

На правах рукописи



Мизгина Татьяна Олеговна

Структурные и функциональные характеристики лектинов гемолимфы двустворчатого моллюска *Glycymeris yessoensis*

1.4.9 – Биоорганическая химия

Автореферат
диссертации на соискание ученой
степени кандидата химических наук

Владивосток – 2023

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Тихоокеанском институте биоорганической химии им. Г.Б. Елякова Дальневосточного отделения Российской академии наук и Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Дальневосточный федеральный университет»

Научные руководители: кандидат химических наук, доцент
Чикаловец Ирина Владимировна

кандидат биологических наук
Черников Олег Викторович

Официальные оппоненты: **Бовин Николай Владимирович**
доктор химических наук, профессор,
Институт биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А.
Овчинникова РАН, заведующий отделом
химической биологии гликанов и липидов

Веремейчик Галина Николаевна
кандидат биологических наук,
Федеральный научный центр
биоразнообразия наземной биоты Восточной
Азии ДВО РАН, старший научный сотрудник
лаборатории биоинженерии

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное
научное учреждение «Научно-
исследовательский институт биомедицинской
химии имени В.Н. Ореховича» (ИБМХ), г.
Москва

Защита состоится «18» мая 2023 г. в 10 часов на заседании диссертационного совета 24.1.213.01 при Тихоокеанском институте биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН по адресу: 690022, г. Владивосток, проспект 100 лет Владивостоку, 159, ТИБОХ ДВО РАН. Факс: (423) 231-40-50, e-mail: dissovet@piboc.dvo.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Тихоокеанского института биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН (г. Владивосток, проспект 100-летия Владивостока, 159/2, ТИБОХ ДВО РАН, www.piboc.dvo.ru).

Автореферат разослан

«___» _____ 2023 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
к.б.н.

Чингизова Е.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Двустворчатые моллюски представляют собой уязвимую к различным загрязняющим веществам и водным микроорганизмам группу морской фауны, так как являются малоподвижными фильтрующими организмами.

В связи с отсутствием у беспозвоночных иммунитета на основе антител, защита моллюсков от патогенной инфекции зависит исключительно от различных патоген-распознающих рецепторов (ПРР), таких как лектины, цитокины, синтазы оксида азота и антимикробные пептиды. Именно они составляют врожденную иммунную систему моллюсков. Среди них лектины играют решающую роль за счет способности к высокоспецифичному распознаванию различных углеводных структур, находящихся на клеточной поверхности микроорганизмов – патоген-ассоциированных молекулярных паттернов (ПАМП), группы молекул, характерных для патогенов, но отсутствующих в организме хозяина. Узнавание маркеров патогенности и стимулирование запуска серии защитных иммунных реакций является основой функционирования врожденного иммунитета. Благодаря разнообразной углеводной специфичности лектинов, присутствующих в организме одного животного, становится возможным выявление широкого спектра патогенов. Лектины принадлежат к гетерогенной группе моно- и олигомерных белков, различающихся по нескольким характеристикам, таким как структура, размер, молекулярная организация и особенно углеводная специфичность. Перечисленные свойства определяют наличие у лектинов различных видов биологической активности, в том числе противоопухолевой, антифунгальной, антибактериальной и противовирусной.

Систематическое сравнительное исследование разнообразных лектинов необходимо для лучшего понимания их функциональной дифференциации. Взаимодействие гликанов с лектинами часто лежит в основе различных терапевтических стратегий. Лектины используются в биотехнологии и диагностике: они способны выявлять тонкие различия в гликофенотипах тканей, что дает важную информацию для персонализированной медицины.

Таким образом, благодаря большому структурному разнообразию и многофункциональной роли лектины обладают огромным потенциалом для применения в современной биотехнологии и медицине, что делает данную работу, несомненно, *актуальной*.

Цель и задачи исследования. Целью настоящей работы являлось выделение и исследование новых лектинов (GYL, GYL_{man}, GYL-R) из гемолимфы двустворчатого моллюска *Glycymeris yessoensis*. Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Разработать схемы эффективного выделения новых лектинов из гемолимфы двустворчатого моллюска *G. yessoensis*, определить их основные физико-химические свойства и тонкую углеводную специфичность.
2. Изучить структурные характеристики лектинов.
3. Исследовать биологические свойства лектинов в качестве паттерн-распознающих рецепторов.
4. Выяснить роль лектинов в системе врожденного иммунитета двустворчатого моллюска *G. yessoensis*.

Научная новизна и практическая ценность работы. Из гемолимфы двустворчатого моллюска *G. yessoensis* впервые были выделены три лектина: рамнозоспецифичный лектин – GYL-R, специфичный к разветвлённым олигоманнанам – GYL_{man}, и лектин С-типа – GYL, проявляющий аффинность к гликопротеинам, содержащим углеводные цепи муцинового типа. Основные физико-химические свойства, структурные характеристики и функции выделенных лектинов были исследованы с использованием оригинальных методик. Высокоспецифичное взаимодействие с патоген-ассоциированными молекулярными паттернами указывает на их принадлежность к паттерн-распознающим

рецепторам, а способность связываться с микроорганизмами позволяет предположить участие лектинов в защитных реакциях врожденного иммунитета моллюска.

Исследование лектинов морских беспозвоночных важно для понимания их биологической функции, филогенетических взаимосвязей и углевод-зависимых процессов передачи сигналов в клетке. Уникальная углеводная специфичность этих лектинов делает их особенно ценными для использования как в структурном углеводном анализе полисахаридов, так и для изучения микрогетерогенности углеводных компонентов биополимеров. Определение изменения уровней лектинов, как неотъемлемой части системы врожденного иммунитета двустворчатых моллюсков, может служить одним из критериев установления степени загрязненности водной среды. Полученные в ходе работы данные расширяют представления о структуре и функциях лектинов беспозвоночных.

Методология и методы исследования. Теоретическую основу работы составляют научные статьи отечественных и зарубежных авторов, посвященные проблеме поиска, выделения и исследования биологической активности лектинов морских беспозвоночных. Методологическую основу исследования формируют классические методы белковой химии (экстракция, диализ, осаждение, различные варианты электрофореза белков, вестерн-блот), спектроскопические методы (КД-спектроскопия, масс-спектрометрия), хроматографические методы (ионообменная, гель-проникающая, аффинная хроматографии), методы молекулярного клонирования и секвенирования, иммунологические методы (иммуоферментный анализ, твердофазный лектин-ферментный анализ), гемагглютинация, гликоэзрей, а также методы биоинформатики (поиск и выравнивание белковых последовательностей с использованием доступных баз данных, построение теоретической модели лектина с помощью сервера SWISS-MODEL и с использованием программы MOE 2020.09, статистический анализ). Расчет статистически достоверных данных основан на использовании программы Microsoft Excel и t-критерия Стьюдента.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Из гемолимфы двустворчатого моллюска *G. yessoensis* выделено три новых лектина, относящиеся к разным семействам, охарактеризованы их основные физико-химические свойства и установлена тонкая углеводная специфичность.
2. Обнаружено существование мультигенного семейства GYL-подобных лектинов у двустворчатого моллюска *G. yessoensis*.
3. Выделенные лектины являются паттерн-распознающими рецепторами и компонентами системы врожденного иммунитета моллюска *G. yessoensis*.

Апробация работы. Материалы диссертации были представлены на III и V Всероссийских конференциях «Фундаментальная гликобиология» (Владивосток, 2016; Гатчина, 2021); 7-ом международном симпозиуме «Химия и химическое образование» (Владивосток, 2017); I и II Объединенных научных форумах «Съезд биохимиков России / Российский симпозиум «Белки и Пептиды» (Сочи, 2017, 2019); XVI и XVIII Всероссийских молодежных школах-конференциях по актуальным проблемам химии и биологии (Владивосток, 2017, 2021); XX Зимней молодежной школе ПИЯФ по биофизике и молекулярной биологии (Гатчина, 2019); 26-ой международной конференции «Pacific Congress on Marine Science and Technology (PACON-2019)» (Владивосток, 2019); Научной конференции, посвященной 55-летию ТИБОХ ДВО РАН и 90-летию со дня рождения его основателя академика Г.Б. Елякова (Владивосток, 2019); XVII Всероссийской молодежной онлайн школе-конференции по актуальным проблемам химии и биологии (Владивосток, 2020).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 4 статьи в журналах, индексируемых в Scopus и Web of Science и рекомендованных ВАК, 11 тезисов докладов в материалах всероссийских и международных конференций.

Личный вклад автора. Все экспериментальные данные, представленные в работе, получены лично автором или студентами под его руководством и при его

непосредственном участии, за исключением инструментальной части N-концевого секвенирования GYL по Эдману, масс-спектрометрии пептидных фрагментов GYL и GYL-R, исследования гликан-связывающей активности с помощью гликоэреза, проведенных на базе Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук. Автор проводил первичный сбор материала, его обработку, планирование исследований и постановку экспериментов, документирование результатов и их анализ, непосредственно участвовал в написании научных публикаций, лично представлял результаты по теме исследования на конференциях.

Степень достоверности результатов. Результаты исследования получены на современном оборудовании с использованием стандартизированных методик и программ.

Структура диссертации. Диссертационная работа содержит следующие разделы: Введение, Литературный обзор, Материалы и методы, Результаты и их обсуждение, Выводы и Список литературы. Список литературы включает 192 источника. Диссертация изложена на 145 страницах и содержит 33 рисунка и 11 таблиц.

Благодарности. Автор выражает благодарность своим научным руководителям к.х.н. Чикаловец Ирине Владимировне и к.б.н. Черникову Олегу Викторовичу за помощь в выполнении диссертационной работы. Автор также выражает благодарность д.б.н. Недашковской О.И. за помощь в выполнении некоторых микробиологических экспериментов, д.х.н. Дмитренку П.С. и н.с. Ким Н.Ю. за получение и помощь в обработке спектральных данных, к.м.н. Исаевой М.П. за помощь в проведении отдельных экспериментов в области молекулярной биологии и генной инженерии, к.ф.-м.н. Лихацкой Г.Н. за помощь в проведении отдельных экспериментов в области биоинформатики, к.х.н. Кокоулину М.С. за помощь в проведении отдельных экспериментов в области химии углеводов, к.х.н. Рогожину Е.А. за помощь в проведении N-концевого секвенирования по Эдману, к.х.н. Шиловой Н.В. за помощь в исследовании гликан-связывающей активности лектинов методом гликоэреза. Автор выражает искреннюю признательность всем сотрудникам лаборатории химии неинфекционного иммунитета ТИБОХ ДВО РАН за всестороннюю поддержку и обсуждение полученных результатов в ходе выполнения работы.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1 Выделение лектинов из гемолимфы двустворчатого моллюска *G. yessoensis*

1.1 Поиск новых лектинов гемолимфы двустворчатых моллюсков

Первичный скрининг наличия активности лектинов в гемолимфе был проведен среди 7 наиболее распространенных и доступных двустворчатых моллюсков, обитающих в прибрежной зоне бухты Троицы Японского моря. Исследование проводили классическим методом определения лектинной активности – реакцией прямой гемагглютинации (РПГА). Наибольший титр ГА обнаружен в гемолимфе широко распространенного тихоокеанского вида двустворчатых моллюсков *G. yessoensis*, поэтому данный вид был выбран для дальнейших исследований.

