

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова  
Дальневосточного отделения Российской академии наук

На правах рукописи

**Фильштейн Алина Петровна**

**Структурно-функциональные особенности и биологическая  
активность лектина из мидии *Mytilus trossulus***

Специальность 1.4.9 – Биоорганическая химия

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

Научный руководитель:  
к.х.н., доцент, Чикаловец Ирина Владимировна

ВЛАДИВОСТОК – 2022

## Оглавление

Оглавление .....	2
Список сокращений и условных обозначений .....	6
Введение .....	8
1 Обзор литературы .....	13
1.1 Классификация лектинов .....	13
1.1.1 Общая характеристика лектинов .....	13
1.1.2 Лектины С-типа (CLR) .....	14
1.1.3 Лектины L-типа .....	15
1.1.4 Лектины Р-типа .....	16
1.1.5 Лектины I-типа (Сиглеки) .....	16
1.1.6 Лектины S-типа (галектины) .....	17
1.2 Лектины морских беспозвоночных .....	18
1.2.1 Лектины двустворчатых моллюсков семейства Mytilidae .....	20
1.2.2 Лектины семейства mytilectin .....	21
1.3 Биологическая активность лектинов .....	23
1.3.1 Взаимодействие с патоген-ассоциированными молекулярными паттернами (ПАМП) .....	23
1.3.2 Антибактериальная активность .....	23
1.3.3 Антифунгальная активность .....	24
1.3.4 Цитокин - стимулирующая активносъ .....	26
1.3.5 Противоопухолевая активность .....	28
1.4 Компьютерное моделирование пространственной структуры лектинов .....	29
1.5 Применение лектинов .....	30
1.5.1 Лектины как векторы для доставки лекарственных препаратов .....	30
1.5.2 Лектины в изучении гликоконъюгатов .....	32
1.5.3 Лектин-аффинная хроматография .....	33
1.5.4 Лектины как гистохимические маркеры .....	34
1.5.5 Микрочипы на основе лектинов (lectin microarray) .....	35
1.5.6 Применение лектинов в иммуноферментном анализе .....	38

2	Материалы и методы исследования .....	40
2.1	Материалы и реактивы .....	40
2.2	Общие методы .....	42
2.2.1	Метод Бредфорда .....	42
2.2.2	Фенол – сернокислотный метод .....	42
2.2.3	Получение суспензии эритроцитов .....	42
2.2.4	Получение суспензии трипсинизированных фиксированных эритроцитов .....	43
2.2.5	Реакция прямой гемагглютинации (ГА) .....	43
2.2.6	ДСН - электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ) .....	43
2.3	Методы выделения и очистки MTL .....	44
2.3.1	Сбор сырья .....	44
2.3.2	Определение титра ГА в экстрактах органов и гемоцитах моллюска <i>M. trossulus</i> .....	44
2.3.3	Получение гидролизованной Сефарозы 4В (H <sup>+</sup> -сефарозы) .....	44
2.3.4	Аффинная хроматография .....	45
2.3.5	МАЛДИ масс-спектрометрия .....	45
2.4	Физико-химические характеристики MTL .....	45
2.4.1	Определение термостабильности MTL .....	45
2.4.2	Определение pH-зависимости активности MTL .....	46
2.4.3	Определение металл - зависимости активности MTL .....	46
2.4.4	Определение углеводной специфичности MTL .....	46
2.4.5	Трипсинолиз MTL в геле .....	47
2.5	Изучение тонкой углеводной специфичности лектина .....	47
2.5.1	Биотинилирование MTL .....	47
2.5.2	Определение тонкой углеводной специфичности .....	47
2.6	Методы установления структуры MTL .....	48
2.6.1	Установление первичной последовательности MTL .....	48
2.6.2	Установление вторичной структуры MTL .....	49

2.6.3	Установление пространственной структуры MTL методами компьютерного моделирования.....	49
2.6.4	Метод динамического рассеяния света .....	50
2.6.5	Выделение иммуноглобулинов IgG <sub>MTL</sub> .....	50
2.6.6	Двойная радиальная иммунодиффузия по Ухтерлони .....	51
2.6.7	Получение конъюгатов IgG <sub>MTL</sub> и MTL с пероксидазой хрена .....	51
2.7	Методы получения рекомбинантного MTL .....	52
2.7.1	Выделение мРНК из мантии <i>M. trossulus</i> и синтез кДНК .....	52
2.7.2	Амплификация структурного гена белка .....	52
2.7.3	Получение генетических конструкций.....	52
2.7.4	Экспрессия рекомбинантного MTL .....	53
2.7.5	Очистка рекомбинантного MTL (r-MTL).....	54
2.7.6	Изучение активностей нативного MTL и rMTL методами иммуноферментного анализа (ИФА) и ГА.....	55
2.8	Методы исследования биологической активности MTL.....	56
2.8.1	Изучение распределения MTL по органам мидии методом ИФА... 56	
2.8.2	Определение уровня лектина в ответ на заражение мидии дрожжами и бактериями.....	56
2.8.3	Взаимодействие MTL с различными патоген-ассоциированными молекулярными паттернами .....	57
2.8.4	Противомикробная активность MTL.....	57
2.9	Статистический анализ.....	63
3	Результаты и обсуждение.....	64
3.1	Выделение и очистка лектина из мидии <i>Mytilus trossulus</i> .....	64
3.2	Физико-химические свойства MTL.....	66
3.2.1	Определение точной молекулярной массы MTL .....	66
3.2.2	Изучение термостабильности, pH-зависимости и металлозависимости активности MTL .....	67
3.2.3	Углеводная специфичность MTL.....	69

3.2.4 Изучение тонкой углеводной специфичности MTL методом гликоэзрей .....	69
3.3 Установление пространственной структуры MTL.....	71
3.3.1 Первичная структура лектина из мидии <i>M. trossulus</i> .....	71
3.3.2 Вторичная структура MTL.....	74
3.3.3 Самоассоциация MTL.....	74
3.3.4 Получение химерного рекомбинантного MTL.....	80
3.4 Биологическая активность MTL.....	84
3.4.1 Распределение MTL по органам мидии.....	84
3.4.2 Заражение мидий дрожжами <i>P. pastoris</i> и бактериями <i>V. proteolyticus</i> .....	86
3.4.3 MTL как паттерн-распознающий рецептор .....	88
3.4.4 Противомикробная активность MTL.....	90
3.4.5 Антифунгальная активность.....	94
3.4.6 Цитокин-стимулирующая активность .....	98
3.4.7 Антипролиферативная активность.....	100
Заключение .....	106
Выводы .....	107
Список литературы .....	108

## Список сокращений и условных обозначений

АФК – активные формы кислорода

ГА – гемагглютинация

ДАБ – диаминобензидин

ДСН – додецилсульфат натрия

ИПТГ – изопропил- $\beta$ -D-1-тиогалактопиранозид

ИФА – иммуноферментный анализ

КД – круговой дихроизм

кДНК – кодирующая дезоксирибонуклеиновая кислота

МАЛДИ – матрично-активированная лазерная десорбция / ионизация

ПААГ-электрофорез – электрофорез в полиакриламидном геле

ПАМП – патоген-ассоциированные молекулярные паттерны

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РНК – рибонуклеиновая кислота

ТЕМЕД – тетраэтилметилендиамин

ТЛФА – твердофазный лектин-ферментный анализ

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

ЯМР – ядерный магнитный резонанс

BSA – бычий сывороточный альбумин

BSM – муцин подчелюстной железы быка

CGL – лектин из мидии *Crenomytilus grayanus*

ConA – лектин из *Canavalia cathartica*

CRD – углевод-связывающий домен

CI-MPR – катион-независимый MPR

CD-MPR – катион-зависимый MPR

CLR – лектиновые рецепторы C – типа

Fuc – фукоза

Gb3 – глоботриоза, трисахарид ( $\text{Gal}\alpha 1\text{--}4\text{Gal}\beta 1\text{--}4\text{Glc}$ )

Gal – галактоза

GalNAc – N-ацетилгалактозамин

Glc – глюкоза

GlcNA – N-ацетилглюкозамин

Glu – глутаминовая кислота

Gly – глутамин

IC 50 – концентрация вещества, приводящая к гибели 50% клеток

Ig – иммуноглобулин

LAC – лектин-аффинная хроматография

IL – интерлейкин

INF- $\gamma$  – гамма-интерферон

LPS – липополисахарид

Lac – лактоза

LacNAc – N-ацетиллактозамин

Man – моноза

MBL – маннан (манноз)-связывающий лектин

MCL – лектин из мидии *Mytilus californianus*

MPR - маннозо-6-фосфатный рецептор

MTL – лектин из мидии *Mytilus trossulus*

MTS – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолин бромид

MytiLec – лектин из мидии *Mytilus galloprovincialis*

NHS – N-гидроксисукцинимидильные сложные эфиры

OVA – овальбумин

PBS – натрий-фосфатный буфер

PI – пропидия йодид

PSM – муцин желудка свиньи

PVDF – поливинилиденфторид

SD – стандартное отклонение

TNF- $\alpha$  – фактор некроза опухоли альфа

## Введение

Межклеточные взаимодействия и взаимодействия клетки с внешними макромолекулами играют важную роль во многих биологических процессах, таких как рост, развитие и дифференцировка клетки, оплодотворение, развитие эмбриона, межклеточное распознавание. Своеобразными регуляторами всех этих взаимодействий выступают расположенные на поверхности клеток гликоконъюгаты. Их углеводные цепи содержат информацию о клетке, закодированную не только в последовательности моносахаридов, но и в пространственной конфигурации углеводных цепей. Причина этого в том, что даже идентичные по составу олигосахариды могут иметь структурные различия, связанные с наличием аномерных центров моносахаридных остатков, разнообразием возможных типов связей между мономерными единицами и существованием разветвлений в углеводной цепи [1].

Таким образом, особенности пространственного строения углеводов обуславливают информационный потенциал рассматриваемых биомолекул, реализация которого подразумевает существование эффективных систем дешифровки. Одной из таких систем является углевод-белковое взаимодействие, которое осуществляется во множестве внутриклеточных и внеклеточных физиологических и патологических процессах. К белкам, способным связываться с углеводами, относятся специфичные к сахарам антитела, ферменты, катализирующие превращение углеводов, транспортные, рецепторные белки и лектины [1].

Углевод-связывающие белки, известные как лектины, широко распространены во всех живых организмах, находящихся на разных ступенях эволюции, начиная от наиболее примитивных форм жизни – вирусов и бактерий – до представителей высших позвоночных, что свидетельствует об эволюционной преемственности (значимости) и универсальности механизмов, основанных на белок-углеводном распознавании. Микрогетерогенность, возникающая из-за множественных копий гена лектина, аллельной



изменчивости или посттрансляционных модификаций продуктов гена, расширяет их молекулярное разнообразие и функциональные возможности [2].

Как физиологически активные вещества лектины широко применяются в биологии и медицине, используются в качестве инструментов для выявления различий в структуре поверхности нормальных и раковых клеток и в качестве регуляторов биологических процессов [3]. В настоящее время их широко применяют для определения групп крови, очистки биологических жидкостей, а также для выделения определенного типа клеток, в частности, незрелых форм лимфоцитов при пересадке костного мозга [4]. В последнее время возрос интерес к медицинскому потенциалу лектинов, например, в качестве модуляторов иммунных процессов [5], противовирусных агентов [6] и онкомаркеров [7]. Некоторые патологические процессы, такие как злокачественная трансформация, сопровождаются нарушением нормального процесса гликозилирования и экспозицией на поверхности опухолевых клеток углеводных маркеров малигнизации. Лектины способны выявлять углеводные детерминанты, специфические для гликоконъюгатов раковых клеток, что позволяет использовать их не только в качестве модельных соединений для изучения механизмов малигнизации, но и как специфические маркеры в практической онкологии для ранней и дифференциальной диагностики рака [8]. Лектины являются также важными инструментами для исследований в таких областях как цитохимия, гистохимия, иммуногистохимия и гликомика [9].

Мультивалентность - особенность лектинов, которая обеспечивает увеличение аффинности лектинов при взаимодействии с лигандами). При этом некоторые лектины образуют из отдельных полипептидов олигомерные структуры путем кластеризации нескольких сходных или идентичных связывающих доменов, что характерно, например, для лектина из мидии *Crenomytilus grayanus* (CGL) [10]. Наличие димерной четвертичной структуры CGL и трипликация лиганд-связывающего сайта приводят к образованию в общей сложности шести сайтов связывания лигандов внутри димера, что имеет

решающее значение для проявления гемагглютинирующей способности этого лектина [11].

Хотя к настоящему времени лектины выделены из более, чем 450 видов живых организмов, начиная от вирусов и до человека, поиск источников новых лектинов, выделение, установление их структуры и функций остается актуальной задачей в силу большого разнообразия биологической активности этих соединений.

**Целью настоящей работы** являлось исследование структуры, физико-химических свойств, биологической активности и роли в защитных реакциях нового лектина, выделенного из мантии мидии *Mytilus trossulus* (MTL). Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Выделить MTL и охарактеризовать его основные физико-химические свойства.
2. Установить аминокислотную последовательность и пространственную структуру MTL.
3. Получить рекомбинантный аналог MTL.
4. Исследовать роль MTL в защитных реакциях мидии *M. trossulus*.
5. Установить принадлежность MTL к паттерн-распознающим рецепторам.
6. Изучить биологическую активность лектина.

**Научная новизна и практическая ценность работы.** Впервые выделен и охарактеризован лектин из мантии мидии *Mytilus trossulus* (MTL). Установлена его первичная и вторичная структуры. На основании полученных данных MTL отнесен к новому семейству лектинов mytelectin, в которое входят лектины: CGL из мидии *Crenomytilus grayanus*, MytiLec - лектин из мидии *Mytilus galloprovincialis* и MCL из мидии *Mytilus californianus*. Пространственная структура MTL, аналогична таковой других членов семейства mytelectin и характеризуется типом укладки, называемой «β-трилистник». Определение тонкой углеводной специфичности показало, что

MTL, в отличие от CGL и MytiLec, проявляет аффинность к концевой галактозе с  $\beta$ -конфигурацией гликозидной связи. Получены доказательства участия MTL в защитных реакциях моллюска, развивающихся в ответ на проникновение различных патогенных микроорганизмов, лектин охарактеризован как паттерн-распознающий рецептор. Впервые получены данные о цитокин-стимулирующей и противоопухолевой активности MTL. Разнообразие биологической активности MTL является предпосылкой для разработки на его основе различных тест-систем, в том числе для ранней дифференциальной диагностики рака. Полученные в работе 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 исследования биологически активных лектинов морских беспозвоночных. Методологическую основу исследования формируют физико-химические методы: аффинная хроматография, ПААГ-электрофорез, спектрометрические методы (КД, масс-спектрометрия); методы молекулярного клонирования и секвенирования; иммунохимические методы: иммуноферментный и лектин-ферментный анализ. Для построения теоретической модели лектина использовались программы Phyte2 и «МОЕ 2020.09». Для расчета статистически достоверных данных использовали метод Стьюдента.

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

#### **Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Лектин (MTL), выделенный из мантии мидии *M. trossulus* является термолабильным, pH-стабильным и металлонеинзависимым лектином, проявляющим специфичность к концевой галактозе с  $\beta$ -конфигурацией гликозидной связи в разветвленных углеводных цепях.

2. MTL является представителем нового семейства лектинов mytelectin.

3. Пространственная структура MTL характеризуется типом укладки, называемой « $\beta$ -трилистник».

4. MTL является паттерн-распознающим рецептором и участвует в реакциях врожденного иммунитета, стимулируя синтез цитокинов и проявляя противомикробную активность.

5. Лектин проявляет антипролиферативную активность, взаимодействуя с гликоконъюгатами, экспрессированными на поверхности опухолевых клеток линии Raji лимфомы Беркитта

**Апробация работы.** Материалы диссертации были представлены на: Всероссийской конференции по «Фундаментальной гликобиологии» (Владивосток, 2016); III Международной научной конференции по биоорганической химии «XII чтения памяти академика Ю. А. Овчиникова» / «VII Российском симпозиуме белки и пептиды» (Москва, 2017); Всероссийской конференции по «Фундаментальной гликобиологии» (Киров, 2018); Научной конференции, посвященной 55-летию ТИБОХ ДВО РАН и 90-летию со дня рождения его основателя академика Г.Б. Елякова (Владивосток, 2019); II объединенном научном форуме VI съезд биохимиков России / IX Российском симпозиуме «Белки и Пептиды» (Сочи, 2019); 25ом Международном симпозиуме «Glycoconjugates» (Италия, 2019). По теме диссертации опубликовано 6 статей в журналах, рекомендованных ВАК.

## **1 Обзор литературы**

### **1.1 Классификация лектинов**

#### **1.1.1 Общая характеристика лектинов**

Углевод-белковые взаимодействия составляют основу различных механизмов, которые необходимы как для внеклеточных, так и для внутриклеточных физиологических процессов, включающих клеточную адгезию, межклеточные коммуникации, передачу сигналов и транспорт, укладку гликопротеинов. Благодаря распознаванию эндогенных углеводных фрагментов, лектины участвуют во множестве ключевых биологических процессов, связанных с эмбриогенезом, развитием и регенерацией тканей и регуляцией функций иммунной системы. С другой стороны, взаимодействуя с инородными экзогенными гликоконъюгатами на поверхности патогенных микроорганизмов, лектины могут функционировать как критические факторы в установлении и поддержании высокоспецифических мутуалистических ассоциаций в комплексах организм-микроб, а также в реакциях врожденного иммунитета в ответ на заражение [2]. В настоящее время лектины обнаружены во всех систематических группах живых организмов: у беспозвоночных, таких как простейшие, насекомые, моллюски, ракообразные, полихеты и морские губки; у позвоночных лектины были выделены и охарактеризованы из рыб, змей и других животных. Из организма человека выделены и охарактеризованы лектины, локализованные, например, в тканях легких и в дендритных клетках. [12].

Существует большое количество классификаций, в соответствии с которыми систематизируют лектины. Согласно молекулярной организации их классифицируют как простые, мозаичные и макромолекулярные лектины [13]. По углеводной специфичности лектины классифицируют на пять групп, согласно моносахариду, к которому они обладают наибольшим аффинитетом: манноза, галактоза/N-ацетилгалактозамин, N-ацетилглюкозамин, фукоза и N-ацетилнейраминовая (сиаловая) кислота [13]. Поскольку лектины продуцируются широким кругом живых организмов, от микроорганизмов до

млекопитающих, их можно сгруппировать в соответствии с источником их выделения: лектины водорослей, лектины микроскопических грибов, бактериальные лектины, животные лектины и растительные лектины [13].

Функционирование лектинов напрямую связано с наличием в их структуре углеводов-связывающих/распознающих доменов (CRD). Как правило, лектины содержат два или более углеводов-связывающих сайта, являясь, таким образом, двухвалентными или поливалентными, но не без исключения [14]. Существование уникальных мотивов CRD в аминокислотной последовательности лектина и различий в пространственной организации этих сайтов и сайтов, предназначенных для координации двухвалентного катиона, необходимого для связывания лигандов с лектинами, позволяет классифицировать лектины как галектины (ранее называвшиеся лектинами S-типа), лектины C-типа (CLR), лектины L-типа, лектины I-типа, лектины P-типа и некоторые другие [2].

### **1.1.2 Лектины C-типа (CLR)**

Лектины C-типа представляют собой семейство  $\text{Ca}^{+2}$ -зависимых углеводов-связывающих белков, которые имеют по меньшей мере один углеводов-связывающий домен. Каждый углеводов-связывающий домен содержит двойную петлю, которая стабилизируется двумя высоко консервативными дисульфидными мостиками. Кальций не только принимает участие в функционировании углеводов-связывающего домена, но и обеспечивает его стабильность. CLR представляют собой надсемейство белков, которые распознают широкий набор лигандов и регулируют разнообразные физиологические функции. Анализ литературы свидетельствует о том, что основное внимание исследователей сосредоточено на способности лектинов C-типа участвовать во врожденных и адаптивных антимикробных иммунных реакциях [15]. Лектины C-типа являются рецепторами распознавания паттернов (PRR), которые взаимодействуют с гликанами вирусов, бактерий, грибов, паразитов, т.е. с молекулярными паттернами, ассоциированными с патогенами

(ПАМП) [16]. CLR осуществляют захват антигенов, их интернализацию и перемещение в лизосомы. Кроме того, известно, что эти белки играют важную роль в возникновении аутоиммунных заболеваний. Дефекты этих молекул приводят к аномалиям в развитии организма, а также к изменению восприимчивости к инфекционным и неинфекционным заболеваниям [17]. С-лектины, содержащиеся в сыворотке крови и межклеточном матриксе, могут быть ассоциированы с клеточной мембраной и обладают широкой субстратной специфичностью [18].

В семействе CLR лектинов выделяют 17 групп белков, которые подразделяются на растворимые лектины, секретируемые клетками, и трансмембранные лектины.

Коллектины являются представителями группы растворимых лектинов. Коллектины – белки, специфичные к маннозе, имеющие уникальную структуру, в состав которой входит домен, состоящий из последовательности богатой цистеином, участок  $\alpha$ -спирали и углевод-связывающий сайт. Эти молекулы принимают участие в защитных реакциях организма. Из шести основных белков этого подсемейства наиболее изученным является маннан-связывающий лектин (MBL) [19].

Селектины относятся к трансмембранным CLR и отвечают за межклеточные контакты и эндоцитоз молекул в клетки [20]. Селектины обеспечивают адгезию лейкоцитов к клеткам эндотелия кровеносных сосудов, что необходимо для их проникновения к месту воспаления. Известны три типа селектинов: L-селектины, P-селектины, E-селектины. Лиганды L-селектинов находятся на эндотелии, тогда как лиганды E- и P- селектинов на поверхности лейкоцитов [21]. Еще одно семейство трансмембранных лектинов составляют эндоцитные лектины. Они вовлечены в процесс рецептор-опосредованного эндоцитоза, связывая и доставляя растворимые лиганды к лизосомам [22].

### **1.1.3 Лектины L-типа**

Лектины L-типа имеют структурные мотивы, которые присутствуют в различных гликан-связывающих белках эукариот. Многие из них используются в широком спектре биомедицинских и аналитических процедур. Растительные лектины L-типа, в основном, содержатся в семенах бобовых растений и синтезируются во время развития семян через несколько недель после цветения. Эти лектины представляют собой один из нескольких классов белков, накапливающихся в высоких концентрациях в семенах, их часто называют запасными (резервными) белками. На данный момент охарактеризовано более 100 лектинов L-типа бобовых семян, они являются наиболее широко изученными белками этого класса. Общей чертой бобовых лектинов L-типа является их олигомерная структура. Все они являются  $\text{Ca}^{2+}$  зависимыми [23].

#### **1.1.4 Лектины Р-типа**

Существует два вида лектинов Р-типа: катион-независимый маннозо-6-фосфатный рецептор с молекулярной массой 300 кДа (CI-MPR) и катион-зависимый MPR с массой 46 кДа (CD-MPR). Оба лектина выполняют физиологические функции по доставке лизосомальных ферментов, которые содержат N-гликаны с терминальным остатком маннозо-6-фосфата (M6P) [24]. CD-MPR и CI-MPR существуют в основном в виде димера, причем каждый мономер связывает один остаток M6P. Лектины Р-типа играют существенную роль в генерации функциональных лизосом в клетках высших эукариот [25]. Более того, в последние годы многофункциональность Р-типа лектинов становится все более очевидной, поскольку список внеклеточных лигандов, распознаваемых ими, расширяется и включает разнообразный спектр M6P-содержащих белков, а также негликозилированных лигандов, что подразумевает роль лектинов в ряде важных физиологических функций [26].

#### **1.1.5 Лектины I-типа (Сиглеки)**

Сиглеки, или лектины иммуноглобулинового (Ig) типа, связывающие сиаловые кислоты, представляют собой семейство иммунорегуляторных



рецепторов, преимущественно обнаруживаемых в клетках кроветворной системы. Лектины I-типа расположены, в основном, на клеточной поверхности кроветворных клеток. Ig-подобный домен V-типа обеспечивает распознавание различных сиалированных гликоконъюгатов, что может приводить к активации или ингибированию иммунного ответа в зависимости от вовлеченных сиглеков. Сиглеки подразделяются на две подгруппы: одна включает в себя сиглеки – 3, 5 и 12 (CD33 - связанные сиалoadгезины), а другая состоит из сиглека-1 (сиалoadгезин), сиглека-2, сиглека-4 (миелин-ассоциированный гликопротеин, MAG) и сиглека-15. В отличие от CD33 - связанных сиглеков, у которых идентичность последовательностей составляет 50-99%, сиглеки другой подгруппы демонстрируют довольно низкую гомологию (приблизительно 25-30% идентичности последовательностей). Лектины I-типа являются посредниками при адгезии макрофагов с эритроцитами. Эти лектины, в основном, играют роль в межклеточных контактах [27].

#### **1.1.6 Лектины S-типа (галектины)**

Принадлежность соединения к семейству галектинов определяется двумя условиями: аффинностью к  $\beta$ -галактозидам и высокой степенью гомологии последовательности углевод-связывающего сайта. Было показано, что галектины представляют собой хорошо растворимые белки, а их активность не зависит от присутствия ионов металлов. У млекопитающих были охарактеризованы и секвенированы 15 галектинов. Углевод-связывающий домен галектинов содержит около 135 аминокислот, образующих структуру, состоящую из  $\beta$ -складок ( $\beta$ -сэндвич). Некоторые галектины представляют собой нековалентные гомодимеры с двумя идентичными CRD, другие галектины состоят из двух отдаленных CRD, соединенных линкерным (связующим) пептидом, и только галектин-3 содержит N-концевую короткую последовательность, связанную с последовательностью из 8-12 коллагеноподобных повторов, соединенных с C-концевым CRD [28]. Локализация галектинов внутри клетки различна, они вовлечены в такие

биологические процессы как межклеточное взаимодействие и связь с внеклеточным матриксом. Галектины оказывают влияние на развитие, рост и жизнеспособность клетки, участвуют в онкогенезе, метастазировании и в регуляции метаболизма [29].

## **1.2 Лектины морских беспозвоночных**

В последние годы пристальное внимание исследователей привлекают лектины из морских беспозвоночных. Они проявляют ряд важных функций и активностей, благодаря своей способности к избирательному связыванию углеводных лигандов [30]. Например, они задействованы во взаимоотношениях паразит-хозяин, в симбиозе и процессе оплодотворения, который часто проходит через взаимодействие углевода на поверхности одной гаметы с лектином на поверхности другой. Кроме того они участвуют в таких неспецифических иммунных реакциях, как агглютинация, опсонизация, фагоцитоз, лизис и способны избирательно агглютинировать грамположительные и грамотрицательные бактерии [31].

Морские организмы относятся к числу сравнительно новых источников лектинов. Вместе с тем, исследования по определению физиологической роли этих соединений, а также работы с использованием как эндогенных, так и экзогенных лектинов в различных живых системах ведутся довольно активно. На сегодняшний день они обнаружены более чем у 300 видов морских беспозвоночных, определена их углеводная специфичность и молекулярная структура.

Лектины наиболее примитивных представителей этой группы, кольчатых червей и губок, имеют молекулярную массу, не превышающую 40 кДа и, как правило, представляют собой мономерные или ассоциированные в димерные формы белки. Лектины моллюсков и иглокожих составляют широкую гетерогенную популяцию как мультимерных, так и моно- или димерных белков. У лектинов членистоногих организмов, ведущих активный образ

жизни, появляются мультимерные белки с молекулярной массой 450 кДа и выше [31].

Чаще всего лектины морских беспозвоночных проявляют специфичность к одному монасахариду и его производным. Так, специфичность к Gal/GalNAc является достаточно типичной для этой группы животных, например, для лектинов двустворчатого моллюска *Anadara granosa* (AGL-IA, AGL-IB, AGL-III, AGL-IV) [32]. Гораздо реже встречается специфичность одновременно к разным монасахаридам и их производным, например, в случае тахилектина-2 из краба *Tachypleus tridentatus* [33] и лектина из морской губки *Halichondria okadai*, проявляющих специфичность к GlcNAc и к GalNAc [34]. Среди лектинов морских беспозвоночных широко распространены представители семейства C- и S- типов лектинов (галектинов). Лектины CLR, выделенные из морских беспозвоночных, имеют низкую гомологию, меньше 40 %, за исключением близкородственных видов, а их углеводная специфичность слабо зависит от аминокислотной последовательности углевод-связывающего сайта. Например, лектин из морского ушка *Haliotis laevis* распознает как GalNAc, так и Man, хотя содержит лишь QPD-мотив (Gln-Pro-Asp), который отвечает за распознавание Gal [35]. Лектин CEL-IV из морского огурца *Cucumaria echinata* специфичен к GalNAc, несмотря на присутствие ответственного за связывание с Man EPN (Glu-Pro-Asp) мотива. Это указывает на то, что предсказать углеводную специфичность лектина, анализируя только его первичную структуру, невозможно. Очевидно, не все факторы, отвечающие за распознавание углевода, известны на сегодняшний день [36].

β-Галактозид-связывающие лектины (галектины) являются одной из наиболее хорошо охарактеризованной групп лектинов морских беспозвоночных. Они имеют относительно сложные структуры. Например, галектин из морского гребешка *Argopectens irradians* (AiGal1) состоит из 549 аминокислот, включающих четыре CRD. Все CRD имеют общие высококонсервативные остатки, ответственные за распознавание β-галактозидного лиганда посредством специфических водородных связей или

гидрофобного стэкинга с фрагментом галактозы [37]. С точки зрения функциональности, известно, что галектины опосредуют различные биологические процессы, такие как защита от инфекций, дифференцировка, секреция цитокинов и апоптоз. В частности, они, как и многие другие лектины, участвуют во взаимодействиях врожденного иммунитета между хозяином и патогеном, распознавая ПАМП, находящиеся на поверхности вирусов, бактерий, грибов или простейших, и впоследствии способствуют удалению патогенов из организма [37].

### 1.2.1 Лектины двустворчатых моллюсков семейства Mytilidae

Примерно с конца 1980-х годов началось интенсивное изучение морских беспозвоночных семейства Mytilidae с целью обнаружения лектинов [38]. Среди лектинов моллюсков этого семейства встречаются представители разных типов лектинов с разнообразными функциями и активностями. Впервые на наличие лектинов была исследована мидия *Mytilus edulis*. В гонадах моллюска было обнаружено три  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимых сиалоспецифичных лектина M3, M6 и M7 [39], участвующих в повторной инициации мейоза, в процессе созревания яйцеклетки [40]. Позднее из мукоцитов слизистой оболочки этого же моллюска был выделен металлозависимый мультиспецифичный лектин (MeML), участвующий в процессе пищеварения мидии путем захвата пищевых частиц [41]. В гемолимфе мидии *Modiolus modiolus* был обнаружен сиалоспецифичный лектин, проявляющий защитные функции в организме моллюска [42]. Еще одним лектином, выделенным из моллюсков семейства Mytilidae является SeviL, найденный в жабрах мидии *Mytilisepta virgata*. Это Gal/GalNAc - специфичный лектин, проявляющий апоптотическое действие в отношении различных культивируемых линий опухолевых клеток (рак груди, яичников и толстой кишки человека) [43].

Наиболее важным было открытие лектинов мидий *Crenomytilus grayanus* (CGL) [44] и *Mytilus galloprovincialis* (MytiLec) [38]. Уникальность этих лектинов заключается в том, что они не подходили ни под одну систему

классификаций. Изначально, на основании специфичности GalNAc/Gal и других свойств предполагалось, что CGL и Mytilec являются галектинами [45]. Но их аминокислотные последовательности не имели гомологии ни с галектинами, ни с другими лектинами животных. Фолдинг CGL и Mytilec имеет высокое сходство – до 73% с фолдингом рицин В-подобных лектинов, относящихся к суперсемейству « $\beta$ -трилистников». Это суперсемейство состоит из 14 семейств, содержащих более 8000 белков, к ним относятся ингибиторы протеаз, факторы роста фибробластов, интерлейкин-1, гемолитические токсины и многочисленные лектины R-типа [46]. Несмотря на принадлежность к суперсемейству « $\beta$ -трилистников», CGL и Mytilec образуют отдельную ветвь, поскольку результаты филогенетического анализа свидетельствуют об отсутствии какой-либо гомологии с другими представителями этого суперсемейства [47]. Исходя из этих данных, было решено отнести CGL и Mytilec к новому семейству – mytilectin [48]. Позднее к этому же семейству был отнесен лектин из мидии *M. californianus* (MCL) [49].

### 1.2.2 Лектины семейства mytilectin

Первыми представителями семейства mytilectin являются Gal/GalNAc-специфичные лектины – CGL [47] и MytiLec [38]. Первичная последовательность CGL содержит три повтора из 39 аминокислотных остатков, которые складываются в три субдомена, называемых  $\alpha$ ,  $\beta$  и  $\gamma$ . У CGL насчитывается три углевод-связывающих сайта, два из которых идентичны и состоят из His, Gly, Asp, His и Asn, третий сайт состоит из аналогичной аминокислотной композиции, за исключением замены Asn на Glu [11]. Установлено, что среди наиболее распространенных гликановых мотивов высокое сродство CGL проявляет к концевым  $\alpha$ -галактозидам. CGL является мультиактивным лектином, обладая цитотоксической [50], бактериостатической [48] и антифунгальной [51] активностями.

Аминокислотная последовательность Mytilec, имеющая 83 % идентичности с последовательностью CGL, включает 149 аминокислот с ацетилтреонином (Ac-Thr) на N-конце, состоит из трех повторяющихся субдоменов по 50 аминокислот, которые имеют до 50% сходства друг с другом [38]. Каждый из субдоменов содержит углевод-связывающий сайт, два сайта связывания идентичны друг другу (His, Gly, Asp, His, Glu), третий сайт несет в себе замену Glu на Asp. Благодаря своей углеводной специфичности по отношению к глоботриозе (Gb3), Mytilec проявляет дозозависимый цитотоксический эффект на клетки Raji лимфомы Беркитта человека (которые имеют высокую поверхностную экспрессию Gb3), но не оказывает такого эффекта на клетки эритролейкемии K562 (которые не экспрессируют Gb3) [52].

