



УДК 577.112:593.65

АКТИНОПОРИНЫ ИЗ АКТИНИИ ЯПОНСКОГО МОРЯ *Oulactis orientalis*: ВЫДЕЛЕНИЕ И ЧАСТИЧНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА

© 2005 г. А. П. Ильина^{*,#}, М. М. Монастырная^{*}, И. Н. Сокотун^{*}, Ц. А. Егоров^{**},
Ю. А. Назаренко^{*}, Г. Н. Лихацкая^{*}, Э. П. Козловская^{*}

^{*}Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН,
690022, Владивосток, просп. 100 лет Владивостоку, 159;

^{**}Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина
и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва

Поступила в редакцию 22.12.2003 г. Принята к печати 03.02.2004 г.

Из актинии Японского моря *Oulactis orientalis* выделены и охарактеризованы два цитолитических токсина (цитолизины Og-A и Og-G). Схема очистки включает гидрофобную хроматографию на полихром-е-1, гель-фильтрацию на Акрилексе П-4, ионообменную хроматографию на целлюлозе CM-32, обращенно-фазовую ВЭЖХ на колонке Nucleosil C₁₈. Молекулярная масса *Oulactis* цитолизин по данным SDS-электрофореза в 14% ПААГ составляет 18 кДа. Характерной особенностью их аминокислотного состава является отсутствие остатков цистеина и высокое содержание основных аминокислот. Гемолитическая активность Og-A и Og-G составляет 295.86 и 322.58 ГЕ/мг соответственно, что на два порядка ниже активности сфингомиелингибируемых цитолизин тропических актиний. Определена аминокислотная последовательность N-концевых фрагментов Og-A (ATFRVLAK) и Og-G (GAIAGAA). Показано, что действие *Oulactis* цитолизин на эритроцитарную мембрану ингибируется экзогенным сфингомиелином. В бислойных липидных мембранах они образуют ионные каналы с проводимостью 16, 32 и 40 пСм в 0.1 М NaCl и 168, 240 и 320 пСм в 1 М NaCl при pH 7.2, что позволяет отнести выделенные цитолизины к группе актинопорин.

Ключевые слова: актинии; актинопорины; аминокислотная последовательность; мембранолитическое действие.

ВВЕДЕНИЕ

Актинии являются продуцентами разнообразных биологически активных полипептидов [1–5]. В последние годы большой интерес исследователей привлекают цитолитические токсины актиний – цитолизины, так как благодаря мощному мембранолитическому действию они проявляют противоопухолевую, антипаразитарную, антимикробную, дерматонекротическую и другие виды биологической активности [4, 6–8]. Цитолизины, кроме того, находят применение в качестве инструментов исследования молекулярной организации и механизмов функционирования биологических и модельных мембран [9–11].

К настоящему времени выделены и охарактеризованы цитолизины более чем из 30 видов актиний. На основании их первичной структуры и физико-химических характеристик они разделены на четыре группы [3]. К первой группе относят цитолизины с *M* 5–8 кДа. Они обнаружены в *Tealia felina* [12], *Radianthus macrodactylus* [1] и *Condylactis aurantiaca* [3]. Показано, что невысо-

кая гемолитическая активность низкомолекулярных цитолизин не ингибируется сфингомиелином [12, 13]. Эти токсины проявляют также антигистаминную активность. Отличительной чертой их аминокислотного состава является отсутствие триптофана и наличие шести остатков цистеина.

Вторую наиболее изученную группу цитолизин составляют высокоосновные полипептиды (*pI* 9 и выше) с молекулярной массой 20 кДа, выделенные из различных видов семейств Actiniidae и Stichodactylidae, обитающих в основном в тропических регионах Мирового океана [1–5, 14]. Показано, что они проявляют мощное литическое действие на сфингомиелинсодержащие мембраны эукариот, образуя в них катион-селективные ионные каналы (поры), благодаря чему получили название актинопорины [1, 15, 16]. Характерной особенностью их аминокислотного состава является отсутствие цистеина. К настоящему времени установлены аминокислотные последовательности восьми актинопорин, причем наблюдается повышение интереса исследователей к изучению структуры и функции рекомбинантных форм актинопорин, получаемых методами генетической инженерии [3].

[#] Автор для переписки (факс: (4232) 31-40-50; эл. почта: annil@piboc.dvo.ru).

Таблица 1. Схема выделения цитолизинов из актинии *O. orientalis*

Стадия очистки	Суммарный белок, мг	Выход, %
Исходный водный экстракт	20000	100
Хроматография на полихrome-1 (рис. 1): пик 1	6500	32.5
Гель-фильтрация на Акрилексе П-4 гемолит. фракций пика 1 рис. 1 (рис. 2): пик 1	2500	12.5
пик 2	1400	7
Ионообменная хроматография на CM-32 целлюлозе гемолит. фракций пика 1 рис. 2: пик 3	90	0.45
ВЭЖХ на Nucleosil C ₁₈ гемолит. фракций пика 3 рис. 3 (рис. 4): фракция 1 (Or-A)	5	0.025
фракция 2 (Or-G)	2.8	0.014

В третью группу входят летальные цитолитические фосфолипазы A₂ из *Stichodactyla helianthus* [17] и *Aiptasia pallida* [18] с M 30–40 кДа и подобные им по физико-химическим свойствам цитолизин без ферментативной активности [3].

Единственным представителем четвертой группы цитолизинов является метридиозин, выделенный из актинии *Metridium senile* (M 80 кДа, pI 5.7) [19]. Его гемолитическая активность на порядок ниже активности сфингомиелинингибируемых цитолизинов второй группы, при действии на холестеринсодержащие бислоиные липидные мембраны метридиозин формирует в них короткоживущие ионные каналы [20].

Выделение и установление аминокислотной последовательности новых актинопоринов, в том числе и из малоисследованных дальневосточных видов актиний, особенно актуально в свете существующей гипотезы Нортон об их роли в качестве видовых хемотаксономических маркеров [21]. В настоящее время исследование функции биологически активных полипептидов на молекулярном уровне требует знаний об их первичной, вторичной и пространственной структуре.

