



УДК 547.96.02+548.73

## ТРЕХМЕРНАЯ СТРУКТУРА АКТИНОКСАНТИНА

I. КРИСТАЛЛИЗАЦИЯ И ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ  
РЕНТГЕНОСТРУКТУРНЫЕ ДАННЫЕ

Илетнев В. Э., Траханов С. Д., Цыганник И. Н.

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина  
Академии наук СССР, Москва

Найдены условия получения высококачественных монокристаллов антибиотика белковой природы — актиноксантина, выделенного из микроорганизмов *Actinomyces globisporus*. Кристаллы орторомбические, пространственная группа  $P2_12_12_1$ , параметры ячейки  $a$  30,9,  $b$  48,8,  $c$  64,1 Å, одна молекула белка на асимметричную часть ячейки, средние размеры кристаллов  $0,15 \times 0,15 \times 0,6$  мм<sup>3</sup>. Полученные кристаллы характеризуются высокой устойчивостью к рентгеновскому излучению, их качество позволяет определить структуру белка с высоким разрешением. На основе тяжелоатомных солей  $UO_2(NO_3)_2$ ,  $K_2Pt(NO_2Cl)_2$ ,  $Pb(CH_3COO)_2$ ,  $KAuCl_4$ ,  $HgCl_2$ ,  $PdCl_2$ ,  $K_2PtCl_6$ , меркурохром получены кристаллические производные.

Актиноксантин — низкомолекулярный белок ( $M$  10 300; 107 аминокислотных остатков), выделенный из культуральной жидкости микроорганизмов *Actinomyces globisporus* [1]. По своим свойствам — способности ингибировать рост некоторых грамположительных бактерий и подавлять или замедлять развитие опухолевых тканей [1, 2] — он близок к антибиотикам белковой природы рода *Streptomyces*: неокарциностатину [3, 4], микромомоцину [5, 6] и др. Подобно неокарциностатину, наиболее изученному белку, выделенному из стрептомицетов, актиноксантин характеризуется наличием двух дисульфидных мостиков и высоким содержанием гидрофобных аминокислотных остатков — Ala, Gly, Val (42 остатка относительно 44 в неокарциностатине) и оксиаминокислотных остатков Ser, Thr (24 и 22). Данные по изучению первичных структур этих белков [7, 8] указывают на высокую степень гомологии их аминокислотных последовательностей. Наблюдаемая аналогия в химическом строении, биологических свойствах и физико-химических характеристиках этих белков позволяет предположить для них не только сходство пространственных структур, но и, как следствие, сходство механизмов их функционального действия. Хотя, согласно опубликованным данным, механизм действия неокарциностатина во многих деталях неясен, тем не менее твердо установлено, что данный антибиотик вызывает образование одонитивных разрывов в ДНК клеток *HeLa* [9—11] и даже деградацию бактериальной ДНК до кислоторастворимой фракции [12]. Отмеченные свойства выдвигают данные антибиотики белковой природы в число очень интересных объектов для рентгеноструктурных исследований.

Данные по кристаллизации и предварительным рентгеноструктурным исследованиям актиноксантина и неокарциностатина были опубликованы

в работах [13, 14]. Однако кристаллы актиноксантина, выращенные из раствора сульфата аммония (пространственная группа  $P3_121$  или  $P3_221$ ), плохо подходили по размерам и морфологии для целей рентгеноструктурного анализа. Качество кристаллов с точки зрения предельно возможного разрешения ( $\sim 3,5 \text{ \AA}$ ) также было невысоким.

В настоящей работе представлены результаты по получению новой кристаллической формы актиноксантина, открывающей возможность установления пространственной структуры белка с высоким разрешением.

Выделение актиноксантина проводилось по методике [2] с дополнительным использованием изофокусирования в борат-полиольной системе [15]. Белок был свободен от белковых примесей и гомогенен согласно гель-фильтрации на колонке с сефадексом G-75 (последняя стадия очистки) и аналитическому электрофорезу в градиентном полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия. Тем не менее желтоватая окраска раствора белка и его УФ-спектры свидетельствовали о присутствии примесей небелкового характера, по-видимому, прочно связанных с белком.