Исследования структуры лектина из мидии *M. californianus*, MCL, показали, что он обладает высоким содержанием  $\beta$ -листов - 38,2% и  $\beta$ -изгибов - 22,5%. По содержанию одного из элементов его регулярной вторичной структуры ( $\beta$ -структуры) он похож на CGL, содержащий 43,1%  $\beta$ -слоев. MCL на 88% идентичен CGL и 100% MytiLec. MCL является первым гликозилированным представителем семейства mytilectin, это наиболее распространенная посттрансляционная модификация, придающая белкам сложную структуру и отличие в физико-химических свойствах. Благодаря такой модификации MCL термоустойчив, его активность сохраняется при 83 °C [49], в то время как активность CGL падает уже при 55 °C [44]. MCL, как и другие представители этого семейства, проявляет бактериостатическую активность, подавляя рост грамположительных и грамотрицательных бактерий [49].

Лектины семейства mytilectin являются перспективными антибактериальными и противоопухолевыми агентами в медицине и биохимическими онкомаркерами в диагностике.

### **1.3 Биологическая активность лектинов**

#### **1.3.1 Взаимодействие с патоген-ассоциированными молекулярными паттернами (ПАМП)**

Фундаментальный аспект иммунной системы заключается в способности отличать свои клетки от клеток чужеродных микроорганизмов. Известно, что, в отличие от позвоночных, у беспозвоночных организмов отсутствует опосредованный антителами гуморальный иммунитет. Однако беспозвоночные организмы обладают врожденным иммунитетом, т.е. обладают механизмами врожденного иммунного ответа, которые защищают их от различных патогенов в водной среде. Уникальной особенностью врожденного иммунного ответа является способность распознавать высококонсервативные структуры, ПАМП, обнаруженные в большой группе патогенов. Врожденная иммунная система включает молекулы-рецепторы белковой природы, которые распознают эти ПАМП и запускает защитные иммунные ответы. У беспозвоночных есть несколько подобных рецепторов: это пептидогликан-связывающий белок,  $\beta$ -1,3-глюкан-связывающий и липополисахарид-связывающий белок, а также toll-подобный рецептор, тирозинсодержащий белок и лектины. У беспозвоночных, включая двусторчатых моллюсков, как правило, в системе врожденного иммунитета доминируют лектины, которые, благодаря своей углеводной специфичности, связываются с различными сахарами, находящимися на поверхности клеточной стенки микроорганизмов. Это взаимодействие запускает каскад реакций, приводящий к фагоцитозу. Вероятнее всего, именно лектины играют решающую роль в защитном механизме двусторчатых моллюсков, осуществляя распознавание и связывание патогенных микроорганизмов и опсонизацию фагоцитарных гемоцитов [29].

#### **1.3.2 Антибактериальная активность**

Известно, что углеводы (гликаны), как наиболее стабильные органические макромолекулы со сложной структурой, играют

фундаментальную роль в образовании антигенов и распознавании их системой врожденного иммунитета. Все клетки покрыты толстыми слоями сложных углеводов, известных как гликокаликс, в которых гликановые компоненты присутствуют в различных гликоформах, таких как гликопротеины, протеогликаны и гликолипиды. Эти гликокомплексы являются основными молекулярными компонентами взаимодействия патоген-хозяин и необходимы как для проникновения патогена, так и для его распознавания [53]. Именно таким образом лектины морских беспозвоночных участвуют в самозащите организма, распознавая, агглютинируя и ингибируя рост бактериальных клеток и биопленок. Например, гликозилированный Gal-специфичный MCL проявляет антибактериальную активность, распознавая углеводы на поверхности клеточной стенки грамположительных и грамотрицательных бактерий. MCL агглютинирует и подавляет рост грамположительной *Lactobacillus plantarum* и грамотрицательной бактерий *E. coli* [49]. Лектины морской губки *Cliona varians* (CvL) оказывают ингибирующий эффект на пролиферацию грамположительных бактерий, клеточная стенка которых представляет собой слой пептидогликана, тогда как лектины морской губки *S. domuncula* (SDLEC) проявляют антибактериальную активность, предпочтительно, в отношении грамотрицательных бактерий, специфически связывая LPS бактерий [54].

Предполагают, лектины действуют либо как ингибиторы роста бактерий после их агглютинации, либо как модуляторы иммунного ответа, вызывая каскад иммунных реакций в организме хозяина для подавления распространения чужеродных микроорганизмов.

### **1.3.3 Антифунгальная активность**

Патогенные грибы оказывают вредоносное действие на жизнь человека, так как способны инициировать различные заболевания, начиная от поверхностных до инвазивных и системных инфекций. Инфекции кожи и ногтей являются наиболее распространенными грибковыми заболеваниями, затрагивающие ~ 25% населения мира [55]. Инвазивные грибковые инфекции



имеют меньшую распространенность по сравнению с поверхностными инфекциями, но вызывают большую обеспокоенность, так как связаны с высокой заболеваемостью и смертностью. Грибы рода *Cryptococcus*, *Candida*, *Aspergillus* и *Pneumocystis* являются самыми опасными для организма человека, так как более 90% всех зарегистрированных смертельных случаев связаны с грибами именно этих родов. Повышенная распространенность грибковых инфекций стимулирует интерес к изучению защитных механизмов противогрибковых иммунных реакций в организме человека. Эти исследования привели к открытию нового вида патоген-распознающих рецепторов, которыми являются лектины. Они распознают углеводные структуры (маннаны, глюканы и хитины), присутствующие на поверхности клеточной стенки грибов, что приводит к индукции врожденного и адаптивного иммунитета для борьбы с патогеном [56]. Например, *dectin-1* (*clec7a*), также известный как рецептор  $\beta$ -глюкана, является наиболее характерным рецептором, участвующим в противогрибковом иммунитете. Этот лектин способен распознавать  $\beta$ -1,3-глюканы в клеточной стенке различных патогенных грибов. После связывания лиганда *dectin-1* может вызывать несколько клеточных реакций, включая фагоцитоз, продукцию хемокинов и цитокинов. Известно, что *dectin-1* играет важную роль в защите желудочно-кишечного тракта во время системного кандидоза и при воспалительных заболеваниях кишечника, модулируя гомеостаз кишечника путем взаимодействия с грибковыми компонентами микробиоты [57]. *Dectin-2*,  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимый лектин, специфичен к  $\alpha$ -маннанам и O-связанным маннопротеинам из нескольких грибов, включая *Candida*, *Histoplasma capsulatum* и *Cryptococcus neoformans*. Взаимодействие *dectin-2* с этими грибами модулирует выработку цитокинов и активных форм кислорода (АФК), а также гибель грибов [58]. *Galectin-3* экспрессируется различными типами клеток, включая моноциты, макрофаги, тучные клетки, В- и Т-клетки. Лектин способен распознавать  $\beta$ -маннан на поверхности клеточной стенки дрожжей *C. albicans*, вызывая защитные противогрибковые реакции через секрецию фактора некроза опухоли ( $\text{TNF-}\alpha$ ) [58].

Антифунгальная активность растительных лектинов изучена, главным образом, против фитопатогенных видов грибов. Чаще всего сообщают о противогрибковых эффектах, связывающих гифы, нитевидные образования грибов, и вызывающих ингибирование их роста и предотвращение прорастания спор. Например, лектины из семян *Phaseolus vulgaris* подавляют рост фитопатогенных грибов *Coprinus comatus* и *Rhizoctonia solani* [59], а также *Valsa mali* [60].

Лектины морских беспозвоночных также обладают антифунгальной активностью, поскольку морские организмы живут в непосредственном контакте с окружающей средой с высокой концентрацией патогенных грибов, вирусов, бактерий [48]. Например, CGL способен ингибировать прорастание конидий грибов из нескольких штаммов *Aspergillus* на 25 – 65 % [61].

### 1.3.4 Цитокин - стимулирующая активность

Известно, что иммунная система макроорганизма включает в себя два механизма действия – врожденный и адаптивный иммунные ответы, активируемые группой клеток и молекул, которые способствуют инактивации или гибели агрессивного агента. Существуют несколько молекул (нейтрофилы, эозинофилы, базофилы и моноциты-макрофаги), способных продуцировать и высвобождать цитокины, которые модулируют активацию иммунных клеток, воспаление и гуморальный ответ.

Лектины способны вызывать иммуномодулирующие эффекты, такие как митогенная активность и индукция Т-хелперов типа 1 (Th1), типа 2 (Th2) или типа 17 (Th17). Основным шагом для запуска иммуномодулирующей активности является связывание лектинов с гликоконъюгатами на поверхности клетки, которые играют роль лектиновых рецепторов. Лектины способны вызывать иммунный ответ через посредников - вторичных мессенджеров, например, диацилглицерина и инозитол-1,4,5-трифосфата, образующихся в результате гидролиза фосфатидилинозитол-4,5-дифосфата, а также повышения уровня цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$  и стимулирования синтеза цитокинов [62].

Цитокины представляют собой группу полипептидных медиаторов, участвующих в формировании и регуляции защитных реакций организма. Важнейшими регуляторами воспалительных и иммунных процессов являются монокины – цитокины, выделяемые активированными моноцитами и макрофагами. Важность и перспективность изучения механизма действия этих цитокинов заключается в их значительной роли в пато- и иммуногенезе [63].

Маннан (или манноза)-связывающий лектин (MBL) способен усиливать фагоцитоз микроорганизмов лейкоцитами и активировать путь лектинового комплемента, а также модулировать иммунный ответ хозяина, независимо от активации комплемента. Экспериментально доказано, что MBL заметно снижает индукцию IL-2, а также продукцию TNF- $\alpha$  и IFN- $\gamma$  в цельной крови человека [64]. Многие из растительных лектинов обладают способностью усиливать фагоцитарную активность иммунных клеток. Так ConBr, лектин из *Canavalia brasiliensis*, вызывает следующие эффекты: продукцию оксида азота (NO) мышинными макрофагами *in vitro* и *in vivo*, активацию и апоптоз лимфоцитов *in vivo*, продукцию IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-4 и TNF- $\alpha$  в мононуклеарных клетках периферической крови человека и высвобождение гистамина из тучных клеток. Лектин из *Cratylia mollis* (крамолл) обладает иммуномодулирующим действием, регулируя уровни IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-10, IL-17 и АФК у мышей. Показано, что крамолл во много раз усиливает антимикотический эффект флуконазола (другого противогрибкового препарата), что свидетельствует о влиянии этого лектина на распространение грибковой инфекции [65]. Известно, что АФК играют важную роль в клеточной передаче сигналов и регулируют экспрессию цитокинов. CGL индуцирует образование АФК в мышинных макрофагах с последующей индукцией цитокинов TNF- $\alpha$  и IL-6 [66]. Лектин из устрицы *Crassostrea gigas* (CgSiglec-1) усиливает фагоцитоз в отношении бактерии *V. splendidus* с высвобождением цитокинов CgTNF-1, CgIFNLP и CgIL-17. Хотя механизм передачи сигналов у моллюсков окончательно не изучен, предполагается, что лектины выступают в качестве регулятора инициации каскада сигналов в реакциях иммунного ответа [67].

### 1.3.5 Противоопухолевая активность

Препараты, которые могут вызывать гибель опухолевых клеток, составляют одну из ключевых стратегий химиотерапии рака. Было показано, что огромное количество лектинов останавливают рост опухолевых клеток посредством индукции апоптоза, который они осуществляют различными путями. Например, лектин из *Bauhinia forficata* индуцирует гибель клеток и ингибирует опосредованную интегрином адгезию клеток рака молочной железы человека MCF-7 [68]. Лектин из *Sclerotium rolfsii* в значительной степени ингибирует пролиферацию и индуцирует апоптоз в клетках рака молочной железы человека MCF-7 и ZR-75, в то же время имеет низкую ингибирующую активность в отношении неопухолевых клеток молочной железы человека MCF-10A и HMEC [69]. Лектин из морской губки *Haliclona cratera* обладает выраженным цитотоксическим действием по отношению к клеткам HeLa (лабораторно культивированный штамм рака шейки матки человека) и FemX (лабораторно культивированный штамм меланомы человека): самые высокие концентрации лектина, которые приводили к гибели 50% раковых клеток ( $IC_{50}$ ), составили 9 мкг/мл и 11 мкг/мл соответственно. Другой лектин (CvL) оказывает цитотоксический эффект на клеточную линию эритролейкемии K-562 (полученную из хронического миелоидного лейкоза). Пролиферация клеток K-562 зависит от дозы CvL ( $IC_{50} = 70$  мкг/мл). Лектин, выделенный из губки *Cliona arion* (CaL), проявляет цитотоксическое действие на клеточные линии HeLa и PC3 (аденокарцинома предстательной железы человека). CaL вызывает дозозависимое ингибирование пролиферации клеток HeLa и PC3.  $IC_{50}$  для клеток HeLa достигается при концентрации лектина 10 мкг/мл, при такой же концентрации CaL гибнет 40% клеток линии PC3 [70]. CGL проявляет цитотоксическое, антипролиферативное действие на клетки Raji (лимфомы Беркитта). Кроме того, при исследовании действия CGL на клеточный цикл клеток Raji установлено, что популяция клеток в фазе G2/M увеличивается и одновременно уменьшается процент клеток в G1 и S-фазах, по

сравнению с контрольными клетками. Это указывает на остановку клеточного цикла в фазе G2/M и приводит к апоптозу, что и было продемонстрировано с помощью экстернализации фосфатидилсерина, активации каспазы-9 и каспазы-3 и расщепления поли(ADP-рибоза)-полимеразы (PARP) [50].

#### **1.4 Компьютерное моделирование пространственной структуры лектинов**

Биологическая активность лектинов, обусловленная связыванием с гликоконъюгатами, экспрессированными на клеточной поверхности, может приводить не только к изменению структуры и свойств клеток, но даже к их гибели. Особое внимание ученых привлекает способность некоторых лектинов вызывать апоптоз опухолевых клеток. В этой связи большой интерес представляет подход конструирования аналогов лектинов с усиленными противоопухолевыми свойствами для применения в диагностике и терапии. Моделирование белков *in silico* помогает прогнозировать и открывает путь к созданию новых, более совершенных белковых молекул с необходимыми свойствами [71].

Структуру белка можно предсказать на основе сравнительного моделирования, используя гомологию аминокислотной последовательности белков. Подходящая трехмерная копия белка с неизвестной пространственной структурой создается на основе сходства с последовательностями известных структур (например, так называемых, прототипов), присутствующих в базах данных. Такой подход продолжает оставаться наиболее точным методом в отличие от других доступных методов. Определение трехмерной (3D) структуры белка может предоставить важную информацию о его биологических функциях и механизме действия [71].

На сегодняшний день, используя методы молекулярного моделирования на основе гомологии белков, определены структуры и предсказаны функции и активности многих лектинов. Установлена третичная структура и предсказана углеводная специфичность лектина из морского ежа *Echinometra lucunter* [72],

определены третичная структура, специфичность и возможная биологическая активность лектина из растения *Dioclea lasiophylla* [73]. Используя подход гомологичного моделирования *in silico*, была предсказана структура углевод-связывающих сайтов CGL, проанализированы механизмы связывания лектина с лигандами (галактозой, глоботриозой и муцином). Методом сайт-направленного мутагенеза показана важность строения консервативных мотивов и установлен индивидуальный вклад аминокислотных остатков CRD в активность лектина [10]. Полученные результаты могут быть полезны при конструировании рекомбинантного CGL с усиленной глоботриоз- и муцин-связывающей активностью [74].

## **1.5 Применение лектинов**

### **1.5.1 Лектины как векторы для доставки лекарственных препаратов**

Применяемые подходы к введению лекарственного вещества в организм человека, основанные на использовании традиционных лекарственных форм, имеют ряд существенных недостатков, главным из которых является его ненаправленное действие, т.е. взаимодействие с нецелевыми биообъектами, что часто приводит не только к побочным эффектам, обусловленным его метаболитами, но и требует повышенного расхода лекарственного вещества. Поэтому, как правило, используются дозы, которые на 1-2 порядка превышают теоретически необходимые. Современное развитие исследовательских методов и технологий подготовило основу для создания новых, инновационных систем контролируемой доставки лекарственных средств с использованием наночастиц, липосом, биоадгезивных систем, способных защитить лекарственное средство от деградации и увеличить его доступность. Однако, они имеют главный недостаток - неспецифичность к субстрату [62].

В последние годы особое внимание уделяется лектин-опосредованной биоадгезии, так как лектины, в зависимости от углеводной специфичности, могут быть потенциальными инструментами при доставке лекарств к цитозолю, органеллам или трансцитозу, как правило, с помощью везикулярного трафика

[75]. Лектины способны направлять наночастицы с заключенными в них лекарственными средствами к клеткам-мишеням, кроме того, лектины, обладающие противоопухолевой или каким-либо другим типом активности, могут быть сами использованы в качестве лекарственного агента. Для этого применяют различные системы доставки (липосомы, альгинат/хитозановые микрокапсулы, альгинатные гранулы и др.) [76].

О доставке макромолекул в мозг с использованием растительного лектина пшеницы (WGA) сообщалось еще в 1989 году. WGA, конъюгированный с пероксидазой хрена (ПХ), использовали в качестве ферментативного индикатора в тканях. WGA связывался с сиаловой кислотой и GlcNAc на поверхности клетки для проникновения в нее посредством адсорбционно-опосредованного эндоцитоза. WGA-ПХ, введенный внутривенно крысам и мышам, был обнаружен в паренхиме нейрогипофиза и в паренхиме передней доли гипофиза через один час. Через 24 ч белок достиг твердой мозговой оболочки. Эти результаты явились первым прямым доказательством доставки переносимых с кровью молекул через гематоэнцефалический барьер в мозг с использованием лектина [75]. Позднее стало известно, что WGA ковалентно связанный с наночастицами, содержащими тимопентин (антибиотик широкого спектра действия), сохраняет свою специфическую углевод-связывающую активность и усиливает пероральное поглощение тимопентина путем улучшения абсорбции наночастиц и защиты тимопентина от деградации [77]. Известно, что специфическое связывание лектинов с опухолевыми клетками запускает механизмы, которые способствуют гибели этих аномальных клеток. Использование противоопухолевого лектина из корейской омелы *Viscum album* (VCA) в системе наночастиц (альгинат / хитозановые гранулы) показало улучшенную внутриклеточную доставку, биодоступность и направленность, что привело к увеличению терапевтического индекса и снижению побочных эффектов [76].

Для лечения рака костей было разработано многофункциональное наноустройство на основе мезопористых наночастиц диоксида кремния,

нагруженных доксорубицином, в качестве наноплатформы, собранной из отдельных составляющих «блоков»: 1) слоя полиакриловой кислоты для минимизации преждевременного высвобождения лекарственного препарата и обеспечения доставки лекарств наносистемой, в зависимости от pH, 2) нацеливающего лиганда – ConA, способного селективно связываться с гликанами опухолевых клеток и интегрироваться в них. Эта многофункциональная наносистема демонстрирует более высокую степень интеграции в клетки остеосаркомы человека. Кроме того, цитотоксичность этого наноустройства в отношении опухолевых клеток в 8 раз выше, чем у свободного доксорубицина. Синергетическая комбинация различных «блоков» в уникальную наноплатформу увеличивает противоопухолевую эффективность и снижает токсичность. Это открывает новые возможности для таргетной терапии рака костей [78]. В целом, интерес к использованию лектинов в качестве активных участников в наноструктурных системах доставки лекарственных средств постоянно растет. Ведутся исследования по получению более мелких фрагментов лектинов с сохранением их углеводной специфичности [79].

### **1.5.2 Лектины в изучении гликоконъюгатов**

Основная задача структурной гликомики - быстрый, чувствительный и высокопроизводительный анализ сложных гликановых структур. Одним из перспективных подходов к изучению гликанов, является технология масс-спектрометрии. Однако применение данного метода имеет свои трудности и недостатки, такие как, например, разделение структурных изомеров (энантиомеров, диастереомеров, аномеров, а также связующих и позиционных изомеров). Альтернативным методом структурной гликомики является так называемое «профилирование гликанов с помощью лектинов», по сути, определение тонкой структуры гликанов с использованием технологий на основе аффинности лектинов. Такой подход при изучении гликанов



обеспечивает значительное преимущество, такое как идентификация изомеров на основе биологических, а не физико-химических принципов [80].

### 1.5.3 Лектин-аффинная хроматография

В настоящее время для выделения, фракционирования и очистки углеводсодержащих структур широко применяется лектин-аффинная хроматография (LAC). Лектины позволяют различать гликановые структуры, разделять и идентифицировать гликоконъюгаты, имеющие патологически измененные углеводные цепи [81]. Аффинная хроматография с использованием лектинов была впервые описана в 1970 году американскими учеными Доннелли и Гольдштейном [82]. LAC представляет собой метод разделения гликопротеинов, основанный на высокоспецифичном взаимодействии между лектином, который иммобилизован на матрице, и его углеводными лигандами [83]. Наиболее распространенными лектинами, которые используются в аффинной хроматографии, являются Con A, WGA и джакалин - лектин из *Artocarpus heterophyllus* [84].

В последнее время для лучшего разделения гликоконъюгатов LAC комбинируют с такими методами, как обращенно-фазовая хроматография, ионно-обменная хроматография и капиллярный электрофорез. Кроме того, используют мульти-лектин аффинную хроматографию (M-LAC). Данный метод, с последовательным использованием нескольких лектиновых колонок, имеющих различную аффинность связывания, позволяет одновременно разделять несколько гликановых мотивов. Так, используя три монолитные колонки (Con A, WGA и RCA-1) в различных конфигурациях, были протестированы специфические гликопротеины сыворотки крови и проведена их последующая идентификация с помощью LC-MS. Использование последовательности лектинов WGA→ConA→RCA-I с дальнейшей идентификацией масс-спектральными методами позволило обнаружить двадцать три гликопротеина, гликановый профиль которых отличался в образцах сывороток здоровых женщин и женщин с раком молочной железы.

Недавно появился альтернативный подход LAC, заключающийся в минимизации лектиновых колонок до микрофлюидного формата. Коммерческие или изготовленные на заказ миниатюрные колонки выгодны как с точки зрения аналитической процедуры, так и по экономическим причинам, так как они уменьшают количество исследуемого образца и реагентов и улучшают воспроизводимость результатов [81].

#### **1.5.4 Лектины как гистохимические маркеры**

Гликоконъюгаты представляют собой сложные макромолекулы, экспрессирующиеся повсеместно в организме. В зависимости от типа ткани отдельные клетки часто экспрессируют на своей поверхности совершенно разные углеводные фрагменты. Эта экспрессия является показателем типа клетки и в случае заболевания может изменяться в процессе патогенеза [85].

Способность лектинов связывать углеводы имеет несомненное значение для исследования изменений экспрессии гликанов клеток на поверхности тканей, так как воспаление, инфекции, иммунологические нарушения напрямую связаны с изменениями их углеводного профиля. Гистохимический анализ с применением конъюгированных лектинов в качестве потенциальных маркеров перегликозилирования гликоконъюгатов может быть использован для идентификации нормальных и трансформированных клеток. Обычно в гистохимии используются лектины, конъюгированные с пероксидазой, с последующим добавлением ферментного субстрата диаминобензидина (ДАБ) и пероксида водорода для визуализации связывания [62]. Этот метод информирует о распределении гликанов внутри и на поверхности клеток и ткани и определяет местоположение нарушенного гликозилирования [81].

Чаще всего гистохимия с применением лектина используется для диагностики и прогнозирования заболеваний человека, определяя степень онкотрансформации гликанов на срезах тканей. Так, лектин из водных экстрактов морской губки *Axinella corgata* (ACL-1) можно применять в качестве маркера для диагностики, а также для картирования тканей при

новообразованиях. Биотинилированный ACL-1 способен взаимодействовать с гликоконъюгатами, находящимися на поверхности нескольких линий опухолевых клеток, таких как рак мочевого пузыря (T24), толстой кишки (HT-29), молочной железы (T-47D, MCF7), яичника (OVCAR-3), легкого (H460) и окрашивать их [86]. Используя лектины в гистохимии, возможно детектировать не только опухолевые клетки, но и различные виды грибов, заражающих человека. Конъюгированные с пероксидазой хрена лектины из *Ulex europaeus* (UEA-I), *Phaseolus vulgaris* (PHA-E), Con A и WGA могут распознавать и визуализировать различные углеводные структуры на поверхности клеточных стенок грибов вида *Aspergillus* в срезах тканей человека с посмертным диагнозом инвазивного аспергиллеза [87]. Примечательно, что использование лектинов в качестве гистохимических маркеров открыло путь для более конкретного, подробного и показательного картирования углеводных структур в тканях, что ранее было невозможно с использованием традиционных гистохимических методов [88]. Применение лектинов имеет большой потенциал в маркировке трансформированных тканей и патологических явлений, таких как метастазирование, а также для диагностики различных заболеваний, в том числе и прогнозирования рака [81].

### 1.5.5 Микрочипы на основе лектинов (lectin microarray)

Современные диагностические методы, такие как компьютерная томография, рентген и цитология, не всегда способны обнаружить злокачественные новообразования на ранних стадиях. В последние годы перспективным методом решения этой проблемы является применение лектинных микрочипов [89]. Впервые микроматрицы на основе лектинов были представлены научному сообществу в 2005 году. Микрочипы представляют собой панель лектинов с различными углевод-связывающими свойствами, иммобилизованными на твердой подложке, в качестве которой используются различные матрицы высокой плотности, например, N-

гидроксисукцинимидильные (NHS) сложные эфиры, эпоксиды, биотин-стрептавидин и 3D гидрогели.

Преимущества использования лектинной микроматрицы по сравнению с традиционными методами заключаются в простоте и высокой чувствительности метода, более низкой строгости к чистоте образца (можно анализировать неочищенные образцы гликопротеина) и сравнительно простой подготовке исследуемых гликоконъюгатов [90]. Поскольку во время подготовки образца не требуется фрагментация белка или высвобождение гликанов, исследуемые гликопротеины сохраняют свою естественную конформацию. Таким образом, микроматрицы на основе лектина подходят для анализа дифференциальных гликановых профилей биологических образцов [89]. В настоящее время разработано и используется несколько вариантов микрочипов (рисунок 1). Лектины с известной аффинностью иммобилизуют путем ковалентного связывания или физической адсорбции на тонкой золотой подложке покрытой NHS. Закрепленные на матрице лектины специфически взаимодействуют с гликоконъюгатами, меченными флуоресцентной меткой (рисунок 1А). Интенсивность свечения измеряется с помощью флуоресцентного сканера [91]. Такую матрицу можно использовать для анализа гликанового профиля клеток здорового пациента по сравнению с клетками больного [89].

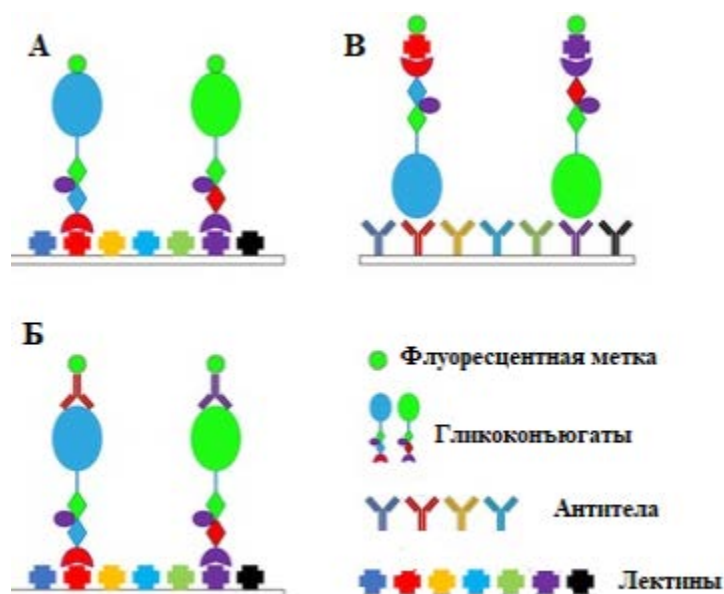


Рисунок 1. – Разновидности лектинных микроматриц.

Еще один вариант микроматриц для обнаружения изменений гликозилирования в молекулах-мишенях заключается в иммобилизации лектинов на твердой подложке, (например, предметном стекле), покрытой нитроцеллюлозной мембраной (рисунок 1Б). Лектины взаимодействуют с гликопротеинами, зондированными мечеными вторичными антителами [89]. В 2007 году американские исследователи разработали очередной вариант лектинной микроматрицы. Данный вид матрицы отличается тем, что на твердой подложке, состоящей из нитроцеллюлозной мембраны, иммобилизованы антитела, взаимодействующие с гликанами, затем полученный комплекс (антитело-гликан) обрабатывается биотинилированными лектинами с последующим добавлением стрептовидина, меченного флуоресцеином (рисунок 1В) [92]. При исследовании N- и O- гликановых профилей сыворотки крови пациентов с раком легких лектины показали изменённые профили экспрессии гликопаттернов у пациентов с ранней стадией аденокарциномы и плоскоклеточного рака легких [93]. Применение микрочипов на основе лектинов из *Maclura pomifera* (MPL) и *Vicia villosa* (VVA) показало, что они являются специфическими биомаркерами рака желудка [94]. Позднее китайскими исследователями было обнаружено, что 15 лектинов (PSA из *Pisum*

*sativum*, РНА-Е из *Phaseolus vulgaris*, ЕСА из *Erythrina cristagalli*, VВА и др.) распознают измененное гликозилирование белка слюны при раке желудка (аденокарцинома I / II / III стадии) [95]. Таким образом, лектинные микрочипы являются быстрым в исполнении, высокопроизводительным и недорогим инструментом для обнаружения глико-биомаркеров, а также позволяют установить структуру и функции гликанов при различных биологических процессах и заболеваниях [89].

### **1.5.6 Применение лектинов в иммуноферментном анализе**

Среди аналитических подходов, основанных на применении лектинов, следует упомянуть микропланшетный твердофазный лектин-ферментный анализ (ТЛФА). Как и иммуноферментный анализ (ИФА), ТЛФА изначально был основан на взаимодействии лектина со специфическими антителами или ингибировании связывания соответствующими сахарами, и использовался для изучения лектин-углеводных взаимодействий. Однако при анализе взаимодействий углеводов с несколькими лектинами возникает потребность в использовании антител, специфичных для каждого из лектинов, что является недостатком этого метода. Поэтому было разработано несколько альтернативных подходов с использованием меченых лектинов [96]. Так, в 1994 году группа ученых предложила использовать в качестве метки для лектина комплекс биотин - авидин. Биотинилированные лектины взаимодействуют с гликопротеинами или другими высокомолекулярными гликоконъюгатами, нековалентно адсорбированными в лунках микротитровального планшета. Образование комплексов детектируют с помощью конъюгатов авидин-фермент [97]. Фермент превращает раствор бесцветного субстрата в окрашенный продукт, интенсивность окраски которого затем измеряют с помощью спектрофотометра и используют для оценки уровня взаимодействия лектина с гликоконъюгатом. В зависимости от структур гликанов, которые необходимо обнаружить, тщательно выбирают лектины с определенной специфичностью [98]. ТЛФА применяется во множестве исследований, включая исследования

биомаркеров рака. Известно, что при анализе гликопротеинов лизата клеток рака молочной железы разных стадий с применением нескольких лектинов (ConA, AAL из гриба *Aleuria aurantia* и MAL II из *Maackia amurensis*), было обнаружено повышенное маннозилирование, галактозилирование, сиалилирование и фукозилирование гликопротеинов в тканях рака груди по сравнению с образцами нормальной ткани [99].

За счет своей экономичности и простоты исполнения твердофазный лектин-ферментный анализ является перспективным методом в диагностических исследованиях.

