



УДК 577.112.5:593.65

ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА АКТИНОПОРИНОВ АКТИНИИ *Oulactis orientalis*

© 2005 г. А. П. Ильина[#], М. М. Монастырская, М. П. Исаева, К. В. Гузев,
В. А. Рассказов, Э. П. Козловская

Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН, 690022, Владивосток, просп.
100 лет Владивостоку, 159

Поступила в редакцию 12.01.2005 г. Принята к печати 26.01.2005 г.

Частичные аминокислотные последовательности актинопоринов Og-A (136 а. о.) и Og-G (144 а. о.), выделенных из актинии *Oulactis orientalis*, обитающей в Японском море, были определены секвенированием клонов, полученных амплификацией геномной и кДНК со специфичными праймерами к *N*-концевым участкам последовательностей актинопоринов *O. orientalis* и к высококонсервативному для всех известных последовательностей актинопоринов *C*-концевому участку. Полная структура Og-A (165 а. о.) и Og-G (173 а. о.) установлена секвенированием кДНК клонов, полученных быстрой амплификацией 3'-концов кДНК. Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей *Oulactis* актинопоринов и актинопоринов тропических видов показал значительные различия в структуре *N*-концевых фрагментов молекул и сайта связывания актинопоринов с мембраной. Предположено, что это может являться причиной низкой гемолитической активности Og-A и Og-G по сравнению с активностью актинопоринов тропических видов.

Ключевые слова: актинии; актинопорины; клонирование, пороформирующая активность.

ВВЕДЕНИЕ

Пороформирующие токсины, продуцируемые рядом живых организмов, таких, как бактерии, насекомые, кишечнополостные, являются водорастворимыми полипептидами. В связи с большим разнообразием проявляемых ими видов биологической активности их структурно-функциональные взаимосвязи особенно интенсивно исследуются в последние годы [1].

Пороформирующие токсины, называемые актинопоринами, выделены и охарактеризованы к настоящему времени более чем из 30 видов актиний, принадлежащих к семействам Actiniidae и Stichodactylidae (тип Coelenterata) и обитающих в основном в тропических регионах мирового океана [2–4]. Это, как правило, высокомолекулярные (*M* около 20 кДа), высокоосновные полипептиды (*pI* 9 и выше), не содержащие остатки цистеина. Установлена высокая степень подобия (80–90% идентичности) полных аминокислотных последовательностей восьми зрелых актинопоринов, выделенных из актиний *Actinia equina* [5, 6], *Stichodactyla helianthus* [7], *Heteractis magnifica* [8] и *A. tenebrosa* [9]. Методами рентгеноструктурного анализа и ЯМР-спектроскопии изучена пространственная струк-

тура двух актинопоринов – стихолизина II из *S. helianthus* [10] и эквинатоксина II из *A. equina* [11, 12]. Показано, что молекула актинопорина представляет собой гидрофобный β-баррель, состоящий из 12 антипараллельных β-листов, обрамленный с противоположных сторон двумя α-спиральными участками. Один из них, амфифильный *N*-концевой аминокислотный фрагмент (30 а. о.), участвует в мембранолитическом процессе [13]. Установлено, что он перемещается к поверхности мембраны за счет конформационной гибкости молекулы в положении 28–30. Проникая в липидный бислой модельной мембраны или клетки-мишени, он образует в нем катионселективные торoidalной формы поры с диаметром около 2 нм. Этому процессу предшествует взаимодействие молекулы актинопорина с поверхностью мембраны с помощью так называемого сайта связывания. Последний находится на экспонированной наружу β-барреля петле между двумя β-листами, в центре аминокислотной последовательности YNWYSNWW (с 110 по 117 а. о. для эквинатоксина II) и, очевидно, представляет собой обогащенный ароматическими аминокислотными остатками участок молекулы [14, 15].