Целью данной работы является выделение актинопоринов из дальневосточной актинии *Oulactis orientalis*, изучение их физико-химических свойств, липидной специфичности, механизма действия на модельных мембранах, установление аминокислотной последовательности N-концевых фрагментов и сравнение с аналогичными характеристиками и структурой актинопоринов тропических видов актиний.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате ранее проведенного скрининга актиний северных умеренных вод (Японского и Охотского морей) с целью поиска источников биологически активных полипептидов нами был выбран широко распространенный в заливе Посыета Японского моря вид – актиния *O. orientalis* (семейство Actiniidae), водные экстракты которой показали значительную гемолитическую и A₂-фосфолипазную активности, а спиртовые – токсическую и трипсинингибирующую активности [22].

Обычно для выделения цитолизинов из актиний используют схемы, включающие осаждение активных полипептидов ацетоном или сульфатом аммония с их последующей гель-фильтрационной и ионообменной хроматографией. В индивидуальном состоянии полипептиды получают ионообменной и обращенно-фазовой ВЭЖХ [1–4, 14].

Мы использовали схему выделения цитолизинов из *O. orientalis*, включающую гидрофобную хроматографию на полихrome-1 (политетрафторэтилене), обессоливание и гель-фильтрацию на Акрилексе П-4, ионообменную хроматографию на целлюлозе CM-32 и обращенно-фазовую ВЭЖХ на колонке Nucleosil C₁₈ (табл. 1). На всех стадиях выделения во фракциях определяли гемолитическую активность, а на первых стадиях кроме гемолитической также и трипсинингибирующую активность, так как известно, что актинии продуцируют значительное количество низко- и высокомолекулярных ингибиторов протеиназ с M 6 и 14 кДа соответственно [13, 23–25]. С целью разделения цитолизинов и ингибиторов протеиназ на первой стадии выделения водный экстракт после центрифугирования и удаления осадка хроматографировали на гидрофобном сорбенте по-

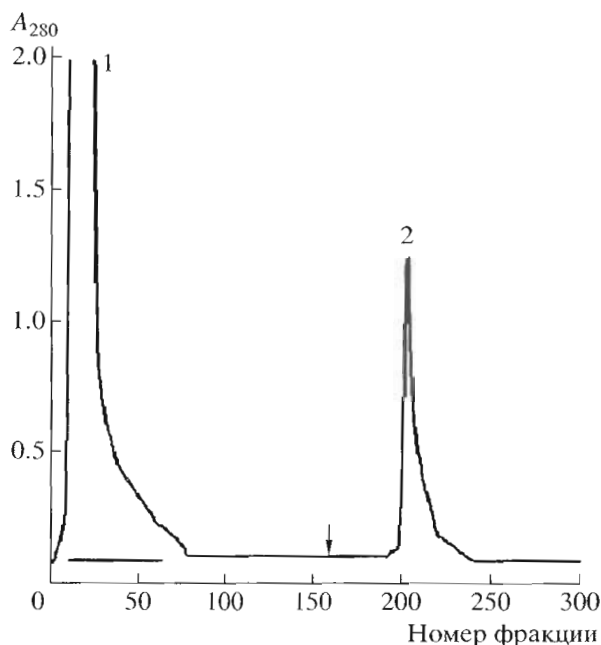


Рис. 1. Гидрофобная хроматография водного экстракта актинии *O. orientalis* на колонке (2.6×15 см) с полихромом-1. Элюция гемолизнов водой (1500 мл), ингибиторов трипсина – 40%-ным этанолом (1200 мл). Скорость элюции 3 мл/мин. Объем фракции 9 мл. Отмечены границы объединения фракций, проявивших гемолитическую активность. Стрелкой показан момент смены элюента.

лихром-1 (рис. 1), который обычно используют в лаборатории для концентрирования и обессоливания нейротоксинов и ингибиторов протеиназ. Ранее было установлено, что цитолизины элюируются с полихрома вслед за свободным объемом воды, а ингибиторы трипсина, хорошо сорбирующиеся этим носителем, – 40%-ным этиловым спиртом [26]. В водной фракции были идентифицированы полипептиды с гемолитической активностью (пик 1), а в спиртовой после упаривания этанола обнаружены полипептиды с трипсинингибирующей активностью (пик 2).

Известно, что 80% веса актинии составляет морская вода. Поэтому водные фракции, содержащие значительное количество морской соли, после хроматографии на полихром-1 лиофилизировали и затем хроматографировали на Акрилексе П-4 (рис. 2), который обычно применяется нами для обессоливания водных экстрактов актиний. Помимо обессоливания этот сорбент позволяет разделять небольшого размера полипептиды по молекулярной массе. В результате гель-фильтрации получено три пика, фракции первых двух обладали значительной гемолитической активностью. Трипсинингибирующей активности в исследуемых трех фракциях не обнаружено.

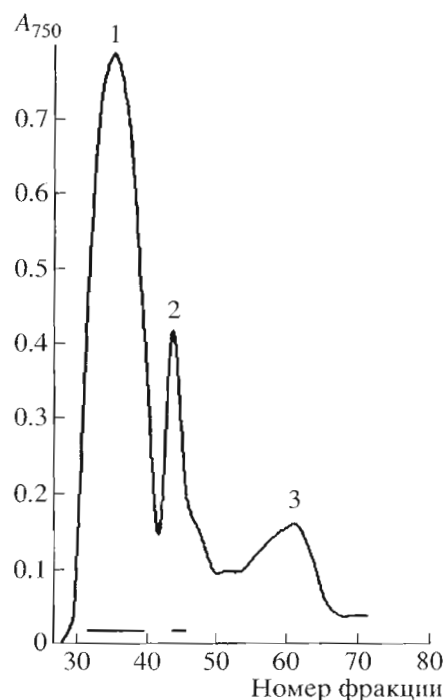


Рис. 2. Гель-фильтрация и обессоливание водной фракции после полихрома-1 (пик 1, рис. 1) на колонке (3×90 см) с Акрилексом П-4. Элюция 0.01 М аммоний-ацетатным буфером, pH 6.0. Скорость элюции 18 мл/ч. Объем фракции 4.5 мл. Отмечены границы объединения фракций, проявивших гемолитическую активность.

