

Фильштейн Алина Петровна



В 2014 г. окончила Дальневосточный федеральный университет по специальности «химия». После окончания магистратуры в 2016 г. была зачислена в аспирантуру Тихоокеанского института биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН. В период обучения получала стипендию Правительства РФ, а также стипендию ДВО РАН. Научно-исследовательскую деятельность в лаборатории химии неинфекционного иммунитета ТИБОХ ДВО РАН, под руководством к.х.н. Чикаловец Ирины Владимировны, А.П. Фильштейн начала, будучи студенткой третьего курса ДВФУ. Область научных интересов связана с изучением лектинов морских беспозвоночных: структуры, биологической активности и способов применения. Неоднократно принимала участие в морских и прибрежных экспедициях. Результаты своих научных исследований представляла на научных конференциях, в том числе международных. Имеет 14 научных публикаций, в том числе 3 статьи.

УДК 594.1:577.112

А.П. ФИЛЬШТЕЙН

Исследование функциональной роли лектина из мидии *Mytilus trossulus* как фактора иммунной системы моллюска

*Методом твердофазного лектин-ферментного анализа показано наличие коллагеноподобного домена в структуре лектина мидии *M. trossulus* (MTL). Показано изменение уровня MTL в ответ на заражение моллюсков дрожжами *Pichia pastoris*. Установлено, что связывание лектина с дрожжами происходит как по углеводсвязывающему сайту лектина, так и с участием его коллагеноподобного домена. MTL играет важную роль в защите организма мидии от воздействия внешних патогенов, либо агреготируя их, либо стимулируя выработку цитокиноподобных молекул, вовлеченных в реакции врожденного иммунитета.*

Ключевые слова: лектины, морские беспозвоночные, врожденный иммунитет, мидия *Mytilus trossulus*.

ФИЛЬШТЕЙН Алина Петровна – аспирант (Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток). E-mail: alishichka@mail.ru

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-34-00210

Study of the functional role of lectin from the mussel *Mytilus trossulus* as a factor in the immune system of the mollusk. A.P. FILSHTEIN (G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, FEB RAS, Vladivostok).

*The existence of the collagen-like domain in structure of lectin from the sea mussel *Mytilus trossulus* (MTL) was shown by enzyme-linked lectin assay. It was shown the change of MTL level in response to *Pichia pastoris* yeast contamination of the mollusks. It is established that binding of a lectin with yeast occurs through its carbohydrate recognition and collagen-like domains. MTL participates in protection of the invertebrate organism against influence of external pathogens, either agglutinating them, or stimulating production of cytokine-like molecules involved in innate immunity of a mussel.*

*Key words: lectins, marine invertebrates, innate immunity, sea mussel *Mytilus trossulus*.*

Лектины – углеводсвязывающие белки или гликопротеины неиммунной природы – способны к специфическому узнаванию и обратимому связыванию с моно-, полисахаридами и гликоконъюгатами, не вызывая их химического превращения [10]. Лектины являются, как правило, сложными мультидоменными белками, взаимодействуют с углеводными структурами лишь отдельные их участки – углеводсвязывающие сайты. Повсеместное существование лектинов в природе и их способность различать близкие по структуре углеводы в растворе и на клеточной поверхности обеспечивают неослабевающий интерес исследователей к изучению их биологических функций.

Существование огромного числа и разнообразия беспозвоночных свидетельствует о наличии у них эффективных систем защиты организма. Известно, что лектины морских беспозвоночных играют важную роль в таких неспецифических иммунных реакциях, как агглютинация, опсонизация, фагоцитоз и лизис [5–7].

Исследование свойств лектинов как факторов иммунной системы беспозвоночных является важным этапом в изучении эволюции иммунитета высших животных, включая человека. При всем многообразии работ, посвященных строению и филогении различных лектинов, данные о динамике их концентраций в ходе ответа на введение чужеродных молекул и клеток, а также на действие антропогенных загрязнителей очень ограничены.

Ранее из мидии *Mytilus trossulus* нами был выделен Gal/GalNAc – специфичный лектин (MTL), определены его основные физико-химические характеристики, углеводная специфичность и первичная аминокислотная последовательность, показано, что уровень лектина изменяется в ответ на заражение моллюска бактерией *Vibrio proteolyticus*, выделенной из мест обитания мидии и являющейся патогенной для нее [4]. Установлено, что MTL взаимодействует с бактерией через свой углеводсвязывающий сайт, агглютинирует ее и таким образом препятствует дальнейшему росту и патогенному влиянию.