Исследование гемолитической активности усеченных с *N*-конца рекомбинантных форм полипептида показало, что она уменьшается с увеличением длины удаляемого фрагмента актинопорина [13]. Мутантные формы эквинатоксина II, полу-

Сокращения: IPTG – изопропил-β-*D*-тиогаляктопиранозид; X-Gal – 5-бром-4-хлор-3-индолл-β-*D*-галактопиранозид.

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

Олигонуклеотидные праймеры, использованные для ПЦР-амплификации

Праймер	Структура (5' → 3')
Dir1	GCT-ATT-ATT/C/A-GCN-GGN-G
Dir2	ACN-TTC-C/AGN-GTN-CTT/G-GCN-AA
Dir3	CCA/T-GTT-GCG/A-ACT/G-GGC-G
Rev	ATG-CCA-TCC-A/GTT-A/GTC-NCC

ченные с помощью цистеинсканирующего мутагена, также подтвердили функциональную важность *N*-концевого фрагмента молекулы [13, 15]. Методами сайт-направленного мутагенеза и био-сенсорного анализа доказана необходимость для белок-липидного взаимодействия наличия в сайте связывания актинопорина с мембраной ароматических аминокислотных остатков Trp112 и Trp116 [14].

Ранее мы установили, что гемолитическая активность водных экстрактов нескольких видов актиний, обитающих в Японском и Охотском морях, на два-три порядка ниже активности экстрактов тропических видов [16]. Это обстоятельство побудило нас провести выделение и исследование физико-химических свойств и структуры актинопоринов из актинии Японского моря *Oulactis orientalis* (семейство Actiniidae). В результате были выделены два цитолитических полипептида, Or-A и Or-G, которые по физико-химическим характеристикам и механизму действия на эритроцитарную мембрану и бислоиные липидные мембраны оказались подобными сфингомиелингибируемым актинопоринам тропических видов [17]. Величины гемолитической активности индивидуальных Or-A и Or-G, равные 295.86 ГЕ/мг и 322.58 ГЕ/мг соответственно, отличались от таковых для актинопоринов тропических видов примерно на два порядка. Методом Эдмана нами были установлены частичные аминокислотные последовательности *N*-концевых фрагментов Or-A (ATFRVLAK-) и Or-G (GAAGAA-) [17].

Цель данной работы – установление полных аминокислотных последовательностей обоих *Oulactis* актинопоринов методами молекулярного клонирования и проведение сравнительного анализа участков аминокислотных последовательностей, ответственных за связывание с мембранами и гемолитическую активность актинопоринов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При сравнении аминокислотных последовательностей *N*-концевых фрагментов Or-A и Or-G с аналогичными аминокислотными последовательностями других актинопоринов было обнаружено 25–75% гомологии [17]. Для установления полной аминокислотной последовательности *Oulactis* актинопоринов были использованы пря-

мые специфичные праймеры к *N*-концевым участкам последовательностей Or-G (Dir1) и Or-A (Dir2) и обратный праймер (Rev) к высокомолекулярному для всех известных последовательностей актинопоринов *S*-концевому участку (таблица).

При проведении полимеразной цепной реакции (ПЦР) с праймерами Dir1, Dir2 и Rev в качестве матрицы использовали полноразмерную кДНК-библиотеку и геномную ДНК актинии *O. orientalis*. Для выбора оптимальных условий проводили несколько ПЦР с последовательным повышением температуры отжига праймеров от 40 до 65°C. При электрофоретическом анализе продуктов этих реакций было обнаружено, что наиболее эффективная амплификация фрагмента ожидаемой длины (около 430 п. о. для Or-G и 400 п. о. для Or-A) наблюдается при температуре отжига 60°C, причем неспецифической амплификации при этой температуре не происходит. Полученный фрагмент клонировали по тупым концам в плазмидный вектор pTZ19R, обработанный эндонуклеазой рестрикции *Hind*II. Рекombинантные клоны *Escherichia coli* штамма DH5α отбирали при помощи синего-голубой селекции на среде, содержащей X-Gal и IPTG.

