



УДК 615.779.931 + 547.962

## АКТИНОКСАНТИН

## VII. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОЛОЖЕНИЯ ДИСУЛЬФИДНЫХ СВЯЗЕЙ \*

*Жигис Л. С., Стояченко И. А., Черес В. З.,  
Решетов П. Д., Хохлов А. С.*

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

Ранее сообщалось об установлении аминокислотной последовательности противоопухолевого белка актиноксантина, содержащего в полипептидной цепи две дисульфидные связи. Для их локализации были использованы частичный кислотный гидролиз и гидролиз термолизином. Методом диагонального электрофореза получено 10 пептидов, последовательность которых была определена полностью или частично при сопоставлении с известной структурой актиноксантина. На основании полученных данных сделан вывод о наличии дисульфидных связей Cys<sup>34</sup>—Cys<sup>43</sup> и Cys<sup>83</sup>—Cys<sup>88</sup>.

В ходе определения первичной структуры противоопухолевого белка актиноксантина было установлено строение пептидов, образующихся при химотриптическом, термолитическом и триптическом гидролизе тетра-S-карбоксиметил- и тетра-S-аминоэтилактоиноксантина, в результате чего была реконструирована его полная аминокислотная последовательность [1—3]. Попытки обнаружения в актиноксантине свободных сульфгидрильных групп путем обработки в денатурирующих условиях такими реагентами на SH-группу, как *n*-хлормеркурбензоат, реактив Эллмана, радиоактивные этиленимин и иодацетамид, дали отрицательные результаты [4], что позволило нам сделать вывод о наличии в актиноксантине двух дисульфидных связей. Их локализации посвящена настоящая работа.

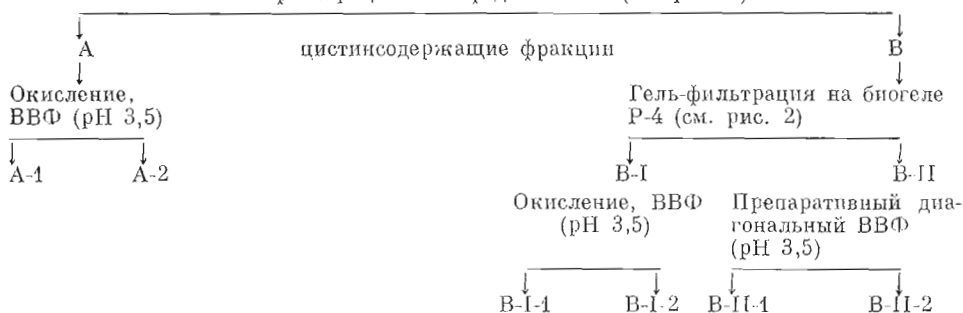
Как сообщалось ранее, нативный актиноксантин устойчив к действию трипсина и химотрипсина. Гидролиз термолизином, пепсином и субтилизином в обычных условиях приводит к гетерогенной смеси пептидов, из которой не представляется возможным выделить цистинсодержащие пептиды. При кислотном гидролизе актиноксантина по остаткам аспарагиновой кислоты [5] (0,03 н. HCl, 110°) в течение 5, 10 и 16 ч в гидролизате найдено соответственно 21, 65 и 95% аспарагиновой кислоты. Поскольку в слабокислой среде при отсутствии кислорода воздуха и тиолов не наблюдается заметного дисульфидного обмена, была сделана попытка использовать указанные условия частичного кислотного гидролиза для получения цистинсодержащих пептидов.

Нативный актиноксантин гидролизовали в указанных условиях в течение 16 ч (гидролиз I, см. «Экспериментальную часть») и полученную смесь пептидов фракционировали согласно схеме. Присутствие цистин-

\* Сообщение VI см. [1].

