

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

На правах рукописи

БУЙНОВСКАЯ

Нина Сергеевна

ГИБРИДНЫЕ БИФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ЛИГАНД-СВЯЗЫВАЮЩИЕ
БЕЛКИ НА ОСНОВЕ ВЫСОКОАКТИВНОЙ ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФАТАЗЫ
МОРСКОЙ БАКТЕРИИ *SOBETIA AMPHILECTI* КММ 296 (*StAR*)

Специальность 1.5.4 – Биохимия

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
к.б.н. Балабанова Л.А.

Владивосток

2023

Оглавление

1. Список сокращений	5
2. Введение.....	9
2.1. Актуальность темы исследования	9
2.2. Научная новизна.....	11
2.3. Теоретическая и практическая значимость исследования.....	13
2.4. Положения, выносимые на защиту	13
2.5. Степень достоверности и апробация результатов исследования.....	15
2.6. Публикации.....	16
2.7. Структура и объём диссертации.....	20
2.8. Личный вклад автора	20
3. Обзор литературных данных	22
3.1. Щелочные фосфатазы.....	22
3.1.1 Распространение в природе, структура и физиологическая роль щелочных фосфатаз	22
3.1.2 Структурно-функциональные особенности холодоактивных щелочных фосфатаз морских бактерий	28
3.1.3 Терапевтический потенциал щелочной фосфатазы и ее использование в комплексных системах доставки лекарств и диагностики	36
3.2. Лектины.....	41
3.2.1 Лектины: история открытия, распространение и функции	41
3.2.2 Лектины морских беспозвоночных и их применение в медицинских исследованиях.....	44
3.3. Неспецифические бактериальные порины и их применение в медицинских исследованиях.....	48
3.4. Лектины и порины как оружие против коронавирусной инфекции и грядущих пандемий	51
4. Материалы и методы	54
4.1. Реагенты и материалы, использованные в работе	54
4.2. Синтез кДНК лектина мидии <i>C. grayanus</i>	55

4.3. Гель – электрофорез ДНК	55
4.4. Трансформация плазмидной ДНК клеток <i>E. coli</i>	56
4.5. Выделение плазмидной ДНК из <i>E. coli</i>	57
4.6. Получение генетической конструкции лектина CGL со щелочной фосфатазой <i>SmAP</i>	57
4.7. Рестрикция ПЦР-фрагментов и плазмиды	59
4.8. Лигирование ПЦР-фрагментов в плазмиду.....	59
4.9. Синтез кодирующей ДНК лектина CGL с тройными заменами аминокислотных остатков в лиганд-связывающем сайте.....	61
4.10. Синтез кодирующей ДНК лектина CGL с одиночными заменами аминокислотных остатков.....	64
4.11. Компьютерное моделирование лектина CGL и молекулярный докинг с лигандами.....	64
4.12. Получение генетической конструкции порина <i>OmpF</i> со щелочной фосфатазой <i>SmAP</i>	65
4.13. Гетерологическая экспрессия в <i>E. coli</i>	66
4.14. Определение концентрации белка.....	67
4.15. Определение активности рекомбинантной щелочной фосфатазы <i>SmAP</i>	67
4.16. Выделение и очистка рекомбинантных белков	68
4.17. Гель-электрофорез белков в полиакриламидном геле	71
4.18. Определение ферментативной активности щелочной фосфатазы <i>SmAP</i> в отношении ЛПС.....	71
4.19. Определение цитотоксической активности рекомбинантной щелочной фосфатазы <i>SmAP</i>	73
4.20. Определение лиганд-связывающей активности рекомбинантного лектина <i>SmAP/CGL</i>	74
4.21. Определение специфичности рекомбинантного лектина <i>SmAP/CGL</i> в отношении онкомаркеров.....	75
4.22. Проведение реакции гемагглютинации с рекомбинантным лектином <i>SmAP/CGL</i>	76
4.23. Определение лиганд-связывающей активности рекомбинантного порина <i>SmAP/OmpF</i>	77

5. Результаты и обсуждение	78
5.1. Получение гибридных белков <i>StAR/CGL</i> и <i>StAR/OmpF</i> с активностью щелочной фосфатазы морской бактерии <i>StAR</i>	78
5.2. Оптимизация схемы очистки рекомбинантной щелочной фосфатазы морской бактерии <i>StAR</i> и ее гибридных бифункциональных аналогов ...	84
5.3. Дефосфорилирующая активность рекомбинантной щелочной фосфатазы <i>StAR</i> в отношении ЛПС <i>E. coli</i>	87
5.4. Ингибирующая активность рекомбинантной щелочной фосфатазы <i>StAR</i> в отношении раковых клеток	93
5.5. Определение антигенной активности порина в составе рекомбинантного гибридного белка <i>StAR/OmpF</i>	95
5.6. Определение функциональной активности лектина в составе рекомбинантного гибридного белка <i>StAR/CGL</i>	100
5.7. Определение лиганд-связывающей специфичности гибридного бифункционального лектина <i>StAR/CGL</i> в отношении муциноподобных онкомаркеров	104
5.8. Сайт-направленный мутагенез галактозосвязывающих сайтов лектина в гибридном белке <i>StAR/CGL</i>	108
5.9. Точечный мутагенез галактозосвязывающих сайтов лектина в гибридном белке <i>StAR/CGL</i>	113
6. Выводы	124
7. Список литературы	126

1. Список сокращений

SmAP – высокоактивная щелочная фосфатаза морской бактерии *Cobetia amphilecti* КММ 296

CGL - лектин морской мидии *Crenomytilus grayanus*

Site 1, Site 2 и Site 3 – первый, второй и третий углевод-связывающие сайты тримерного лектина CGL

OmpF - порин патогенной бактерии *Yersinia pseudotuberculosis* (иерсининн)

ТЛФА - твердофазный лектин-иммуноферментный анализ

ЩФ – щелочная фосфатаза

КММ – коллекция морских микроорганизмов ТИБОХ ДВО РАН

SmAP/CGL – гибридный аналог щелочной фосфатазы морской бактерии *C. amphilecti* КММ 296 и лектина мидии *C. grayanus*

SmAP/OmpF – гибридный аналог щелочной фосфатазы морской бактерии *C. amphilecti* КММ 296 и порина патогенной бактерии *Y. pseudotuberculosis*

ИФА – иммуноферментный анализ

ПЦР – полимеразная цепная реакция

НМ – наружная мембрана

ЛПС – липополисахарид

PSM (Porcine Stomach Mucin) – муцин желудка свиньи

G3 – глоботриоза

РЭА - раковый эмбриональный антиген

ПСА - простат-специфический антиген

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

КФ – классификация ферментов

T-47D – клеточная линия карциномы молочной железы человека

MDA-MB-231 – клеточная линия аденокарциномы молочной железы человека

HT-29 – клеточная линия колоректальной карциномы

TNAP (Tissue Nonspecific Alkaline Phosphatase) – тканенеспецифичная щелочная фосфатаза человека

IAP (Intestinal Alkaline Phosphatase) - кишечная щелочная фосфатаза человека

PLAP (Placental Alkaline Phosphatase) - плацентарная щелочная фосфатаза человека

Pi - фосфат неорганический (inorganic phosphate)

K_m - константа Михаэлиса

VAP – щелочная фосфатаза *Vibrio* sp. G15-21

у.а. – удельная активность фермента

k_{cat} – число оборотов фермента (максимальное количество субстрата, которое фермент может преобразовать в продукт реакции в единицу времени)

ЭДТА – этилендиаминтетраацетат натрия

PDB (Protein Data Base) – международная база белковых структур

TAP – щелочная фосфатаза антарктической бактерии штамма TAB5

ESAP – щелочная фосфатаза *E. coli*

M1 – первый металлосвязывающий сайт щелочной фосфатазы

M2 - второй металлосвязывающий сайт щелочной фосфатазы

п-НФФ – *para*-нитрофенилфосфат (4-нитрофенилфосфат)

п-НФ – *p*-нитрофенол (4-нитрофенол)

АМФ – аденозинмонофосфат

HBV – вирус гепатита В

PAMP (Pathogen-Associated Molecular Patterns) DAMP (Damage-Associated Molecular Patterns) и SAMP (Stress-Associated Molecular Patterns) - молекулярные паттерны, ассоциированные с патогеном, нарушением клеточного гомеостаза и стрессом

PRR (Pattern Recognition Receptor) - специфические рецепторы врожденной иммунной системы, распознающие паттерны PAMP, DAMP, SAMP

TLR (Toll-Like Receptor) – клеточные рецепторы PRR, распознающие паттерны микроорганизмов и активирующие клеточный иммунный ответ

CLR (C-type Lectin Receptor) - миелоидные лектиновые рецепторы C-типа, распознающие разные паттерны молекул и активирующие клеточный иммунный ответ

CTL (C-type Lectin) - суперсемейство лектинов C-типа

CRD (Carbohydrate Recognition Domain) – домены распознавания углеводов

RBD (Receptor Binding Domain) – рецептор-связывающий домен

УДФ - уридин-5-дифосфат

MytiLec – галактозо(Gal)-специфичный лектин мидии *Mytilus galloprovincialis*

MTL – галактозо-N-ацетил(GalNAc)/Gal-специфичный лектин морской мидии *Mytilus trossulus*

BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) - интерактивная программа поиска и базового локального выравнивания нуклеотидных и аминокислотных последовательностей

PHYRE2 (Protein Homology/analogy Recognition Engine V 2.0) – международная база данных белковых аналогов

Да (Дальтон) – единица измерения молекулярной массы белков

FRIL - глюкозо-маннозоспецифичный растительный лектин бобовой культуры *Lablab purpureus*

SARS-CoV-2 - коронавирусная инфекция COVID-19

GRFT - лектин из красных водорослей *Griffithsia* sp.

IC₅₀ – концентрация вещества для ингибирования биологического процесса на 50 % (концентрация полумаксимального ингибирования)

РНК – рибонуклеиновая кислота

VanLec – специфичный к маннозе лектин из бананов

ДСН – додецилсульфат натрия

кДНК – комплементарная ДНК

ДТТ – дитиотреитол

dNTP – дезоксинуклеотидтрифосфаты для ПЦР

LB (Lysogeny Broth)– питательная среда для микроорганизмов

ОП/OD – оптическая плотность

ИПТГ – изопропил-бета-D-тиогалактозид

МОЕ (Molecular Operating Environment) – программная платформа для молекулярного дизайна, которая объединяет в одном пакете визуализацию, моделирование и симуляцию

БСА – бычий сывороточный альбумин

АФП - альфа-фетопроtein

СА 125 - онкомаркер рака яичников

СА 19-9 - онкомаркер рака поджелудочной железы

СА 72-4 - неспецифический онкомаркер карциномы

MBL-AJ - маннан-связывающий лектин дальневосточной голотурии

Apostichopus japonicus

S-LPS-055:B5 – коммерческий липополисахарид *E. coli* (Sigma)

а.о. – аминокислотные остатки

Гис-таг – дополнительная последовательность а.о. (6xHis) в рекомбинантном белке для проведения металлоаффинной хроматографии

КОЕ – колониобразующая единица

2. Введение

2.1. Актуальность темы исследования

Одним из актуальных направлений белковой инженерии является генетическая модификация белков *in silico* и *in vitro* для изучения их структурно-функциональных взаимодействий, а также синтеза рекомбинантных аналогов с заданными свойствами. Впечатляющими результатами применения такого подхода являются гибридные и мутантные белки с новыми или улучшенными функциями для применения в биомедицинских технологиях.

Гибридный или химерный белок — это составной белок, полученный объединением фрагментов, функциональных доменов или полноразмерных аминокислотных последовательностей белков с использованием методов белковой химии, или генной инженерии. Гибридные белки могут состоять из нескольких доменов белков с разными биологическими функциями от одного или нескольких организмов.

Генно-инженерная работа по получению гибридных белков включает в себя создание генетической конструкции и оптимизацию условий экспрессии генов в рекомбинантных или трансгенных клетках организма-хозяина для обеспечения направленного синтеза целевых белков. Гибридные мультифункциональные белки можно использовать для диагностики, профилактики и даже лечения онкологических и инфекционных заболеваний. Методами генной инженерии можно обеспечить слияние белков, специфически распознающих и связывающих маркеры патологического процесса (лиганды или выработанные к ним антитела) с белками, обладающими ферментативной активностью, с целью усовершенствования методов обнаружения лиганд-связанных комплексов и соответственно выявления патологии.

Получение гибридных бифункциональных белков путем конструирования генетического вектора, содержащего ген высокоактивной щелочной фосфатазы (ЩФ) морской бактерии *Cobetia amphilecti* КММ 296 (*SmAP*) и ген лектина морской мидии *Crenomytilus grayanus* (*CGL*) или порина бактериального патогена *Yersinia pseudotuberculosis* (*OmpF*), может повысить специфичность и эффективность новых диагностических тест-систем для выявления соответственно онкологических или инфекционных заболеваний человека. Методом твердофазного лектин-иммуоферментного анализа (ТЛФА) показано, что лектин мидии *CGL* обладает способностью связывать галактозосодержащие антигены и онкомаркеры. Порообразующий белок *Y. pseudotuberculosis* (иерсинии) – порин *OmpF* (иерсинин), реагирует с антисыворотками к штаммам патогенных для человека видов иерсиний, на основе чего был разработан метод диагностики псевдотуберкулеза с использованием иерсинина в качестве диагностического антигена. Для усовершенствования методов очистки и исследования свойств рекомбинантных лиганд-связывающих белков, а также методов выявления связавшихся комплексов лектина *CGL* с онкомаркерами и порина *OmpF* с антителами к возбудителю псевдотуберкулеза - *Y. pseudotuberculosis*, нами предложено использование высокоактивной щелочной фосфатазы морской бактерии *SmAP* в качестве эффективного молекулярного хромогенного детектора.

В связи с этим, **целью** данной работы является получение гибридных бифункциональных аналогов лектина *CGL* и порина *OmpF* на основе генетической конструкции, несущей ген высокоактивной щелочной фосфатазы (ЩФ) морской бактерии *C. amphilecti* КММ 296 (*SmAP*), изучение свойств полученных гибридов белков и возможности их применения в молекулярной биотехнологии и медицине.

Задачи исследования:

1. Получить генетические конструкции гибридных аналогов лектина морской мидии *C. grayanus* (*CGL*) и порина патогенной бактерии *Y.*

pseudotuberculosis (OmpF), соединенных со щелочной фосфатазой *SmAP* (*SmAP/CGL* и *SmAP/OmpF* соответственно), для клонирования в клетках *Escherichia coli*.

2. Провести скрининг рекомбинантных клонов *E. coli* для выявления признаков синтеза рекомбинантных белков и получения штаммов-продуцентов гибридных бифункциональных полипептидов *SmAP/CGL* и *SmAP/OmpF*.

3. Разработать и оптимизировать схему выделения и очистки рекомбинантного белка *SmAP* и его гибридных бифункциональных аналогов *SmAP/CGL* и *SmAP/OmpF*.

4. Провести исследование лиганд-связывающих и ферментативных свойств гибридных бифункциональных белков *SmAP/CGL* и *SmAP/OmpF* методами твердофазного лектин-ферментного анализа (ТЛФА) и иммуноферментного анализа (ИФА) соответственно.

5. Показать возможность использования гибридных бифункциональных белков *SmAP/CGL* и *SmAP/OmpF* в молекулярной биотехнологии и медицине.

6. Показать возможность использования рекомбинантной высокоактивной щелочной фосфатазы *SmAP* в молекулярной биологии и медицине.

7. Провести исследование структурно-функциональных особенностей лектина CGL методами *in silico* и ПЦР-опосредованного сайт-направленного мутагенеза гибридного бифункционального белка *SmAP/CGL*.

2.2. Научная новизна

Впервые разработаны экспрессирующие генетические конструкции, несущие гены лектина морской мидии *S. grayanus* (CGL) и неспецифического порообразующего белка наружной мембраны (НМ) возбудителя псевдотуберкулеза *Y. pseudotuberculosis* (OmpF), объединенные с геном высокоактивной ЩФ морской бактерии *S. amphilecti* КММ 296 (*SmAP*), для

направленного синтеза рекомбинантных бифункциональных белков CmAP/CGL и CmAP/OmpF в клетках рекомбинантного штамма *E. coli* Rosetta (DE3); выделены рекомбинантные гибридные белки CmAP/CGL и CmAP/OmpF и охарактеризованы их лиганд-связывающие и ферментативные свойства. Показана возможность использования CmAP/CGL и CmAP/OmpF для выявления методами ИФА муциноподобных онкомаркеров и антител к возбудителям псевдотуберкулеза соответственно.

Впервые обнаружена дефосфорилирующая активность рекомбинантной высокоактивной щелочной фосфатазы морской бактерии CmAP в отношении бактериальных липополисахаридов (ЛПС), что является основой для разработки методов борьбы с эндотоксимией.

В процессе выполнения работы впервые на основе результатов структурного анализа *in silico* получены следующие мутантные формы галактозоспецифичного лектина CGL морской мидии: тройные мутации N16A/P17A/G19A (первый углеводсвязывающий сайт - Site 1), H64A/P65A/G67A (второй углеводсвязывающий сайт - Site 2) и N108A/P109A/G111A (третий углеводсвязывающий сайт - Site 3); одиночные мутации His37Ala и Asn119Ala (Site 1), His85Ala и Asn27Ala (Site2) и His129Ala, Asp127Ala и Glu75Ala (Site 3). Мутантные формы CGL были использованы для изучения свойств лектина с помощью определения уровня активности щелочной фосфатазы морской бактерии CmAP в составе его рекомбинантного гибридного аналога CmAP/CGL в комплексах «CmAP/CGL - лиганд». В результате этого удалось детализировать структуру сайтов связывания тримерного лектина CGL с углеводными детерминантами муциноподобных онкомаркеров, оценить вклад отдельных аминокислотных остатков активного центра CGL и его окружения в углевод-связывающую активность и установить механизм его связывания с такими лигандами, как муцин (PSM) и глоботриоза (G3).

2.3. Теоретическая и практическая значимость исследования

Теоретическая значимость работы заключается в возможности применения ее результатов для исследования структурно-функциональных особенностей лиганд-связывающих белков путем их мечения высокоактивной щелочной фосфатазой *StAP*. Результаты работы могут служить источником теоретических знаний в профильных институтах и университетах, а также могут быть включены в методические руководства.

К **практической** значимости работы относятся: возможности применения полученных данных для дальнейшего исследования взаимодействия лектинов и поринов с лигандами в клинических образцах пациентов, а также для структурно-функциональных исследований диагностических и терапевтических мишеней. Диссертационная работа является источником данных для разработки новых методов в области биотехнологии и медицины, в частности, для получения высокоспецифичных лектинов и поринов и усовершенствования методов диагностики некоторых видов рака и иерсиниозов соответственно. Кроме того, в результате проведенных исследований выявлен терапевтический потенциал щелочной фосфатазы морской бактерии.

2.4. Положения, выносимые на защиту

1. Генно-инженерные гибридные полипептиды *StAP/CGL* и *StAP/OmpF* являются бифункциональными аналогами природных белков - фермента с активностью щелочной фосфатазы морской бактерии *StAP* и соответственно лиганд-связывающих белков с активностью лектина мидии *CGL* и порина *OmpF* возбудителя псевдотуберкулеза.

2. Оптимизация экспрессии генов и схемы выделения рекомбинантных лектинов *StAP/CGL* и поринов *StAP/OmpF* из штаммов-продуцентов *E. coli*

Rosetta (DE3) позволяет добиться стабильного выхода активных бифункциональных белков в растворимой форме.

3. Гибридные лиганд-связывающие белки *StAR/CGL* и *StAR/OmpF* с ферментативной активностью высокоэффективной щелочной фосфатазы морской бактерии *StAR* являются подходящими моделями для лабораторных исследований структуры, функции и механизмов взаимодействия лектинов и поринов с лигандами, в частности при использовании методов мутагенеза.

4. Методами мутагенеза *in silico* и *in vitro* установлены углевод-связывающие сайты галактозоспецифичного лектина *CGL*, вклад отдельных аминокислотных остатков в его связывание с муцином и муциноподобными лигандами, определен механизм его связывания с концевыми остатками галактозы и фукозы в олигосахаридах, определяющих повышенную специфичность в отношении муциноподобных антигенов.

5. Использование гибридных белков лектинов *StAR/CGL* и поринов *StAR/OmpF*, обладающих ферментативной активностью высокоэффективной щелочной фосфатазы морской бактерии *StAR*, позволяет сократить стадии ИФА и модулировать специфичность связывающих белков в отношении лигандов.

6. Существует целесообразность разработки методов определения муциноподобных онкомаркеров на основе гибридного лектина *StAR/CGL*, в частности, таких как раковый эмбриональный антиген (РЭА) и маркер рака поджелудочной железы (СА 19-9), и методов определения антител в сыворотке крови больных псевдотуберкулезом на основе гибридного порина *StAR/OmpF*. Рекомбинантная высокоактивная щелочная фосфатаза морской бактерии *StAR* обладает ферментативной активностью в отношении ЛПС *E. coli*, что можно использовать в методах детоксикации ЛПС в терапевтических целях. Выявленный ингибирующий эффект *StAR* в отношении пролиферации некоторых линий раковых клеток внесет вклад в исследования механизмов онкогенеза.

2.5. Степень достоверности и апробация результатов исследования

Достоверность результатов исследования обеспечена применением современных генно-инженерных, биохимических, молекулярно-биологических и биоинформатических методов исследования, адекватных поставленным задачам. Результаты всех экспериментов получены с использованием сертифицированного оборудования, их воспроизводимость подтверждена несколькими повторами.

Результаты диссертационной работы были представлены на следующих международных и российских конференциях: Всероссийская научно-практическая конференция «Биологически активные вещества из морских гидробионтов в биотехнологии и медицине», г. Владивосток, 7-8 октября, 2014 г.; Региональная научно-практическая конференция студентов, аспирантов и молодых ученых по естественным наукам, Владивосток, 15–30 апреля 2014 г.; Проблемы развития высоких технологий «PhysioMedi» : Восьмая международная научно-практическая конференция «Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине», Санкт-Петербург, Россия 20–22 мая, 2015 г.; V съезд физиологов СНГ, V съезд биохимиков России, Конференция ADFLIM, Сочи – Дагомыс, Россия, 4–8 октября 2016; «Фундаментальная гликобиология» III Всероссийская конференция, Владивосток, 7–12 сентября 2016 г; The 3rd International symposium on Life Sciences, Vladivostok, Russia, September 4–8, 2018 : proc. and abstr. – Vladivostok, 2018; «Сохранение и преумножение генетических ресурсов микроорганизмов» Всероссийская школа-конференция, Санкт-Петербург, 22–23 июня 2022 г; The 9th annual student scientific conference in English, Vladivostok, 25–31 May 2022; Международная Научная Конференция по Моделированию и Анализу Комплексных Систем и Процессов, Москва, 7-9 декабря, 2022 г.

По материалам диссертации опубликовано 7 статей в журналах Перечня ведущих рецензируемых научных изданий, рекомендованных ВАК Минобразования и науки РФ.

2.6. Публикации

Статьи:

1. Буйновская Н. С. Структурно-функциональные особенности углеводсвязывающих сайтов галактозоспецифичного лектина мидии *Crenomytilus grayanus* // Вестник ДВО РАН. – 2015. – № 6. – С. 150–154.

2. Голотин В. А., Балабанова Л. А., **Буйновская Н. С.**, Лихацкая Г. Н., Булгаков А. А., Черников О. В., Чикаловец И. В., Рассказов В. А. Щелочная фосфатаза морской бактерии *Cobetia marina* как инструмент в исследовании свойств рекомбинантных белков // Вестник ДВО РАН. – 2015. – № 6. – С. 125–131.

3. Kovalchuk S. N., Golotin V. A., Balabanova L. A., **Buinovskaya N. S.**, Likhatskaya G. N., Rasskazov V. A. Carbohydrate-binding motifs in a novel type lectin from the sea mussel *Crenomytilus grayanus*: homology modeling study and site-specific mutagenesis // Fish & Shellfish Immunology. – 2015. – Vol. 47, № 1. – P.

4. Buinovskaya N. S., Golotin V. A., Balabanova L. A., Kovalchuk S. N., Likhatskaya G. N., Rasskazov V. A. Effect of point mutations in carbohydrate-binding sites on the functionality of a lectin from *Crenomytilus grayanus* // Achievements in the Life Science. – 2016. – Vol. 10, suppl. – P. S6.

5. Буйновская Н. С., Балабанова Л. А., Портнягина О. Ю., Новикова О. Д., Рассказов В. А. Гибридный бифункциональный белок на основе порина OmpF и высокоактивной щелочной фосфатазы // Биоорганическая химия. – 2018. – Т. 44, № 4. – С. 417–424.

6. Kovalchuk S. N., **Buinovskaya N. S.**, Likhatskaya G. N., Rasskazov V. A., Son O. M., Tekutyeva L. A., Balabanova L. A. Mutagenesis studies and structure-

function relationships for GalNAc/Gal-specific lectin from the sea mussel *Crenomytilus grayanus* // Marine Drugs. – 2018. – Vol. 16, № 12. – P. 471[1–10].

7. Терентьева Н. А., **Буйновская Н. С.**, Носкова Ю. А., Слепченко Л. В., Недашкова О. И., Текутьева Л. А., Балабанова Л. А. Гидролитические ферменты из морских организмов как ингибиторы образования биопленок. // Биология моря. – 2020. – Т.46, № 4. – С. 285–288.

Материалы научных конференций. Тезисы:

1. Голотин В. А., **Ярмоленко (Буйновская) Н. С.**, Балабанова Л. А., Черников О. В., Чикаловец И. В., Молчанова В. И., Рассказов В. А. Получение рекомбинантного бифункционального полипептида на основе щелочной фосфатазы морской бактерии и галактозосвязывающего лектина морской мидии: материалы всероссийской научно-практической конференции «Биологически активные вещества из морских гидробионтов в биотехнологии и медицине» // Здоровье. Медицинская экология. Наука. – 2014. – № 3 (57). – С. 22–23.

2. **Ярмоленко (Буйновская) Н. С.**, Голотин В. А., Балабанова Л. А., Рассказов В. А. Установление структуры галектина мидии *Crenomytilus grayanus* // Материалы региональной научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых по естественным наукам, Владивосток, 15–30 апреля 2014 г.: научное электронное издание – Владивосток: Дальневосточный федеральный университет, 2014. – С. 47–48.

3. Голотин В. А., **Буйновская Н. С.**, Балабанова Л. А., Лихацкая Г. Н., Рассказов В. А. Щелочная фосфатаза морской бактерии в исследовании свойств лектина мидии // Проблемы развития высоких технологий «PhysioMedi»: сборник статей Восьмой международной научно-практической конференции «Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине», 20–22 мая 2015 г., Санкт-Петербург, Россия. – 2015. – Т. 1. – С. 35–37. – СПб.: Изд-во Политехнического университета.

4. **Буйновская Н. С.**, Балабанова Л. А., Портнягина О. Ю., Голотин В. А., Новикова О. Д., Рассказов В. А. Гибридный бифункциональный порин с фосфатазной активностью: V съезд физиологов СНГ, V съезд биохимиков России, Конференция ADFLIM, Сочи – Дагомыс, Россия, 4–8 октября 2016 // ActaNaturae. – 2016. – № S-2. – С. 236.

5. Голотин В. А., Балабанова Л. А., Портнягина О. Ю., Рассказов В. А., Носкова Ю. А., **Буйновская Н. С.**, Слепченко Л. В., Новикова О. Д. Получение водорастворимого рекомбинантного OmpF порина *Y. pseudotuberculosis* для диагностики псевдотуберкулеза. // V съезд физиологов СНГ, V съезд биохимиков России, Конференция ADFLIM, Сочи – Дагомыс, Россия, 4–8 окт. 2016, ActaNaturae. – 2016. – № S-2. – С. 130–131.

6. **Буйновская Н. С.**, Голотин В. А., Балабанова Л. А., Ковальчук С. Н., Лихацкая Г. Н., Рассказов В. А. Влияние точечных мутаций углеводсвязывающих сайтов на функциональность лектина мидии *Crenomytilus grayanus* // «Фундаментальная гликобиология» III Всероссийская конференция, Владивосток, 7–12 сентября 2016 г.: материалы конференции – Владивосток: Мор. гос. университет, 2016. – С. 122.

7. Balabanova L. A., Slepchenko L. V., **Buinovskaya N. S.**, Likhatskaya G. N., Kuzmich A. S., Portnyagina O. Yu., Novikova O. D., Bakunina I. Yu., Shkryl Yu. N., Kovalchuk S. N. Marine bacterial enzymes for molecular genetics and structure-function studies // Вестник ДВО РАН. – 2018. – № 6, suppl. – С. 76–77.

8. **Buinovskaya N. S.**, Bakholdina S. I., Balabanova L. A. Dephosphorylation of lipopolysaccharides by alkaline phosphatase from marine bacterium // Вестник ДВО РАН. – 2018. – № 6, suppl. – С. 80–81.

10. **Буйновская Н. С.**, Носкова Ю. А., Христенко В. С., Слепченко Л. В., Текутьева Л. А., Балабанова Л. А. Оптимизация производства рекомбинантной высокоактивной щелочной фосфатазы морской бактерии *Cobetia amphilecti*. // Конференция, посвященная 55-летию ТИБОХ ДВО РАН и 90-летию со дня рождения его основателя академика Г. Б. Елякова, Владивосток, 11–15 сент. 2019 г.: материалы конференции – Владивосток, 2019. – С. 61.

11. Терентьева Н. А., **Буйновская Н. С.**, Носкова Ю. А., Слепченко Л. В., Володько А. В., Недашковская О. И., Тимченко Н. Ф., Долматова Л. С., Елисейкина М. Г., Балабанова Л. А. Биологически активные вещества морского происхождения как ингибиторы образования биопленок. // Конференция, посвященная 55-летию ТИБОХ ДВО РАН и 90-летию со дня рождения его основателя академика Г. Б. Елякова, Владивосток, 11–15 сент. 2019 г.: материалы конф. – Владивосток, 2019. – С. 106.

12. **Буйновская Н. С.**, Лихацкая Г. Н., Ковальчук С. Н., Балабанова Л. А. In silico мутагенез лектина CGL для повышения специфичности к онкомаркерам у рекомбинантного гибрида со щелочной фосфатазой морской бактерии *Cobetia amphilecti* КММ 1561 // Сохранение и преумножение генетических ресурсов микроорганизмов: сборник тезисов Всероссийской школы-конференции, Санкт-Петербург, 22–23 июня 2022 г. – М.: Издательство Перо, 2022. – С. 21. – ISBN 978-5-00204-342-2.

13. **Buinovskaya N. S.**, Likhatskaya G. N., Kovalchuk S. N., Balabanova L. A. Prediction of new ligand-binding properties of a galactose-specific lectin by *in silico* mutagenesis // The 9th annual student scientific conference in English, Vladivostok, 25–31 May 2022 : conference proceedings. – Vladivostok: Far East. Feder. Univ., 2022. – P. 11–13.

14. **Буйновская, Н. С.**, Лихацкая, Г. Н. Текутьева Л. А., Балабанова Л. А. Применение компьютерного моделирования и молекулярного докинга для поиска и разработки новых фармацевтических и диагностических средств на основе метаболитов морских организмов. // Международная научная конференция по моделированию и анализу комплексных систем и процессов. – Москва: НИУ ВШЭ, 7-9 декабря 2022 г.

Патенты:

1. Патент 2016132052. Российская федерация. Рекомбинантная плазмидная ДНК pET40CmAP/OmpF, кодирующая гибридный бифункциональный полипептид CmAP/OmpF со свойствами высокоактивной

щелочной фосфатазы CmAP и порообразующего мембранного белка OmpF, рекомбинантный штамм *E. coli* Rosetta(DE3)/pET40CmAP/OmpF – продуцент гибридного бифункционального полипептида CmAP/OmpF и способ его получения/ Балабанова Л.А., Голотин В.А., Буйновская Н.С., Портнягина О.Ю., Новикова О.Д., Рассказов В.А.; заявитель и патентообладатель Учреждение РАН Тихоокеан. ин-т биоорг. химии ДВО РАН от 25.08.2017г.

2.7. Структура и объём диссертации

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов и их обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 149 страницах, включает 30 рисунков, 9 таблиц. Список литературы включает 203 источника.

2.8. Личный вклад автора

Основные результаты работы получены автором лично, включая конструирование рекомбинантных плазмид, наработку препаративных количеств плазмидных ДНК, трансформацию клеток *E. coli*, гетерологическую экспрессию целевых генов в составе полученных конструкций в клетках *E. coli*, разработку схемы выделения и очистки рекомбинантных белков, оценку специфической активности рекомбинантных белков методами ИФА и гемагглютинации, ПЦР-опосредованный сайт-направленный мутагенез гибридного лектина. *In silico* анализ сайтов связывания лектина и предсказание структуры лиганд-связанных комплексов природного лектина и его мутантов выполнены канд. физ.-мат. наук Лихацкой Галиной Николаевной (Лаборатория биоиспытаний и механизма действия биологически активных веществ ТИБОХ ДВО РАН). Полученные результаты обсуждались при активном участии автора. Оценка лиганд-связывающей активности гибридных лектинов CmAP/CGL проведена после полученной консультации у канд. биол. наук Чикаловец Ирины Владимировны (Лаборатория химии неинфекционного иммунитета ТИБОХ ДВО РАН). Оценка связывающей

активности гибридного порина *StAR/OmpF* в отношении антител к рекомбинантному порину иерсинии и компонентов сыворотки крови больных иерсиниозом проведена под руководством канд. биол. наук Портнягиной Ольги Юрьевны (Лаборатория молекулярных основ антибактериального иммунитета ТИБОХ ДВО РАН). Оценка ферментативной активности рекомбинантной *StAR* в отношении бактериальных ЛПС проведена под руководством канд. биол. наук Бахолдиной Светланы Ивановны (Лаборатория молекулярных основ антибактериального иммунитета ТИБОХ ДВО РАН). Эксперимент по определению влияния рекомбинантной *StAR* на пролиферацию раковых клеток линий Т-47D, MDA-MB-231 и HT-29 проведен при участии млад. науч. сотр. Кузьмич Александры Сергеевны (Лаборатория химии неинфекционного иммунитета ТИБОХ ДВО РАН). Метод ИФА на основе использования гибридного лектина *StAR/CGL* с активностью ЩФ и муциноподобных онкомаркеров разработан под руководством доцента, канд. биол. наук Ковальчук Светланы Николаевны (Лаборатория морской биохимии ТИБОХ ДВО РАН).

3. Обзор литературных данных

3.1. Щелочные фосфатазы

Щелочные фосфатазы (ЩФ; КФ 3.1.3.1) широко распространены в природе и встречаются во многих организмах от бактерий до человека. Этот класс ферментов принадлежит к неспецифичным эктоферментам, которые катализируют гидролиз сложных моноэфиров фосфорной кислоты в межклеточном пространстве или окружающей среде. У прокариот они локализованы в периплазматическом пространстве, у эукариотов - на внешнем слое клеточной мембраны (McComb et al., 1979; Millán et al., 2006).

3.1.1 Распространение в природе, структура и физиологическая роль щелочных фосфатаз

У млекопитающих ЩФ представлены в виде группы изоферментов, экспрессирующихся в различных тканях организма и отличающихся физико-химическими свойствами и физиологическими функциями, которые до конца еще не изучены (Vimalraj, 2020; Zaher et al., 2020). ЩФ присутствуют в незначительных количествах в плаценте, слизистой оболочке подвздошной кишки, почках, костях и печени. Большая часть ЩФ сыворотки крови (более 80%) высвобождается из печени и костей и небольшое количество - из кишечника. Тканенеспецифичная ЩФ (TNAP) кодируется одним геном, который экспрессируется в печени, костях и почках. Кишечная (IAP) и плацентарная (PLAP) щелочные фосфатазы кодируются отдельными генами (Lallès, 2014). Все тканенеспецифичные ЩФ имеют одинаковую аминокислотную последовательность, но разные углеводные и липидные боковые цепи, таким образом различные посттрансляционные модификации придают им уникальные физико-химические свойства (Dixon, 2021). У млекопитающих ЩФ играют основную роль в формировании костей и предотвращении воспаления кишечника (Bates et al., 2007; Bilski et al., 2017).

Недавние исследования показали, что кишечный изофермент IAP участвует в формировании видового состава кишечной микрофлоры (Malo et al., 2010). Кроме того, существует корреляция неустановленной этиологии между уровнем синтеза изоферментов ЩФ у человека и различными патофизиологическими процессами, включая сердечно-сосудистые отклонения и болезнь Альцгеймера (Levitt et al., 2022).

У бактерий ЩФ играют основную роль в использовании органических фосфатов в качестве альтернативного источника жизненно важного микроэлемента - фосфора (P_i), в условиях его дефицита в питательной среде (McComb et al., 1979). ЩФ катализируют гидролиз фосфомоноэфиров в окружающей среде, таких как глюкозофосфат, ДНК и РНК (5'- и 3'-концы), рибо- и дезоксирибо-нуклеотид монофосфаты, дифосфаты, и трифосфаты (НМФ, НДФ, НТФ и дНМФ, дНДФ, дНТФ), фосфатидаты липидов, полифосфаты и пирофосфат. Кроме того, ЩФ неспецифически дефосфорилируют некоторые белки (Green and Sambrook, 2020). Наконец, ЩФ имеют глобальное биогеохимическое значение, являясь одними из самых распространенных ферментов почв и Мирового Океана. Было показано, что ЩФ участвуют в регуляции локальных микробиомов, индукции минерализации биопленок и экзоскелетов беспозвоночных, ремедиации тяжелых металлов и органических загрязнений (Golotin et al., 2015; Srivastava et al., 2021; Dong et al., 2022; Singh et al., 2022). Щелочные фосфатазы широко распространены среди морских бактерий, которые извлекают P_i из растворенных в Мировом океане фосфорсодержащих соединений (Zheng et al., 2019; Noskova et al., 2019). Кроме того, морские бактерии и диатомовые водоросли могут аккумулировать P_i в виде полифосфатов с последующим его высвобождением из клеток в окружающую среду с одновременным увеличением уровня фосфатазной активности. Таким образом, микроорганизмы принимают активное участие в энзиматической индукции и регулировании зародышеобразования фосфоритов и апатитов наряду с

геохимическими процессами образования минералов (Omelon et al., 2013; Skouri-Panet et al., 2018).

Большинство ЩФ в природе являются гомодимерами, где каждый каталитический центр содержит два иона Zn^{2+} и один ион Mg^{2+} , необходимые для проявления ферментативной активности. Несмотря на консервативность основных характеристик каталитического механизма, ЩФ млекопитающих имеют более высокие значения удельной активности (у.а.), более низкие значения константы Михаэлиса (K_m), а также более щелочной оптимум рН по сравнению с бактериальными ЩФ (Millán et al., 2006) (Таблица 1). Однако ферменты некоторых морских бактерий, например, штаммов *Vibrio* sp. G15-21 (VAP) и *Cobetia amphilecti* (CmAP), в сильнощелочной среде имеют показатели у.а., сопоставимые или даже превышающие таковые ЩФ млекопитающих, и могут проявлять активность в мономерном состоянии (Gudjónsdóttir and Ásgeirsson, 2008; Golotin et al., 2015) (Таблица 1).