Для подтверждения наличия в отобранных клонах рекомбинантной вставки определенной длины применяли метод ПЦР “на колониях” с использованием универсальных праймеров. Отобранные этим методом клоны далее секвенировали по методу [18]. На основании полученной нуклеотидной последовательности была выведена частичная аминокислотная последовательность Or-G (144 а. о.) и Or-A (136 а. о.) (рисунок). Ранее Андерлу с соавтор. установили [19], что гены, кодирующие эквинатоксины, не содержат интроны. Идентичность нуклеотидных последовательностей, кодирующих фрагменты Or-A и Or-G, полученных амплификацией кДНК и геномной ДНК, показала, что гены, кодирующие актинопорин *O. orientalis*, также не содержат интроны.

Для установления полной аминокислотной последовательности актинопоринов *O. orientalis* проведена быстрая амплификация 3'-концов кДНК. В качестве затравок использовали специфичные праймеры Dir1–3, кодирующие аминокислотные последовательности актинопоринов Or-A и Or-G (таблица) и “cap”-праймеры. Полученные фрагменты имели длину 450 п. о. и состояли из нуклеотидной последовательности, кодирующей фрагмент актинопоринов длиной 98 а. о., и 3'-нетранслируемой области, содержащей сигнал полиаденилирования AATAAA, а также саму poly(A)-область. Доказательством того, что каждая из структур кДНК реальна, а не продукт ошибки ПЦР, является наличие не менее трех независимых клонов для каждой из двух структур кДНК.

Or-G	-----GAILTGAALGFNVHQTIVLKALGVSRKIATGVDNESGGTWTALNAYFRSGTDDVILPFPVPPNKALLYSGOKDTGPVATGAVGVL	85
Or-A	-----ATFNVLAKVLABEFGKVSRIKAVGVDNESGGTWTALNAYFRSGTDDVILPDLVPPNKALLYSGOKDTGPVATGAVGVL	77
EqtV	SVAVAGAVIEGAILTFNVLTQIVLKALGDI SRKIAGVVDNESGGTWTALNAYFRSGTDDVILPFPVPPNKALLYNGQKDRGPVATGAVGVL	90
EqtIV	SVAVAGATIKGAALTFNVLTQIVLKALGDI SRKIAGVVDNESGGTWTALNAYFRSGTDDVILPFPVPPNKALLYNGQKDRGPVATGAVGVL	90
EqtII	SADVAGAVIDGASLSEFDILKIVLQALGNVKKRIAGVVDNESGGTWTALNAYFRSGTDDVILPFPVPPNKALLYNGQKDRGPVATGAVGVL	90
TenC	SADVAGAVIDGASLSEFDILKIVLQALGNVKKRIAGVVDNESGGTWTALNAYFRSGTDDVILPFPVPPNKALLYNGQKDRGPVATGAVGVL	90
HetIII	SAALAGTIEEGASLGFQILDKVLELGVSRKIAGVVDNESGGTWTALNAYFRSGTDDVILPFPVPPNKALLYSGRKTGPPVATGAVAAF	90
StII	--ALAGTIEEGASLTFEVLQKIVLELGVSRKIAGVVDNESGGTWTALNAYFRSGTDDVILPFPVPPNKALLYSGRKTGPPVATGAVAAF	88
StI	--SELAGTIEEGASLTFEVLQKIVLELGVSRKIAGVVDNESGGTWTALNAYFRSGTDDVILPFPVPPNKALLYSGRKTGPPVATGAVAAF	89

Консенсус GaiIdGAsltFnlvtVLkaLGkvsRKIAVGvDNESGGtWtAlNaYFRS GtTdvIlPhkVpNgkAlLYnGqKdtGPVATGaVgvl

