Е.В.КЛЫШКО, А.П.ИЛЬИНА, Г.Н.ЛИХАЦКАЯ, М.П.ИСАЕВА, К.В.ГУЗЕВ, М.М.МОНАСТЫРНАЯ, Э.П.КОЗЛОВСКАЯ, А.В.ЛИПКИН, Е.И.БАРСОВА, И.Б.КРЫЖКО, Е.В.ТРИФОНОВ, Е.А.НУРМИНСКИЙ

Актинопорины: структура и функция

Методами структурной белковой химии и генетической инженерии установлены аминокислотные последовательности фрагментов двух цитолизинов тропической актинии Radianthus macrodactylus RTX-A и RTX-S II (138 и 141 аминокислотных остатков соответственно). Оба цитолизина отнесены согласно их физико-химическим и биологическим свойствам к группе актинопоринов. Изучено действие RTX-S II на ионную проницаемость бислойных липидных мембран, показано, что он является сфингомиелинзависимым каналообразующим цитолизином, формирующим в мембранах олигомерные ионпроводящие комплексы. Установлено ингибирующее действие RTX-S II на оплодотворенные яйцеклетки морского ежа, что может свидетельствовать о взаимодействии актинопоринов с белковыми компонентами цитоскелета клеточной мембраны. Методом сравнительного моделирования получены пространственные модели фрагментов RTX-A и RTX-S II и выявлены их различия в функционально важных участках. Теоретически предсказано образование комплекса актинопорина со структурным белком мембраны, G-актином. В результате образования комплекса возможны нарушение полимеризации актина и ингибирование пролиферации клетки.

Actinoporins: The structure and action. E.V.KLYSHKO, A.P.IL'INA, G.N.LIKHATSKAYA, M.P.ISAEVA, K.V.GUZEV, M.M.MONASTYRNAYA, E.P.KOZLOVSKAYA (Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, FEB RAS, Vladivostok), A.V.LIPKIN, E.I.BARSOVA (M.M.Shemyakin–Yu.A.Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, RAS, Moscow), I.B.KRYZHKO, E.V.TRIFONOV, E.A.NURMINSKY (Institute of Automation and Control Processes, FEB RAS, Vladivostok).

The amino acid sequences of two fragments of cytolysins RTX–A and RTX–S II (138 and 141 amino acids, respectively) from the sea anemone Radianthus macrodactylus have been determined by methods of the structural protein chemistry and genetic engineering. According to their molecular weight, physical–chemical and biological properties, both cytolysins RTX–A and RTX–S II have been referred to the actinoporin group. The RTX–S II action on the ion permeability of the bilayer lipid membranes has been studied. It has been shown that mechanism of the cytolysin action consists in formation of the sphingomyelin–dependent oligomer ion channels in membranes. The actinoporin inhibitory action on the sea urchin eggs has been ascertained that

КЛЫШКО Елена Владимировна, ИЛЬИНА Анна Павловна, ЛИХАЦКАЯ Галина Николаевна, ИСАЕ-ВА Марина Петровна — кандидат медицинских наук, ГУЗЕВ Константин Викторович, МОНАСТЫР-НАЯ Маргарита Михайловна — кандидат химических наук, КОЗЛОВСКАЯ Эмма Павловна — доктор химических наук (Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН, Владивосток), ЛИП-КИН Алексей Валерьевич — кандидат химических наук, БАРСОВА Екатерина Ивановна — кандидат химических наук (Институт биоорганической химии им. М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН, Москва), КРЫЖКО Игорь Борисович — кандидат физико–математических наук, ТРИФОНОВ Евгений Викторович — кандидат физико-математических наук, НУРМИНСКИЙ Евгений Алексеевич — доктор физико–математических наук (Институт автоматики и процессов управления ДВО РАН, Владивосток).

Работа частично поддержана грантом РФФИ № 02–04–49486, программой ФХБ РАН и грантами ДВО РАН по поддержке фундаментальных исследований и исследований молодых ученых.

allows assuming the interaction of actinoporins with proteins of a cell membrane. The 3D-structures of fragments of cytolysins RTX–A and RTX–S II have been obtained by comparative modeling methods and their distinctions in functionally important sites have been revealed. The actinoporin–G-actin complex formation has been theoretically predicted. This formation can result in changes of the actin polymerization and inhibition of the cell proliferation.