Для дальнейшего исследования функций лектина в организме моллюска был проведен эксперимент по заражению мидии дрожжами *P. pastoris*. Титр лектина, определенный методом гемагглютинации (ГА), резко снижался через 30 мин после иммунизации моллюсков. По всей вероятности, это связано с быстрым расходом молекул лектина в ходе ответа на антиген и его удалением из организма. Через 3 ч после иммунизации концентрация лектина возрастала в 2,5 раза, предположительно, вследствие активации процесса его синтеза и механизма секреции. Через 6 ч, по мере удаления антигена из организма, концентрация лектина снижалась и постепенно возвращалась к исходному уровню. В контрольной группе животных также отмечались небольшие колебания в титре ГА, что может быть обусловлено ответом на травму при иммунизации.

Чтобы понять характер действия MTL на дрожжи, был проведен эксперимент по связыванию лектина с клетками *P. pastoris*, мечеными флуоресцентной меткой. Для этого к суспензии FITC-меченых дрожжей добавляли MTL, результат оценивали с помощью флуоресцентного микроскопа. Как видно из рис. 1, лектин вызывает агглютинацию микроорганизмов, т.е. взаимодействует с их клеточной поверхностью.

Для выяснения характера связывания был поставлен эксперимент по ингибированию взаимодействия лектина с дрожжами специфичным моносахаридом Gal, для контроля использовали неспецифичный моносахарид Glc. Glc не оказывал никакого влияния

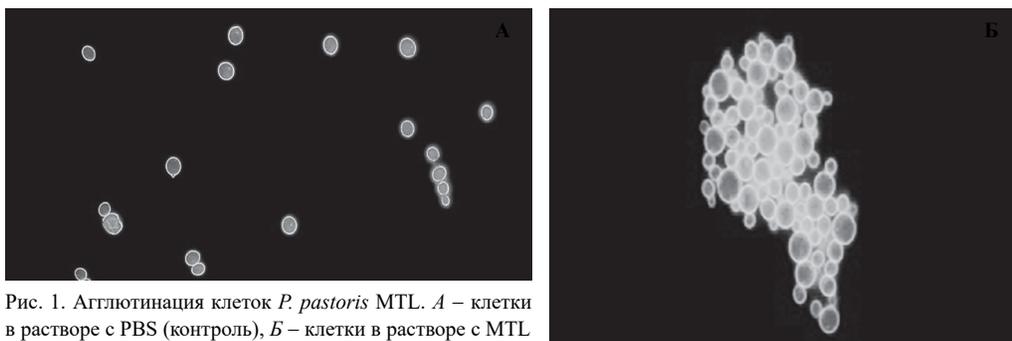


Рис. 1. Агглютинация клеток *P. pastoris* MTL. *A* – клетки в растворе с PBS (контроль), *Б* – клетки в растворе с MTL

(рис. 2*A*), в то же время в присутствии Gal наблюдается частичное разрушение агрегатов (рис. 2*B*). Возможно, взаимодействие MTL с клеточной поверхностью дрожжей обусловлено не только связыванием углеводсвязывающего сайта лектина с моносахаридами, присутствующими в гликоконъюгатах клеточной стенки, но и каким-либо другим механизмом.

Известно, что MTL образует олигомеры при увеличении его концентрации или при длительном хранении. Некоторые лектины, например галактозидсвязывающие лектины – галектины, образуют олигомеры за счет гидрофобного взаимодействия их коллагеноподобных доменов друг с другом [9]. Полипептидная цепь MTL содержит участки, богатые пролином, глицином и тирозином, что характерно для коллагеноподобных доменов, поэтому мы предположили наличие такого же домена в его структуре. Чтобы подтвердить эту гипотезу и установить роль коллагеноподобного домена в процессе самоассоциации лектина, методом твердофазного лектин-ферментного анализа было исследовано взаимодействие MTL с белками, содержащими коллагеноподобный (коллаген-I, желатин) и коллагенсвязывающий (фибронектин) домены. Для этого на полистирольный планшет в одинаковой концентрации наносили растворы коллагена, фибронектина, желатина (денатурированный коллаген). В качестве отрицательного контроля использовали раствор бычьего сывороточного альбумина (БСА), в качестве положительного контроля – раствор PSM (porcine stomach mucin), в отношении которого лектин проявляет наибольшую связывающую активность за счет большого количества Gal/GalNAc-содержащих углеводов