Dir1
Dir2
Dir3

Or-G	AYYMSDGNLGLVYFVSPFDYNLYSNWWDVVKVYRGRRRADQAMYEDLYYG-IPYGGDNGWHARKLGYGLKSRGFMKSSAQSLLEIHTVTKA	144
Or-A	AYAMSDGNLGLVYFVSPFDYNLYSNWWDVVKVYRGRRRADQAMYEDLYYG-IPYGGDNGWHARKLGYGLKSRGFMKSSAQSLLEIHTVTKA	136
EqtV	AYAMSDGNLGLVYFVSPFDYNLYSNWWDVVKVYRGRRRADQAMYEDLYYG-IPYGGDNGWHARKLGYGLKSRGFMKSSAQSLLEIHTVTKA	179
EqtIV	AYAMSDGNLGLVYFVSPFDYNLYSNWWDVVKVYRGRRRADQAMYEDLYYG-IPYGGDNGWHARKLGYGLKSRGFMKSSAQSLLEIHTVTKA	179
EqtII	AYYMSDGNLGLVYFVSPFDYNLYSNWWDVVKVYRGRRRADQAMYEDLYYG-IPYGGDNGWHARKLGYGLKSRGFMKSSAQSLLEIHTVTKA	179
TenC	AYYMSDGNLGLVYFVSPFDYNLYSNWWDVVKVYRGRRRADQAMYEDLYYG-IPYGGDNGWHARKLGYGLKSRGFMKSSAQSLLEIHTVTKA	179
HetIII	AYYMSDGNLGLVYFVSPFDYNLYSNWWDVVKVYRGRRRADQAMYEDLYYG-IPYGGDNGWHARKLGYGLKSRGFMKSSAQSLLEIHTVTKA	177
StII	AYYMSDGNLGLVYFVSPFDYNLYSNWWDVVKVYRGRRRADQAMYEDLYYG-IPYGGDNGWHARKLGYGLKSRGFMKSSAQSLLEIHTVTKA	175
StI	AYYMSDGNLGLVYFVSPFDYNLYSNWWDVVKVYRGRRRADQAMYEDLYYG-IPYGGDNGWHARKLGYGLKSRGFMKSSAQSLLEIHTVTKA	176

Консенсус AYAMSDGNLGLVYFVSPFDYNLYSNWWDVVKVYRGRRRADQAMYEDLYYG-IPYGGDNGWHARKLGYGLKSRGFMKSSAQSLLEIHTVTKA

← Rev

Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей актинопоринов. Or-G, Or-A – *Oulactis* актинопорин из *O. orientalis*. EqtII, EqtIV, EqtV – эквинатоксин II (код Genbank, P17723), эквинатоксин IV (код Genbank, Q9Y1U9), эквинатоксин V (код Genbank, Q93109) из *A. equina* [20–22]. TenC – тенебросин C (код Genbank, P17723) из *A. tenebrosa* [9]. HetIII – магнификализин III (код Genbank, Q9U6X1) [24] из *H. magnifica*. StI, StII – стихолизин I (код Genbank, P81662) и стихолизин II (код Genbank, P07845) из *S. helianthus* [23]. Консенсус последовательностей представлен внизу. Идентичные аминокислотные остатки во всех последовательностях выделены темным цветом. Выравнивание выполнено с помощью программы CLASTALW [30]. Стрелками отмечены последовательности, используемые для синтеза олигонуклеотидных праймеров.

При сравнении полных аминокислотных последовательностей Or-A (165 а. о.) и Or-G (173 а. о.) установлено, что степень подобия этих полипептидов составляет 81.2%, а с учетом консервативных замен – 92.1%. Идентичность исследуемых актинопоринов с эквинатоксинами II–V из *A. equina* [20–22] и тенебросином C из *A. tenebrosa* [9], которые также относятся к семейству Actiniidae, составляет 77–79%, в то время как со стихолизинами I–II из *S. helianthus* [23] и магнификализином III из *H. magnifica* [24] (оба вида принадлежат к семейству Stichodactylidae) она составляет 68–70% (рисунок).

