

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

Федеральное государственное автономное образовательное  
учреждение высшего образования  
«Дальневосточный федеральный университет»

На правах рукописи

**Мизгина Татьяна Олеговна**

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

Специальность 1.4.9 – Биоорганическая химия

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

Научные руководители:

к.х.н., доцент Чикаловец Ирина Владимировна

к.б.н. Черников Олег Викторович

Владивосток – 2023

## Оглавление

Список сокращений и условных обозначений .....	7
Введение .....	9
1 Обзор литературы.....	15
1.1 Морские организмы как источники биологически активных соединений	15
1.2 Тип Mollusca: класс Bivalvia.....	16
1.2.1 Иммунитет Bivalvia .....	17
1.2.2 Компоненты и механизмы клеточного иммунитета.....	18
1.2.3 Гуморальные факторы и связанные с ними защитные механизмы .....	20
1.3 Лектины морских организмов. Структура и функция.....	23
1.3.1 Лектины С-типа .....	24
1.3.2 Фукозоспецифичные лектины .....	30
1.3.3 Рамнозоспецифичные лектины.....	34
1.3.4 Галектины .....	40
2 Материалы и методы исследования .....	46
2.1 Материалы и реактивы.....	46
2.2 Общие методы .....	49
2.2.1 Метод Бредфорда .....	49
2.2.2 Фенол – сернокислотный метод .....	49
2.2.3 Получение суспензии эритроцитов .....	49
2.2.4 Получение суспензии трипсинизированных эритроцитов.....	49
2.2.5 Получение суспензии фиксированных эритроцитов.....	49
2.2.6 Получение десиалированного PSM.....	50
2.2.7 Реакция прямой гемагглютинации (РПГА).....	50
2.2.8 Реакция ингибирования РПГА .....	50
2.2.9 Электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии ДСН (ДСН- ПААГ-электрофорез) .....	51

2.3 Методы выделения и очистки лектинов из двустворчатого моллюска	
<i>G. yessoensis</i> .....	51
2.3.1 Сбор сырья .....	51
2.3.2 Экстракция .....	51
2.3.3 Получение гемолимфы .....	52
2.3.4 Определение титра гемагглютинирующей активности (ГА) лектинов в экстрактах органов и гемолимфе моллюска .....	52
2.3.5 Синтез аффинного сорбента лактозил-сефароза .....	52
2.3.6 Синтез аффинного сорбента PSM-сефароза .....	53
2.3.7 Выделение дрожжевого маннана .....	53
2.3.8 Синтез аффинного сорбента маннан-сефароза .....	54
2.3.9 Аффинная хроматография на лактозил-сефарозе .....	54
2.3.10 Аффинная хроматография на PSM-сефарозе .....	55
2.3.11 Аффинная хроматография на маннан-сефарозе .....	55
2.3.12 Гель-фильтрация .....	56
2.4 Физико-химические характеристики GYL, GYLman и GYL-R .....	56
2.4.1 МАЛДИ-ВП масс-спектрометрия .....	56
2.4.2 Определение Ca <sup>2+</sup> -зависимости активности лектинов .....	56
2.4.3 Определение термостабильности лектинов .....	57
2.4.4 Определение pH-стабильности лектинов .....	57
2.4.5 Определение аминокислотного состава .....	57
2.4.6 Трипсинолиз лектинов в геле .....	57
2.5 Изучение углеводной специфичности GYL, GYLman и GYL-R .....	58
2.5.1 Получение конъюгатов GYL, GYLman и GYL-R с пероксидазой хрена (ПХ) .....	58
2.5.2 Подбор условий для ТЛФА .....	58
2.5.3 Определение углеводной специфичности лектинов .....	59
2.5.4 Биотинилирование GYL и GYL-R .....	60
2.5.5 Определение тонкой углеводной специфичности .....	60
2.6 Методы установления структуры лектинов .....	61

2.6.1 N-концевое секвенирование GYL по Эдману.....	61
2.6.2 nano-ESI MS/MS масс-спектрометрия GYL и GYL-R.....	62
2.6.3 Установление первичной структуры GYL.....	63
2.6.3.1 Выделение РНК и синтез кДНК .....	63
2.6.3.2 3'-RACE ПЦР .....	63
2.6.3.3 5'-RACE ПЦР .....	64
2.6.3.4 Амплификация полноразмерного транскрипта гена GYL.....	65
2.6.3.5 Электрофорез фрагментов ДНК .....	66
2.6.3.6 Получение генетических конструкций на основе вектора pTZ57R/T.....	66
2.6.3.7 Отбор колоний, содержащих рекомбинантные плазмиды .....	66
2.6.3.8 Секвенирование ДНК и анализ последовательностей .....	67
2.6.4 Спектроскопия кругового дихроизма GYL, GYL <sub>map</sub> и GYL-R .....	67
2.6.5 Расчет элементов вторичной структуры GYL in silico .....	68
2.6.6 Установление пространственной структуры GYL методами компьютерного моделирования.....	68
2.6.7 Выделение иммуноглобулинов IgG <sub>GYL</sub> .....	68
2.6.8 Двойная радиальная иммунодиффузия по Ухтерлони .....	69
2.6.9 Получение конъюгатов IgG <sub>GYL</sub> с пероксидазой хрена.....	70
2.7 Противомикробная активность лектинов .....	70
2.7.1 Взаимодействие лектинов с ПАМП .....	70
2.7.2 Взаимодействие лектинов с микроорганизмами .....	71
2.7.3 Ингибирование связывания лектинов с бактериями .....	71
2.7.4 Агглютинация микроорганизмов лектинами.....	72
2.7.5 Влияние GYL на образование биопленок .....	72
2.7.6 Измерение уровня GYL в ответ на заражение моллюсков бактериями и антропогенное загрязнение .....	73
2.8 Статистический анализ .....	74
3 Результаты и обсуждение .....	75

3.1 Поиск лектинов двустворчатого моллюска <i>G. yessoensis</i> .....	75
3.2 Разработка методов выделения и очистки лектинов гемолимфы двустворчатого моллюска <i>G. yessoensis</i> .....	76
3.2.1 Выделение рамнозоспецифичного лектина (GYL-R) из гемолимфы двустворчатого моллюска <i>G. yessoensis</i> .....	77
3.2.2 Выделение муцин-специфичного лектина (GYL) из гемолимфы двустворчатого моллюска <i>G. yessoensis</i> .....	78
3.2.3 Выделение маннан-специфичного лектина (GYLman) из гемолимфы двустворчатого моллюска <i>G. yessoensis</i> .....	79
3.3 Изучение физико-химических свойств лектинов .....	80
3.3.1 Гомогенность, молекулярная масса и субъединичный состав .....	80
3.3.2 Зависимость активности лектинов от концентрации ионов $Ca^{2+}$ .....	83
3.3.3 Изучение термостабильности лектинов .....	85
3.3.4 pH-стабильность лектинов .....	87
3.4 Изучение углеводной специфичности лектинов .....	89
3.4.1 Углеводная специфичность GYLman, GYL и GYL-R .....	89
3.4.2 Тонкая углеводная специфичность лектинов .....	92
3.5 Структурные характеристики лектинов .....	95
3.5.1 Изучение аминокислотной последовательности лектинов .....	95
3.5.2 Клонирование кДНК и установление аминокислотной последовательности GYL .....	97
3.5.3 Поиск и анализ гомологов GYL .....	102
3.5.4 Сигнальный пептид аминокислотной последовательности GYL .....	104
3.5.5 N-гликозилирование GYL .....	105
3.6 Изучение пространственной организации лектинов .....	107
3.6.1 Расчет элементов вторичной структуры лектинов методами КД- спектроскопии .....	107
3.6.2 Расчет элементов вторичной структуры GYL in silico .....	108
3.6.3 Влияние температуры на пространственную организацию GYL и GYL-R .....	109

3.6.4 In silico анализ пространственной структуры GYL.....	112
3.7 Биологическая активность GYL-R, GYL и GYLman.....	116
3.7.1 Взаимодействие лектинов с ПАМП .....	117
3.7.2 Взаимодействие лектинов с микроорганизмами .....	118
3.7.3 Влияние GYL на образование микробных биопленок .....	122
3.7.4 Исследование роли GYL в защитных реакциях двустворчатого моллюска <i>G. yessoensis</i> .....	124
Выводы .....	126
Список литературы .....	127

## Список сокращений и условных обозначений

а.о. – аминокислотный остаток

АМП – антимикробные пептиды

АФК – активные формы кислорода

БСА – бычий сывороточный альбумин

ВИЧ – вирус иммунодефицита человека

ГА – гемагглютинация

ГЖХ – газо-жидкостная хроматография

дНТФ – дезоксинуклеотид-трифосфат

ДСН – додецилсульфат натрия

ДТТ – дитиотреитол

ИФА – иммуноферментный анализ

КД – круговой дихроизм

кДНК – кодирующая дезоксирибонуклеиновая кислота

МАЛДИ-ВП – времяпролетная масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией / ионизацией

н.п.– пары нуклеотидов

ПААГ-электрофорез – электрофорез в полиакриламидном геле

ПАМП – патоген-ассоциированные молекулярные паттерны

ПРР – патоген-распознающие рецепторы

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПХ – пероксидаза хрена

РНК – рибонуклеиновая кислота

РПГА – реакция прямой гемагглютинации

ТЛФА – твердофазный лектин-ферментный анализ

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

ЯМР – ядерный магнитный резонанс

BSM – bovine submaxillary mucin, муцин подчелюстной железы быка

CRD – carbohydrate recognition domain, углевод-связывающий домен

CTL – C-type lectin, лектины С-типа  
CTLD – C-type lectin domain, лектиноподобный домен С-типа  
Fet – фетуин  
FTL – F-type lectin, лектины F-типа, фукозоспецифичные лектины  
FTLD – F-type lectin domain, лектиноподобный домен F-типа  
Fuc – фукоза  
Gb3 – глоботриазилцерамид (глоботриоза)  
Gal – галактоза  
GalNAc – N-ацетилгалактозамин  
Glc – глюкоза  
GlcNAc – N-ацетилглюкозамин  
Glu – глутаминовая кислота  
Gly – глутамин  
GYL-R, GYL и GYLman – лектины из моллюска *Glycymeris yessoensis*  
IC<sub>50</sub> – концентрация вещества, приводящая к гибели 50% клеток  
Ig – иммуноглобулин  
Lac – лактоза  
LacNAc – N-ацетиллактозамин  
Man – манноза  
MBL – mannose binding lectin, маннан (маннозо)-связывающий лектин  
OVA – ovalbumin, овальбумин  
PBS – phosphate buffered saline, натрий-фосфатный буфер  
PSM – porcine stomach mucin, муцин желудка свиньи  
RACE – rapid amplification of cDNA ends, быстрая амплификация концевых фрагментов кДНК  
RBL – rhamnose-binding lectins, рамнозоспецифичные лектины  
Rha – рамноза  
SD – standard deviation, стандартное отклонение  
TBS – tris buffered saline, трис-буферный раствор



## Введение

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

В связи с отсутствием у беспозвоночных иммунитета на основе антител, защита моллюсков от патогенной инфекции зависит исключительно от различных патоген-распознающих рецепторов (ПРР), таких как лектины, цитокины, синтазы оксида азота и антимикробные пептиды (АМП). Именно они составляют врожденную иммунную систему моллюсков [1, 2]. Среди них лектины играют решающую роль за счет способности к высокоспецифичному распознаванию различных углеводных структур, находящихся на клеточной поверхности микроорганизмов – патоген-ассоциированных молекулярных паттернов (ПАМП), группы молекул, характерных для патогенов, но отсутствующих в организме хозяина. Узнавание маркеров патогенности и стимулирование запуска серии защитных иммунных реакций является основой функционирования врожденного иммунитета [3]. Благодаря разнообразной углеводной специфичности лектинов, присутствующих в организме одного животного, становится возможным выявление широкого спектра патогенов. Лектины принадлежат к гетерогенной группе моно- и олигомерных белков, различающихся по нескольким характеристикам, таким как структура, размер, молекулярная организация и особенно углеводная специфичность. Перечисленные свойства определяют наличие у лектинов различных видов биологической активности, в том числе противоопухолевой [4], антифунгальной [5], антибактериальной [6] и противовирусной [7–9].

Систематическое сравнительное исследование разнообразных лектинов необходимо для лучшего понимания их функциональной

дифференциации. Взаимодействие гликанов с лектинами часто лежит в основе различных терапевтических стратегий [10]. Лектины используются в биотехнологии и диагностике: они способны выявлять тонкие различия в гликофенотипах тканей, что дает важную информацию для персонализированной медицины [11].

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

**Степень разработанности темы.** Начиная с новаторской работы, опубликованной более века назад [12], накоплен большой объем информации о клеточных и гуморальных факторах, обеспечивающих иммунитет двустворчатых моллюсков, хотя текущие знания носят описательный характер. Несмотря на то, что лектины беспозвоночных в последнее время интенсивно исследуются, информация об источниках их выделения, структуре и свойствах по сравнению с таковой по лектинам из высших животных и наземных растений, ограничена. Структурно-функциональные исследования лектинов, выделенных из морских беспозвоночных, расширят представления о разнообразии лектинов и основах их функционирования. Кроме того, свойства, описанные для одних и тех же или разных лектинов в различных биологических системах, могут привести к иным интерпретациям существующих данных и способствовать разработке новых идей в этой области.

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

1. Разработать схемы эффективного выделения новых лектинов из гемолимфы двустворчатого моллюска *G. yessoensis*, определить их

основные физико-химические свойства и тонкую углеводную специфичность.

2. Изучить структурные характеристики лектинов.

3. Исследовать биологические свойства лектинов в качестве паттерн-распознающих рецепторов.

4. Выяснить роль лектинов в системе врожденного иммунитета двустворчатого моллюска *G. yessoensis*.

**Научная новизна и практическая ценность работы.** Из гемолимфы двустворчатого моллюска *G. yessoensis* впервые были выделены три лектина: рамнозоспецифичный лектин – GYL-R, специфичный к разветвлённым олигоманнанам – GYLman, и лектин С-типа – GYL, проявляющий аффинность к гликопротеинам, содержащим углеводные цепи муцинового типа. Основные физико-химические свойства, структурные характеристики и функции выделенных лектинов были исследованы с использованием оригинальных методик. Высокоспецифичное взаимодействие с патоген-ассоциированными молекулярными паттернами указывает на их принадлежность к паттерн-распознающим рецепторам, а способность связываться с микроорганизмами позволяет предположить участие лектинов в защитных реакциях врожденного иммунитета моллюска.

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

расширяют представления о структуре и функциях лектинов беспозвоночных.

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

**Личный вклад автора.** Все экспериментальные данные, представленные в работе, получены лично автором или студентами под его руководством и при его непосредственном участии, за исключением инструментальной части N-концевого секвенирования GYL по Эдману, масс-спектрометрии пептидных фрагментов GYL и GYL-R, исследования гликан-связывающей активности с помощью гликоэзрея (printed glycan array, печатный массив гликанов – совокупность углеводных лигандов, иммобилизованных на твердый носитель), проведенных на базе Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук. Автор проводил первичный сбор

материала, его обработку, планирование исследований и постановку экспериментов, документирование результатов и их анализ, непосредственно участвовал в написании научных публикаций, лично представлял результаты по теме исследования на конференциях.

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

**Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Из гемолимфы двустворчатого моллюска *G. yessoensis* выделено три новых лектина, относящиеся к разным семействам, охарактеризованы их основные физико-химические свойства и установлена тонкая углеводная специфичность.

2. Обнаружено существование мультигенного семейства GYL-подобных лектинов у двустворчатого моллюска *G. yessoensis*.

3. Выделенные лектины являются паттерн-распознающими рецепторами и компонентами системы врожденного иммунитета моллюска *G. yessoensis*.

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

форуме «VI Съезд биохимиков России / IX Российский симпозиум «Белки и Пептиды» (Сочи, 2019); XVII Всероссийской молодёжной онлайн школе-конференции по актуальным проблемам химии и биологии (Владивосток, 2020); V Всероссийской конференции «Фундаментальная гликобиология» (Гатчина, 2021); XVIII Всероссийской молодёжной школе-конференции по актуальным проблемам химии и биологии (Владивосток, 2021).

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

## 1 Обзор литературы

### 1.1 Морские организмы как источники биологически активных соединений

Океаны покрывают 70% поверхности Земли и составляют 90% биосферы. Биологическое разнообразие морской среды и связанное с ним многообразие синтезируемых химических соединений составляют практически неограниченный ресурс новых биоактивных веществ [13].

В морях и океанах встречаются живые организмы, принадлежащие практически ко всем основным систематическим таксонам животных. Микробная и вирусная нагрузка в естественных морских средах обитания может достигать  $10^6$  бактерий и  $10^9$  вирусов на мл морской воды, многие из микроорганизмов являются патогенными [14]. Морские животные и беспозвоночные, в частности, обладают разнообразными видами стратегий, с помощью которых они защищают себя от микробов и вирусов. К таким защитным реакциям относится, в том числе, синтез антибактериальных и противовирусных молекул [15].

Анализ литературных данных показал, что большинство соединений, выделенных из морских организмов, являются небольшими молекулами, такими как терпеноиды, полиэферы, поликетиды, липопротеины и антимикробные пептиды.

Однако макромолекулы, такие как белки, гликопротеины и липопротеины, также могут проявлять антимикробную и противовирусную активность, принимать участие в реакциях врожденного иммунитета морских организмов [16, 17]. Формируя разнообразные рецепторы на поверхности клеток [18], макромолекулы участвуют в межклеточных взаимодействиях в ходе их развития и дифференцировки [19].

## 1.2 Тип Mollusca: класс Bivalvia

Тип Mollusca – один из крупнейших, самых разнообразных и важных групп в животном мире. Он охватывает восемь таксономических классов: Gastropoda, Bivalvia, Scaphopoda, Cephalopoda, Polyplacophora, Monoplacophora, Caudofoveata и Solenogastres, включающих более 85000 существующих в настоящее время видов и 60000 дополнительных видов, задокументированных описаний окаменелостей. Таким образом, моллюски занимают второе место по численности среди животных [20]. Они характеризуются широким морфологическим и физиологическим разнообразием и необычайно хорошо приспособлены к неблагоприятным условиям среды. Начиная с позднекембрийской эры, моллюски заселили почти все экологические ниши: от наземных местообитаний до глубоководных гидротермальных источников [21].

Класс Bivalvia (двустворчатые моллюски) включает животных, заключенных в две створки раковины. Это важная экологическая группа включает множество съедобных видов и широко распространена в пресноводных, эстуарных и морских экосистемах. Примерами являются мидии, устрицы, морские гребешки и др. Таксономически они подразделяются на два основных подкласса, а именно: небольшой подкласс *Protobranchia* (примитивные морские инфаунальные двустворчатые моллюски) и большой подкласс *Autobranchia*, который делится на отряд *Pteriomorphia* и надотряд *Hereroconchia*, включающий отряды *Paleoheterodonta* и *Heterodonta*.

Существование большого числа и разнообразия моллюсков свидетельствует о наличии у них эффективных систем защиты собственного организма.



### 1.2.1 *Иммунитет Bivalvia*

Иммунная система двустворчатых моллюсков представлена широким спектром чувствительных рецепторов и селективных эффекторов. Синергические (или синергетические) сигнальные сети осуществляют генетическую регуляцию работы иммунной системы моллюсков. Как фильтраторы двустворчатые моллюски могут аккумулировать большое количество микроорганизмов из водной среды. Это может привести к накоплению потенциальных патогенов (бактерий, вирусов, грибов, паразитов) в организме моллюска, которые устанавливают нейтральные отношения с хозяином, не вызывая заболеваний. Однако при изменении условий окружающей среды количество комменсальных патогенов может увеличиваться и вызывать гибель моллюсков. Изучение взаимосвязи между активностью иммунной системы и наличием патогена необходимо для эффективной защиты промысловых видов моллюсков при их культивировании и для контроля за накоплением патогенов, потенциально опасных для здоровья человека [22].

Представители класса *Bivalvia*, так же как все беспозвоночные, «полагаются» исключительно на врожденную, нелимфоидную систему иммунных реакций [23]. Их внутренняя защита реализуется посредством клеточных и гуморальных компонентов. К первым относятся фагоцитоз и инкапсуляция, с последующим уничтожением возбудителя с помощью ферментов и активных форм кислорода. Вторые включают в себя различные реакции, опосредованные целым рядом молекул, таких как агглютинины (например, лектины), антимикробные пептиды (АМП) и лизосомальные ферменты. Все эти молекулы присутствуют у моллюсков в норме, но могут быть дополнительно индуцированы при неблагоприятных условиях [24, 25].

### 1.2.2 Компоненты и механизмы клеточного иммунитета

Гемоциты – циркулирующие клетки гемолимфы двустворчатых моллюсков, отвечающие за клеточно-опосредованный иммунитет. Они являются фагоцитами и выполняют функцию первой линии защиты от паразитов и патогенов, участвуют в заживлении ран, репарации нервов, формировании и ремонте раковины, перестройке тканей, (например, рассасывание половых желез после размножения), а также в обмене и переносе питательных веществ. Гемоциты не ограничены системой гемолимфы, а свободно перемещаются из синусов (гемолимфатических пространств) в окружающую соединительную ткань, мантийную полость и просвет кишечника. Гемоциты способны к хемотаксису, адгезии, фагоцитозу, генерации активных форм кислорода, а также к внутриклеточному накоплению микробицидных факторов, то есть они проявляют полный набор свойств, характерных для любого фагоцита, вовлеченного в реакции врожденного иммунитета у всех многоклеточных животных независимо от уровня их организации [26–29].

Инкапсуляция и фагоцитоз – два основных гемоцитарных клеточных механизма устранения чужеродных веществ и мертвых клеток, которые осуществляются иммунокомпетентными клетками – гемоцитами [30,31]. Когда патоген вторгается в организм моллюска, запускается ряд реакций, инициируемых как патогеном в его попытке выжить, так и моллюском, который пытается уничтожить захватчика [32].

У моллюсков первой реакцией на инфекцию/повреждение является гемоцитоз, он включает измеримое увеличение количества циркулирующих гемоцитов, которые затем инфильтрируют инфицированные или поврежденные ткани. Фагоцитоз является следующим шагом в процессе защиты и включает стадии хемотаксиса, опсонизации, эндоцитоза, образования фагосом, слияния фагосомы и лизосомы, респираторного взрыва и экзоцитоза. Появление в гемолимфе

хематтрактантов – продуктов деструкции тканей, каскадов коагуляции или продуктов жизнедеятельности паразита – вызывает хемотаксис [33,34]. Массивную фокальную инфильтрацию гемоцитов в месте инфекции могут вызывать различные патогены двустворчатых моллюсков, такие как *Vibrio tapetis*, *Perkinsus marinus* и др. [35–37].

За хемотаксисом следует опсонизация – процесс адсорбции гемоцитов на поверхности патогена/паразита и других инородных частиц, в ходе которого последние становятся более восприимчивыми к действию фагоцитарной активности гемоцитов моллюсков [38].

Фагоцитоз осуществляется макрофагоподобными клетками (амебоцитами), способными к эндоцитозу путем обволакивания псевдоподиями инородных частиц. При инвагинации клеточных мембран инородный материал оказывается заключенным в фагосому. Фагосомы делятся на первичные и вторичные лизосомы, где изолированные частицы подвергаются воздействию гидролитических ферментов, активных форм кислорода (АФК), оксида азота, а также антимикробных факторов [39].

Другой механизм клеточного иммунного ответа двустворчатых моллюсков – инкапсуляция, представляющая собой защитную реакцию на вторжение чужеродных агентов, которые слишком велики, чтобы их фагоцитировать. Гемоциты образуют капсулу, которая охватывает инородное тело (например, многоклеточного паразита), после чего гемоциты начинают синтезировать цитотоксические продукты (расщепляющие ферменты и АФК). Подобный механизм защиты используют моллюски *Crassostrea gigas* при заражении копеподами *Myicola ostreae* и *Dreissena polymorpha*, при инфицировании трематодами *Viscephalus polymorphus*. На поверхности жабр моллюсков образуется массивное скопление гемоцитоподобных клеток, окруженное тонким слоем фибробластоподобных клеток, поглощающее рачков и паразитов [40].

### 1.2.3 Гуморальные факторы и связанные с ними защитные механизмы

Циркулирующие гемоциты выделяют в гемолимфу множество биологически активных молекул, которые играют важную роль в системе гуморальной защиты. Такие молекулы обычно подразделяются на две категории: ферменты лизосомального происхождения, такие как аминопептидазы,  $\beta$ -глюкуронидазы, кислая фосфатаза, щелочная фосфатаза,  $\alpha$ -маннозидаза, эстеразы и пероксидазы и серологически-активные соединения (лизоцимы, АМП, агглютинины (лектины)) [32]. Воздействие инфекционных агентов и их структурных компонентов вызывает повышение уровня лизосомальных ферментов, которые играют ключевую роль в деградации чужеродного материала во вторичных фагосомах и расщепляют чужеродный материал по классическому пути лизосомального пищеварения. Лизосомальные ферменты также могут высвобождаться во внеклеточную среду в процессе или после фагоцитоза гемоцитами.

Термин «лизоцим» используется для собирательного описания группы гетерогенных и широко распространенных белков, участвующих в системе врожденного иммунитета моллюсков, которые проявляют сильное литическое действие против бактерий. Как правило, лизоцим содержится в гемоцитах пищеварительной железы, а концентрация его увеличивается при введении бактериальных клеток. Лизоцим обладает ферментативной активностью гликозидгидролазы, которая катализирует гидролиз пептидогликана и, в меньшей степени, хитина. Поскольку пептидогликан является основным компонентом бактериальной клеточной стенки у грамположительных бактерий, но не у грамотрицательных, лизоцим проявляет более сильную активность против первых [41].

АМП обнаружены как у прокариот, так и у эукариот, и на сегодняшний день выделено более 800 таких пептидов. Они не очень специфичны, действуют против широкого круга микроорганизмов,

включая бактерии, дрожжи, грибы и, в некоторых случаях, вирусы и протисты [42]. Многочисленные АМП, охарактеризованные у морских двустворчатых моллюсков, продуцируются в гемоцитах, где они хранятся в виде неактивных предшественников и высвобождаются в виде активных соединений при микробном заражении. АМП могут действовать на внутриклеточном уровне посредством фагоцитоза и внеклеточно после экзоцитоза. Почти все известные АМП двустворчатых моллюсков относятся к одной большой категории пептидов, богатых остатками цистеина, которые образуют дисульфидные связи. Эти АМП характеризуются необычно высокой степенью внутривидового разнообразия, что определяет широкий спектр действия этих молекул, наделяя популяции двустворчатых моллюсков эффективным инструментом для борьбы с микробным заражением [41].

Лектины – это белки и гликопротеины, содержащие некаталитический домен распознавания углеводов, который взаимодействует со специфическими остатками моно- и олигосахаридов [43]. Лектины синтезируются гемоцитами. На поверхности клеток лектины выполняют роль белковых рецепторов для чужеродных антигенов, идентифицируя патогены, способствуя их иммобилизации, связыванию и уничтожению путем фагоцитоза.

На рисунке 1 схематически представлены гуморальные и клеточные защитные механизмы двустворчатых моллюсков при бактериальной или паразитарной инфекции. Стадии 1-2, включающие присутствие и синтез лектинов: (1) хемотаксис, привлечение и миграция; (2) распознавание и прикрепление вторгающихся микроорганизмов. Стадия 3, микроорганизмы интернализуются внутри фагосомы. Стадия 4, микроорганизм уничтожается с помощью кислородозависимой и кислороднезависимой микробицидных ферментных систем. Стадия 3' – инкапсуляция и разрушение микроорганизмов извне с помощью лизосомальных ферментов

и активности АФК, если они слишком велики для интернализации. Стадия 4' – инкапсулированные микробы разрушаются внеклеточно [44].

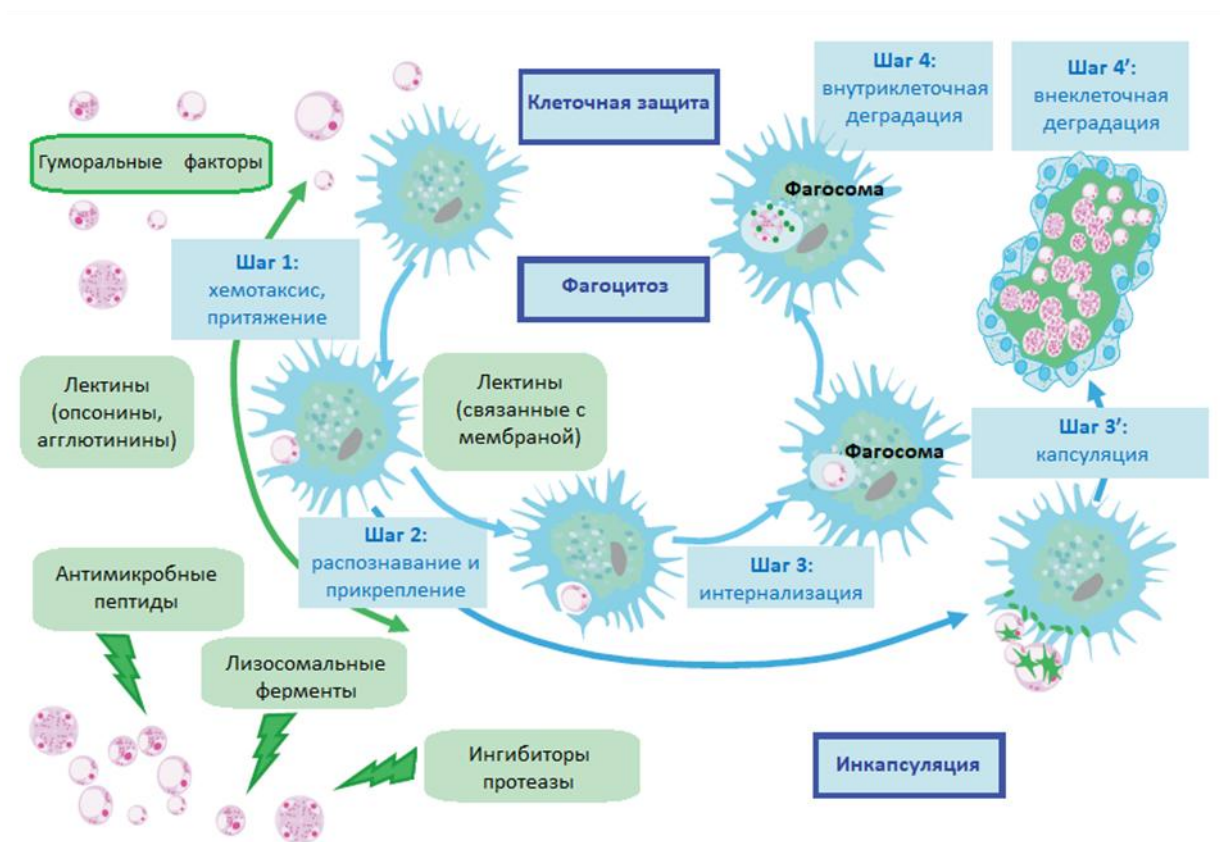


Рисунок 1 – Активация гуморальных и клеточных защитных механизмов двустворчатых моллюсков при бактериальной или паразитарной инфекции [44]

Практически все эукариотические и бактериальные клетки, в том числе многие оболочечные вирусы, содержат углеводы и углеводсодержащие комплексы различной сложности (например, гликопротеины, гликолипиды). Их считают «третьим алфавитом жизни», так как углеводные фрагменты как растворимых, так и ассоциированных с клеткой гликоконъюгатов кодируют сложную информацию, которая «декодируется» специфическими углевод-связывающими белками [45]. Лектины в свою очередь являются молекулами, способными к «дешифровке» гликокода.

Иммунную защиту у моллюсков индуцируют многочисленные ПРР, обладающие способностью распознавания консервативных структур различных патогенов – ПАМП, а так же аномальных самостоятельных элементов (водорослей и др.) [46]. Внеклеточные секретируемые ПРР представляют собой эволюционно консервативные семейства и составляют значительную часть транскриптома большинства известных видов двустворчатых моллюсков. Молекулы канонических ПРР моллюсков с активностью распознавания углеводов в основном состоят из пяти главных доменов связывания: домен Ig (FREP, белки IgSF); домен LRR (TLR и LRR); лектиновый домен (CTL, галектин); C1q домен (C1qDC); домен рецептора-мусорщика – Scavenger receptors (SR). Они характеризуются дюжиной различных доменов распознавания углеводов (carbohydrate recognition domain – CRD). ПРР существуют в сотнях вариантов белков, что обеспечивает значительную степень их разнообразия [3].

Для CRD лектинов характерна значительная «пластичность» при взаимодействии с ПАМП. Они связываются с различными патогенами, распознавая даже самые минимальные изменения углеводного профиля их поверхности, иммобилизуют инфекционные агенты и активируют различные сигнальные пути [47]. Опосредованная лектинами активация системы комплемента способствует фагоцитозу патогенов [48, 49].

Таким образом, лектины являются ключевыми компонентами врожденных иммунных механизмов как распознающие, так и эффекторные факторы.

### **1.3 Лектины морских организмов. Структура и функция**

Классификация всех существующих лектинов была основана на идентификации уникальных мотивов аминокислотной последовательности и структурной укладки CRD, а также необходимости в двухвалентных катионах или восстанавливающей среде для связывания лиганда. К

основным семействам относятся: лектины С-типа (CTL), лектины F-типа (FTL), лектины R-типа (RTL), лектины H-типа (HTL), лектины P-типа (PTL), лектины X-типа (XTL), лектины I-типа (ITL), пентраксины, галектины (ранее лектины S-типа), лектины, связывающие рамнозу (RBL), фиколины и другие [48].

Морские животные наделены большим и сложным набором лектинов. Основными эволюционно не связанными друг с другом классами лектинов рыб и морских беспозвоночных являются CTL, FTL, галектины и RBL, которые участвуют в межклеточных взаимодействиях, обладают множеством функций и активностей, в том числе участвуют в иммунном надзоре и гомеостазе [50, 51].

### 1.3.1 Лектины С-типа

Лектины С-типа являются одним из основных семейств лектинов животного происхождения, члены которого взаимодействуют  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимым образом с моно-, олиго- и полисахаридами. Ионы кальция не только принимают участие в связывании углеводного остатка, но и обеспечивают постоянство структуры лектинового домена, необходимое для активации лектина [52].

Различают 2 типа CTL: 1) растворимые, выделяемые клетками в составе секрета; 2) трансмембранные, отвечающие за межклеточные взаимодействия, клеточную адгезию и активизацию мембранных каналов. Как правило, они образуют многодоменные структуры и содержат один или несколько высококонсервативных CRD, состоящих из 110–130 аминокислотных остатков и имеющих смешанную  $\alpha/\beta$  топологию [53, 54]. CRD лектинов С-типа образуют подсемейство большой группы белковых доменов, называемых лектиноподобными доменами С-типа (CTLD). Оно включает более тысячи идентифицированных членов, большинство из которых лишены лектиновой активности [50]. На основании структур доменов CRD суперсемейства лектинов С-типа выделяют 17 подтипов:



лектиканы, группа ASGR, коллектины, селектины, рецепторы НК-клеток, группа маннозных рецепторов макрофагов, Reg-белки, группа кондролектина, аттрактин, SEEC, группа тетранектина, полицистин I, СВСП, группа тромбомодулина, DGCR2, Vimlec и EMBP. Reg-белки – лектины, которые состоят из одного CTLD и короткого N-концевого пептида, в то время как лектины С-типа в других группах имеют более одного CTLD [55].

Структура консервативного CRD суперсемейства CTLD представлена на рисунке 2. Весь домен представляет собой петлю, в которой его N- и С-концевые  $\beta$ -тяжи ( $\beta 1$  и  $\beta 5$ ) сближаются, образуя антипараллельный  $\beta$ -лист. Вторая петля, называемая областью длинной петли, находится внутри домена. Четыре цистеина ( $C^I$ ,  $C^{II}$ ,  $C^{III}$ ,  $C^{IV}$ ), которые являются наиболее консервативными остатками CTLD, образуют дисульфидные (цистеиновые) мостики в основаниях петель:  $C^I$  и  $C^{IV}$  связывают тяж  $\beta 5$  и  $\alpha$ -спираль  $\alpha 1$  (всю доменную петлю), а  $C^{II}$  и  $C^{III}$  связывают  $\beta 3$  и  $\beta 5$  тяжи (длинную петлю). Остальная часть цепи образует две фланкирующие  $\alpha$ -спирали ( $\alpha 1$  и  $\alpha 2$ ) и второй («верхний»)  $\beta$ -лист, сформированный тяжами  $\beta 2$ ,  $\beta 3$  и  $\beta 4$ . Область длинной петли участвует в  $Ca^{2+}$ -зависимом связывании углеводов [56].