Таблица 1. Некоторые молекулярные и каталитические характеристики щелочных фосфатаз различного происхождения

Источник ЩФ, обозначение ЩФ (литературный источник)	Молекулярная масса, форма (кДа x кол-во субъединиц)	Количество аминокислот а.о.	pI	pH-оптимум, (оптимальный буфер)	T ° C-оптимум	T ° C инактивации	Удельная активность, K_M , k_{cat} , зависимость Me^{2+}
<i>E.coli</i> , (ЕСАР) (McComb et al., 1979)	47,2 x 2	450	5,54	8,0 (0,1 М трис-НСl)	37	90°C, 50%, 8 мин	60 ед/мг; $K_M=0,17$ мМ; $k_{cat}=139/сек^{-1}$
<i>Pandalus borealis</i> (SAP), креветка, SAP (de Backer et al., 2002)	52,9 x 2	475	4,68	10,4 (0,1 М глицин-NaOH)	37	65°C, 100 %, 15 мин	4500 ед/мг; $K_M=0,54$ мМ; $k_{cat}=11500/сек^{-1}$; (Mg^{2+})
<i>Vibrio</i> sp. (VAP) G15-21, морская бактерия, VAP (Helland et al., 2009)	55,4 x 2	502	5,39	10,0 (10 мМ трис-НСl/10 мМ глицин-NaOH)	37	40°C, 50%, 6 мин	3707 ед/мг; $K_M=2$ мМ; $k_{cat}=1024/сек^{-1}$; (Mg^{2+})
<i>Atlantic strain</i> (TAB5), морская бактерия штамм TAB5, TAP (Rina et al., 2000; Lu et al., 2010)	38 x n	353	5,48	8,5 (1 М ДЭА)	25	50°C, 100 %; 15 мин	1650 ед/мг; (Mg^{2+})
<i>Halomonas</i> sp. 593 (Ishibashi et al., 2005; Arai et al., 2014)	62 x 2	527	-	10,25 (0,97 М ДЭА)	37-50	60°C, 80%, 5 мин	6700 ед/мг (Mg^{2+} , Mn^{2+})

Источник ЩФ, обозначение ЩФ (литературный источник)	Молекулярная масса, форма (кДа x кол-во субъединиц)	Количество аминокислот а.о.	pI	pH-оптимум, (оптимальны й буфер)	T ° C- оптиму м	T ° C инактиваци и	Удельная активность, K _M , k _{cat} , зависимость Me ²⁺
Плацента человека, (PLAP) (Le Du et al., 2001)	55,5 x 2	512	5,79	9,8 (1 М ДЭА)	37	68°C, 50%, 30 мин	k _{cat} =460±11/ сек ⁻¹ ; K _M =0,36± 0,03 мМ; (Mg ²⁺)
<i>Shewanella</i> sp. морская бактерия (Murakawa et al., 2002),	41,8	400	-	9,8	40	20°C	1500 ед/мг
<i>Scylla serrata</i> , зеленый краб (Zhang et al., 2001)	димер	-	-	10,0 (50 мМ Na ₂ CO ₃ /NaH CO ₃)	37	-	k _{cat} =8,72/ сек ⁻¹
<i>Stihopus japonicaus</i> , кишечник голотурии (Wu et al., 2013)	167 x 3 (97, 35, 35)	-	-	10,4 (0,2 М глицин /NaOH) (Mg ²⁺)	40	50°C, 83%, 60 мин	K _M =5,76 мМ (Mg ²⁺)
<i>Strongylocentrotus intermedius</i> , яйцеклетки морского ежа (Сейткалиева и др., 2017).	75 x 2	-	-	8,1 – 8,5 (25 мМ Tris- HCl буфер, 150 мМ NaCl)	45	48 °C, 50%, 20 мин	K _M =0,17 мМ V _{max} =0,98 мкМоль/мин ⁻¹ (Mg ²⁺ , Ca ²⁺ , Mn ²⁺)

Источник ЩФ, обозначение ЩФ (литературный источник)	Молекулярная масса, форма (кДа x кол-во субъединиц)	Количество аминокислот а.о.	pI	pH-оптимум, (оптимальны й буфер)	T ° C- оптиму м	T ° C инактиваци и	Удельная активность, K _M , k _{cat} , зависимость Me ²⁺
SamPhoD, морская бактерия <i>Cobetia amphilecti</i> КММ 296 (Noskova et al., 2019)	54,8 x 2	492	5,08	9,2	45	-	K _M =4,2 мМ V _{max} =0,203 мМ/мин (Co ²⁺ и Fe ³⁺)
StAP, морская бактерия <i>Cobetia amphilecti</i> КММ 296 морская бактерия, StAP (Golotin et al., 2015)	55 x 1	503	4,53- 4,92	10,3 в (1М ДЭА) (Mg ²⁺)	37-50 °C	50 °C, 60 мин	K _M =13,2±1,48 мМ, k _{cat} =28300/ сек ⁻¹ k _{cat} /K _M =2,1± 0,24 x 10 ⁶ сек ⁻¹ /M ⁻¹

В целом, ферменты из морских источников имеют более пластичную структуру и поэтому лучше работают при более низких температурах по сравнению с ферментами из наземных организмов, что дает возможность снижения энергопотребления производственных процессов при их применении в биотехнологии (Golotin et al., 2015; Lee et al., 2015; Balabanova et al., 2017; Yuivar et al., 2017). В настоящее время известны три больших структурных семейства прокариотических ЩФ: PhoA, PhoD и PhoX. Они отличаются друг от друга структурой, механизмом ферментативного действия, субклеточной локализацией, субстратной специфичностью и зависимостью проявления своей активности от различных ионов металлов, диапазонов температуры и pH (Luo et al., 2009; Golotin et al., 2015; Noskova et al., 2019) (Таблица 1).

3.1.2 Структурно-функциональные особенности холодоактивных щелочных фосфатаз морских бактерий

Ферменты морского происхождения, включая ЩФ, зачастую адаптированы к выполнению своих каталитических функций при низких значениях температуры, поэтому представляют особый интерес для биотехнологии и индустрии (Santiago et al., 2016; Latip et al., 2019). Такая адаптация возможна благодаря эволюционным изменениям в первичной и вторичной структуре ферментов, что приводит к образованию более гибкой пространственной структуры и увеличению доступности растворителям. Эти изменения включают снижение общего количества остатков аргинина и пролина, увеличение содержания остатков лизина, отсутствие дисульфидных связей, уменьшение количества стабилизирующих солевых мостиков и гидрофобных связей. Появление дополнительных петель с нерегулярной вторичной структурой и замена громоздких аминокислотных остатков вокруг ферментативной щели и в самом активном центре способствуют оптимизации электростатического потенциала поверхности молекулы (Рисунок 1).

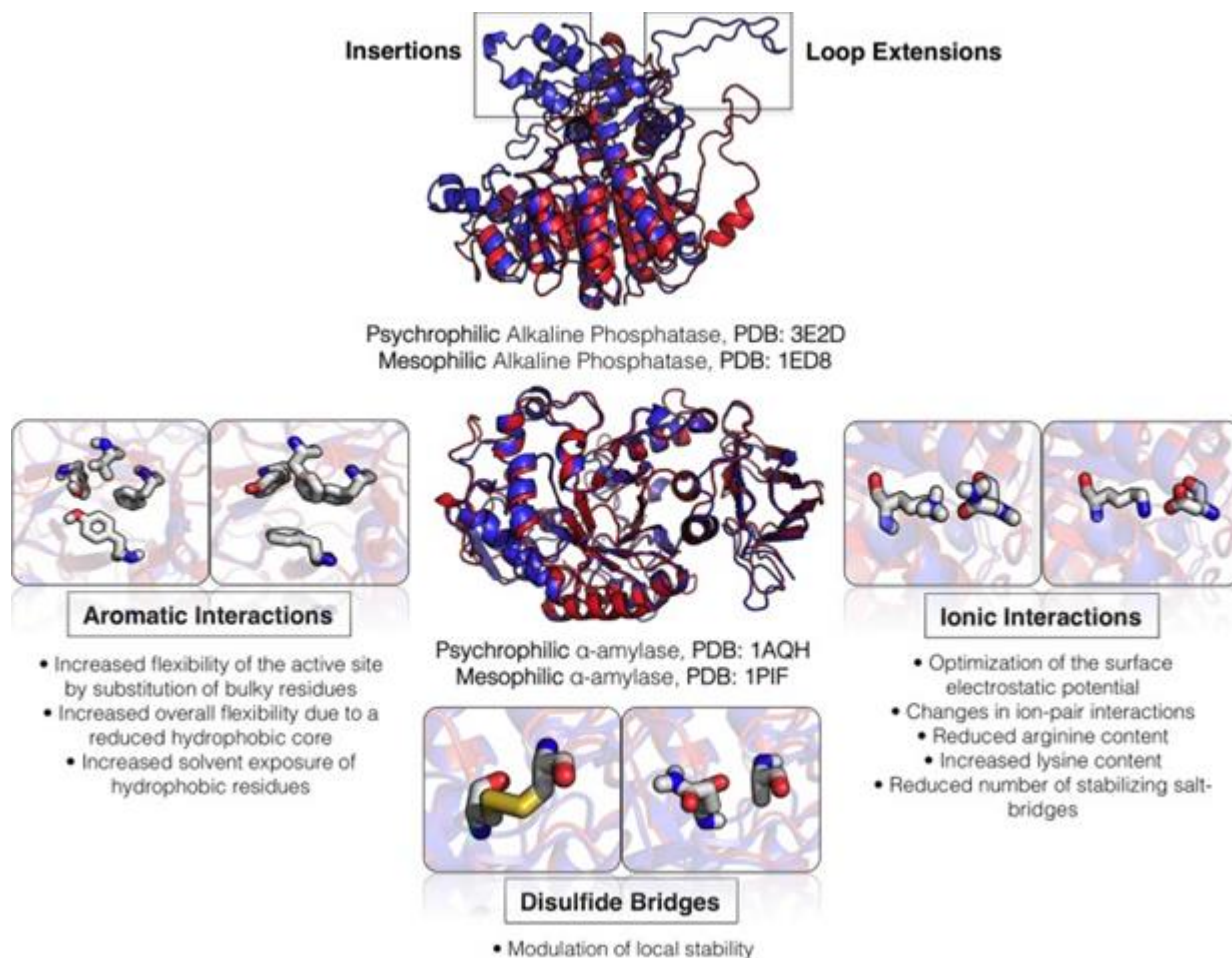


Рисунок 1. Распространенные модификации ферментов, адаптированных к катализу при низких температурах (Santiago et al., 2016). Суперпозиция трехмерных структур холодоактивных (Psychrophilic) и умеренно термостабильных (Mesophilic) щелочных фосфатаз (наверху) и α-амилаз (внизу): у белков психрофильных организмов (синий цвет) видны дополнительные вставки (Insertions) и петели из аминокислотной последовательности с нерегулярной структурой (Loop Extensions) вблизи активного центра, изменения в ароматических и ионных взаимодействиях (Aromatic Interactions; Ionic Interactions), возможность модулирования локальной стабильности из-за отсутствия дисульфидных мостиков (Disulfide Bridges).

Примером результата холодной адаптации является ЩФ морской бактерии *C. amphilecti* КММ 296 (CmAP), которая отличается повышенными

значениями константы скорости реакции k_{cat} (число оборотов фермента или число молекул субстрата, превращаемых в продукт реакции одной молекулой фермента за 1 с в условиях насыщения субстратом) и каталитической эффективности фермента k_{cat}/K_M (Таблица 1). При оптимальном значении $pH \geq 10,0$ в ходе проявления ферментативной активности у *SmAP* значительно увеличивается K_M , однако за счет одновременного увеличения скорости высвобождения продукта реакции из активного центра фермент катализирует расщепление субстрата во много раз эффективнее, чем его аналоги (Gudjónsdóttir and Ásgeirsson, 2008; Nasu et al., 2012; Golotin et al., 2015; Balabanova et al., 2014). Для проявления ферментативной активности *SmAP* в оптимальном буфере не требуется наличия экзогенных двухвалентных катионов металлов (Me^{2+}) в реакционной смеси и димеризации ферментных субъединиц (Golotin et al., 2015). Кроме того, высокая концентрация ЭДТА в инкубационной смеси не ингибирует *SmAP*, что важно для биотехнологического использования наряду с другими его свойствами как холодоактивного фермента (возможность проведения низкотемпературного катализа и повышенная эффективность). Фермент достаточно термолабилен по сравнению с ЩФ из мезофильных организмов (Таблица 1). Время полужизни ($t_{1/2}$) *SmAP* при 45 °C и 40 °C в присутствии 2 mM ЭДТА составляет 16 и 27 мин соответственно. Однако в присутствии стабилизирующего иона Mg^{2+} термостабильность *SmAP* возрастает до $t_{1/2}$ равному 120 мин при 45 C° (Golotin et al., 2015).

Для выявления особенностей структуры и функции молекулы ЩФ *SmAP*, влияющих на высокую скорость взаимодействия с субстратом и термолабильность, была построена 3D-модель на основе кристаллической структуры близкого гомолога – ЩФ VAR (код доступа в базе данных кристаллических структур белков PDB: 3E2D_B) морской психрофильной γ -протеобактерии *Vibrio* sp. G15-21, с высокой степенью общей идентичности структур (69,4 %) и значением среднеквадратичного отклонения α -атомов

(RMSD) 0,43 Å при суперпозиции 3D-моделей CmAP и VAP. (Helland et al., 2009; Golotin et al., 2015).

Первичная структура прототипа VAP характеризуется наличием дополнительных участков, видимых при попарном выравнивании ее аминокислотной последовательности со структурой умеренно термостабильного аналога ECAP из *E. coli* (Gudjónsdóttir, B. Ásgeirsson, 2008; Helland et al., 2009). После установления трехмерной структуры VAP (PDB: 3E2D_V) было обнаружено, что эти дополнительные аминокислотные последовательности образуют наружные петли из аминокислотных остатков 162-175 (петля I), 325-351 (петля II), 361-395 (петля III) и 405-450 (петля IV) (Рисунок 2).

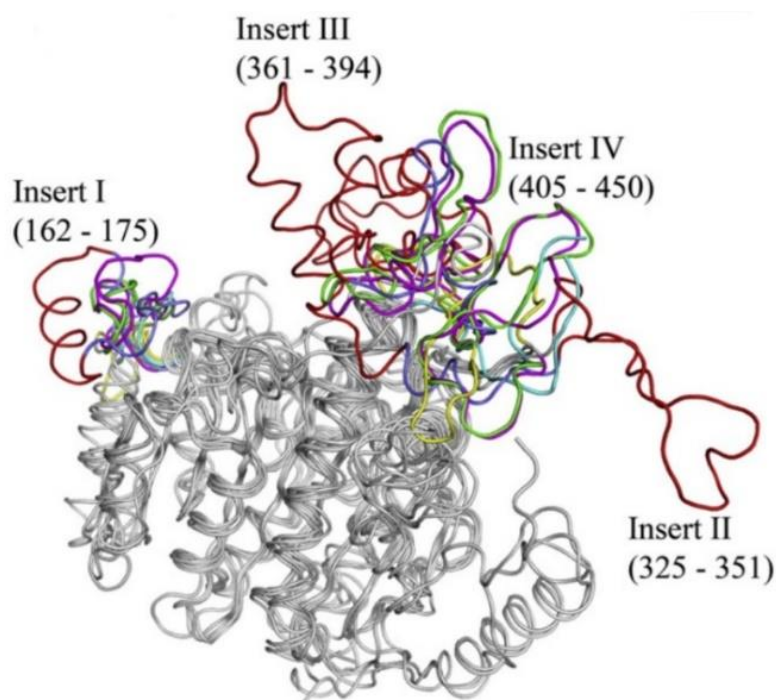


Рисунок 2. Суперпозиция пространственных моделей щелочных фосфатаз из *Vibrio* sp. G15-21 (VAP, бордовый цвет), штамма антарктической бактерии TAB5 (TAP, голубой цвет), *E. coli* (ECAP, желтый цвет), креветки *Pandalus borealis* (SAP, зеленый цвет) и человеческой плаценты (PLAP, сиреневый цвет) (Helland et al., 2009).

При наличии экспериментальной структуры высокого разрешения, полученной методом рентгеноструктурного анализа, моделирование 3D-структур ферментов и их докинг с субстратами или конкурентными ингибиторами позволяют выявить эссенциальные аминокислотные остатки и определить механизм действия фермента (Qian et al., 2007; Moulton, 2007; Asgeirsson et al., 2020). На сегодняшний день на основании кристаллографических исследований фермент-субстратных комплексов ЩФ и направленного мутагенеза их активных центров установлено большое количество различных структур и, вместе с тем, выявлено ограниченное количество типов механизмов их каталитического действия, что подтверждает универсальность механизма действия этих ферментов в природе (McComb et al., 1979; Gudjónsdóttir and Ásgeirsson, 2008; Zalatan et al., 2008; Asgeirsson et al., 2020).

Так, в активный центр ферментов VAP и *StAP*, как и у других ЩФ, входят два иона цинка и один ион магния (Рисунок 3).

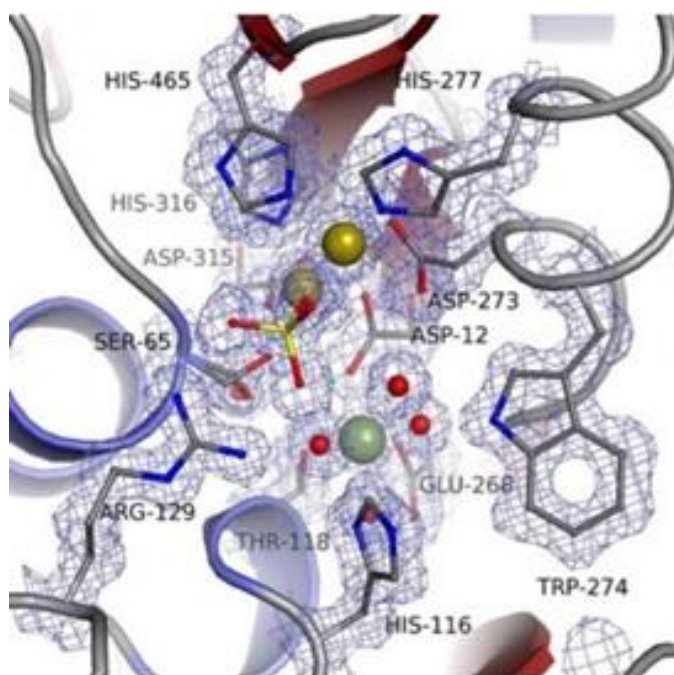


Рисунок 3. Изображение активного центра фермента VAP, кристаллизованного с сульфат-ионом: плотность электронов вокруг активного

центра VAP (серая сетка); каталитические ионы цинка (желтые сферы) и магния (зеленая сфера); каталитический остаток Ser65 (Helland et al., 2009).

Ион Zn^{2+} в первом металлосвязывающем сайте (M1) скоординирован шестью Н-связями с остатками Asp273, His277, His475 так, что образует контакты с двумя атомами кислорода субстрата (Helland et al., 2009). Ион Zn^{2+} во втором металлосвязывающем сайте (M2) скоординирован пятью Н-связями с остатками Asp12, Ser65, Asp315, His316 и образует контакт с одним атомом кислорода субстрата. Ион Mg^{2+} в металлосвязывающем сайте M3 образует Н-связи с остатками Asp12, Thr118, Glu268 и тремя молекулами воды, и не участвует напрямую в катализе, а выполняет таким образом функцию, стабилизирующую необходимую конформацию молекулы фермента (октаэдрическая геометрия). Аминокислотные остатки, участвующие в образовании металлосвязывающих сайтов, у всех ЩФ консервативны, за исключением остатков сайта M3 (Рисунок 3). В суперпозиции остатков His116 у VAP и CmAP у фермента кишечной палочки ECAP расположен остаток Asp. В положении, соответствующем остатку Thr118 у ферментов VAP и CmAP, плацентарная ЩФ человека PLAP имеет остаток Ser. Наконец, на месте остатка Trp274 у VAP в щелочной фосфатазе TAP из арктического штамма бактерии TAB5 также присутствует остаток Trp, тогда как в молекулах бактериальной ЩФ ECAP и эукариотических ЩФ SAP и PLAP в этом же положении находятся остатки Lys и His соответственно. Однако субстрат-связывающий остаток аргинина у всех ЩФ является идентичным. Так, субстрат-связывающий остаток Arg148 у фермента TAP при связывании субстрата занимает ту же позицию в третичной структуре, что и остаток Arg129 у ЩФ VAP и CmAP (Helland et al., 2009; Koutsioulis et al., 2010; Golotin et al., 2015).

Известно, что каталитическая эффективность фермента зависит от доступности субстрата к активному центру. Протяженные аминокислотные вставки образуют петли в структуре ЩФ VAP, которые расположены близко

у входа в достаточно узкую, по-сравнению с другими ЩФ, ферментативную щель каталитического центра (Helland et al., 2009; Gudjónsdóttir and Ásgeirsson, 2008). Каталитический центр ЩФ VAR глубоко погружен в щель между вставками III и IV с одной стороны и фланкирующим доменом - с другой (Рисунок 2). Относительно узкий проход к активному центру, по-видимому, компенсируется наличием участка со сравнительно большим положительным потенциалом, притягивающим отрицательно заряженную фосфатную группу субстрата (Helland et al., 2009). Электростатическое взаимодействие является преимущественным для увеличения каталитической эффективности ферментов у адаптированных к холоду видов организмов (Smalås et al., 2000; Santiago et al., 2016).

Несмотря на идентичность топологии каталитического Ser65 и субстрат-связывающего Arg129, а также остатков, связанных с ионами металлов Zn^{2+} и Mg^{2+} у ЩФ *StAP* и VAR, в их первичной и вторичной структурах имеются небольшие различия. Анализ неидентичных областей их аминокислотных последовательностей, локализованных преимущественно на поверхностях 3D-структур, выявил у ЩФ *StAP* относительное увеличение, от 2 до 10 раз, количества остатков Ala, Val, Arg, Pro, Gly и Phe и, наоборот, снижение количества остатков Lys, Ile, Asn и Tyr (Golotin et al., 2015). Кроме того, у ЩФ *StAP* и VAR обнаружены небольшие отличия (2%) в содержании гидрофобных остатков, влияющих на вторичную структуру. Незначительные структурные различия *StAP* и VAR, вероятно, определяют существенные различия в их свойствах, таких как более высокая термостабильность (в 4 раза) и каталитическая эффективность у *StAP* (Hauksson et al., 2000; Nasu et al., 2012; Golotin et al., 2015). Повышенную эффективность каталитического расщепления субстрата под действием ЩФ *StAP* по сравнению с другими ферментами можно объяснить уникальными свойствами субстрат-связывающего Arg129 и остатков в микроокружении ферментативной щели, которые они приобретают в условиях $pH \geq 10$ в момент связывания субстрата с активным центром *StAP* (Рисунок 4).

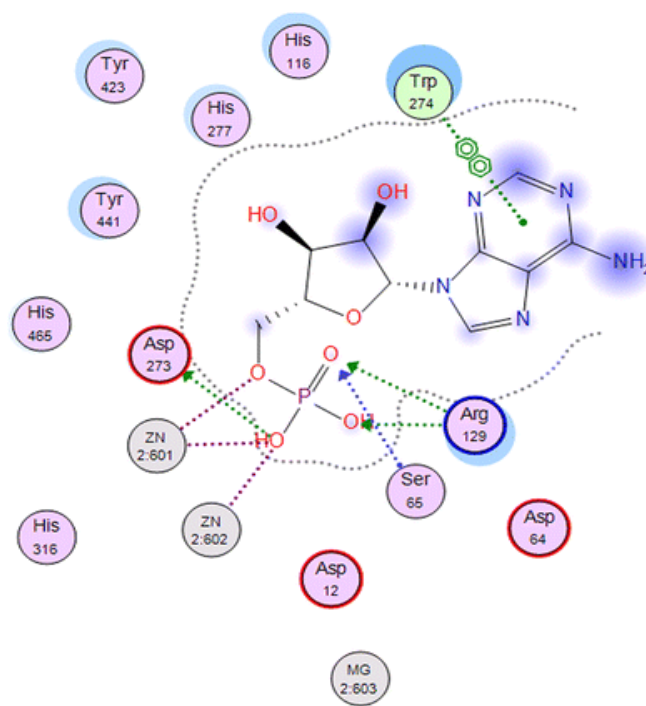


Рисунок 4. 2D - диаграмма контактов взаимодействия субстрата АМФ с аминокислотными остатками активного центра щелочной фосфатазы *SmAP* (Golotin et al., 2015).

Отличительная особенность фермента *SmAP* заключается в том, что при значениях $\text{pH} \geq 10,0$ субстрат-связывающий остаток Arg129 и остаток Tyr441, участвующий в π - π взаимодействиях ароматических колец с субстратом (Рисунок 4), становятся нейтральным и отрицательно заряженным соответственно, что ускоряет высвобождение продукта реакции PO_4^{4-} из активного центра. При этом протяженная область положительно заряженных остатков вдоль узкого входа в ферментативную щель способствует эффективному аккумулярованию отрицательно заряженных молекул субстрата, увеличивая K_M . Такие особенности структуры позволяют *SmAP* эффективно работать даже при высоких концентрациях конечных продуктов реакции без их ингибирующего действия на фермент в отличие от других ЩФ (McComb et al., 1979; Plisova et al., 2005; Golotin et al., 2015).

На сегодняшний день известны несколько холодоактивных ЩФ морских бактерий с установленными физико-химическими и каталитическими

свойствами (Таблица 1): ЩФ из антарктических штаммов и северных вод Тихоокеанского региона (Kobori et al., 1984; Rina et al., 2000), *Vibrio* sp. G15-21 (Hauksson et al., 2000), *Shewanella* sp. (Murakawa et al., 2002 г.), SIB1 (Suzuki et al., 2005), *Holomonas* sp. 593 (Ishibashi et al., 2005) и *C. amphilecti* КММ 296 (Plisova et al. 2005; Golotin et al., 2015). Все эти бактерии принадлежат к классу γ -*Proteobacteria* за исключением неустановленного вида антарктической бактерии штамма TAB5 (Rina et al., 2000). Получение некоторых холодоактивных ЩФ, таких как CmAP из *C. amphilecti* КММ 296 и TAP из штамма TAB5, было оптимизировано с использованием рекомбинантных ДНК-технологий (Lu et al., 2010; Nasu et al., 2012; Golotin et al., 2015).

3.1.3 Терапевтический потенциал щелочной фосфатазы и ее использование в комплексных системах доставки лекарств и диагностики

Несмотря на то, что ЩФ является одним из наиболее часто встречающихся и изученных ферментов, появляются всё новые сведения о механизме ее действия, биологической роли в организме и окружающей среде, а также большом разнообразии способов ее применения в доставке лекарств и диагностике (Levitt et al., 2022; Le-Vinh et al., 2022).

Традиционно ЩФ используется в качестве биохимического маркера патологических состояний человека благодаря тому, что существует корреляция между уровнем экспрессии фермента и его посттрансляционной модификацией, ведущей к образованию той или иной изоформы (TNAP, IAP, PLAP), характерной для конкретной патологии. На этом принципе основаны многие методы диагностики различных заболеваний (Okazaki et al., 2004; Goth et al., 2008). Щелочная фосфатаза также используется в качестве маркера клеточной дифференцировки как в морфологических исследованиях, так и в выборе методов терапии рака (Shanmugham et al., 2007; Hossain and Jung, 2008; Zhang et al., 2013; Lea et al., 2013). Однако использование ЩФ в альтернативных и комбинаторных методах терапии было предложено лишь в

последнее десятилетие (Whitehouse et al., 2010; Martinez-Moya et al., 2012; Peters et al., 2013; Rentea et al., 2012). Идеи использования ЩФ в терапии появились в связи с открытием её новых свойств, таких как защита кишечника (регуляция pH поверхности кишечника, ослабление воспаления), абсорбция и усвоение липидов, а также кальция и других микроэлементов, детоксикация свободных нуклеотидов и бактериальных липополисахаридов (ЛПС) (Vaishnava et al., 2007; Lalles, 2013).

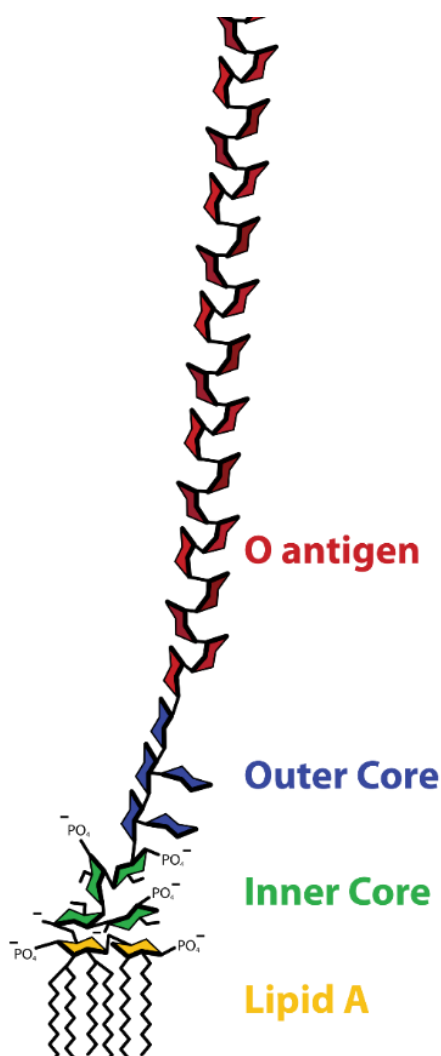


Рисунок 5. Бактериальный фосфорилированный ЛПС - медиатор воспаления и физиологический субстрат для ЩФ кишечника человека IAP.

Помимо функций, указанных выше, у ЩФ кишечника была выявлена роль в модулировании воспалительного процесса и, предположительно, в формировании и модулировании кишечной микрофлоры при создании барьера против проникновения бактерий в кровотоки через стенки кишечника (Bates et al., 2007; Vaishnava et al., 2007; Whitehouse et al., 2010; Lynes and Widmaier, 2011; Martinez-Moya et al., 2012; Peters et al., 2013; Rentea et al., 2013; Lalles, 2013; Zhang et al., 2013; Lei et al., 2015). Было показано, что гастроинтестинальное применение препарата ЩФ кишечника приводило к регуляции воспалительного процесса и улучшению регенерации тканей кишечного тракта (Bates et al., 2007; Whitehouse et al., 2010; Rentea et al., 2012, 2013; Peters et al., 2013). Местный и системный противовоспалительный эффект связан с дефосфорилирующей активностью изофермента IAP в отношении ЛПС - сильнейших эндотоксинов, вызывающих эндотоксимию и сепсис (Рисунок 5).

Это свойство ЩФ является чрезвычайно важным, поскольку до сих пор сепсис, запускающий процессы ускоренного апоптоза, масштабных эндотелиальных повреждений, угнетения иммуногенеза и повреждения миокарда, является неразрешимой проблемой в современной реаниматологии и интенсивной терапии, лидируя среди причин высокой смертности (Аверьянов и др., 2010). Стратегические направления разработки новых лекарств и методов лечения сепсиса всегда были связаны с действием на возбудителей или механизмы развития патологического процесса. В настоящее время большинство экспертов признает, что в ближайшие годы не приходится ожидать появления новых «прорывных» антибиотиков, более того, все острее встает проблема антибиотикоустойчивости внутрибольничных возбудителей сепсиса. В связи с этим разработка препаратов ЩФ и методов их применения в качестве антисептических средств является весьма актуальной и перспективной (Whitehouse et al., 2010; Rentea et al., 2012; 2013; Peters et al., 2013).

Однако ограниченное количество экспериментальных данных и слабая корреляция между моделью воспаления у экспериментальных животных и патогенезом этого процесса у людей вызывают необходимость дальнейшего изучения вопроса об участии ЩФ в формировании иммунного ответа и модулировании воспалительного процесса в организме посредством регуляции состава и «поведения» микроорганизмов кишечной микрофлоры (Vaishnava et al., 2007; Bates et al., 2007; Chen et al., 2010; Lalles et al., 2013; Estaki et al., 2014).

Другое применение ЩФ в терапии – активация фосфат-содержащих пролекарств для улучшения фармакокинетики и биодоступности активных соединений (Рисунки 6, 7). Фосфатные пролекарства составляют большую категорию терапевтических средств, которые повышают профиль растворимости основного лекарственного средства, снижая необходимость использования вспомогательных веществ (Le-Vinh et al., 2022). Как показано на рисунке 7, с помощью ЩФ происходит переход от ионизированного

пролекарства к неионизированной форме лекарства, что обеспечивает его высокую проницаемость через мембрану и, таким образом, повышенную абсорбцию в целевой ткани или органе (Le-Vinh et al., 2022).

Кроме того, ЩФ может применяться в качестве активатора в комплексных системах целевой доставки лекарств в положительно заряженные клетки опухолей для преобразования их заряда и в системах доставки самособирающихся биоматериалов для биотрансформации волокон, гидрогелей и мицелл с целью инициирования апоптоза раковых или бактериальных клеток (Le-Vinh et al., 2022).

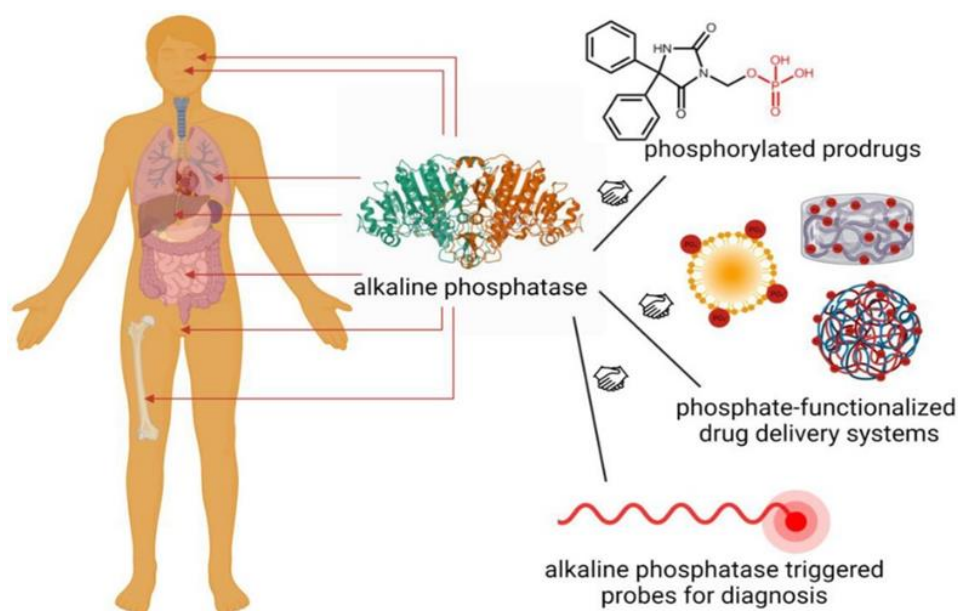


Рисунок 6. Использование ЩФ для активации фосфат-содержащих пролекарств и диагностики (Le-Vinh et al., 2022).

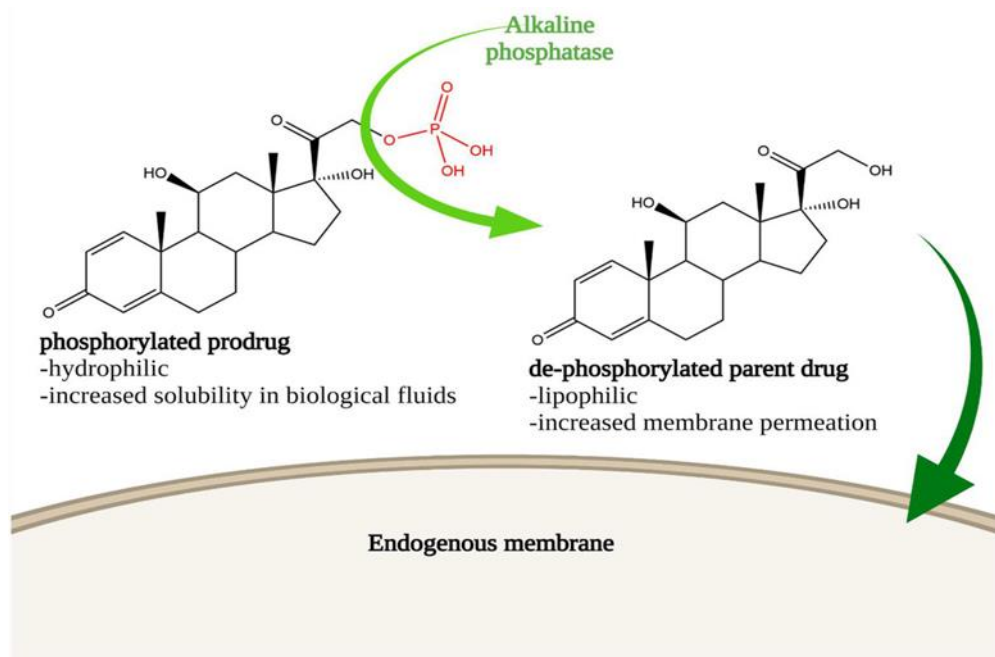


Рисунок 7. Превращение преднизолона фосфата в составе пролекарства в его исходное состояние в организме под действием ЩФ (Le-Vinh et al., 2022).

Для целей диагностики различных заболеваний и опухолей в настоящее время используются различные подходы, основанные на использовании флуоресцентных методов, таких как мультирежимные молекулярные зонды и системы агрегации, индуцируемые ЩФ. Благодаря высокой чувствительности и селективности молекулярных зондов, а также неинвазивным свойствам, их используют для определения активности ЩФ, скрининга ингибиторов ЩФ, а также для визуализации и обнаружения раковой опухоли в режиме реального времени, в том числе с одновременным терапевтическим эффектом (Wu et al., 2018; Balbaied et al., 2019; Fang et al., 2022).

Другим примером использования ЩФ в диагностике является маркировка ДНК вируса гепатита В (HBV) ферментом в качестве зонда для его обнаружения в сыворотке крови (Tu et al., 2004). Модифицированная ЩФ ковалентно связывается с одной нитью ДНК вируса и ферментативный комплекс визуализируется с помощью субстрата при блот-гибридации. Эти эксперименты продемонстрировали перспективность применения ЩФ как

чувствительного, быстрого, безопасного и дешевого метода обнаружения ДНК вируса (Tu et al., 2004).

Щелочные фосфатазы также могут быть использованы для обнаружения отходов производства и загрязнения окружающей среды. Существенная корреляция между фосфатазной активностью, общим числом жизнеспособных клеток, а также концентрацией аденозинтрифосфата, открывает перспективы использования ЩФ в качестве индикатора микробной плотности и биомассы в пресноводных отложениях. (Menzorova et al., 2014).

В молекулярной биологии ЩФ являются эффективным инструментом для значительного повышения эффективности лигирования вектора за счет дефосфорилирования его концевых фосфатных групп и предотвращения таким образом самолигирования (Szeberényi et al., 2014; Wang et al., 2013; Green and Sambrook, 2020).

Однако, чаще всего препараты ЩФ в научных и коммерческих целях применяются для ферментативного мечения вторичных антител и лектинов в диагностических методах ИФА и блоттинга (Estabrook et al., 2004; Balabanova et al., 2014).

3.2. Лектины

3.2.1 Лектины: история открытия, распространение и функции

Термин «лектин» впервые был введен в 1954 г. Уильямом К. Бойдом (Boyd and Shapleigh, 1954; Kilpatrick, 2002; Sharon and Lis, 2004) для обозначения растительных агглютининов. Со временем, благодаря открытию новых активностей у этого типа белков, это определение было расширено до более общего термина, и в настоящее время к лектинам могут быть отнесены белки неиммуноглобулиновой природы, которые распознают углеводы и не обладают ферментативной активностью (Tsaneva and Van Damme, 2020).

Лектины включают широкий спектр гликан-связывающих белков с высоким уровнем организации и изменчивости молекулярной структуры (McMahon et al., 2005; Gabius, 2018). В течение многих лет лектины

использовались в качестве универсальных инструментов для взаимодействия с углеводами, но, несмотря на все эти исследования, их физиологическая роль все еще находится на стадии изучения (Tsaneva and Van Damme, 2020; de Coninck and Van Damme, 2021). Еще в девятнадцатом веке Вейр Митчелл впервые описал лектинную активность секретов животных, продемонстрировав гемагглютинацию, вызванную ядом гремучей змеи, хотя в то время вещество, ответственное за эту активность, не было идентифицировано как лектин (Mitchell, 1860; Kilpatrick, 2000).

В эволюционном плане лектины являются древними соединениями, которые встречаются во всех царствах живой природы. При переходе к высшим животным наблюдается усложнение их структуры. (Abhinav et al., 2016). Лектины растений и животных разных видов обладают большим структурным разнообразием и весьма обширным репертуаром функций (Arlinghaus and Eble, 2012). Патогенные микроорганизмы для связывания с гликоконъюгатами на поверхности клеток хозяина используют либо свои собственные лектины, либо лектины хозяина для успешного инфицирования и обеспечения собственной защиты от его иммунной системы (Sharon, 2006; Rodrigues et al., 2015; Meiers et al., 2019; Thompson et al., 2019).