Анализ аминокислотных последовательностей актинопоринов из актинии *O. orientalis* и тропических видов актиний показал, что в обоих случаях вариabельными участками молекул полипептидов являются N- и C-концевые фрагменты, тогда как центральная часть молекул всех актинопоринов наиболее консервативна (рисунок). Как видно из рисунка, N-концевые фрагменты аминокислотных последовательностей обоих *Oulactis* актинопоринов значительно усечены (Or-A укорочен на 13 а. о., а Or-G – на 5 а. о.) по сравнению с N-концевыми последовательностями актинопоринов тропических видов. Не исключено, что низкая гемолитическая активность *Oulactis* актинопоринов может быть связана с отсутствием у молекул нескольких концевых аминокислотных остатков, что затрудняет

способность α-спирального фрагмента включаться в липидный бислой. Данное предположение хорошо согласуется с результатами исследования пороформирующей активности мутантных форм эквинатоксина II, полученных N-концевым усекающим мутагенезом. Так, было показано, что отсутствие в мутантных формах актинопорина первых 5 и 10 а. о. уменьшает его гемолитическую активность на 31 и 89% соответственно, а удаление 33 а. о. приводит к ее полной потере [13]. Исследование топологии этого важного участка молекулы в мембране с помощью цистенн-сканирующего и сайт-направленного мутагенеза и исследование проводимости формируемых ими в мембране пор показало, что в мембрану включается N-концевой, спирализованный, участок молекулы эквинатоксина II (с 10 по 28 а. о.) [15]. При этом, согласно данным рентгеноструктурного анализа и ЯМР-спектроскопии, первые 5 а. о. не спирализованы [11, 12]. С помощью вращательной проекции Шиффера и Эдмундсона [25] показано, что в амфифильной α-спиральной структуре данного фрагмента гидрофобные аминокислотные остатки находятся на внешней стороне спирали и образуют с жирнокислотными цепочками липидов стенки функциональные поры, а отрицательно заряженные остатки Asp10, Asp17, Glu24 экспонированы внутрь формируемой поры. В молекулах *Oulactis* актинопоринов полярные аминокислотные

остатки находятся в положении Arg4 для Or-A, Asn12 и Lys19 для Or-G, что соответствует Asp17 и Glu24 у эквинатоксина II (рисунок). В пятом положении у Or-G и в одиннадцатом у Or-A находится остаток гидрофобной аминокислоты Ala, что соответствует Asp10 и Glu24 для EqtII. Можно предположить, что гидрофобные или положительно заряженные аминокислотные остатки N-концевого α -спирального участка молекул *Oulactis* актинопоринов, направленные внутрь поры, затрудняют индуцированную ими ионную проницаемость эритроцитарной мембраны для ионов калия.

Общей закономерностью для некоторых групп пороформирующих токсинов (среди которых выделяются бактериальные холестеринингибируемые цитолизины и сфингомиелинингибируемые актинопорины) является наличие ароматического кластера, выполняющего функцию сайта связывания с мембраной клетки-мишени [26]. В основе специфического связывания этих пороформирующих токсинов с мембраной лежит гидрофобное и электростатическое взаимодействие с ней остатков триптофана [14]. Показано, что в связывании молекул актинопоринов тропических видов актиний с липидной мембраной участвуют Trp112, Trp116, Trp117 [27]. При сравнении аминокислотных последовательностей *Oulactis* актинопоринов и эквинатоксина II видно, что в положениях 103, 104 для Or-A и 111, 112 для Or-G находятся остатки Trp, которые соответствуют остаткам Trp116, Trp117 для EqtII. Однако в положении 99 для Or-A и 107 для Or-G находится не Trp, а Leu, в отличие от Trp112 для EqtII (рисунок). Такая замена одного из трех важных для связывания с мембраной остатков триптофана, по-видимому, приводит к снижению связывания *Oulactis* актинопоринов Or-A и Or-G с поверхностью мембраны. Ранее Андерлу с соавтор. было показано, что замена триптофана на фенилаланин, осуществленная сайт-направленным мутагенезом, приводит к уменьшению (в случае замен Trp112Phe или Trp116Phe) или полной потере (в случае замен Trp112, 116Phe) способности мутанта актинопорина связываться с мембраной [14].