Известно, что актинии, относящиеся к типу Coelenterata, являются богатейшим источником биологически активных соединений полипептидной природы, таких как нейро– и цитотоксины, протеолитические ферменты, ингибиторы протеиназ [5, 25, 28]. Нейротоксины являются модуляторами и блокаторами Na⁺ и K⁺ каналов и используются в качестве инструментов в нейрофизиологических и фармакологических исследованиях. В настоящее время возрос интерес к веществам, обладающим мембранотропным и цитостатическим действием, лежащим в основе противоопухолевого, кардиостимулирующего, дерматонекротического, антимикробного, антипаразитарного и других фармакологических свойств этих соединений, и в последнее десятилетие в изучении цитолизинов актиний наблюдается значительный прогресс [8].

Более чем из 30 видов актиний выделены и охарактеризованы цитолитические токсины, которые на основании их первичной структуры и физико–химических свойств были разделены на 4 группы [8]. К І группе относятся цитолизины с молекулярной массой (м. м.) 5—8 кДа, выделенные из Radianthus macrodactylus [2] и Tealia felina [15]. ІІ группу цитолизинов составляют высокоосновные полипептиды (рІ 9 и выше) с м. м. 20 кДа, так называемые актинопорины, выделенные из различных видов семейств Actiniidae и Stichodactylidae [23]. В ІІІ группу входят летальные цитолитические фосфолипазы A_2 (30—40 кДа) из Aiptasia pallida [18] и подобные им по физико–химическим свойствам цитолизины без ферментативной активности из Urticina piscivora [13]. Единственным представителем IV группы холестеринингибируемых цитолизинов является метридиолизин, выделенный из актинии Metridium senile [4, 11], с м. м. 80 кДа.

Наиболее изучены цитолизины ІІ группы: эквинатоксины, стихолизины и магнификализины, выделенные из Actinia equina [16], Stichodactyla helianthus [14] и Heteractis magnifica [21] соответственно. К настоящему времени установлены аминокислотные последовательности восьми зрелых актинопоринов [8]. Для эквинатоксина II установлена кристаллическая структура [10]. Показано, что актинопорины оказывают мембранотропное действие на сфингомиелинсодержащие мембраны эукариот, формируя в них катионселективные ионные каналы (поры), состоящие из 3-4 молекул [3, 14]. В основном работы по изучению механизма действия актинопоринов направлены на исследование их взаимодействия с липидами, входящими в мембрану [3, 12, 17, 22]. К настоящему времени механизм этого процесса до конца не выяснен, но авторами [3, 8, 10, 14, 17, 22, 23, 28] была предложена модель для описания процесса порообразования, согласно которой цитолизин взаимодействует своим богатым триптофанами участком с липидным бислоем, причем это взаимодействие обратимо и не приводит к лизису клетки. Затем N-концевой фрагмент молекулы цитолизина проникает в липидный бислой, конформация молекулы изменяется, образуется достаточно прочный комплекс цитолизина с липидным матриксом, в котором формируются поры, приводящие к нарушению проницаемости мембраны.

Установление структур новых актинопоринов продолжает оставаться актуальным в свете существующей гипотезы Нортона [27] об их роли видовых хемотаксономических маркеров; кроме этого остается невыясненным механизм взаимодействий актинопоринов с мембранными белками клеток, которые, несомненно, вносят свой вклад в процессы трансмембранного транспорта ионов и метаболитов. В настоящее время уровень функциональных исследований зависит от знаний первичной, вторичной, третичной структур биологически активных полипептидов, позволяющих использовать современные методы молекулярного моделирования.

Целью настоящей работы является выделение и установление аминокислотной последовательности актинопоринов из Radianthus macrodactylus методами структурной белковой химии и генетической инженерии, построение пространственной модели актинопоринов и их комплексов со структурным белком клеточной мембраны G-актином методами компьютерного моделирования.

Выделение, физико–химические и биологические свойства актинопорина RTX–S II

Ранее мы выделили и охарактеризовали три высокомолекулярных (20 кДа) цитолизина RTX–A (Ala), RTX–S (Ser) и RTX–G (Gly) из актинии Radianthus macrodactylus, которые показали высокую гемолитическую, токсическую и цитотоксическую активности. Для актинопорина RTX–A (Ala) была установлена аминокислотная последовательность N–концевого фрагмента, состоящего из 31 аминокислотного остатка [26]. Был исследован механизм действия RTX–A на биологических (эритроциты человека, кролика, собаки) [1, 31] и модельных (БЛМ, липосомы различного липидного состава) мембранах [3, 6] и показано, что актинопорин формирует как в тех, так и в других катионселективные ионные каналы. Установлено, что мембранотропное действие полипептида ингибируется экзогенным сфингомиелином.

