

УДК 577.112.5

Hct-A — новое семейство актинопоринов актинии *Heteractis crispa*

Е. В. Лейченко*, М. М. Монастырская, Е. А. Зелепуга, Е. С. Ткачева, М. П. Исаева,
Г. Н. Лихацкая, С. Д. Анастюк, Э. П. Козловская
Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, 690022,
Владивосток, просп. 100 лет Владивостоку, 159
*E-mail: 969844@gmail.com
Поступила в редакцию 25.09.2014

РЕФЕРАТ Из тропической актинии *Heteractis crispa* комбинацией методов жидкостной хроматографии выделено несколько новых изоформ актинопоринов с молекулярными массами от 18995.5 до 19398.7 Да, обладающих высокой гемолитической активностью. Показано, что в водных растворах актинопорины существуют в виде моно-, ди- и тримеров. Установлены нуклеотидные последовательности генов, кодирующих актинопорины, получены аминокислотные последовательности новых полипептидов, принадлежащих к семейству Hct-A актинопоринов. Новые актинопорины различаются величиной изоэлектрической точки, количеством и локализацией заряженных аминокислотных остатков в функционально значимом N-концевом фрагменте молекулы, а также зарядом тетрапептида (74-77 а.о.), который принимает участие в электростатическом взаимодействии с цитоплазматической мембраной. Получен рекомбинантный актинопорин rHct-A2 с молекулярной массой 19141 Да, рI 9.64 и величиной гемолитической активности 4.0×10^4 GE/мг. Показано, что проводимость ионных каналов, формируемых rHct-A2 в БЛМ, аналогична проводимости нативного актинопорина из *H. crispa*. Полученные данные расширяют знания о структурно-функциональных взаимосвязях актинопоринов и вносят вклад в понимание механизма функционирования этих молекул, что является основой для создания соединений с высоким биомедицинским потенциалом. В настоящее время их рассматривают как модели для получения противоопухолевых, антибактериальных и кардиостимулирующих агентов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА актиния; актинопорины; гемолитическая активность; проводимость липидных мембран; структурно-функциональный анализ.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ПФТ – пороформирующие токсины; БЛМ – бислоиные липидные мембраны; а.о. – аминокислотный остаток (при числе); GST – глутатион-S-трансфераза; ИПТГ – изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид.

ВВЕДЕНИЕ

Причина пристального внимания исследователей к актиниям, морским кишечнорастворимым, – продуцируемые ими яды, которые представляют собой сложные смеси биологически активных соединений белковой природы. Для дальнейшего использования в качестве фармакологических агентов наибольший интерес представляют нейротоксины (модуляторы ионных каналов Nav, ASICs и Kv), различные по структуре и механизму действия ингибиторы протеиназы и актинопорины, принадлежащие к семейству α -пороформирующих токсинов (α -ПФТ) [1-3]. Актинопорины обладают уникальной пространственной структурой, что позволяет им существовать как в водорастворимом, так и в мембраносвязанном состоянии и обуслов-

ливает их способность связываться с мембранами, содержащими сфингомиелин, и формировать в них ионные каналы или поры [4]. С пороформирующей активностью связывают широкий спектр проявляемого этими полипептидами фармакологического действия: противоопухолевого, антипаразитарного, дерматонекротического и кардиостимулирующего [5-7]. Установлено, что актинопорин EqtII из *Actinia equina* в концентрации 0.1-1 нМ оказывает кардиотоксический эффект, а при более высоких концентрациях стимулирует агрегацию тромбоцитов [8]. Показано, что в небольших концентрациях ($\sim 10^{-9}$ М) тенеброзины (актинопорины из *Actinia tenebrosa*) также действуют как кардиостимуляторы [9]. Обнаружено, что актинопорины EqtII и Bc2 из *Bunodosoma caissarum* [10] являют-

ся эффективными противоопухолевыми агентами, действующими на фибросаркому и глиобластому [11]. Недавно на клетках HeLa, TNP-1, MDA-MB-231 и SNU-C4 нами было показано, что актинопорин RTX-A из *Heteractis crisper* в нетоксичных концентрациях проявляет противоопухолевое действие, а также подавляет опухолевую трансформацию эпителиальных клеток мыши JB6P+Cl41, стимулированную эпидермальным фактором роста [7]. Установлено, что это действие обусловлено индукцией p53-независимого апоптоза и ингибированием активности онкогенных ядерных факторов AP-1 и NF-κB.

В последние годы α-пороформирующие токсины актиний используют для создания фармакологических препаратов, представляющих собой иммуноконъюгаты актинопоринов с лигандами: моноклональными антителами, гормонами или факторами роста, действие которых направлено на цитоплазматические мембраны опухолевых и/или паразитарных клеток [6]. В связи с этим актуальным представляется исследование молекулярных основ фармакологических эффектов актинопоринов.

Данная работа является продолжением структурно-функциональных исследований актинопоринов, она посвящена выделению актинопоринов из актинии *H. crisper*, установлению нуклеотидных последовательностей кодирующих их генов, получению рекомбинантных аналогов и изучению некоторых аспектов механизма взаимодействия актинопоринов с биологическими мишенями.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали реактивы следующих фирм: Reanal, Венгрия; Whatman, Англия; ICN Biochemicals, Sigma, Invitrogen, Thermo Scientific, США; Fermentas, Литва; Merk, Германия; «Криохром», «Сибэнзим», «Хеликон», «Евроген», Россия.

Биологический материал

Актинии *H. crisper* были собраны на литорали Южно-Китайского моря во время научной экспедиции на НИС «Академик Опарин» в 2007 г. Видовая принадлежность актиний была определена Е.Е. Костиной (ИБМ ДВО РАН, г. Владивосток). Образцы актиний были заморожены и хранились при -20°C .

Выделение и очистка полипептидов

Приготовление водного экстракта, осаждение суммарных фракций водорастворимых белков ацетоном (63%) осуществляли по методике, описанной ранее [12]. Все операции проводили при $+4^{\circ}\text{C}$.

Ионообменную хроматографию полипептидов проводили на колонке (2.6×50 см) с целлюлозой КМ-32,

уравновешенной 0.01 М аммоний-ацетатным буферным раствором, pH 6.0, в линейном градиенте концентрации NaCl (0–0.5 М, общий объем 2 л) в рабочем буферном растворе. Скорость элюции составляла 20 мл/ч, объем фракций – 5 мл.

Гель-фильтрацию полипептидов проводили на колонке Superdex Peptide 10/30, уравновешенной 0.1 М аммоний-ацетатным буферным раствором, pH 6.0, на высокоэффективном хроматографе среднего давления FPLC (AKTAsistem Pharmacia, Швеция). Элюцию проводили со скоростью 3 мл/мин. Объем фракций составил 1.5 мл.