Для дальнейшей очистки цитолитических полипептидов 1-го пика рис. 2 использовали ионообменную хроматографию на целлюлозе СМ-32 (рис. 3). Гемолитически активные фракции 1-го пика показали фосфолипазную активность, в то время как во фракциях правого склона пика 3 идентифицированы только прямые гемолитики, цитолизины, которые после объединения и диализа были лиофилизированы и подверглись дальнейшему разделению.

На завершающей стадии очистки цитолизиннов использовали ВЭЖХ на колонке с обращенной фазой Nucleosil C_{18} (рис. 4). Полученные в результате ВЭЖХ гемолитически активные полипептиды пиков 1 и 2 были гомогенны (данные SDS-электрофореза в 14% ПААГ, масс-спектрометрического анализа и *N*-концевого аминокислотного анализа). Согласно *N*-концевым остаткам цитолизиннов – аланину (пик 1) и глицину (пик 2) и принятой для названий цитолизиннов актиний аббревиатуре [1], они были названы нами *Oulactis* цитолизинами Og-A и Og-G.

По данным SDS-электрофореза, молекулярная масса обоих цитолизиннов составляет 18 кДа, согласно данным MALDI-TOF, она равна 15353.7 и 16035.9 Да для Og-A и Og-G. Близкие значения молекулярных масс имеют актинопорины из тро-

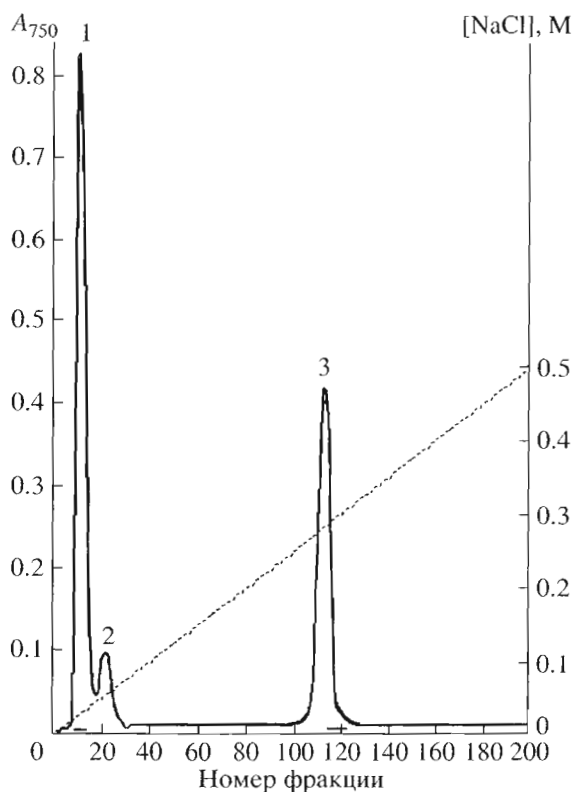


Рис. 3. Ионнообменная хроматография гемолитических фракций пика 1 (рис. 2) на колонке (2.6 × 50 см) с целлюлозой CM-32 в градиенте концентрации NaCl (0–0.5 М) в 0.01 М аммоний-ацетатном буфере, pH 6.0. Скорость элюции 24 мл/ч. Объем фракции 10 мл. Отмечены границы фракций, проявивших гемолитическую активность.

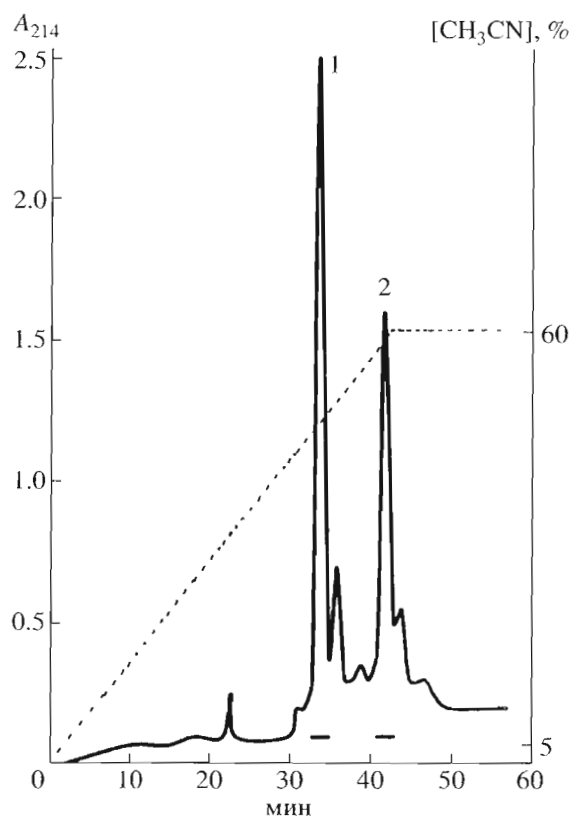


Рис. 4. ВЭЖХ цитолизина пика 3 (рис. 3) на колонке (4.6 × 250 мм) с обращенной фазой Nucleosil C₁₈ в градиенте концентрации ацетонитрила (5–60%) в 0.1% трифторуксусной кислоте за 60 мин. Скорость элюции 1 мл/мин. Отмечены границы объединения фракций, проявивших гемолитическую активность.

пических видов *S. helianthus* [27], *R. macrodactylus* [14], *Actinia equina* [28]. Для аминокислотного состава *Oulactis* цитолизин (табл. 2) характерно высокое содержание неполярных аминокислот, наличие четырех остатков триптофана, отсутствие остатков цистеина. Наблюдается гомология с аминокислотным составом сфингомиелинингибируемых цитолизин 2-й группы, причем наибольшее подобие — с эквинатоксинами II и V из актинии *A. equina* [3], представителя того же семейства Actiniidae, к которому принадлежит вид *O. orientalis*.

Показано, что гомогенные *Oulactis* цитолизин, подобно цитолизинам тропических видов, не проявляют активность фосфолипазы A₂, хотя суммарный водный экстракт *O. orientalis* ею обладал [22]. В процессе выделения цитолизин полипептиды с A₂-фосфолипазной активностью отделяются от цитолизин 2 группы на стадии ионообменной хроматографии (рис. 3, пик 1).

Токсичность выделенных цитолизин в несколько раз ниже токсичности цитолизин, продуцируемых тропическими видами актиний. Величина летальной дозы LD₅₀ составляет 16.36 мг/кг.