Установленные нами полные аминокислотные последовательности двух актинопоринов из актинии Японского моря *O. orientalis* имеют значительные структурные отличия в функционально значимых участках молекул от актинопоринов тропических видов и являются, таким образом, природными моделями для изучения структурно-функциональных взаимосвязей актинопоринов. В дальнейшем планируется получение и исследование мутантных форм Or-A и Or-G *Oulactis* актинопоринов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали триптон (ICN Biochemicals, США), агар (Ferak Berlin, Германия); дрожжевой экстракт, глюкозу, трис(гидроксиметил)аминометан (Трис), этилендиаминтетрауксусную кислоту (EDTA, динатриевая соль), β -меркаптоэтанол (Sigma, США); IPTG, X-Gal (Fermentas, Литва); глицерин, гуанидинизотиоцианат, саркозил (ICN Biochemicals, США); агарозу (BioRad, США); дезоксинуклеозидтрифосфаты и дидезоксинуклеозидтрифосфаты, [α -³³P]dATP (Сибэнзим, Новосибирск); реактивы отечественного производства квалификации "ос. ч.", эндонуклеазы рестрикции, T4-ДНК-лигазу, щелочную фосфатазу, T4-полинуклеотидкиназу, Taq-ДНК-полимеразу (Сибэнзим, Новосибирск).

Биологический материал. Актинии *O. orientalis* собирали на глубине до 1 м в заливе Посьета Японского моря (Хасанский район Приморского края) в начале сентября 2002 г. и хранили в аквариуме с природной морской водой. Их видовая принадлежность определена Костиной Е.Е. (Институт биологии моря ДВО РАН, Владивосток).

Олигонуклеотидные зонды Dir1, Dir2, Dir3, Rev (EuroGene, Москва); M13F и M13R (Сибэнзим, Новосибирск).

Выделение тотальной РНК. Щупальца актинии *O. orientalis* суспензировали в 200 мкл лизирующего буфера (4 М гуанидинизотиоцианат; 30 мМ ацетат натрия, pH 7.0; 0.5% саркозил, 1% (по объему) β -меркаптоэтанол). После интенсивного встряхивания на вортексе добавляли 160 мкл уравновешенного дистиллированной водой фенола и 160 мкл смеси хлороформ-изоамиловый спирт (24 : 1). После интенсивного встряхивания смесь центрифугировали 10 мин при 12000 g. Экстракцию РНК из водной фазы смесью фенола с хлороформом (1 : 1) проводили трижды до исчезновения интерфазы. К водной фазе добавляли 2.5 объема этанола. После выдерживания в течение 2 ч при -20°C смесь центрифугировали 20 мин при 12000 g. Осадок, содержащий РНК, растворяли в 200 мкл воды и использовали для синтеза кДНК.

Синтез кДНК проводили в соответствии с протоколом Smart™ Kit (Clontech, США). Для реакции отбирали по 3 мкг тотальной РНК.

Геномную ДНК из щупалец *O. orientalis* выделяли по методу [28]. К растертым в порошок в ступке с жидким азотом щупальцам актинии добавляли десять объемов буфера для экстракции (10 мМ Трис-НСl pH 8.0, 0.5% SDS, 0.1 М EDTA, 5 мкл РНКазы (0.5 мг/мл) (Fermentas, Литва)) и инкубировали 1 ч при 37°C. К смеси добавляли протеиназу К (>30 ед/мг) (Сибэнзим, Новосибирск) (до конечной концентрации 100 мкг/мл) и инкубировали 3 ч при 50°C. ДНК дважды экстрагировали фенолом, уравновешенным 10 мМ буфером Трис-НСl pH 8.0, затем смесью фенол-хлороформ-изоамиловый спирт (25 : 24 : 1) и смесью

хлороформ–изоамиловый спирт (24 : 1). При всех экстракциях органическую и водную фазы осторожно перемешивали в течение 10 мин. ДНК осаждали 95% этанолом и растворяли в 100 мкл воды. Концентрацию ДНК определяли с помощью электрофореза в 0.8%-ном агарозном геле, в качестве стандарта использовали λ -ДНК (Сибэнзим, Новосибирск) различной концентрации.

