



УДК 547.962+539.26

СТРУКТУРА АКТИНОКСАНТИНА НА АТОМНОМ УРОВНЕ

Плетнев В. З., Кузин А. П.

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

Малкина Л. В.

Институт кристаллографии им. А. В. Шубникова Академии наук СССР, Москва

Пространственная структура противоопухолевого белка актиноксантина определена рентгеновским методом изоморфного замещения при разрешении 2 Å. Приведены координаты α -углеродных атомов аминокислотных остатков и описаны детали молекулярной геометрии белка, включая распределение угловых параметров ϕ , ψ , χ_1 , расположение внутримолекулярных водородных связей, положение по цепи элементов вторичной структуры и данные по локализации тяжелых ионов на функциональных группах в изоморфных производных белка.

Интересные свойства антибиотика белковой природы актиноксантина *Actinomyces globisporus* (M 10 300), обладающего антибактериальной и противоопухолевой активностью [1], послужили причиной развертывания широких рентгеноструктурных исследований в плане дальнейшего изучения структурно-функциональной зависимости. Определение рентгеновскими методами полизоморфного замещения кристаллической ($P2_12_12_1$; a 30,9 Å, b 48,8 Å, c 64,1 Å и Z 4 [2]) структуры апоформы актиноксантина с разрешением 4 Å [3] и затем 2,5 Å [4] позволило установить ряд существенных деталей его пространственной организации. Отличительной особенностью полученной структуры является отсутствие α -спиралей и повышенное содержание антипараллельной β -структуры. Основная часть белковой цепи (~70%) представляет собой слегка уплощенный двухслойный цилиндр, образованный семью антипараллельными β -сегментами (S1—S7).

Внутренняя полость цилиндра заполнена плотно упакованными, ориентированными к оси цилиндра боковыми цепями гидрофобных остатков, внешняя поверхность состоит в основном из боковых радикалов гидрофильных остатков. Найденная β -супервторичная структура обнаруживает сильное топологическое сходство с соответствующими β -укладками в доменах иммуноглобулинов, субъединицах супероксиддисмутазы, в белках азурине и пластоцианине [4].

Меньшая (~30%) и менее регулярная часть белка включает в себя два сближенных в пространстве, замкнутых дисульфидными связями цикла 34—43 и 83—88 и искривленную двухсегментную ($\beta 1$ и $\beta 2$) β -шпильку, расположенную на удлиннном переходе между сегментами S5 и S6 β -цилиндра.

Обе части молекулы разделены ярко выраженной молекулярной полостью, которая, по-видимому, служит местом связывания низкомолекулярного небелкового компонента — хромофора.

Было показано, что актиноксантин и родственные белки неокардиостатин и ауромоминин проявляют активность только в комплексе с хромофором [5—6], причем роль активного фактора отводится именно этому компоненту. Белковая же часть осуществляет лишь транспортную роль и защищает хромофор от инактивации.

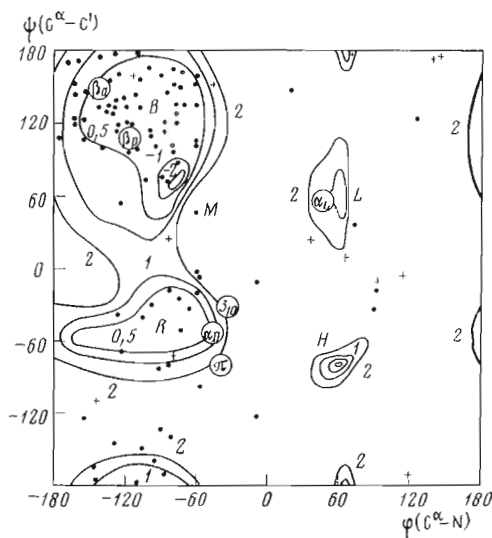
Химическая структура хромофора актиноксантина неизвестна, хотя спектральными методами было показано его сходство с хромофорной