Лектины позвоночных участвуют во множестве физиологических процессов, таких, например, как сворачивание и транспортировка белков (Meiers et al., 2019). Кроме того, лектины иммунной системы эволюционировали таким образом, чтобы распознавать как собственные (McEver, 2015; Cagnoni et al., 2016; Borsig, 2018), так и чужеродные гликановые структуры (van Kooyk and Rabinovich, 2008; Dam and Brewer, 2010; Drickamer and Taylor, 2015). Это различие между «своим» и «чужим» позволяет иммунной системе реагировать на столкновение с патогеном, оставляя здоровую ткань хозяина нетронутой (Medzhitov et al., 2002). Эта функция основана на взаимодействии эволюционно-устойчивых фрагментов молекул, ассоциированных с распознаванием собственно патогенов и изменениями, связанными с нарушениями клеточного гомеостаза и стрессом,

так называемых молекулярных паттернов (PAMP, DAMP и SAMP) (Varki, 2011), которые распознаются специфическими рецепторами (PRR) (Kumar et al., 2011). Помимо хорошо охарактеризованных Toll-подобных рецепторов (TLR) известны, например, миелоидные лектиновые рецепторы С-типа (CLR), принадлежащие к суперсемейству лектинов С-типа (CTL), которые служат важными PRR в системе врожденного иммунитета (Weis et al., 1998; Stoff et al., 2021).

Лектины с рецепторами С-типа представляют собой большое семейство, включающее дендритные клеточно-специфические молекулы межклеточной адгезии (Watanabe et al., 2020; Rahimi, 2020; Palomares et al., 2022). Эти лектины характеризуются наличием одного или нескольких характерных доменов распознавания углеводов (CRD). Они часто олигомеризуются в гомодимеры, гомотримеры и олигомеры более высокого порядка с небольшими отличиями в субдоменной структуре, что увеличивает их avidность к поливалентным лигандам (Zelensky and Gready, 2005; Roy et al., 2016; Agrahari et al., 2022).

В человеческом организме лектины распространены в органах и тканях повсеместно и проявляют, как и лектины других организмов, селективность в отношении определенных углеводных структур (Raposo et al., 2021). Много усилий было направлено на выявление фундаментальной роли этих лектинов в физиологических и патологических явлениях. В отличие от лектинов растений, лектины животных, в частности лектины человека, вызывают большой интерес из-за их роли в таких важных физиологических процессах, как воспаление, иммунные реакции, канцерогенез, патогенная инфекция и другие (Mason and Tarr, 2015; Yau et al., 2015; Dan and Ng, 2013; Brown et al., 2018). Некоторые лектины человека, такие как лектины С-типа, галектины и иммуноглобулиноподобные лектины, связывающие сиаловую кислоту (Siglecs), считаются важными мишенями для разработки терапевтических средств при лечении заболеваний у человека (Macauley et al., 2014; Kawasaki

et al., 2011; Mahajan and Pillai, 2016; Siddiqui et al., 2019; Munkley and Scott, 2019).

3.2.2 Лектины морских беспозвоночных и их применение в медицинских исследованиях

Лектины морских беспозвоночных относятся к зоолектинам. В настоящее время выделяют восемь семейств зоолектинов: лектины Р-, С-, I-, L-, М-типов, пентраксины, калнексины и галектины (Drickamer, 1993; Sharon, 2007; Vasta and Ahmed, 2008). Представители семейства калнексинов и лектинов L-, Р-, М-типов являются внутриклеточными белками и участвуют в регуляции процессов жизнедеятельности клеток. Большинство лектинов С-, I-типов, пентраксинов и галектинов секретируются клеткой в окружающую среду или локализуются на клеточной мембране, выполняя множество функций, включая клеточную адгезию, клиренс гликопротеинов и распознавание патогенов.

У морских беспозвоночных встречаются лектины с различной структурой и различной специфичностью связывания углеводов, что вызывает большой интерес к этим объектам и служит основой для их использования в разнообразных медицинских исследованиях, в том числе в изучении онкогенеза (Fujii et al., 2012; Wang et al., 2006; Gowda et al., 2008; Hasan and Ozeki, 2019). Многие из этих лектинов проявляют сродство к галактозосодержащим гликанам клеточной поверхности, осуществляющим многочисленные биологические функции в клетках, включая противоопухолевую и антимикробную активность.

По сравнению с нормальными клетками характер гликозилирования поверхности раковых клеток изменен, что влияет на множественные клеточные механизмы, осуществляемые с помощью лектинов посредством их ассоциации с соответствующими гликанами (Ohtsubo et al., 2006). Изменения в процессе гликозилирования сопровождается злокачественное перерождение клеток (Powlesland et al., 2009; Stowell et al., 2015). Галактозоспецифичные

(GalNAc/Gal-специфичные) лектины, или галектины, способствуют связыванию опухолевых клеток посредством взаимодействия с галактозосодержащими углеводными лигандами на их поверхности (Powlesland et al., 2009). Сообщалось, что многие лектины морских беспозвоночных связываются с гликанами на поверхности опухолевых клеток и убивают те из них, которые вызывают апоптоз (Queiroz et al., 2009; Kawsar et al., 2011; Chernikov et al., 2017). С другой стороны, лектины могут модулировать проникновение и целевое взаимодействие лекарственных средств с раковыми клетками (Fujii et al., 2012; Zurga et al., 2017). Оба эти явления демонстрируют значительное влияние лектин-гликанового взаимодействия на пролиферацию и регуляцию опухолевых клеток (Queiroz et al., 2009; Kawsar et al., 2011; Fujii et al., 2012; Chernikov et al., 2017; Hasan et al., 2019).

Кроме того, лектины морских беспозвоночных, являясь компонентом врожденного иммунитета, агглютинируют как грамотрицательные, так и грамположительные бактерии посредством взаимодействия с ЛПС и пептидогликанами их клеточных стенок (Schroder et al., 2003; Moura et al., 2006; Gowda et al., 2008; Hasan and Ozeki, 2019). Остатки галактозы, присутствующие в виде концевых сахаров в полисахаридах и ЛПС многих бактерий, влияют на внутриклеточный состав энтеробактерий и способствуют синтезу уридиндифосфат (УДФ)-галактозы (Cox et al., 2002; Fridrich and Whitfield, 2005). Эндотоксины других микроорганизмов также могут содержать галактозу в качестве составной части сложных молекул (Lodowska et al., 2012).

В яйцах и гонадах морских брюхоногих моллюсков также присутствуют различные лектины, которые предположительно играют важную роль в раннем развитии и защите организма. Так, из яйцеклеток *Aplysia kurodai* (Kawsar et al., 2009; Kawsar et al., 2011; Hasan et al., 2014) и других видов *Aplysia* (*A. depilans*, *A. dactylomela* и *A. californica*) (Carneiro et al., 2017) были выделены и очищены лектины нового класса, первичные структуры которых

обладали тройной тандемной повторяющейся последовательностью, состоящей из 210–230 аминокислотных остатков, сходной с доменом DUF3011 некоторых неохарактеризованных бактериальных белков (Motohashi et al., 2017).

В 2016 году Terada и другие опубликовали 3-D структуру нового Gal-специфичного лектина MytiLec из мидии *Mytilus galloprovincialis* (Terada et al., 2016), который обладал бактериостатическим и антибактериальным действием и глоботриозозависимой цитотоксичностью (Fujii et al., 2012; Hasan et al., 2016). Почти в то же время установили кристаллическую структуру похожего лектина CGL из морской мидии *Crenomytilus grayanus* (Jakób et al., 2015; Liao et al., 2016). Однако в лаборатории морской биохимии ТИБОХ ДВО РАН сообщение о первичной последовательности этого лектина CGL с аналогичной структурой и антибактериальной активностью появилось еще в 2013 году (Kovalchuk et al., 2013; Jakób et al., 2015; Liao et al., 2016). Анализ белковых последовательностей этих двух лектинов показал, что они образуют новое семейство лектинов, имеющих общую структуру — три тандемных повтора с похожими друг на друга последовательностями, состоящими из 40 аминокислотных остатков и трех участков связывания углеводов в каждом субдомене (Рисунок 8).

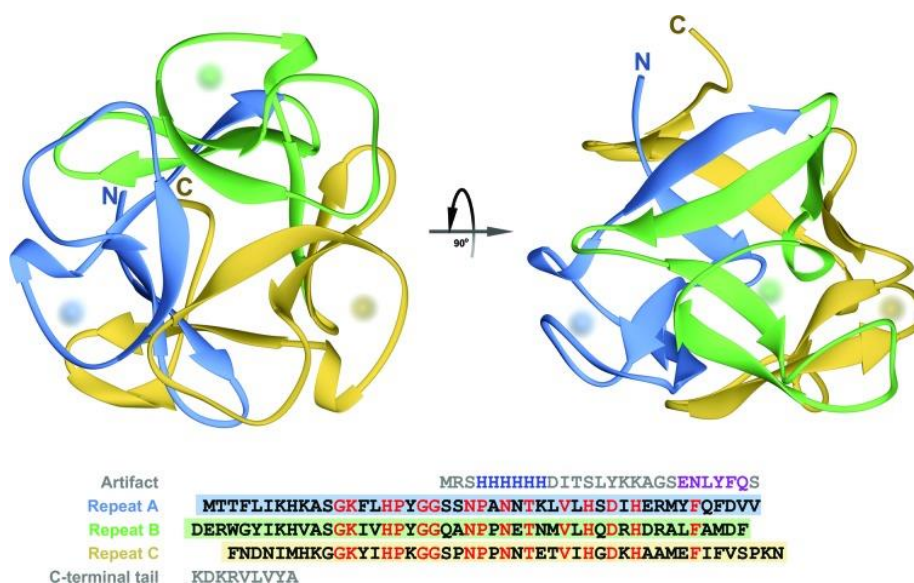


Рисунок 8. Модель структуры CGL в двух ортогональных ориентациях с тремя тандемными повторами в субдоменах (показаны разными цветами), полученная методом кристаллографии (Jakób et al., 2015). Расположение предполагаемых сайтов связывания углеводов указано размытыми сферами. Три субдомена в аминокислотной последовательности выровнены относительно друг друга и выделены с использованием той же цветовой схемы, что и в мультидоменном белке. Аминокислотные остатки, окрашенные в красный цвет, составляющие в среднем 37% выровненных участков, являются общими для всех трех повторов.

Согласно классификации белка, основанной на идентификации доменов с использованием баз данных белковых семейств Pfam (Finn et al., 2016) и InterPro (www.ebi.ac.uk/interpro/), все MytiLec-подобные последовательности относятся к суперсемейству β -трилистника (Fujii et al., 2018). Трехмерные структуры MytiLec-1 и CGL включают складку β -трилистника (Рисунок 5), которая также характерна для лектинов R-типа - широко распространенного семейства лектинов, встречающегося почти во всех таксонах (Terada et al., 2016; Liao et al., 2016). Благодаря значительной степени сходства предположили, что это новое структурное семейство лектинов содержит все MytiLec-подобные последовательности лектинов, обнаруженных у двустворчатых моллюсков. Эта подтверждается результатами транскриптомного анализа, проведенного для *M. galloprovincialis*, который показал наличие у того же вида двух других последовательностей, названных MytiLec-2 и MytiLec-3, сходных с MytiLec-1 (Gerdol et al., 2015). Позже была охарактеризована структура и функция нового GalNAc/Gal-специфического лектина (MTL) из морской мидии *Mytilus trossulus* (Chikalovets et al., 2016; Filshtein et al., 2023). Рода *Mytilus* и *Crenomytilus* близки друг другу по данным анализа генома (Chichvarkhin et al., 2000). Поиск гомологичных последовательностей с использованием интерактивной программы BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) позволил выявить высокую идентичность

и сходство MTL, CGL и MytiLec-1 (85%) и полное отсутствие гомологии с другими известными лектинами. Данные сервера PHYRE2 (Protein Homology/analogy Recognition Engine V 2.0) также подтвердили общую структуру β -трилистника для лектинов MTL, MytiLec-1 и CGL (Chikalovets et al., 2016). Эти лектины похожи между собой и по основным физико-химическим свойствам. Данное семейство лектинов вызывает интерес из-за способности оказывать действие на разные типы опухолевых клеток и патогенных микроорганизмов (Chikalovets et al., 2020). В связи с этим лектины морских беспозвоночных активно исследуются в области структурной гликобиологии с целью разработки тест-систем для дифференциальной диагностики ряда заболеваний (Чикаловец и др., 2010; 2015).

Кроме лектинов для разработки диагностических тест-систем можно применять и другие лиганд-связывающие белки, какими являются большинство белков наружной мембраны бактериальных клеток, включая неспецифические порообразующие белки (порины) (Новикова и др., 2010).

3.3. Неспецифические бактериальные порины и их применение в медицинских исследованиях

Среди транспортных белков наружной мембраны (НМ) бактерий доминируют интегральные β -структурированные белки, так называемые неспецифические порины, предназначенные для пассивной диффузии гидрофильных молекул с молекулярной массой не более 600 Да. Они образуют трансмембранные водонаполненные каналы (или поры), которые обеспечивают обмен низкомолекулярными веществами между клеткой и внешним окружением. Кроме того, локализованные на поверхности бактериальной клетки участки полипептидной цепи поринов, так называемые петли, являются потенциальными сайтами взаимодействия для функционально важных контактов с другими клетками (Nikaido et al., 1977). С одной стороны, порины представляют собой молекулы-мишени для системы врожденного иммунитета организма-хозяина: они активируют факторы

немедленной защиты и включаются в формирование специфического иммунного ответа, направленного на освобождение от патогена. С другой стороны, порины выступают как эффекторы патогенеза, подавляя отдельные стадии иммунной защиты и обеспечивая выживание патогена в макроорганизме (Портнягина и др., 2005; Galdiero et al., 2012). Это позволяет рассматривать порообразующие белки НМ бактерий весьма перспективными для решения целого ряда задач инфекционной иммунологии. Особенности структуры и многообразие свойств поринов делают их идеальным объектом для установления корреляций между структурой и функцией этих бактериальных антигенов и других важных биоактивных макромолекул (Новикова и др., 2014; Neary et al., 2001).

Неспецифические порины существуют в нативном состоянии в виде олигомеров (чаще всего тримеров) (Рисунок 9). Неспецифические порины являются примером белков прокариот, наиболее охарактеризованных в структурно-функциональном отношении, а также в плане установления их роли в физиологии организма хозяина (Nikaido et al., 1977; Galdiero et al., 2012, Chistyulin et al., 2019). В отличие от специфических и лиганд-зависимых поринов, эти белки обладают слабой катионной селективностью и способностью существовать в функционально активной конформации (как открытая пора) в отсутствие каких-либо специфических субстратов (Galdiero et al., 2012). Порины, как и другие интегральные мембранные белки, погружены в жидкокристаллический матрикс НМ, состоящий из липидов. В связи с этим чрезвычайно важными для проявления функции пориновых белков являются их взаимодействие с липидами НМ и модуляция ориентации алифатических цепей липидов на границе липид-белок (Phale et al., 1998).

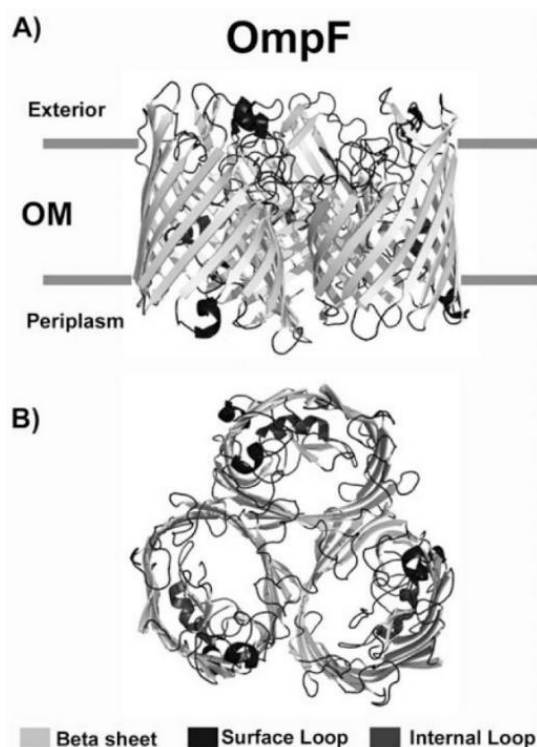


Рисунок 9. Трехмерная структура порина OmpF из *E. coli*. Наружные и внутренние петли показаны темно-серым цветом: внеклеточное пространство сверху, периплазматическая область внизу (A); тримерная структура порина (B) (Galdiero et al., 2012).

Иммунный ответ на белки НМ бактерий, в том числе порины, имеет ряд особенностей. Во-первых, высокий уровень антител к белкам НМ ряда грамотрицательных бактерий обнаруживается у людей как при естественном течении инфекции, так и при вакцинации. Во-вторых, в крови животных и человека наблюдается длительная циркуляция специфических антител как в результате иммунизации, так и при развитии заболевания, то есть, в организме хозяина развивается иммунологическая память. Интересно, что антитела к поринам обнаруживаются в сыворотках крови экспериментальных животных (мышей, кроликов, крыс, обезьян) вне зависимости от формы вводимого антигена, то есть при иммунизации целыми клетками, фрагментами клеточной стенки бактерий или изолированными белками (Портнягина и др., 2005; Marandi et al., 1997; Achouak et al., 2001; Galdiero et al., 2012).

Многие исследователи отмечали видоспецифичность иммунного ответа к поринам грамтрицательных бактерий, обусловленную консервативностью структуры поринов (Новикова и др., 2014; Neary et al., 2001). Так, из бактерии *Y. pseudotuberculosis* (штамм 598, 1В серовар) был выделен белок – порин OmpF, названный иерсинином, относящийся к термозависимым порообразующим белкам НМ бактерий, ассоциированным с пептидогликаном (Вострикова, 2000; Novikova et al. 1989). Было показано, что иерсинин является иммунодоминантным антигеном НМ псевдотуберкулезного микроба (Вострикова, 2000). Обнаружено также, что, как при иммунизации мелких и крупных лабораторных животных, так и при естественном развитии заболевания у людей, в сыворотках крови присутствуют антитела к иерсинину с высоким титром. В ряде работ порин OmpF псевдотуберкулезного микроба был охарактеризован как видоспецифический антиген (Новикова и др., 1996; Портнягина и др., 2000). Данное свойство делает этот белок перспективным для диагностики заболеваний, вызываемых всеми серовариантами псевдотуберкулезного микроба. Использование иерсинина в качестве диагностического антигена позволило разработать ИФА тест-систему для диагностики псевдотуберкулеза, по чувствительности и эффективности существенно превосходящую коммерческие диагностические тест-системы на основе типоспецифических липополисахаридов (Новикова и др., 2010).

3.4. Лектины и порины как оружие против коронавирусной инфекции и грядущих пандемий

В связи с недавно прошедшей коронавирусной пандемией невозможно не сказать несколько слов о важности лектинов и поринов в данной области исследований.

Лектины могут быть использованы для идентификации и характеристики структуры гликанов, входящих в состав вирусных частиц (Greig and Bouillant, 1977; Wu et al., 2009). Гликаны, представляющие собой углеводную часть гликопротеинов, играют решающую роль как в развитии

иммунных реакций в организме человека (Van Breedam et al., 2014), так и в патогенезе вирусных инфекций (Lardone et al., 2021). Противовирусные лектины могут блокировать проникновение вируса, связывая гликаны вируса или клетки хозяина (Carneiro et al., 2021). Противовирусные лектины могут связываться с вирусным белком Spike (S) SARS-CoV (Keyaerts et al., 2007), в частности, было обнаружено, что маннозо/глюкозо- и N-ацетилглюкозамин(GlcNAc)-специфичные лектины ингибируют проникновение нескольких коронавирусов, похожих на SARS-CoV (O'Keefe et al., 2010; Hsieh et al., 2010; Kumaki et al., 2011), MERS-CoV (Millet et al., 2016). Глюкозо-маннозоспецифичный растительный лектин FRIL из *Lablab purpureus* эффективен в отношении вирусных гликопротеинов как *in vivo*, так и *in vitro* в результате нейтрализации связывания SARS-CoV-2 с N-гликанами сложного типа (Liu et al., 2020). Другой маннозоспецифичный растительный лектин из чечевицы *Lens culinaris* продемонстрировал сильную ингибирующую активность в отношении SARS-CoV-2 на ранних стадиях инфекции. Лектин чечевицы блокирует связывание тримера ACE2-S с гликанами олигоманнозного типа и N-ацетилглюкозамином по сайтам гликозилирования N165, N234 и N343, расположенным вокруг домена связывания с рецептором (Wang et al., 2021). Лектин GRFT (Grifththsin), полученный из красных водорослей *Grifithsia sp.*, представляет собой лиганд-связывающий белок с высокой маннозоспецифичностью, который значительно ингибирует псевдовирусную инфекцию SARS-CoV-2 *in vitro* с IC₅₀ 63 нмоль/л по сравнению с популярным препаратом ремдесивиром с эффективной концентрацией 0,77 мкмоль/л; GRFT также ингибирует S-опосредованное слияние клеток SARS-CoV-2 с IC₅₀ 323 нмоль/л (Cai et al., 2020). Также сообщалось, что GRFT ингибировал контагиозность SARS-CoV в исследованиях *in vivo* и *in vitro* (O'Keefe et al., 2010). Согласно результатам исследования молекулярного докинга и моделирования еще один специфичный к маннозе лектин VanLec, полученный из бананов, может воздействовать на N-гликаны шиповидных гликопротеинов и таким образом

нейтрализовать контагиозность SARS-CoV-2 (Lokhande et al., 2020). В целом, маннозоспецифичные противовирусные лектины, полученные из водорослей, являются мощными ингибиторами различных РНК-вирусов, включая коронавирусы (Alam et al., 2021).

На основе же бактериальных поринов предложена новая вакцинная платформа для создания субъединичной вакцины против коронавирусной инфекции из полимеризованных рецептор-связывающих (RBD) доменов белков SARS-CoV-2 (Yang et al., 2022). Используя принцип полимеризации порина ClyA, запускаемой клеточной мембраной кишечной палочки *E. coli*, сконструирована нанопора для правильного сворачивания и полимеризации иммуногенных RBD белков коронавируса. Полимеризованный таким образом RBD белок коронавируса продемонстрировал «правильные» конформационные эпитопы, способные индуцировать нейтрализующие антитела. Такие наноструктуры способствуют поглощению и обработке антигена дендритными клетками, вызывая тем самым эффективную выработку нейтрализующих SARS-CoV-2 антител, системного клеточного иммунного ответа и Т-клеток памяти. Новая вакцинная платформа на основе полимеризованных поринов (ПП), вероятно, найдет дополнительное применение, включая другие вирусные и бактериальные вакцины, вакцины против опухолей, доставку лекарств и диагностику заболеваний (Yang et al., 2022).

4. Материалы и методы

4.1. Реагенты и материалы, использованные в работе

Для процедур выделения и манипуляции с ДНК использовали такие материалы и реактивы, как гуанидинизотиоцианат, ацетат натрия, изопропанол, этанол, трисгидроксиметиламинометан (трис), этилендиаминтетраацетат натрия (ЭДТА, натриевая соль), додецилсульфат натрия (ДСН), гидроксид натрия (Panreac), бромистый этидий (Amresco), агароза (Bio-Rad, США), дезоксинуклеозидтрифосфаты и набор стандартов для определения молекулярных масс (Bio-Rad, США), эндонуклеазы рестрикции NcoI, SacI, SalI, T4-ДНК-лигаза (Fermentas), агароза (Amresco), реактивы для секвенатора ДНК (Applied Biosystems, США), плазмидный вектор pET-40b(+) (Novage, США). Штаммы *E. coli* (DH5 α , Rosetta (DE3)) культивировали с использованием триптона, дрожжевого экстракта, агара и хлорида натрия (Amresco). Штаммы были любезно предоставлены сотрудниками фирмы «Евроген» (Москва, Институт биоорганической химии им. Шемякина).

Очистка и прочие манипуляции с рекомбинантными белками проводили с использованием таких материалов, как ДЭАЭ-52 – целлюлоза (Wharm, Англия), Ni-NTA агароза (Qiagen), супердекс 200PG (Sigma, Германия), MonoQ (General Electric), ДНКазу (SkyGen, Москва, Россия), Ni²⁺-ИМАС-Sephарозе, Source 15 Q, mono-Q HR (GE Healthcare Life Sciences, Бакингемшир, Великобритания), глицерин, хлорид натрия, хлорид калия, ЭДТА, трис, ацетат натрия, гидрокарбонат натрия, диэтаноламин (ДЭА), ДСН (Sigma-Aldrich), *n*-нитрофенилфосфат (*n*-НФФ) (Serva), Тритон X-100, β -меркаптоэтанол (ICN Biochemicals, США), акриламид, бисакриламид, персульфат аммония (ПСА) (ICN Biochemicals, США), тетраэтилметилендиамин (ТЕМЕД) (Lancaster).

Геммаглютинирующую способность лектинов проверяли с использованием донорской крови человека, любезно предоставленной лабораторией химии неинфекционного иммунитета ТИБОХ ДВО РАН.

Все реактивы отечественного производства имели квалификацию «осч», реактивы зарубежного производства – «biotechnology grade» и «ultra pure grade».

4.2. Синтез кДНК лектина мидии *C. grayanus*

Выделение РНК и синтез кДНК лектина мидии *C. grayanus* проводили с использованием наборов для выделения суммарной РНК «RNA Solo» и для синтеза кДНК «Mint» («Евроген», Москва) согласно рекомендациям производителя. Реакционная смесь для синтеза первой цепи ДНК состояла из следующих компонентов: 3 мкл раствора суммарной РНК мидии *C. grayanus*, 1 мкл 3'-праймера (10 мкМ), 1 мкл раствора PlugOligo (Евроген). Денатурировали РНК при 70 °С в течение 2 мин. По истечении времени прогрева температуру инкубации снижали до 42 °С и инкубировали 3 мин. Затем добавляли следующие компоненты: 2 мкл 5х буфера для синтеза первой цепи, 1 мкл ДТТ (20 мМ), 1 мкл смеси dNTP (10 мкМ), 1 мкл Mint-ревертазы. Инкубировали смесь при 42 °С в течение 30 мин, после чего добавляли 5 мкл IP-смеси (компонент из набора реактивов «Mint») и инкубировали при 42 °С в течение 1 ч и 30 мин.

Аmplификацию кДНК проводили методом ПЦР. Реакционная смесь состояла из следующих компонентов: 40 мкл стерильной воды, 5 мкл 10х Encuslo-буфера для ПЦР, 1 мкл смеси dNTP (10 мМ), 2 мкл праймера M1 (10 мкМ), 1 мкл 50х смесь полимераз (Encuslo полимеразы, Евроген), 1 мкл первой цепи кДНК. Профиль ПЦР: предварительная денатурация – 95 °С - 1 мин, 95 °С - 15 сек, 66 °С - 20 сек, 72 °С - 3 мин, количество циклов – 25.

4.3. Гель – электрофорез ДНК

ДНК разделяли электрофорезом в 1-2 % горизонтальном агарозном геле в 100 мМ Трис-ацетатном буфере, рН 8,0, содержащем 1 мМ ЭДТА и 1 мкг/мл бромистого этидия, при напряженности 5 В/см при комнатной температуре. Для нанесения на гель раствор ДНК смешивали в соотношении 1:5 с 50 %

глицерином, содержащим 0,1 % красителя Понсо красный и 0,1 % саркозила. По окончании разделения окрашенную бромистым этидием ДНК наблюдали при освещении геля ультрафиолетовыми лучами при $\lambda=260$ нм (Маниатис и др., 2004; Green and Sambrook, 2020).

4.4. Трансформация плазмидной ДНК клеток *E. coli*

Для приготовления компетентных клеток 0,5 мл ночной культуры *E. coli* штамма DH5 α (для размножения плазмид) или штамма Rosetta (DE3) (для проведения экспрессии рекомбинантных генов), выращенной в среде LB при 37 °С и интенсивной аэрации, разводили в 100 раз предварительно нагретой до 37 °С средой LB и выращивали при 37 °С и интенсивной аэрации в течение 2-4 часов до OD₆₀₀=0,5-0,7 (Салганик, 1990; Green and Sambrook, 2020). Культуру охлаждали во льду в течение 10 мин и клетки осаждали центрифугированием (4500 об/мин, 5 мин, 4 °С). Осадок ресуспендировали в 15 мл охлажденного стерильного буфера RF-1 (100 мМ KCl, 50 мМ MnCl₂ x 4H₂O, 10 мМ CaCl₂ x 2H₂O, 15 % глицерин, 30 мМ ацетата калия, pH 5,8) и инкубировали при 0 °С 15 мин. Клетки затем снова осаждали центрифугированием (4500 об/мин, 5 мин, 4 °С) и ресуспендировали в 4 мл буфера RF-2 (75 мМ CaCl₂x2H₂O, 10 мМ KCl, 15 % глицерин, 10 мМ MOPS, pH 6,8).

Плазмидную ДНК (30 нг) смешивали с 100 мкл компетентных клеток *E. coli*, приготовленных по методике (Салганик, 1990; Green and Sambrook, 2020), инкубировали 45 мин на льду, прогревали смесь 2 мин при 42 °С и снова охлаждали на льду в течение 1 мин. После 10-кратного разбавления смеси теплой средой LB и инкубации при 37 °С в течение 1 ч клетки высевали на чашки Петри с агаризованной LB средой, содержащей канамицин 25 мкг/мл. Культуру выращивали 14-16 ч при температуре 37 °С.

Скрининг бактериальных колоний, содержащих плазмиды с искомыми вставками генов, проводили методом ПЦР с помощью специфических праймеров для плазмиды pET40-b(+), предложенных производителем (Novagen): #69945-3 – GAACGCCAGCACATGGACAG (прямой праймер);

#69337-3 – GCTAGTTATTGCTCAGCGG (обратный праймер). Профиль реакции: 98 °C- 15 с; затем (95 °C- 10 сек; 55 °C – 20 сек; 72 °C – 1,5-2,0 мин) - 25 циклов.

4.5. Выделение плазмидной ДНК из *E. coli*

Плазмидную ДНК выделяли методом щелочного лизиса (Мазин и др., 1990; Green and Sambrook, 2020). Клетки *E.coli* осаждали из 3 мл ночной культуры центрифугированием в течение 1 мин при 12000 об/мин и 4 °C, осадок ресуспендировали в 100 мкл буфера А (25 мМ Трис-НСl, рН 8,0, 50 мМ глюкоза, 20 мМ ЭДТА) и лизировали клетки добавлением 100 мкл раствора В (0,2 М NaOH, 1 % ДСН). Сразу после осветления раствора добавляли 150 мкл 3 М ацетата натрия (рН 5,2), перемешивали и центрифугировали 5 мин при 12000 об/мин. К супернатанту добавляли 400 мкл смеси фенол: хлороформ: изоамиловый спирт (25:24:1) и после перемешивания в течение 5 мин центрифугировали при 12000 об/мин 3 мин. К водной фазе добавляли 2,2 объема 96 %-го этанола, после 1 ч инкубирования при -20 °C нуклеиновые кислоты осаждали центрифугированием при 12000 об/мин в течение 15 мин. Осадок промывали 70 % этанолом и растворяли в 50 мкл бидистиллированной воды. Для освобождения от РНК раствор обрабатывали РНКазой при конечной концентрации 50 нг/мл в течение 2 ч при 37 °C, затем смесью фенол: хлороформ: изоамиловый спирт (25:24:1). ДНК осаждали добавлением к водной фазе 5 мкл 3 М ацетата натрия (рН 5,2), 2,5 объема 96 %-го этанола и центрифугированием при 12000 об/мин в течение 15 мин. Осадок промывали 70 % этанолом и растворяли в 20 мкл бидистиллированной воды.

4.6. Получение генетической конструкции лектина CGL со щелочной фосфатазой *StAR*

Для построения химерной конструкции амплифицировали кодирующий участок гена щелочной фосфатазы *StAR* с использованием геномной ДНК морской бактерии *S. amphilecti* КММ296 и двух геноспецифичных праймеров,

содержащих на концах сайты рестрикции эндонуклеаз NcoI и SacI для клонирования в плазмиде pET 40(b+):

5'-TATTCCATGGCCAGAGATCAAGAATGTCATTCTGAT-3' (прямой праймер на N-конец CmAP, сайт рестрикции подчеркнут);

5'-
TTAAGAGCTCAGAACCACCACCAGAACACCACCACCAGAACCCAS
CACCACCSTTCGCTACCACSTGTCTTCAGATACTGTCCT-3' (обратный праймер на C-конец CmAP, сайт рестрикции подчеркнут). Обратный праймер содержит последовательность линкерного участка (Gly₄Ser)₃ для независимого соединения третичных структур белков CmAP и CGL.

Амплификацию гена лектина CGL проводили с использованием полученной кДНК мидии *C. grayanus* и геноспецифичных для CGL праймеров содержащих на концах сайты рестрикции эндонуклеаз SacI и SalI для клонирования в плазмиду pET 40(b+) после гена CmAP и линкера:

CGL_SacI_For; TATAGAGCTCCACAACGTTTCTTATCAAACACA;
CGL_SalI_rev; AGCTGTCGACGGCATAAACTAAAACGCGCTTGTCTTT.

ПЦР проводили в 20 мкл реакционной смеси, включающей 5 мкл 10x Encyclo-буфера для ПЦР, 1 мкл смеси dNTP (10 mM), 2 мкл каждого праймера (5 мкМ), 0,4 мкл 50x смесь полимераз (Encyclo полимеразы, Евроген), 1 мкл матричной ДНК (10-20 нг), в амплификаторе (Eppendorf) по следующей схеме:

для гена CmAP: 95 °C – 3 мин (95 °C – 15 сек, 72 °C- 1,5 мин) x 38 циклов;

для гена CGL: 95 °C – 3 мин (95 °C – 15 сек, 72 °C- 40 сек) x 30 циклов.

ПЦР-продукты анализировали с помощью электрофореза.

Перед лигированием все ПЦР-продукты очищали набором реактивов для выделения ДНК из агарозного геля и реакционных смесей «Cleanup» (Евроген, Москва), затем обрабатывали соответствующими эндонуклеазами рестрикции.

4.7. Рестрикция ПЦР-фрагментов и плазмиды

ПЦР-продукты и плазмиду pET40-b(+) (Novagen) последовательно обрабатывали эндонуклеазами рестрикции SacI и SalI (Fermentas) для генов лиганд-связывающих белков CGL и OmpF, NcoI и SacI (Fermentas) для гена ЩФ *StAR* в 0,5-мл микроцентрифужной пробирке (Eppendorf). На 50 мкл инкубационной смеси добавляли рестриктазу в количестве 5 ед, 5 мкл 10x буфера для рестрикции и 1 мкг ДНК. Смесь инкубировали в течение 3 ч при температуре 37 °С. Для дальнейшего эффективного лигирования плазмиду обрабатывали рекомбинантной щелочной фосфатазой (0,1 ед *StAR*) через 2,5 часа после начала инкубации рестрикционной смеси и продолжали инкубировать в течение получаса.

Для удаления ферментов рестрикционную смесь обрабатывали фенолом (рН 8,0) в соотношении 1:1 и перемешивали переворачиванием. Смесь центрифугировали при 13000 об/мин в течение 10 мин. при комнатной температуре. В супернатант добавляли 0,1 объёма 3М ацетата натрия (рН 5,2), 1 объём изопропанола (или 2,5 объёма этанола), смесь перемешивали и выдерживали при -20 °С в течение 30 мин. Далее осадок промывали 70 % этанолом, высушивали на воздухе и растворяли в деионизованной воде.

4.8. Лигирование ПЦР-фрагментов в плазмиду

Лигирование генов гибридных белков в плазмиду pET-40b(+) осуществляли в 2 стадии:

1) лигирование рестрицированного ПЦР-фрагмента, содержащего гены *StAR* и линкера (Gly₄Ser)₃, и рестрицированной плазмиды pET-40b(+) проводили в 20 мкл инкубационной смеси, содержащей солевой 5x буфер для ДНК-лигазы и 4 ед. ДНК-лигазы фага T4 (Fermentas). Смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч. Необходимое количество ПЦР-фрагментов (вставки) рассчитывали по формуле:

$$\left(\frac{m(\text{вектора}), \text{нг} \times l(\text{вставки}), \text{кбаз}}{l(\text{вектора}), \text{кбаз}} \right) \times \left(\frac{v(\text{вставки}), \text{Моль}}{v(\text{вектора}), \text{Моль}} \right) = m, \text{нг} ,$$

где $\left(\frac{v(\text{вставки}), \text{Моль}}{v(\text{вектора}), \text{Моль}} \right) = \frac{1}{1}$

Далее лигирующую смесь приливали к суспензии компетентных клеток *E. coli* DH5 α (200 мкл) для трансформации полученных плазмид рЕТ40*StAP* по методике, описанной выше. Селекцию колоний проводили методом ПЦР с использованием плазмид-специфических праймеров для рЕТ-40b(+) (Novagen). Отобранные колонии выращивали для выделения и очистки рекомбинантных плазмид как описано выше.

2) вторым этапом проводили двойную рестрикцию рекомбинантной плазмиды рЕТ40*StAP*, несущей ген щелочной фосфатазы *StAP* с линкером, и ПЦР-фрагмента гена лиганд-связывающего белка (CGL или *OmpF*) рестриктазами *SacI* и *SalI* по методике, описанной выше, для подготовки к лигированию.

Далее лигирование гена лиганд-связывающего белка (CGL или *OmpF*) и рекомбинантной плазмиды рЕТ40*StAP* проводили в 20 мкл инкубационной смеси, содержащей солевой 5x буфер для ДНК-лигазы и 4 ед. ДНК-лигазы фага T4 (Fermentas). Смеси инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч, необходимое количество вставки рассчитывали по формуле, указанной выше.

Далее лигирующую смесь приливали к суспензии компетентных клеток *E. coli* DH5 α (200 мкл) для трансформации полученными плазмидами рЕТ40*StAP*/CGL (или рЕТ40*StAP*/*OmpF*) по методике, описанной выше. Селекцию колоний проводили методом ПЦР с использованием плазмид-специфических праймеров для рЕТ40-b(+) (Novagen). Отобранные колонии по наличию целевой вставки генов соответствующего размера выращивали для выделения и очистки рекомбинантных плазмид как описано выше. После инкубирования в течение 16 ч при 37 °C клоны отсевали, выделяли плазмидную ДНК и проводили скрининг на наличие мутаций при помощи

автоматического секвенирования. Далее отбирали плазмидную ДНК рЕТ40*StAR/OmpF*, содержащую корректные последовательности генов *StAR* и *CGL*.

4.9. Синтез кодирующей ДНК лектина CGL с тройными заменами аминокислотных остатков в лиганд- связывающем сайте

Для выявления значимости консервативных участков НPY/KG в сайтах связывания каждой субъединицы тримера CGL (Site 1, Site2 и Site3) и их вклада в общую углевод-связывающую (лектинную) активность CGL получали мутантные формы гибрида *StAR/CGL* методом ПЦР с использованием в качестве ДНК-матрицы плазмиду, содержащую полноразмерный ген гибридного белка *StAR/CGL* с немутантным лектином CGL. Замены трех аминокислотных остатков His, Pro и Gly на Ala вводили в консервативные участки НPY/KG каждого сайта связывания (Site 1, Site 2 и Site 3) в лектинную часть гибридного белка *StAR/CGL* с помощью праймеров:

(1) Site1dir-

5'AAGGCCAGTGGAAAGTTTCTTGCTGCATACGCTGGCAGTAGCA
AC-3'

(2) Site 1 rev –

5'-
AGCAGGGTTGCTACTGCCAGCGTATGCAGCAAGAACTTTCCAC -3'

(3) Site 2 dir –

5'-
GTTGCAAGTGGAAAAATTGTCGCTGCCTACGCCGGACAAGCTAAT-3'

(4) Site 2 rev –

5’-

TGGTGGATTAGCTTGTCCGGCGTAGGCAGCGACAATTTTTCCAC -3’

(5) Site3dir-

5’-

CACAAGGAGGTAAATATATCGTCGTCAAGGCAGGATCCCCGAAT-3’

(6) Site 3 rev –

5’-

CGGTGGATTCTGGGGATCCTGCCTTGGCGGCGATGTATTTACCTC -3’

Каждый мутантный ген CGL, содержащий три замены в одном из сайтов связывания, получали методом ПЦР в несколько этапов с использованием в качестве матрицы рекомбинантную плазмиду pET-40b(+) *CmAP/CGL*:

1) первую цепь ДНК с мутациями получали с использованием прямого праймера на N-конец гена немутантного белка CGL (CGL_SacI_For; TATAGAGCTCCACAACGTTTCTTATCAAACACA) и обратного праймера (2) на С-конец гена немутантного белка CGL, включающего в свой состав запланированные мутации одновременно трех остатков His, Pro и Gly.

2) вторую цепь ДНК с теми же мутациями получали с использованием прямого праймера (1), включающего в свой состав эти мутации, и обратного праймера на С-конец гена природного типа белка CGL (CGL_SalI_rev; AGCTGTCGACGGCATAAACTAAAACGCGCTTGTCTTT).