Методом ингибирования РПГА показано, что L-Fuc, D-Man, D-Glc, L-Rha, Lac, Fet, dsFet, OVA, тиреоглобулин, гликопротеин муцинового типа (PSM) и дрожжевой α -D-маннан из *Saccharomyces cerevisiae* ингибируют активность лектинов гемолимфы. Наиболее эффективными ингибиторами оказались дрожжевой маннан, PSM и рамноза.

Известно, что маннан-специфичные лектины проявляют потенциальные противовирусные свойства, взаимодействуя с гликанами вирусной оболочки, что предотвращает проникновение вируса в клетки-хозяина. Муцин-специфичные лектины демонстрируют противоопухолевую, иммуномодулирующую и антибактериальную активности. Рамнозосвязывающие лектины (RBL) проявляют антипролиферативный эффект за счет специфического распознавания глоботриозы (Gb3) – трисахарида, экспрессированного на поверхности клеток Raji лимфомы Беркетта. Такие свойства делает эти лектины перспективными объектами для биомедицинских исследований.

1.2 Разработка методов выделения и очистки лектинов из гемолимфы двустворчатого моллюска *G. yessoensis*

Наиболее эффективным и широко распространенным методом выделения лектинов является аффинная хроматография. В качестве лигандов для синтеза нескольких аффинных сорбентов были выбраны лактоза, PSM и α -D-маннан.

α -D-Маннан выделен нами из культуры дрожжей *S. cerevisiae* для синтеза аффинного сорбента маннан-сефарозы CL-4В методом активации дивинилсульфоном. Структура маннана установлена методами ГЖХ, ^1H - и ^{13}C -ЯМР спектроскопии. Показано, что полученный маннан представляет собой высоко разветвленный гомополисахарид, построенный из α -1,6, α -1,2 и α -1,3-связанных остатков D-Man и соответствует структуре известного дрожжевого маннана из *S. cerevisiae*.

Синтез аффинного сорбента PSM-сефарозы CL-4В проводили по методике производителя, иммобилизуя гликопротеин на BrCN активированной сефарозе CL-4В.

При синтезе аффинного сорбента для выделения рамнозоспецифичного лектина был выбран дисахарид лактоза, которую иммобилизовали на сефарозу CL-4В методом активации дивинилсульфоном. Выбор объясняется одинаковой ориентацией гидроксильной группы при C2 и C4 в структуре пиранозного кольца у L-рамнозы, D-галактозы и лактозы.

1.2.1 Выделение рамнозоспецифичного лектина (GYL-R)

Рамнозоспецифичный лектин из гемолимфы *G. yessoensis* выделяли методом аффинной хроматографии в объеме на лактозил-сефарозе, лектин элюировали буфером, содержащим рамнозу. Итоговую очистку лектина проводили методом гель-фильтрации на колонке Superdex 75 Increase 10/300. Полученный лектин проявлял высокую гемагглютинирующую активность в концентрации 0,1 мг/мл (титр ГА 1:2048). Анализ не связанной с лактозил-сефарозой фракции показал снижение гемагглютинирующей активности почти на 60 % и наличие гемагглютининов, специфичных к L-Fuc, D-Man, D-Glc, Fet, dsFet, OVA, тиреоглобулину, PSM и α -D-маннану.

1.2.2 Выделение муцин-специфичного лектина (GYL)

Выделение муцин-специфичного лектина проводили методом аффинной хроматографии в объеме, добавляя не связавшуюся с лактозил-сефарозой фракцию к PSM-сефарозе. Элюцию GYL осуществляли глицин-HCl буфером с pH 2,9 с последующей нейтрализацией белковых фракций. Итоговую очистку лектина проводили методом гель-фильтрации на колонке Superdex 75 Increase 10/300 GL. Анализ гемагглютинирующей активности лектина в концентрации 0,1 мг/мл показал, что GYL агглютинирует эритроциты с титром ГА 1:64. Лектинная активность в не связавшейся с PSM-сефарозой фракции существенно снизилась (10 % от исходной активности), ингибирование РПГА показало наличие гемагглютининов, специфичных к D-Man и α -D-маннану из *S. cerevisiae*.

1.2.3 Выделение маннан-специфичного лектина (GYLman)

Новая схема выделения GYLman в одну стадию на аффинном сорбенте маннан-сефарозе с последующей очисткой лектина методом гель-фильтрации на колонке Superose 6 Increase 10/300 GL позволила увеличить выход лектина на 60 %. Элюцию белка с аффинного сорбента проводили буфером, содержащим маннозу. Анализ гемагглютинирующей активности показал, что GYLman проявляет высокую активность (титр ГА 1:256) в концентрации 0,1 мг/мл.

2 Изучение физико-химических свойств лектинов

2.1 Гомогенность, молекулярная масса и субъединичный состав

Определение молекулярной массы и гомогенности выделенных лектинов проводили методом электрофореза в 15 % ДСН-ПААГ в восстанавливающих (в присутствии дитиотреитола, ДТТ) и невосстанавливающих условиях.

Кажущаяся молекулярная масса лектина GYL-R составила 27 кДа в невосстанавливающих и 30–33 кДа в восстанавливающих условиях. Скорее всего, лектин представляет собой мономер и, являясь представителем рамнозоспецифичных лектинов, имеет в своей структуре четыре внутренних дисульфидных связи. В восстанавливающих условиях мономер претерпевает конформационные изменения вследствие разрыва дисульфидных мостиков и приобретает более рыхлую конфигурацию, что вызывает замедление миграции и сдвиг кажущейся молекулярной массы.

GYL состоит из двух мономеров, соединенных дисульфидной связью, с кажущейся молекулярной массой 18 кДа.

GYLman представляет собой высокомолекулярный олигомер с кажущейся молекулярной массой в невосстанавливающих условиях более 250 кДа. В восстанавливающих условиях белок распадается на субъединицы, молекулярная масса которых около 70 кДа.

Определение точной молекулярной массы белков проводили методом МАЛДИ-ВП масс-спектрометрии. Для двухсубъединичной молекулы GYL она составила 36053,50 Да (однозарядный ион) и 18118,50 Да (двухзарядный ион). Молекулярная масса субъединицы GYLman, определенная в восстанавливающих условиях, равна $m/z = 69189,60$ Да, что соответствует однозарядному иону, $m/z = 34657,05$ Да и $m/z = 8584,73$ Да, что соответствует двухзарядному и восьмизарядному иону соответственно. Определенная молекулярная масса GYL-R составила 30415,12 Да. Анализ проводили в линейном режиме с использованием цитохрома С (12361,55 Да) и миоглобина (16952,55 Да) в качестве внешних стандартов. Полученные результаты хорошо согласуются с данными ДСН-ПААГ-электрофореза и свидетельствуют о гомогенности выделенных лектинов.

2.2 Зависимость активности GYL, GYLman и GYL-R от температуры, pH и ионов кальция

Основные физико-химические свойства выделенных лектинов, определенные методами РПГА (табл. 1).

Таблица 1 - Сравнительные характеристики GYL, GYLman и GYL-R

Характеристика	GYL	GYLman	GYL-R
Зависимость активности от температуры	Активен в интервале от 4 до 40 °С, температура инактивации 45 °С	Активен в интервале от 4 до 90 °С, температура инактивации 95 °С	Активен в интервале от 4 до 100 °С, температура инактивации 105 °С
Зависимость активности от pH среды	Максимально активен в интервале pH 8-10, pH инактивации 3	Максимально активен в интервале pH 7-9, pH инактивации 4	Максимально активен в интервале pH 4-9, pH инактивации не обнаружена
Зависимость активности от присутствия ионов Ca ²⁺	Активен в присутствии 10 мМ	Активен в присутствии 10 мМ	Не требуются ионы Ca ²⁺

Известно, что двустворчатые моллюски имеют незамкнутую кровеносную систему, гемолимфа находится в постоянном контакте с экстрапаллиальной жидкостью (заключенной между мантией и раковинной) и, опосредованно, с окружающей средой. Полагают, что у двустворчатых моллюсков физиологические процессы происходят, в основном, в гемолимфе. В связи с этим, вероятно, физико-химические характеристики

выделенных нами из гемолимфы лектинов (GYLman, GYL, GYL-R), а именно зависимость их активности от pH-, Ca²⁺- и температуры, обусловлены условиями обитания.

3 Углеводная специфичность лектинов

3.1 Углеводная специфичность GYLman, GYL и GYL-R, установленная методом твердофазного лектин-ферментного анализа (ТЛФА)

Важнейшей характеристикой лектинов является их углеводная специфичность, для определения которой были получены конъюгаты лектинов с ферментной меткой – пероксидазой хрена (GYL-ПХ, GYLman-ПХ, GYL-R-ПХ) и разработаны методы ТЛФА. В качестве ингибиторов лектинной активности использовали набор моно-, олиго- и полисахаридов, гликопротеинов и липополисахаридов (табл. 2).

Таблица 2 – Углеводная специфичность GYLman, GYL и GYL-R, определенная методом ТЛФА

№	Ингибитор	IC ₅₀ мг/мл		
		GYLman	GYL	GYL-R
1	D-галактоза	н.и.	н.и.	0,156
2	L-рамноза	н.и.	н.и.	0,002
3	Рафиноза	н.и.	н.и.	0,625
4	Лактоза	н.и.	н.и.	0,313
5	L-фукоза	н.и.	0,17	н.и.
6	α-D-Man-(1→2)-Man	0,500	н.и.	н.и.
7	α-D-Man-(1→2)-α-Man-(1→2)-Man	0,031	н.и.	н.и.
8	α-D-Man-(1→2)-[Man-(1→2)] ₃ -Man	0,125	н.и.	н.и.
9	α-D-Man-(1→2)-[Man-(1→2)] ₆ -Man	0,063	н.и.	н.и.
10	ЛПС <i>E. coli</i> O111:B4	0,063	н.и.	н.и.
11	α-D-Маннан <i>S. cerevisiae</i> (SIGMA)	0,016	н.и.	н.и.
12	α-D-Маннан <i>S. cerevisiae</i> (данная работа)	0,016	н.и.	н.и.
13	α-D-Маннан <i>C. albicans</i> (штамм КММ 455)	0,031	н.и.	н.и.
14	PSM (муцин из желудка свиньи)	0,016	0,033	0,016
15	dsPSM	0,016	0,008	0,063
16	OVA (яичный овальбумин)	н.и.	0,025	н.и.
17	Fet	н.и.	0,008	н.и.
18	dsFet	н.и.	0,004	н.и.
19	Тиреоглобулин	н.и.	0,004	н.и.