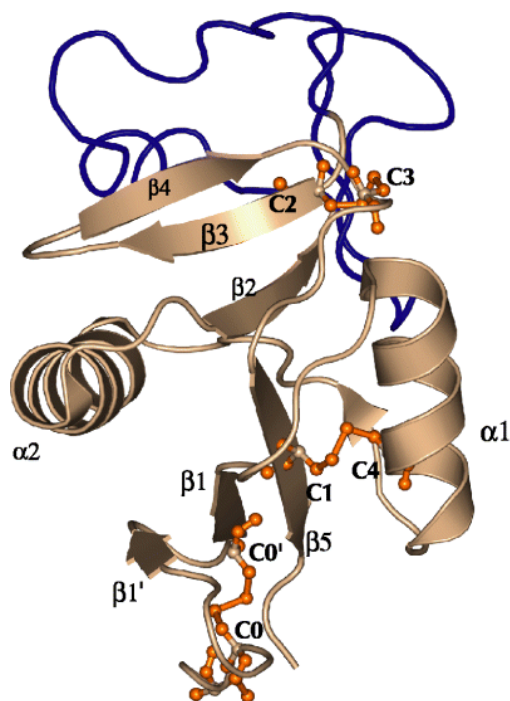


Рисунок 2 – Структура CTLD [56]. Изображение типичной структуры CTLD (субъединица 1K9I). Область длинной петли показана синим цветом. Цистеиновые мостики показаны оранжевым, включая цистеиновый мостик, специфичный для длинной формы CTLD (C<sup>0</sup>-C<sup>0'</sup>)

В каждом CRD имеется от одного до четырех сайтов связывания Ca<sup>2+</sup>. За высокоспецифичное распознавание и Ca<sup>2+</sup>-зависимое связывание углеводных структур отвечает сайт связывания 2, который включает в себя два консервативных пептидных мотива. У позвоночных первым мотивом всегда является EPN (Glu-Pro-Asn) или QPD (Gln-Pro-Asp), а вторым – всегда WND (Trp-Asn-Asp), который, как установлено, взаимодействует с первым мотивом в процессе связывания с углеводами [57]. Более того, дальнейшие исследования показали, что лектины С-типа с мотивами EPN/WND связываются с Man, GlcNAc, Fuc и Glc, в то время как лектины С-типа с мотивом QPD/WND связывают Gal и GalNAc [58].

В отличие от позвоночных, у беспозвоночных обнаружено большое разнообразие аминокислотных последовательностей в соответствующих сайтах. Помимо классических мотивов EPN и WND, существуют не менее семи типов первого мотива и более десяти типов второго мотива, представленных в разных STL моллюсков. Например, последовательности

EPD (Glu-Pro-Asp), QPG (Gln-Pro-Gly), QPS (Gln-Pro-Ser), YPG (Tyr-Pro-Gly) и YPT (Tyr-Pro-Thr) обнаружены в первом мотиве, одновременно WID (Trp-Ile-Asp), WSD (Trp-Ser-Asp), WHD (Trp-His-Asp), FSD (Phe-Ser-Asp) и LSD (Leu-Ser-Asp) обнаружены во втором мотиве [58]. Первый мотив рассматривается как «переключатель» при специфическом связывании с углеводом, а второй обеспечивает специфичность и аффинность этого взаимодействия [59, 60].

В присутствии ионов  $Ca^{2+}$  CTL инициируют широкий спектр биологических процессов, таких как адгезия, эндоцитоз и нейтрализация патогенов [61]. У беспозвоночных, не имеющих адаптивного иммунитета, вся нагрузка защиты от инвазии патогенов ложится на врожденную иммунную систему, поэтому потребность в разнообразном и эффективном репертуаре защитных лектинов может быть одним из объяснений обилия CTLD у беспозвоночных [62, 63].

CTL из китайской белой креветки *Fenneropenaeus chinensis*, названный FcLec4, в присутствии ионов кальция агглютинирует как грамположительные, так и грамотрицательные бактерии. Интересно, что FcLec4, прочно связываясь с *Vibrio anguillarum*, действует как опсонин, участвуя в гемоцитарном фагоцитозе беспозвоночного [64, 65]. CTL гребешка *Argopecten irradians* (AiCTL-3) связывается с грамположительной бактерией *Staphylococcus aureus*, а также с грамотрицательными бактериями *Escherichia coli* и *V. anguillarum*. AiCTL-3 значительно усиливает фагоцитоз гемоцитов гребешка *in vitro*, действуя в качестве опсонина, играющего важную роль в уничтожении патогенов [66].

Многочисленные исследования потенциальной роли CTL у различных видов моллюсков проводятся, главным образом, с целью изучения их участия в распознавании, иммобилизации и опсонизации бактериальных патогенов. Репертуар CTL у отдельного вида представляется весьма разнообразным и сложным, а экспрессия и

локализация СТЛ описана в гемоцитах, плазме и мантийной слизи, а также в имеющих отношение к иммунным реакциям органах и тканях, таким как мантия, жабры и кишечник. Кроме того, эксперименты с инфекционным заражением показали, что в большинстве случаев синтез СТЛ модулируется воздействием потенциальных патогенов. Сообщение о том, что моллюски могут экспрессировать компоненты системы комплемента, предполагает, что СТЛ могут функционировать не только как опсоины и агглютинины патогенов, но и инициировать механизмы активации системы комплемента «по лектиновому пути». У млекопитающих эту роль выполняет маннан-связывающий лектин [49].

MBL (mannose binding lectin) – это  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимые белки, высокоспецифично связывающие моно-, олиго- и полисахариды, содержащие маннозу и образующие мультимерные структуры. MBL состоят из N-концевого богатого цистеином домена, коллагеноподобного домена и С-концевого CRD. У млекопитающих MBL образует олигомеры, каждый из которых содержит три идентичные полипептидные цепи (субъединицы). Он является важным компонентом врожденного иммунитета, благодаря стимуляции противовоспалительных эффектов и усилению иммунного ответа на инвазию патогенов [67, 68]. В основном, экспрессия MBL происходит в печени, откуда он высвобождается в плазму, где не только распознает потенциально патогенные микробы, но и, связываясь с их поверхностью, может также активировать систему комплемента [69]. Таким образом, MBL, рассматриваемый в качестве прототипа растворимого PPP, наделен не только антимикробными, но и эффекторными свойствами.

В качестве факторов врожденной иммунной системы MBL также встречаются у беспозвоночных, относящихся к подразделу царства животных Deuterostomia (вторичноротым). Два маннозоспецифичных лектина из асцидии *Ciona intestinalis* (CioMBL-QPD и CioMBL-EPN), имеющих структурную гомологию с MBL позвоночных, содержат

коллагеноподобный домен, а их CRD имеют высокую степень идентичности с CRD MBL млекопитающих [70]. MBL морского ежа *Pseudocentrotus depressus* (PdMBCL) агглютинирует бактерию *Lactococcus garvieae*, действуя как антимикробный агент [71].

Интересно, что белков с гомологичной MBL комбинацией доменов (N-концевой богатый цистеином домен, коллагеноподобный домен и C-концевой CRD) у представителей подраздела царства животных Protostomia (первичноротые) нет [72]. Однако, известно большое количество CTL, связывающих маннозу и маннаны, обнаруженных у таких представителей Protostomia, как моллюски. Распознающий маннозу лектин C-типа, выделенный из плазмы моллюска *Hemifusus pugilinus*, проявляет антибактериальную и фунгицидную активности [73]. Новый лектин C-типа из тихоокеанской устрицы *C. gigas* (названный CgCLec), содержащий домен белка контроля комплемента, распознает разнообразные ПАМП и участвует в активации системы комплемента [74].

Маннан-связывающие лектины обладают широким спектром противовирусной активности. N-гликаны с высоким содержанием маннозы в основном присутствуют на гликопротеинах, заякоренных в оболочке некоторых вирусов (ВИЧ, вирус гепатита С и др.) и участвующих во взаимодействии с клетками хозяина. Примерами таких соединений могут служить гликопротеин 120 (gp120), обнаруженный на поверхности ВИЧ, и шиповидный гликопротеин SARS-CoV [75]. Эти гликаны, расположенные близко к сайтам связывания рецепторов, являются привлекательными и многообещающими мишенями для распознавания лектинами. Таким образом, MBL могут ингибировать начальные этапы проникновения вируса в клетки хозяина и предотвращать дальнейшее заражение [76].

CTL являются разнообразными и широко распространенными белками в животном мире, включая моллюсков. Они содержат уникальные структурные мотивы и функциональные домены, независимо от того, обладают ли они углевод-связывающими свойствами или нет.

### 1.3.2 Фукозоспецифичные лектины

Семейство лектинов F-типа характеризуется уникальной аминокислотной последовательностью, структурной организацией и специфичностью к L-фукозе, которая является невосстанавливающим терминальным моносахаридом в гликанах, обнаруженных у про- и эукариот. FTL является одним из самых последних идентифицированных и структурно охарактеризованных семейств, которое было случайно открыто в результате поиска фукозоспецифичных STL в сыворотке и экстрактах печени полосатого окуня *Morone saxatilis* [77]. Члены семейства FTL содержат углевод-связывающий домен (FTLD) с фукозо- и кальций-связывающими мотивами аминокислотных последовательностей. Его структура представляет собой  $\beta$ -бочонок с топологией желейного рулета, новый тип укладки (“F-type” fold) [78], первоначально описанный в комплексе лектина речного угря *Anguilla anguilla* (AAA) с  $\alpha$ -L-фукозой ( $\alpha$ -Fuc). Структура состоит из двух  $\beta$ -листов, образованных тремя ( $\beta 5$ ,  $\beta 8$  и  $\beta 11$ ) и пятью ( $\beta 2$ ,  $\beta 3$ ,  $\beta 10$ ,  $\beta 6$  и  $\beta 7$ ) антипараллельными  $\beta$ -тяжами соответственно и расположенных друг против друга. Два коротких антипараллельных тяжа ( $\beta 4$  и  $\beta 9$ ) закрывают нижнюю часть бочонка, из которого выступают N- и C-концы, образуя антипараллельный двухцепочечный  $\beta$ -лист. На верхней части бочонка соединительные  $\beta$ -тяжи противоположных листов образуют пять петель (CDR1–5), которые окружают положительно заряженный карман с высоким значением заряда, связывающий  $\alpha$ -Fuc (рисунок 3А). Субъединицы AAA при участии хлорида кальция могут образовывать тримеры, содержащие один катион  $\text{Ca}^{2+}$  на домен и несколько ионов  $\text{Cl}^-$ , а два тримера могут образовывать гексамеры с расположенными друг против друга поверхностями, связывающими углеводы (рисунок 3Б) [79].

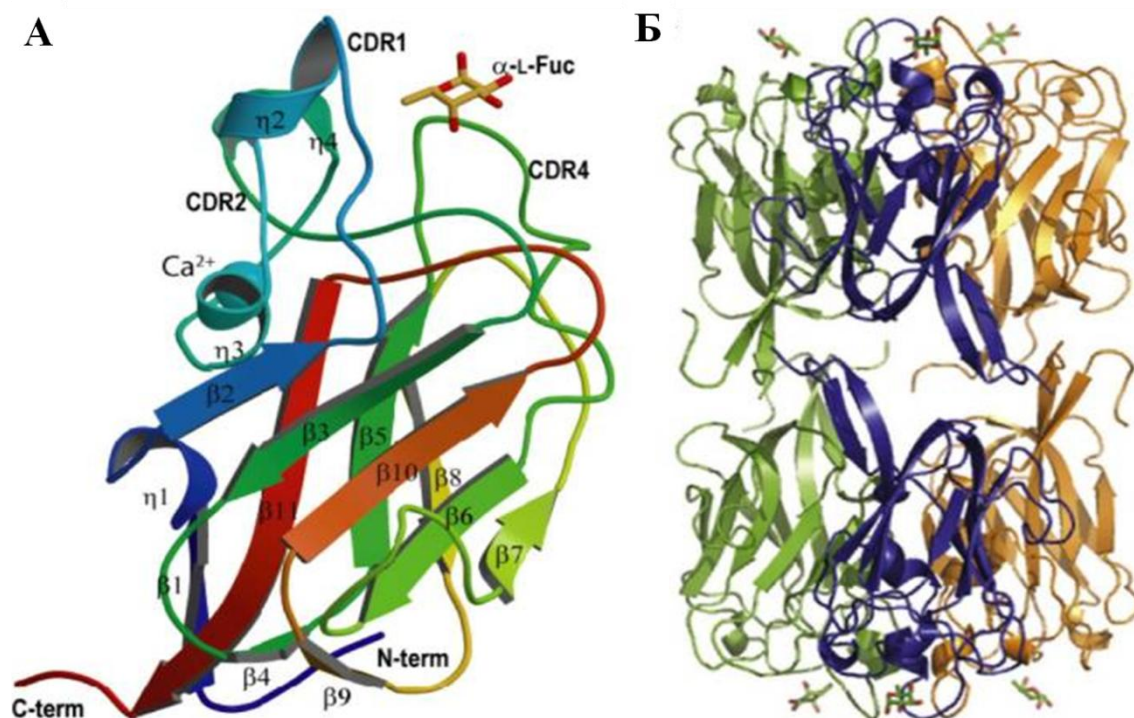


Рисунок 3 – Структура лектина *A. anguilla* (AAA) и четвертичная структура олигомеров AAA [79]. А – Ленточная диаграмма AAA, представленная двумя  $\beta$ -листами и петлей (CDR), окружающими углевод-связывающий сайт. Связанная  $\alpha$ -Fuc показана желтым цветом. Кальций показан в виде синей сферы. Б – Четвертичная структура гексамера AAA, содержащего в каждом тримере один ион хлора. Гексамер образован двумя уложенными друг на друга тримерами со связывающими углеводными сайтами, расположенными на противоположных сторонах

Семейство FTL включает широко распространенные белки, состоящие из одного, двух или большего количества FTLD, расположенных либо тандемно, либо в мозаичных комбинациях с другими доменами, различающимися по структуре и функции, в результате чего лектиновые субъединицы проявляют плейотропные свойства даже в пределах одного вида [51]. Некоторые FTL выполняют функцию иммунного распознавания, в то время как другие участвуют в микробном патогенезе, оплодотворении и других разнообразных функциях [78, 80–82].

Тандемно расположенные FTLD схожи по своему строению, но не идентичны [79]. Присутствие у отдельных особей нескольких изолектинов FTL, в последовательностях которых обнаружены аминокислотные замены

в положениях, критических для распознавания сахара, убедительно свидетельствует о разнообразии углеводной специфичности. Такая особенность является ключевой не только для белков, участвующих во врожденном иммунитете, таких как FTL угря [81], но также и для тех, которые распознают гетерогенные «собственные» гликановые лиганды, как обнаружено у биндинов тихоокеанской устрицы *C. gigas* [83–85].

Свойственная для FTL олигомеризация субъединиц приводит к поливалентности, свойству, которое делает возможным перекрестное связывание лигандов и агглютинацию клеток, а также обеспечивает более высокую авидность лектина к кластерным гликанам [86]. Для лектинов, которые несут только один CRD в полипептиде, объединение субъединиц в олигомеры дополнительно усиливает их свойства. Так, физиологически значимая структура AAA представляет собой гомотримеры и гексамеры, которые обеспечивают кооперативное связывание с мультивалентными гликанами [78]. Подобно MBL, трехкратная циклическая симметрия тримера AAA оптимизирует ориентацию и расстояние между отдельными сайтами связывания FTLD для лучшего связывания с гликановыми лигандами на поверхностях микроорганизмов.

Моделирование взаимодействия фукозоспецифичного лектина полосатого окуня *M. saxatilis* (MsaFBP32) с фукозилированными олигосахаридами прокариот и эукариот показало, что FTL с бинарными тандемными CRD могут функционировать как опсоины. Опсонизация потенциальных патогенов может происходить за счет опосредованного FTL перекрестного связывания углеводных фрагментов на клеточной поверхности микроорганизмов с поверхностными гликанами на фагоцитарных клетках хозяина [80]. Опсонические свойства FTL были экспериментально продемонстрированы на бинарных тандемных FTL морского окуня *Dicentrarchus labrax* (DIFBL) и дорады *Sparus aurata* (SauFBL). Предварительная обработка клеток *E. coli* с помощью DIFBL или SauFBL усиливало фагоцитоз бактерий перитонеальными



макрофагами *D. labrax* и *S. aurata* по сравнению с контрольными образцами, не подвергавшимися такому воздействию. Это подтверждает концепцию о том, что F-лектины с поливалентными FTLD, такие как AAA, DIFBL, SauFBL и MsaFBP32, могут функционировать как опсонины, способствующие фагоцитозу микробных патогенов [87, 88].

Ранее сообщалось о присутствии FTL у некоторых видов гастропод [89]. Также, были получены экспериментальные доказательства участия FTL двустворчатых моллюсков в бактериальном распознавании [90], а также об определенной роли белков, содержащих FTLD, в эмбриогенезе [83]. Однако, основные функции, которые выполняют FTL у беспозвоночных, связаны, главным образом, с защитой собственного организма от патогенной инвазии. Так, F-лектин из жемчужной устрицы *Pinctada martensii* (PmF) в большом количестве экспрессируется в гемоцитах и жабрах и значительно (в 13 раз) активируется при инфекционном заражении *V. alginolyticus*, что позволяет предположить, что PmF участвует в реакциях врожденного иммунного ответа [91].

Разнообразный репертуар FTL, выявленный у брюхоногого моллюска *Littorina littorea*, предположительно связан с системой иммунной защиты [89]. FTL моллюска *Mya truncata* были идентифицированы как в матриксе раковины, так и в белках ткани мантии, что указывает на то, что во время процесса биоминерализации раковины, функции иммунной защиты могут выполняться белками, секретлируемыми мантией, которые позже включаются в матрикс раковины [90].

Несмотря на разнообразие FTL у амфибий, рептилий, птиц и прототерийных млекопитающих, в геномах плацентарных млекопитающих не обнаруживаются достоверных гомологов FTL [91, 92]. Следовательно, в процессе эволюции животных, находящихся выше уровня прототерийных млекопитающих это семейство лектинов могло быть утрачено как таковое, либо в результате полного вымирания, либо в результате кооптации других функций.

### 1.3.3 Рамнозоспецифичные лектины

Около 30 лет назад из цитоплазматической жидкости неоплодотворенных икры японского пурпурного морского ежа *Anthocidaris crassispina* был выделен новый лектин (SUEL), проявляющий специфичность к D-галактозидам [93]. В настоящее время SUEL признан первым описанным представителем нового семейства животных лектинов, связывающих рамнозу (RBL), ориентация гидроксильных групп L-рамнозы в положениях C2, C3 и C4 совпадает с ориентацией гидроксильных групп инвертированной формы D-галактозы в положениях C4, C3 и C2 соответственно. Долгое время семейство носило название SUEL/RBL. В данный момент исследователи ограничили название семейства до RBL [94]. Впоследствии RBL были обнаружены у костистых рыб и у некоторых водных видов беспозвоночных организмов, таких как кольчатые черви и двустворчатые моллюски среди первичноротых и асцидий среди хордовых [50]. Все RBL не имеют гомологии аминокислотной последовательности с известными семействами лектинов, не требуют присутствия  $Ca^{2+}$  для распознавания углеводов, содержат один или несколько CRD с уникальной  $\alpha/\beta$ -структурой длиной около 100 аминокислот с восемью высококонсервативными цистеиновыми остатками, связанными четырьмя дисульфидными мостиками с характерной топологией [95, 96]. Согласно номенклатурной системе EMBL ([www.embl.org](http://www.embl.org)), эта структура называется D-галактозид/L-рамнозоспецифичным лектином SUEL-типа, или доменом SUEL-типа (<http://www.uniprot.org/uniprot/P22031>).

Внутри каждого домена между цистеинами  $C^I-C^{III}$ ,  $C^{II}-C^{VIII}$ ,  $C^{IV}-C^{VII}$  и  $C^V-C^{VI}$  существуют четыре дисульфидные связи. Каждый домен имеет два антипараллельных  $\beta$ -листа, образованных двумя ( $\beta_2$ ,  $\beta_4$ ) и тремя ( $\beta_1$ ,  $\beta_3$  и  $\beta_5$ )  $\beta$ -тяжами, а также три  $\alpha$ -спирали ( $\alpha_1-3$ ). Два характерных пептидных мотива: (AN)YGR(TD) – (YGR-мотив) и DPCXGT(Y)KY(L) – (DPC-мотив), расположенных на N- и C-концевых участках каждого

домена соответственно, являются консервативными почти во всех CRD RBL (рисунок 4) [97].

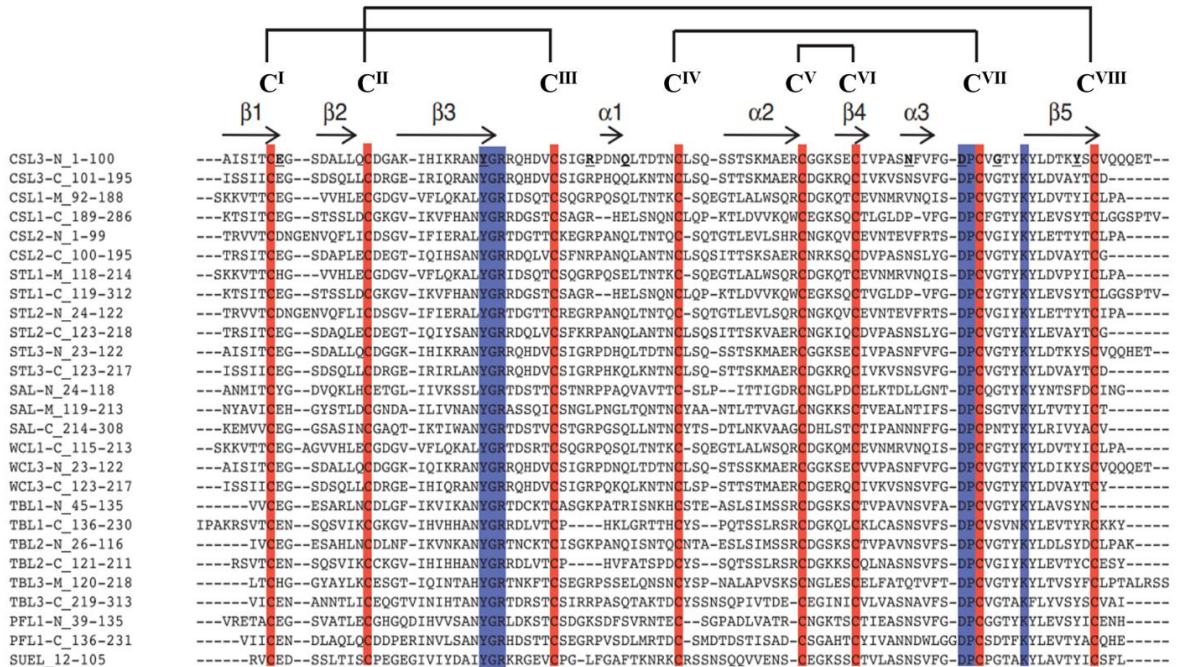


Рисунок 4 – Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей SUEL-родственных лектинов [97].

Лектины икры кеты *Oncorhynchus keta* (CSL1, P86177; CSL2, P86178; CSL3, P86179), лектины икры стальноголовой форели *Oncorhynchus mykiss* (STL1, NP 001117667; STL2, NP 001117668; STL3, NP 001117669), лектин икры сома *Silurus asotus* (SAL, Q9PVW8), лектины икры лучеперой рыбы *Salvelinus leucomaenis* (WCL1, BAB83628; WCL3, BAB83629), лектины икры мелкочешуйной краснопёрки *Tribolodon brandti* (TBL1, BAF45138; TBL2, BAF45139; TBL3, BAF45140), лектин слизистой оболочки икры лучеперой рыбы *Leiognathus nuchalis* (PFL1, BAE02882) и лектин икры морского ежа *A. crassispina* (SUEL, P22031). Выравнивание проводили с использованием Clustal W (ver1.83). N, M и C, использованные в названии последовательностей, представляют собой N-концевой, средний и C-концевой домены соответственно. Положения дисульфидных связей и элементы вторичной структуры показаны сверху. Консервативные остатки Cys выделены красным. Консервативные мотивы выделены синим цветом

Структура RBL (на примере мышиноного латрофилина-1 (Lat-1) GPCR) состоит из пяти  $\beta$ -тяжей, одной длинной  $\alpha$ -спирали и двух небольших спиральных элементов (рисунок 5).

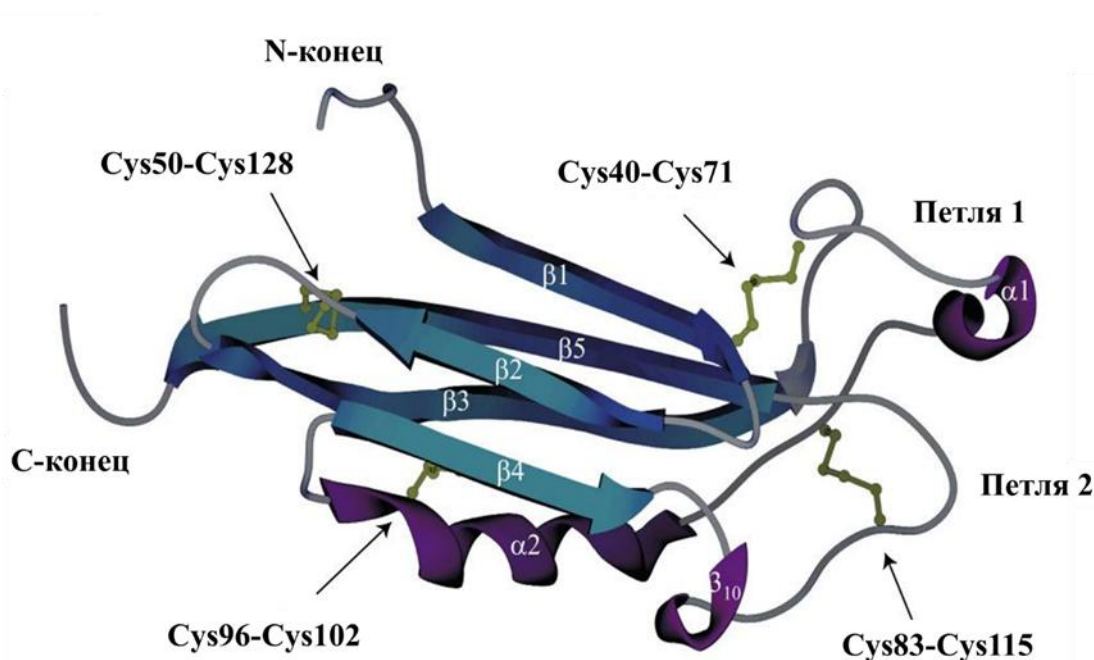


Рисунок 5 – Схематическое изображение структуры латрофилина-1 [98]. Указаны элементы вторичной структуры и петли 1 и 2. Дисульфидные мостики показаны зеленым цветом

Как видно на рисунке 5, полная структурная укладка представляет собой  $\beta$ -сэндвич с двумя антипараллельными листами (состоящими из  $\beta 1$ ,  $\beta 5$ ,  $\beta 3$  и  $\beta 2$ ,  $\beta 4$  соответственно). Два дисульфидных мостика стабилизируют элементы этого структурного ядра, соединяя концы листов  $\beta 2$  и  $\beta 5$  (Cys50–Cys128), а конец  $\alpha 2$  с  $\beta 4$  (Cys96–Cys102). RBL включает две длинные петли, соединяющие  $\beta 3$  и  $\alpha 2$  (петля 1) и  $\beta 4$  с  $\beta 5$  (петля 2). Эти петли не имеют регулярной вторичной структуры, за исключением двух упомянутых выше одновитковых спиральных элементов. Более короткая петля 2 содержит обычно консервативную богатую пролином последовательность, **PDPCPG**, и находится в контакте с большей петлей 1. Конформация этих петель закрепляется еще двумя дисульфидными мостиками, соединяющими две петли вместе (Cys83–Cys115) и конец  $\beta 1$  с петлей 1 (Cys41–Cys71) [98].

Описанная пространственная структура уникальна для всех CRD RBL, а такая комбинация  $\alpha$ -спиралей,  $\beta$ -листов и петель, не имеющих

регулярной вторичной структуры, наблюдается в семействах как RBL, так и лектинов С-типа, хотя функция RBL является металл-независимой [99].

На основании белковой архитектуры RBL объединены в характерные структурные семейства, содержащие прото (SUEL), химерный и тандемный типы [100]. Тип прото состоит из одного CRD RBL, образует ковалентно связанный через дополнительный остаток цистеина гомодимер, расположенный на N-конце. Тип тандемного повтора содержит два или три тандемно повторяющихся CRD в одном полипептиде. К этому типу относятся все известные RBL из икры рыб. Химерный тип состоит как из CRD RBL, так и других доменов. К этому типу относятся C21orf63 человека и латрофилин-1 мыши. C21orf63 представляет собой трансмембранный рецептор, содержащий два тандемно повторяющихся CRD RBL, трансмембранный домен и внутриклеточный домен. Латрофилин-1 также является трансмембранным рецептором с CRD RBL на N -конце [97].

На сегодняшний день члены семейства RBL идентифицированы у более чем 25 видов рыб, с преобладающей экспрессией в яичниках, икре и слизи кожи [101], а также у морских ежей [93], устрицы *Pteria penguin* [102], асцидии *Botryllus schlosseri* [103] и мечехвоста *Tachypleus tridentatus* [104]. В результате поиска в базе данных UniLectin3D по типу Mollusca обнаружено 473 предсказанных лектиновых кандидата RBL [105].

Вопрос о том, является ли L-рамноза физиологическим лигандом лектинов этого семейства, остается спорным, поскольку L-рамноза редко метаболизируется у животных. Предполагаемым естественным лигандом RBL рыб и беспозвоночных является гликофинголипид глоботриазилцерамид (Gb3) – глоботриоза, широко распространенный в мембранных липидных рафтах [50]. Экспрессия в поверхностных тканях и способность взаимодействовать с бактериями указывает на то, что RBL естественным образом связаны с врожденной иммунной системой

животных, что позволяет предположить их прямое участие в механизмах самозащиты организма [94].

Многие RBL могут взаимодействовать с грамотрицательными и грамположительными бактериями с последующей агглютинацией, распознавая ЛПС и ЛТК (липотейхоевую кислоту) соответственно. Так, RBL из радужной форели *O. mykiss* (STL), агглютинируют как грамположительные, так и грамотрицательные бактерии и ингибируют рост бактерий путем связывания с ЛПС и ЛТК бактериальных поверхностей [106]. RBL распознают некоторые О-антигены и связываются с гликолипидами и гликопротеинами патогенов рыб. Например, STL 2-подобный лектин стальноголовой форели *O. mykiss* выделен в высокой концентрации с поверхностного слоя спор паразита-микроспоридия *Loma salmonae*, который является возбудителем заболевания жабр как у диких, так и у выращенных в аквакультуре лососевых во всем мире. Это свидетельствует о том, что RBL принимают непосредственное участие во взаимодействии хозяина и патогена [107].

RBL действуют в отношении патогенов как опсоины, которые способствуют агглютинации бактерий и фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов. Так, рекомбинантный HPL (RBL из гемолимфы тайваньского мечехвоста *T. tridentatus*) избирательно связывается с грамположительной бактерией *Listeria monocytogenes* и проявляет антимикробный эффект с условно-патогенной грамотрицательной бактерией *Pseudomonas aeruginosa* (синегнойная палочка). Механизм антимикробного действия лектина заключается в ингибировании образования биопленки за счет связывания с рамнозосодержащими фрагментами бактерий, что приводит к снижению уровня внеклеточного дирамнолипида (регулятор биопленки). Это, в свою очередь, провоцирует диспергирование зрелой биопленки, вследствие чего снижается цитотоксичность бактерии по отношению к эпителиальным клеткам легких человека в тесте *in vitro*. Аналогично, снижается

инфицирование *P. aeruginosa* эмбрионов рыбок *Danio rerio in vivo*. Таким образом, rHPL служит антибиопленочным агентом с новым механизмом распознавания фрагментов рамнозы в липополисахаридах, дирамнолипидах и структурных полисахаридах в биопленках [108]. RBL устрицы *P. penguin* (PPL) агглютинирует как грамотрицательные, так и грамположительные бактерии, особо высокоспецифично взаимодействуя со штаммами *E. coli*. В высоких концентрациях PPL ингибирует рост *E. coli* и проявляет слабую, но отчетливую антибактериальную активность, снижая КОЕ гладких клеток в культуре на чашках [102].

Несколько RBL из икры кеты *O. keta*, CSL1, 2 и 3, индуцируют продукцию провоспалительных цитокинов, включая IL-1 $\beta$ 1, IL-1 $\beta$ 2, TNF- $\alpha$ 1, TNF- $\alpha$ 2 и IL-8, и взаимодействуют с Gb3 на поверхности перитонеальных макрофагов клеточной линии RTM5 радужной форели *O. mykiss* и фибробластоподобных клеток линии RTG-2, полученных из гонадной ткани радужной форели. Кроме того, показано, что CSL оказывают опсонизирующий эффект на RTM5, связываясь с Gb3 [109].

Рамнозоспецифичный лектин из колониальной асцидии *B. schlosseri* (BsRBL) действует как опсонин, усиливая фагоцитоз чужеродных клеток. BsRBL не оказывает прямого влияния на рост бактерий, его активность против микроорганизмов заключается в повышении их видимости для фагоцитов. BsRBL активирует фагоциты, индуцируя их направленное движение к связанным с лектином бактериальным клеткам, в результате чего происходит стимуляция фагоцитов, приводящая к респираторному взрыву с последующей выработкой соединений, содержащих АФК, обладающих микробицидной активностью, включая анионы супероксидов и пероксида [110].

Углевод-связывающий домен RBL появился на ранней стадии эволюции многоклеточных животных и обнаружен во множестве белков с различной архитектурой доменов, от базальных многоклеточных

животных (например, книдарий рамноспондинов) до млекопитающих (например, латрофилин).

#### 1.3.4 Галектины

Галектины (ранее известные как лектины S-типа) представляют семейство растворимых белков, которые с высокой специфичностью связывают  $\beta$ -галактозиды. Они присутствуют во многих формах жизни, от нематод и грибов до животных, где выполняют широкий спектр функций. В частности, галектины, обнаруженные у людей, различаются не только по тканевой экспрессии, но и по клеточной локализации, олигомеризации, пространственной архитектуре и средству связывания с углеводами. Это делает их ответственными за широкий спектр как внутри-, так и внеклеточных функций, включая участие в иммунных реакциях [111]. Им присущи многие черты цитоплазматических белков, т.е. они не содержат дисульфидных мостиков, отличаются отсутствием сигнального пептида и гликозильных остатков, во многих случаях их N-концевые аминокислоты ацетилированы [19, 112].

Галектины содержат консервативный CRD, состоящий примерно из 130-140 аминокислотных остатков, который сворачивается в виде двух антипараллельных  $\beta$ -слоев, расположенных в виде  $\beta$ -сэндвича, и принимает форму «закрывающейся кисти руки». «Тыльная сторона кисти» образована  $\beta$ -тяжами от F1 до F(X) (F-листы), а «ладонь» состоит из тяжей от S1 до S(Y) (S-листы). Во всех галектинах сайт связывания углеводов (carbohydrate-binding site – CBS) расположен на S-листовой стороне сэндвича, а мотив распознавания  $\beta$ -галактозидов образуется тяжами S4, S5 и S6. (рисунок 6).



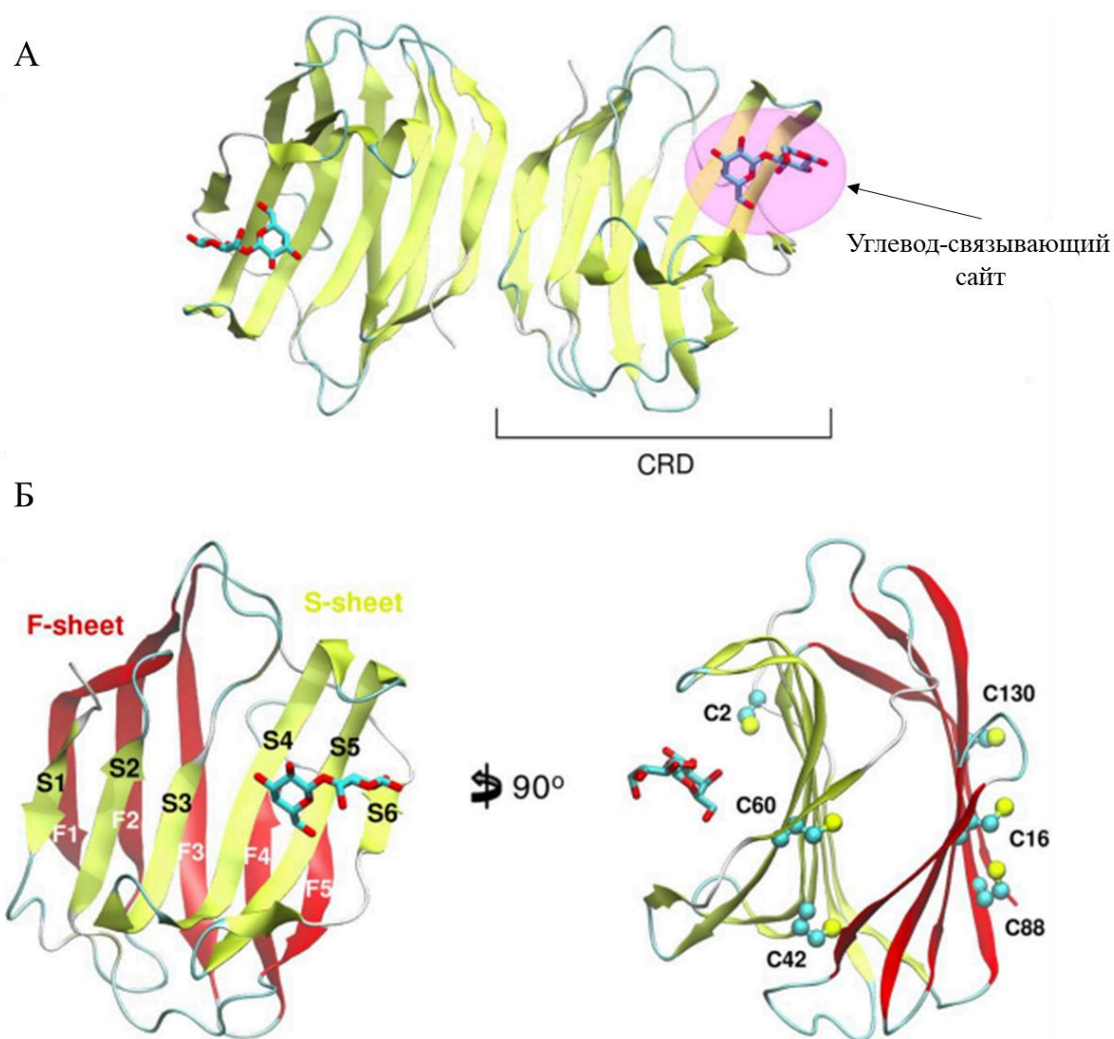


Рисунок 6 – Структура галектина Gal-1. А – димер Gal-1. Б – Мономер Gal-1 («S-лист» окрашен желтым цветом и «F-лист» – красным цветом). Все цистеины представлены в виде голубых шариков [111]

CRD галектинов имеют общие высококонсервативные остатки, ответственные за распознавание  $\beta$ -галактозидного лиганда, His, Asn, Arg и Glu (обозначены красным на рисунок 7). Они составляют углевод-связывающий мотив, который взаимодействует с этим лигандом посредством специфических водородных связей с гидроксилами C4 и C6 Gal и гидроксилом C3 GlcNAc, в то время как Trp и Val (обозначены синим на рисунок 7) обеспечивают аффинность связывания за счет гидрофобного стэкинга с углеводным фрагментом [113, 114].

