

Кононов Леонид Олегович

**ХИМИЯ УГЛЕВОДОВ И
ГЛИКОБИОЛОГИЯ**

<https://углеводы.su>

Добрый день!

Лекция 6

Углевод-связывающие белки

6. *Essentials of glycobiology*, A. Varki, et al. (Eds.), 3d edn., 2017, Ch. 28–38.
10. *The Sugar Code. Fundamentals of glycosciences*, H.-J. Gabius (Ed.), 2009, Ch. 13, 14, 15, 16, 19.
38. M. E. Taylor, K. Drickamer. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **2007**, *19*, 572.
41. N. Sharon. *Biochem. Soc. Trans.* **2008**, *36*, 1457.
49. H.-J. Gabius, S. André, J. Jiménez-Barbero, A. Romero, D. Solís. *Trends Biochem. Sci.* **2011**, *36*, 298.
62. D. Solís, N. V. Bovin, A. P. Davis, J. Jiménez-Barbero, A. Romero, R. Roy, K. Smetana Jr., H.-J. Gabius. *Biochim. Biophys. Acta* **2015**, *1850*, 186.

Сегодня мы будем обсуждать углевод-связывающие белки.

Необходимая литература, как обычно представлена на слайде.

Лектины и другие углевод- связывающие белки

Не все углевод-связывающие белки являются лектинами.



Можно выделить несколько типов углевод-связывающих белков, не являющихся лектинами:

- 1) Анти-углеводные антитела, как естественные, так и иммунные, распознают углеводные структуры, т.е. связывают их.
- 2) Ферменты, участвующие в синтезе олигосахаридной цепи (гликозилтрансферазы) или расщепляющие гликозидную связь, тем самым вызывая деградацию углеводных цепей (гликозидазы) также распознают и связывают углеводные структуры.
- 3) Транспортные белки, которые транспортируют углеводсодержащие структуры, также распознают и связывают углеводные структуры.

А остальные специфические белки, обладающие свойством избирательно связывать углеводы и углеводные компоненты гликоконъюгатов различной природы, но не являющиеся углевод-связывающими белками, перечисленными выше, относят к лектинам. Лектины тоже подразделяются на два больших класса: собственно лектины и гликозаминогликан-связывающие белки.

Сравнение двух основных классов углевод-связывающих белков

5

	Lectins ^a	Glycosaminoglycan-binding proteins ^b
Shared evolutionary origins	yes (within each group)	no
Shared structural features	yes (within each group)	no
Defining AA residues involved in binding	often typical for each group	patch of basic amino acid residues
Type of glycans recognized	N-glycans, O-glycans, glycosphingo-lipids (a few also recognize sulfated glycosaminoglycans)	different types of sulfated glycosaminoglycans
Location of cognate residues within glycans	typically in sequences at outer ends of glycan chains	typically in sequences internal to an extended sulfated glycosaminoglycan chain
Specificity for glycans recognized	stereospecificity high for specific glycan structures	often recognize a range of related sulfated glycosaminoglycan structures
Single-site binding affinity	often low; high avidity generated by multivalency	often moderate to high
Valency of binding sites	multivalency common (either within native structure or by clustering)	often monovalent
Subgroups	C-type lectins, galectins, P-type lectins, I-type lectins, L-type lectins, R-type lectins etc.	heparan sulfate-binding proteins, chondroitin sulfate-binding proteins, dermatan sulfate-binding proteins
Types of glycans recognized within each group	can be similar (e.g., galectins) or variable (e.g., C-type lectins)	classification itself is based on type of glycosaminoglycan chain recognized

Отличия собственно лектинов и гликозаминогликан-связывающих белков:

В то время как классические лектины имеют общее эволюционное происхождение и сходные структуры для каждой группы лектинов, белки, связывающие гликозаминогликаны, лишены этих свойств.

В случае классических лектинов вполне определенные остатки аминокислот вовлечены в связывание углеводных лигандов.

В то же время гликозаминогликаны, несущие отрицательный заряд, который обеспечивается сульфатированием или наличием остатков уроновых кислот, связываются с гликозаминогликан-связывающими белками через остатки основных аминокислот.

Лектины распознают моносахаридные остатки, расположенные на концах олигосахаридной цепи, причем они распознают определенные структуры с довольно высокой специфичностью, тогда как гликозаминогликан-связывающие белки часто распознают набор сходных углеводных структур гликозаминогликанов, расположенных в глубине цепей часто внутри протяженных сильно сульфатированных доменов.

Углевод-связывающие домены лектинов мультивалентны, а в гликозаминогликан-связывающих белках моновалентны.

Классификация лектинов очень широкая, а гликозаминогликансвязывающие белки называют по типу

гликозаминогликана, который эти белки распознают, и поскольку этих гликанов не так много, то и групп связывающих их белков не много.

Гликозаминогликан (ГАГ)- связывающие белки

Сейчас мы подробнее рассмотрим гликозаминогликан (ГАГ)-связывающие белки.

Примеры белков, связывающихся с ГАГ

7

Cell/matrix interactions	Coagulation/ fibrinolysis	Lipolysis	Inflammation	Growth factors and morphogens
laminin	antithrombin	lipoprotein lipase	cytokines (IL-2, IL-7, IL-8)	FGFs and FGF receptors
fibronectin	heparin cofactor II	hepatic lipase		HGF; scatter factor
vitronectin	tissue factor pathway inhibitor	apoE	chemokines (e.g., MIP-1 β , SDF-1, etc.)	VEGF
thrombospondin		apoB		TGF- β
tenascin	thrombin	apoA-V		BMPs
various collagens	protein C inhibitor		TNF- α	Hedgehogs
amyloid proteins	tPA and PAI-1		L and P selectins	Wnts
			superoxide dismutase	
			microbial adhesins	

В таблице приведены примеры и названия гликозаминогликан-связывающих белков. Они классифицированы по типам выполняемых ими биологических функций, среди которых липолиз, свертывание крови, взаимодействие клеток между собой и внеклеточным матриксом, воспалительные процессы.

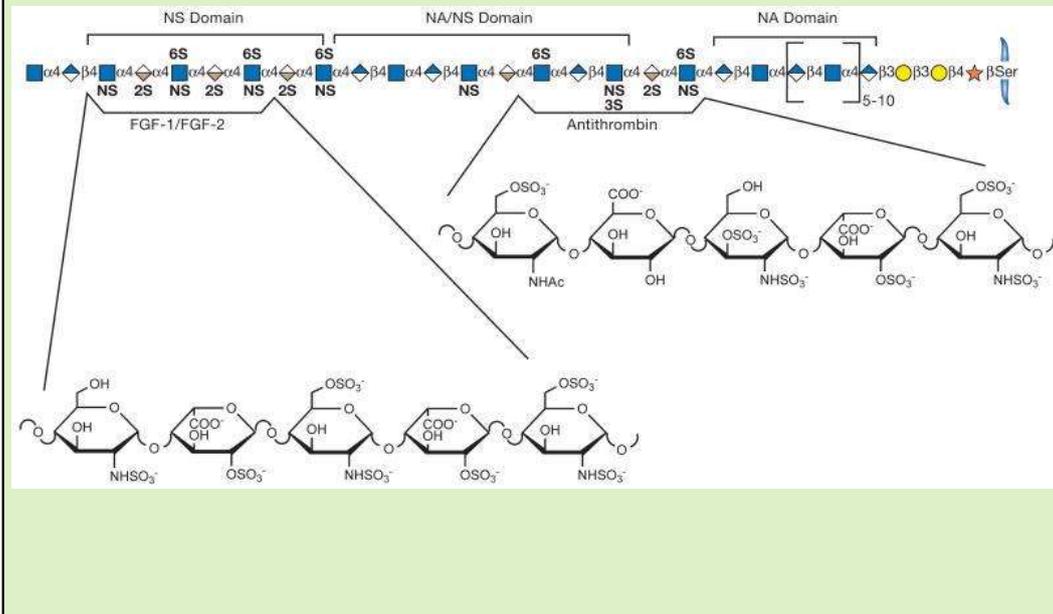
Примеры олигосахаридов, которые узнаются ГАГ-связывающими белками

8

Protein	Glycosaminoglycan partner	Oligosaccharide
Antithrombin	heparin/heparan sulfate	
Fibroblast growth factor 2	heparin/heparan sulfate	
Lipoprotein lipase	heparin/heparan sulfate	
Heparin cofactor II	dermatan sulfate	
Herpes simplex virus Glycoprotein gD	heparin/heparan sulfate	

Здесь представлены структуры гликанов, которые узнаются этими белками. С некоторыми мы уже сталкивались, например, антитромбин, который связывает пентасахаридный фрагмент гепарина.