3) Две синтезированные разнонаправленные цепи ДНК с одинаковыми мутациями соединяли между собой в эквимольном соотношении по принципу комплементарности с помощью реакции, содержащей в 20 мкл смеси: 2 мкл 10х буфера для ПЦР, 0,4 мкл ДНК-полимеразы (Энцикло полимеразы, Евроген), 0,4 мкл 50х раствора dNTP и деионизованная вода.

Профиль реакции ПЦР: t крышки ПЦР-машины – 105 °С, денатурация ДНК t = 95 °С - 20 сек, отжиг праймеров t = 64 °С - 3 мин, работа полимеразы t = 72 °С - 2 мин, 4 цикла.

Итоговый ПЦР-продукт использовали в следующей ПЦР как ДНК-матрицу для получения полноразмерного гена CGL, имеющего в своем составе нуклеотидные замены, кодирующие запланированные мутации.

4) Для получения полноразмерного гена мутантного CGL использовали реакционную смесь на 20 мкл: 2 мкл 10x буфера для ПЦР, 0,4 мкл dNTP, 0,4 мкл ДНК-полимераза (Евроген), 1 мкл раствора мутантного ПЦР-продукта (ДНК-матрицы), полученного в предыдущей реакции, праймеры на N- и С-конец гена CGL с сайтами рестрикции (CGL_SacI_For; TATAGAGCTCCACAACGTTTCTTATCAAACACA и CGL_SalI_rev; AGCTGTGCGACGGCATAAACTAAAACGCGCTTGTCTTT). Амплификацию проводили по следующей схеме: 95 °С – 2 мин (первичная денатурация ДНК), (95 °С – 15 сек (денатурация ДНК), 72 °С- 1,2 мин (отжиг праймеров и работа Энцикло полимеразы, Евроген) x 35 циклов.

Лигирование мутантного полноразмерного гена CGL проводили в рекомбинантную плазмиду pET40bStAP, содержащую предварительно встроенный ген щелочной фосфатазы StAP с линкером на конце как описано в предыдущей главе.

Для очистки мутантных ПЦР-фрагментов от ДНК немутантного лектина CGL, используемого в реакциях в качестве ДНК-матрицы для ПЦР, использовали набор для очистки ДНК из агарозного геля («Цитокин», Санкт-Петербург; «Cleanup», Евроген, Москва).

Лигирование, трансформацию и экспрессию гибридных белков StAP/CGL, содержащих мутантные и немутантные формы лектина CGL, проводили по одинаковой схеме. Далее при любых манипуляциях с мутантными белками в качестве контроля использовали гибридный белок StAP/CGL, содержащий последовательность природного типа лектина CGL.

4.10. Синтез кодирующей ДНК лектина CGL с одиночными заменами аминокислотных остатков

Установление значимости отдельных аминокислотных остатков в активном центре лектина CGL и его микроокружении (Таблица 2) проводили также методом ПЦР-опосредованного мутагенеза. В ген CGL вводили нуклеотидные замены методом ПЦР с использованием в качестве ДНК-матрицы полноразмерный ген природного типа белка CGL из рекомбинантной плазмиды pET40b*StAP/CGL*, как описано в предыдущей главе. Мутации вводили в лектинную часть гибридного белка с помощью праймеров, указанных в Таблице 2.

Таблица 2. Олигонуклеотиды для получения мутантных форм лектина CGL с заменой одного аминокислотного остатка на остаток аланина

Мутация	Прямой праймер (5'-3')	Обратный праймер (5'-3')
Asn27Ala	AGTAGCAACCCTGCTAACGCCACTAAGTTG	GCAGGACCAACTTAGTGCGTTAGCAGGGT
His37Ala	GTCCTGCATAGCGATATCGCTGAAAGAATG	GGAAGTACATTCTTTCAGCGATATCGCTAT
Glu 75Ala	AGCTAATCCACCAAATGCCACCAATATGGTTC	TGATGCAGAACCATATTGGTGGCATTGGTG
His85Ala	GTTCTGCATCAAGATCGTGCTGATCGGGCA	GAATAGTGCCCGATCAGCACGATCTTGAT
Asn119Ala	ATCCCCGAATCCACCGAATGCTACCGAAACAG	GTATAACTGTTTCGGTAGCATTCGGTGGAT
Asp127Ala	CAGTTATACATGGAGCTAAACATGCAGCCA	GAATCCATGGCTGCATGTTTAGCTCCATGTA
His129Ala	ATACATGGAGATAAAGCTGCAGCCATGGAA	CAAAAATGAATCCATGGCTGCAGCTTTATCT

4.11. Компьютерное моделирование лектина CGL и молекулярный докинг с лигандами

Модель пространственной структуры CGL была построена на основе кристаллической структуры лектина MytiLec, установленной с разрешением 1,05 Å (код PDB: 3WMV) (Kovalchuk et al., 2013; Terada et al., 2016). Анализ контактов между CGL и лигандами, мутагенез *in silico*, молекулярный докинг и визуализацию результатов проводили с помощью модулей Ligand Interaction и Dock-программы MOE 2018.01 (Molecular Operating Environment (MOE)),

2018.01; Chemical Computing Group ULC, 1010 Sherbrooke St. West, Suite #910, Montreal, QC, Canada, H3A 2R7, 2018.). В анализе использовали кристаллическую структуру CGL в комплексах с галактозой (PDB: 5F8W), галактозамином (PDB: 5F8Y), глоботриозой Gb3 (PDB: 5F90) и трисахаридным остатком GalNAc α 1-3Gal [Fuc α 1-2] из муцина желудка свиньи (PSM), которая идентична терминальному трисахариду антигена гистогруппы А крови человека (HBGA А-трисахарид; PDB: 2WMI) (Tian et al., 2008). Молекулярный докинг PSM-трисахарид GalNAc α 1-3Gal [Fuc α 1-2] с CGL проводили с использованием комплекса с галактозамином (PDB: 5F8Y) в качестве матрицы. Энергия связи лиганда (обобщенная энергия борновского взаимодействия в молекулярной механике) представляла собой несвязанную энергию взаимодействия между рецептором и лигандом и включала энергии Ван-дер-Ваальса, Кулона и обобщенную борновскую неявную энергию взаимодействия с растворителем (Labute, 2008). Изменение энергии связывания мутантов CGL с галактозой (Gal) и глоботриозой (G3) рассчитывали, как $\Delta E = E_{mut} - E_{wt}$, где E_{mut} – энергия связывания мутантного лектина CGL, E_{wt} – энергия связывания лектина CGL природного типа.

4.12. Получение генетической конструкции порина OmpF со щелочной фосфатазой CmAP

Рекомбинантную плазмидную ДНК pET40CmAP/OmpF, кодирующую полноразмерную щелочную фосфатазу CmAP морской бактерии *C. amphilecti* КММ 296 и полноразмерный порин OmpF *Y. pseudotuberculosis*, соединенные между собой гибким линкером (Gly₄Ser)₃, получали встраиванием гена порина OmpF в SacI/SalI-фрагмент рекомбинантной плазмиды pET40CmAP, метод получения которой описан выше.

Аmplификацию гена OmpF-белка проводили с использованием геномной ДНК грамотрицательной бактерии *Y. pseudotuberculosis* и пары праймеров, включающих сайты рестрикции SacI и SalI: OmpF40-Sac-dir: ТТАААГАГСТССГАААТСТАТААСАААГАТGGCAACA; OmpF40-Sal-rev:

TTAAGTCGACTTAGAACTGATAAACCAAGCCAAC (сайты рестрикции подчеркнуты).

2 мкг плазмидной ДНК рЕТ40*StAP* и ПЦР-фрагмента гена *OmpF* обрабатывали рестриктазами *SacI* и *SacII* в соответствии с методикой, описанной выше, и из полученных гидролизатов выделяли векторную часть плазмиды в 1 % геле легкоплавкой агарозы.

Очищенные фрагменты гена *OmpF* и векторную часть плазмиды рЕТ40*StAP* сшивали при помощи лигазной реакции в 50 мкл буфера для лигирования согласно инструкции производителя T4-лигазы (Fermentas, Литва). 10 мкл реакционной смеси использовали для трансформации компетентных клеток *E. coli* Rosetta (DE3). Трансформанты высевали на LB-агар, содержащий 25 мкг/мл канамицина. После инкубирования в течение 16 ч при 37 °С клоны отсеивали, выделяли плазмидную ДНК и проводили скрининг на наличие мутаций при помощи автоматического секвенирования. Далее отбирали плазмидную ДНК рЕТ40*StAP/OmpF*, содержащую корректные последовательности генов *StAP* и *OmpF*.

4.13. Гетерологическая экспрессия в *E. coli*

Для проведения экспрессии рекомбинантных генов культуру отобранных рекомбинантных клеток *E. coli* Rosetta (DE3), трансформированных плазмидой, высевали в 10 мл жидкой среды LB, содержащей 25 мкг/мл канамицина и оставляли в течение 12 ч на шейкере при 37 °С. Выращенную ночную затравку инокулировали в 150 мл среды LB, содержащей 25 мкг/мл канамицина, и выращивали при 37 °С на шейкере при 250 об/мин. По достижении необходимой оптической плотности ($OD_{600} = 0,6-0,8$) в среду добавляли индуктор экспрессии изопропил-Д-тиогалактопиранозид (ИПТГ) до конечной концентрации 1 мМ, после чего культуру клеток инкубировали на шейкере при 250 об/мин при 37 °С в течение 3-4 ч, затем клетки центрифугировали при 5000 об/мин в течение 10 минут.

Для получения максимального количества функционального растворимого рекомбинантного белка на этапе гетерологической экспрессии генов проводили оптимизацию условий культивирования клеток рекомбинантного штамма. Скорость роста бактериальной массы и продуктивность штамма определяли в диапазоне температур 12 - 37 °С и концентраций индуктора экспрессии ИПТГ от 0,2 до 0,5 мМ/мл при инкубации на шейкере при 250 об/мин в течение 12 ч.

4.14. Определение концентрации белка

Количество белка в растворе определяли с использованием реактива Бредфорд: 5-20 мкл раствора белка доводили до 100 мкл дистиллированной водой или буфером и добавляли 1 мл реактива Бредфорд (Bradford, 1976). Оптическую плотность измеряли спектрофотометром при длине волны 595 нм. Концентрацию белка определяли по формуле: $m = \frac{OD_{595}}{k}$, где k определяется по калибровочной кривой, построенной с использованием бычьего сывороточного альбумина (БСА).

4.15. Определение активности рекомбинантной щелочной фосфатазы *StAR*

Качественный контроль активности ЩФ у рекомбинантного белка *StAR* и гибридных белков *StAR/CGL* и *StAR/OmpF* осуществляли при комнатной температуре путем добавления 5-10 мкл образца (лизата клеток или белкового раствора на разных этапах очистки рекомбинантного белка) в 200 мкл буфера, содержащего 0,1 М Трис-НСl, 0,2 М КСl, рН 10,0 и 2 мМ *n*-НФФ, по скорости окрашивания реакционной смеси в желтый цвет за счет быстрого высвобождения хромогенного продукта реакции *n*-НФФ по сравнению с контрольными образцами клеток, трансформированными пустой плазмидой рЕТ40-b(+).

Для количественного определения активности ЩФ рекомбинантных белков использовали стандартную процедуру: 5 мкл образца приливали к 495 мкл буфера, содержащего 0,1 М Трис-НСl, 0,2 М КСl, 2 мМ *n*-НФФ, рН 10,0. Реакционную смесь инкубировали при 37 °С в течение 30 мин. Для остановки реакции использовали 2 мл охлажденного 0,5 М NaOH. Количество образовавшегося *n*-НФ определяли с помощью спектрофотометра при длине волны 400 нм против контрольного образца, не содержащего рекомбинантный фермент. Удельную активность рассчитывали по формуле:

$$y.a. = \frac{2,5 \times OD_{400}}{18,6 \times t \times 0,005 \times C},$$

где OD₄₀₀-оптическая плотность при длине волны 400 нм; 2,5 – объем реакционной смеси; 18,6 – коэффициент экстинкции *n*-НФФ; *t* – время инкубации при 37 °С (в мин.); 0,005 – объем образца (в мл); *C* – концентрация образца (в мг/мл)

За единицу активности использовали количество фермента, необходимого для образования 1 мМ *n*-НФ за 1 мин. Удельная активность (у.а.) приведена в единицах на 1 мг белка.

4.16. Выделение и очистка рекомбинантных белков

Для оптимизации выхода целевых рекомбинантных белков и/или чистоты конечного препарата использовали следующие схемы выделения и очистки:

Схема №1. После экспрессии клетки из 1 л культуры рекомбинантной *E. coli* Rosetta (DE3) осаждали центрифугированием при 4 000 об/мин в течение 15 мин, затем ресуспендировали в 250 мл буфера А, содержащем 20 мМ Трис-НСl (рН 8,2), 0,01 % NaN₃, обрабатывали ультразвуком на ледяной бане до осветления раствора и центрифугировали при 11 000 об/мин в течение 30 мин. Супернатант наносили на колонку (4 х 25 см) с ДЭАЭ-52 целлюлозой (Whatman, Великобритания), затем промывали буфером Б, содержащим 20 мМ Трис-НСl (рН 8,2), 0,01 % NaN₃ и 100 мМ NaCl. Элюцию проводили линейным

градиентом NaCl от 0,1 до 0,35 мМ в буфере А (20 объемов колонки, 120 мл/ч). Уравновешенную буфером Б Ni-NTA агарозу (4 мл) (Qiagen, Нидерланды) смешивали с ферментативно активными белковыми фракциями и инкубировали при перемешивании на шейкере в течение часа. Для элюции белка со смолы полученную суспензию помещали на колонку (0,5 x 2 см), промывали буфером А и элюировали белок буфером С, содержащим 20 мМ Трис-НСl (рН 8,2), 0,01 % NaN₃ и 40 мМ ЭДТА. Затем белок обессоливали и концентрировали на ионообменной смоле ДЭАЭ-Toyopearl (0,5 x 2 см), элюируя белок двумя объемами 0,4 М NaCl в буфере А. В полученную фракцию добавляли 5 ед. энтеропептидазы L-NEP (Gasparian et al., 2006) и инкубировали 15 ч при 21 °С. После инкубации раствор белка наносили на колонку (1,5 x 170 см) с сефакрилом S-200HR (Sigma-Aldrich, США), уравновешенную буфером Б. Чистоту полученных фракций анализировали с помощью ДСН-ПААГ электрофореза (Laemmli, 1970).

Схема №2. После экспрессии клетки из 1 л культуры рекомбинантной *E. coli* Rosetta (DE3) осаждали центрифугированием при 4 000 об/мин в течение 15 мин, затем ресуспандировали в 250 мл буфера А (25 мМ Трис-НСl, рН 9,0) обрабатывали ультразвуком на ледяной бане до осветления раствора и центрифугировали при 11 000 об/мин в течение 30 мин. В супернатант лизата добавляли CaCl₂ и MgCl₂ до конечной концентрации 10 мМ и ДНКазу (SkyGen, Москва, Россия) до конечной концентрации 5 ед/мг, инкубировали при 37°С в течение 1 ч, затем центрифугировали при 11000 об/мин в течение 20 мин. Результирующий супернатант наносили на колонку (25 × 3,2 см) с металлоафинной смолой Ni²⁺-IMAC-Sepharose (GE Healthcare, Великобритания) уравновешенной буфером А. Рекомбинантный белок элюировали линейным градиентом 0–0,5 М имидазола в буфере А с добавлением 0,5 М NaCl (6 объемов колонки) со скоростью 1,3 мл/мин. Фракцию, содержащую рекомбинантный белок, очищали на колонке (10 × 1,4 см) с ионнообменной смолой Source 15 Q (GE Healthcare, Великобритания), уравновешенной буфером А, затем белок элюировали линейным градиентом

0–0,5 М NaCl в буфере А. Ионообменную хроматографию проводили со скоростью 1 мл/мин, объем фракций - 1 мл. Фракции целевого белка объединяли и обрабатывали энтеропептидазой L-NEP (Gasparian et al., 2006) в конечной концентрации 1 ед/мг белка в течение 12 часов при 25°C. Затем раствор белка наносили на колонку со смолой для гель-фильтрации Superdex 200 PG (105 × 2 см) (GE Healthcare, Великобритания), предварительно уравновешенную буфером А с добавлением 0,15 М NaCl со скоростью 0,5 мл/мин. Фракции целевого белка концентрировали и дополнительно очищали рехроматографией на ионообменной колонке mono-Q HR (4 × 0,8 см) (GE Healthcare, Великобритания), уравновешенной буфером А. После нанесения на колонку и промывания буфером А целевой белок элюировали линейным градиентом 0–0,5 М NaCl в буфере А со скоростью 0,5 мл/мин, объем фракций - 1 мл. Чистоту полученных фракций анализировали с помощью ДСН-ПААГ электрофореза (Laemmli, 1970).

Схема №3. После экспрессии клетки из 1 л культуры рекомбинантной *E. coli* Rosetta (DE3) осаждали центрифугированием при 4 000 об/мин в течение 15 мин, ресуспендировали в 250 мл буфера А, содержащего 20 мМ Трис-НСl (рН 9,0), 5 мМ имидазола, 0,5 М NaCl, 20% глицерин (Sigma-Aldrich, США), обрабатывали ультразвуком на ледяной бане до осветления лизата. После центрифугирования дезинтегрированного лизата при 11000 об/мин в течение 20 мин супернатант насыщали сухим сульфатом аммония до 30% и доводили концентрацию NaCl до 0,5 М. Осадок удаляли центрифугированием (15 мин при 11000 об/мин, 4 °С). Супернатант собирали и донасыщали сульфатом аммония до 70% в течение ч, что приводило к осаждению рекомбинантного белка. Осадок центрифугировали в течение 15 мин при 11000 об/мин при комнатной температуре и ресуспендировали в буфере А. Результирующий супернатант наносили на металлоафинный сорбент (Ni²⁺- IMAC-Sepharose, V колонки = 160 мл, GE Healthcare), уравновешенный в том же буфере, скорость нанесения - 1 мл/мин. Колонку промывали тем же буфером А, после чего рекомбинантный белок элюировали линейным градиентом 0,005–0,5 М

имидазола в буфере А при скорости элюции 2 мл/мин. После этого проводили диализ в течение 12 ч против буфера А, содержащего 50% глицерина (Sigma-Aldrich). Гис-таг (His-tag) рекомбинантного белка удаляли в течение 12 ч инкубации с энтеропептидазой L-NEP (Gasparian et al., 2006) из расчета 1-2 ед на 1 мг рекомбинантного белка при равномерном перемешивании. После рехроматографии на металлоафинном сорбенте несвязавшиеся фракции собирали и наносили на ионнообменный сорбент Sours 15 Q (V колонки = 8 мл, GE Healthcare) со скоростью 5 мл/мин. Элюцию проводили градиентом 0,15-1,0 М NaCl в буфере А при скорости 2 мл/мин. Фракции целевого белка идентифицировали с помощью субстрата *n*-НФФ по наличию ферментативной активности ЩФ и по молекулярной массе, определенной методом ДСН-ПААГ электрофореза (Laemmli, 1970).

4.17. Гель-электрофорез белков в полиакриламидном геле

На каждом этапе выделения белков проводили контроль эффективности очистки продукта электрофорезом по методу Лэммли (Laemmli, 1970). Белки разделяли в вертикальном 12,5 % полиакриламидном геле (ПААГ) в буфере для электрофореза (96 мМ трис-глицин, 0,05 % SDS, рН 8,34). В качестве контроля использовали коммерческие белковые маркеры (Fermentas, Литва; Bio-Rad, США).

4.18. Определение ферментативной активности щелочной фосфатазы *СтАР* в отношении ЛПС

В качестве субстратов для ферментативной реакции использовали 2 образца липополисахаридов: ЛПС *E. coli* 0:55 (S-ЛПС, м.м. 22000 Да) и Ra-ЛПС *E. coli* EH100 (Ra-ЛПС, м.м. 4616 Да) (Sigma-Aldrich, США). Липополисахариды (0,2 мг/мл) растворяли в 0,1 М Трис-HCl буфере, рН 7,7, содержащем 0,1 М KCl, тремя способами: инкубация при 24 °С в течение 12 ч (образец №1); инкубация при 37 °С в течение 12 ч (образец № 2); инкубация

при 24 °С в течение 12 ч в том же буфере с добавлением триэтиламина (ТЭА) до рН 10,0 (образец № 3).

Образцы № 4 и 5 готовили следующим образом: ЛПС *E. coli* 0:55 (1 мг/мл) растворяли в 1 М диэтаноламиновом буфере (ДЭА), рН 10,3, при комнатной температуре в течение 1 ч (образец № 4); Ра-ЛПС *E. coli* 0,2 мг/мл растворяли в 1 М ДЭА буфере, рН 10,3, при 24 °С в течение 12 ч (образец № 5).

Ферментативную активность рекомбинантной ЩФ СтАР (препараты: 0,3 мг/мл, у.а. 2300 ед/мг (*n*-НФФ), или 0,2 мг/мл, у.а. 2100 ед/мг (*n*-НФФ)) с использованием ЛПС-субстрата определяли с помощью количественного анализа фосфора, оставшегося в ЛПС после гидролиза. Аликвоту фермента (0,0003 – 0,024 мг/мл) в 1 М ДЭА, рН 10,3, и различные образцы ЛПС (№ 1, 2, 3, 4, 5) смешивали в стеклянных виалах с крышками (общий объем 1 мл) и инкубировали при 37 °С при перемешивании в течение 30 мин, 2 ч, 6 ч и 12 ч. После окончания реакции образцы переносили в диализные трубки (с размером пор 3000 Да) и диализовали против дистиллированной воды в течение 2 сут в холодной комнате для удаления свободного фосфора.

Для количественного определения фосфора в растворе ЛПС до и после обработки ЩФ СтАР использовали универсальный молибдатный реагент (Vaskovsky et.al, 1975), для которого готовили рабочий раствор: к 5,5 мл исходного реактива добавляли 26 мл 1 Н серной кислоты и доводили объем дистиллированной водой до 100 мл. Реактив устойчив при хранении в склянке из темного стекла при комнатной температуре одну неделю. Аликвоту раствора ЛПС отбирали в пробирку и упаривали досуха в термошкафу при 100 °С. К сухому остатку добавляли 0,05 мл 72 % (или 0,07 % мл 57 %) хлорной кислоты и сжигали в дюралевом блоке при 180-200 °С в течение 20 мин. После охлаждения в пробирки добавляли 0,45 мл рабочего реагента. Смесь в пробирке тщательно перемешивали с помощью вортекса, пробирки помещали в кипящую водяную баню на 15 мин. После образования фосфорномолибденовой сини пробирки охлаждали и измеряли оптическую

плотность образцов в кварцевой кювете ($l = 1$ см) при 815 нм на спектрофотометре Specol (Carl Zeiss, Германия). Для каждой пробы делали по 3 параллельных измерения. Для каждого измерения использовали контрольную пробу (буфер без ЛПС с той же концентрацией фермента *SmAP*), поглощение которой не превышало 0,04-0,05 единиц оптической плотности.

Калибровочную кривую для определения фосфора в образцах ЛПС строили по однозамещенному фосфату натрия ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$) (AppliChem, Германия), растворенному в воде (стоковый раствор - 7,8 мг в 250 мл) в интервале концентраций 0,03 - 0,3 мкг/мл.

4.19. Определение цитотоксической активности рекомбинантной щелочной фосфатазы *SmAP*

Для определения цитотоксической активности ЩФ *SmAP* использовали стандартный MTS-метод (Barltrop et al, 1991). Метод основан на способности живых клеток перерабатывать MTS-реагент (5-(3-карбоксиметоксифенил)–2-(4,5-диметилтиазолил)-3-(4-сульфофенил) тетразолий, внутренняя соль (желтая окраска, $\lambda_{\text{max}} = 382$ нм) в формазан (красная окраска, $\lambda_{\text{max}} = 492$ нм). Количество образующегося формазана, которое затем определяется спектрофотометрически, находится в прямой зависимости от количества живых клеток.

Клетки высевали в 96-луночный планшет и инкубировали в течение ночи в соответствующей клеточной среде в объёме 100 мкл/лунку (6×10^3 клеток/лунку). Далее клеточную среду заменяли на свежую (100 мкл), содержащую 5 мкл буфера (0,25 М Трис-НСl, pH 8,5) с различным количеством единиц активности (2,3 ед, 1,15 ед, 0,15 ед, 0,023 ед, 0,0046 ед) рекомбинантной ЩФ *SmAP* (0,7 мг/мл (0,25 М Трис-НСl, pH 8,5), у.а. 2300 ед/мг), после чего клетки инкубировали в течение 24 и/или 48 ч. В контрольные лунки добавляли 5 мкл того же буфера без фермента (0,25 М Трис-НСl, pH 8,5). Затем 20 мкл раствора MTS-реагента добавляли в каждую лунку и инкубировали в течение 2 ч. Степень трансформации MTS-реагента в

формазази измеряли спектрофотометрически при $\lambda = 492$ нм и $\lambda = 690$ нм (фон) с помощью спектрофотометра μ Quant BioTek (США). После вычитания фонового поглощения для вычисления количества живых клеток, оставшихся в экспериментальных лунках, использовали выраженное в процентах отношение интенсивности поглощения в экспериментальных лунках к аналогичным показателям в контрольных лунках, где клетки не обрабатывали раствором рекомбинантной ЩФ *SmAP*. Цитотоксическую активность представляли, как количество единиц активности ЩФ на 6×10^3 клеток, способную ингибировать 50% жизнеспособных клеток (half-maximal inhibition concentration, IC_{50}).

4.20. Определение лиганд-связывающей активности рекомбинантного лектина *SmAP/CGL*

Лектинную активность рекомбинантного гибридного лектина *SmAP/CGL* определяли по способности связываться со специфическим лигандом с использованием твердофазного лектин-ферментного анализа (ТЛФА), разработанным в Лаборатории химии неинфекционного иммунитета (ТИБОХ ДВО РАН). Для сенсбилизации лунок планшета (Nunc™ Maxisorp, Thermo Scientific, США) в качестве лиганда использовали муцин желудка свиньи (PSM), предоставленный Лабораторией химии неинфекционного иммунитета, (ТИБОХ ДВО РАН), в концентрации 20 мкг/мл, растворенный в буфере 1 (TBS - 0,01 М Трис-НСl (рН 9,0), 0,15 М NaCl). В каждую лунку планшета вносили по 150 мкл раствора и инкубировали в течение 12 часов при +4 °С. Для количественной оценки углевод-связывающей активности гибридного белка раствор лиганда вносили во все лунки. После инкубации проводили серийную отмывку планшета дистиллированной водой, затем буфером 2 (TBS Triton X 100 - 0,01 М Трис-НСl (рН 9,0), 0,15 М NaCl, 0,05% тритон X-100). Для предотвращения неспецифического связывания гибридного лектина с сорбирующей поверхностью лунок планшета проводили блокировку неспецифических центров связывания с помощью БСА. Для этого раствор

БСА в концентрации 1 мг/мл вносили по 300 мкл в каждую лунку планшета и инкубировали 1 ч при 37 °С. После инкубации проводили еще одну серию отмывок, как описано выше. Далее в первый вертикальный ряд лунок планшета вносили по 300 мкл образца рекомбинантного гибридного белка *SmAP/CGL* с концентрацией 0,2 мкг/мл в буфере TBS Triton X 100 (буфер 2). В остальные лунки вносили гибридный лектин *SmAP/CGL* в серии двукратных разведений в том же буфере 2. В качестве контроля в последние лунки планшета вносили буферный раствор. После этого планшет с образцами инкубировали при комнатной температуре в течение 90 мин, затем следовала серия отмывки планшета от несвязавшихся белков буфером 2. Далее в лунки помещали по 150 мкл буфера, содержащего 1 М ДЭА (рН 10,3) и 15 мМ *n*-НФФ. Планшет инкубировали 30 мин при комнатной температуре. Реакцию останавливали добавлением 100 мкл 1 М NaOH.

Визуализацию образовавшихся комплексов «лектин-лиганд» осуществляли по развитию окраски в результате расщепления *n*-НФФ до паранитрофенола (*n*-НФ) щелочной фосфатазой *SmAP*, входящей в состав гибридного бифункционального лектина *SmAP/CGL*. Измерение концентрации образовавшихся лектин-лигандных комплексов проводили спектрофотометрически при $D_{\lambda}=400$ нм по активности *SmAP*.

4.21. Определение специфичности рекомбинантного лектина *SmAP/CGL* в отношении онкомаркеров

Специфичность рекомбинантного лектина *SmAP/CGL* в отношении онкомаркеров ПСА (простат-специфический антиген), РЭА (раковый эмбриональный антиген), АФП (альфа-фетопротеин), СА-125 (онкомаркер рака яичников), СА 19-9 (онкомаркер рака поджелудочной железы), СА 72-4 (неспецифический онкомаркер карциномы) (Хема, Москва), определяли методом ТЛФА. На полистирольный 96-луночный микропланшет высокой сорбции (Greiner Bio-One, Австрия) адсорбировали по 100 мкл онкомаркеров ПСА, РЭА, АФП, СА-125, СА 19-9, СА 72-4 (Хема, Москва) в трех повторах и

инкубировали в течение 16 ч при 4 °С. Отмывку несвязавшихся молекул онкомаркеров проводили промывочным буфером 1, содержащим 0,1 М Трис-НСl (рН 9,0), 0,15 М NaCl, 0,05 % Тритон X-100 (10 раз по 300 мкл), затем отмывочным буфером 2 (0,1 М Трис-НСl, рН 9,0, 0,15 М KCl). Для блокировки свободных мест связывания в лунки вносили по 100 мкл 1% раствора БСА и инкубировали в течение ночи при 4 °С. После 10-ти кратной отмывки БСА промывочным буфером 1 и затем буфером 2 (без Тритона X-100) в лунки вносили по 100 мкл раствора рекомбинантного гибридного лектина *StAR/CGL* с активностью ЩФ и инкубировали в течение ночи при 4 °С. Несвязавшийся рекомбинантный лектин *StAR/CGL* удаляли отмывочным буфером 10 раз по 300 мкл, потом буфером 2. Взаимодействие рекомбинантного лектина с онкомаркерами оценивали по активности ЩФ. Для этого в лунки микропланшета добавляли по 100 мкл буфера, содержащего 0,1 М Трис-НСl (рН 9,0), 0,15 М KCl и 2 мМ *n*-НФФ. После 30 мин инкубации при 37 °С реакцию останавливали добавлением 200 мкл 2 М NaOH. Количество образовавшегося в процессе ферментативной реакции *n*-НФ определяли на спектрофотометре (Eppendorf, Germany) при длине волны 400 нм.

4.22. Проведение реакции гемагглютинации с рекомбинантным лектином *StAR/CGL*

Для реакции гемагглютинации использовали кровь второй положительной группы, осаждали эритроциты при 1500 об/мин. Отмывали буферным раствором TBS 3-5 раз. Получали 2-% суспензию эритроцитов.

Реакцию проводили в круглодонном 96-луночном планшете. В первые лунки наносили по 200 мкл образца рекомбинантного лектина, со второго ряда в каждую лунку - буфер TBS по 100 мкл во все лунки, кроме последних (контроль - без образца), после чего титровали. Далее добавляли во все лунки полученную суспензию эритроцитов по 50 мкл и инкубировали. Через 30 мин визуально оценивали результат, принимая за титр гемагглютинации последнее разведение образца, при котором наблюдалась агглютинация.

4.23. Определение лиганд-связывающей активности рекомбинантного порина *StAR/OmpF*

Антигенные свойства порина в составе гибридного белка *StAR/OmpF* определяли методом ИФА по эффективности взаимодействия со специфическими антителами к рекомбинантному *OmpF*-порину, полученными ранее в Лаборатории молекулярных основ антибактериального иммунитета ТИБОХ ДВО РАН (Портнягина и др., 2009). Проведение ИФА осуществляли в двух вариантах, которые отличались сенситинами, наносимыми на микропланшет (Costar, США). Первый вариант: лунки микропланшета сенсibilizировали мышшиной поликлональной специфической сывороткой к рекомбинантному *OmpF*-порину или пуловой сывороткой крови больных псевдотуберкулезом в разведении 1/800. Сенсibilizированные планшеты выдерживали в течение ночи при 4 °С, планшет отмывали от несвязавшихся антител и затем добавляли различные количества рекомбинантного белка *StAR/OmpF*, растворенного в буфере 25 мМ Трис-НСl, рН 8,5 (0,625-10 мкг/100 мкл). Инкубацию проводили в течение ночи при 4 °С и затем добавляли раствор *n*-НФФ (2 мМ) в буфере, содержащем 0,1 М Трис-НСl, 0,2 М КСl, рН 10,0, для определения активности ЩФ. Результаты реакции учитывали на спектрофотометре μ Quant BioTek (США) при длине волны 405 нм. Второй вариант: лунки микропланшета сенсibilizировали гибридным белком *StAR/OmpF* в количестве 5 мкг/100 мкл, выдерживали в течение ночи при 4 °С, планшет отмывали от несвязавшегося антигена и добавляли мышшиные поликлональные специфические антитела к рекомбинантному *OmpF*-порину или сыворотки крови больных псевдотуберкулезом в серии двойных разведений. Инкубацию проводили в течение ночи при 4 °С и затем добавляли раствор субстрата для определения фосфатазной активности (2 мМ *n*-НФФ, 0,1 М Трис-НСl, 0,2 М КСl, рН 10,0). Результаты реакции учитывали на спектрофотометре μ Quant BioTek (США) при длине волны 405 нм.

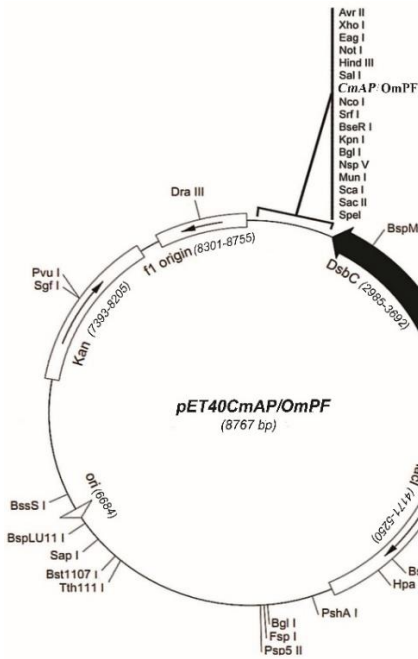
5. Результаты и обсуждение

5.1. Получение гибридных белков *StAR/CGL* и *StAR/OmpF* с активностью щелочной фосфатазы морской бактерии *StAR*

Структура и свойства галактозосвязывающего лектина CGL (ГенБанк ID: JQ314213) из морской мидии *S. grayanus*, порина OmpF (ГенБанк ID: AY855840) из патогенной бактерии *Y. pseudotuberculosis* (OmpF) и щелочной фосфатазы StAR (ГенБанк ID: ABD92772) из морской бактерии *S. amphilecti* KMM 296 (ВКМ В-2021 Д) были установлены ранее (Портнягина и др., 2000; Kovalchuk et al., 2013; Golotin et. al., 2015). Кроме того, описаны методы получения рекомбинантных аналогов высокоактивной ЩФ StAR (Пат. 2447151; Golotin et. al., 2015), порина OmpF (Хоменко и др., 2008), лектина CGL (Kovalchuk et al., 2013) и гибридного бифункционального маннан-связывающего лектина MBL-AJ из дальневосточной голотурии *Apostichopus japonicus* с активностью ЩФ StAR (Balabanova et al., 2014).

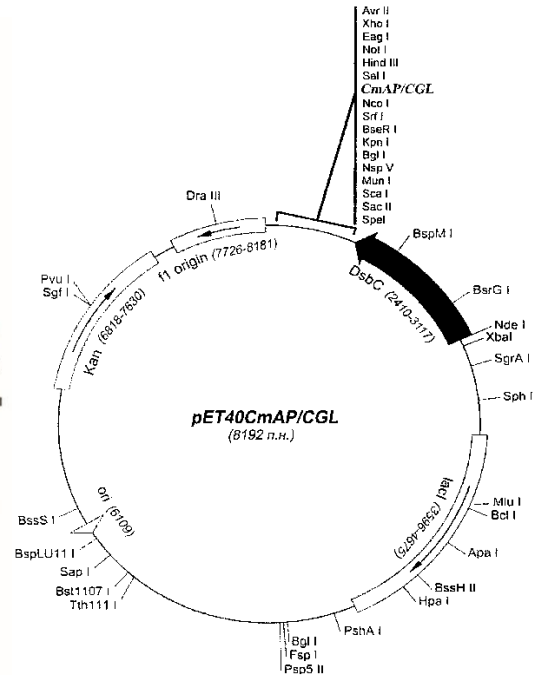
В данной работе в результате разработки генно-инженерных конструкций были получены плазмидные ДНК pET40*StAR/OmpF* и pET40*StAR/CGL*, кодирующие гибридные полипептиды *StAR/OmpF* и *StAR/CGL* соответственно. Полученная плазида pET40*StAR/OmpF* имеет 8767 пар оснований (п.о.) и характеризуется наличием рекомбинантной ДНК размером 2577 п.о., определяющей синтез гибридного белка *StAR/OmpF*, у которого полноразмерные последовательности ЩФ StAR и порина OmpF соединены между собой гибким линкером (Gly₄Ser)₃ (Рисунок 10 А).

А



Фиг. 1

Б



Фиг. 1

С



Рисунок 10. Схема рекомбинантных плазмид (А) pET40CmAP/OmpF и (Б) CmAP/CGL. Плазмиду pET40CmAP, имеющую полилинкер со встроенным геном щелочной фосфатазы CmAP по сайтам рестрикции NcoI и SalI (выделено красным), использовали для встраивания следом генов лиганд-связывающих белков по сайтам рестрикции SalI и SacI и получения конструкций pET40CmAP/OmpF и pET40CmAP/CGL (С): специфические праймеры на плазмиду (#69945-3 и #69337-3) для скрининга рекомбинантных колоний указаны черными стрелочками; область кодирования шаперона DsbC и сайта узнавания для энтеропептидазы (Asp₄Lys) находится выше

полилинкера и подчеркнута жирной линией; гис-таг (His-tag) закодирован выше сайта энтерокиназы для использования в афинной хроматографии с металлосвязывающим сорбентом (Ni-агароза); стоп-кодон (Stop) для рекомбинантного белка вводили через обратный геноспецифичный праймер; Rbs – участок связывания с рибосомой.

Плазмида pET40*SmAP/CGL* имеет 8192 п.о. и характеризуется наличием рекомбинантной ДНК размером 2028 п.о., определяющей синтез гибридного белка *SmAP/CGL*, у которого последовательности ЩФ *SmAP* и лектина *CGL* также соединены между собой линкером (Gly₄Ser)₃ (Рисунок 10 Б). Выбор линкера (Gly₄Ser)₃ обусловлен его гибкостью и подвижностью, что способствует независимому расположению белковых доменов в пространстве и сохранению их природной функции, как было показано для гибридного белка MBL-AJ со щелочной фосфатазой *SmAP* в его составе (Balabanova et al., 2014).

Скрининг фосфатазной активности и общего белка в культуральных жидкостях рекомбинантных колоний *E. coli* Rosetta (DE3)/pET40*SmAP/OmpF* и *E. coli* Rosetta (DE3)/pET40*SmAP/CGL*, которые были получены в результате трансформации соответствующими плазмидами (Рисунок 10, 11), позволил на первом этапе идентифицировать наиболее продуктивные микробиальные продуценты гибридных рекомбинантных белков *SmAP/OmpF* и *SmAP/CGL*.

На рисунке 11 для примера приведены ПЦР колоний штамма *E. coli* Rosetta (DE3), трансформированных плазмидой pET40*SmAP/CGL*.

