

На правах рукописи

Ильина Анна Павловна

Исследование структуры актинопоринов актиний
Oulactis orientalis и *Radianthus macrodactylus*

02.00.10 – биоорганическая химия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Владивосток-2005

Работа выполнена в Тихоокеанском институте биоорганической химии
Дальневосточного отделения РАН

Научный руководитель:

доктор химических наук,
старший научный сотрудник
Козловская Э.П.

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук,
профессор
Эпштейн Л.М.
кандидат химических наук
старший научный сотрудник
Сова В.В.

Ведущая организация:

Институт биомедицинской химии
РАМН им. В.Н. Ореховича, г. Москва

Защита состоится 21 апреля 2005 г. в 10 часов на заседании диссертационного совета Д 005.005.01 в Тихоокеанском институте биоорганической химии ДВО РАН по адресу: 690022, г. Владивосток, проспект 100 лет Владивостоку, 159, ТИБОХ ДВО РАН. Факс: (4232) 314-050, электронная почта: science@piboc.dvo.ru

С диссертацией можно ознакомиться в филиале Центральной научной библиотеки ДВО РАН (г. Владивосток, проспект 100 лет Владивостоку, 159, ТИБОХ ДВО РАН).

Автореферат разослан "16" марта 2005 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
к.х.н., с.н.с.



Прокопенко Г.И.

Общая характеристика работы

Актуальность проблемы. Одной из фундаментальных задач физико-химической биологии является выяснение молекулярных основ функционирования биологических мембран, выполняющих ряд важнейших для клеток функций. Мембрана является границей раздела при клеточной компартментализации, через нее осуществляются контакты клеток друг с другом и с окружающей средой, мембрана также защищает клетку от действия агрессивных факторов окружающей среды. Важнейшее направление в современных исследованиях составляет изучение механизмов транспорта ионов и метаболитов через мембраны, липид-белковых и белок-белковых взаимодействий в мембране, играющих ключевую роль в ряде биологических процессов. Многие из этих процессов жизненно важны для клеток, а некоторые из них ответственны за их гибель. Общеизвестными и универсальными инструментами в этих исследованиях являются α - и β -пороформирующие токсины (ПФТ), группа цитолитических полипептидов и белков, продуцируемая как прокариотическими, так и эукариотическими клетками. ПФТ многих бактерий являются инвазивными факторами ряда опасных заболеваний, что и предопределяет необходимость всестороннего изучения их структуры и механизма действия.

Наиболее изученными представителями ПФТ, наряду с холестеринингибируемыми цитолизинами грамположительных бактерий, являются сфингомиелинингибуемые цитолизины актиний – актинопорины. Уникальная пространственная организация и способность формировать в мембранах поры лежат в основе антиопухолевой, кардиостимулирующей, антипаразитарной и других видов биологической активности актинопоринов, т.е. ПФТ являются перспективными соединениями для создания новых лекарственных препаратов.

В данной работе изучены физико-химические свойства двух актинопоринов Or-A и Or-G из актинии *Oulactis orientalis* (Японское море), установлена полная аминокислотная последовательность этих полипептидов, а также актинопорина RTX-A актинии *Radianthus macrodactylus* (Индийский океан).

Цель и задачи исследования. Настоящая работа является частью исследований, проводимых в Тихоокеанском институте биоорганической химии ДВО РАН по изучению структуры и функции биологически активных полипептидов актиний. Целью диссертационной работы явились поиск, исследование физико-химических свойств актинопоринов актинии *O. orientalis*, установление структуры и анализ структурно-функциональных взаимосвязей *Oulactis* и *Radianthus* актинопоринов.

Положения, выносимые на защиту.

1. Дальневосточные актинии являются перспективным источником биологически активных полипептидов, в частности, цитолизина.
2. Цитолитические полипептиды Or-A и Or-G, выделенные из дальневосточной актинии *O. orientalis*, по физико-химическим свойствам, первичной структуре и механизму действия относятся к группе сфингомиелинингибуемых актинопоринов.
3. В основе различий гемолитической активности *Oulactis* актинопоринов Or-A и Or-G и *Radianthus* актинопорина RTX-A лежат различия в аминокислотной последовательности функционально важных участков молекул, в частности *N*-концевого фрагмента.

Научная новизна и практическая значимость работы. Проведен анализ структурно-функциональных взаимосвязей актинопоринов, одной из групп пороформирующих токсинов, широко исследуемых в настоящее время. Впервые в гомогенном состоянии выделены два цитолизина Or-A и Or-G из дальневосточной актинии *O. orientalis*. Установлено, что по механизму действия *Oulactis* цитолизина относятся к группе сфингомиелинингибуемых актинопоринов. Определены полные аминокислотные последовательности Or-A, Or-G и RTX-A из актинии *R. macrodactylus*. Методами сравнительного моделирования предсказана пространственная структура *Radianthus* и *Oulactis* актинопоринов. Показано, что *N*-концевые фрагменты аминокислотных последовательностей актинопоринов дальневосточной актинии короче на несколько аминокислотных остатков, что может объяснить различия в величине их гемолитической активности. Таким образом, *Oulactis* актинопорины являются уникальными природными моделями для изучения структурно-функциональных взаимосвязей актинопоринов. Всестороннее изучение структуры и функции пороформирующих токсинов является не только важной задачей фундаментальных исследований, но и необходимо с прикладной точки зрения, так как позволяет создать предпосылки к получению новых высокоспецифичных лекарственных препаратов на их основе.

Апробация работы. Результаты работы были доложены на 3rd European Conference on Marine Natural Products, Elmau Castle, Bavaria, Germany, 2002; Объединенной международной научной конференции «Новая геометрия природы», Казань, Россия, 2003; International Symposium Chemistry & Biology of Marine Organisms, Kolympari, Crete, Greece, 2003; XI International Symposium on Marine Natural Products, Sorrento, Italy, 2004.

Публикации. По материалам исследования опубликовано 5 статей и 4 тезисов докладов.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, обсуждения результатов, экспериментальной части и выводов, изложена на 118

страницах машинописного текста и включает 40 рисунков, 10 таблиц и список цитируемой литературы, состоящий из 247 наименований.

Автор выражает искреннюю признательность и глубочайшую благодарность всем сотрудникам лаборатории химии пептидов ТИБОХ ДВО РАН, оказавшим помощь в проведении исследования, за содействие в проведении отдельных разделов работы сотрудникам других лабораторий ТИБОХ ДВО РАН: к.м.н. Исаевой М.П., н.с. Лихацкой Г.Н., м.н.с. Гузеву К.В., вед. инженеру Тищенко Л.Я., сотрудникам Института биоорганической химии РАН им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова (Москва): проф. Егорову Ц.А., к.б.н. Липкину А.В. и к.б.н. Барсовой Е.В., сотруднику Института биологии моря ДВО РАН (Владивосток) к.б.н. Костиной Е.Е. за помощь при определении видовой принадлежности актиний.

Содержание работы

Скрининг актиний Японского и Охотского морей

Исследование было направлено на поиск новых источников актинопоринов среди актиний Японского и Охотского морей. С этой целью был проведен скрининг актиний, собранных в 27 экспедиционном рейсе НИС «Академик Опарин» в прибрежных районах южного Сахалина и в заливе Посьета (табл. 1).