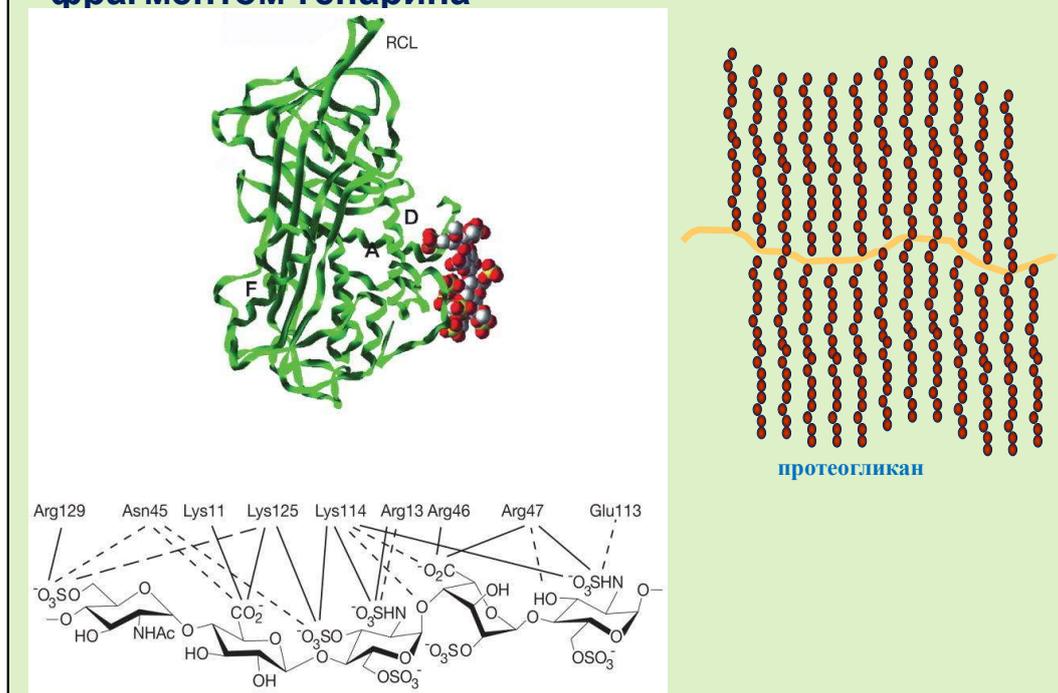
Доменная структура гепарансульфата/гепарина: 9 сайты связывания с различными лигандами



Важно что в полисахариде существуют разные домены, которые обладают разной специфичностью связывания с гликозаминогликан-связывающими белками. Так, например, в гепарине анти тромбин распознает пентасахаридную последовательность, а факторы роста фибробластов распознают совсем другой фрагмент, который исчерпывающе сульфатирован.

Комплекс антитромбина с пентасахаридным фрагментом гепарина

10



Эта картинка должна вам напомнить, как много участков связывания моносахаридных остатков в пентасахаридном фрагменте гепарина с разными остатками аминокислот в антитромбине. Благодаря этому специфическому распознаванию запускается терминирование коагуляции крови.

Классификация лектинов

Теперь мы разберем классификацию лектинов.

Варианты классификации лектинов

12

- ▶ Классификация, основанная на природе гликановых последовательностей, с которыми лектин связывается наиболее прочно
 - ▶ Например, β -галактозид-связывающие лектины = галектины.
- ▶ Классификация, основанная на анализе гомологии аминокислотных последовательностей белковых цепей и сходства их третичных структур.
 - ▶ Углевод-связывающие домены (CRD) каждой группы (типа) лектинов содержат консервативные мотивы последовательностей аминокислот.
 - ▶ Общая доменная архитектура (мотив укладки) каждого типа лектинов сходна для представителей одного типа (имеет характерный «фолд») и различается для лектинов разных типов.

Выделяют две классификации лектинов:

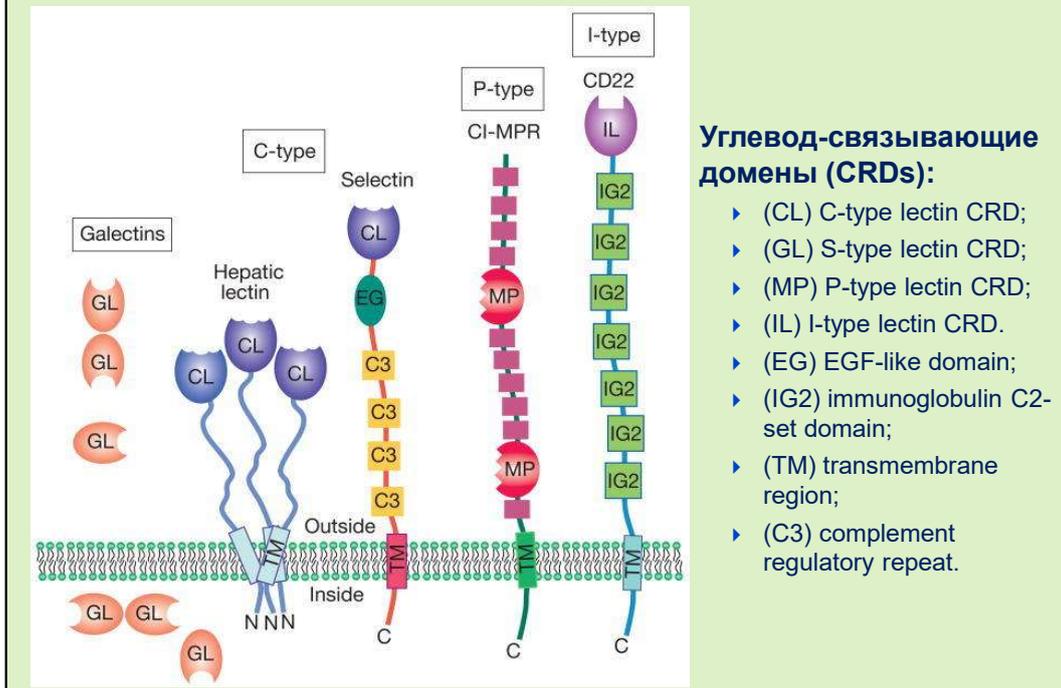
Первая основана на природе гликановых последовательностей, с которыми лектин связывается наиболее прочно. Часто эту специфичность связывания отражает даже названия этих лектинов. Например, β -галактозид-связывающие лектины = галектины, которые распознают терминальные остатки [бета]-галактозы.

Второй вариант классификации основан на анализе гомологии аминокислотных последовательностей белковых цепей и сходства их третичных структур.

Оказывается, что углевод-связывающие домены (CRD) каждой группы (типа) лектинов содержат консервативные мотивы последовательностей аминокислот. Вследствие чего общая доменная архитектура (мотив укладки) каждого типа лектинов сходна для представителей одного типа (имеет характерный «фолд») и различается для лектинов разных типов.

