

АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ БІООРГАНІЧНОЇ ХІМІЇ ТА НАСТОХІМІЇ

На правах рукопису
УДК 577.112.5

МИРОШНИЧЕНКО
ОЛЬГА САЛАВАТІВНА

ПЕРВИННА СТРУКТУРА КАТАЛАЗИ ГРИБА *PENICILLIUM VITALE*

02.00.10 - біоорганічна хімія, хімія природних та фізіологічно
активних речовин

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ - 1994

AB 29.244

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана у відділі молекулярних механізмів біосинтезу білка Інституту молекулярної біології та генетики АН України.

Наукові керівники - доктор біологічних наук
Е. А. Козлов

кандидат біологічних наук
Т. Л. Левітіна

Офіційні опоненти - доктор хімічних наук,
професор С. Б. Серебряний

кандидат біологічних наук
Л. О. Чернухіна

Провідна організація - Київський університет
ім. Т. Шевченка

Захист відбудеться "25" березня 1994 року на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 016.65.01 в Інституті біоорганічної хімії та нафтохімії АН України (253660, м. Київ, вул. Мурманська, 1).

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту біоорганічної хімії та нафтохімії АН України (253660, м. Київ, вул. Мурманська, 1).

Автореферат розісланий "25" лютого 1994 року.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради

Федорук

Д. М. Федорук

ЛНБ України ім. В. Стефаника



00801458 (Q)

ЛНБ ім. В. Стефаника
АН України

AB - 22, 22
ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність проблеми. Вивчення взаємозв'язку структури і функції ферментів є одним з найактуальніших напрямків у пізнанні хімічних основ життєдіяльності. Основою аналізу структурно-функціональних взаємовідносин є знання амінокислотної послідовності і просторової структури білка.

Дана робота являє собою дослідження, присвячене вивченню первинної структури каталази гриба *Penicillium vitale* (далі PVC).

Каталаза (EC 1.11.1.6 H_2O_2 : H_2O_2 оксидоредуктаза) - фермент, який міститься у клітинах переважної більшості аеробних організмів і здійснює розкладання перекису водню на воду і молекулярний кисень. Універсальність і ефективність ферменту роблять його безумовно цікавим об'єктом, структурно-функціональне дослідження якого дозволить наблизитися до розуміння механізму дії каталази, що бере участь в окислювально-відновлювальних реакціях організму.

На основі рентгеноструктурного аналізу (Vainshtein et al., 1986) було встановлено просторову структуру молекули PVC, що складається із чотирьох ідентичних субодиниць; хід поліпептидного ланцюга; елементи вторинної структури та запропоновано модель організації активного центра і можливу амінокислотну послідовність PVC. Очевидно, що для глибшого розуміння молекулярного механізму дії цього ферменту, окрім просторової структури, необхідно також знання достовірної амінокислотної послідовності.

У процесі реалізації основної функції каталаза поряд з іншими оксидоредуктазами (пероксидаза, супероксиддисмутаза) бере участь у захисті організму від агрубного впливу перекису водню та інших токсичних продуктів кисневого метаболізму. Протягом останніх років з'явилися перспективи різноманітного застосування препаратів каталази у широкому спектрі захворювань людини, а також у харчовій та хімічній промисловостях, що стимулює дослідження у напрямку спрямованої модифікації ферменту.

Мета та задачі дослідження. Метою даної роботи було з'ясування амінокислотної послідовності PVC хімічними методами, виявлення її

структурних особливостей та встановлення еволюційних взаємовідносин між досліджуваною каталазою та каталазами іншого походження.

В задачі даного дослідження входило:

1. Виділення та з'ясування будови трипептичних пептидів модифікованої по залишках лізину малеїновим ангідридом і немодифікованої каталази.
2. Вивчення будови бромціанових пептидів.
3. Реконструкція поліпептидного ланцюга PVC на основі будови виділених пептидів, а також порівняння їх з відомими первинними структурами інших каталаз.
4. З'ясування еволюційних взаємовідносин PVC з іншими каталазами.

Наукова новизна роботи. Вперше встановлено будову ряду трипептичних і бромціанових пептидів, які перекривають поліпептидний ланцюг PVC, що нараховує 697 амінокислотних залишків. Реконструйовано і локалізовано шість ділянок поліпептидного ланцюга каталази, які містять 557 амінокислотних залишків. З'ясовано еволюційні взаємовідносини для 16 каталаз різних таксономічних груп організмів.

Практична цінність роботи. Стримані результати можуть бути основою вивчення молекулярного механізму дії каталаз і цілеспрямованої модифікації ферменту методами генетичної інженерії. Результати дослідження можна використовувати також в курсах лекцій в учбових закладах.

Апробація матеріалів дисертації. Результати роботи доповідалися на VII і VIII Всесоюзних симпозіумах по хімії білків і пептидів (Таллін, 1987; Тбілісі, 1990); на школі-конференції "Структура і функція біополімерів" (Львів, 1989).

По матеріалах дисертації опубліковано 5 статей, список яких наведено в кінці автореферату.

Структура та об'єм роботи. Дисертація викладена на 92 сторінках машинописного тексту і складається із вступу, огляду літератури, матеріалів і методів, результатів та їх обговорення, заключення, висновків і списку цитованої літератури. Огляд літератури містить дані щодо фізіологічної ролі, фізико-хімічних і каталітичних властивостей, наяв-

ності ізоферментів, просторової структури, амінокислотних послідовностей каталази. Список літератури налічує 125 джерел. Дисертація включає 8 таблиць і 6 рисунків.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Препарати каталази люб'язно надані співробітниками Інституту біохімії АН України. У роботі використано наступні методи: модифікація білка за залишками лізину малеїновим ангідридом (Butler, Hartley, 1972), хімічне розщеплення білка бромціаном (Gross, Witkop, 1962) і частковим кислотним гідролізом, ферментативне розщеплення білка трипсином і хілотрипсином, модифікація білка малеїновим ангідридом. При розділенні сумішей пептидів використовували методи гелі-фільтрування, зворотно-фазової високоефективної рідинної хроматографії (HPLC), екстракції органічними розчинниками, високоефективного електрофорезу і хроматографії на папері. Застосовано також автоматичний та ручний методи секвенування (Гусак та ін., 1979), методи N-кінцевого і амінокислотного аналізу.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ І ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Раніше в нашій лабораторії розпочало вивчення триптичних пептидів FVC (Гусак та ін., 1989). Нами досліджено пептиди, отримані при розщепленні трипсином малеїл-каталази (Tm), бромціанові пептиди (BrCN), а також продовжено аналіз триптичних пептидів (T) немодифікованої каталази.