ВЭЖХ полипептидов осуществляли на колонке с обращенной фазой сорбента Nucleosil C₁₈ (4.6×250 мм), уравновешенной 10% ацетонитрилом в 0.1% трифторуксусной кислоте, на хроматографе Agilent 1100 (Agilent Technologies, США). Элюирование проводили в градиенте концентрации ацетонитрила от 10 до 90% в 0.1% трифторуксусной кислоте при pH 2.2 в течение 60 мин. Скорость элюции – 0.5 мл/мин. Для упаривания ацетонитрила использовали вакуумный концентратор Concentrator 5301 (Eppendorf, Германия).

Концентрацию белка определяли по методу Лоури [13], в качестве стандарта использовали бычий сывороточный альбумин.

Клонирование генов актинопоринов

кДНК синтезировали на основе суммарной мРНК, выделенной из щупалец актинии *H. crisper* [14]. Нуклеотидные последовательности, кодирующие зрелые актинопоринны, были амплифицированы с помощью ген-специфичных праймеров 5'-TCGTTACc/aATGATA-3' (*hct₁sign*) и 5'-GATTCTCTATTTGTCTTC-3' (*hct₁notransl*), сконструированных в программе Vector NTI 8 (Invitrogen, США) на основе последовательностей известных генов актинопоринов. Праймеры были синтезированы в НПО «Евроген» (г. Москва). ПЦР проводили на амплификаторе GeneAmp® PCR System 2700 (Applied Biosystems, США) при следующих условиях: 94°C – 5 мин; затем 28 циклов: 94°C – 30 с, 59°C – 45 с, 72°C – 45 с; затем 72°C – 15 мин. ПЦР-фрагменты (650 п.н.) выделяли из агарозного геля с помощью набора DNA Extraction Kit (Thermo Scientific, США) и клонировали в pTZ57R/T, используя систему T/A cloning (Thermo Scientific, США). Рекомбинантными плазмидами трансформировали клетки штамма DH5a *Escherichia coli*. Клоны отбирали при помощи сине-голубой селекции на среде LB, содержащей X-Gal и ИПТГ. Присутствие в отобранных клонах нужной вставки определяли с помощью метода ПЦР «на колониях» со стандартными праймерами.

Установление и анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей

Плазмидную ДНК выделяли методом щелочно-го лизиса [15]. Определение нуклеотидных последовательностей вставок проводили на ДНК-анализаторе ABI3130xl (Applied Biosystems, США). [16]. Нуклеотидные и выведенные аминокислотные последовательности анализировали с помощью пакета программ Vector NTI 8 (Invitrogen, США).

Экспрессия генов актинопорина

Для создания экспрессионной конструкции фрагмент ДНК, кодирующий актинопорин, амплифицировали с помощью Vent-ДНК-полимеразы («Сибэнзим», Россия) и ген-специфичных праймеров: *hct-a(f)* (5'-GGCTTTAGCTGGTACAATTATCGCGGGTGCA-3') и *hct-a(r)* (5'-CCCSAAGCTTAGCGTGAGATCT-TAATTTGCAGTAT-3'). Для сохранения эндопептидазного сайта и корректной вставки гена в вектор рЕТ-41a(+) (Novagen, США) на 5'-конец прямого праймера был добавлен dGMP, а в состав обратного праймера введен сайт рестрикции для HindIII, совмещенный со стоп-кодоном, а также четыре дополнительных нуклеотида для эффективной работы рестриктазы. ПЦР проводили при следующих условиях: 94°C – 5 мин; затем 30 циклов: 94°C – 30 с, 65°C – 45 с, 72°C – 45 с; затем 72°C – 15 мин. В качестве матрицы использовали рTZ57R/T со вставкой гена *hct-a2*. ПЦР-фрагмент обрабатывали рестриктазой HindIII, клонировали в вектор рЕТ-41a(+) по сайтам рестрикции PshAI и HindIII. Рекомбинантные плазмиды выделяли и секвенировали. Плазмиды с правильной вставкой использовали для трансформации клеток штамма Rosetta (DE3) *E. coli* путем электропорации на приборе Multiporator (Eppendorf, Германия). Трансформированные клетки культивировали в среде 2xYT, содержащей антибиотики канамицин (50 мкг/мл) и хлорамфеникол (34 мкг/мл), в течение ночи, после чего культуру наращивали в объеме 100 мл до светопоглощения $A_{600} = 0.5-0.6$. Для индукции экспрессии добавляли ИПТГ (Fermentas, Литва) в конечной концентрации 0.1 mM и продолжали наращивать клетки в течение 3 ч при температуре 30°C для получения гибридного белка в растворимой форме. Затем клетки центрифугировали (8000 об/мин) и промывали буферным раствором 1 × PBS.

Выделение рекомбинантного актинопорина

Клетки, содержащие гибридный белок, ресуспендировали в 1 × PBS (1 : 5 по объему) и обрабатывали ультразвуком на приборе Sonopuls HD 2070 (Bandelin Electronic, Германия) для разрушения клеточной оболочки. После центрифугирования

(10000 об/мин) клеточный лизат наносили на Ni²⁺-САМ-агарозу, инкубировали в течение 10 мин (+4°C) при постоянном перемешивании для связывания гибридного белка с носителем. Для удаления белков клеточного лизата Ni²⁺-САМ-агарозу с гибридным белком промывали буферным раствором (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM имидазол, pH 8.0), а затем буферным раствором для реакции с энтеропептидазой (20 mM Трис-HCl, 50 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, pH 8.0). К гибриднему белку добавляли энтеропептидазу (New England BioLabs, Великобритания) из расчета 1 ед. фермента на 20 мкг гибридного белка и инкубировали смесь при комнатной температуре в течение ночи при постоянном перемешивании. После осаждения Ni²⁺-САМ-агарозы центрифугированием при 3000 об/мин фракцию, содержащую рекомбинантный актинопорин, отбирали и инкубировали с STI-агарозой для удаления энтеропептидазы.

Электрофоретический анализ

Электрофорез проводили по методу Лэммли [17] в вертикальных пластинах (9 × 12 × 1 мм) в 15% полиакриламидном геле в присутствии 0.1% додецилсульфата натрия (ДСН). Молекулярные массы оценивали с использованием стандартного набора белков-маркеров PageRuler™ Unstained protein ladder, 10–200 кДа (Fermentas, Литва).

Масс-спектрометрический анализ

Молекулярные массы полипептидов определяли на времяпролетном масс-спектрометре Ultraflex III TOF/TOF (Bruker Daltonic, Германия). Времяпролетные масс-спектры фиксировали в прямом пролете и режиме рефлектора.

Гемолитическая активность

Гемолитическую активность определяли на эритроцитах мыши в среде, содержащей 0.9% NaCl. Уровень гемоглобина в супернатанте измеряли спектрофотометрически при 540 нм после предварительного быстрого охлаждения реакционной смеси и ее центрифугирования для осаждения эритроцитов и их теней. За одну гемолитическую единицу (ГЕ) принимали количество белка, вызывающее гемолиз 50% эритроцитов в 1 мл 0.7% суспензии, за 30 мин при 37°C.