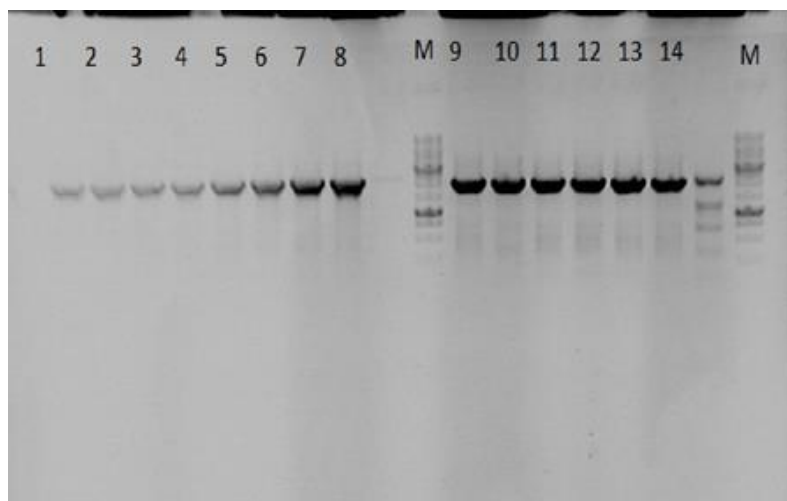


Рисунок 11. Электрофореграмма ПЦР-продуктов, полученных с использованием в качестве ДНК-матрицы отдельных колоний *E. coli* Rosetta (DE3), трансформированных плазмидой pET40*SmAP*/CGL, и плазмид-специфичных праймеров для pET-40b(+), (#69945-3; #69337-3): М – маркер длины ДНК-фрагментов (BioRad, США); 1-8 и 9-14 – ПЦР-фрагменты ДНК рекомбинантных колоний *E. coli* Rosetta (DE3)/pET40*SmAP*/CGL, выросших на селективной среде с канамицином (25 мкг/мл). ПЦР-фрагменты имеют длину около 2300 пар нуклеотидов (п.н.), что соответствует суммарной длине слитых кодирующих последовательностей *SmAP* (1500 п.н.), лектина CGL (500 п.н.) и части плазмидного полилинкера (около 300 п.н.).

Полученные рекомбинантные штаммы *E. coli* Rosetta (DE3)/pET40*SmAP*/CGL и (DE3)/pET40*SmAP*/OmpF показали высокий уровень ИПТГ-индуцируемого синтеза растворимых и стабильных рекомбинантных белков *SmAP*/CGL и *SmAP*/OmpF с высокой относительной ферментативной активностью ЩФ (Таблица 3). Как видно из данных таблицы, все рекомбинантные клоны обладают фосфатазной активностью. Наиболее активные клоны 2, 3 и 5 использовали для получения рекомбинантного белка *SmAP*/CGL.

Таблица 3. Скрининг активности щелочной фосфатазы *CmAP* у рекомбинантных колоний *E. coli* Rosetta (DE3)/pET40*CmAP*/CGL

Номер колонии	Относительная активность ЩФ (ОП _{400нм})
Контроль*	0,022
1	0,297
2	0,538
3	0,678
4	0,477
5	0,485
6	0,343
7	0,354
8	0,225

* – для измерения активности ЩФ использовали лизат клеток *E. coli* Rosetta (DE3) без плазмиды pET40*CmAP*/CGL.

Данные ДСН-ПААГ-электрофореза показали, что рекомбинантные белки *CmAP*/OmpF и *CmAP*/CGL содержат в своем составе плазмидный шаперон DsbC (32,5 кДа) и имеют молекулярную массу 127,5 и 104,5 кДа соответственно. Полученные гибридные белки имели широкий диапазон значений температуры (25-37 °С) и рН (7,5-9,5) в проявлении активности ЩФ (Рисунок 12). Удельная активность ЩФ препаратов гибридных рекомбинантных белков *CmAP*/CGL и *CmAP*/OmpF, используемых в дальнейших исследованиях, составляла 1000-1500 ед/мг в зависимости от степени очистки. Известно, что плазмидный шаперон DsbC (Рисунок 10) способствует правильному фолдингу рекомбинантного белка и не вносит существенного вклада в функциональность рекомбинантных одиночных и гибридных белков (Balabanova et al., 2014; Golotin et al., 2015). Кроме того, отщепление DsbC может привести к выпадению гибридных белков в осадок

при хранении, поэтому этап обработки рекомбинантных белков *St*AP/CGL и *St*AP/OmpF энтеропептидазой L-NEP может быть необязательным для упрощения схемы их выделения и очистки (Рисунок 12).

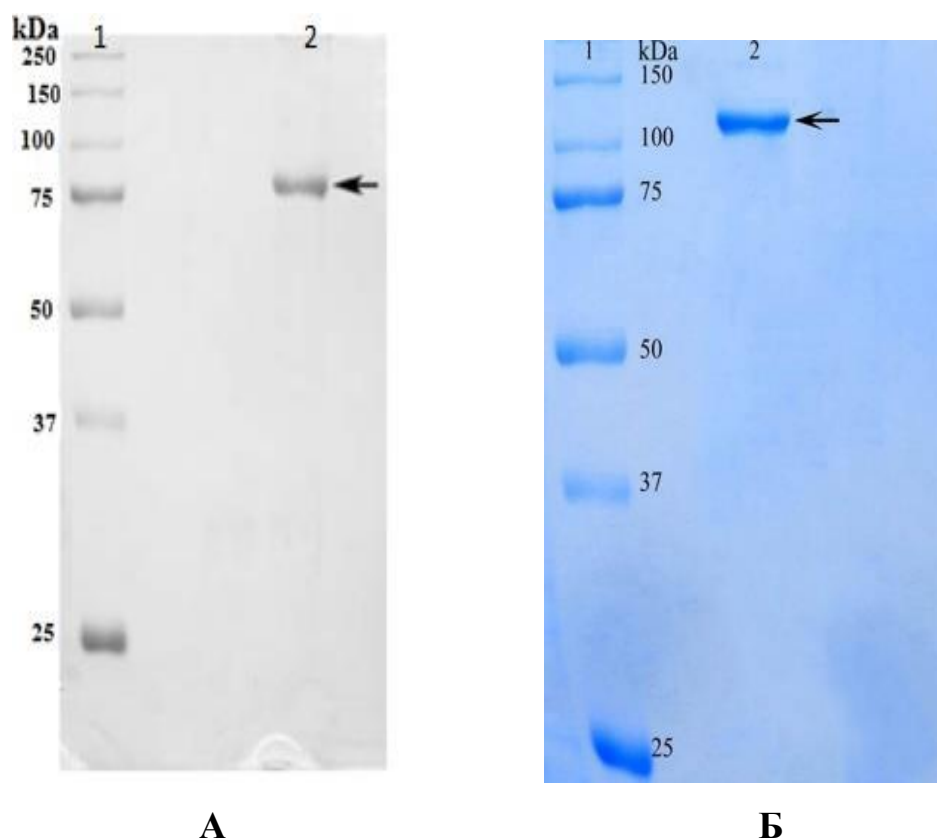


Рисунок 12. Электрофореграмма очищенных рекомбинантных гибридных белков *St*AP/CGL и *St*AP/OmpF: А) маркер молекулярной массы белков фирмы Биорад (дорожка 1 слева); гомогенный белок *St*AP/CGL – окрашенная полоса (дорожка 2 справа), приблизительно соответствующая расчетной массе 75 кДа гибридного белка (55 кДа - *St*AP; 17 кДа – CGL; ≥ 2 кДа – межсубъединичный пептид $(\text{Gly}_4\text{Ser})_3$ и фланкирующие а.о. плазмидного полиникера); Б) маркер молекулярной массы белков фирмы Биорад (дорожка 1 слева); гомогенный белок *St*AP/OmpF – окрашенная полоса (дорожка 2 справа), приблизительно соответствующая расчетной массе 127,5 кДа гибридного белка (55 кДа – *St*AP; 40 кДа – OmpF; 32,5 кДа – плазмидный шаперон DsbC).

Таким образом, в результате гетерологической экспрессии получены растворимые недеградируемые рекомбинантные гибридные белки *StAR/CGL* и *StAR/OmpF*, обладающие ферментативной активностью ЩФ *StAR*.

5.2. Оптимизация схемы очистки рекомбинантной щелочной фосфатазы морской бактерии *StAR* и ее гибридных бифункциональных аналогов

Ранее в результате многостадийной очистки рекомбинантного белка *StAR* получали гомогенные препараты с выходом 1 мг белка из 1 литра культуры клеток рекомбинантного штамма *E. coli* (Balabanova et al., 2014; Golotin et al., 2015). Удельная активность ЩФ такого препарата составляла до 12700 ед/мг белка, определенная в диэтанолминовом буфере (1 М ДЭА, pH 10,3), что приблизительно соответствует 3500 ед/мг белка в Трис-НСl буфере (0,25 М, pH 9,5-10,0) (Nasu et al., 2012; Golotin et al., 2015). В данной работе оптимизацию схемы выделения рекомбинантных белков проводили на негибридной рекомбинантной ЩФ морской бактерии *StAR* (Таблица 4-6).

Таблица 4. Выделение и очистка рекомбинантного белка *StAR* по схеме №1

Стадия выделения	Общий белок, мг	Удельная активность, ед/мг	Выход, %
Клеточный лизат	245	41	100
DEAE-52 cellulose	47,5	284	73
Ni-NTA agarose	5	1670	58
L-HEP	5	1650	57
Sephacryl S-100 HR	2	3800	34

Таблица 5. Выделение и очистка рекомбинантного белка *СmAP* по схеме №2

Стадия выделения	Общий белок, мг	Удельная активность, ед/мг	Выход, %
Клеточный лизат	1481	187	100
Ni-Sepharose HP	832	262	78
Source 15Q	151	727	40
L-HEP	12	3653	17
Superdex 200 GE	4,3	4935	8

Таблица 6. Выделение и очистка рекомбинантного белка *СmAP* по схеме №3

Стадия выделения	Общий белок, мг	Удельная активность, ед/мг	Выход, %
Клеточный лизат	290	559	100
Сульфат аммония	111	657	38
Ni-Sepharose HP	75	1764	26
Диализ	37	1760	13
L-HEP	37	3512	13
Source 15Q	18	7116	6

В схеме №3 (Таблица 6) каждый этап разделения белков, диализ и обработка энтеропептидазой полуочищенного препарата проводили в присутствии 20-50 % высокоочищенного глицерина (Sigma-Aldrich), что позволило избежать агрегации и денатурации термолабильного фермента *СmAP* и сохранить его высокую ферментативную активность ЩФ. Подробно

условия проведения этапов выделения по трем схемам описаны в главе «Материалы и методы».

В результате очистки рекомбинантного белка *СmAP* по схеме №3 с использованием глицерина (Таблица 6) из одного литра культуры клеток удалось получить 18 мг препарата гомогенного белка (Рисунок 13, Таблица 6) с у.а. 7116 ед/мг в буфере 0,20 М TrisHCl, pH 9,5 (20000 ед/мг в буфере 1М ДЭА, pH 10,3), что намного превышает значения активности, полученные для этого фермента ранее (Nasu et al., 2012; Golotin et al., 2015).

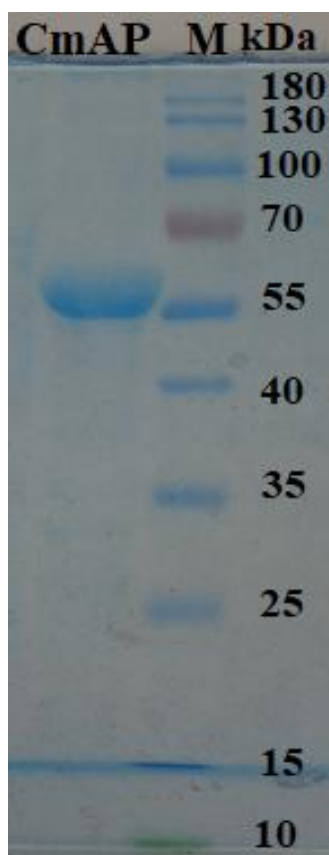


Рисунок 13. Электрофореграмма очищенного препарата рекомбинантного белка *СmAP* (25 mM Трис-НСl, pH 9,0, 30% глицерина) после этапа удаления плазмидного шаперонного белка *DsbC* (схема очистки №3): полоса на дорожке слева соответствует зрелому белку *СmAP* (55 кДа); М – маркер молекулярной массы белков (Thermo Fisher Scientific, США).

Несмотря на то, что у.а. щелочной фосфатазы *StAR* в гибридных белках *StAR/CGL* и *StAR/OmpF* на каждом этапе очистки была в 1,5-2 раза ниже, чем у негибридного рекомбинантного белка *StAR* за счет увеличения общей массы белка на единицу активности фермента и соответственно склонности к агрегации, результаты применения схем № 1-3 для их выделения были сопоставимыми с результатами, представленными в таблице 4-6. Несмотря на более низкую активность ЩФ у гибридных лиганд-связывающих белков, степень их растворимости и бифункциональной активности увеличивалась в присутствии плазмидного шаперона DsbC (Рисунок 10, 12), поэтому этап удаления шаперона в некоторых случаях был нецелесообразен, например, при длительном хранении гибридных белков при низких температурах. Кроме того, применение глицерина высокой степени очистки на каждом этапе выделения рекомбинантных аналогов ЩФ *StAR* по схеме №3 не представляется возможным при масштабировании процесса получения гомогенного препарата из-за его дороговизны и отсутствия на данный момент импортозамещенного аналога этого реактива.

Таким образом, рекомбинантный аналог ЩФ *StAR*, полученный путем экспрессии генно-инженерной конструкции на основе плазмиды pET-40b(+), может служить моделью для разработки и масштабирования методов получения и очистки рекомбинантных гибридных белков *StAR/CGL* и *StAR/OmpF*.

5.3. Дефосфорилирующая активность рекомбинантной щелочной фосфатазы *StAR* в отношении ЛПС *E. coli*

В качестве субстрата для ЩФ *StAR* в рамках диссертационной работы были изучены фосфорсодержащие соединения – хемотипы липополисахаридов *E. coli*: ЛПС 055:B5 (S-ЛПС) и ЛПС EH100 (Ra –мутант).

ЛПС является основным компонентом наружной мембраны грамотрицательных бактерий, занимая около 70% ее поверхности. Полная структура амфифильной молекулы ЛПС (S-форма), характерная для

большинства встречающихся в природе диких штаммов бактерий, состоит из трех частей: гидрофобного липида А, олигосахарида кора и О-полисахаридной цепи. О-полисахарид присоединяется к олигосахариду кора, который, в свою очередь, связан с липидным компонентом - липидом А. Липид А большинства изученных бактерий представляет собой дифосфорилированный β -1,6-связанный дисахарид глюкозамина (диаминогенциобиоза), несущий остатки высших жирных кислот. Помимо S-формы ЛПС, бактерии синтезируют и кор-дефектные молекулы ЛПС (R-хемотипы), имеющие в своем составе липид А и коровую часть разной длины. Кор-дефектные структуры обозначаются как Rb - Re-хемотипы, а структуры, имеющие полный внешний кор, как Ra-хемотип (Freudenberg et al., 2008).

В мицеллах ЛПС, образующихся в водных растворах, липид А расположен внутри мицелл, а О-полисахарид, построенный в большинстве случаев из гидрофильных моносахаридных остатков, как и в бактериальных клетках, направлен в сторону водной фазы. Поэтому растворимость ЛПС зависит от длины О-полисахарида.

Так, для S-ЛПС в 0,1 М Трис-НСl буфере, рН 7,7, показано, что количество определяемого фосфора в контрольном образце увеличивалось в 6 раз при уменьшении концентрации ЛПС с 1 до 0,2 мг/мл, повышении температуры инкубации до 37 °С (образец № 2), а также при добавлении триэтиламина и защелачивании среды до рН 10,0 (образец № 3), в сравнении с ЛПС- образцом № 1, (инкубация при 24 °С и без добавления триэтиламина ТЭА) (Рисунок 14). Максимальное содержание фосфора было определено в образце ЛПС № 3.

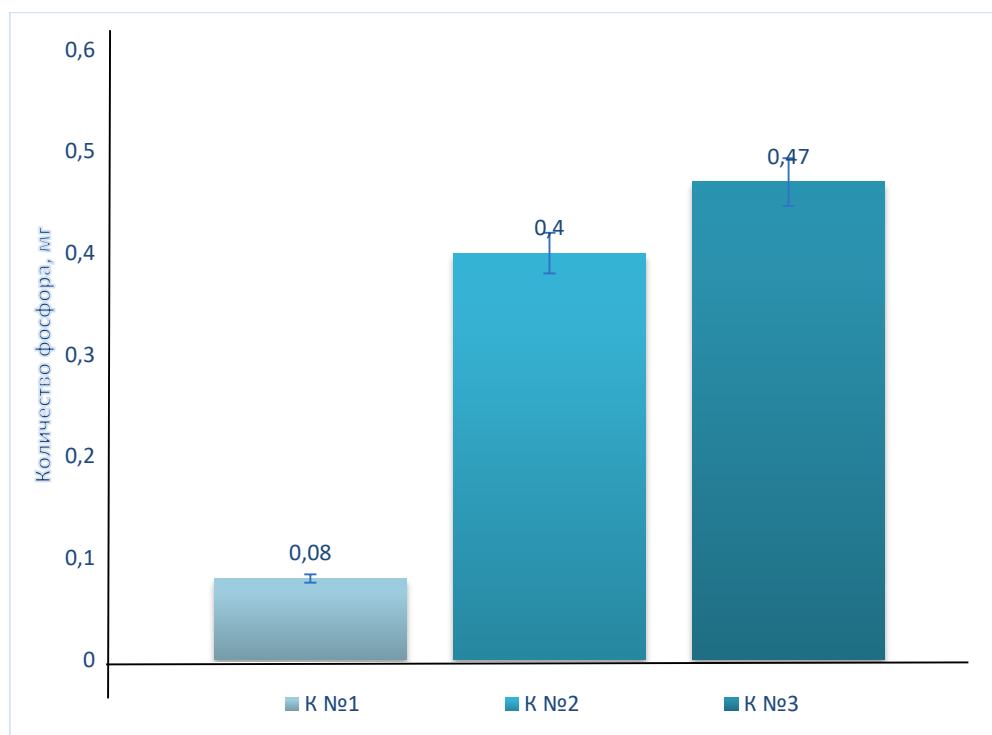


Рисунок 14. Зависимость определяемого количества фосфора в контрольных образцах S-ЛПС (№1-3) от условий их растворения: К №1 - инкубация S-ЛПС в 0,1 М Трис-НСl буфере, рН 7,7, при 24 °С в течение 12 ч; К №2 - инкубация S-ЛПС в 0,1 М Трис-НСl буфере, рН 7,7, при 37 °С в течение 12 ч; К №3 - инкубация S-ЛПС 0,1 М Трис-НСl буфере, рН 7,7, с добавлением триэтиламина (ТЭА) до рН 10,0 при 24 °С в течение 12 ч.

Как следствие, максимальную дефосфорирующую активность рекомбинантный фермент *СтАР* проявил в отношении ЛПС-образца № 3, для которого количество гидролизованного фосфора составило 89% от контрольного образца (не обработанного *СтАР*) (Рисунок 15). Оптимальное время реакции при 37 °С составило не менее 30 мин при оптимальной концентрации *СтАР* 0,0003 - 0,024 мг/мл.

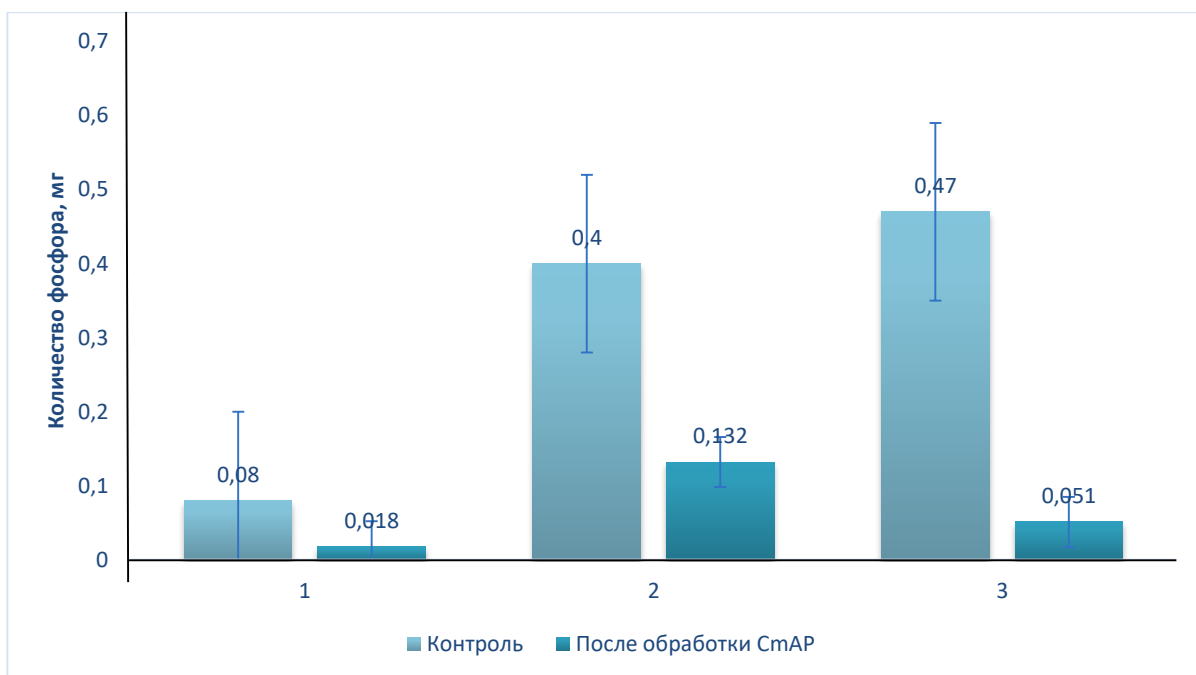


Рисунок 15. Количество фосфора (в мкг) в образцах S-ЛПС (№ 1-3) до (столбцы слева) и после (столбцы справа) обработки рекомбинантной ЩФ *StAR* (0,3 мг/мл, у.а. 2300 ед/мг) при проведении ферментативной реакции в течение 30 минут при 37 °С и различной пробоподготовке ЛПС: № 1 - инкубация S-ЛПС в 0,1 М Трис-НСl буфере, рН 7,7, при 24 °С в течение 12 ч; 2 - инкубация S-ЛПС в 0,1 М Трис-НСl буфере, рН 7,7, при 37 °С в течение 12 ч; 3 - инкубация S-ЛПС в 0,1 М Трис-НСl буфере, рН 7,7, с добавлением триэтиламина (ТЭА) до рН 10,0 при 24 °С в течение 12 ч.

Для Ра-хемотипа ЛПС были подобраны (по количеству определяемого фосфора) следующие оптимальные условия растворения: 0,2 мг/мл в 1 М ДЭА-буфере, рН 10,3, 37 °С, 12 ч (Рисунок 16). Однако максимальная активность фермента для этого образца была ниже, чем для S-ЛПС, и составляла 70% от контрольного образца (не обработанного фосфатазой *StAR*) даже после увеличения времени проведения реакции до 12 ч (Рисунок 17).

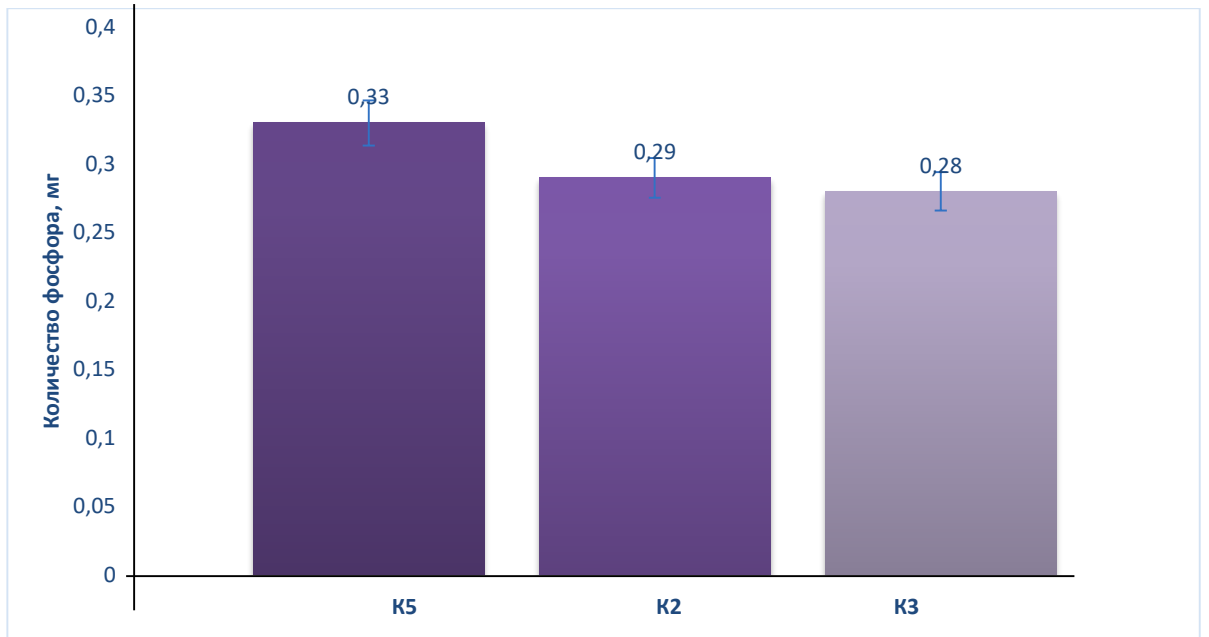


Рисунок. 16. Зависимость определяемого количества фосфора в контрольных образцах Ra-ЛПС (№ 2, 3 и 5) от условий их растворения: K5 - Ra-ЛПС *E. coli* 0,2 мг/мл растворяли в 1 М ДЭА буфере, рН 10,3, при 24 °С в течение 12 ч; K2 - Ra-ЛПС *E. coli* 0,2 мг/мл растворяли в 1 М ДЭА буфере, рН 10,3, при 37 °С в течение 12 ч; K3 - Ra-ЛПС *E. coli* 0,2 мг/мл растворяли в 0,1 М Трис-НСl буфере, рН 7,7, рН 10,3, с добавлением триэтиламина (ТЭА) до рН 10,0, при 24 °С в течение 12 ч.

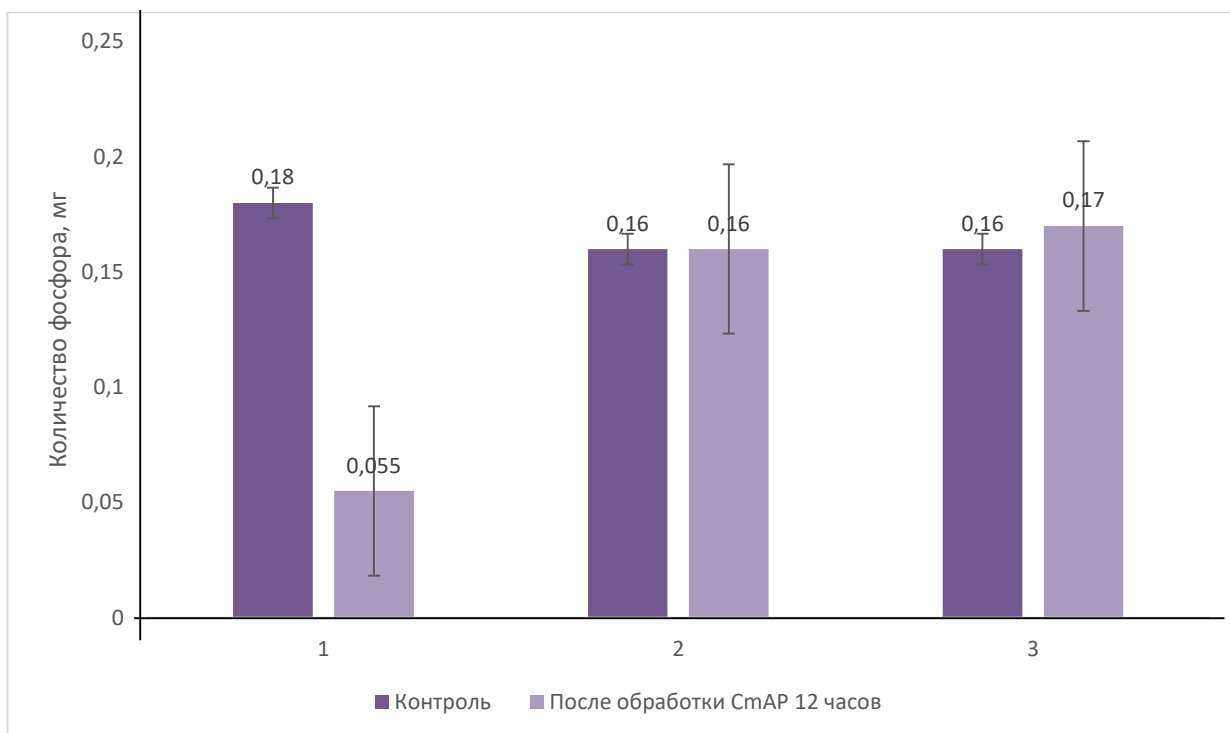


Рисунок 17. Количество фосфора (в мкг) в образцах Ра-мутанта (№ 2, 3 и 5) до (столбцы слева) и после (столбцы справа) обработки щелочной фосфатазой *StAR* (0,3 мг/мл, у.а. 2300 ед/мг) при проведении ферментативной реакции в течение 12 ч, 37 °С и различной пробоподготовке ЛПС: 1 - К5 - Ра-ЛПС *E. coli* 0,2 мг/мл растворяли в 1 М ДЭА буфере, рН 10,3, при 24 °С в течение 12 ч; 2 - К2 - Ра-ЛПС *E. coli* 0,2 мг/мл растворяли в 1 М ДЭА буфере, рН 10,3, при 37 °С в течение 12 ч; 3 - К3 - Ра-ЛПС *E. coli* 0,2 мг/мл растворяли в 0,1 М Трис-НСl буфере, рН 7,7, с добавлением триэтиламина (ТЭА) до рН 10, при 24 °С в течение 12 ч.

Таким образом, ЩФ морской бактерии *StAR* проявляет ферментативную активность в отношении ЛПС, которая в значительной степени зависит от степени его дезагрегации (доступности фосфатных остатков в молекуле ЛПС) в растворе. Фермент *StAR* способен практически полностью дефосфорилировать ЛПС, если он имеет полную структуру (S-форма) и предварительно растворен в буфере со значением рН не менее 10,0 с последующей инкубацией в течение 12 ч при 37 °С. Вероятно, меньшая эффективность ЩФ *StAR* в отношении гидролиза остатков фосфора Ра-

хемотипа ЛПС (без О-специфических цепей) объясняется большей гидрофобностью и склонностью к агрегации этих молекул в аналогичных условиях инкубации (Рисунок 16, 17).

Специфичность ЩФ морской бактерии *StAR* по отношению к бактериальным ЛПС обнаружена нами впервые. По этому свойству она схожа с эпителиальным кишечным ферментом эукариот, в частности изоферментом человека IAP, который дефосфорилирует ЛПС своей и патогенной микрофлоры кишечника для предотвращения воспаления и персистенции бактерий и эндотоксинов в кровотоке (Bates et al., 2007; Chen et al., 2010; Estaki et al., 2011; Whitehouse et al., 2012; Rentea et al., 2012; Bilski et al., 2017; Singh et al., 2020; Le-Vinh et al., 2022).

Полученные данные о дефосфорилирующей активности *StAR* в отношении ЛПС являются перспективной основой для разработки нового терапевтического подхода для нейтрализации эффектов бактериальных эндотоксинов (болезнь Крона, сепсис, эндотоксический шок) с помощью высокоактивной ЩФ морской бактерии.

5.4. Ингибирующая активность рекомбинантной щелочной фосфатазы *StAR* в отношении раковых клеток

Гомогенный препарат рекомбинантной высокоактивной ЩФ *StAR* был апробирован в предварительном исследовании влияния экзогенной активности ЩФ на деление клеток карциномы молочной железы (T-47D), аденокарциномы молочной железы (MDA-MB-231) и колоректальной аденокарциномы (HT-29). Эксперимент был задуман после ранее полученных результатов по дозозависимому ингибирующему эффекту от обработки рекомбинантной ЩФ *StAR* клеток разных бактериальных патогенов человека (Balabanova et. al., 2017). Аналогично результатам исследования влияния рекомбинантной *StAR* на размножение бактериальных клеток, этот же препарат *StAR* с у.а. 2300 ед/мг подавлял рост клеточной линии MDA-MB-231 на 44,9% после 48 ч инкубации с ферментом со значением эффективной

концентрации полумаксимального ингибирования IC_{50} $2,3 \text{ ед}/6 \times 10^3 \text{ КОЕ}$ (в 100 мкл) (Рисунок 18, Б). Это соответствует $\approx 0,3 \text{ мкг}$ фермента с максимальной активностью $7000 \text{ ед}/\text{мг}$. Таким образом, в пересчете на концентрацию белка значение IC_{50} *СтАР* составляет $3 \text{ мкг}/\text{мл}$.

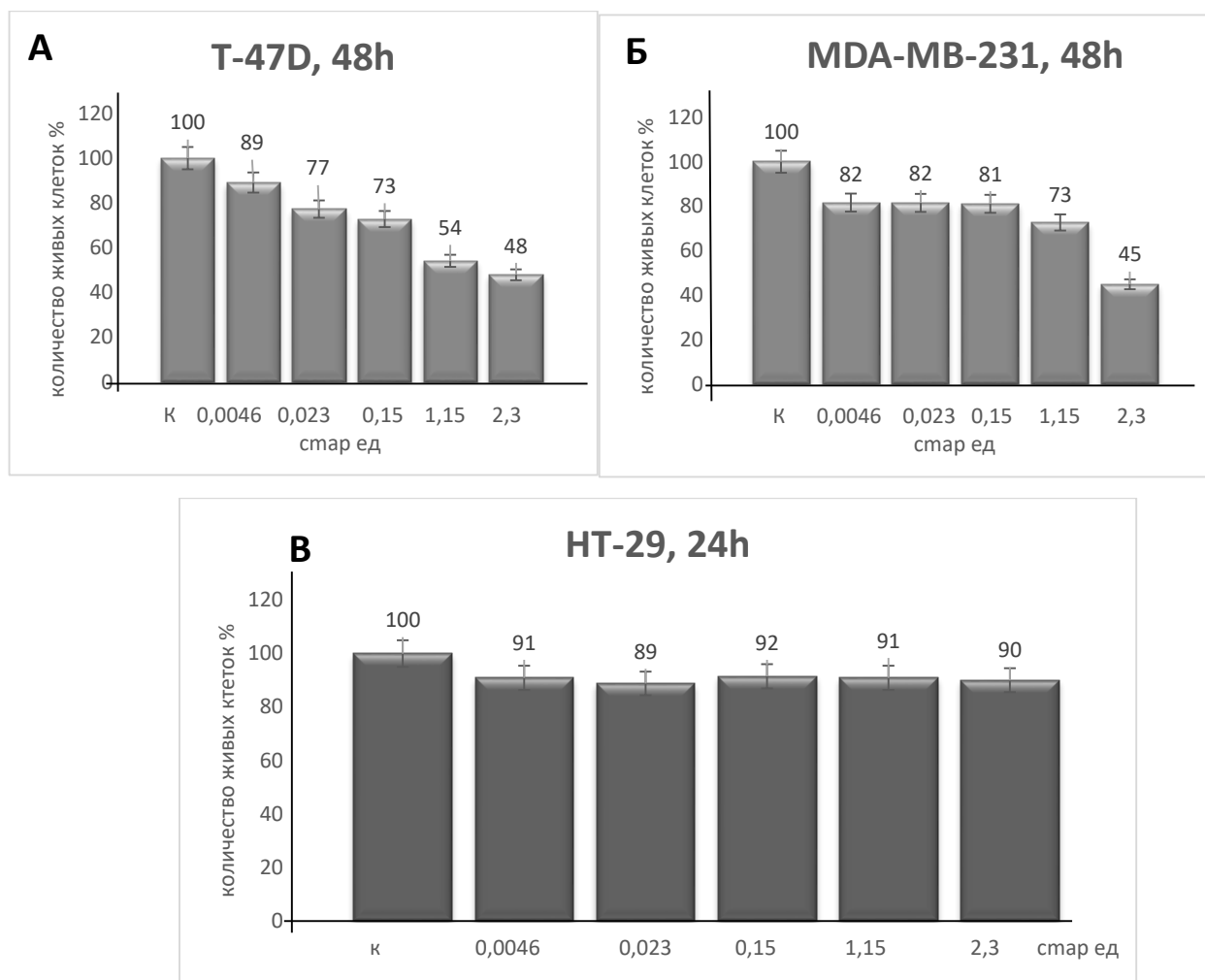


Рисунок 18. Влияние различных концентраций очищенного препарата высокоактивной рекомбинантной щелочной фосфатазы *СтАР* на рост раковых клеточных линий в течение различного времени: А) карцинома молочной железы Т-47D (48 ч); Б) аденокарцинома молочной железы MDA-MB-231 (48 ч); В) колоректальная аденокарцинома HT-29 (24 ч). По оси ОХ – количество живых клеток в лунке (%), по оси У – количество единиц активности фермента *СтАР* (в 5 мкл Трис-НСl, рН 9,0), добавленное в лунку в питательную среду. К – в контрольную лунку в питательную среду с

клетками (6×10^3 КОЕ) вместо фермента добавляли 5 мкл буфера Трис-НСl, рН 9,0.

В целом, максимальный ингибирующий эффект наблюдался при инкубировании со щелочной фосфатазой *StAR* в течение 48 ч обеих линий раковых клеток молочной железы T-47D и MDA-MB-231 при значении IC_{50} 2,0 и 2,3 ед/ 6×10^3 КОЕ (≈ 3 мкг/мл) (Рисунок 18 А, Б). Очевидно, фермент включает какие-то общие молекулярно-генетические механизмы регуляции клеточного деления с участием ЩФ - ключевого фермента метаболизма нуклеиновых кислот, как у бактерий, так и у эукариот (Balabanova et al., 2017). Однако при дальнейшем исследовании механизмов действия ЩФ *StAR* на клетки рака молочной железы человека могут быть обнаружены и новые, пока неустановленные функции ЩФ, сопряженные с процессами фосфорилирования/дефосфорилирования или трансфосфорилирования белковых регуляторов или других внеклеточных (или экстрацеллюлярных) физиологических субстратов ЩФ. Например, известно, что положительная регуляция фосфорилирования киназы А с участием ЩФ повышает активность μ -калпаина – протеолитического кальций-зависимого фермента, участвующего во многих физиологических процессах клетки, включая апоптоз (Du et al., 2018).

5.5. Определение антигенной активности порина в составе рекомбинантного гибридного белка *StAR/OmpF*

Антигенную активность рекомбинантного гибридного порина *StAR/OmpF* с активностью ЩФ *StAR*, очищенного до гомогенного препарата (Рисунок 12 Б), определяли методом ИФА по способности специфического связывания как с антителами, полученными к рекомбинантному *OmpF*-порину от иммунизированных мышей, так и с антителами к возбудителю *Y. pseudotuberculosis* в пуловой сыворотке крови больных псевдотуберкулезом (Новикова и др. 1995; Портнягина и др., 2009).

Специфичность взаимодействия OmpF порина в составе гибридного белка StAP/OmpF была сравнима с таковой для очищенного рекомбинантного порина, что подтверждено результатами ИФА с использованием вторичных антител к иммуноглобулинам мыши, меченных пероксидазой.

Как видно из данных рисунка 19, гибридный белок StAP/OmpF проявлял одновременно фосфатазную и антигенную активность порина при связывании с иммобилизованными на планшете мышинными антителами к порину OmpF и антителами в пуловой сыворотке крови больных псевдотуберкулезом (первый вариант ИФА). Рост активности ЩФ находился в линейной зависимости от увеличения концентрации в инкубационной среде гибридного бифункционального белка StAP/OmpF, специфически взаимодействующего с антителами к рекомбинантному порину и антителами к *Y. pseudotuberculosis*, присутствующими в пуловой сыворотке крови больных псевдотуберкулезом (Рисунок 19).