Установлено также, что гемолитическая активность Or-A и Or-G составляет 295.86 и 322.58 ГЕ/мг белка соответственно, что на два порядка ниже активности *Radianthus* цитолизин RTX-A и RTX-G [14] и других цитолизин тропических видов [3]. Значительные различия величин токсической и гемолитической активностей цитолизин актиний северных умеренных вод и тропических видов связаны, вероятно, с различной средой обитания этих животных. Как известно, биота холодных северных морей гораздо беднее, чем теплых тропических. Предполагается, что биологическая роль цитолизин, как и нейротоксинов, состоит в умерщвлении жертв, которыми актинии питаются, в отпугивании хищников и конкурентов в борьбе за место обитания [5]. Установлено, что в водах залива Посьета отсутствует реальная угроза со стороны хищников, которыми для актиний являются крупные, превосходящие их по размерам, голожаберные моллюски [29].

При исследовании липидной специфичности *Oulactis* цитолизин мы установили, что преинкубация с экзогенным сфингомиелином полностью ингибирует их гемолитическую активность, та-

Таблица 2. Аминокислотный состав цитолизинов *Oulactis* (Or-A, Or-G) из *O. orientalis*, *Equina* (Eq II, Eq V) из *A. equina* [28], *Stichodactyla* (Sh I–IV) из *S. helianthus* [27, 36], *Radianthus* (RTX-A, -G, -S) из *R. macrodactylus* [14] (число остатков на 1 моль белка)

Аминокислота	Цитолизины <i>Oulactis</i>		Цитолизины <i>Equina</i>		Цитолизины <i>Stichodactyla</i>				Цитолизины <i>Radianthus</i>		
	Or-A	Or-G	Eq II	Eq V	Sh I	Sh II	Sh III	Sh IV	RTX-A	RTX-G	RTX-S
Asx	14	13	18	21	18	14	15	19	16	16	17
Thr	11	9	9	11	9	9	9	9	8	11	6
Ser	8	9	11	12	13	11	10	12	10	10	10
Glx	10	11	9	9	9	10	9	12	10	10	10
Pro	5	5	5	5	5	5	5	7	5	4	5
1/2 Cys	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gly	18	24	20	20	21	20	18	23	21	20	20
Ala	24	21	17	14	12	14	13	15	14	14	17
Val	9	11	15	16	9	10	10	10	9	8	9
Met	4	5	3	5	5	5	5	5	5	6	6
Ile	6	7	8	8	6	6	7	8	7	7	8
Leu	14	14	16	16	10	10	12	13	12	12	11
Tyr	10	11	11	10	12	9	10	10	10	10	10
Phe	6	5	5	5	5	5	5	5	6	6	6
Trp	4	4	5	4	4	4	4	3	4	4	4
Lys	12	10	10	8	10	10	10	11	11	12	8
His	3	5	5	5	0	1	1	1	2	2	2
Arg	8	9	11	9	8	8	7	8	7	6	7
Число а.о.	166	173	179	179	201	151	150	171	157	158	156
N-Концевая аминокислота	Ala	Gly	Ser	Ser	Ala	Ala	Gly	Ser	Ala	Gly	Ser
<i>M</i> (Да)*	18000	18000	20000	20000	17600	17600	17600	17500	20000	20000	20000
<i>M</i> (Да)**	18286	18726									

Приведены средние значения, полученные из двух экспериментов при гидролизе в течение 24 ч (результаты 48- и 72-часовых гидролизом аналогичны). * Молекулярная масса по данным SDS-электрофореза. ** Молекулярная масса рассчитана исходя из аминокислотного состава.

ким образом, они, подобно *Radianthus* цитолизинам, относятся к группе сфингомиелингибирующих цитолизинов актиний.

На первом этапе исследования механизма мембранотропного действия *Oulactis* цитолизинов изучено влияние суммы *Oulactis* цитолизинов, полученных после ионообменной хроматографии (рис. 3, пик 3), на ионную проницаемость бислойных липидных мембран (БЛМ) с различным содержанием сфингомиелина. При добавлении фракции цитолизинов в водную фазу наблюдались дискретные флуктуации тока, характерные для актинопоринов (рис. 5). Обнаружено, что интегральная проводимость БЛМ, индуцированная *Oulactis* цитоли-

зинами, возрастает с увеличением содержания сфингомиелина в мембранах. Более высокая активность токсинов проявлялась при pH среды 8.0, чем при pH 7.2. Действие *Oulactis* цитолизинов на проводимость БЛМ pH- и сфингомиелинзависимо и аналогично действию на мембраны цитолизинов из тропических видов актиний. Анализ концентрационной зависимости действия токсинов показал, что их мембранотропная активность проявляется при концентрациях 300–1000 нг/мл, сравнимых с действующими концентрациями актинопоринов из тропических видов морских актиний [3, 30].

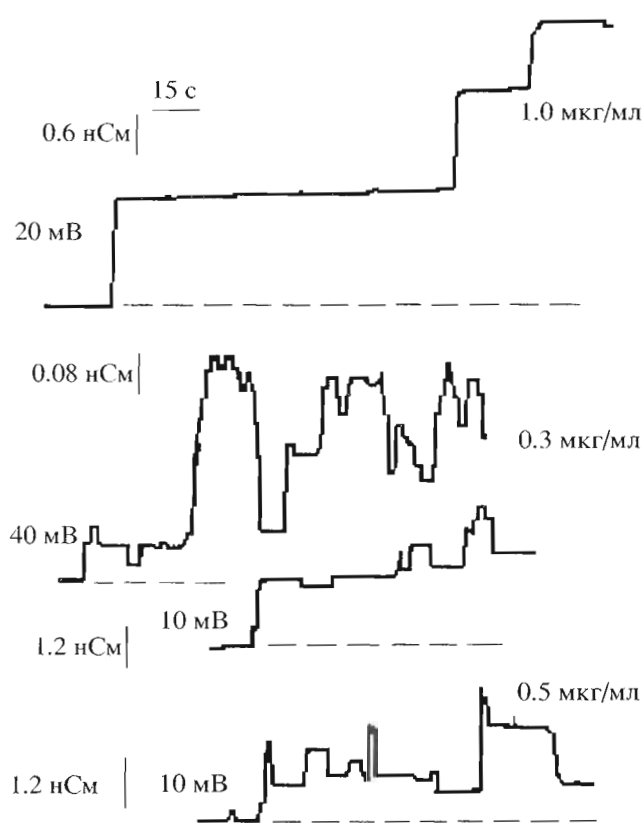


Рис. 5. Записи тока через моноолеиновые БЛМ, содержащие сфингомиелин, при двустороннем введении в водную фазу *Oulactis* цитолизина. Весовое отношение моноолеин–сфингомиелин равно 10 : 1. Концентрации *Oulactis* цитолизина и мембранный потенциал указаны на рисунке, рН среды 7.2.