Предварительный диализ раствора белка относительно противораствора 60–70% 2-метил-2,4-пентандиола (МПД) в 20 мМ NaOAc-буфере pH 4,4, с последующим центрифугированием содержимого диализного мешка позволял не только убрать выпавшую в осадок значительную часть примесей, но и сконцентрировать раствор белка до требуемой концентра-

ции в соответствии с приблизительным соотношением  $C_p^0/C_p^1 \approx C_{\text{МПД}}^0/C_{\text{МПД}}^1$ , где  $C^0$  и  $C^1$  — концентрации белка и МПД внутри диализного мешка до и после диализа. Для определения концентрации белка использовалось среднее значение коэффициента  $E_{1\text{см}}^{1\%} = 3,2$  ( $\lambda$  278 нм), полученное как из расчета вкладов ароматических аминокислотных остатков актиноксантина в его УФ-спектр [16], так и из отношения величин поглощения в УФ-спектре раствора кристаллов белка при  $\lambda$  278 нм к его концентрации, определенной по методу Лоури [17].

Кристаллы актиноксантина (рис. 1) выращивались в течение 3–4 недель при  $2^\circ \text{C}$  диализом относительно противораствора 75% (объемн.) МПД в 20 мМ NaOAc, pH 4,4. Объем раствора белка на ячейку составлял 15–25 мкл при концентрации 15–20 мг/мл.

Полученные кристаллы имели хорошо ограниченную призматическую форму со средними размерами  $0,15 \times 0,15 \times 0,6 \text{ мм}^3$  и характеризовались высокой устойчивостью по отношению к рентгеновскому пучку (за 450 ч экспозиции в рентгеновском пучке при режиме работы рентгеновской трубки 50 кВ и 20 мА максимальное падение интенсивности контрольных рефлексов не превышало 20%). Кристаллы позволяли получить дифракционное поле до разрешения по меньшей мере  $1,8 \text{ \AA}$ , что указывало на их высокое качество.

Пространственная группа  $P2_12_12_1$  и параметры ячейки  $a$  30,9  $\text{\AA}$ ,  $b$  48,8  $\text{\AA}$ ;  $c$  64,1  $\text{\AA}$ ,  $V_{\text{яч}}$  96 700  $\text{\AA}^3$  определялись по прецессионным рентгенограммам (рис. 2), полученным на генераторе G X-6 (Elliott, Англия) при использовании излучения острофокусной трубки с вращающимся анодом с последующим уточнением параметров на автодифрактометре  $P1$  (Syntex, США). Рассчитанный в предположении четырех молекул белка на ячейку, объем асимметрической части на единицу молекулярной массы ( $V_M = 2,40 \text{ \AA}^3/\text{дальтон}$ ) попадает в диапазон значений, характерный для кристаллов глобулярных белков [18]. Объемное содержание растворителя в кристалле, вычисленное по параметру  $V_M$ , а также величине удельного парциального объема  $\bar{v}$  0,706  $\text{см}^3/\text{г}$ , составляет  $\sim 50\%$ .

Введение тяжелых атомов при получении кристаллических производных осуществлялось методом диффузии соответствующих ионов через диализную мембрану [19]. Для этого диализные микроячейки с образовавшимися кристаллами переносились в растворы солей тяжелых металлов в маточной жидкости без предварительной селекции кристаллов. Варьи-