Как известно, наряду с цитолизинами актинии продуцируют нейротоксины и ингибиторы протеиназ. Содержание цитолизinov, нейротоксинов и ингибиторов трипсина определялось в водных и этанольных экстрактах актиний. Самую высокую токсичность проявили этанольные экстракты *Cribrinopsis similis* и *Stomphia* sp. ($LD_{50} = 36.55$ и 53.36 мг/кг, соответственно). Этанольные экстракты остальных видов имели слабовыраженную токсичность ($LD_{50} \approx 200-400$ мг/кг) (табл. 1). Обычно токсичность этанольных экстрактов актиний связывают, в основном, с действием нейротоксинов, вызывающих нарушение сердечной деятельности и остановку сердца экспериментальных животных, и, в меньшей степени, с действием цитолизinov. Поскольку в этанольных экстрактах исследуемых видов актиний Охотского и Японского морей гемолитическая активность не была обнаружена, можно предположить, что токсическое действие на экспериментальных животных оказывают нейротоксины. Токсичность водных экстрактов актиний *Actinostola* sp., *Metridium senile fimbriatum*, *O. orientalis* (залив Посьета) оказалась в два раза выше, чем соответствующих этанольных (табл. 1). Невысокую, в целом, токсичность водных экстрактов актиний можно объяснить, по-видимому, действием цитолизinov. Таким образом, было установлено, что токсичность этанольных и водных экстрактов актиний бореальных вод на 2-3 порядка ниже, чем токсичность экстрактов тропических видов актиний.

Таблица 1

Сравнительная характеристика биологической активности водных и этанольных экстрактов актиний
Японского и Охотского морей

№	Источник	Место сбора, глубина	Гемолитическая активность, ГЕ/мг	Фосфоли- пазная A ₂ активность*	Токсичность, ЛД ₅₀ , мг/кг мыши		Трипсин- ингибирующая активность, ИЕ/мг	
			H ₂ O	H ₂ O	H ₂ O	EtOH	H ₂ O	EtOH
1	<i>Actinostola callosa</i>	Охотское море, 46°19'7" с.ш., 143°45'11" в.д., 143 м	1.15	+	-	203.70	5.08	0.82
2	<i>Stomphia</i> sp.	Охотское море, 46°19'8" с.ш., 143°51'2" в.д., 188-200 м	1.54	+	-	53.36	2.80	0.84
3	<i>Stomphia coccinea</i>	Охотское море, 46°19'6" с.ш., 143°45'15" в.д., 142 м	1.39	+	-	302.62	3.81	1.61
4	<i>Cribrinopsis similis</i>	Охотское море, 46°19'6" с.ш., 143°45'15" в.д., 142 м	64.93	+	126.4	36.55	55.43	8.74
5	<i>Actinostola</i> sp.	Охотское море, 46°07'11" с.ш., 143°30'54" в.д., 59-71 м	3.33	+	123.4	213.60	3.72	1.93
6	<i>Metridium senile</i> <i>fimbriatum</i>	Охотское море, 46°18'2" с.ш., 142°21'7" в.д., 22-26 м	2.92	+	118.7	253.16	2.34	0.67
7	<i>Oulactis orientalis</i> (= <i>Anthopleura orientalis</i>)	Охотское море, залив Анива, мыс Анастасии, литораль	2.65	+	-	428.60	4.39	5.68
8	<i>Oulactis orientalis</i> (= <i>Anthopleura orientalis</i>)	Японское море, залив Посёта, 0.5-1 м	5.68	+	100.0	299.34	5.29	1.16

"-" – активность не обнаружена; * – количество не определено.

Показано, что все водные экстракты актиний boreальных вод обладают гемолитической активностью (табл. 1). Но даже самый высокий уровень активности, проявляемой актиниями *C. similis* и *O. orientalis* (залив Посьета) (64.93 и 5.68 ГЕ/мг, соответственно), был в несколько раз ниже, чем водных экстрактах актиний, распространенных в тропических водах.

Значительные различия в величинах токсической и гемолитической активности экстрактов boreальных и тропических видов актиний связаны, вероятно, со средой обитания этих животных. Предполагается, что биологическая роль нейро- и цитотоксинов состоит в умерщвлении жертв при добыче актиниями пищи, отпугивании хищников и конкурентов в борьбе за место обитания. Как известно, биота холодных морей гораздо беднее, чем теплых тропических, и количество, как потенциальных жертв актиний, так и их врагов, по-видимому, уменьшается. Поэтому низкие значения гемолитической и токсической активностей для видов, собранных в boreальных водах, могут быть обусловлены тем, что актиниям нет необходимости вырабатывать токсины против хищников, таких, например, как крупные голожаберные моллюски. По наблюдениям гидробиологов, они не обитают в заливе Посьета и на литорали юга Сахалина.

Помимо так называемых "прямых" гемолитических факторов, актинии boreальных вод, подобно наземным ядовитым насекомым и пресмыкающимся, продуцируют и "непрямые" – фосфолипазы A_2 . Наличие фосфолипазной A_2 активности у всех анализируемых видов актиний было установлено по появлению на хроматограмме пятен, соответствующих жирным кислотам и лизолецитину, продуктам гидролиза лецитина

Выделение и физико-химические свойства актинопоринов из *O. orientalis*

В результате проведенного скрининга актиний северных умеренных вод был выбран для дальнейших исследований широко распространенный в заливе Посьета вид *O. orientalis* (семейство Actiniidae), водные экстракты которого показали значительную гемолитическую и A_2 -фосфолипазную, а спиртовые – токсическую и трипсинингибирующую активности. Для выделения цитолизина применяли схему, включающую гидрофобную хроматографию на полихrome-1 (политетрафторэтилене), обессоливание и гель-фильтрационную хроматографию на Акрилксе П-4, ионообменную хроматографию на целлюлозе CM-32 и обращенно-фазовую ВЭЖХ на колонке Nucleosil C_{18} (табл. 2). На всех стадиях выделения во фракциях определяли гемолитическую активность, а на первых стадиях и трипсинингибирующую активность. На первой стадии выделения водный экстракт после центрифугирования и удаления осадка хроматографировали на гидрофобном сорбенте полихrome-1 (рис. 1), при этом отделялись липиды, пигменты, соли, а также балластные белки, такие как нейротоксины и ингибиторы протеиназ. Ранее было установлено, что

цитוליзины элюируются с полихрома вслед за свободным объемом колонки, а ингибиторы трипсина и нейротоксины, хорошо сорбирующиеся на этом носителе, – 40%-ным водным этанолом. Полипептиды с гемолитической активностью были обнаружены в водной фракции (пик 1), а с трипсинингибирующей активностью – в водно-этанольной фракции (пик 2).