Примечание – IC₅₀ – концентрация, необходимая для 50 % ингибирования связывания; н.и. – не ингибировали. Не ингибировали при концентрации 10 мг/мл: N-ацетил-D-галактозамин, D-глюкоза, N-ацетил-D-глюкозамин, D-Талоза, Сахароза, Мелибиоза, N-гликолилнейраминовая кислота, N-ацетилнейраминовая кислота, D-манноза, N-ацетил-D-маннозамин, тетраманнозид α-Man-(1→2)-[Man-(1→2)]₂-Man, гексаманнозид α-Man-(1→2)-[Man-(1→2)]₄-Man, гептаманнозид α-Man-(1→2)-[Man-(1→2)]₅-Man, β-p-N-ПН-галактоза, Gal-1-3GalNAc, α-Me-галактоза, Овомукоид (OVO).

Как видно из таблицы 2, большинство моно- и олигосахаридов не ингибировали активность GYLman. Наибольшую активность лектин проявил к высокоразветвленным дрожжевым маннанам с α-1,6-связанным маннопиранозильным остовом и короткими α-1,2-связанными маннопиранозильными боковыми цепями, что характерно для маннан-

специфичных лектинов морских беспозвоночных. Необходимо отметить возрастающую ингибирующую способность лектина в ряду: дисахарид, трисахарид, пентасахарид.

Наилучшими лигандами для GYL являются, главным образом, гликопротеины, содержащие цепи муцинового типа, и единственный моносахарид – фукоза. Подобное проявление углеводной специфичности характерно для муцин-специфичных лектинов, которые, в свою очередь, проявляют иммуномодулирующие и противоопухолевые свойства.

Лучшими ингибиторами для GYL-R являются L-Rha, D-Gal и ее производные. Ориентация гидроксильных групп L-Rha в положениях C2 и C4 совпадает с ориентацией гидроксильных групп D-Gal, поэтому для взаимодействия углевод-связывающего сайта лектина с этими сахарами важны OH-группы именно в этом положении.

3.2 Углеводная специфичность GYL и GYL-R, установленная с помощью гликоэзрей

Гликановый микроэзрей – мультиантигенный микрочип, с иммобилизованными на его поверхности природными и синтетическими гликанами, анализ связывания с которыми дает возможность устанавливать аффинность лектинов к широкому спектру углеводных структур. Для определения тонкой углеводной специфичности исследованных лектинов были использованы 378 олигосахаридов, обнаруженных в N-, O-гликанах и гликофинголипидах тканей млекопитающих, а также 229 полисахаридов бактерий. В таблицах 3 и 4 представлены углеводные цепи, к которым GYL и GYL-R проявляли наибольшую специфичность.

Таблица 3 – Лиганды GYL-R

Структура лиганда	Короткое или тривиальное название	Интенсивность связывания (RFU)
L-Rha α -sp3	L-Rha-C3	64931
Galα1-4(Fucα1-2)Galβ1-4GlcNAcβ-sp3	Gal α 4'(Fuc α 2')LN-C3	47673
6-O-Bn-Gal α 1-4(6-O-Bn)GlcNAc β -sp3	6,6'-Bn $_2$ - α LN-C3	40421
Galα1-4Galβ1-4GlcNAcβ-sp3	Gal α 4'LN-C3	24853
Galα1-4GlcNAcβ-sp3	Gal α 4GlcNAc β -C3	17157
Galα1-4GalNAcα-sp3	Gal α 4GalNAc α -C3	12517
6-O-Bn-Gal β 1-4GlcNAc β -sp2	6'-BnLN-C2	4917
Galα1-4Galβ-sp3	Gal α 4Gal β -C3	2404
Gal β 1-4GlcNAc β 1-6Gal β 1-4GlcNAc β -sp2	LN6'LN-C2	1829
6-O-Su-Gal β 1-4GlcNAc β -sp2	6'-suLN-C2	1686
Galα1-4Galβ1-4Glcβ-sp2	Gal α 4'Lac-C2, GbOse3	1245
Gal α 1-3GalNAc α -sp3	Gal α 3GalNAc α -C3	1061
Gal β 1-4GlcNAc β -sp3	LN-C3	735
Gal α 1-3GlcNAc β -sp3	Gal α 3GlcNAc β -C3	447

Примечание – Интенсивность связывания в относительных единицах флуоресценции (RFU, среднее значение). Исследуемые лиганды приведены в порядке убывания их интенсивности связывания.

GYL-R высокоспецифично связывал моносахарид L-Rha и гликаны, содержащие остаток α -Gal в терминальном положении (табл. 3). Среди олигосахаридов наиболее сильное связывание GYL-R обнаружено при взаимодействии с разветвленным тетрасахаридом **Gal α 1-4(Fuc α 1-2)Gal β 1-4GlcNAc β -sp3**. Избирательное высоко аффинное связывание с этим гликаном по сравнению с другими олигосахаридами с α -Gal в терминальном положении достигается также присутствием остатка фукозы на невозстанавливаемом конце. Та же высокая аффинность связывания наблюдается при наличии у соседних сахаров объёмных заместителей, таких как Bn (бензил), NAc (N-ацетил). Например, связывание с **Gal α 1-4Gal β -sp3** в 6 раз слабее, чем с **Gal α 1-4GalNAc α -sp3**. Примечательно, что GYL-R связывался с Gb3 в 50 раз слабее, чем с L-Rha.

Таблица 4 – Лиганды GYL

Структура лиганда	Короткое или тривиальное название	Интенсивность связывания (RFU)
GalNAc α 1-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β -sp3	GalNAc α 3`Le ^x -C3	9114
4-O-Su-Gal β 1-4GlcNAc β -sp3	4`-suLN-C3	5774
4,6-O-Su2-Gal β 1-4GlcNAc β -sp2	4`,6`-su2LN-C2	3338
GalNAc α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β 1-4GlcNAc β -sp3	A (type 2)-C3	2080
Galβ1-4GlcNAcβ-sp3	LN-C3	929
Galβ1-4(Fucα1-3)GlcNAcβ-sp3	Le ^x -C3	742
GalNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β -sp3	GalNAc β 3`LN-C3	615

Примечание – Интенсивность связывания в относительных единицах флуоресценции (RFU, среднее значение). Исследуемые лиганды приведены в порядке убывания их интенсивности связывания.

Определение тонкой углеводной специфичности GYL показало, что только 4 олигосахарида распознаются с высокой аффинностью (табл. 4). Наиболее сильное связывание было с тетрасахаридом GalNAc α 1-3Gal β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc β -sp3, затем специфичность взаимодействия постепенно уменьшалась. Однако все 4 гликана содержат один и тот же общий мотив – Gal β 1-4GlcNAc β , выделенный в таблице жирным шрифтом. Заместители галактозы значительно увеличивают силу взаимодействия лектина с олигосахаридами. Так, добавление сульфатной группы в положение 4 к дисахариду (4-O-Su-Gal β 1-4GlcNAc β -sp3) приводит к 6-кратному увеличению связывания, но дополнительное сульфатирование в положении 6 его заметно снижает. Моносахарид GalNAc, присоединенный к трисахариду Le^x (GalNAc α 3`Le^x-C3), приводит к 12-кратному увеличению связывания. В то же время добавление этого моносахарида к эпитопу Gal β 1-4GlcNAc β , не содержащему Fuc (GalNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β -sp3), приводит к значительной потере активности. Следует отметить, что положение Fuc также имеет значение. Так, в наиболее специфичном тетрасахариде фукозилирован концевой фрагмент дисахарида Gal β 1-4GlcNAc β (Lewis x). Если точкой разветвления является Gal, сила связи падает почти в 4 раза (GalNAc α 1-3(Fuc α 1-2)Gal β 1-4GlcNAc β -sp3).

Примечательно, что ни дисахарид лактозамина как таковой, без заместителей, ни наиболее распространенный в природе разветвленный олиголактозамин, содержащий триманнозильное ядро, не являются предпочтительными в массиве гликанов. Принимая во внимание все указанные особенности, можно реконструировать гликотоп для GYL как «Gal β 1-4GlcNAc β », который обязательно содержит дополнительный контактирующий с лектином фрагмент, такой как GalNAc, или сульфатная группа или метильная группа остатков Fuc. Лектин не проявляет строгой специфичности к одному типу углеводов. Это может быть связано с универсальностью и высокой адаптируемостью GYL к окружающей среде.

4 Структурные характеристики лектинов

4.1 Изучение аминокислотной последовательности лектинов

Секвенирование пептидов GYL и GYL-R *de novo* включало идентификацию пептидов методом тандемной масс-спектрометрии с ионизацией наноэлектрораспылением (nano-ESI MS/MS).

В таблице 5 представлены группы схожих пептидов GYL-R, содержащих три консервативных пептидных мотива, характерных для рамнозоспецифичных лектинов - (AN)YGR(TD)- (YGR-мотив) и -DPCXGT(Y)KY(L)- (DPC и KYL-мотивы), которые расположены в N- и C-концевой области каждого домена соответственно, и сохраняются почти во всех углевод-распознающих доменах (CRD) RBL.

Таблица 5 – Пептиды GYL-R, установленные методом nano-ESI MS/MS

Пептиды GYL-R	m/z	Заряд	Масса, Да
LEYASYGR	479,7357	2	957,4556
(K)YLSVYVYTCCK	566,7903	2	1131,5635
LEAVNSVFGDPCVGTGTYK	928,4499	2	1854,8821
EDTLVCELNTDLLSCEER	732,6665	3	2194,9722

Полученные результаты подтверждают наши данные о принадлежности выделенного лектина к RBL и свидетельствуют о перспективности полученных пептидов для дальнейшего установления аминокислотной последовательности GYL-R.

Характерные для лектинов С-типа (CTL) мотивы: EPN (Glu-Pro-Asn) и WND (Trp-Asn-Asp), были обнаружены в группе схожих пептидов GYL (табл. 6).

Таблица 6 – Пептиды GYL, установленные методом nano-ESI MS/MS

Пептиды GYL	m/z	Заряд	Масса, Да
TTASQLENASKNHYLNGTDSAVEGQFR	1042,8264	3	3125,4326
CFSYVDWMSAEEPNDRFDADCLHLR	1045,1152	3	3132,3164
KWNDLSCSK	505,2257	2	1008,4335
LPFFFLCEKPTETCSDK	1060,0051	2	2117,98
MTQAAAEEYCTTQDGHLAQPTSEGLNTFLK	1110,177	3	3327,5022

Фрагменты этих пептидов, содержащие консервативные для CTL мотивы, были взяты за основу праймеров при определении нуклеотидной последовательности кДНК и соответствующей ей аминокислотной последовательности GYL.

Ферментативный гидролиз и идентификация пептидов GYLman методом nano-ESI MS/MS не увенчались успехом. Для получения данных об аминокислотном составе проведен кислотный гидролиз GYLman и установлено, что глицин, аспаргиновая и глутаминовая кислоты являются преобладающими. Молекула белка гидрофильна и имеет небольшой отрицательный заряд. Процентное содержание ароматических аминокислот составляет всего 3,6 %, что могло отразиться на низких показателях оптической плотности при длине волны 280 нм.