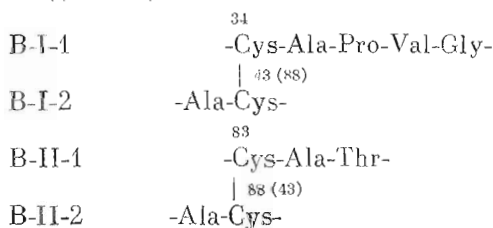
## Выделение цистинсодержащих продуктов гидролиза I актиноксантина \*

Гель-фильтрация на сефадексе G-25 (см. рис. 1)



\* ВВФ — высоковольтный электрофорез.

содержащих пептидов в полученных фракциях А и В и гомогенность цистинсодержащих фрагментов А и В-I были доказаны методом диагонального электрофореза [6]. После окисления пептидов А и В-I надмуравьиной кислотой и последующего высоковольтного электрофореза на бумаге получены две пары пептидов А-1 и А-2, В-I-1 и В-I-2, аминокислотный состав которых приведен в таблице. Из фракции В-II методом препаративного диагонального электрофореза на бумаге при pH 3,5 получена пара пептидов В-II-1 и В-II-2, аминокислотный состав которых также приведен в таблице. На основании аминокислотного состава с учетом известных данных о строении актиноксантина [1] можно сделать вывод, что полученные цистинсодержащие пептиды соответствуют следующим участкам полипептидной цепи актиноксантина:



**Аминокислотный состав цистинсодержащих пептидов актиноксантина**

Пептид	Cys (O <sub>2</sub> H)	Asp	Thr	Ser	Glu	Pro	Gly	Ala	Val	Ile	Количество аминокислот в пептиде
A-1 *	0,84 (1)				1,00 (1)	1,00 (1)	0,84 (1)	1,83 (2)	1,17 (1)	0,67 (1)	8
A-2	1,00 (1)			(0,67)			(0,67)	1,00 (1)			2
B-I-1	0,65 (1)					0,87 (1)	1,08 (1)	1,30 (2)	1,08 (1)		5
B-I-2	1,00 (1)							1,00 (1)			2
B-II-1	0,75 (1)		1,00 (1)					1,00 (1)			3
B-II-2	1,00 (1)							0,95 (1)			2
S-I-1	1,05 (1)	1,80 (2)	0,82 (1)					1,80 (2)			6
S-I-2	0,91 (1)	1,00 (1)							1,00 (1)		3
S-II-1	0,82 (1)				1,00 (1)	0,91 (1)		2,00 (2)		0,82 (1)	6
S-II-2	0,86 (1)	1,00 (1)				0,81 (1)		1,05 (1)			4

\* Кроме указанных аминокислот идентифицирован Туг.

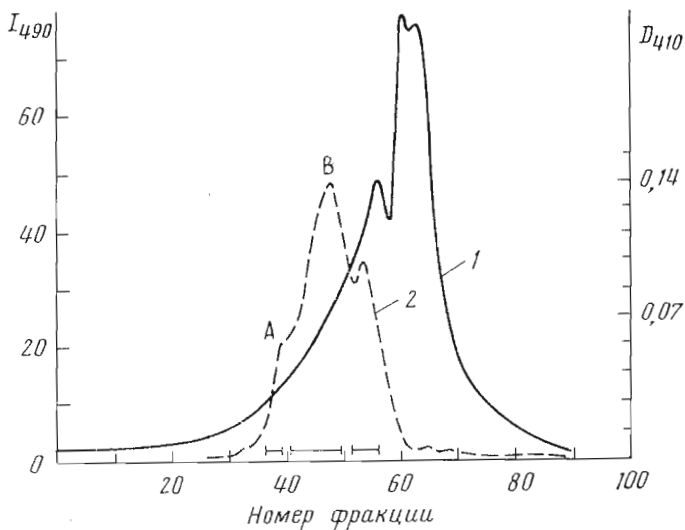


Рис. 1. Гель-фильтрация на сефадексе G-25 продуктов гидролиза I актиноксантина: 1 — интенсивность флуоресценции (в относительных единицах); 2 —  $D_{410}$