Результаты, обработанные по правилам вариационной статистики с использованием пакета программ MS Office Excel 2007, представлены как средние значения, полученные из шести независимых экспериментов ± стандартное отклонение. Статистическую значимость различий между показателями оценивали по однопараметрическому тесту ANOVA.

Определение N-концевой аминокислотной последовательности

Аминокислотную последовательность N-концевого фрагмента рекомбинантного актинопорина определяли на автоматическом твердофазном аминокислотном секвенаторе белков Procise 492 cLC (Applied Biosystems, США) по программе производителя, используя образец белка на pvdf-мембране. Рекомбинантный белок был перенесен из полиакриламидного геля на 0.45 мкм pvdf-мембрану (Millipore, США) в буферном растворе, содержащем 25 мМ Трис, 192 мМ глицин, 20% метанол, 0.1% ДСН, pH 8.3, при 26 В, 60 мА, в течение ночи с использованием Mini Trans-Blot® камеры (Bio-Rad, США). Мембрану окрашивали 0.04% Coomassie Brilliant Blue G-250 в 10% (по объему) ледяной уксусной кислоте, затем отмывали от красителя 50% (по объему) метанолом и высушивали в термостате при 37°C.

Получение бислойных липидных мембран

Бислойные липидные мембраны (БЛМ) формировали на отверстиях тefлонового стаканчика диаметром 0.25 мм по методу Мюллера [18] из 1% раствора моноолеина в *n*-гептане, содержащего заданные концентрации сфингомиелина. Водная фаза: 0.1 М или 1 М NaCl, 10 мМ Hepes, pH 7.5. Актинопорины RTX-A (5 нг/мл) и Hct-A2 (50 нг/мл) добавляли в водную фазу до формирования БЛМ.

Измерение электрических характеристик БЛМ

Ток через БЛМ измеряли высокоомным вольтметр-электронметром ВК2-16 в режиме фиксации потенциала на мембране с помощью хлорсеребряных электродов (потенциал асимметрии 2-3 мВ). Регистрацию тока на выходе усилителя осуществляли потенциометром КПС-4.

Гомологичное моделирование актинопоринов

Модели пространственной структуры актинопоринов были генерированы методом гомологичного моделирования с помощью веб-сервера SWISS-MODEL [19] и программы Swiss-PdbViewer [20]. В качестве прототипа при построении модели использовали пространственную структуру стихолизина StnII (PDB ID 1GWY) [21] актинии *Stichodactyla helianthus*, полученную из Protein Data Bank [22]. Оценку электростатических свойств молекулярной поверхности в силовом поле Amber ff12 и визуализацию структур выполняли с помощью программы MOE [23].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно опубликованным данным, нативные актинопоринины обычно выделяют из водных экстрактов цельных животных и дальнейшую их очистку про-

водят комбинацией различных методов жидкостной хроматографии [4, 12, 24, 25]. В данной работе для выделения индивидуальных актинопоринов использовали метод их осаждения из водного экстракта актинии *H. crispa* (= *Radianthus macrodactylus*) ацетоном и разделение компонентов полученного суммарного белкового препарата с помощью катионообменной хроматографии, FPLC гель-фильтрации и ОФ ВЭЖХ.

На рис. 1А приведен профиль элюции суммарного белкового препарата, полученный в результате хроматографии на целлюлозе КМ-32. Полипептиды фракции 2 обладали высокой гемолитической активностью, а фракции 1 и 3 имели более низкую активность. Полипептиды фракции 2 были рехроматографированы в тех же условиях. Последующую очистку актинопоринов проводили методом гель-фильтрации (рис. 1Б). В результате были получены гемолитически активные фракции, содержащие от 50 до 500 мкг белка. Согласно данным электрофоретического анализа эти фракции содержали полипептиды с молекулярной массой около 19–20 кДа. Полипептиды фракций 1-3 подвергали обращенно-фазовой ВЭЖХ на колонке Nucleosil C₁₈ (рис. 1В-Д соответственно). В результате были получены как фракции гомогенных полипептидов (рис. 1Г), так и фракции, содержащие несколько полипептидов (рис. 1В,Д) с молекулярной массой от 18995.5 до 19398.7 Да, согласно данным масс-спектрометрического анализа. Очевидно, что в суммарных фракциях актинопоринины представлены множеством изоформ с очень близкими физико-химическими свойствами и, вероятно, с этим связано уширение пиков при хроматографическом разделении этих полипептидов.

Из *H. crispa* нами ранее были выделены и охарактеризованы актинопоринины RTX-A, RTX-S и RTX-SII, а также определены нуклеотидные последовательности генов и получены 18 аминокислотных последовательностей актинопоринов семейства Hct-S, содержащих N-концевой остаток серина [12, 14, 25, 26]. Экспериментальные значения молекулярных масс выделенных актинопоринов лежат в пределах от 18995.5 до 19398.7 Да и согласуются с расчетными значениями для семейства Hct-S (от 19338 до 19518 Да), что свидетельствует о существовании множества изоформ актинопоринов не только на геномном или транскриптомном, но и на трансляционном уровне. Наличие в масс-спектрах сигналов меньшей интенсивности в области 38543 и 57950 м/з показывает, что актинопоринины существуют в водных растворах также в форме димеров и/или тримеров соответственно, что согласуется с экспериментальными данными, полученными ранее для StnII из *S. helianthus* [27].