В данном исследовании мы выделили из R. macrodactylus новый полипептид, обладающий гемолитической активностью и не проявляющий фосфолипазную активность. Схема выделения включала гельпроникающую и ионообменную хроматографии в режиме нормального давления, а также ионообменную и обращенно-фазовую



Рис. 1. Хроматография гемолитически активных фракций из Radianthus macrodactylus. А: ионообменная ВЭЖХ на колонке Ultropac TSK CM-3SW, уравновешенной 0,1 М аммонийно-ацетатным буфером, pH 6,0. Элюция проводилась в градиенте концентрации (пунктирная линия) от 0 до 100 % раствора В (1 М аммонийно-ацетатный буфер, pH 6,0) в растворе А (0,1 М аммонийно-ацетатный буфер, pH 6,0), скорость элюции 1 мл/мин. Б: обращенно-фазовая ВЭЖХ на колонке 242 Nucleosil C18 (2,0x75 мм); элюция в ступенчатом градиенте концентрации (пунктирная линия) от 0 до 65 % растворителя В (ацетонитрил) в растворе А (0,1 %–ная трифторуксусная кислота в воде); скорость элюции 200 мкл/мин



Рис. 2. Дискретные флуктуации проводимости моноолеиновых мембран, содержащих 10 % сфингомиелина, при добавлении токсина RTX-S II (А — 2 нг/мл, Б — 4 нг/мл, В — 50 нг/мл) с одной стороны мембраны. Водная фаза: 0,1 M NaCl, 5 mM Tris–HCl, pH 7,2. Мембранный потенциал 40—50 мВ

ВЭЖХ (рис. 1). В результате был получен гомогенный по данным капиллярного электрофореза полипептид, молекулярная масса которого составляла согласно данным SDS-электрофореза в градиенте плотности ПААГ 20 кДа, изоэлектрическая точка — около 10. Согласно N-концевому анализу он был назван RTX-S II, так как отличался от выделенного нами ранее актинопорина RTX-S временем удерживания при ВЭЖХ на колонке Ultropac TSK CM-3SW и имел некоторые различия в аминокислотном составе.

Гемолитическая активность RTX-S II составила 3,6·10⁴ ГЕ/мг белка. Наиболее близки по гемолитической активности актинопорины стихолизин II из S. helianthus (3,14·10⁴ ГЕ/мг) и магнификализины I и II из H. magnifica (3,6.10⁴ и 3,3.10⁴ ГЕ/м соответственно) [14, 21]. Наличие еще одного представителя актинопоринов не вызывает удивления, так как известно, что эти полипептиды существуют в виде изоформ с очень

близкими физико-химическими характеристиками и принадлежат к мультигенному семейству [7].

Действие цитолизина RTX–S II на ионную проницаемость мембран изучено с помощью техники бислойных липидных мембран (БЛМ). Обнаружено, что RTX–S II вызывает дискретные изменения проводимости мембран, содержащих сфингомиелин, при добавлении в водную фазу с одной стороны мембраны (рис. 2). Действие цитолизина на ионную проницаемость мембран зависит от их липидного состава и pH среды. Активность цитолизина увеличивается при действии на мембраны, содержащие сфингомиелин, и наибольшая она в слабощелочной среде; проявляется при концентрациях 2—100 нг/мл, сопоставимых с действующими концентрациями актинопоринов из других тропических видов актиний. Анализ величины флуктуаций проводимости, индуцированной RTX–S II в моноолеиновых БЛМ, содержащих 10 % сфингомиелина, показал, что наиболее вероятная проводимость каналов составляет 72 ± 8 пСм в 0,1 M NaCl при pH 7,2. Зависимость интегральной проводимости мембран от концентрации цитолизина (рис. 3) показала, что при изменении концентрации RTX–S II в 10 раз проводимость мембраны увеличивается на 4 порядка. Это указывает на участие 4 молекул полипептида в образовании олигомерного ион-проводящего комплекса в мембране. Таким образом, механизм действия RTX-S II на мембраны состоит в сфингомиелинзависимом формировании в липидном бислое олигомерных ион-проводящих структур, детальное строение которых предполагается изучить в дальнейшем. Цитолизин RTX-S II по своим физико-химическим свойствам и механизму действия на проницаемость мембран можно отнести к группе актинопоринов.