## 2 Материалы и методы исследования

### 2.1 Материалы и реактивы

В данной работе использованы следующие реактивы: трис, ДСН (додецилсульфат натрия), акриламид, бис-акриламид, твин-20, ТЕМЕД (тетраэтилметилендиамин), ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота), ИПТГ (изопропил- $\beta$ -D-1-тиогалактопиранозид), имидазол (Helicon, Россия); ДАБ (диаминобензидин), Gal, GalNAc, Glc, GlcNAc, Fuc, Lac (лактоза), Man, LacNAc (N-ацетиллактозамин), коллагеназа из *Clostridium histolyticum*, LPS (lipopolysaccharide из *Escherichia coli* Serotype 055:B5),  $\beta$ -1,3-глюкан из *Euglena gracilis*, пептидогликан из *S. aureus*, маннан из *Saccharomyces cerevisiae*, (Sigma, USA); глутаральдегид (Acros organics, USA); лимонная кислота, серная кислота, соляная кислота, синапиновая кислота, фенол, дигидрофосфат натрия, гидроксид натрия, карбонат натрия, тетрагидридоборат натрия, бикарбонат натрия, периодат натрия, хлорид натрия, хлорид кальция, хлорид магния, хлорид марганца, хлорид цинка, перекись водорода, сульфат аммония, нитрат серебра, дигидрофосфат калия, гидрофосфат калия, этанол, метанол, уксусная кислота, формальдегид, глицерин, Coomassie G-250 (кумасси), FITC (fluorescein isothiocyanate изотиоцианатфлуоресцеина), DMSO (dimethyl sulfoxide, диметилсульфоксид), кристаллический фиолетовый (N,N,N',N',N'',N''-гексаметил-парарозанилин хлорид) (Росхим, Россия); набор стандартных белков для электрофореза (Fermentas, EU); трипсин (Promega, USA); BSA (bovine serum albumine, бычий сывороточный альбумин) (ПанЭко, Россия); ТМБ (тетраметилбензидин), асиалофетуин, PSM (porcine stomach mucin, муцин желудка свиньи), OVA (ovalbumin, овальбумин), BSM (bovine submaxillary mucin, муцин подчелюстной железы быка), фетуин, асиалофетуин, ацетонитрил, ацетат натрия, ДТТ (дителиотреитол) (Sigma, USA); BrCN - активированная сефароза 4B (Uppsala, Sweden); клеточная среда RPMI 1640, FBS (эмбриональна бычья сыворотка), MTS-реагент (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолин бромид) (CORNING, Mediatech, Inc.); коммерческий набор для цитокинов DuoSet (R&D Systems, EU); коммерческий



набор для биотинилирования (EZ-Link™ Sulfo-NHS-Biotinylation Kit), стандарты молекулярных масс (Page Ruler Unstained Broad Range Protein Ladder), эндонуклеазы рестрикции (SacI, SalI), буферный раствор для эндонуклеаз рестрикции (Tango), T4-ДНК-лигаза, набор реактивов для секвенирования ДНК BigDye Terminator v.3.1 3.1, набор для секвенирования ABI Prism Big Dye Terminator 3.1 CycleSequencing Kit, ДНКаза I, плаزمида рTZ57R/T, генетический вектор рЕТ-40b(+) (Thermo Fisher Scientific, USA); стандарты молекулярных масс ДНК DNA Ladder (100-3000 н.п.) (Сибэнзим, Россия); набор для выделения суммарной РНК ExtractRNA, набор для полимеразной цепной реакции (ПЦР) Encyclo PCR Kit, набор для амплификации EncycloTaq Polymerase, набор для выделения плазмид Plasmid Miniprep, набор реактивов для синтеза амплифицированной кДНК MMLV RT (Евроген, Россия); набор для синтеза кДНК SMART cDNA Amplification Kit (Clontech, USA); набор для клонирования InsTAclone PCR Cloning Kit (Fermentas, Литва); плазмида рЕТ-40b(+), компетентные клетки *E. coli* Rosetta (DE3) (Novagen, Германия); компетентные клетки *E. coli* DH5α (Novagen, Германия); канамицин, гентамицин, триптон, дрожжевой экстракт, мочеви́на, колонка IMAC Ni-Charged resin (Bio-Rad, USA); ген-специфические праймеры (Евроген, Россия):

MTL-Sac-dir (5' - TATAGAGCTCAATGACAACGTTTCTTATCAA – 3')

MTL-Sal-stop-rev (5' - TATAGTCGACTTAGTAGGCATA -3'),

стандартные T7 праймеры (Евроген, Россия):

T7-F (5' - ТААТАСГАСТСАСТАТАГГГ - 3')

T7-R (5' - GCTAGTTATTGCTCAGCGG - 3'),

праймеры для амплификации кДНК MTL (Евроген, Россия):

CGL-exp\_dir (5'- ATGACAACGTTTCTTATCAAACACAAGGCCAGTG -3')

CGL-exp\_rev (5' - GGCATAAACTAAAACGCGCTTGTCTTT-3'),

праймеры для амплификации 3'- и 5'-концевые области кДНК MTL (Евроген, Россия):

MTL-3race: (5'-GGAAAAATTGTCCATCCCTACG-3')

MTL-5race: (5'-CGTAGGGATGGACAATTTTCC-3').

Все реактивы отечественного производства имели квалификацию «о.с.ч.» или «ч.д.а.», импортные реактивы имели маркировку «для молекулярной биологии» или «для аналитической работы».

Масса эритроцитов человека была получена на станции переливания крови (Владивосток), кролика в виварии ТИБОХ ДВО РАН. CGL, IgG<sub>MTL</sub> и PSM-ПХ (пероксидаза хрена) — в лаборатории химии неинфекционного иммунитета ТИБОХ ДВО РАН. Бактерии и дрожжи (грамположительные бактерии *S. aureus* КММ 434 и *Bacillus subtilis* ATCC 6633, грамотрицательные бактерии *V. proteolyticus* CCUG 20302T и *E. coli* VKPM V 7335, дрожжевые грибы *Pichia pastoris* КММ 455) были предоставлены д.б.н. Недашковской Ольгой Ильиничной, лаборатория микробиологии ТИБОХ ДВО РАН. Грибы, ассоциированными с моллюском *M. trossulus* в естественных условиях, выделены и выращены д.б.н. Пивкиным М.В., сотрудником лаборатории микробиологии ТИБОХ ДВО РАН.

## **2.2 Общие методы**

### **2.2.1 Метод Бредфорда**

Наличие белка определяли по методу Бредфорда: в 96-луночный планшет наносили по 100 мкл пробы и контроля, затем в каждую добавляли по 100 мкл реактива Бредфорд. Измеряли оптическую плотность при 595 нм и определяли концентрацию белка, используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин (BSA) [100].

### **2.2.2 Фенол – сернокислотный метод**

Наличие углеводов определяли фенол – сернокислотным методом [101].

### **2.2.3 Получение суспензии эритроцитов**

Эритроцитарную массу трижды промывали 0,01 М PBS (phosphate buffered saline, натрий-фосфатный буфер) (0,01 М NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 0,15 М NaCl) pH

7,5 и центрифугировали при 1500 об/мин в течение 3 мин. В дальнейшем использовали 2 % суспензию эритроцитов в 0,01 М PBS.

#### **2.2.4 Получение суспензии трипсинизированных фиксированных эритроцитов**

К 10 % суспензии эритроцитов в 0,01 М PBS pH 7,5 добавляли трипсин (1:250, из расчета 3 мг на 1 мл осадка эритроцитов), инкубировали 2 ч при 37 °C при перемешивании. Отмывали от трипсина пять раз 0,01 М PBS pH 7,5 и центрифугированием при 1500 об/мин в течение 3 мин. В дальнейшем использовали 2 % суспензию эритроцитов в 0,01 М PBS pH 7,5.

К 2 % суспензии трипсинизированных эритроцитов в 0,01 М PBS pH 7,5 добавляли равный объем 0,2 % глутаральдегида и инкубировали при комнатной температуре при перемешивании в течение 30 мин. Далее эритроциты отмывали от глутаральдегида пять раз, смешивая с десятикратным объемом 0,01 М PBS и центрифугированием при 1500 об/мин в течение 3 мин. В дальнейшем использовали 2 % суспензию эритроцитов в 0,01 М PBS.

#### **2.2.5 Реакция прямой гемагглютинации (ГА)**

Реакцию гемагглютинации проводили в 0,01 М PBS pH 7,5 в 96 – луночных U – образных планшетах для иммунологических реакций (Nunc, Denmark). Готовили ряд двукратных разведений по 0,025 мл лектин – содержащего раствора в 0,01 М PBS pH 7,5. Затем добавляли 0,025 мл 2 % суспензии эритроцитов человека и кролика. Реакцию агглютинации оценивали визуально через 30-60 мин при комнатной температуре. За титр ГА принимали последнее разведение, где еще наблюдалась ГА.

#### **2.2.6 ДСН - электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ)**

Электрофорез в ПААГ проводили по методу Лэммли [102] на приборе EPS 301 (Amersham pharmacia biotech, Sweden), используя 12,5 % разделяющий и 4 % концентрирующий ПААГ в присутствии 0,1 % ДСН. Образцы готовили в

буфере, содержащем 0,2 % ДСН в отсутствии или присутствии дитиотреитола (ДТТ). В качестве стандартов использовали набор рекомбинантных высокоочищенных белков (Fermentas, EU). Гель прокрашивали Coomassie G-250 при 55 °С.

### **2.3 Методы выделения и очистки MTL**

#### **2.3.1 Сбор сырья**

Мидию *Mytilus trossulus* собирали на Морской экспериментальной станции ТИБОХ (побережье б. Троица, залив Посьета, Японское море). Мантию мидии отделяли и хранили в замороженном виде при -18 °С.

#### **2.3.2 Определение титра ГА в экстрактах органов и гемоцитах моллюска *M. trossulus***

Для получения лектин-содержащего экстракта органы (мантию, жабры, гепатопанкреас, гонады, мускул, гемоциты) гомогенизировали, лектин экстрагировали трехкратным объемом 0,01 М PBS pH 7,5 в течение 12 ч при 4 °С при перемешивании. Полученный экстракт фильтровали через капроновую ткань и центрифугировали в течение 30 минут при 8000 об/мин (центрифуга К-23, Janetzki, ГДР). Гемоциты получали центрифугированием гемолимфы при 2000 об/мин 15 мин. Полученную надосадочную жидкость удаляли, осадок суспендировали в 0,01 М PBS pH 7,5 и для разрушения клеточной стенки гемоциты центрифугировали при 15000 об/мин 30 мин, дальнейшую работу проводили с супернатантом. Активность лектина в супернатантах определяли методом ГА.

#### **2.3.3 Получение гидролизованной Сефарозы 4В (H<sup>+</sup>-сефарозы)**

Гидролизованную сефарозу получали по методике Эрссона [103]. 50 мл Сефарозы 4В (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden) промывали несколько раз 0,2 М HCl. К 50 мл геля добавляли 100 мл 0,2 М HCl и инкубировали 2 ч при 50 °С. Переносили гель на фильтр Шотта и отмывали

дистиллированной водой до нейтрального значения pH, после чего промывали еще несколькими объемами 0,01 М PBS pH 7,5. Хранили в этом же буфере с добавлением азидата натрия при температуре 4 °C.

### **2.3.4 Аффинная хроматография**

Аффинную хроматографию проводили в объеме, смешивая экстракт мантии с гидролизованной сефарозой в соотношении 1:1 (v/v). Связывание с сорбентом проводили в течение 24 ч при 4 °C при перемешивании. Полноту связывания с сорбентом оценивали реакцией ГА, определяя активность лектина в надосадочной жидкости. Сорбент отмывали тем же буфером от белка (до нулевой адсорбции при 280 нм) и от полисахаридов (проверяли фенол-сернокислотным методом). Элюцию лектин-содержащей фракции проводили 0,01 М PBS, содержащим 0,2 М галактозы. Связанную фракцию диализовали от галактозы против 0,01 М PBS в течение 24 ч при 4 °C, анализировали методом ГА, концентрировали в центриконах (Regenerated Cellulose 10000 Mw, Amicon, Millipore) в течение 30 мин при 4000 об/мин. Общее содержание белка определяли методом Бредфорда, используя для построения калибровочной кривой BSA.

### **2.3.5 МАЛДИ масс-спектрометрия**

Образцы MTL анализировали на масс-спектрометре Ultraflex III MALDI-TOF/TOF (Bruker, Germany) с импульсным УФ-лазером (энергия импульса 100 мДж, 337 нм). В качестве матрицы использовали синапиновую кислоту (sinapinic acid).

## **2.4 Физико-химические характеристики MTL**

### **2.4.1 Определение термостабильности MTL**

Аликвоты MTL объемом 0,05 мл выдерживали в течение получаса в термостате при температурах 4, 20, 30, 40, 50, 60, 70 и 80 °C, после чего оценивали активность лектина реакцией ГА при комнатной температуре.

#### **2.4.2 Определение pH-зависимости активности MTL**

Аликвоты MTL объемом 0,5 мл диализовали против 50 мл буферного раствора при комнатной температуре без перемешивания в течение 1 ч. Буферные растворы: 0,05 М цитратный буфер (pH 4,0; 5,0), 0,05 М PBS (pH 7,5; 8,0), 0,1 М ацетатный буфер (pH 9,0; 10,0). Аликвоты диализовали в течение 24 ч против 0,01 М PBS (pH 7,5) при 4 °С. Активность лектина оценивали реакцией ГА.

#### **2.4.3 Определение металл - зависимости активности MTL**

Раствор MTL объемом 0,5 мл диализовали против 0,01 М TBS (0,01 М трис + 0,15 М NaCl, pH 7,5) в присутствии 0,02 М ЭДТА при 4 °С в течение 12 ч. Затем диализовали против 0,01 М TBS в течение суток. Далее готовили в планшете ряд двукратных разведений по 0,025 мл в 0,01 М TBS с добавлением 0, 1, 5, 10, 20 mM CaCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>. Инкубировали в течение часа при комнатной температуре и оценивали активность лектина реакцией ГА.

#### **2.4.4 Определение углеводной специфичности MTL**

Анализ проводили в U-образных планшетах (Nunc, Denmark). Предварительно в лунках планшета готовили ряд двукратных разведений моно- и полисахаридов (Gal, GalNAc, Glc, GlcNAc, Fuc, Lac, Man, LacNAc, маннан) и гликопротеинов (PSM, OVA, BSM, фетуин, асиалофетуин) по 0,025 мл. Затем вносили по 0,025 мл тестируемого раствора лектина в подобранной концентрации, инкубировали 1 ч и добавляли по 0,025 мл 2% суспензии эритроцитов. Значение минимальной концентрации каждого моносахарида или гликопротеина, необходимого для полного ингибирования реакции ГА, оценивали визуально.

### **2.4.5 Трипсинолиз MTL в геле**

После ДСН-электрофореза в ПААГ гель прокрашивали кумасси G-250 и вырезали белковые полосы. Далее гель отмывали от красителя (дважды по 30 минут смесью 1:1 ацетонитрила и 0,05 М карбоната аммония и единожды в течение 20 минут ацетонитрилом, отбирая жидкость после каждого шага) и высушивали. Высушенные полосы геля подвергли воздействию трипсина в течение 12 часов при 37 °С, полученные пептиды и пептиды, дополнительно экстрагированные из геля ацетонитрилом, анализировали методом MALDI-TOF масс-спектро스코пии.

Теоретический трипсинолиз проводили с использованием сервера ExPASy (<https://www.expasy.org/resources/findpept>).

## **2.5 Изучение тонкой углеводной специфичности лектина**

### **2.5.1 Биотинилирование MTL**

Для приготовления MTL меченого биотином использовали коммерческий набор (EZ-Link™ Sulfo-NHS-Biotinylation Kit, Thermo).

Готовили раствор MTL 1 мг/мл в буфере 0,1 М PBS pH 7,2, добавляли 2,66 мг биотина и оставляли инкубироваться на 24 ч при 4 °С. Затем наносили смесь на колонку (Zeba™ Spin Desalting Column, 5mL), центрифугируя 2 мин при 1000 об/мин. Далее определяли количество связанного биотина в НАВА калькуляторе, представленном на сайте Thermo Fisher Scientific: <https://www.thermofisher.com/ru/ru/home/life-science/protein-biology/protein-labeling-crosslinking/biotinylation/biotin-quantitation-kits/haba-calculator.html>

### **2.5.2 Определение тонкой углеводной специфичности**

Тонкую углеводную специфичность лектина определяли методом гликоэрея, разработанного для изучения гликан-белкового взаимодействия:

<http://www.functionalglycomics.org/static/consortium/resources/resourcecoreh.shtml>

Для получения матрицы на предметные стекла, активированные N-гидроксисукцинимидом (NHS), были нанесены 609 N- и O-связанных природных и синтетических гликанов млекопитающих с амиолинкерами, образующими ковалентные амидные связи. Количество биотинилированного MTL, связавшегося с каждым гликаном, определяли после добавления FITC-меченного стрептавидина и сканирования на приборе PerkinElmer ScanArray. Работа выполнена в Университете Эмори, Атланта, США на коммерческой основе.

## **2.6 Методы установления структуры MTL**

### **2.6.1 Установление первичной последовательности MTL**

Суммарную РНК выделяли из мантии мидии *M. trossulus* методом гуанидин-тиоцианат / фенол / хлороформ [104]. кДНК синтезировали из суммарной РНК и подвергали 21 циклу амплификации (95 °C - 10 с, 63 °C - 20 с, 72 °C - 90 с) с помощью набора SMART cDNA Amplification Kit (Clontech, США) в соответствии с инструкцией производителя. кДНК разводили в 15 раз и 1 мл этого раствора использовали для ПЦР. Амплификацию фрагмента кДНК MTL проводили с применением праймеров:

CGL-F: (5'-ATGTAYTTYCARTTTGATG-3')

CGL-R: (5'-CATRTTNTGYTCRTTNGGNG-3'),

созданных на основе пептидной последовательности MYFQFDVVDER и PPNETNM. ПЦР проводили с помощью набора Encyclo PCR Kit (Евроген, Россия). Амплификацию проводили в течение 35 циклов (95 °C - 10 с, 58 °C - 15 с, 72 °C - 20 с). Полученный ПЦР продукт размером 100 п.н. клонировали в плазмиде pTZ57R/T с использованием набора InsTAclone PCR Cloning Kit (Fermentas, Литва) и секвенировали нуклеотидную последовательность с помощью набора ABI Prism Big Dye Terminator 3.1 CycleSequencing Kit (Applied Biosystems, США) на секвенаторе ABI 3130xl (Applied Biosystems, США) в соответствии с рекомендациями и протоколами производителя. 3'- и 5'-



концевые области кДНК, кодирующей MTL, были амплифицированы с помощью ПЦР с ген-специфическими праймерами:

MTL-3race: (5'-GGAAAAATTGTCCATCCCTACG-3')

MTL-5race: (5'-CGTAGGGATGGACAATTTTCC-3'),

и клонированы, как описано выше. Анализ нуклеотидных последовательностей и выводение первичной структуры осуществляли при помощи программ CHROMAS, GENERUNNER и ExPASy.

### **2.6.2 Установление вторичной структуры MTL**

Спектры КД регистрировали на спектрополяриметре Jasco J-500A (Japan) в кварцевых кюветах с толщиной слоя 1 мм для пептидной области спектра и 1 см для ароматической. Прибор калибровали по 0,06 % раствору d-камфора-10-сульфоната аммония (Katayama Chemical, Japan). Отношение эллиптичностей полос при 192 и 290 нм составляло 2,05. В пептидной области спектра (190 – 240 нм) эллиптичность рассчитывали как эллиптичность среднего аминокислотного остатка, приняв молекулярную массу равной 117 Да, в единицах (град\*см<sup>2</sup>)/дмоль по формуле:  $[\theta] = ([\theta]_{\text{набл}} * S * 117) / (10 * c * l * P)$ , где S – чувствительность шкалы прибора, c – концентрация белка (мг/мл), l – длина оптического пути (мм), P – процентное содержание белка (0,987). Процентное содержание элементов вторичной структуры определяли с использованием программы CDPPro [30].

### **2.6.3 Установление пространственной структуры MTL методами компьютерного моделирования**

Фолдинг MTL был предсказан с использованием сервера PHYRE2:

<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>

Построение моделей пространственной структуры лектина проводили с использованием сервера SWISS-MODEL:

<https://swissmodel.expasy.org/interactive/>

Модель четвертичной структуры гомодимера MTL строили с помощью сервера SWISS-MODEL и компьютерной программы «Мое 2020.09» (<https://www.chemcomp.com>). В качестве прототипа использовали структуру CGL (PDB: 5F8S).

#### **2.6.4 Метод динамического рассеяния света**

Готовили растворы лектина в 0,01 М PBS с концентрацией 2 мг/мл, 0,2 мг/мл. Измеряли размеры частиц в растворах на приборе Malvern (Zeya sizer, Nano-ZS, USA) через 24 ч и 48 ч. Результаты обрабатывали в программе MS Excel.

#### **2.6.5 Выделение иммуноглобулинов IgG<sub>MTL</sub>**

Иммунную сыворотку получали как описано [105].

Готовили раствор антигена (MTL) с концентрацией 2 мг/мл. На 0-й, 7-й, 14-й, 28-й и 42-й день кролику весом 3-4 кг вводили смесь 0,05 мл раствора антигена и 0,05 мл неполного адьюванта Фрейда. Инъекцию проводили в подколенную ямку задних ног, под конъюнктивы глаз, вдоль обеих сторон позвоночника, подкожно в лопаточную область слева и справа и внутривенно в ушную вену. На 50-й день отбирали 45 мл крови из краевой ушной вены и определяли титр полученных антител.

Выделение антител проводили по методике [105]. К 20 мл сыворотки добавляли 5 г  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , инкубировали 20 ч при комнатной температуре. Осадок отделяли центрифугированием в течение 30 мин при 4000 об/мин. Осадок промывали дважды 1,75 М раствором  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  и растворяли в 3 мл дистиллированной воды. Диализ раствора антител проводили в два этапа: 12 ч при 4 °С против дистиллированной воды, 24 ч против 0,05 М ацетатного буфера pH 5,0, двухэтапный диализ повторяли дважды. Затем раствор антител центрифугировали 30 мин при 4500 об/мин и наносили на заряженную, уравновешенную 0,05 М ацетатным буфером колонку с сефадексом DEAE A-50 (2×30 см). Антитела элюировали тем же ацетатным буфером, регистрируя

оптическую плотность фракций на спектрофотометре при 280 нм. Фракции, содержащие белок, диализовали против дистиллированной воды в течение 24 ч при 4 °C, затем лиофильно высушивали и проводили иммунодиффузию.

#### **2.6.6 Двойная радиальная иммунодиффузия по Ухтерлони**

1,5 г агара растворяли в 100 мл 0,01 М PBS, pH 7,2. Смесь нагревали на водяной бане до растворения агара. Горячий раствор наносили на предметные стекла по 4,5 мл и оставляли застывать. До использования готовые пластины хранили во влажной камере. Перед использованием в геле специальным штампом вырезали лунки, которые заполняли растворами исследуемых веществ и оставляли на ночь во влажной камере при комнатной температуре. Результат наблюдали визуально по образованию полос преципитации [106].

#### **2.6.7 Получение конъюгатов IgG<sub>MTL</sub> и MTL с пероксидазой хрена**

Конъюгат получали перйодатным методом [107].

2 мг пероксидазы хрена растворяли в 0,5 мл дистиллированной воды и добавляли 0,1 мл 0,1 М NaIO<sub>4</sub>. Инкубировали 30 мин в темноте при комнатной температуре. Окисленную пероксидазу диализовали ночь против 1 л 0,001 М ацетатного буфера pH 4,4. 4 мг IgG<sub>MTL</sub> растворяли в 0,5 мл 0,1 М карбонатного буфера pH 9,5, смешивали с раствором окисленной ПХ. Конъюгат инкубировали 2 ч при комнатной температуре и добавляли 0,05 мл раствора NaBH<sub>4</sub>, концентрация 4 мг/мл (раствор готовили непосредственно перед использованием), инкубировали еще 2 ч при комнатной температуре и переводили в 0,01 М PBS.

Для приготовления конъюгата MTL–ПХ применяли технологию, описанную выше, но с небольшими изменениями. Вместе с лектином добавляли 50 мМ Gal для защиты углеводов-связывающих участков. Полученный конъюгат диализовали от моносахарида против 1 л дистиллированной воды в течение суток при 4 °C. К каждому конъюгату добавляли 1 мл глицерина, в соотношении 1:1, и хранили при -18 °C.

## 2.7 Методы получения рекомбинантного MTL

### 2.7.1 Выделение мРНК из мантии *M. trossulus* и синтез кДНК

Суммарная РНК была выделена из мантии мидии *M. trossulus* с использованием набора ExtractRNA (Евроген, Россия). Целостность РНК оценивали с помощью электрофореза в агарозе, концентрацию и степень чистоты определяли спектрофотометрически. Синтез и получение амплифицированной кДНК проводили, используя 1 мкг суммарной РНК, обработанной ДНКазой I (Thermo Fisher, США), и набора реактивов MMLV RT (Евроген, Россия).

### 2.7.2 Амплификация структурного гена белка

Амплификацию гена MTL проводили с использованием набора EncycloTaq Polymerase (Евроген, Россия), кДНК и ген-специфических праймеров:

MTL-Sac-dir (5' - TATAGAGCTCAATGACAACGTTTCTTATCAA - 3') и

MTL-Sal-stop-rev (5' - TATAGTCGACTTAGTAGGCATA - 3').

ПЦР проводили в амплификаторе (Eppendorf, Германия) по следующей схеме:

(95 °C – 15 с, 60 °C – 15 с, 72 °C – 30 с) × 35 циклов.

Температура отжига праймеров 60 °C. ПЦР-продукты анализировали с помощью горизонтального электрофореза в 1 % агарозном геле.

### 2.7.3 Получение генетических конструкций

ПЦР продукты и плазмидный вектор pET-40b (+) (Novagen, Германия) были обработаны эндонуклеазами рестрикции (SacI, SalI). На 0,05 мл инкубационной смеси вносили 5 ед. рестриктазы (0,005 мл 10× буфера для рестрикции и 1 мкг ДНК). Смесь инкубировали 4 ч при 37 °C. Для более эффективного лигирования фрагментов в вектор последний обрабатывали высокоактивной щелочной фосфатазой (CmAP, РИВОС ДВО РАН) [108].

Лигирование ПЦР-фрагментов в экспрессионный вектор осуществляли с помощью ДНК-лигазы T4 (Thermo Fisher Scientific, США). Для этого 0,02 мл инкубационной смеси, содержащей 5× солевой буфер для ДНК-лигазы, 4 ед. ДНК-лигазы фага T4 (Thermo Fisher Scientific, США), 5 нг вектора и 10 нг ПЦР-фрагментов инкубировали 12 ч при 14 °С.

Компетентные клетки *E. coli* штамма DH5α трансформировали лигазной смесью методом теплового шока (Heat - Shok) [109]. Клетки выращивали на агаризованной среде LB (на 1 л: 10 г бактотритона, 5 г экстракта дрожжей, 10 г NaCl, 15 г бактериологического агара) с канамицином (25 мг/мл). Методом ПЦР отбирали трансгенные колонии с использованием стандартных T7 праймеров:

T7-F (5'- TAATACGACTCACTATAGGG - 3')

T7-R (5'- GCTAGTTATTGCTCAGCGG - 3')

Далее выбранные колонии выращивали в 20 мл жидкой среды LB (без бактериологического агара) с канамицином (25 мг/мл). Рекомбинантные плазмиды выделяли с использованием набора Plasmid Miniprep (Евроген, Россия) по методике, рекомендованной производителем. Количество и чистоту плазмид анализировали при помощи 1% агарозного гель-электрофореза в трис-ацетатном буфере (2 М трис, 50 мМ ЭДТА, 1 М уксусной кислоты, pH 8.4.).

Секвенирование ПЦР-фрагментов и рекомбинантных плазмид проводили с использованием T7 праймеров и коммерческого набора реактивов BigDye™ Terminator v.3.1 на генетическом ДНК анализаторе ABI 3130xl (Applied Biosystems, США) в соответствии с рекомендациями и протоколами производителя. Нуклеотидную последовательность анализировали с помощью программ GENERUNNRE, CHROMAS.

#### **2.7.4 Экспрессия рекомбинантного MTL**

Для экспрессии генов в системе pET использовали компетентные клетки *E. coli* штамма Rosseta DE3. Трансформацию рекомбинантной плазмиды в компетентные клетки проводили методом теплового шока (Heat-Shok) [109]. 0,2

мл компетентных клеток инкубировали во льду в течение 20 мин, затем помещали в термостат (42 °C) на 90 с и быстро охлаждали во льду. Далее к смеси добавляли 400 мкл питательной среды LB, инкубировали 60 мин при 37 °C. Центрифугировали при 3000 об/мин, 2 мин. Осадок суспендировали и высеивали на агаризованную (1,5%) LB среду, содержащую 25 мкг/мл канамицина.

Клетки, содержащие рекомбинантные плазмиды, выращивали в течение ночи при 37 °C на чашке с агаризованной LB средой с 25 мкг/мл канамицина. Отдельную колонию собирали и помещали в колбу с 25 мл среды LB и выращивали в шейкер-инкубаторе в течение 12 ч при 37 °C с перемешиванием при 250 об/мин. Ночную культуру переносили в 1 л свежей среды MX, содержащей триптон (10 г/л), дрожжевой экстракт (7,5 г/л),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (2,3 г/л),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (12,5 г/л),  $\text{MgCl}_2$  (0,9 г/л), глицерин (4 мл/л), сорбит (72 г/л) [110]. Когда оптическая плотность суспензии клеток при длине волны 600 нм достигала 0,8, к бактериальной культуре добавляли 0,2 мМ индуктора IPTG и продолжали инкубацию при 18 °C до 24 ч при 250 об/мин. Трансформированные пустой плазмидой pET-40b (+) клетки *E. coli* Rosetta (DE3) использовали в качестве контроля экспрессии.

### 2.7.5 Очистка рекомбинантного MTL (r-MTL)

Очистку белков проводили при 4 °C. Собранные клетки *E. coli* Rosetta (DE3) / MTL40 ресуспендировали в 150 мл 0,02 М PBS, pH 7,4 и полностью лизировали ультразвуковой обработкой, затем центрифугировали при 10000 об/мин в течение 10 мин при комнатной температуре. Супернатант инкубировали на льду в течение 2-4 ч, а затем центрифугировали при 10000 об/мин в течение 20 мин. Осадок промывали 0,02 М PBS pH 7,4 3 раза и растворяли в 150 мл 0,01 М PBS, pH 7,4, содержащего 5,5 М мочевины и 0,003 М имидазол. После центрифугирования супернатант наносили на колонку IMAC Ni-Charged resin (Bio-Rad, США) уравновешенную 10 мМ PBS буфером, pH 6,0, содержащим 5,5 М мочевины и 0,01 М имидазола. Элюирование

проводили линейным градиентом концентрации имидазола до 0,15 М в том же буфере. Фракции, содержащие рекомбинантный белок, объединяли и диализовали в течение ночи в 0,02 М PBS, pH 7,4. Концентрацию лектина определяли методом Бредфорда, а чистоту - методом электрофореза в ПААГ. Раствор лиофильно сушили и хранили при 4 °С.

Сравнительный анализ элементов вторичной структуры нативного и рекомбинантного MTL проводили методом КД спектроскопии.

### **2.7.6 Изучение активностей нативного MTL и rMTL методами иммуноферментного анализа (ИФА) и ГА**

На 96-луночный планшет (Nunc, Denmark) адсорбировали PSM по 0,1 мл в лунку 10 мкг/мл в 0,01 М PBS pH 7,5. Инкубировали ночь при 4 °С, после чего промывали 3 раза отмывочным буфером (PBS/T: 0,01 М PBS pH 7,5 + 0,05% Tween-20). Блокировали свободные места связывания на планшете 1 % раствором BSA в 0,01 М PBS pH 7,5, по 0,3 мл в лунку планшета в течение 2 ч при 37 °С с перемешиванием и отмывали PBS/T. В отдельном планшете готовили ряд двукратных разведений нативного MTL и r-MTL от 400 мкг/мл до 0 мкг/мл, наносили в заблокированные лунки в дубликатах по 0,1 мл в 0,01 М PBS pH 7,5. Инкубировали 1 ч при 37° С с перемешиванием и отмывали PBS/T. Затем в каждую лунку добавляли по 0,1 мл конъюгата IgG<sub>MTL</sub>-ПХ в PBS/T в заранее подобранном разведении (1:800). Инкубировали 1 ч при 37 °С с перемешиванием, отмывали. Количество связавшегося лектина определяли, добавляя по 0,1 мл субстрата ТМБ (3,3',5,5'-тетраметилбензидин) 10 мг/мл в каждую лунку. Оптическое поглощение при 450 нм измеряли на спектрофотометре (μQuant, BioTek Instruments, USA) после остановки реакции 5 % серной кислотой, добавленной по 0,05 мл в каждую лунку.

Сравнение активности рекомбинантного и нативного MTL проводили методом ГА согласно п. 2.2.4.

## 2.8 Методы исследования биологической активности MTL

### 2.8.1 Изучение распределения MTL по органам мидии методом ИФА

Из образцов органов мидии (мантия, мускул, гепатопанкреас, жабры, гонады, гемоциты) готовили экстракты в 0,01 М PBS pH 7,5 (соотношение образца к PBS 1:3). Содержание лектина в экстрактах определяли методом ИФА. На 96-луночный планшет (Nunc, Denmark) адсорбировали IgG<sub>MTL</sub> в концентрации 1 мкг/мл в 0,01 М PBS. Инкубировали ночь при 4 °С, отмывали планшет и блокировали 1 % раствором BSA как описано ранее (п. 2.7.6.). Добавляли по 0,1 мл экстракта в лунку в трипликатах, инкубировали 1 ч при 37 °С, отмывали планшет. Затем в лунку добавляли 0,1 мл конъюгата IgG<sub>MTL</sub> - ПХ (200 нг/мл) в PBS/Т и инкубировали 1 ч при 37 °С, отмывали и определяли ферментативную активность как в п. 2.7.6. Количество MTL в каждом образце устанавливали по калибровочной кривой, в качестве стандарта использовали чистый образец MTL. Результаты представляли как среднее значение  $\pm$ SD.

### 2.8.2 Определение уровня лектина в ответ на заражение мидии дрожжами и бактериями

Исследование проводили на Морской экспериментальной станции (МЭС) Тихоокеанского института биоорганической химии ДВО РАН в б. Троица (зал. Посъета, Японское море). Материалом для исследования служили мидии *M. trossulus* (Gould, 1850) трехлетнего возраста, длиной около 7 см и весом 23-25 г, выращиваемые в культуре. 84 отобранных мидий были помещены в аквариумы для акклиматизации при постоянной температуре 18 °С и солености воды 32 ‰ в течение 4 суток. Контрольную группу мидий (28 особей) иммунизировали 0,01 М PBS pH 7,5, вкалывая в аддуктор по 0,2 мл раствора. Первую опытную группу (28 особей) иммунизировали в аддуктор суспензией дрожжей *P. pastoris*, разведенных стерильным раствором 0,01 М PBS до ОП<sub>600</sub> = 0,4, так же, как и контрольную. Мидий второй опытной группы (28 особей) иммунизировали аналогичным образом, вкалывая по 0,2 мл суспензии бактерий *V. proteolyticus*, также разведенных стерильным раствором 0,01 М PBS до ОП<sub>600</sub>



= 0,4. Животные были возвращены в аквариумы. Затем через 0, 0,5, 3, 6, 12, 24 и 48 ч готовили экстракты из мантии 4-х особей каждой группы и анализировали на лектинную активность методом ИФА как в п. 2.8.1.

### **2.8.3 Взаимодействие MTL с различными патоген-ассоциированными молекулярными паттернами**

На 96-луночный разборный планшет (Nunc, Denmark) в концентрации 50 мкг/мл в 0,01 М PBS pH 7,5 в дубликатах по 0,1 мл в лунку наносили патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (ПАМП:  $\beta$ -1,3-глюкан, LPS и пептидогликан), а также PSM и BSA в качестве положительного и отрицательного контролей соответственно. Инкубировали при 4 °C в течение ночи, а лунки с ПАМП дополнительно 2 ч при 60 °C. После промывки и блокирования свободных мест связывания (п. 2.7.6.) наносили по 0,1 мл конъюгата MTL-ПХ в концентрациях от 10 мкг/мл до 0,3135 мкг/мл в PBS/Т. Инкубировали 1 ч при 37 °C с перемешиванием, отмывали планшет и определяли количество связавшегося лектина путем измерения оптической плотности после добавления субстрата к ферменту, как описано в п. 2.7.6.