Как показал анализ флуктуаций тока, наиболее вероятная проводимость каналов, формируемых *Oulactis* цитолизинами, составляет 16, 32 и 40 пСм в 0.1 М NaCl и 168, 240 и 320 пСм в 1 М NaCl при рН 7.2 (рис. 6). Таким образом, по характеру действия на проводимость модельных мембран исследуемые цитолизины могут быть отнесены ко

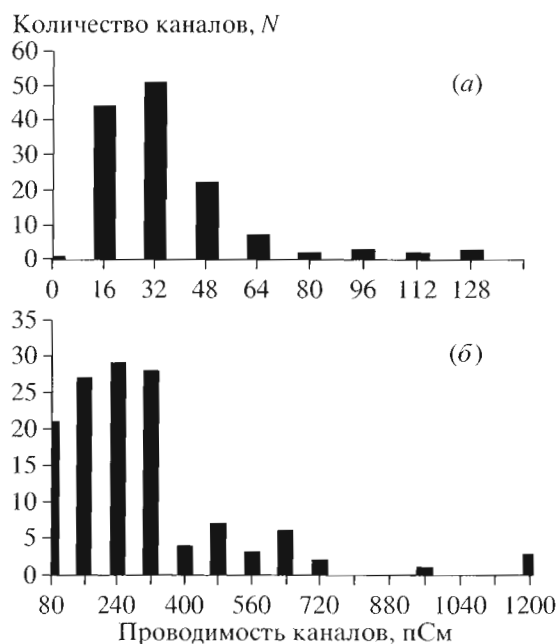


Рис. 6. Гистограммы проводимости каналов, образуемых *Oulactis* цитолизинами: (а) – в 0.1 М NaCl; (б) – в 1 М NaCl.

второй группе цитолизина актиний – актинопоринам. Их действие на БЛМ состоит в образовании в липидных бислоях ионных каналов различной проводимости. Образуемые *Oulactis* цитолизинами каналы потенциалчувствительны, с увеличением мембранного потенциала наблюдалось уменьшение действующей концентрации цитолизина (рис. 5) и нелинейная зависимость величины проводимости каналов от мембранного потенциала. Исследование параметров одиночных ионных каналов индивидуальных цитолизина Or-A и Or-G планируется провести в дальнейшем.

К настоящему времени определена полная аминокислотная последовательность восьми актинопоринам из тропических видов: *A. equina* [21, 28], *S. helianthus* [27], *Heteractis magnifica* [31], *A. teneb-*

Таблица 3. Сравнение аминокислотных последовательностей N-концевых фрагментов *Oulactis* цитолизина (Or-A, Or-G) из *O. orientalis*, *Radianthus* цитолизина А (RTX-A) из *R. macrodactylus* [14], магнификализина I и II (Hmg I, Hmg II) из *H. magnifica* [30, 37], *Stichodactyla* цитолизина III (Sh III) из *S. helianthus* [27], эквинатоксина II (Eq II) из *A. equina* [28] и тенебрисина-С (Tn C) из *A. tenebrosa* [31]

Or-A		A T F R V L A K
Or-G		G A I I A G A A
RTX-A		A L A G A I I A G G V L G L K I L I E V L G E L G K V K V K I
Hmg I		A L A G T I I A G A S L T F K I L D E V
Hmg II	S A A L A G T I I D G A S L G F D I L N K V	
Sh III		A L A G T I I A G A S L T F Q V L D K V L E E L G K V S R S G
Eq II	S A D V A G A V I D G A S L S F D I L K T V L E A L G N V K R K I	
Tn C	S A D V A G A V I D G A S L S F D I L K T V L E A L G N V K R K I	

rosa [32], шесть из которых – эквинатоксины II, IV и V из *A. equina* [33–35], стихолизины I и II (II более известен как цитолизин III) из *S. helianthus* [36] и цитолизин HmgIII из *H. magnifica* [37] были клонированы.

Нами установлена аминокислотная последовательность *N*-концевых фрагментов *Oulactis* цитолизинов Or-A (ATFRVLAK-) и Or-G (GAIAGAA-) соответственно. Как видно из табл. 3, представленные фрагменты Or-A и Or-G имеют от 25 до 75% гомологии с *N*-концевыми фрагментами последовательностей актинопоринов тропических актиний *R. macrodactylus* [14], *S. helianthus* [27], *A. equina* [28], *H. magnifica* [31], *A. tenebrosa* [32]. Отмечается высокая степень гомологии (75%) между фрагментами обоих *Oulactis* цитолизинов и *Stichodactyla* цитолизинном III (Sh III) несмотря на то, что виды *O. orientalis* и *S. helianthus* являются представителями разных семейств – Actiniidae и Stichodactylidae соответственно. При этом наблюдается некоторый сдвиг *N*-концевых фрагментов аминокислотных последовательностей *Oulactis* цитолизинов по сравнению с *N*-концевыми последовательностями остальных цитолизинов. Очевидно, более низкую гемолитическую и токсическую активности Or-A и Or-G можно объяснить этими различиями. Известно, что *N*-концевые α -спиральные участки молекул играют важную роль в мембранотропном действии актинопоринов, отвечая за их гемолитическую активность [38, 39].