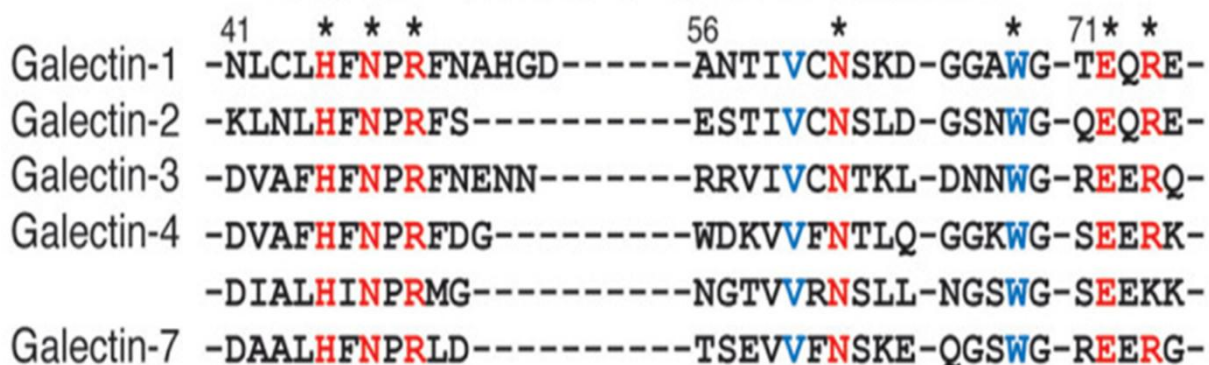


Рисунок 7 – Выравнивание аминокислотных последовательностей галектинов человека (1, 2, 3, 4, 7). Нумерация аминокислот показана для галектина-1, который имеет всего 135 аминокислот, другие галектины выровнены без указания их номеров. Звёздочкой показаны высококонсервативные остатки сайта связывания углеводов

На основании первичной структуры и субъединичной организации галектины млекопитающих классифицируются как прото, химерные и тандемно-повторяющиеся типы [115]. Галектины типа прото (галектины 1, 2, 5, 7, 10, 13, 14 и 15), состоящие из одного CRD с короткой N-концевой последовательностью, обычно представляют собой гомодимеры из нековалентно связанных субъединиц, в то время как галектины типа тандемных повторов (галектины 4, 6, 8, 9 и 12) содержат два неидентичных CRD, соединенных коротким пептидным линкером и являются мономерными. Галектины химерного типа имеют один C-концевой CRD, соединенный с Pro- и Gly – богатым N-концевым доменом, например галектин-3, состоящий из одного CRD и дополнительного N-концевого нелектинового домена (рисунок 8А).

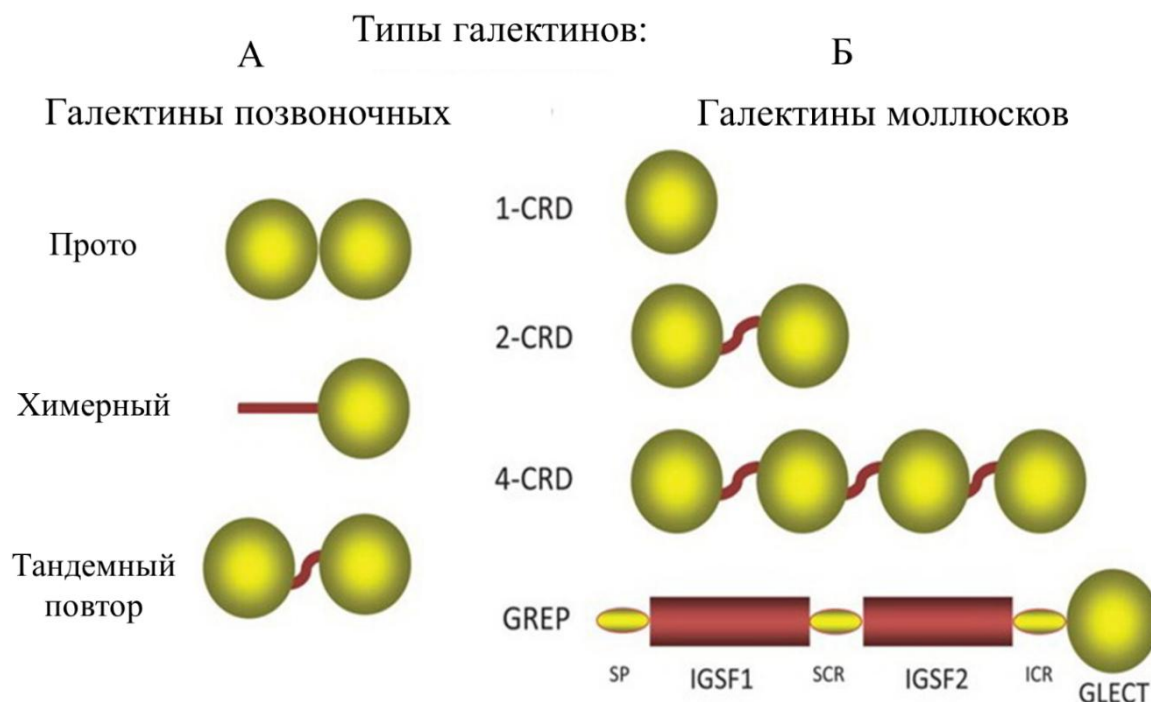


Рисунок 8 – Доменная организация галектинов у позвоночных и водных моллюсков [129]. А – Схематическое изображение доменной организации трех типов галектинов (прото, химерный и тандемный повтор) позвоночных. Б – Схематическое изображение доменной организации наиболее распространенных типов галектинов водных моллюсков

С точки зрения функциональных аспектов предполагается, что галектины позвоночных опосредуют различные биологические процессы, такие как защита от инфекций, активация клеток, дифференцировка, секреция цитокинов и апоптоз [116–120]. Более того, они являются частью врожденного иммунитета, участвуют во взаимодействиях хозяина и патогена путем распознавания ПАМП на поверхности вирусов, бактерий, грибов или простейших [121–123].

В отличие от других таксонов животных, идентификация и характеристика галектинов водных моллюсков началась сравнительно недавно. Аминокислотный анализ лектина из устрицы *Crassostrea virginica* выявил присутствие четырех CRD галектинов, хотя доменная организация белка не соответствовала ни одному из известных типов галектинов [124]. В течение года галектиноподобные аминокислотные последовательности были установлены в близкородственном моллюске *C. gigas* [125] и

пресноводной улитке *Biomphalaria glabrata* [126]. С тех пор галектины обнаруживают у все большего числа видов беспозвоночных, включая двустворчатых и брюхоногих моллюсков [127]. В отличие от трех типов галектинов позвоночных (рисунок 8 А), галектины моллюсков можно разделить на две основные группы в зависимости от количества CRD: 2-CRD и 4-CRD (рисунок 8Б). Исключение из этих основных групп представляют собой галектин из тихоокеанской устрицы *S. gigas* – единственный галектин, обнаруженный до сих пор у водных моллюсков с 1-CRD [125], и позднее описанный транскрипт химерного белка, родственного галектину (GREP), у *B. glabrata* [128].

Галектины 4-CRD представляют собой белки, состоящие из полипептидной цепи длиной примерно в 560 аминокислот с приблизительной молекулярной массой 64 кДа, в которой четыре похожих, но не идентичных CRD разделены короткими линкерными пептидами длиной от 8 до 17 аминокислотных остатков [124]. 2-CRD галектины состоят из полипептидов длиной от 280 до 300 аминокислот с приблизительной молекулярной массой 32 кДа, в которых два похожих, но не идентичных CRD разделены линкерным пептидом длиной 10–15 аминокислот [126].

Таким образом, очевидно, что у галектинов водных моллюсков проявились черты, отличные от описанных для галектинов позвоночных видов. Во-первых, репертуар галектинов у моллюсков менее разнообразен, поскольку у большинства видов было идентифицировано не более четырех различных CRD (чаще всего один или два), в отличие от репертуара млекопитающих, который включает 15 различных типов галектинов. Кроме того, галектины водных моллюсков обнаруживают доменную организацию, отличную от таковой у позвоночных. Наконец, у большинства моллюсков, исследованных на сегодняшний день, экспрессия галектинов повышается при инфекционном заражении, и это наблюдение

подтверждает их предполагаемую роль во врожденных иммунных реакциях [129].

Показано, что галектины моллюсков действуют ПРР-подобным образом, проявляя антибактериальные, противовирусные и противопаразитарные свойства [130], а бактериальная инфекция может модулировать экспрессию галектинов, которые, в свою очередь, регулируют дальнейшие иммунные реакции [131]. Установлено, что увеличение экспрессии галектинов беспозвоночных, индуцированное бактериями, вирусами, грибами или паразитами наблюдается у устриц [132], амфиоксусов [133] и моллюсков [134].

По данным филогенетического анализа 2-CRD и 4-CRD типы галектинов являются древними, поскольку они уже присутствовали у общего предка как двустворчатых, так и брюхоногих моллюсков. Поразительная структурная и эволюционная консервативность архитектуры и механизмов действия CRD подтверждает ключевую роль галектинов в основных биологических функциях, связанных с распознаванием  $\beta$ -галактозидов [114].

## 2 Материалы и методы исследования

### 2.1 Материалы и реактивы

В данной работе использованы следующие реактивы: трис, ДСН (додецилсульфат натрия), акриламид, бис-акриламид, твин-20, ТЕМЕД (тетраэтилметилендиамин), кумасси бриллиантовый синий R-250, ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота), ДАБ (диаминобензидин), Gal, GalNAc, Glc, GlcNAc, Fuc, Lac (лактоза), Man, LacNAc (N-ацетиллактозамин), ЛПС из *E. coli* Serotype 055:B5,  $\beta$ -1,3-глюкан из *Euglena gracilis*, пептидогликан из *S. aureus*, маннан из *Saccharomyces cerevisiae*, ТМБ (тетраметилбензидин), асиалофетуин, PSM (porcine stomach mucin, муцин желудка свиньи), OVA (ovalbumin, овальбумин), BSM (bovine submaxillary mucin, муцин подчелюстной железы быка), фетуин, асиалофетуин, ацетонитрил, ацетат натрия, ДТТ (дитиотреитол), реактив Бредфорда (Sigma, США); глутаровый альдегид (Acros Organics, США); лимонная кислота, серная кислота, соляная кислота, синапиновая кислота, фенол, дигидрофосфат натрия, гидроксид натрия, карбонат натрия, тетрагидридоборат натрия, бикарбонат натрия, периодат натрия, хлорид натрия, хлорид кальция, хлорид магния, хлорид марганца, хлорид цинка, перекись водорода, сульфат аммония, нитрат серебра, дигидрофосфат калия, гидрофосфат калия, этанол, метанол, уксусная кислота, формальдегид, глицерин, ДМСО (диметилсульфоксид), кристаллический фиолетовый (N,N,N',N'',N'''-гексаметилпарарозанилин хлорид) (Росхим, Россия); набор стандартных белков для электрофореза (Fermentas, Латвия); трипсин (Promega, США); БСА (бычий сывороточный альбумин) (ПанЭко, Россия); BrCN-активированная сефароза CL-4B, сефароза CL-4B (Amersham Pharmacia Biotech, Швеция); коммерческий набор для определения методом ИФА цитокинов DuoSet (R&D Systems, США); коммерческий набор для биотинилирования EZ-Link™ Sulfo-NHS-Biotinylation Kit (Thermo Fisher Scientific, США)); реагент для выделения

суммарной РНК ExtractRNA, набор реактивов для синтеза кДНК Mint, набор праймеров для специфической амплификации концевых фрагментов кДНК Mint RACE primer set, набор для амплификации Encyclo PCR kit (Евроген, Россия); компетентные клетки *E. coli* XL1-Blue (Stratagene, США); Т4-ДНК-лигаза, набор реактивов для секвенирования ДНК BigDye Terminator v.3.1 3.1, набор для секвенирования ABI Prism Big Dye Terminator 3.1 CycleSequencing Kit, ДНКаза I, плазмидный вектор pTZ57R/T, стандарты молекулярных масс ДНК DNA Ladder (100-3000 н.п.) (Thermo Fisher Scientific, США); бромистый этидий (MP Biomedicals, США), карбенициллин (Invitrogen, США); олигонуклеотидные праймеры, синтезированные фирмой ЗАО «Евроген» (Россия) (таблица 1).

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

Компоненты для приготовления 1 л среды LB – 10 г бакто-триптона, 5 г дрожжевого экстракта, 10 г NaCl. Компоненты для приготовления 1 л среды LB-Agar – 10 г бакто-триптона, 5 г дрожжевого экстракта, 10 г NaCl, 15 г бакто-агара.

Все растворы были приготовлены с использованием деионизованной воды (сопротивление 18,2 МОм), полученной на установке Milli-Q Integral 3 (Millipore, США).

Масса эритроцитов человека была получена в Краевой станции переливания крови (г. Владивосток), эритроцитов кролика в виварии ТИБОХ ДВО РАН. Бактерии и дрожжи (грамположительные бактерии *Staphylococcus aureus* КММ 434 и *Bacillus subtilis* ATCC 6633, грамотрицательные бактерии *Vibrio proteolyticus* CCUG 20302Т и *Escherichia coli* VKPM V 7335, дрожжевые грибы *Pichia pastoris* КММ 455) были предоставлены д.б.н. Недашковской Ольгой Ильиничной, лаборатория микробиологии ТИБОХ ДВО РАН.

Таблица 1 – Олигонуклеотидные праймеры, использованные в работе

Название праймера	Последовательность 5'→3'	Назначение
Lectin_PST_For	AGCNCARCCNCANWSN GARGG	вырожденный праймер на основе последовательности пептида LAQPTSE; 1-ый этап 3'-RACE; полугнездовая (seminested) ПЦР
Lectin_EEP_Rev	ACACCRAANCKRITYRTY NGGYTC	вырожденный праймер на основе последовательности пептида EP(D/N)(D/N)RFGE; полугнездовая ПЦР
Lectin_MMD_For	ATGATGGAYTAYGTNRA YTGGATG	вырожденный праймер на основе последовательности пептида MMDYV(N/D)WM; 2-ой этап 3'-RACE
GYL_Rev1-cap	ACATCTTTCCGGTCAAT GACTAT	1-ый этап 5'-RACE; полугнездовая ПЦР;
GYL_Rev2-T7	ACTATATTACCGATCCC AAGGAGT	2-ой этап 5'-RACE
GYL1_start	CAGTTTATTGAGGAAGG AGACTTG	Аmplификация последовательности зрелого белка
GYL1_stop1	CAATGACTATATTACCG ATCCCAA	Аmplификация последовательности зрелого белка
GYL1_stop2	GTACGGTTTTTCATCTTTC CGG	Аmplификация последовательности зрелого белка
M13_F	GTAAAACGACGGCCAGT	Секвенирование клонированных фрагментов
M13_R	CAGGAAACAGCTATGAC	



## 2.2 Общие методы

### 2.2.1 Метод Бредфорда

Наличие белка определяли по методу Бредфорда [135]. В 96-луночный планшет вносили по 0,1 мл пробы и контроля, затем в каждую добавляли по 0,1 мл реактива Бредфорда. Измеряли оптическую плотность при 595 нм после 10 мин встряхивания на шейкере для планшета и определяли концентрацию белка, используя в качестве стандарта БСА.

### 2.2.2 Фенол – сернокислотный метод

Наличие углеводов определяли фенол-сернокислотным методом [136].

### 2.2.3 Получение суспензии эритроцитов

Эритроцитарную массу, полученную из цельной крови человека/кролика, трижды промывали 0,01 М TBS (0,01 М Tris, 0,15 М NaCl, pH 8,0) и центрифугировали при 1500 об/мин в течение 5 мин. В дальнейшем использовали 2% суспензию эритроцитов, приготовленную в 0,01 М TBS.

### 2.2.4 Получение суспензии трипсинизированных эритроцитов

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

### 2.2.5 Получение суспензии фиксированных эритроцитов

К 2% суспензии трипсинизированных эритроцитов в 0,01 М TBS добавляли равный объем 0,2% глутарового альдегида и инкубировали при

комнатной температуре при перемешивании в течение 30 мин. Далее эритроциты отмывали от глутарового альдегида пять раз, смешивая с десятикратным объемом 0,01 М ТБС и центрифугированием при 1500 об/мин в течение 5 мин. В дальнейшем использовали 2% суспензию эритроцитов в 0,01 М ТБС.

#### 2.2.6 *Получение десИАлированного PSM*

5 мг PSM растворяли в 2 мл муравьиной кислоты (рН 2,0) и инкубировали 1,5 ч при температуре 80 °С. После диализовали против дистиллированной воды в течение 24 ч при 4 °С и лиофильно сушили.

#### 2.2.7 *Реакция прямой гемагглютинации (РПГА)*

Реакцию прямой гемагглютинации проводили с трипсинизированными эритроцитами человека групп крови 0, А, В и АВ, а также трипсинизированными эритроцитами кролика. К серии двукратных разведений 0,025 мл исходного раствора лектина с равным объемом буфера ТБС-Са (0,01 М Трис-НСl, 0,15 М NaCl, 10 мМ СаCl<sub>2</sub>, рН 8,0) в U-образных лунках несорбирующего планшета (Nunc, Нидерланды) добавляли по 0,025 мл 2% суспензии соответствующих эритроцитов, предварительно отмытых этим же буфером. Титр гемагглютинации определяли через 30 мин инкубирования при комнатной температуре как максимальное разведение раствора лектина, при котором наблюдается видимая гемагглютинация.

#### 2.2.8 *Реакция ингибирования РПГА*

Ингибирование РПГА проводили в ТБС-Са. Предварительно в РПГА определяли оптимальную концентрацию лектина, равную разведению его исходного раствора в предпоследней лунке, где наблюдалась отчетливо выраженная агглютинация. Готовили серию

двукратных разведений 0,025 мл моно-, олиго- и полисахаридов с равным объемом буфера TBS-Ca в U-образных лунках несорбирующего планшета (Nunc, Нидерланды). Далее во все лунки добавляли по 0,025 мл раствора лектина с оптимальной концентрацией и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем, в каждую лунку добавляли 0,025 мл 2% суспензии эритроцитов. Через 30 мин инкубации при комнатной температуре определяли минимальную концентрацию ингибитора, при которой происходит отмена РПГА.

### 2.2.9 Электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии ДСН (ДСН-ПААГ-электрофорез)

ДСН-ПААГ-электрофорез проводили по методу Лэммли [137] на приборе EPS 301 (Amersham Pharmacia Biotech, Швеция), используя 15% разделяющий и 4% концентрирующий ПААГ в присутствии 0,1% ДСН. Образцы готовили в буфере, содержащем 0,2% ДСН в отсутствии или присутствии дитиотреитола (ДТТ). В качестве стандартов использовали набор маркеров с известной молекулярной массой Amersham Pharmacia Biotech (Швеция). Гель прокрашивали кумасси R-250.

## 2.3 Методы выделения и очистки лектинов из двустворчатого моллюска *G. yessoensis*

### 2.3.1 Сбор сырья

Двустворчатого моллюска *G. yessoensis* собирали на Морской экспериментальной станции (МЭС) ТИБОХ ДВО РАН (побережье б. Троица, залив Посьета, Японское море) в августе 2020 и 2021 г.

### 2.3.2 Экстракция

Мускул, мантию, гепатопанкреас, жабры и гонады моллюска гомогенизировали для получения лектин-содержащих экстрактов. Лектин экстрагировали трехкратным объемом TBS-Ca в течение 12 ч при 4 °С с

перемешиванием. Полученные экстракты фильтровали через капроновую ткань и центрифугировали в течение 30 мин при 12000 об/мин.

### *2.3.3 Получение гемолимфы*

Гемолимфу отбирали из аддуктора стерильным шприцом, объединяли и центрифугировали при 2000 об/мин в течение 30 мин для осаждения гемоцитов. Бесклеточный супернатант диализовали против буфера ТВ-Са (0,01 М Трис-HCL, 10 мМ CaCl<sub>2</sub>, pH 8,0), центрифугировали при 14000 об/мин в течение 30 мин и использовали для выделения лектина. Азид натрия и PMSF были добавлены для предотвращения роста бактерий и ингибирования активности протеаз соответственно.

### *2.3.4 Определение титра гемагглютинирующей активности (ГА) лектинов в экстрактах органов и гемолимфе моллюска*

ГА лектинов экстрактов органов и гемолимфы определяли методом РПГА с фиксированными трипсинизированными эритроцитами кролика и фиксированными трипсинизированными эритроцитами человека групп крови 0, А, В и АВ. Титр гемагглютинации определяли через 30 мин инкубирования при комнатной температуре как максимальное разведение раствора лектина, при котором наблюдается видимая гемагглютинация

### *2.3.5 Синтез аффинного сорбента лактозил-сефароза*

Аффинный сорбент синтезировали путем иммобилизации лактозы на сефарозе CL-4В (Amersham Pharmacia Biotech, Швеция). Для этого 40 мл сефарозы отмывали водой, затем 0,5 М Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH 11,0 и сушили на воздухе. Гель суспендировали в 80 мл 0,5М Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH 11,0, добавляли 4 мл дивинилсульфона и инкубировали 70 мин при комнатной температуре, непрерывно встряхивая. Активированную сефарозу отмывали водой, затем к ней приливали раствор 400 мг лактозы в 80 мл 0,5 М Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH 10,0 и

встряхивали при 4 °С в течение 48 ч. Сорбент отмывали водой, суспендировали в 0,5 М Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, рН 8,5, содержащем 1,6 мл β-меркаптоэтанола, встряхивали 3 ч при комнатной температуре, отмывали водой, TBS-Са и переносили в колонку [138].

### 2.3.6 Синтез аффинного сорбента PSM-сефароза

7,5 г BrCN-активированной сефарозы CL 4В гидротировали в течение 30 мин в холодном растворе 1 мМ HCl и отмывали тем же раствором на фильтре Шотта из расчета 200 мл раствора на один грамм сорбента. Далее гель промывали 10 объемами дистиллированной воды и буфером для связывания (0,1 М NaHCO<sub>3</sub>, 0,5 М NaCl, рН 7,9) из расчета 5 мл буфера на один грамм сухого геля. После этого гель смешивали с лигандом PSM, растворенном в буфере для связывания (10 мг на 1 мл геля, при соотношении объемов раствора лиганда и геля 2:1), и оставляли в течение ночи при 4 °С и перемешивании. Гель промывали буфером для связывания до нулевой абсорбции при 280 нм. Активные группы матрицы, не прореагировавшие с лигандом, блокировали 0,2 М раствором глицина в течение 16 ч при 4 °С и перемешивании. После блокировки гель пять раз попеременно промывался буфером для связывания и ацетатным буфером (0,1 М CH<sub>3</sub>COONa, 0,5 М NaCl, рН 4,0). Промытый сорбент переводили в TBS-Са для дальнейшей хроматографии.

### 2.3.7 Выделение дрожжевого маннана

Гликополимеры выделяли из культуры дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* штамма X2180 путем автоклавирования с 50 мМ Na-цитратным буфером, рН 7,5 в течение 1 ч, с последующим осаждением этанолом. Повторно растворяли в воде, заряженные вещества удаляли осаждением с помощью цетовлона. Маннан осаждали 1% тетраборатом натрия, растворяли в 2% АсОН и повторно осаждали этанолом. Осадок

обрабатывали протеиназой К (50 °С, 3 ч), подвергали диализу, хроматографировали на колонке DEAE TSK 650M с использованием градиента NaCl от 0 до 1 М и подвергали диализу [139]. Полученный полисахарид анализировали с использованием химических методов и <sup>13</sup>C ЯМР-спектроскопии.

### 2.3.8 Синтез аффинного сорбента маннан-сефароза

Аффинный сорбент синтезировали путем иммобилизации внеклеточного маннана, выделенного из культуры дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* штамм X2180, на сефарозе CL-4B (Amersham Pharmacia Biotech, Швеция). Для этого 40 мл сефарозы отмывали водой, затем 0,5 М Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH 11,0. Гель суспендировали в 80 мл 0,5 М Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH 11,0, добавляли 4 мл дивинилсульфона и инкубировали 70 мин при комнатной температуре с перемешиванием. Активированную сефарозу отмывали водой, затем к ней добавляли раствор 400 мг маннана в 80 мл 0,5 М Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH 10,0 и инкубировали с перемешиванием при 4 °С в течение 48 ч. Сорбент отмывали водой, суспендировали в 0,5 М Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH 8,5, содержащем 1,6 мл β-меркаптоэтанола, встряхивали 3 ч при комнатной температуре, отмывали водой, TBS-Са и переносили в колонку [138].

### 2.3.9 Аффинная хроматография на лактозил-сефарозе

Аффинную хроматографию проводили в объёме. Гемолимфу наносили на сорбент в соотношении 1 мл гемолимфы на 1 мл сорбента. Связывание с лактозил-сефарозой происходило в течение 12 ч при 4 °С, с перемешиванием. Полноту связывания лектина с сорбентом определяли методом ГА в несвязанной фракции. Сорбент промывали TBS-Са от белка (до нулевой адсорбции при 280 нм) и от полисахаридов (проверяли фенол-сернокислотным методом). Лектин элюировали буфером TBS-Са, содержащим 0,2 М рамнозу. Общее содержание белка определяли методом

Бредфорда, используя для построения калибровочной кривой БСА. Белоксодержащие фракции объединяли, концентрировали, диализовали против дистиллированной воды и лиофильно сушили.

#### 2.3.10 *Аффинная хроматография на PSM-сефарозе*

Аффинную хроматографию проводили в объёме. Несвязанную с лактозил-сефарозой фракцию гемолимфы наносили на PSM-сефарозу в соотношении 1 мл гемолимфы на 1 мл сорбента. Связывание с сорбентом происходило в течение 12 ч при 4 °С, с перемешиванием. Полноту связывания лектина с сорбентом определяли методом ГА в несвязанной фракции. Сорбент промывали TBS-Са от белка (до нулевой адсорбции при 280 нм) и от полисахаридов (проверяли фенол-сернокислотным методом). Лектин элюировали глицин-HCl буфером с рН 2,9 с последующей нейтрализацией. Общее содержание белка определяли по методу Бредфорда и по оптической плотности при длине волны 280 нм. Фракции, проявляющие активность в реакции ГА, объединяли, диализовали и лиофильно сушили.

#### 2.3.11 *Аффинная хроматография на маннан-сефарозе*

Аффинную хроматографию проводили в объёме, инкубируя несвязанную с PSM-сефарозой фракцию гемолимфы с маннан-сефарозой. Полноту связывания лектина с сорбентом определяли методом ГА. Через 1 ч в несвязанной фракции лектинная активность отсутствовала. Сорбент отмывали тем же буфером от белка (до нулевой адсорбции при 280 нм) и от полисахаридов (проверяли фенол-сернокислотным методом). Маннан-специфичный лектин элюировали TBS-Са, содержащим 0,2 М маннозу. Белоксодержащие фракции объединяли, концентрировали, диализовали против дистиллированной воды и лиофильно сушили.

### 2.3.12 Гель-фильтрация

Хроматографию фракций, полученных после аффинных сорбентов, проводили на хроматографе АКТА FPLC (Amersham Pharmacia Biotech, Швеция) с колонкой Superdex 75 HR 10/30 (1x30 см), уравновешенной TBS-Ca. На колонку наносили раствор лектина в буфере TBS-Ca, предварительно отфильтрованный через шприцевой фильтр 0,45 мкм. Лектины GYL и GYL-R подвергались гель-фильтрации на колонке Superdex 75 Increase 10/300 GL (GE Healthcare, Швеция), а GYLman на колонке Superose 6 Increase 10/300 GL (GE Healthcare, Швеция). Белок элюировали тем же буфером со скоростью потока 0,5 мл/мин и контролировали по поглощению при 280 нм. Фракции собирали, анализировали с помощью РПГА и ДСН-ПААГ-электрофореза, объединяли, диализовали против дистиллированной воды и лиофильно сушили.

## 2.4 Физико-химические характеристики GYL, GYLman и GYL-R

### 2.4.1 МАЛДИ-ВП масс-спектрометрия

Образцы лектинов анализировали методом масс-спектрометрии с использованием Ultraflex III МАЛДИ-ВП (Bruker, Германия) с импульсным УФ-лазером (энергия импульса 100 мДж, 337 нм). В качестве матрицы использовали синапиновую кислоту (sinapinic acid), смешивая ее с образцом белка в соотношении 1:1. Анализ проводили в линейном режиме с использованием цитохрома С (12361,55 Да) и миоглобина (16952,55 Да) в качестве внешних стандартов.

### 2.4.2 Определение $Ca^{2+}$ -зависимости активности лектинов

Растворы GYLman, GYL и GYL-R объемом 0,5 мл диализовали против 0,01 М TBS, содержащем 0,02 М ЭДТА при 4 °С в течение 12 ч. Затем диализовали против 0,01 М TBS в течение суток. Далее оценивали



активность лектинов РПГА в 0,01 М ТBS с добавлением 0, 1, 5, 10, 20 мМ CaCl<sub>2</sub>.

#### 2.4.3 *Определение термостабильности лектинов*

Аликвоты GYLman, GYL и GYL-R объемом 0,05 мл выдерживали в течение 30 мин в термостате при температурах 4, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 и 105 °С, после чего оценивали активность лектинов с помощью РПГА при комнатной температуре.

#### 2.4.4 *Определение pH-стабильности лектинов*

Аликвоты GYLman, GYL и GYL-R объемом 0,5 мл диализовали против 50 мл буферного раствора при комнатной температуре без перемешивания в течение 24 ч. Буферные растворы: 0,01 М цитратный буфер (pH 2,0, 3,0, 4,0, 5,0, 6,0), 0,01 М ТBS (pH 7,0, 8,0, 9,0), 0,01 М ацетатный буфер (pH 10,0, 11,0, 12,0). Далее аликвоты подвергали обратному диализу в течение 24 ч против ТBS-Са при 4 °С. Активность лектинов оценивали с помощью РПГА.

#### 2.4.5 *Определение аминокислотного состава*

К 100 мкг GYLman добавляли 0,5 мл 6 N HCl и гидролизовали в среде аргона 24 ч при 100 °С. По окончании гидролиза соляную кислоту упаривали и анализировали состав на автоматическом аминокислотном анализаторе (Hitachi 835, Japan).

#### 2.4.6 *Трипсинолиз лектинов в геле*

После ДСН-ПААГ-электрофореза в 15% ПААГ гель прокрашивали кумасси R-250 и вырезали белковые полосы, соответствующие лектинам. Далее гель отмывали от красителя (дважды по 30 мин смесью

ацетонитрила и 0,05 М карбоната аммония (1:1, об/об) и один раз в течение 20 мин ацетонитрилом) и высушивали. Высушенные полосы геля подвергли воздействию трипсина (Promega, США) с концентрацией 0,0125 мг/мл в течение 12 ч при 37 °С. Полученные пептиды экстрагировали из геля ацетонитрилом и анализировали методом МАЛДИ-ВП масс-спектрометрии.

## **2.5 Изучение углеводной специфичности GYL, GYLman и GYL-R**

### *2.5.1 Получение конъюгатов GYL, GYLman и GYL-R с пероксидазой хрена (ПХ)*

Конъюгат получали периодатным методом [140]. 2 мг ПХ (Sigma, США) растворяли в 0,5 мл дистиллированной воды и добавляли 0,1 мл 0,1 М NaIO<sub>4</sub>. Инкубировали 30 мин в темноте при комнатной температуре. Окисленную пероксидазу диализовали ночь против 1 л 0,001 М ацетатного буфера pH 4,4. Лектин растворяли в 0,5 мл 0,1 М карбонатного буфера pH 9,5, смешивали с раствором окисленной ПХ. Конъюгат инкубировали 2 ч при комнатной температуре и добавляли 0,05 мл раствора NaBH<sub>4</sub>, концентрация 4 мг/мл, инкубировали еще 2 ч при комнатной температуре и диализовали против 0,01 М TBS pH 8,0 сутки при 4 °С, затем добавляли глицерин в отношении 1:1 и хранили конъюгат при -18 °С.

### *2.5.2 Подбор условий для ТЛФА*

На 96-луночный планшет (Nunc, Дания) адсорбировали PSM в концентрации 5, 10, 20, 50 мкг/мл в TBS-Ca в дубликатах по 0,1 мл в лунку, в последние два ряда адсорбировали БСА в концентрации 50 мкг/мл в TBS-Ca в качестве отрицательного контроля связывания. Инкубировали ночь при 4 °С, после чего промывали 3 раза отмывочным буфером (TBS-Ca, 0,05% твин-20). Блокировали свободные места связывания на планшете 1% раствором БСА в TBS-Ca, по 0,3 мл мкл в каждую лунку,

инкубировали в течение 1 ч при 37 °С с перемешиванием, после чего 3 раза промывали отмывочным буфером. Готовили конъюгат лектинов с ПХ (GYL-ПХ, GYLman-ПХ и GYL-R-ПХ) в концентрации 40 мкг/мл (разведение 1:50 исходного раствора конъюгата, полученного в п. 2.5.1) и методом двойных разведений наносили на планшет в дубликатах по 0,1 мл в отмывочном буфере. Инкубировали 1 ч при 37 °С с перемешиванием, отмывали планшет, как описано выше. В каждую лунку добавляли по 0,1 мл субстрата ТМБ. Субстрат готовился из расчёта 0,1 мл ТМБ (10 мг ТМБ на 1 мл ДМСО) и 1,5 мкл H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> на 10 мл 0,1 М ацетатного буфера, рН 6. После развития окраски реакцию останавливали, добавляя в каждую лунку 0,05 мл 5%-ной серной кислоты. Количество связавшегося лектина определяли путем измерения оптической плотности на спектрофотометре  $\mu$ Quant (BioTek Instruments, США) при 450 нм.

### *2.5.3 Определение углеводной специфичности лектинов*

На 96-луночный планшет (Nunc, Дания) адсорбировали PSM в концентрации 50 мкг/мл в TBS-Ca по 0,1 мл раствора во все лунки. Инкубировали ночь при 4 °С, после чего промывали и блокировали свободные места связывания, как описано выше. Потенциальные ингибиторы готовили в необходимой концентрации в TBS-Ca. Методом двойных разведений в дубликатах, вносили в каждую лунку по 0,05 мл. Одновременно добавляли во все лунки по 0,05 мл конъюгата лектина в начальной концентрации 4 мкг/мл в отмывочном буфере. Инкубировали 1 ч при 37 °С с перемешиванием, после отмывали планшет. Во все лунки вносили по 0,1 мл субстрата ТМБ и инкубировали в темноте 5 мин, после чего останавливали реакцию 0,05 мл 5% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Измеряли оптическую плотность на спектрофотометре  $\mu$ Quant (BioTek Instruments, США) при длине волны 450 нм.

#### 2.5.4 Биотинилирование GYL и GYL-R

Биотинилирование лектинов (GYL и GYL-R) проводили, используя коммерческий набор EZ-Link™ Sulfo-NHS-Biotinylation Kit.

Готовили растворы GYL и GYL-R 1 мг/мл в буфере 0,01 М PBS pH 7,2, добавляли 2,66 мг биотина и оставляли инкубироваться на 24 ч при 4 °С. Затем наносили смесь на колонку Zeba™ Spin Desalting Column и центрифугировали 2 мин при 1000 об/мин. В лунки микропланшета вносили по 0,16 мл PBS и по 0,02 мл раствора премикса НАВА/Avidin. Далее в одну из лунок вносили раствор биотинилированного лектина, а в качестве положительного контроля в другую лунку вносили 0,02 мл биотинилированной пероксидазы хрена. В качестве отрицательного контроля вносили 0,02 мл PBS. Измеряли оптическую плотность растворов в лунках при 500 нм после 2 мин встряхивания на шейкере для планшета.

Далее определяли количество связанного биотина в НАВА калькуляторе, представленном на сайте Thermo Fisher Scientific: <https://www.thermofisher.com/ru/ru/home/life-science/protein-biology/protein-labeling-crosslinking/biotinylation/biotin-quantitation-kits/haba-calculator.html>.