### **2.8.4 Противомикробная активность MTL**

Грамположительные (*S. aureus* и *B. subtilis*), грамотрицательные бактерии (*E. coli* и *V. proteolyticus*), а также дрожжевые грибы (*P. pastoris*) были предоставлены д.б.н. Недашковой Ольгой Ильиничной, лаборатория микробиологии ТИБОХ ДВО РАН. Бактерии культивировали ночь на агаре в культуральной среде LB. Далее все микроорганизмы центрифугировали при 4000 об/мин и дважды отмывали стерильным 0,01 М PBS. Для дальнейших экспериментов клеточные суспензии разводили до  $ОП_{600}=0,8 - 1$ , что соответствует количеству клеток от  $2 \times 10^8$  до  $2 \times 10^{10}$  в мл.

### **2.8.4.1 Противомикробная активность**

#### **2.8.4.1.1 Определение связывания лектина с микробами и дрожжами с использованием метода электроблоттинга**

Анализ проводили как описано [111]. К 0,05 мл суспензий клеток (см. п. 2.8.4.) добавляли по 0,05 мл лектин-содержащего раствора (500 мкг/мл), инкубировали 1 час при комнатной температуре. Далее осаждали клетки центрифугированием в течение 5 мин при 4000 об/мин, промывали стерильным 0,01 М PBS. Повторяли процедуру 4 раза для удаления несвязавшегося лектина. Для разрушения клеточных стенок их обрабатывали 7 % ДСН в течение 1 мин, центрифугировали при 10000 об/мин. Супернатант подвергали электрофоретическому разделению в ПААГ. Белки под действием электрического тока переносили на PVDF мембрану методом сухого переноса (электроблоттинг) на приборе Trans-Blot Turbo (BIO-RAD, USA). Свободные места связывания на мембране блокировали 1 % раствором BSA в 0,01 М PBS pH 7,5 в течение ночи. Затем мембрану инкубировали 1 ч с конъюгатом IgG<sub>MTL</sub>-ПХ с концентрацией 100 мкг/мл. После отмывания мембраны наличие лектина выяляли в присутствии хромогенного субстрата диаминобензидином (ДАБ) (3 мг ДАБ и 10 мкл 30 % перекиси водорода в 10 мл 0,01 М PBS).

#### **2.8.4.1.2 Агглютинация микроорганизмов лектином**

Эксперимент проводили как описано в [112]. К 0,025 мл клеточных суспензий (см. п. 2.8.4.) добавляли по 0,025 мл раствора лектина до конечной концентрации 0,2 мг/мл и инкубировали в течение 60 мин при 15 °С. В качестве контроля использовали клетки в стерильном 0,01 М PBS. Результат агглютинации оценивали с помощью светового микроскопа (AxioCam MRc (Zeiss) с увеличением в 400 и 1000 раз.

#### **2.8.4.1.3 Ингибирование роста микробиальных клеток**

Влияние лектина на рост микроорганизмов оценивали методом турбодиметрии [111]. Бактериальные клетки с ОП<sub>600</sub>=0,8-1 дополнительно

разводили стерильным 0,01 М PBS в 200 раз. На 96-луночный планшет в триплетах наносили по 0,05 мл клеточных суспензий и лектин-содержащего раствора до конечной концентрации 0,2 мг/мл. В качестве контроля использовали клетки в стерильном 0,01 М PBS. Клетки инкубировали 24 ч при комнатной температуре при перемешивании, измеряя мутность растворов при ОП<sub>600</sub> через разные промежутки времени (0,5, 1, 3, 6, 9, 12 и 24 ч).

#### **2.8.4.1.4 Влияние лектина на образование биопленок**

Влияние лектина на образование биопленок проводили как описано в [113]. Наносили на 96-луночный планшет в триплетах по 0,1 мл клеточных суспензий и лектин-содержащего раствора до конечной концентрации 0,1 мг/мл и инкубировали в течение суток при 37 °С. Слабо прикрепленные клетки дважды отмывали 0,15 М NaCl 2 раза, нанося по 0,2 мл в лунку. Оставляли на воздухе до высыхания. Далее клетки фиксировали, инкубируя их 15 мин в 99 % метаноле (по 0,2 мл). Удаляли метанол и высушивали на воздухе при комн. температуре. Далее клетки инкубировали 5 мин с 0,2 мл 1 % кристаллическим фиолетовым, промывали от красителя дистиллированной водой и высушивали в течение 20 мин. Для перехода красителя из прикрепленных клеток в раствор в каждую лунку добавляли по 0,2 мл 33 % уксусной кислоты. Измеряли оптическую плотность при 590 нм.

#### **2.8.4.2 Антифунгальная активность**

Грибы, ассоциированные с мидией *M. trossulus*, были получены д.б.н. Пивкиным Михаилом Викторовичем, сотрудником лаборатории микробиологии ТИБОХ ДВО РАН из донных отложений мест обитания моллюска. В колбы емкостью 250 мл вносили 100 мл жидкой среды Тубаки, засеивали суспензию спор и выращивали при комнатной температуре в течение 7 суток на вращательной качалке Gerhardt S-5 (Germany) при 160 об/мин. Полученный мицелий отбирали, отмывали несколько раз 0,01 М PBS pH 7,5,

центрифугировали в течение 5 мин при 2700 об/мин. К осадку добавляли 0,01 М PBS pH 7,5 до величины оптической плотности 0,8 при длине волны 700 нм.

#### **2.8.4.2.1 Связывание и ингибирование связывания MTL с грибами**

На планшет (Nunc, Denmark) наносили по 0,05 мл мицелий разведенных до оптической плотности 0,8 при длине волны 700 нм, для адсорбции инкубировали в течение 24 ч при комнатной температуре. Не адсорбированные образцы удаляли, а адсорбированные фиксировали, инкубируя планшет при 75 °С в течение 50 мин. Отмывали планшет PBS/Т и блокировали 1 % BSA в 0,01 М PBS pH 7,5. Затем наносили по 0,1 мл конъюгата MTL-ПХ в концентрации 2,5 мкг/мл в PBS/Т. Параллельно для определения характера связывания лектина с грибами наносили 0,1 мл конъюгата MTL-ПХ с добавлением ингибитора – галактозы в концентрации от 10 мг/мл до 0,3135 мг/мл. Ферментативную активность определяли, как в п. 2.7.6. Значение ингибирующей активности галактозы рассчитывали по уравнению:

$$\text{ИА} = \frac{\text{ОП при 700 нм}}{\text{ОП (контр.) при 700 нм}} * 100 \%$$

где ИА – ингибирующая активность (%), ОП при 700 нм – оптическая плотность образца в присутствии ингибитора, ОП (контр.) при 700 нм – оптическая плотность образца без ингибитора.

Концентрацию ингибитора, снижающую связывание лектина на 50%, определяли по графику, отражающему зависимость ингибирующей способности от концентрации ингибитора.

#### **2.8.4.2.2 Влияние MTL на рост конидий грибов**

Грибы выращивали в течение суток в жидкой среде Тубаки в присутствии раствора MTL в 0,01 М PBS (0,5 мг/мл) (опытная группа) и в его отсутствии (контрольная группа).

Действие MTL на рост конидий грибов определяли двумя методами.

1. Конидии грибов, выращенные в присутствии и отсутствии MTL, суспендировали в морской воде и вносили по 0,1 мл в лунку на планшет и интенсивность прорастания конидий грибов измеряли как мутность растворов при 600 нм ( $\mu$ Quant, BioTek Instruments, USA).

2. Длины гиф в контроле и образце измеряли под микроскопом (Olympus System BX 60). О влиянии MTL на рост конидий судили по торможению гифального роста по сравнению с контролем. В качестве контроля случайным образом были выбраны 50 конидий из экспериментальных групп и оценены на прорастание с помощью микроскопа. Конидии, имеющие одну гифальную нить, по крайней мере, в два раза длиннее непроросших конидий, считались успешно проросшими.

#### **2.8.4.3 Цитокин-стимулирующая активность лектина**

Цитокин-стимулирующую активность изучали при спонтанной и индуцированной продукции на клетках цельной крови человека. Цельную гепаринизированную кровь донора разводили в 5 раз клеточной средой RPMI 1640 и разделяли на две части. Одну часть стимулировали LPS в концентрации 10 мкг/мл в течение 30 мин при 37 °C и перемешивании. Стимулированные и нестимулированные клетки наносили на 96-луночный планшет (Costar, USA) по 0,15 мл в лунку, далее добавляли по 0,15 мл раствора MTL, приготовленного на среде RPMI 1640 в концентрации 5 и 80 мкг/мл. В качестве контроля использовали стимулированные и нестимулированные клетки, к которым вместо лектин-содержащего раствора добавляли 0,15 мл среды RPMI 1640. Планшет инкубировали в течение 24 ч при 37 °C в 5 % атмосфере CO<sub>2</sub>, далее клетки осаждали центрифугированием в течение 10 мин при 1500 об/мин.

Уровень цитокинов в надосадочной жидкости определяли методом иммуноферментного анализа с использованием тест-систем для определения INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10 по методике производителя (DuoSet R&D Systems, EU).

#### **2.8.4.4 Влияние MTL на жизнеспособность опухолевых клеток**

Культуры клеток различных линий лимфомы Беркета (Raji, Daudi, EB-1) в среде RPMI 1640 1X (среда разработанная в Roswell Park Memorial Institute для культивирования лейкемических клеток человека во взвешенном состоянии) с 10 % эмбриональной бычьей сывороткой (FBS) и бычьим инсулином (0,01 мг/мл) поддерживали в инкубаторе при 37 °C в среде 5 % CO<sub>2</sub>. Жизнеспособность клеток оценивали по восстановлению 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолин бромид (МТС-реагент) до его формазанового продукта. Для этого клетки высевали в 96-луночные планшеты с плотностью 5000 клеток на лунку и инкубировали при 37 °C в среде 5 % CO<sub>2</sub> в течение 24 ч. Лектин-содержащие растворы добавляли в каждую лунку при различных концентрациях (12,5, 25, 50, 100 мкг/мл) и инкубировали в течение 48 ч. Затем в каждую лунку добавляли 0,01 мл МТС-реагента и инкубировали еще в течение 4 ч при 37 °C в среде 5 % CO<sub>2</sub>. Жизнеспособность клеток оценивали, измеряя оптическую плотность при 490/690 нм на спектрофотометре EMax Microplate Reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

#### **2.8.4.5 Влияние MTL на клеточный цикл клеток линии Raji лимфомы Беркитта**

Методом проточной цитометрии с окрашиванием йодидом пропидия (PI) проводили анализ клеточного цикла. Клетки лимфомы Беркитта (Raji) в количестве  $1 \times 10^6$  в 10 % FBS-RPMI 1640 подвергали воздействию разных концентраций MTL (от 0 до 500 мкг/мл) и инкубировали в течение 24 ч. Затем фиксировали в 70 % этаноле на льду в течение 2 ч. Клетки осаждали центрифугированием и промывали 0,01 М PBS pH 7,5, ресуспендировали в этом же буфере, содержащем 10 мкг/мл РНКазы и инкубировали при 37 °C в течение

1 ч. Далее добавляли 10 мкл PI в концентрации 1 мг/мл и анализировали клетки методом проточной цитометрии с использованием BD FACSCalibur (BD Biosciences, США).

## **2.9 Статистический анализ**

Экспериментальные результаты представлены как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение. Различия между средними значениями оценивали с помощью двустороннего t- критерия Стьюдента, при этом  $p < 0,05$  считали статистически значимым.

### 3 Результаты и обсуждение

#### 3.1 Выделение и очистка лектина из мидии *Mytilus trossulus*

Марикультурная мидия вида *M. trossulus* была собрана на Морской экспериментальной станции ТИБОХ ДВО РАН.

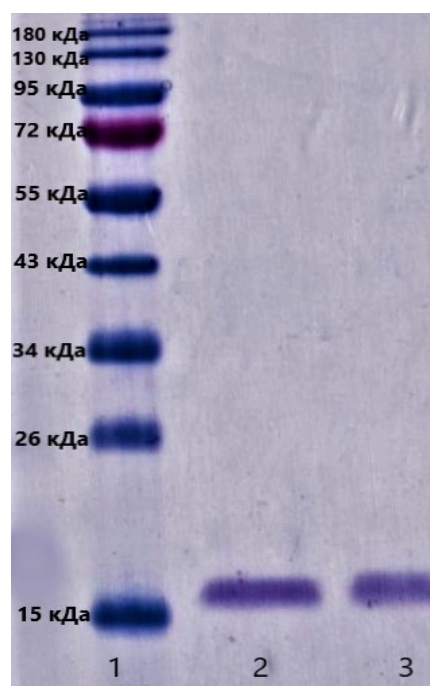
Определение содержания лектина в отдельных частях организма мидии проводили с помощью экстракции фосфатно-солевым буфером (PBS) (0,01 M pH 7,5) различных органов моллюска и последующего исследования гемагглютинирующей активности полученных экстрактов. Наибольшая лектинная активность наблюдалась в экстракте мантии мидии, при использовании трипсинизированных фиксированных эритроцитов кролика титр ГА составлял 1:1024, следовательно, для дальнейшего выделения лектина использовали мантию мидии.

Наиболее распространенным методом выделения лектинов является аффинная хроматография [114]. Для выбора аффинного сорбента изучали специфичность полученного экстракта к различным моносахаридам методом ингибирования ГА. Было установлено, что в экстракте мантии мидии присутствуют гемагглютинины со специфичностью к Gal, GalNAc и гликопротеину муцинового типа PSM. Предложенная нами ранее схема выделения лектина на аффинном сорбенте PSM-сефарозе не позволила получить MTL в количествах, достаточных для дальнейших исследований. Кроме того, для получения лектина в гомогенном состоянии требовалась дополнительная очистка методом гель-хроматографии [61]. В связи с этим, нами была разработана новая схема выделения MTL в одну стадию на аффинном сорбенте гидролизованной сефарозе 4В.

Сефароза, как известно, состоит из перекрестно сшитой агарозы, у которой при гидролизе идет частичный разрыв  $\beta$ -галактозидных связей с образованием концевых остатков галактозы, к которым MTL проявляет аффинитет. Выделение проводили методом аффинной хроматографии на гидролизованной сефарозе, элюируя лектин-содержащую фракцию PBS с добавлением 0,2 M Gal.



Гомогенность полученного белка проверяли методом ДСН-ПААГ электрофореза в присутствии и отсутствии дитиотреитола (ДТТ).



1 – стандарты молекулярных масс, 2 – фракция после аффинной хроматографии с ДТТ,

3 – фракция после аффинной хроматографии без ДТТ

Рисунок 2 – Электрофореграмма образца MTL после аффинной хроматографии на гидролизованной сефарозе, полученная методом ДСН-ПААГ электрофореза

Как видно из рисунка 2, после аффинной хроматографии на гидролизованной сефарозе был получен гомогенный белок, мономер которого имеет молекулярную массу около 17 кДа. Одинаковая подвижность полипептидных зон в образцах 2 и 3 свидетельствует об отсутствии дисульфидных связей в MTL. Анализ гемагглютинирующей активности показал, что полученный лектин проявляет высокую активность (титр ГА 1:512 от концентрации 0,1 мг/мл).

В таблице 1 представлены сравнительные данные по очистке лектина на всех стадиях по двум схемам выделения. Как видно из данных таблицы, разработанная схема не только упрощает выделение лектина, но и увеличивает выход и активность белка по сравнению с ранее используемой схемой.

Таблица 1 – Очистка лектина из мидии *M. trossulus*

№	Стадия очистки	Объем (мл)	Суммарный белок (мг)	Общая Г А (U)	Специфи- ческая активность (U/мг)	Степень очистки (раз)	Выход, мкг/г
Ранее используемая схема выделения MTL [115]							
1	Экстракция	60	284,5	15360	54	1	23
2	PSM - сефароза	22	2,7	704	261	5	
3	Гель- фильтрация на Sephacryl S-200	0,5	0,03	64	2133	40	
Вновь разработанная схема выделения MTL							
1	Экстракция	120	314	30720	97,8	1	250
2	H <sup>+</sup> - сефароза	40	2,6	20480	7876,9	80,5	

Общая ГА = Титр \* V<sub>общий</sub> (мл); Специфическая активность = Общая ГА/мг суммарного белка

Выход лектина при пересчете на один грамм мантии моллюска составил 250 мкг/г. Этот результат сопоставим с выходом лектинов из других морских двустворчатых моллюсков [116, 117, 44].

## 3.2 Физико-химические свойства MTL

### 3.2.1 Определение точной молекулярной массы MTL

Точная молекулярная масса лектина была определена методом масс-спектрометрии МАЛДИ (рисунок 3).

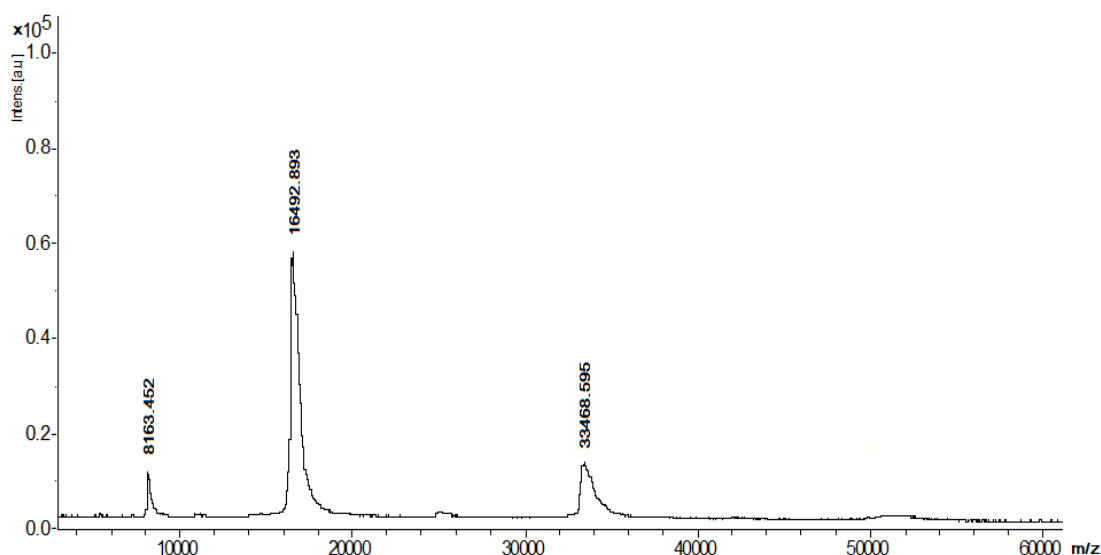


Рисунок 3 – МАЛДИ масс-спектр MTL

Согласно данным масс-спектра точная молекулярная масса мономера лектина составила 16492 Да, что подтверждает результат, полученный методом электрофореза (рисунок 2). Следует отметить, что лектин помимо мономерной формы может существовать и в форме димера, об этом свидетельствует пик однозарядного иона с массой 33468 Да. Лектины двустворчатых моллюсков способны образовывать олигомерные структуры, которые не содержат межцепочечные или внутрицепочечные дисульфидные связи. В качестве примера можно привести лектины из устрицы *Crassostrea gigas* (CGL1) [118] и из мидии *C. grayanus* (CGL) [11].

### 3.2.2 Изучение термостабильности, рН-зависимости и металлозависимости активности MTL

Влияние температуры, рН среды и ионов металлов на активность лектина изучали методом ГА. Установлено, что MTL является термолабильным, его активность полностью теряется после нагревания в течение 30 минут при 60 °C (рисунок 4). Утрата гемагглютинирующей активности при нагреве выше 50-60 °C характерна для лектинов морских двустворчатых моллюсков [49].

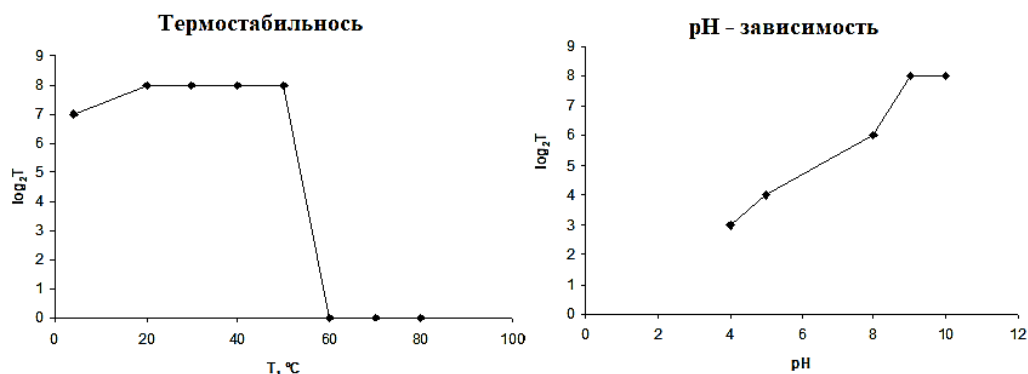


Рисунок 4 – Термостабильность и pH – зависимость активности MTL

При исследовании зависимости активности MTL от pH среды, обнаружено, что лектин сохраняет свою активность в широком диапазоне pH (рисунок 4). Следует отметить, что наибольший титр в реакции ГА наблюдался при pH раствора от 9 до 10. Напротив, снижение лектинной активности на 50 % обнаружено при pH 5-6 и на 75 % – при pH 4. Увеличение гемагглютинирующей активности одновременно с увеличением pH среды также характерно для лектинов мидии *C. grayanus* [44] и тропического моллюска *Ruditapes philippinarum* [117]. Для изучения металлозависимости активности MTL из лектин-содержащего раствора диализом против ЭДТА удаляли ионы металлов и проводили реакцию ГА в присутствии различных концентраций ионов кальция, цинка, марганца и магния. Установлено, что MTL способен вызывать агглютинацию эритроцитов вне зависимости от присутствия этих ионов металлов. Следовательно, исследуемый лектин является металлонеиндепендентным. Среди лектинов морских двустворчатых моллюсков встречаются как металлоиндепендентные, чаще всего  $\text{Ca}^{2+}$ , так и металлоиндепендентные. К металлоиндепендентным лектинам двустворчатых моллюсков относятся представители С-типа лектинов [119, 120, 121, 122], в их аминокислотной последовательности присутствуют консервативные сайты связывания иона металла: EPN и QPD / WND [123], в то время как, металлонеиндепендентные лектины не содержат подобных доменов [43, 52, 124].

### 3.2.3 Углеводная специфичность MTL

Важной характеристикой лектина является его углеводная специфичность, которая лежит в основе одной из систем их классификации. По результатам исследования установлено, что наибольший аффинитет MTL проявлял к Gal и GalNAc (таблица 2). Лучшими ингибиторами среди гликопротеинов являлись PSM и фетуин. Эти гликопротеины содержат О-связанные углеводные цепи муцинового типа с остатками Gal и GalNAc [125, 126].

Таблица 2 – Ингибирование гемагглютинирующей активности MTL углеводами и гликопротеинами

Ингибитор	Минимальная ингибирующая концентрация, мМ
Glc	55,5
GlcNAc	45,2
Gal	1,7
GalNAc	0,7
Lac	29,2
LacNAc	13
Man	н.и.
маннан from <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	н.и.
Fuc	60,9
OVA	н.и.
PSM	0,0156 мг/мл
BSM	н.и.
фетуин	0,0156 мг/мл
асиалофетуин	0,0156 мг/мл

н.и. – не ингибирует

Таким образом, согласно результатам ингибирования ГА MTL можно отнести к Gal/GalNAc-специфичным лектинам. В последнее время для более детального изучения углевод-белкового взаимодействия используется метод гликоэзрей [127].

### 3.2.4 Изучение тонкой углеводной специфичности MTL методом гликоэзрей

Тонкую углеводную специфичность изучали в Консорциуме по функциональной гликомике (США) методом микрочипов, используя 609 природных и синтетических гликанов млекопитающих, точечно адсорбированных на поверхности N-гидроксисукцинимид-активированной стеклянной подложке. Для этого был получен конъюгат лектина с биотином, специфичность связывания которого с углеводами была установлена по интенсивности флуоресценции после добавления FITC-меченного стрептовицина и детекции на сканирующем спектрофлуориметре.

Полученные данные были обработаны и сведены в таблицу, в которой представлены углеводные цепи, к которым лектин проявлял наибольшую специфичность (таблица 3).

Таблица 3 – Наиболее активные лиганды MTL

№ лиганда	Структура лиганда	Флуоресценция (%) <sup>1</sup>
587	Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-6(Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-2)Mana1-6(Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-2Mana1-3)Manb1-4GlcNAcb1-4(Fuca1-6)GlcNAcb-Sp24	100
585	Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-6(Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-2)Mana1-6(Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-2Mana1-3)Manb1-4GlcNAcb1-4(Fuca1-6)GlcNAcb-Sp24	78,2
581	Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-6(Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-2)Mana1-6(Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-2Mana1-3)Manb1-4GlcNAcb1-4(Fuca1-6)GlcNAcb-Sp24	70
332	Gala1-4Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb-Sp0	64,9
122	Galα1-4Galβ1-4Glcβ-Sp0	23,3
72	Fuca1-2Galβ1-4(Fuca1-3)GlcNAcb-Sp8	0,03

<sup>1</sup>Выражено в процентах от флуоресценции лиганда с самой высокой активностью

Установление профиля связывания гликанов показало, что MTL способен связывать гликановые цепи как с α-, так и с β-галактозой на невозстанавливающих концах, при этом более сильное взаимодействие наблюдалось с терминальной β-галактозой углеводных цепей сильно разветвленных гликанов.

Известно, что на аффинность связывания достаточно слабых лигандов может влиять плотность лиганда и концентрация белка. Если сродство

отдельных сайтов связывания к углеводам довольно слабое, то высокая avidность к более крупным субстратам может быть достигнута за счет кооперативного действия нескольких сайтов связывания [128]. Вероятно, на степень связывания MTL с лигандами влияет не только пространственная ориентация и вариабельность углеводов-связывающих сайтов лектина, в результате которых предпочтительней происходит связывание с  $\beta$  конфигурацией терминальной галактозы, но и разветвленность лиганда, которая приводит к мультифункциональному взаимодействию. Интересно отметить, что CGL, имеющий небольшие различия в CRD от MTL, обладает наибольшим сродством к  $\alpha$ -галактозе в слабо разветвленных гликанах [48].

### 3.3 Установление пространственной структуры MTL

#### 3.3.1 Первичная структура лектина из мидии *M. trossulus*

Для амплификации кДНК MTL использовали пару праймеров:

CGL-exp\_dir: 5'- ATGACAACGTTTCTTATCAAACACAAGGCCAGTG -3'

CGL-exp\_rev: 5'- GGCATAAACTAAAACGCGCTTGTCTTT-3',

которые сконструировали на основе структуры кДНК лектина мидии *S. grayanus* (CGL). Выбор праймеров был основан на том, что оба моллюска являются близкородственными видами и относятся к одному подсемейству моллюсков Mytilinae. Кроме того, методом ИФА установлена высокая степень перекрестной реактивности между CGL и MTL [129]. Это позволяет нам предположить, что гены, кодирующие одни и те же функциональные белковые молекулы, могут иметь высокую идентичность. На основе установленной нуклеотидной последовательности фрагмента кДНК были сконструированы олигонуклеотидные праймеры для амплификации концевых фрагментов кДНК лектина. В результате ПЦР с использованием этих праймеров был получен фрагмент кДНК длиной 450 п.н., который был клонирован в векторе pTZ57R/T и секвенирован. Таким образом, была получена последовательность из 150 аминокислотных остатков. Для подтверждения соответствия выведенной аминокислотной последовательности нативному белку был проведен

сравнительный анализ молекулярных масс пептидных фрагментов, полученных в результате практического трипсинолиза нативного лектина (рисунок 5) и теоретического трипсинолиза выведенной аминокислотной последовательности с помощью сервера ExPASy (таблица 4).

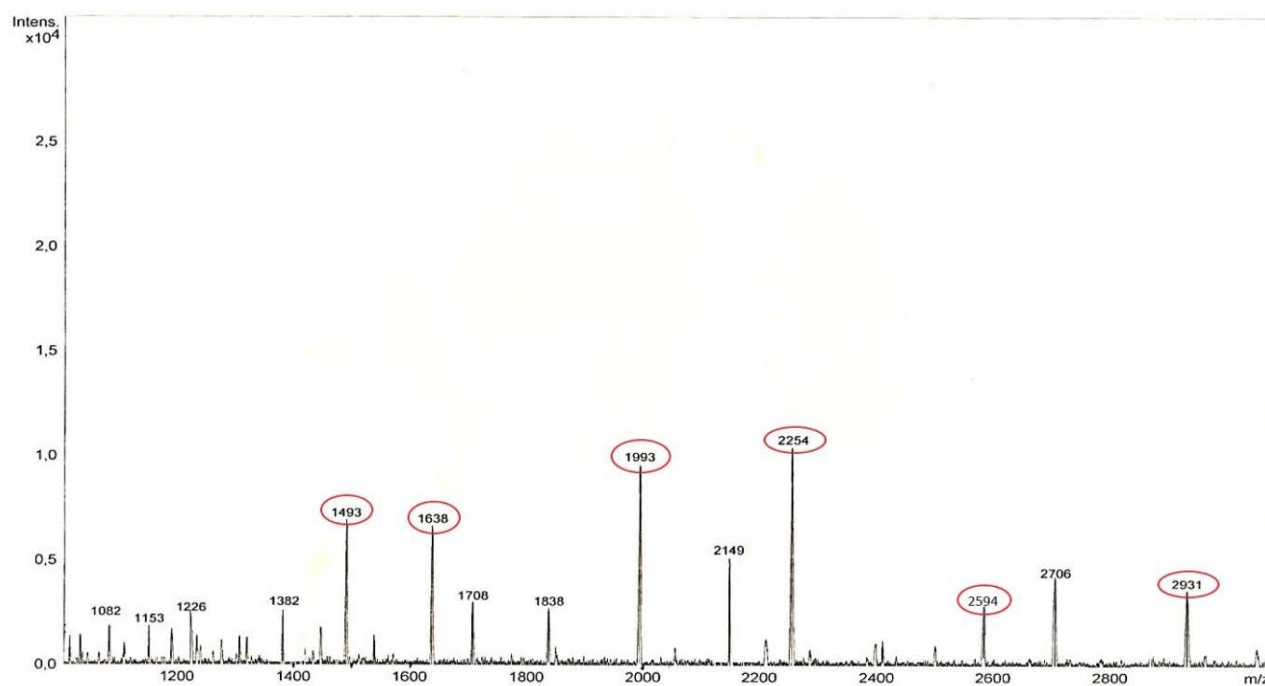


Рисунок 5 – МАЛДИ масс-спектр пептидов MTL, полученных в результате трипсинолиза

Таблица 4 - Анализ пептидных масс, полученных после трипсинолиза MTL

Фрагмент аминокислотной последовательности, соответствующий пептидной массе	Пептидные массы, после теоретического трипсинолиза, Да	Пептидные массы по данным MALDI-TOF, Да
GTNLVLHSDIHERMYFQFEVVNER	2933	2931
WRYIKHVA SEKIVHPFGGK	2252	2254
PLNGTNMVLHQDR	1494	1492
RALFAMDF FNDNIRHK	1994	1993
GGKYIHPKGGSKNPSN	1640	1638
NLTVMHGDEHGAMEFIFVSPKNK	2600	2584

Установлено, что выведенная аминокислотная последовательность соответствует нативному MTL. Поиск и анализ гомологичных



последовательностей с использованием программы BLAST позволил определить, что единственными известными на сегодняшний день структурными гомологами MTL являются CGL (83 % идентичности и 89% гомологии), MytiLec (84% идентичности и 88% гомологии) и MCL (84 % идентичности и 88% гомологии) (рисунок 6) [48].

MTL	1	MTTFLIKHKASGKYFHPKGGTSNPPNGTNLVLHSDIHERMYFQFEVVNERWRYIKHVASE	60
MCL	1	MTTFLIKHKASGKFLHPKGGSSNPANDTNLVLHSDIHERMYFQFDVDERWGYIKHAASG	60
MytiLec	1	TTFLIKHKASGKFLHPKGGSSNPANDTNLVLHSDIHERMYFQFDVDERWGYIKHAASG	59
CGL	1	MTTFLIKHKASGKFLHPYGGSSNPANNTKLVLHSDIHERMYFQFDVDERWGYIKHVASG	60
*****:*** **:*:*:*:*:*:*****:***:*****.***			
MTL	61	KIVHPPGGKADPLNGTNNMVLHQDRHDFAMDFNDNIRHKGGKYIHPKGGSKNPSNGN	120
MCL	61	KIVHPLGGKADPPNETKLVLHQDRHDFAMDFNDNIIHKAGKYVHPKGGSTNPPNET	120
MytiLec	60	KIVHPLGGKADPPNETKLVLHQDRHDFAMDFNDNIIHKAGKYVHPKGGSTNPPNET	119
CGL	61	KIVHPYGGQANPPNETNMVLHQDRHDFAMDFNDNIMHKGGKYIHPKGGSPNPPNET	120
*:*** **:*:*:*:*:*:*****:*****:***:*****.***			
MTL	121	LTVMHGDEHGAMEFIFVSPKNKDKRVLVYA	150
MCL	121	LTVMHGDKKHGAMEFIFVSPKNKDKRVLVYV	150
MytiLec	120	LTVMHGDKKHGAMEFIFVSPKNKDKRVLVYV	149
CGL	121	ETVIHGDKHAAMEFIFVSPKNKDKRVLVYA	150
**:*:*:*:* **:*:*:*:*:*:*****:*****:***:*****.***			

Желтым цветом обозначены идентичные а.о., зеленым цветом обозначены консервативные замены а.о., розовым цветом обозначены полуконсервативные замены а.о., белым цветом обозначены уникальные замены.