Таблица 2

Схема выделения цитוליзинов из *O. orientalis*

Стадия очистки	Суммарный белок, мг	Выход, %
1. Исходный экстракт	20000	100
Хроматография на полихrome-1: фракции пика 1	6500	32,5
2. Гель-фильтрация на Акрилексе П-4 фракций пика 1:		
фракции пика 1	2500	12,5
фракции пика 2	1400	7
3. Ионообменная хроматография на СМ-32 целлюлозе фракций пика 1:		
фракции пика 3	90	0.45
4. ВЭЖХ на Nucleosil C ₁₈ фракций пика 3:		
фракции пика 1 (Or-A)	5	0.025
фракции пика 2 (Or-G)	2.8	0.014

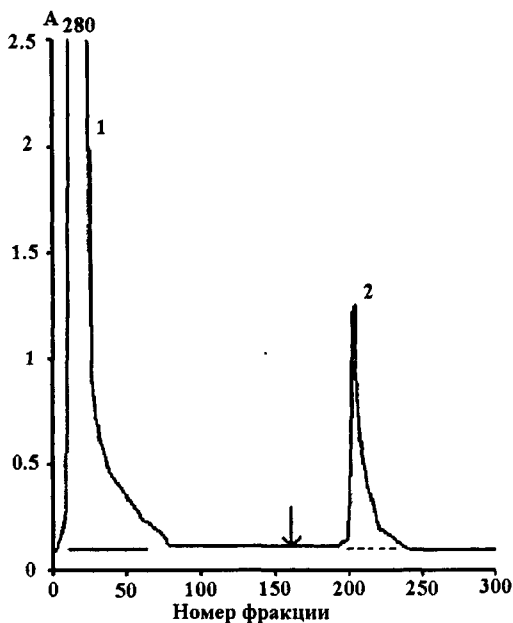


Рис. 1. Гидрофобная хроматография водного экстракта актинии *O. orientalis* на колонке (2.6×15 см) с полихромом-1. Элюция гемолизинов водой (1500 мл), ингибиторов трипсина – 40%-ным этанолом (1200 мл). Скорость элюции 3 мл/мин. Объем фракций 9 мл. Сплошной линией отмечены границы фракций, проявивших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

Водные фракции, содержащие значительное количество морской соли, после хроматографии на полихrome-1 лиофилизировали и затем обессоливали на Акрилексе П-4 (рис 2). При этом удалось разделить небольшого размера полипептиды по молекулярной массе. В результате гель-фильтрации получено три пика, фракции первых двух обладали значительной гемолитической активностью. В исследуемых фракциях трипсинингибирующая активность не обнаружена

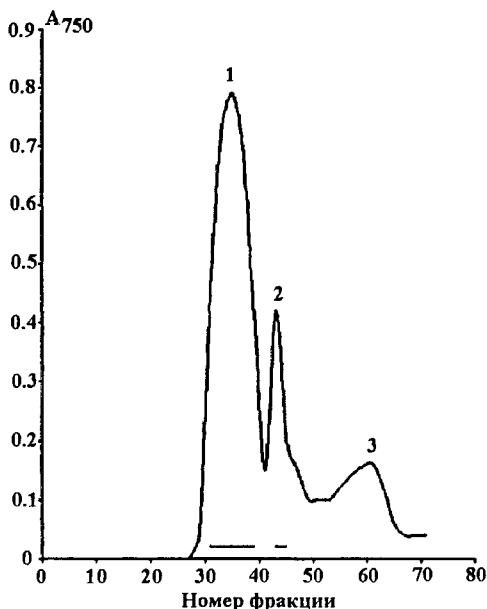


Рис. 2. Гель-фильтрация и обессоливание водной фракции цитолитинов после полихрома-1 (пик 1, рис. 1) на колонке (3×90 см) с Акрилексом П-4. Элюция 0.01 М аммоний-ацетатным буфером, pH 6.0. Скорость элюции 18 мл/ч. Объем фракций 4.5 мл. Сплошной линией отмечены границы фракций, проявляющих гемолитическую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

Для дальнейшей очистки цитолитических полипептидов, содержащихся во фракциях 1-го пика (рис. 2), была использована ионообменная хроматография на целлюлозе СМ-32 (рис. 3). Кроме гемолитической активности, фракции 1-го пика проявили также A_2 -фосфолипазную, в то время как во фракциях правого склона пика 3 идентифицированы только прямые гемолитики, цитолитины. Эти фракции после объединения и диализа были лиофилизированы. На завершающей стадии очистки цитолитинов использована ВЭЖХ на колонке с обращенной фазой Nucleosil C_{18} (рис 4). По данным SDS-электрофореза в 14% ПААГ, а также масс-спектрометрического и *N*-концевого аминокислотного анализов, полученные в результате ВЭЖХ полипептиды (рис 4, пики 1 и 2), проявляющие гемолитическую активность, были гомогенными. *N*-Концевые аминокислотные остатки цитолитинов – аланин (пик 1) и глицин (пик 2). Согласно принятой классификации цитолитинов активный они были названы *Oulactis* цитолитинами Or-A и Or-G.

По данным SDS-электрофореза в 14% ПААГ, молекулярная масса обоих цитолизинов составляет 18 кДа, согласно данным MALDI-TOF-MS, она равна 15353.7 и 16035.9 Да для Or-A и Or-G, соответственно. Близкие значения молекулярной массы имеют актинопорины, выделенные из тропических видов *Stichodactyla helianthus*, *R. macrodactylus* и *Actinia equina*.

Рис. 3.

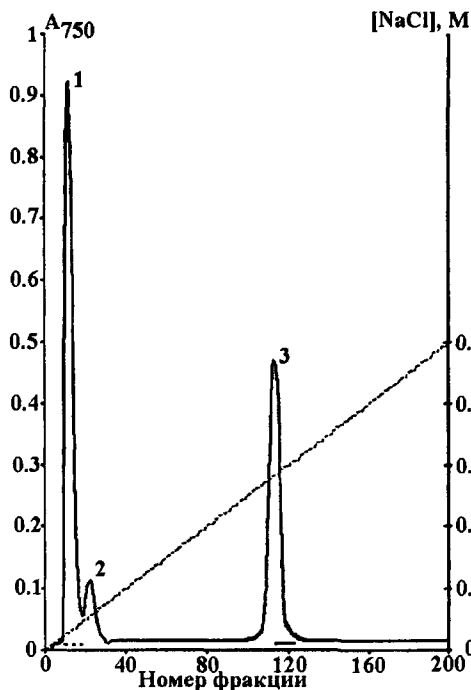


Рис. 4.

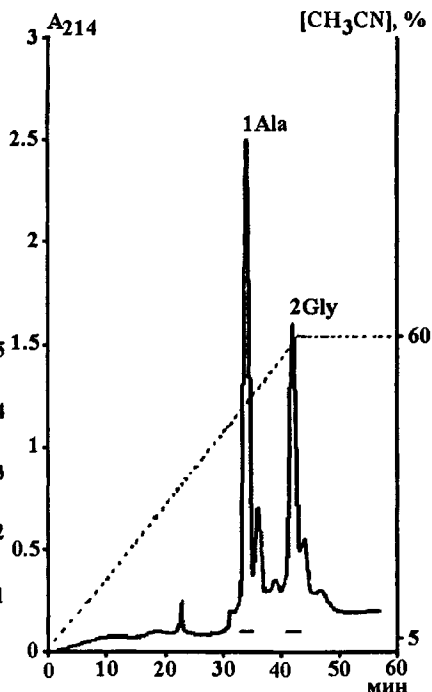


Рис. 3. Ионнообменная хроматография полипептидов фракций пика 1 (рис. 2), обладающих гемолитической активностью, на колонке (2.6×50 см) с целлюлозой CM-32 в градиенте концентрации NaCl (0–0.5 M) в 0.01 M аммоний-ацетатном буфере, pH 6.0. Скорость элюции 24 мл/ч. Объем фракций 10 мл. Пунктиром отмечены границы фракций, проявляющих A₂-фосфолипазную активность. Сплошной линией отмечены границы фракций, проявляющих гемолитическую активность.