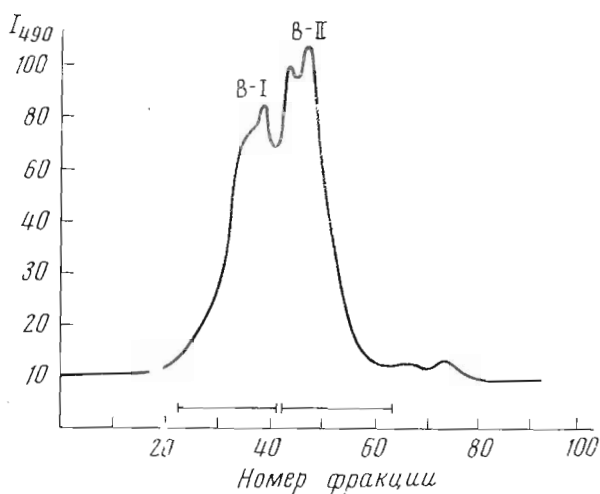


Рис. 2. Гель-фильтрация на биогеле P-4 фракции B

Факт получения идентичных дипептидов B-I-2 и B-II-2 объясняется наличием в актиноксантине двух одинаковых участков -Asp-Ala-Cys-Asp- в районе Cys<sup>43</sup> и Cys<sup>88</sup>. Таким образом, полученные данные свидетельствовали лишь о том, что остатки Cys<sup>34</sup> и Cys<sup>83</sup> не связаны между собой, и не позволяли окончательно локализовать дисульфидные связи в актиноксантине.

При кислотном гидролизе актиноксантина в указанных условиях в течение 10 ч образуется гетерогенная смесь, которую не удалось расфракционировать. Поэтому в дальнейшем полученный гидролизат подвергали дополнительной обработке термолизом при 45° (гидролиз II, см. «Экспериментальную часть»). Полученную смесь пептидов разделяли гель-фильтрацией на сефадексе G-25 (рис. 3). Методом диагонального электрофореза было показано, что во фракции S присутствуют два цистинсодержащих пептида (рис. 4). С помощью препаративного высоковольтного диагонального электрофореза при pH 3,5 из фракции S было получено

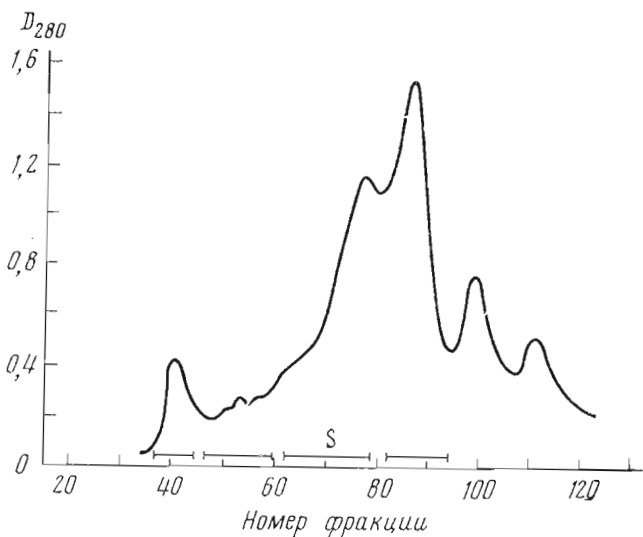


Рис. 3. Гель-фильтрация на сефадексе G-25 продуктов гидролиза II актиноксантина

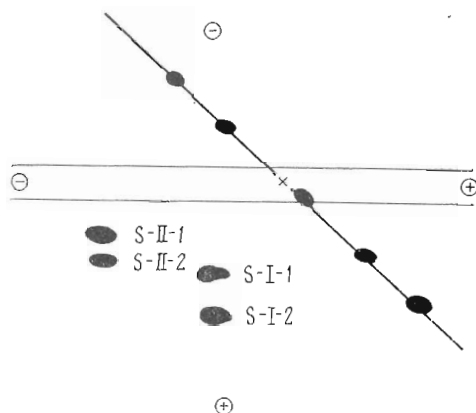
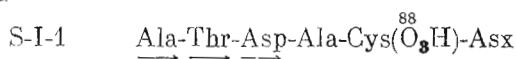