Наши дальнейшие исследования будут направлены на установление полной аминокислотной последовательности Or-A и Or-G, а также олигонуклеотидной последовательности генов, кодирующих эти актинопорины.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали полихром-1 (Олайне, Латвия), Акрилекс П-4 (Reanal, Венгрия), целлюлозу CM-32 (Whatman, Англия); набор стандартов для определения молекулярных масс (Pharmacia, Fine Chemicals AB, США); реактивы для электрофореза в ПААГ, 5-диметиламинонафталин-1-сульфохлорид (Serva, Германия); холестерин, сфингомиелин, моноолеин (Sigma, США). Все остальные реактивы отечественного производства имели квалификацию “ос. ч.”.

Приготовление экстракта. Актинии *O. orientalis* собирали на глубине до 1 м в бухте Посъета Японского моря (Хасанский район Приморского края) и хранили при -20°C . Их видовая принадлежность определена Костиной Е.Е. (Институт биологии моря ДВО РАН, Владивосток). Цельные актинии гомогенизировали (0.5 кг) в трех объемах холодной дистиллированной воды, после экстракции биологически активных соединений в течение 24 ч экстракт фильтровали через

несколько слоев ткани, а затем центрифугировали при 3000 g в течение 1 ч (К-23, Германия). Осадок отбрасывали, супернатант повторно центрифугировали при 10000 g в течение 2 ч (К-24, Германия). Липидный слой отбрасывали, прозрачный супернатант использовали для дальнейшей очистки цитолизинов.

Все выделительные операции проводили при 4°C .

Во всех фракциях определяли гемолитическую и трипсинингибирующую активности. Количество белка (при всех видах хроматографии) определяли по методу Лоури [40]. В качестве стандарта использовали бычий сывороточный альбумин.

Гидрофобную хроматографию водного экстракта *O. orientalis* (рис. 1) проводили на колонке (2.6×15 см) с полихромом-1, уравновешенным водой. Элюцию цитолизинов осуществляли водой (1500 мл), элюцию ингибиторов протеиназ – 40%-ным этиловым спиртом (1200 мл) со скоростью 3 мл/мин, объем фракций составлял 9 мл. Детектирование осуществляли с помощью проточного спектрофотометра Uvicord 8300 (LKB, Швеция) при длине волны 280 нм.

Обессоливание и гель-фильтрацию объединенной фракции пика 1 рис. 1 проводили на колонке (3×90 см) с Акрилексом П-4 (рис. 2), уравновешенным 0.01 М аммоний-ацетатным буфером, pH 6.0 при скорости элюции 18 мл/ч. Объем фракции 4.5 мл.

Ионообменную хроматографию актинопоринов *O. orientalis* (объединенной фракции пика 1 рис. 2) выполняли на колонке (2.6×50 см) с целлюлозой CM-32 (рис. 3), уравновешенной 0.01 М аммоний-ацетатным буфером, pH 6.0 в градиенте концентрации NaCl (0–0.5 М, общий объем 2 л) в рабочем буфере. Скорость элюции составляла 24 мл/ч, объем фракции 10 мл.

Для обращенно-фазовой ВЭЖХ использовали хроматограф Altex 114M Solvent Delivery Module (Beckman, США), детектор 2151 (LKB, Швеция) и колонку Nucleosil C₁₈ (4.6×250 мм) (Sigma Aldrich, США) (рис. 4). Хроматографию актинопоринов (рис. 3, пик 3) проводили в градиенте концентрации ацетонитрила (5–60%) в 0.1% трифторуксусной кислоте, pH 2.2. Скорость элюции составляла 1 мл/мин.

SDS-электрофорез актинопоринов проводили по методу Лэммли [41] в вертикальных пластинах ($9 \times 12 \times 1$ мм) 14%-ного полиакриламидного геля в присутствии 0.1% додецилсульфата натрия. Для определения молекулярной массы полипептидов в качестве стандартов использовали белки-маркеры (*M*, кДа): фосфолипазу В (94), альбумин (67), овалбумин (43), карбоангидразу (30), α -лактоальбумин (14) (набор (Serva, ФРГ)).

Масс-спектрометрический анализ молекулярной массы актинопоринов MALDI-TOF проводили

ли в группе масс-спектрометрии ИБХ им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН на времяпролетном масс-спектрометре Vision 2000 (Temo, Англия). Времяпролетные масс-спектры фиксировали в прямом пролете и режиме рефлектора.

N-Концевые аминокислотные остатки Oг-A и Oг-G определяли по методу Грея [42]. Дансильные производные аминокислот идентифицировали двумерной ТСХ на пластинках (5 × 5 см) с закрепленным слоем силикагеля марки КСК (5–7 мк) 481 [43].

Аминокислотный анализ осуществляли на аминокислотном анализаторе D-500 (Durum, США). Образцы полипептидов (2.5–3 нмоль) гидролизовали 24, 48 и 72 ч 5.7 н. HCl при 110°C. Содержание триптофана определяли спектрофотометрически на приборе Cary 219 (Varian, Англия) по вторым производным УФ-спектров полипептидов.

N-Концевую аминокислотную последовательность Oг-A и Oг-G определяли на автоматическом секвенаторе белков Procise модели 492 (Applied Biosystems, США) по программе производителя.

Гемолитическую активность актинопоринов определяли на эритроцитах мыши в среде, содержащей 0.9 % NaCl, 1 mM KCl, 10 mM глюкозу, 5 mM Трис-HCl-буфер, pH 7.4. Уровень гемоглобина в супернатанте измеряли спектрофотометрически при 540 нм после предварительного охлаждения реакционной смеси и ее центрифугирования для осаждения эритроцитов и их теней. Лизис 0.7% суспензии эритроцитов (1.2 ОЕ₇₂₀) под действием 10 мкл 1% водного раствора голотуринина А из морской кукумарии *Holothuria leucospilota* (любезно предоставленный лабораторией химии морских природных соединений ТИБОХ ДВО РАН) принимали за 100%-ный гемолиз (соответствует поглощению 0.9 при 540 нм). За одну гемолитическую единицу (ГЕ) принимали количество белка, вызывающее 50%-ный гемолиз в 1 мл 0.7% суспензии эритроцитов за 30 мин при 37°C.

Токсичность актинопоринов определяли на белых беспородных мышах весом 20–22 г внутрибрюшинной инъекцией исследуемой пробы. Для количественного определения токсической активности полипептидов использовали величину летальной дозы LD₅₀, мг/кг (количество белка, при введении которого 50% экспериментальных животных гибнут).