Рис. 4. ВЭЖХ цитолизин 3 пика (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 фракций, проявляющих гемолитическую активность.

Для аминокислотного состава *Oulactis* цитолизин (табл. 3) характерно высокое содержание неполярных аминокислот, наличие четырех остатков триптофана, отсутствие остатков цистеина. Таким образом, наблюдается высокая степень гомологии с

аминокислотным составом сфингомиелинингибируемых цитолизинов второй группы, причем наибольшее подобие – с эквинатоксинами II и V из актинии *A. equina*, представителя семейства Actiniidae, к которому принадлежит также *O. orientalis*.

Таблица 3

Аминокислотный состав цитолизинов (число остатков на 1 моль белка)

Аминокислота	<i>Oulactis</i> цитолизин		<i>Equina</i> цитолизин		<i>Stihodactyla</i> цитолизин				<i>Radianthus</i> цитолизин		
	Or-A	Or-G	II	V	I	II	III	IV	A	G	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
½ 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
M (Да)*	18000	18000	20000	20000	17600	17600	17600	17500	20000	20000	20000

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.

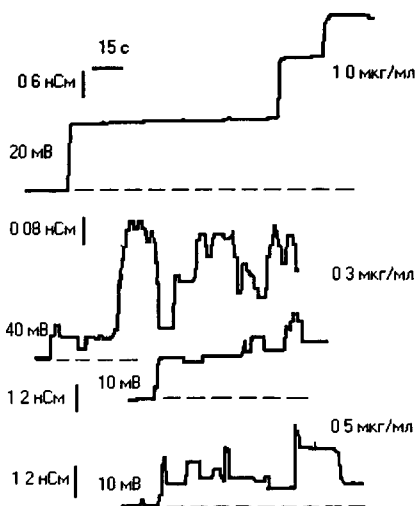
Индивидуальные *Oulactis* цитолизин, подобно цитолизинам тропических видов актиний, не проявляют A₂-фосфолипазную активность. В процессе выделения цитолизин

полипептиды с A_2 -фосфолипазной активностью отделяются на стадии ионообменной хроматографии (рис. 3, пик 1).

Гемолитическая активность Or-A и Or-G, определенная на эритроцитах мышей, составляет 295.86 и 322.58 ГЕ/мг белка, соответственно, что на два порядка ниже активности цитолизинотропических видов актиний. Прединкубация *Oulactis* цитолизинотропических видов актиний с экзогенным сфингомиелином приводит к полной потере их гемолитической активности. Таким образом, они, подобно цитолизинам тропических видов актиний, относятся к группе сфингомиелингибируемых цитолизинотропических видов актиний, которые являются каналоформерами.

Исследование мембранотропного действия *Oulactis* цитолизинотропических видов актиний проведено на бислойных липидных мембранах (БЛМ), содержащих сфингомиелин, с использованием суммы Or-A и Or-G. При добавлении цитолизинотропических видов актиний в водную фазу наблюдались дискретные флуктуации тока (рис. 5), характерные для действия актинопоринотропических видов актиний. Было показано, что интегральная проводимость БЛМ, индуцированная *Oulactis* цитолизинотропическими видами актиний, возрастает с увеличением содержания сфингомиелина в мембранах. Также было обнаружено, что при pH среды 8.0 проводимость каналов выше, чем при pH 7.2, ранее подобная зависимость была отмечена для актинопоринотропических видов актиний. Мембранотропная активность Or-A и Or-G проявляется при концентрациях (300–1000 нг/мл), сравнимых с действующими концентрациями актинопоринотропических видов актиний, с увеличением мембранного потенциала действующие концентрации полипептидов уменьшаются (рис. 5).

Размер пор, формируемых в БЛМ *Oulactis* цитолизинотропическими видами актиний, значительно меньше, чем пор, образуемых в мембранах актинопоринотропических видов актиний. Как показал



анализ флуктуаций тока, наиболее вероятная проводимость каналов составляет 16, 32 и 40 пСм в 0.1 М NaCl и 168, 240 и 320 пСм в 1 М NaCl при pH 7.2 (рис. 6).

Рис. 5. Проводимость каналов, формируемых *Oulactis* актинопоринами (при двустороннем введении в водную фазу) в моноолеиновых БЛМ, содержащих сфингомиелин. Весовое отношение моноолеин:сфингомиелин равно 10:1, pH среды 7.2. Концентрации *Oulactis* актинопоринотропических видов актиний и мембранный потенциал указаны на рисунке.

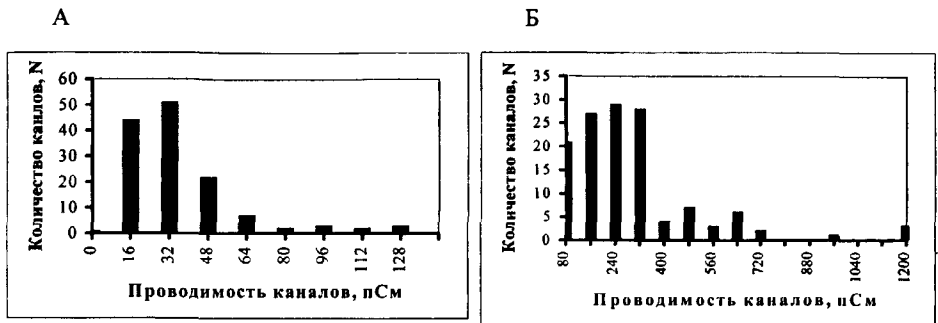


Рис. 6. Гистограммы проводимости каналов, образуемых *Oulactis* актинопоринами: (А) – в 0.1 М NaCl; (Б) – в 1 М NaCl.

Таким образом, характер действия *Oulactis* цитолизина на модельные липидные мембраны подтвердил, что они относятся к группе пороформирующих сфингомиелинзависимых цитолизина – актинопоринам.

Установление полной аминокислотной последовательности

Oulactis актинопориннов Or-A и Or-G

Установление аминокислотной последовательности выделенных полипептидов проведено с использованием современных методов структурной белковой химии и молекулярной биологии. Автоматическим методом Эдмана установлена аминокислотная последовательность N-концевых фрагментов *Oulactis* актинопориннов Or-A и Or-G, ATRVLAK- и GAIIAGAA-, соответственно. С помощью программы CLUSTALW было проведено их сравнение с аналогичными фрагментами аминокислотных последовательностей актинопориннов тропических видов (рис. 7).