4.2 Клонирование кДНК и установление аминокислотной последовательности GYL

Для определения первичной структуры GYL клонировали ПЦР-фрагменты, полученные с использованием подхода быстрого определения 3'- и 5'-кДНК-концов (3'- и 5'-RACE) и вырожденных праймеров, разработанных на основе вышеуказанных пептидов (табл. 6). При проведении 3'-RACE с использованием двух прямых праймеров Lectin_PTSE и Lectin_MMD был получен ПЦР-фрагмент ~ 450 п.н. По данным секвенирования эта последовательность кодирует EPN- и WND-мотивы, стоп-кодон и поли(А)-тракт. Далее на основании этой последовательности разработали ген-специфичные праймеры, GYL_R1_Cap и GYL_R2_T7 для проведения 5'-RACE. В результате был получен фрагмент размером ~660 п.н., кодирующий 5'-нетранслируемую область (5'-НТО), сигнальный пептид и N-концевой фрагмент зрелого белка. Результирующая последовательность длиной 690 п.н. была собрана из перекрывающихся 3'- и 5'-RACE-фрагментов.

На рисунке 1 показана полноразмерная кДНК (690 п.н.) GYL и выведенная на ее основе аминокислотная последовательность (161 а.о.). кДНК лектина включает 48 н.о. 5'-НТО, 483 н.о. белок-кодирующей части и 159 н.о. 3'-НТО, включая стоп-кодон и поли(А)-тракт. Открытая рамка считывания GYL кодирует белок из 161 а.о., включая типичный N-концевой сигнальный пептид (остатки 1–20) и одиночный CTLD (остатки 24–152) с мотивами EPN (Glu117-Pro118-Asn119) и WND (Trp137-Asn138-Asp139) (рис. 1). Расчетная масса зрелого GYL (остатки 21-161) составляет 16047,69 Да, а теоретическая

Таблица 7 – Характеристика членов мультигенного семейства GYL-подобных лектинов С-типа

Регистрационный номер GenBank	Название	Молекулярная масса зрелого белка, Да	pI	Заряд при pH 7
OP897819	GYL	16046,59	4,6	-10,94
OP897820	GYL-подобный 1	16482,77	5,15	-7,69
OP897821	GYL-подобный 2	16424,74	5,32	-6,69
OP897822	GYL-подобный 3	16862,01	4,39	-14,93
OP897823	GYL-подобный 4	15996,31	4,56	-10,11
OP897824	GYL-подобный 5	16095,44	4,65	-9,11
OP897825	GYL-подобный 6	16081,42	4,65	-9,11
OP897826	GYL-подобный 7	16144,37	4,71	-8,11
OP897827	GYL-подобный 8	16042,21	4,65	-9,10

Общей особенностью изоформ является то, что все зрелые белки содержат один CTLD, предсказанный программой SMART, и включают консервативные мотивы EPN или APN (GYL-подобный 1 и GYL-подобный 2) и WND (рис. 2). Таким образом, установленные изоформы являются лектинами С-типа.

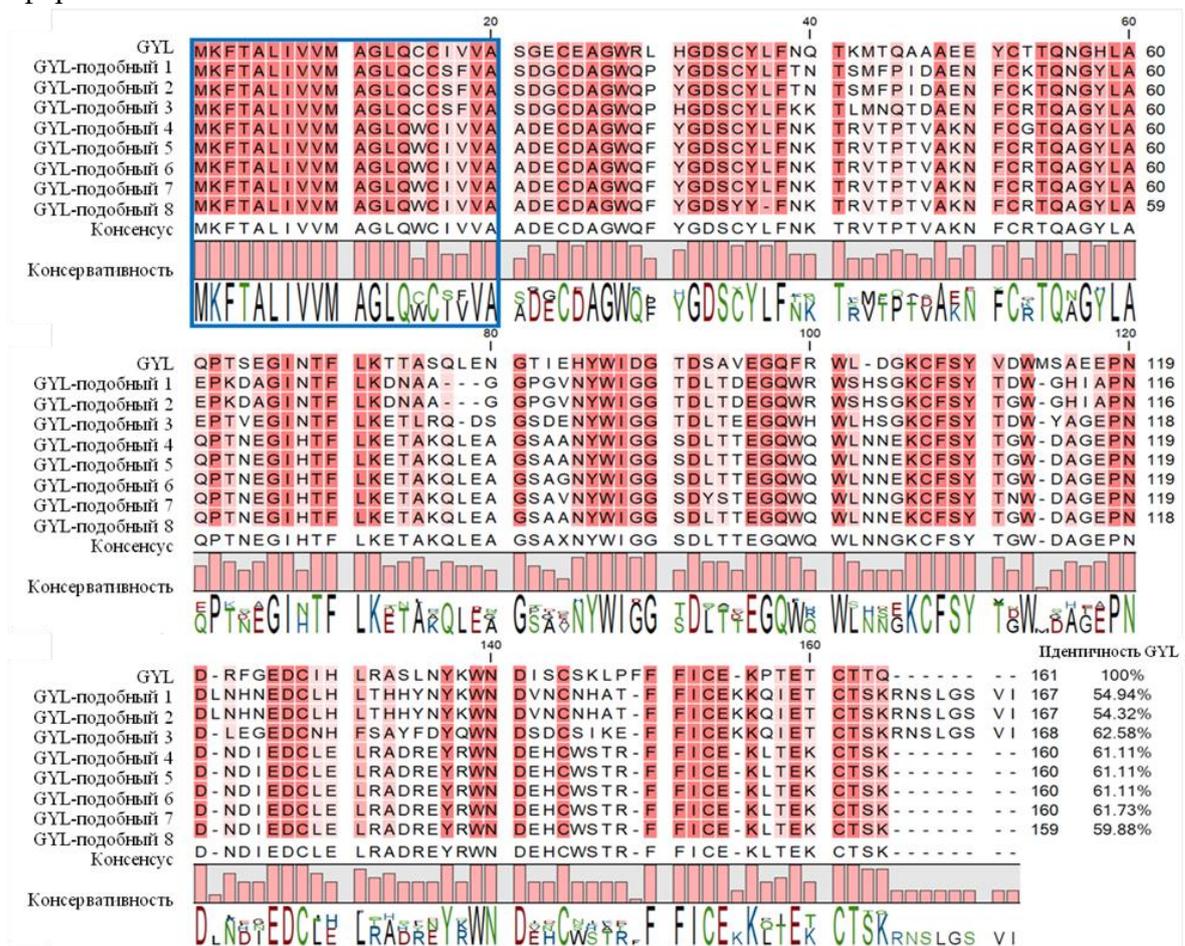


Рисунок 2 – Выравнивание аминокислотных последовательностей членов мультигенного семейства GYL-подобных лектинов С-типа из *G. yessoensis*. Идентичные и консервативные аминокислотные остатки показаны на темном и светло-красном фоне соответственно. Для множественного выравнивания последовательностей использовали Vector NTI Advance™ 11.0 (Invitrogen, США). Визуализация выполнена с помощью программного обеспечения CLC Main Workbench (Qiagen, Дания)

Наличие консервативного сигнального пептида и варибельной последовательности зрелого белка характерно для последовательностей, кодирующих мультигенные семейства. Этот факт прямо указывает на существование мультигенного семейства GYL-подобных лектинов С-типа у двустворчатого моллюска *G. yessoensis*.

4.3 Поиск и анализ гомологов GYL

Поиск гомологичных последовательностей осуществляли на серверах NCBI, UniProt и KEGG, используя алгоритмы BLASTN и BLASTP (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Результаты BLAST-анализа показали значительное сходство последовательности CTLD GYL с CTLD-содержащими белками и лектинами. Например, GYL разделяет 42% сходства с CTLD-содержащим белком из брюхоногого моллюска *Candidula unifasciata* (CAG5124220.1), 41% с CTLD-содержащим белком из двустворчатого моллюска *Mytilus coruscus* (CAC5386982.1), 40,8% с макрофагальным маннозным рецептором 1 из краба-стригуна *Chionoecetes opilio* (KAG0712468.1), 39,5% с перлюциноподобным CTLD-содержащим белком (XP_034305914.1) из *Crassostrea gigas* и 38,17% с CTLD-содержащим белком (CLECT_DC-SIGN_like) из тасманского дьявола *Sarcophilus harrisii* (XP_012396311.1). Характерные признаки суперсемейства лектинов С-типа были идентифицированы в GYL путем множественного выравнивания аминокислотных последовательностей.

4.4 Сигнальный пептид аминокислотной последовательности GYL

Сигнальный пептид (СП) был предсказан по данным последовательности GYL с использованием программы обнаружения СП «SignalP 6.0». Сайт расщепления между аминокислотами Gly22 и Glu23 предсказан с вероятностью 94%.

Установление фактического сайта протеолиза проведено секвенированием по методу Эдмана N-концевого фрагмента GYL. Получены пептидные последовательности длиной 6 и 8 аминокислотных остатков: Ser21-Gly22-Glu23-X24-Glu25-Ala26-Gly27-Trp28 и Glu23-X24-Glu25-Ala26-Gly27-Trp28 (X означает неидентифицированный аминокислотный остаток). Возможно, исследуемый образец представляет собой смесь двух изоформ GYL, отличающихся двумя N-концевыми аминокислотными остатками. Альтернативно, гетерогенность N-конца могла возникнуть из-за неравномерного отщепления СП ввиду наличия двух характерных для расщепления последовательностей (Val18-Val19-Ala20 и Ala20-Ser21-Gly22).

4.5 N-гликозилирование GYL

При анализе последовательности, полученной из кДНК, выявлено, что масса молекулы на 1995 Да меньше, чем установленная с помощью масс-спектрометрии. Принимая во внимание, что секретируемые лектины часто гликозилированы, было высказано предположение, что GYL является гликопротеином. Анализ N-гликанов GYL методом ГЖХ в виде ацетилованных метилгликозидов показал наличие в их составе моносахаридных остатков ксилозы, маннозы, D-глюкозамина, 3-О-метилованной галактозы, 6-деокси-D-глюкозы (D-хинозовы), 3-О-метилованной 6-деокси-D-глюкозы. К настоящему времени ксилоза и метилированные гексозы обнаружены в составе N-гликанов белков у многих видов моллюсков и признаны их типичным признаком. Предсказание сайтов N-гликозилирования аминокислотной последовательности GYL с использованием сервера «NetNGlyc-1.0» показало, что N-гликозилированы Asn19 и Asn60 зрелого белка.

5 Изучение пространственной организации лектинов

5.1 Расчет элементов вторичной структуры лектинов методами КД-спектроскопии

Пространственная организация на уровне вторичной структуры лектинов изучена методом спектроскопии КД. Форма спектров КД в дальней УФ-области (190–260 нм) и расчет содержания элементов вторичной структуры белков с помощью пакета программ CD

Pro, используя метод Sreerama, показали, что GYL-R и GYL относятся к α/β -структурированным белкам. Данные представлены в таблице 8.