#### 2.5.5 Определение тонкой углеводной специфичности

Тонкую углеводную специфичность лектина определяли с помощью гликоэрея [141]. Печать гликочипов была произведена на бесконтактном принтере биочипов sciFLEXARRAYER S5 (Scienion, Германия) на базе ООО «Семиотик» и лаборатории углеводов Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

В качестве подложки использовались стекла, покрытые активированным полимером, производства Schott Nexterion slide H (Schott Nexterion®, Германия), на которые были нанесены 609 образцов N- и O-связанных природных и синтетических гликанов. Для анализа был взят

биотинилированный GYL в буфере TBS-Ca и биотинилированный GYL-R в буфере 0,01 М PBS pH 7,2. Количество биотинилированных GYL и GYL-R, связавшихся с каждым гликаном, определяли после добавления FITC-меченного стрептавидина и сканирования конфокальным флуоресцентным сканером ProScanArray Gx Innoscan 1100 AL и MArS. Интенсивность флуоресценции выражалась в относительных единицах (RFU – relative fluorescence units). Сканирование изображений производилось с разрешением 5-10 мкм. Подбор параметров сканирования производился эмпирическим путем для гликочипов, использованных в определенном эксперименте, с учетом основного требования – более 95% сигналов должны попадать в область шкалы измерения прибора, т.е. не превышать значения RFU 65535. В качестве положительных контролей для последующей оценки флуоресцентных сигналов использовался флуоресцентно-меченный Alexa555 и Alexa-647 стрептавидин в концентрации 20 мкмоль/л. В качестве отрицательного контроля – использовали трегалозу в концентрации 50 мкМ.

Работа выполнена на базе ООО «Семиотик» и лаборатории углеводов ИБХ РАН на коммерческой основе.

## **2.6 Методы установления структуры лектинов**

### *2.6.1 N-концевое секвенирование GYL по Эдману*

Для анализа полипептидов методом N-концевого секвенирования по Эдману, образец GYL после ДСН-ПААГ-электрофореза в восстанавливающих условиях в 15% ПААГ переносили методом электроблоттинга на поливинилиденфторидную мембрану (Novex, США) в 192 мМ трис-глициновом буфере (pH 7,4) с 20% содержанием метанола и 0,01% ДСН при силе тока 160 мА в течение 1 ч. После окрашивания раствором Ронсеау S обнаруженную полосу GYL вырезали и подвергали секвенированию по методу деградации Эдмана с использованием

секвенатора белков PPSQ-33A (Shimadzu, Япония). Анализ проводили согласно протоколу производителя. Аминокислотные остатки идентифицировали как производные фенилтиогидантиона (PTH) с использованием программного обеспечения LabSolutions (Shimadzu, Япония). Работу проводили на базе лаборатории нейрорецепторов и нейрорегуляторов ИБХ РАН.

### 2.6.2 *nano-ESI MS/MS* масс-спектрометрия GYL и GYL-R

Секвенирование *de novo* GYL и GYL-R проводили путем расщепления трипсином и анализа полученных пептидов. Образцы загружали в самодельную колонку-ловушку 100 мкм × 20 мм, заполненную сорбентом Inertsil ODS3 3 мкм (GL Sciences, Япония) в подвижной фазе (2% ацетонитрила (ACN), 98% H<sub>2</sub>O, 0,1% трифторуксусной кислоты (ТФУ) в количестве 0,01 мл в мин потока и разделяли при комнатной температуре. Обращенно-фазовую хроматографию проводили с использованием системы Ultimate 3000 Nano LC (Thermo Fisher Scientific, США), которая была соединена с масс-спектрометром Orbitrap Q Exactive Plus (Thermo Fisher Scientific, США) через источник наноэлектрораспыления (Thermo Fisher Scientific, США). В качестве подвижной фазы А использовали воду, содержащую 0,1% (об./об.) ТФУ, а в качестве подвижной фазы В использовали ACN, содержащую 0,1% ТФУ (об./об.) и 20% (об./об.) H<sub>2</sub>O [142]. Пептиды GYL элюировали из колонки-ловушки с линейным градиентом: 3–6% подвижной фазы В в течение 3 мин; 6–25% В в течение 30 мин, 25–40% В в течение 25 мин, 40–60% В в течение 4 мин, 60% В в течение 3 мин, 60–99% В в течение 0,1 мин, 99% В в течение 10 мин, и 99–2% В в течение 0,1 мин при скорости потока 500 нл/мин. После каждого градиента колонку повторно уравнивали А в течение 10 мин. Данные MS были собраны в режиме сбора данных (DDA).

Для анализа использовали режим работы спектрометра "high/high" с разрешением 120k/35k (MS и MS/MS). Секвенирование *de novo* проводили с использованием пакета программного обеспечения PEAKS Studio 10.0 (Bioinformatics Solutions Inc., Канада) с точностью массы 10 ppm/0,02 Да (MS и MS/MS). В последующий анализ были взяты только пептиды со значениями ALC>80% (Average Local Confidence, средняя локальная достоверность) [143]. Работа выполнена на базе ИБХ РАН на коммерческой основе.

### 2.6.3 Установление первичной структуры GYL

#### 2.6.3.1 Выделение РНК и синтез кДНК

Суммарную РНК выделяли из гемоцитов двустворчатого моллюска *G. yessoensis* с использованием набора реактивов ExtractRNA (Евроген, Россия) (по методике производителя). РНК была растворена в деионизованной воде и хранилась при -80 °С. Целостность РНК определяли с помощью горизонтального гель-электрофореза в камере для электрофоретического разделения ДНК PSU 400/600 (Scie-Plas Ltd., Великобритания), концентрацию и степень чистоты – на спектрофотометре Implen Nanophotometre P300 (Implen, Германия). Синтез и получение амплифицированной кДНК проводили с использованием 2 мкг суммарной РНК, предварительно обработанной ДНКазой I (Thermo Fisher Scientific, США), и набора реактивов Mint для синтеза кДНК (Евроген, Россия) на амплификаторе Gene Amp PCR System 2720 (Applied Biosystems, США).

#### 2.6.3.2 3'-RACE ПЦР

Для постановки всех этапов 3'-RACE использовали Encyclo PCR набор и Mint RACE primer набор (Евроген, Россия). Первый этап заключался в проверке специфичности взаимодействия вырожденного праймера Lectin\_PST\_For (таблица 1) с амплифицированной кДНК и

получении с его помощью 3'-концевой области целевой кДНК. Амплифицированную кДНК прогревали при 70 °С в течение 2 мин, после чего отбирали 2 мкл, разводили в 38 мкл воды (20х кДНК). Далее готовили реакционную смесь (деионизованная вода – 36 мкл, 10х буферный раствор для Encyclo ДНК-полимеразы – 5 мкл, 2 мМ дНТФ (по 2 мМ каждого нуклеотида) – 5 мкл, 2 мкМ Lectin\_PST\_For – 1 мкл, 20х кДНК – 2 мкл, 50х Encyclo ДНК-полимераза – 1 мкл). Приготовленную смесь разделяли на 2 части по 25 мкл. К одной из них добавляли 1 мкл 25х Step-out primer mix 1, а вторую оставляли в качестве контроля и добавляли 1 мкл деионизованной воды. Пробирки помещали в амплификатор Gene Amp PCR System 2720 (Applied Biosystems, США), задавали следующую программу амплификации: 95 °С – 1 мин; 22 цикла 95 °С – 15 с, 55 °С – 20 с, 72 °С – 3 мин; 72 °С – 7 мин.

На втором этапе проверяли специфичность взаимодействия другого вырожденного праймера Lectin\_MMD\_For (таблица 1) с целью получения специфического фрагмента 3'-концевой области целевой кДНК. Дополнительную проверку специфичности полученного фрагмента проводили с использованием вырожденного праймера Lectin\_EEP\_Rev (таблица 1) и праймера 25х Step-out primer mix 2 из набора Mint RACE primer. Подготовка матрицы, состав реакционной смеси и условия амплификации выполняли, как описано выше для этапа 1. Очистку полученного ПЦР-фрагмента (~450 п.н.) проводили с помощью набора Clean Up Mini (Евроген, Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Клонирование и секвенирование ПЦР-фрагмента выполняли так, как описано ниже в 2.6.3.7.

### 2.6.3.3 5'-RACE ПЦР

Для постановки всех этапов 5'-RACE использовали Encyclo PCR набор и Mint RACE primer набор. Первый этап заключался в проверке



специфичности взаимодействия ген-специфичного праймера GYL\_Rev1-sar (таблица 1) с амплифицированной кДНК и получении с его помощью 5'-концевой области целевой кДНК. Подготовка матрицы, состав реакционной смеси (используя ген-специфичный праймер GYL\_Rev1-sar и праймер 25x Step-out primer mix 1 из набора Mint RACE primer) и условия амплификации выполнялись, как описано для этапа 1 в п. 2.6.3.2.

На втором этапе проверяли специфичность взаимодействия другого ген-специфичного праймера GYL\_Rev2-T7 (таблица 1) с целью получения специфического фрагмента 5'-концевой области целевой кДНК. Подготовка матрицы, состав реакционной смеси (используя ген-специфичный праймер GYL\_Rev2-T7 и праймер 25x Step-out primer mix 2 из набора Mint RACE primer) и условия амплификации выполнялись также, как описано для этапа 1 в п. 2.6.3.2. Очистку полученного ПЦР-фрагмента (~600 п.н.) проводили с помощью набора Clean Up Mini (Евроген, Россия) по инструкции производителя. Клонирование и секвенирование ПЦР-фрагмента проводили, как описано ниже в 2.6.3.7.

#### *2.6.3.4 Амплификация полноразмерного транскрипта гена GYL*

Для постановки амплификации использовали Encyclo PCR набор и ген-специфичные праймеры GYL1\_start, GYL1\_stop1 и GYL1\_stop2. Подготовка матрицы, состав реакционной смеси (используя GYL1\_start и GYL1\_stop1 (смесь 1); GYL1\_start и GYL1\_stop2 (смесь 2)) и условия амплификации выполнялись, как описано для этапа 1 в п. 2.6.3.2. Очистку полученного ПЦР-фрагмента (~700 п.н.) проводили с помощью набора Clean Up Mini (Евроген, Россия) по инструкции производителя. Клонирование и секвенирование ПЦР-фрагмента проводили, как описано ниже в 2.6.3.7.

### 2.6.3.5 Электрофорез фрагментов ДНК

Анализ фрагментов ДНК проводили с помощью электрофореза в 1% или 1,5% агарозном геле при напряжении 80 В в буфере TAE (40 mM Трис-ацетатный буферный раствор pH 7,6, 1mM ЭДТА). В качестве стандартов использовали маркеры молекулярных длин и веса ДНК в диапазоне 100–3000 н.п. Агарозный гель окрашивали раствором бромистого этидия (1 мкг/мл). Визуализацию образцов осуществляли при помощи системы гель-документирования VersaDoc 4000 (Bio-Rad, США).

### 2.6.3.6 Получение генетических конструкций на основе вектора pTZ57R/T

Очистку ПЦР-фрагментов проводили с помощью набора Clean Up Mini (Евроген, Россия) по инструкции производителя. Лигирование ПЦР-фрагментов в плазмидный вектор pTZ57R/T проводили с помощью набора InsTAclone PCR Cloning Kit (Thermo Fisher Scientific, США) по инструкции производителя.

Компетентные клетки штамма *E. coli* Top10 трансформировали 1 мкл лигазной смеси путем электропорации в приборе Multiporator (Eppendorf, Германия) при напряжении 1700 В (5 мсек). Затем к клеткам добавляли 1 мл среды LB, инкубировали при 37 °С в течение 60 мин при 180 об/мин и рассеивали шпателем на чашки Петри со средой LB-агар с карбенициллином (100 мкг/мл). Чашки инкубировали при 37 °С в течение 16–18 ч.

### 2.6.3.7 Отбор колоний, содержащих рекомбинантные плазмиды

Колонии штамма *E. coli* Top10 (трансформированные продуктами лигирования) тестировали на наличие плазмидного вектора с нужной вставкой с помощью ПЦР. Реакционную смесь для проведения ПЦР готовили из расчета 10 мкл на каждую колонию. Состав реакционной смеси: деионизованная вода – 7,6 мкл, 10x буферный раствор для Epcyclo

ДНК-полимеразы – 1 мкл, смесь дНТФ (концентрация каждого – 10 мМ) – 0,2 мкл, 10 мкМ M13\_F праймер – 0,5 мкл, 10 мкМ M13\_R праймер – 0,5 мкл, Encyclo ДНК-полимераза – 0,2 мкл. В качестве ДНК-матрицы использовали клетки отдельной колонии, которые также дублировали путем рассеивания на новой чашке Петри со средой LB-агар, содержащей карбенициллин (100 мкг/мл), и инкубировали при 37 °С в течение 18 ч. Реакцию проводили на амплификаторе при следующих условиях: 94 °С – 5 мин, затем 25 циклов: 94 °С – 20 сек, 55 °С – 20 сек, 72 °С – 20 сек, затем 72 °С – 5 мин, 10 °С – ∞. Результаты визуализировали при помощи электрофореза в 1,5% агарозном геле. Колонии с ПЦР-фрагментами соответствующей длины отбирали для секвенирования.

#### *2.6.3.8 Секвенирование ДНК и анализ последовательностей*

Секвенирующая реакция проводилась с помощью набора ABI Prism Big Dye Terminator v.3.1 (Applied Biosystems, США) на генетическом анализаторе SeqStudio (Thermo Fisher Scientific, США) в соответствии с рекомендациями и протоколами производителя с использованием стандартных M13 праймеров (таблица 1). Анализ и сборку последовательностей проводили с использованием пакета программ MEGA X [144]. Секвенирование выполнял м.н.с лаборатории морской биохимии ТИБОХ ДВО РАН Балдаев С. Н.

#### *2.6.4 Спектроскопия кругового дихроизма GYL, GYL<sub>map</sub> и GYL-R*

Регистрацию спектров кругового дихроизма (КД) проводили на спектрометре Chirascan-plus CD в кварцевых кюветах с длиной оптического пути 0,1 и 1 см для съемки спектров в пептидной (190-240 нм) и ароматической (230-310 нм) областях соответственно. Кювету с раствором лектина в концентрации 0,4 мг/мл в деионизированной воде термостатировали при заданной температуре в течение 20–25 мин до

снятия спектра КД. Регистрацию спектров проводили в диапазоне температур от 25 до 95 °С. Содержание элементов вторичной структуры белка рассчитывали с помощью пакета программ CD Pro, используя метод Sreerama [145].

#### 2.6.5 Расчет элементов вторичной структуры GYL *in silico*

Предсказание элементов вторичной структуры было осуществлено сервером PredictProtein (<https://www.predictprotein.org/>) по аминокислотной последовательности GYL.

#### 2.6.6 Установление пространственной структуры GYL методами компьютерного моделирования

Теоретические модели пространственной структуры лектина GYL в мономерной и димерной формах были получены с помощью сервера SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>). В качестве прототипа использовали кристаллическую структуру домена лектина С-типа CD209 антигенподобного белка В мыши (код PDB 4c9f) [146]. Содержание элементов вторичной структуры в теоретической модели лектина GYL было рассчитано с помощью программы VEGA ZZ (<http://www.vegazz.net>). Визуализация структур выполнена с помощью программы Molecular Operating Environment (MOE) 2020.0901 (<https://www.chemcomp.com>; *Molecular Operating Environment (MOE)*, 2020.09; Chemical Computing Group ULC, 1010 Sherbrooke St. West, Suite #910, Montreal, QC, Canada, H3A 2R7, 2020).

#### 2.6.7 Выделение иммуноглобулинов IgG<sub>GYL</sub>

Иммунную сыворотку получали, как описано [147]. Готовили раствор антигена (GYL) с концентрацией 2 мг/мл. На 0-й, 7-й, 14-й, 28-й и 42-й день кролику весом 3-4 кг вводили смесь 0,05 мл раствора антигена и

0,05 мл неполного адьюванта Фрейда. Инъекцию проводили в подколенную ямку задних ног, под конъюнктивы глаз, вдоль обеих сторон позвоночника, подкожно в лопаточную область слева и справа и внутривенно в ушную вену. На 50-й день отбирали 45 мл крови из краевой ушной вены и определяли титр полученных антител.

Выделение антител проводили по методике, описанной в работе [147]. К 20 мл сыворотки добавляли 5 г  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , инкубировали 20 ч при комнатной температуре. Осадок отделяли центрифугированием в течение 30 мин при 4000 об/мин. Осадок промывали дважды 1,75 М раствором  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  и растворяли в 3 мл дистиллированной воды. Диализ раствора антител проводили в два этапа: 12 ч при 4 °С против дистиллированной воды, 24 ч против 0,05 М ацетатного буфера pH 5,0, двухэтапный диализ повторяли дважды. Затем раствор антител центрифугировали 30 мин при 4500 об/мин и наносили на уравновешенную 0,05 М ацетатным буфером колонку с сефадексом DEAE A-50 (2×30 см). Антитела элюировали тем же ацетатным буфером, регистрируя оптическую плотность фракций на спектрофотометре при 280 нм. Фракции, содержащие белок, диализовали против дистиллированной воды в течение 24 ч при 4 °С, затем лиофильно сушили и проводили иммунодиффузию.

#### 2.6.8 Двойная радиальная иммунодиффузия по Ухтерлони

1,5 г агара растворяли в 100 мл 0,01 М PBS, pH 7,2. Смесь нагревали на водяной бане до растворения агара. Горячий раствор наносили на предметные стекла по 4,5 мл и оставляли застывать. До использования готовые пластины хранили во влажной камере. Перед использованием в геле специальным штампом вырезали лунки, которые заполняли растворами исследуемых веществ и оставляли на ночь во влажной камере при комнатной температуре. Результат наблюдали визуально по образованию полос преципитации [148].

### 2.6.9 Получение конъюгатов IgG<sub>GYL</sub> с пероксидазой хрена

Конъюгат получали перийодатным методом, как описано в п 2.5.1. К раствору конъюгата добавляли глицерин, в соотношении 1:1, и хранили при -18 °С.

## 2.7 Противомикробная активность лектинов

Грамположительные (*S. aureus* и *B. subtilis*), грамотрицательные бактерии (*E. coli* и *V. proteolyticus*), а также дрожжевые грибы (*C. albicans* и *P. pastoris*) были предоставлены д.б.н. Недашковской Ольгой Ильиничной, Лаборатория микробиологии ТИБОХ ДВО РАН. Клетки всех микроорганизмов центрифугировали при 4000 об/мин и дважды отмывали стерильным 0,01 М PBS pH 7,5. Для дальнейших экспериментов клеточные суспензии разводили до ОП<sub>600</sub>=0,8-1,0, что соответствует количеству клеток от  $2 \times 10^8$  до  $2 \times 10^{10}$  в 1 мл.

### 2.7.1 Взаимодействие лектинов с ПАМП

На 96-луночный планшет (Nunc, Дания) наносили для адсорбции растворы следующих веществ: ЛПС *E. coli* O111:B4, пептидогликана *S. aureus*, маннана *S. cerevisiae*, β-1,3-глюкана *E. gracilis* в концентрации 50 мкг/мл в 0,01 М TBS-Ca pH 8,0 в трипликатах по 0,1 мл в лунку. Инкубировали ночь при 4 °С, после чего 3 раза промывали отмывочным буфером (TBS-Ca, 0,05% твин-20). Блокировали свободные места связывания на планшете, этим же буфером по 0,3 мл в каждую лунку, инкубировали в течение 1 ч при 37 °С с перемешиванием, после чего 3 раза промывали отмывочным буфером. Методом двойных разведений наносили на планшет конъюгаты GYL-PIX, GYL-R-PIX и GYLman-PIX по 0,1 мл в отмывочном буфере (начальная концентрация 10 мкг/мл). Инкубировали 1 ч при 37 °С с перемешиванием, после отмывали планшет, как описано

ранее. Определяли ферментативную активность и измеряли оптическую плотность, как описано ранее.

### 2.7.2 Взаимодействие лектинов с микроорганизмами

На 96-луночный планшет (Nunc, Дания) наносили для адсорбции в трипликатах суспензии грамположительных (*S. aureus*, *B. subtilis*), грамотрицательных (*E. coli*, *V. proteolyticus*) бактерий и дрожжей *C. albicans* по 0,1 мл в лунку ( $ОП_{600}=0,8-1,0$ ) и инкубировали в течение ночи при 4° С. Планшет прогревали 45 мин при 80 °С для фиксирования бактерий. Содержимое лунок осторожно вытряхивали. Блокировали свободные места связывания на планшете отмывочным буфером, по 0,3 мл в каждую лунку, инкубировали в течение 1 ч при 37 °С, после чего 3 раза промывали отмывочным буфером. Методом двойных разведений наносили на планшет конъюгаты GYL-ПХ, GYL-R-ПХ и GYLman-ПХ по 0,1 мл в отмывочном буфере в начальной концентрации 10 мкг/мл. Инкубировали 1 ч при 37 °С, затем отмывали планшет, как описано ранее. Определяли ферментативную активность и измеряли оптическую плотность, как описано ранее.

### 2.7.3 Ингибирование связывания лектинов с бактериями

На 96-луночный планшет (Nunc, Дания) наносили для адсорбции бактерии, как описано ранее. Ингибиторы (L-Rha, L-Fuc, D-Gal, D-Glc в концентрации 10 мг/мл и  $\alpha$ -D-Маннан из *S. cerevisiae* в концентрации 1мг/мл) готовили в 0,01 М TBS-Ca pH 8,0. Методом двойных разведений вносили в каждую лунку по 0,05 мл ингибиторов. Одновременно добавляли во все лунки по 0,05 мл конъюгатов GYL-ПХ, GYL-R-ПХ и GYLman-ПХ в начальной концентрации 4 мкг/мл в отмывочном буфере. Инкубировали 1 ч при 37 °С с перемешиванием, после отмывали планшет,

как описано ранее. Определяли ферментативную активность и измеряли оптическую плотность, как описано ранее.

#### *2.7.4 Агглютинация микроорганизмов лектинами*

Агглютинацию микроорганизмов проводили, как описано в работе [149]. К 0,025 мл клеточных суспензий ( $ОП_{600}=0,8-1,0$  в стерильном TBS-Ca pH 8,0) добавляли по 0,025 мл раствора лектина в этом же буфере до конечной концентрации 0,2 мг/мл и инкубировали в течение 1 ч при 20 °С. В качестве контроля использовали клетки в стерильном TBS-Ca pH 8,0. Результат агглютинации наблюдали в световом микроскопе AxioCam MRc (Zeiss, Германия) с увеличением в 400 и 1000 раз.

#### *2.7.5 Влияние GYL на образование биопленок*

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



### 2.7.6 Измерение уровня GYL в ответ на заражение моллюсков бактериями и антропогенное загрязнение

Исследование уровня GYL в ответ на заражение моллюсков бактериями и антропогенное загрязнение проводили на МЭС ТИБОХ ДВО РАН в б. Троица (зал. Посъета, Японское море). Материалом для исследования служили 75 одинаковых по размерам отобранных особей двустворчатых моллюсков *G. yessoensis*, которые были помещены в аквариумы для акклиматизации при постоянной температуре 18 °C и солености воды 32 ‰ в течение 4 суток. После окончания периода акклиматизации моллюсков первой экспериментальной группы подвергали воздействию дизельного топлива – 0,5 мг/л. Токсичное вещество вносили однократно в аквариум с морской водой объемом 4 л, где содержались 30 особей. Контрольная группа моллюсков (30 особей) получала инъекцию в аддуктор по 0,2 мл 0,01 М PBS pH 7,5. Вторую экспериментальную группу (30 особей) иммунизировали суспензией бактерий *V. proteolyticus*, разведенной стерильным раствором 0,01 М PBS до ОП<sub>600</sub> = 0,4. Изменение уровня лектина у моллюсков анализировали через 0, 0,5, 3, 6, 12 и 24 ч, отбирая по 4 особи из каждой группы. У отобранных моллюсков забирали гемолимфу, центрифугировали 1500 об/мин 10 мин, отделяли гемоциты и вновь центрифугировали 12000 об/мин 30 мин. В полученном супернатанте определяли количество лектина с помощью ИФА, разработанного на основе IgG<sub>GYL</sub>. На 96-луночный планшет (Nunc, Дания) адсорбировали/наносили IgG<sub>GYL</sub> в концентрации 1 мкг/мл в TBS-Ca. Инкубировали в течение ночи при 4 °C, отмывали планшет и блокировали 1% раствором БСА. В каждую лунку в трипликатах добавляли по 0,1 мл образца гемолимфы, инкубировали 1 ч при 37 °C, отмывали планшет TBS-Ca с 0,1% твин-20 (отмывочный буфер). Затем в лунку добавляли 0,1 мл конъюгата IgG<sub>GYL</sub>-ПХ (200 нг/мл) в отмывочном буфере и инкубировали 1 ч при 37 °C, отмывали и определяли ферментативную активность, как описано в п. 2.5.2. Количество GYL в каждом образце устанавливали по

калибровочной кривой, в качестве стандарта использовали чистый образец GYL. Результаты представляли как среднее значение  $\pm$  SD.

## **2.8 Статистический анализ**

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

### 3 Результаты и обсуждение

#### 3.1 Поиск лектинов двустворчатого моллюска *G. yessoensis*

Особи широко распространенного тихоокеанского вида двустворчатых моллюсков – *G. yessoensis* были собраны на МЭС ТИБОХ ДВО РАН. Поиск углеводов-распознающих белков в гемолимфе и экстрактах органов моллюска *G. yessoensis* проводили классическим методом определения активности лектинов – реакцией прямой гемагглютинации (РПГА), используя набор эритроцитов с разными углеводными профилями гликокаликса. Для увеличения чувствительности метода использовали стандартную процедуру обработки эритроцитов трипсином. Данная обработка предполагает удаление части белковых компонентов надмембранного комплекса, маскирующих углеводные детерминанты клеток [150].

В результате было установлено, что гемолимфа и полученные экстракты в разной степени агглютинировали нативные и трипсинизированные эритроциты. Результаты РПГА представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Титр гемагглютинирующей активности в гемолимфе и экстрактах органов двустворчатого моллюска *G. yessoensis*

Исследуемый образец	Титр РПГА									
	Эритроциты кролика		Эритроциты человека Группы О		Эритроциты человека Группы А		Эритроциты человека Группы В		Эритроциты человека Группы АВ	
	Нат.	Тр. ф	Нат.	Тр. ф	Нат.	Тр. ф	Нат.	Тр. ф	Нат.	Тр. ф
Экстракт мантии	2	32	н.а.	4	н.а.	4	н.а.	2	н.а.	4
Экстракт мускула	н.а.	8	н.а.	4	н.а.	2	н.а.	н.а.	н.а.	2
Экстракт гонад	н.а.	8	н.а.	н.а.	н.а.	н.а.	н.а.	н.а.	н.а.	2
Экстракт жабер	н.а.	4	н.а.	4	н.а.	2	н.а.	н.а.	н.а.	2
Экстракт гепатопанкреаса	н.а.	2	н.а.	2	н.а.	2	н.а.	н.а.	н.а.	2
Гемолимфа	64	512	64	128	2	16	н.а.	16	4	32

Примечание – Титр РПГА – максимальное разведение лектина, при котором еще отмечается агглютинация эритроцитов; Нат. – нативные эритроциты; Тр. ф. – трипсинизированные эритроциты, зафиксированные глутаровым альдегидом; н.а. – не агглютинирует

Как видно из таблицы 2, наибольший титр агглютинации (1:512) был обнаружен в гемолимфе моллюска при использовании трипсинизированных эритроцитов кролика. Поэтому именно гемолимфа была выбрана в качестве объекта для дальнейшего выделения и исследования углеводов-связывающих белков, а эритроциты кролика были выбраны для определения лектинной активности на всех стадиях выделения лектинов и изучения их свойств.

### **3.2 Разработка методов выделения и очистки лектинов гемолимфы двустворчатого моллюска *G. yessoensis***

Наиболее эффективным и широко распространенным методом выделения лектинов является аффинная хроматография [151]. С целью выбора наиболее подходящего лиганда для синтеза аффинных сорбентов проводили предварительное определение углеводной специфичности гемагглютининов гемолимфы моллюска *G. yessoensis* методом ингибирования РПГА различными моно-, олиго-, полисахаридами и гликопротеинами. Установили, что Fuc, Man, Glc, Rha, Lac, Fet, dsFet, OVA, тироглобулин, гликопротеин муцинового типа PSM и дрожжевой  $\alpha$ -D-маннан из *Saccharomyces cerevisiae* наиболее эффективно ингибировали РПГА. Очевидно, в гемолимфе исследуемого моллюска присутствуют лектины, специфичные к этим углеводам. Поэтому в качестве лигандов для синтеза нескольких аффинных сорбентов были выбраны лактоза, PSM и  $\alpha$ -D-маннан.

$\alpha$ -D-Маннан был выделен нами из культуры дрожжей *S. cerevisiae*, как описано [139]. Структура маннана была установлена методами ГЖХ,  $^1\text{H}$ - и  $^{13}\text{C}$ -ЯМР спектроскопии. Показано, что полученный маннан

представляет собой высоко разветвленный гомополисахарид, построенный из  $\alpha$ -1,6,  $\alpha$ -1,2 и  $\alpha$ -1,3-связанных остатков D-Man (рисунок 9) и соответствует структуре известного дрожжевого маннана из *S. cerevisiae*.

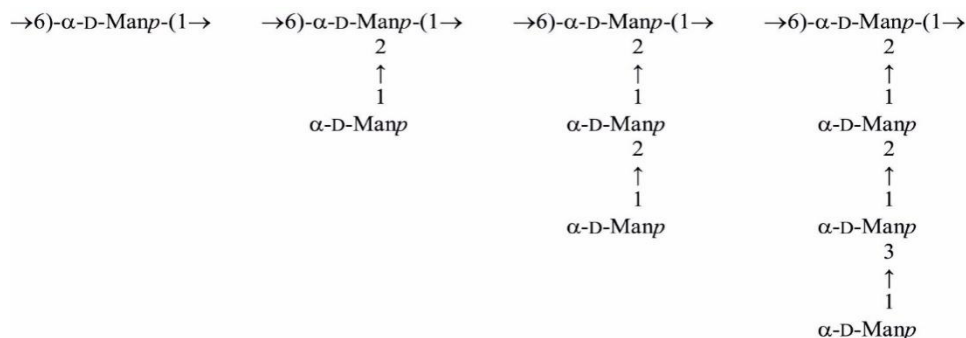


Рисунок 9 – Схематическая структура выделенного дрожжевого  $\alpha$ -D-маннана из *S. cerevisiae*

Необходимо отметить, что в аналитическом эксперименте инкубация гемолимфы с интактным носителем (Сефарозой CL-4В) не приводила к уменьшению лектинной активности, что свидетельствовало об отсутствии связывания лектинов с исходной полимерной основой сорбента. Синтез аффинного сорбента PSM-Сефарозы CL-4В проводили по методике производителя Sigma-Aldrich, иммобилизуя гликопротеин на Сефарозе CL-4В. При синтезе аффинных сорбентов маннан-Сефарозы CL-4В и лактозил-Сефарозы CL-4В, углеводы иммобилизовали на Сефарозе CL-4В методом активации сорбента дивинилсульфоном [152]. В результате для выделения лектинов гемолимфы моллюска *G. yessoensis* были получены три аффинных сорбента: маннан-сефароза CL-4В, PSM-сефароза CL-4В и лактозил-сефароза CL-4В.

### 3.2.1 Выделение рамнозоспецифичного лектина (GYL-R) из гемолимфы двусторчатого моллюска *G. yessoensis*

Как правило, RBL выделяют на аффинных сорбентах, таких как муцин-сефароза [102], рамнозил-сефароза [153] или галактозил-агароза [154]. Однако, использование для этих целей лактозил-сефарозы или

лактозил-агарозы также позволило выделить несколько лектинов, специфичных не только к лактозе, но и к рамнозе [101, 155]. Такое разнообразие лигандов для связывания RBL объясняется одинаковой ориентацией гидроксильной группы при C2 и C4 в структуре пиранозного кольца у L-рамнозы, D-галактозы и лактозы [50]. Использование муцин-сефарозы привело бы к одновременному связыванию с сорбентом двух лектинов: PSM- и рамнозоспецифичного. Галактозил-сефароза не являлась подходящим сорбентом, поскольку Gal не ингибировала РПГА гемагглютининов гемолимфы моллюска. Поэтому рамнозоспецифичный лектин из гемолимфы *G. yessoensis* выделяли методом аффинной хроматографии на лактозил-Сефарозе CL-4В в объеме. Эффективность связывания лектина оценивали по изменению титра агглютинации в надосадочной жидкости. Элюцию связавшегося белка проводили буфером с концентрацией рамнозы 0,2 М, т.к. этот моносахарид оказался наилучшим ингибитором связывания лектина с аффинным сорбентом. Белковые фракции объединяли, диализовали и лиофильно сушили. Окончательную очистку лектина проводили методом гель-фильтрации на колонке Superdex 75 Increase 10/300.

Полученный лектин проявлял высокую гемагглютинирующую активность (титр ГА 1:2048, от начальной концентрации 0,1 мг/мл). Анализ несвязанной с лактозил-сефарозой фракции показал снижение гемагглютинирующей активности почти на 60% и наличие гемагглютининов, специфичных к Fuc, Man, Glc, Fet, dsFet, OVA, тиреоглобулину, PSM и  $\alpha$ -D-маннану.

### 3.2.2 Выделение муцин-специфичного лектина (GYL) из гемолимфы двусторчатого моллюска *G. yessoensis*

Для выделения муцин-специфичного лектина не связавшуюся с лактозил-сефарозой фракцию наносили на PSM-сефарозу. Аффинную хроматографию проводили в объёме. Эффективность связывания лектина

оценивали по изменению титра агглютинации в образце до нанесения на сорбент и в несвязанной фракции. Элюцию GYL проводили глицин-HCl буфером с рН 2,9 с последующей нейтрализацией. Фракции, проявляющие ГА, объединяли, диализовали и лиофильно сушили. Окончательную очистку лектина осуществляли методом гель-фильтрации на колонке Superdex 75 Increase 10/300 GL.

Анализ гемагглютинирующей активности лектина от концентрации 0,1 мг/мл показал, что GYL агглютинирует эритроциты с титром ГА 1:64. Лектинная активность в не связанной с PSM-сефарозой фракции составляла приблизительно 10% от исходной активности, т.е. еще более существенно снизилась. Ингибирование РПГА показало, что фракция содержит гемагглютинины, специфичные к D-Man и  $\alpha$ -D-маннану из *S. cerevisiae*.

### 3.2.3 Выделение маннан-специфичного лектина (GYLman) из гемолимфы двустворчатого моллюска *G. yessoensis*

Предложенная ранее двухстадийная схема выделения GYLman позволяла получить белок в гомогенном состоянии, но с небольшим выходом и частичной потерей активности [156]. Разработанная новая эффективная схема заключалась в использовании аффинной хроматографии на маннан-сефарозе с последующей очисткой лектина методом гель-фильтрации на колонке Superose 6 Increase 10/300 GL. Элюцию белка с аффинного сорбента проводили буфером, содержащим 0,2 М D-Man. Фракции, содержащие белок, объединяли, диализовали и лиофильно сушили. В таблице 3 представлены результаты выделения GYLman с использованием новой схемы очистки белка.

Таблица 3 – Очистка маннан-специфичного лектина двустворчатого моллюска *G. yessoensis*

Образец	Объем образца (мл)	Титр ГА	Общая активность ГА (U)	Концентрация белка (мг/мл)	Количество белка (мг)	Специфическая активность (U/мг)	Степень очистки (раз)
Сырая гемолимфа	50	512	25 600	11,75	587,50	43,57	1
GYLman старая схема выделения	2	128	256	0,15	0,3	853,3	20
GYLman новая схема выделения	2	512	1024	0,25	0,5	2048	47

Примечание – Общая ГА = Титр × Vобщий (мл); Специфическая активность = Общая ГА/мг суммарного белка

Как видно из таблицы 3, использование новой схемы выделения позволило увеличить выход лектина на 60%. Анализ гемагглютинирующей активности показал, что GYLman проявляет высокую активность (титр ГА 1:256, от начальной концентрации 0,1 мг/мл).

### 3.3 Изучение физико-химических свойств лектинов

#### 3.3.1 Гомогенность, молекулярная масса и субъединичный состав

Для определения молекулярной массы и гомогенности выделенных лектинов проводили ДСН-ПААГ-электрофорез в 15% геле в восстанавливающих (в присутствии дитиотреитола, ДТТ) и невосстанавливающих условиях.

В невосстанавливающих условиях GYLman представляет собой высокомолекулярный олигомер с кажущейся молекулярной массой более 250 кДа (рисунок 10). В восстанавливающих условиях белок распадается на субъединицы, молекулярная масса которых около 70 кДа. Эти данные



указывают на наличие дисульфидных связей и субъединичность молекулы лектина. Олигомеризация характерна для маннан-связывающих лектинов.

Установлено, что GYL в невосстанавливающих условиях представляет собой белок с кажущейся молекулярной массой около 36 кДа (рисунок 10). При воздействии на лектин восстанавливающего агента полоса, соответствующая молекулярной массе 36 кДа, полностью исчезала, но появлялась полипептидная зона в области 18 кДа. Этот факт указывает на наличие дисульфидных связей и субъединичность молекулы лектина, которая, очевидно, состоит из двух субъединиц одинаковой молекулярной массы.