Or-A	-----ATFRVLAK
Or-G	-----GAIIAGAA
RTX-A	--ALAGAIAGGVGLKILIEVLGELGKVKVI
RTX-SII	SAALAGTIITLGASLG
HmgI	--ALAGTIIAGASLTFFKILDEV
HmgII	SAALAGTIITDGASLCFDILNKV
StIII	--ALAGTIIAGASLTFFQVLDKVLLEELGKVSRS
EqII	SADVAGAVITDGASLSFDILKTVLEALGNVKKRI
TnC	SADVAGAVITDGASLSFDILKTVLEALGNVKKRI

Рис. 7. Сравнение аминокислотных последовательностей N-концевых фрагментов актинопориннов: *Oulactis* актинопорины Or-A, Or-G из *O. orientalis*; *Radianthus* актинопорины RTX-A, RTX-SII из *R. macrodactylus*; магнификализины I и II (HmgI, HmgII) из *H. magnifica*; *Stichodactyla* цитолизин III (StIII) из *S. helianthus*; эквинатоксин II (EqII) из *A. equina* и тенебросин-С (TnC) из *A. tenebrosa*. Идентичные аминокислотные остатки во всех последовательностях отмечены черным цветом. Выравнивание выполнено с помощью программы CLUSTALW.

Для установления полной аминокислотной последовательности *Oulactis* актинопоринов были использованы прямые специфические праймеры к *N*-концевым участкам последовательностей Or-G (Dir1) и Or-A (Dir2) и обратный праймер (Rev) к высокомолекулярному для всех известных последовательностей актинопоринов *C*-концевому участку (табл. 4).

Таблица 4

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-GGT-GCG/A-ACT/G-GGC-G
Rev	ATG-CCA-TCC-A/GTT-A/GTC-NCC

*Синтез всех праймеров, используемых в работе, был осуществлен в НПО "EuroGene" (Москва)

При проведении полимеразной цепной реакции (ПЦР) с праймерами Dir1, Dir2 и Rev в качестве матрицы использована полноразмерная кДНК-библиотека и геномная ДНК актинии *O. orientalis*. Для выбора оптимальных температурных параметров реакции проведено 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 фрагментов 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. Полученные в результате амплификации фрагменты клонированы по тупым концам в плазмидный вектор pTZ19R, обработанный эндонуклеазой рестрикции HindII. Рекombинантные клоны *Escherichia coli* штамма DH5α отобраны при помощи сине-голубой селекции на среде, содержащей X-Gal и IPTG.

Для подтверждения наличия в отобранных клонах рекомбинантной вставки определенной длины применен метод ПЦР "на колониях" с использованием универсальных праймеров. Отобранные этим методом клоны далее секвенировали. На основании полученной нуклеотидной последовательности была выведена частичная аминокислотная последовательность Or-G (143 а.о.) и Or-A (135 а.о.) (рис. 8). Ранее Андерлу с соавторами установил, что гены, кодирующие актинопорины, не содержат интроны. Идентичность нуклеотидных последовательностей фрагментов Or-A и Or-G, полученных амплификацией кДНК и геномной ДНК, показала, что гены, кодирующие актинопорины *O. orientalis*, также не содержат интроны.

Для установления полной аминокислотной последовательности актинопоринов *O. orientalis* проведена быстрая амплификация 3'-концов кДНК. В качестве затравок были

использованы стандартные “cap”-праймеры, специфичные праймеры Dir1, Dir2, а также Dir3, кодирующий центральные части аминокислотных последовательностей актинопоринов Or-A и Or-G (табл. 4). Полученные фрагменты имели длину чуть меньше 500 п.о. и состояли из нуклеотидной последовательности, кодирующей фрагмент актинопоринов в 98 а.о. и 3'-нетранслируемой области, содержащей poly(A)-область. ПЦР-фрагменты были клонированы в pTZ19R и секвенированы. На основании полученных нуклеотидных последовательностей были выведены аминокислотные последовательности C-концевых фрагментов актинопоринов. Таким образом, было установлено, что полная аминокислотная последовательность Or-A составляет 165 а.о., а Or-G – 173 а.о. (рис. 8).

Сравнение последовательностей Or-A и Or-G показало, что процент гомологии между ними составляет 81.2%, а с учетом консервативных замен – 92.1%. Гомология между исследуемыми актинопоринами и эквинатоксинами II-V из *A. equina* и тенебросином С из *A. tenebrosa* (данные виды также относятся к семейству Actiniidae) составляет 77-79%, в то время как со стихолизинами I и II из *S. helianthus* и магнификализином III из *H. magnifica* (оба вида принадлежат к семейству Stichodactylidae) гомология составляет 68-70% (рис. 8).

Установление полной аминокислотной последовательности

Radianthus актинопорина RTX-A

Сравнение N-концевых фрагментов RTX-A из *R. macrodactylus* и *Oulactis* актинопоринов показало, что наиболее высокая степень гомологии наблюдается для RTX-A и Or-G (рис. 7). Для установления полной аминокислотной последовательности RTX-A использованы прямой (Dir1) и обратный (Rev) праймеры, синтезированные для определения последовательности *Oulactis* актинопоринов (табл. 4).

Из щупалец актинии *R. macrodactylus* выделена тотальная РНК и, с использованием Smart Kit, синтезирована кДНК. При проведении ПЦР с праймерами Dir1 и Rev в качестве матрицы использована полноразмерная кДНК-библиотека *R. macrodactylus*. ПЦР-фрагмент, содержащий около 430 п.о., был клонирован в вектор pBlueScript SK⁺ и секвенирован. На основании полученной нуклеотидной последовательности была выведена частичная аминокислотная последовательность RTX-A (144 а.о.). Для установления полной последовательности RTX-A была проведена быстрая амплификация 3'-концов кДНК *R. macrodactylus* со специфичными Dir1, Dir3 (табл. 4) и стандартными “cap”-праймерами. Полученные ПЦР-фрагменты клонированы в pTZ19R и секвенированы. На основании полученной нуклеотидной последовательности была выведена аминокислотная последовательность C-концевого фрагмента актинопорина. Было установлено, что полипептидная цепь RTX-A состоит из 175 а.о. (рис. 8).