Полимеразную цепную реакцию проводили с использованием ген-специфичных праймеров Dir1–3, Rev (EuroGene, Москва) (таблица), TagSE-полимеразы, буфера для TagSE-полимеразы, раствора дезоксирибонуклеотидов (Сибэнзим, Новосибирск) и ДНК, выделенной из *O. orientalis*. Реакцию проводили на амплификаторе (Eppendorf, Германия), используя “hot-start” в следующем режиме: денатурация – 30 с при 94°C, отжиг – 30 с при 60°C, синтез – 1 мин при 72°C; 28 циклов. Продукты реакции анализировали с помощью электрофореза в 1.5%-ном агарозном геле, в качестве стандартов использовали набор нуклеотидов с длиной фрагментов от 100 до 1500 п. о. (Сибэнзим, Новосибирск).

Клонирование и секвенирование. Полученные фрагменты были клонированы в плазмидный вектор pTZ19R (Сибэнзим, Новосибирск). Отобранные клоны секвенировали с прямым и обратным M13-праймерами по методу [18] на капиллярном ДНК-секвенаторе (ABI, PRISM™ 310, США).

Компьютерный анализ. Поиск гомологичных последовательностей проводили, используя белковые базы данных и программу BLASTX [29], а множественное выравнивание аминокислотных последовательностей – с помощью программы CLUSTALW [30].

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают искреннюю благодарность Костиной Е.Е. (ИБМ ДВО РАН, Владивосток) за определение видовой принадлежности актинии *O. orientalis*, Барсовой Е.В. (ИБХ им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва) за синтез кДНК-библиотеки, Мудрику Н.Н. (ИБХ им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва) за синтез и очистку олигонуклеотидных праймеров.

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. Wimley W.C. // Curr. Opin. Struct. Biol. 2003. V. 13. P. 404–411.
2. Kem W.R. // The Biology of Nematocysts / Eds D.A. Hessinger, H.M. Lenhoff. New York: Academic Press, 1988. P. 375–405.
3. Norton R.S. // J. Toxicol.-Toxin Rev. 1998. V. 17. P. 99–130.
4. Anderluh G., Maček P. // Toxicon. 2002. V. 40. P. 111–124.
5. Norton R.S., Maček P., Reid G.E., Simpson R.J. // Toxicon. 1992. V. 30. P. 13–23.
6. Ferlan I., Jackson K.W. // Toxicon. 1983. V. 21 (Suppl. 3). P. 141–144.
7. Blumenthal K.M., Kem W.R. // J. Biol. Chem. 1983. V. 258. P. 5574–5581.
8. Khoo K.S., Kam W.K., Khoo H.E., Gopalakrishnakone P., Chung M.C.M. // Toxicon. 1993. V. 31. P. 1567–1579.
9. Thomson M., Moritz R.L., Simpson R.J., Norton R.S. // Biochem. Int. 1987. V. 15. P. 711–718.
10. Mancheno J.M., Martin-Benito J., Martinez-Ripoll M., Gavilanes J.G., Hermoso J.A. // Structure. 2003. V. 11. P. 1319–1328.
11. Athanasiadis A., Anderluh G., Maček P., Turk D. // Structure. 2001. V. 9. P. 341–346.
12. Anderluh G., Dalla Serra M., Viero G., Guella G., Maček P., Menestrina G. // J. Biol. Chem. 2003. V. 278. P. 45216–45223.
13. Anderluh G., Pungerčar J., Križaj I., Štrukelj B., Gubenšek F., Maček P. // Protein Eng. 1997. V. 10. P. 751–755.
14. Hong Q., Gutiérrez-Aguirre I., Barlič A., Malovrh P., Kristan K., Podlesek Z., Maček P., Turk D., González-Mañas J.M., Lakey J.H., Anderluh G. // J. Biol. Chem. 2002. V. 277. P. 41916–41924.
15. Malovrh P., Viero G., Dalla Serra M., Podlesek Z., Lakey J.H., Maček P., Menestrina G., Anderluh G. // J. Biol. Chem. 2003. V. 278. P. 22678–22685.
16. 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.
17. Ильина А.П., Монастырская М.М., Соколин И.Н., Егоров Ц.А., Назаренко Ю.А., Лихацкая Г.Н., Козловская Э.П. // Биоорганическая химия. 2005. Т. 31. С. 39–48.
18. Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1977. V. 74. P. 5463–5467.
19. Anderluh G., Pungerčar J., Štrukelj B., Maček P., Gubenšek F. // Croat. Chem. Acta. 1995. V. 68. P. 533–542.
20. Anderluh G., Pungerčar J., Štrukelj B., Maček P., Gubenšek F. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1996. V. 220. P. 437–442.
21. Pungerčar J., Anderluh G., Gubenšek F., Štrukelj B. // Biochem. Biophys. Acta. 1997. V. 1341. P. 105–107.
22. Anderluh G., Križaj I., Štrukelj B., Gubenšek F., Maček P., Pungerčar J. // Toxicon. 1999. V. 37. P. 1391–1401.
23. Lanio E.M., Morera V., Alvarez C., Tejuca M., Gomez T., Pazos F., Basada V., Martinez D., Huerta V., Padron G., Chavez M.A. // Toxicon. 2001. V. 39. P. 187–194.
24. Wang Y.W., Chua K.L., Khoo H.E. // Biochim. Biophys. Acta. 2000. V. 1478. P. 9–18.

