



УДК 591.145.2:543.424

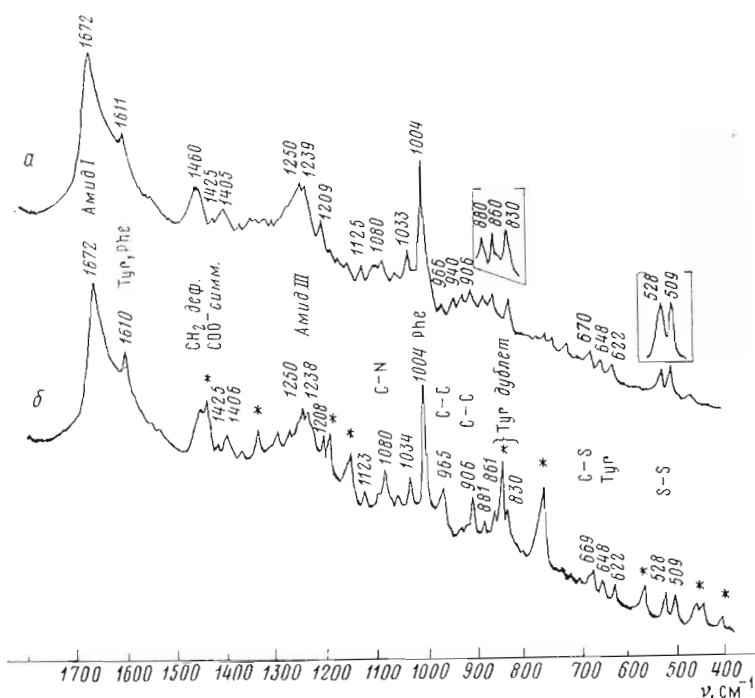
СТРУКТУРА АКТИНОКСАНТИНА В КРИСТАЛЛЕ  
И ВОДНОМ РАСТВОРЕ*Набиев И. Р., Траханов С. Д., Плетнев В. З.,  
Ефремов Е. С.**Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина  
Академии наук СССР, Москва*

Методом лазерной КР-спектроскопии проведен сравнительный анализ спектров актиноксантина в кристаллическом состоянии и в растворе. На основании анализа частот и контура полос колебаний Амид I, Амид III и полос в области валентных С—С- и С—N-колебаний сделан вывод, что конформация полипептидной цепи актиноксантина в кристалле и растворе идентична. Одинаковая частота и контур полос S—S- и C—S-валентных колебаний, а также сходство спектров в области тирозинового Ферми-резонансного дублета свидетельствуют, что как конфигурация дисульфидных связей, так и, вероятно, состояние гидроксильных групп тирозиновых остатков актиноксантина в кристалле и растворе одинаковы. По спектрам КР актиноксантина в растворе оценено процентное содержание  $\beta$ -структуры, неупорядоченной формы и  $\alpha$ -спирали.

В последнее время среди противораковых препаратов большое внимание привлекает группа низкомолекулярных ( $M \sim 10\,000$ ) белков, продуцируемых микроорганизмами рода *Streptomyces* и *Actinomyces*. Актиноксантин (107 аминокислотных остатков [1]), принадлежащий к этой группе, обладает ярко выраженной антибактериальной активностью, а также способностью подавлять развитие ряда опухолевых тканей [2, 3]. Как следует из данных рентгеноструктурных исследований [4, 5], две внутримолекулярные S—S-связи и высокое содержание  $\beta$ -структуры обеспечивают плотную упаковку молекулы актиноксантина и ее устойчивость к протеолитическому расщеплению. Исследование молекулярного механизма функционирования этого белка неразрывно связано с изучением его конформационных особенностей в различных состояниях. В этой связи представляется важным сопоставление пространственной структуры белка в кристалле и растворе. Результаты такого сопоставления, осуществленного методом КР, приведены в настоящем сообщении.

В спектрах КР как раствора, так и кристаллического актиноксантина (рисунок) полосы Амид I с максимумом  $1672\text{ см}^{-1}$  и Амид III —  $1250\text{ см}^{-1}$  с плечом  $1239\text{ см}^{-1}$  и некоторой асимметрией в высокочастотную сторону свидетельствуют о содержании  $\beta$ -структуры, неупорядоченной формы и участков  $\beta$ -изгибов [6]. Правильность отнесения указанных полос в области  $1235\text{—}1280\text{ см}^{-1}$  к колебаниям Амид III подтверждается спектром актиноксантина в тяжелой воде. Сопоставление спектров КР в  $\text{H}_2\text{O}$  и  $^2\text{H}_2\text{O}$  по методу Липпета [7] показало, что содержание  $\beta$ -структурных участков и неупорядоченной формы составляет соответственно 65—70 и 35—30%.