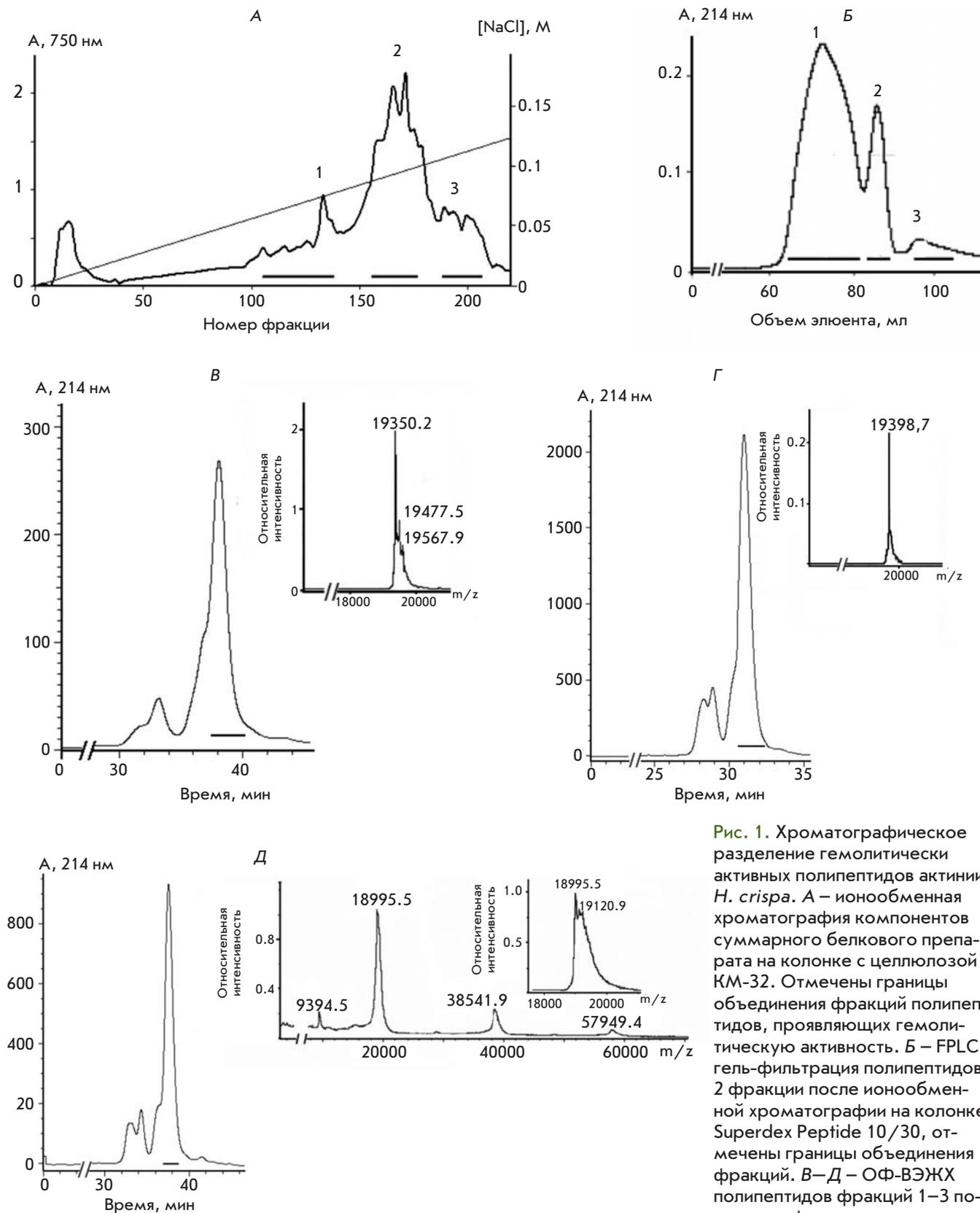


Рис. 1. Хроматографическое разделение гемолитически активных полипептидов актинии *H. crispa*. А – ионообменная хроматография компонентов суммарного белкового препарата на колонке с целлюлозой КМ-32. Отмечены границы объединения фракций полипептидов, проявляющих гемолитическую активность. Б – FPLC гель-фильтрация полипептидов 2 фракции после ионообменной хроматографии на колонке Superdex Peptide 10/30, отмечены границы объединения фракций. В–Д – ОФ-ВЭЖХ полипептидов фракций 1–3 после гель-фильтрации на колонке Nucleosil C₁₈ и масс-спектры полученных соединений

	β1			α1			β2			β3			β4			β5			β6		
	SSS	HHH	HHHH	HHHH	HHHHH	HHHHH	SSSSSSSS	SSSSSS	SSSS	SSSSSS	SS	S	SS	SS	SSSSSS	SS	SS	SSSSSS	SSSSS	SSSSS	SSSSS
	10			20			30		40	50			60			70		80			90
RTX-A	--ALAG	IIA	GASLTFQILD	KVLAE	LGQVS	RKIAIGIDNE	SGGSWTAMNA	YFRSGT	TDVI	LPEFV	PNQKA	LLYSGRK	NRG	PDTTGAV	GAL						
Hct-A2	..T..	..G..	..G..K..	..V..	..L..	..DT..	..VA..	..AF													
Hct-A3	..T..	..G..	..G..K..	..V..	..L..	..DT..	..VA..	..AF													
Hct-A4	..T..	..K..	E..G..K..	..V..V..	..L..	..DT..	..EA..	..AF													
Hct-A6	..T..	..K..	E..G..K..	..V..A..	..L..	..DT..	..EA..	..AF													
Hct-A5	..T..	..K..	E..G..K..	..V..V..	..L..	..DT..	..EA..	..AF													
Hct-S3	SA..T..E	..G..	..G..K..	..V..	..L..	..DT..	..VA..	..AF													
Hct-S5	SA..T..	..K..	E..G..K..	..V..V..	..L..	..DT..	..EA..	..AF													
Hct-S6	SA..T..	..K..	E..G..K..	..V..V..	..L..	..DT..	..EA..	..AF													
Hct-S7	SA..T..TE	..G..	..G..K..	..V..	..L..	..DT..	..VA..	..AF													
HMGIII	SA..T..E	..G..	..G..K..	..V..V..	..L..	..DT..	..VA..	..AF													
StnI	-SE..T..D	..EV..	..G..K..	..V..	..T..L..	..SS..	..VA..	..AF													
StnII	..T..	..V..	..E..K..	..V..	..T..L..	..DT..	..VA..	..AF													
EqfII	SADV..V..D	..S..D..K	T..EA..N..K	..V..V..	..KT..L..T	..S..IV	..HK..HG..	..N..Q..D..	..VA..	..V											
EqfIV	SV..V..K	..A..NV..Q	T..KA..DI	..V..V..	..KT..L..T	..S..IV	..HK..HG..	..N..Q..D..	..VA..	..V											
EqfV	SV..V..K	..A..NV..Q	T..KA..DI	..V..V..	..KT..L..T	..S..IV	..HK..HG..	..N..Q..D..	..VA..	..V											

	β7			β8			α2			β9			β10			β11			β12			
	SSSS	SSS	SSSSSS	SSSSS	SSS	H	HHHHHHH	SS	SS	SSSSS	SSS	SSS	SSS	SSS	SSS	SSS	SSS	SSS	SSSSSS	SSSSSS	SSSSSS	
	100			110		120	130		140	150		160	170		180							
RTX-A	AYYMS	NGNTL	GVMF	SVFPDY	NLYSN	NWWDVK	VYSG	KRRADQ	AMYED	LYY-S	NPYRG	DNGWH	QKNL	GYGLKM	KGIM	TSA	GAGEA	IMEIR	ISR	- [175]		
Hct-A2	..H..	..F..	..G..M..-G	..RV	..LQ..K..- [175]																	
Hct-A3	..H..	..F..	..G..M..-G	..R..R..	..LQ..K..- [175]																	
Hct-A4	..D..	..S..	..G..M..-G	..LQ..K..- [175]																		
Hct-A6	..D..	..I..	..G..M..-G	..LQ..K..- [175]																		
Hct-A5	..D..	..I..	..G..M..-G	..LQ..K..- [175]																		
Hct-S3	..H..	..F..	..G..M..-G	..R..	..LQ..K..- [177]																	
Hct-S5	..D..	..I..	..G..M..-G	..LQ..K..- [177]																		
Hct-S6	..D..	..I..	..G..M..-G	..MLQ..K..- [177]																		
Hct-S7	..H..	..F..	..G..M..-G	..R..	..LQ..K..- [177]																	
HMGIII	..H..	..F..	..G..M..-G	..R..	..LQ..K..- [177]																	
StnI	..S..	..W..	..I..P..	..G..M..-G	..Y	..K..Q..K..- [176]																
StnII	..S..	..W..	..I..	..G..M..-G	..E..R..	..K..Q..K..- [175]																
EqfII	..L..D..	..A..L..Y..	..W..N..R	..I..K..	..R..E..NL	..S..F..	..TR..	..S..R..F..N..S..H..	..L..HV..KA [179]													
EqfIV	..A..D..	..A..L..Y..	..W..N..R	..IFK..R..	..R..Q..YL	..S..F..	..ERH..	..S..R..F..N..G..Q..	..L..HVTKA [179]													
EqfV	..A..D..	..A..L..Y..	..W..N..R	..IFK..R..	..R..Q..YL	..S..F..	..ERH..	..S..R..F..N..G..Q..	..L..HVTKA [179]													