Триптичні пептиди малеїл-каталази. Субодинаця каталази містить по 30 амінокислотних залишків лізину і аргініну. При розщепленні трипсином малеїнованої каталази теоретично слід очікувати отримання 81 пептида. В результаті розщеплення було одержано дві фракції - розчинних і нерозчинних пептидів. Обидві фракції розділяли за посередництвом комбінації різних методів. Схеми розділення цих фракцій представлені на рис. 1 і 2 (цифрами після операцій гелі-фільтрування і HPLC позначено номери піків; цифрами в графі "в/в електрофорез" - число отриманих

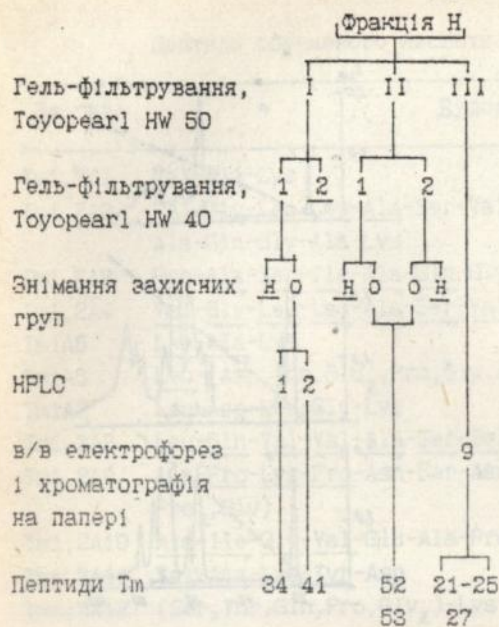


Рис.2. Схема розділення нерозчинної фракції Tm пептидів

фракцій; "о"- осад; "н"- надосадова рідина; підкреслено фракції, які в подальшому не досліджували; в графі "пептиди Tm" зазначено номери пептидів, отриманих внаслідок розділення).

На рис.3 представлено результати гель-фільтрування розчинних і нерозчинних пептидів.

В усіх фракціях пептидів, отриманих внаслідок гель-фільтрування, знімали захисні малеільні групи. У деяких випадках при цьому одержували осад, які відділяли від надосадової рідини. Отримані таким чином 30 фракцій розділяли далі методами екстракції органічними розчинниками, зворотно-фазової HPLC, високовольтного електрофорезу та хроматографії на папері. Результати фракціонування методом HPLC наведено на рис.4.

В результаті розділення отримано 210 фракцій, гомогенність яких контролювали N-кінцевим та амінокислотним аналізами, а декотрих - електрофорезом в ПААГ.

Внаслідок розділення одержано 48 індивідуальних пептидів, побудову яких з'ясовували ручним методом секвенування (до 10 стадій) і автоматичним секвенуванням. Великі пептиди додатково субфрагментували трипсином і обмеженим кислотним гідролізом (пептиди Tm1 і Tm2). Субфрагменти після розділення високовольтним електрофорезом і хроматографією на папері секвенували. Триптичні субфрагменти Tm пептидів не наводяться, а пептиди (A), отримані при обмеженому кислотному гідролізі, представлені в табл.1.

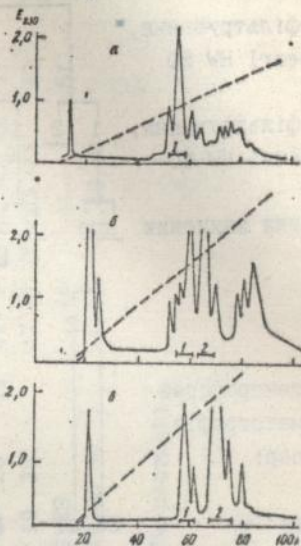
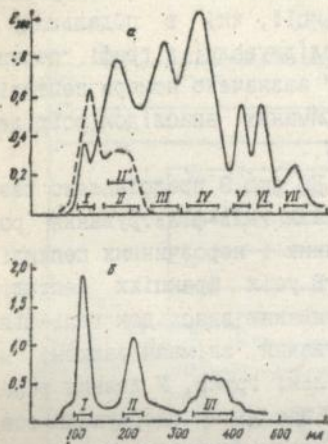


Рис.3. Гель-фільтрування розчинних (а) і нерозчинних (б) пептидів триптичного гідролізату малеїнованої каталази. Колонка: TSK Toyorearl HW-50, 2x100 см; елюент: 0,2 М NH HCO (з додаванням 6 М гуанідинхлориду для фракції нерозчинних пептидів); об'єм фракції 3 мл; швидкість елюції 20 мл/год. Пунктиром позначено рехроматографію піка I.

Рис.4. HPLC фракції I-II'-2-0 (а); об'єднаних фракцій III-1-0, III-2-0, III-3-0 (б), представлених на рис.1, а також фракції I-1-0, наведеної на рис.2 (в). Колонка: Ultrasphere C-18, 10x250 мм; елюент: градієнт концентрації ацетонітрилу (5-80%) в 0,1% трифтороцтовій кислоті; швидкість елюції 2мл/хв.

Пептиди обмеженого кислотного гідролізу Tm1 і Tm2

Пептид:	Будова
Tm1,2A1	<u>Val-Ala</u> -Lys
Tm1,2A2	<u>Val-Gly-Leu-Leu-Ala-Ser-Val-Asn-Lys-Pro-Ala-Ser-Ile-Ala-Gln-Gly-Ala-Lys</u>
Tm1,2A3	<u>Pro-Ala-Ser-Ile-Ala-Gln-Gly-Ala-Lys</u>
Tm1,2A4	<u>Val-Gly-Leu-Leu-Ala-Ser-Val-Asn-Lys</u>
Tm1A5	<u>Leu-Ala-Lys</u>
Tm1A6	<u>Leu-(Asp, Thr, Glu₂, Pro, Gly, Ala, Val₂, Ile, Leu, Phe)-Lys</u>
Tm1A7	<u>Leu-Asp-Leu-Gly-Lys</u>
Tm1,2A8	<u>Leu-Gln-Val-Val-Ala-Ser-Ser-Gly-Asp</u>
Tm1,2A9	<u>Ala-Pro-Lys-Pro-Asn-Ser-Asn-Tyr-Phe-His-(Asn, Thr, Gln, Pro₂, Gly)</u>
Tm1,2A10	<u>Ala-Ile-Gly-Val-Glu-Ala-Pro-Lys-Pro-Asn</u>
Tm1,2A11	<u>Val-Ala-Lys-Tyr-Asp</u>
Tm1,2A12	(Ser, Thr, Gln, Pro, Gly ₂)-Lys
Tm1,2A13	<u>Leu-Phe-Lys-Asp</u>
Tm1A14	<u>Leu-Asp-Leu-Gly-Lys-Phe</u>
Tm1,2A15	<u>Ala-(Phe, Met)-Arg</u>
Tm1,2A16	<u>Arg-Leu-Val-Ala-Gln-Gly-Asp</u>
Tm1,2A17	Arg

На основі викладених даних здійснено реконструкцію лізин-вмісних Tm пептидів, наведених у табл.2. В табл.2 і надалі підкреслено пептиди з послідовностями, що перекриваються. Стрілками позначено число стадій деградації за Едманом.