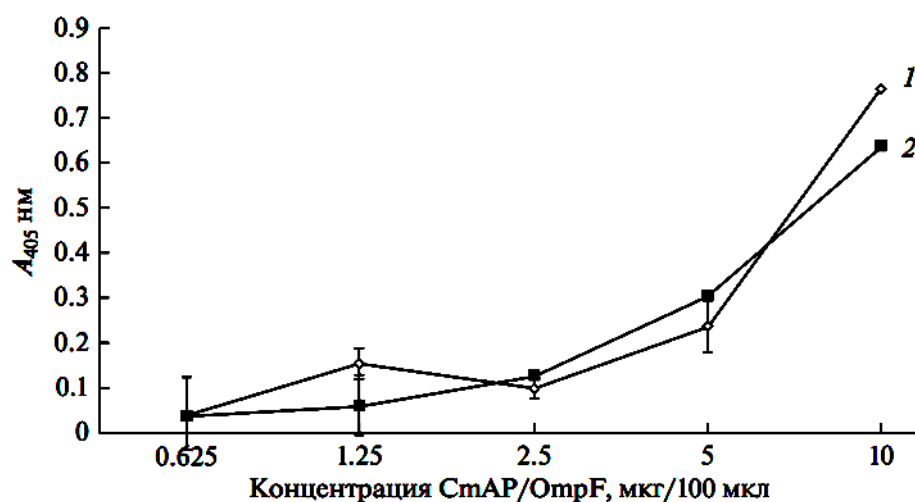


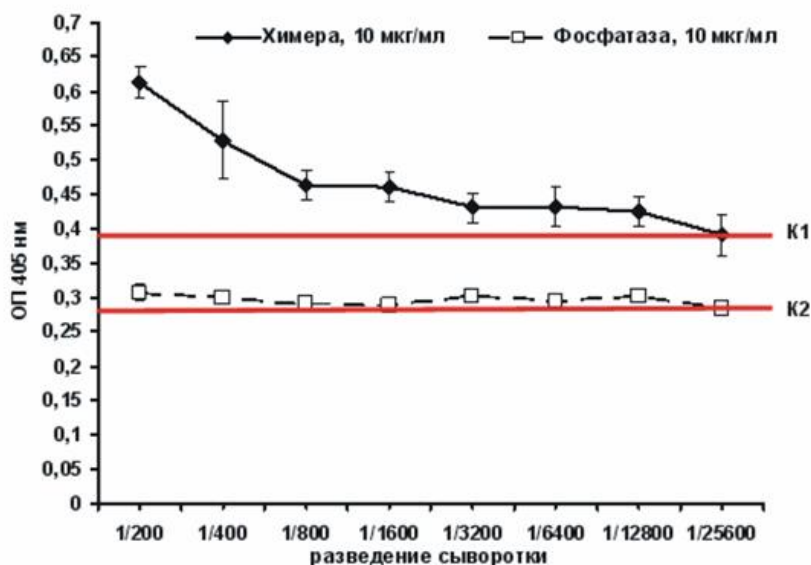
Рисунок 19. Антигенная активность рекомбинантного гибридного белка StAP/OmpF по первому варианту ИФА – иммобилизация антител на планшете (разведение 1/800): (1) взаимодействие StAP/OmpF с мышинными антителами к рекомбинантному порину OmpF; (2) взаимодействие StAP/OmpF с антителами пуловой сыворотки больных псевдотуберкулезом. Связывание антител с StAP/OmpF (двукратные разведения) оценивали по относительной активности ЩФ StAP (A_{405}).

Эти результаты свидетельствуют о том, что гибридный белок *StAR/OmpF* способен образовывать комплексы с антителами в качестве диагностического антигена, наличие которых может выявляться путем взаимодействия с субстратом к ЩФ.

Однако при проведении массовых анализов, иммобилизация исследуемых сывороток на планшете с целью выявления специфических антител к возбудителю заболевания сопряжена с рядом методических и технических трудностей. В связи с этим был апробирован второй вариант проведения ИФА, когда на планшет сначала наносили диагностический антиген - гибридный бифункциональный белок *StAR/OmpF*, а затем добавляли исследуемые образцы сывороток (Рисунок 20).

Согласно данным, представленным на рисунке 20 А, ферментативная активность гибридного *StAR/OmpF* в контроле К1 была существенно выше после иммобилизации на планшет, чем у рекомбинантного белка *StAR* в контроле К2. Это, возможно, связано с тем, что в составе гибридного (химерного) белка *StAR* более доступна для взаимодействия с субстратом.

А



Б

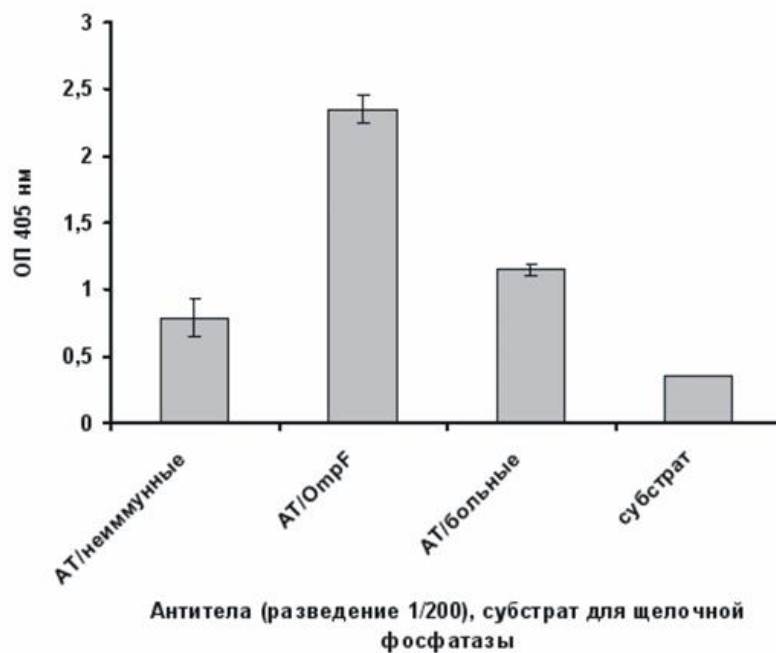


Рисунок 20. Антигенная активность рекомбинантного гибридного белка *StAR/OmpF* (на рисунке обозначено как «Химера») по второму варианту ИФА – иммобилизация на планшет диагностического антигена *StAR/OmpF*: А - взаимодействие гибридного белка *StAR/OmpF* (0.5 мкг в лунке) с мышинной антисывороткой к рекомбинантному *OmpF*. По оси ОУ – оптическая плотность окрашенного раствора комплекса “*StAR/OmpF*-антитело”, характеризующая активность ЩФ в его составе; по оси ОХ – двукратные

разведения антисыворотки. Горизонтальные линии – контроли взаимодействия рекомбинантного гибрида *СтАР/OmpF* (К1) и рекомбинантной фосфатазы *СтАР* (К2, Фосфатаза) с субстратом ЩФ (*n*-НФФ) в отсутствии антител (время взаимодействия с субстратом – 25 мин);

Б - взаимодействие гибридного белка *СтАР/OmpF* (0.5 мкг в лунке) с сывороткой крови неиммунных мышей (АТ/неиммунные); мышинной антисывороткой к рекомбинантному порину *OmpF* (АТ/*OmpF*); пуловой сывороткой больных псевдотуберкулезом (АТ/больные), все сыворотки использованы в разведении 1:200. Контроль (на рисунке обозначено как «субстрат») – взаимодействие *СтАР/OmpF* с субстратом ЩФ (*n*-НФФ) в отсутствии антител (время взаимодействия с субстратом – 40 мин).

Интересно отметить, что активность *СтАР* в составе гибридного белка (Рисунок 20 А) при взаимодействии с субстратом заметно ниже, чем таковая в присутствии антител, как в иммунных (мышинных или человеческих), так и в неиммунных мышинных сыворотках. Как следует из данных рисунка 20 Б, это увеличение было весьма значительным - в 7,8 раза в присутствии антител к рекомбинантному порину и 3,8 раза в присутствии сывороток пациентов, по сравнению с контролем - фосфатазной активностью гибрида *СтАР/OmpF* без антител (Рисунок 20 Б). Увеличение времени инкубации комплекса «*СтАР/OmpF* – антитела к *OmpF*» с субстратом ЩФ от 25 до 40 мин приводило к значительному усилению интенсивности поглощения (ОП, A_{405}) продукта цветной ферментативной реакции: от 0,62 (Рисунок 20 А) до 2,4 ОЕ (рисунок 20 Б). Согласно литературным данным (Brennan et al., 1994; 1995), такое явление, как положительная (до 300%), так и отрицательная (до 40-50%) модуляция активности фермента наблюдалась при связывании гибридной молекулы, состоящей из рекомбинантной ЩФ *E.coli* и фрагмента вируса иммунодефицита человека (HIV 1 gp120) с антителами к данному фрагменту. Однако активация ЩФ *E. coli* наблюдалась только в том случае, когда в молекуле фосфатазы имелись точечные замены. Авторы предположили, что в

основе такой стимуляции лежат неспецифические взаимодействия эпитопов гибридных белков с антителами (Brennan et al., 1994; 1995). В нашем случае существенная активация ферментативной активности наблюдалась только в присутствии специфических антител к порину бактерии *Y. pseudotuberculosis*, в то время как в присутствии иммуноглобулинов неиммунной сыворотки такая активация была незначительной (Рисунок 20 Б).

Таким образом, использование порина в составе гибридного бифункционального полипептида *StAR/OmpF* с активностью ЩФ позволяет сократить время анализа по сравнению с таковым при стандартной процедуре проведения непрямого метода ИФА. В последнем случае помимо диагностического антигена и исследуемых сывороток требуется использование вторых антител, меченных ферментом (Портнягина и др., 2000, 2009; Хоменко и др., 2008).

Разработанный подход может послужить основой для усовершенствования диагностики острых и вторично-очаговых форм псевдотуберкулеза.

5.6. Определение функциональной активности лектина в составе рекомбинантного гибридного белка *StAR/CGL*

Анализ клеточных экстрактов рекомбинантных клонов штамма *E. coli* Rosetta (DE3)/pET40*StAR/CGL* по уровню активности ЩФ и результатам ДСН-ПААГ-электрофореза показал, что культивирование при температуре 18 °С и концентрации ИПТГ 0,2 мМ в течение 12 ч обеспечивало высокий уровень экспрессии гибридного рекомбинантного белка *StAR/CGL* (Таблица 7, Рисунок 21).

Таблица 7. Относительная ферментативная активность ЩФ лизатов *E. coli* Rosetta (DE3)/pET40CmAP/CGL

Номер колонии штамма <i>E. coli</i> Rosetta (DE3)/pET40CmAP/CGL	К	1	2	3	4	5	6	7	8
ОП _{400нм}	0,085	0,181	0,114	0,16	1,125	1,11	0,172	0,181	0,204

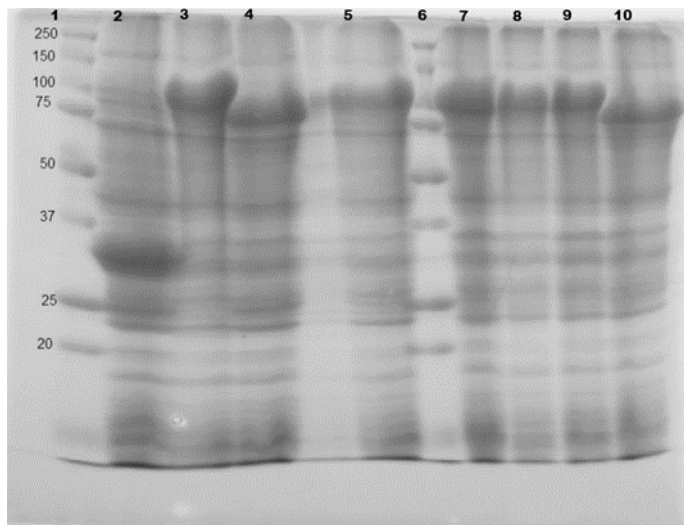


Рисунок 21. Электрофореграмма белков лизатов рекомбинантных культур *E. coli* Rosetta (DE3)/pET40CmAP/CGL: дорожки 1 и 6 –маркеры белков для электрофореза, кДа (BioRad, США); Дорожки 3-5 и 7-10 – клеточные экстракты рекомбинантных колоний штамма *E. coli* Rosetta (DE3)/pET40CmAP/CGL после ИПТГ-индуцированной экспрессии (рекомбинантный гибрид CmAP/CGL соответствует молекулярной массе 104,5 кДа); дорожка 2 – контрольный штамм *E. coli* Rosetta (DE3).

На электрофореграмме проведенного ДСН-ПААГ-электрофореза лизатов видно мажорную белковую полосу с молекулярной массой около 100 кДа, что соответствует расчетной молекулярной массе гибридного белка CmAP/CGL и плазмидного шаперона DsbC и свидетельствует о сверхэкспрессии рекомбинантного белка (Рисунок 21).

На первом этапе для определения наличия лектинной активности рекомбинантного гибридного белка *StAR/CGL* была проведена реакция прямой гемагглютинации образцов клеточных лизатов клеток *E. coli* Rosetta (DE3)/pET40*StAR/CGL* (Рисунок 21) в 96-ти луночном планшете (Рисунок 22).

Результаты гемагглютинации показали, что из восьми клонов *E. coli* Rosetta (DE3)/pET40*StAR/CGL*, синтезирующих рекомбинантный белок с активностью ЩФ, только четыре синтезировали белок с гемагглютинирующей активностью (Рисунок 22), свойственной лектинам (Sano and Ogawa, 2014). Из данных рисунка 22 видно, что значительной гемагглютинирующей активностью обладали образцы 3, 4, 6 и 8.

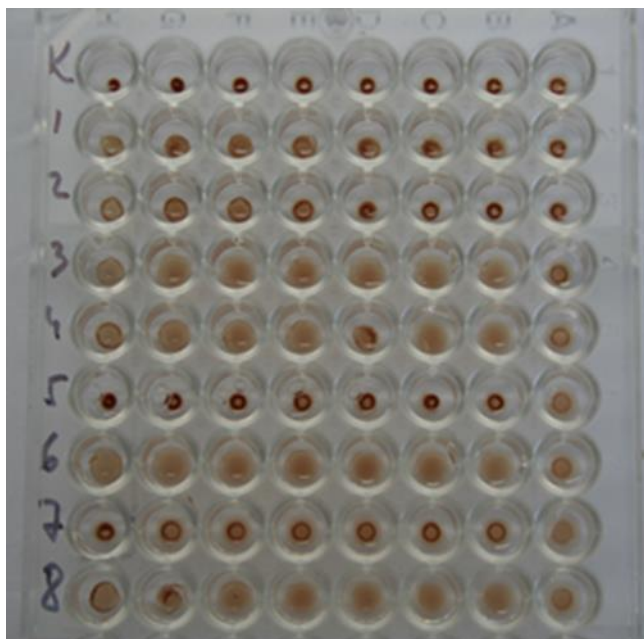


Рисунок 22. Результаты реакции прямой гемагглютинации: К (контроль) – 2-% суспензия эритроцитов крови А (II) в буфере, не содержащем лизат клеток *E. coli* Rosetta (DE3)/pET40*StAR/CGL*; лунки 1-8 – 2-% суспензия эритроцитов крови А (II) после добавления лизата клеток *E. coli* Rosetta (DE3)/pET40*StAR/CGL*, содержащего гибридный белок *StAR/CGL*. При положительной реакции в лунке образуется осадок с неровными краями - «зонтик», при отрицательной реакции в лунке образуется ровный осадок в виде «пуговки».

Учитывая отрицательные результаты реакции гемагглютинации и низкую ферментативную активность, образцы клонов рекомбинантного штамма *E. coli* Rosetta (DE3)/pET40*StAP*/CGL под номерами 1 и 7 не представляли интереса. В дальнейшем было решено использовать клоны 3 и 6 для характеристики свойств бифункционального белка *StAP*/CGL (Таблица 7, Рисунок 22).

На втором этапе определения функциональной активности лектина в составе гибридного белка *StAP*/CGL проводили твердофазный лектин-ферментный анализ (ТЛФА) как с использованием образцов лизатов клеток *E. coli* Rosetta (DE3)/pET40*StAP*/CGL, содержащих гибридные белки *StAP*/CGL (Рисунок 21, 23), так и с использованием очищенного препарата *StAP*/CGL (Рисунок 12 А). В качестве лиганда использовали муцин желудка свиньи (PSM) в двух концентрациях (Рисунок 23).

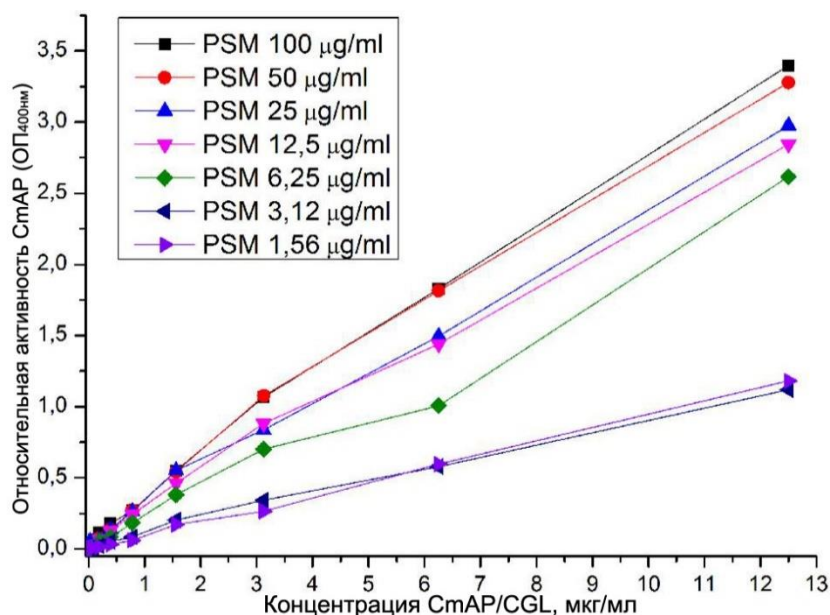


Рисунок 23. Зависимость активности ЩФ очищенного рекомбинантного белка *StAP*/CGL от концентрации лиганда PSM. По оси абсцисс - концентрация *StAP*/CGL (мкг/мл); по оси ординат - относительная активность ЩФ гибрида *StAP*/CGL (A_{400}).

Как видно из данных рисунка 23, существует линейная зависимость между активностью ЩФ и концентрацией гибридного белка *StAP/CGL* и лиганда, используемых в ТФЛА. При концентрации менее 2 мкг/мл гибридный белок *StAP/CGL* уже проявляет высокую ферментативную и лиганд-связывающую активность в отношении муцина в концентрации от 1,5 до 100 мкг/мл, что весьма перспективно для разработки методов диагностики патологий, в которых используются муциноподобные маркеры (Чикаловец и др., 2010; 2015).

5.7. Определение лиганд-связывающей специфичности гибридного бифункционального лектина *StAP/CGL* в отношении муциноподобных онкомаркеров

Ранее углеводная специфичность лектина мидии *CGL* была исследована в отношении более чем 600 синтетических и природных углеводных структур, обнаруженных в клетках млекопитающих (Чикаловец и др., 2015). Было показано, что максимальное связывание *CGL* наблюдается с гликопротеином муцином и глоботриозой (*Gb3*) - эпитопом со структурой $\text{Gal}\alpha 1\text{-4Gal}\beta 1\text{-4Glc}$. Данная углеводная структура обнаружена в составе мембран клеток лимфомы Беркитта линии *Raji* и некоторых других. Лектин моллюска *CGL* обладал антипролиферативным действием *in vitro* в отношении клеток *Raji* (IC_{50} 10 мкг/мл), которое отменялось галактозой, что говорит об углевод-белковом галактозоспецифичном механизме взаимодействия *CGL* с клетками раковой опухоли (Чикаловец и др., 2015; Chernikov et al., 2017).

В данной работе для исследования лиганд-связывающей активности галактозоспецифичного лектина *CGL* в отношении углеводных детерминант опухолевых клеток использовали полученный с помощью генно-инженерных методов очищенный бифункциональный аналог этого лектина - *StAP/CGL*, с активностью щелочной фосфатазы *StAP* и муцин-связывающей активностью лектина *CGL*, а также коммерческие онкомаркеры (олигосахариды), близкие

по структуре олигосахаридам муцина (муциноподобные онкомаркеры), такие как ПСА (простатспецифический антиген), РЭА (раковый эмбриональный антиген), АФП (альфа-фетопротеин), СА-125 (онкомаркер рака яичников), СА 19-9 (онкомаркер рака поджелудочной железы), СА 72-4 (неспецифический онкомаркер карциномы) (Рисунок 24).

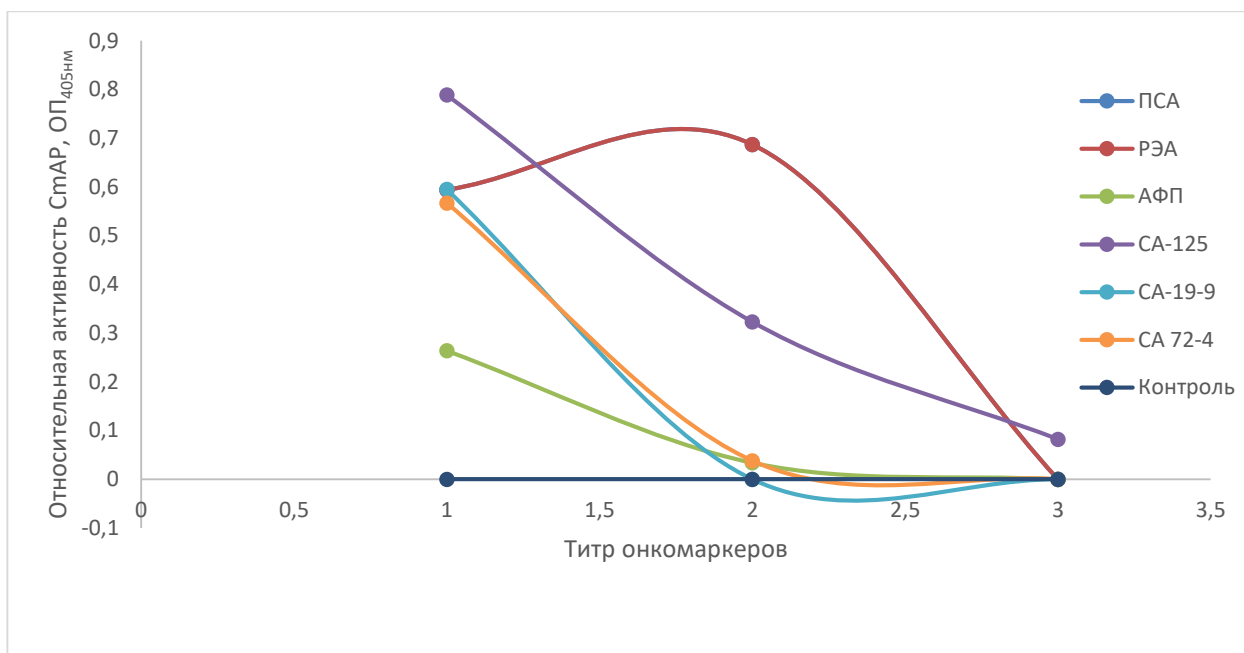


Рисунок 24. Зависимость связывания рекомбинантного гибридного белка СмАР/CGL (0,44 мг/мл) от специфичности и концентрации онкомаркера, используемого в ТФЛА: 1 - 0,1 мкг/мкл (стоковый раствор); 1,5 – 0,06 мкг/мкл; 2 – 0,05 мкг/мкл; 2,5 – 0,04 мкг/мкл; 3 – 0,03 мкг/мкл. Эффективность образования комплексов гибридного белка СмАР/CGL с лигандами показана в относительных единицах активности щелочной фосфатазы СмАР (по оси ОУ=ОП_{405нм}).

Результаты показали, что лектин CGL, генетически слитый с СмАР, связывается со всеми муциноподобными онкомаркерами, кроме ПСА, при высоких концентрациях в реакционной смеси как самих онкомаркеров (0,06 - 0,1 мкг/мкл), так и гибридного белка (0,44 мг/мл), вероятно, из-за неспецифического связывания и/или агрегации гибридного белка. Так, для ЩФ кишечника теленка было показано, что ее агрегация в присутствии

определенной концентрации ионов цинка или пирофосфата никак не влияет на каталитическую активность фермента (Gentile et al., 2021). При использовании меньших концентраций рекомбинантного белка *SmAP/CGL* (0,0044 до 0,044 мг/мл) и больших разведений онкомаркеров (от 1:125 до 1: 625000) было выявлено, что с помощью ТФЛА на основе гибридного белка *SmAP/CGL* можно достоверно идентифицировать лишь РЭА и СА 19-9 (Таблица 8). На сегодняшний день известно, что олигосахарид СА 19-9 является маркером рака поджелудочной железы при значениях, превышающих 40 ед/мл в клиническом анализе. Он имеет большую диагностическую ценность при комбинации с РЭА в мониторинге как рака поджелудочной железы, так и колоректальной карциномы (Fong et al., 2012; Vukobrat-Bijedic et al., 2013).

Однако онкомаркеры СА 125 и СА 72-4 связывались лишь в присутствии высокой концентрации гибридного белка *SmAP/CGL* (0,44 мг/мл), что ставит под сомнение специфичность лектина *CGL* в отношении этих антигенов (Рисунок 24, Таблица 8)

Таблица 8. Показатели фосфатазной активности у связавшихся комплексов гибридного лектина *SmAP/CGL* с муциноподобными онкомаркерами

Концентрация гибрида <i>SmAP/CGL</i>	Время инкубации и титр маркера	ПСА	РЭА	АФП	СА 19-9	СА 125	СА 72-4	БСА	Пустой
0,44 мг/мл	Сток (30 мин)	0,039	0,594	0,264	0,789	0,595	0,567	0	0
0,44 мг/мл	1:125 (30 мин)	0,043	0,687	0,034	0,323	0	0,038	0	0
0,0044 мг/мл	1: 1000 1: 5000 1: 25000 1: 125000 1: 625000 (ночь)	-*	0,472 0,481 0,450 0,573 0,458	-	0,344 0,313 0,343 0,336 0,235	-	-	0,240	0
0,0044 мг/мл	1: 1000 1: 5000 1: 25000 1: 125000 1: 625000 (1 час)	-	0,121 0,150 0,175 0,122 0,146	-	0,159 0,117 0,122 0,133 0,125			0,072	0

* - онкомаркер в данном титре не использовали в ТФЛА из-за низких предыдущих значений активности ЩФ

Однако проблема неспецифического связывания даже при высоком титре антигенов (1:625000), а также нежелательного неспецифического связывания бычьего сывороточного альбумина (БСА) с гибридной молекулой *SmAP/CGL* в данной работе остается нерешенной (Таблица 8).

Таким образом, отработка параметров проведения ТФЛА, таких как концентрация используемых белков, титр исследуемых образцов и время инкубации их с гибридным бифункциональным белком *SmAP/CGL*, а также выбор белка (вместо БСА) для связывания неспецифических центров связывания лектина при пробоподготовке (Таблица 8), имеет большое значение для получения достоверных результатов при определении онкомаркеров РЭА и СА-19-9 (Таблица 8). Поэтому разработка новых методов ранней дифференциальной диагностики рака с применением гибридного бифункционального лектина *SmAP/CGL* является непростой, но весьма актуальной задачей.

Для определения возможности повышения специфичности *SmAP/CGL* к онкомаркерам необходимо детальное исследование структуры-функции лектинной части гибридной молекулы *SmAP/CGL*.

5.8. Сайт-направленный мутагенез галактозосвязывающих сайтов лектина в гибридном белке *SmAP/CGL*

Для исследования структурно-функциональных особенностей лектина CGL в составе гибридного белка *SmAP/CGL* проводили его мутагенез *in silico* с помощью молекулярного моделирования и докинга в программе МОЕ (Molecular Operating Environment, 2018). Молекулярную модель лектина CGL получили на основе кристаллической структуры лектина *Mutiles* из мидии *M. galloprovincialis* (PDB: 3WMV), установленной с высоким разрешением - 1,05 Å, которую использовали в дальнейшем для *in silico* анализа каждого сайта связывания в тримере CGL (Kovalchuk et al., 2013; Terada et al., 2016). Немного позже в базе PDB появилась кристаллическая структура самого лектина CGL

(PDB: 5F8S), установленная одновременно независимыми группами ученых (Jakóб et al., 2015; Liao et al., 2016). Однако наложение всех атомов Ca ранее полученной модели CGL и кристаллической структуры CGL (PDB: 5F8S) показало, что они практически полностью совпадают при значении RMSD 0,4 Å. Таким образом, предсказанная структура лектина CGL хорошо согласуется с экспериментально установленной структурой CGL и пригодна для проведения исследований мутагенеза *in silico* и молекулярного докинга.

В результате молекулярного докинга лектина CGL со специфическим лигандом – галактозамином (GalNAc) (PDB: 5F8Y), были определены варианты нескольких аминокислотных замен, разрушающих углевод-связывающие сайты каждого из трех мономеров (Site 1, Site 2, Site 3), образующих общий активный центр тримерного лектина CGL (Рисунок 25 А). Предсказанные углевод-связывающие аминокислотные остатки (а.о.) совпали с консервативными а.о. НPY/KGG для всех последовательностей tandemных повторов (Рисунок 8) в субъединицах лектина CGL (Kovalchuk et al., 2013).

Для экспериментального подтверждения локализации и функции углевод-связывающих сайтов в 3-D структуре и роли каждого такого сайта в активном центре в кодирующую последовательность CGL одновременно вводили замены нескольких кодонов с использованием двух геноспецифичных праймеров, приводящих к замене трех а.о. в каждом углевод-связывающем сайте: Н12А/Р17А/Г19А (Site1), Н64А/Р65А/Г67А (Site 2) и Н108А/Р109А/Г111А (Site 3) (Рисунок 25).

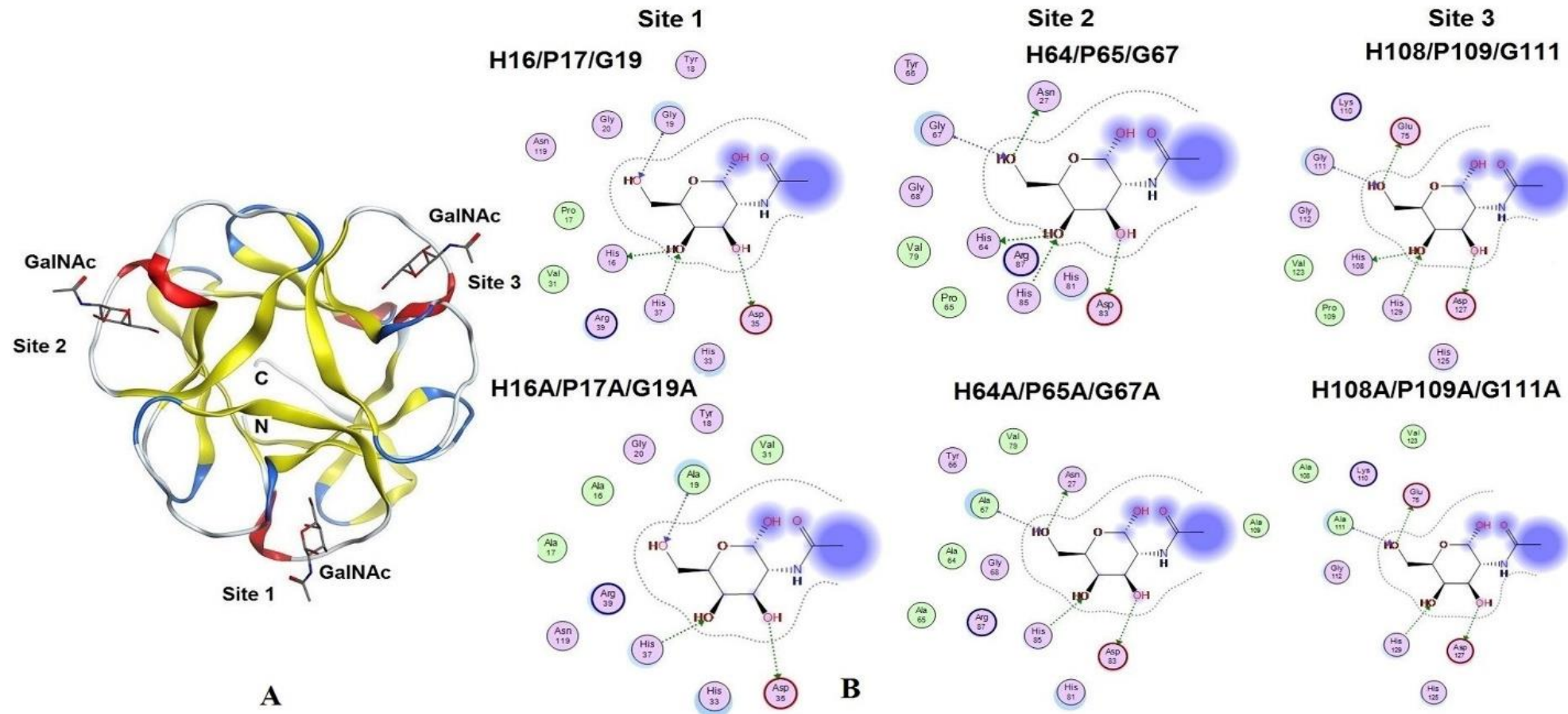


Рисунок 25. А – 3D-модель комплекса Gal/GalNAc-специфичного лектина CGL и лиганда GalNAc. Структура белка показана в виде ленточной диаграммы, структура лиганда GalNAc показана палочками. В – 2D-диаграмма углеводсвязывающих сайтов (Site 1, 2, 3) лектина CGL с GalNAc (вверху) и его тройных мутантных аналогов по каждому сайту связывания (внизу) - H16A/P17A/G19A (Site 1), H64A/P65A/G67A (Site 2) и H108A/P109A/G111A (Site 3).

Результаты гемагглютинации показали, что практически ни один из белков с тройными мутациями H12A/P17A/G19A (Site 1), H64A/P65A/G67A (Site 2) и H108A/P109A/G111A (Site 3) не проявляет активности, что свидетельствует о критическом значении всех трех сайтов связывания для проявления гемагглютинирующих свойств лектина CGL (Рисунок 26).

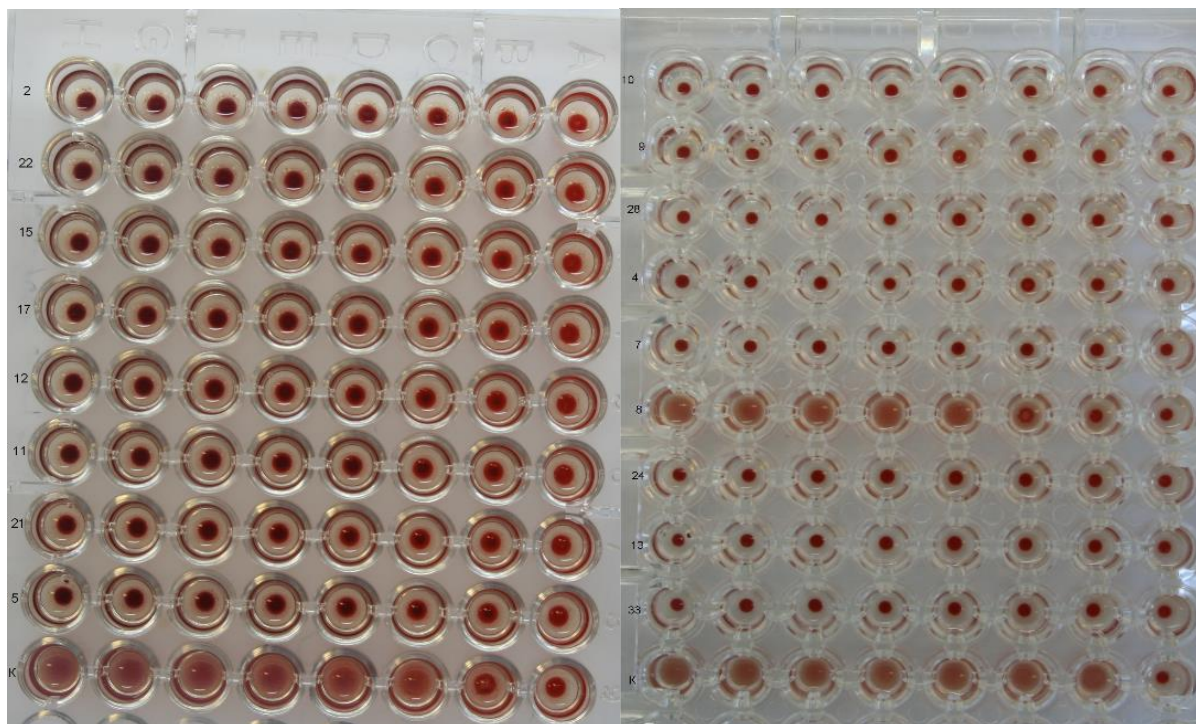


Рисунок 26. Результаты реакции прямой гемагглютинации. Слева направо двукратное разведение образцов буферным раствором TBS. Последний ряд (внизу) – контрольный рекомбинантный лектин CGL без мутаций. При положительной реакции в лунке образуется осадок с неровными краями - «зонтик», при отрицательной реакции в лунке образуется ровный осадок в виде «пуговки».

По данным ТЛФА с использованием муцина (PSM) в качестве лиганда мутации, разрушающие сайты связывания Site 1 и Site 2 (Рисунок 25 В), уменьшают углевод-связывающую активность CGL в 18 и 32 раза соответственно, а мутация, разрушающая третий сайт Site 3, - в 6 раз, что

свидетельствует о существенном вкладе всех трех сайтов в связывание с лигандом PSM (Рисунок 27).

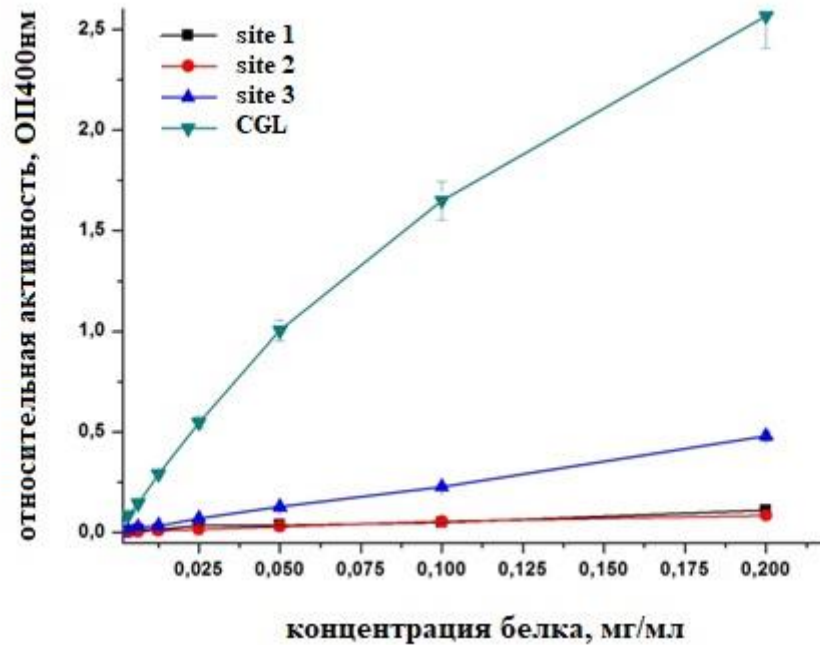


Рисунок 27. Зависимость образования лектин-лигандных комплексов с муцином (PSM) от концентрации гибридного лектина *СmAP/CGL* и его мутантных аналогов Н12А/Р17А/Г19А (Site 1), Н64А/Р65А/Г67А (Site 2) и Н108А/Р109А/Г111А (Site 3) (ОХ, мкг/мл). ОУ – относительная активность гибрида *СmAP/CGL*, измеренная по активности щелочной фосфатазы *СmAP* (ОП₄₀₀, нм).

Полученные экспериментальные данные коррелируют с данными молекулярного докинга, которые свидетельствуют о том, что потеря активности связана с разрывом водородных (Н-Н) связей между остатками Н16, Н64 и Н108 и лигандом GalNAc из-за увеличения расчетной энергии связывания (Рисунки 25, 27).

Таким образом, методом сайт-направленного мутагенеза подтверждена структура активного центра тримерного галактозосвязывающего лектина CGL, включающего три идентичных сайта связывания НPY/KGG,

локализованных в трех гомологичных мономерах (гомотример), но имеющих разный уровень углевод-связывающей активности.

5.9. Точечный мутагенез галактозосвязывающих сайтов лектина в гибридном белке *StAR/CGL*

In silico анализ взаимодействия CGL с лигандами GalNAc (PDB: 5F8Y) и α -галактозой (Gal) (PDB: 5F8W) показал, что в связывании лиганда помимо а.о. консервативного участка активного центра лектина - НPY/KGG, образующего углевод-связывающий сайт каждого домена тримерного белка CGL (Рисунки 8, 25) участвуют также отдельные а.о., которые в третичной структуре CGL образуют Н-Н-связи с этими моносахаридами.

Для дальнейшего изучения зависимости углевод-связывающей функции активного центра галактозосвязывающего лектина мидии CGL от его структуры, определяющей специфичность к галактозе и галактозамину, провели аланиновый *in silico* мутагенез следующих предсказанных а.о., участвующих в связывании лигандов: His37 и Asn119 (Site 1), His85 и Asn27 (Site 2); Asp127, His129 и Glu75 (Site 3) (Рисунок 28). Эти а.о. были выбраны для проведения экспериментального мутагенеза в целях подтверждения их роли в углевод-связывающей активности CGL с использованием муцина в качестве лиганда, имеющего концевые остатки галактозы в составе эпитопов O-олигосахаридов (Chikalovets et al., 2015; 2020).