Кажущаяся молекулярная масса лектина GYL-R, согласно данным электрофореза составила 27 кДа в невосстанавливающих условиях и 30-33 кДа – в восстанавливающих (рисунок 10). Скорее всего, лектин представляет собой мономер и, подобно другим представителям рамнозоспецифичных лектинов, имеет в своей структуре четыре внутренних дисульфидных связи. В восстанавливающих условиях мономер претерпевает конформационные изменения вследствие разрыва дисульфидных мостиков и приобретает более «рыхлую» структуру, что вызывает замедление миграции и приводит к увеличению значения кажущейся молекулярной массы. Такое поведение в условиях электрофореза является характерным для RBL и описано для многих лектинов этого класса [153].

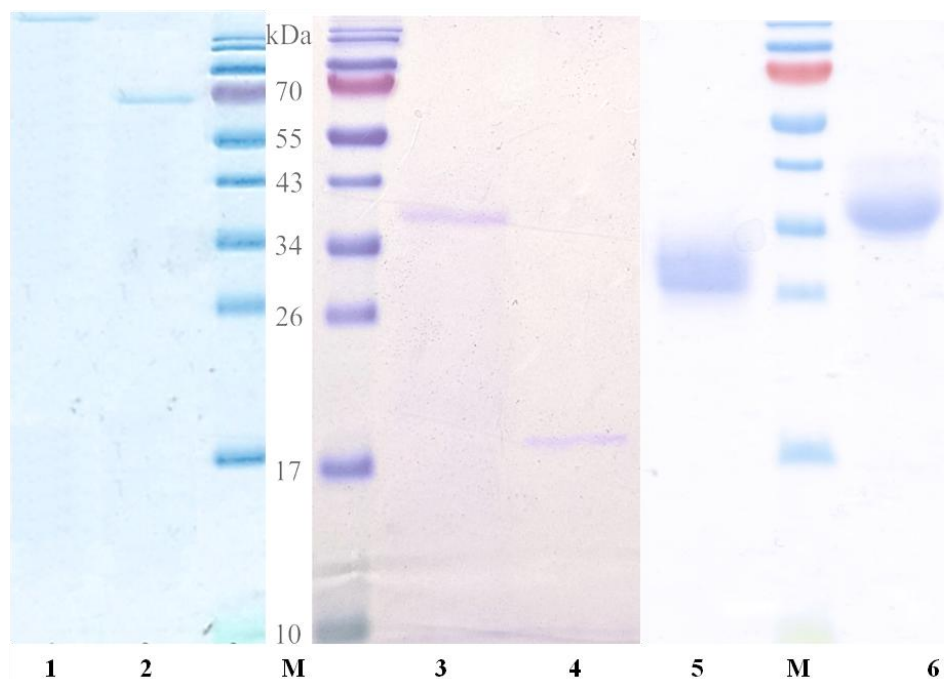


Рисунок 10 – 15% ДСН-ПААГ-электрофорез. В невосстанавливающих условиях (без ДТТ): 1 – GYLman, 3 – GYL, 5 – GYL-R. В восстанавливающих условиях (в присутствии ДТТ): 2 – GYLman, 4 – GYL, 6 – GYL-R. М – белки-маркеры с молекулярной массой 10-180 кДа. Гель окрашен кумасси бриллиантовым синим R-250

Определение точной молекулярной массы белков проводили методом МАЛДИ-ВП масс-спектрометрии (рисунок 11). Для двухсубъединичной молекулы GYL она составила 36053,5 Да (однозарядный ион) и 18118,5 Да (двухзарядный ион). Молекулярная масса субъединицы GYLman, определенная в восстанавливающих условиях, равна  $m/z = 69189,6$  Да, что соответствует однозарядному иону,  $m/z = 34657,056$  Да и  $m/z = 8584,729$  Да, что соответствует двухзарядному и восьмизарядному иону соответственно. Определенная молекулярная масса GYL-R составила 30415,121 Да.

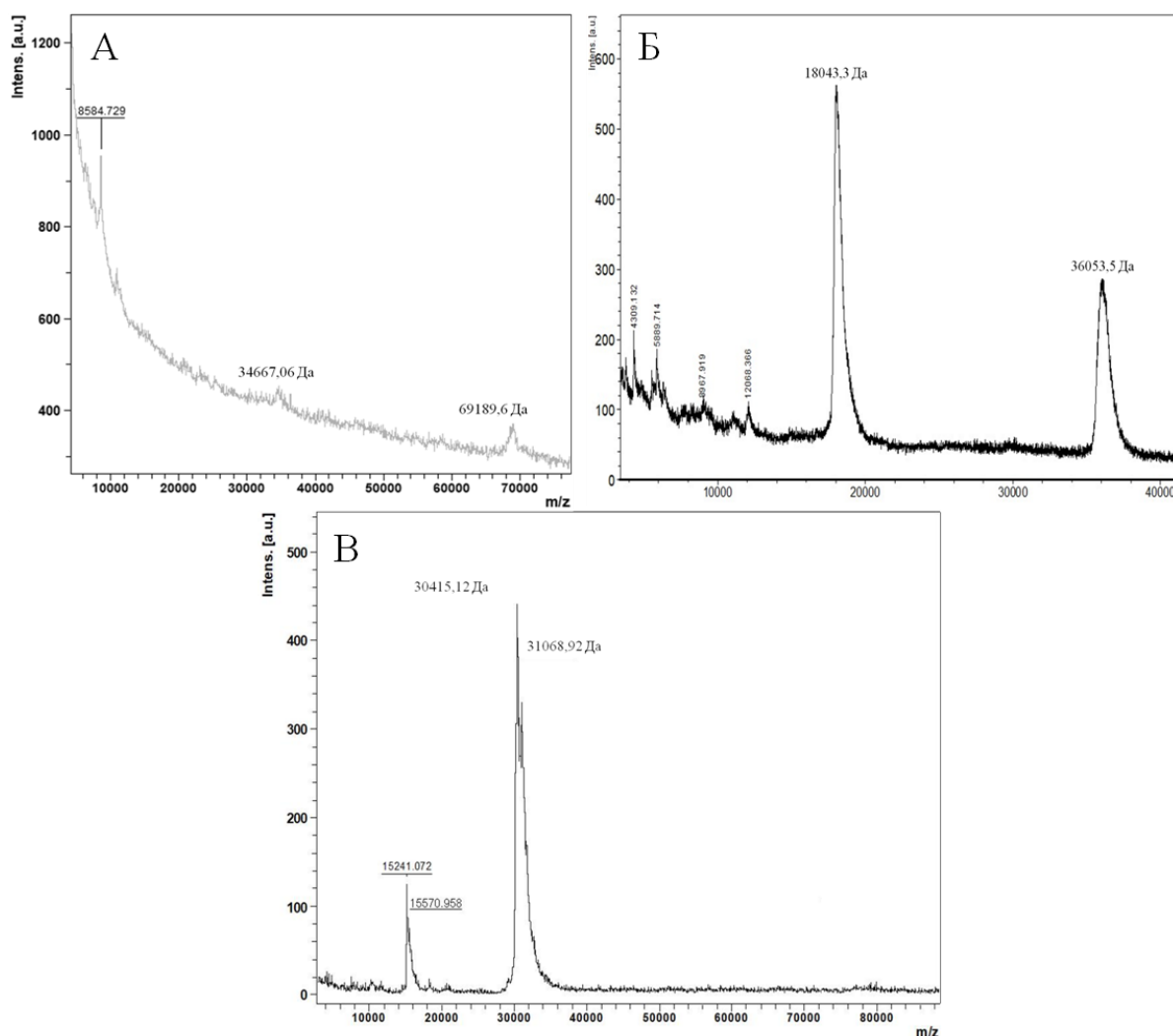


Рисунок 11 – Масс-спектры лектинов. А – GYLman, Б – GYL, В – GYL-R

Анализ проводили в линейном режиме с использованием цитохрома С (12361,55 Да) и миоглобина (16952,55 Да) в качестве внешних стандартов. Полученные результаты хорошо согласуются с данными ДСН-ПААГ-электрофореза и свидетельствуют о гомогенности выделенных лектинов.

### 3.3.2 Зависимость активности лектинов от концентрации ионов $\text{Ca}^{2+}$

Наличие или отсутствие зависимости активности лектина от присутствия ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в среде является одним из основных свойств, необходимых для установления принадлежности данного лектина к какой-либо систематической группе. Например, лектины С-типа – это

суперсемейство углеводов-распознающих белков, которые могут распознавать моно-, олиго и полисахариды, а также гликопротеины и гликолипиды и связываться с концевыми сахарами их молекул кальций-зависимым образом [157].

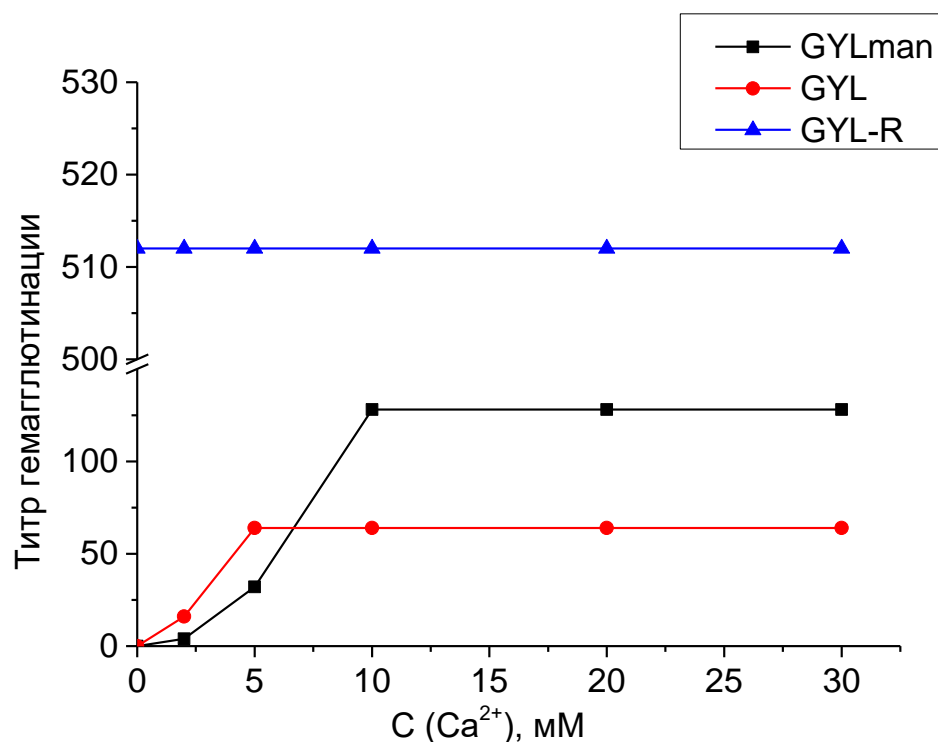


Рисунок 12 – Ca<sup>2+</sup> зависимость активности лектинов

Для того чтобы определить, требуется ли присутствие катионов двухвалентных металлов для связывания, было изучено влияние хелатирующего агента ЭДТА на гемагглютинирующую активность. Как видно из рисунка 12, GYL-R агглютинировал эритроциты кролика, как в присутствии, так и отсутствии ионов кальция в растворе. Следовательно, этот лектин является Ca<sup>2+</sup>-независимым, как и большинство рамнозоспецифичных лектинов [97].

Напротив, GYL и GYLman являются Ca<sup>2+</sup>-зависимыми лектинами, поскольку в отсутствие ионов кальция не проявляют гемагглютинирующую активность. Максимальная активность лектинов

установлена в интервале концентраций ионов  $\text{Ca}^{2+}$  5-30 мМ. Концентрация  $\text{Ca}^{2+}$  в гемолимфе варьирует от 5,46 до 6,68 мМ [158]. Следовательно, максимум активности GYL и GYLman соответствует примерно физиологическому содержанию  $\text{Ca}^{2+}$ . Углеводная специфичность и  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимость GYL и GYLman позволяют предположить, что они являются членами семейства лектинов С-типа.

### 3.3.3 Изучение термостабильности лектинов

Влияние температуры на проявление активности лектинов изучали методом РПГА (рисунок 13).

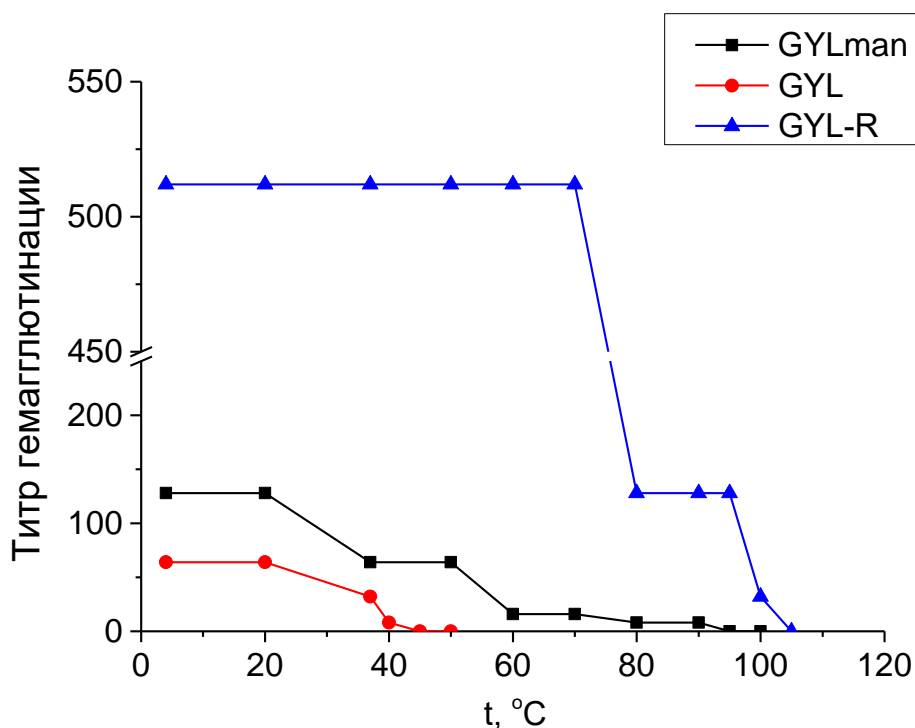


Рисунок 13 – Термостабильность лектинов

Установлено, что все исследуемые белки максимально активны в интервале низких температур от 4 до 20 °С, что соответствует температурному диапазону среды обитания моллюска и характерно для большинства известных лектинов беспозвоночных [159]. Такие условия являются физиологическими для этого вида и, вероятно, оптимальны

также для молекулярных систем, поддерживающих их на соответствующем уровне жизнедеятельность. Прогрев растворов лектинов при температуре выше 20 °С по-разному влиял на изучаемые белки.

Раствор GYL-R сохранял исходную активность до 70 °С, к полной инактивации лектина приводило нагревание до 105 °С. Сохранение гемагглютинирующей активности при таких высоких для белков температурах характерно для рамнозоспецифичных лектинов. Так, PPL – рамнозоспецифичный лектин из устрицы *P. penguin* целиком сохранял гемагглютинирующую активность после термообработки при 60 °С и терял половину своей активности после нагревания при 70 °С. Для полной инактивации PPL требовалось нагревание при 100 °С в течение 40 мин [102]. Аналогично, полная инактивация рамнозоспецифичного лектина DIRBL из плазмы морского окуня *D. labrax* достигалась инкубацией образца в течение 30 мин при 100 °С [154]. Данные свойства, скорее всего, обусловлены особенностями аминокислотного состава рамнозоспецифичных лектинов, а именно наличием восьми консервативных цистеинов, образующими четыре дисульфидных связи, которые стабилизируют третичную структуру белка и предотвращают её разворачивание при нагревании. Это предположение подтвердилось при нагревании раствора GYL-R в присутствии меркаптоэтанола: температура инактивации гемагглютинирующей активности существенно снизилась и составила 60 °С.

Активность GYL стремительно падала с повышением температуры и полностью исчезала при температуре 45 °С. Известно, что углеводсвязывающие домены лектинов С-типа формируются при образовании пространственной структуры белка [160], наблюдаемые температурно-зависимые изменения активности GYL могут быть вызваны изменениями вторичной и третичной структуры нативного лектина. Нагревание раствора GYLman, в интервале температур 30-90 °С привело к постепенному

снижению активности, а при нагревании до 95 °С происходила полная инактивация лектина.

Большинство лектинов морских беспозвоночных инактивируется при более низких температурах, например, гемагглютинирующая активность лектина из двустворчатого моллюска *Macoma birmanica* начинает экспоненциально снижаться после нагревания до 50 °С в течение 30 мин, в случае лектина из мидии *M. californianus* – после нагревания до 60 °С [161], лектин из мидии *S. grayanus* теряет активность при нагревании до 65 °С [162].

### 3.3.4 рН-стабильность лектинов

Влияние рН среды на проявление активности лектинов изучали методом РПГА (рисунок 14).

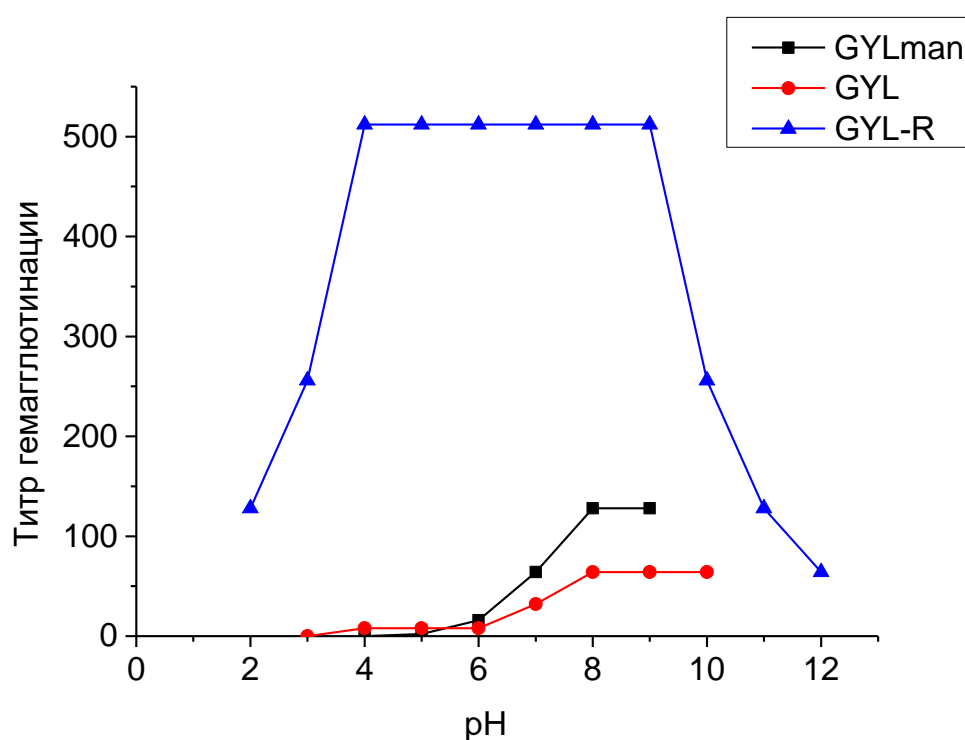


Рисунок 14 – рН зависимость активности лектинов

О влиянии кислотности среды на проявление активности лектинов можно судить по результатам экспериментов, представленным на рисунке 14. Титр агглютинации для лектинов GYL и GYLman возрастал при переходе рН из кислой области в щелочную и достигал максимума при рН 8,0. В диапазоне рН 8,0-9,0 активность лектинов не менялась. Такая большая величина рН-оптимума характерна для лектинов С-типа. Инактивация GYL наблюдалась при рН 3,0 а GYLman при рН 4,0. При рН 5,0 и ниже активность маннан-связывающего лектина морского ежа *Strongylocentrotus nudus* MBL-SN полностью терялась [163]. Рост гемагглютинирующей активности одновременно с увеличением значения рН среды характерен для лектинов многих моллюсков, например, мидии *C. grayanus* [162]. Буферная емкость гемолимфы беспозвоночных, представляющей карбонат-бикарбонатную систему, колеблется в интервале рН 7,0-8,0 в соответствии с физиологическим состоянием животного. Этот факт, по-видимому, и определяет характер зависимости активности лектинов от рН, возрастающей при переходе из кислой в щелочную область [158].

Активность GYL-R была максимальной в диапазоне значений рН от 4,0 до 9,0 и падала при рН 2,0-3,0 и 10,0-12,0. Минимальная активность лектина установлена при рН 12,0, значение рН инактивации не установлена. Возможно, стабильность гемагглютинирующей активности в таком широком диапазоне значений рН также обусловлена стабилизацией молекулы лектина дисульфидными мостиками. Для лектинов двустворчатых моллюсков не характерна такая рН-стабильность гемагглютинирующей активности. Так, например, галактоз-специфичный лектин из гребешка *P. yessoensis* полностью инактивируется при рН 4,0 и 11,0 [164]. В то же время, для некоторых лектинов беспозвоночных рН-стабильность характерна. Так, гемагглютинирующая активность лектина DrfL из губки *Cinachyrella apion* оставалась неизменной после инкубации в диапазоне значений рН от 2,0 до 11,0 [165]. Известно, что двустворчатые



моллюски имеют незамкнутую кровеносную систему, гемолимфа находится в постоянном контакте с экстрапаллиальной жидкостью (заключенной между мантией и раковиной) и, опосредованно, с окружающей средой. Полагают, что у двустворчатых моллюсков физиологические процессы происходят, в основном, в гемолимфе [158]. В связи с этим, вероятно, физико-химические характеристики выделенных нами из гемолимфы лектинов (GYL<sub>man</sub>, GYL, GYL-R), а именно зависимость их активности от pH-, Ca<sup>2+</sup>- и температуры, обусловлены условиями обитания.

### **3.4 Изучение углеводной специфичности лектинов**

#### *3.4.1 Углеводная специфичность GYL<sub>man</sub>, GYL и GYL-R*

Углеводная специфичность – важнейшая характеристика лектинов. Ранее углеводную специфичность лектинов идентифицировали с помощью гемагглютинации – анализа связывания лектинов с углеводными компонентами клеточной стенки эритроцитов. В настоящее время для определения специфичности связывания лектинов с гликанами доступно несколько методов, включая твердофазный лектин-ферментный анализ (ТЛФА), равновесный диализ, поверхностный плазмонный резонанс, изотермическую титрационную калориметрию, фронтальную аффинную хроматографию и гликоэзрей.

Для определения углеводной специфичности лектинов были разработаны методы ТЛФА с использованием лектинов с ферментной меткой – пероксидазой хрена (GYL-ПХ, GYL<sub>man</sub>-ПХ, GYL-R-ПХ). В качестве ингибиторов лектинной активности использовали набор моно-олиго- и полисахаридов, гликопротеинов и липополисахаридов (таблица 4).

Таблица 4 – Углеводная специфичность GYLman, GYL и GYL-R, определенная методом ТЛФА

№	Ингибитор	IC <sub>50</sub> мг/мл		
		GYLman	GYL	GYL-R
1	D-Gal	н.и.	н.и.	0,156
2	L-Rha	н.и.	н.и.	<b>0,002</b>
3	Рафиноза	н.и.	н.и.	0,625
4	Lac	н.и.	н.и.	0,313
5	L-Fuc	н.и.	0,17	н.и.
6	$\alpha$ -D-Man-(1→2)-Man	0,500	н.и.	н.и.
7	$\alpha$ -D-Man-(1→2)- $\alpha$ -Man-(1→2)-Man	0,031	н.и.	н.и.
8	$\alpha$ -D-Man-(1→2)-[Man-(1→2)] <sub>3</sub> -Man	0,125	н.и.	н.и.
9	$\alpha$ -D-Man-(1→2)-[Man-(1→2)] <sub>6</sub> -Man	0,063	н.и.	н.и.
10	ЛПС <i>E. coli</i> O111:B4	0,063	н.и.	н.и.
11	$\alpha$ -D-Маннан <i>S. cerevisiae</i> (коммерческий)	<b>0,016</b>	н.и.	н.и.
12	$\alpha$ -D-Маннан <i>S. cerevisiae</i> (выделенный)	0,016	н.и.	н.и.
13	$\alpha$ -D-Маннан <i>C. albicans</i> КММ 455	0,031	н.и.	н.и.
14	PSM	<b>0,016</b>	0,033	0,016
15	dsPSM	0,016	<b>0,008</b>	0,063
16	OVA	н.и.	0,025	н.и.
17	Fet	н.и.	0,008	н.и.
18	dsFet	н.и.	0,004	н.и.
19	Тироглобулин	н.и.	0,004	н.и.

Примечание – IC<sub>50</sub> – концентрация, необходимая для 50% ингибирования связывания; н.и. – не ингибировали; не ингибировали при концентрации 10 мг/мл: D-GalNAc, D-Glc, D-GlcNAc, D-гало́за, сахароза, мелибиоза, N-гликолилнейрамино́вая кислота, N-ацетилнейрамино́вая кислота, D-Man, D-ManNAc, тетраманнозид  $\alpha$ -Man-(1→2)-[Man-(1→2)]<sub>2</sub>-Man, гексаманнозид  $\alpha$ -Man-(1→2)-[Man-(1→2)]<sub>4</sub>-Man, гептаманнозид  $\alpha$ -Man-(1→2)-[Man-(1→2)]<sub>5</sub>-Man,  $\alpha$ -Gal-(1→3) $\beta$ GalNAc,  $\alpha$ -Me-Gal, OVO

Как видно из таблицы 4, большинство моно- и олигосахаридов, не ингибировали активность GYLman. Наибольшую активность лектин проявил к высокоразветвленным дрожжевым маннанам с  $\alpha$ -1,6-связанным

маннопиранозильным остовом и короткими  $\alpha$ -1,2-связанными маннопиранозильными боковыми цепями, что характерно для маннан-специфичных лектинов морских беспозвоночных [163]. Необходимо отметить возрастающую ингибирующую способность лектина в ряду: дисахарид, трисахарид, пентасахарид. Известно, что Man9 и Man5 обнаружены в углеводной части gp120 – гликопротеина, экспрессированного на оболочке ВИЧ. Показано, что эти маннозиды играют существенную роль в процессах присоединения ВИЧ к поверхностным рецепторам клетки, таким как CD4. Некоторые маннозоспецифичные лектины способны ингибировать слияние ВИЧ с CD4<sup>+</sup> клетками, связываясь с gp120 [166]. Можно предположить, что GYLman будет проявлять такой же биологический эффект.

Наилучшими лигандами для GYL являются, главным образом, гликопротеины, содержащие цепи муцинового типа. Из моносахаридов, ингибирующее действие проявляла только L-Fuc. Подобное проявление углеводной специфичности характерно для муцин-специфичных лектинов, которые, в свою очередь, проявляют иммуномодулирующие и противоопухолевые свойства. Так, например, лектин из гриба *Aspergillus panamensis* имеет терапевтический потенциал как иммуномодулятор, а лектин из губки *Haliclona caerulea* снижает жизнеспособность раковых клеток MCF7, запуская апоптоз и аутофагию в клетке [167].

Из результатов, представленных в таблице 4, видно, что для GYL-R лучшими ингибиторами являются L-Rha, D-Gal и ее производные. Ориентация гидроксилы L-Rha в положениях C2 и C4 совпадает с ориентацией гидроксилы D-Gal, поэтому для взаимодействия углевод-связывающего сайта лектина с этими сахарами важны ОН-группы именно в этом положении.

Лектины с подобной специфичностью также хорошо связываются с трисахаридом Gal $\alpha$ 1-4Gal $\beta$ 1-4Glc – глоботриозой (Gb3). Эти лектины проявляют антипролиферативный эффект в отношении клеток Raji

лимфомы Беркитта, на поверхности которых экспрессирована Gb3. В настоящий момент большое количество исследований посвящено Gb3, потому что она является одним из компонентов клеточной поверхности, обогащенных гликосфинголипидом микродоменов (GEM), которые функционируют как пусковой механизм передачи сигнала внутрь клетки. Исследования регуляторных эффектов различных Gb3-связывающих лектинов поможет выявить новые механизмы, благодаря которым многофункциональные лектины способны передавать различные регулирующие рост сигналы через один и тот же гликан. Например, Gal/GalNAc-специфичные лектины MytiLec и CGL вызывают прямой апоптоз опухолевых клеток путем связывания с Gb3, а SAL, лектин, выделенный из икры рыбы *S. asotus*, относящийся к RBL, индуцирует арест клеточного цикла в клетках Raji лимфомы Беркитта в фазе G0/1, связываясь с Gb3. Вероятно, взаимодействие этих лектинов с Gb3 приводят к разным регуляторным сигналам в клетке [168–170].

### 3.4.2 Тонкая углеводная специфичность лектинов

Гликановый микроэрей – мультиантигенный микрочип, который, благодаря наличию в нем природных и синтетических гликанов, дает возможность устанавливать аффинность лектинов к широкому спектру углеводных структур. Для определения тонкой углеводной специфичности исследованных лектинов были использованы 378 олигосахаридов, обнаруженных в N-, O-гликанах и гликосфинголипидах тканей млекопитающих, а также 229 полисахаридов бактерий [171]. В таблицах 5 и 6 представлены углеводные цепи, к которым GYL и GYL-R проявляли наибольшую специфичность.

Таблица 5 – Лиганды GYL-R

Структура лиганда	Короткое или тривиальное название	Интенсивность связывания (RFU)
L-Rha $\alpha$ -sp3	L-Rha-C3	64931
<b>Gal<math>\alpha</math>1-4(Fuca1-2)Gal<math>\beta</math>1-4GlcNAc<math>\beta</math>-sp3</b>	Gal $\alpha$ 4'(Fuca2')LN-C3	47673
6-O-Bn- <b>Gal<math>\alpha</math>1-4(6-O-Bn)GlcNAc<math>\beta</math>-sp3</b>	6,6'-Bn <sub>2</sub> - $\alpha$ LN-C3	40421
<b>Gal<math>\alpha</math>1-4Gal<math>\beta</math>1-4GlcNAc<math>\beta</math>-sp3</b>	Gal $\alpha$ 4'LN-C3	24853
<b>Gal<math>\alpha</math>1-4GlcNAc<math>\beta</math>-sp3</b>	Gal $\alpha$ 4GlcNAc $\beta$ -C3	17157
<b>Gal<math>\alpha</math>1-4GalNAc<math>\alpha</math>-sp3</b>	Gal $\alpha$ 4GalNAc $\alpha$ -C3	12517
6-O-Bn-Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ -sp2	6'-BnLN-C2	4917
<b>Gal<math>\alpha</math>1-4Gal<math>\beta</math>-sp3</b>	Gal $\alpha$ 4Gal $\beta$ -C3	2404
Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-6Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ -sp2	LN6'LN-C2	1829
6-O-Su-Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ -sp2	6'-suLN-C2	1686
<b>Gal<math>\alpha</math>1-4Gal<math>\beta</math>1-4Glc<math>\beta</math>-sp2</b>	Gal $\alpha$ 4' Lac-C2, GbOse3	1245
Gal $\alpha$ 1-3GalNAc $\alpha$ -sp3	Gal $\alpha$ 3GalNAc $\alpha$ -C3	1061
Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ -sp3	LN-C3	735
Gal $\alpha$ 1-3GlcNAc $\beta$ -sp3	Gal $\alpha$ 3GlcNAc $\beta$ -C3	447

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

GYL-R высокоспецифично связывал моносахарид L-Rha и гликаны, содержащие остаток  $\alpha$ -Gal в терминальном положении. Среди олигосахаридов наиболее сильное связывание GYL-R обнаружено при взаимодействии с разветвленным тетрасахаридом Gal $\alpha$ 1-4(Fuca1-2)Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ -sp3. Избирательное высоко аффинное связывание с этим гликаном по сравнению с другими олигосахаридами с  $\alpha$ -Gal в терминальном положении достигается также присутствием остатка фукозы на невосстанавливаемом конце. Та же высокая аффинность связывания

наблюдается при наличии у соседних сахаров объёмных заместителей, таких как Bn (бензил), NAc (N-ацетил). Например, связывание с **Gal $\alpha$ 1-4Gal $\beta$ -sp3** в 6 раз слабее, чем с **Gal $\alpha$ 1-4GalNAc $\alpha$ -sp3**. Примечательно, что по данным гликоэрея, GYL-R связывался с Gb3 в 50 раз слабее, чем с L-Rha.

Таблица 6 – Лиганды GYL

Структура лиганда	Короткое или тривиальное название	Интенсивность связывания
GalNAc $\alpha$ 1-3 <b>Gal<math>\beta</math>1-4(Fuc<math>\alpha</math>1-3)GlcNAc<math>\beta</math>-sp3</b>	GalNAc $\alpha$ 3`Le <sup>x</sup> -C3	9114
4-O-Su- <b>Gal<math>\beta</math>1-4GlcNAc<math>\beta</math>-sp3</b>	4`-suLN-C3	5774
4,6-O-Su2- <b>Gal<math>\beta</math>1-4GlcNAc<math>\beta</math>-sp2</b>	4`,6`-su2LN-C2	3338
GalNAc $\alpha$ 1-3(Fuc $\alpha$ 1-2) <b>Gal<math>\beta</math>1-4GlcNAc<math>\beta</math>-sp3</b>	A (type 2)-C3	2080
<b>Gal<math>\beta</math>1-4GlcNAc<math>\beta</math>-sp3</b>	LN-C3	929
<b>Gal<math>\beta</math>1-4(Fuc<math>\alpha</math>1-3)GlcNAc<math>\beta</math>-sp3</b>	Le <sup>x</sup> -C3	742
GalNAc $\beta$ 1-3 <b>Gal<math>\beta</math>1-4GlcNAc<math>\beta</math>-sp3</b>	GalNAc $\beta$ 3`LN-C3	615

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

Определение тонкой углеводной специфичности GYL показало, что только 4 олигосахарида распознаются с высокой аффинностью (таблица 6). Наиболее сильное связывание было с тетрасахаридом GalNAc $\alpha$ 1-3Gal $\beta$ 1-4(Fuc $\alpha$ 1-3)GlcNAc $\beta$ -sp3, затем специфичность взаимодействия постепенно уменьшалась. Однако все 4 гликана содержат один и тот же общий мотив – Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ , выделенный в таблице жирным шрифтом. Заместители галактозы значительно увеличивают силу взаимодействия лектина с олигосахаридами. Так, добавление сульфатной группы в положение 4 к дисахариду (4-O-Su-**Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ -sp3**) приводит к 6-кратному увеличению связывания, но дополнительное сульфатирование в

положении б его заметно снижает. Моносахарид GalNAc, присоединенный к трисахариду Le<sup>x</sup> (GalNAcα3`Le<sup>x</sup>-C3), приводит к 12-кратному увеличению связывания. В то же время добавление этого моносахарида к эпитопу Galβ1-4GlcNAcβ, не содержащему Fuc (GalNAcβ1-3Galβ1-4GlcNAcβ-sp3), приводит к значительной потере активности. Следует отметить, что положение Fuc также имеет значение. Так, в наиболее специфичном тетрасахариде фукозилирован концевой фрагмент дисахарида Galβ1-4GlcNAcβ (Lewis x). Если точкой разветвления является Gal, сила связи падает почти в 4 раза (GalNAcα1-3(Fucα1-2)Galβ1-4GlcNAcβ-sp3).

Примечательно, что ни дисахарид лактозамина как таковой, без заместителей, ни наиболее распространенный в природе разветвленный олиголактозамин, содержащий триманнозильное ядро, не являются предпочтительными в массиве гликанов. Принимая во внимание все указанные особенности, можно реконструировать гликотоп для GYL как «Galβ1-4GlcNAcβ», который обязательно содержит дополнительный контактирующий с лектином фрагмент, такой как GalNAc, или сульфатная группа или метильная группы остатков Fuc. Лектин не проявляет строгой специфичности к одному типу углеводов. Это может быть связано с универсальностью и высокой адаптируемостью GYL к окружающей среде.

### **3.5 Структурные характеристики лектинов**

#### *3.5.1 Изучение аминокислотной последовательности лектинов*

Для установления полной аминокислотной последовательности лектинов была получена смесь низкомолекулярных пептидов с помощью ферментативного гидролиза и проведено определение молекулярных масс полученных пептидов методом МАЛДИ-ВП масс-спектрометрии. Для идентификации этих пептидов был использован метод пептидного фингерпринта с привлечением базы данных, содержащей известные

белковые последовательности. Поиск гомологов по масс-спектрам полученных протеолитических фрагментов среди известных лектинов не дал положительных результатов, что говорит об уникальных аминокислотных последовательностях изучаемых лектинов.

Следующим шагом было секвенирование пептидов *de novo*, включающее идентификацию пептидов методом жидкостной хромато-масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением (nano-ESI MS/MS), которое дало множественные последовательности пептидов. Полученные данные удалось проанализировать и интерпретировать для GYL и GYL-R.

В таблице 7 представлена группа пептидов GYL-R, содержащих три консервативных пептидных мотива, характерных для рамнозоспецифичных лектинов -(AN)YGR(TD)- (YGR-мотив) и -DPCXGT(Y)KY(L)- (DPC и KYL-мотивы), которые расположены соответственно в N- и C-концевой области каждого домена и сохраняются почти во всех углевод-связывающих доменах RBL [172, 173]. Полученные результаты подтверждают наши данные о принадлежности выделенного лектина к RBL и свидетельствуют о перспективности полученных пептидов для дальнейшего установления аминокислотной последовательности GYL-R.

Таблица 7 – Пептиды GYL-R, установленные методом nano-ESI MS/MS

Пептиды GYL-R	m/z	заряд	Масса, Да
<b>LEYASYGR</b>	479,7357	2	957,4
<b>(K)YLSVVYTCK</b>	566.7903	2	1131,6
LEAVNSVFGDPCVGTYK	928,4499	2	1854,9
EDTLVCELNTDLLSCEER	732,6665	3	2194,9

В группе пептидов GYL были обнаружены характерные для лектинов С-типа мотивы: EPN (Glu-Pro-Asn) и WND (Trp-Asn-Asp) (таблица 8). Фрагменты этих пептидов были взяты за основу праймеров



при определении нуклеотидной последовательности кДНК и соответствующей ей аминокислотной последовательности GYL.