Таблиця 2

Будова триптичних пептидів малеїл-каталази

Пептид:	Будова
1	2
Tm1	<u>Val-Ala-Lys-Ala-Ile-Gly-Val-Glu-Ala-Pro-Lys-Pro-Asn-Ser-Asn-Tyr-Phe-His-(Asn, Thr, Gln, Pro₂, Gly)-(His, Thr, Ser, Gly, Ala, Ile, Phe)-Val-</u>

1	2
	Ala-Lys-Tyr-Asp-(Thr, Ser, Gln, Pro, Gly ₂)-Lys-Val-Gly-Leu-Leu-Ala-Ser-Val-Asn-Lys-Pro-Ala-Ser-Ile-Ala-Gln-Gly-Ala-Lys-Leu-Gln-Val-Val-Ala-Ser-Ser-Gly-Asp-(Ser, Glx ₂ , Ala, Ile)-Leu-Phe-Lys-Asp-Ala-Phe-Met-Arg-Leu-Val-Ala-Gln-Gly-Asp-(Thr, Glu, Pro, Val, Ile, Leu, Phe)-Lys-Leu-Ala-Lys-Leu-Asp-Leu-Gly-Lys-Phe-Ser-Arg
Tm2	Val-Ala-Lys-Ala-Ile-Gly-Val-Glu-Ala-Pro-Lys-Pro-Asn-Ser-Asn-Tyr-Phe-His-(Asn, Thr, Gln, Pro ₂ , Gly)-(His, Thr, Ser, Gly, Ala, Ile, Phe)-Val-Ala-Lys-Tyr-Asp-(Thr, Ser, Gln, Pro, Gly ₂)-Lys-Val-Gly-Leu-Leu-Ala-Ser-Val-Asn-Lys-Pro-Ala-Ser-Ile-Ala-Gln-Gly-Ala-Lys-Leu-Gln-Val-Val-Ala-Ser-Ser-Gly-Asp-(Ser, Glx ₂ , Ala, Ile)-Leu-Phe-Lys-Asp-Ala-Phe-Met-Arg
Tm3	Gly-Ser-Pro-Lys-Ala-Tyr-Ser-Asn-Thr-Glu-Pro-Asn-Lys
Tm4	Gly-Ser-Asp-Leu-Ala-Gln-Gly-Ser-Gln-Ile-Ser-Ser-Gln-Arg
Tm5	Gly-Thr-Gly-Ala-His-Gly-Thr-Phe-Leu-Ser-Tyr-Gly-Asp-Trp-Ser-Asn-Leu-Thr-Ala-Ala-Ser-Phe-Leu-Ser-Ala-Glu-Gly-Lys-Gln-Thr-Pro-Ser-Phe-Thr-Lys-Phe-Ser-Thr-Val-Ser-Gly-Ala-Arg
Tm6	Gly-Val-Asp-Phe-Thr-Glu-Asp-Pro-Leu-Leu-Gln-Gly-Arg
Tm7	Phe-Ala-Val-Asp-Gln
Tm8	Gly-Phe-Phe-Thr-Ala-Pro-Glu-Arg
Tm9	Leu-Val-Thr-Asp-Asn-Gly-Lys
Tm10	Phe-Pro-Glu-Gln-Gly-Pro-Glu-Leu-Gly-Val-Glu-Asp-Leu-Phe-(Asx ₄ , Thr, Ser ₃ , Glx ₆ , Gly, Ala, Val, Met, Ile ₂ , Leu, Tyr, Phe)-Arg
Tm14	Phe-Glu-Leu-Met-Gln-(Asx, Glx ₄ , Gly, Val ₂ , Ile ₂ , Leu)-Arg
Tm16	Phe-Asn-Thr-Ser-Gln-Val-Lys
Tm17	Gln-Lys-Ile-Gln-Arg
Tm18	Lys-Phe-Leu-Asp-Arg
Tm19	Thr-Ala-Ser-Gly-Lys-Leu-Gln-Arg
Tm20	Ser-Ser-Val-Val-Arg
Tm21	Glu-Arg
Tm22	Gly-Ser-Ala-Asp-Thr-Ala-Arg
Tm23	Ile-Ser-Asp-Asn-Leu-Thr-Ala-Arg
Tm24	Asp-Gly-Ala-Gly-Glu-Met-(Asx, Pro ₂ , Ile, Leu)-Phe
Tm25	Asp-Gly-Ala-Gly-Glu-Met
Tm26	Phe-Pro-Glu-Gln-Gly-Pro-Glu-Leu-Gly-Val-Glu-Asp-Leu-Phe-(Asx ₄ ,

1	2
	Thr, Ser ₃ , Glx ₆ , Gly, Ala, Val, Met, Ile ₂ , Leu, Tyr, Phe)-Arg-Glu-Leu-Arg
Tm27	<u>Ala-Pro-Ile-His-Asn-Asp-Asn-Arg</u>
Tm28	<u>His-Gly-Pro-Asn-Ile-Gln-Gln-Leu-Gly-Phe-Asn-Arg-Pro-Pro-Arg</u>
Tm29	<u>Phe-Asp-Glu-His-Arg</u>
Tm31	<u>Ala-Ser-Phe-Val-Glu-Thr-Gln-Glu-Trp-Gly-Ala-Lys</u>
Tm32	<u>Asp-Gly-Ala-Gly-Glu-Met-(Asx, Pro₂, Ile, Leu)-Phe-Ala-Ser-Phe-Val-Glu-Thr-Gln-Glu-Trp-Gly-Ala-Lys</u>
Tm34	<u>Phe-His-Trp-Tyr-Asp-Leu-Gln-Gly-(Ser, Glu₂, Pro, Ala, Val, Ile, Leu₂, Trp)-Arg</u>
Tm35	<u>Phe-Asn-Thr-Ser-Gln-Val-Thr-Lys-Ser-Ser-Val-Val-Arg</u>
Tm36	<u>Val-Pro-Glu-Arg</u>
Tm38	<u>Phe-Gly-Phe-Asp-Leu-Pro-Leu-Asp-Thr-Lys</u>
Tm41	<u>Phe-Tyr-Val-Asp-Glu-Gly-Asn-Phe-Asp-Ile-Val-Gly-Asn-Asn-Ile-Pro-Val-Phe-Phe-Ile-Trp-Asp-(Thr, Glx, Ala₂, Val, Met, Ile₂, Leu, His)-Lys-Gln-(Asp, Pro₂, Leu)-Arg</u>
Tm42	<u>Ala-Val-Ala-Asp-Phe-Arg</u>
Tm43	<u>Phe-Leu-Asp-Arg</u>
Tm44	<u>Asp-Val-His-Gly-Phe-Ala-Thr-Arg</u>
Tm45	<u>Ala-Val-His-Ala-Arg</u>
Tm46	<u>Asn-Asp-Asp-Asn-Val-Thr-His-Ala-Arg</u>
Tm47	<u>Gly-Ala-Thr-Leu-Leu-Gln-(Asx₂, Thr, Glx, Ile, Leu₂, Phe)-Phe-Ala-Phe-Asp-Arg</u>
Tm48	<u>Phe-Ser-Arg</u>
Tm49	<u>Thr-Phe-Arg</u>
Tm50	<u>Ala-Phe-Asp-Arg</u>
Tm51	<u>Leu-Phe-Ser-Tyr-Leu-Asp-Thr-Gln-Leu-Asn-Arg</u>
Tm52	<u>Met-Gln-(Asx₅, Thr, Ser₂, Glx₃, Gly₂, Ala₅, Val₃, Leu, Tyr, Phe₂)-Lys-Arg</u>
Tm53	<u>Leu-Val-Thr-Asp-Asn-Gly-Lys-Thr-Lys-Leu-Val-Lys-Phe-His-Trp-Tyr-Asp-Leu-Gln-Gly-(Ser, Glx₂, Pro, Ala, Val, Ile, Leu₂, Trp)-Arg</u>
Tm54	<u>Gly-Asp-Phe-Arg</u>
Tm55	<u>Leu-Val-Ala-Glu-Gly-Asp-(Glu, Thr, Pro, Val, Ile, Leu, Phe)-Lys</u>
Tm56	<u>Leu-Gln-Val-Val-Ala-Ser-Ser-Asp-(Ser, Glu, Gln, Ala, Ile)-Leu-Phe-Lys-Asp-Ala-Phe-Met-Arg</u>
Tm57	<u>Gln-Asn-Ser-Ser-Asn-Pro-Thr-Arg</u>

Таким чином, нами встановлено будову 48 пептидів, що нараховують 719 залишків амінокислот. У тому числі 34 пептиди з послідовностями, що не перекриваються, включають 572 залишки амінокислот.