Основные типы лектинов (на основе анализа первичной/третичной структуры белка)

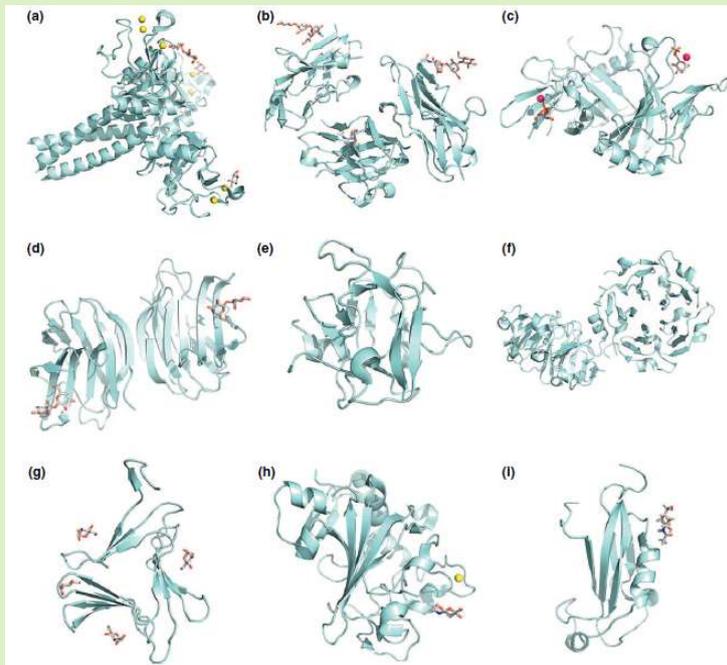
13



На слайде приведены основные типы лектинов, которые были классифицированы на анализе последовательности полипептидной цепи. Здесь можно видеть, что лектины могут быть растворимыми и мембраносвязанными, имеют разнообразную архитектуру и различные связывающие домены.

Разнообразие типов третичных структур («фолдов») лектинов: несколько примеров

14



Здесь показаны 9 примеров типов третичных структур лектинов, называемых фолдами. Этот слайд демонстрирует то, насколько они разные.

Галерея лектинов: все известные типы третичных структур («фолдов») лектинов

15

62. D. Solís, N. V. Bovin, A. P. Davis, J. Jiménez-Barbero, A. Romero, R. Roy, K. Smetana Jr., H.-J. Gabius. *Biochim. Biophys. Acta* **2015**, *1850*, 186-235. DOI: 10.1016/j.bbagen.2014.03.016.

Более подробный список структур фолдов можно найти в базах данных, а некоторые приведены в представленной на слайде публикации, где также детально описано, какие сахара они связывают и как они это делают.

Лектины растений

Лектины L- и R-типов

Долгое время считалось, что лектины присутствуют только в растениях.

Лектины: что это такое и чем вредно?

04.04.2015



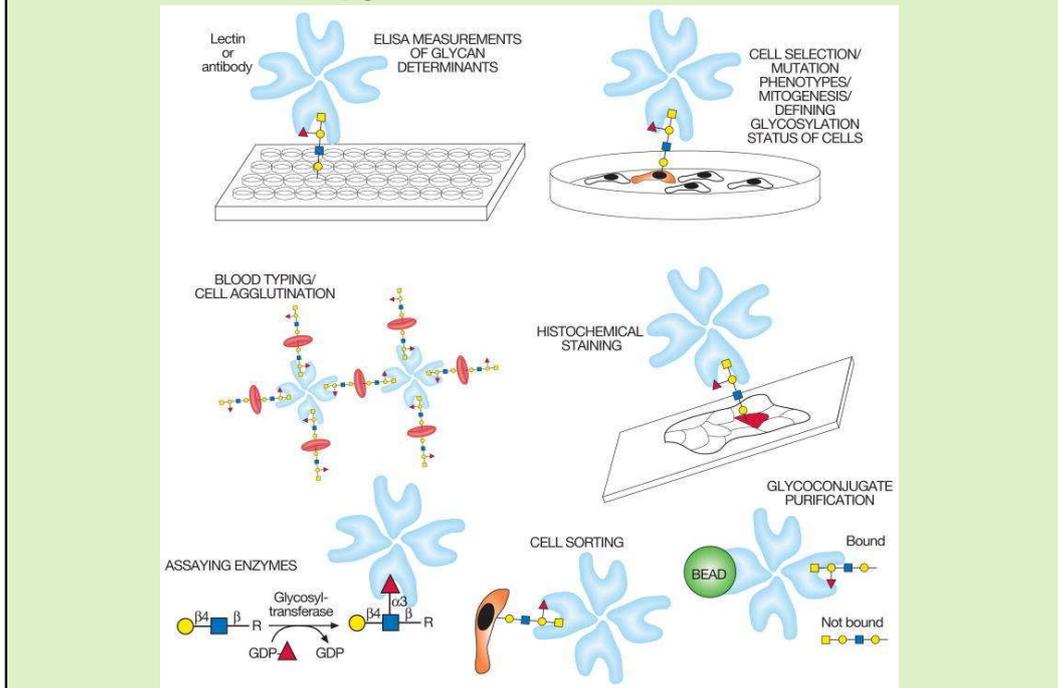
Лектинами называют очень разнообразное семейство углеводов-связывающих белков. В природе настолько много лектинов, что они содержатся во всех растительных и животных организмах. Без преувеличения можно сказать, что без лектинов нет жизни.

А если так, почему тогда известно, что лектины вредны, и что с их употреблением в пищу надо быть очень осторожным?

Лектины растений достаточно хорошо описаны даже в популярной литературе. На слайде приведена типичная страничка из интернета.

Использование лектинов в гликобиологии: лектины – инструменты исследования

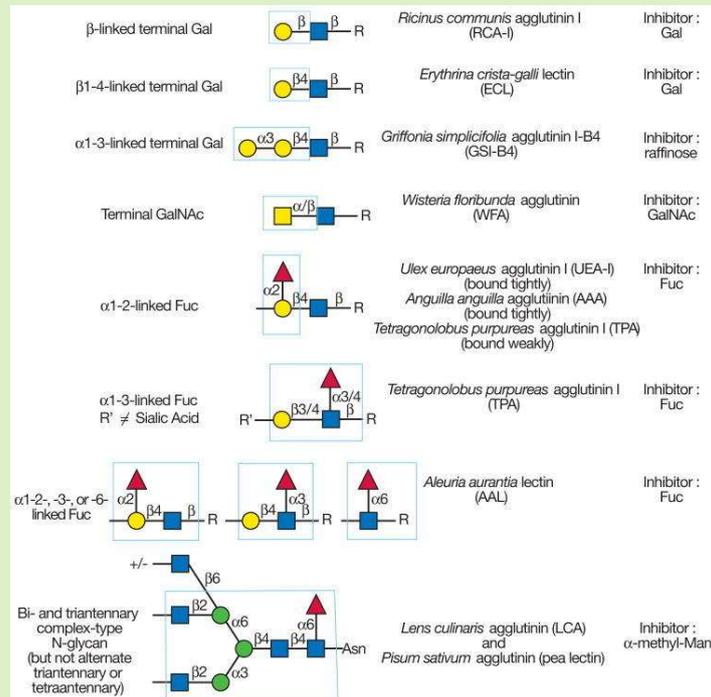
18



Растительные лектины активно используются в биологии уже многие годы. Благодаря специфичности взаимодействия лектинов с углеводными структурами были установлены структуры олигосахаридных фрагментов, с которыми связываются лектины. Лектины применяются в иммуноферментном анализе, гистохимическом окрашивании, анализе продуктов ферментативной реакции, определении групп крови при коагуляции, а иммобилизованные лектины можно использовать для очистки гликоконъюгатов или для сортировки клеток.