25. Schiffer M., Edmundson A.B. // *Biophys.* 1967. V. 7. P. 121–135.
26. Parker M.W., Feil S.C. // *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 2005. V. 88. P. 91–142.
27. Anderluh G., Barlič A., Podleseck Z., Maček P., Pungercar J., Gubenšek F., Zecchini M.L., Serra M.D., Menestrina G. // *Eur. J. Biochem.* 1999. V. 263. P. 128–136.
28. Blin N., Stafford D.W. // *Nucleic Acids Res.* 1976. V. 3. P. 2303–2308.
29. Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. // *J. Mol. Biol.* 1990. V. 215. P. 403–410.
30. Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. // *Nucleic Acid Res.* 1994. V. 22. P. 4673–4680.

Primary Structures of Actinoporins from Sea Anemone *Oulactis orientalis*

A. P. Il'ina[#], M. M. Monastyrnaya, M. P. Isaeva,
K. V. Guzev, V. A. Rasskazov, and E. P. Kozlovskaya

[#] Fax: (4232) 31-4050; e-mail: annil@piboc.dvo.ru
Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far East Division,
Russian Academy of Sciences, pr. 100-letiya Vladivostoka 159, Vladivostok, 690022 Russia

Partial amino acid sequences of the actinoporins Or-A (136 aa) and Or-G (144 aa) isolated from the Sea of Japan sea anemone *Oulactis orientalis* were determined by sequencing the clones obtained by the amplification of genomic DNA and cDNA with specific primers to the *N*-terminal regions of the *O. orientalis* actinoporin sequences and to the *C*-terminal region, which is known to be highly conservative in all the known actinoporin sequences. The complete structures of Or-A (165 aa) and Or-G (173 aa) were established by sequencing the cDNA clones obtained by the fast amplification of 3'-ends of cDNA. A comparative analysis of the amino acid sequences of the *Oulactis* actinoporins with those of actinoporins from tropical species revealed considerable differences in the structures of their *N*-terminal fragments and their membrane-binding sites. We believe that these differences could explain lower hemolytic activities of Or-A and Or-G than that of actinoporins from the tropical species. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2005, vol. 31, no. 4; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: actinoporins, cloning, pore-forming activity, sea anemones