Триптичні пептиди немодифікованої каталази. В цьому розділі викладено дані, які доповнюють, або уточнюють наведену раніше структуру триптичних пептидів (Гусак та ін., 1989).

Високовольтним електрофорезом і хроматографією на папері нами було виділено 24 триптичних пептиди. Їх побудову представлено у табл.3.

Таблиця 3

Будова триптичних пептидів немодифікованої каталази

Пептид:	Будова
1	2
T2	<u>Gly-Thr-Gly-Ala</u> -(Asx ₂ , Thr ₂ , Ser ₄ , Glx, Gly ₃ , Ala ₃ , Leu ₃ , Tyr, Phe ₂ , Trp, His)-Lys
T4	<u>Ala-Ile-Gly-Val-Glu</u> -(Asx ₃ , Thr ₂ , Ser ₂ , Glx, Pro ₄ , Gly ₂ , Ala ₃ , Val, Ile, Tyr, Phe ₂ , Lys, His ₂)-Lys
T5	<u>His-Gly-Pro-Asn</u> -(Asx, Glx ₂ , Pro ₂ , Gly, Ile, Leu, Phe, Arg)-Arg
T6	<u>Asp-Gly-Ala-Gly-Glu-Met</u> -(Asx, Pro ₂ , Ile, Leu, Phe)-Ala-Ser-Phe-Val-Glu-Thr-Gln-Glu-Trp-Gly-Ala-Lys
T15	<u>Ala-Ser-Phe-Val-Glu-Thr-Gln-Glu-Trp-Gly-Ala-Lys</u>
T16	<u>Gln-Thr-Pro-Ser-Phe-Thr-Lys</u>
T17	<u>Gly-Pro-Ser</u> -(Thr, Gly, Ala ₂ , Leu)-Arg
T21	<u>Gly-Val-Ala-Leu-Gly-Lys</u>
T23	<u>Gln-Gly-Leu-Glu-Gly-Lys</u>
T36	<u>Gln-Val-Leu-Asn-Ser</u> -(Gly, Ala, Met)-Met-(Thr ₂ , Glu, Phe)-Phe-(Arg, Thr, Ser, Pro)-Arg
T41	<u>Leu-Val-Thr-Asp-Asn-Gly-Lys</u>
T52	<u>Phe-Ser-Arg</u>
T53	<u>Phe</u> -(His, Pro, Leu)-Arg
T54	<u>Phe-Ser-His-Trp-Lys</u>
T55	<u>Gln-Gln-Gln-Lys-Lys</u>
T56	<u>Ala</u> -(Gln ₂ , Glu, Gly, Ala, Phe)-Lys
T57	<u>Tyr-Asp</u> -(Thr, Ser, Gln, Pro, Gly ₂)-Lys

1:	2
T59	Phe-Gly-Lys
T60	Thr-Phe-Arg
T61	Phe-(Asx, Glx ₅ , Gly, Val ₂ , Met, Ile ₂ , Leu ₂)-Arg
T63	Lys-Phe-Gly-Val-Asn-Gly-Phe-Val-His-Thr-Arg
T64	Asn-Asn-Lys
T65	Asn-Asn-Lys-Arg
T66	Arg
Tn1	Asn-(Asx, Glx ₃ , Pro, Gly ₂ , Ala, Val ₂ , Met ₂ , Ile ₃ , Leu, Phe ₂ , His)-Arg
Tn2	Phe-(Asx, Ser, Glx ₃ , Pro, Gly, Ala, Val, Ile, Leu ₃ , Tyr, Trp ₂ , His)-Arg
Tn3	Phe-Pro-Glu-Gln-(Asx ₅ , Thr, Ser ₃ , Glx ₉ , Pro, Gly ₃ , Ala, Val ₂ , Met, Ile ₂ , Leu ₄ , Tyr, Phe ₂ , Arg)-Arg

Пептид Т36 додатково субфрагментували хімотрипсином. Отримано два пептиди: Т36Сh1 - Asn-(Ser, Gly, Ala, Met)-Met і Т36Сh2 - Gln-(Asn, Thr, Ser, Glu, Gly, Ala, Val, Ile, Leu, Phe)-Phe, на основі яких реконструйовано Т36.

Пептиди, наведені у табл.3, нараховують 312 амінокислотних залишків. 23 пептиди з послідовностями, що не перекриваються між собою, містять 308 амінокислотних залишків.

Бромціанові пептиди. Розділення бромціанових пептидів здійснено нами раніше (Левітіна та ін., 1989). В нашій роботі досліджено п'ять індивідуальних пептидів, будову яких наведено в табл.4.

Таблиця 4
Будова бромціанових пептидів PVC

Пептид:	Будова
1:	2
BrcN1	Asp-Val-Ile-Ile-Glu-Thr-Leu-HSer
BrcN6	Phe-Gln-Pro-Gly-His-Ile-Val-Arg-Gly-Val-Asp-Phe-Thr-Glu-Asp-Pro-Leu-Leu-Gln-Gly-Arg-Leu-Phe-Ser-Tyr-Leu-Asp-Thr-Gln-Leu-Asn-Arg-His-Gly-Pro-Asn-Ile-Gln-Gln-Leu-Gly-Phe-Asn-Arg-Pro-Pro-Arg-Ala

	1	2
		Pro-Ile-His-Asn-Asp-Asn-Arg-Asp-Gly-Ala-Gly-Glu-HSer
BrCN7	<u>Gln-Val-Ala-Asn-Ala-Asn-Ser-Val-Asp-Glu-Gly-Gln-Ala-Asn-Ser-Asp-Glu-(Thr, Gly, Ala₂, Val, Leu, Tyr, Phe₂)-Lys-Arg-Val-Ala-Lys-Ala-Ile-Gly-Val-Glu-Ala-Pro-Lys-Pro-Asn-Ser-Asn-Tyr-Phe-His-(Asn, Thr, Gln, Pro₂, Gly)-(His, Thr, Ser, Gly, Ala, Ile, Phe)-Val-Ala-Lys-Tyr-Asp-(Thr, Ser, Gln, Pro, Gly₂)-Lys-Val-Gly-Leu-Leu-Ala-Ser-Val-Asn-Lys-Pro-Ala-Ser-Ile-Ala-Gln-Gly-Ala-Lys-Leu-Gln-Val-Val-Ala-Ser-Ser-Gly-Asp-(Ser, Glu, Gln, Ala, Ile)-Leu-Phe-Lys-Asp-Ala-Phe-HSer</u>	
BrCN8	<u>Gln-Asp-Gly-Val-(Val, Ile)-Glu-(Glx₂, Ile, Leu)-Arg-Phe-Gly-Phe-Asp-Leu-Pro-Leu-Asp-Thr-Lys-Gln-Val-Leu-Asn-Ser-Ala-HSer</u>	
BrCN9	<u>Leu-Phe-Asp-Glu-Val-Ile-Gly-Ala-HSer</u>	

Пептиди BrCN6 і BrCN7 отримано в суміші (BrCN6,7) у співвідношенні 5:1. На суміші BrCN6,7 пройдено 32 стадії деградації за Едманом. Суміш також розщеплювали трипсином, хімотрипсином. удову триптичних і хімотриптичних субфрагментів представлено в табл.5.