Координаты α -углеродных атомов актиноксантина

№	Оста-ток	x/a	y/b	z/c	№	Оста-ток	x/a	y/b	z/c
1	Ala	0,272	-0,141	0,099	65	Arg	-0,370	-0,132	0,438
2	Pro	0,166	-0,160	0,125	66	Lys	-0,311	-0,129	0,490
3	Ala	0,136	-0,115	0,172	67	Ser	-0,359	-0,198	0,506
4	Phe	0,043	-0,115	0,211	68	Tyr	-0,420	-0,253	0,476
5	Ser	0,021	-0,058	0,249	69	Ala	-0,444	-0,330	0,476
6	Val	0,073	-0,029	0,280	70	Gly	-0,347	-0,373	0,458
7	Ser	-0,095	0,045	0,295	71	Gln	-0,360	-0,415	0,409
8	Pro	-0,114	0,043	0,353	72	Thr	-0,273	-0,444	0,373
9	Ala	-0,053	-0,018	0,376	73	Pro	-0,285	-0,445	0,314
10	Ser	-0,034	0,017	0,428	74	Ser	-0,315	-0,521	0,319
11	Gly	-0,109	0,053	0,466	75	Gly	-0,422	-0,501	0,344
12	Leu	-0,202	0,013	0,443	76	Thr	-0,403	-0,529	0,398
13	Ser	-0,312	0,010	0,470	77	Pro	-0,427	-0,476	0,440
14	Asp	-0,386	-0,051	0,461	78	Val	-0,334	-0,460	0,477
15	Gly	-0,472	-0,045	0,419	79	Gly	-0,370	-0,407	0,517
16	Gln	-0,399	0,007	0,392	80	Ser	-0,372	-0,330	0,529
17	Ser	-0,385	0,001	0,333	81	Val	-0,272	-0,290	0,513
18	Val	-0,270	-0,001	0,311	82	Asp	-0,237	-0,223	0,540
19	Ser	-0,231	0,013	0,256	83	Cys	-0,171	-0,181	0,502
20	Val	-0,169	-0,047	0,233	84	Ala	-0,133	-0,147	0,552
21	Ser	-0,098	-0,042	0,185	85	Thr	-0,065	-0,210	0,566
22	Gly	-0,041	-0,093	0,150	86	Asp	-0,071	-0,256	0,518
23	Ala	0,036	-0,087	0,104	87	Ala	-0,002	-0,237	0,471
24	Ala	0,105	-0,136	0,072	88	Cys	-0,090	-0,212	0,434
25	Ala	0,029	-0,197	0,067	89	Asn	-0,067	-0,196	0,378
26	Gly	-0,074	-0,210	0,036	90	Leu	-0,113	-0,198	0,322
27	Glu	-0,164	-0,264	0,040	91	Gly	-0,070	-0,247	0,281
28	Thr	-0,234	-0,283	0,086	92	Ala	-0,103	-0,258	0,225
29	Tyr	-0,195	-0,281	0,142	93	Cly	-0,070	-0,300	0,178
30	Tyr	-0,241	-0,285	0,197	94	Asn	-0,096	-0,366	0,149
31	Ile	-0,232	-0,240	0,246	95	Ser	-0,040	-0,429	0,128
32	Ala	-0,261	-0,244	0,303	96	Gly	0,035	-0,384	0,096
33	Gln	-0,212	-0,230	0,356	97	Leu	0,079	-0,339	0,139
34	Cys	-0,167	-0,294	0,382	98	Asn	0,054	-0,326	0,196
35	Ala	-0,102	-0,311	0,431	99	Leu	0,068	-0,249	0,191
36	Pro	-0,027	-0,372	0,439	100	Gly	0,104	-0,248	0,248
37	Val	-0,080	-0,409	0,485	101	His	0,038	-0,215	0,292
38	Gly	-0,079	-0,481	0,508	102	Val	0,047	-0,155	0,329
39	Gly	-0,002	-0,488	0,462	103	Ala	0,035	-0,145	0,388
40	Gln	-0,096	-0,473	0,425	104	Leu	0,016	-0,077	0,416
41	Asp	-0,133	-0,410	0,395	105	Thr	-0,008	-0,063	0,474
42	Ala	-0,235	-0,379	0,418	106	Phe	-0,125	-0,052	0,490
43	Cys	-0,283	-0,328	0,379	107	Gly	-0,130	-0,006	0,541
44	Asn	-0,390	-0,290	0,378					
45	Pro	-0,464	-0,333	0,344					
46	Ala	-0,506	-0,264	0,328					
47	Thr	-0,453	-0,198	0,308					
48	Ala	-0,397	-0,256	0,279					
49	Thr	-0,429	-0,253	0,222					
50	Ser	-0,376	-0,256	0,169					
51	Phe	-0,334	-0,204	0,129					
52	Thr	-0,282	-0,201	0,076					
53	Thr	-0,194	-0,155	0,054					
54	Asp	-0,199	-0,116	0,003					
55	Ala	-0,130	-0,121	-0,046					
56	Ser	-0,047	-0,095	-0,007					
57	Gly	-0,082	-0,113	0,048					
58	Ala	-0,073	-0,077	0,101					
59	Ala	-0,195	-0,075	0,103					
60	Ser	-0,239	-0,027	0,146					
61	Phe	-0,331	-0,042	0,184					
62	Ser	-0,365	-0,032	0,240					
63	Phe	-0,358	-0,084	0,285					
63'	Thr	-0,404	-0,078	0,340					
64	Val	-0,338	-0,114	0,383					