Таблица 8 – Содержание элементов вторичной структуры лектинов, %

Образец	α -спираль	β -структура			β изгиб	Неупорядоченная структура (RC)	$\Sigma = \beta_{\text{изгиб}} + \text{RC}$
		A-антипараллельные	P-параллельные	$\Sigma = A+P$			
GYL	17,4	26,18	9,11	35,29	16,57	30,74	47,31
GYL-R	14,0	22,1	12,3	34,4	21,8	29,8	51,6

Спектры КД GYL (рис. 3А) в дальней УФ-области характеризуются положительной полосой с максимумом при 193 нм и отрицательной полосой с максимумом при 208 нм и плечом 220 нм, что говорит о перекрывающихся вкладах элементов α -спирали и β -листа. Смешанная α/β топология является характерной особенностью CTL.

В спектре КД GYL-R (рис. 3Б) в дальней УФ-области наблюдалась отрицательная полоса с максимумом при 220 нм и плечом при 208 нм и положительная полоса с максимумом при 195 нм, что отражало смешанную топологию с более высоким содержанием β -структур. Это является характерным для рамнозоспецифичных лектинов, поскольку общая пространственная организация домена RBL имеет структуру β -сэндвича с двумя антипараллельными слоями, состоящими из пяти β -тяжей каждый, одной длинной α -спирали и одного небольшого спирального элемента.

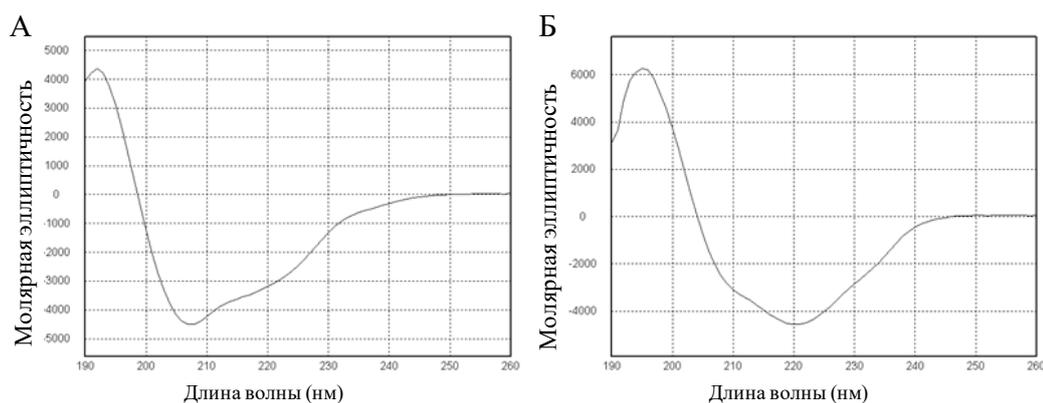


Рисунок 3 – Спектры КД в дальней УФ-области. А – спектр GYL, Б – спектр GYL-R

5.2 Расчет элементов вторичной структуры GYL *in silico*

Аминокислотная последовательность GYL была введена на сервер PredictProtein (<https://www.predictprotein.org/>) для предсказания вторичной структуры лектина. Рассчитанные сервером данные соответствуют полученным с помощью КД. Прогнозируемое содержания α -спиралей 17 % (24 остатка), β -структур 30 % (43 остатка), неупорядоченных структур 52 % (74 остатка).

5.3 Влияние температуры на пространственную организацию GYL и GYL-R

По изменениям в спектре КД в дальнем УФ-диапазоне можно определить, теряет ли белок при высоких температурах всю свою вторичную структуру, либо только ее часть, или просто претерпевает конформационные изменения, затрагивающие фрагменты вторичной структуры. Влияние температуры на пространственную организацию лектинов GYL и GYL-R было изучено методом КД-спектроскопии.

Согласно спектрам КД в области поглощения пептидных связей, нагревание раствора GYL до 30 °C не приводило к конформационным изменениям молекул на уровне вторичной структуры. При дальнейшем повышении температуры от 40 °C и выше, наблюдалось

снижение эллиптичности положительной полосы в области 193 нм, смещение максимума отрицательной полосы от 208 до 204 нм и сглаживание минимума при 220 нм. Это свидетельствует об изменении относительного содержания α -спирали и неупорядоченной структуры в белке в пользу последней. Наблюдаемые изменения в структуре GYL, нагретого до 42 °С, сопровождаются потерей гемагглютинирующей активности. После полного остывания до температуры 25' °С спектр КД GYL приобретает форму близкую к таковой спектра исходного (непрогретого) белка с некоторым снижением эллиптичности полос при 193, 208 и 220 нм. Однако гемагглютинирующая активность GYL не восстанавливается, следовательно, рефолдинг белка не приводит к активации углевод-связывающего сайта лектина.

В случае GYL-R, согласно спектрам КД, постепенное повышение температуры раствора до 50 °С приводило к снижению эллиптичности в области 195 нм, при этом смещение максимумов отрицательной полосы при 208 нм и 220 нм отсутствовало. Заметные изменения в структуре GYL-R проявлялись при нагревании от 60 °С и выше. В спектре лектина с ростом температуры наблюдается формирование четкого минимума при 205 нм (66 °С) и его постепенное смещение в сторону коротких длин волн до 200 нм (90 °С) со значительным увеличением абсолютного значения эллиптичности этой полосы, что свидетельствует о разворачивании вторичной структуры белка. В этих спектрах интенсивность отрицательной полосы при ~220 нм остается относительно высокой, указывая на сохранение некоторого количества β -структуры. Как показано ранее, GYL-R сохранял исходную гемагглютинирующую активность при нагреве до 70 °С, при дальнейшем повышении температуры активность падала на ~75% (95 °С), полная инактивация лектина наблюдалась только при 105 °С. Можно сделать вывод, что нагревание лектина до 95 °С приводит к изменениям его вторичной структуры, но стабилизирующий эффект четырех внутренних дисульфидных связей позволяет сохранить активную конформацию углевод-связывающих сайтов. После охлаждения GYL-R до 25 °С на спектре КД наблюдалось существенное восстановление вторичной структуры лектина. Однако после этой процедуры лектин сохранил только 25% активности, т. е. имел активность на уровне таковой GYL-R, выдержанного при температуре 95 °С. Следовательно, в данных условиях после охлаждения не происходит восстановление нативной пространственной структуры лектина, включая углевод-связывающие сайты.

5.4 *In silico* анализ пространственной структуры GYL

Методами структурной биоинформатики проведен анализ первичной структуры лектина GYL и построена теоретическая модель пространственной структуры с помощью сервера SWISS-MODEL. В качестве прототипа был выбран мышинный антигенподобный белок CD209 (код PDB 4c9f). Идентичность аминокислотной последовательности GYL и прототипа составила 30%, выравнивание аминокислотных последовательностей представлено на рисунке 4.

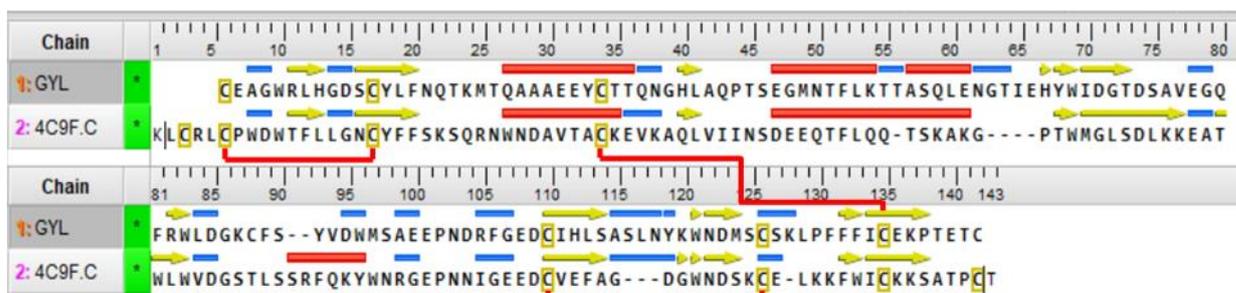


Рисунок 4 – Выравнивание аминокислотных последовательностей 3D-модели GYL и CD209 (код PDB 4c9f). Элементы вторичной структуры: α -спирали показаны красным цветом, желтым цветом β -структура и синим цветом изгибы. Дисульфидные мостики показаны светло-красным

Потенциальная третичная структура CRD в GYL установлена с помощью алгоритма прогнозирования SWISS-MODEL на основе шаблона 4с9f (рис. 5А). 3D-суперпозиция модели и прототипа показала, что величина среднеквадратичного отклонения составляет 0,404 Å для 126 C α -атомов (рис. 5Б).

Качество пространственной структуры GYL оценивали с помощью функции QMEANDisCo на сервере SWISS-MODEL. Показатель QMEANDisCo, близкий к 1,0, указывает на хорошее соответствие между теоретической моделью и экспериментальными структурами того же размера. QMEANDisCo Global для GYL составил $0,61 \pm 0,07$. Стереохимическое качество и надежность структуры проверяли с использованием графика Рамачандрана и Z-показателя, который позволяет учесть зависимость электронной плотности от разрешения типа аминокислотного остатка. Оценка качества модели с помощью карты Рамачандрана показала, что 91,73% аминокислотных остатков расположено в наиболее благоприятной области. Рассчитанный Z-показатель белка составил $-1,69 \pm 0,70$.