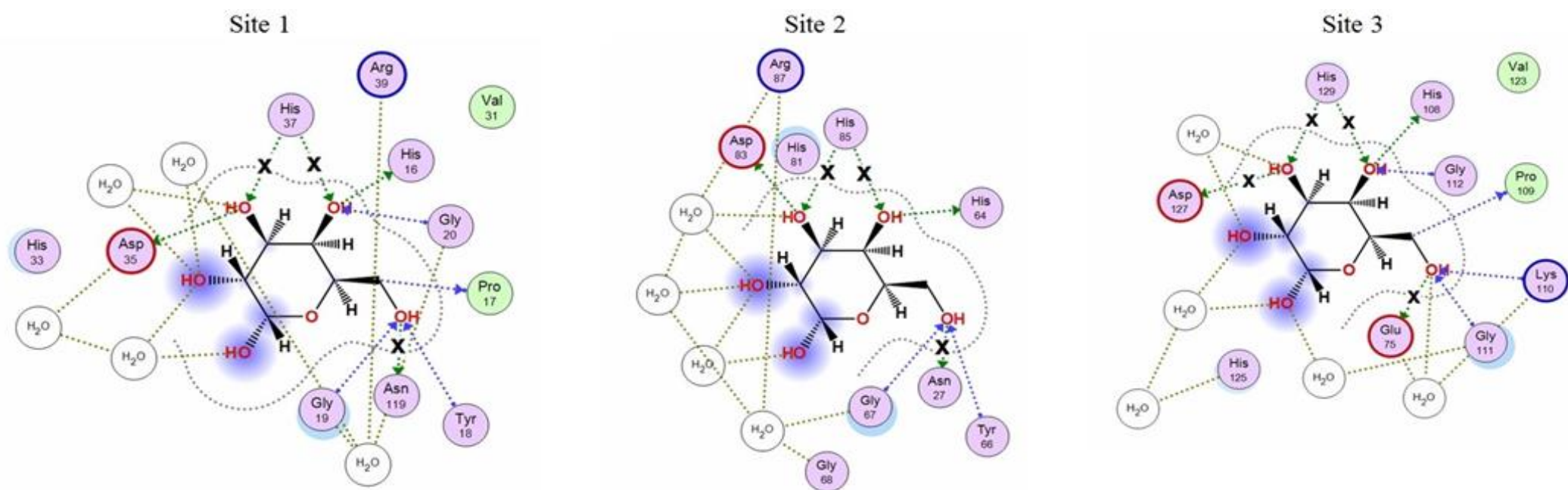


Рисунок 28. 2D-диаграммы углевод-связывающих сайтов (Site 1, 2, 3) лектина CGL с моносахаридом Gal. В комплексах галактозы с мутантными белками CGL показан разрыв H-H-связи в местах замены а.о. на остаток Ala (обозначено крестиком (x)).

Муцин-связывающая активность полученных мутантных белков CGL варьировала в широких пределах и составляла от 9% до 73% от активности рекомбинантного лектина CGL с немутированной последовательностью белка - природного типа CGL (Рисунок 29). В мутантных CGL с одиночными заменами His37Ala, His129Ala, Glu75Ala, Asp127Ala и His85Ala, Asn27Ala, Asn119Ala лектинная активность в отношении муцина была ниже, чем у природного CGL в 1,4; 2,3; 3,2; 4,5; 5,0; 5,9 и 11,1 раза соответственно (Рисунок 29).

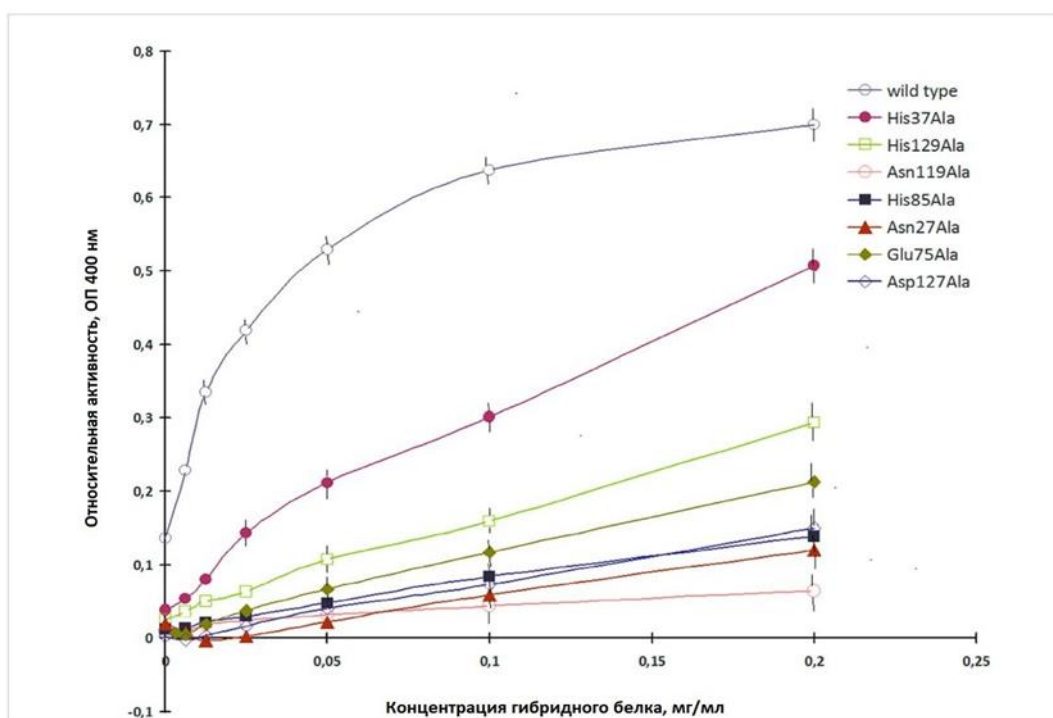


Рисунок 29. Муцин-связывающая активность природного и мутантного типов лектина у гибридного белка CGL/CmAP. Комплексы “лектин-муцин” (ось X) определяли путем измерения относительной фосфатазной активности гибрида CGL/CmAP (ось Y).

Однако муцин-связывающая активность полученных мутантных белков не коррелировала с изменениями расчётной энергии их связывания с моносахаридом Gal. Было предположено, что степень сродства CGL к лигандам может зависеть от степени их олигомеризации (Таблица 9). Данные по кристаллической структуре гликопротеина муцина в базе данных

отсутствуют. Поэтому был проведен *in silico* анализ контактов мутантных CGL с более сложно устроенным (олигомерным) лигандом - трисахаридом Gb3 (PDB: 5F90), имеющем в своем составе один остаток глюкозы и два остатка галактозы ($\text{Gal}\alpha\text{-4Gal}\beta\text{-4Glc}$), к которому по экспериментальным данным природный лектин CGL имеет наибольшую аффинность (Чикаловец и др., 2015; Chernikov et al., 2017). Способность лектина CGL распознавать глоботриозу (Gb3) на поверхности клеток рака молочной железы и связывать гликопротеины муцинового типа, которые часто относят к онкогенной трансформации, делает перспективным использование данного лектина в качестве биосенсора для диагностики рака (Чикаловец и др., 2015; Chernikov et al., 2017). Поэтому для понимания механизма связывания CGL с лигандами муцинового типа крайне важно оценить индивидуальный вклад а.о. активного центра CGL в лектинную активность.

Результаты молекулярного докинга показали, что замещение His37, His129, Glu75, Asp127, His85, Asn27 и Asn119 на остаток Ala изменяет количество контактов CGL с трисахаридом Gb3 (Рисунок 30) и расчетную энергию связывания с ним (Таблица 9).

Таблица 9. Муцин-связывающая активность мутантных лектинов CGL и расчетная энергия их связывания с галактозой и глоботриозой

Мутация	Связывание Gal ΔE^a , kcal/mol	Связывание G3 ΔE^b , kcal/mol	Относительная муцин- связывающая активность ^c , %
Asn119Ala*	1,9	4,9	9
Asn27Ala**	2,0	5,2	17
Asp127Ala***	4,0	4,3	22
His85Ala**	3,6	3,4	20
Glu75Ala***	3,4	4,7	31
His129Ala***	3,5	3,6	43
His37Ala*	3,5	3,1	73

a/b – разница между расчетной энергией связывания мутантных CGL с галактозой (ΔE^a) и глоботриозой (ΔE^b) и энергией связывания природного типа CGL с этими лигандами; c – муцин-связывающая активность мутантных белков измерялась относительно активности природного типа CGL (100%); * – первый углеводсвязывающий сайт лектина CGL (Site 1), ** – второй углеводсвязывающий сайт лектина CGL (Site 2), *** – третий углеводсвязывающий сайт лектина CGL (Site 3).

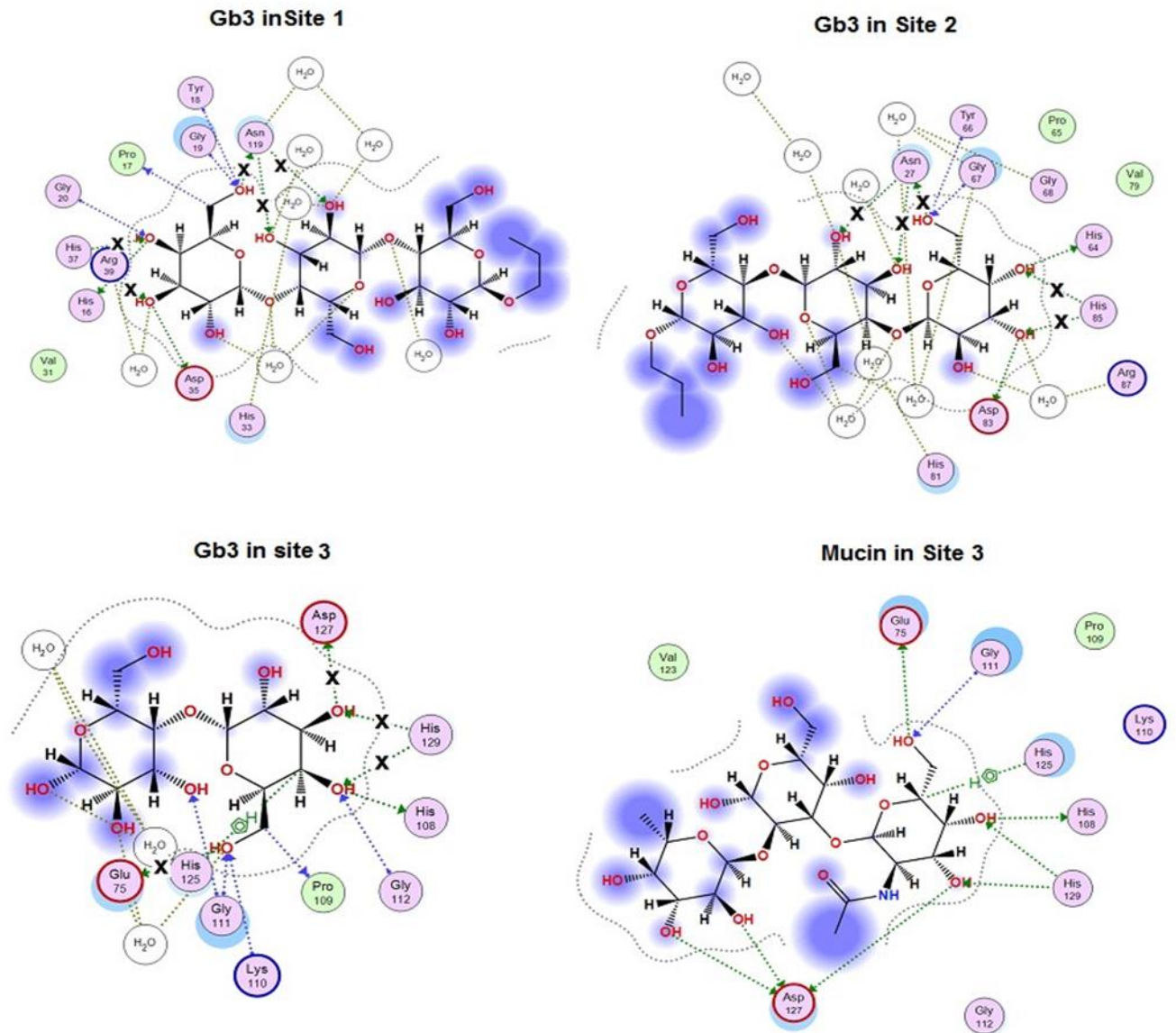


Рисунок 30. 2D-диаграмма контактов между лектином CGL и лигандами: глоботриозой (Gb3 in Site 1, 2, 3) и муцином (Mucin in Site 3). Показано появление новых Н-Н-связей в комплексах CGL (зеленые прерывистые стрелочки): с двумя остатками галактозы трисахарида Gb3 и муцина в сайтах связывания Site 1, 2, 3 (сверху и внизу слева, контакты для Gb3 и муцина идентичны) и третьим остатком фукозы олигосахарида муцина в сайте связывания Site 3 (внизу справа). Контакты между лектином CGL и третьим остатком Gb3 (Glc, глюкозой) не образуются. Разрыв Н-Н-связей в

местах введения замены а.о. на остаток Ala в комплексах мутантных CGL с лигандами Gb3 и муцином обозначены крестиком (x).

На рисунке 30 видно, что остатки Asn27 из второго сайта (Gb3 in Site 2) и Asn119 из первого сайта (Gb3 in Site 1) образуют по одной Н-Н-связи с концевым остатком Gal, как и в случае докинга с моносахаридом Gal, и две дополнительные Н-Н-связи появляются со вторым остатком Gal при докинге с трисахаридом Gb3 (Рисунок 30: Gb3 in Site 1; Gb3 in Site 2). Поэтому мутантные лектины $CGL_{Asn27Ala}$ и $CGL_{Asn119Ala}$ теряют не по одной, а по три водородные связи в первом и втором сайтах при связывании с трисахаридом Gb3 (Рисунок 30: Gb3 in Site 1; Gb3 in Site 2). Это может объяснить резкое снижение их сродства к муцину в эксперименте *in vitro*, который также имеет два остатка Gal на концах своих олигосахаридных цепей (Рисунок 29, Таблица 9).

Остаток Glu75 расположен в третьем сайте связывания CGL (Site 3) и имеет такую же топологию, что и остатки Asn27 и Asn119 в двух других сайтах связывания Site 2 и 1 соответственно. Однако, в отличие от них, он образует только одну Н-Н-связь с ОН-группой атома C₆ концевой остатка Gal (Рисунок 30: Gb3 in Site 3), поэтому значения расчетной энергии связывания в комплексах $CGL_{Glu75Ala}-Gb3$ и $CGL_{Glu75Ala}-Gal$ отличаются незначительно (Таблица 9). Вероятно, по этой же причине мутантный белок $CGL_{Glu75Ala}$ сохранил более высокий уровень активности (31%) природного лектина CGL в отношении муцина по сравнению с его мутантными аналогами $CGL_{Asn27Ala}$ и $CGL_{Asn119Ala}$ (Рисунок 29).

Однако оказалось невозможным объяснить несоответствие данных *in vitro* муцин-связывающей активности и полученной с помощью *in silico* анализа расчетной энергии связывания остальных мутантных лектинов CGL в области контактов ни с моносахаридом Gal, ни с трисахаридом Gb3, похожим по структуре на эпитоп муцина (Таблица 9).

Так, идентичные по топологии остатки His37 (Site 1), His85 (Site 2) и His129 (Site 3) образуют две Н-Н-связи только с одним концевым галактозным остатком Gb3, и расчетная энергия связи природного CGL и лектина с мутациями His37Ala, His85Ala и His129Ala как с моносахаридом Gal, так и с трисахаридом Gb3 схожа (Таблица 9, Рисунок 30). Несмотря на это, значения муцин-связывающей лектинной активности у мутантных белков CGL_{His37Ala}, CGL_{His85Ala} и CGL_{His129Ala} отличаются между собой и от значений активности немутантного лектина CGL (Таблица 9, Рисунок 29). Если в результате разрыва этих двух Н-Н-связей у лектина CGL_{His37Ala} активность сохранялась до 70%, то у CGL_{His85Ala} и CGL_{His129Ala} она снижалась до 20 и 43% соответственно (Таблица 9). Вероятно, неравнозначное изменение активности этих мутантных белков происходит в результате какой-то тонкой структурной перестройки микроокружения каждого сайта связывания после замены этих ключевых остатков His на аланин, которую невозможно обнаружить методом *in silico* анализа. Ранее группой китайских ученых уже было показано отличие в аффинности сайтов связывания 1–3 природного лектина CGL к галактозе с помощью метода ядерно-магнитного резонанса (ЯМР) (Liao et al., 2016), что подтверждено нами в данном исследовании путем выключения каждого сайта методом аланинового мутагенеза (Рисунки 25, 27). Несмотря на консервативность и идентичность топологии ключевых а.о. всех сайтов связывания в активном центре (Рисунок 8), выключение третьего сайта Site 3 в меньшей степени повлияло на муцин-связывающую активность лектина CGL (Рисунок 27).

Кроме того, муцин-связывающая активность лектина CGL с мутацией Asp127Ala в третьем сайте связывания Site 3 составила всего 22% от исходной активности природного CGL, несмотря на то, что модели его комплексов с Gal и Gb3 предсказывают разрыв только одной водородной связи (Таблица 9, Рисунок 30), что хорошо согласуется с имеющимися кристаллографическими данными этих комплексов (PDB: 5F8W, 5F8Y и 5F90). Для объяснения такого резкого изменения муцин-связывающей активности лектина CGL_{Asp127Ala} была

построена еще одна теоретическая модель комплекса CGL с трисахаридом эпитопа крови группы А (II) со структурой GalNAc α 1-3Gal[Fuc α 1-2] (PDB: 2WMI), которая, как оказалось, идентична конечному трисахариду муцина (Tian et al., 2008), поскольку данные по кристаллической структуре самого муцина отсутствуют (Рисунки 30, 31).

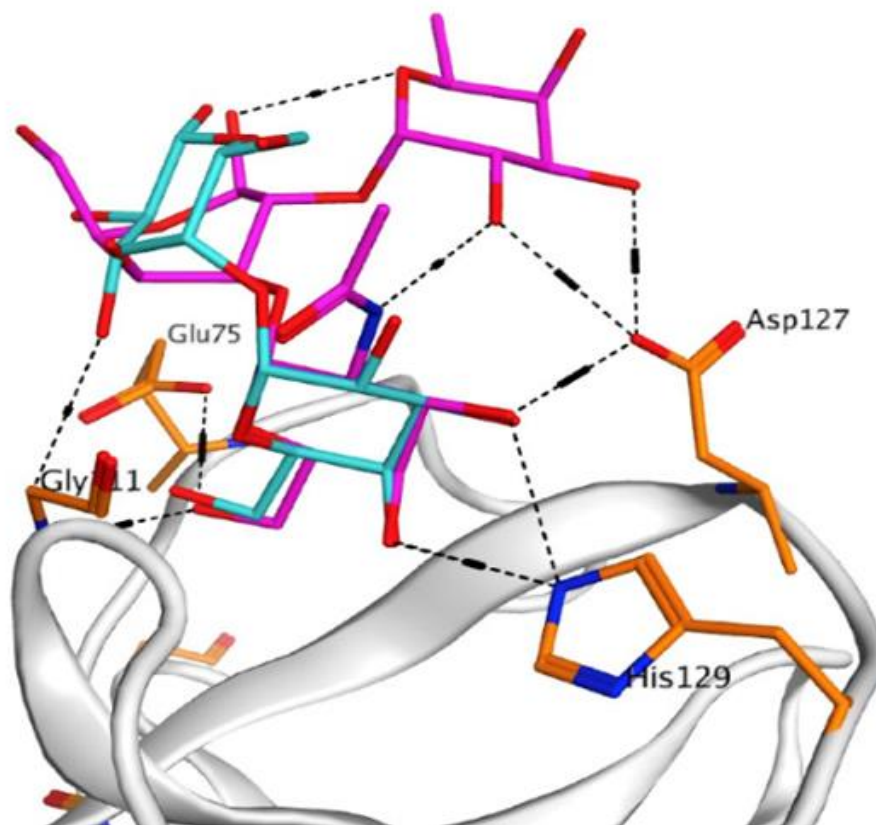


Рисунок 31. 3D-суперпозиция трисахарида Gb3 (голубой) и углеводного эпитопа гликопротеина PSM (розовый) в углевод-связывающем сайте Site 3 лектина CGL. Показано, что аминокислотный остаток Asp127 образует одну Н-Н-связь (черная прерывистая линия) с концевым остатком галактозы трисахаридов Gb3 и гликопротеина PSM и две Н-Н-связи с третьим остатком фукозы гликопротеина PSM, который отсутствует в Gb3 (заменен на Glc).

Данные молекулярного докинга с муциновым трисахаридом GalNAc α 1-3Gal [Fuc α 1-2] (PSM) показали, что в третьем сайте связывания CGL (Site 3) появляются дополнительные отличия между *in silico* связыванием с Gb3 и муцином (Рисунки 30, 31). Как видно из данных рисунка 30, у лектина CGL

возникает дополнительная Н-Н-связь между а.о. Asp127 и концевым галактозным остатком при связывании с трисахаридом Gb3 и муцином (Рисунок 30: Gb in Site 3). Однако этот же остаток Asp127 образует еще две Н-Н-связи с третьим остатком фукозы (Fuc), входящим в состав эпитопа муцина (Рисунок 30: Mucin in Site 3), тогда как третьим остатком в трисахариде Gb3 является остаток глюкозы, к которому лектин CGL не имеет афинности. Анализ контактов комплекса CGL и PSM-трисахарида GalNAc α 1-3Gal [Fuc α 1-2] выявил, что между третьим сайтом CGL Site 3 и а.о. Asp127 образуются одна водородная связь с C₃-ОН-группой концевого остатка Gal и две дополнительные водородные связи с ОН-группами атомов C₂ и C₃ третьего остатка Fuc (Рисунки 29, 30). Поэтому мутантный CGL_{Asp127Ala} потерял не одну, а три дополнительные водородные связи с трисахаридом муцина, что может объяснить резкое снижение муцин-связывающей активности *in vitro* (Таблица 9, Рисунки 30, 31). Таким образом, а.о. Asp127 третьего сайта связывания лектина CGL по-разному участвует в связывании различных по составу и степени олигомеризации лигандов, что определяет модулирующее действие на силу и специфичность данного взаимодействия.

Однако аминокислотные остатки Asp35 и Asp83 в сайтах Site 1 и 2 у тримера CGL расположены в тех же 3-D-суперпозициях, что и остаток Asp127 в сайте Site 3, поэтому можно предположить, что они также образуют по три водородные связи с трисахаридом муцина. Муцин-связывающая активность мутантных белков CGL_{Asp35Ala} и CGL_{Asp83Ala} еще не исследована, но вполне вероятно, что она будет меньше, чем у мутанта CGL_{Asp127Ala}, так как сайт Site 3 имеет меньший вклад в афинность лектина, о чем свидетельствуют большинство полученных результатов мутагенеза *in vitro* (Рисунки 27, 29).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что а.о. His37 и Asn119 (Site 1), His85 и Asn27 (Site 2), Asp127, His129 и Glu75 (Site 3) являются эссенциальными для углевод-связывающей функции активного центра лектина CGL. Вклад этих аминокислотных остатков в муцин-связывающую активность CGL не одинаков. Аланиновая замена одного из них не приводит

к полной потере муцин-связывающей активности CGL, что указывает на сохранение остаточной лектинной функции за счет двух других немутированных сайтов связывания. Так, замены Asn119Ala (Site 1) и Asn27Ala (Site 2) у CGL приводят к наибольшему снижению муцин-связывающей активности (9% и 17% соответственно) по сравнению с равнозначной аланиновой заменой остатка Glu75 (31%) в сайте Site 3, так как CGL_{Glu75Ala} теряет лишь одну Н-Н-связь по сравнению с тремя Н-Н-связями у мутантов CGL_{Asn119Ala} и CGL_{Asn27Ala} (Таблица 9, Рисунки 28, 30). Кроме того, аминокислотный остаток Asp127 в третьем сайте Site 3 и аналогичные остатки Asp35 и Asp83 в сайтах Site 1 и Site 2 соответственно играют решающую роль в проявлении более высокой степени афинности лектина CGL к муцину, чем к глоботриозе, за счет возможности образовывать Н-Н-связи с третьим остатком фукозы, отсутствующим у Gb3 (Рисунки 30, 31).

Таким образом, повышенная эффективность связывания галактозоспецифичного лектина CGL с эпитопом муцина по сравнению с другими лигандами обусловлена составом и последовательностью его концевых моносахаридных звеньев из-за способности CGL связываться с двумя концевыми остатками галактозы и следующим за ними остатком фукозы.

Выполненный нами комплексный *in vitro* и *in silico* анализ, несомненно, приведет к пониманию молекулярных механизмов функционирования лектина CGL, что позволит разработать синтетический аналог CGL с повышенной углевод-связывающей активностью в отношении некоторых онкомаркеров.

6. Выводы

1. Получены генетические конструкции на основе плазмиды pET40-b(+), содержащие гибридные гены лектина морской мидии *S. grayanus* (pET40CmAP/CGL) и порина патогенной бактерии *Y. pseudotuberculosis* (pET40CmAP/OmpF), соединенные со щелочной фосфатазой CmAP морской бактерии *S. amphilecti* КММ 296 через гибкий линкер (Gly₄Ser)₃, для клонирования и гетерологической экспрессии в клетках *E. coli*.

2. Получены штаммы-продуценты *E. coli* Rosetta(DE3)/pET40CmAP/CGL и *E. coli* Rosetta(DE3)/pET40CmAP/OmpF для синтеза растворимых гибридных бифункциональных белков CmAP/CGL и CmAP/OmpF соответственно.

3. По оптимизированной схеме, разработанной для получения рекомбинантной щелочной фосфатазы CmAP, проведены выделение и очистка рекомбинантных гибридных белков CmAP/CGL и CmAP/OmpF, что позволило существенно увеличить выход целевых продуктов.

4. Методами ТЛФА и ИФА соответственно выявлены лиганд-связывающие свойства гибридных белков CmAP/CGL и CmAP/OmpF. Продемонстрирован высокий уровень активности щелочной фосфатазы CmAP в составе комплексов со специфическими лигандами – муцином PMS и антителами к порину OmpF. Показано, что при определении антител к порину в пуловой сыворотке крови больных псевдотуберкулезом активность щелочной фосфатазы CmAP в составе гибридного белка CmAP/OmpF можно использовать вместо вторых антител, меченных пероксидазой.

5. На основе рекомбинантного гибридного бифункционального белка CmAP/CGL продемонстрирована возможность разработки новых методов комплексного определения онкомаркеров СА 19-9 и РЭА для диагностики рака поджелудочной железы и колоректальной карциномы.

6. Показано, что гомогенный препарат высокоактивной рекомбинантной щелочной фосфатазы *SmAP* подавляет пролиферацию клеток карциномы (T-47D) и аденокарциномы молочной железы (MDA-MB-231) при концентрации максимального полуингибирования IC_{50} $2,3 \text{ ед/6} \times 10^3 \text{ КОЕ}$ или 3 мкг/мл . Установленная дефосфорилирующая активность *SmAP* в отношении ЛПС грамотрицательных бактерий определяет перспективу ее использования в методах нейтрализации воспалительных процессов, вызванных бактериальными эндотоксинами.

7. Методами *in silico* и ПЦР-опосредованного сайт-направленного мутагенеза гибридного бифункционального белка *SmAP/CGL* установлено, что лектинную активность гомотримера CGL обеспечивают одновременно три углевод-связывающих сайта НPY/KGG, имеющих разный уровень активности. Степень афинности лектина CGL к лигандам муцинового типа зависит от состава трисахарида, образующего специфический эпитоп. Лектин CGL проявляет специфичность к двум остаткам галактозы и третьему остатку фукозы эпитопа.

7. Список литературы

1. Abhinav K. V., Samuel E., Vijayan M. Archeal lectins: An identification through a genomic search // *Proteins Struct Funct Bioinf.* 2016. Vol. 84, № 1. P. 21–30.
2. Achouak W., Heulin T., Pages J. P. Multiple facets of bacterial porins // *FEMS Microbiol Lett.* 2001. Vol. 199, № 1. P. 1–7.
3. Agrahari A. K., Bose P., Jaiswal M. K., Rajkhowa S., Singh A. S., Hotha S., Mishra N., Tiwari V. K. Cu(I)-Catalyzed click chemistry in glycoscience and their diverse applications // *Chem Rev.* 2021. Vol. 121. P. 7638–7956.
4. Alam M. A., Parra-Saldivar R., Bilal M., Afroze C. A., Ahmed M. N., Iqbal H., Xu J. Algae-derived bioactive molecules for the potential treatment of SARS-CoV-2 // *Molecules.* Vol. 26, № 8. P. 2134.
5. Arai S., Yonezawa Y., Ishibashi M., Matsumoto F., Adachi M., Tamada T., Tokunaga H., Blaber M., Tokunaga M. and Kurokita R. Structural characteristics of alkaline phosphatase from the moderately halophilic bacterium *Halomonas sp.* 593 // *Acta Cryst.* 2014. Vol. D70. P. 811–820.
6. Arlinghaus F. T., Eble J. A. C-type lectin-like proteins from snake venoms // *Toxicon.* 2012. Vol. 60, № 4. P. 512–519.
7. Asgeirsson B., Markússon S., Hlynsdóttir S. S., Helland R., J. G. Hjörleifsson J. G. X-ray crystal structure of *Vibrio* alkaline phosphatase with the non-competitive inhibitor cyclohexylamine // *Biochemistry and Biophysics Reports.* 2020. Vol. 24. P. 100830.
8. Balabanova L., Golotin V., Kovalchuk S., Bulgakov A., Likhatskaya G., Son O., Rasskazov V. A. Novel bifunctional hybrid with marine bacterium alkaline phosphatase and Far Eastern holothurians mannan-binding lectin activities // *Plos One.* 2014. Vol. 9, № 11. P. e112729.
9. Balabanova L., Podvolotskaya A., Slepchenko L., Eliseikina M., Noskova Yu., Nedashkovskaya O., Son O., Tekutyeva L., Rasskazov V. Nucleolytic

- enzymes from the marine bacterium *Cobetia amphilecti* KMM 296 with antibiofilm activity and biopreservative effect on meat products // Food Control. 2017. Vol. 78. P. 270–278.
10. Balbaied T., Moore E. Overview of optical and electrochemical alkaline phosphatase (ALP) biosensors: recent approaches in cells culture techniques // Biosensors (Basel). 2019. Vol. 9, № 3. P.102.
11. Barltrop J. A., Owen T. C., Cory A. H., Cory J. G. 5-(3carboxymethoxyphenyl)-2-(4,5-dimethylthiazolyl)-3-(4-sulfophenyl)tetrazolium, inner salt (MTS) and related analogs of 3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5 diphenyltetrazolium bromide (MTT) reducing to purple watersoluble formazans as cell-viability indicators // Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 1991. Vol. 1. P. 611-614.
12. Bates J. M., Akerlund J., Mittge E., Guillemin K. Intestinal alkaline phosphatase detoxifies lipopolysaccharide and prevents inflammation in zebrafish in response to the gut microbiota // Cell Host Microbe. 2007. Vol. 2. P. 371–382.
13. Bilski J., Mazur-Bialy A., Wojcik D., Zahradnik-Bilska J., Brzozowski B., Magierowski M., Mach T., Magierowska K., Brzozowski T. The role of intestinal alkaline phosphatase in inflammatory disorders of gastrointestinal tract // Mediators Inflamm. 2017. P. 9074601.
14. Borsig L. Selectins in cancer immunity // Glycobiology. 2018. Vol. 28. № 9. P. 648–655.
15. Boyd W. C., Shapleigh E. Specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins) // Science. 1954. Vol. 119. P. 419.
16. Bradford M. M. A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal Biochem. 1976. Vol. 72. P. 248-254.
17. Brennan C., Christianson K., Surowy T., Mandecki W. Modulation of enzyme activity by antibody binding to an alkaline phosphatase-epitope hybrid protein // Protein Eng. 1994. Vol. 7, № 4. P. 509-514.

18. Brennan C. A., Christianson K., La Fleur M. A., Mandeck W. A molecular sensor system based on genetically engineered alkaline phosphatase // Comparative Study. 1995. Vol. 92, № 13. P. 5783-5787.
19. Brown G. D., Willment J. A., Whitehead L. C-type lectins in immunity and homeostasis // Nat Rev Immunol. 2018. Vol. 18. P. 374–389.
20. Cagnoni A. J., Perez Saez J. M., Rabinovich G. A., Marino K. V. Turning-off signaling by siglecs, selectins, and galectins: chemical inhibition of glycan-dependent interactions in cancer // Front Oncol. 2016. Vol. 6. P. 109.
21. Cai Y., Xu W., Gu C., Cai X., Qu D., Lu L., Xie Y., Jiang S. Grifthsin with a broad-spectrum antiviral activity by binding glycans in viral glycoprotein exhibits strong synergistic effect in combination with a pan-coronavirus fusion inhibitor targeting SARS-CoV-2 spike S2 subunit // Virol Sin. 2020. Vol. 35, № 6. P. 857–860.
22. Carneiro D. C., Fernandez L. G., Monteiro-Cunha J. P., Benevides R. G., Cunha Lima S. T. A patent review of the antimicrobial applications of lectins: perspectives on therapy of infectious diseases // J Appl Microbiol. 2021. Vol. 132, № 2. P. 841-854.
23. Carneiro R. F., Torres R. C., Chaves R. P., de Vasconcelos M. A., de Sousa B. L., Goveia A. C., Arruda F. V., Matos M. N., Matthews-Cascon H., Freire V. N. et al. Purification, biochemical characterization, and amino acid sequence of a novel type of lectin from *Aplysia dactylomela* eggs with antibacterial/antibiofilm potential // Mar Biotechnol. 2017. Vol. 19. P. 49–64.
24. Chen K. T., Malo M. S., Moss A. K., Zeller S., Johnson P., Ebrahimi F., Mostafa G., Alam S. N., Ramasamy S., Warren H. S., Hohmann E. L., Hodin R. A. Identification of specific targets for the gut mucosal defense factor intestinal alkaline phosphatase // Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2010. Vol. 299. P. G467–G475.
25. Chernikov O., Kuzmich A., Chikalovets I., Molchanova V., Hua K. F. Lectin CGL from the sea mussel *Crenomytilus grayanus* induces Burkitt's

- lymphoma cells death via interaction with surface glycan // *Int J Biol Macromol.* 2017. Vol. 104. P. 508–514.
26. Chichvarkhin A. I., Kartavtsev I. F., Kafanov A. I. Genetic connections between some species of *Mytilidae* (Mollusca: Bivalvia) from the northern part of the Pacific Ocean // *Genetika.* 2000. Vol. 36. P. 1206–1220.
27. Chikalovets I., Filshtein A., Molchanova V., Mizgina T., Lukyanov P., Nedashkovskaya O., Hua K. F., Chernikov O. Activity dependence of a novel lectin family on structure and carbohydrate-binding properties // *Molecules.* 2020. Vol. 25, № 1. P. 150.
28. Chikalovets I. V., Kovalchuk S. N., Litovchenko A. P., Molchanova V. I., Pivkin M. V., Chernikov O. V. A new Gal/GalNAc-specific lectin from the mussel *Mytilus trossulus*: Structure, tissue specificity, antimicrobial and antifungal activity // *Fish Shellfish Immunol.* 2016. Vol. 50. P. 27-33.
29. Chistyulin D. K., Novikova O. D., Zelepuga E. A., et al. An Abnormally High Closing Potential of the OMPF Porin Channel from *Yersinia Ruckeri*: The Role of Charged Residues and Intramolecular Bonds // *Acta Naturae.* 2019. Vol. 11. №. 3. P. 89-98.
30. Coninck T. De. Van Damme E. J. M. Review: The multiple roles of plant lectins // *Plant Sci.* 2021. Vol. 313. P. 111096.
31. Cox A. D., Li J., Richards J. C. Identification and localization of glycine in the inner core lipopolysaccharide of *Neisseria meningitides* // *Eur J Biochem.* 2002. Vol. 269. P. 4169–4175.
32. Dam T. K., Brewer C. F. Lectins as pattern recognition molecules: the effects of epitope density in innate immunity // *Glycobiology.* 2010. Vol. 20, № 3. P. 270–279.
33. Dan X. L., Ng T. B. Lectins in human cancer: both a devil and an angel // *Curr Protein Pept Sci.* 2013. Vol.14. P. 481–491.

34. de Backer M., McSweeney S., Rasmussen H.B., Riise B.W., Lindley P., Hough E. The 1.9 Å crystal structure of heat-labile shrimp alkaline phosphatase // *J Mol Biol.* 2002. V. 318, № 5. P. 1265-1274.
35. Dixon I. M. C. Tissue non-specific alkaline phosphatase (TNAP): A player in post-MI cardiac fibrosis. // *EBioMedicine.* 2021. Vol. 68. P. 103430.
36. Dong H., Huang L., Zhao L., Zeng Q., Liu X., Sheng Y., Shi L., Wu G., Jiang H., Li F., Zhang L., Guo D., Li G., Hou W., Chen H. A critical review of mineral–microbe interaction and co-evolution: mechanisms and applications // *Natl Sci Rev.* 2022. Vol. 9, № 10. P. 128.
37. Drickamer K. Evolution of Ca(2+)-dependent animal lectins // *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 1993. Vol. 45. P. 207-232.
38. Drickamer K., Taylor M. E. Recent insights into structures and functions of C-type lectins in the immune system // *Curr Opin Struct Biol.* 2015. Vol. 34. P. 26–34.
39. Estaki M., DeCoffe D., Gibson D. L. Interplay between intestinal alkaline phosphatase, diet, gut microbes and immunity // *World J Gastroenterol.* 2014. Vol. 20. P. 15650-15656.
40. Fang J., Feng Y., Zhang Y., Wang A., Li J., Cui C., Guo Y., Zhu J., Lv Z., Zhao Z., Xu C., Shi H. Alkaline phosphatase-controllable and red light-activated RNA modification approach for precise tumor suppression // *J Am Chem Soc.* 2022. Vol. 144, № 50. P. 23061–23072.
41. Filshtein A. P., Chikalovets. I. V., Mizgina T. O., Lukyanov P. A., Hua K. F., Chernikov O. V. Spatial structure of lectin from the mussel *Mytilus trossulus*: in-sights from molecular modelling and practical proof // *Mar Drugs.* 2023. Vol. 21. P. 10.
42. Finn R. D., Coghill P., Eberhardt R. Y., Eddy S. R., Mistry J., Mitchell A. L., Potter S. C., Punta M., Qureshi M., Sangrador-Vegas A., et al. The Pfam protein families database: Towards a more sustainable future // *Nucleic Acids Res.* 2016. Vol. 44. P. D279–D285.

43. Fong Z. V., Winter J. M. Biomarkers in pancreatic cancer: diagnostic, prognostic, and predictive // *Cancer J.* 2012. Vol. 18. № 6. P. 530-538.
44. Freudenberg M. A., Tchaptchet S., Keck S., Fejer G., Huber M., Schütze N., Beutler B., Galanos C. Lipopolysaccharide sensing an important factor in the innate immune response to Gram-negative bacterial infections: benefits and hazards of LPS hypersensitivity. // *Immunobiology.* 2008. Vol. 213(3-4). P. 193-203.
45. Fridrich E., Whitfield C. Lipopolysaccharide inner core oligosaccharide structure and outer membrane stability in human pathogens belonging to the *Enterobacteriaceae* // *J Endotoxin Res.* 2005. Vol. 11. P. 133–144.
46. Fujii Y., Dohmae N., Takio K., Kawsar S. M. A., Matsumoto R., Hasan I., Koide Y., Kanaly R.A., Yasumitsu H., Ogawa Y., et al. 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. Vol. 287. P. 44772–44783.
47. Fujii Y., Gerdol M., Hasan I., Koide Y., Matsuzaki R., Ikeda M., Rajia S., Ogawa Y., Kawsar S.M.A., Ozeki Y. Phylogeny and properties of a novel lectin family with β -trefoil folding in mussels // *Trends Glycosci. Glycotechnol.* 2018. Vol. 30. P. J155–J168.
48. Fujii Y., Sugawara S., Araki D., Kawano T., Tatsuta T., Takahashi K., Kawsar S. M., Matsumoto R., Kanaly R. A., Yasumitsu H., et al. MRP1 expressed on Burkitt's lymphoma cells was depleted by catfish egg lectin through Gb3-glycosphingolipid and enhanced cytotoxic effect of drugs // *Protein J.* 2012. Vol. 31. P. 15–26.
49. Galdiero S., Falanga A., Cantisani M., Tarallo R., Della Pepa M. E., D'Oriano V., Galdiero M. Microbe-host interactions: structure and role of Gram-negative bacterial porins // *Curr Protein Pept Sci.* 2012. Vol. 13, № 8. P. 843-54.