Рис. 2. Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей актинопоринов. RTX-A, RTX-SII, Hct-As, Hct-Ss – актинопорины *H. crispa*; HMGIII – магнификализин *Heteractis magnifica* (Swiss-prot, Q9U6X1); StnI, StnII – стихолизины *S. helianthus* (Swiss-Prot, P81662, P07845); EqfII, EqfIV, EqfV – эквинатоксины *A. equina* (Swiss-Prot, P61914, Q9Y1U9, Q93109). Идентичные остатки отмечены точками; длина α-спиралей и β-тяжей соответствует структуре StnII и показана буквами H и S соответственно

Следует заметить, что отличительной особенностью первичной структуры актинопорина RTX-A, выделенного из *H. crispa* (19273 Да), является отсутствие первых двух N-концевых аминокислотных остатков [12]. Согласно расчетным значениям молекулярных масс актинопоринов семейства Hct-S (от 19338 до 19518 Да) и значениям, определенным для актинопоринов MALDI TOF масс-спектрометрией (от 18995.5 до 19398.7 Да), можно предположить существование еще одного семейства актинопоринов с меньшими значениями молекулярных масс и, вероятно, с остатком аланина на N-конце молекулы.

Клонирование генов актинопоринов

Для определения нуклеотидных последовательностей генов, кодирующих зрелые актинопорины актинии *H. crispa*, были сконструированы пря-

мой (*hct_sign*) и обратный (*hct_notransl*) праймеры. Праймер *hct_sign* создан на основе анализа сигнальных последовательностей известных актинопоринов, а ген-специфичный обратный праймер *hct_notransl* – на основе ранее полученной информации о 3'-нетранслируемой области *rtx-a* и *rtx-sii* *H. crispa* [28].

В результате ПЦР, клонирования, секвенирования и анализа ПЦР-фрагментов были получены 17 последовательностей генов актинопоринов, пять из которых кодировали актинопорины нового семейства Hct-A (Hct-A2-Hct-A6), а 12 – актинопорины семейства Hct-S, установленного нами ранее (*рис. 2*) [26]. Идентичность нуклеотидных последовательностей составила от 93 до 99%, а аминокислотных последовательностей – от 88 до 99%. Наиболее представленными оказались Hct-A2-Hct-A4, Hct-S3, Hct-S5 и Hct-S6.

Расчетные молекулярные массы актинопоринов семейств Hct-A и Hct-S составили от 19158

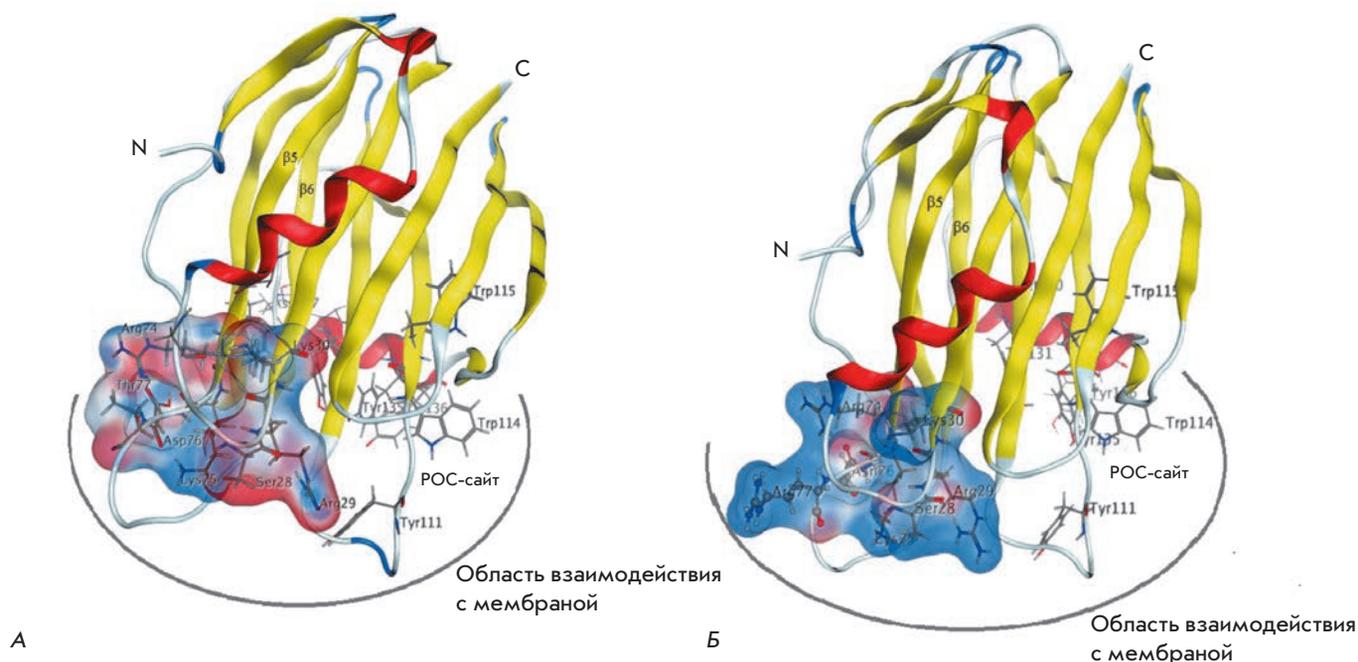


Рис. 3. Модели пространственной структуры актинопоринов Hct-A2 и Hct-A6. Модели пространственной структуры актинопоринов Hct-A2 (А) и Hct-A6 (Б) представлены в виде ленточной диаграммы и окрашены согласно элементам вторичной структуры. Аминокислотные остатки, формирующие РОС-сайт связывания, «псевдожесткую» петлю 28SRK30, а также остатки с заряженной боковой цепью на петле, соединяющей β 5- и β 6-тяжи, представлены в виде стержневой модели; аминокислотные остатки Asn76 и Arg77 актинопорина Hct-A6 представлены в виде шаростержневой модели. Варибельные участки молекулярной поверхности окрашены согласно электростатическим свойствам: положительно заряженные – синим, а отрицательно заряженные – красным. Визуализация выполнена с помощью программы MOE [23]

до 19518 Да, что соответствует нативным актинопоринам *H. crista*, *A. equina*, *S. helianthus*, *H. magnifica*, *Phyllosticus semoni* [12, 24–32]. Все представители семейств Hct-A и Hct-S являются высокоосновными полипептидами, расчетные значения их изоэлектрических точек лежат в диапазоне 9.10–9.74, что характерно для актинопоринов *H. crista*, а также для большинства известных представителей актинопоринов из других видов актиний.

