gln-Gly-Phe-Ile-Asp-Leu-Gly-.

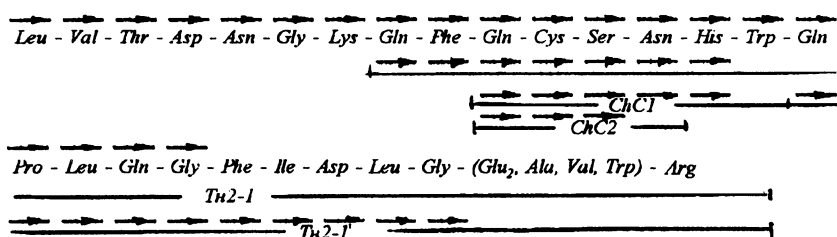


Схема выяснения аминокислотной последовательности цистеинсодержащего пептида каталазы гриба *P. vitale*. Стрелками указаны стадии деградации по методу Эдмана соответствующих пептидов

Как видно из аминокислотных последовательностей, пептид ChC1 входит в состав пептида Tn2-1, удлиняя его последовательность на остаток триптофана. Из сопоставления аминокислотных составов пептидов Tn2-1 и Tn2-1' следует, что состав Tn2-1 равен сумме состава Tn2-1' и состава N-концевой последовательности Tn2-1 плюс остаток триптофана. Tn2-1' занимает C-концевое положение в Tn2-1 и возник в результате неспецифического расщепления связи Trp-Glu при переварке каталазы трипсином. Этот вывод подтверждается дальнейшим исследованием триптического цистеинсодержащего пептида из малеил-каталазы. Ранее полученную из нерастворимого материала триптического гидролизата малеил-каталазы смесь пептидов Tm40, Tm52, Tm53 (4,5) окисляли и разделяли высоковольтным электрофорезом на бумаге при pH 1,9, вследствие чего был получен один цистеинсодержащий пептид с составом: CysSO₃H, Asp₄, Thr, Ser, Glu₆, Pro, Gly₃, Ala, Val₂, Ile, Leu₃, Phe₂, Trp₂, His, Lys, Arg. На пептиде с помощью секвенатора пройдено 20 стадий.

На основании выясненной N-концевой последовательности пептида, представленного на рисунке, можно сделать вывод о том, что данный пептид и пептиды ChC1, Tn2-1, Tn2-1 образуются из одного участка полипептидной цепи каталазы. На рисунке обозначены все вышеописанные пептиды, входящие в этот участок.

О. С. Мірошніченко, Т. Л. Левітіна, М. Т. Бобровська, Е. А. Козлов

Амінокислотна послідовність навкруги залишку цистеїну каталази гриба *Penicillium vitale*

Резюме

У роботі показано, що поліпептидний ланцюг субодиниці каталази гриба *P. vitale* містить один залишок цистеїну. Отримано п'ять пептидів з ділянки білка, що містить цистеїн. З'ясовано будову цих пептидів. Реконструйовано амінокислотну послідовність ділянки білка, що нараховує 31 амінокислотний залишок та вміщує залишок цистеїну.

O. S. Miroshnitchenko, T. L. Levitina, M. T. Bobrovskaya, E. A. Kozlov

The amino acid sequence around the cystein residue of *Penicillium vitale* catalase

Summary

The *P. vitale* catalase polypeptide chain was shown to contain 1 residue of cystein. 5 peptides from the polypeptide chain region containing the cystein residue were obtained and their structure was elucidated. The amino acid sequence around the cystein residue, including 31 amino acid residues, was reconstructed.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гудкова Л. В., Кириленко М. Т., Левитина Т. Л., Козлов Э. А. Исследование субъединичной структуры каталазы *Penicillium vitale* // Укр. биохим. журн.—1985.—57, № 4.—С. 29—33.
2. Кириленко М. Т., Левитина Т. Л., Гудкова Л. В. и др. Триптические пептиды каталазы гриба *Penicillium vitale*. 2. Разделение и аминокислотный состав нерастворимых пептидов // Биополимеры и клетка.—1988.—4, № 1.—С. 40—43.
3. 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. 2—5.
4. Левитина Т. Л., Мирошниченко О. С., Гудкова Л. В. и др. Триптические пептиды малеил-каталазы гриба *Penicillium vitale*. 1. Выделение и аминокислотный состав // Там же.—№ 2.—С. 3—8.
5. 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.
6. Бобровская М. Т., Латышко Н. В., Левитина Т. Л. и др. Строение некоторых пептидов, полученных расщеплением каталазы гриба *Penicillium vitale* стафилококковой протеазой // Там же.—1994.—10, № 2.—С. 49—51.
7. Козлов Э. А., Левитина Т. Л., Бобровская М. Т. и др. Дополнительное исследование бромциановых фрагментов каталазы гриба *Penicillium vite* // Там же.—С. 45—48.
8. Егоров Ц. А., Шахпоронов М. И., Давидович Ю. А. и др. Получение нерастворимого носителя с активированной SH-группой и его использование в химии белка // Биоорг. химия.—1977.—3, № 8.—С. 1111—1116.
9. Овчинников Ю. А., Абдулаев Н. Г., Богачук А. С. Использование ковалентной хроматографии в исследовании структуры мембранных белков // Биол. мембраны.—1985.—2, № 10.—С. 962—975.
10. Козлов Э. А., Кириленко М. Т., Левитина Т. Л. и др. Триптические пептиды каталазы гриба *Penicillium vitale*. 1. Разделение и аминокислотный состав растворимых пептидов // Биополимеры и клетка.—1987.—3, № 5.—С. 40—45.
11. Hirs C. H. W. Determination of cystein as cysteic acid // Meth. Enzymol.—1967.—11.—Р. 59—62.
12. Easley C. W. Combination of specific colour reactions useful in the peptide mapping techniques // Biochim. et biophys. acta.—1969.—107, N 2.—Р. 386—388.
13. Гусак Н. М., Овандер М. Н., Дробот Л. Б., Серебряный С. Б. Определение структуры пептидов комбинированным методом Дансил-Эдман // Методы молекуляр. биологии.—Киев: Наук. думка, 1979.—142 с.