Рисунок 6 – Сравнение аминокислотных последовательностей MTL (UniProt: A0A0G2UGT2), MCL (UniProt: A0A0P0E482), CGL (UniProt: H2FH31) и MytiLec (UniProt: B3EWR1)

Аналогично этим лектинам молекула MTL содержит три аминокислотных тандемных повтора с высокой степенью идентичности между собой и три углевод-связывающих домена на молекулу. Согласно классификации, основанной на гомологии первичных структур, MTL можно отнести к лектинам семейства mytilectin, наряду с CGL, MCL и MytiLec. Все эти лектины распознают  $\alpha$ -Gal, относительно редкий природный моносахарид и, по-видимому, помогают регулировать клеточные процессы, такие как апоптоз и дифференцировка. Возможно, что в морской среде присутствуют еще неизвестные клеточные мишени с поверхностной экспрессией  $\alpha$ -Gal / GalNAc и, что митилектины способны распознавать и ингибировать пролиферацию таких мишеней [38].

### 3.3.2 Вторичная структура MTL

Для дальнейшей характеристики MTL была изучена его пространственная организация методом спектроскопии КД. Расчет элементов вторичной структуры лектина с помощью программы CONTIN/LL (пакет программ CDPPro) показал, что доминирующим элементом регулярной вторичной структуры MTL является  $\beta$ -структура (таблица 5). Результаты спектроскопии КД согласуются с данными, полученными при расчете элементов вторичной структуры теоретически предсказанной модели MTL с помощью сервера PROTEUS Structure Prediction Server 2.0 (<http://www.proteus2.ca/proteus2/index.jsp>) (таблица 5).

Таблица 5 – Содержание элементов вторичной структуры MTL, %

№ п/п	Образец	$\alpha$ -спираль			$\beta$ -структура			$\beta$ -изгиб	Неупорядоченная структура
		I	II	III	I	II	III		
1.	Данные КД-спектроскопии	1.0	5.0	6.0	27.1	12.8	39.9	21.5	32.6
2.	Теоретические данные	7			41			18	33

I –  $\alpha_r$ ,  $\beta_r$ -регулярная структура; II –  $\alpha_d$ ,  $\beta_d$ -искаженная структура; III - суммарное количество ( $\alpha_r + \alpha_d$ ), ( $\beta_r + \beta_d$ )

Преобладание  $\beta$ -структуры, обнаруженное для MTL, является характерным признаком для всех лектинов семейства mytilectin [47, 49, 130]. Аминокислотную последовательность лектина использовали для предсказания его третичной структуры методом компьютерного моделирования на основе структурной гомологии белков (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/>). Согласно результатам, полученным при использовании сервера PHYRE2, MTL имеет структуру  $\beta$ -трилистника, как у Mytilec [131] и CGL [10]. Такие структуры могут образовывать олигомеры лектинов, благодаря внутренней симметрии [132].

### 3.3.3 Самоассоциация MTL

Способность лектинов к самоассоциации влечет за собой кластеризацию нескольких углеводов-связывающих доменов, что обеспечивает им высокую

авидность по отношению к большим лигандам, т.к. аффинность индивидуальных углевод-связывающих сайтов лектинов достаточно слабая [133]. Несмотря на то, что в первых публикациях, посвященных выделению лектинов, относящихся к семейству mytilectin, они были описаны как мономеры [44, 52], позднее использование более современных методов исследования позволило с уверенностью утверждать, что, как минимум, димеризация является необходимым условием для проявления ими биологической активности [131]. Кроме того, при увеличении концентрации CGL и MCL образовывали высокомолекулярные олигомеры [49]. При сравнении первичной структуры MTL со структурами лектинов семейства mytilectin обнаружено, что MTL имеет в своем составе аминокислоты, способствующие образованию димерной структуры и ее стабилизации, как у CGL (Ala<sub>91</sub>, Met<sub>92</sub>, Phe<sub>94</sub>, Phe<sub>95</sub>, Leu<sub>147</sub>, Tyr<sub>149</sub>, Ala<sub>150</sub>) [11], , MCL (Arg<sub>50</sub>, Phe<sub>94</sub>, Phe<sub>95</sub>, Asn<sub>96</sub>) [49] и Mytilec (Phe<sub>94</sub>, Phe<sub>95</sub>) [131] (рисунок 7).

MTL	1	MTTFLIKHKASGKYFHPKGGTSNPPNGTNLVLHSDIHERMYFQFEVVNERWRYIKHVASE	60
MCL	1	MTTFLIKHKASGKFLHPKGGSSNPANDTNVLVHSDIHERMYFQFDVVDERWGVIKHAASG	60
MytiLec	1	TTFLLIKHKASGKFLHPKGGSSNPANDTNVLVHSDIHERMYFQFDVVDERWGVIKHAASG	59
CGL	1	MTTFLIKHKASGKFLHPYGGSSNPANNTKLVLHSDIHERMYFQFDVVDERWGVIKHVASG *****:***:*****:*****:***:*****_**	60
MTL	61	KIVHPFGGKADPLNGTNMVLHQDRHDRALEAMDFFNINIRHKGKKYIHPKGGSKNPNGN	120
MCL	61	KIVHPLGGKADPPNETKLVLHQDRHDRALEAMDFFNIIHKAGKYVHPKGGSTNPPNET	120
MytiLec	60	KIVHPLGGKADPPNETKLVLHQDRHDRALEAMDFFNIIHKAGKYVHPKGGSTNPPNET	119
CGL	61	KIVHPYGGQANPPNETNMVLHQDRHDRALEAMDFFNIMHKGKKYIHPKGGSPNPNNT *:*** **:*:*.***::***** *****:***:***:***** ***:*	120
MTL	121	LTVMHGDEHGAMEFIFVSPKNKDKRVLVYA	150
MCL	121	LTVMHGDKHGAMEFIFVSPKNKDKRVLVYV	150
MytiLec	120	LTVMHGDKHGAMEFIFVSPKNKDKRVLVYV	149
CGL	121	ETVIHGDKHAAEFIFVSPKNKDKRVLVYA **:*:** * *****	150

Зеленым цветом выделены аминокислоты, отвечающие за образование димерной структуры

Рисунок 7 – Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей лектинов семейства mytilectin

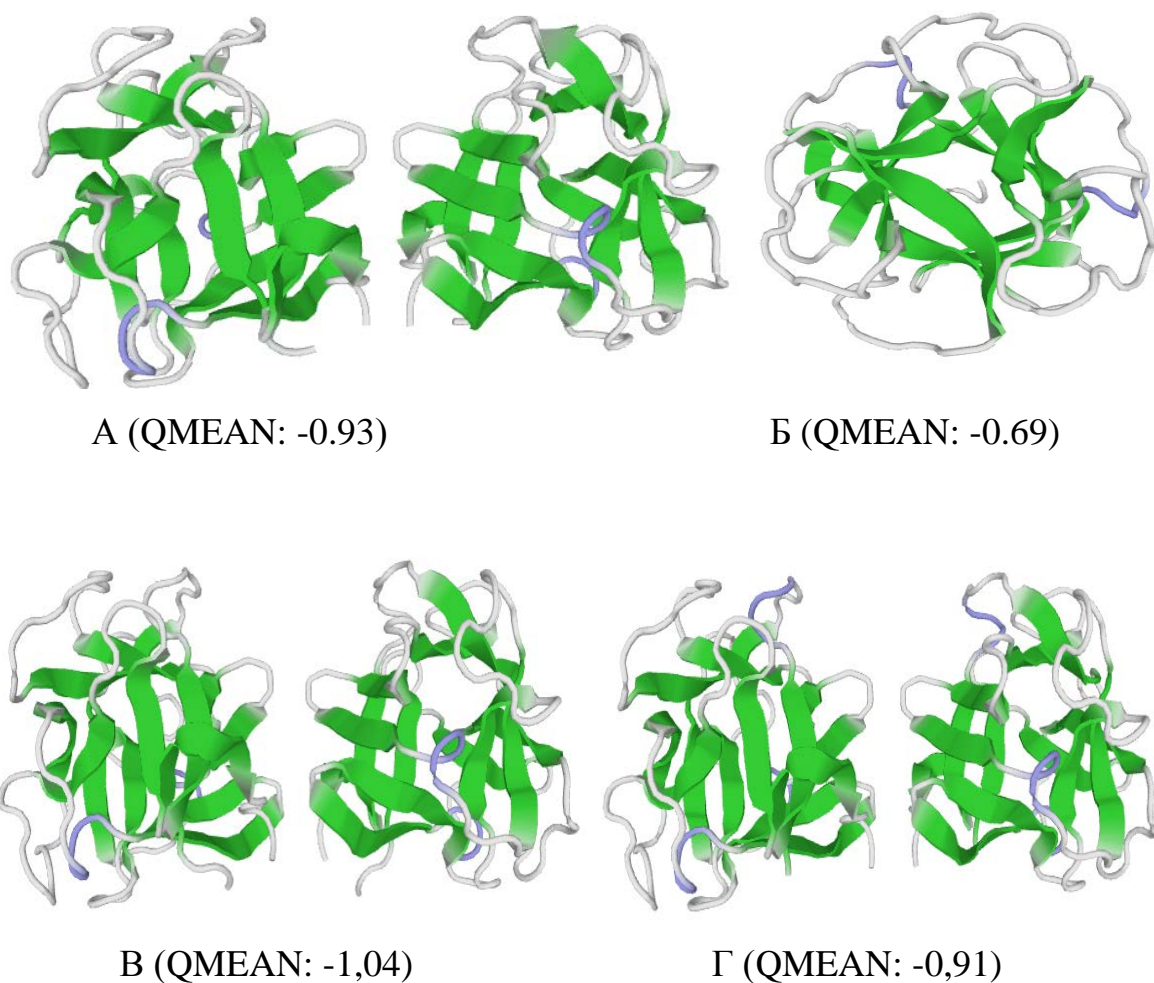
Таким образом, можно предположить, что MTL способен образовывать стабильную димерную структуру, благодаря наличию Arg<sub>50</sub>, Ala<sub>91</sub>, Met<sub>92</sub>, Phe<sub>94</sub>, Phe<sub>95</sub>, Asn<sub>96</sub>, Leu<sub>147</sub>, Tyr<sub>149</sub>, Ala<sub>150</sub> в своей аминокислотной последовательности. Построение теоретической модели пространственной структуры MTL проводили с использованием сервера SWISS-MODEL

(<https://swissmodel.expasy.org/interactive>), содержащего библиотеку прототипов. В результате для целевой последовательности MTL было найдено 14 наиболее подходящих прототипов белков с уже известной кристаллической структурой (таблица 6).

Таблица 6 – Прототипы лектинов, используемые для построения теоретической модели пространственной структуры MTL

Код прототипа PDB	Идентичность, %	Вид молекулы	Методика исследования структуры прототипа	Разрешение	Описание прототипа
6bfm.1.A	84,00	гомодимер	Рентгеноструктурный анализ	1,49Å	Лектин из мидии <i>Mytilus californianus</i>
6bfm.1.B	84,00	гомодимер	Рентгеноструктурный анализ	1,49Å	Лектин из мидии <i>Mytilus californianus</i>
3wmu.1.A	83,78	гомодимер	Рентгеноструктурный анализ	1,10Å	Лектин из мидии <i>Mytilus galloprovincialis</i>
3wmu.1.B	83,78	гомодимер	Рентгеноструктурный анализ	1,10Å	Лектин из мидии <i>Mytilus galloprovincialis</i>
5f8s.1.B	83.33	гомодимер	Рентгеноструктурный анализ	1.08Å	Лектин из мидии <i>Crenomytilus grayanus</i>
5duy.1.A	83.33	мономер	Рентгеноструктурный анализ	2.12Å	Лектин из мидии <i>Crenomytilus grayanus</i>
5vbk.1.A	84.00	мономер	Рентгеноструктурный анализ	1.79Å	Лектин из мидии <i>Mytilus californianus</i>
5xg5.1.A	80.49	мономер	Рентгеноструктурный анализ	1.54Å	MITSUBA-1
6i15.1.A	13.64	мономер	Рентгеноструктурный анализ	1.91Å	Фасцин
1dfc.1.A	13.64	мономер	Рентгеноструктурный анализ	2.90Å	Фасцин
6i17.1.A	13.64	мономер	Рентгеноструктурный анализ	1.56Å	Фасцин
6i0z.1.A	13.64	мономер	Рентгеноструктурный анализ	1.77Å	Фасцин
3llp.1.A	13.64	мономер	Рентгеноструктурный анализ	1.80Å	Фасцин
4gp3.2.A	13.64	мономер	Рентгеноструктурный анализ	2.25Å	Фасцин

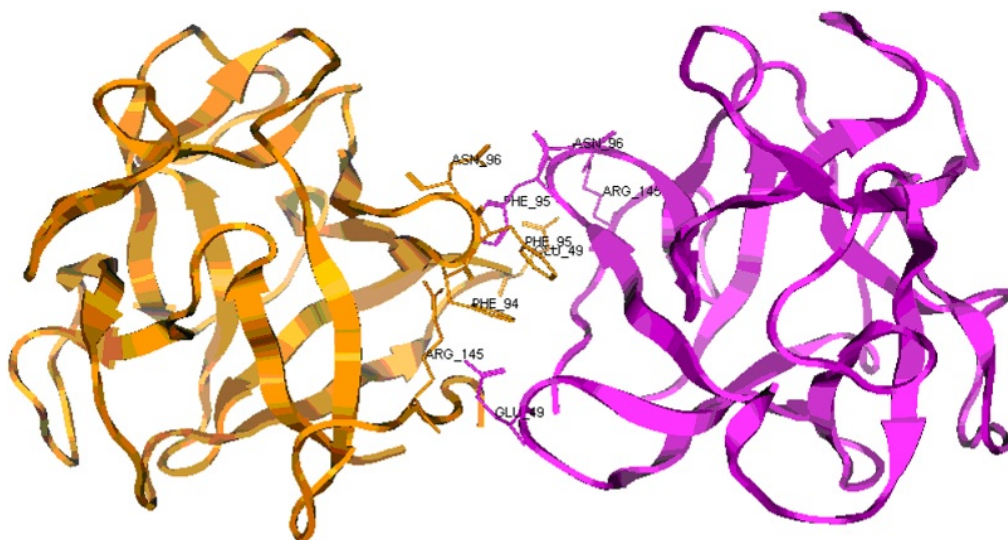
Большинство представленных протипов лектинов, имеющих высокий процент идентичности аминокислотной последовательности с MTL - это лектины семейства mytilectin. Поэтому для построения модели димерной структуры MTL были выбраны CGL (мономер - **5duy.1.A**, гомодимер - **5f8s.1.B**), Mytilec (гомодимер - **3wmu.1.A**) и MCL (гомодимер - **6bfm.1.A**) (рисунок 8).



QMEAN - составная функция, с помощью которой можно оценить абсолютное качество искомой модели белка на основе выбранного прототипа: А –гомомер CGL, Б –мономер CGL, В –гомомер MCL, Г –гомомер Mytilec

Рисунок 8 – Теоретические модели димерной структуры MTL, сконструированные на основе разных прототипов с использованием сервера SWISS-MODEL

По величине QMEAN для каждого прототипа можно определить качество построенной теоретической модели белка как на глобальном (для всей конструкции), так и на локальном уровне (для отдельных остатков). Иными словами QMEAN показывает, насколько построенная модель сопоставима с экспериментальными структурами белков аналогичного размера. Величина, близкая к нулю, свидетельствует о хорошем соответствии между теоретической моделью и экспериментальными структурами аналогичного размера. Судя по данным, представленным на рисунке 8, наиболее точными моделями димерной структуры MTL являются модели А и Г, для построения которых в качестве прототипов использовали димеры молекул CGL и Mytilec соответственно. Полученные результаты были подтверждены методом компьютерного моделирования в программе «МОЕ 2020.09», в качестве прототипа для построения модели димера MTL использовали CGL (5f8s.1.B) (рисунок 9).



Структура белка показана в виде ленточной диаграммы, оранжевым и розовым цветами выделены мономеры MTL. Среднеквадратичное отклонение всех C- $\alpha$  атомов составляет 0,5Å

Рисунок 9 – Теоретическая модель пространственной структуры димера MTL, сконструированная в программе «МОЕ 2020.09» с использованием прототипа CGL (5f8s.1.B)



Установлено, что димерная структура MTL образуется в результате укладки и интеркаляции ароматических боковых цепей Phe<sub>94</sub>, Phe<sub>95</sub> и Tyr<sub>149</sub> с последующей стабилизацией структуры посредством водородных связей и гидрофобных взаимодействий следующих аминокислот: Glu<sub>49</sub>, Arg<sub>50</sub>, Asp<sub>93</sub>, Asn<sub>96</sub> и Ala<sub>150</sub>. Полученный результат коррелирует с результатами, описанными для кристаллической структуры гомодимера CGL [11] и MCL [49].

Методами динамического рассеяния света (ДРС) (рисунок 10) и ДСН-ПААГ электрофореза была исследована динамика поведения MTL в растворах с разной концентрацией лектина (рисунок 11).

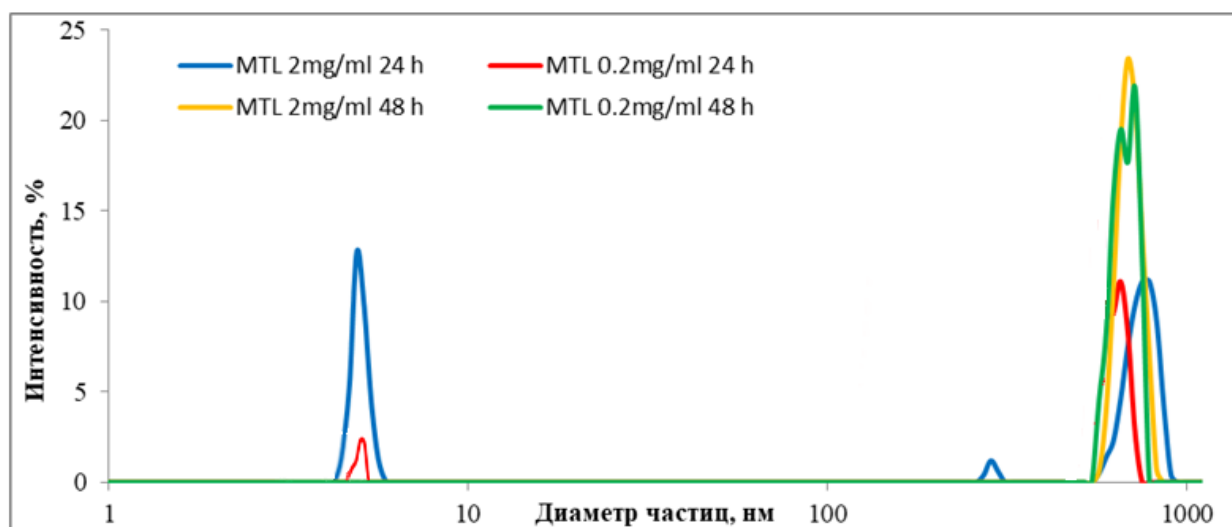
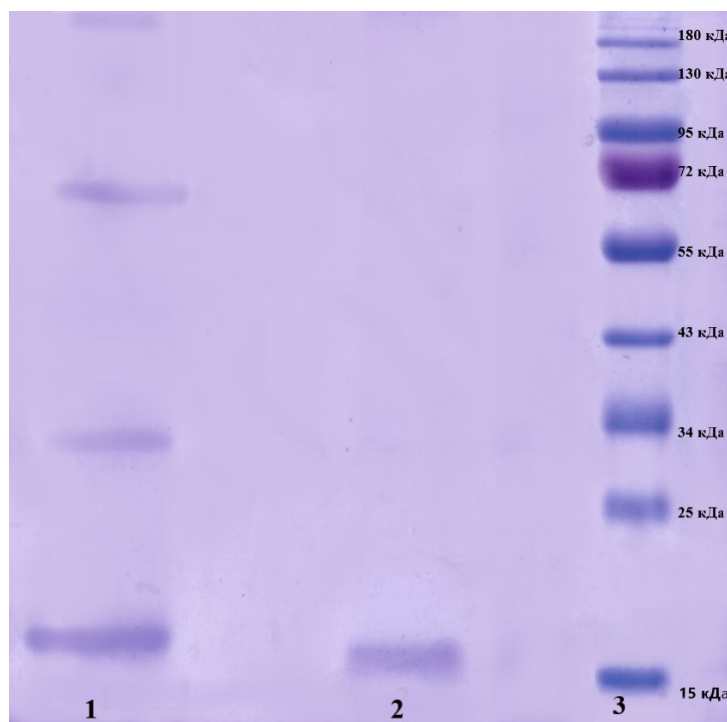


Рисунок 10 - Распределение частиц MTL по размеру для растворов с разной концентрацией в разные промежутки времени, полученное методом ДРС

На рисунке 10 представлено полученное на приборе Malvern (Zeya sizer, Nano-ZS, USA) распределение по размеру частиц лектина в растворе в зависимости от концентрации белка. Показано, что первые 24 часа растворы MTL обеих концентраций содержат как мономерные частицы диаметром около 4,8 нм, так и большие агрегаты, в то время как через 48 часов наблюдаются только агрегаты. Высокая склонность к олигомеризации обусловлена наличием большого числа аминокислот, способных образовывать и стабилизировать агрегаты. Полученные результаты

согласуются с данными электрофореза в ПААГ. При увеличении концентрации MTL или времени его экспозиции в растворе происходит димеризация лектина, которая впоследствии приводит к его олигомеризации (рисунок 11).



1 - MTL после экспозиции в растворе в течение 48 дней, 2 – свежевыделенный MTL, 3 - стандарты молекулярных масс

Рисунок 11 –Электрофореграмма образцов MTL в зависимости от времени экспозиции в растворе, полученная методом ДСН – ПААГ электрофореза

Важный вывод из проведенного нами структурного исследования MTL заключается в том, что димерная пространственная структура и удвоение сайтов связывания лиганда может дать в общей сложности шесть сайтов связывания лиганда с лектином. Это может привести к поливалентности молекулы лектина, которая имеет решающее значение для нескольких биологических свойств, например, для агглютинации.

### 3.3.4 Получение химерного рекомбинантного MTL

Выделение лектинов из природных источников часто сопряжено с рядом факторов, негативно влияющих на свойства, чистоту и выход конечного



продукта. Поэтому в последнее время большинство исследований проводится на рекомбинантных белках.

Для создания рекомбинантной конструкции был использован экспрессионный вектор pET40b(+). Выбор данного вектора связан с тем, что он имеет N-концевую сигнальную последовательность, специфичную для *E. coli*, позволяющую направлять чужеродный белок в периплазму клетки. Выбранный вектор содержит также последовательности из восьми остатков His на N- и C-концах плазмиды, что облегчает выделение гибридного белка из клеточного лизата с помощью металл-аффинной хроматографии, а наличие гена, кодирующего окислительно-восстановительный белок DsbC, способствует правильному сворачиванию рекомбинантного белка.

Последовательность гена, кодирующая зрелый лектин, была амплифицирована с помощью ген-специфичных праймеров (MTL-Sal-stop-rev и MTL-Sac-dir). В качестве матрицы в реакции была использована рекомбинантная плазмида на основе вектора pET-40b (+) со вставкой соответствующего транскрипта гена MTL. Полученные ПЦР-фрагменты, содержащие сайт рестрикции SacI и SalI, а также сайт для XhoI и стоп-кодон ТАА на 3'-конце, были обработаны соответствующими эндонуклеазами и субклонированы в экспрессионный вектор pET40b(+) по указанным сайтам рестрикции под T7-контролируемый промотор (рисунок 12). Для более эффективного лигирования фрагментов в вектор последний обрабатывали высокоактивной щелочной фосфатазой (CmAP, РИВОС ДВО РАН). Рекомбинантные пептиды были получены в бактериальной системе *E. coli* штамма Rosseta DE3.

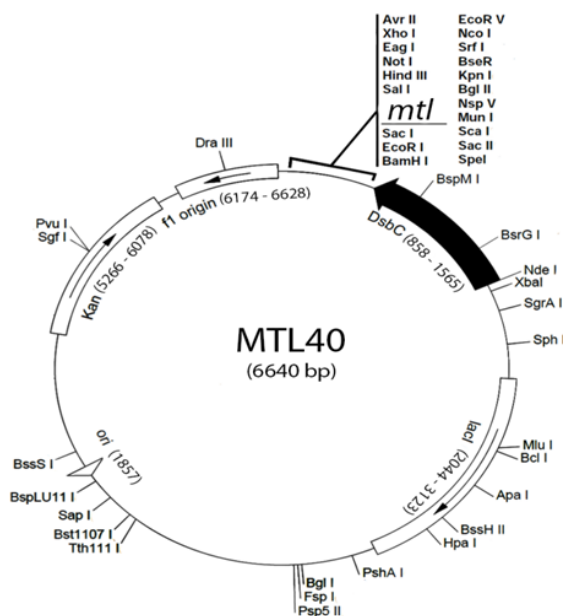
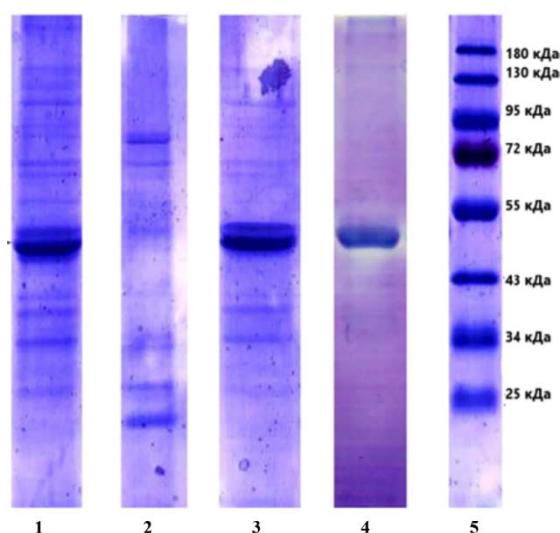


Рисунок 12 – Плазмида рЕТ40b(+), определяющая синтез рекомбинантного MTL

Экспрессия MTL проводилась на ранее разработанной среде MX [110]. Подобрал условия для увеличения выхода рекомбинантного белка (концентрацию индуктора ИПТГ 0,02 М и культивирование при 18 °С в течение 20 ч), удалось получить рекомбинантный аналог MTL (rMTL) в комплексе с шапероном (DsbC) в активной растворимой форме (рисунок 13, фракция 1). После инкубации в течение ночи, было обнаружено, что рекомбинантный лектин, как и нативный агрегирует, образуя нерастворимый осадок (рисунок 13, фракция 2). Для получения rMTL в растворимой форме использовали несколько концентраций мочевины от 2 М до 8 М. Установлено, что при концентрациях ниже 5 М агрегаты rMTL не растворялись, а при концентрациях выше 7 М rMTL не проявлял активности, возможно, из-за разрушающего действия высоких концентраций мочевины на пространственную структуру rMTL. Подобрал условия для растворения осадка (5,5 М мочевины) и нанеся его на аффинный сорбент, был получен очищенный химерный белок (рисунок 13, фракция 4).



1 - растворимая белковая фракция rMTL после экспрессии с шапероном DsbC ; 2 - растворимая белковая фракция rMTL после ночной инкубации при 4 °C; 3 – фракция, растворенного осадка в растворе 5,5 М мочевины после инкубации при 4 °C; 4 –фракция rMTL с шапероном DsbC после  $\text{Ni}^{2+}$  - аффинного сорбента; 5 – стандарты молекулярных масс

Рисунок 13 – Электрофореграмма фракций rMTL после экспрессии и очистки на  $\text{Ni}^{2+}$  - аффинном сорбенте, полученная методом ДСН – ПААГ электрофореза

Пространственная структура рекомбинантного химерного лектина была исследована методом спектроскопии КД (таблица 7). Расчет содержания элементов вторичной структуры показал, что rMTL имеет вторичную структуру, содержащую элементы регулярной ( $\alpha$ -спираль и  $\beta$ -структура) и неупорядоченной структуры ( $\beta$ -изгиб и неупорядоченная форма).

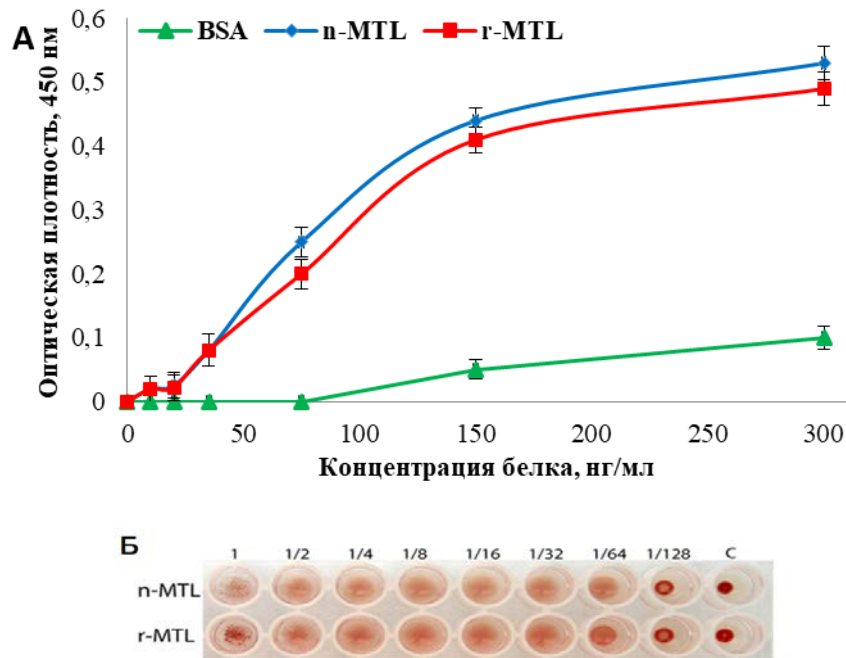
Таблица 7 – Содержание элементов вторичной структуры rMTL, %

Образец	$\alpha$ -спираль			$\beta$ -структура			$\beta$ -изгиб	Неупорядоченная структура
	I	II	III	I	II	III		
rMTL [c]=0,2 мг/мл	0.1	3.5	3.6	27.8	14.3	42.1	20.5	33.8

I –  $\alpha_r$ -,  $\beta_r$ - регулярные; II –  $\alpha_d$ -,  $\beta_d$ - искаженные структуры; III - суммарное количество ( $\alpha_r + \alpha_d$ ) и ( $\beta_r + \beta_d$ )

Методом ИФА было установлено, что связь nMTL и rMTL с адсорбированным IgG<sub>MTL</sub> является концентрационнозависимой, а связывающая

способность rMTL сравнима с таковой нативного лектина (рисунок 14 А). Результаты гемагглютинации также указывают на отсутствие разницы в активности рекомбинантного и нативного лектинов (рисунок 14 Б).



А – Метод иммуноферментного анализа; Б – метод гемагглютинации (С – контроль)

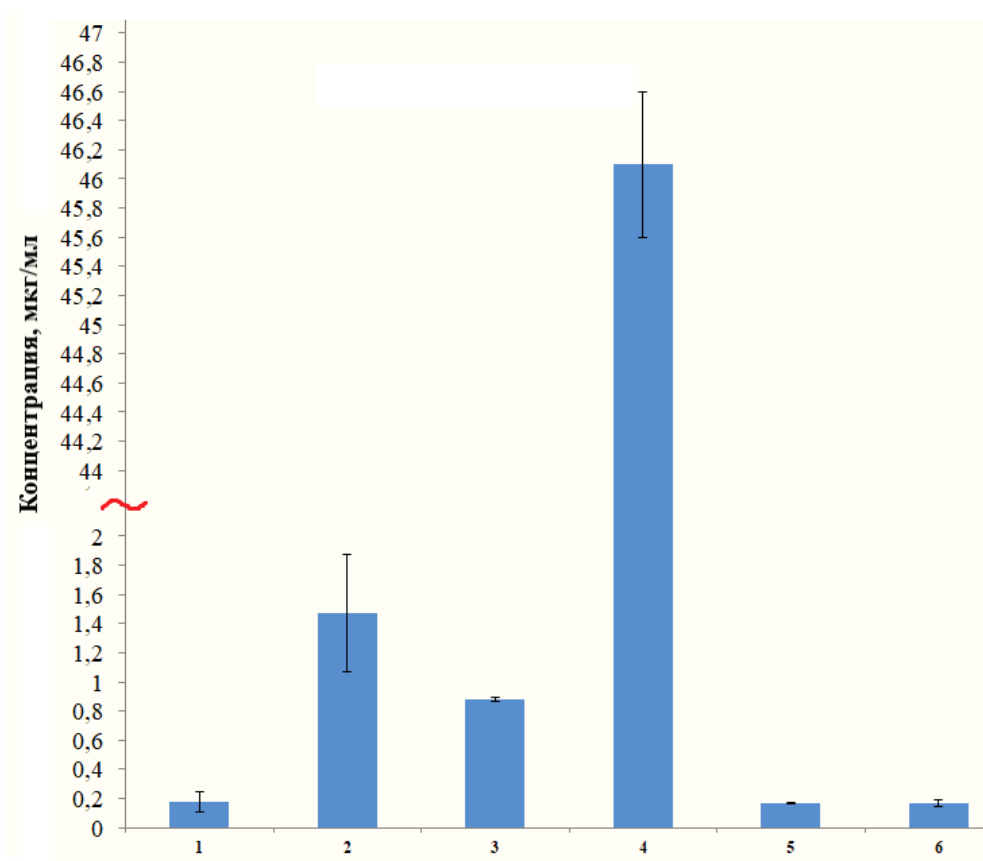
Рисунок 14 – Изучение активности rMTL методами ИФА и ГА

Таким образом, показано, что рекомбинантный лектин в комплексе с шапероном не отличается по активности от нативного MTL.

### 3.4 Биологическая активность MTL

#### 3.4.1 Распределение MTL по органам мидии

Для выяснения роли MTL в организме мидии мы определили содержание лектина в различных органах моллюска методом ИФА (рисунок 15).