Таблиця 5
Триптичні і хімотриптичні субфрагменти суміші BrCN6,7

Пептид	Вудова
1	2
BrCN6T1	<u>Phe-Gln-Pro-Gly-His-Ile-Val-Arg</u>
BrCN6T2	<u>Gly-Val-Asp-Phe-Thr-Glu-Asp-Pro-Leu-Leu-Gln-Gly-Arg</u>
BrCN6T3	<u>Leu-Phe-Ser-Tyr-Leu-Asp-Thr-Gln-Leu-Asn-Arg</u>
BrCN6T4	<u>His-Gly-Pro-Asn-Ile-Gln-Gln-Leu-Gly-Phe-Asn-Arg-Pro-Pro-Arg</u>
BrCN6T5	<u>Ala-Pro-Ile-His-Asn-Asp-Asn-Arg</u>
BrCN6T6	<u>Asp-Gly-Ala-Gly-Glu-HSer</u>
BrCN7T7	<u>Val-Ala-Lys</u>
BrCN7T8	<u>Tyr-Asp-(Thr, Ser, Gln, Pro, Gly₂)-Lys</u>
BrCN7T9	<u>Leu-Gln-(Asx, Ser₃, Glx₂, Gly, Ala₂, Val₂, Ile, Leu, Phe)-Lys</u>
BrCN6Ch1	<u>Ser-Tyr-Leu-Asp-Thr-Gln-Leu</u>
BrCN6Ch2	<u>Asn-Arg-His-Gly-Pro-Asn-Ile-Gln-Gln-Leu-Gly-Phe</u>

1	2
BrCN6Ch3	Asn-Arg-Pro-Pro-Arg-Ala-Pro-Ile-His
BrCN6Ch4	Asn-Asp-Asn-Arg-Asp-Gly-Ala-Gly-Glu-HSer
BrCN6Ch5	Gly-Phe-Asn-Arg-Pro-Pro-Arg-Ala-Pro-Ile-His
BrCN7Ch6	Ser-Val-Asn-Glu-(Gln,Gly,Ala)-Asn

На основі співвідношення пептидів BrCN6 і BrCN7 у суміші розраховано їх амінокислотний склад та ідентифіковано їх субфрагменти. Для реконструкції BrCN7 залучено пептиди Tm1, Tm2, Tm52. Було також використано пептиди, отримані нами при розщепленні каталази стафілококовою протеазою: Sp26 - Gly-Gln-Ala-Asn-Ser-Asp-Glu; Sp30 - Ala-Asn-Ser-Val-Asn-Glu; Sp39 - Ser-Asp; Sp40 - Gln-Val-Asn-Ala-Asn.

Пептид BrCN8 розщеплювали трипсином. Одержано два пептиди: BrCN8T1 - Phe-(Asp₃, Thr, Ser, Glu, Pro, Gly, Ala, Val, Leu₃, Phe₂)-HSer і BrCN8T2 - Gln-(Ser, Asp, Ala, Val, Leu)-HSer. Для його реконструкції притягнуто пептид T36 (табл.3), а також T31 - Phe-Gly-Phe-Asp-Leu-Pro-Leu-Asp-Thr-Lys і Sp13 - Gly-Val-(Glx₂, Ile, Leu)-Arg-Phe-Gly-Phe-Asp-Leu-Pro-Leu-Asp-Thr-Lys-Gln-Val-Leu-Asn-Ser-Ala-Met-Glu.

Наведені у табл.4 бромціанові пептиди містять 218 амінокислотних залишків.

Реконструкція поліпептидного ланцюга PVC. Для реконструкції поліпептидного ланцюга PVC ми визначили N-кінцевий амінокислотний залишок-Thr. На цій основі ми вважаємо, що на N-кінці розміщується пептид Tm19 (табл.2). Ми вважаємо, що C-кінцевим пептидом є Tm7 (табл.2), тому що він є неспецифічним для трипсина і виділяється з великим виходом.

Порівнюючи побудову пептидів, наведених у табл.2-4, між собою та з відомими амінокислотними послідовностями 15 каталаз, а також з можливою ("рентгеноструктурною") амінокислотною послідовністю досліджуваної нами PVC, ми реконструювали і локалізували ще чотири ділянки поліпептидного ланцюга PVC. У підсумку шість ділянок нараховують 557 амінокислотних залишків. Із досліджених нами в даній роботі і раніше (Гусак та ін., 1989) триптичних пептидів амінокислотні послідовності 21 пептида не перекриваються між собою і з амінокислотними послідовностями

ми локалізованих ділянок. Ці пептиди містять 140 залишків амінокислот (табл.6).

Таблиця 6

Триптичні пептиди, додаткові до реконструйованих ділянок

Пептид:	Будова
Tm3	Gly-Ser-Pro-Lys-Ala-Tyr-Ser-Asn-Thr-Glu-Pro-Asn-Lys
Tm4	Gly-Ser-Asp-Leu-Ala-Gln-Gly-Ser-Gln-Ile-Ser-Ser-Gln-Arg
Tm17	Gln-Lys-Ile-Gln-Arg
Tm18	Lys-Phe-Leu-Asp-Arg
Tm23	Ile-Ser-Asp-Asn-Leu-Thr-Ala-Arg
Tm36	Phe-Asn-Thr-Ser-Gln-Val-Lys-Ser-Ser-Val-Val-Arg
Tm54	Gly-Asp-Phe-Arg
Tm57	Gln-Asn-Ser-Ser-Asn-Pro-Thr-Arg
T7	Gln-(Asn,Thr,Gln,Gly,Ala,Val)-Lys
T12	Glu-Val-Thr-Gln-Gly-Ile-(Pro ₂ ,Val ₂ ,Ile,Leu ₂)-Lys
T18	Asp-Ile-Lys
T21	Gly-Val-Ala-Leu-Gly-Lys
T23	Gln-Gly-Leu-Glu-Gly-Lys
T25	Gly-Leu-Gln-Gly-Lys
T28	Thr-Pro-Lys
T40	Gln-(Asn,Met,Leu)-Arg
T53	Phe-(His,Pro,Leu)-Arg
T56	Ala-(Gln ₂ ,Glu,Gly,Ala,Phe)-Lys
T59	Phe-Gly-Lys
T65	Asn-Asn-Lys-Arg
T66	Arg