Согласно полученным данным, в ткани щупалец *H. crista*, как и актиний *A. equina* [29, 33], *H. magnifica* [34], *S. helianthus* [24, 35], синтезируется целый ряд изоформ актинопоринов, кодируемых мультигенными семействами. Актинопорины различаются единичными аминокислотными заменами (рис. 2), большинство из которых находится в функционально значимом амфифильном N-концевом фрагменте молекулы (1–27 а.о.), участвующем в порообразовании и связанным с β -кором высокозаряженной петлей S/KRK30 [21, 28, 36]. Все представители актинопоринов характеризуются высокой консервативностью аминокислотных остатков, входящих в ароматический РОС-сайт связывания с мем-

браной (104–137 а.о.), а также остатка Lys77, локализованного на петле, соединяющей β 5- и β 6-тяжи (76–79 а.о.). Этот остаток, как показано для EqтII, участвует в процессе олигомеризации мономеров [37].

In silico-анализ заряженных аминокислотных остатков в области взаимодействия актинопоринов с мембраной

К настоящему времени установлено, что в основе молекулярного механизма порообразования лежит электростатическое притяжение положительно заряженной молекулы актинопорина к противоположно заряженной цитоплазматической мембране и специфическое взаимодействие РОС-сайта связывания с фосфорилхолиновой головкой сфингомиелина [5, 21, 28, 36]. Происходящая затем конформационная перестройка N-концевого фрагмента молекулы приводит сначала к его переходу в водно-липидный интерфейс и затем к включению в гидрофобный кор мембраны. Процесс сопровождается олигомеризацией трех-четырёх или девяти молекул мономера [27, 38–40]

Для определения локализации функционально важных участков актинопоринов семейства Hct-A

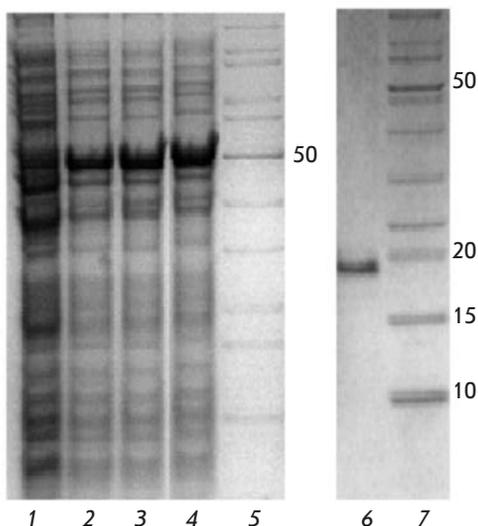


Рис. 4. Электрофореграммы белков клеточного лизата после экспрессии рЕТ-41а(+)-*hct-a2* без добавления ИПТГ (1); после экспрессии рЕТ-41а(+)-*hct-a2* с добавлением ИПТГ в концентрации 0.1, 0.5 и 1.0 мМ (2–4 соответственно); и рекомбинантного актинопорина rHct-A2 (6); 5, 7 – маркеры молекулярной массы, кДа

(Hct-A2–Hct-A6) были построены модели их пространственных структур. В качестве прототипа использовали кристаллическую структуру StnII (PDB, 1gwyA), выполненную с наивысшим разрешением 1.71 Å (идентичность последовательностей составляет от 90.29 до 99.43%). Полученные модели 3D-структуры актинопоринов содержат по 12 β-тяжей, образующих β-кор, и по две α-спирали, расположенные на N- и C-концах молекулы. Антипараллельные β-тяжи соединены между собой и с α-спиральными фрагментами молекулы петлями различной протяженности (рис. 3), включающимися при порообразовании в мембранный интерфейс [40]. Величина RMSD для 175 Cα-атомов модели относительно прототипа составила 0.27 Å.

В представленной работе проведен анализ вариаций заряженных остатков в области взаимодействия актинопоринов с мембраной. Картирование на молекулярной поверхности этих молекул изменений ее электростатических свойств показало, что несмотря на высокую консервативность расположения заряженных остатков в структуре актинопоринов, на петле 74–83, соединяющей β5- и β6-тяжи, расположен вариабельный участок (рис. 2 и 3). Согласно данным криоэлектронной микроскопии эта петля, локализованная, как и ROC-сайт связывания, на поверхности контактов актинопо-

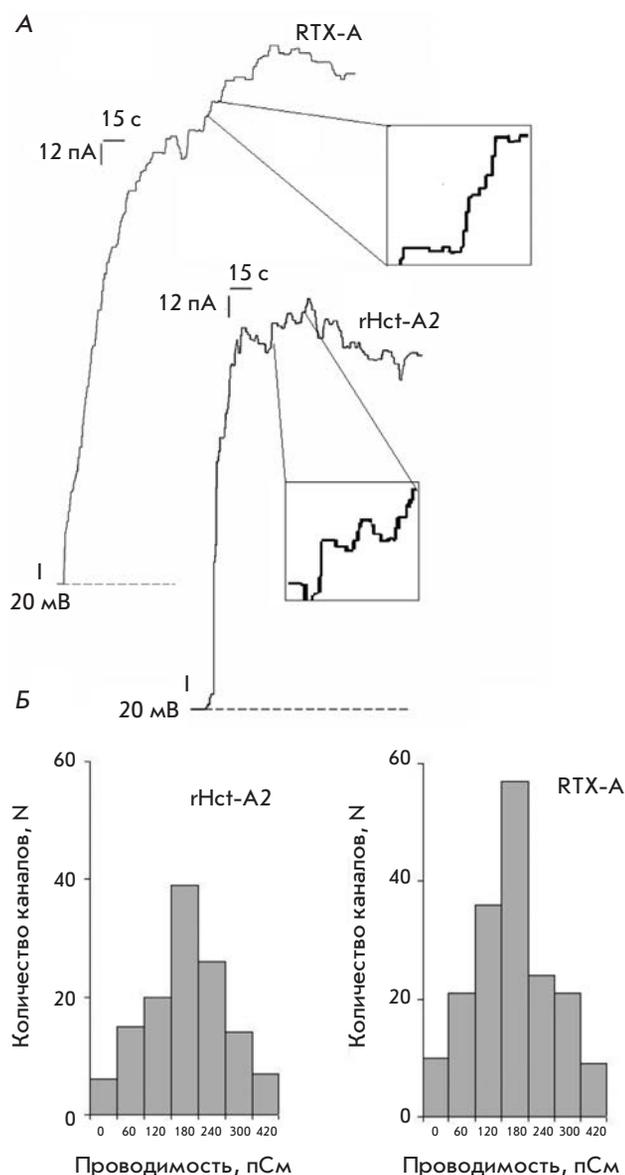


Рис. 5. Результаты исследования каналаобразующей активности актинопоринов на БЛМ. А – проводимость БЛМ, индуцированная актинопоринами *H. crispa*: rHct-A2 (50 нг/мл) и RTX-A (5 нг/мл). Мембранный потенциал – 20 мВ. Б – гистограммы проводимости мембран, модифицированных актинопоринами, rHct-A2 и RTX-A