Рис. 3. Зависимость интегральной проводимости мембран из 1 %-ного моноолеина в н-гептане, содержащих 10 % сфингомиелина, от концентрации токсина RTX-S II в водной фазе (0,1 M NaCl, 5 mM Tris-HCl, pH 7,2) с одной стороны мембраны. Данные приведены в двойном логарифмическом масштабе. Наклон кривой n=4,1

Установление аминокислотной последовательности актинопоринов RTX-S II и RTX-А

Установлена аминокислотная последовательность N-концевого фрагмента RTX-S II: SAALAGTITLGASLG-. При сравнении этого фрагмента с аналогичными аминокислотными последовательностями других актинопоринов, а также с последовательностью RTX-A была обнаружена высокая степень их гомологии. Однако некоторые различия в первичной структуре позволили нам синтезировать прямые специфичные праймеры к N-концевым участкам последовательностей RTX-A (A: 5'-GCTATTATT/C/AGCNGGNGC-3') и RTX-S II (S: 5'-ACAAT-TAT/CTCTCGGGGCAAGTCTAGG-3'). Обратный праймер (R: 5'-ATG CCA TCC A/GTT A/GTC NCC-3') был синтезирован к высокогомологичному С-концевому участку последовательностей актинопоринов (рис. 4).

При проведении полимеразной цепной реакции (ПЦР) с праймерами A и R в качестве матрицы была использована полноразмерная кДНК-библиотека R. macrodactylus. ПЦР-фрагмент, содержащий около 420 пар оснований (п. о.), был клонирован в pTZ19R (Fermentas) и секвенирован. На основании полученной нуклеотидной последовательности была выведена частичная аминокислотная последовательность RTX-A (138 AK). При установлении аминокислотной последовательности RTX-S II ПЦР проводилась с праймерами S и R и геномной ДНК, выделенной из щупалец актинии. Нуклеотидная последовательность, состоящая из 423 п. о. и кодирующая 141 аминокислоту, была получена при прямом секвенировании ПЦР-фрагмента. Ранее было показано, что гены, кодирующие актинопорины, не содержат интронов [9]. Мы также не обнаружили интронных нуклеотидных последовательностей, по крайней мере на этом участке кодирующего региона. Идентичность полученных последовательностей RTX-A (138 AK) и RTX-S II (141 AK) составляет 89 %, а с учетом консервативных замен — 95 % (рис. 4).

При множественном выравнивании аминокислотных последовательностей методом CLUSTLW была обнаружена высокая степень гомологии RTX–A и RTX–S II с HET3, магнификализином из H. magnifica (87 % и 96 % соответственно) и с CYT1, CYT2, стихолизинами из S. helianthus (84—86 % и 87—91 % соответственно). Такая высокая степень гомологии аминокислотных последовательностей RTX–A и RTX–S II с магнификализином и стихолизинами может быть