Гликаны, прочно связывающиеся с лектинами

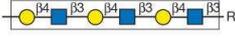
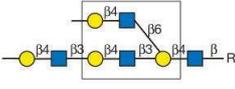
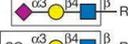
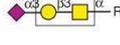
19



На слайде приведены примеры гликанов, которые прочно связываются с растительными лектинами. Это гликаны, содержащие остатки галактозы, фукозы или более сложные структуры. В таблице, представленной на слайде, также представлены ингибиторы, препятствующие связыванию этих углеводных структур с лектинами.

Гликаны, узнаваемые лектинами растений

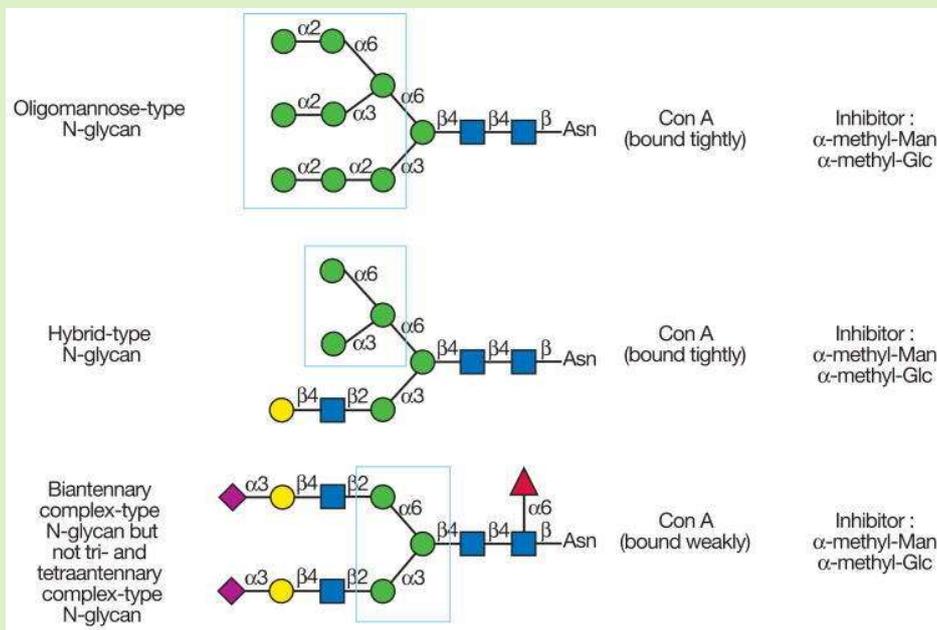
20

	<i>Lycopersicon esculentum</i> agglutinin (tomato lectin or LEA) <i>Solanum tuberosum</i> lectin (potato lectin) <i>Datura stramonium</i> agglutinin (DSA)	Inhibitor : chitotriose (GlcNAc ₆)
	<i>Phytolacca americana</i> mitogen (pokeweed mitogen) <i>Triticum vulgare</i> agglutinin (wheat germ agglutinin or WGA)	Inhibitor : chitotriose (GlcNAc ₆)
	<i>Maackia amurensis</i> leucoagglutinin (MAL)	Inhibitor : lactose
		
	<i>Sambucus nigra</i> agglutinin (SNA)	Inhibitor : lactose
		
	<i>Triticum vulgare</i> agglutinin (wheat germ agglutinin or WGA) <i>Limax flavus</i> agglutinin (LFA)	Inhibitor : GlcNAc sialic acid
	<i>Triticum vulgare</i> agglutinin (wheat germ agglutinin or WGA) <i>Griffonia simplicifolia</i> lectin II (GSL-II) (low affinity)	Inhibitor : GlcNAc
	<i>Griffonia simplicifolia</i> lectin II (GSL-II) (high affinity)	Inhibitor : GlcNAc
	<i>Vicia villosa</i> agglutinin (VVA) <i>Wisteria floribunda</i> agglutinin (WFA) <i>Dolichus biflorus</i> agglutinin (DBA) <i>Artocarpus integrifolia</i> agglutinin (Jacalin lectin)	Inhibitor : GalNAc GalNAc α -methyl-Gal
	<i>Artocarpus integrifolia</i> agglutinin (Jacalin lectin)	Inhibitor : α -methyl-Gal
	<i>Arachis hypogaea</i> agglutinin (peanut agglutinin or PNA) <i>Artocarpus integrifolia</i> agglutinin (Jacalin lectin)	Inhibitor : lactose α -methyl-Gal

В то же время растительными лектинами узнается гораздо больший набор структур, включающий сиаловые кислоты и лактозаминные цепи.

N-Гликаны, узнаваемые конканавалином А (ConA) из *Canavalia ensiformis*

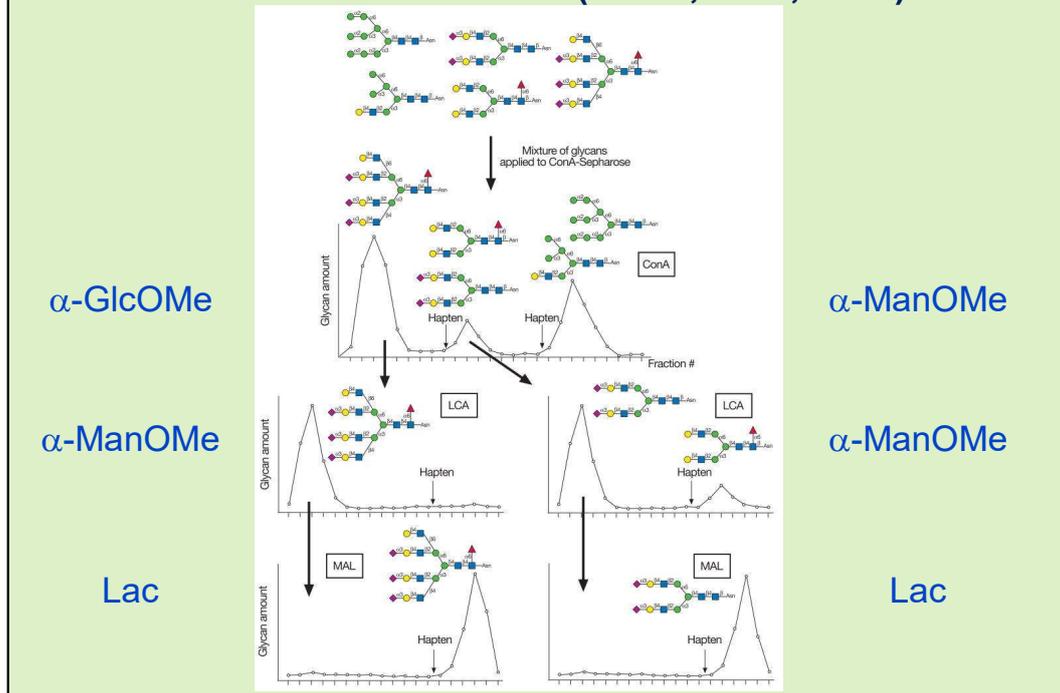
21



На этом слайде более крупным планом показаны гликановые структуры, узнаваемые конканавалином А. Это один из самых известных лектинов, который распознает олигосахаридные фрагменты N-цепей гликанов, содержащих остатки маннозы. В рамку обведены структуры, узнаваемые этим лектином. В биохимических лабораториях часто можно слышать, что этот лектин связывается с маннозой. Как можно видеть из картинки, это явное упрощение.

Аффинная хроматография: на колонках иммобилизованы лектины (ConA, LCA, MAL)

22



Способность лектинов специфично связываться с гликановыми фрагментами активно используется в аффинной хроматографии для очистки гликоконъюгатов.

Здесь показан пример использования нескольких аффинных колонок и нескольких ингибиторов связывания, которые селективно элюируют определенные типы структур гликанов.