ринов с липидным интерфейсом, играет важную роль как в распознавании, так и во взаимодействии с мембраной [21]. Показано, что замена нейтрального остатка Thr на положительно заряженный остаток Arg в положении 77 и отрицательно заряженного Asp на Asn в положении 76 у трех представителей семейства Hct-A4–Hct-A6 значительно увеличивает плотность положительного заряда в данной об-

ласти (рис. 3). На наш взгляд, это должно привести к сильному электростатическому взаимодействию как данной петли, так и соседней, высокозаряженной «псевдожесткой» петли SRK (28–30 а.о.), с поверхностью мембраны. Очевидно, именно эти электростатические взаимодействия способствуют, в свою очередь, конформационной реорганизации N-концевого фрагмента и последующей его дислокации и включению в мембрану.

Получение рекомбинантного актинопорина и исследование его свойств

Большое количество изоформ актинопоринов в одном виде-продуценте создает определенные трудности для получения гомогенных полипептидов в достаточном для проведения структурно-функциональных исследований количестве. С целью получения индивидуальных актинопоринов были подобраны условия экспрессии их генов в бактериальной системе и разработана схема их выделения в рекомбинантной форме.

Для создания конструкции, экспрессирующей ген актинопорина, была выбрана рЕТ-система, в частности, плазмидный вектор рЕТ-41a(+), предназначенный для экспрессии в *E. coli* целевых белков, слитых с белком-носителем – глутатион-S-трансферазой (GST). На основе последовательностей генов, кодирующих зрелые актинопорины семейства Hct-A, были сконструированы ген-специфичные праймеры *hct-a(f)* и *hct-a(r)*, фланкирующие ген *hct-a2* с 5'- и 3'-концов соответственно. В качестве матрицы для ПЦР использовали рекомбинантную плазмиду рTZ57R, содержащую ген *hct-a2*. В результате ПЦР был получен фрагмент (550 п.н.), который встроили в плазмиду по PshAI- и HindIII-сайтам. Рекомбинантные плазмиды с нужной вставкой использовали для трансформации штамма Rosetta (DE3) *E. coli*. Рекомбинантный актинопорин был получен в виде слитого с GST гибридного белка с полигистидиновым «хвостом» (GST-His6-rHct-A2). По данным электрофоретического анализа молекулярная масса гибридного белка была чуть более 50 кДа (рис. 4), что согласуется с расчетными данными (~52 кДа). GST-His6-rHct-A2 был обнаружен также в культуральной среде, но в меньшем количестве. ИПТГ в концентрации 0.1–1.0 мМ практически не влиял на выход рекомбинантного белка. Рекомбинантный актинопорин rHct-A2 с молекулярной массой около 20 кДа был выделен из клеточного лизата в нативных условиях с помощью аффинной хроматографии (рис. 4). Выход актинопорина составил в среднем 4 мг/л. В результате секвенирования была определена N-концевая аминокислотная последовательность (15 а.о.), которая полностью соответствовала выведенной на основании нуклеотидной

последовательности. Расчетная молекулярная масса rHct-A2 составила 19141 Да, а изоэлектрическая точка – 9.64. Гемолитическая активность rHct-A2 составила 4.0×10^4 ГЕ/мг, что сравнимо с активностью актинопоринов как *H. crispus* [12, 25, 26], так и других видов актиний [4, 5, 9, 24, 29].

В результате определения каналобразующей активности рекомбинантного актинопорина на БЛМ, сформированных из моноолеина и сфингомиелина (1 : 3), было установлено, что rHct-A2 в концентрации 50 нг/мл вызывает дискретные флуктуации тока в мембране, что свидетельствует о появлении в ней проводящих структур – ионных каналов (рис. 5А). Наиболее вероятная величина проводимости каналов, индуцированных rHct-A2 в 0.1 М NaCl при pH 7.5, составила 180 ± 30 пСм, что соответствует проводимости каналов, формируемых нативным RTX-A (рис. 5Б).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Согласно фармакологическим исследованиям актинопоринов, их биологическая активность определяется неспецифическим действием, приводящим к увеличению проницаемости мембран, что может стимулировать различные токсические эффекты в клетках. Фактически увеличение клеточной проницаемости, вызываемое актинопоринами, приводит к глубоким изменениям морфологии клетки и ее органелл, клеточной фрагментации [5], а также к увеличению размера клеток и их гибели [41, 42]. Структурно-функциональные исследования актинопоринов, как и многих других токсинов, направлены, в конечном итоге, на определение их фармакологической активности и терапевтического потенциала. В настоящее время α -ПФТ актиний рассматривают как модели для дизайна противоопухолевых, антибактериальных и кардиостимулирующих агентов [43, 44]. Созданные природой уникальные соединения, по-видимому, могут найти успешное применение в качестве лекарственных препаратов (или основы для создания препаратов) в сочетанной терапии онкозаболеваний и/или различных кардио- и цитопатологий. ●

Авторы выражают благодарность сотрудникам ТИБОУ ДВО РАН О.В. Черникову за секвенирование N-концевой аминокислотной последовательности и К.В. Гузеву за секвенирование нуклеотидных последовательностей.