50. Gasparian M. E., Ostapchenko V. G., Dolgikh D. A., Kirpichnikov M. P. Biochemical characterization of human enteropeptidase light chain. // Biochemistry (Mosc). 2006. Vol. 71(2). P. 113-9.
51. Gentile K., Bhide A., Kauffman J., Ghosh S., Maiti S., Adair J., Lee Tae-Hee, Sen A. Enzyme aggregation and fragmentation induced by catalysis relevant species // Phys Chem Chem Phys. 2021. Vol. 23. P. 20709-20717.
52. Gerdol M., Venier P. An updated molecular basis for mussel immunity // Fish Shellfish Immunol. 2015. Vol. 46. P. 17–38.
53. Golotin V., Balabanova L., Likhatskaya G., Rasskazov V. Recombinant production and characterization of a highly active alkaline phosphatase from marine bacterium *Cobetia marina* // Mar Biotechnol (NY). 2015. Vol. 17, № 2. P. 130-143.
54. Goth L., Asztalos L., Dezső B. Rare isoform of alkaline phosphatase in necrotic granulomatous inflammation of liver // Clinica Chimica Acta. 2008. Vol. 387. P. 175–176.
55. Gowda N.M., Goswami U., Khan M.I. Purification and characterization of a T-antigen specific lectin from the coelomic fluid of a marine invertebrate, sea cucumber (*Holothuria scabra*) // Fish Shellfish Immunol. 2008. Vol. 24. P. 450–458.
56. Green M. R., Sambrook J. Alkaline Phosphatase // Cold Spring Harb Protoc. 2020. Vol. 03, № 8. P. 100768.
57. Greig A. S., Bouillant A. M. Binding effects of concanavalin A on a coronavirus // Can J Comp Med. 1977. Vol. 41, № 1. P. 122–126.
58. Gudjónsdóttir K., Asgeirsson B. Effects of replacing active site residues in a cold-active alkaline phosphatase with those found in its mesophilic counterpart from *Escherichia coli* // FEBS J. 2008. Vol. 275(1). P.117-27.
59. Hasan I., Gerdol M., Fujii Y., Rajia S., Koide Y., Yamamoto D., Kawsar S. M. A., Ozeki Y. CDNA and gene structure of MytiLec-1, a bacteriostatic R-type lectin from the mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*). Mar Drugs. 2016. Vol. 14. P. 92.

60. Hasan I., Ozeki Y. Histochemical localization of N-acetylhexosamine-binding lectin HOL-18 in *Halichondria okadai* (Japanese black sponge), and its antimicrobial and cytotoxic anticancer effects // *Int J Biol Macromol*. 2019. Vol. 124. P. 819–827.
61. Hasan I., Watanabe M., Ishizaki N., Sugita-Konishi Y., Kawakami Y., Suzuki J., Dogasaki C., Rajia S., Kawsar S. M. A., Koide Y. et al. A galactose-binding lectin isolated from *Aplysia kurodai* (sea hare) eggs inhibits streptolysin-induced hemolysis // *Molecules*. 2014. Vol. 19. P. 13990–14003.
62. Hauksson J. B., Andrésón O. S., Ásgeirsson B. Heat-labile bacterial alkaline phosphatase from a marine *Vibrio* sp. // *Enzyme Microb Technol*. 2000. Vol. 27, № 1-2. P. 66-73.
63. Helland R., Larsen R. L., Asgeirsson B. The 1.4 Angstrom crystal structure of the large and cold-active *Vibrio* sp. alkaline phosphatase // *Biochim Biophys Acta*. 2009. Vol. 1794. P. 297–308.
64. Hossain A., Jung L. K. Expression of bone specific alkaline phosphatase on human B cells // *Cellular Immunology*. 2008. Vol. 253. P. 66–70.
65. Hsieh L. E., Lin C. N., Su B. L., Jan T. R., Chen C. M., Wang C. H., Lin D. S., Lin C. T., Chueh L. L. Synergistic antiviral effect of *Galanthus nivalis* agglutinin and nelfinavir against feline coronavirus // *Antivir Res*. 2010. Vol. 88, № 1. P. 25–30.
66. Ishibashi M., Yamashita S., Tokunaga M. Characterization of halophilic alkaline phosphatase from *Halomonas* sp. 593, a moderately halophilic bacterium // *Biosci Biotechnol Biochem*. 2005. Vol. 69, № 6. P. 1213-1216.
67. Jakó b M., Lubkowski J., O'Keefe B. R., Wlodawer A. Structure of a lectin from the sea mussel *Crenomytilus grayanus* (CGL) // *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun*. 2015. Vol. 71. P. 1429-36.
68. Kawasaki N., Rademacher C., Paulson J. C. CD22 Regulates Adaptive and Innate Immune Responses of B Cells // *J Innate Immun*. 2011. Vol. 3. P. 411–419.

69. Kawsar S. M. A., Matsumoto R., Fujii Y., Matsuoka H., Masuda N., Iwahara C., Yasumitsu H., Kanaly R.A., Sugawara S., Hosono M., et al. Cytotoxicity and glycan-binding profile of a D-galactose-binding lectin from the eggs of a Japanese sea hare (*Aplysia kurodai*) // *Protein J.* 2011. Vol. 30. P. 509–519.
70. Kawsar S. M. A., Matsumoto R., Fujii Y., Yasumitsu H., Dogasaki C., Hosono M., Nitta K., Hamako J., Matsui T., Kojima N. et al. Purification and biochemical characterization of D-galactose binding lectin from Japanese sea hare (*Aplysia kurodai*) eggs // *Biochemistry.* 2009. Vol. 74. P. 709–716.
71. Keyaerts E., Vijgen L., Pannecouque C., Van Damme E., Peumans W., Egberink H., Balzarini J., Van Ranst M. Plant lectins are potent inhibitors of coronaviruses by interfering with two targets in the viral replication cycle // *Antivir Res.* 2007. Vol. 75, № 3. P. 179–187.
72. Kilpatrick D. C. *Handbook of Animal Lectins: Properties and Biomedical Applications*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2000.
73. Kilpatrick D. C. Animal lectins: a historical introduction and overview // *Biochim Biophys Acta.* 2002. Vol. 1572. P. 187–197.
74. Kobori H., Sullivan C. W., Shizuya H. Heat-labile alkaline phosphatase from Antarctic bacteria: Rapid 5' end-labeling of nucleic acids // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1984. Vol. 81, № 21. P. 6691-6695.
75. Koutsioulis D., Lyskowski A., Mäki S., Guthrie E., Feller G., Bouriotis V., Heikinheimo P. Coordination sphere of the third metal site is essential to the activity and metal selectivity of alkaline phosphatases // *Protein Sci.* 2010. Vol. 19, № 1. P. 75-84.
76. Kovalchuk S. N., Chikalovets I. V., Chernikov O. V., Molchanova V. I., Li W., Rasskazov V. A., Lukyanov P. A. CDNA cloning and structural characterization of a lectin from the mussel *Crenomytilus grayanus* with a unique amino acid sequence and antibacterial activity // *Fish Shellfish Immunol.* 2013. Vol. 35. P. 1320–1324.
77. Kumaki Y., Wandersee M. K., Smith A. J., Zhou Y., G. Simmons, N. M. Nelson, K. W. Bailey, Z. G. Vest, J. K. Li, Chan P. K., Smee D. F., Barnard

- D. L. Inhibition of severe acute respiratory syndrome coronavirus replication in a lethal SARS-CoV BALB/c mouse model by stinging nettle lectin, *Urtica dioica* agglutinin // *Antivir Res.* 2011. Vol. 90, № 1. P. 22–32.
78. Kumar H., Kawai T., Akira S. Pathogen recognition by the innate immunesystem // *Int Rev Immunol.* 2011. Vol. 30, № 1. P. 16–34.
79. Labute P. The generalized born/volume integral (GB/VI) implicit solvent model: estimation of the free energy of hydration using London dispersion instead of atomic surface area // *J Comput Chem.* 2008 Vol. 29. P. 1963–1968.
80. Laemmli U. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. // *Nature.* 1970. Vol. 227. P. 680-685.
81. Lalles J. P. Intestinal alkaline phosphatase: novel functions and protective effects // 2013. *Nutr Rev.* Vol. 72. P. 82–94.
82. Lardone R. D., Garay Y. C., Parodi P., de la Fuente S., Angeloni G., Bravo E.O., Schmider A. K., Irazoqui F.J. How glycobiology can help us treat and beat the COVID-19 pandemic // *J Biol Chem.* 2021. Vol. 296. P. 100375.
83. Latip M. A., Hamid A. A., Hadry Nordin N. F. Microbial hydrolytic enzymes: *In silico* studies between polar and tropical regions // *Polar Sci.* 2019. Vol. 20. P. 9-18.
84. Le Du M. H., Stigbrand T., Taussig M. J. Crystal structure of alkaline phosphatase from human placenta at 1.8 Å resolution – implication for a substrate specificity // *J Biochem Chem.* 2001. Vol. 276, № 12. P. 9158-9165.
85. Lea M. A., Qureshi M. S., Buxhoeveden M., Gengel N., Kleinschmit J., desBordes C. Regulation of the proliferation of colon cancer cells by compounds that affect glycolysis, including 3-bromopyruvate, 2-deoxyglucose and biguanides // *Anticancer Res.* 2013. Vol. 33. P. 401–407.
86. Lee D. H., Choi S. L., Rha E., Kim S. J., Yeom S. J., Moon J. H., Lee S. G. A novel psychrophilic alkaline phosphatase from the metagenome of tidal flat sediments // *BMC Biotechnol.* 2015. Vol. 15. P. 1-13.

87. Lei W., Ni H., Herington J., Reese J., Paria B. C. Alkaline phosphatase protects lipopolysaccharide-induced early pregnancy defects in mice // *Plos One*. 2015. P. 0123243.
88. Le Vinh B., Akkuş-Dağdeviren Z. B., Le N. M. N., Nazir I., Bernkop-Schnürch A. Alkaline phosphatase: a reliable endogenous partner for drug delivery and diagnostics // *Adv Therap*. 2022. Vol. 5. P. 2100219.
89. Levitt M. D., Hapak S. M., Levitt D. G. Alkaline phosphatase pathophysiology with emphasis on the seldom-discussed role of defective elimination in unexplained elevations of serum ALP - A Case report and literature review clinical and experimental gastroenterology // *Clin Exp Gastroenterol*. 2022. Vol. 15. P. 41–49.
90. Liao J. H., Chien C. T., Wu H. Y., Huang K. F., Wang I., Ho M. R., Tu I. F., Lee I. M., Li W., Shih Y. L. et al. A Multivalent marine lectin from *Crenomytilus grayanus* possesses anti-cancer activity through recognizing globotriose Gb3 // *J Am Chem Soc*. 2016. Vol. 138. P. 4787–4795.
91. Liu Y. M., Shahed-Al-Mahmud M., Chen X., Chen T. H., Liao K. S., Lo J. M., Wu Y. M., Ho M. C., Wu C. Y., Wong C. H., Jan J. T., Ma C. A carbohydrate-binding protein from the edible lablab beans effectively blocks the infections of influenza viruses and SARS-CoV-2 // *Cell Rep*. 2020. Vol. 32, № 6. P. 108016.
92. Lodowska J., Wolny D., Jaworska-Kik M., Kurkiewicz S., Dzierzewicz Z., Weglarz L. The chemical composition of endotoxin isolated from intestinal strain of *Desulfovibrio desulfuricans* // *Sci World J*. 2012. Vol. 2012. P. 647352.
93. Lokhande K. B., Apte G. R., Shrivastava A., Singh A., Pal J. K., Venkateswara Swamy K., Gupta R. K. Sensing the interactions between carbohydrate-binding agents and N-linked glycans of SARS-CoV-2 spike glycoprotein using molecular docking and simulation studies // *J Biomol Struct Dyn*. 2020. Vol. 40. P. 1–19.

94. Lu Z., Chen W., Liu R., Hu X., Ding Y. A novel method for high-level production of psychrophilic TAB5 alkaline phosphatase // *Protein Expr Purif.* 2010. Vol. 74, № 2. P. 217-22.
95. Luo H., Benner R., Longa R. A., Hu J. Subcellular localization of marine bacterial alkaline phosphatases // *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009. Vol. 106. P. 21219–21223.
96. Lynes M. D., Widmaier E. P. Involvement of CD36 and intestinal alkaline phosphatases in fatty acid transport in enterocytes, and the response to a high-fat diet // *Life Sci.* 2011. Vol. 88. P. 384–391.
97. Macauley M. S., Crocker P. R., Paulson J. C. Siglec-mediated regulation of immune cell function in disease // *Nat Rev Immunol.* 2014. Vol. 14. P. 653–666.
98. Mahajan V. S., Pillai S. Sialic acids and autoimmune disease. *Immunol Rev.* 2016. Vol. 269. P. 145–161.
99. Malo M. S., Alam S. N., Mostafa G., Zeller S. J., Johnson P. V., N. Mohammad N., Chen K. T., Moss A. K., Ramasamy S., Faruqi A., Hodin S., Malo P. S., Ebrahimi F., Biswas B., Narisawa S., Millan J. L., Warren H. S., Kaplan J. B., Kitts C. L., Hohmann E. L., Hodin R.A. Intestinal alkaline phosphatase preserves the normal homeostasis of gut microbiota // *Gut.* 2010. Vol. 59. P. 1476–1484.
100. Marandi M. V., Mittal K. R. Role of outer membrane protein H (OmpH)- and OmpA-specific monoclonal antibodies from hybridoma tumors in protection of mice against *Pasteurella multocida*. II *Infect Immun.* 1997. Vol. 65, № 11. P. 4502-4508.
101. Martinez-Moya P., Ortega-Gonzalez M., Gonzalez R., Anzola A., Ocon B., Hernandez-Chirlaque C., Lopez-Posadas R., Suarez M. D., Zarzuelo A., Martinez-Augustin O., de Medina F. S. Exogenous alkaline phosphatase treatment complements endogenous enzyme protection in colonic inflammation and reduces bacterial translocation in rats // *Pharmacological Research.* 2012. Vol. 66. P. 144– 153.

102. Mason C. P., Tarr A. W. Human lectins and their roles in viral infections // *Molecules*. 2015. Vol. 20. P. 2229–2271.
103. McComb R. B., Bowers G. N. Jr., Posen S. Alkaline Phosphatase. New York: Plenum. 1979.
104. McEver R. P. Selectins: initiators of leucocyte adhesion and signalling at the vascular wall // *Cardiovasc Res*. 2015. Vol. 107, № 3. P. 331–339.
105. McMahon S. A., Miller J. L., Lawton J. A., Kerkow D. E., Hodes A., Marti-Renom M. A., Doulatov S., Narayanan E., Sali A., Miller J. F., Ghosh P. The C-type lectin fold as an evolutionary solution for massive sequence variation // *Nat Struct Mol Biol*. 2005. Vol. 12, № 10. P. 886–892.
106. Medzhitov R., Janeway Jr. C. A. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system // *Science*. 2002. Vol. 296, № 5566. P. 298–300.
107. Meiers J., Siebs E., Zahorska E., Titz A. Lectin antagonists in infection, immunity, and inflammation // *Curr Opin Chem Biol*. 2019. Vol. 53. P. 51–67.
108. Menzorova N. I., Seytkalieva A. V., Rasskazov V. A. Enzymatic methods for the determination of pollution in seawater using salt resistant alkaline phosphatase from eggs of the sea urchin *Strongylocentrotus intermedius* // *Mar Pollut Bull*. 2014. Vol. 79. P. 188-195.
109. Estabrook M. M., Jack D. L., Klein N. J., Jarvis G. A.; Mannose-Binding Lectin Binds to Two Major Outer Membrane Proteins, Opacity Protein and Porin, of *Neisseria meningitidis*. // *J Immunol*. 2004. Vol. 172, № 6. P. 3784–3792.
110. Millán J. L. Alkaline Phosphatases: Structure, substrate specificity and functional relatedness to other members of a large superfamily of enzymes // *Purinergic Signal*. 2006. Vol. 2, № 2. P. 335–341.
111. Millet J. K., Séron K., Labitt R. N., Danneels A., Palmer K. E., Whittaker, J. Dubuisson G. R., Belouzard S. Middle East respiratory

- syndrome coronavirus infection is inhibited by griffithsin // *Antivir Res.* 2016. Vol. 133. P. 1–8.
112. Motohashi S., Jimbo M., Naito T., Suzuki T., Sakai R., Kamiya H. Isolation, amino acid sequences, and plausible functions of the galacturonic acid-binding egg lectin of the Sea hare *Aplysia kurodai* // *Mar Drugs.* 2017. Vol. 15. P. 161.
113. Moulton J. Comparative modeling in structural genomics // *Structure.* 2007. Vol. 16. P. 14–16.
114. Moura R. M., Queiroz A. F., Fook J. M., Dias A. S., Monteiro N. K., Ribeiro J. K., Moura G. E., Macedo L. L., Santos E. A., Sales M. P. CvL, a lectin from the marine sponge *Cliona varians*: Isolation, characterization and its effects on pathogenic bacteria and *Leishmania promastigotes* // *Comp Biochem Physiol. A Mol Integr Physiol.* 2006. Vol. 145. P. 517–523.
115. Munkley J., Scott E. Targeting aberrant sialylation to treat cancer // *Medicines.* 2019. Vol. 6. P. 102.
116. Murakawa T., Yamagata H., Tsuruta H., Aizono Y. Cloning of cold-active alkaline phosphatase gene of a psychrophile, *Shewanella* sp., and expression of the recombinant enzyme // *Biosci Biotechnol Biochem.* 2002. Vol. 66, №4. P. 754-761.
117. Nasu E., Ichiyanagi A., Gomi K. Cloning and expression of a highly active recombinant alkaline phosphatase from psychrotrophic *Cobetia marina* // *Biotechnol Lett.* 2012. Vol. 34, № 2. P. 321-328.
118. Neary J. M., Yi K. S., Karalus R. J., Murphy T. F. Antibodies to loop 6 of the P2 porin protein of nontypeable *Haemophilus influenzae* are bactericidal against multiple strains // *Infect Immun.* 2001. Vol. 69, №. 2. P. 773–778.
119. Nikaido H., Song S. A., Shaltiel L., Nurminen M. Outer membrane of *Salmonella*. XIV. Reduced transmembrane diffusion rate in porin-deficient mutants. // *Biochem Biophys Res Commun.* 1977. Vol. 76, № 2. P. 324-330.

120. Noskova Y., Likhatskaya G., Terentieva N., Son O., Tekutyeva L., Balabanova L. A novel alkaline phosphatase/phosphodiesterase, CamPhoD, from marine bacterium *Cobetia amphilecti* KMM 296 // *Mar Drugs*. 2019. Vol. 22, № 17(12). P. 657.
121. Novikova O. D., Frolova G. M., Vakorina T. I., Tarankova Z. A., Glazunovet V. P. Conformational stability and immunochemical properties of yersinin--a basic protein of the outer membrane of the *Pseudotuberculosis* microbe// *Rus J Bioorg Chem*. 1989. Vol. 15. P. 763–772.
122. O’Keefe B. R., Giomarelli B., Barnard D. L., Shenoy S. R., Chan P. K., McMahon J. B., Palmer K. E., Barnett B. W., Meyerholz D. K., Wohlford-Lenane C. L., McCray Jr. P. B. Broad-spectrum *in vitro* activity and *in vivo* efficacy of the antiviral protein griffthsin against emerging viruses of the family *Coronaviridae* // *J Virol*. 2010. Vol. 84, № 5. P. 2511–2521.
123. Ohtsubo K., Marth J. D. Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease // *Cell*. 2006. Vol. 126. P. 855–867.
124. Okazaki T., Suzuki M., Nagai T., Nagai T. Abnormal alkaline phosphatase isoenzymes detected in the serum of elderly patients // *Scand J Clin Lab Invest*. 2004. Vol. 64. P. 611–617.
125. Omelon S., Ariganello M., Bonucci E., Grynypas M., Nanci A. A review of phosphate mineral nucleation in biology and geobiology // *Calcif Tissue Int*. 2013. Vol. 93. P.382–396.
126. Palomares F., Gomez F., de la Fuente M. C., PerezSanchez N., Torres M. J., Mayorga C., Rojo J., Ramos-Soriano J. Fucodendropeptides induce changes in cells of the immune system in food allergic patients via DC-SIGN receptor // *Carbohydr Res*. 2022. Vol. 517. P. 108580.
127. Peters E., van Elsas A., Heemskerk S., Jonk L., van der Hoeven J., Arend J., Masereeuw R., Pickkers P. Alkaline phosphatase as a treatment of sepsis-associated acute kidney injury // *J Pharmacol Exp Ther*. 2013. Vol. 344. P. 2–7.

128. Phale P. S., Philippsen A., Kiefhaber T., Koebnik R., Phale V. P., Schirmer T., Rosenbusch J. P. Stability of trimeric OmpF porin: the contributions of the latching loop L2. // *Biochemistry*. 1998. Vol. 37, № 45. P. 15663-15670.
129. Plisova E. Yu., Balabanova L. A., Ivanova E. P., Kozhemyako V. B., Mikhailov V. V., Agafonova E. V., Rasskazov V. A. A highly active alkaline phosphatase from the marine bacterium *Cobetia* // *Mar Biotechnol* (NY). 2005. Vol. 7, № 3. P. 173-178.
130. Powlesland A. S., Hitchen P. G., Parry S., Graham S. A., Barrio M. M., Elola M. T., Mordoh J., Dell A., Drickamer K., Taylor M. E. Targeted glycoproteomic identification of cancer cell glycosylation // *Glycobiology*. 2009. Vol. 19. P. 899–909.
131. Qian B., Raman S., Das R., Bradley P., McCoy A. J., Read R. J., Baker D. High-resolution structure prediction and the crystallographic phase problem // *Nature*. 2007. Vol. 450. P.259–261.
132. Queiroz A. F. S., Silva R. A., Moura R. M., Dreyfuss J. L., Paredes-Gamero E. J., Souza A. C. S., Tersariol I. L. S., Santos E. A., Nader H. B., Justo G. Z. et al. Growth inhibitory activity of a novel lectin from *Cliona varians* against K562 human erythroleukemia cells // *Cancer Chemother Pharmacol*. 2009. Vol. 63. P. 1023–1033.
133. Rahimi N. C-type Lectin CD209L/L-SIGN and CD209/ DC-SIGN: Cell adhesion molecules turned to pathogen recognition receptors // *Biology*. 2020. Vol. 10. P. 1.
134. Raposo C. D., Canelas A. B., Barros M. T. Human Lectins, Their Carbohydrate Affinities and Where to Find Them // *Biomolecules*. 2021. Vol. 11. P. 188.
135. Rentea R. M., Liedel J. L., Fredrich K., Pritchard K., Oldham K. T., Simpson P. M., Gourlay D. M. Enteral intestinal alkaline phosphatase administration in newborns decreases iNOS expression in a neonatal

- necrotizing enterocolitis rat model // J Pediatr Surg. 2013. Vol. 48. P. 124–128.
136. Rentea R. M., Liedel J. L., Welak S. R., Cassidy L. D., Mayer A. N., Pritchard K. A., Oldham K. T., Gourlay D. M. Intestinal alkaline phosphatase administration in newborns is protective of gut barrier function in a neonatal necrotizing enterocolitis rat model // J Pediatr Surg. 2012. Vol. 47. P. 1135–1142.
137. Rina M., Pozidis C., Mavromatis K., Tzanodaskalaki M., Kokkinidis M., Bouriotis V. Alkaline phosphatase from the Antarctic strain TAB5 // Europ J Biochem. 2000. Vol. 267, № 4. P. 1230-1238.
138. Rodrigues J. A., Acosta-Serrano A., Aebi M., Ferguson M. A., Routier F. H. Parasite Glycobiology: A Bittersweet Symphony // PLoS Pathog. 2015. Vol. 11, № 11. P. e1005169.
139. Roy R., Murphy P. V., Gabius H. J. Multivalent carbohydrate-lectin interactions: how synthetic chemistry enables insights into nanometric recognition // Molecules. 2016. Vol. 21. P. 629.
140. Sano K., Ogawa H. Hemagglutination (inhibition) assay. Methods Mol Biol. 2014. Vol. 1200. P. 47-52.
141. Santiago M., Ramírez-Sarmiento C. A., Zamora R. A., Parra L. P. Discovery, molecular mechanisms, and industrial applications of cold-active enzymes // Front Microbiol. 2016. Vol. 7. P. 1408.
142. Schroder H. C., Ushijima H., Krasko A., Gamulin V., Thakur N. L., Diehl-Seifert B., Muller I. M., Muller W. E. Emergence and disappearance of an immune molecule, an antimicrobial lectin, in basal metazoa. A tachylectin-related protein in the sponge *Suberites domuncula* // J Biol Chem. 2003. Vol. 278. P. 32810–32817.
143. Shanmugham L. N., Petrarca C., Castellani M. L., Symeonidou I., Frydas S., Vecchiet J., Falasca K., Tete S., Conti P., Salini V. IL-1b induces alkaline phosphatase in human phagocytes // Arch Med Res. 2007. Vol. 38. P. 39-44.

144. Sharon N. Carbohydrates as future anti-adhesion drugs for infectious diseases // *Biochim Biophys Acta*. 2006. Vol. 1760, № 4. P. 527–537.
145. Sharon N. Lectins: carbohydrate-specific reagents and biological recognition molecules // *J Biol Chem*. 2007. Vol. 282, № 5. P. 2753-2764.
146. Sharon N., Lis H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules // *Glycobiology*. 2004. Vol. 14. P. 53R–62R.
147. Siddiqui S. S., Matar R., Merheb M., Hodeify R., Vazhappilly C. G., Marton J., Shamsuddin S. A., Zouabi H. Al. Siglecs in brain function and neurological disorders // *Cells*. 2019. Vol. 8. P. 1125.
148. Singh S. B., Coffman C. N., Varga M. G., Carroll-Portillo A., Cody A. Braun C. B., Lin H. C. Intestinal alkaline phosphatase prevents sulfate reducing bacteria-Induced increased tight junction permeability by inhibiting snail pathway // *Front Cell Infect Microbiol Sec. Bacteria and Host*. 2022. Vol. 12. P. 882498.
149. Skouri-Panet F., Benzerara K., Cosmidis J., Férard C., Caumes G., De Luca G., Heulin T., Duprat E. *In vitro* and *in silico* evidence of phosphatase diversity in the biomineralizing bacterium *Ramlibacter tataouinensis* // *Front Microbiol*. 2018. Vol. 8. P. 2592.
150. Smalås A. O., Leiros H. K. S., Os V., Willassen N. P. Cold adapted enzymes // *Biotech Ann Rev*. 2000. Vol. 6. P.1-57.
151. Srivastava A., Saavedra D. E. M., Thomson B. et al. Enzyme promiscuity in natural environments: alkaline phosphatase in the ocean // *ISME J*. 2021. Vol. 15. P. 3375–3383.
152. Stoff M., Ebbecke T., Ciurkiewicz M., Pavasutthipaisit S., Mayer-Lambertz S., Störk T., Pavelko K., Baumgärtner W., Jung K., Lepenies B., Beineke A. C-type lectin receptor DCIR contributes to hippocampal injury in acute neurotropic virus infection // *Sci Rep*. 2021; 11: 23819.
153. Stowell S. R., Ju T. Cummings R. D. Protein glycosylation in cancer // *Annu Rev Pathol*. 2015. Vol. 10. P. 473–510.

154. Suzuki Y., Takano K., Kanaya S. Stabilities and activities of the N- and C-domains of FKBP22 from a psychrotrophic bacterium overproduced in *Escherichia coli* // FEBS J. 2005. Vol. 272, № 3. P. 632-642.
155. Szeberényi J. Problem-solving test: DNA manipulation with alkaline phosphatase and polynucleotide kinase // Biochem Mol Biol Educ. 2014. Vol. 42, № 4. P. 348-50.
156. Terada D., Kawai F., Noguchi H., Unzai S., Hasan I., Fujii Y., Park S. Y., Ozeki Y., Tame J. R. H. Crystal structure of MytiLec, a galactose-binding lectin from the mussel *Mytilus galloprovincialis* with cytotoxicity against certain cancer cell types // Sci Rep. 2016. Vol. 6. P. 28344.
157. Thompson A. J., de Vries R. P., Paulson J. C. Virus recognition of glycan receptors // Curr Opin Virol. 2019. Vol. 34. P. 117–129.
158. Tian P., Engelbrektson A., Mandrell R. Two-Log Increase in sensitivity for detection of norovirus in complex samples by concentration with porcine gastric mucin conjugated to magnetic beads // Appl Environ Microbiol. 2008. Vol. 74. P. 4271–4276.
159. Tsaneva M., Van Damme E. J. M. 130 years of plant lectin research // Glycoconj J. 2020. Vol. 37. P. 533–551.
160. Tu Z., Ke L. H., He G. The application of alkaline phosphatase labeled HBV probe in serum detection // Virus Genes. 2004. Vol. 28. P. 151-156.
161. Vaishnava S., Hooper L. V. Alkaline phosphatase: keeping the peace at the gut epithelial surface // Cell host & microbe. 2007. Vol. 2. P. 365–367.
162. Van Breedam W., Pöhlmann S., Favoreel H. W., de Groot R. J., Nauwynck H. J. Bitter-sweet symphony: glycan-lectin interactions in virus biology // FEMS Microbiol Rev. 2014. Vol. 38, № 4. P. 598–632.
163. Van Kooyk Y., Rabinovich G. A. Protein-glycan interactions in the control of innate and adaptive immune responses // Nat Immunol. 2008. Vol. 9, № 6. P. 593–601.
164. Varki A. Since there are PAMPs and DAMPs, there must be SAMPs Glycan “self-associated molecular patterns” dampen innate immunity, but

- pathogens can mimic them // *Glycobiology*. 2011. Vol. 21, № 9. P.1121–1124.
165. Vaskovsky V. E., Kostetsky E. Y., Vasendin I. M. A universal reagent for phospholipid analysis // *J Chromatogr*. 1975. Vol. 114, № 1. P. 129-141.
166. Vasta G. R., Ahmed H. *Animal lectins: a functional view*. Boca Raton: CRC Press; 2008. ISBN 9780849372698 - CAT# 7269; *Classification of Animal Lectins. Part I: Structures and functions of animal lectins*.
167. Vimalraj S. Alkaline phosphatase: Structure, expression and its function in bone mineralization // *Gene*. 2020. Vol. 5, № 754. P. 144855.
168. Vukobrat-Bijedic Z., Husic-Selimovic A., Sofic A., Bijedic N., Bjelogrljic I., Gogov B., Mehmedovic A. Cancer antigens (CEA and CA 19-9) as markers of advanced stage of colorectal carcinoma // *Med Arch*. 2013. Vol. 67, № 6. P. 397-401.
169. Wang H., Gao J., Wong A. H., Hu K., Li W., Wang Y., Sang J. Rfa2 is specifically dephosphorylated by Pph3 in *Candida albicans* // *Biochem J*. 2013. Vol. 449, № 3. P. 673-81.
170. Wang J. H., Kong J., Li W., Molchanova V., Chikalovets I., Belogortseva N., Lukyanov P., Zheng Y. T. A beta-galactose-specific lectin isolated from the marine worm *Chaetopterus variopedatus* possesses anti-HIV-1 activity // *Comp Biochem Physiol, C Toxicol Pharmacol*. 2006. Vol. 142. P. 111–117.
171. Wang W., Wu J., Hu Y., Wu G., Yu C., Xu K., Liu X., Wang Q., Huang W., Wang L., Wang Y. Lentil lectin derived from *Lens culinaris* exhibit broad antiviral activities against SARS-CoV-2 variants // *Emerg Microbes Infect*. 2021. Vol. 10, № 1. P. 1519–1529.
172. Watanabe Y., Allen J. D., Wrapp D., McLellan J. S., Crispin M. Site-specific glycan analysis of the SARS-CoV-2 spike // *Science*. 2020. Vol. 369. P. 330–333.
173. Weis W. I., Taylor M. E., Drickamer K. The C-type lectin superfamily in the immune system // *Immunol Rev*. 1998. Vol. 163. P. 19–34.

174. Whitehouse J. S., Riggle K. M., Purpi D. P., Mayer A. N., Pritchard K. A., Oldham K. T., Gourlay D. M. The protective role of intestinal alkaline phosphatase in necrotizing enterocolitis // *Journal of Surgical Research*. 2010. Vol. 163. P. 79–85.
175. Wu A. M., Lisowska E., Duk M., Yang Z. Lectins as tools in glycoconjugate research // *Glycoconj J*. 2009. Vol. 26. P. 899.
176. Wu C., Zhang R., Du W., Cheng L., Liang G. Alkaline phosphatase-triggered self-assembly of near-infrared nanoparticles for the enhanced photoacoustic imaging of tumors // *Nano Lett*. 2018. Vol. 18, № 12. P. 7749–7754.
177. Wu H. T., Li D. M., Zhu B. W. et al. Purification and characterization of alkaline phosphatase from the gut of sea cucumber *Stichopus japonicus* // *Fish Sci*. 2013. Vol. 79. P. 477–485.
178. Yang Z., Hua L., Yang M., Li W., Ren Z., Zheng X., Chen H., Long Q., Bai H., Huang W., Ma Y. Polymerized porin as a novel delivery platform for coronavirus vaccine. // *J Nanobiotechnol*. 2022. Vol. 20, P. 260.
179. Yau T., Dan X., Ng C. C. W., Ng T. B. Lectins with potential for anti-Cancer therapy // *Molecules*. 2015. Vol. 20. P. 3791–3810.
180. Yuivar Ya., Barahona S., Alcaíno J., Cifuentes V., Baeza M. Biochemical and thermodynamical characterization of glucose oxidase, invertase, and alkaline phosphatase secreted by antarctic yeasts // *Front Mol Biosci*. 2017. Vol. 4. P. 86.
181. Zaher D. M., El-Gamal M. I., Omar H. A., Aljareh S. N., Al-Shamma S.A., Ali A.J., Zaib S., Iqbal J. Recent advances with alkaline phosphatase isoenzymes and their inhibitors // *Arch Pharm (Weinheim)*. 2020. Vol. 353, № 5. P. e2000011.
182. Zalatan J. G., Fenn T. D., Herschlag D. Comparative enzymology in the alkaline phosphatase superfamily to determine the catalytic role of an active-site metal ion // *J Mol Biol*. 2008. Vol. 384, № 5. P. 1174-1189.

183. Zelensky A. N., Gready J. E. The C-type lectin-like domain superfamily // FEBS J. 2005. Vol. 272. P. 6179–6217.
184. Zhang R. Q., Chen Q. X., Xiao R., Xie L. P., Zeng X. G., Zhou H. M. Inhibition kinetics of green crab (*Scylla serrata*) alkaline phosphatase by zinc ions: a new type of complexing inhibition // Biochim Biophys Acta. 2001. V. 1545. P. 6-12.
185. Zhang Z., Zhou Y., Qian H., Shao G., Lu X., Chen Q., Sun X., Chen D., Yin R., Zhu H., Shao Q., Xu W. Stemness and inducing differentiation of small cell lung cancer NCI-H446 cells // Cell Death and Disease. 2013. Vol. 4. P. e633.
186. Zheng L., Ren M., Xie E., Ding A., Liu Y., Deng S., Zhang D. Roles of phosphorus sources in microbial community assembly for the removal of organic matters and ammonia in activated sludge // Front Microbiol. 2019. Vol. 10. P. 1023.
187. Zurga S., Nanut M. P., Kos J., Sabotic J. Fungal lectin MpL enables entry of protein drugs into cancer cells and their subcellular targeting // Oncotarget. 2017. Vol. 8. P. 26896–26910.
188. Аверьянов А. В., Гельфанд Б. Р. Перспективы лечения сепсиса // Журнал «Клиническая практика». 2010. Том. 2. С. 13.
189. Балабанова Л. А., Рассказов В. А. Плаزمида 40Ph, определяющая синтез щелочной фосфатазы *SmAP*, штамм *E. coli rosetta* (DE3)/40Ph – продуцент химерного белка, включающего аминокислотную последовательность рекомбинантной щелочной фосфатазы *SmAP*, и способ ее получения. Пат. 2447151С1. 2012.
190. Вострикова О. П. Иммуный ответ к основному порообразующему белку наружной мембраны *Yersinia pseudotuberculosis* у людей и экспериментальных животных. М., 2000. 15 с. Деп. в ВИНТИ 28.03.00, № 795–ВОО.

191. Мазин А. В., Кузнецов К. Д., Краев А. С. Методы молекулярной генетики и генной инженерии // Наука. 1990.
192. Маниатис Т., Фрич Э., Сембрук Д. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование // Москва «Мир». 2004.
193. Новикова О. Д., Вострикова О. П., Портнягина О. Ю., Хоменко В. А., Соловьева Т. Ф., Оводов Ю. С. Антигенные свойства поринов наружной мембраны рода иерсиний // Бюлл. эксп. биол. мед. 1996. № 6. С. 657–660.
194. Новикова О. Д., Хоменко В. А., Вострикова О. П., Портнягина О. Ю., Сидорова О. В., Чистялин Д. К., Соловьева Т. Ф. Порообразующие белки наружной мембраны некоторых грамотрицательных бактерий. Структура и свойства // Вестник ДВО РАН. 2014. № 1. С. 120-134.
195. Портнягина О. Ю., Вострикова О. П., Новикова О. Д., Исаева М. П., Стенкова А. М., Гузев К. В., Малашенкова В. Г., Хоменко В. А., Сидорова О. В., Горбач Т. А., Соловьева Т. Ф. Разработка и апробация высокоэффективных тест-систем для диагностики иерсиниозов // Тихоокеанский медицинский журнал. 2010. № 3. С. 85-90.
196. Портнягина О. Ю., Вострикова О. П., Хоменко В. А., Новикова О. Д., Соловьева Т. Ф., Бениова С. Н., Малашенкова В. Г., Гордеев А. В. Апробация иммуноферментной тест-системы на основе белка-порины из *Yersinia pseudotuberculosis* для диагностики псевдотуберкулеза (экстраинтестинального иерсиниоза) у детей // Иммунология. 2000. № 2. С. 59–61.
197. Портнягина О. Ю., Новикова О. Д., Соловьева Т. Ф. Иммунологические свойства неспецифических поринов наружной мембраны грамотрицательных бактерий // Биологические мембраны. 2005. Т. 22, № 5. С. 357–365.
198. Портнягина О. Ю., Сидорова О. В., Хоменко В. А., Новикова О. Д., Вострикова О. П., Соловьева Т. Ф. // Бюлл. эксп. биол. мед. 2009. №7. С. 85-88.

199. Салганик Р. И. Методы молекулярной генетики и генной инженерии // Новосибирск "Наука" 1990.
200. Сейткалиева А. В., Мензорова Н. И., Вакорина Т. И., Дмитренко П. С., Рассказов В. А. Новая солейстойчивая щелочная фосфатаза из яйцеклеток морского ежа *Strongylocentrotus intermedius* // Прикл. биохим. микробиол. 2017. Т. 53, № 1. С. 1–10.
201. Хоменко В. А., Портнягина О. Ю., Новикова О. Д., Исаева М. П., Ким Н. Ю., Лихацкая Г. Н., Вострикова О. П., Соловьева Т. Ф. Выделение и характеристика рекомбинантного OmpF-подобного порина из наружной мембраны *Yersinia pseudotuberculosis* // Биоорганическая химия. 2008. Т. 34, № 2. С. 177–184.
202. Чикаловец И. В., Кузьмич А. С., Молчанова В. И., Черников О. В., Взаимодействие лектина CGL с гликанами опухолевых клеток // Российский симпозиум «Белки и пептиды», Новосибирск, 12–17 июля 2015 г. С. 429.
203. Чикаловец И. В., Молчанова В. И., Булгаков А. А., Черников О. В., Петрова И. Ю., Лукьянов П. А. Использование лектинов морских гидробионтов для диагностики ряда социально значимых заболеваний человека // Вестник ДВО РАН. 2010. № 5, С. 125-130.