Лектины клеток животных

**Селектины, коллектины, фиколины, сиглеки,
галектины**

В конце 60-х годов прошлого века появились первые уверенные данные, что лектины обнаружены у животных, названия которых перечислены на слайде. Далее мы по очереди рассмотрим эти классы более подробно.

Функции лектинов клеток животных

Activity	Example of lectin
Recognition of stem region of <i>N</i> -glycans, a signal for ubiquitin conjugation when accessible in incorrectly folded glycoproteins	F-box proteins Fbs1 and Fbs2, which comprise the ligand-specific part of SCF ^{ubiquitin} ligase complexes
Molecular chaperones with dual specificity for Glc ₃ /Glc ₁ Man ₉ GlcNAc ₂ and protein part of nascent glycoproteins in the ER	Malectin/ribophorin I complex, calnexin, calreticulin
Targeting of misfolded glycoproteins with Man ₉₋₅ GlcNAc ₂ as carbohydrate ligand to ER-associated degradation (ERAD)	EDEM1,2 ⁷ /Mnl1 (Htm1) (lectins or glycosidases?), Yos9p (MRH ⁴ domain) in yeast, erlectin (XTP3-B ⁸) and OS-9 ⁹ in mammals
Intracellular routing of glycoproteins and vesicles and apical delivery	Comitin, ERGIC5 ³ and VIP36 ⁶ (probably also ERG1 ¹ and VIPL ¹), galectins-3, -4 and -9, P-type lectins
Intracellular transport and extracellular assembly	Non-integrin 67 kDa elastin/laminin-binding protein
Enamel formation and biomineralization	Amelogenin
Inducer of membrane superimposition and zippering (formation of Birbeck granules)	Langerin (CD207)
Cell type-specific endocytosis	Cysteine-rich domain (β-trefoil) of the dimeric form of mannose receptor for GalNAc-4-SO ₄ -bearing glycoprotein hormones in hepatic endothelial cells, dendritic cell and macrophage C-type lectins (mannose receptor family members (tandem-repeat type) and single-CRD ⁵ lectins such as trimeric langerin/CD207 or tetrameric DC-SIGN/CD209), hepatic and macrophage asialoglycoprotein receptors, HARE ¹⁰ , P-type lectins
Recognition of foreign glycans (β1,3-glucans, cell wall peptidoglycan, LOS ⁸ and LPS ⁸), mycobacterial glycolipid or host-like epitopes	CR3 ⁸ (CD11b/CD18, Mac-1 antigen), C-type lectins such as collectins, DC-SIGN, dectin-1, Mincle and RegIIy (murine) ⁴ or HIP/PAP (human), ficolins, galectins, immulectins, intelectins, <i>Limulus</i> coagulation factors C and G, siglecs, tachylectins
Recognition of foreign or aberrant glycosignatures on cells (including endocytosis or initiation of opsonization or complement activation) and of apoptotic/necrotic cells (glycans or peptide motifs)	Collectins, C-type macrophage and dendritic cell lectins, CR3 (CD11b/CD18, Mac-1 antigen), αθ-defensins, ficolins, galectins, pentraxins (CRP, limulin), RegIIy (HIP/PAP), siglecs, tachylectins
Targeting of enzymatic activity in multimodular proteins	Acrosin, <i>Limulus</i> coagulation factor C, Iaforin, β-trefoil fold ((QxW) ₃ domain) of GalNAc-Ts ¹ involved in mucin-type O-glycosylation, frequent in microbial glycosylhydrolases for plant cell wall polysaccharides, termed carbohydrate-binding modules
Bridging of molecules	Cerebellar soluble lectin, cytokines (e.g. IL-2 ¹¹ , IL-2R and CD3 of TCR), galectins
Induction or suppression of effector release (H ₂ O ₂ , cytokines etc.)	Chitinase-like YKL-40, galectins, I-type lectins (e.g. CD33 (siglec-3), siglecs-7 and -9), selectins and other C-type lectins such as CD23, BDCA2 and dectin-1, Toll-like receptor 4
Alteration of enzymatic activities in modular proteins/receptor endocytosis via lattice formation	Mannan-binding lectin (acting on meprins); galectins
Cell growth control, induction of apoptosis/anoikis and axonal regeneration	Amphoterin and other heparin-binding proteins, cerebellar soluble lectin, chitinase-like lectins, C-type lectins, galectins, hyaluronic acid-binding proteins, siglecs (e.g. CD22 and CD33)
Cell migration and routing	Galectins, hyaluronic acid-binding proteins (CD44, hyalectans/lecticans, RHAMM ¹²), I-type lectins, selectins and other C-type lectins
Cell-cell interactions	Galectins, gliolectin, I-type lectins (e.g. siglecs, N-CAM ¹³ , P ₀ or L1), selectins and other C-type lectins such as DC-SIGN or macrophage mannose receptor
Cell-matrix interactions	Calreticulin, discoidin I, galectins, heparin- and hyaluronic acid-binding lectins including hyalectans/lecticans
Matrix network assembly	Galectins (e.g. galectin-3/hensin), non-integrin 67 kDa elastin/laminin-binding protein, proteoglycan core proteins (C-type CRD and G1 domain of hyalectans/lecticans)

Этот слайд демонстрирует огромное разнообразие функций лектинов животных клеток.

Что узнают лектины млекопитающих?

25

- ▶ ASGPR (свое)
- ▶ галектины (свое и чужое-?)
- ▶ сиглеки (свое и чужое)
- ▶ цитокины (свое)
- ▶ коллектины (чужое)
- ▶ фиколины (чужое)
- ▶ Ман-связывающие белки С-типа (чужое)
- ▶ DC-SIGN (чужое)

Лектины млекопитающих узнают разные углеводные структуры:

Асиалогликопротеиновый рецептор (ASGPR) узнает СВОИ гликаны, содержащие остатки галактозы и N-ацетилгалактозамина.

Есть галактозо-распознающие галектины, которые как и сиглеки, узнают и СВОИ гликаны, и ЧУЖИЕ. Цитокины распознают только СВОЕ, тогда как коллектины, фиколины, маннозо-связывающие белки С-типа и DC-SIGN – только ЧУЖОЕ, что используется для защиты от патогенов.

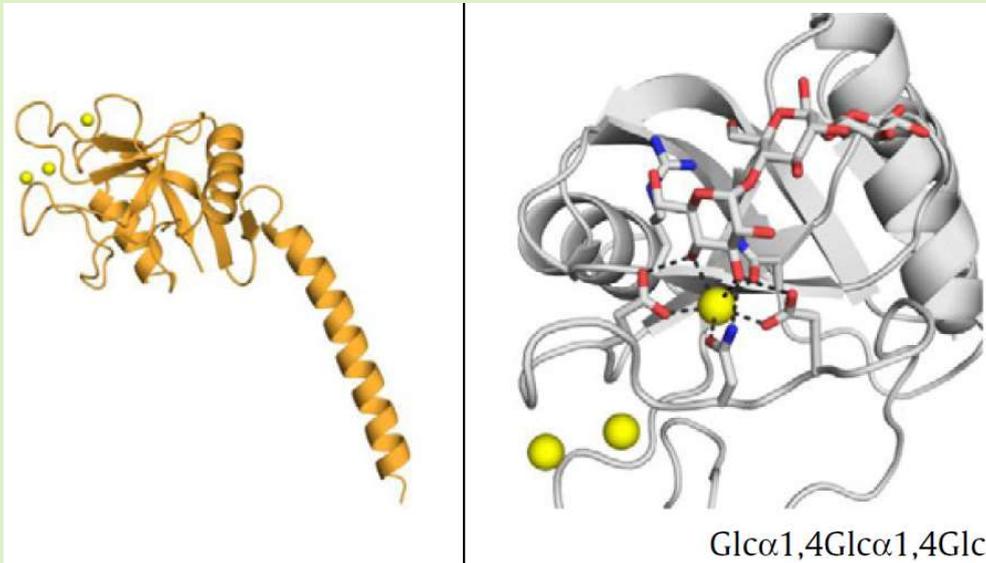
Лектины С-типа

**Селектины, коллектины,
асиалогликопротеиновый рецептор,
рецепторы дендритных клеток,
рецепторы эндоцитоза**

Мы будем рассматривать лектины в соответствии с их первичной аминокислотной последовательностью, которая транслируется в различные трехмерные структуры (фолды). Наиболее изучены и разнообразны лектины С-типа.