1 – жабры, 2 – гонады, 3 – гемоциты, 4 – мантия, 5 – мускул, 6 – гепатопанкреас

Рисунок 15 – Распределение MTL по органам мидии

MTL был обнаружен во всех исследуемых тканях взрослых мидий, включая жабры, гонады, гемоциты, мантию, мускул и гепатопанкреас, что указывает на участие лектина в поддержании нормальных физиологических функций этих органов у моллюска, и это характерно для многих лектинов морских беспозвоночных [43]. Известно, что клетки гемолимфы играют основную роль в иммунных реакциях у мидий. Однако, в соответствии с более общим взглядом на связь иммунитета с метаболизмом и другими процессами организма, типичные иммунные гены и белки также должны экспрессироваться в «неиммунных» клетках, тканях и органах. Например, лектин CgLec-4E экспрессируется в пищеварительной железе здорового моллюска, устрицы *C. gigas*. Но после заражения моллюска вибрионом *V. alginolyticus* уровень лектина значительно возрастает, что подтверждает роль бактериальной инфекции в индукции синтеза CgLec-4E клетками пищеварительной железы

[134]. Экспрессия C1q/TNF-подобных молекул (MGC0284) была обнаружена в различных тканях *M. galloprovincialis* [135], а высокий уровень экспрессии гена MytiLec в мантии и жабрах позволяет предположить, что MytiLec играет существенную роль в тканях, контактирующих с внешней средой [38]. Уровень MTL в мантии был самым высоким (в 33 раза превышающим его содержание в гонадах и в 55 раз в гемоцитах), что также характерно для многих лектинов двустворчатых моллюсков, у которых мантия является органом, первым контактирующим с изменчивой внешней средой и, следовательно, наиболее чувствительным к внешнему воздействию [51, 120, 136]. Высокий уровень MTL в мантии может быть связан также с частыми контактами этого органа с патогенами, что индуцирует постоянный повышенный синтез лектина, обусловленный необходимостью защиты организма животного от агрессивной окружающей среды. Известно, что лектины большинства беспозвоночных участвуют в таких иммунных реакциях, как активация пропенооксидазы, клеточная адгезия, бактериальный клиренс, фагоцитоз, то есть способны выступать в качестве активаторов и регуляторов иммунного ответа [137]. Организм моллюска обеспечивает содержание белка, необходимое для распознавания и элиминации возбудителя. Иммунное распознавание «свой-чужой» является первым и решающим шагом в реакциях врожденного иммунного ответа.

#### **3.4.2 Заражение мидий дрожжами *P. pastoris* и бактериями *V. proteolyticus***

Изменение уровня лектина в экстрактах мантии после заражения моллюсков дрожжами *P. pastoris* и бактериями *V. proteolyticus* показало участие MTL в реакциях врожденного иммунитета моллюска (рисунок 16).

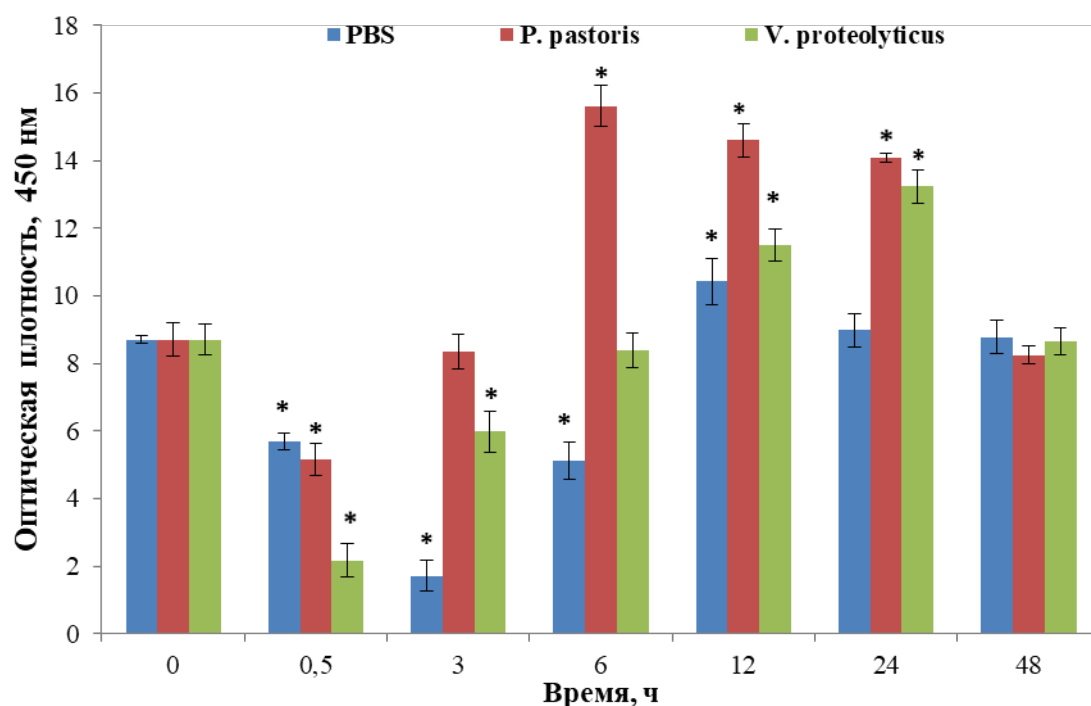


Рисунок 16 - Изменение уровня MTL в ответ на заражение моллюска *M.*

*trossulus* дрожжами *P. pastoris* и бактериями *V. proteolyticus*

Данные представлены как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение ( $n=3$ ),  $*p<0,05$

В ответ на введение патогенов в организм мидии через 30 минут после иммунизации наблюдалось резкое снижение уровня лектина. По всей вероятности, это связано с быстрым «расходованием» молекул лектина при ответе на антиген и его удаление. Через 3 часа после иммунизации бактериями концентрация лектина возросла более чем в 2 раза, как и в случае заражения устрицы *Pinctada martensii* [138], что может свидетельствовать об активации процесса синтеза лектинов. В случае заражения дрожжами уровень MTL достигал максимального значения через 6 часов, а при бактериальном заражении только через 24 часа. Вероятно, это связано не только с разными ПАМП, экспрессированными на поверхности бактерий и дрожжей, но и с активацией различных звеньев врожденного иммунитета мидий. По мере удаления антигена из организма, концентрация лектина снижалась и постепенно возвращалась к исходному уровню. В контрольной группе после

введения мидиям буферного раствора также отмечались колебания уровня лектина, что, возможно, было обусловлено травмой от инъекции.

На основании полученных результатов можно предположить, что исследуемый лектин является компонентом иммунной системы мидии и участвует в защите организма беспозвоночного от внешнего воздействия. MTL, наряду с другими лектинами, чья экспрессия также регулируется обилием возбудителей в морской воде, в том числе инфекционных бактерий и простейших, взаимодействует с микроорганизмами через углевод-связывающий домен, агглютинируя или опсонизируя их и защищая организм моллюска от заражения [134, 139].

### **3.4.3 MTL как паттерн-распознающий рецептор**

Процесс распознавания лектинами углеводных детерминант на поверхности клеток различных патогенов играет важную роль в системе защитных реакций врожденного иммунитета различных групп животных, прежде всего у беспозвоночных, не имеющих системы приобретенного иммунитета. В настоящее время углевод-распознающие рецепторы, равно как и SR- (рецепторы мусорщики) и Toll-подобные рецепторы, относятся к группе паттерн-распознающих рецепторов (PPR), которые выполняют жизненно важную функцию удаления патогенов путем распознавания консервативных углеводных структур, называемых патоген-ассоциированными молекулярными паттернами (ПАМП), широко представленными на поверхности микроорганизмов [140]. Как компоненты врожденного иммунитета, лектины морских беспозвоночных агглютинируют грамположительные и грамотрицательные бактерии через взаимодействие, главным образом, с липополисахаридом и пептидогликаном их клеточных стенок [141].

Методом твердофазного лектин-ферментного анализа была изучена способность MTL связываться с основными видами ПАМП: LPS, пептидогликаном,  $\beta$ -1,3-глюканом, а также в качестве положительного и отрицательного контроля использовали PSM и BSA соответственно.



Установлено, что лектин взаимодействует с исследуемыми ПАМП в следующей зависимости: пептидогликан >  $\beta$ -1,3-глюкан > LPS (рисунок 17).

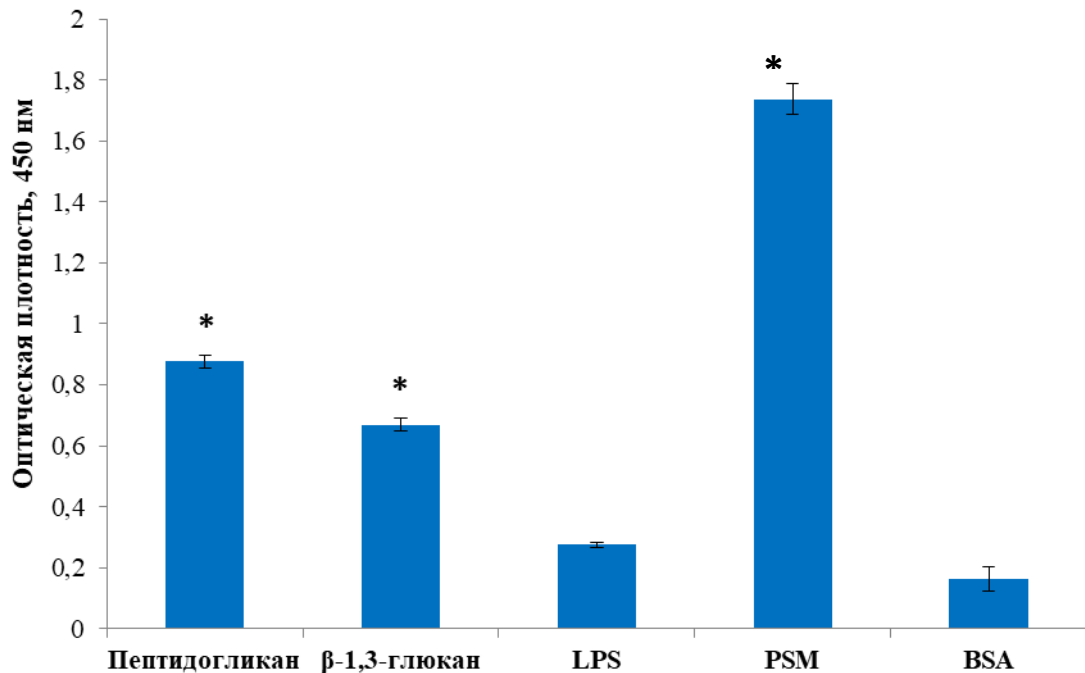


Рисунок 17 – Взаимодействие MTL с различными ПАМП

Данные представлены как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение (n=3), \* $p < 0,05$

Стоит отметить, что лектин в большей степени связывается с пептидогликаном – ПАМП, входящим в состав клеточной стенки как грамотрицательных, так и грамположительных бактерий [142] и с  $\beta$ -1,3-глюканом, входящим в состав клеточной стенки дрожжей и грибов [142], в то время, как с LPS – ПАМП, входящим, преимущественно, в состав клеточной стенки грамотрицательных бактерий [143], лектин взаимодействует на уровне неспецифического связывания как с BSA. Несмотря на то, что MTL напрямую слабо связывается с LPS, его синтез существенно индуцируется при заражении моллюска грамотрицательной бактерией *V. proteolyticus*. Вероятно, распознавание и связывание лектина с ПАМП, экспрессированными на клеточной поверхности бактерии *V. proteolyticus*, обусловлено, главным образом, взаимодействием с пептидогликаном. Ман-специфичный  $\text{Ca}^{2+}$  - зависимый лектин из рыбы *Oplegnathus punctatus* почти в 30 раз сильнее связывался с пептидогликаном чем с LPS, а спустя 8 часов после заражения

грамотрицательной бактерией *V. anguillarum* его уровень повышался более чем в 4 раза [144]. Однако, Gal-специфичный лектин из моллюска *Solen grandis* также напрямую не взаимодействовал с LPS, но его мРНК экспрессия значительно индуцировалась после стимуляции липополисахаридом [145]. Это свидетельствует о том, что распознавание и связывание с LPS, а также и с другими ПАМП может быть сложным процессом, в котором принимают участие кроме лектинов и другие молекулы.

#### 3.4.4 Противомикробная активность MTL

Противомикробную активность лектина изучали уже не на компонентах клеточных стенок бактерий, а на самих бактериях.

Методом электрофореза в ПААГ с последующим Вестерн-блоттингом показано, что MTL взаимодействует как с грамположительными (*S. aureus* и *B. subtilis*), так и с грамотрицательными бактериями (*E. coli* и *V. proteolyticus*), а также с дрожжевыми грибами (*P. pastoris*) (рисунок 18). Агглютинация микроорганизмов лектином означает его микробостатическую активность (рисунок 19), а ингибирование агглютинации специфическим моносахаридом – галактозой (данные не представлены), свидетельствует об участии CRD лектина во взаимодействии с углеводами клеточных стенок бактерий.

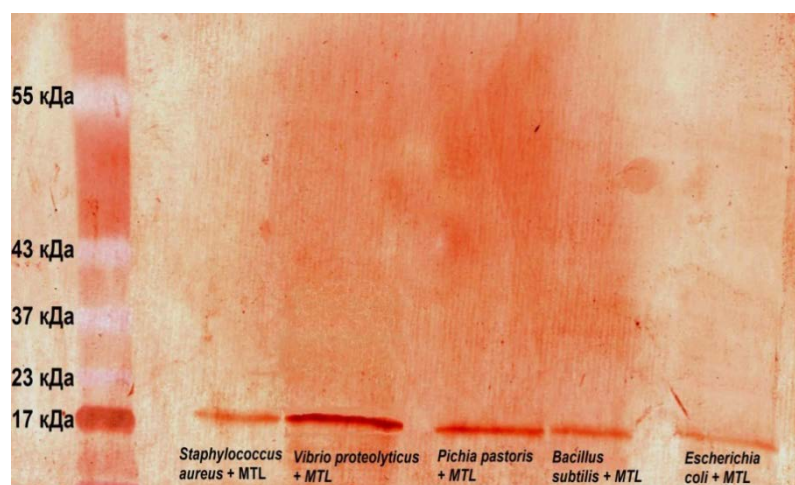


Рисунок 18 – Взаимодействие лектина с бактериями и дрожжевыми грибами

Галактозные остатки, присутствующие как терминальные сахара в LPS грамотрицательных бактерий, таких как *Vibrio spp.* и *E. coli*, а также в пептидогликанах и липотейхоевой кислоте грамположительных бактерий, влияют на их внутриклеточный состав и выступают в качестве углеводных мишеней для лектинов [146, 147, 148, 149].

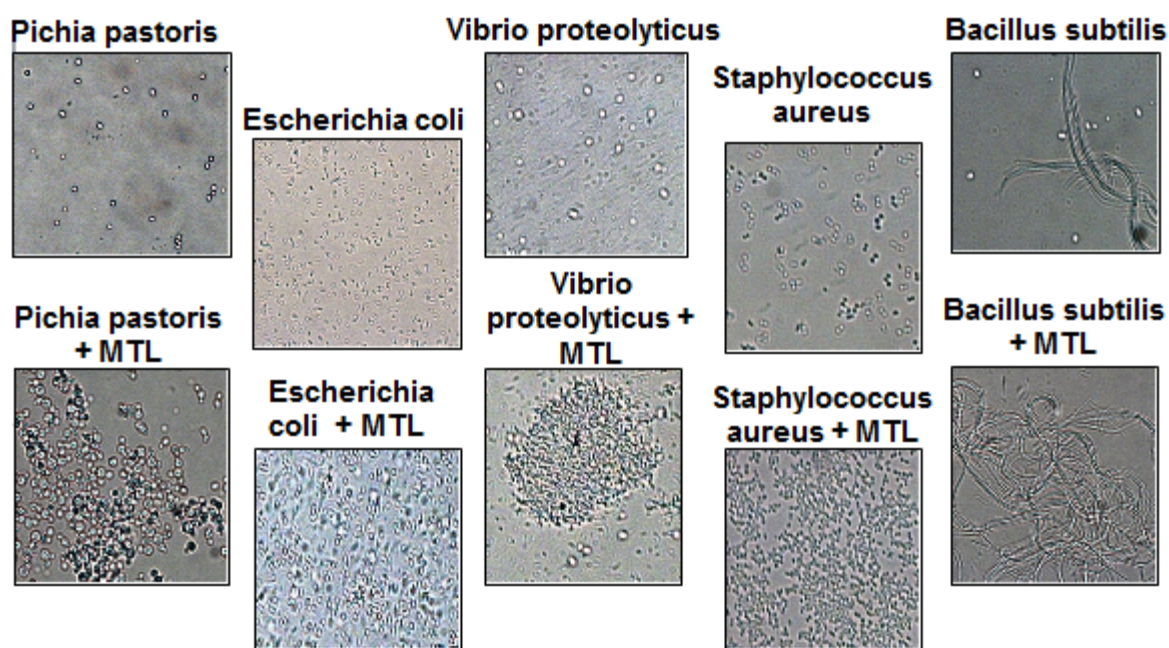


Рисунок 19 – Агглютинация клеток бактерий и дрожжей под действием MTL

Действуя как опсоины, в случае усиления фагоцитоза или индуцируя бактериальную агглютинацию, лектины морских беспозвоночных участвуют в реакциях врожденного иммунного ответа [145, 150]. Хотя механизм бактериальной агглютинации MTL до сих пор неясен, вполне вероятно, что это явление опосредовано узнаванием вышеупомянутых ПАМП членами семейства митилектинов, действующими как PRR.

Микробостатические свойства MTL были подтверждены действием лектина на рост бактериальных клеток методом турбидиметрии. При измерении суммарной мутности микробной суспензии, как параметра их роста, в присутствии и отсутствии лектина установлено, что MTL ингибирует рост грамположительной бактерии *B. subtilis* на 62%, дрожжей *P. pastoris* на 44,6 % и

грамотрицательной бактерии *E. coli* всего на 10,6 %, но не ингибирует рост бактерий *V. proteolyticus* и *S. aureus* (рисунок 20).

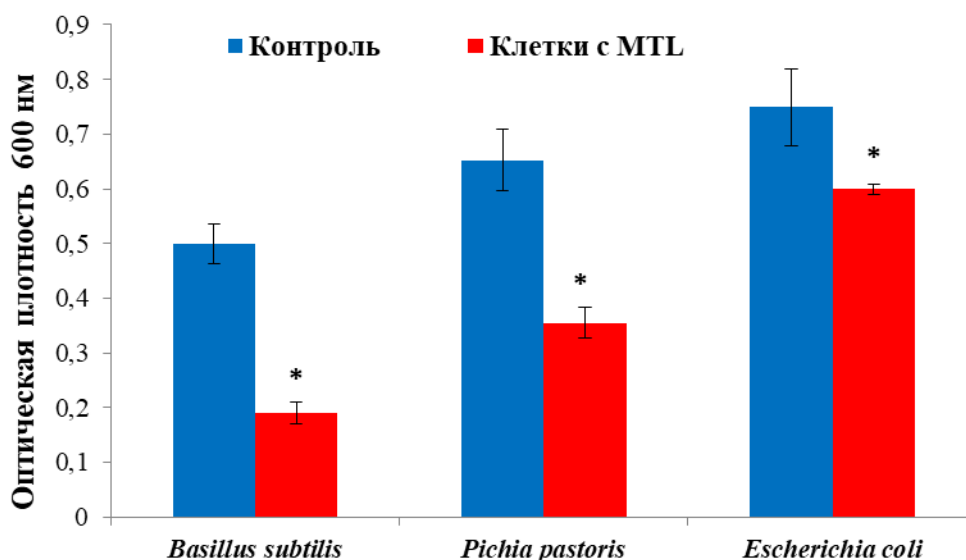


Рисунок 20 – Влияние MTL на рост клеток

Данные представлены как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение ( $n=3$ ),  $*p<0,05$

Известно, что Gal-специфичный лектин из морского брюхоногого моллюска *Aplysia dactylomela* (ADEL), как и MTL, агглютинирует клетки *S. aureus*, но не ингибирует их рост [151], а лектины из морского брюхоногого моллюска *Aplysia kurodai* (AKL, AKL-40) проявляют ингибирующее действие на рост как грамположительных, так и грамотрицательных микроорганизмов, но не влияют на рост *E. coli*. Вероятно, антибактериальная активность лектинов может зависеть не только от специфичности связывания гликанов, но и от поливалентности лектина и/или авидности к лиганду [141].

В настоящее время основной формой существования бактерий в естественных условиях являются связанные с поверхностью сообщества, получившие название биопленок [152]. Лектины, связываясь с поверхностью микроорганизмов, могут препятствовать не только адгезии бактерий к поверхности, но и затруднять их агрегацию друг с другом. При исследовании влияния MTL на образование биопленок установлено, что лектин уменьшает их

биомассу в случае *E. coli* на 61,5%, *S. aureus* - на 13,0%, *B. subtilis* на - 52,3%, проявляя, таким образом, бактериостатическую активность (рисунок 21).

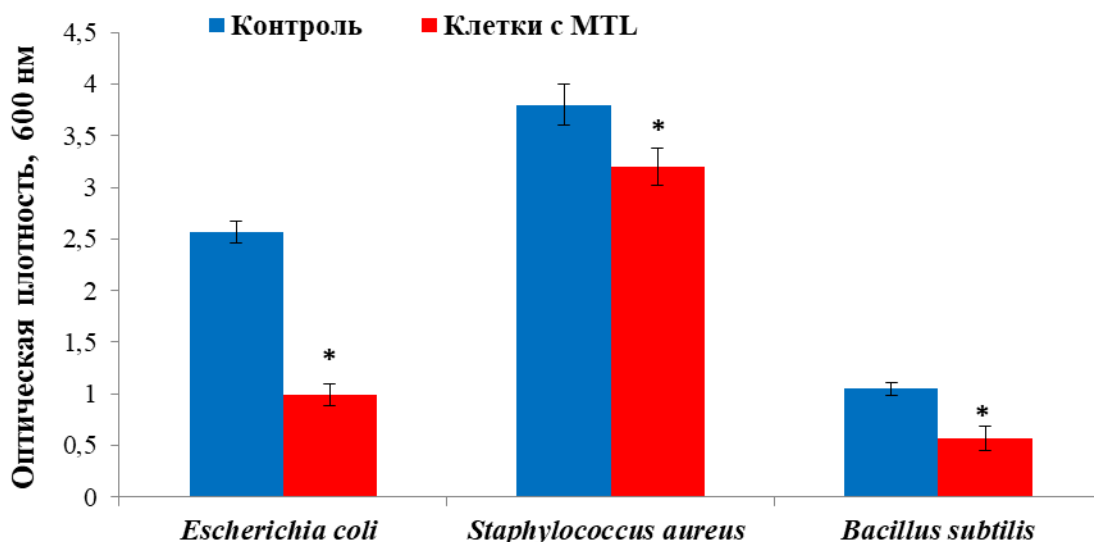


Рисунок 21 - Влияние MTL на образование биопленок

Данные представлены как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение (n=3), \* $p < 0,05$

Высокая степень ингибирования роста бактерий *B. subtilis* и их биопленок объясняется тем, что множество полисахаридов клеточных стенок бактерий семейства Bacillaceae в местах разветвления углеводной цепи имеют свободные остатки как  $\alpha$  -, так и  $\beta$ -Gal / GalNAc [153].

Микробостатические свойства MTL, которые ранее были показаны для CGL [51] и MytiLec [154] позволяют сделать вывод, что MTL действует как молекула ПРР аналогично другим членам этого семейства [155]. Обобщая полученные результаты, можно сделать вывод, что митилектины функционируют либо напрямую как ингибиторы клеточного роста, либо, после агглютинации, как модуляторы иммунного ответа, индуцируя действие других иммунных клеток и молекул.

### 3.4.5 Антифунгальная активность

#### 3.4.5.1 Связывание MTL с грибами

В отличие от антибактериальной активности лектинов, их антифунгальная активность изучена недостаточно. Составной частью как клеточной стенки бактерий, так и клеточной стенки грибов или гиф, являются сложные гликановые полимеры, такие как хитин, глюканы, маннаны, галактоманнаны, глюкоманнаны, рамноманнаны и фосфоманнаны, состоящие из остатков N - ацетилглюкозамина, глюкозы, маннозы, галактозы и/или рамнозы [156].

Изучение антифунгальной активности MTL проводили, используя грибы, ассоциированные с данным видом моллюсков в естественных условиях (таблица 8, рисунок 22). В эксперименте использовались грибы, выделенные и выращенные для этой цели Пивкиным М.В., д.б.н., сотрудником лаборатории микробиологии ТИБОХ ДВО РАН.

Таблица 8 – Грибы, ассоциированные с мидией *M. trossulus*

Номер штамма	Название штамма
13M1	<i>Fusarium sporotrichioides</i> Sherb.
13M2	<i>Trichoderma viride</i> Pers.
13M3	<i>Fusarium saccardoanum</i> Syd.
13M4	<i>Haematonectria haematococca</i> (Berk. & Broome) Samuels & Rossman [ <i>Fusarium solani</i> (Mart.) Sacc.]
13M5	<i>Haematonectria haematococca</i> (Berk. & Broome) Samuels & Rossman [ <i>Fusarium solani</i> (Mart.) Sacc.]
13M6	<i>Aspergillus awamori</i> Nakaz.
13M8	<i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissl.

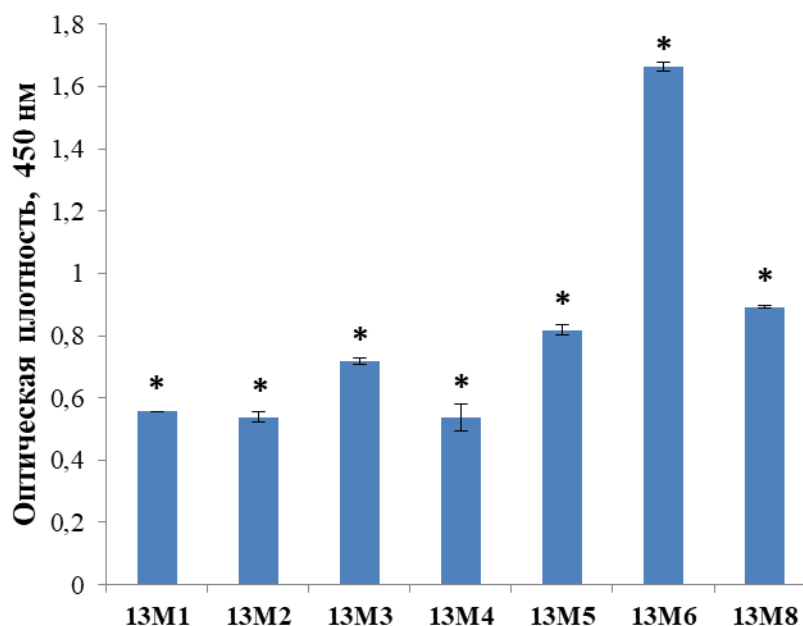


Рисунок 22 – Взаимодействие MTL с грибами, ассоциированными с мидией *M. trossulus*. BSA- отрицательный контроль

Данные представлены как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение (n=4), \* $p < 0,05$

Методом ТЛФА установлено, что лучше всего MTL взаимодействует со штаммом 13M6 (*Aspergillus awamori* Nakaz.). Это объясняется тем, что клеточная стенка некоторых грибов рода *Aspergillus* имеет центральный слой разветвленного  $\beta$ -1,3-глюкана, ковалентно связанного с хитином и галактоманнаном (маннозный остов с короткими галактофуранозными боковыми цепями). Грибы *A. fumigatus* продуцируют внеклеточный матрикс, включающий моносахариды,  $\alpha$ -1,3-глюканы, галактоманнаны и галактозаминогалактаны, состоящие из вариабельных галактопиранозных повторов, связанных с N-ацетилгалактозамином [156]. По результатам ингибирования галактозой связывания лектина с грибами установлено, что взаимодействие идет по углевод-белковому пути за счет гликоконъюгатов, экспонированных на клеточной мембране (таблица 9).

Таблица 9 – Ингибирование связывания MTL с грибами галактозой

Штамм гриба	13M1	13M2	13M3	13M4	13M5	13M6	13M8
IC <sub>50</sub> (Gal), mM	Не ингибирует	4	1,6	4	3,9	4,4	2,05

IC<sub>50</sub> – концентрация, необходимая для 50 % ингибирования связывания MTL с грибами

Стоит отметить, что взаимодействие со штаммом 13M1 происходит по иному пути, возможно белок-белковому, так как при использовании высоких концентраций специфичного моносахарида не удалось достичь 50% ингибирования связывания.

Известно, что антифунгальная активность лектинов связана с их способностью ингибировать рост и развитие грибов и дрожжей. Ингибирование роста грибов происходит в результате связывания лектина с гифами, что приводит к плохому поглощению питательных веществ. Кроме того, связавшись с гифами, лектин препятствует процессу прорастания спор или нарушает синтез и/или отложение хитина в клеточной стенке гриба [157].

#### 3.4.5.2 Действия MTL на рост конидий грибов

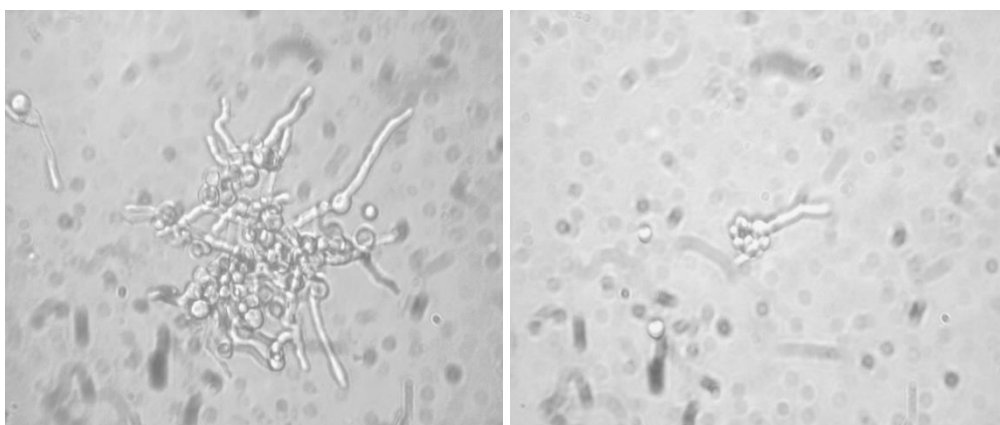
Механизм фунгиостатической активности изучали посредством воздействия лектина на проростание конидий («спор») грибов [158]. Конидии 3 штаммов грибов выращивали в присутствии лектина и без него. Результат оценивали по длине проростковых гиф, измеренных как в контроле, так и в опытном образце под микроскопом с помощью микрометра. О влиянии лектина на проростание конидий судили по ингибированию гифального роста по сравнению с контролем (рисунок 23). Методом турбидиметрии была определена мутность контрольных и опытных образцов (таблица 10).



Таблица 10 – Ингибирование роста конидий грибов лектином, определенное методом турбодиметрии

Образец	13M2	13M3	13M8
Контроль (ОП 700 нм)	0,18	0,159	0,183
Опыт (ОП 700 нм)	0,02	0,123	0,102
% ингибирования	89	23	44

Мутность растворов в присутствии лектина оказалась существенно ниже по сравнению с контролем. Согласно результатам, представленным в таблице 11 и на рисунке 23, это обусловлено ингибированием гифального роста конидий.



**А**

**Б**

**А** – контроль (без MTL); **Б** – в присутствии MTL

Рисунок 23 – Проростание конидий штамма 13M2

Таблица 11 – Длина конидий грибов при добавлении лектина и без него

Штамм гриба	Длина проростковых гиф в контрольной группе, микрон	Длина проростковых гиф в опытной группе, микрон	% ингибирования
13M2	180	4	99
13M3	309,6	31,8	89,7
13M8	157	18,1	88,5

В отсутствии MTL происходило активное проростание конидий с последующим гифальным ростом, в то время как в присутствии лектина наблюдалось ингибирование роста. Полученные результаты объясняются тем,

что в течение своего жизненного цикла грибы прорастают из конидий с образованием гиф. Этот процесс сопровождается изменением состава клеточной стенки, в частности, клеточная стенка конидий содержит  $\alpha$ -1,3-глюкан, 1,8-дигидроксинафталин-(DHN) меланин и стержневой слой, состоящий из гидрофобов (высокоорганизованных гидрофобных белков). При образовании гиф формируется внеклеточный матрикс, содержащий  $\alpha$ -1,3-глюканы и, в том числе, высокоспецифичные для MTL галактоманнаны, галактозаминогалактаны [156].

На основании полученных результатов можно сделать вывод, что MTL обладает выраженным фунгиостатическим действием на развитие конидий. В организме мидии MTL, прежде всего, препятствует прорастанию конидий грибов, в меньшей степени, их мицеллярному росту [61].

#### **3.4.6 Цитокин-стимулирующая активность**

В последнее десятилетие было продемонстрировано немало доказательств участия лектинов в иммунологических реакциях. Транскрипты мРНК почти всех лектинов морских беспозвоночных увеличиваются после стимуляции патогенами или ПАМП, что указывает на их участие в процессе иммунной регуляции [53]. Известно, что иммуномодулирующее действие белков, пептидов и белковых гидролизатов из морских источников направлено на различные мишени, в том числе макрофаги, функция которых проявляется не только во внутриклеточном переваривании и уничтожении микроорганизмов, но и в инициации секреции набора цитокинов с различной функциональной активностью: IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 и IL-12 [159].

Влияние MTL на спонтанную и индуцированную продукцию клетками крови человека провоспалительных (TNF- $\alpha$  и IFN- $\gamma$ ) и противовоспалительного (IL-10) цитокинов было изучено методом ИФА (рисунок 24).