Рис. 4. Диагональный высоковольтный электрофорез фракции S (см. рис. 3)

две пары пептидов S-I-1 и S-I-2, S-II-1 и S-II-2, аминокислотный состав которых приведен в таблице.

Строение пептидов определяли полностью или частично при сопоставлении с известной последовательностью актиноксантина.

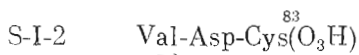
Пептид S-I-1



Строение пептида установлено на основании аминокислотного состава, определения N-концевого аминокислотного остатка и трех стадий деградации по Эдману, после которых в остаточном пептиде (3-S-I-1) по сравнению с исходным найдено:

	Cys(O <sub>3</sub> H)	Asp	Thr	Ala
S-I-1	1,05	1,80	0,82	1,80
	(1)	(2)	(1)	(2)
3-S-I-1	0,90	1,22	0,10	0,86

Пептид S-I-2



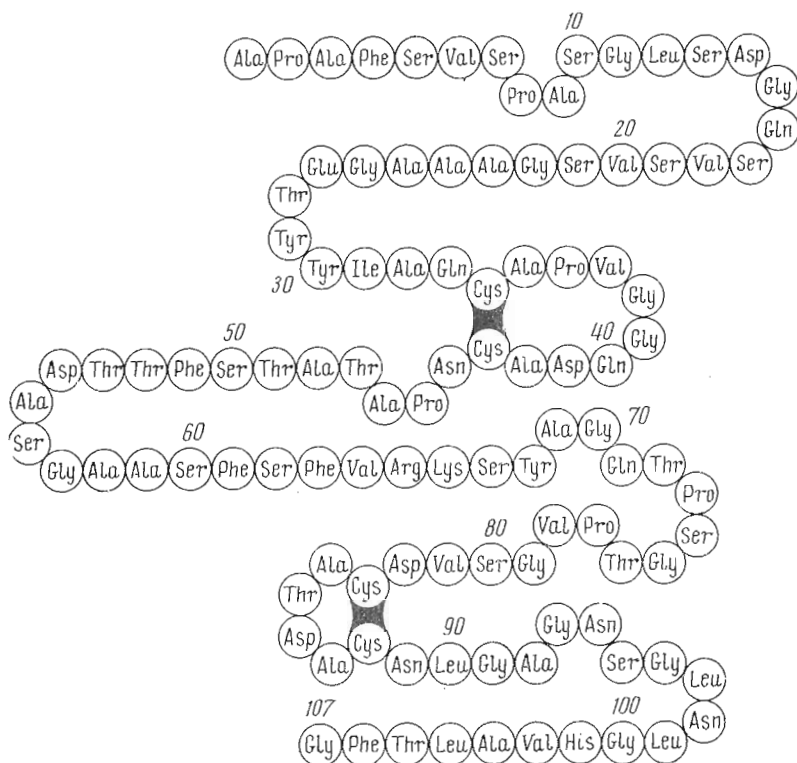
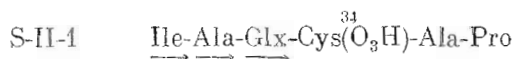


Рис. 5. Первичная структура актиноксантина

Строение пептида определено на основании аминокислотного состава, определения N-концевого аминокислотного остатка и одной стадии деградации по Эдману, после которой в остаточном пептиде (1-S-I-2) в сравнении с исходным найдено:

	Cys(O <sub>3</sub> H)	Asp	Val
S-I-2	0,91	1,00	1,00
	(1)	(1)	(1)
1-S-I-2	1,02	1,00	0,10