Трипсинингибирующая активность. К 200 мкл раствора трипсина (100 мкг/мл 1 mM HCl) и 250 мкл 0.1 M Трис-HCl-буфер (pH 8.1) добавляли 50 мкл водного раствора исследуемого образца. Смесь выдерживали 5 мин при 37°C, затем добавляли 250 мкл раствора субстрата трипсина *n*-нитроанилида *N*-бензоил-*D,L*-аргинина, приготовленного как было описано [13]. Количество образовавшегося в результате гидролиза *n*-нитроанилина оп-

ределяли при 410 нм. Измерение проводили относительно контрольного образца, содержащего субстрат, денатурированный фермент и ингибитор в соответствующем разбавлении. За единицу трипсинингибирующей активности принимали количество белка, необходимое для 50%-ного ингибирования 1 мг трипсина.

Фосфолипазную активность в полипептидных фракциях определяли по появлению продуктов гидролиза лецитина (*L*- α -фосфотидилхолина) – субстрата фосфолипазы А₂, обнаруживаемых ТСХ на пластинках с закрепленным слоем SiO₂ по ранее предложенному методу [44].

Ингибирующее действие сфингомиелина определяли по методу Бернхеймера [45]. Цитолизин предварительно инкубировали с дисперсией сфингомиелина в молярном соотношении 1 : 1, 1 : 2, 1 : 4, 1 : 8, 1 : 16, 1 : 50, 1 : 100 в течение 60 мин. Степень гемолиза эритроцитов, добавленных к липид-белковой смеси, определяли спектрофотометрически при 540 нм по поглощению супернатанта, полученного после центрифугирования суспензии эритроцитов.

Бислойные липидные мембраны (БЛМ) формировали на отверстиях тефлонового стаканчика диаметром 0.25 мм по методу Мюллера [46] из 1% раствора моноолеина в *n*-гептане, содержащего сфингомиелин в заданных концентрациях. Водная фаза, в которой формируется БЛМ, 0.1 или 1 M NaCl, 10 mM Hepes, pH 7.2 и 8.0. Цитолизин добавляли в водную фазу до формирования БЛМ.

Измерение электрических характеристик БЛМ проводили при комнатной температуре. Ток через БЛМ измерялся высокоомным вольтметр-электронметром ВК2-16 в режиме фиксации потенциала на мембране с помощью хлорсеребряных электродов с потенциалом асимметрии 2–3 мВ. Регистрация тока на выходе усилителя осуществлялась потенциометром КПС-4.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают искреннюю благодарность Костиной Е.Е. (ИБМ ДВО РАН, Владивосток) за определение видовой принадлежности актинии *O. orientalis*, Гребельному С.Д. (Зоологический институт РАН, Санкт-Петербург) за помощь при определении видовой принадлежности этой актинии и Гришину Е.В. (ИБХ РАН, Москва) за критические замечания в обсуждении результатов.