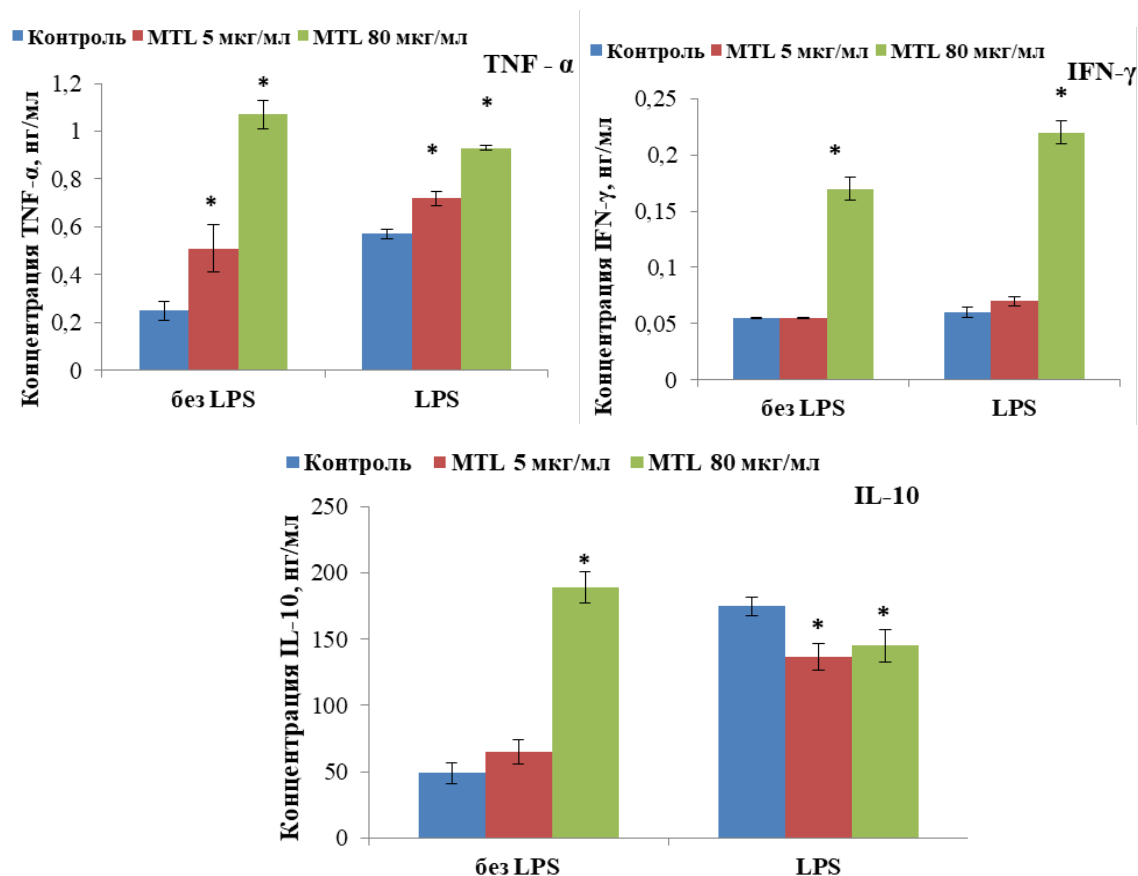


Рисунок 24 - Цитокин-стимулирующая активность MTL на цельной крови человека

Данные представлены как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение (n=3), \* $p < 0,05$

Установлено, что MTL оказывает стимулирующее действие на спонтанную продукцию как провоспалительных, так и противовоспалительного цитокинов. В случае индукции клеток LPS лектин проявлял иммуномодулирующую активность, уменьшая сверхэкспрессию уровня IL-10, особенно при небольшой концентрации. Известно, в организме морских беспозвоночных присутствуют цитокиноподобные молекулы, которые гомологичны по морфологии и функции цитокинам млекопитающих [160]. Первым идентифицированным цитокином двустворчатых моллюсков был интерлейкин-17, продуцируемый в значительных количествах в гемоцитах устриц *C. gigas* в ответ на бактериальное заражение [161]. Позднее последовательности IL-17 или их высокочувствительные транскрипты были найдены у многих видов двустворчатых моллюсков [162]. Затем другой

цитокин TNF- $\alpha$  был обнаружен в брюхоногом моллюске *Haliotis discus* [163]. Этот многофункциональный иммуномодулятор также найден у *C. gigas* [164], *C. hongkongensis* [165] и *Ostrea edulis* [166]. Показано, что транскрипты TNF- $\alpha$  моллюсков активируются в ответ на заражение и модулируют фагоцитоз и апоптоз в гемоцитах. В гребешках *C. farreri* доказано присутствие молекул TNF- $\alpha$  и TNF-рецептора 1, взаимодействие которых запускает так называемый TNF-путь, основной путь апоптоза, а также воспаления и иммунитета [167]. Анализ Mytibase, интерактивного каталога 7112 транскриптом *M. galloprovincialis*, показал наличие 146 TNF – подобных доменов [135].

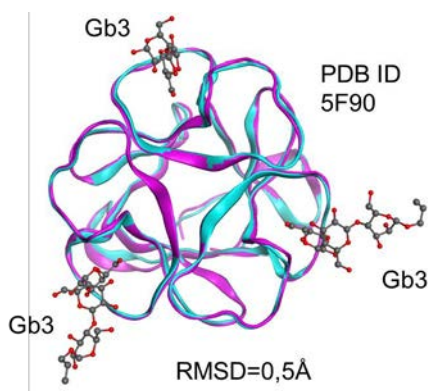
Таким образом, моллюск, столкнувшись с патогеном, инициирует цепь событий, начиная с индукции синтеза активных белков, в том числе лектинов, которые в свою очередь, действуя на различные мишени, запускают синтез цитокинов. Все разнообразие биологического действия цитокинов, секретируемых макрофагами, направлено на нейтрализацию и уничтожение патогена: от инициации белков острой фазы и активации системы комплемента до привлечения в зону проникновения патогена дополнительных фагоцитирующих клеток [162]. Увеличение уровня цитокинов при действии MTL на клетки крови человека показало иммуномодулирующую активность лектина, которую он проявляет в организме мидии, подвергшейся внешнему заражению. Действуя не только как ПРР, агглютинируя или опсонизируя патоген, MTL опосредовано влияет на синтез цитокинов, таким образом, еще раз подтверждая свое участие в реакциях врожденного иммунитета мидии.

### **3.4.7 Антипролиферативная активность**

#### **3.4.7.1 Взаимодействие MTL с глоботриозой *in silico***

На сегодняшний день даже самые эффективные противоопухолевые препараты, применяемые в терапии онкологических заболеваний, обладают значительной токсичностью, что ограничивает их использование и эффективность, не обеспечивая полного излечения. Основной причиной токсичности является отсутствие селективности препаратов по отношению

только к опухолевым клеткам. Следовательно, растет потребность в новых перспективных соединениях, обладающих выраженной специфичностью к опухолевым клеткам и как можно меньшей токсичностью в отношении нормальных клеток. Способность лектинов к высокоспецифичному взаимодействию с гликанами позволяет им связываться с раковыми клетками и проявлять противоопухолевую активность, индуцируя различные формы регулируемой гибели клеток и ингибируя их пролиферацию [168]. Ввиду того, что лектины семейства *mytilectin* проявляют высокую противоопухолевую активность по отношению к опухолевым клеткам разных линий лимфомы Беркитта [50], а также имея данные о значительном аффинитете MTL к мотиву Gal $\alpha$ 1-4Gal $\beta$ 1-4GlcNAc, схожему со структурой глоботриозы (Gb3) (Gal $\alpha$ 1-4Gal $\beta$ 1-4Glc), экспрессируемой на мембране некоторых опухолевых клеток, *in silico* была изучена энергия связывания лектина с Gb3. В качестве прототипа была выбрана кристаллическая структура комплекса CGL с глоботриозой (PDB ID 5F90\_B) (рисунок 25).



Структура белков показана в виде ленточной диаграммы: розовым цветом обозначен MTL, бирюзовым цветом обозначен CGL. Среднеквадратичное отклонение всех C- $\alpha$  атомов составляет 0,5Å

Рисунок 25 – Суперпозиция теоретической модели структуры MTL с прототипом кристаллической структурой CGL при взаимодействии с Gb3.

Анализ контактов в углевод-связывающих сайтах лектина, проведенный с помощью модуля Ligand Interaction программы «МОЕ 2020.09», показал, что

MTL связывается только с терминальным моносахаридным остатком Gb3 (рисунок 26).

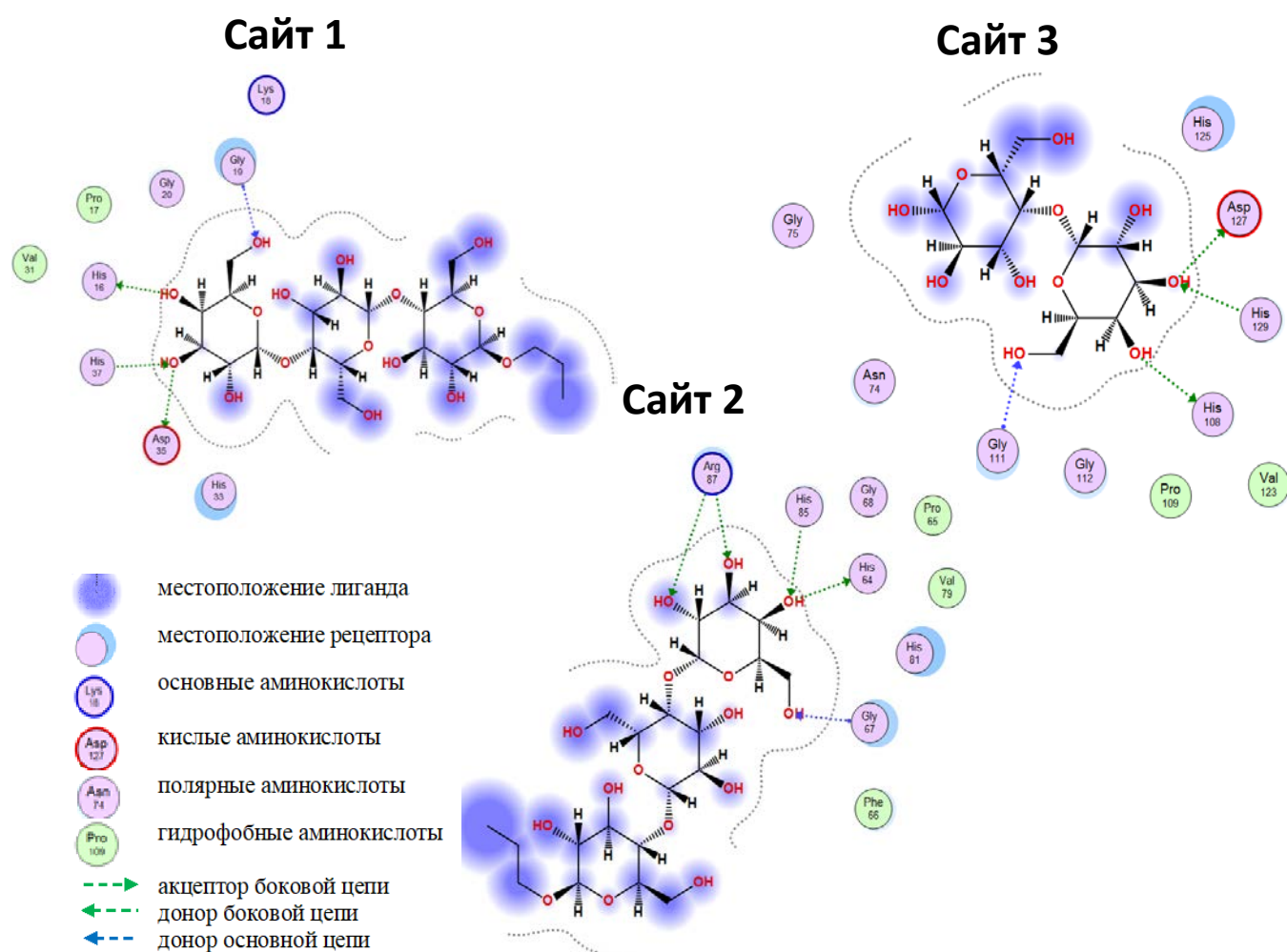


Рисунок 26 - 2D-диаграмма контактов лектина MTL с глоботриозой.

Суммарная энергия связи трех углевод-связывающих сайтов MTL с глоботриозой  $\Delta G$  равна -56,456 ккал/моль (-236,4 кДж/моль), что свидетельствует о энергетически выгодном состоянии лектина в комплексе с лигандом. Полученные данные указывают на возможную противоопухолевую активность лектина по отношению к раковым клеткам лимфомы Беркитта, которые экспрессируют большое количество глоботриозы [169].

### 3.4.7.2 Антипролиферативное действие MTL на клетки линии лимфомы Беркитта

Клетки лимфомы Беркитта (линии Raji, EB-1 и Daudi) обрабатывали различными концентрациями MTL и через 48 часов регистрировали действие лектина (рисунок 27).

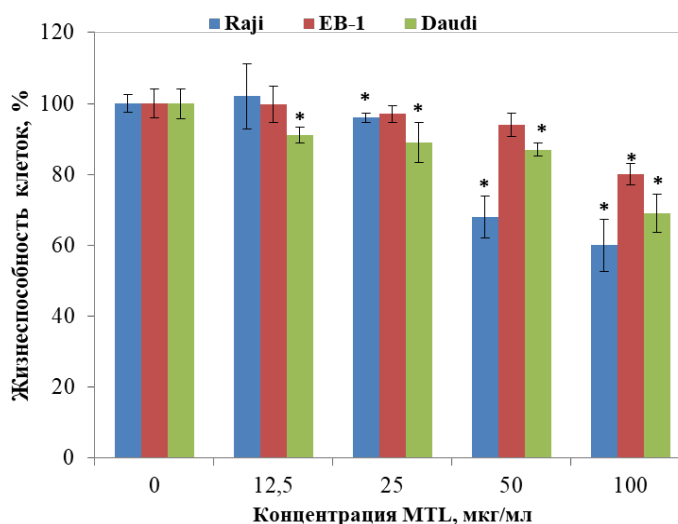


Рисунок 27 – Антипролиферативное действие MTL в отношении клеток лимфомы Беркитта, установленное с помощью MTS-метода.

Данные представлены как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение (n=3), \*p<0,05

В результате исследования установлено, что лектин проявляет прямое дозозависимое антипролиферативное действие в отношении всех исследуемых клеток линий лимфомы Беркитта. Наибольшая активность MTL наблюдается в отношении клеток линии Raji, что дает основание для более глубокого изучения его антипролиферативной активности на этой линии клеток.

### 3.4.7.3 Влияние MTL на клеточный цикл клеток линии Raji лимфомы Беркитта

Все эукариотические клетки имеют четыре фазы внутриклеточного цикла: G1-фаза начального роста, во время которой идет синтез мРНК, белков, других клеточных компонентов; S-фаза, во время которой идет репликация ДНК клеточного ядра, также происходит удвоение центриолей; G2-фаза

подготовки к митозу; М-фаза деления клетки. G0-внешняя фаза, соответствующая периоду клеточного цикла, в течение которого клетки находятся в состоянии покоя и не делятся, рассматривается как растянутая G1-фаза. Регуляция клеточного цикла и повреждение ДНК имеют очень тесную связь с идентификацией и развитием опухолевых клеток [170]. Индукция клеточной гибели или ингибирование клеточной пролиферации напрямую связаны с активацией различных внутриклеточных сигнальных путей для остановки цикла раковых клеток в фазе G1, S или G2 [171].

Изучение влияния MTL на клеточный цикл проводили методом проточной цитометрии. Клетки Raji линии лимфомы Беркитта инкубировали в присутствии различных концентраций MTL. После добавления интеркалирующего красителя PI клетки анализировали на проточном цитофлуориметре (рисунок 28).

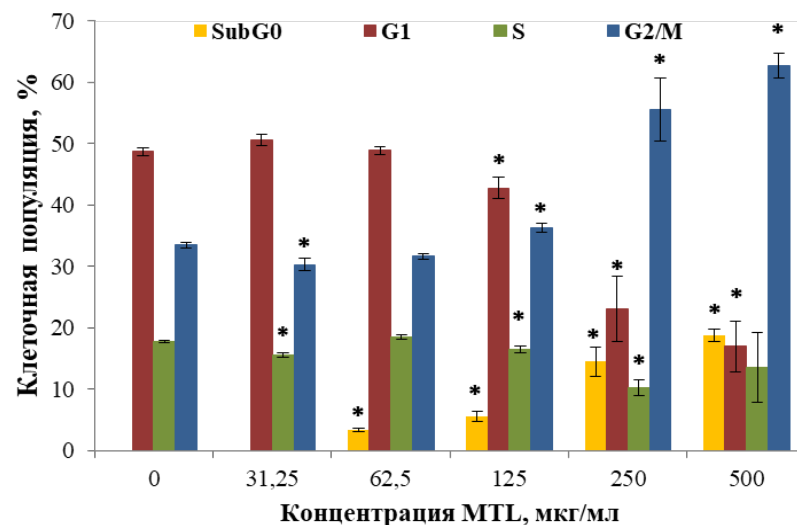


Рисунок 28 - Влияние MTL на клеточный цикл клеток линии Raji лимфомы Беркитта установленное методом проточной цитофлуориметрии после окраски PI.

Данные представлены как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение (n=3), \* $p < 0,05$

Установлено, что MTL вызывает дозозависимое увеличение популяции клеток в фазе G2/M от 33 % до 64 %. Аналогичные результаты были показаны для CGL, который является структурным гомологом MTL. Обработка клеток



Raji CGL в концентрации 20 мкг/мл приводит к аресту клеточного цикла также в фазе G2/M [50]. Стоит отметить небольшое, но концентрационно - зависимое увеличение клеточной популяции в фазе SubG0, позволяющее сделать предположение, что после ареста клеточного цикла, возможно, происходит апоптотическая гибель клеток.

Ингибирование прогрессии цикла в фазе G2/M наблюдается также в случае ряда химиотерапевтических препаратов, используемых для борьбы с различными типами рака [172].

Полученные результаты указывают на возможность применения MTL в качестве антипролиферативного агента для терапии онкологических заболеваний. Благодаря высокой специфичности взаимодействия с опухолевыми клетками, MTL может быть использован для диагностики и дифференцировки онкопатологий.

### Заключение

Рост заболеваемости в последнее время побуждает ученых и медиков к интенсивному поиску новых средств для борьбы с заболеваниями различной этиологии. Биоактивные белки из морских источников привлекают все большее внимание исследователей. Многочисленные биологические свойства лектинов, их высокая активность и многофункциональность, а также доступность в виде рекомбинантных аналогов делают их интересными молекулами не только с точки зрения фундаментальных научных исследований, но и перспективными для практического использования, особенно в области разработки противомикробных, противоопухолевых и иммуностимулирующих препаратов.

Одним из таких соединений является MTL, структура и свойства которого охарактеризованы в данной работе. В результате проведенных исследований были получены убедительные доказательства его принадлежности к новому семейству лектинов – mytilectin. Важной особенностью молекулы MTL является способность к димеризации, что влечет за собой увеличение числа углеводов-связывающих сайтов и обеспечивает высокую авидность по отношению к большим лигандам. Биологическая активность MTL свидетельствует о принадлежности лектина к группе паттерн-распознающих рецепторов и о непосредственном участии в реакциях врожденного иммунитета моллюска.

Широкий спектр биологической активности MTL делает его интересным объектом в контексте научных исследований, особенно в области разработки новых противомикробных, противоопухолевых и иммуностимулирующих препаратов.

### Выводы

1. Из экстракта мантии мидии *M. trossulus* выделен и охарактеризован новый GalNAc/Gal-специфичный лектин (MTL).
2. Методами молекулярной биологии установлена первичная структура MTL, анализ которой показал, что MTL является еще одним представителем недавно открытого нового семейства лектинов mytelectin.
3. Сравнительный анализ молекулярных масс пептидных фрагментов, полученных в результате практического трипсинолиза нативного лектина и теоретического трипсинолиза выведенной аминокислотной последовательности показал, что аминокислотная последовательность соответствует нативному MTL.
3. Методом компьютерного моделирования установлено, что лектин имеет структуру  $\beta$ -трилистника и образует димеры с удвоением сайтов связывания лиганда.
4. Впервые получен рекомбинантный аналог MTL, активность которого сопоставима с активностью нативного лектина.
5. Выявлена принадлежность MTL к паттерн-распознающим рецепторам, что подтверждается цитокин-стимулирующей, противомикробной, антифунгальной активностями и указывает на участие лектина в реакциях врожденного иммунитета мидии.
6. Показана антипролиферативная активность лектина по отношению к клеткам линии Raji лимфомы Беркитта.

### Список литературы

1. H. Gabius. The sugar code // Wiley-Blackwell. – 2009. – 570 p.
2. G. R. Vasta, H. Ahmed, C. Feng, K. Saito, S. Tasumi, E.W. Odom. Lectin Repertoires in Invertebrates and Ectothermic Vertebrates: Structural and Functional Aspects // Comprehensive lyscience (Second Edition). – 2021. – V. 5. – P. 74-92.
3. F. J. Hugo, A. M. Evandro, S. M. B. Wildson, T. H. Edson, N. N. G. Luiz. Molecular mechanisms involved in the antitumor activity of isolated lectins from marine organisms: A systematic review / Current Drug Targets. – 2020. – V. – 21 (6). – P. 616-625.
4. A. Naeem, M. Saleemuddin, R. H. Khan. Glycoprotein targeting and other applications of lectins in biotechnology // Curr. Protein Pept. Sci. – 2007. – V. 8 (3). – P. 261-271.
5. M. R. Cardoso, C. M. Mota, D. P. Ribeiro, P. G. Noletto, W. B. Andrade, M. A. Souza, N. M. Silva, T. W. Mineo, J. R. Mineo, D. A. Silva. Adjuvant and immunostimulatory effects of a D-galactose-binding lectin from *Synadenium carinatum latex* (ScLL) in the mouse model of vaccination against neosporosis / Vet. Res. – 2012. – V. 43. – P. 76.
6. J. Balzarini. Carbohydrate-binding agents: a potential future cornerstone for the chemotherapy of enveloped viruses? // Antivir. Chem. Chemother. – 2007. – V. 18. – P. 1–11.
7. Z. Liu, Y. Luo, T. T. Zhou, W. Z. Zhang. Could plant lectins become promising anti-tumour drugs for causing autophagic cell death? // Cell Prolif. – 2013. – V. 46. – P. 509-515.
8. И. В. Чикаловец, В. И. Молчанова, А. А. Булгаков, О. В. Черников, И. Ю. Петрова, П. А. Лукьянов. Использование лектинов морских гидробионтов для диагностики ряда социально значимых заболеваний человека // Вестник ДВО РАН. – 2010. – № 5. – С. 125-130.
9. A. K. Gautam, D. Sharma, J. Sharma, K. Ch. Saini. Legume lectins: Potential use as a diagnostics and therapeutics against the Cancer // Intern. J. of Biol. Macromol. – 2020. – V. 142. – P. 474-483.

10. S. N. Kovalchuk, V. A. Golotin, L. A. Balabanova, N. S. Buinovskaya, G. N. Likhatskaya, V. A. Rasskazov. Carbohydrate-binding motifs in a novel type lectin from the sea mussel *Crenomytilus grayanus*: Homology modeling study and site-specific mutagenesis // *Fish & Shellfish Immun.* – 2015. – V. 47. – P. 565-571.
11. J. H. Liao, C. Chien, H. Wu, K. Huang, I. Wang, M. Ho, I. Tu, I. Lee, W. Li, Y. Shih, C. Wu, P. Lukyanov, S. Hsu, S. Wu. A multivalent marine lectin from *Crenomytilus grayanus* possesses anti-cancer activity through recognizing globotriose Gb3 // *J. Am. Chem. Soc.* – 2016. – V. 138. – P. 4787–4795.
12. A. Santos, M. Silvia, T. Napoleao, P. Paiva, M. Correia, L. Coelho. Lectins: Function, structure, biological properties and potential applications // *Research Trends. Current Topics in Peptide & Protein Research.* – 2014. – V. 15. – P. 41-62.
13. G. Vasta, H. Ahmed. Introduction to animal lectins // CRC Press. Animal lectins. 1st Edition. – 2008. – P. 3-8.
14. M. Gerdol. First insights into the repertoire of secretory lectins in rotifers // *Mar. Drugs.* – 2022. – V. 20 (2). P. – 130.
15. Se-K. Kim. Marine Proteins and Peptides: Biological Activities and Applications // John Wiley & Sons, Ltd. 1st edition. – 2013. – P. 45-46.
16. S. Mayer, M. K. Raulf, B. Lepenies. C-type lectins: their network and roles in pathogen recognition and immunity // *Histochem. & Cell Biol.* – 2017. – V. 147 (2). – P 223–237.
17. G. Brown, J. Willment, L. Whitehead. C-type lectins in immunity and homeostasis // *Nat. Rev. Immunol.* – 2018. – V. 18. – P. 374–389.
18. K. Drickamer, R. Dodd. Lectins // *Glycobiol.* – 2001. – V. 11 (5). – P. 71-79.
19. I. Epstein, Q. Eichbaum, S. Sheriff, R. A. Ezekowitz. The collectins in innate immunity // *Curr. Opin. Immunol.* – 1996. – V. 8 (1). – P. 29-35.
20. H. Lis. Carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition / H. Lis, N. Sharon // *Chem. Rev.* – 1998. – V. 98. – P. 637-674.

21. Y. Akimoto, Y. Imai, I. Hirabayashi. Histochemistry and cytochemistry of endogenous animal lectins // *Progr. Histochem. Cytochem.* – 1998. – V. 33. – P. 1-92.
22. R. D. Cummings, R. P. McEver. C-type Lectins // *Essentials of Glycobiol.* [Internet]. 3rd edition. Cold Spring Harbor. – 2017. – Chapter 34. – P. 435-452.
23. R. D. Cummings, M. E. Etzler, A. Surolia. L-Type Lectins // *Essentials of Glycobiol.* [Internet]. 3rd edition. Cold Spring Harbor. – 2017. – Chapter 32. – P. 410 – 422.
24. K. Kiriya, K. Itoh. Glycan recognition and application of P-type lectins // *Lectin Purif. & Anal.* – 2020. – V. 2132. – P. 267-276.
25. A. Varki, S. Kornfeld. P-Type lectins / In: Varki A, Cummings R. D., Esko J. D., et al., editors // *Essentials of Glycobiol.* [Internet]. 3rd edition. Cold Spring Harbor. – Chapter 33. – P. 422-434.
26. N. M. Dahms, M. K. Hancock. P-type lectins // *Bioch. & Biophys. Acta (BBA). General Subjects.* – 2002. – Volume 1572 (2–3). – P. 317-340.
27. K. F. Bornhofft, T. Goldammer, A. Rebl, S. P. Galuska. Siglecs: A journey through the evolution of sialic acid-binding Immunoglobulin-Type lectins // *Developmental & Comparative Immunology.* – 2018. – V. 86. – P. 219-231.
28. J. Hirabayashi, K. Kasai. The family of metazoan metal-independent  $\beta$ -galactoside-binding lectins: structure, function and molecular evolution // *Glycobiol.* – 1993. – V. 3. – P. 297-304.
29. B. P. Chatterjee. *Marine Proteins and Peptides: Biological Activities and Applications*: 1st edition // John Wiley & Sons, Ltd. Published. – 2013. – 46 p.
30. T. Suzuki, K. Mori. A galactose-specific lectin from the hemolymph of the pearl oyster, *Pinctada fucata martensii* // *Comp. Biochem. Physiol.* – 1989. – V. 3. – P. 455-462.
31. О. В. Черников, И. В. Чикаловец, В. И. Молчанова, А. С. Кондрашина, В. Ли, П. А. Лукьянов. Лектины морских гидробионтов // *Биохим.* – 2013. – Т. 78. – вып. 7. – С. 977 – 989.

32. M. Adhya, B. Singha. Gal/GalNAc specific multiple lectins in marine bivalve *Anadara granosa* // Fish & Shellfish Immun. – 2016. – V. 50. – P. 242-246.
33. H. G. Beisel, S. Kawabata, S. Iwanaga, R. Huber, W. Bode. Tachylectin-2: crystal structure of a specific GlcNAc/GalNAc-binding lectin involved in the innate immunity host defense of the Japanese horseshoe crab *Tachypleus tridentatus* // J. EMBO. – 1999. – V. 18. (9). – P. 2313-22.
34. S. M. A. Kawsar, Y. Fujii, R. Matsumoto, T. Ichikawa, H. Tateno, J. Hirabayashi, H. Yasumitsu, Ch. Dogasaki, M. Hosono, K. Nitta, J. Hamako, T. Matsui, Y. Ozeki. Isolation, purification, characterization and glycan-binding profile of a d-galactoside specific lectin from the marine sponge, *Halichondria okadai* // Comparative Biochem. and Physiol. Part B: Biochem. & Molec. Biol. – 2008. – V. 150 (4). – P. 349-357.
35. K. Mann, I. M. Weiss, S. Andre, H.-Joachim Gabius, M. Fritz. The amino-acid sequence of the abalone ( *Haliotis laevis*) nacre protein perlucin // European J. of Biochem. – 2000. – V. 267 (16). – P. 5257-5264.
36. T. Hatakeyama, T. Kamiya, M. Kusunoki, S. Nakamura-Tsuruta, J. Hirabayashi, Sh. Goda, H. Unno. Galactose recognition by a tetrameric C-type lectin, CEL-IV, containing the EPN carbohydrate recognition motif // J. Biol. Chem. – 2011. – V 286 (12). – P. 10305–10315.
37. X. Song, H. Zhang, L. Wang, J. Zhao, C. Mu, L. Song, L. Qiu, X. Liu. A galectin with quadruple-domain from bay scallop *Argopecten irradians* is involved in innate immune response // Dev. Comp. Immunol. – 2011. – V. 35. – P. 592-602.
38. Y. Fujii, M. Gerdol, I. Hasan, Y. Koide, R. Matsuzaki, M. Ikeda, S. Rajia, Y. Ogawa, S. M. A. Kawsar, Y. Ozeki. Phylogeny and properties of a novel lectin family with  $\beta$ -trefoil folding in mussels // Trends Glycosci. Glycotechnol. – 2018. – V. 30. – P. J155–J168.
39. Takagi, T., Nakamura, A., Deguchi, R., Kyojuka, K. Isolation, characterization, and primary structure of three major proteins obtained from *Mytilus edulis* sperm // J. Biochem. – 1994. – V. 116. – P. 598–605.

40. Th. G. Lima, M. A. Adaptive evolution of M3 Lysin—A candidate gamete recognition protein in the *Mytilus edulis* species complex // Molec. Biol. & Evol. – 2013. – V. 30(12). – P. 2688–2698.
41. E. P. Espinosa, M. Perrigault, B. Allam. Identification and molecular characterization of a mucosal lectin (MeML) from the blue mussel *Mytilus edulis* and its potential role in particle capture // Comp. Biochem. & Physiol. Part A: Molec. & Integr. Physiol. – 2010. – V. 156 (4). – P. 495-501.
42. S. Tunkijjanukij, H. V. Mikkelsen, J. A. Olafsen. A Heterogeneous sialic acid-binding lectin with affinity for bacterial LPS from horse mussel (*Modiolus modiolus*) Hemolymph // Comp. Biochem. Physiol. Biochem. Mol. Biol. – 1997. – V. 117. – P. 273–286.
43. Y. Fujii, M. Gerdol, S. M. A. Kawsar, I. Hasan, F. Spazzali, T. Yoshida, Y. Ogawa, S. Rajia, K. Kamata, Y. Koide, Sh. Sugawara, M. Hosono, J. R. H. Tame, H. Fujita, A. Pallavicini, Y. Ozeki. A GM1b/asialo-GM1 oligosaccharide-binding R- type lectin from purplish bifurcate mussels *Mytilisepta virgata* and its effect on MAP kinases // J. FEBS. – 2020. – V. 287 (12). – P. 2612-2630.
44. N. I. Belogortseva, V. I. Molchanova, A. V. Kurika, A. S. Skobun, V. E. Glazkova. Isolation and characterization of new GalNAc/Gal-specific lectin from the sea mussel *Crenomytilus grayanus* // Comp. Biochem. Physiol. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol. – 1998. – V. 119. – P. 45–50.
45. C. Tong, W. Li, Q. Jin, C. Tan, M. Qu, W. Chen, V. Molchanova, I. Chikalovets, O. Chernikov, P. Lukyanov. Lectin from the sea mussel *Grenomytilus grayanus* and its effects on *Saccharomyces cerevisiae* // Afr. J. Biotechnol. – 2011. – V. 10. – P. 18532-18538.
46. Y. Fujii. Methods in molecular biology. Purification and functional characterization of the effects on cell signaling of Mytilectin // Lectin Purific. & Anal. Chapter 21. – 2020. – P. 201-213.
47. S. Kovalchuk, I. Chikalovets, O. Chernikov, V. Molchanova, W. Li, V. Rasskazov, P. Lukyanov. cDNA cloning and structural characterization of a lectin



from the mussel *Crenomytilus grayanus* with a unique amino acid sequence and antibacterial activity // *Fish & Shellfish Immun.* – 2013. – V. 35 (4). – P. 1320-1324.

48. I. Chikalovets, A. Filshtein, V. Molchanova, T. Mizgina, P. Lukyanov, O. Nedashkovskaya, Kuo-Feng Hua, O. Chernikov. Activity dependence of a novel lectin family on structure and carbohydrate-binding properties // *Mol.* – 2020. – V. 25. – P. 150.

49. E. Garcia-Maldonado, P. Cano-Sanchez, A. Hernandez-Santoyo. Molecular and functional characterization of a glycosylated galactose-binding lectin from *Mytilus californianus* // *Fish & Shellfish Immun.* – 2017. – V. 66. – P. 564-574.

50. O. Chernikov, A. Kuzmich, I. Chikalovets, V. Molchanova, K.-F. Hua. Lectin CGL from the sea mussel *Crenomytilus grayanus* induces Burkitt's lymphoma cells death via interaction with surface glycan // *Inter. J. of Biol. Macromol.* – 2017. – V. 104. Part A. – P. – 508-514.

51. I. Chikalovets, O. Chernikov, M. Pivkin, V. Molchanova, A. Litovchenko, W. Li, P. Lukyanov. A lectin with antifungal activity from the mussel *Crenomytilus grayanus* // *Fish & Shellfish Immunol.* – 2015. – V. 42. – P. 503-507.