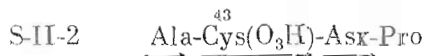
Пептид S-II-1



Строение пептида установлено на основании аминокислотного состава, определения N-концевого аминокислотного остатка и трех стадий деградации по Эдману, после которых в остаточном пептиде (3-S-II-2) в сравнении с исходным найдено:

	Cys(O <sub>3</sub> H)	Glu	Pro	Ala	Ile
S-II-1	0,82	1,00	0,91	2,00	0,82
	(1)	(1)	(1)	(2)	(1)
3-S-II-1	1,00	0,35	0,62	1,04	—

Пептид S-II-2



Строение установлено на основании аминокислотного состава, определения N-концевого аминокислотного остатка и трех стадий деградации по Эдману. После одной стадии деградации в остаточном пептиде (1-S-II-2)

в сравнении с исходным найдено:

	Cys(O <sub>3</sub> H)	Asp	Pro	Ala
S-II-2	0,86 (1)	1,00 (1)	0,81 (1)	1,05 (1)
1-S-II-2	0,90	1,02	0,72	0,15

Строение реконструированных на этом основании цистинсодержащих пептидов позволяет однозначно локализовать положение двух дисульфидных связей в молекуле актиноксантина (рис. 5).

### Экспериментальная часть

Актиноксантин выделяли по методике, ранее разработанной в нашей лаборатории [7,8].

*Гидролиз I.* 50 мг (4,5 мкмоль) нативного белка растворяли в 50 мл 0,03 н. HCl и инкубировали 16 ч при 110° в вакуумированной ампуле.

*Гидролиз II.* 140 мг (12,7 мкмоль) актиноксантина растворяли в 140 мл 0,03 н. HCl и инкубировали 10 ч при 110°. Полученный раствор смеси пептидов лиофилизовали, растворяли в 120 мл N-этилморфолин-ацетатного буфера (pH 6,0), содержащего ионы Ca<sup>2+</sup> (0,002 M), добавляли термолизин (Worthington Biochem. Corp.) в соотношении фермент — субстрат 1 : 30 и инкубировали 24 ч при 45°.

Смеси пептидов фракционировали в обоих случаях гель-фильтрацией на колонке (2 × 150 см) с сефадексом G-25 (fine) в 0,05 н. уксусной кислоте, собирали фракции по 3,0 мл при скорости элюции 40 мл/ч (рис. 1 и 3). Фракции анализировали спектрофлуориметрически после реакции с нингидрином и фенилацетальдегидом ( $\lambda_{\text{возб}}$  390 нм —  $\lambda_{\text{исп}}$  490 нм), как было описано в предыдущих работах [3] (рис. 1 и 2). Для обнаружения цистинсодержащих пептидов во фракциях была использована реакция с 5,5'-дитиобис (2-нитробензойной)кислотой после предварительного восстановления NaBH<sub>4</sub> (измерение поглощения при 410 нм) [9] или метод диагонального электрофореза на бумаге FN12 («Filtrak», ГДР) [6].

Объединенную фракцию B (рис. 1) дополнительно разделяли на колонке с биогелем P-4 (1,7 × 150 см) в 0,05 н. уксусной кислоте. Собирали фракции по 2,7 мл при скорости элюции 40 мл/ч. Профиль элюции представлен на рис. 2.

Фракции A (рис. 1) и B-1 (рис. 2) окисляли надмуравьиной кислотой по стандартной методике [6], образующиеся пары пептидов разделяли с помощью высоковольтного электрофореза на бумаге (75 В/см; pH 3,5; 50 мин).

Пептиды B-II-1 и B-II-2, S-I-1 и S-I-2, S-II-1 и S-II-2 выделяли методом препаративного диагонального электрофореза [10] (75 В/см; pH 3,5; 50 мин).