Таким чином, поліпептидний ланцюг включає 697 амінокислотних залишків. Це на 27 залишків перевищує довжину поліпептидного ланцюга за даними рентгеноструктурного аналізу. В ділянках "рентгеноструктурної" послідовності PVC, що відповідають локалізованим нами ділянкам, авторами (Vainshtein et al., 1986) ідентифіковано 433 амінокислотних за-

DLTKVWPHGDYPLIPVGKLVLRN PV NYFAEVEQLAFDPSNMPPGIEPSDKMLQGRLFAYPD 359
 N(IE)MLFDEIVIGAMFQPGHIVRGVDFTEDPLLQGRLFYSYLD
 DPTKI.IPEELVPVQRVGKMLVRN PD NFFAENEQAAPHGHI VPGLDFTNDPLLQGRLFYSYTD 417
 * * * * *

THRHRG=PNYLQIPVNCOPYRARVANYQRDGP MCM MDNQG GAPNYYPNSPSAPEHQPSAL= 418
 TQLNRHG=PNIQQLGFNRPPRAPIHNDNRDGAGEM(IDLPP)FASFYETQEWGAK
 TQISRLGGPNFHEIPINRPTC=PYHNFQRDGMHRM GIDIN PA=NYEPNSINDNWPRETPPG 476
 * * * * *

====EHR=THFSGDVQRFN=SANDDNVTQVRTFYLKVLNEEQRKRLOENIAGHLKDAQL=FIQ 474
 FDEHRFSSHWKFGVNGFVHTRNDNVTHARGFFTAPERQQKKRAVADFRMQVNANSVNEGQ
 PKFGGFESYQERVEGNKVRERSPSFGYYSHPRFLFWLSQTPFEQRHIVDGGFSFELSKVVRP=YIR 540
 * * * * *

KKAVK NFSDVHPEYG SRIQALLDKYNEEKPKN 506
 ANSDE(AFAFVALTYG)KRVAKAIGVEAPKPSNYPH(PPTQNG)(IHFTASG)VAKYD(GPTGQ
 ERVVD QLAHIDLTLA QAVAKNLGIELTDDQLNITP PPDVNG LKKDPS= LSLYA IPDGD 597
 * * * * *

S)KVGLLASVKNPASTIAQGAQLQVASSGD(AQEIS)LFKDAFMRLVAQGD(ITVLPFE)KLAKL
 V KGRVVAILLNDEVRSADLLAILKALKAK GVHAK LLY=SRMGEVTADD GTVLPPIA ATPAG 656
 * * * * *

DLGKFSRFELMQDGV(IV)E(ILEQE)RFGFDLPLDTKQVLNSAMGM(FETT)F(RPTS)R
 APSLTVD A V I P C G N I A D I A D N G D A N Y Y L M E A Y K H L K P I A L A G D A R K F K A T I K I A D Q 713
 ** * * * 8 * * * * *

FAVDQ
 GEEGIVEADSADGSFMDLLTLMAAHRVWSRIPKIDKIPA 753
 *

У порівнюваних послідовностях BLC і ECC рисочками і зірочками позначено амінокислотні залишки відповідно ідентичні і гомологічні амінокислотним залишкам PVC. У дужках ділянок PVC амінокислотні залишки розставлені за принципом максимальної схожості з іншими каталазами.

Для шести порівнюваних ділянок нами розрахований ступінь спорідненості (% ідентичних і гомологічних залишків до загального числа залишків, що порівнюються) PVC до BLC, ECC та 13 інших каталаз. Ступінь спорідненості PVC до BLC для чотирьох ділянок (за виключенням N-кінцевих) складає відповідно 60, 45, 52, 38 %, а до ECC - 61, 47, 54, 32 %. У всіх каталаз для зазначених ділянок він змінюється у діапазоні 98 - 35 %. Спостерігається зниження ступеня спорідненості для ділянок у напрямку від N-до C-кінця, що природно, оскільки у найближчу до N-кінця ділянку входять три з чотирьох амінокислотних залишків активного центра : His74, Ser113, Asn147 (нумерація за BLC) а також 11 амінокислотних залишків, що взаємодіють з гемом. В деякій мірі вирізняється третя ділянка, тому що містить четвертий амінокислотний залишок активного центра - Tyr367, а також десять залишків, що взаємодіють з гемом. Серед цих десяти залишків нами ідентифіковано три суттєвих заміни - Ile329, Gln334, Gln361, порівняльно з іншими каталазами, в яких у цих положеннях знаходяться залишки амінокислот Asp, Glu, His. Ми вважаємо, що заміною заряджених залишків на гідрофобні і незаряджені можна пояснити підвищену стійкість PVC у розчинах.

Таким чином, можна відзначити високий ступінь консервативності ділянок поліпептидного ланцюга каталаз, відповідальних за її основну функцію - розкладання перекису водню. Є підстави вважати, що додаткові C-кінцеві домени PVC і ECC не мають суттєвого значення для головної функції, про що свідчить низький ступінь їх гомології (32 %) в межах порівнювальної ділянки.

Ступінь спорідненості в цілому для шести ділянок складає 48 % у PVC і BLC та 44 % у PVC і ECC, коливаючись при порівнянні з іншими каталазами наочно (48 - 32 %), тоді як каталази іншого походження проявляють більшу схожість (95 - 32 %). Найбільша схожість каталази PVC виявляється з каталазами ссавців, нижча - з каталазами рослин і мікроорганізмів, у той час як каталази таксономічно близьких груп проявляють значно вищий ступінь спорідненості (95 - 70 %).

Не дивлячись на те, що нами встановлено будову набору пептидів, що перекривають увесь поліпептидний ланцюг, нам не вдалося реконструювати поліпептидний ланцюг FVC навіть при порівнянні з іншими каталазами. Тим не менше ми вважаємо, що головну мету роботи досягнуто, оскільки нами вірогідно реконструйовано і локалізовано шість ділянок поліпептидного ланцюга каталази, котрі включають 83 % довжини ланцюга. На основі цих даних з'ясовано ступінь спорідненості між 16 каталазами, встановлено консервативні функціонально важливі ділянки та визначено заміни суттєвих амінокислотних залишків, що обумовлюють, як нам здається, властивості каталаз, які відрізняють їх від інших. Однак ми робимо спробу виписати можливу амінокислотну послідовність, заповнюючи проміжки між реконструйованими ділянками (стр.13 - 15) триптичними пептидами, які не ввійшли до них (табл. 6), за принципом максимальної схожості з іншими каталазами:

