

**Маргарита Монастырная**

**Мембраноактивные токсины  
актиний**

**Характеристика, структура, механизм  
действия**

**Palmarium Academic Publishing**

## **Impressum / Выходные данные**

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek: Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

Alle in diesem Buch genannten Marken und Produktnamen unterliegen warenzeichen-, marken- oder patentrechtlichem Schutz bzw. sind Warenzeichen oder eingetragene Warenzeichen der jeweiligen Inhaber. Die Wiedergabe von Marken, Produktnamen, Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen u.s.w. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutzgesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürften.

Библиографическая информация, изданная Немецкой Национальной Библиотекой. Немецкая Национальная Библиотека включает данную публикацию в Немецкий Книжный Каталог; с подробными библиографическими данными можно ознакомиться в Интернете по адресу <http://dnb.d-nb.de>.

Любые названия марок и брендов, упомянутые в этой книге, принадлежат торговой марке, бренду или запатентованы и являются брендами соответствующих правообладателей. Использование названий брендов, названий товаров, торговых марок, описаний товаров, общих имён, и т.д. даже без точного упоминания в этой работе не является основанием того, что данные названия можно считать незарегистрированными под каким-либо брендом и не защищены законом о брендах и их можно использовать всем без ограничений.

Coverbild / Изображение на обложке предоставлено: [www.ingimage.com](http://www.ingimage.com)

Verlag / Издатель:

Palmarium Academic Publishing

ist ein Imprint der / является торговой маркой

AV Akademikerverlag GmbH & Co. KG

Heinrich-Böcking-Str. 6-8, 66121 Saarbrücken, Deutschland / Германия

Email / электронная почта: [info@palmarium-publishing.ru](mailto:info@palmarium-publishing.ru)

Herstellung: siehe letzte Seite /

Напечатано: см. последнюю страницу

ISBN: 978-3-659-98325-2

Zugl./ Утверд.: Докторская диссертация, Владивосток, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, 2007

Copyright / АВТОРСКОЕ ПРАВО © 2013 AV Akademikerverlag GmbH & Co. KG

Alle Rechte vorbehalten. / Все права защищены. Saarbrücken 2013

Автор выражает искреннюю признательность научному руководителю, д.х.н. профессору Э.П. Козловской, за огромное внимание, ценные советы, критический анализ и помощь на всех этапах проведения данного исследования. Автор приносит глубокую благодарность всем сотрудникам лаборатории химии пептидов и других лабораторий Тихоокеанского института биоорганической химии Дальневосточного отделения РАН (г. Владивосток), принимавшим участие в экспериментальной работе: к.х.н. Зыковой Т.А., н.с. Вожжовой Е.И., к.х.н. Лейченко Е.В., к.х.н. Ильиной А.П., к.б.н. Апаликовой О.В., к.ф.-м.н. Лихацкой Г.Н., к.м.н. Исаевой М.П., к.х.н. Вакориной Т.И., м.н.с. Гузеву К.В.

Автор также искренне благодарен за плодотворное сотрудничество в рамках проведенных исследований д.х.н. Рудневу В.С., сотруднику Института химии ДВО РАН (г. Владивосток); чл.-корр. РАМН Иванову А.С. и к.б.н. Мольнару А.А., сотрудникам Института биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН (г. Москва); к.б.н. Чантурия А.Н., сотруднику Института биохимии им. А.В. Палладина (г. Киев); к.б.н. Брезестовскому П.Д., сотруднику Института экспериментальной кардиологии ВКНЦ РАМН (г. Москва); д.б.н. Шнырову В.Л., сотруднику Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН (г. Пушкино-на-Оке); д.х.н., проф. Егорову Ц.А. (посмертно) и к.х.н. Назимову И.В., сотрудникам Института биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (г. Москва).