Аминокислотный состав пептидов определяли после 24-часового гидролиза 6 н. HCl при 110°. Анализы были выполнены на автоматическом анализаторе аминокислот В10 CAL-201 (США). N-Концевые аминокислотные остатки определяли методом Грея и Хартли в виде Dns-производных [11]. Микротонкослойную хроматографию Dns-аминокислот проводили на силикагеле (6 × 6 см) в системах, описанных ранее [12], причем для анализа использовали не более 0,005 мкмоль пептида.

Аминокислотную последовательность пептидов определяли по методу Эдмана [13] на уровне 0,05—0,07 мкмоль пептида. N-концевые аминокислотные остатки остаточных пептидов идентифицировали в виде Dns-производных. Для контроля за ходом деградации в ряде случаев использовали субтрактивный метод [14].

## ЛИТЕРАТУРА

1. Черчес Б. З., Чупова Л. А., Жигис Л. С., Стояченко И. А., Решетов П. Д., Хохлов А. С. (1975) *Биоорганическая химия*, **1**, 1147—1161.
2. Решетов П. Д., Жигис Л. С., Стояченко И. А., Хохлов А. С. (1975) *Биоорганическая химия*, **1**, 940—949.
3. Чупова Л. А., Решетов П. Д., Хохлов А. С. (1975) *Биоорганическая химия*, **1**, 928—939.
4. Черчес Б. З., Чупова Л. А., Решетов П. Д., Хохлов А. С. (1975) *Биоорганическая химия*, **1**, 688—690.
5. Schultz J. (1967) *Methods in Enzymol.* (Hirs C. H. W., ed.), Acad. Press, N. Y., **11**, 255—261.
6. Brown I. R., Hartley B. S. (1966) *Biochem. J.*, **101**, 214—228.
7. Хохлов А. С., Черчес Б. З., Решетов П. Д., Смирнова Г. М., Колодидкая Т. А., Сорокина 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.
8. Khokhlov A. S., Cherches B. Z., Reshetov P. D., Smirnova G. M., Sorokina I. B., Prokoptzeva T. A., Koloditskaya T. A., Smirnov V. V., Navashin S. M., Phomina I. P. (1970) *J. Antib.*, **22**, 541—544.
9. Nabeeb A. F. S. A. (1973) *Anal. Biochem.*, **56**, 60—65.
10. Phelan J. J., Hirs C. H. W. (1970) *J. Biol. Chem.*, **245**, 654—661.
11. Gray W. R., Hartley B. S. (1963) *Biochem. J.*, **89**, 59p — 60p.
12. Spivak V. A., Sherbukhin V. V., Orlov V. M., Varshavsky Ya. M. (1974) *Anal. Biochem.*, **39**, 271—281.
13. Gray W. R. (1967) *Methods in Enzymol.* (Hirs C. H. W., ed.), Acad. Press, N. Y., **11**, 469—475.
14. Konigsberg W. (1967) *Methods in Enzymol.* (Hirs C. H. W., ed.), Acad. Press, N. Y., **11**, 461—468.

Получена в редакцию  
9.IX.1975

## LOCATION OF DISULFIDE BONDS IN ACTINOXANTHIN

ZHIGIS L. S., STOYACHENKO I. A., CHERCHES B. Z.,  
RESHETOV P. D., KHOKHLOV A. S.

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

Previously, actinoxanthin was shown to consist of a single polypeptide chain cross-linked by two disulfide bonds. To determine their position the use was made of the partial acid hydrolysis and thermolytic digestion. Gel filtration on Sephadex G-25, Biogel P-4, and successive performic acid oxidation and diagonal electrophoresis afforded 10 peptides containing cysteic acid. The total or partial amino acid sequence determination for these fragments, along with the data on the primary structure of actinoxanthin, allowed to locate the disulfide bridges at position Cys<sup>34</sup>—Cys<sup>43</sup> and Cys<sup>83</sup>—Cys<sup>88</sup>.