Типичная третичная структура лектинов
С-типа: β -сэндвич

27



Третичная структура (фолд) лектинов С-типа представлена [бета]-сэндвичем. В образовании комплекса углеводного лиганда с полипептидной цепью лектина С-типа всегда участвуют ионы кальция.

17 Групп лектинов С-типа: доменное строение

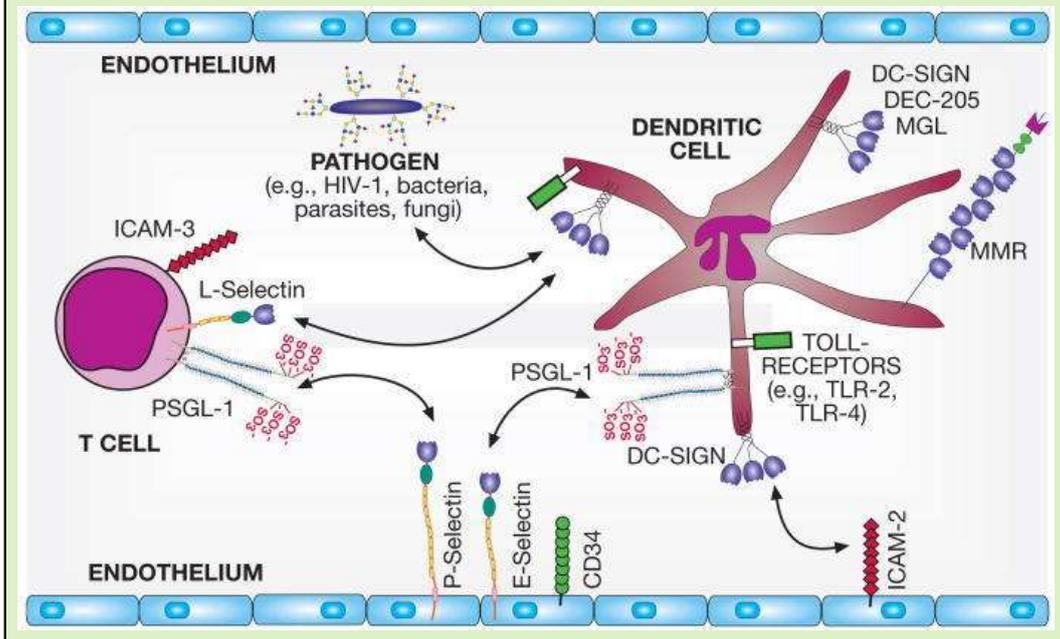
28



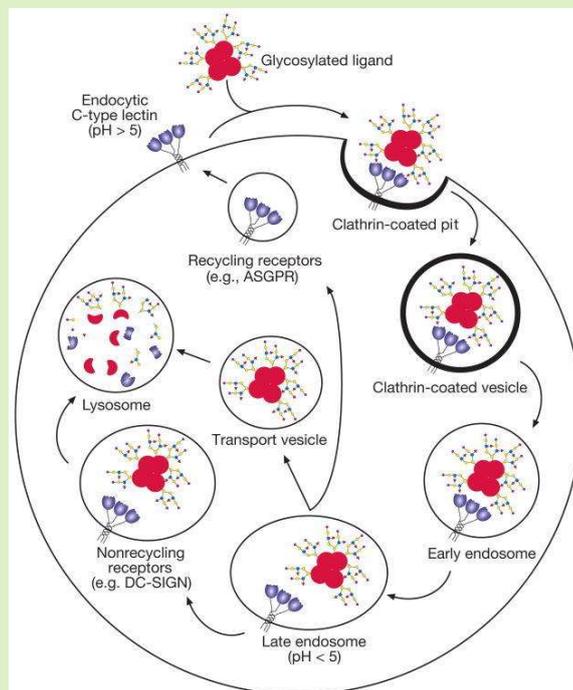
Разнообразие доменов лектинов С-типа позволило выделить 17 групп этих лектинов. Домен участвует в узнавании углеводов при посредничестве ионов кальция. Молекула лектина может содержать один или много доменов, которые могут располагаться внутри цепочки, или на ее концах цепочки, или образовывать различные структуры.

Лектины С-типа: система врожденного иммунитета, распознавание патогенов и клеточная адгезия

29



Лектины С-типа являются компонентами системы врожденного иммунитета, и помогают организму распознавать углеводные структуры патогенов и участвуют в клеточной адгезии. Эти лектины расположены на Т-клетках, дендритных и эндотелиальных клетках.



Первый тип лектинов С-типа – это рецепторы эндоцитоза. Гликопротеин, несущий лиганд лектина, распознается и связывается с лектином, далее этот комплекс, образованный при участии ионов кальция, транспортируется внутрь клетки внутри эндосомы. После подкисления рН до 5 в поздних эндосомах комплекс распадается, после чего гликопротеин расщепляется, а лектиновый рецептор может либо тоже расщепляться, либо вновь возвращаться на мембрану клетки для повторного цикла. Это зависит от типа рецептора.

Например, асиалогликопротеиновый рецептор повторно экспрессируется на мембране клетки после акта рецептор-опосредованного эндоцитоза.

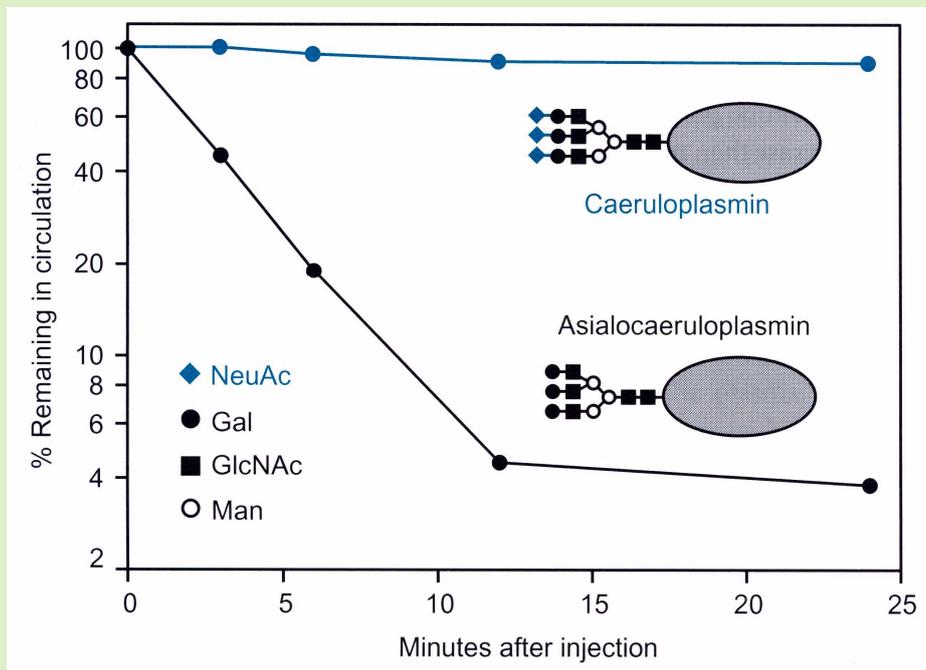
Асиалогликопротеиновый рецептор

Лектин С-типа

Рассмотрим этот рецептор подробнее. Он является лектином С-типа.