## СОДЕРЖАНИЕ

<b>1. ВВЕДЕНИЕ</b>	7
<b>2. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР. СТРУКТУРА И МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ПОРОФОРМИРУЮЩИХ ТОКСИНОВ БЕЛКОВОЙ ПРИРОДЫ</b>	12
2.1. Мишени действия мембраноактивных белков и пептидов	12
2.2. Классификация пороформирующих токсинов (ПФТ)	13
2.3. Основные ступени поробразования	15
2.4. $\alpha$ -Пороформирующие токсины	16
2.4.1. Колицины бактерии <i>Escherichia coli</i>	16
2.4.2. Апоптотические белки Вах и Bcl- $\chi_1$ семейства Bcl-2 белков, ключевых регуляторов апоптоза	21
2.4.3. Дифтерийный токсин (ДТ) из <i>Corynebacterium diphtheriae</i>	26
2.4.3.1. Некоторые биохимические аспекты действия ДТ	26
2.4.3.2. Основа структурно-функциональных взаимосвязей ДТ	27
2.4.4. Актинопорины – высокомолекулярные цитолизины актиний II-й группы	29
2.4.4.1. Классификация цитолизингов актиний	29
2.4.4.2. Первичная структура актинопорингов	31
2.4.4.3. Вторичная и третичная структуры актинопорингов	34
2.4.4.4. Исследование конформационного состояния актинопорингов	37
2.4.4.5. Взаимодействие актинопорингов с липидными компонентами мембран	39
2.4.4.6. Исследование механизма олигомеризации актинопорингов	40
2.4.4.7. Исследование взаимодействия актинопорингов с мембранным интерфейсом, фосфохолиновый сайт связывания	42
2.4.4.8. Молекулярный механизм порообразования	44
2.5. $\beta$ -Пороформирующие токсины	47
2.5.1. Стафилококковый $\alpha$ -гемолизин из <i>Staphylococcus aureus</i>	47
2.5.2. Холестеринзависимые цитолизины (ХЗЦ) грамположительных бактерий	50
2.5.2.1. Перфринголизин О из <i>Clostridium perfringens</i> и родственные ХЗЦ	52
2.5.2.2. Сайт связывания ХЗЦ с мембранным холестерином	53
2.5.2.3. Механизм мембранолитического действия ХЗЦ	54
2.5.2.4. Влияние холестерина на олигомеризацию и литическую активность ХЗЦ	56
2.5.2.5. Биохимические эффекты ХЗЦ	57
2.5.3. Гидрализины – новая группа $\beta$ -ПФТ гидр семейства Cnidaria	58
2.6. Пороформирующие антимикробные пептиды	60
2.6.1. Биологическая роль и классификация	60
2.6.2. Механизм мембранотропного действия антимикробных пептидов	63
2.6.3. Дермасептины	65