Таблица 8 – Пептиды GYL, установленные методом nano-ESI MS/MS

Пептиды GYL	m/z	заряд	Масса, Да
TTASQLENASKNHYWLNGTDSAVEG QFR	1042,8264	3	3125,4
CFSYVDWMSAEEPNDRFDADCLHLR	1045,1152	3	3132,3
KWNDLSCSK	505,2257	2	1008,4
LPFFFLCEKPTETCSDK	1060,0051	2	2117,9
MTQAAAEEYCTTQDGHLAQPTSEGL NTFLK	1110,177	3	3327,5

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

### 3.5.2 Клонирование кДНК и установление аминокислотной последовательности GYL

Для определения первичной структуры GYL мы клонировали ПЦР-фрагменты, полученные с использованием подхода быстрого определения 3'- и 5'-кДНК-концов (3'- и 5'-RACE) и вырожденных праймеров, разработанных на основе вышеуказанных пептидов (таблица 8). При проведении 3'-RACE с использованием двух прямых праймеров Lectin\_PTSE и Lectin\_MMD был получен ПЦР-фрагмент ~ 450 п.н. По данным секвенирования эта последовательность кодирует EPN- и WND-

мотивы, стоп-кодон и поли(А)-тракт. Далее на основании этой последовательности мы разработали ген-специфичные праймеры, GYL\_R1\_Cap и GYL\_R2\_T7 для проведения 5'-RACE. В результате был получен фрагмент размером ~660 п.н., кодирующий 5'-нетранслируемую область (5'-НТО), сигнальный пептид и N-концевой фрагмент зрелого белка. Результирующая последовательность длиной 690 п.н. была собрана из перекрывающихся 3'- и 5'-RACE-фрагментов.

На рисунке 15 показана полноразмерная кДНК (690 п.н.) *GYL* и выведенная на ее основе аминокислотная последовательность (161 а.о.). кДНК лектина включает 48 н.о. 5'-НТО, 483 н.о. белок-кодирующей части и 159 н.о. 3'-НТО, включая стоп-кодон и поли(А)-тракт. Открытая рамка считывания *GYL* кодирует белок из 161 а.о., включая типичный N-концевой сигнальный пептид (остатки 1–20) и одиночный CTLD (остатки 24–152) с мотивами EPN (Glu117-Pro118-Asn119) и WND (Trp137-Asn138-Asp139) (рисунок 15). Расчетная масса зрелого GYL (остатки 21-161) составляет 16047,69 Да, а теоретическая изоэлектрическая точка – 4,61. Анализ аминокислотной последовательности проводился на сайте Inter Pro (<https://www.ebi.ac.uk>).

```

1:  atcttcagttttattgaggaaggagacttgaaaactaaaaatcgcaaaaATGAAGTTTACA
1:                                     M K F T
61:  GCTTTAATCGTCGTAATGGCTGGATTGCAGTGTGTATTGTTGTAGCATCGGGTGAGTGT
5:  A L I V V M A G L Q C C I V V A S G E C
121: GAGGCCGGGTGGCGGCTCCATGGTGA CTCTTGT TATTTGTTTAAACGACACAAAGATGACT
25:  E A G W R L H G D S C Y L F N Q T K M T
181: CAAGCTGCCGCTGAGGAATATTGCACAACACAAAATGGTCATCTGGCACAACCTACATCT
45:  Q A A A E E Y C T T Q N G H L A Q P T S
241: GAGGGGATAAACACATTCCTGAAAACAACTGCGAGCCAATTGGA AAAATGGA ACTATTGAG
65:  E G I N T F L K T T A S Q L E N G T I E
301: CACTATTGGATTGATGGAACGGATTTCAGCAGTAGAGGGACAATTCCGCTGGTTAGACGGA
85:  H Y W I D G T D S A V E G Q F R W L D G
361: AAGTGCTTTTCATATGTAGACTGGATGTCGGCTGAAGAACCAAATGACCGATTTGGAGAA
105: K C F S Y V D W M S A E E P N D R F G E
421: GATTGTATCCATCTTAGAGCTTCGCTCAATTACAAATGGAATGACATAAGCTGTTCAAAA
125: D C I H L R A S L N Y K W N D I S C S K
481: CTACCGTTTTTTTTTCATTTGTGAAAAACCGACAGAAACATGTACAACACAATGAAaactcc
145: L P F F F I C E K P T E T C T T Q *
541: ttgggatcggtaatatagtcattgaccggaagatgaaaaccgtacgttcaacattcagt
601: acaatgttcatttttcataaatcgaaagaattaaatttgatatattaacaaagttaata
661: taagtttcaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

```

Рисунок 15 – Последовательность полноразмерного транскрипта и соответствующая ей аминокислотная последовательность GYL.

Нуклеотидные остатки и аминокислотные остатки пронумерованы слева. Старт-кодон (ATG) выделен жирным шрифтом, стоп-кодон (TGA) показан звездочкой. Сигнальный пептид подчеркнут двойной линией. Мотивы специфичного связывания лиганда EPN и WND выделены красным цветом. 5'- и 3'-НТО показаны строчными буквами. CTLD, предсказанный программой SMART, выделен серым. Поли(А)-тракт подчеркнут одной линией

Чтобы подтвердить существование полноразмерного транскрипта GYL, были сконструированы праймеры GYL\_start и GYL\_stop1, фланкирующие белок-кодирующую последовательность этого гена. В результате клонирования, секвенирования и транслирования ПЦР-фрагмента (~700 п.н.) было обнаружено несколько изоформ: изоформа 1 –

изоформа 9 (рисунок 16). Длина их кДНК варьировала от 690 п.н. (для изоформы 8) до 717 п.н. (для изоформы 3).

Мы обозначили изоформу 1 как GYL (рисунок 15), поскольку она содержит те же аминокислотные последовательности пептидов, которые были идентифицированы нами с помощью нано-ESI MS/MS (таблица 8). Другие изоформы GYL были названы GYL-подобные 1–8. Все изоформы характеризуются высококонсервативным сигнальным пептидом длиной 20-21 а.о. (с ~ 95% идентичностью) и высоковариабельной последовательностью зрелого белка (54,32–61,73% идентичности) (рисунок 16). Молекулярная масса зрелых белков варьировала от 15996 до 16862 Да, а значения pI — от 4,39 (GYL-подобный 3) до 5,15 (GYL-подобный 1) (таблица 9).

Таблица 9 – Характеристика членов мультигенного семейства GYL-подобных лектинов С-типа

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

Общей особенностью изоформ является то, что все зрелые белки содержат один CTLD, предсказанный программой SMART, и включают консервативные мотивы EPN или APN (GYL-подобный 1 и GYL-подобный

2) и WND (рисунок 16). Таким образом, установленные изоформы являются лектинами С-типа.

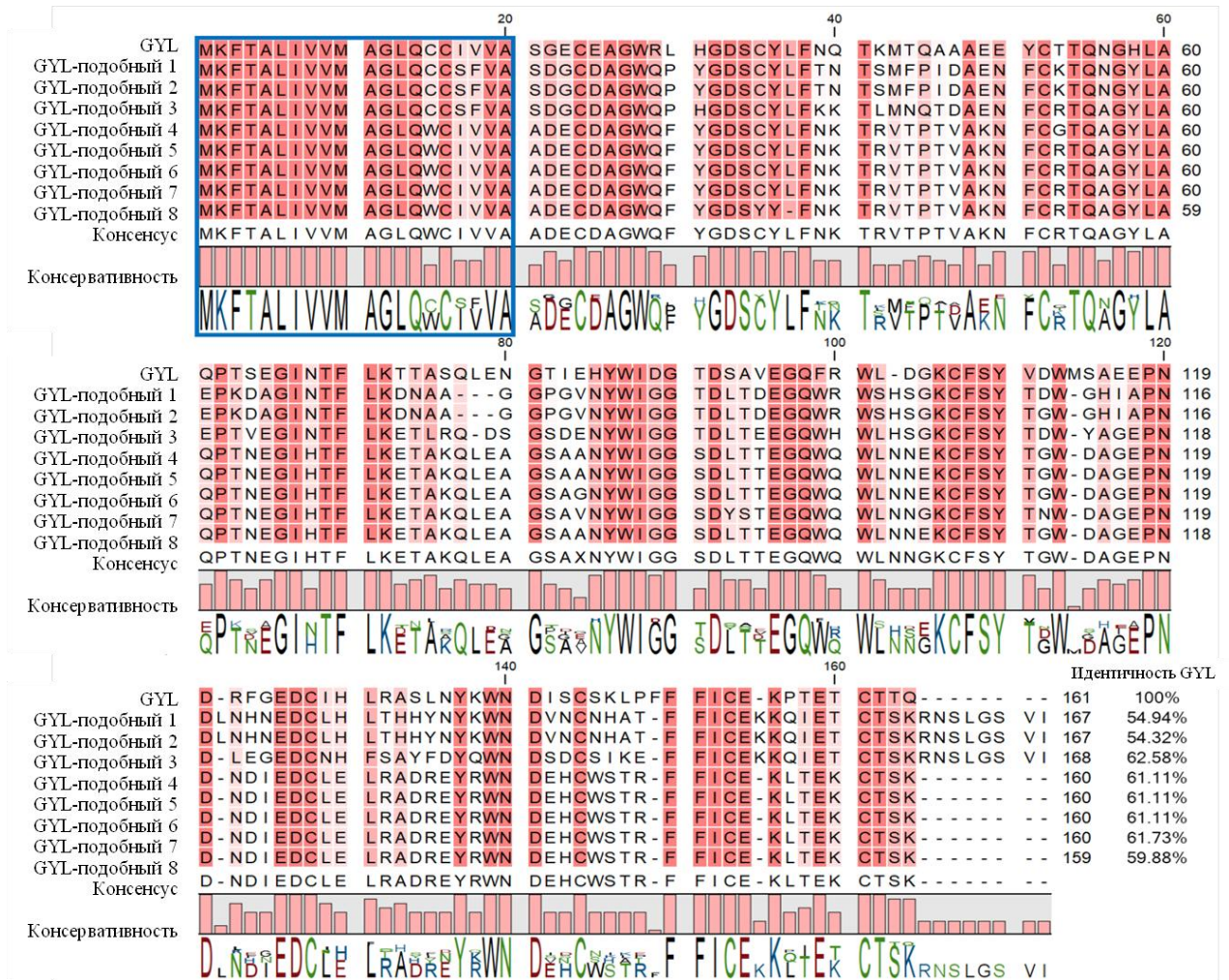


Рисунок 16 – Выравнивание аминокислотных последовательностей членов мультигенного семейства GYL-подобных лектинов С-типа из *G. yessoensis*.

Идентичные и консервативные аминокислотные остатки показаны на темном и светло-красном фоне соответственно. Для множественного выравнивания последовательностей использовали Vector NTI Advance™ 11.0 (Invitrogen, США) [174]. Визуализация выполнена с помощью программного обеспечения CLC Main Workbench (Qiagen, Дания)

Наличие консервативного сигнального пептида и варибельной последовательности зрелого белка характерно для последовательностей, кодирующих мультигенные семейства [175, 176]. Этот факт прямо указывает на существование мультигенного семейства GYL-подобных лектинов С-типа у двустворчатого моллюска *G. yessoensis*.

### 3.5.3 Поиск и анализ гомологов GYL

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

Результаты BLAST-анализа показали значительное сходство последовательности CTLD GYL с CTLD-содержащими белками и лектинами. Например, GYL разделяет 42% сходства с CTLD-содержащим белком из брюхоногого моллюска *Candidula unifasciata* (CAG5124220.1), 41% с CTLD-содержащим белком из двустворчатого моллюска *Mytilus coruscus* (CAC5386982.1), 40,8% с макрофагальным маннозным рецептором 1 из краба-стригуна *Chionoecetes opilio* (KAG0712468.1), 39,5% с перлюциноподобным CTLD-содержащим белком (XP\_034305914.1) из *C. gigas* и 38,17% с CTLD-содержащим белком (CLECT\_DC-SIGN\_like) из тасманского дьявола *Sarcophilus harrisii* (XP\_012396311.1).

Характерные признаки суперсемейства лектинов С-типа были идентифицированы в GYL путем множественного выравнивания аминокислотных последовательностей (рисунок 17). Дисульфидные связи играют критическую роль в фолдинге и рефолдинге белков, а также в создании и поддержании трехмерных структур. Для всех четырех цистеиновых остатков ( $C^I$ ,  $C^{II}$ ,  $C^{III}$  и  $C^{IV}$ ), участвующие в образовании внутренних дисульфидных мостиков в CRD, характерна высокая позиционно-специфичная консервативность (рисунок 17). Кроме того, присутствие двух цистеиновых остатков ( $C^0$  и  $C^{0'}$ ) на N-конце CRD указывает на наличие в GYL так называемой «длинной формы» CRD (рисунок 17).

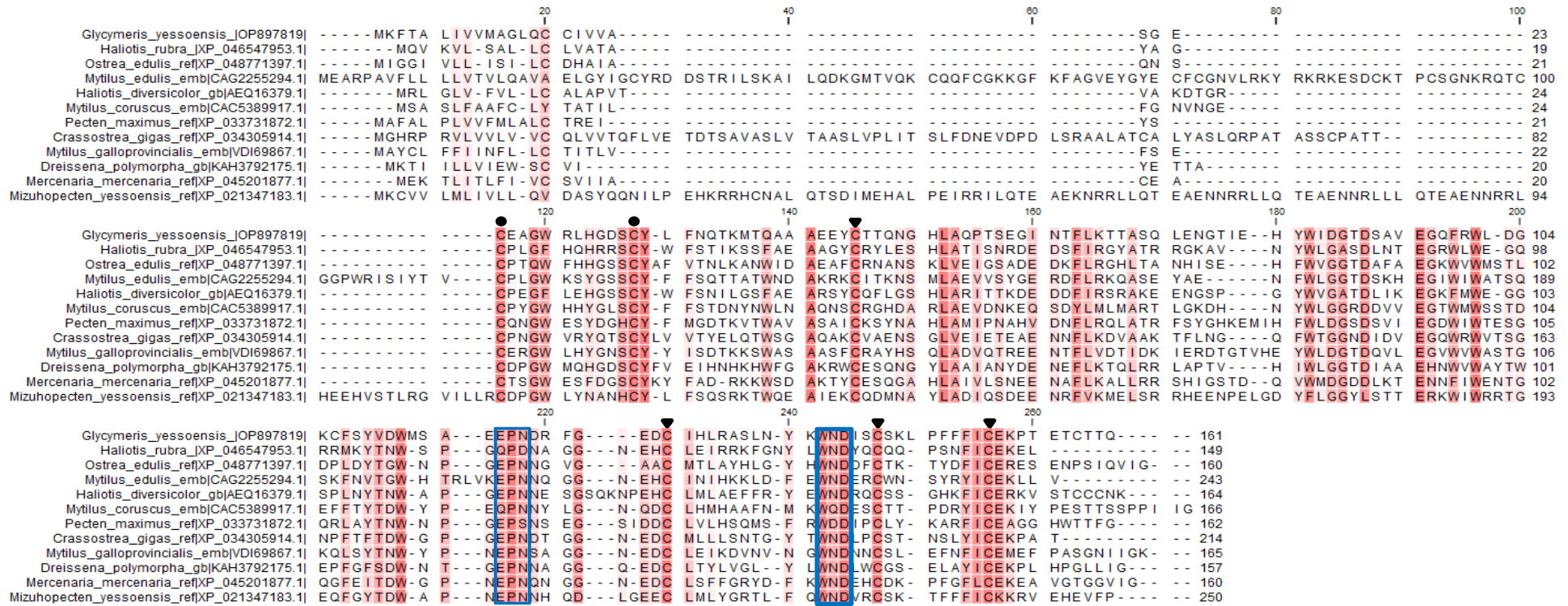


Рисунок 17 – Множественное выравнивание аминокислотной последовательности GYL с другими белками и лектинами, содержащими CTLD, с помощью программы ClustalW. Номера доступа в GenBank для некоторых включенных видов: *M. galloprovincialis* (VDI69867.1), *O. edulis* (XP 048771397.1), *C. gigas* (XP 034305914.1), *H. rubra* (XP 046546494.1), *H. diversicolor* (AEQ16379.1), *P. maximus* (XP 033731872.1), *M. mercenaria* (XP 045201877.1), *D. polymorpha* (KAN3792175.1), *M. coruscus* (CAC5389917.1), *M. edulis* (CAG2255294.1), *M. yessoensis* (XP 0213147183.1). Аминокислотные остатки, консервативные в 50% последовательностей и более, заштрихованы темно-красным цветом, а аналогичные аминокислоты заштрихованы светло-красным цветом. Консервативные цистеиновые остатки, участвующие в формировании внутренних дисульфидных мостиков CRD, отмечены значком ▼, тогда как два дополнительных цистеиновых остатка в длинной форме отмечены ●. Буквы в рамке обозначают мотив для определения специфичности связывания лиганда. Визуализация выполнена с помощью программного обеспечения CLC Main Workbench (Qiagen, Дания)

### 3.5.4 Сигнальный пептид аминокислотной последовательности GYL

Сигнальные пептиды (СП) представляют собой короткие последовательности аминокислот, которые контролируют секрецию и транслокацию белка во всех живых организмах. Во время или после мембранной транслокации сигнальная пептидаза удаляет СП. Предсказание сигнального пептида по данным последовательности GYL проводили с использованием программы SignalP 6.0 [177]. Сайт расщепления между аминокислотами Gly22 и Glu23 предсказан с вероятностью 94%. С помощью указанной программы определены тип и субобласти СП, которые характеризуют каждую аминокислоту СП (рисунок 18).

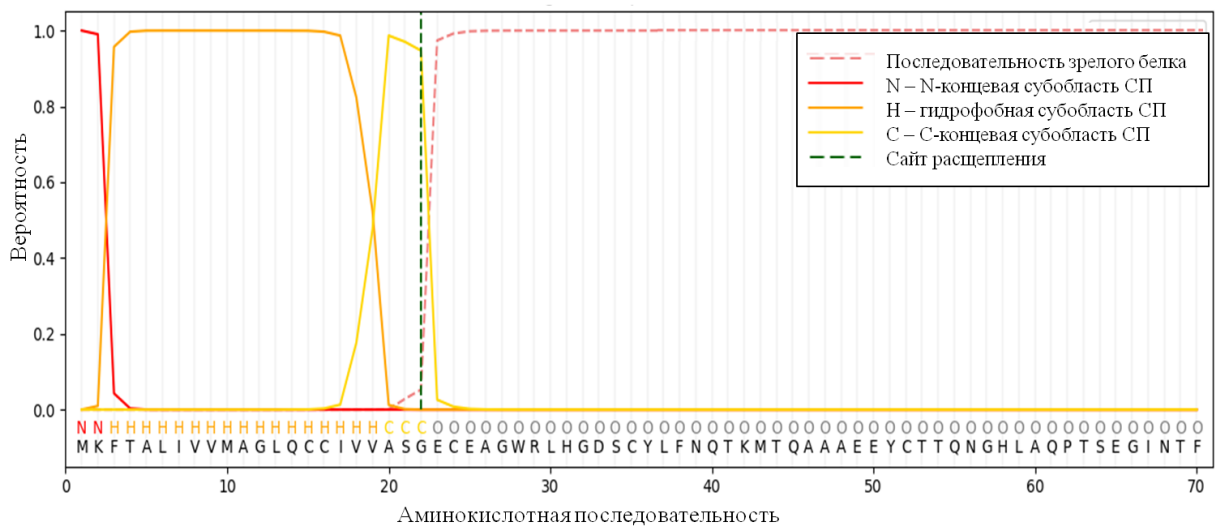


Рисунок 18 – Предсказание сигнального пептида по данным последовательности GYL. Субобласти СП: N – N-концевая область, Н – гидрофобная область и С – С-концевая область

Для установления точного сайта протеолиза проведено секвенирование по методу Эдмана N-концевого фрагмента GYL. Получены пептидные последовательности длиной 6 и 8 аминокислотных остатков (рисунок 19). Возможно, исследуемый образец представляет собой смесь из двух изоформ GYL, которые отличаются на два N-концевых аминокислотных остатка.



N-концевая аминокислотная  
последовательность GYL (1)



N-концевая аминокислотная  
последовательность GYL (2)

Рисунок 19 – Секвенирование N-концевого фрагмента GYL методом Эдмана

Консенсусная последовательность для отщепления сигнального пептида от секретируемого белка была установлена как Ala-X-Ala (-3, X, -1). Для положения -1 предпочтительны остатки аланина, глицина и серина. В дополнение к этим трем остаткам в положении -3 также могут находиться более крупные остатки, такие как валин, треонин, лейцин и изолейцин. Аланин является наиболее распространенной аминокислотой в положениях -1 (>50%), -3 (>80%) [178]. Таким образом, неоднородность N-конца, возможно, возникла в результате неравномерного расщепления СП, в виду присутствия двух характерных последовательностей для расщепления (V18-V19-A20 и A20-S21-G22).

### 3.5.5 N-гликозилирование GYL

Посттрансляционные модификации расширяют спектр функциональных возможностей многих белков. Выяснение структурных аспектов и последствий такого образования конъюгатов, естественно, зависит от сложности структуры присоединенных соединений [179]. Прикрепленные гликаны вносят вклад не только в физические свойства, такие как конформационная стабильность, устойчивость к протеазам, заряд или гидрофильность, но также модулируют несколько типов процессов распознавания, начиная от репродуктивной биологии, само-/не саморасознавания, межклеточных коммуникаций, развития и дифференцировки клеток, взаимодействия хозяин-патоген или хозяин-симбионт и иммунной активации, до гибели клеток и даже эволюции. N-гликозилирование, один из наиболее распространенных типов

гликозилирования. Процесс начинается в эндоплазматическом ретикулуме (ЭР) с образования связанного с липидом предшественника, который переносится единым блоком на амид боковой цепи аспарагина, расположенной в консенсусной последовательности Asn-X-Ser/Thr, где X может быть любой аминокислотой, кроме пролина. Чаще всего, предшественником является Glc3Man9GlcNAc2 [180, 181].

При анализе последовательности, полученной из кДНК, мы отметили, что она на 1995 Да меньше, чем полученная с помощью масс-спектрометрии. Принимая во внимание, что часто секретируемые лектины гликозилированы, мы решили проанализировать, имеет ли GYL в своей структуре гликаны. Анализ N-гликанов GYL методом ГЖХ в виде ацетилированных метилгликозидов показал наличие в их составе моносахаридных остатков ксилозы, маннозы, D-глюкозамина, 3-О-метирированной галактозы, 6-деокси-D-глюкозы (D-хиновозы), 3-О-метирированной 6-деокси-D-глюкозы. К настоящему времени ксилоза и метилированные гексозы обнаружены в составе N-гликанов гликопротеинов у многих видов моллюсков и признаны их типичным признаком [182].

Предсказание сайтов гликозилирования GYL, по данным аминокислотной последовательности, проводили с использованием сервера NetNGlyc-1.0, который предсказывает сайты N-гликозилирования в белках, используя искусственные нейронные сети.

```
SGECEAGWRLHGDSCYLF N QT KMTQAAAEYCTTQNGHLAQPTSEGINTFLKTTASQLE N GT IENYIWDGTDSAVEGQFR      80
WLDGKCFSYVDWMSAEEPNDRFGEDCIHLRASLNKWNDISCSKLPFFFFICEKPTETCTTQ
```

Рисунок 20 – Предсказание сайтов гликозилирования GYL.

Последовательности Asn-Xaa-Ser/Thr выделены синим цветом. Остатки аспарагина, предположительно N-гликозилированные, выделены красным цветом

По данным, предсказанным сервером (рисунок 20), N-гликозилированы Asn19 и Asn60. Таким образом, на субъединицу GYL

приходится два сайта гликозилирования, а на димерную молекулу четыре сайта гликозилирования.

### 3.6 Изучение пространственной организации лектинов

#### 3.6.1 Расчет элементов вторичной структуры лектинов методами КД-спектроскопии

Содержание элементов вторичной структуры белка можно определить, анализируя его спектр кругового дихроизма (КД) в дальнем УФ-диапазоне, как сумму дробных кратных эталонных спектров для каждого структурного типа [183].

Пространственная организация на уровне вторичной структуры лектинов была изучена методом спектроскопии КД. Форма спектров КД в дальней УФ-области (190–260 нм) и расчет содержания элементов вторичной структуры белков с помощью пакета программ CD Pro, используя метод Sreerama [145] показали, что GYL-R и GYL относятся к  $\alpha/\beta$ -структурированным белкам. Данные представлены в таблице 10.

Таблица 10 – Содержание элементов вторичной структуры лектинов, %

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

Спектры КД GYL в дальней УФ-области характеризуются положительной полосой с максимумом при 193 нм и отрицательной полосой с максимумом при 208 нм и плечом 220 нм (рисунок 21А), что говорит о перекрывающихся вкладах элементов  $\alpha$ -спирали и  $\beta$ -листа. Смешанная  $\alpha/\beta$

топология является характерной особенностью CTL и описана ранее в литературном обзоре [52, 53].

В спектре КД GYL-R в дальней УФ-области наблюдалась отрицательная полоса с максимумом при 220 нм и плечом при 208 нм и положительная полоса с максимумом при 195 нм (рисунок 21Б), что отражало смешанную ( $\alpha$  и  $\beta$ ) вторичную структуру с более высоким содержанием  $\beta$ -структуры. Это является характерным для рамнозоспецифичных лектинов, поскольку общая пространственная организация домена RBL имеет структуру  $\beta$ -сэндвича с двумя антипараллельными слоями, состоящими из пяти  $\beta$ -тяжей каждый, одной длинной  $\alpha$ -спирали и одного небольшого спирального элемента [184].

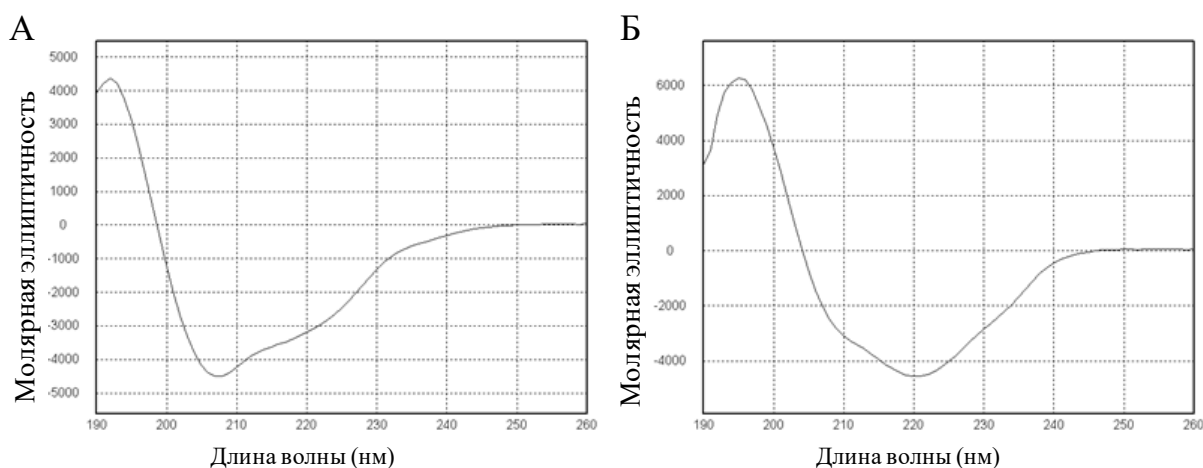


Рисунок 21 – Спектры КД в дальней УФ-области (190–240 нм).

А – спектр GYL, Б – спектр GYL-R

### 3.6.2 Расчет элементов вторичной структуры GYL *in silico*

Пространственная организация на уровне вторичной структуры GYL может быть оценена и расчетными методами по аминокислотной последовательности. Программы предсказывают состояние каждой аминокислоты.

Аминокислотная последовательность GYL была введена на сервер PredictProtein (<https://www.predictprotein.org/>) для предсказания

предполагаемых характеристик вторичной структуры. Рассчитанные сервером данные соответствуют полученным с помощью КД (рисунок 22).

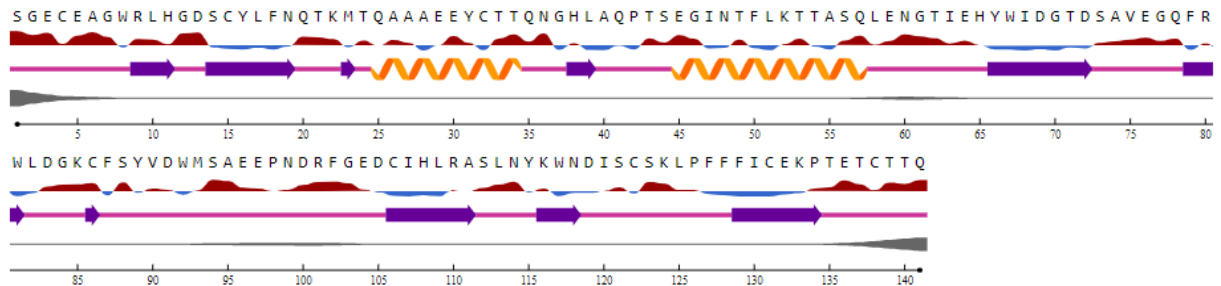


Рисунок 22 – Предсказанная вторичная структура GYL и схематическое изображение её элементов

Прогнозируемое содержания элементов вторичной структуры GYL согласуется с данными спектроскопии КД нативного лектина. Согласно данным сервера:  $\alpha$ -спиралей 17% (24 остатка), обозначены желтым;  $\beta$ -структур: 30,5% (43 остатка), обозначены фиолетовым; неупорядоченных структур: 52,5% (74 остатка), обозначены розовым (рисунок 22),

### 3.6.3 Влияние температуры на пространственную организацию GYL и GYL-R

По изменениям в спектре КД в дальнем УФ-диапазоне, можно определить, теряет ли белок при высоких температурах всю свою вторичную структуру, либо только ее часть, или просто претерпевает конформационные изменения, затрагивающие фрагменты вторичной структуры [183]. Влияние температуры на пространственную организацию лектинов GYL и GYL-R было изучено методом КД-спектроскопии.

Согласно спектрам КД в области поглощения пептидных связей, нагревание раствора GYL до 30 °C не приводило к конформационным изменениям молекул на уровне вторичной структуры (рисунок 23А). При дальнейшем повышении температуры от 40 °C и выше, наблюдалось снижение эллиптичности положительной полосы в области 193 нм,

смещение максимума отрицательной полосы от 208 до 204 нм и сглаживание минимума при 220 нм. Это свидетельствует об изменении относительного содержания  $\alpha$ -спирали и неупорядоченной структуры в белке в пользу последней. Наблюдаемые изменения в структуре GYL, нагретого до 42 °С, сопровождаются потерей гемагглютинирующей активности.

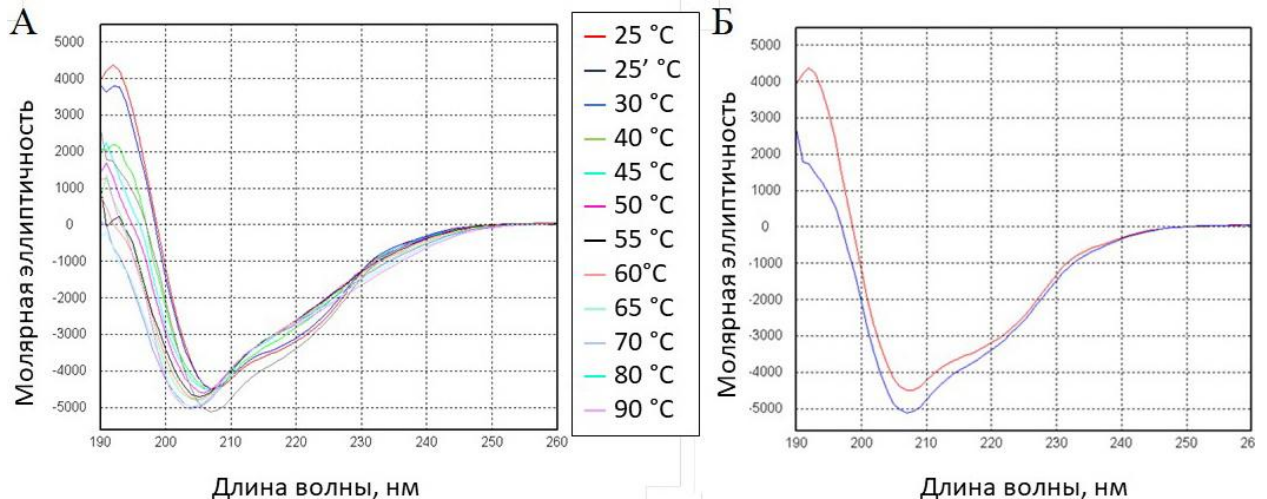


Рисунок 23 – Влияние температуры на вторичную структуру GYL

Обратимость конформационных изменений, индуцированных температурой, была изучена методом КД-спектроскопии (рисунок 23Б). После полного остывания до температуры 25' °С спектр КД GYL приобретает форму близкую к таковой спектра исходного (непрогретого) белка с некоторым снижением эллиптичности полос при 193, 208 и 220 нм (рисунок 23Б). Однако гемагглютинирующая активность GYL не восстанавливается, следовательно, рефолдинг белка не приводит к активации углевод-связывающего сайта лектина.

В случае GYL-R, согласно спектрам КД (рисунок 24А), постепенное повышение температуры раствора до 50 °С приводило к снижению эллиптичности в области 195 нм, при этом смещение максимумов отрицательной полосы при 208 нм и 220 нм отсутствовало. Заметные изменения в структуре GYL-R проявлялись при нагревании от 60 °С и выше. В спектре лектина с ростом температуры наблюдается формирование четкого

минимума при 205 нм (66 °С) и его постепенное смещение в сторону коротких длин волн до 200 нм (90 °С) со значительным увеличением абсолютного значения эллиптичности этой полосы, что свидетельствует о разворачивании вторичной структуры белка. В этих спектрах интенсивность отрицательной полосы при ~220 нм остается относительно высокой, указывая на сохранение некоторого количества  $\beta$ -структуры. Как показано ранее на рисунке 3, GYL-R сохранял исходную гемагглютинирующую активность при нагреве до 70 °С, при дальнейшем повышении температуры активность падала на ~75% (95 °С), полная инактивация лектина наблюдалась только при 105 °С. Можно сделать вывод, что нагревание лектина до 95 °С приводит к изменениям его вторичной структуры, но стабилизирующий эффект четырех внутренних дисульфидных связей позволяет сохранить активную конформацию углевод-связывающих сайтов.

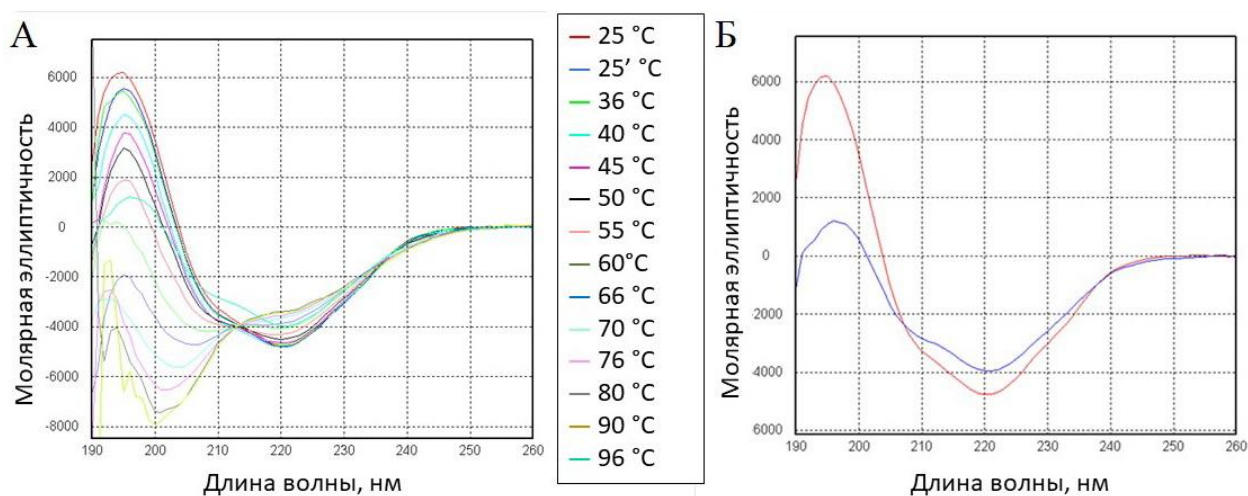


Рисунок 24 – Влияние температуры на вторичную структуру GYL-R

Была изучена обратимость процесса денатурации GYL-R под действием температуры. После охлаждения до 25 °С лектина, прогретого при 95 °С, наблюдалось существенное восстановление его вторичной структуры: его спектр имел характеристики близкие к таковым нативного GYL-R (рисунок 24Б). Однако после этой процедуры лектин сохранил только 25%

активности., т. е. имел активность на уровне таковой GYL-R, выдержанного при температуре 95 °С. Следовательно, в данных условиях после охлаждения не происходит восстановление нативной пространственной структуры лектина, включая углевод-связывающие сайты.

### 3.6.4 *In silico* анализ пространственной структуры GYL

Методами структурной биоинформатики проведен анализ первичной структуры лектина GYL и построена теоретическая модель пространственной структуры с помощью сервера SWISS-MODEL [185,186].