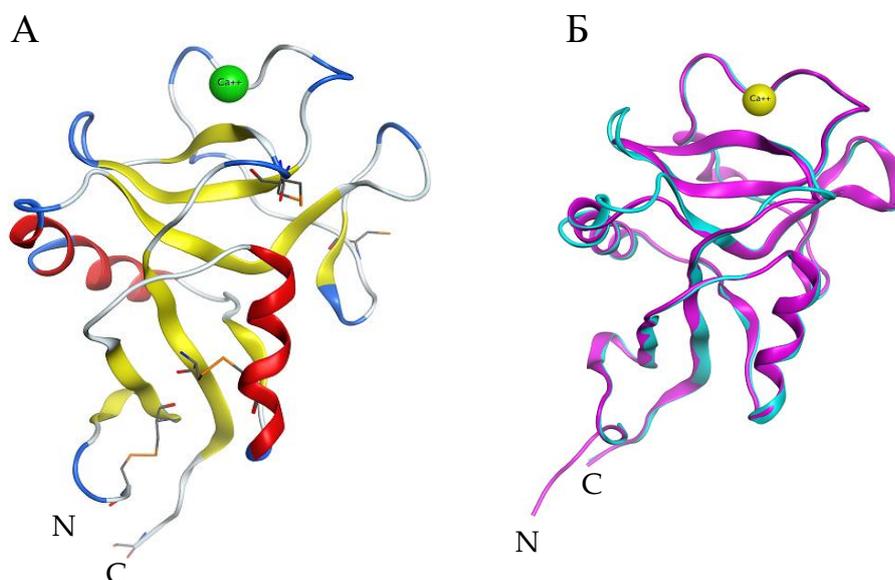


Рисунок 5 – Пространственная структура GYL. А – теоретическая модель пространственной структуры мономера GYL. Структура белка показана в виде ленточной диаграммы, β -структура показана желтым цветом, α -спирали – красным цветом, изгибы – голубым цветом, неупорядоченная структура – серым цветом, ион Ca $^{2+}$ окрашен зеленым цветом. Дисульфидные связи показаны в стержневой форме оранжевым цветом. Б – 3D-суперпозиция модели GYL (синий) и прототипа CD209 (розовый). Рисунок получен с помощью программы Molecular Operating Environment (MOE) 2020.0901

CRD GYL принял типичную длинную структуру с двойной петлей. Нижняя часть домена состоит из двух α -спиралей и четырех β -цепей, а верхняя часть состоит из пяти β -цепей. Ca $^{2+}$ -связывающий центр 2, участвующий в связывании углеводов, располагается в верхней части области длинной петли. Шесть цистеинов образуют три дисульфидных мостика в основаниях петель. Четыре цистеина C1(Cys32)-C4(Cys131) и C2(Cys106)-C3(Cys122), являющиеся наиболее консервативными остатками CRD CTL, образуют два дисульфидных мостика в основаниях петель. Cys32 и Cys131 связывают всю петлю домена, тогда как Cys106 и Cys122 связывают область длинной петли (рис. 6А). Кроме того, два других цистеина C0(Cys4)-C0'(Cys15) образуют третий дисульфидный мостик, стабилизирующий нижнюю часть CRD, именно он специфичен для длинных форм CRD CTL. Свободные Cys86 и Cys132 являются остатками, потенциальными для образования межмолекулярного мостика при димеризации белка.

Содержание элементов вторичной структуры в 3D модели GYL (17,78% α -спираль и 26,67% β -структура) согласуется с данными спектроскопии КД нативного лектина, что свидетельствует о достаточно высоком качестве полученной модели.

Ранее, методами ДСН-ПААГ-электрофореза, гель-фильтрации и МАЛДИ-ВП масс-спектрометрии были получены данные о гомодимерной форме нативного GYL (два мономера, связанных дисульфидной связью). Последовательность белка включает два свободных цистеиновых остатка (Cys86 и Cys138), способных к созданию межмолекулярных связей. Cys86 расположен в области длинной петли, а Cys132 на С-конце. Возможная олигомерная структура белка, построенная с помощью сервера SWISS-MODEL, с образованием межмолекулярного мостика между Cys138 (субъединица 1) и Cys138' (субъединица 2) представлена на рисунке 6.

Олигомеризация лектина приводит к поливалентности, свойству, которое делает возможным перекрестное связывание лигандов и агглютинацию клеток, а также обеспечивает более высокую авидность лектина к кластерным гликанам. Для таких лектинов, как GYL, которые несут один CRD в каждом полипептиде, его свойства дополнительно усиливаются за счет объединения субъединиц в олигомерные формы.

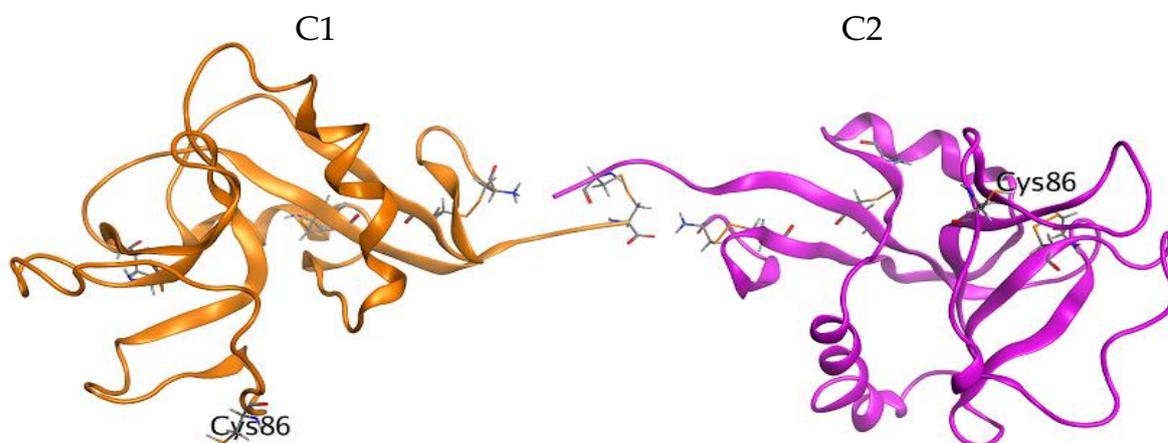


Рисунок 6 – Ленточная диаграмма модели 3D-структуры гомодимера GYL. Субъединицы GYL обозначены C1(оранжевым цветом) и C2 (розовым цветом). Структура остатков цистеина показана в стержневой форме. Отмечено положение свободного остатка Cys86

Таким образом, методами структурной биоинформатики получены теоретические модели пространственной структуры лектина GYL в мономерной и димерной форме. Результаты, полученные методами компьютерного моделирования, согласуются с экспериментальными данными для лектина GYL.

6 Биологическая активность GYL-R, GYL и GYLmap

6.1 Взаимодействие лектинов с ПАМП

Принадлежность исследуемых лектинов к паттерн-распознающим рецепторам определяли, изучая их способность связываться с основными видами ПАМП (ЛПС *Escherichia coli* O111:B4, пептидогликаном *Staphylococcus aureus*, α -D-маннаном *S. cerevisiae*, β -1,3-глюканом *Euglena gracilis*).

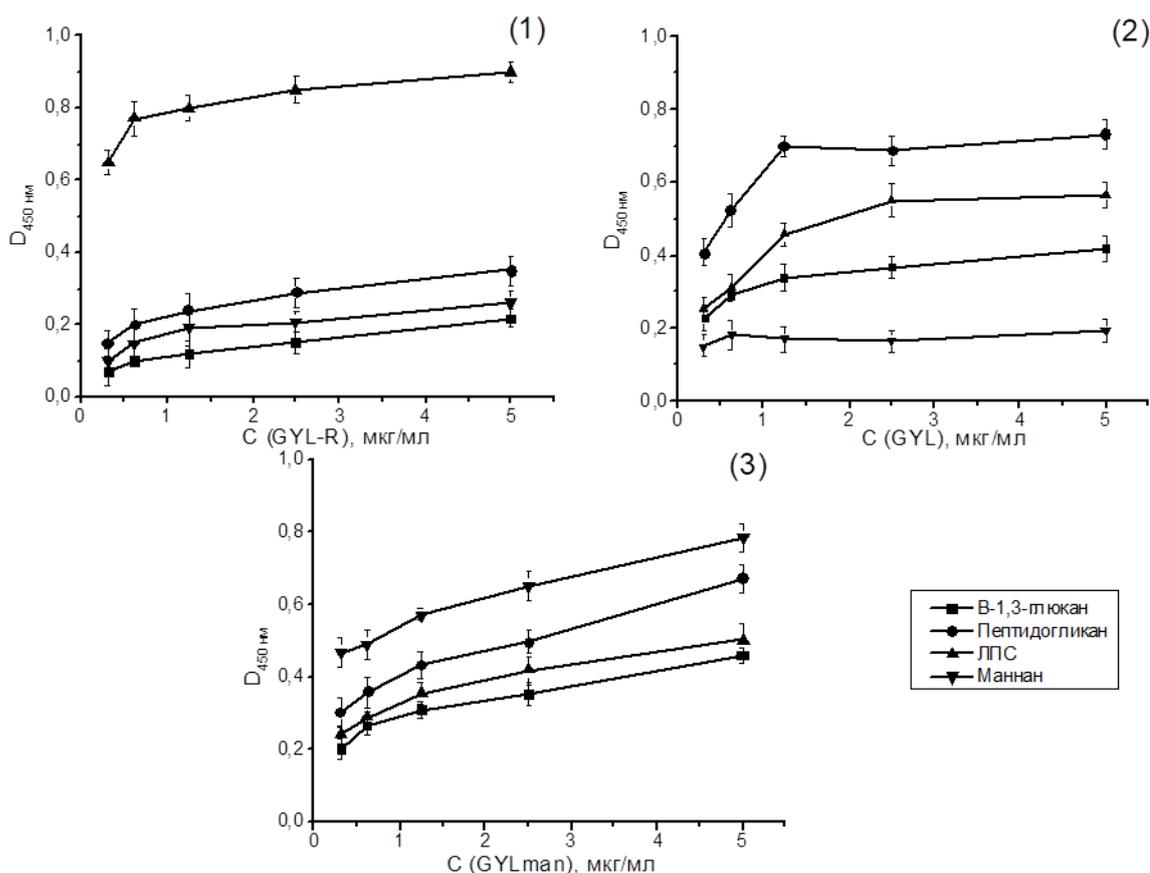


Рисунок 7 – Взаимодействие GYL-R, GYL и GYLman с ПАМП, адсорбированными на полистирольном планшете, определенное методом ТЛФА. Данные представлены как среднее значение \pm SD (n=3).

Методом ТЛФА установлено, что GYL-R, GYL и GYLman проявляют концентрационно-зависимое связывание со всеми исследуемыми ПАМП. GYL-R высокоспецифично связывается с ЛПС по сравнению с остальными ПАМП. GYL предпочтительно связывал пептидогликан и ЛПС, но имел небольшую связывающую активность по отношению к β -1,3-глюкану и маннану, которые являются компонентами клеточной стенки дрожжей. Связывание GYLman с исследуемыми паттернами убывает в ряду: α -D-маннан>пептидогликан>ЛПС> β -1,3-глюкан (рис. 7).

6.2 Взаимодействие лектинов с микроорганизмами

Изучение взаимодействия исследуемых лектинов уже не с компонентами клеточных мембран бактерий и дрожжей, а с целыми клетками микроорганизмов, включая грамположительные бактерии (*B. subtilis*, *S. aureus*), грамотрицательные бактерии (*E. coli*, *V. proteolyticus*) и дрожжи *C. albicans* проводили методом ТЛФА.

GYL-R высокоспецифично связывался с грамотрицательной бактерией *E. coli* (рис. 8) и обладал минимальной аффинностью по отношению к остальным микроорганизмам. Эти данные хорошо коррелируют с предыдущим экспериментом, поскольку из всех исследуемых ПАМП GYL-R наиболее эффективно взаимодействовал с ЛПС.