2.6.4. Мелиттин.....	66
2.6.5. Аламетицин.....	69
2.7. Некоторые аспекты молекулярной организации и функционирования цитоплазматических мембран, определяющие механизм действия мембраноактивных белков и пептидов.....	70
2.7.1. Структурная организация бислоя и функциональная роль липидных микродоменов.....	70
2.7.2. Модуляция изменений цитоскелета клеток-мишеней..... бактериальными патогенами.....	72
2.7.3. Сравнительная характеристика структурных особенностей водорастворимых мембраноактивных белков и пептидов и мембранных белков цитоплазматических мембран.....	74
2.7.4. Локализация и роль остатков ароматических аминокислот в связывании с мембранным интерфейсом.....	77
2.7.5. Движущие силы фолдинга мембраноактивных пептидов и белков, взаимодействующих с мембраной.....	79
2.8. Перспективы исследования ПФТ и антимикробных пептидов.....	80
2.9. Заключение.....	81
3. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	84
3.1. Введение.....	84
3.2. Поиск биологически активных полипептидов в актиниях тропических и дальневосточных морей.....	86
3.3. Выделение и очистка цитолизиннов актиний.....	91
3.3.1. Высокомолекулярные <i>Radianthus</i> цитолизины (II группа).....	91
3.3.2. Низкомолекулярные <i>Radianthus</i> цитолизины (I группа).....	96
3.3.3. Высокомолекулярные <i>Oulactis</i> цитолизины (II группа).....	104
3.3.4. Высокомолекулярный <i>Metridium</i> цитолизин (IV группа).....	107
3.4. Физико-химические свойства, липидная специфичность и биологическая активность цитолизиннов актиний.....	108
3.4.1. Высокомолекулярные <i>Radianthus</i> цитолизины.....	108
3.4.2. Низкомолекулярные <i>Radianthus</i> цитолизины RmI и RmII.....	118
3.4.3. Высокомолекулярные <i>Oulactis</i> цитолизины.....	120
3.4.4. Высокомолекулярный <i>Metridium</i> цитолизин.....	122
3.5. Исследование мембранолитического действия цитолизиннов на модельные мембраны.....	125
3.5.1. Влияние <i>Radianthus</i> цитолизина RTX-A и <i>Metridium</i> цитолизина на проницаемость липосом.....	125
3.5.2. Порообразующее действие <i>Radianthus</i> , <i>Oulactis</i> и <i>Metridium</i> цитолизиннов на бислойные липидные мембраны (БЛМ).....	139
3.5.2.1. Высокомолекулярные <i>Radianthus</i> цитолизины.....	139
3.5.2.2. Высокомолекулярные <i>Oulactis</i> цитолизины.....	157
3.5.2.3. Низкомолекулярный <i>Radianthus</i> цитолизин RmII.....	159
3.5.2.4. Метридиолизин из <i>Metridium senile</i> .....	161
3.6. Исследование мембранолитического действия цитолизиннов на биологические мембраны.....	166

3.6.1. Действие цитолизинов II-й, I-й и IV-й групп на эритроциты млекопитающих.....	166
3.6.2. Действие <i>Radianthus</i> цитолизина RTX-A на яйцеклетки морского ежа <i>Strongylocentrotus intermedius</i> .....	171
3.6.3. Изучение проводимости изолированного фрагмента эритроцитарной мембраны, индуцированной цитолизинотоксичностью RTX-A.....	173
3.6.4. Влияние цитолизина RTX-S II на развитие ооцитов морского ежа <i>Strongylocentrotus intermedius</i> .....	177
3.7. Исследование липидной специфичности и липид-белкового взаимодействия <i>Radianthus</i> цитолизинотоксичности методом дифференциальной сканирующей микрокалориметрии.....	178
3.8. Установление первичной структуры <i>Radianthus</i> и <i>Oulactis</i> цитолизинотоксичности.....	193
3.8.1. Определение частичной аминокислотной последовательности <i>Oulactis</i> цитолизинотоксичности Or-A и Or-G и <i>Radianthus</i> цитолизинотоксичности RTX-A, RTX-S II и RmII методами структурной химии белка.....	193
3.8.2. Установление полной аминокислотной последовательности Or-A и Or-G.....	196
3.8.3. Установление полной аминокислотной последовательности RTX-A.....	203
3.8.4. Установление полной аминокислотной последовательности RTX-S II.....	207
3.9. Исследование вторичной структуры и конформационной стабильности актинопорина RTX-S II.....	211
3.9.1. Пространственная организация нативного актинопорина RTX-S II.....	212
3.9.2. Влияние различных факторов на конформацию актинопорина RTX-S II.....	213
3.9.3. Исследование влияния температуры, pH среды и ионной силы раствора на гемолитическую активность RTX-S II.....	224
3.10. Анализ структурно-функциональных взаимосвязей <i>Radianthus</i> и <i>Oulactis</i> актинопоринотоксичности.....	227
3.11. <i>Radianthus</i> актинопоринотоксичности как инструмент количественного определения сфингомиелина в биологических жидкостях и тканях.....	239
3.12. Заключение.....	240
<b>4. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....</b>	<b>241</b>
<b>5. ВЫВОДЫ.....</b>	<b>263</b>
<b>6. СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....</b>	<b>267</b>