Анализ показал, что наиболее близкими гомологами являются лектины С-типа, а самым близким гомологом с идентичностью 42% является белок брюхоногого моллюска *Candidula unifasciata* (CAG5124220.1), содержащий домен лектина С-типа. Поиск прототипа с экспериментально установленной 3D-структурой показал, что лектины С-типа человека и мыши имеют идентичность 30% с GYL. При выборе прототипа учитывалось консервативное положение остатков цистеина, важное для правильной пространственной упаковки молекулы лектина. В качестве прототипа был выбран мышинный антигеноподобный белок CD209 (код PDB 4c9f) [146]. Идентичность аминокислотной последовательности GYL и прототипа составила 30%, выравнивание аминокислотных последовательностей представлено на рисунке 25.



Рисунок 25 – Выравнивание аминокислотных последовательностей 3D-модели GYL и CD209 (код PDB 4c9f). Элементы вторичной структуры показаны красным цветом  $\alpha$ -спирали, желтым цветом  $\beta$ -структура и синим цветом изгибы. Дисульфидные мостики показаны красным



Потенциальная третичная структура CRD в GYL была установлена с помощью алгоритма прогнозирования SWISS-MODEL на основе шаблона 4c9f (рисунок 26А). 3D-суперпозиция модели и прототипа показала, что величина среднеквадратичного отклонения составляет 0,404 Å для 126 Ca-атомов (рисунок 26Б).

Качество пространственной структуры GYL оценивали с помощью функции QMEANDisCo на сервере SWISS-MODEL. Показатель QMEANDisCo, близкий к 1,0, указывает на хорошее соответствие между теоретической моделью и экспериментальными структурами того же размера. QMEANDisCo Global для GYL составил  $0,61 \pm 0,07$ . Стереохимическое качество и надежность структуры проверяли с использованием графика Рамачандрана (способ визуализации двугранных углов аминокислот полипептидной основы ( $\psi$  и  $\phi$ ) в белках) и Z-показателя, который позволяет учесть зависимость электронной плотности от разрешения типа аминокислотного остатка. Чем больше значение Z-показателя для данного аминокислотного остатка, тем «хуже» он вписан в электронную плотность. Приемлемыми считаются значения Z-показателя  $< 2$ . Оценка качества модели с помощью карты Рамачандрана показала, что 91,73% аминокислотных остатков расположено в наиболее благоприятной области. Рассчитанный Z-показатель белка составил  $-1,69 \pm 0,70$ . Общая оценка MolProbity составляет 2,14 (результаты получены с использованием сервера MolProbity версии 4.4).

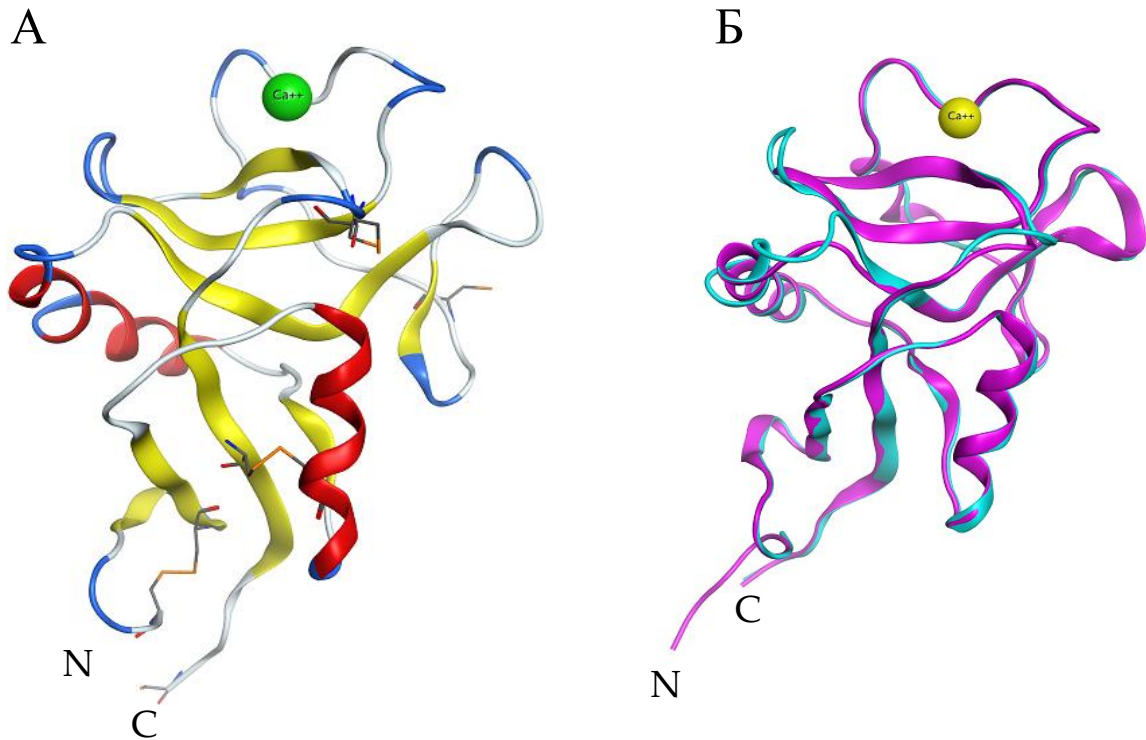


Рисунок 26 – Пространственная структура GYL.

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

CRD GYL принял типичную длинную структуру с двойной петлей. Нижняя часть домена состоит из двух  $\alpha$ -спиралей и четырех  $\beta$ -цепей, а верхняя часть состоит из пяти  $\beta$ -цепей.  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающий центр 2, участвующий в связывании углеводов, располагается в верхней части области длинной петли. Шесть цистеинов образуют три дисульфидных мостика в основаниях петель. Четыре цистеина C1(Cys32)-C4(Cys131) и C2(Cys106)-C3(Cys122), являющиеся наиболее консервативными остатками CRD CTL, образуют два дисульфидных мостика в основаниях петель. Cys32 и Cys131 связывают всю петлю домена, тогда как Cys106 и Cys122 связывают область длинной петли (рисунок 26А). Кроме того, два других

цистеина C0(Cys4)-C0'(Cys15) образуют третий дисульфидный мостик, стабилизирующий нижнюю часть CRD, именно он специфичен для длинных форм CRD CTL. Свободные Cys86 и Cys132 являются остатками, потенциальными для образования межмолекулярного мостика при димеризации белка.

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

Ранее, методами ДСН-ПААГ-электрофореза, гель-фильтрации и МАЛДИ-ВП масс-спектрометрии были получены данные о гомодимерной форме нативного GYL (два мономера связанных дисульфидной связью). Последовательность белка включает два свободных цистеиновых остатка (Cys86 и Cys138), способных к созданию межмолекулярных связей. Cys86 расположен в области длинной петли, а Cys132 на С-конце.

Вероятность димеризации, предсказанная сервером SWISS-MODEL, для Cys138 составляла 68%, для Cys86 всего 3%. Возможная олигомерная структура белка, построенная с помощью этого сервера, при образовании межмолекулярного мостика между Cys138 (субъединица 1) и Cys138' (субъединица 2) представлена на рисунке 27.

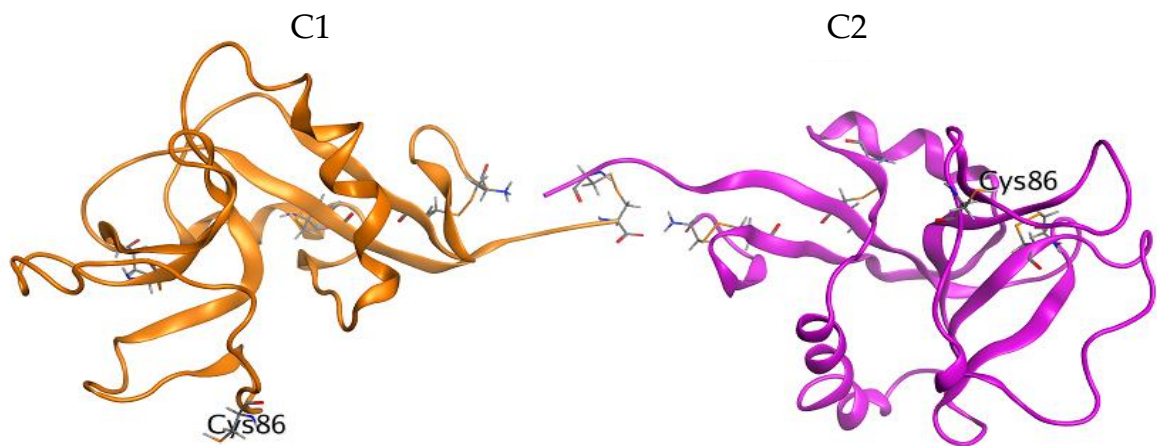


Рисунок 27 – Ленточная диаграмма модели 3D-структуры гомодимера GYL. Субъединицы GYL обозначены C1 (оранжевым цветом) и C2 (розовым цветом). Структура остатков цистеина показана в стержневой форме. Отмечено положение свободного остатка Cys 86

Олигомеризация лектина приводит к поливалентности, свойству, которое делает возможным перекрестное связывание лигандов и агглютинацию клеток, а также обеспечивает более высокую авидность лектина к кластерным гликанам. Для таких лектинов, как GYL, которые несут один CRD в каждом полипептиде, его свойства дополнительно усиливаются за счет объединения субъединиц в олигомерные формы [86].

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

### 3.7 Биологическая активность GYL-R, GYL и GYLman

Важнейшей особенностью лектинов является распознавание и агглютинация клеток за счет нековалентного связывания специфических углеводных лигандов на клеточной поверхности. Широкое распространение лектинов в гемолимфе и различных других частях тела моллюсков

свидетельствует о том, что они играют важную роль в иммунной защите животного от инфицирования патогенными микроорганизмами.

### 3.7.1 Взаимодействие лектинов с ПАМП

Для определения принадлежности исследуемых лектинов к паттерн-распознающим рецепторам была изучена их способность связываться с основными видами ПАМП (ЛПС *E. coli* O111:B4, пептидогликаном *S. aureus*,  $\alpha$ -D-маннаном *S. cerevisiae*,  $\beta$ -1,3-глюканом *E. gracilis*) (рисунок 28).

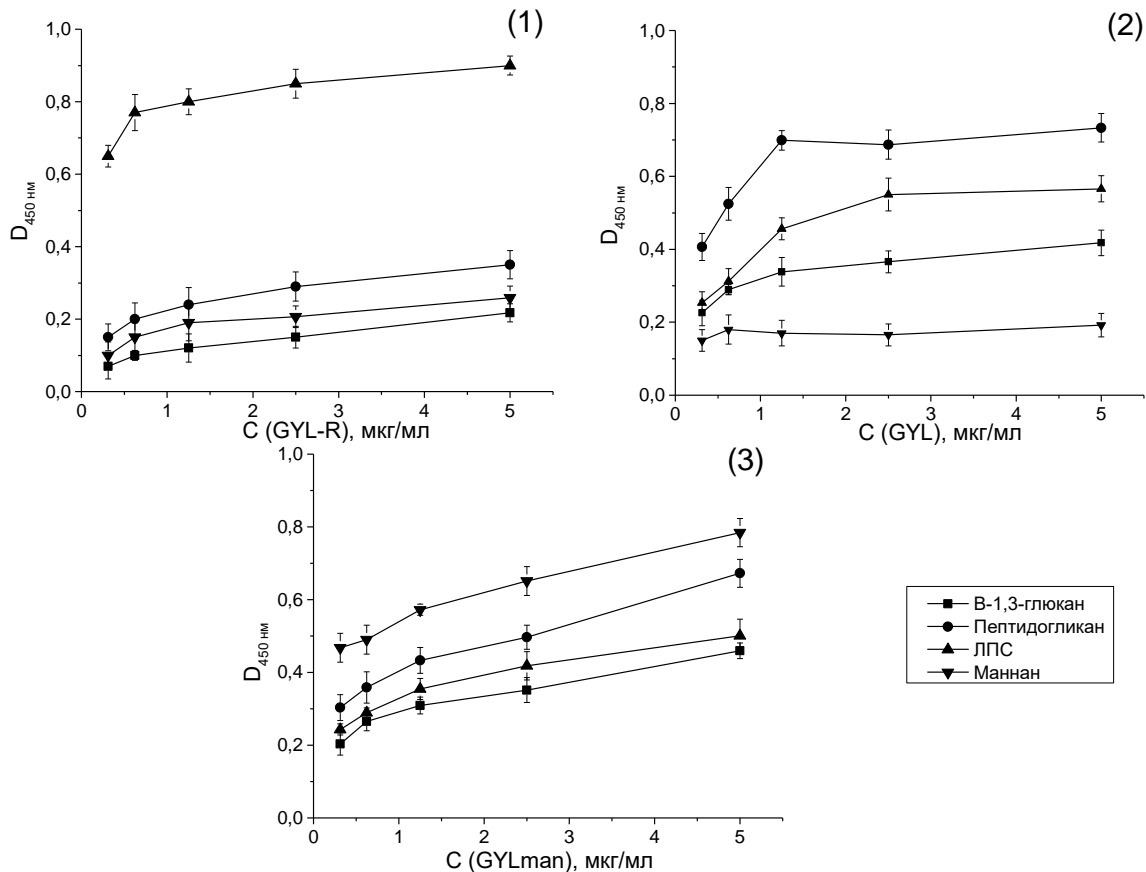


Рисунок 28 – Взаимодействие GYL-R, GYL и GYLman с ПАМП, адсорбированными на полистирольном планшете, определенное методом ТЛФА. Данные представлены как среднее значение  $\pm$  SD (n=3).

Методом ТЛФА было установлено, что GYL-R, GYL и GYLman проявляют концентрационно-зависимое связывание со всеми исследуемыми ПАМП. GYL-R высокоспецифично связывается с ЛПС по сравнению с

остальными ПАМП. GYL предпочтительно связывал пептидогликан и ЛПС, но имел меньшую связывающую активность по отношению к  $\beta$ -1,3-глюкану и маннану, которые являются компонентами клеточной стенки дрожжей. Связывание GYLman с исследуемыми паттернами убывает в ряду:  $\alpha$ -D-маннан > пептидогликан > ЛПС >  $\beta$ -1,3-глюкан.

ЛПС и пептидогликан являются основными компонентами оболочки грамотрицательных и грамположительных бактерий соответственно, маннан основной компонент дрожжевых клеточных стенок, а  $\beta$ -1,3-глюкан основной компонент клеточных стенок грибов.

Сиалоспецифический лектин (SABL) из мантийского моллюска *Ruditapes philippinarum* проявлял очевидную активность в отношении ЛПС и пептидогликана, но не в отношении глюкана, и грамотрицательной бактерии *Vibrio harveyi* [187]. CTL из устрицы *C. gigas* (обозначенный как CgCLec-2) связывал различные ПАМП, включая ЛПС, маннан и пептидогликан. CgCLec-2 проявлял активность, подавляющую рост *S. aureus* и усиливал фагоцитарную активность гемоцитов в отношении *V. splendidus* [188].

### 3.7.2 Взаимодействие лектинов с микроорганизмами

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

GYL-R высокоспецифично связывался с грамотрицательной бактерией *E. coli* (рисунок 29) и обладал минимальной аффинностью по отношению к остальным микроорганизмам. Эти данные хорошо коррелируют с предыдущим экспериментом, поскольку из всех исследуемых ПАМП GYL-R наиболее эффективно взаимодействовал с ЛПС.

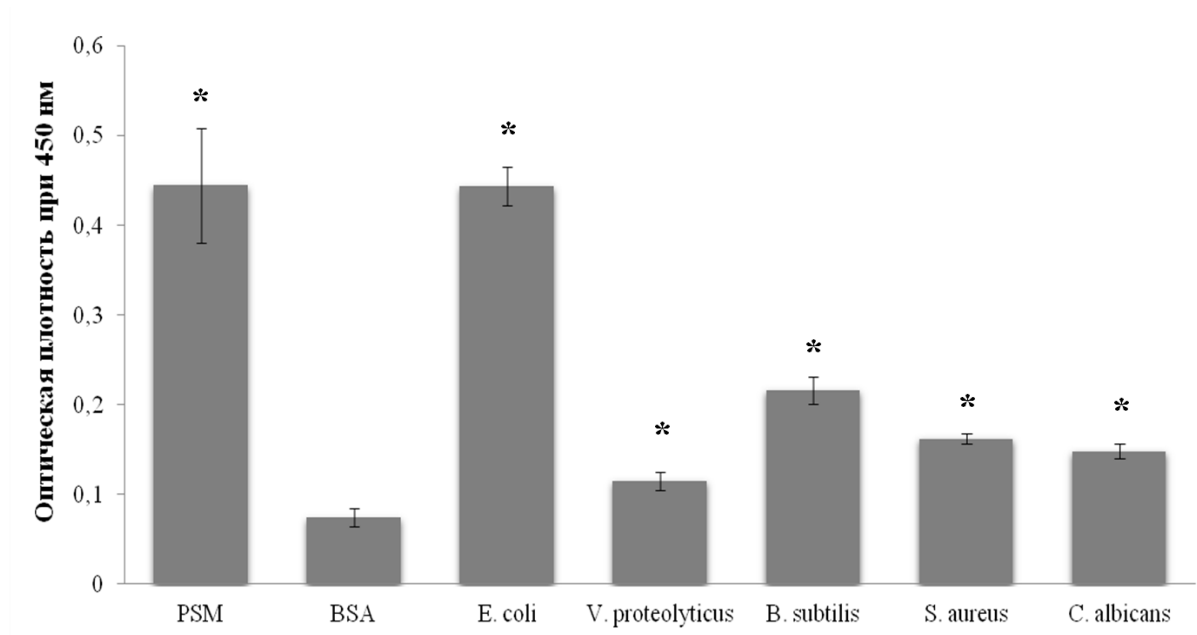


Рисунок 29 – Связывание GYL-R с микроорганизмами, определенное методом ТЛФА (BSA – отрицательный контроль связывания, PSM – положительный контроль связывания). Данные представлены как среднее значение  $\pm$  SD (n=3). \*  $p < 0,05$

GYL обладает широким спектром связывания микробов, взаимодействуя со всеми протестированными типами микроорганизмов с разной интенсивностью (рисунок 30).

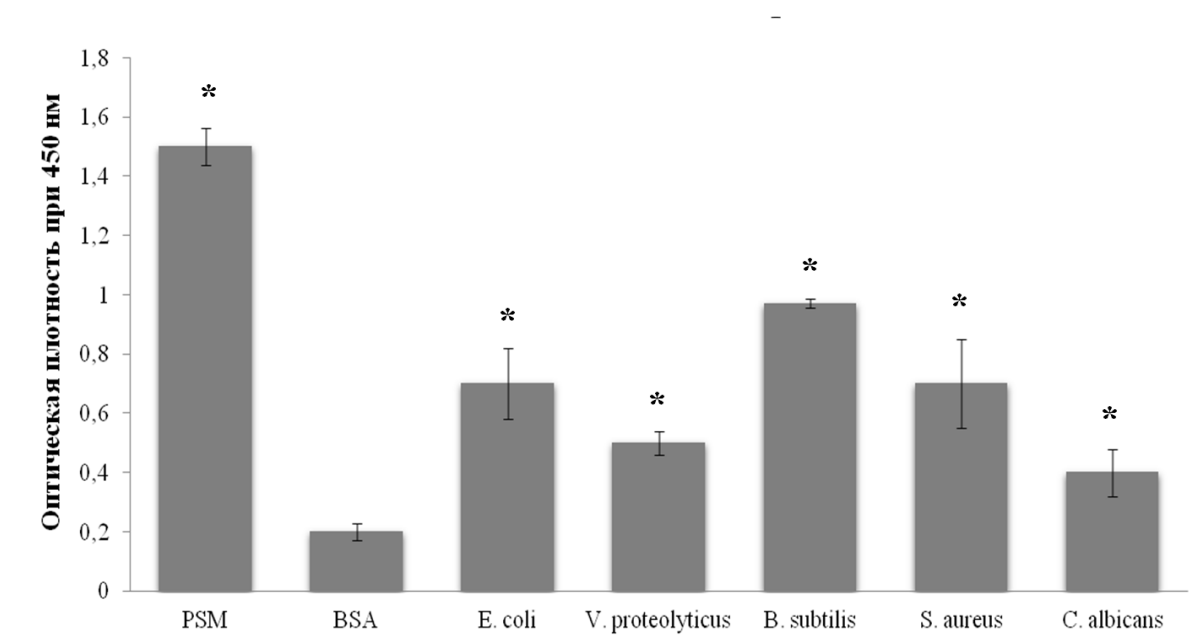


Рисунок 30 – Связывание GYL с микроорганизмами, определенное методом ТЛФА (BSA – отрицательный контроль связывания, PSM – положительный контроль связывания). Данные представлены как среднее значение  $\pm$  SD (n=3). \*  $p < 0,05$

GYLman специфично связывает как грамположительные (*S. aureus*, *B. subtilis*), так и грамотрицательные (*E. coli*, *V. proteolyticus*) бактерии, а также дрожжи *C. albicans*, что предполагает его широкий спектр распознавания ПАМП (рисунок 31).

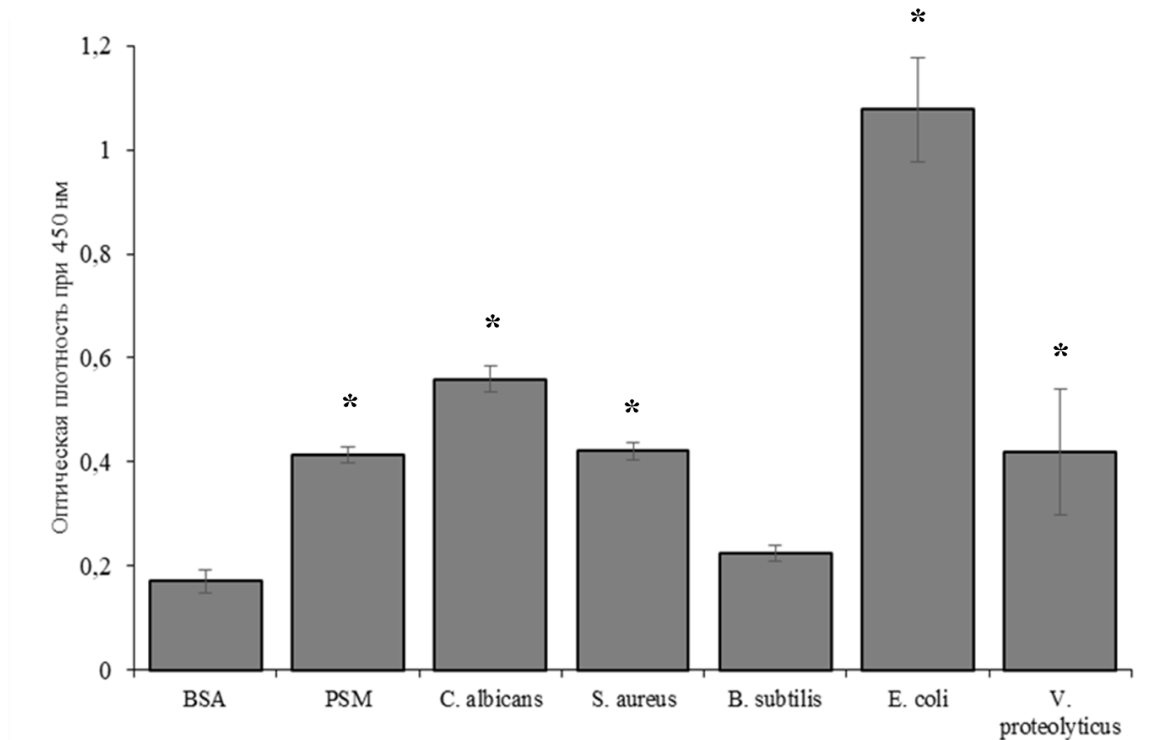


Рисунок 31 – Связывание GYLman с микроорганизмами, определенное методом ТЛФА (БСА – отрицательный контроль связывания, PSM – положительный контроль связывания). Данные представлены как среднее значение  $\pm$  SD (n=3). \*  $p < 0,05$

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



микробной клетки может быть представлен углеводами с разнообразной структурой.

Специфичность связывания лектинов с микроорганизмами определяли методом ТЛФА в присутствии специфичных и неспецифичных ингибиторов. В результате было установлено, что взаимодействие лектинов с бактериями и дрожжами идёт по лектинному пути (таблица 11).

Таблица 11 – Ингибирование связывания лектинов с микроорганизмами, определенное методом ТЛФА

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

Примечание – н.и.– не ингибировал

Как видно из таблицы 11, взаимодействие с ингибиторами, специфичными для каждого из лектинов, приводило к уменьшению связывания на 50% и более. При этом концентрация ингибитора, необходимая для отмены взаимодействия лектина с экспрессированными на клеточной поверхности углеводными гликанами, варьировала в зависимости от исследуемого микроорганизма.

Для дальнейшего изучения механизма взаимодействия с микроорганизмами и подтверждения полученных ранее результатов методом микроскопического анализа было исследовано взаимодействие лектинов с микроорганизмами после их инкубирования в растворе. В результате были выявлены крупные уплотненные конгломераты, которые и служили подтверждением агглютинирующих свойств лектинов. Установлено, что GYL-R агглютинирует только грамотрицательную бактерию *E. coli*, связывая

её в плотные агрегаты и частично препятствуя дальнейшему росту. *E. coli* часто содержат Rha в структуре своих ЛПС, и этим обусловлена высокая степень распознавания и связывания этой бактерии рамнозоспецифичными лектинами. В целом, все Rha-содержащие ПАМП на клеточной поверхности бактерий являются сайтами распознавания RBL [104].

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

Известно, что пептидогликан, присутствующий в грамотрицательных бактериях, включает только 10–20% компонентов их клеточной стенки по сравнению с 50–80% в грамположительных бактериях [189]. Кроме того, пептидогликан грамотрицательных бактерий находится в периплазматическом пространстве, а пептидогликан грамположительных бактерий находится на поверхности. Способность лектинов С-типа распознавать микроорганизмы во многом зависит от плотности ПАМП, присутствующих на микробной поверхности [57].

Наши данные свидетельствуют о том, что GYL и GYLman распознают микроорганизмы и взаимодействует непосредственно с компонентами клеточной стенки этих микроорганизмов, такими как пептидогликан из грамположительных бактерий и ЛПС из грамотрицательных бактерий, что указывает на то, что они являются ПРР.

### 3.7.3 Влияние GYL на образование микробных биопленок

В настоящее время общепризнано, что основной формой существования бактерий в естественных условиях являются связанные с поверхностью сообщества, получившие название биопленок, а не отдельные планктонные клетки. Лектины, связываясь с поверхностью микроорганизмов, могут препятствовать не только адгезии бактерий к поверхности, но и

затруднять их агрегацию друг с другом. Поэтому, следующим этапом нашего исследования было изучение способности GYL ингибировать образование биопленок бактериями (рисунок 32).

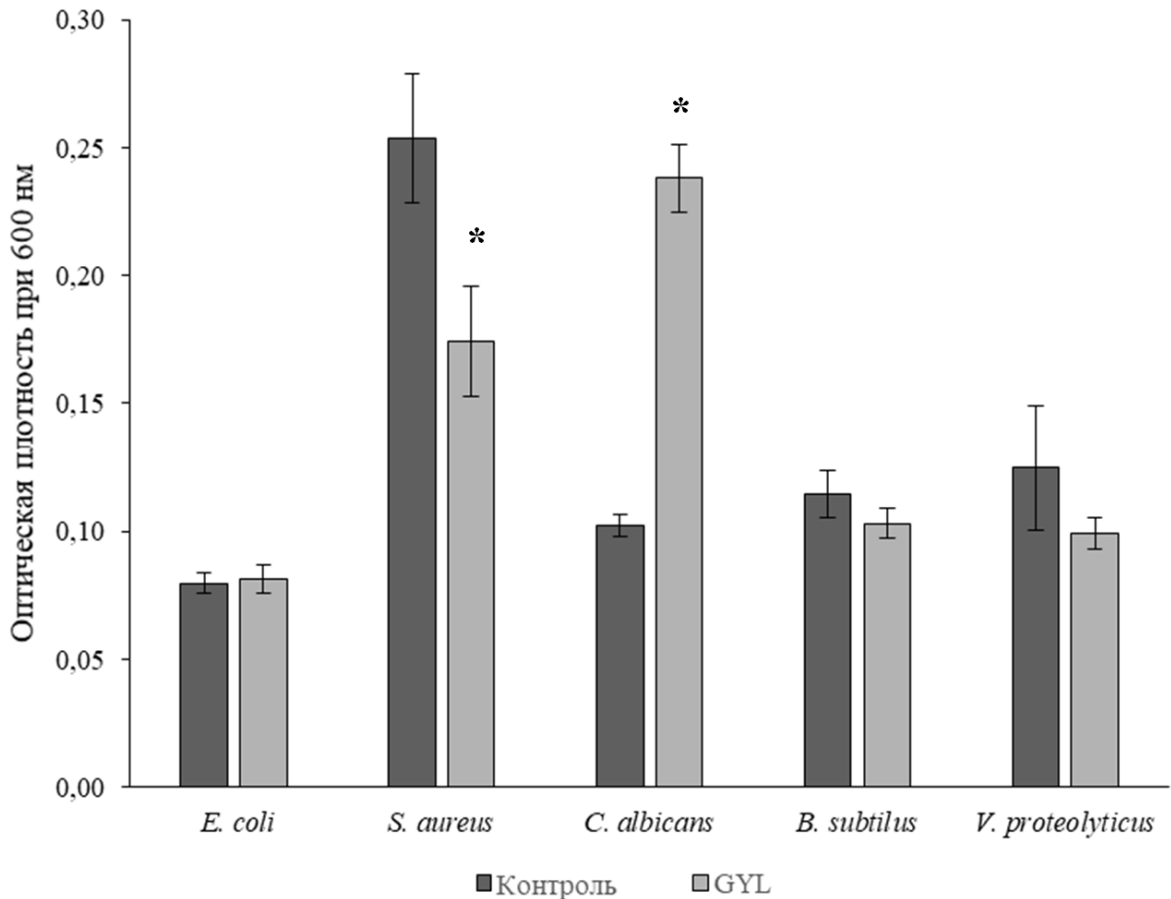


Рисунок 32 – Ингибирование образования биопленок GYL. Данные представлены как среднее значение  $\pm$  SD (n=3). \*  $p < 0,05$

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

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

Для изучения функциональной роли GYL в организме моллюска, было исследовано изменение уровня лектина в гемолимфе в ответ на антропогенное загрязнение окружающей среды дизельным топливом и заражение моллюска бактерией *V. proteolyticus*, изолированной из мест его обитания и патогенной для морских беспозвоночных. Уровень лектина определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА). Показано, что после иммунизации моллюсков бактериями происходит активация синтеза GYL, через 30 мин его содержание возрастает в 4 раза. После этого концентрация GYL резко падает, что связано с быстрым расходом молекул лектина в реакциях, направленных на удаление патогена. Через двое суток по мере выведения антигена из организма моллюска содержание лектина возвращается к исходному уровню. В контрольной группе, моллюски которой получали инъекцию буферным раствором 0,01 М PBS pH 7,5, также отмечались небольшие изменения уровня GYL, что было обусловлено, вероятно, ответом на травму при иммунизации (рисунок 33). Аналогичные результаты были получены для галектина из красного морского ушка *Haliotis rufescens*, где пик экспрессии наблюдался через 3 ч после заражения *V. alginolyticus* [190], у моллюска *Tegillarca granosa*, подвергнувшегося воздействию *V. parahaemolyticus* [191], и у двустворчатых моллюсков *Mytilus trossulus* после заражения *V. proteolyticus* [192]. Никаких значительных изменений в уровне экспрессии лектина не наблюдалось в группе, подвергнувшейся воздействию дизельного топлива. Довольно неожиданные результаты были получены для моллюсков после сочетанного действия микроорганизмов и дизельного топлива. Через 48 ч после инъекции уровень экспрессии лектина увеличился примерно в 25 раз, что свидетельствует о том, что в условиях неблагоприятного антропогенного воздействия моллюски становятся более чувствительны к бактериальному заражению (рисунок 33).

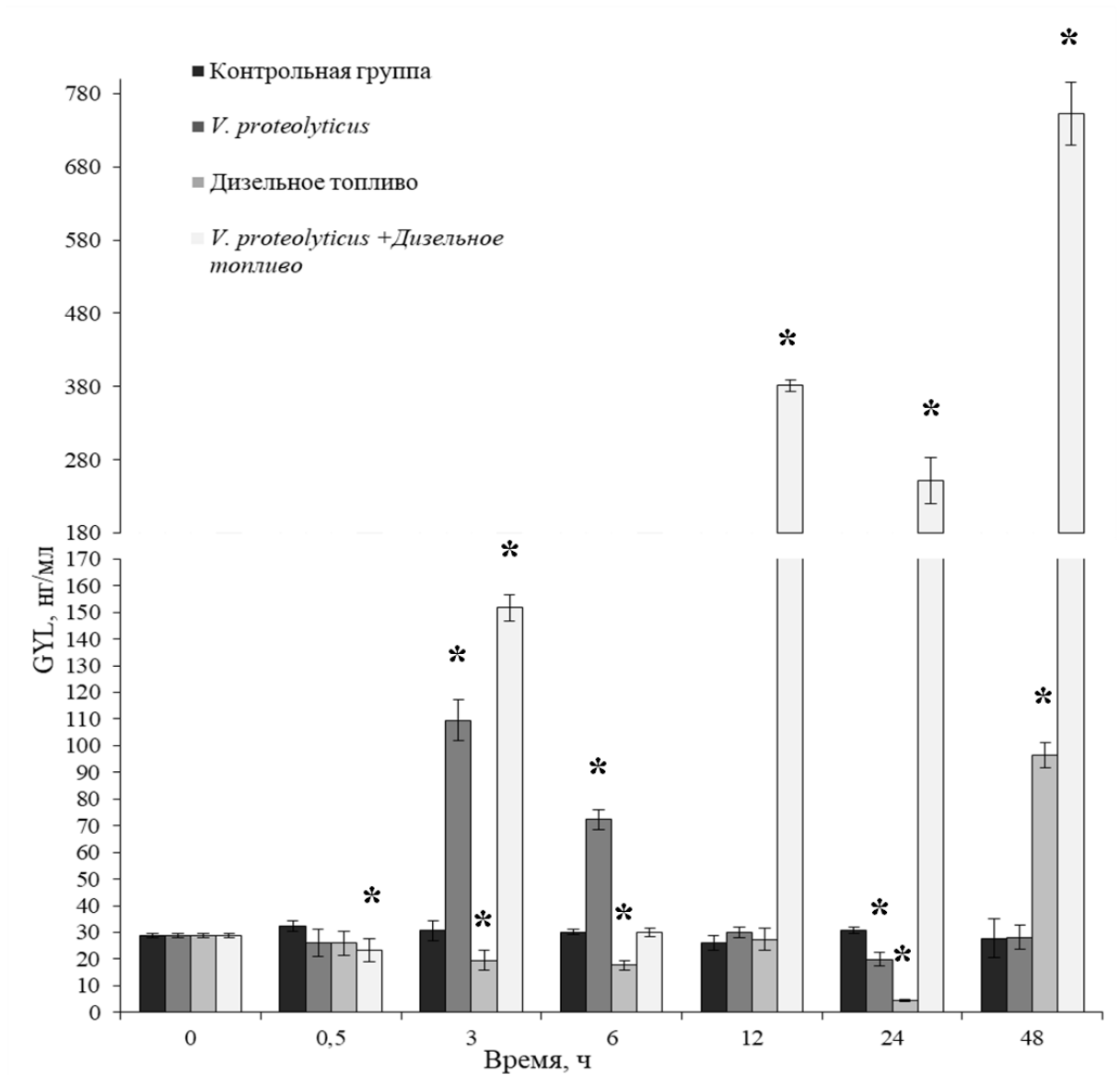


Рисунок 33 – Изменение концентрации GYL в ответ на антропогенное загрязнение и на заражение моллюска бактерией *V. proteolyticus*. Данные представлены как среднее значение  $\pm$  SD (n=3). \*  $p < 0,05$

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

## Выводы

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

**Список литературы**

1. Iwanaga S., Bok L.L. Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals // *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*. 2005. Vol. 38, № 2. P. 128–150.
2. Castillo M.G., Salazar K.A., Joffe N.R. The immune response of cephalopods from head to foot // *Fish Shellfish Immunol*. 2015. Vol. 46, № 1. P. 145–160.
3. Wang W. et al. Pathogen-derived carbohydrate recognition in molluscs immune defense // *International Journal of Molecular Sciences*. 2018. Vol. 19, № 3. P. 721.
4. Catanzaro E. et al. Antitumor potential of marine and freshwater lectins // *Marine Drugs*. 2020. Vol. 18, № 1. P. 11.
5. Nikolakopoulou C., Willment J.A., Brown G.D. C-Type Lectin Receptors in Antifungal Immunity // *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2020. Vol. 1204. P. 1–30.
6. Breitenbach Barroso Coelho L.C. et al. Lectins as antimicrobial agents // *Journal of Applied Microbiology*. 2018. Vol. 125, № 5. P. 1238–1252.
7. Nabi-Afjadi M. et al. Lectins and lectibodies: potential promising antiviral agents // *Cellular and Molecular Biology Letters*. 2022. Vol. 27, № 1. P. 37.
8. Mitchell C.A., Ramessar K., O’Keefe B.R. Antiviral lectins: Selective inhibitors of viral entry // *Antiviral Research*. 2017. Vol. 142. P. 37–54.
9. Da Silva L.C.N. et al. Exploring lectin-glycan interactions to combat COVID-19: Lessons acquired from other enveloped viruses // *Glycobiology*. 2021. Vol. 31, № 4. P. 358–371.
10. Valverde P. et al. Glycans in drug discovery // *MedChemComm*. 2019. Vol. 10, № 10. P. 1678–1691.
11. Bonnardel F. et al. LectomeXplore, an update of UniLectin for the discovery of carbohydrate-binding proteins based on a new lectin classification // *Nucleic Acids Res*. 2021. Vol. 49, № D1. P. D1548–D1554.