Примечание. Номером 63' помечен предполагаемый остаток Thr, локализованный (дополнительно к известной аминокислотной последовательности [10]) при проведении хода полипептидной цепи на 2,5 Å карте электронной плотности.

Рис. 1. Распределение конформационных углов φ , ψ основной цепи актиноксантина на потенциальной поверхности Ас-Ala-NHMe; крестиками отмечены положения углов остатков Gly



частью неокарциностаина [7]. Для последней была установлена лишь частичная структура: она включает производное нафталинкарбоновой кислоты и модифицированный остаток галактозы, разделенные углеводородной цепью [8]; молекулярный вес хромофора равен 661.

Данное исследование посвящено изучению конформационных особенностей актиноксантина на атомном уровне. Проведен анализ структуры, полученной с разрешением 2 Å после семи циклов предварительного уточнения в прямом пространстве по методу Даймонда [9]. При этом понижение R -фактора от 0,53 до 0,38 (по 5160 рефлексам с $l > 3$, и ограничением $10 \text{ \AA} > d \geq 2 \text{ \AA}$) дало количественное подтверждение общей правильности атомной организации белка, установленной по 2,5 Å-карте электронной плотности на оптическом компараторе Ричардса.

В предлагаемом сообщении представлены надежно установленные результаты, касающиеся отдельных деталей молекулярной геометрии актиноксантина на данном начальном этапе уточнения.

В табл. 1 представлены координаты C^α -атомов остатков актиноксантина, полученные после седьмого цикла уточнения структуры в прямом пространстве.

Распределение двугранных углов φ и ψ основной цепи белка на потенциальной поверхности остатка аланина (охватывающего конформационные состояния всех остатков, кроме глицина) показало, что угловые параметры ряда остатков, имеющих боковую цепь, располагаются на конформационной карте в энергетически невыгодных для изолированного остатка областях (рис. 1). Можно ожидать, что последующее уточнение структуры должно сместить положения соответствующих точек к ближайшим локальным минимумам.

Большое число водородных связей между β -сегментами (рис. 2) хорошо коррелирует с повышенной плотностью φ, ψ -точек в конформационной области B (рис. 1), описывающей β -структурные формы полипептидной цепи.

Распределение β -структурных участков и β -изгибов по цепи белка (табл. 2) получены на основе анализа положения внутримолекулярных водородных связей и конформационных состояний фрагментов по углам φ, ψ . Девять β -структурных участков и семь β -изгибов включают около 80% всех остатков белка (54—53 и 26% соответственно). Оставшиеся 20% остатков располагаются в неупорядоченных областях. β -участок $S4$ состоит из двух коротких β -сегментов 40—43 и 48—54, разделенных β -петлей 44—47. Конформационные формы найденных β -изгибов относятся к четырем (из восьми встречающихся в белках [12—13]) резко различающимся