		→					
RTX-S II	TI TL	GASLGFOILD	KVLGELGKVS	RKIAVGVDNE	SGGSWTALNA	YFRSGTTDVI	54
RTX-A		GASLTFQILD	KVLAELGQVS	RKIAIGIDNE	SGGSWTAMNA	YFRSGTTDVI	50
HET3	SAALAGTIIE	GASLGFQILD	KVLGELGKVS	RKIAVGVDNE	SGGSWTALNA	YFRSGTTDVI	60
CYT2	ALAGTIIA	GASLTFQVLD	KVLEELGKVS	RKIAVGIDNE	SGGTWTALNA	YFRSGTTDVI	58
CYT1	-SELAGTIID	GASLTFEVLD	KVLGELGKVS	RKIAVGIDNE	SGGTWTALNA	YFRSGTTDVI	59
EQT5	SVAVAGAVIE	GATLTFNVLQ	TVLKALGDIS	RKIAVGIDNE	SGMTWTAMNT	YFRSGTSDVI	60
EQT4	SVAVAGAIIK	GAALTFNVLQ	TVLKALGDIS	RKIAVGVDNE	SGKTWTALNT	YFRSGTSDIV	60
SrcI	-KISGGTVIA	AGRLTLDLLK	TLLGTLGSIS	RKIAIGVDNE	TGGLITGNNV	YFRSGTSDDI	59
EQT2	SADVAGAVID	GASLSFDILK	TVLEALGNVK	RKIAVGVDNE	SGKTWTALNT	YFRSGTSDIV	60
RTX-S II	LPEFVPNQKA	LLYSGRKDTG	PVATGAVAAF	AYYMSNGHTL	GVMFSVPFDY	NLYSNWWDVK	114
RTX-A	LPEFVPNQKA	LLYSGRKNRG	PDTTGAVGAL	AYYMSNGNTL	GVMFSVP FDY	NLYSNWWDVK	110
HET3	LPEFVPNQKA	LLYSGRKDTG	PVATGAVAAF	AYYMSNGHTL	GVMFSVPFDY	NFYSNWWDVK	120
CYT2	LPEFVPNTKA	LLYSGRKDTG	PVATGAVAAF	AYYMSSGNTL	GVMFSVPFDY	NWYSNWWDVK	118
CYT1 Dome	LPEVVPNTKA	LLYSGRKSSG	PVATGAVAAF	AYYMSNGNTL	GVMFSVPFDY	NWYSNWWDVK	119
EQT5	LPHTVPHGKA	LLYNGQKDRG	PVATGVVGVL	AYAMSDGNTL	AVLFSIPFDY	NLYSNWWNVK	120
EQTA	LPHKVPHGKA	LLYNGQKDRG	PVATGAVGVL	AYAMSDGNTL	AVLFSVPYDY	NWYSNWWNVR	120
SICI	LPHRVEIGEA	LLYNGOVDDG	PVAIGAVGVF	TY ILSDGNIL	AVLFSVPFDI	NFISNWWNVK	119
EQ12	LPHKVPHGKA	LLINGQKDRG	PVAIGAVGVL	AILMSDGNIL	AVLFSVPIDI	NWISNWWNVK	120
			·				
RTX-S II	IYSGKRRADO	AMYEDMYYG-	NPYRGDNG				141
RTX-A	VYSGKRRADO	AMYEDLYYS-	NPYRGDNGW-				138
HET3	VYSGKRRADO	GMYEDMYYG-	NPYRGDNGWH	OKNLGYGLRM	KGIMTSAGEA	ILOIRISR	177
CYT2	IYSGKRRADQ	GMYEDLYYG-	NPYRGDNGWH	EKNLGYGLRM	KGIMTSAGEA	KMQIKISR	175
CYT1	IYPGKRRADQ	GMYEDMYYG-	NPYRGDNGWY	QKNLGYGLRM	KGIMTSAGEA	KMQIKISR	176
EQT5	VYKGHRRADQ	RMYEELYYNL	SPFRGDNGWH	NRDLGYGLKG	RGFMNSSGQS	ILEIHVTKA-	179
EQT4	IFKGRRRADQ	RMYEQLYYYL	SPFRGDNGWH	ERHLGYGLKS	RGFMNSGGQA	ILEIHVTKA-	179
SrcI_	IYSGKRNADY	DMYHELYYDA	NPFEGDDTWE	YRYLGYGMRM	EGYMNSPGEA	ILKITVMPD-	178
EQT2	IYKGKRRADQ	RMYEELYYNL	SPFRGDNGWH	TRNLGY-GLK	SRGFMNSSGH	AILEIHVSKA	-179

Рис. 4. Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей зрелых цитолизинов актиний. RTX–S II, RTX–A — актинопорины R. macrodactylus; HET3 – магнификализин H. magnifica (Swiss-prot, Q9U6X1); CYT1, CYT2 — актинопорины S. helianthus (Swiss–prot, P81662, P07845); EQT2, EQT4, EQT5 — эквинатоксины A. equina (Swiss–prot, P17723, Q9Y1U9, Q93109); SrcI — цитолизин Sagartia rosea (TrEMBL, AAP04347). Жирным шрифтом показан участок, богатый остатками ароматических аминокислот

объяснена принадлежностью этих видов актиний, R. macrodactylus, H. magnifica и S. helianthus, к одному семейству Stichodactylidae.

Сравнение последовательностей актинопоринов показало высокую консервативность фрагмента FDYNLYSNWWDVKIY, содержащего большое количество ароматических аминокислотных остатков (выделены). Установлено, что именно этот фрагмент молекулы участвует в связывании с поверхностью мембраны [8]. Кроме того, не изменяются число и положение остатков пролина (β –изгибы). Основные различия в аминокислотных последовательностях актинопоринов находятся на N– и C–концевых участках молекулы, тогда как средний участок последовательности этих полипептидов очень консервативен. Показано, что именно N–концевой, вариабельный α –спиральный, участок полипептидной цепи участвует в формировании поры в цитоплазматической мембране и отвечает, таким образом, за мембранолитическую активность актинопоринов [8].