52. Y. Fujii, N. Dohmae, K. Takio, SM. Kawsar, R. Matsumoto, I. Hasan, Y. Koide, RA. Kanaly, H. Yasumitsu, Y. Ogawa, S. Sugawara, M. Hosono, K. Nitta, J. Hamako, T. Matsui, Y. Ozeki. A lectin from the mussel *Mytilus galloprovincialis* has a highly novel primary structure and induces glycan-mediated cytotoxicity of globotriaosylceramide-expressing lymphoma cells // *J. Biol. Chem.* – 2012. – V. 287(53). – P. 44772-44783.

53. W. Wang, X. Song, L. Wang, L Song. Pathogen-derived carbohydrate recognition in molluscs immune defense // *Int. J. Mol. Sci.* – 2018. – V. 19 (3). – P. 721.

54. J. Garderes, M. L. Bourguet-Kondracki, B. Hamer, R. Batel, H. C. Schroder, W. E. Muller. Porifera Lectins: Diversity, physiological roles and biotechnological potential // *Mar. drugs.* – 2015. – V. 13 (8). – P. 5059–5101.

55. B. Havlickova, V.A. Czaika, M. Friedrich. Epidemiological trends in skin mycoses worldwide // *Mycoses.* – 2008. – V. 51 (4). – P. 2–15.

56. N. A. R. Gow.: The Fungal Cell Wall: Structure, Biosynthesis, and Function // Microbiol. Spectr. Chapter 12. – 2017. – 5 (3). – P. 15.
57. F. Salazar, G. D. Brown. Antifungal Innate Immunity: A Perspective from the Last 10 Years // J. Innate Immun. – 2018. – V. 10 (5-6). – P. 373–397.
58. K. L. Becker, D. C. Ifrim, J. Quintin, M. G. Netea, F. L. van de Veerdonk. Antifungal innate immunity: recognition and inflammatory networks // Semin. Immunopathol. – 2015. – V. 37. – P. 107–116.
59. X. Y. Ye, T. B. Ng, P. W. K. Tsang, J. Wang. Isolation of a homodimeric lectin with antifungal and antiviral activities from red kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds // J. Prot. Chem. – 2001. – V. 20 (5). – P. 367–375.
60. A. S. W. Ang, R. C. F. Cheung, X. Dan, Y. S. Chan, W. Pan, T. B. Ng. Purification and characterization of a glucosamine-binding antifungal lectin from *Phaseolus vulgaris* cv. Chinese Pinto Beans with antiproliferative activity towards nasopharyngeal carcinoma cells // Appl. Biochem. & Biotech. – 2014. – V. 172 (2). – P. 672–686.
61. I. V. Chikalovets, S. N. Kovalchuk, A. P. Litovchenko, V. I. Molchanova, M. V. Pivkin, O.V. Chernikov. A new Gal/GalNAc-specific lectin from the mussel *Mytilus trossulus*: Structure, tissue specificity, antimicrobial and antifungal activity // Fish & Shellfish Immunol. – 2016. – V. 50. – P. 27–33.
62. L. C. B. B. Coelho, P. M. dos Santos Silva, V. L. de Menezes Lima, E. V. Pontual, P. M. G. Paiva, Th. H. Napoleao, M. T. dos Santos Correia. Lectins, interconnecting proteins with biotechnological/pharmacological and therapeutic applications // Evid. Based Complement Alternat. Med. – 2017. – V. 2017. – P. 22.
63. N. Sharon. Lectins: 2nd edition // Springer. – 2007. – 454 p.
64. J. Zhou, M. Hu, J. Li, Y. Liu, J. Luo, L. Zhang, X. Lu, D. Zuo, Z. Chen. Mannan-binding lectin regulates inflammatory cytokine production, proliferation, and cytotoxicity of human peripheral natural killer cells // Mediators Inflamm. – 2019. – V. 2019. – P. 12.
65. A. Mishra, A. Behuraa, Sh. Mawatwal, A. Kumar, L. Naik, S. S. Mohanty, D. Manna, P. Dokania, A. Mishra, S. K. Patra, R. Dhimana. Structure-

function and application of plant lectins in disease biology and immunity // Food and chem. toxicol. – 2019. – V. 134. – P. 110827.

66. O. Chernikov, W. Wong, L. Li, I. Chikalovets, V. Molchanova, S. Wu, J. Liao, K. Hua. A GalNAc/Gal-specific lectin from the sea mussel *Crenomytilus grayanus* modulates immune response in macrophages and in mice // Scienti. rep. – 2017. – V. 7(1). – P. 6315.

67. C. Liu, Sh. Jiang, M. Wang, L. Wang, H. Chen, J. Xu, Zh. Lv, L. Song. A novel siglec (CgSiglec-1) from the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) with broad recognition spectrum and inhibitory activity to apoptosis, phagocytosis and cytokine release // Devel. & Comparative Immun. – 2016. – V. 61. – P. 136-144.

68. M. Silva, C. de Paula, J. Ferreira, E. Paredes-Gamero, A. Vaz, M. Sampaio, M. Correia, M. Oliva. *Bauhinia forficata* lectin (BfL) induces cell death and inhibits integrin-mediated adhesion on MCF7 human breast cancer cells // Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj. – 2014. – V. 1840. – P. 2262.

69. M. A. Savanur, S. M. Eligar, R. Pujari, C. Chen, P. Mahajan, A. Borges, P. Shastry, A. Ingle, R. D. Kalraiya, B. M. Swamy, J. M. Rhodes, L. G. Yu, S. R. Inamdar. *Sclerotium rolfsii* Lectin Induces Stronger Inhibition of Proliferation in Human Breast Cancer Cells than Normal Human Mammary Epithelial Cells by Induction of Cell Apoptosis // PLoS One. – 2014. – V. 9. – P. e110107.

70. J. Garderes, M. Bourguet-Kondracki, B. Hamer, R. Batel, H. C. Schroder, W. E. G. Mülle. Porifera lectins: diversity, physiological roles and biotechnological potential // Mar. Drugs. – 2015. – Vol. 13 (8). – P. 5059–5101.

71. F. I. Khan, D.-Q. Wei, K.-R. Gu, Md. I. Hassan, Sh. Tabrez. Current updates on computer aided protein modeling and designing // Inter. J. Biol. Macromol. – 2016. – V. 85. – P.48-62.

72. R. F. Carneiro, C. S. Teixeira, A. A. de Melo, A. S. de Almeida, B. S. Cavada, O. V. de Sousa, B. A. M. da Rocha, C. S. Nagano, A. H. Sampaio. L-rhamnose-binding lectin from eggs of the *Echinometra lucunter*: amino acid sequence and molecular modeling // Int. J. Biol. Macromol. – 2015. – V. 78. – P. 180-188.

73. V. R. Pinto-Junior, V. J. S. Osterne, M. Q. Santiago, C. F. Lossio, C. S. Nagano, C. R. C. Rocha, J. C. F. Nascimento, F. L. F. Nascimento, I. B. Silva, A. S. Oliveira, J. L. A. Correia, R. B. Leal, A. M. S. Assreuy, B. S. Cavada, K. S. Nascimento. Molecular modeling, docking and dynamics simulations of the *Dioclea lasiophylla* Mart. Ex Benth seed lectin: an edematogenic and hypernociceptive protein // *Biochimie*. – 2017. – V. 135. – P. 126-136.
74. S. N. Kovalchuk, N. S. Buinovskaya, G. N. Likhatskaya, V. A. Rasskazov, O. M. Son, L. A. Tekutyeva, L. A. Balabanova. Mutagenesis studies and structure-function relationships for GalNAc/Gal-specific lectin from the sea mussel *Crenomytilus grayanus* // *Mar. Drugs*. – 2018. – V. 16(12). – P. 471.
75. W. Acosta, C. L. Cramer. Targeting macromolecules to CNS and other hard-to-treat organs using lectin-mediated delivery // *Int. J. Mol. Sci.* – 2020. – V. 21. – P. 971.
76. E. de O. Figueiroa, C. R. A. da Cunha, P. B. S. Albuquerque, R. A. de Paula, M. A. Aranda-Souza, M. A. da Silva, A. Zagnignan, M. G. Carneiro-da-Cunhaa, L. C. Nascimento da Silva, M. T. dos Santos Correia. Lectin-carbohydrate interactions: Implications for the development of new anticancer agents // *Curr. Medicinal Chem.* – 2017. – V. 24. – P. 1-14.
77. Y. Sheng, H. He, and H. Zou. Poly(lactic acid) nanoparticles coated with combined WGA and water-soluble chitosan for mucosal delivery of  $\beta$ -galactosidase // *Drug Deliv.* – 2014. – V. 21 (5). – P. 370–378.
78. M. Martinez-Carmona, D. Lozano, M. Colilla, M. Vallet-Regi. Lectin-conjugated pH-responsive mesoporous silica nanoparticles for targeted bone cancer treatment // *Acta Biomater.* – 2018. – V. 65. – P. 393-404.
79. M. L. Bruschi. Lectins and Nanostructured Drug Delivery Systems // *Cur. Drug Deliv.* – 2019. – V. 16(3). – P. 268-269.
80. A. Kuno, N. Uchiyama, S. Koseki-Kuno, Y. Ebe, S. Takashima, M. Yamada, J. Hirabayashi. Evanescent-field fluorescence-assisted lectin microarray: a new strategy for glycan profiling // *Nat. Methods*. – 2005. – V. 2 (11). – P. 851-856.

81. M. Lastovickova, D. Strouhalova, J. Bobalova. Use of lectin-based affinity techniques in breast cancer glycoproteomics // *J. Proteome Res.* – 2020. – V. 19 (5). – P. 1885–1899.
82. E. H. Donnelly, I. J. Goldstei. Glutaraldehyde-insolubilized concanavalin A: An adsorbent for the specific isolation of polysaccharides and glycoproteins // *Biochem. J.* – 1970. – V. 118(4). – P. 679–680.
83. O. H. Hashim, J. J. Jayapalan, Ch-S. Lee. Lectins: an effective tool for screening of potential cancer biomarkers /*PeerJ.* – 2017. – V. 5. – P. 3784.
84. D. S. Hage, J. A. Anguizola, C. B. Rong, L. R. Matsuda, E. Papastavros, E. Pfaunmiller, J. Vargas, X. Zheng. Pharmaceutical and biomedical applications of affinity chromatography: Recent trends and developments // *J. Pharmaceutical & Biomedical Analysis.* – 2012. – V. 69. – P. 93-105.
85. S. E. Wong, C. E. Winbanks, Ch. S. Samuel, T. D. Hewitson. Lectin histochemistry for light and electron microscopy // *Histology Protocols.* – 2009. – V. 611. – P. 103-114.
86. R. R. Dresch, G.D. Zanetti, F.J. Irazoqui, V.G Sendra, N. Zlocowski, A. Bernardi, R.M. Rosa, A.M. Battastini, A.T. Henriques, M.M. Vozari-Hampe. Staining tumor cells with biotinylated ACL-I, a lectin isolated from the marine sponge, *Axinella corrugata* // *Biotech Histochem.* – 2013. – V. 88(1). – P. 1–9.
87. A. F. G. Leal, N. E. P. Lopes, A. T. R. Clark, N. T. De Pontes Filho, E. I. C. Beltrao, and R. P. Neves. Carbohydrate profiling of fungal cell wall surface glycoconjugates of *Aspergillus* species in brain and lung tissues using lectin histochemistry // *Medical Mycol.* – 2012. – V. 50 (7). – P. 756–759.
88. S. A. Brooks. Lectin histochemistry: Historical perspectives, state of the art, and the future / *Histochem. of Single Mol.* – 2017. – V. – 1560. – P. 93-107.
89. K. Dang, W. Zhang, Sh. Jiang, X. Lin, A. Qian. Application of lectin microarrays for biomarker discovery // *Chemistry Open.* – 2020. – V. 9. – P. 285 – 300.

90. H. Yu, J. Shu, Zh. Li. Lectin microarrays for glycoproteomics: an overview of their use and potential // *Exp. Rev. Proteomics*. – 2020. – V. 17 (1). – P. 27-39.
91. T. Zheng, D. Peelen, L. M. Smith. Lectin Arrays for profiling cell surface carbohydrate expression // *J. Am. Chem. Soc.* – 2005. – V. 127. – P. 9982–9983.
92. S. Chen, T. LaRoche, D. Hamelinck, D. Bergsma, D. Brenner, D. Simeone, R. E. Brand, B. B. Haab. Multiplexed analysis of glycan variation on native proteins captured by antibody microarrays // *J. Nat. Methods*. – 2007. – V. 4. – P. 437–444.
93. Y. Liang, P. Han, T. Wang, H. Ren, L. Gao, P. Shi, S. Zhang, A. Yang, Z. Li, M. Chen,. Stage-associated differences in the serum N- and O-glycan profiles of patients with non-small cell lung cancer / *Clin. Proteomics*. – 2019. – V. 16. – P. 20.
94. W. L. Huang, Y. G. Li, Y. C. Lv, X. H. Guan, H. F. Ji, B. R. Chi. Use of lectin microarray to differentiate gastric cancer from gastric ulcer // *J. Gastroenterol.* – 2014. – V. 20. – P. 5474–5482.
95. J. Shu, H. Yu, X. Li, D. Zhang, X. Liu, H. Du, J. Zhang, Z. Yang, H. Xie, Z. Li. Salivary glycopatterns as potential biomarkers for diagnosis of gastric cancer // *Oncotarget*. – 2017. – V. 8. – P. 35718–35727.
96. O. D. Hendrickson, A. V. Zherdev. Analytical application of lectins // *Critical Reviews in Anal. Chem.* – 2018. – V. 48(4). – P. 279-292.
97. M. Duk, E. Lisowska, J. H. Wu, A. M. Wu. The biotin/avidin-mediated microtiter plate lectin assay with the use of chemically modified glycoprotein ligand // *Anal. Biochem.* – 1994. – V. 221(2). – P. 266–272.
98. O. H. Hashim, J. J. Jayapalan, Ch.-S. Lee. Lectins: an effective tool for screening of potential cancer biomarkers // *PeerJ*. – 2017. – V. 5. – P. e3784.
99. G. R. Wi, B. I. Moon, H. J. Kim, W. Lim, A. Lee, J. W. Lee. A lectin-based approach to detecting carcinogenesis in breast tissue // *Oncol. Letters*. – 2016. – V. 11 (6). – P. 3889–3895.

100. M. M. Bradford. A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal. Biochem.* – 1976. – V. 72. – P. 248-254.
101. M. Dubois, K. Gilles, I. Hakimton, P. Rebers, F. Smith. Colorimetric method for determination of sugars and related substances // *Anal. Chem.* – 1956. – Vol. 28. – P. 350-358.
102. U. Laemmli. Cleavage of structural protein during the assembly of head of the bacteriophage T4 // *Nature.* – 1970. – V. 227. – P. 680-685.
103. B. Ersson, K. Aspberg, J. Porath. The phytohemagglutinin from sunn hemp seeds (*Crotalaria juncea*). Purification by specific affinity chromatography // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1973. – V. 310. – P. 446-452.
104. Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction // *Analyt. Biochem.* – 1987. – V. 162 (1). – P. 156-159.
105. Н. Аксельнес. Руководство по количественному иммуноэлектрофорезу. Методы и применение // М.: Мир. – 1977. – 200 с.
106. Г. Фримель. Иммунологические методы // М.: Мир. – 1979. – 476 с.
107. P. K. Nakane, A. Kawaoi. Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugation // *J Histochem Cytochem.* – 1974. – V. 22(12). – 1084-91.
108. V. Golotin, L. Balabanova, G. Likhatskaya, V. Rasskazov, Recombinant production and characterization of a highly active alkaline phosphatase from marine bacterium *Cobetia marina* // *Mar. Biotechnol.* – 2015. – V. 17 (2). – P. 130–143.
109. J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis. *Molecular Cloning: a Laboratory manual* // CSHL Press. New York. – 1989.
110. V. A. Golotin, L. A. Balabanova, Yu .A. Noskova, L. V. Slepchenko, I. Yu. Bakunina, N. S. Vorobieva, N. A. Terenteva, V. A. Rasskazov. Optimization of cold-adapted alpha-galactosidase expression in *Escherichia coli* // *Protein Expr. Purif.* – 2016. – V. 123. – P. 14–18.

111. Y. Yanhong, Y. Yingcai, H. Huiqing, F. Kaixia. A short-form C-type lectin from *Amphioxus acts* as a direct microbial killing protein via interaction with peptidoglycan and glucan // J. Immunol. – 2007. – V. 179. – P. 8425-8434.
112. L. Ming, L. Chaozheng, M. Chunxia, L. Haoyang. Identification of a C-type lectin with antiviral and antibacterial activity from pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* // Devel. & Comp. Immun. – 2014. – V. 46. – P. 231–240.
113. S. Jayanthi, R. Ishwarya, M. Anjugam, A. Iswarya. Purification, characterization and functional analysis of the immune molecule lectin from the haemolymph of blue swimmer crab *Portunus pelagicus* and their antibiofilm properties // Fish & Shellfish Immunology. – 2017. – V. 62. – P. 227-237.
114. G. R. F. Goncalves, O. R. R. Gandolfi, L. S. Santos, R. C. F. Bonomo, C. M. Veloso, L. A. A. Verissimo, R. I. Fontan. Immobilization of sugars in supermacroporous cryogels for the purification of lectins by affinity chromatography // J. Chromatography B. – 2017. – V. 1068-1069. – P. 71-77.
115. I. V. Chikalovets, A. S. Kondrashina, O. V. Chernikov, V. I. Molchanova, P. A. Luk'yanov. Isolation and general characteristics of lectin from the mussel *Mytilus trossulus* // Chem. Natural Comp. – 2013. – V. 48 (6). – P. 1058–1061.
116. M. Adhya, B. Singha, B. Chatterjee. Purification and characterization of an N-acetylglucosamine specific lectin from marine bivalve *Macoma birmanica* // Fish & Shellfish Immunol. – 2009. – V. 27 (1). – P. 1-8.
117. A. Bulgakov, K. Park, K. Choi, H. Lim, M. Cho. Purification and characterisation of a lectin isolated from the Manila clam *Ruditapes philippinarum* in Korea // Fish & Shellfish Immunol. – 2004. – V. 16 (4). – P. 487-499.
118. H. Unno, K. Matsuyama, Y. Tsuji, Sh. Goda, K. Hiemori, H. Tatenno, J. Hirabayashi, T. Hatakeyama. Identification, characterization and X-ray crystallographic analysis of a novel type of mannose-specific lectin CGL1 from the pacific oyster *Crassostrea gigas* // Scient. Reports. – 2016. – V. 6. – P. 29135.
119. J. Yang, L. Qiu, X. Wang, L. Wang, L. Wang, Z. Zhou, Z. Zhang, L. Liu, L. Song. An ancient C-type lectin in *Chlamys farreri* (CfLec-2) that mediate



pathogen recognition and cellular adhesion // Dev. Comp. Immunol. – 2010. – V. 34 (12). – P. 1274-1282.

120. H. Zhang, P. Kong, L. Wang, Z. Zhou, J. Yang, L. Qiu, L. Song. CfLec-5 a pattern recognition receptor in scallop *Chlamys farreri* agglutinating yeast *Pichia pastoris* // Fish & Shellfish Immunol. – 2010. – V. 29 (1). – P. 149-156.

121. X. Xu, K. Liao, P. Shi, J. Xu, Zh. Ran, Ch. Zhou, Lin Zhang, J. Cao, X. Yan. Involvement of a novel  $\text{Ca}^{2+}$ -independent C-type lectin from *Sinonovacula constricta* in food recognition and innate immunity / Fish & Shellfish Immunology. – 2020. – V. 104. – P. 374-382.

122. H. Unno, Sh. Itakura, Sh. Higuchi, Sh. Goda, K. Yamaguchi, T. Hatakeyama. Novel  $\text{Ca}^{2+}$ -independent carbohydrate recognition of the C- type lectins, SPL-1 and SPL- 2, from the bivalve *Saxidomus purpuratus* // Protein science. – 2019. – V. 28. – P. 766-778

123. Y. Sh. Yina, Sh. Y. Cui, X. Zh. Weiwei, Zh. Ch. Li. Novel C-type lectin from razor clam *Sinonovacula constricta* agglutinates bacteria and erythrocytes in a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent manner // Develop. & Compar. Immun. – 2018. – V. 86. – P. 9-16.

124. H. Unno, T. Hatakeyama. Mannose-specific oyster lectin CGL1 // Lectin Purif. & Anal. – 2020. – V. 2132. – P. 621-628.

125. J. Perez-Vilar, R. L. Hill. The structure and assembly of secreted mucins // J. Biol. Chem. – 1999. – V. 274. – P. 31751–31754.

126. R. Spiro, V. Bhoyroo. Structure of the O-glycosidically linked carbohydrate units of fetuin // J. Biol. Chem. – 1974. – V. 249. – P. 5704–5717.

127. O. E. Galanina, M. Mecklenburg, N. E. Nifantiev, G. V. Pazyninaa, N. V. Bovin. GlycoChip: multiarray for the study of carbohydrate-binding proteins // Lab. Chip. – 2003. – V. 3. – P. 260-265.

128. O. Oyelaran, J. C. Gildersleeve. Glycan arrays: recent advances and future challenges // Curr. Opin. Chem. Biol. – 2009. – V. 13. – P. 406–413.

129. И. В. Чикаловец, О. В. Черников, В. И. Молчанова, А. С. Кондрашина, П. А. Лукьянов. Выделение и общая характеристика лектина из мидии *Mytilus trossulus* // ХПС. – 2012. – № 6. – С. 933 – 936.

130. Y. Fujii, S.M.A. Kawsar, I. Hasan, H. Fujita, M. Gerdol, Y. Ozeki. Purification and functional characterization of the effects on cell signaling of Mytilectin: A novel  $\beta$ -trefoil lectin from marine mussels // *Lectin Purif. & Anal.* – 2020. – V. 2132. – P. 201-213.

131. D. Terada, F. Kawai, H. Noguchi, S. Unzai, I. Hasan, Y. Fujii, S.-Yong Park, Y. Ozeki, J. R. H. Tamea. Crystal structure of MytiLec, a galactose-binding lectin from the mussel *Mytilus galloprovincialis* with cytotoxicity against certain cancer cell types // *Sci. Rep.* – 2016. – V. 6. – P. 28344.

132. S. Notova, F. Bonnardel, F. Lisacek, A. Varrot, A. Imberty. Structure and engineering of tandem repeat lectins // *Curr. Opin. Struct. Biol.* – 2020. – V. 62. – P. 39-47.

133. D. Terada, A. R. D. Voet, H. Noguchi, K. Kamata, M. Ohki, Ch. Addy, Y. Fujii, D. Yamamoto, Y. Ozeki, J. R. H. Tame, K. Y. J. Zhang. Computational design of a symmetrical  $\beta$ -trefoil lectin with cancer cell binding activity // *Sci. Rep.* – 2017. – V. 7. – P. 5943.

134. H. Chen, X. Cai, H. Qiu, J. Fang, X. Wu. A novel C-type lectin from *Crassostrea gigas* involved in the innate defense against *Vibrio alginolyticus* // *Biochem. & Biophys. Res. Commun.* – 2021. – V. 566. – P. 155-163.

135. P. Venier, L. Varotto, U. Rosani, C. Millino, B. Celegato, F. Bernante, G. Lanfranchi, B. Novoa, Ph. Roch, A. Figueras, A. Pallavicini. Insights into the innate immunity of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* // *BMC Genomics.* – 2011. – V. 12 (69). – P. 1-19.

136. C. Li, S. Yu, J. Zhao, X. Su, T. Li. Cloning and characterization of a sialic acid binding lectins (SABL) from Manila clam *Venerupis philippinarum* // *Fish & Shellfish Immunol.* – 2011. – V. 30. – P. 1202-1206.

137. L.-L. Zhao, Y.-Q. Wang, Y.-J. Dai, L.-J. Zhao, Q. Qin, L. Lin, Q. Ren, J.-F. Lan. A novel C-type lectin with four CRDs is involved in the regulation of antimicrobial peptide gene expression in *Hyriopsis cumingii* // *Fish & Shellfish Immunol.* - 2016. - V. 55. – P. 339-347.

138. J. Chen, Sh. Xiao, Z. Yu. F-type lectin involved in defense against bacterial infection in the pearl oyster (*Pinctada martensii*) // Fish & Shellfish Immunol. – 2011. – V. 30 (2). – P. 750-754.

139. Y. Shen, Y. Shao, Y. Cui, X. Zhao, W. Zhang, Ch. Li. Novel C-type lectin from razor clam *Sinonovacula constricta* agglutinates bacteria and erythrocytes in a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent manner // Develop. & Comp. Immunol. - 2018. – V. 86. – P. 9-16.

140. D. P. McKernan. Chapter 3. Pattern recognition receptors as potential drug targets in inflammatory disorders // Advan. in Prot. Chem. & Struc. Biol. – 2020. – V. 119. – P. 65-109.

141. R. R. Swarna, A. K. M. Asaduzzaman, S. R. Kabir, N. Arfin, S. M. A. Kawsar, S. Rajia, Y. Fujii, Y. Ogawa, K. Hirashima, N. Kobayashi, M. Yamada, Y. Ozeki, I. Hasan. Antiproliferative and antimicrobial potentials of a lectin from *Aplysia kurodai* (Sea Hare) Eggs // Mar. Drugs. – 2021. – V. 19. – P. 394.

142. Sh. Kurata, Sh. Ariki, Sh. Kawabata. Recognition of pathogens and activation of immune responses in *Drosophila* and horseshoe crab innate immunity // Immunobiol. – 2006. – V. 211 (4). – P. 237-249.

143. C. De Castro, M. Parrilli, O. Holst, A. Molinaro. Chapter 5. Microbe-associated molecular patterns in innate immunity: extraction and chemical analysis of gram-negative bacterial lipopolysaccharides // Methods in Enzym. – 2010. – V. 480. – P. 89-115.

144. X. Liu, X. Li, M. Peng, X. Wang, X. Du, L. Meng, J. Zhai, J. Liu, H. Yu, Q. Zhang. A novel C-type lectin from spotted knifejaw, *Oplegnathus punctatus* possesses antibacterial and anti-inflammatory activity // Fish & Shellfish Immunol. – 2019. – V. 92. – P. 11–20.

145. T. Zhao, X. Wei, J. Yang, Sh. Wang, Y. Zhang. Galactoside-binding lectin in *Solen grandis* as a pattern recognition receptor mediating opsonization // Fish & Shellfish Immunol. – 2018. – V. 82. – P. 183-189.

146. E. Frirdich, Ch. Whitfield. Lipopolysaccharide inner core oligosaccharide structure and outer membrane stability in human pathogens

belonging to the Enterobacteriaceae // J. Endotoxin Res. – 2005. – V. 11(3). – P. 133-44.

147. J. Kubler-Kielb, W. T. Lai, R. Schneerson, E. Vinogradov. The structure of the *Escherichia coli* O148 lipopolysaccharide core region and its linkage to the O-specific polysaccharide // Carbohydr. Res. – 2011. – V. 346. – P. 150–152.

148. E. Valiente, N. Jimenez, S. Merino, J. M. Tomas, C. Amaro. *Vibrio vulnificus* biotype 2 serovar E gne but not galE is essential for lipopolysaccharide biosynthesis and virulence // Infect. Immun. – 2008. – V. 76. – P. 1628–1638.

149. R. A. Klein, R. Hartmann, H. Egge, T. Behr, W. Fisher. The aqueous solution structure of a lipoteichoic acid from *Streptococcus pneumoniae* strain R6 containing 2,4-diamino-2,4,6-trideoxy-galactose: Evidence for conformational mobility of the galactopyranose ring // Carbohydr. Res. – 1998. – V. 281. – P. 79–98.

150. F. Hou, Y. Liu, Sh. He, X. Wang, A. Mao, Zh. Liu, Ch. Sun, X. Liu. A galectin from shrimp *Litopenaeus vannamei* is involved in immune recognition and bacteria phagocytosis // Fish & Shellfish Immunol. – 2015. – V. 44 (2). – P. 584-591.

151. R. F. Carneiro, R. C. Torres, R. P. Chaves, M. A. de Vasconcelos, B. L. de Sousa, A. C. Goveia, F. V. Arruda, M. N. Matos, H. Matthews-Cascon, V. N. Freire, E. H. Teixeira, C. S. Nagano, A. H. Sampaio. Purification, biochemical characterization, and amino acid sequence of a novel type of lectin from *Aplysia dactylomela* Eggs with antibacterial/antibiofilm potential // Mar. Biotechnol. – 2017. – V. 19 (1). – P. 49-64.

152. T. Bjarnsholt, O. Ciofu, M. Givskov. Applying insights from biofilm biology to drug development - can a new approach be developed // Nature. – 2013. – V. – 12. – P. 791–808.

153. B. Choudhury, Ch. Leoff, E. Saile, P. Wilkins, C. P. Quinn, E. L. Kannenberg, R. W. Carlson. The structure of the major cell wall polysaccharide of *Bacillus anthracis* is species-specific // J. Biol. Chem. – 2006. – V. 281 (38). – P. 27932-27941.

154. I. Hasan, M. Gerdol, Y. Fujii, S. Rajia, Y. Koide, D. Yamamoto, S. M. A. Kawsar, Y. Ozeki. cDNA and Gene Structure of MytiLec-1, A Bacteriostatic R-

Type Lectin from the Mediterranean Mussel (*Mytilus galloprovincialis*) // Mar. Drugs. – 2016. – V. 14. – P. 92.

155. M. Gerdol, P. Venier, M. Gerdol, P. Venier. An updated molecular basis for mussel immunity // Fish & Shellfish Immunol. – 2015. – V. 46. – P. 17–38.

156. T. L. Doering, R. D. Cummings, M. Aebi. Essentials of Glycobiology [Internet]. 3rd edition. // Cold Spring Harbor (NY). – 2017. – Chapter 23 Fungi.

157. L. C. B. B. Coelho, P. M. dos Santos Silva, W. F. de Oliveira, M. C. de Moura, E. V. Pontual, F. S. Gomes, P. M. G. Paiva, T. H. Napoleao, M. T. dos Santos Correia. Lectins as antimicrobial agents // J. Applied Microbiol. – 2018. – V. 125. – P. 1238-1252.

158. О. В. Черников, В. И. Молчанова, И. В. Чикаловец, П. А. Лукьянов. Биологическая активность лектинов морских гидробионтов // Вестник ДВО РАН. – 2007. – Т. 5. – С.131-135.

159. H. K. Kang, H. H. Lee, C. H. Seo, Y. Park. Antimicrobial and immunomodulatory properties and applications of marine-derived proteins and peptides // Mar. Drugs. – 2019. – V. 17. – P. 350.

160. D. Malagoli, S. Sacchi, E. Ottaviani. Lectins and cytokines in celomatic invertebrates: Two tales with the same end // Invertebr. Surviv. J. – 2010. – V. 7. – P. 1–10.

161. R. S. Gueguen, Y. J. de Lorgeril, F. Goetz. Rapid accumulation of an interleukin 17 homolog transcript in *Crassostrea gigas* hemocytes following bacterial exposure // Dev. Comp. Immunol. – 2008. – V. 32. – P. 1099–1104.

162. M. Gerdol, et al. Immunity in molluscs: Recognition and effector mechanisms, with a focus on Bivalvia // Springer Inter. Pub. AG. Adv. Comp. Immun. – 2018.

163. D. M. Zoysa, S. Jung, J. Lee. First molluscan TNF-alpha homologue of the TNF superfamily in disk abalone: molecular characterization and expression analysis // Fish & Shellfish Immunol. – 2009. – V. 26. – P. 625–631.

164. Y. Sun, Zh. Zhou, L. Wang, Ch. Yang, Sh. Jianga, L. Song. The immunomodulation of a novel tumor necrosis factor (CgTNF-1) in oyster *Crassostrea gigas* // Develop. & Comp. Immunol. – 2014. – V. 45 (2). – P. 291-299.
165. F. Qu, Zh. Xiang, Y. Zhang, J. Li, Sh. Xiao, Y. Zhang, Y. Qin, Y. Zhou, Z.Yu. Molecular identification and functional characterization of a tumor necrosis factor (TNF) gene in *Crassostrea hongkongensis* // Immunobiol. – 2017. – V. 222 (5). – P. 751-758.
166. L. Martin-Gimez, A. Villalba, M. J. Carballal, E. Abollo. Molecular characterisation of TNF, AIF, dermatopontin and VAMP genes of the flat oyster *Ostrea edulis* and analysis of their modulation by diseases // Gene. – 2014. – V. 533 (1). – P. 208-217.
167. L. Song, L. Wang, H. Zhang, M. Wang. The immune system and its modulation mechanism in scallop // Fish & Shellfish Immunol. – 2015. – V. 46 (1). – P. 65-78.
168. E. Catanzaro, C. Calcabrini, A. Bishayee, C. Fimognari. Antitumor potential of marine and freshwater lectins // Mar. Drugs. – 2019. – V. 18 (1). – P. 11.
169. E. Nudelman, R. Kannagi, S. Hakomori, M. Parsons, M. Lipinski, J. Wiels, M. Fellous, T. Tursz. A glycolipid antigen associated with Burkitt lymphoma defined by a monoclonal antibody // Science. – 1983. – V. 220. – P. 509-511.
170. L. Song, J. Mao, J. Zhang, M. M. Ibrahim, L.-H. Li, J.-W. Tang. Annexin A7 and its binding protein galectin-3 influence mouse hepatocellular carcinoma cell line *in vitro* // Biomed. & Pharmacotherapy. – 2014. – V. 68 (3). – P. 377-384.
171. B. K. Srinivas, M. Ch. Shivamadh, Sh. Jayarama. Musa acuminata lectin exerts anti-cancer effects on HeLa and EAC cells via activation of caspase and inhibitions of Akt, Erk, and Jnk pathway expression and suppresses the neoangiogenesis in *in-vivo* models // Intern. J. Biol. Macromol. – 2021. – V. 166. – P. 1173-1187.

172. R. C. Cheung, J. H. Wong, W. Pan, Y. S. Chan, C. Yin, X. Dan, T. B. Ng. Marine lectins and their medicinal applications // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2015. – V. 99. – P. 3755–3773.