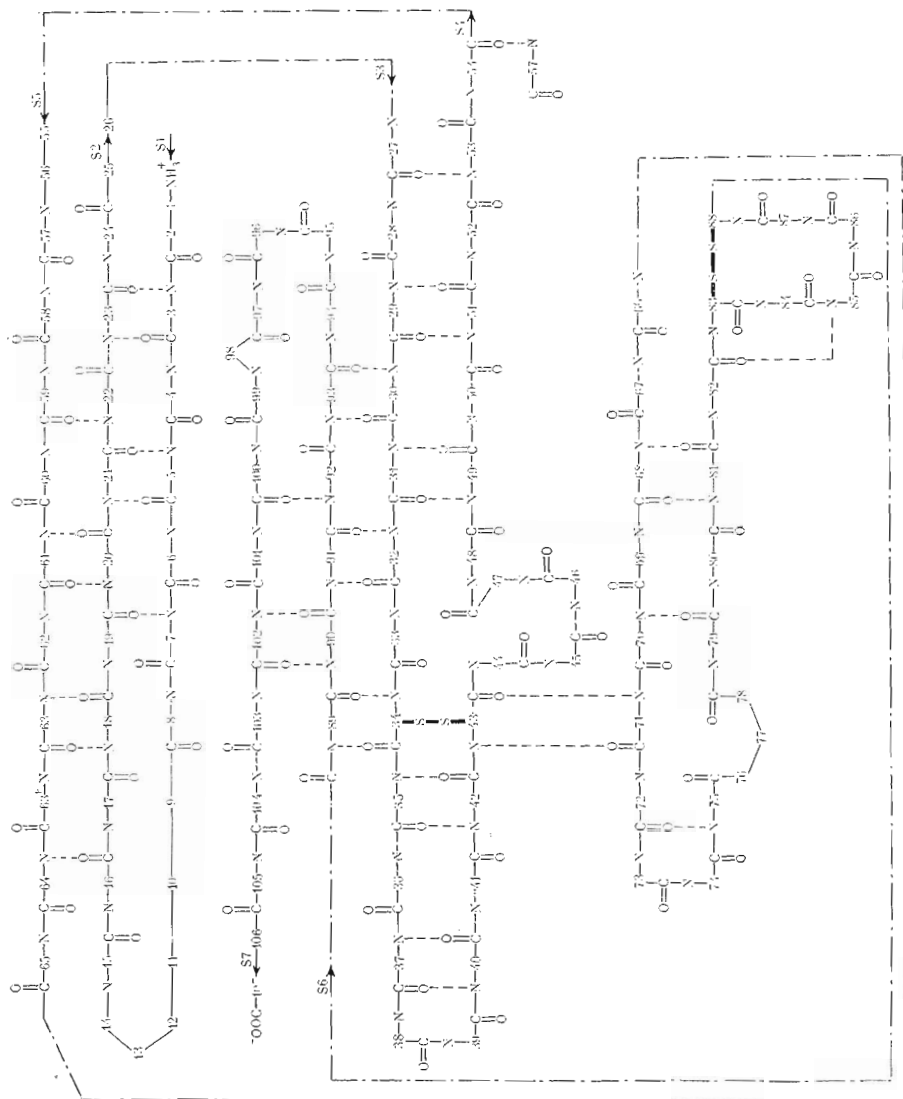


Рис. 2. Локализация внутримолекулярных водородных связей в структуре актиноксантина

Вторичная структура актиноксантина

β-сегмент	Локализация	β-изгиб	Локализация	Тип [11—13]
β-цилиндр				
S1	3—6	S1—S2	9—12	VII
S2	16—23	S3—S4	37—40	I'
S3	28—37	S4—S5	54—57	I
S4	40—43	β-петля на S4	44—47	VII
	48—54			
S5	60—64	S6—S7	94—97	III
S6	88—93			
S7	101—102			
β-шпилька				
β1	67—72	β1—β2	72—75	III
β2	80—82	После β2	82—85	III

тидам. Величины φ , ψ -углов β -сегмента 67—72 и β -изгиба 54—57 показывают заметные отклонения от наиболее оптимальных по энергии значений.

На рис. 3 дана объединенная диаграмма распределения углов χ_1 боковых цепей аминокислотных остатков актиноксантина, исключая Gly и Pro. Максимальная заселенность соответствует значениям углов 60, 180 и 300°, отвечающим минимумам торсионной энергии при вращении вокруг связей $C^\alpha-C^\beta$. Боковые радикалы шести остатков характеризуются невыгодной с точки зрения этого критерия ориентацией: 0, 120, 240°. При дальнейшем уточнении ожидается определенная энергетическая оптимизация положений этих радикалов.