Or-G	-----GALLAGALGEMHQTIVLKALGVSRKIAIGVDNESGGTWTALNAYFRSGTTDVLPEVPNQKALLYSGOKDTGPVATGAVGVL	85
Or-A	-----ATETVLAKVIAELGKVSRRKIAVGVDNESGGTWTALNAYFRSGTTDVLPEVPNQKALLYSGOKDTGPVATGAVGVL	77
EqtV	SVAVAGATITLGCALTNVLTQVTLKALGDIDSRKIAVGDNESGGTWTALNAYFRSGTTDVLPEVPNQKALLYSGOKDRGPVATGAVGVL	90
EqtIV	SVAVAGATITLGCALTNVLTQVTLKALGDIDSRKIAVGDNESGGTWTALNAYFRSGTTDVLPEVPNQKALLYSGOKDRGPVATGAVGVL	90
EqtII	SVAVAGATITLGCALTNVLTQVTLKALGDIDSRKIAVGDNESGGTWTALNAYFRSGTTDVLPEVPNQKALLYSGOKDRGPVATGAVGVL	90
TenC	SADVAGATIDGASISDILKTVEALGKVRKIAVGVDNESGGTWTALNAYFRSGTTDVLPEVPNQKALLYSGOKDRGPVATGAVGVL	90
RTXA	SADVAGATIDGASISDILKTVEALGKVRKIAVGVDNESGGTWTALNAYFRSGTTDVLPEVPNQKALLYSGOKDRGPVATGAVGVL	90
RTXSII	--ALACATITAGASLTFCILDKVIAELGKVSRRKIAIGVDNESGGTWTALNAYFRSGTTDVLPEVPNQKALLYSGOKDRGPVATGAVGVL	88
HmgIII	SAALAGATITLGCALTNVLTQVTLKALGDIDSRKIAVGDNESGGTWTALNAYFRSGTTDVLPEVPNQKALLYSGOKDRGPVATGAVGVL	90
HMT	SAALAGATITLGCALTNVLTQVTLKALGDIDSRKIAVGDNESGGTWTALNAYFRSGTTDVLPEVPNQKALLYSGOKDRGPVATGAVGVL	90
StII	--ALACATITLGCALTNVLTQVTLKALGDIDSRKIAVGDNESGGTWTALNAYFRSGTTDVLPEVPNQKALLYSGOKDRGPVATGAVGVL	88
StI	-SELAGATITLGCALTNVLTQVTLKALGDIDSRKIAVGDNESGGTWTALNAYFRSGTTDVLPEVPNQKALLYSGOKDRGPVATGAVGVL	89
Консенсус	saalagatitacaslctfqlvqlgkvsrrkIAVGVDNESGGTWTALNAYFRSGTTDVLPEVPNQKALLYSGOKDTGPVATGAVGVL	
Or-G	AYVMSDGNLTGLVMSFVPFDYNLYSNMWDVKVYSGKRADQGMVEDLYG-IPYCGDNGWHARKLGYGLKRGFMKSSAQSIILEIHTVTKA	173
Or-A	AYVMSDGNLTGLVMSFVPFDYNLYSNMWDVKVYSGKRADQGMVEDLYG-NPYCGDNGWHARKLGYGLKRGFMKSSAQSIILEIHTVTKA	165
EqtV	AYVMSDGNLTGLVMSFVPFDYNLYSNMWDVKVYSGKRADQGMVEDLYG-IPYCGDNGWHARKLGYGLKRGFMKSSAQSIILEIHTVTKA	179
EqtIV	AYVMSDGNLTGLVMSFVPFDYNLYSNMWDVKVYSGKRADQGMVEDLYG-IPYCGDNGWHARKLGYGLKRGFMKSSAQSIILEIHTVTKA	179
EqtII	AYVMSDGNLTGLVMSFVPFDYNLYSNMWDVKVYSGKRADQGMVEDLYG-IPYCGDNGWHARKLGYGLKRGFMKSSAQSIILEIHTVTKA	179
TenC	AYVMSDGNLTGLVMSFVPFDYNLYSNMWDVKVYSGKRADQGMVEDLYG-IPYCGDNGWHARKLGYGLKRGFMKSSAQSIILEIHTVTKA	179
RTXA	AYVMSDGNLTGLVMSFVPFDYNLYSNMWDVKVYSGKRADQGMVEDLYG-IPYCGDNGWHARKLGYGLKRGFMKSSAQSIILEIHTVTKA	175
RTXSII	AYVMSDGNLTGLVMSFVPFDYNLYSNMWDVKVYSGKRADQGMVEDLYG-IPYCGDNGWHARKLGYGLKRGFMKSSAQSIILEIHTVTKA	177
HmgIII	AYVMSDGNLTGLVMSFVPFDYNLYSNMWDVKVYSGKRADQGMVEDLYG-IPYCGDNGWHARKLGYGLKRGFMKSSAQSIILEIHTVTKA	177
HMT	AYVMSDGNLTGLVMSFVPFDYNLYSNMWDVKVYSGKRADQGMVEDLYG-IPYCGDNGWHARKLGYGLKRGFMKSSAQSIILEIHTVTKA	177
StII	AYVMSDGNLTGLVMSFVPFDYNLYSNMWDVKVYSGKRADQGMVEDLYG-IPYCGDNGWHARKLGYGLKRGFMKSSAQSIILEIHTVTKA	175
StI	AYVMSDGNLTGLVMSFVPFDYNLYSNMWDVKVYSGKRADQGMVEDLYG-IPYCGDNGWHARKLGYGLKRGFMKSSAQSIILEIHTVTKA	176
Консенсус	AYVMSDGNLTGLVMSFVPFDYNLYSNMWDVKVYSGKRADQGMVEDLYGInPyRGDNGWHARKLGYGLKRGFMKSSAQSIILEIHTVTKA	

Rev

Рис. 8. Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей актинопорфинов актиний. Or-G, Or-A из *O. orientalis*; EqtII (код Genbank, P17723), EqtIV (код Genbank, Q9Y1U9), EqtV (код Genbank, Q93109) из *A. equina*; TenC (код Genbank, P17723) из *A. tenebrosa*; RTX-A, RTX-SII из *R. macrodactylus*; HmgIII (код Genbank, Q9U6X1), HMT из *H. magnifica*; StI (код Genbank, P81662), StII (код Genbank, P07845) из *S. hellanthus*. Консенсус последовательностей представлен в виде. Идентичные аминокислотные остатки во всех последовательностях отмечены черным цветом. Выравнивание выполнено с помощью программы CLUSTALW. Стрелками отмечены последовательности, используемые для синтеза олигонуклеотидных праймеров.

На наличие нескольких генов, кодирующих последовательности высокоомологичных изоформ *Radianthus* актинопоринов, указывают различия в аминокислотных последовательностях *N*-концевых фрагментов RTX-A, установленных методами молекулярной биологии и автоматическим методом Эдмана (рис. 7, 8). Ранее существование мультигенного семейства у эквинатоксинов было обнаружено Андерлу с соавторами.

При множественном выравнивании аминокислотных последовательностей методом CLUSTLW была обнаружена высокая степень гомологии RTX-A с HmgIII из *H. magnifica* (87%) и с SiI, SiII из *S. helianthus* (84 и 87%, соответственно). Такая высокая степень гомологии аминокислотных последовательностей актинопоринов *R. macrodactylus* с магнификализином и стихолизинами может быть объяснена принадлежностью этих видов актиний, *R. macrodactylus*, *H. magnifica* и *S. helianthus*, к одному семейству Stichodactylidae (рис. 8).

Исследование структурно-функциональных взаимосвязей актинопоринов

Согласно существующей гипотезе, основанной на экспериментальных данных, механизм действия актинопоринов включает две стадии, первая из которых – связывание молекулы с мембраной с помощью сайта связывания (триптофанобогащенный участок), а вторая – проникновение в липидный бислой *N*-концевого фрагмента (10-28 а.о.). Определение локализации функционально важных участков *Oulactis* и *Radianthus* актинопоринов было проведено методами компьютерного моделирования. С помощью автоматического сервера Swiss-model (<http://expasy.org/swiss-model>) и программы SPDBV (<http://expasy.org/spdbv/>) по аминокислотным последовательностям полипептидов предсказаны пространственные структуры *Radianthus* актинопорина RTX-A и *Oulactis* актинопоринов Or-A и Or-G с элементами вторичной структуры, полученными с помощью программы Molmol (рис. 9). В качестве прототипов использованы эквинатоксин II (1IAZ) и стихолизин II (1GWY), кристаллические структуры которых определены Атанасиадисом и Манчено с разрешением 1.9 Å и 1.7 Å, соответственно. Точность полученных теоретических моделей высока (RMSD < 0.5 Å) и практически соответствует точности экспериментальных моделей, использованных нами в качестве прототипов. Величина параметров RMSD для C α атомов актинопоринов, принадлежащих одному семейству, составляет менее 0.3 Å и не более 0.8 Å – у актинопоринов, принадлежащих к разным семействам (табл. 5).