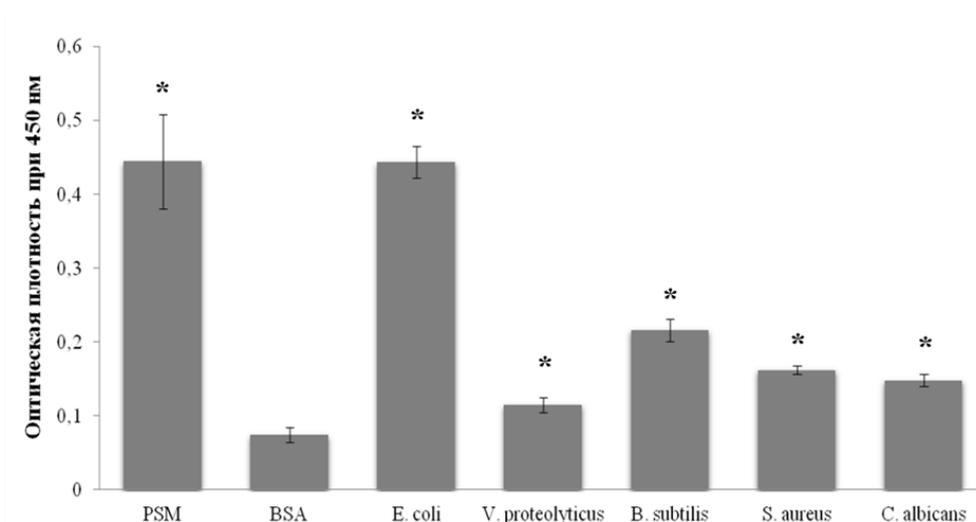


Рисунок 8 – Связывание GYL-R с микроорганизмами, определенное методом ТЛФА (BSA – отрицательный контроль связывания, PSM – положительный контроль связывания). Данные представлены как среднее значение \pm SD (n=3). * $p < 0,05$

GYL обладает широким спектром связывания микробов, взаимодействуя со всеми протестированными типами микроорганизмов с разной интенсивностью (рис. 9).

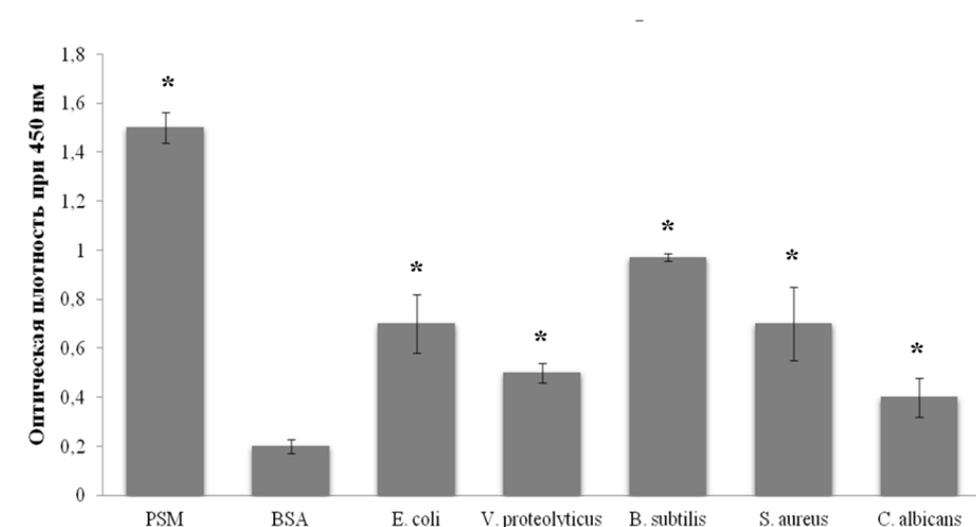


Рисунок 9 – Связывание GYL с микроорганизмами, определенное методом ТЛФА (BSA – отрицательный контроль связывания, PSM – положительный контроль связывания). Данные представлены как среднее значение \pm SD (n=3). * $p < 0,05$

GYLman специфично связывает как грамположительные (*S. aureus*, *B. subtilis*), так и грамотрицательные (*E. coli*, *V. proteolyticus*) бактерии, а также дрожжи *C. albicans*, что предполагает его широкий спектр распознавания ПАМП (рис. 10).

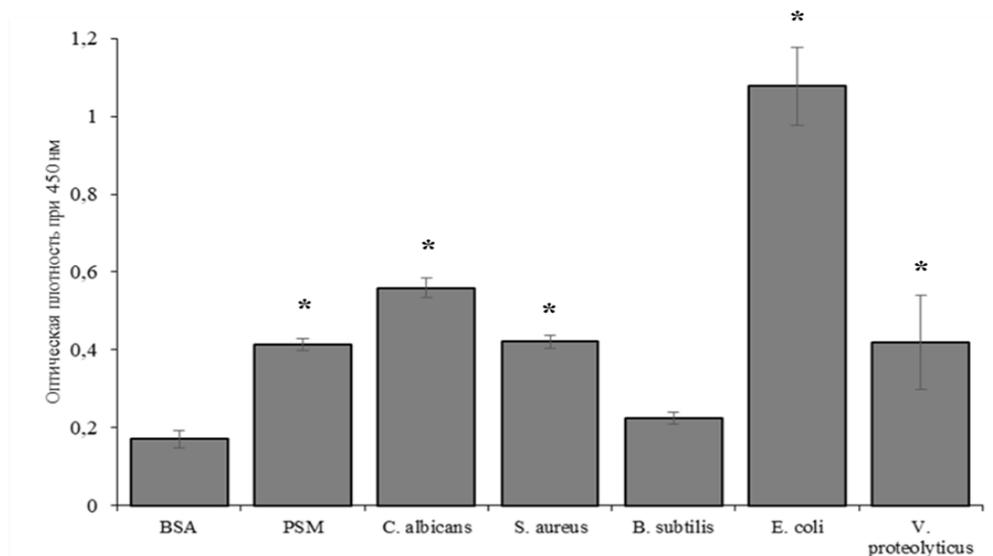


Рисунок 10 – Связывание GYLman с микроорганизмами, определенное методом ТЛФА (BSA – отрицательный контроль связывания, PSM –положительный контроль связывания). Данные представлены как среднее значение \pm SD (n=3). * $p < 0,05$

Следует отметить, что GYLman показал большую связывающую активность в отношении клеток *E. coli*, но не клеток *C. albicans*, несмотря на то, что из всех исследуемых ПАМП наиболее эффективно он взаимодействовал с маннаном. Известно, что основным компонентом клеточной стенки дрожжей являются именно маннопротеины. Возможно, это связано с тем, что мишенью для маннан-связывающих лектинов служит ЛПС *E. coli*, содержащий маннозильные остатки в О-специфическом полисахариде и маннолигосахариды кора, которые являются относительно консервативными. Полагают, что в распознавании патогенов могут быть задействованы более сложные механизмы, поскольку состав гликокаликса микробной клетки может быть представлен углеводами с разнообразной структурой.

Специфичность связывания лектинов с микроорганизмами определяли методом ТЛФА в присутствии специфичных и неспецифичных ингибиторов. В результате было установлено, что взаимодействие лектинов с бактериями и дрожжами идёт по лектинному пути (табл. 9).

Таблица 9 – Ингибирование связывания лектинов с микроорганизмами, определенное методом ТЛФА

Микроорганизмы	IC ₅₀ , мг/мл					
	GYL-R		GYL		GYLman	
	L-Rha	D-Glc	L-Fuc	D-Gal	α -D-Маннан	D-Glc
<i>E. coli</i>	0,005	н. и	2,51	н. и	0,10	н. и
<i>V. proteolyticus</i>	8,53	н. и	5,03	н. и	0,44	н. и
<i>S. aureus</i>	7,25	н. и	3,75	н. и	0,85	н. и
<i>B. subtilis</i>	6,56	н. и	1,25	н. и	0,92	н. и
<i>C. albicans</i>	2,51	н. и	4,84	н. и	0,01	н. и

Примечание – н.и.– не ингибировал

Как видно из таблицы 9, взаимодействие с ингибиторами, специфичными для каждого из лектинов, приводило к уменьшению связывания на 50% и более. При этом концентрация ингибитора, необходимая для отмены взаимодействия лектина с экспрессированными на

клеточной поверхности углеводными гликанами, варьировала в зависимости от исследуемого микроорганизма.

Взаимодействие лектинов с микроорганизмами в растворе было исследовано методом микроскопии. В результате выявлены крупные уплотненные конгломераты, которые и служили подтверждением агглютинирующих свойств лектинов. Установлено, что GYL-R агглютинирует только грамотрицательную бактерию *E. coli*, связывая её в плотные агрегаты. *E. coli* часто содержат L-Rha в структуре своих ЛПС, и этим обусловлена высокая степень распознавания и связывания этой бактерии RBL.

Для GYL выявлена агглютинирующая активность в отношении грамположительных бактерий *B. subtilis*, *S. aureus* и грамотрицательной бактерии *E. coli*. GYLman связывает все изучаемые микроорганизмы. Данные взаимодействия соответствует спектрам связывания лектинов с ПАМП.

Полученные данные свидетельствуют, что GYL-R, GYL и GYLman распознают микроорганизмы и взаимодействует непосредственно с компонентами клеточной стенки микроорганизмов, такими как пептидогликан из грамположительных бактерий и ЛПС из грамотрицательных бактерий, что указывает на их принадлежность к ПРР.

6.3 Влияние GYL на образование микробных биопленок

В настоящее время общепризнано, что основной формой существования бактерий в естественных условиях являются связанные с поверхностью сообщества, получившие название биопленок, а не отдельные планктонные клетки. Лектины, связываясь с поверхностью микроорганизмов, могут препятствовать не только адгезии бактерий к поверхности, но и затруднять их агрегацию друг с другом. На рисунке 11 представлены результаты ингибирования образования биопленок лектином.

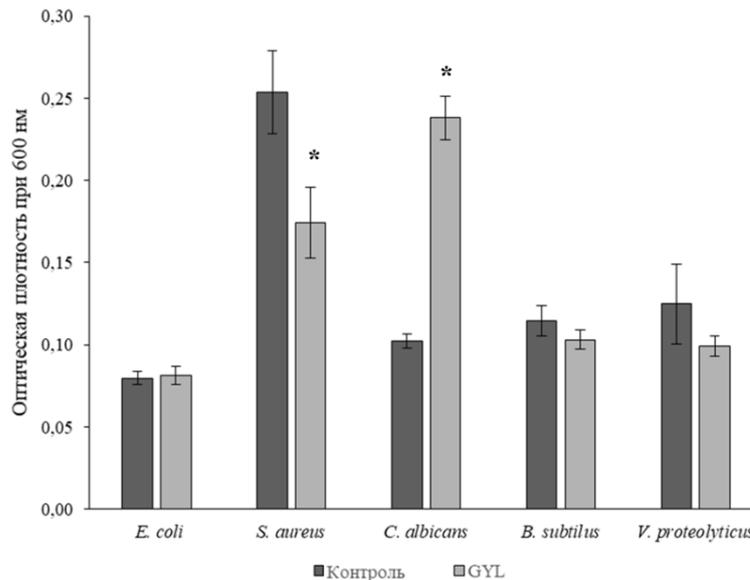


Рисунок 11 – Ингибирование образования биопленок лектином. Данные представлены как среднее значение \pm SD (n=3). * $p < 0,05$

Установлено, что GYL уменьшал биомассу грамположительных бактерий *S. aureus* на 31,2 % и *B. subtilis* на 9,9 %, грамотрицательной *V. proteolyticus* на 20,7 %, но не оказывал ингибирующего действия на образование биопленок бактерией *E. coli* и дрожжами *C. albicans*. Данные согласуются с результатами предыдущих экспериментов.