Thr-Ala-Ser-Gly-Lys-Leu-Gln-Arg-Arg-Phe-Asn-Thr-Ser-Gln-Val-Lys-Ser-Ser-Val-Val-Arg-Gln-Gly-Leu-Glu-Gly-Lys-Gly-Pro-Ser-(Thr, Gly, Ala₂, Leu)-Arg-Gly-Ala-Thr-Leu-Leu-Gln-(Asx₂, Thr, Glx, Ile, Leu₂, Phe₅₀)-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-Gly-Asp-Trp-Ser-Asn-Leu-Thr-Ala-Ala-Ser-Phe-Leu-Ser¹⁰⁰-Ala-Glu-Gly-Lys-Gln-Thr-Pro-Ser-Phe-Thr-Lys-Phe-Ser-Thr-Val-Ser-Gly-Ala-Arg-Gly-Ser-Ala-Asp-Thr-Ala-Arg-Asp-Val-His-Gly-Phe-Ala-Thr-Arg-Phe-Tyr-Val-Asp-Glu-Gly-Asn-Phe-Asp¹⁵⁰-Ile-Val-Gly-Asn-Asn-Ile-Pro-Val-Phe-Phe-Ile-Trp-Asp-Val-Ile-Ile-Glu-Thr-Leu-Met-Ala-(His, Ala)-Lys-Gln-(Asp, Pro₂, Leu)-Arg-Phe-(His, Pro, Leu)-Arg-Phe-Gly-Lys-Gly-Asp-Phe-Arg-Ile-Ser-Asp-Asn-Leu-Thr-Ala-Arg-Gly-Ser-Asp-Leu-Ala-Gln-Gly-Ser-Gln-Ile-Ser-Ser-Gln-Arg-Gly-Val-Ala-Leu-Gly-Lys-His-Arg-Met-(Thr₂, Glu, Pro, Phe)-Arg-Thr-Phe-Arg-Leu-Val-Thr-Asp-Asn-Gly-Lys-Thr-Lys-Leu-Val-Lys-Phe-His-Trp-Tyr-Asp²⁵⁰-Leu-Gln-Gly-(Ser, Glx₂, Pro, Ala, Val, Ile, Leu₂, Trp)-Arg-Phe-Pro-Glu-Gln-Gly-Pro-Glu-Leu-Gly-Val-Glu-Asp-Leu-Phe-(Asx₄, Thr, Ser₃, Glx₆, Gly, Ala, Val, Met, Ile₂, Leu, Tyr₄₀₀)-Arg-Glu-Leu-Arg-Gln-Asn-Ser-Ser-Asn-Pro-Thr-Arg-Glu-Val-Thr-Gln-Gly-Ile-(Pro₂, Val₂, Ile, Leu₂)-Lys-Gln-(Asn, Met, Leu)-Arg-Asn-(Glu, Ile)-Met-Leu-Phe-Asp-Glu-Val-Ile-Gly-Ala-Met-Phe-Gln-Pro-Gly-His-Ile-Val-Arg-Gly-

LIBRARY of B. Stepanov
AN UCRNA

Val-Asp-Phe-Thr-Glu-Asp-Pro-Leu-Leu-Gln-Gly-Arg-Leu-Phe-Ser-Tyr-Leu-³⁵⁰
 Asp-Thr-Gln-Leu-Asn-Arg-His-Gly-Pro-Asn-Ile-Gln-Gln-Leu-Gly-Phe-Asn-
 Arg-Pro-Pro-Arg-Ala-Pro-Ile-His-Asn-Asp-Asn-Arg-Asp-Gly-Ala-Gly-Glu-
 Met-(Asp,Pro₂,Ile,Leu)-Phe-Ala-Ser-Phe-Val-Glu-Thr-Gln-Glu-Trp-Gly-¹⁰⁰
 Ala-Lys-Gln-(Asn,Thr,Gln,Gly,Ala,Val)-Lys-Asp-Ile-Lys-Phe-Asp-Glu-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-Ala-Pro-Glu-Arg-Gln-⁴⁵⁰
 Gln-Gln-Lys-Lys-Arg-Ala-Val-Ala-Asp-Phe-Arg-Met-Gln-Val-Asn-Ala-Asn-
 Ser-Val-Asn-Glu-Gly-Gln-Ala-Asn-Ser-Asp-Glu-(Thr,Gly,Ala₃,Val,Leu,Tyr,
 Phe₂)-Lys-Arg-Val-Ala-Lys-Ala-Ile-Gly-Val-Glu-Ala-Pro-Lys-Pro-Asn-Ser-⁵⁰⁰
 Asn-Tyr-Phe-His-(Asn,Thr³⁵⁰,Gln,Pro₂,Gly)-(Thr,Ser,Gly,Ala,Ile,Phe,His)-
 Val-Ala-Lys-Tyr-Asp-(Thr,Ser,Glu,Pro,Gly₂)-Lys-Val-Gly-Leu-Leu-Ala-
 Ser-Val-Asn-Lys-Pro-Ala-Ser-Ile-Ala-Gln-Gly-Ala-Lys-Leu-Gln-Val-Val-
 Ala-Ser-Ser-Gly-Asp-(Ser,Glu,Gln,Ala,Ile)-Leu-Phe-Lys-Asp-Ala-Phe-Met-
 Arg-Leu-Val-Ala-Glu-Gly-Asp-(Thr,Glu,Pro,Val,Ile,Leu,Phe)-Lys-Leu-Ala-⁶⁰⁰
 Lys-Leu-Asp-Leu-Gly-Lys-Phe-Ser-Arg-Phe-Glu-Leu-Met-Gln-Asp-Gly-Val-
 (Val,Ile)-Glu-(Glx₃,Ile,Leu)-Arg-Phe-Gly-Phe-Asp-Leu-Pro-Leu-Asp-Thr-
 Lys-Gln-Val-Leu-Asn-Ser-Ala-Met-Gly-Met-(Thr₂,Glu,Phe)-Phe-(Arg,Thr,
 Ser,Pro)-Arg-Ala-(Gln₂,Glu,Gly,Ala,Phe)-Lys-Gly-Leu-Gln-Gly-Lys-Thr-⁶⁵⁰
 Pro-Lys-Gly-Ser-Pro-Lys-Ala-Tyr-Ser-Asn-Thr-Glu-Pro-Asn-Lys-Asn-Asn-
 Lys-Arg-Gln-Lys-Ile-Gln-Arg-Lys-Phe-Leu-Asp-Arg-Phe-Ala-Val-Asp-Gln

На ділянках можливої послідовності 9-27, 164-203, 288-314, 407-417, 650-692 триптичні пептиди можуть бути переставлені як в межах ділянок, так і між ними. Ступінь спорідненості можливої амінокислотної послідовності PVC з іншими каталазами незначно відрізняється від такого для вірогідно виписаних ділянок. Отже ми вважаємо, що основні висновки щодо структурно-функціональних і еволюційних взаємовідносин цілком вірогідні.