В табл. 3 представлены данные по связыванию тяжелых атомов на функциональных группах белка в пяти использованных для решения структуры изоморфных производных. Остатки, участвующие в связывании, характерны для большинства производных других белков [14]. Пространственное распределение тяжелых ионов в производных актиноксантина указывает на наличие в молекуле белка трех основных, сильно удаленных друг от друга областей связывания. Наиболее густо заселенная область находится в молекулярной полости. Две другие расположены по разные стороны от полости и примыкают к полюсам воображаемого эллипсоида со стороны N- и C-концов молекулы соответственно. Подавляющее большинство тяжелых ионов локализуется на концевых заряженных группах боковых цепей гидрофильных остатков за счет электростатических взаимодействий.

Пространственная структура актиноксантина имеет вытянутую почкообразную форму. Цилиндрическая часть белка, состоящая из двух право-

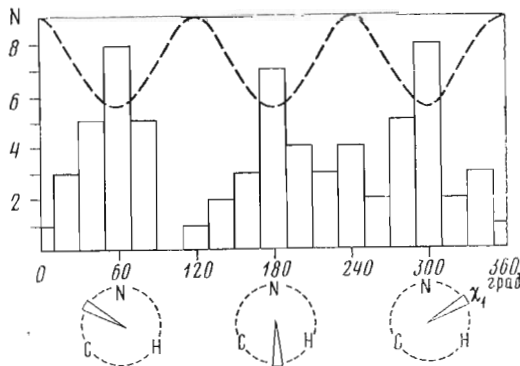


Рис. 3. Диаграмма распределения углов χ_1 боковых цепей аминокислотных остатков актиноксантина. Пунктирной линией схематически показана форма торсионного потенциала, описывающего вращение вокруг связи $C^\alpha-C^\beta$

Локализация тяжелоатомных групп в изоморфных производных актиноксантина

Производное	№ центра	Положение присоединения	№ центра	Положение присоединения
UO ₂ (NO ₃) ₂	1 *	Asp (86), Arg (65)	5 *	Ser (80)
	2 **	Asp (54)	6 **	Glu (27)
	3 ***	Asn (98)	7 ***	Asp (41)
	4 ***	Asp (41)		
K ₂ Pt(NO ₂ Cl) ₂	1 ***	Cys (34, 43), Asp (41)	4 ***	Asp (41)
	2 ***	His (101)	5 ***	His (101)
	3 ***	Asn (98)	6 ***	Cys (34, 43), Asp (41)
KAuCl ₄	1 ***	Asp (41), His (101)	5 ***	Asn (98), His (101)
	2 ***	Asn (98), His (101)	6 *	Asp (82)
	3 *	Lys (66)	7 ***	His (101)
	4 ***	Asp (41), Cys (34, 43)	8 ***	Cys (34, 43)
HgCl ₂	1 ***	Asn (98), His (101)	5 ***	Asn (98)
	2 ***	Asn (98)	6 ***	Cys (34, 43), Asp (41)
	3 **	Ala (1), Gln (40)	7 *	Asp (86), Arg (65)
	4 ***	Asp (41)	8 ***	Gly (91)
Pb(CH ₃ COO) ₂	1 *	Asp (86), Arg (65)	5 ***	Asp (41)
	2 ***	Asp (41)	6 **	Glu (27)
	3 ***	Asn (98)	7 **	Glu (27)
	4 **	Ser (60)	8 **	Glu (27)

Примечание. Принадлежность к одной из трех основных областей связывания: * область со стороны С-конца, ** область со стороны N-конца, *** молекулярная полость.

скрученных β-слоев, суживается с одного конца, переходя в завиток и образуя отчетливо выраженную внутримолекулярную полость. Внутренняя боковая поверхность полости выстлана основными цепями водородсвязанных участков S7, S6, S3 и частично S4 с петлей 44–47; там же расположена дисульфидная связь 34–43. Дно полости ограничено боковыми цепями остатков Ala (32, 48) и Pro (45). Периферийная часть обрамлена ориентированными внутрь полости боковыми цепями гидрофобных (Pro (36, 73)) и гидрофильных (Asp (41), Asn (90, 98) и His (101)) остатков. Можно полагать, что при образовании активного комплекса расположенные в полости боковые цепи перечисленных остатков принимают непосредственное участие в связывании молекулы хромофора за счет гидрофобных и электростатических взаимодействий, а также образования водородных связей; гидрофильные остатки, по-видимому, играют основную роль в этом акте.