Пространственная структура фрагментов актинопоринов RTX-A и RTX-S II

Эквинатоксин II, выделенный из актинии A. equina, стал первым актинопорином, кристаллическая структура которого определена в 2001 г. с разрешением 1,9 Å [10]. Недавно установлена кристаллическая структура еще одного актинопорина — стихолизина II из актинии Stoichactis helianthus с разрешением 1,7 Å [24]. Показано, что молекула актинопорина — это однодоменный белок, со-

Таблица 1

Идентичность (%) аминокислотных последовательностей фрагментов RTX-A и RTX-S I и актинопоринов в базе данных PDB, определенная с помощью SWISS-MODEL сервера

Актинопорины R. macrodactylus	liaz	1kd6	1gwy
RTX–A	73,1	73,1	86,6
RTX–S II	71,7	71,7	90,8

Таблица 2

Величина параметра RSMD, рассчитанная с помощью программы SPDBV, для С_а атомов RTX-A, RTX-S II, эквинатоксина II (1iaz) и стихолизина II (1gwy)

	liaz	1gwy	RTX–A	RTX–S II
RTX–A	0,39	0,36	-	0,05
RTX–S II	0,40	0,35	0,05	-

стоящий из 12 β-цепей, образующих гидрофобный кор, и двух α-спиралей, ассоциированных симметрично с двух сторон кора. Пространственные структуры эквинатоксина II и стихолизина II с элементами вторичной структуры, полученные с помощью программы Molmol, показаны на 3-й сторонке обложки, рис. 3. Молекула актинопорина, как показано методом ЯМР, имеет жесткое строение в водном растворе за исключением конформации подвижного N-конца [20].

Изучена конформация актинопорина в воде при температуре 300 К методом молекулярно-динамической симуляции и минимизации энергии с помощью пакета GROMACS (<u>http://www.gromacs.org</u>), установленного в межведомственном суперкомпьютерном центре ДВО РАН. На 2-й сторонке обложки показан результат симуляции эквинатоксина в воде в течение 100 рs с шагом 0,002 ps. Обнаружено, что изменение конформации происходит в области подвижного N-концевого фрагмента молекулы.

Аминокислотные последовательности фрагментов актинопоринов RTX-A и RTX-S II имеют высокую степень идентичности с актинопоринами, пространственная структура которых установлена экспериментально (табл. 1).

Высокая степень идентичности аминокислотных последовательностей RTX–A и RTX–S II позволила нам получить пространственные структуры этих фрагментов с помощью автоматического сервера SWISS–MODEL [19, 29, 30].

После оптимизации петель и минимизации энергии сервером энергия молекул RTX–A и RTX–S II составляла –3945,506 кДж/моль и –4174,660 кДж/моль соответственно. Величины параметра RSMD, рассчитанные с помощью программы SPDBV, для C_{α} атомов RTX–A, RTX–S II, эквинатоксина II и стихолизина II приведены в табл. 2. Как видно из табл. 2, точность полученных теоретических моделей высока (rsmd<0,5) и практически соответствует точности экспериментальных моделей, используемых в качестве прототипов. Различие между полученными моделями менее 0,05.

Сравнение пространственных структур фрагментов RTX–A и RTX–S II со структурой эквинатоксина II и стихолизина II позволило выяснить, где располагаются консервативные и вариабельные участки молекул. Наиболее консервативным участком является гидрофобный кор молекул, а вариабельные участки расположены в области больших и малых петель и двух α–спиралей, ассоциированных симметрично с двух сторон кора. В системе водородных связей фрагментов RTX–A и RTX–S II имеются различия: количество водородных связей больше в молекуле RTX–S II, различия наблюдаются для остатков Asn33, Asp72, Asn92, Tyr116 и Asp129. Количество ионных связей во фрагментах молекул также различно. В молекуле RTX–A на одну ионную связь больше. Локализация ионных связей в структуре фрагментов RTX–A и RTX–S II показана на 3–й сторонке обложки, рис. 4.

Таким образом, впервые получены пространственные структуры для двух актинопоринов, выделенных из тропической актинии R. macrodactylus, обнаружены различия в их функционально важных участках, которые могут лежать в основе различий физико–химических свойств и биологической активности.

Изучение взаимодействия актинопорина RTX-S II с актином

Ранее при изучении взаимодействия RTX-A с тенями эритроцитов человека и собаки помимо специфического липид-белкового связывания со сфингомиелином было обнаружено взаимодействие актинопорина с интегральным мембранным белком G-актином. Факт взаимодействия был установлен по исчезновению на электрофоретических денситограммах теней эритроцитарных мембран, модифицированных актинопорином, полосы, соответствующей актину (43 кДа), и образованию новой, соответствующей белок-белковому комплексу актин-цитолизин [31].