ASGPR – асиалогликопротеиновый рецептор: как открыли первый лектин млекопитающих

32

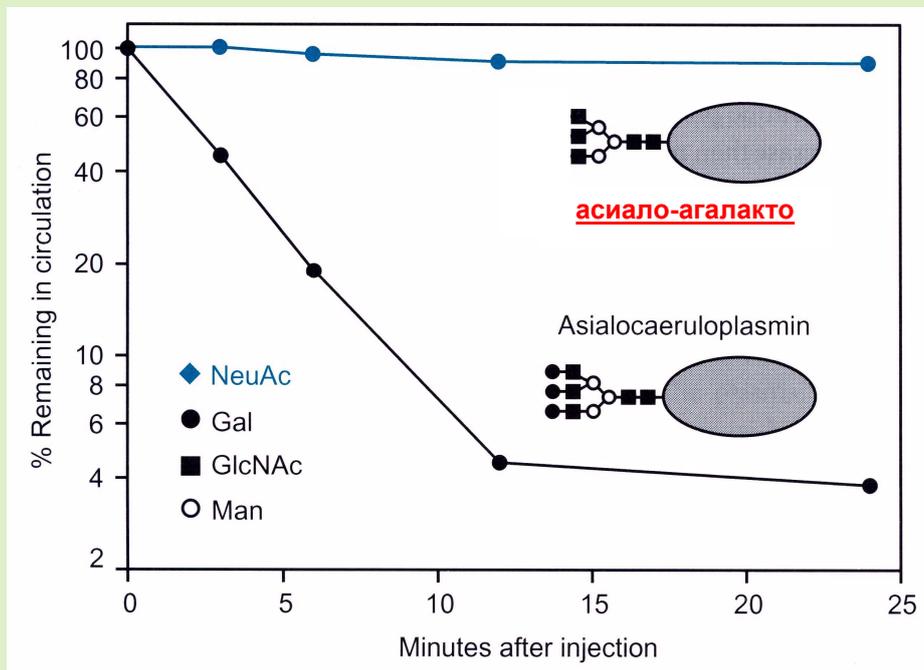


Это первый лектин, обнаруженный в млекопитающих.

Открыли асиалогликопротеиновый рецептор случайно, изучая динамику циркуляции в крови церулоплазмينا. Содержание этого гликопротеина в крови не изменяется в течение получаса. Однако асиалоцерулоплазмин, полученный после его обработки гликопротеина сиалидазой, отщепляющей остатки N-ацетилнейраминовой кислоты, выводился из крови за 15 минут.

ASGPR – асиалогликопротеиновый рецептор: как открыли первый лектин млекопитающих

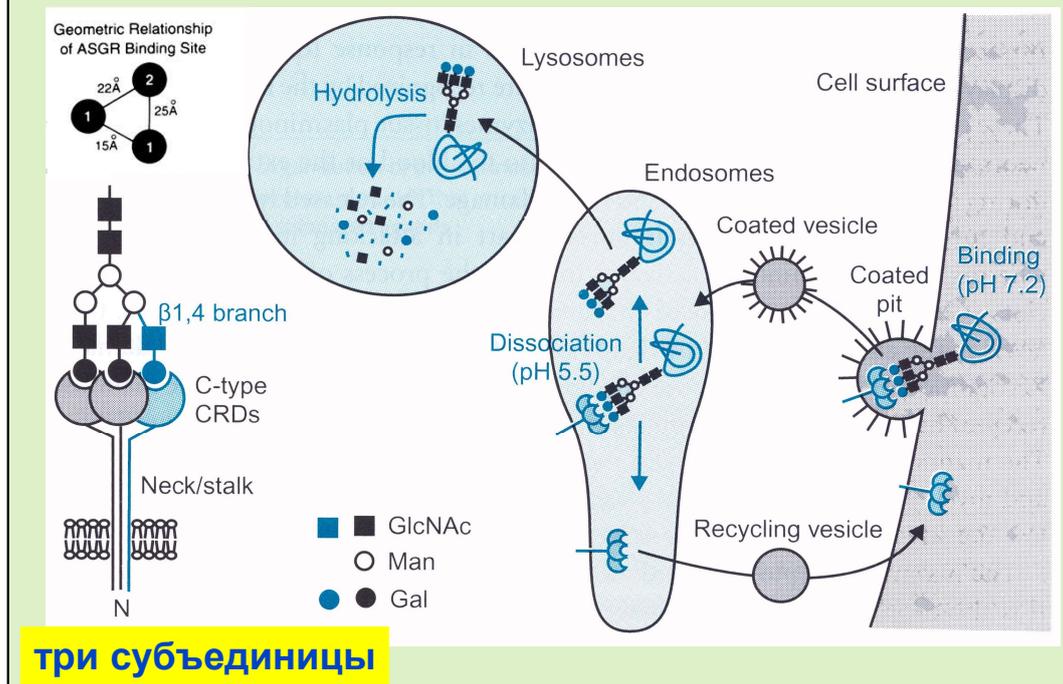
33



Но оказалось, что если галактозидазой убрать из асиалоцерулоплазмينا остатки галактозы, то получаемый асиало-агалакто-церулоплазмин снова долго циркулировал в крови. Поэтому эти исследователи пришли к выводу, что резкое снижение циркулирующего в крови асиало-церулоплазмينا объясняется его взаимодействием с рецептором, в котором активное участие играют остатки галактозы.

Связывание с ASGPR – первый этап рецептор-опосредованного эндоцитоза

34

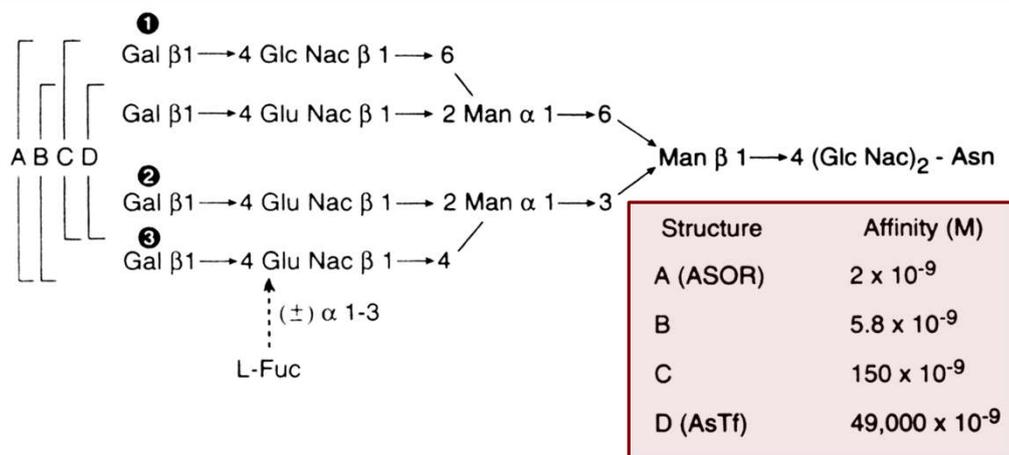


Рецептор включает три субъединицы, расположенные в вершинах неравностороннего треугольника.

Связывание с асиалогликопротеиновым рецептором – это первый этап рецептор-опосредованного эндоцитоза гликопротеинов, содержащие гликаны с терминальными остатками галактозы или N-ацетилгалактозамина.

Требования к точной структуре гликана

35



Обычно говорят, что этот рецептор связывает гликаны с терминальными остатками галактозы или N-ацетилгалактозамина.. Но это сильное упрощение ситуации, как можно видеть из этого слайда. Варьируя расположение остатков галактозы в гликане можно менять его аффинность на несколько порядков.