У края полости на внешней поверхности завитка находится группа из пяти гидрофильных остатков — Gln (71), Gln (40), Thr (72, 76), Ser (74). Боковые цепи последних четырех остатков пространственно сближены и имеют тетраэдрическое расположение. Такая пространственная конфигурация, по-видимому, не случайна, хотя функциональный смысл ее пока неясен.

В целом следует подчеркнуть, что определенные сведения, касающиеся биологической функции белка, включая детали связывания хромофорного компонента в молекулярной полости, могут быть получены путем рентгеноструктурного исследования актиноксантина в активной холоформе.

Авторы приносят большую благодарность акад. Ю. А. Овчинникову за постоянное внимание к работе и ценные замечания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Khokhlov A. S., Cherches B. Z., Reshetov P. D., Smirnova C. M., Sorokina I. B., Koloditskaya T. A., Smirnov V. V., Navashin S. M., Fomina J. P. J. Antibiotics, 1969, v. 22, № 11, p. 541–544.
2. Плетнев В. З., Траханов С. Д., Цыганник Н. Н. Биоорган. химия, 1979, т. 5, № 11, с. 1605–1608.

3. Pletnev V. Z., Kuzin A. P., Trakhanov S. D., Kostetsky P. V., Popovich V. A., Tsuganik I. N. *Biopolymers*, 1981, v. 20, № 4, p. 679-694.
4. Pletnev V. Z., Kuzin A. P., Trakhanov S. D., Kostetsky P. V. *Biopolymers*, 1982, v. 21, p. 287-300.
5. Goldberg I. H., Hatayama T., Kappen L. S., Napier M. A., Povirk L. F. *Molecular Actions and Targets for Cancer Chemotherapeutic Agents*.— Acad. Press, Inc., 1981, p. 163-191.
6. Suzuki H., Miura K., Kumada Y., Takeuchi T., Tanaka N. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1980, v. 94, № 1, p. 255-261.
7. Плетнев В. З., Старовойтова Н. В., Чупова Л. А., Ефремов Е. С. *Биоорганич. химия*, 1982, т. 8, № 2, с. 169-171.
8. Napier M. A., Goldberg I. H., Hensens O. D., Dewey R. S., Liesch J. M., Schonberg G. A. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1981, v. 100, № 4, p. 1703-1712.
9. Diamond R. *Acta Cryst.*, 1966, v. 21, № 2, p. 253-266.
10. Khokhlov A. S., Reshetov P. D., Chupova L. A., Cherches B. Z., Zhigis L. S., Stoyachenko I. A. *J. Antibiot.*, 1976, v. 29, № 12, p. 1026-1034.
11. Venkatachalam C. M. *Biopolymers*, 1968, v. 6, № 10, p. 1425-1436.
12. Lewis P. N., Motany F. A., Scheraga H. A. *Biochim. et biophys. acta*, 1973, v. 303, № 2, p. 211-229.
13. Chou P. Y., Fasman G. D. *J. Mol. Biol.*, 1977, v. 115, № 2, p. 135-175.
14. Бландел Т., Джонсон Л. *Кристаллография белка*. М.: Мир, 1979, с. 220-260.

Поступила в редакцию
23.VI.1982

ACTINOXANTHIN STRUCTURE AT THE ATOMIC LEVEL

PLETNEV V. Z., KUZIN A. P., MALININA L. V.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry and A. V. Shubnikov
Institute of Crystallography, Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

The three-dimensional structure of actinoxanthin has been determined by the x-ray multiple isomorphous replacement method at 2 Å resolution. The C^α-atom coordinates are given, and the details of protein molecular geometry are described. These include the location of intramolecular hydrogen bonds, distribution of secondary structure elements and the angle parameters φ , ψ , χ_1 along the backbone, as well as the data concerning localization of the heavy atom ions at the functional groups in the protein isomorphous derivatives.