6.4 Исследование роли GYL в защитных реакциях двустворчатого моллюска *G. yessoensis*

Функциональная роль GYL в организме моллюска была исследована в условиях антропогенного загрязнения окружающей среды дизельным топливом и заражения моллюска бактерией *V. proteolyticus*, изолированной из мест его обитания и патогенной для морских беспозвоночных. Изменение уровня лектина в гемолимфе определяли методом иммуноферментного анализа. Показано, что после иммунизации моллюсков бактериями происходит активация синтеза GYL, через 30 минут его содержание возрастает в 4 раза. После этого концентрация GYL резко падает, что связано с быстрым расходом молекул лектина в реакциях, направленных на удаление патогена. Через двое суток по мере выведения антигена из организма моллюска содержание лектина возвращается к исходному уровню. В контрольной группе, моллюски которой были иммунизированы фосфатным буфером, также отмечались небольшие изменения уровня GYL, что было обусловлено, вероятно, ответом на травму при иммунизации (рис. 12). Никаких значительных изменений в уровнях экспрессии лектина не наблюдалось в группе, подвергавшейся воздействию дизельного топлива.

Довольно неожиданные результаты были получены для моллюсков после сочетанного действия микроорганизмов и дизельного топлива. Через 48 часов после инъекции уровень экспрессии лектина увеличился примерно в 25 раз, что свидетельствует о том, что в условиях неблагоприятного антропогенного воздействия моллюски становятся более чувствительны к бактериальному заражению (рис. 12).

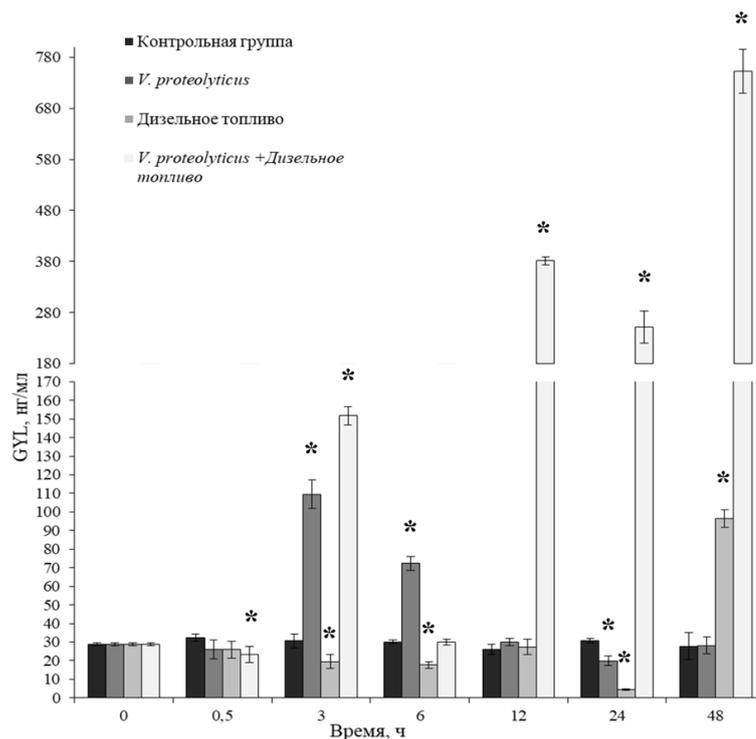


Рисунок 12 - Изменение концентрации GYL в ответ на антропогенное загрязнение и на заражение моллюска бактерией *V. proteolyticus*. Данные представлены как среднее значение \pm SD (n=3). * $p < 0,05$

Можно предположить, что исследуемый лектин является компонентом врожденного иммунитета моллюска и участвует в защите организма беспозвоночного от воздействия внешних патогенов.

Выводы

1. Лектин GYL, выделенный из гемолимфы *G. yessoensis*, является α/β -структурированным, термолабильным, Ca^{2+} -зависимым лектином, проявляющим специфичность к углеводным цепям муцинового типа, относится к паттерн-распознающим рецепторам и компонентам системы врожденного иммунитета моллюска.
2. GYL не проявляет строгой специфичности к одному типу углеводов. Его реконструированным гликобпом является $\text{Gal}\beta 1\text{-4GlcNAc}\beta$, содержащий дополнительный контактирующий с лектином заместитель, такой как $\text{GalNAc}/\text{SO}_4^{2-}/\text{Fuc}$.
3. Аминокислотная последовательность GYL включает одиночный углевод-связывающий домен, содержащий консервативные мотивы, характерные для лектинов С-типа EPN (Glu117-Pro118-Asn119) и WND (Trp137-Asn138-Asp139).
4. Наличие консервативного сигнального пептида и вариабельной последовательности зрелого белка указывает на существование в гемолимфе двустворчатого моллюска *G. yessoensis* мультигенного семейства GYL-подобных лектинов
5. Лектин GYLman, выделенный из гемолимфы *G. yessoensis*, является термостабильным Ca^{2+} -зависимым лектином, проявляющим специфичность к высоковетвленным маннам, относится к паттерн-распознающим рецепторам.
6. Лектин GYL-R, выделенный из гемолимфы *G. yessoensis*, является α/β -структурированным, термостабильным, Ca^{2+} -независимым лектином, проявляющим специфичность к L-рамнозе и α -галактозидам, относится к паттерн-распознающим рецепторам.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах

1. Чикаловец И.В., Молчанова В.И., **Мизгина Т.О.**, Фильштейн А.П., Лукьянов П.А., Черников О.В. Углевод-связывающие белки и полисахариды морских гидробионтов // Вестник ДВО РАН. 2019. № 5 (207). С. 115-122.
2. **Mizgina T.O.**, Chikalovets I.V., Molchanova V.I., Kokoulin M.S., Filshtein A.P., Sidorin E.V., Chernikov O.V. Characteristic of lectin from the bivalve *Glycymeris yessoensis*, as pattern recognition receptor // Russ. J. Bioorg. Chem. 2020. V. 46 (6). P. 1187–1197.
3. **Mizgina T.O.**, Chikalovets I.V., Molchanova V.I., Ziganshin R.H., Chernikov O.V. Identification and Characterization of a Novel Lectin from the Clam *Glycymeris yessoensis* and Its Functional Characterization under Microbial Stimulation and Environmental Stress // Mar. Drugs. 2021. V. 19 (9). Art. 474.
4. **Mizgina, T.O.**, Baldaev, S.N., Likhatskaya, G.N., Molchanova, V.I., Kokoulin, M.S., Filshtein, A.P., Rogozhin, E.A., Chikalovets, I.V., Isaeva, M.P., Chernikov, O.V. Molecular Cloning and Characteristics of a Lectin from the Bivalve *Glycymeris yessoensis* // Mar. Drugs. 2023. V. 21 (2). Art. 55.

Материалы конференций

1. **Мизгина Т.О.**, Чикаловец И.В. Новый Gal/GalNAc-специфичный лектин из двустворчатого моллюска *Glycymeris yessoensis*. // Сборник тезисов докладов 3-ей Всероссийской конференции «Фундаментальная гликобиология», 7-12 сентября 2016 г., С. 105.
2. **Мизгина Т.О.**, Чикаловец И.В., Молчанова В.И., Черников О.В. Лектин из двустворчатого моллюска *Glycymeris yessoensis*. // Материалы XVI Всероссийской молодежной школы-конференции памяти В.Е. Васильковского по актуальным проблемам химии и биологии», 4-9 сентября 2017 г., С. 35.

3. Мизгина Т.О., Чикаловец И.В., Молчанова В.И., Черников О.В. Изменение уровня лектина из двустворчатого моллюска *Glycymeris yessoensis* в ответ на антропогенное загрязнение // Acta Naturae, Спецвыпуск, 2017, Т. 9. № S. С. 29.

4. Мизгина Т.О., Чикаловец И.В., Молчанова В.И., Черников О.В. Лектин из двустворчатого моллюска *Glycymeris yessoensis*: физико-химические свойства и биологическая активность. // Сборник научных трудов 7-ого Международного симпозиума «Химия и химическое образование», 17-20 октября 2017, С. 25.

5. Мизгина Т.О., Чикаловец И.В., Молчанова В.И., Черников О.В. Новый маннан-связывающий лектин из двустворчатого моллюска *Glycymeris yessoensis* // Acta Naturae, Спецвыпуск, 2019, С. 279.

6. Мизгина Т.О., Чикаловец И.В., Молчанова В.И., Черников О.В. Биологическая активность нового лектина из двустворчатого моллюска *Glycymeris yessoensis* // Материалы XX Зимней молодежной школы ПИЯФ по биофизике и молекулярной биологии, 25 фев. – 2 марта 2019, С. 174–175.

7. Mizgina T.O., Chikalovets I.V., Molchanova V.I., Chernikov O.V. The mollusk *Glycymeris yessoensis* as an indicator of the sea pollution // Abstracts of the 26th International Conference of Pacific Congress on Marine Science and Technology (PACON-2019), July 16–19, 2019, P.143.

8. Мизгина Т.О., Чикаловец И.В., Молчанова В.И., Черников О.В. Биологическая активность лектинов из двустворчатого моллюска *Glycymeris yessoensis* // Материалы научной конференции, посвященной 55-летию ТИБОХ ДВО РАН и 90-летию со дня рождения его основателя академика Г.Б. Елякова, 11–15 сентября 2019, С. 46.

9. Мизгина Т.О., Чикаловец И.В., Молчанова В.И., Черников О.В. Лектины двустворчатого моллюска *Glycymeris yessoensis* как паттерн-распознающие рецепторы // Материалы XVII Всероссийской молодежной онлайн школы-конференции по актуальным проблемам химии и биологии, 7–10 сентября 2020, С. 23.

10. Мизгина Т.О., Чикаловец И.В., Молчанова В.И., Черников О.В. Структурные характеристики лектинов гемолимфы двустворчатого моллюска *Glycymeris yessoensis*. Материалы XVIII Всероссийской молодежной школы-конференции по актуальным проблемам химии и биологии, 6–13 сентября 2021, С. 45.

11. Мизгина Т.О., Чикаловец И.В., Молчанова В.И., Кузьмич А.С., Зиганшин Р.Х., Черников О.В. Лектин С-типа из гемолимфы двустворчатого моллюска *Glycymeris yessoensis*. // Тезисы докладов V Всероссийской конференции «Фундаментальная гликобиология», 21–24 сентября 2021, С. 88-89.