12. Cuénot L. Les organes phagocytaires des mollusques // Arch. Zool. Exp. Gén. 1914. Vol. 54, № 54. P. 267–305.
13. Kim J.-A., Kim S.-K. Bioactive Peptides from Marine Sources as Potential Anti-Inflammatory Therapeutics // Curr. Protein Pept. Sci. 2013. Vol. 14, № 3. P. 177–182.
14. Ammerman J. et al. Bacterioplankton growth in seawater: I. Growth kinetics and cellular characteristics in seawater cultures // Mar. Ecol. Prog. Ser. 1984. Vol. 18, № 1/2. P. 31–39.
15. Smith V.J., Desbois A.P., Dyrinda E.A. Conventional and unconventional antimicrobials from fish, marine invertebrates and micro-algae // Marine Drugs. 2010. Vol. 8, № 4. P. 1213–1262.
16. Zhang H. et al. Characteristics of Marine Biomaterials and Their Applications in Biomedicine // Marine Drugs. 2022. Vol. 20, № 6. P. 372.
17. Sharon N., Lis H. History of lectins: From hemagglutinins to biological recognition molecules // Glycobiology. 2004. Vol. 14, № 11. P. 53R-62R.
18. Vasta G.R., Ahmed H. Animal lectins as cell surface receptors: current status for invertebrate species. // Progress in molecular and subcellular biology. 1996. Vol. 17. P. 158–182.
19. Kilpatrick D.C. Animal lectins: A historical introduction and overview // Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects. 2002. Vol. 1572, № 2–3. P. 187–197.
20. Ponder W.F., Lindberg D.R. Phylogeny and evolution of the Mollusca // Choice Rev. Online. Univ of California Press, 2008. Vol. 46, № 01. P. 46-0291-46–0291.
21. Plazzi F., Passamonti M. Towards a molecular phylogeny of Mollusks: Bivalves' early evolution as revealed by mitochondrial genes // Mol. Phylogenet. Evol. 2010. Vol. 57, № 2. P. 641–657.
22. Balbi T. et al. Immunological Responses of Marine Bivalves to Contaminant Exposure: Contribution of the -Omics Approach. // Front. Immunol. 2021. Vol. 12. P. 618726.



23. Ghosh J. et al. Invertebrate immune diversity // *Developmental and Comparative Immunology*. 2011. Vol. 35, № 9. P. 959–974.
24. López C. et al. Enzyme characterisation of the circulating haemocytes of the carpet shell clam, *Ruditapes decussatus* (Mollusca:bivalvia) // *Fish Shellfish Immunol.* 1997. Vol. 7, № 8. P. 595–608.
25. Song L. et al. Bivalve immunity // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2010. Vol. 708. P. 44–65.
26. Xue Q., Renault T. Monoclonal antibodies to European flat oyster *Ostrea edulis* hemocytes: Characterization and tissue distribution of granulocytes in adult and developing animals // *Dev. Comp. Immunol.* 2001. Vol. 25, № 3. P. 187–194.
27. Wootton E.C., Dyrinda E.A., Ratcliffe N.A. Bivalve immunity: Comparisons between the marine mussel (*Mytilus edulis*), the edible cockle (*Cerastoderma edule*) and the razor-shell (*Ensis siliqua*) // *Fish Shellfish Immunol.* 2003. Vol. 15, № 3. P. 195–210.
28. Aladaileh S. et al. Sydney rock oyster (*Saccostrea glomerata*) hemocytes: Morphology and function // *J. Invertebr. Pathol.* 2007. Vol. 96, № 1. P. 48–63.
29. García-García E. et al. Immune responses of mussel hemocyte subpopulations are differentially regulated by enzymes of the PI 3-K, PKC, and ERK kinase families // *Dev. Comp. Immunol.* 2008. Vol. 32, № 6. P. 637–653.
30. Canesi L. et al. Bacteria-hemocyte interactions and phagocytosis in marine bivalves // *Microsc. Res. Tech.* 2002. Vol. 57, № 6. P. 469–476.
31. Ellis R.P. et al. Immunological function in marine invertebrates: Responses to environmental perturbation // *Fish and Shellfish Immunology*. 2011. Vol. 30, № 6. P. 1209–1222.
32. Gestal C. et al. Study of diseases and the immune system of bivalves using molecular biology and genomics // *Rev. Fish. Sci.* 2008. Vol. 16, № SUPPL.1. P. 131–154.

33. Галактионов В.Г. Очерки эволюционной иммунологии. М.: Наука, 1995. 256 p.
34. Schultz J.H., Adema C.M. Comparative immunogenomics of molluscs // *Dev. Comp. Immunol.* 2017. Vol. 75. P. 3–15.
35. Paillard C., Le Roux F., Borrego J.J. Bacterial disease in marine bivalves, a review of recent studies: Trends and evolution // *Aquatic Living Resources.* 2004. Vol. 17, № 4. P. 477–498.
36. Le Roux F., Wegner K.M., Polz M.F. Oysters and Vibrios as a Model for Disease Dynamics in Wild Animals // *Trends in Microbiology.* 2016. Vol. 24, № 7. P. 568–580.
37. Wendling C.C., Batista F.M., Wegner K.M. Persistence, seasonal dynamics and pathogenic potential of vibrio communities from pacific oyster hemolymph // *PLoS One* / ed. Zhou D. 2014. Vol. 9, № 4. P. e94256.
38. Wang J. et al. The oyster genome reveals stress adaptation and complexity of shell formation // *Nature.* 2012. Vol. 490, № 7418. P. 49–54.
39. Buggé D.M. et al. Oxidative burst in hard clam (*Mercenaria mercenaria*) haemocytes // *Fish Shellfish Immunol.* 2007. Vol. 23, № 1. P. 188–196.
40. Lockyer A.E. et al. Trematodes and snails: An intimate association // *Canadian Journal of Zoology.* 2004. Vol. 82, № 2. P. 251–269.
41. Gerdol M. et al. Immunity in molluscs: Recognition and effector mechanisms, with a focus on bivalvia // *Advances in Comparative Immunology.* Cham: Springer International Publishing, 2018. P. 225–341.
42. Falco A. et al. The Immune System of Marine Organisms as Source for Drugs against Infectious Diseases // *Mar. Drugs.* 2022. Vol. 20, № 6. P. 363.
43. Manning J.C. et al. Lectins: a primer for histochemists and cell biologists // *Histochemistry and Cell Biology.* 2017. Vol. 147, № 2. P. 199–222.
44. Gosling E. Diseases and parasites // *Marine Bivalve Molluscs.* Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2015. P. 429–477.
45. Kaltner H. et al. The sugar code: Letters and vocabulary, writers, editors and readers and biosignificance of functional glycan–lectin pairing //

- Biochemical Journal. 2019. Vol. 476, № 18. P. 2623–2655.
46. Gerdol M., Venier P. An updated molecular basis for mussel immunity // *Fish Shellfish Immunol.* 2015. Vol. 46, № 1. P. 17–38.
  47. Vasta G.R., Ahmed H. *Animal lectins: a functional view.* Florida, USA: Taylor & Francis/CRC Press. Boca Raton, 2008.
  48. Vasta G.R. et al. Biological roles of lectins in innate immunity: Molecular and structural basis for diversity in self/non-self recognition // *Advances in Experimental Medicine and Biology.* New York, NY: Springer New York, 2007. Vol. 598. P. 389–406.
  49. Fujita T., Matsushita M., Endo Y. The lectin-complement pathway - Its role in innate immunity and evolution // *Immunological Reviews.* 2004. Vol. 198, № 1. P. 185–202.
  50. Ogawa T. et al. Diversified Carbohydrate-Binding Lectins from Marine Resources // *J. Amino Acids.* 2011. Vol. 2011. P. 1–20.
  51. Gerdol M. First Insights into the Repertoire of Secretory Lectins in Rotifers // *Mar. Drugs.* 2022. Vol. 20, № 2. P. 130.
  52. Drickamer K., Dodd R.B. C-type lectin-like domains in *Caenorhabditis elegans*: Predictions from the complete genome sequence // *Glycobiology.* 1999. Vol. 9, № 12. P. 1357–1369.
  53. Drickamer K., Taylor M.E. Biology of animal lectins // *Annual Review of Cell Biology.* 1993. Vol. 9, № 1. P. 237–264.
  54. Dohnálek J., Skálová T. C-type lectin-(like) fold – Protein-protein interaction patterns and utilization // *Biotechnol. Adv.* 2022. Vol. 58. P. 107944.
  55. Chatterjee B.P., Adhya M. Lectins with Varying Specificity and Biological Activity from Marine Bivalves // *Marine Proteins and Peptides: Biological Activities and Applications.* Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2013. P. 41–68.
  56. Zelensky A.N., Gready J.E. The C-type lectin-like domain superfamily // *FEBS Journal.* 2005. Vol. 272, № 24. P. 6179–6217.
  57. Cambi A., Koopman M., Figdor C.G. How C-type lectins detect pathogens //

- Cellular Microbiology. 2005. Vol. 7, № 4. P. 481–488.
58. Wang L. et al. The immune role of C-type lectins in molluscs // *ISJ-Invertebrate Surviv. J.* 2011. Vol. 8, № 2. P. 241–246.
  59. Drickamer K. Engineering galactose-binding activity into a C-type mannose-binding protein // *Nature.* 1992. Vol. 360, № 6400. P. 183–186.
  60. Talaei-Khozani T., Monsefi M., Ghasemi M. Lectins influence chondrogenesis and osteogenesis in limb bud mesenchymal cells // *Glycoconj. J.* 2011. Vol. 28, № 2. P. 89–98.
  61. Weis W.I., Taylor M.E., Drickamer K. The C-type lectin superfamily in the immune system // *Immunological Reviews.* 1998. Vol. 163, № 1. P. 19–34.
  62. Lan T. et al. A four-CRD C-type lectin from razor clam *Sinonovacula constricta* mediates agglutination and phagocytosis // *Gene.* 2020. Vol. 728. P. 144287.
  63. Yang J. et al. C-type Lectin in *Chlamys farreri* (CfLec-1) mediating immune recognition and opsonization // *PLoS One* / ed. Rojas M. 2011. Vol. 6, № 2. P. e17089.
  64. Wang X.W. et al. A novel C-type lectin (FcLec4) facilitates the clearance of *Vibrio anguillarum* in vivo in Chinese white shrimp // *Dev. Comp. Immunol.* 2009. Vol. 33, № 9. P. 1039–1047.
  65. Wang X.W., Zhao X.F., Wang J.X. C-type lectin binds to  $\beta$ -integrin to promote hemocytic phagocytosis in an invertebrate // *J. Biol. Chem.* 2014. Vol. 289, № 4. P. 2405–2414.
  66. Huang M. et al. A C-type lectin (AiCTL-3) from bay scallop *Argopecten irradians* with mannose/galactose binding ability to bind various bacteria // *Gene.* 2013. Vol. 531, № 1. P. 31–38.
  67. Xue D. et al. Black rockfish C-type lectin, SsCTL4: A pattern recognition receptor that promotes bactericidal activity and virus escape from host immune defense // *Fish Shellfish Immunol.* 2018. Vol. 79. P. 340–350.
  68. Ourth D.D., Rose W.M., Siefkes M.J. Isolation of mannose-binding C-type lectin from sea lamprey (*Petromyzon marinus*) plasma and binding to

- Aeromonas salmonicida* // *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2008. Vol. 126, № 3–4. P. 407–412.
69. Thiel S., Gadjeva M. Humoral pattern recognition molecules: Mannan-binding lectin and ficolins // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2009. Vol. 653. P. 58–73.
70. Skjoedt M.O. et al. Two mannose-binding lectin homologues and an MBL-associated serine protease are expressed in the gut epithelia of the urochordate species *Ciona intestinalis* // *Dev. Comp. Immunol.* 2010. Vol. 34, № 1. P. 59–68.
71. Iiyama C. et al. Mannose-binding C-type lectins as defense molecules on the body surface of the sea urchin *Pseudocentrotus depressus* // *Dev. Comp. Immunol.* 2021. Vol. 116. P. 103915.
72. Gorbushin A.M. Derivatives of the lectin complement pathway in Lophotrochozoa // *Dev. Comp. Immunol.* 2019. Vol. 94. P. 35–58.
73. Sivakamavalli J. et al. Purification and partial characterization of carbohydrate-recognition protein C-type lectin from *Hemifusus pugilinus* // *Carbohydr. Res.* 2021. Vol. 499. P. 108224.
74. Sun J. et al. A novel C-type lectin activates the complement cascade in the primitive oyster *Crassostrea gigas* // *J. Biol. Chem.* 2021. Vol. 297, № 6. P. 101352.
75. Ritchie G. et al. Identification of N-linked carbohydrates from severe acute respiratory syndrome (SARS) spike glycoprotein // *Virology.* 2010. Vol. 399, № 2. P. 257–269.
76. Sato Y. et al. High mannose-specific lectin (KAA-2) from the red alga *Kappaphycus alvarezii* potently inhibits influenza virus infection in a strain-independent manner // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2011. Vol. 405, № 2. P. 291–296.
77. Odom E.W., Vasta G.R. Characterization of a binary tandem domain F-type lectin from striped bass (*Morone saxatilis*) // *J. Biol. Chem.* 2006. Vol. 281, № 3. P. 1698–1713.
78. Bianchet M.A. et al. A novel fucose recognition fold involved in innate

- immunity // *Nat. Struct. Biol.* 2002. Vol. 9, № 8. P. 628–634.
79. Vasta G.R. et al. F-Type Lectins: A highly diversified family of fucose-binding proteins with a unique sequence motif and structural fold, involved in self/non-self-recognition // *Frontiers in Immunology*. 2017. Vol. 8, № NOV. P. 1648.
80. Bianchet M.A. et al. Structure and specificity of a binary tandem domain F-Lectin from striped bass (*Morone saxatilis*) // *J. Mol. Biol.* 2010. Vol. 401, № 2. P. 239–252.
81. Honda S. et al. Multiplicity, structures, and endocrine and exocrine natures of Eel fucose-binding lectins // *J. Biol. Chem.* 2000. Vol. 275, № 42. P. 33151–33157.
82. Saito T. et al. A newly identified horseshoe crab lectin with binding specificity to O- antigen of bacterial lipopolysaccharides // *J. Biol. Chem.* 1997. Vol. 272, № 49. P. 30703–30708.
83. Moy G.W. et al. Extraordinary intraspecific diversity in oyster sperm binding // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2008. Vol. 105, № 6. P. 1993–1998.
84. Moy G.W., Vacquier V.D. Binding genes of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* // *Gene*. 2008. Vol. 423, № 2. P. 215–220.
85. Springer S.A. et al. Oyster sperm binding is a combinatorial fucose lectin with remarkable intra-species diversity // *Int. J. Dev. Biol.* 2008. Vol. 52, № 5–6. P. 759–768.
86. Dam T.K., Brewer C.F. Effects of clustered epitopes in multivalent ligand-receptor interactions // *Biochemistry*. 2008. Vol. 47, № 33. P. 8470–8476.
87. Salerno G. et al. F-type lectin from the sea bass (*Dicentrarchus labrax*): Purification, cDNA cloning, tissue expression and localization, and opsonic activity // *Fish Shellfish Immunol.* 2009. Vol. 27, № 2. P. 143–153.
88. Cammarata M. et al. Primary structure and opsonic activity of an F-lectin from serum of the gilt head bream *Sparus aurata* (Pisces, Sparidae) // *Ital. J. Zool.* 2012. Vol. 79, № 1. P. 34–43.
89. Gorbushin A.M., Borisova E.A. Lectin-like molecules in transcriptome of

- Littorina littorea* hemocytes // *Dev. Comp. Immunol.* 2015. Vol. 48, № 1. P. 210–220.
90. Arivalagan J. et al. Shell matrix proteins of the clam, *Mya truncata*: Roles beyond shell formation through proteomic study // *Mar. Genomics.* 2016. Vol. 27. P. 69–74.
91. Chen J., Xiao S., Yu Z. F-type lectin involved in defense against bacterial infection in the pearl oyster (*Pinctada martensii*) // *Fish Shellfish Immunol.* 2011. Vol. 30, № 2. P. 750–754.
92. Bishnoi R. et al. Prevalence of the F-type lectin domain // *Glycobiology.* 2015. Vol. 25, № 8. P. 888–901.
93. Ozeki Y. et al. Amino Acid Sequence and Molecular Characterization of a D-Galactoside-Specific Lectin Purified from Sea Urchin (*Anthocidaris crassispina*) Eggs // *Biochemistry.* 1991. Vol. 30, № 9. P. 2391–2394.
94. Ahmmed M.K. et al. An Update of Lectins from Marine Organisms: Characterization, Extraction Methodology, and Potential Biofunctional Applications // *Marine Drugs.* 2022. Vol. 20, № 7. P. 430.
95. Jimbo M. et al. Purification, cloning and characterization of egg lectins from the teleost *Tribolodon brandti* // *Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol.* 2007. Vol. 147, № 2. P. 164–171.
96. Terada T. et al. Structural characterization of a rhamnose-binding glycoprotein (lectin) from Spanish mackerel (*Scomberomorus niphonius*) eggs // *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 2007. Vol. 1770, № 4. P. 617–629.
97. Tateno H. SUEL-related lectins, a lectin family widely distributed throughout organisms // *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry.* 2010. Vol. 74, № 6. P. 1141–1144.
98. Vakonakis I. et al. Solution Structure and Sugar-Binding Mechanism of Mouse Latrophilin-1 RBL: a 7TM Receptor-Attached Lectin-Like Domain // *Structure.* 2008. Vol. 16, № 6. P. 944–953.
99. Kim S.K. Marine OMICS: Principles and Applications // *Marine OMICS:*

- Principles and Applications / ed. Kim S.-K. CRC Press, 2016. 1–724 p.
100. Kim S.K. Marine Proteins and Peptides: Biological Activities and Applications // Marine Proteins and Peptides: Biological Activities and Applications / ed. Kim S.-K. John Wiley & Sons, Ltd, 2013.
  101. Okamoto M. et al. Tandem repeat l-rhamnose-binding lectin from the skin mucus of ponyfish, *Leiognathus nuchalis* // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2005. Vol. 333, № 2. P. 463–469.
  102. Naganuma T. et al. Isolation, characterization and molecular evolution of a novel pearl shell lectin from a marine bivalve, *Pteria penguin* // Mol. Divers. 2006. Vol. 10, № 4. P. 607–618.
  103. Gasparini F. et al. Novel rhamnose-binding lectins from the colonial ascidian *Botryllus schlosseri* // Dev. Comp. Immunol. 2008. Vol. 32, № 10. P. 1177–1191.
  104. Ng S.K. et al. A recombinant horseshoe crab plasma lectin recognizes specific pathogen-associated molecular patterns of bacteria through rhamnose e115296 // PLoS One / ed. Palaniyar N. 2014. Vol. 9, № 12. P. e115296.
  105. Bonnardel F. et al. Unilectin3d, a database of carbohydrate binding proteins with curated information on 3D structures and interacting ligands // Nucleic Acids Res. 2019. Vol. 47, № D1. P. D1236–D1244.
  106. Tateno H. et al. Rhamnose-binding lectins from steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) eggs recognize bacterial lipopolysaccharides and lipoteichoic acid // Biosci. Biotechnol. Biochem. 2002. Vol. 66, № 3. P. 604–612.
  107. Booy A., Haddow J.D., Olafson R.W. Isolation of the salmonid rhamnose-binding lectin STL2 from spores of the microsporidian fish parasite *Loma salmonae* // J. Fish Dis. 2005. Vol. 28, № 8. P. 455–462.
  108. Fu T.K. et al. Rhamnose Binding Protein as an Anti-Bacterial Agent—Targeting Biofilm of *Pseudomonas aeruginosa* // Mar. Drugs. 2019. Vol. 17, № 6. P. 355.



109. Watanabe Y. et al. The function of rhamnose-binding lectin in innate immunity by restricted binding to Gb3 // *Dev. Comp. Immunol.* 2009. Vol. 33, № 2. P. 187–197.
110. Franchi N. et al. Immune roles of a rhamnose-binding lectin in the colonial ascidian *Botryllus schlosseri* // *Immunobiology.* 2011. Vol. 216, № 6. P. 725–736.
111. Modenutti C.P. et al. The Structural Biology of Galectin-Ligand Recognition: Current Advances in Modeling Tools, Protein Engineering, and Inhibitor Design // *Frontiers in Chemistry.* 2019. Vol. 7.
112. Barondes S.H. et al. Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins // *Journal of Biological Chemistry.* 1994. Vol. 269, № 33. P. 20807–20810.
113. Nagae M. et al. Structural analysis of the recognition mechanism of poly-N-acetyllactosamine by the human galectin-9 N-terminal carbohydrate recognition domain // *Glycobiology.* 2009. Vol. 19, № 2. P. 112–117.
114. Cummings R.D. et al. *Galectins // Essentials of Glycobiology. Essentials / ed. Varki A, Cummings RD, Esko JD et al. New York: Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2022.*
115. Hirabayashi J., Kasai K.I. The family of metazoan metal-independent  $\beta$ -galactoside-binding lectins: Structure, function and molecular evolution // *Glycobiology.* 1993. Vol. 3, № 4. P. 297–304.
116. Filer A. et al. Galectin 3 induces a distinctive pattern of cytokine and chemokine production in rheumatoid synovial fibroblasts via selective signaling pathways // *Arthritis Rheum.* 2009. Vol. 60, № 6. P. 1604–1614.
117. Alge-Priglinger C.S. et al. Inhibition of human retinal pigment epithelial cell attachment, spreading, and migration by the human lectin galectin-1. // *Mol. Vis.* 2009. Vol. 15. P. 2162–2173.
118. Koh H.S. et al. Twist2 regulates CD7 expression and galectin-1-induced apoptosis in mature T-cells // *Mol. Cells.* 2009. Vol. 28, № 6. P. 553–558.
119. Mengshol J.A. et al. A crucial role for Kupffer cell-derived galectin-9 in

- regulation of T cell immunity in hepatitis C infection // *PLoS One* / ed. Unutmaz D. 2010. Vol. 5, № 3. P. e9504.
120. Mengshol J.A. et al. Correction: A Crucial Role for Kupffer Cell-Derived Galectin-9 in Regulation of T Cell Immunity in Hepatitis C Infection // *PLoS One*. 2010. Vol. 5, № 3.
  121. Rabinovich G.A., Gruppi A. Galectins as immunoregulators during infectious processes: From microbial invasion to the resolution of the disease // *Parasite Immunology*. 2005. Vol. 27, № 4. P. 103–114.
  122. Ouellet M. et al. Galectin-1 Acts as a Soluble Host Factor That Promotes HIV-1 Infectivity through Stabilization of Virus Attachment to Host Cells // *J. Immunol*. 2005. Vol. 174, № 7. P. 4120–4126.
  123. Pelletier I. et al. Specific recognition of *Leishmania major* poly- $\beta$ -galactosyl epitopes by galectin-9: Possible implication of galectin-9 in interaction between *L. major* and host cells // *J. Biol. Chem*. 2003. Vol. 278, № 25. P. 22223–22230.
  124. Tasumi S., Vasta G.R. A Galectin of Unique Domain Organization from Hemocytes of the Eastern Oyster (*Crassostrea virginica*) Is a Receptor for the Protistan Parasite *Perkinsus marinus* // *J. Immunol*. 2007. Vol. 179, № 5. P. 3086–3098.
  125. Yamaura K., Takahashi K.G., Suzuki T. Identification and tissue expression analysis of C-type lectin and galectin in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* // *Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol*. 2008. Vol. 149, № 1. P. 168–175.
  126. Yoshino T.P. et al. Molecular and functional characterization of a tandem-repeat galectin from the freshwater snail *Biomphalaria glabrata*, intermediate host of the human blood fluke *Schistosoma mansoni* // *Gene*. 2008. Vol. 411, № 1–2. P. 46–58.
  127. Vasta G.R. et al. Biochemical Characterization of Oyster and Clam Galectins: Selective Recognition of Carbohydrate Ligands on Host Hemocytes and *Perkinsus* Parasites // *Frontiers in Chemistry*. 2020. Vol. 8. P.

- 98.
128. Dheilly N.M. et al. A family of variable immunoglobulin and lectin domain containing molecules in the snail *Biomphalaria glabrata* // *Dev. Comp. Immunol.* 2015. Vol. 48, № 1. P. 234–243.
129. Vasta G.R. et al. Structural, functional, and evolutionary aspects of galectins in aquatic mollusks: From a sweet tooth to the Trojan horse // *Fish Shellfish Immunol.* 2015. Vol. 46, № 1. P. 94–106.
130. Watson A. et al. The Role of Anti-Viral Effector Molecules in Mollusc Hemolymph // *Biomolecules.* 2022. Vol. 12, № 3. P. 345.
131. Vasta G.R. Roles of galectins in infection // *Nature Reviews Microbiology.* 2009. Vol. 7, № 6. P. 424–438.
132. Zhang D. et al. A multidomain galectin involved in innate immune response of pearl oyster *Pinctada fucata* // *Dev. Comp. Immunol.* 2011. Vol. 35, № 1. P. 1–6.
133. Yu Y. et al. Molecular and biochemical characterization of galectin from amphioxus: Primitive galectin of chordates participated in the infection processes // *Glycobiology.* 2007. Vol. 17, № 7. P. 774–783.
134. Kim J.Y. et al. Noble tandem-repeat galectin of Manila clam *Ruditapes philippinarum* is induced upon infection with the protozoan parasite *Perkinsus olseni* // *Dev. Comp. Immunol.* 2008. Vol. 32, № 10. P. 1131–1141.
135. 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, № 1–2. P. 248–254.
136. DuBois M. et al. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances // *Anal. Chem.* 1956. Vol. 28, № 3. P. 350–356.
137. Laemmli U.K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4 // *Nature.* 1970. Vol. 227, № 5259. P. 680–685.
138. Bulgakov A.A. et al. Molecular and Biological Characterization of a Mannan-Binding Lectin from the Holothurian *Apostichopus Japonicus* //

- Glycobiology. 2007. Vol. 17, № 12. P. 1284–1298.
139. Vinogradov Evgeny, Petersen Bent K.B. Structural analysis of the intact polysaccharide mannan from *Saccharomyces cerevisiae* yeast using <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectroscopy at 750 MHz // *Carbohydr. Res.* 1998. Vol. 307, № 1–2. P. 177–183.
  140. Егоров А.М., Осипов А.П., Дзантиев Б.Б. Г.Е.М. Теория и практика иммуноферментного анализа. Москва: Высшая школа, 1991. 288 p.
  141. Galanina O.E. et al. GlycoChip: multiarray for the study of carbohydrate-binding proteins // *Lab Chip.* 2003. Vol. 3, № 4. P. 260.
  142. Kovalchuk S.I., Jensen O.N., Rogowska-Wrzesinska A. FlashPack: Fast and Simple Preparation of Ultrahigh-performance Capillary Columns for LC-MS\* // *Mol. Cell. Proteomics.* 2019. Vol. 18, № 2. P. 383–390.
  143. Ma B. et al. PEAKS: powerful software for peptide de novo sequencing by tandem mass spectrometry // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2003. Vol. 17, № 20. P. 2337–2342.
  144. Kumar S. et al. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms // *Mol. Biol. Evol.* / ed. Battistuzzi F.U. 2018. Vol. 35, № 6. P. 1547–1549.
  145. Sreerama N., Woody R.W. Estimation of Protein Secondary Structure from Circular Dichroism Spectra: Comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR Methods with an Expanded Reference Set // *Anal. Biochem.* 2000. Vol. 287, № 2. P. 252–260.
  146. Silva-Martín N. et al. Structural Basis for Selective Recognition of Endogenous and Microbial Polysaccharides by Macrophage Receptor SIGN-R1 // *Structure.* 2014. Vol. 22, № 11. P. 1595–1606.
  147. Аксельнес Н. Руководство по количественному иммуноэлектрофорезу. Методы и применение. МИР, 1977. 200 p.
  148. Фримель Г. Иммунологические методы. Медицина, 1987. 472 p.
  149. Li M. et al. Identification of a C-type lectin with antiviral and antibacterial activity from pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* // *Dev. Comp.*

- Immunol. 2014. Vol. 46, № 2. P. 231–240.
150. Sano K., Ogawa H. Hemagglutination (Inhibition) Assay. 2014. P. 47–52.
151. Nascimento K.S. et al. An overview of lectins purification strategies // J. Mol. Recognit. 2012. Vol. 25, № 11. P. 527–541.
152. Adhya M., Singha B., Chatterjee B.P. Purification and characterization of an N-acetylglucosamine specific lectin from marine bivalve *Macoma birmanica* // Fish Shellfish Immunol. 2009. Vol. 27, № 1. P. 1–8.
153. Watanabe Y. et al. Isolation and characterization of l-rhamnose-binding lectin, which binds to microsporidian *Glugea plecoglossi*, from ayu (*Plecoglossus altivelis*) eggs // Dev. Comp. Immunol. 2008. Vol. 32, № 5. P. 487–499.
154. Cammarata M. et al. A rhamnose-binding lectin from sea bass (*Dicentrarchus labrax*) plasma agglutinates and opsonizes pathogenic bacteria // Dev. Comp. Immunol. 2014. Vol. 44, № 2. P. 332–340.
155. Carneiro R.F. et al. l-rhamnose-binding lectin from eggs of the *Echinometra lucunter*: Amino acid sequence and molecular modeling // Int. J. Biol. Macromol. 2015. Vol. 78. P. 180–188.
156. Mizgina T.O. et al. Lectin of the Bivalve *Glycymeris yessoensis* as a Pattern Recognition Receptor // Russ. J. Bioorganic Chem. 2020. Vol. 46, № 6. P. 1187–1197.
157. Drickamer K. Ca<sup>2+</sup>-dependent carbohydrate-recognition domains in animal proteins // Curr. Opin. Struct. Biol. 1993. Vol. 3, № 3. P. 393–400.
158. Lopes-Lima M. et al. Seasonal variations of pH, pCO<sub>2</sub>, pO<sub>2</sub>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> and Ca<sup>2+</sup> in the haemolymph: implications on the calcification physiology in *Anodonta cygnea* // J. Comp. Physiol. B. 2009. Vol. 179, № 3. P. 279–286.
159. Bulgakov A.A. et al. Isolation and properties of a mannan-binding lectin from the coelomic fluid of the holothurian *Cucumaria japonica*. // Biochemistry. (Mosc). 2000. Vol. 65, № 8. P. 933–939.
160. Weis W.I., Drickamer K., Hendrickson W.A. Structure of a C-type mannose-binding protein complexed with an oligosaccharide // Nature. 1992. Vol. 360,

- № 6400. P. 127–134.
161. García-Maldonado E., Cano-Sánchez P., Hernández-Santoyo A. Molecular and functional characterization of a glycosylated Galactose-Binding lectin from *Mytilus californianus* // *Fish Shellfish Immunol.* 2017. Vol. 66. P. 564–574.
  162. Belogortseva N.I. et al. Isolation and Characterization of New GalNAc/Gal-Specific Lectin from the Sea Mussel *Crenomytilus Grayanus* // *Comp. Biochem. Physiol. Part C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 1998. Vol. 119, № 1. P. 45–50.
  163. Bulgakov A.A. et al. Mannan-Binding Lectin of the Sea Urchin *Strongylocentrotus nudus* // *Mar. Biotechnol.* 2013. Vol. 15, № 1. P. 73–86.
  164. Chikalovets I. V. et al. Isolation and Characterization of Lectin from the Scallop *Patinopecten yessoensis* // *Chem. Nat. Compd.* 2017. Vol. 53, № 4. P. 717–721.
  165. Medeiros D.S. et al. A lactose specific lectin from the sponge *Cinachyrella apion*: Purification, characterization, N-terminal sequences alignment and agglutinating activity on *Leishmania promastigotes* // *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol.* 2010. Vol. 155, № 3. P. 211–216.
  166. Leal R.B. et al. Crystal structure of DlyL, a mannose-specific lectin from *Dioclea lasiophylla* Mart. Ex Benth seeds that display cytotoxic effects against C6 glioma cells // *Int. J. Biol. Macromol.* 2018. Vol. 114. P. 64–76.
  167. do Nascimento-Neto L.G. et al. Halilectin-3, a Lectin from the Marine Sponge *Haliclona caerulea*, Induces Apoptosis and Autophagy in Human Breast Cancer MCF7 Cells Through Caspase-9 Pathway and LC3-II Protein Expression // *Anticancer. Agents Med. Chem.* 2018. Vol. 18, № 4. P. 521–528.
  168. Fujii 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, № 53. P. 44772–44783.

169. Chernikov O. et al. 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.
170. Sugawara S. et al. Catfish (*Silurus asotus*) Lectin Enhances the Cytotoxic Effects of Doxorubicin // *YAKUGAKU ZASSHI.* 2005. Vol. 125, № 3. P. 327–334.
171. Oinam L., Tateno H. Evaluation of Glycan-Binding Specificity by Glycoconjugate Microarray with an Evanescent-Field Fluorescence Detection System. 2022. P. 25–32.
172. Mu L. et al. An l-rhamnose-binding lectin from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) possesses agglutination activity and regulates inflammation, phagocytosis and respiratory burst of monocytes/macrophages // *Dev. Comp. Immunol.* 2022. Vol. 126. P. 104256.
173. Hatakeyama T. et al. CDNA cloning and characterization of a rhamnose-binding lectin SUL-I from the toxopneustid sea urchin *Toxopneustes pileolus* venom // *Toxicon. Pergamon,* 2015. Vol. 94. P. 8–15.
174. Lu G. Vector NTI, a balanced all-in-one sequence analysis suite // *Brief. Bioinform.* 2004. Vol. 5, № 4. P. 378–388.
175. Morrison G.M. Signal Sequence Conservation and Mature Peptide Divergence Within Subgroups of the Murine beta-Defensin Gene Family // *Mol. Biol. Evol.* 2003. Vol. 20, № 3. P. 460–470.
176. Isaeva M.P. et al. A new multigene superfamily of Kunitz-type protease inhibitors from sea anemone *Heteractis crispa* // *Peptides.* 2012. Vol. 34, № 1. P. 88–97.
177. Teufel F. et al. SignalP 6.0 predicts all five types of signal peptides using protein language models // *Nat. Biotechnol.* 2022. Vol. 40, № 7. P. 1023–1025.
178. Musik J.E. et al. The role of signal sequence proximal residues in the mature region of bacterial secreted proteins in *E. coli* // *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 2022. Vol. 1864, № 10. P. 184000.

179. The Sugar Code: Fundamentals of Glycosciences / ed. Gabius H.-J. John Wiley & Sons, Ltd, 2011.
180. Aebi M. N-linked protein glycosylation in the ER // *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 2013. Vol. 1833, № 11. P. 2430–2437.
181. Stanley P., Taniguchi N., Aebi M. N-glycans // *Essentials of Glycobiology* [Internet]. 3rd edition. 2017.
182. Staudacher E. Mollusc N-glycosylation: Structures, Functions and Perspectives // *Biomolecules.* 2021. Vol. 11, № 12. P. 1820.
183. Ranjbar B., Gill P. Circular Dichroism Techniques: Biomolecular and Nanostructural Analyses- A Review // *Chem. Biol. Drug Des.* 2009. Vol. 74, № 2. P. 101–120.
184. Araújo C.A.C. et al. A rhamnose-binding lectin from *Rhodnius prolixus* and the impact of its silencing on gut bacterial microbiota and *Trypanosoma cruzi* // *Dev. Comp. Immunol.* 2021. Vol. 114. P. 103823.
185. Waterhouse A. et al. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes // *Nucleic Acids Res.* 2018. Vol. 46, № W1. P. W296–W303.
186. Bertoni M. et al. Modeling protein quaternary structure of homo- and hetero-oligomers beyond binary interactions by homology // *Sci. Rep.* 2017. Vol. 7, № 1. P. 10480.
187. Li S. et al. Immune recognition, antimicrobial and opsonic activities mediated by a sialic acid binding lectin from *Ruditapes philippinarum* // *Fish Shellfish Immunol.* 2019. Vol. 93. P. 66–72.
188. Li H. et al. A single-CRD C-type lectin from oyster *Crassostrea gigas* mediates immune recognition and pathogen elimination with a potential role in the activation of complement system // *Fish Shellfish Immunol.* 2015. Vol. 44, № 2. P. 566–575.
189. Kurata S., Ariki S., Kawabata S. Recognition of pathogens and activation of immune responses in *Drosophila* and horseshoe crab innate immunity // *Immunobiology.* 2006. Vol. 211, № 4. P. 237–249.



190. Maldonado-Aguayo W., Teneb J., Gallardo-Escárate C. A galectin with quadruple-domain from red abalone *Haliotis rufescens* involved in the immune innate response against to *Vibrio anguillarum* // *Fish Shellfish Immunol.* 2014. Vol. 40, № 1. P. 1–8.
191. Bao Y. et al. A tandem-repeat galectin from blood clam *Tegillarca granosa* and its induced mRNA expression response against bacterial challenge // *Genes Genomics.* 2013. Vol. 35, № 6. P. 733–740.
192. Chikalovets I. V. et al. 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.