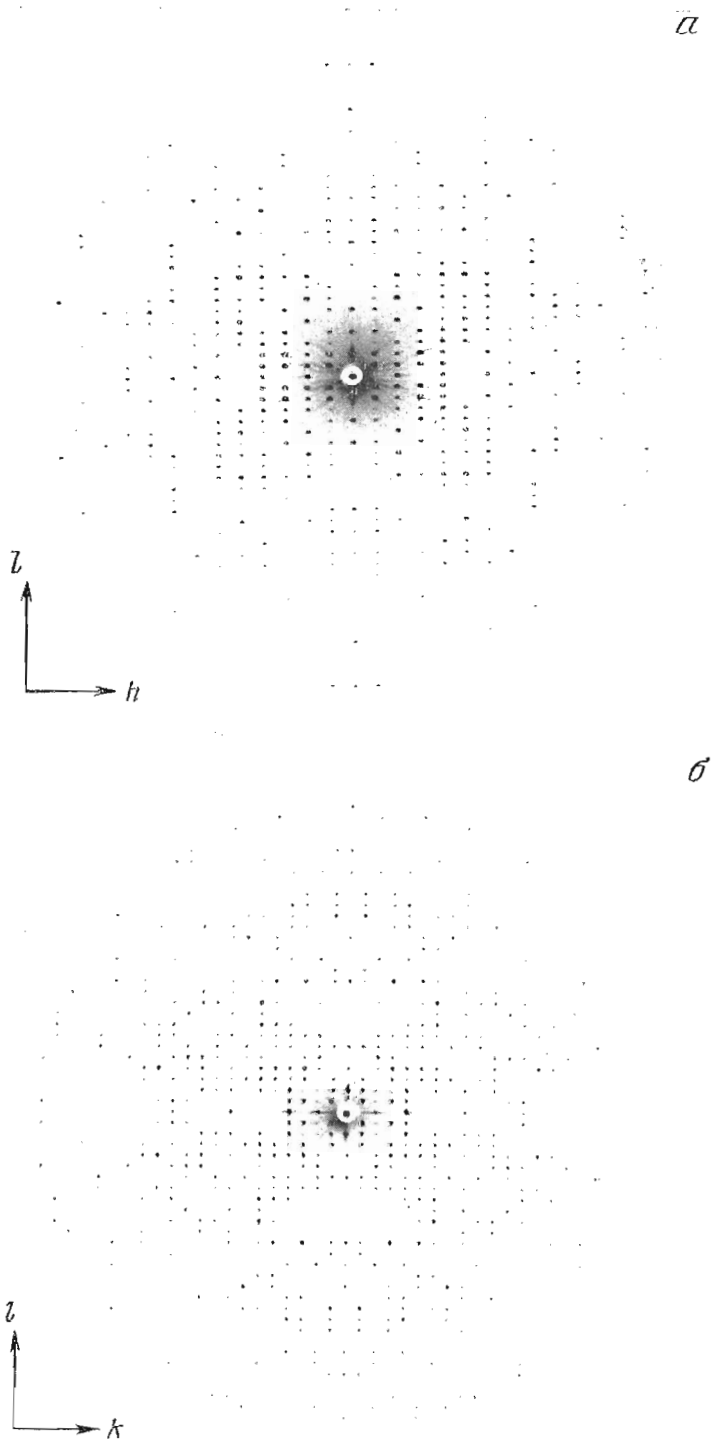


Рис. 2. Прецессионные рентгенограммы нулевых слоевых зон  $h0l$  (а),  $0kl$  (б),  $hk0$  (в) при угле прецессии  $\mu 20^\circ$  и времени экспозиции 20–25 ч

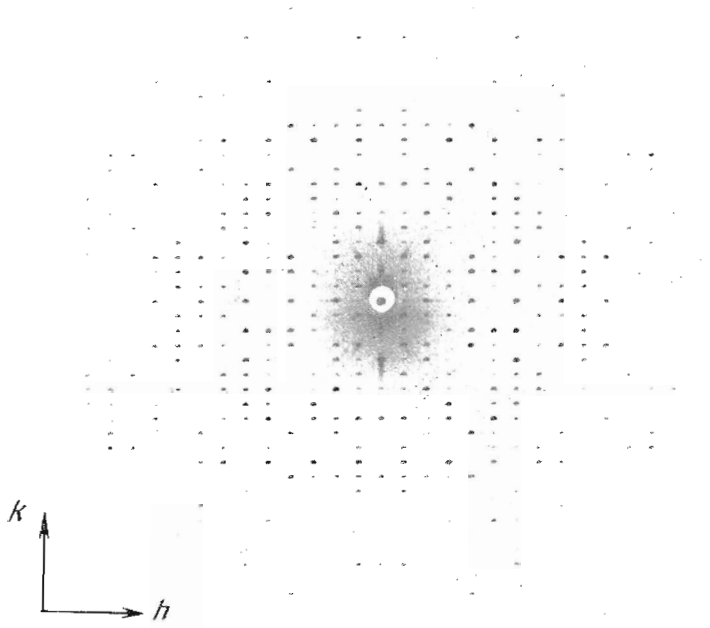


FIG. 2e

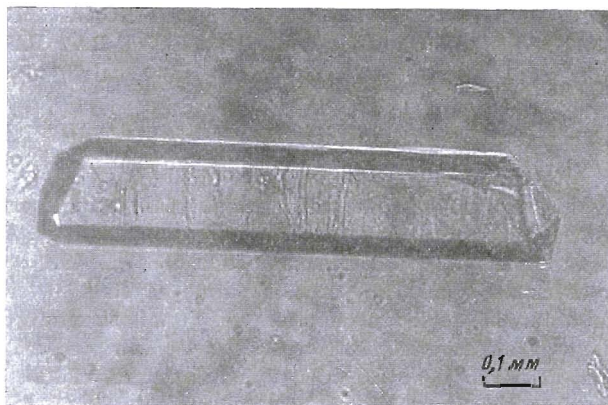


Рис. 1. Микрофотография кристалла актиноксантина

вание времени днализа и концентрации солей тяжелых металлов привело к получению 8 производных (на основе солей  $UO_2(NO_3)_2$ ,  $K_2Pt(NO_2Cl)_2$ ,  $Pb(CH_3COO)_2$ ,  $KAuCl_4$ ,  $HgCl_2$ ,  $PdCl_2$ ,  $K_2PtCl_4$ , меркурохром, характеризующихся заметными изменениями относительных интенсивностей дифракционных отражений при небольших изменениях параметров ячеек.