Нами исследовано цитолитическое действие RTX–S II на оплодотворенные яйцеклетки морского ежа Strongylocentrotus intermedius, в мембранах которого сфингомиелин отсутствует. Показано, что актинопорин в концентрации 10 мкг/мл (280 ГЕ) вызывает торможение дробления яйцеклеток, но не лизис клеток. Через 1,5 ч от начала оплодотворения обработанные цитолизином ооциты не отличались от контрольных, а через 20 ч находились на 13-й стадии ранней гаструлы, в то время как контрольные — на 15-й стадии средней гаструлы. Отсутствие сфингомиелина (специфического мембранного акцептора II группы цитолизинов актиний) в мембранах оплодотворенных ооцитов позволяет высказать предположение о связывании RTX–S II с мембранными белками и о влиянии на процессы пролиферации клеток.

С помощью программы GRAMM для предсказания белок-белкового взаимодействия по атомной структуре молекул мы показали возможность взаимодействия актинопорина с актином в сравнении с комплексом актина и пептидного регулятора его полимеризации — профилина (см. 3-ю сторонку обложки, рис. 5). Механизм ингибирующего действия актинопоринов на пролиферацию клеток может быть связан как с нарушением проницаемости клеточных мембран, так и с образованием комплексов актинопоринов с актином, ингибирующих полимеризацию актина.

Таким образом, проведенное исследование показывает взаимосвязь между структурой и функцией актинопоринов — важных инструментов исследования молекулярной организации и механизмов функционирования биологических и модельных мембран.

ЛИТЕРАТУРА

1. Брежестовский П.Д., Монастырная М.М., Козловская Э.П., Еляков Г.Б. Действие гемолизина из морской анемоны Radianthus macrodactylus на эритроцитарную мембрану // ДАН СССР. 1988. Т. 299. С. 748—750.

2. Зыкова Т.А., Монастырная М.М., Апаликова О.В., Швец Т.В., Козловская Э.П. Низкомолекулярные цитолизины и ингибиторы трипсина из морской актинии Radianthus macrodactylus. Выделение и частичная характеристика // Биоорган. химия. 1997. Т. 24. С. 509—516.

3. Иванов А.С., Мольнар А.А., Козловская Э.П., Монастырная М.М. Действие токсина из Radianthus macrodactylus на проводимость биологических и модельных мембран // Биол. мембраны. 1987. Т. 4. С. 243—248.

4. Монастырная М.М., Козловская Э.П., Иванов А.С., Мольнар А.А., Халилов Э.М., Еляков Г.Б. Действие метридиолизина из морской анемоны Metridium senile на биологические и модельные мембраны // Биол. мембраны. 1988. Т. 5. С. 830—835.

5. Орлов Б.Н., Гелашвили Д.Б. Зоотоксинология. Ядовитые животные и их яды. М.: Высш. шк., 1985. 280 с.

6. Руднев И.С., Лихацкая Г.Н., Козловская Э.П., Монастырная М.М., Еляков Г.Б. Действие гемолизина из морской анемоны Radianthus macrodactylus на проводимость липидных мембран // Биол. мембраны. 1984. Т. 1. С. 1019—1024.

7. Anderluh G., Krizaj I., Štrukelj B., Gubenšek F., Macek P., Pungercar J. Equinatoxins, pore–forming proteins from sea anemone Actinia equina, belong to a multigene family // Toxicon. 1999. Vol. 37. P. 1391—1401.

8. Anderluh G., Macek P. Cytolytic peptide and protein toxins from sea anemones (Anthozoa: Actiniaria) // Toxicon. 2002. Vol. 40. P. 111-124.

9. Anderluh G., Pungercar J., Štrukelj B., Macek P., Gubenšek F. The coding region of the equinatoxin II gene lacks introns // Croat. Chem. Acta. 1995. Vol. 68. P. 533—542.

10. Athanasiadis A., Anderluh G., Macek P., Turk D. Crystal structure of the soluble form of equinatoxin II, a pore–forming toxin from the sea anemone Actinia equina // Structure. 2001. Vol. 9. P. 341–346.

11. Bernheimer A.W., Avigad L.S. A cholesterol inhibitable cytolytic protein from the sea anemone Metridium senile // Biochim. Biophys. Acta. 1978. Vol. 541. P. 96—106.

12. Bernheimer A.W., Avigad L.S. Properties of a toxin from the sea anemone Stoichactis helianthus, including specific binding to sphingomyelin // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1976. Vol. 73. P. 467–471.