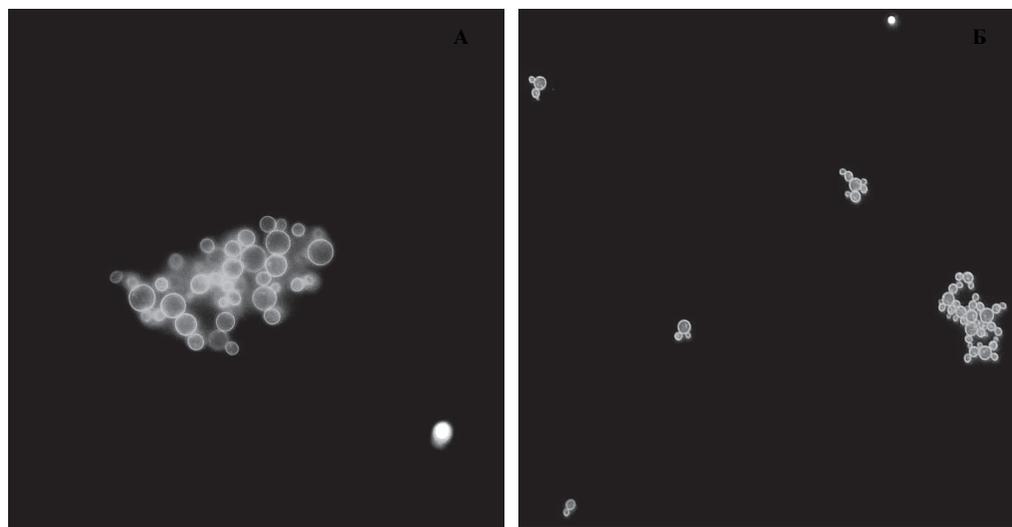


Рис. 2. Ингибирование моносахаридами связывания MTL с клетками *P. pastoris*. *A* – клетки в растворе с MTL и Glc, *Б* – клетки в растворе с MTL и Gal

цепей. К адсорбированным белкам добавляли конъюгат лектина с ферментной меткой (пероксидазой хрена). Ферментативную активность определяли, добавляя субстрат для пероксидазы – тетраметилбензидин (ТМБ). Для определения аффинности МТЛ к исследуемым соединениям рассчитывали константы ассоциации, используя двойные обратные координаты [2].

Оказалось, что во всех случаях связывание МТЛ с белками и гликопротеинами зависит от концентрации, только с БСА оно происходит на уровне неспецифического взаимодействия. Порядок констант связывания (10^5) свидетельствует о высокой аффинности МТЛ к исследуемым соединениям. Для определения характера взаимодействия МТЛ с лигандами (белок-белковое или углевод-белковое) изучали ингибирование связывания специфичным моносахаридом лектина – Gal. Gal хорошо ингибирует связывание лектина с PSM ($IC_{50} = 3,14$ мМ), следовательно, связывание МТЛ с этим гликопротеином происходит по лектинному пути с участием углеводсвязывающего сайта. В то же время связывание МТЛ с фибронектином, желатином и коллагеном не ингибируется галактозой, следовательно, оно осуществляется за счет белок-белкового взаимодействия гидрофобного коллагеноподобного домена лектина и гидрофобных участков белков-лигандов.

Вероятно, взаимодействие МТЛ с фибронектином идет по коллагенсвязывающему домену фибронектина, а с коллагеном – по коллагеноподобному домену. Полученные результаты позволяют предположить, что лектин наряду с углеводсвязывающим сайтом содержит и коллагеноподобный домен, за счет которого происходит его самоассоциация, и агглютинацию дрожжей *P. pastoris* вызывает не только углеводсвязывающий сайт лектина, но и его коллагеноподобный домен. В геномах разных дрожжей обнаружены последовательности, гомологичные генам коллагена высших эукариот в области кодирования спирального домена. Одним из мест локализации белков с коллагеноподобными последовательностями является клеточная стенка дрожжей [1].