Таблица 5

Величины параметров RMSD (среднеквадратичное отклонение, Å) для C α атомов *Oulactis* актинопоринов Or-G, Or-A, *Radianthus* актинопоринов RTX-A, RTX-SII, эквинатоксина II (IIAZ) и стихолизина II (IGWY), рассчитанные с помощью программы SPDBV

Актинопорин	IGWY	IIAZ
RTX-A	0,06	0,76
RTX-SII	0,25	0,79
Or-A	0,57	0,28
Or-G	0,58	0,29

Согласно теоретическим моделям *Oulactis* и *Radianthus* актинопоринны являются β -структурированными полипептидами с высоким содержанием неупорядоченной структуры (табл. 6). Молекулы состоят из жестко сформированного кора, образованного 12 антипараллельными β -стрэндами и двумя короткими α -спиралями, расположенными на противоположных сторонах β -кора (рис. 9). Две β -петли (β -шпильки) расположены вне β -кора молекулы (нижняя часть молекул на рис. 9). Вблизи одной из петель расположен участок, обогащенный остатками триптофана Trp103, Trp104 (Or-A), Trp111, Trp112 (Or-G) и Trp114, Trp115 (RTX-A), которые экспонированы наружу β -кора молекулы. Остальные петли и C-концевой участок формируют плоскую поверхность на вершине молекулы (рис. 9). Основные различия в визуализированных пространственных структурах Or-G, Or-A и RTX-A наблюдаются в α -спиральных N-концевых фрагментах молекул.

Таблица 6

Содержание элементов вторичной структуры *Oulactis* актинопоринов Or-G, Or-A, *Radianthus* актинопорина RTX-A, эквинатоксина II (IIAZ) и стихолизина II (IGWY)

Актинопорин	β -структура, %	α -спираль (3 $_{10}$ α -спираль), %	неупорядоченная структура, %
IIAZ	47.5	9.5 (1.7)	47.5
IGWY	47.4	10.3 (1.7)	40.1
Or-A	48.2	10.0 (0)	40.8
Or-G	47.7	9.9 (1.7)	39.5
RTX-A	48.0	10.3 (1.7)	38.9

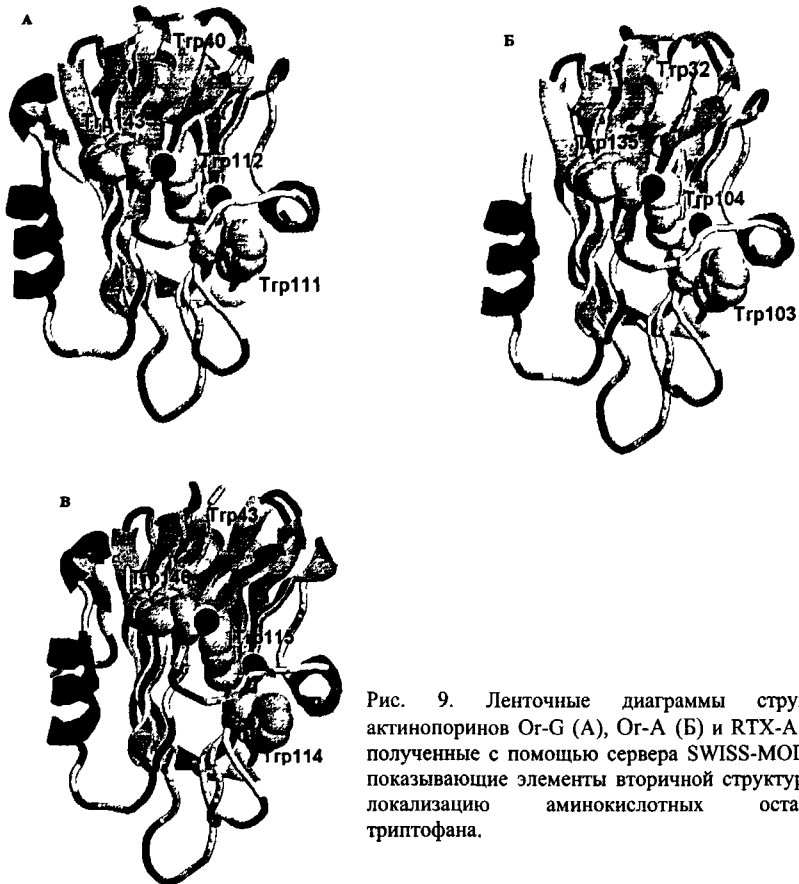


Рис. 9. Ленточные диаграммы структур актинопоринов Or-G (А), Or-A (Б) и RTX-A (В), полученные с помощью сервера SWISS-MODEL, показывающие элементы вторичной структуры и локализацию аминокислотных остатков триптофана.

Таким образом, анализ аминокислотных последовательностей и пространственных структур Or-G, Or-A и RTX-A подтверждает, что вариабельными участками молекул актинопоринов являются *N*- и *C*-концевые фрагменты, тогда как центральная часть молекул наиболее консервативна (рис. 8, 9). В аминокислотных последовательностях *N*-концевых участков RTX-A, RTX-SII, StII и HmgIII присутствуют только консервативные замены и их количество незначительно, что позволяет объяснить близкие значения гемолитической активности: 3.5×10^4 , 3.6×10^4 , 3.14×10^4 и 3.3×10^4 ГЕ/мг для RTX-A, RTX-SII, StII и HmgIII, соответственно. Вместе с тем процент гомологии аминокислотной последовательности RTX-A с последовательностями актинопоринов актиний, принадлежащих к другому

семейству (Actiniidae), значительно меньше (64-67%). В их *N*-концевых участках присутствует 12 неконсервативных замен и величина активности RTX-A и TnC отличается на порядок (1.7×10^5 ГЕ/мг для TnC).

N-Концевые фрагменты аминокислотных последовательностей *Oulactis* актинопоринов не только высоко вариабельны, но и значительно усечены, Or-A укорочен на 13 а.о., а Or-G – на 5 а.о. по сравнению с последовательностями актинопоринов тропических видов (рис. 8). По-видимому, низкую гемолитическую активность *Oulactis* актинопоринов (295.86 ГЕ/мг для Or-A и 322.58 ГЕ/мг для Or-G) можно объяснить отсутствием у молекул нескольких *N*-концевых аминокислотных остатков. Данное предположение подтверждается результатами исследований мутантных форм эквинатоксина II, проведенных Андерлу с соавторами. Ими было установлено, что отсутствие первых 5 или 10 аминокислотных остатков в мутантных формах актинопорина уменьшает их гемолитическую активность на 31 и 89 %, соответственно, а эквинатоксин II без 33 *N*-концевых остатков теряет ее полностью. Можно предположить, что длина α -спирального фрагмента молекулы актинопорина играет важную роль в формировании в липидном бислое поры, проницаемой для ионов калия.