$\alpha$ -Спиральные участки в пределах точности использованного метода



Спектр КР актиноксантина в водном растворе (а) и в кристалле (б). Концентрация в растворе 100 мг/мл, мощность лазера 250 мВт, напряжение на ФЭУ 1150 В, ширина щели 600 мкм, скорость сканирования  $30 \text{ см}^{-1}/\text{мин}$ , временная константа 1,5. Спектр КР кристалла снят в противорастворе (75% (объемн.%) раствор 2-метил-2,4-пентандиола в NaOAc-буфере). Мощность лазера 50 мВт, напряжение на ФЭУ 1180 В, ширина щели 600 мкм, скорость сканирования  $30 \text{ см}^{-1}/\text{мин}$ , временная константа 1,5. \* — наиболее интенсивные полосы противораствора

( $\sim 10\%$  [8]) не выявлены. Полученный результат согласуется с данными рентгеноструктурных исследований, которые указывают на повышенное содержание  $\beta$ -структуры ( $\sim 55\text{--}60\%$ ) и отсутствие  $\alpha$ -спиральных участков в пространственной организации актиноксантина [4, 5].

Из анализа полос в области C—C и C—N-колебаний ( $880\text{--}1200 \text{ см}^{-1}$ ) — чувствительных маркеров конформационных изменений [6] — также следует, что конформация актиноксантина в кристалле и растворе одинакова.

Отношение интенсивностей полос тирозинового дублета ( $I_{859}/I_{830}$ ) в области  $800\text{--}900 \text{ см}^{-1}$ , характеризующее состояние гидроксильных групп остатков тирозина, в спектре КР водного раствора актиноксантина равно 1,0, что интерпретируется как водородно-несвязанное состояние всех трех остатков тирозина [9]. В спектре КР кристаллического образца интенсивности полос  $859$  и  $830 \text{ см}^{-1}$  примерно равны, однако точно определить их отношение интенсивностей сложно из-за интенсивной полосы кристаллизационного противораствора с максимумом  $840 \text{ см}^{-1}$  (рисунок).

Изучение спектров КР белков и полипептидов в области  $480\text{--}750 \text{ см}^{-1}$  позволило получить ряд корреляций между частотой полос валентных S—S- и C—S-колебаний и конфигурацией дисульфидных связей [6]. В спектрах КР актиноксантина в кристалле и растворе наблюдаются две полосы S—S-валентных колебаний равной интенсивности с максимумами  $509$  и  $528 \text{ см}^{-1}$ . Эти полосы соответствуют *гош-гош-гош*- и *гош-гош-транс*-конфигурациям дисульфидных связей соответственно.

Из приведенных выше экспериментальных данных следует, что в пределах информативности метода лазерной спектроскопии комбинационного рассеяния различий в конформационных состояниях актиноксантина в кристалле и водном растворе не обнаружено. Это касается конформации

основной цепи белка, состояния тирозиновых остатков и конфигурации дисульфидных связей. Аналогичный вывод был сделан ранее при исследовании конформации  $\alpha$ -лактальбумина в кристалле и растворе [10]. Однако для рибонуклеазы А в этих состояниях были найдены существенные отличия в геометрии дисульфидных связей и локальном окружении тирозиновых остатков [11], а для карбоксипептидазы А и инсулина отмечены даже изменения конформации полипептидной цепи [11, 12].

### Экспериментальная часть

Очистку белка и выращивание монокристаллов проводили как описано в работе [4]. Перед снятием спектров КР белковый раствор был подвергнут диализу и сконцентрирован до  $\sim 100$  мг/мл в коллодиевых мешках УН 100/10 фирмы «Schleicher und Schüll» (ФРГ). Раствор и кристаллический образец помещали в пирексовые капилляры с внутренним диаметром 1 мм. Для предотвращения локального теплового разрушения образца под лазерным лучом кристаллы помещали в противораствор (75% (объемн.%) раствор 2-метил-2,4-пентандиола в NaOAc-буфере), а спектры снимали при вращении капилляра. Спектры КР были получены на раман-спектрометре «Ramanog HG-2S» (Jobin Yvon) с двойным монохроматором на вогнутых голографических решетках и фотоумножителем типа RCA-c31034. Для возбуждения использовалась линия 514,5 нм Ar<sup>+</sup>-лазера «Spectra Physics 164-03». Накопление спектров в аналоговом режиме и их обработку проводили с помощью компьютера «Nicolet-1180».