Авторы выражают глубокую благодарность А. С. Хохлову, П. Д. Решетову и Л. С. Жигис за предоставление белкового вещества.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Khokhlov A. S., Cherches B. Z., Reshetov P. D., Smirnova G. M., Sorokina I. B., Kolditskaya T. A., Smirnov V. V., Navashin S. M., Fomina I. P. (1969) *J. Antibiotics*, **22**, 541–544.
2. Хохлов А. С., Черчес Б. З., Решетов П. Д., Смирнова Г. М., Колодицкая Т. А., Сорочкина И. Б., Прокопцева Т. А., Рябова И. Д., Смирнов В. В., Навашин С. М., Фомина И. П. (1970) *Изв. АН СССР. Сер. биол.*, № 5, 755–763.
3. Ishida N., Miyazaki K., Kumagai K., Rikimaru M. (1965) *J. Antibiotics*, **18**, 67–76.
4. Maeda H., Kumagai K., Ishida N. (1966) *J. Antibiotics, Ser. A*, **19**, 253–259.
5. Chimura H., Ishizuka M., Hamada M., Hori S., Kimura K., Iwanaga J., Takeuchi T., Imezawa H. (1968) *J. Antibiotics*, **21**, 44–49.
6. Yamashita T., Naoi N., Watanabe K., Takeuchi T., Imezawa H. (1976) *J. Antibiotics*, **29**, 415–423.
7. Maeda H., Glazer C. B., Kuromizu K., Meienhofer J. (1974) *Arch. Biochem. and Biophys.*, **164**, 379–385.
8. Khokhlov A. S., Reshetov P. D., Chupova L. A., Cherches B. Z., Zhigis L. S., Stoyachenko I. A. (1976) *J. Antibiotics*, **29**, 1026–1034.
9. Beerman T. A., Goldberg I. H. (1974) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **59**, 1254–1261.
10. Beerman T. A., Goldberg I. H. (1977) *Biochim. et biophys. acta*, **475**, 281–293.
11. Kappen L. S., Goldberg I. H. (1978) *Biochim. et biophys. acta*, **520**, 481–489.
12. Ono Y., Watanabe K., Ishida N. (1966) *Biochim. et biophys. acta*, **119**, 46–58.
13. Мелик-Адамян В. Р., Решетов П. Д. (1974) *Докл. АН СССР*, **214**, 1440–1441.
14. Sieker L. S., Jensen L. H., Anantha Samy T. S. (1976) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **68**, 358–362.
15. Troitsky G. V., Zav'yalov V. P., Kirjukhin J. F., Abramov V. M., Agitsky G. Yu. (1975) *Biochim. et biophys. acta*, **400**, 24–31.
16. Бурштейн Э. А. (1973) вып. «Итоги науки и техники». *Мол. биол.*, **3**, 128–215.
17. Lowri O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. (1951) *J. Biol. Chem.*, **193**, 491–497.
18. Matthews B. W. (1968) *J. Mol. Biol.*, **33**, 491–497.
19. Lipscomb W. N., Coppola J. C., Hartsuck J. A., Ludwig M. L., Muirhead H., Searl J., Steits T. A. (1966) *J. Mol. Biol.*, **19**, 423–441.

Поступила в редакцию  
7.V.1979

THREE-DIMENSIONAL STRUCTURE OF ACTINOXANTHINE.  
I. CRYSTALLIZATION AND PRELIMINARY X-RAY DATA

PLETNEV V. Z., TRAKHANOV S. D., TSIGANNIK I. N.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry,  
Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

The conditions have been found for growing high-quality single crystals of actinoxanthine, a protein antibiotic isolated from *Actinomyces globisporus*. It crystallizes in orthorhombic space group  $P2_12_12_1$  with cell parameters  $a$  30.9,  $b$  48.8,  $c$  64.1 Å and have one molecule per asymmetric unit. The actinoxanthine crystals (average dimensions 0.15×0.15×0.6 mm) are stable to X-ray radiation and permit structure determination to high resolution. Heavy atom derivatives of crystals have been prepared with the aid of salts:  $UO_2(NO_3)_2$ ,  $K_2Pt(NO_2Cl)_2$ ,  $Pb(CH_3COO)_2$ ,  $KAuCl_4$ ,  $HgCl_2$ ,  $PdCl_2$ ,  $K_2PtCl_4$ , mercurochrome.

---