Общей закономерностью для некоторых групп пороформирующих токсинов, включая сфингомиелинингибируемые актинопорины, является наличие ароматического кластера (триптофанобогатенного участка), выполняющего функцию сайта связывания с мембраной клетки-мишени. Предполагается, что эти остатки участвуют в связывании молекулы не только с липидными головками, но и жирнокислотными цепями. Амфифильный характер индольного кольца триптофана способствует «заякориванию» молекулы актинопорина в мембране в результате электростатических взаимодействий и образования водородных связей. Рядом авторов показано, что в связывании молекул EqtII с липидной мембраной участвуют Trp112, Trp116, Trp117 и наиболее критичным для сайта связывания является Trp112, так как замена этого остатка на фенилаланин почти полностью предотвращает связывание молекулы с мембраной, вследствие чего происходит потеря актинопорином гемолитической активности. При сравнении аминокислотных последовательностей *Oulactis* и *Radianthus* актинопоринов и EqtII видно, что в положениях 103, 104 в Or-A, 111, 112 в Or-G и 114, 115 в RTX-A находятся остатки Trp (соответствуют остаткам Trp116, Trp117 в EqtII). Эти остатки экспонированы наружу и могут входить в сайт связывания молекул с мембраной (рис. 8, 9). Положению Trp112 в EqtII соответствуют

Leu99 в Or-A, Leu107 в Or-G, Leu110 в RTX-A, Leu112 в RTX-SII и EqtV, а также Phe112 в HmgIII и HMT (рис. 8). Несмотря на это все актинопорины, кроме *Oulactis* актинопоринов, проявляют высокую гемолитическую активность. По-видимому, аминокислотный остаток в данном положении не имеет принципиальной важности для связывания этих актинопоринов с мембраной, что не согласуется с данными, полученными в результате сайт-направленного мутагенеза этого остатка EqtII (Trp112Phe). Наличие таких противоречий свидетельствует о необходимости продолжения исследований структурно-функциональных взаимосвязей актинопоринов. Однозначного мнения о механизме действия этих пороформирующих токсинов до сих пор не существует и в настоящее время гипотеза двухступенчатого механизма подвергается проверке. Для выяснения молекулярных основ механизма действия актинопоринов необходимо уточнить роль не только *N*-концевого и триптофанобогащенного участков молекул, но и определить, участвуют ли в его реализации *C*-концевой спирализованный участок и β -шпильки.

Выводы

1. Проведен скрининг актиний Японского и Охотского морей с целью поиска биологически активных полипептидов, обладающих цитолитической активностью, в результате которого определен перспективный для дальнейших исследований вид *O. orientalis*, широко распространенный в бореальных водах.
2. Из актинии *O. orientalis* выделены два полипептида (Or-A и Or-G), которые, согласно их физико-химическим характеристикам, липидной специфичности и механизму действия, отнесены к группе сфингомиелинингибируемых цитолитических полипептидов актиний – актинопоринам.
3. Методами молекулярной биологии установлены полные аминокислотные последовательности *Oulactis* актинопоринов Or-A (165 а.о.) и Or-G (173 а.о.) и *Radianthus* актинопорина RTX-A (175 а.о.).
4. Методом сравнительного моделирования по аминокислотной последовательности полипептидов предсказаны пространственные структуры Or-A, Or-G и RTX-A, которые, за исключением *N*-концевых фрагментов молекул, имеют высокую степень подобия со структурами актинопоринов, установленными экспериментально.
5. Анализ структурно-функциональных взаимосвязей *Oulactis* актинопоринов Or-A и Or-G и *Radianthus* актинопорина RTX-A подтвердил важность *N*-концевых α -спиральных фрагментов молекул актинопоринов для проявления ими гемолитической активности.

Список основных публикаций по теме диссертации

1. Il'ina A.P., Monastyrnaya M.M., Zykova T.A., Kozlovskaya E.P. The biologically active polypeptides from the sea anemone *Anthopleura orientalis* // 3rd European Conference on Marine Natural Products: book of abstr. – Elmau Castle, Bavaria, Germany 2002. P. 59.
2. Клышко Е.В., Ильина А.П., Монастырская М.М., Бурцева Ю.В., Костина Е.Е., Зыкова Т.А., Мензорова Н.И., Козловская Э.П. Биологически активные полипептиды и гидролитические ферменты в актиниях низкореальных вод // Биология моря. 2003. Т. 29, № 3. С. 189-194.
3. Козловская Э.П., Клышко Е.В., Ильина А.П., Исаева М.П., Гузев К.В., Зыкова Т.А., Монастырская М.М. Цитолизины актиний // Объединенная международная научная конференция «Новая геометрия природы»: сб. расш. тез. докл. – Казань. 2003. Т. II. Биология. Медицина. С. 179-183.
4. Il'ina A., Lipkin A., Barsova E., Monastyrnaya M., Likhatskaya G., Kozlovskaya E., Luk'yanov S. cDNA Cloning Actinoporin from Sea Anemone *Radianthus macrodactylus* // International Symposium Chemistry & Biology of Marine Organisms: book of abstr – Kolympari, Crete, Greece. 2003. P. 107.
5. Клышко Е.В., Ильина А.П., Лихацкая Г.Н., Исаева М.П., Гузев К.В., Монастырская М.М., Козловская Э.П., Липкин А.В., Барсова Е.В., Крыжко И.Б., Трифонов Е.В., Нурминский Е.А. Актинопорины: структура и функция // Вестник ДВО РАН. 2004. Т. 115, № 3. С. 45-53.
6. Klyshko E.V., Isaeva M.P., Monastyrnaya M.M., Il'ina A.P., Guzev K.V., Vakorina T.I., Dmitrenok P.S., Zykova T.A., Kozlovskaya E.P. Isolation, properties and partial amino acid sequence of a new actinoporins from the sea anemone *Radianthus macrodactylus* // Toxicon. 2004. Vol. 44. P. 315-324.
7. Ильина А.П., Монастырская М.М., Сокотун И.Н., Егоров Ц.А., Назаренко Ю.А., Лихацкая Г.Н., Козловская Э.П. Актинопорины из актинии Японского моря *Oulactis orientalis*: выделение и частичная характеристика // Биоорг. химия. 2005. Т. 31, № 1. С. 39-48.
8. Il'ina A., Monastyrnaya M., Isaeva M., Guzev K., Likhatskaya G., Kozlovskaya E. cDNA Cloning Actinoporins from Sea Anemone *Oulactis orientalis* // XI International Symposium on Marine Natural Products: proceed. – Sorrento, Italy. 2004. P. 43.
9. Ильина А.П., Монастырская М.М., Исаева М.П., Гузев К.В., Рассказов В.А., Козловская Э.П. Первичная структура актинопоринов актинии *Oulactis orientalis* // Биоорг. химия. 2005. Т. 31, № 4.

Соискатель



Ильина А.П

ЗАО «Фартроп»

г. Владивосток, ул. Алеутская, 28

Тираж 100 экз.

Изготовлено с машинописных листов

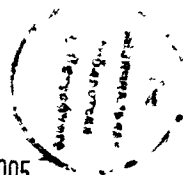
Отпечатано 15.03.2005

02.00

РНБ Русский фонд

2005-4

40945



22 МАР 2005