Работа поддержана комплексной программой фундаментальных исследований ДВО РАН «Дальний Восток» 42П. Получение и исследование свойств рекомбинантного актинопорина выполнено за счет средств гранта РФ (проект № 14-25-00037).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Parker M.W., Feil S.C. // *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 2005. V. 88. № 6202. P. 91–142.
2. Chi V., Pennington M.W., Norton R.S., Tarcha E.J., Londono L.M., Sims-Fahey B., Upadhyay S.K., Lakey J.T., Iadonato S., Wulff H., et al. // *Toxicol.* 2012. V. 59. № 4. P. 529–546.
3. Frazão B., Vasconcelos V., Antunes A. // *Mar. Drugs.* 2012. V. 10. № 8. P. 1812–1851.
4. Turk T.J. // *Toxicol. Toxin. Rev.* 1991. V. 10. P. 223–262.
5. Anderluh G., Maček P. // *Toxicol.* 2002. V. 40. № 2. P. 111–124.
6. Tejuca M., Anderluh G., Dalla Serra M. // *Toxicol.* 2009. V. 54. № 8. P. 1206–1214.
7. Fedorov S., Dyshlovoy S., Monastyrnaya M., Shubina L., Leychenko E., Kozlovskaya E., Jin J.-O., Kwak J.-Y., Bode A.M., Dong Z., et al. // *Toxicol.* 2010. V. 55. № 4. P. 811–817.
8. Batista U., Maček P., Sedmak B. // *Cell Biol. Int. Rep.* 1990. V. 14. № 11. P. 1013–1024.
9. Norton R.S., Bobek G., Ivanov J.O., Thomson M., Beer E.F., Mortiz R.L., Simpson R.J. // *Toxicol.* 1990. V. 28. № 1. P. 29–41.
10. Migues P.V., Leal R.B., Mantovanni M., Nicolau M., Gabilan N.H. // *NeuroReport.* 1999. V. 10. № 1. P. 67–70.
11. Soletti R.C., Alves T., Vernal J., Terenzi H., Anderluh G., Borges H.L., Gabilan N.H., Moura-Neto V. // *Anticancer Res.* 2010. V. 30. № 4. P. 1209–1215.
12. Monastyrnaya M.M., Zykova T.A., Apalikova O.V., Shwets T.V., Kozlovskaya E.P. // *Toxicol.* 2002. V. 40. № 8. P. 1197–1217.
13. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. // *J. Biol. Chem.* 1951. V. 193. № 1. P. 265–275.
14. Il'ina A., Lipkin A., Barsova E., Issaeva M., Leychenko E., Guzev K., Monastyrnaya M., Lukyanov S., Kozlovskaya E. // *Toxicol.* 2006. V. 47. № 5. P. 517–520.
15. Sambrook J., Russel D.W. *Molecular cloning. Laboratory Manual.* 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. P. 1.31–1.58.
16. Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1977. V. 74. № 12. P. 5463–5467.
17. Laemmli U.K. // *Nature.* 1970. V. 227. № 5259. P. 680–685.
18. Muller P., Rudin D.O., Tien H.T., Wescott W.C. // *J. Phys. Chem.* 1963. V. 67. P. 534–535.
19. Guex N., Peitsch M.C. // *Electrophoresis.* 1997. V. 18. № 15. P. 2714–2723.
20. Guex N., Peitsch M.C., Schwede T. // *Electrophoresis.* 2009. V. 30. Suppl 1. P. S162–173.
21. Mancheño J.M., Martín-Benito J., Martínez-Ripoll M., Gavilanes J.G., Hermoso J.A. // *Structure.* 2003. V. 11. № 11. P. 1319–1328.
22. <http://www.rcsb.org/>
23. Molecular Operating Environment (MOE), 2013.08; Chemical Computing Group Inc., 1010 Sherbooke St. West, Suite #910, Montreal, QC, Canada, H3A 2R7, 2014.
24. Lanio M.E., Morera V., Alvarez C., Tejuca M., Gómez T., Pazos F., Besada V., Martínez D., Huerta V., Padrón G., et al. // *Toxicol.* 2001. V. 39. № 2–3. P. 187–194.
25. Klyshko E.V., Issaeva M.P., Monastyrnaya M.M., Il'ina A.P., Guzev K.V., Vakorina T.I., Dmitrenok P.S., Zykova T.A., Kozlovskaya E.P. // *Toxicol.* 2004. V. 44. № 3. P. 315–324.
26. Ткачева Е.С., Лейченко Е.В., Монастырня М.М., Исаева М.П., Зелепуга Е.А., Анастюк С.Д., Дмитренко П.С., Козловская Э.П. // *Биохимия.* 2011. Т. 76. № 10. С. 1387–1397.
27. Alegre-Cebollada J., Cunietti M., Herrero-Galán E., Gavilanes J.G., Martínez-del-Pozo A. // *J. Mol. Biol.* 2008. V. 382. № 4. P. 920–930.
28. Monastyrnaya M., Leychenko E., Issaeva M., Likhatskaya G., Zelepuga E., Kostina E., Trifonov E., Nurminski E., Kozlovskaya E. // *Toxicol.* 2010. V. 56. № 8. P. 1299–1314.
29. Maček P., Lebez D. // *Toxicol.* 1981. V. 19. № 2. P. 233–240.
30. Anderluh G., Pungerčar J., Štrukelj B., Maček P., Gubenšek F. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996. V. 220. № 2. P. 437–442.
31. Samejima Y., Yanagisawa M., Aoki-Tomomutsu Y., Iwasaki E., Ando J., Mebs D. // *Toxicol.* 2000. V. 38. № 2. P. 259–264.
32. Nagai H., Oshiro N., Takuwa-Kuroda K., Iwanaga S., Nozaki M., Nakajima T.A. // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2002. V. 66. № 12. P. 2621–2625.
33. Wang Y., Yap L.L., Chua K.L., Khoo H.E. // *Toxicol.* 2008. V. 51. № 8. P. 1374–1382.
34. Anderluh G., Križaj I., Štrukelj B., Gubenšek F., Maček P., Pungerčar J. // *Toxicol.* 1999. V. 37. № 10. P. 1391–1401.
35. Blumenthal K.M., Kem W.R. // *J. Biol. Chem.* 1983. V. 258. № 9. P. 5574–5581.
36. Kristan K., Podlessek Z., Hojnik V., Gutierrez-Aguirre I., Gunčar G., Turk D., Gonzalez-Manas J.M., Lakey J.H., Maček P., Anderluh G. // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. № 45. P. 46509–46517.
37. Anderluh G., Barlič A., Potrich C., Macek P., Menestrina G. // *J. Membrane Biol.* 2000. V. 173. № 1. P. 47–55.
38. Mechaly A.E., Bellomio A., Gil-Cartón D., Morante K., Valle M., González-Mañas J.M., Guérin D.M. // *Structure.* 2011. V. 19. № 2. P. 181–191.
39. Bakrač B., Gutiérrez-Aguirre I., Podlessek Z., Sonnen A.F.-P., Gilbert R.J.C., Macek P., Lakey J.H., Anderluh G. // *J. Biol. Chem.* 2009. V. 283. № 27. P. 18665–18677.
40. Rojko N., Kristan K.C., Viero G., Zerovnik E., Maček P., Dalla Serra M., Anderluh G. // *J. Biol. Chem.* 2013. V. 288. № 33. P. 23704–23715.
41. Zorec R., Tester M., Maček P., Mason W.T. // *J. Membrane Biol.* 1990. V. 118. № 3. P. 243–249.
42. Meunier F.A., Frangez R., Benoit E., Ouanounou G., Rouzair-Dubois B., Suput D., Molgo J. // *Toxicol.* 2000. V. 38. № 11. P. 1547–1560.
43. Lewis R.J., Garcia M.L. // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2003. V. 2. № 10. P. 790–802.
44. Takagi J. // *Biochem. Soc. Transactions.* 2004. V. 32. № 3. P. 403–406.