13. Cline E.I., Wiebe L.I., Young J.D., Samuel D. Toxic effects of the novel protein UpI from the sea anemone Urticina piscivora // Pharm. Res. 1995. Vol. 32. P. 309—314.

14. de los Rios V., Mancheño J.M., del Pozo A.M., Alfonso C., Rivas G., Oñaderra M., Gavilanes J.G. Sticholisin II, a cytolysin from the sea anemone Stichodactyla helianthus, is a monomer–tetramer associating protein // FEBS Letters. 1999. Vol. 455. P. 27–30.

15. Elliott R.C., Konya R.S., Vickneshwara K. The isolation of a toxin from the Dahlia sea anemone, Tealia felina L. // Toxicon. 1986. Vol. 24. P. 117-122.

16. Ferlan I., Jackson K.W. Partial amino acid sequence of equinatoxin // Toxicon. 1983. Vol. 21 (Suppl. 3). P. 141-144.

17. Galettis P., Norton R.S. Biochemical and pharmacological studies of the mechanism of action of tenebrosin C, a cardiac stimulatory and hemolytic protein from the sea anemone, Actinia tenebrosa // Toxicon. 1990. Vol. 28. P. 695—706.

18. Grotendorsta G.R., Hessinger D.A. Purification and partial characterization of the phospholipase A2 and co–lytic factor from sea anemone (Aiptasia pallida) nematocyst venom // Toxicon. 1999. Vol. 37. P. 1779—1796.

19. Guex N., Peitsch M.C. SWISS–MODEL and the Swiss–PdbViewer: An environment for comparative protein modeling // Electrophoresis. 1997. Vol. 18. P. 2714–2723.

20. Hinds M.G., Zhang W., Anderluh G., Hansen P.E., Norton R.S. Solution structure of the eukaryotic pore–forming cytolysin equinatoxin II. Implications for pore formation // J. Mol. Biol. 2002. Vol. 315. P. 1219.

21. Khoo K.S., Kam W.K., Khoo H.E., Gopalakrishnakone P., Chung M.C.M. Purification and partial characterization of two cytolysins from a tropical sea anemone, Heteractis magnifica // Toxicon. 1993. Vol. 31. P. 1567—1579.

22. Macek P., Belmonte G., Pederzolli C., Menestrina G. Mechanism of action of equinatoxin II, a cytolysin from the sea anemone Actinia equina L. belonging to the family of actinoporins // Toxicology. 1994. Vol. 87. P. 205—227.

23. Macek P. Polypeptide cytolytic toxins from sea-anemones (Actiniaria) // FEMS Microbiol. Immunol. 1992. Vol. 105. P. 121-130.

24. Mancheño J.M., Martin–Benito J., Martinez–Ripol M., Gavilanes J.G., Hermoso J.A. Crystal and electron microscopy structures of sticholysin II actinoporin reveal insights into the mechanism of membrane pore formation // Structure. 2003. Vol. 11. P. 1–20.

25. Mebs D., Gebauer E. Isolation of proteinase inhibitory, toxic and hemolytic polypeptides from a sea anemone, Stoichactis sp. // Toxicon. 1980. Vol. 18. P. 97—106.

26. Monastyrnaya M.M., Zykova T.A., Apalikova O.W., Shwets T.W., Kozlovskaya E.P. Biologically active polypeptides from the tropical sea anemone Radianthus macrodactylus // Toxicon. 2002. Vol. 40. P. 1197—1217.

27. Norton R.S., Macek P., Reid G.E., Simpson R.J. Relationship between the cytolysins tenebrosin–C from Actinia tenebrosa and equinatoxin II from Actinia equina // Toxicon. 1992. Vol. 30. P. 13–23.

28. Norton R.S. Structure and function of peptide and protein toxins from marine organisms // J. Toxicol. — Toxin Rev. 1998. Vol. 17. P. 99—130.

29. Peitsch M.C. Protein modeling by E-mail // Bio/Technology. 1995. Vol. 13. P. 658-660.

30. Schwede T., Kopp J., Guex N., Peitsch M.C. SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server // Nucleic Acids Res. 2003. Vol. 31. P. 3381-3385.

31. Shnirov V.L., Monastyrnaya M.M., Zhadan G.G., Kuznetsova S.M., Kozlovskaya E.P. Calorimetric study of interaction of toxin from Radianthus macrodactylus with erythrocyte membrane // Biochem. Int. 1992. Vol. 26. P. 219–229.