### ЛИТЕРАТУРА

1. Khokhlov A. S., Reshetov P. D., Chupova L. A., Cherches B. Z., Zhigis L. S., Stoyachenko L. A. Chemical studies on actinoxanthin.— J. Antibiotics, 1976, v. 29, № 10, p. 1026—1034.
2. Khokhlov A. S., Cherches B. Z., Reshetov P. D., Smirnova G. M., Sorokina I. B., Kolditskaja T. A., Smirnov V. V., Navashin S. M., Fomina I. P. Physico-chemical and biological studies on actinoxanthin, an antibiotic from *Actinomyces globisporus* 1131.— J. Antibiotics, 1969, v. 22, № 11, p. 541—544.
3. Хохлов А. С., Черчес Б. З., Решетов П. Д., Смирнова Г. М., Колодицкая Т. А., Сорокина И. Б., Прокопцева Т. А., Рябова И. Д., Смирнов В. В., Навашин С. М., Фомина И. П. Актиноксантин, очистка и биологические свойства.— Изв. АН СССР. Сер. биол., 1970, № 5, с. 755—763.
4. Плетнев В. З., Траханов С. Д., Цыганник И. Н. Трехмерная структура актиноксантина. I. Кристаллизация и предварительные рентгеноструктурные данные.— Биоорган. химия, 1979, т. 5, № 11, с. 1605—1608.
5. Плетнев В. З., Кузин А. П., Траханов С. Д., Попович В. А., Цыганник И. Н. Пространственная структура актиноксантина. II. Локализация тяжелых атомов в изоморфных производных прямыми рентгеновскими методами.— Биоорган. химия, 1980, т. 6, № 4, с. 563—569.
6. Spiro T. G., Gaber B. P. Laser Raman spectroscopy as a probe of conformation.— Ann. Rev. Biochem., 1977, v. 46, p. 553—572.
7. Lippert J. L., Tyninski D., Desmeules P. J. Determination of the secondary structure of proteins by laser Raman spectroscopy.— J. Amer. Chem. Soc., 1976, v. 98, № 22, p. 7075—7080.
8. Fox J., Tu A. T. Conformational analysis of a snake venom neurotoxin by prediction from sequence, circular dichroism, and Raman spectroscopy.— Arch. Biochem. and Biophys., 1979, v. 193, № 2, p. 407—414.
9. Siamwiza M. N., Lord R. C., Chen M. C., Takamatsu T., Harada I., Matsuura H., Shimanouchi T. Interpretation of the doublet at 850 and 830  $\text{cm}^{-1}$  in the Raman spectra of tyrosyl residues in proteins and certain model compounds.— Biochemistry, 1975, v. 14, № 22, p. 4664—4668.
10. Yu N. T. Comparison of protein structure in crystals, in lyophilized state, and in solution by laser Raman Scattering. III.  $\alpha$ -lactalbumin.— J. Amer. Chem. Soc., 1974, v. 96, № 14, p. 4664—4668.
11. Yu N. T., Jo B. H. Comparison of protein structure in crystals, in lyophilized state, and in solution by laser Raman Scattering. II. Ribonuclease A and carboxipeptidase.— J. Amer. Chem. Soc., 1973, v. 95, № 16, p. 5033—5037.
12. Yu N. T., Liu C. S., O'Shea D. C. Laser Raman spectroscopy and the conformation of insulin and proinsulin.— J. Mol. Biol., 1972, v. 70, № 1, p. 117—132.

Поступила в редакцию  
29.IX.1980

## ACTINOXANTHINE STRUCTURE IN CRYSTAL AND AQUEOUS SOLUTION

NABIEV I. R., TRAKHANOV S. D., PLETNEV V. Z., EFREMOV E. S.

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

Laser Raman spectroscopy was used for a comparative study of actinoxanthine in crystal and in aqueous solution. Basing on the analysis of Amide I and Amide III bands as well as the region of valent C—C and C—N vibrational bands, the conclusion was drawn that the conformation of actinoxanthine polypeptide chain in crystal is similar to that in solution. The similarity of valent S—S and C—S bands as well as the similarity of the spectra in the region of the Fermi-resonance dublet of tyrosine testify to the identity of configuration of disulfide bonds and, probably, the state of hydroxyl groups of tyrosine residues in crystal and solution. The content of  $\beta$ -structure, unordered form and  $\alpha$ -helix was quantitated from the laser Raman spectra taken in solution.