Данная работа частично поддержана грантами РФФИ (№ 02-04-49486), ДВО РАН (№ 03-1-05-002) и Программой Президиума РАН “Молекулярная и клеточная биология” (№ 03-1-0-05-002).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Kem W.R.* // The Biology of Nematocysts // Eds D.A. Hessinger, H.M. Lenhoff. New York: Academic Press, 1988. P. 375–405.
2. *Norton R.S.* // J. Toxicol.-Toxin Rev. 1998. V. 17. P. 99–130.
3. *Anderluh G., Maček P.* // Toxicon. 2002. V. 40. P. 111–124.
4. *Turk T.* // J. Toxicol.-Toxin Rev. 1991. V. 10. P. 223–262.
5. *Maček P.* // FEMS Microbiol. Immunol. 1992. V. 105. P. 121–130.
6. *Tejica M., Anderluh G., Maček P., Marcet R., Torres D., Sarracent J., Alvarez C., Lanio M.E., Serra M.D., Menestrina G.* // Int. J. Parasitol. 1999. V. 29. P. 489–498.
7. *Batista U., Maček P., Sedmak B.* // Period. Biol. 1986. V. 88. P. 97–98.
8. *Kem W.R., Pennington M.W., Norton R.S.* // Perspect. Drug Discov. Des. 1999. V. 16. P. 11–129.
9. *Shnyrov V.L., Monastyrnaya M.M., Zhadan G.G., Kuznetsova S.M., Kozlovskaya E.P.* // Biochem. Int. 1992. V. 26. P. 219–229.
10. *Zhadan G.G., Kuznetsova S.M., Opalikova O.V., Monastyrnaya M.M., Emelyanenko V.I., Zyкова T.A., Villar E., Shnyrov V.L.* // Biochem. Mol. Biol. Int. 1994. V. 32. P. 331–340.
11. *Chanturiya A.N.* // Biochim. Biophys. Acta. 1990. V. 1026. P. 248–250.
12. *Elliott R.C., Konya R.S., Vickneshwara K.* // Toxicon. 1986. V. 24. P. 117–122.
13. *Зыкова Т.А., Монастырская М.М., Аналикова О.В., Швец Т.В., Козловская Э.П.* // Биооргани. химия. 1998. Т. 24. С. 509–516.
14. *Monastyrnaya M.M., Zyкова T.A., Apalikova O.W., Shwets T.W., Kozlovskaya E.P.* // Toxicon. 2002. V. 40. P. 1197–1217.
15. *Linder R., Bernheimer A.W., Kim K.S.* // Biochim. Biophys. Acta. 1977. V. 467. P. 290–300.
16. *Иванов А.С., Мольнар А.А., Козловская Э.П., Монастырская М.М.* // Биол. мембраны. 1987. Т. 4. С. 243–248.
17. *Gomez T., Wong L., Chavez M., Lanio M.E., Romero L.* // Toxicon. 1987. V. 25. P. 369.
18. *Grotendorsta G.R., Hessinger D.A.* // Toxicon. 1999. V. 37. P. 1779–1796.
19. *Bernheimer A.W., Avigad L.S.* // Biochim. Biophys. Acta. 1978. V. 541. P. 96–106.
20. *Монастырская М.М., Козловская Э.П., Иванов А.С., Мольнар А.А., Халилов Э.М., Еляков Г.Б.* // Биол. мембраны. 1988. Т. 5. С. 830–835.
21. *Norton R.S., Maček P., Reid G.E., Simpson R.J.* // Toxicon. 1992. V. 30. P. 13–23.
22. *Клышко Е.В., Ильина А.П., Монастырская М.М., Бурцева Ю.В., Костина Е.Е., Зыкова Т.А., Мензорова Н.И., Козловская Э.П.* // Биол. моря. 2003. Т. 29. С. 189–194.
23. *Shiomi K., Ishikawa M., Yamanaka H., Kikuchi T.* // Nippon Suisan Gakkaishi. 1989. V. 55. P. 1235–1241.
24. *Lenarčič B., Ritonja A., Štrukelj B., Turk B., Turk V.* // J. Biol. Chem. 1997. V. 272. P. 13899–13903.
25. *Швец Т.В., Монастырская М.М., Зыкова Т.А., Козловская Э.П.* // Сб. тез. докл. Второго Межд. Симп. “Химия и химическое образование” / Владивосток: Изд-во ДВГУ, 2000. С. 233.
26. *Зыкова Т.А., Винокуров Л.М., Маркова Л.Ф., Козловская Э.П., Еляков Г.Б.* // Биооргани. химия. 1985. Т. 11. С. 293–301.
27. *Blumenthal K.M., Kem W.R.* // J. of Biol. Chem. 1983. V. 258. P. 5574–5581.
28. *Ferlan I., Jackson K.W.* // Toxicon. 1983. V. 21 (Suppl. 3). P. 141–144.
29. *Костина Е.Е.* Распространение и экология современных и ископаемых морских организмов. Владивосток: ДВО АН СССР, 1990. С. 89–96.
30. *Руднев И.С., Лихацкая Г.Н., Козловская Э.П., Монастырская М.М., Еляков Г.Б.* // Биол. мембраны. 1984. Т. 1. С. 1019–1024.
31. *Khoo K.S., Kam W.K., Khoo H.E., Gopalakrishnakone P., Chung M.C.M.* // Toxicon. 1993. V. 31. P. 1567–1579.
32. *Thomson M., Moritz R.L., Simpson R.J., Norton R.S.* // Biochem. Int. 1987. V. 15. P. 711–718.
33. *Anderluh G., Pungercar J., Štrukelj B., Maček P., Gubenšek F.* // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1996. V. 220. P. 437–442.
34. *Pungercar J., Anderluh G., Gubenšek F., Štrukelj B.* // Biochem. Biophys. Acta. 1997. V. 1341. P. 105–107.
35. *Anderluh G., Barlič A., Podlessek Z., Maček P., Pungercar J., Gubenšek F., Zechini M.L., Serra M.D., Menestrina G.* // Eur. J. Biochem. 1999. V. 263. P. 128–136.
36. *Lanio E.M., Morera V., Alvarez C., Tejica M., Gomez T., Pazos F., Basada V., Martinez D., Huerta V., Padron G., Chavez M.A.* // Toxicon. 2001. V. 39. P. 187–194.
37. *Wang Y.W., Chua K.L., Khoo H.E.* // Biochim. Biophys. Acta. 2000. V. 1478. P. 9–18.
38. *Anderluh G., Pungercar J., Krizaj I., Štrukelj B., Gubenšek F., Maček P.* // Protein Eng. 1996. V. 10. P. 751–755.
39. *Maček P., Belmont G., Pederczoli C., Menestrina G.* // Toxicology. 1994. V. 87. P. 205–227.
40. *Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J.* // J. Biol. Chem. 1951. V. 193. P. 265–275.
41. *Laemmli U.K.* // Nature. 1970. V. 227. P. 680–682.
42. *Grey W.R.* // Methods in Enzymology / Eds C.H.W. Hirs, S.N. Timasheff. New York; San Francisco; London: Acad. Press, 1972. V. 11. P. 121–139.
43. *Беленький Б.Г., Ганкина Е.С., Нестеров В.В.* // Докл. АН СССР. 1967. Т. 172. С. 91–93.
44. *Vaskovsky V.E., Suppes Z.S.* // Comp. Biochem. Physiol. 1972. V. 43B. P. 601–609.

45. Bernheimer A.W., Avigad L.S. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1976. V. 73. P. 467–471. 46. Muller P., Rudin D.O., Tien H.T., Wescott W.C. // Phys. Chem. 1963. V. 67. P. 534–535.

Actinoporins from the Sea of Japan Anemone *Oulactis orientalis*: Isolation and Partial Characterization

A. P. Il'ina*#, M. M. Monastyrnaya*, I. N. Sokotun*, Ts. A. Egorov**,
Yu. A. Nazarenko*, G. N. Likhatskaya*, and E. P. Kozlovskaya*

#Fax: +7-(4232) 31-4050; e-mail: annil@piboc.dvo.ru

*Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences,
pr. 100 let Vladivostoku 159, 690022 Russia

**Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

Two cytolytic toxins (cytolysins Or-A and Or-G) were isolated from the Sea of Japan anemone *Oulactis orientalis* and characterized. Their purification scheme involved a hydrophobic chromatography on Polychrom 1, a gel filtration on Akrilex P-4, a cation-exchange chromatography on CM-32 cellulose, and a reversed-phase HPLC on a Nucleosil C₁₈ column. The molecular masses of Or-A and Or-G were determined by SDS-PAGE in 14% PAG to be ca. 18 kDa. The absence of Cys residues and a high content of basic amino acid residues are characteristic of their amino acid compositions. The hemolytic activities of Or-A and Or-G were found to be 295.86 and 322.58 HU/mg, respectively; these are by three orders of magnitude lower than those of sphingomyelin-inhibitable cytolysins from the tropic sea anemones. The amino acid sequences of the *N*-terminal fragments of Or-A and Or-G were determined to be ATFRVLAK and GAIAGAA, respectively. Action of the cytolysins on the erythrocyte membrane is inhibited by exogenous sphingomyelin. They form ion channels in bilayer lipid membranes with the conductivity of 16, 32, and 40 pSm in 0.1 M NaCl and 168, 240, and 320 pSm in 1 M NaCl at pH 7.2. Therefore, they were attributed to the group of actinoporins. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2005, vol. 31, no. 1; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: actinoporin, amino acid sequence, membranolytic activity, sea anemone