Біохімія, т. 2, Гусак Н.М., Маршалюк О.С.,
 Ділянки 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 402, 403, 404, 405, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 423, 424, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 431, 432, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463, 464, 465, 466, 467, 468, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 480, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499, 500, 501, 502, 503, 504, 505, 506, 507, 508, 509, 510, 511, 512, 513, 514, 515, 516, 517, 518, 519, 520, 521, 522, 523, 524, 525, 526, 527, 528, 529, 530, 531, 532, 533, 534, 535, 536, 537, 538, 539, 540, 541, 542, 543, 544, 545, 546, 547, 548, 549, 550, 551, 552, 553, 554, 555, 556, 557, 558, 559, 560, 561, 562, 563, 564, 565, 566, 567, 568, 569, 570, 571, 572, 573, 574, 575, 576, 577, 578, 579, 580, 581, 582, 583, 584, 585, 586, 587, 588, 589, 590, 591, 592, 593, 594, 595, 596, 597, 598, 599, 600, 601, 602, 603, 604, 605, 606, 607, 608, 609, 610, 611, 612, 613, 614, 615, 616, 617, 618, 619, 620, 621, 622, 623, 624, 625, 626, 627, 628, 629, 630, 631, 632, 633, 634, 635, 636, 637, 638, 639, 640, 641, 642, 643, 644, 645, 646, 647, 648, 649, 650, 651, 652, 653, 654, 655, 656, 657, 658, 659, 660, 661, 662, 663, 664, 665, 666, 667, 668, 669, 670, 671, 672, 673, 674, 675, 676, 677, 678, 679, 680, 681, 682, 683, 684, 685, 686, 687, 688, 689, 690, 691, 692, 693, 694, 695, 696, 697, 698, 699, 700, 701, 702, 703, 704, 705, 706, 707, 708, 709, 710, 711, 712, 713, 714, 715, 716, 717, 718, 719, 720, 721, 722, 723, 724, 725, 726, 727, 728, 729, 730, 731, 732, 733, 734, 735, 736, 737, 738, 739, 740, 741, 742, 743, 744, 745, 746, 747, 748, 749, 750, 751, 752, 753, 754, 755, 756, 757, 758, 759, 760, 761, 762, 763, 764, 765, 766, 767, 768, 769, 770, 771, 772, 773, 774, 775, 776, 777, 778, 779, 780, 781, 782, 783, 784, 785, 786, 787, 788, 789, 790, 791, 792, 793, 794, 795, 796, 797, 798, 799, 800, 801, 802, 803, 804, 805, 806, 807, 808, 809, 810, 811, 812, 813, 814, 815, 816, 817, 818, 819, 820, 821, 822, 823, 824, 825, 826, 827, 828, 829, 830, 831, 832, 833, 834, 835, 836, 837, 838, 839, 840, 841, 842, 843, 844, 845, 846, 847, 848, 849, 850, 851, 852, 853, 854, 855, 856, 857, 858, 859, 860, 861, 862, 863, 864, 865, 866, 867, 868, 869, 870, 871, 872, 873, 874, 875, 876, 877, 878, 879, 880, 881, 882, 883, 884, 885, 886, 887, 888, 889, 890, 891, 892, 893, 894, 895, 896, 897, 898, 899, 900, 901, 902, 903, 904, 905, 906, 907, 908, 909, 910, 911, 912, 913, 914, 915, 916, 917, 918, 919, 920, 921, 922, 923, 924, 925, 926, 927, 928, 929, 930, 931, 932, 933, 934, 935, 936, 937, 938, 939, 940, 941, 942, 943, 944, 945, 946, 947, 948, 949, 950, 951, 952, 953, 954, 955, 956, 957, 958, 959, 960, 961, 962, 963, 964, 965, 966, 967, 968, 969, 970, 971, 972, 973, 974, 975, 976, 977, 978, 979, 980, 981, 982, 983, 984, 985, 986, 987, 988, 989, 990, 991, 992, 993, 994, 995, 996, 997, 998, 999, 1000

Handwritten signature or initials.

Обл.-наук. арх. 1.0
 Державний архів Львова
 Інститут біології і медицини НАН України

1. Отримано 48 триптичних пептидів модифікованої за залишками Lys малеїновим ангідридом каталази та з'ясовано їх повну або часткову будову. 24 пептиди з послідовностями, що не перекриваються, нараховують 572 амінокислотні залишки.

2. Одержано 24 триптичних пептиди немодифікованої каталази і визначено їх будову. 23 пептиди з послідовностями, що не перекриваються, містять 137 амінокислотних залишків.

3. Отримано 5 бромціанових пептидів, що налічують 218 амінокислотних залишків, та з'ясовано їх побудову.

4. Із зазначеного набору пептидів реконструйовано шість ділянок поліпептидного ланцюга PVC, які включають у сумі 557 амінокислотних залишків (83 % довжини ланцюга), а також відібрано 21 триптичний пептид з послідовностями, котрі не перекриваються, що складає ще 140 амінокислотних залишків. Реконструйовані ділянки містять всі важливі для функціонування фермента залишки амінокислот.

5. По реконструйованих ділянках визначено ступінь спорідненості PVC з іншими каталазами та з'ясовано еволюційні взаємовідносини 16 каталаз.

6. Порівнюючи отримані дані з амінокислотними послідовностями 15 каталаз, виписано найвірогіднішу амінокислотну послідовність PVC, яка налічує 697 амінокислотних залишків.

СПИСОК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ПО ТЕМІ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Левитина Т.Л., Гусак Н.М., Гудкова Л.В., Мирошниченко О.С., Роднин Н.В., Атепалихина С.А., Кириленко М.Т., Козлов Э.А. Сравнительное химическое исследование первичной структуры каталазы гриба *Penicillium vitale* // VII Всесоюз. симпоз. по химии белков и пептидов: Тез. докл. - Таллинн, 1987. - С. 65-66.

2. Левитина Т.Л., Гусак Н.М., Роднин Н.В., Кириленко М.Т., Мирошниченко О.С., Козлов Э.А. Бромциановые фрагменты каталазы гриба *Penicillium vitale* // Биополимеры и клетка. - 1989. - 5, №5. - С. 55-63.

3. Мирошниченко О.С., Кириленко М.Т., Левитина Т.Л., Гусак Н.М., Козлов Э.А. Бромциановые фрагменты каталазы гриба *Penicillium vitale* // Школа-конференция "Структура и функции биополимеров": Тез. докл. - Львов, 1989.

4. Левитина Т.Л., Гусак Н.М., Гудкова Л.В., Мирошниченко О.С., Атепалихина С.А., Козлов Э.А. Изучение аминокислотной последовательности гриба *Penicillium vitale*; триптические фрагменты малеил-производного фермента // VIII Всесоюз. симп. по химии белков: Тез. докл. - Тбилиси, 1990. - С. 99.

5. Мирошниченко О.С. Биогенез, физиологическая роль и свойства каталазы // Биополимеры и клетка. - 1992. - 8, №6. - С. 3-25.

6. Козлов Э.А., Гудкова Л.В., Левитина Т.Л., Кириленко М.Т., Мирошниченко О.С. Дополнительное исследование триптических пептидов каталазы гриба *Penicillium vitale* // Биополимеры и клетка. - 1993. - 9, №1. - С. 22-25.

7. Левитина Т.Л., Мирошниченко О.С., Гудкова Л.В., Бобровская М.Т., Латышко Н.В., Козлов Э.А. Триптические пептиды малеил-каталазы гриба *Penicillium vitale*. 1. Выделение и аминокислотный состав // Биополимеры и клетка. - 1993. - 9, №2. - С. 3-8.

8. Левитина Т.Л., Бобровская М.Т., Гусак Н.М., Мирошниченко О.С., Гудкова Л.В., Латышко Н.В., Козлов Э.А. Триптические пептиды малеил-каталазы гриба *Penicillium vitale*. 2. Строение пептидов // Биополимеры и клетка. - 1993. - 9, №3. - С. 42-45.

Зам. 46 Формат 60x84/16 Обл.-вид.арк. I,0

Підписано до друку 17.02.1994 р. Тираж 100

Поліграфічна дільниця ІТФ ім.М.М.Боголюбова АН України

462512

AB 29.244

AB 29.244