Влияние коллагеноподобного домена лектина на реакции, связанные с врожденным иммунитетом мидии, подтверждается стимуляцией МТЛ продукции провоспалительных цитокинов. Ранее было показано, что МТЛ индуцирует синтез цитокинов клетками периферической крови человека [3]. Цитокины представляют собой группу полипептидных медиаторов, участвующих в формировании и регуляции защитных реакций организма, осуществляя взаимосвязь между неспецифическими защитными реакциями и специфическим иммунитетом. В иммунном узнавании у беспозвоночных участвуют клетки и гуморальные факторы, которые, наряду с лектинами, включают и цитокины, присутствующие в гемолимфе [8]. Для изучения механизма действия лектина на клетки крови был поставлен эксперимент по ингибированию индукции цитокинов специфичным моносахаридом Gal и коллагеном. Установлено, что добавление Gal ингибирует стимуляцию INF- γ на 30 %, что свидетельствует о взаимодействии лектина с клетками крови через углеводсвязывающий сайт. Добавление Gal ингибирует и синтез TNF- α на 22 %, но и коллаген снижает уровень цитокина на 51 %, что свидетельствует об участии в индукции цитокина как углеводсвязывающего сайта, так и коллагеноподобного домена МТЛ. Стимуляция синтеза IL-6 лектином происходит при участии его коллагеноподобного домена, так как только добавление коллагена уменьшает продукцию цитокина на 25 %. Лектин из голотурии *Cucumaria echinata* (CEL-I) не только индуцировал синтез цитокинов мышинными макрофагами, но и связывался с их клеточной поверхностью. Добавление специфического моносахарида GalNAc приводило лишь к частичному ингибированию связывания и стимуляции синтеза цитокинов [12]. Агглютинин из растения *Abrus precatorius*, который полностью терял углеводсвязывающую активность после денатурирующего прогревания, продолжал стимулировать синтез TNF- α и IL-1 мышинными макрофагами [11]. Полагают, что наряду с углеводсвязывающими сайтами эти лектины содержат какие-то неизвестные функциональные домены, которые вовлечены в индукцию цитокинов.

На основании полученных результатов можно предположить, что одним из таких доменов может быть коллагеноподобный домен лектина, который не только ответственен за

самоассоциацию МТЛ, но и выполняет важные биологические функции в организме животных. Лектин участвует в защите организма беспозвоночного от воздействия внешних патогенов, либо агглютинируя их, либо стимулируя выработку цитокиноподобных молекул, вовлеченных во врожденный иммунитет мидии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Калеева Т.С. Роль белков в молекулярной организации клеточной стенки дрожжей: автореф. дис. ... д-ра биол. наук. Москва: Изд-во МГУ, 2003. 24 с.
2. Кноре Д.Г., Мызина С.Д. Биологическая химия. М.: Высш. школа, 2000. 479 с.
3. Чикалов И.В., Кондрашина А.С., Черников О.В., Молчанова В.И., Лукьянов П.А. Выделение и общая характеристика лектина из мидии *Mytilus trossulus* // Химия природ. соединений. 2012. № 6. С. 933–936.
4. Chikalovets I.V., Kovalchuk S.N., Litovchenko A.P., Molchanova V.I., Pivkin M.V., Chernikov O.V. A new Gal/GalNAc-specific lectin from the mussel *Mytilus trossulus*: Structure, tissue specificity, antimicrobial and antifungal activity // Fish Shellfish Immunol. 2016. Vol. 50. P. 27–33.
5. Garcia-Maldonado E., Cano-Sanchez P., Hernandez-Santoyo A. Molecular and functional characterization of a glycosylated Galactose-Binding lectin from *Mytilus californianus* // Fish Shellfish Immunol. 2017. Vol. 66. P. 564–574.
6. Gestal C., Roch P., Renault T., Pallavicini A., Paillard C., Novoa B., Oubella R., Venier P., Figueras Huerta A. Study of Diseases and the Immune System of Bivalves Using Molecular Biology and Genomic // Rev. Fish. Sci. 2008. Vol. 16 (S1). P. 133–156.
7. Iwanaga S., Lee B.L. Recent advances in innate immunity of invertebrate animals // J. Biochem. Mol. Biol. 2005. Vol. 38, N 2. P. 128–150.
8. Malagoli D., Sacchi S., Ottaviani E. Lectins and cytokines in celomatic invertebrates: two tales with the same end // ISJ. 2010. Vol. 7. P. 1–10.
9. Mehul B., Bawumia S., Martin S.R., Hughes R.C. Structure of baby hamster kidney carbohydrate-binding protein CBP30, an S-type animal lectin // J. Biol. Chem. 1994. Vol. 269. P. 18250–18258.
10. Sharon N., Lis H. Lectins. 2nd ed. Springer, 2007. 454 p.
11. Tripathi T., Maiti T.K. Immunomodulatory role of native and heat denatured agglutinin from *Abrus precatorius* // Inter. J. Biochem. Cell Biol. 2005. Vol. 37. P. 451–462.
12. Yamanishi T., Yamamoto Y., Hatakeyama T., Yamaguchi K., Oda T. CEL-I, an Invertebrate N-Acetylgalactosamine-specific C-Type Lectin, Induces TNF- α and G-CSF Production by Mouse Macrophage Cell Line RAW264.7 Cells // J. Biochem. 2007. Vol. 142. P. 587–595.