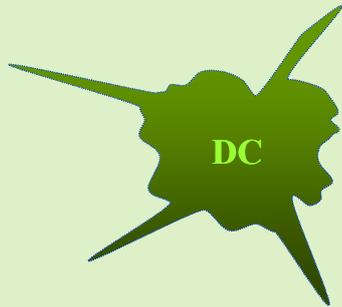
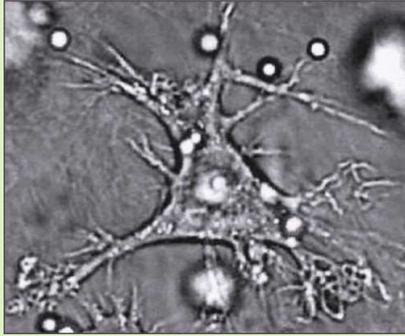
Лектины на дендритных клетках

Лектины С-типа, галектины, сиглеки

На дендритных клетках расположены лектины С-типа, а также галектины и сиглеки.

Лектины на дендритных клетках (DC)

37

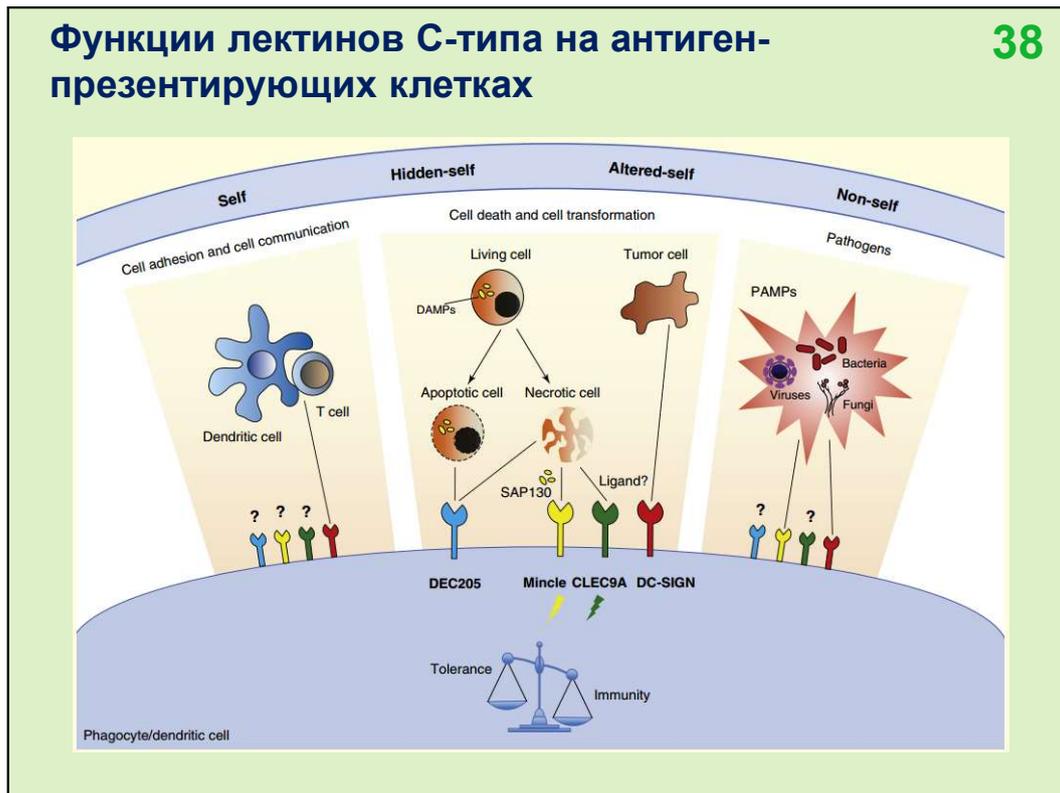


▶ Лектины С-типа:

- ▶ DC-SIGN
- ▶ DEC-205
- ▶ Mf Gal-рецептор
- ▶ Man-рецептор
- ▶ Дектин
- ▶ CLec
- ▶ L-Селектин
- ▶ Галектины: -1, -3, -9
- ▶ Сиглеки: -3, -7, -9, -10, -15

Мы рассмотрим селектины, маннозный рецептор и DC-SIGN. Это- все лектины С-типа.

Галектины и сиглеки нумеруют, т.к. их много.



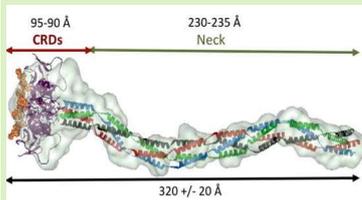
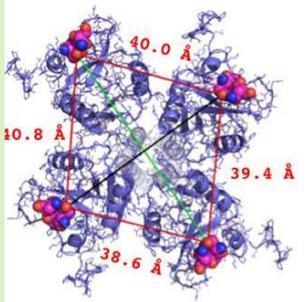
Функции лектинов С-типа на дендритных клетках сводятся к тому, что они распознают углеводные структуры как «свое» и «чужое». Когда это структуры «своего» эти лектины (DC-SIGN) являются посредниками в коммуникации между клетками и их адгезии. Более того, эти лектины могут распознавать «скрытые свои» или измененные структуры на клетках в результате онкотрансформации, запуская апоптоз или некроз таких клеток в результате взаимодействия узнанных углеводных структур с разными лектиновыми рецепторами на дендритных клетках. При распознавании лектинами С-типа углеводных структур «чужого» на патогенах запускается каскад воспалительных иммунных реакций. Таким образом, распознавание лектиновыми рецепторами дендритных клеток углеводных структур позволяет регулировать баланс толерантности к «своему» и иммунного ответа к «чужому».

DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin)

39

Лектин С-типа

Интернализация вируса HIV-1 (связывание gp120)



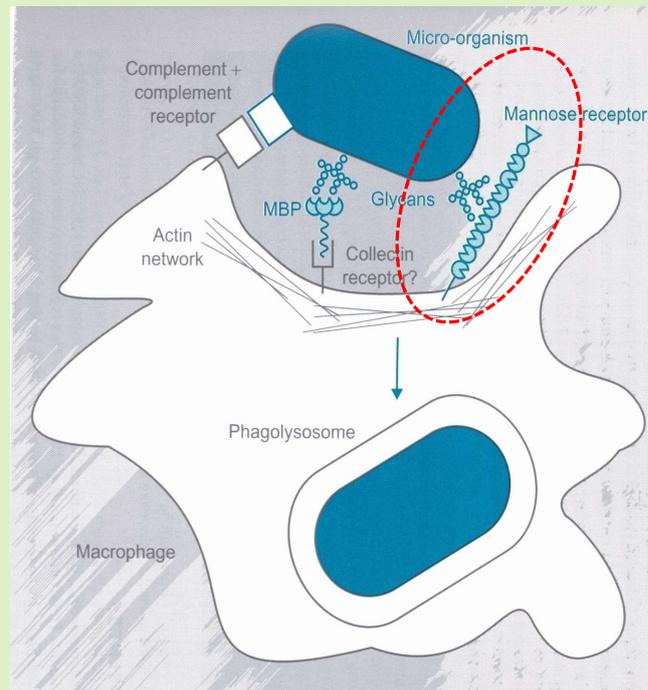
Лектин DC	Специфичность
DC-SIGN	$[GalNAc\beta 1-4(Fuc\alpha 1-3)GlcNAc]_2 > Le^x-Le^x \approx Man_9-GlcNAc_2 > Man_8-GlcNAc_2 > Le^b \approx Le^y > Le^a \approx Man_7-GlcNAc_2 \approx GalNAc\beta 1-4(Fuc\alpha 1-3)GlcNAc \approx Man_6-GlcNAc_2 \approx Le^s \approx SuLe^s$
DEC-205	$[GlcNAc\beta 1-4]_3 > Le^y-Le^x-Le^x \approx KDN\alpha 2-3Gal\beta 1-4GlcNAc\beta \approx Gal\alpha 1-3Gal\beta 1-4Glc \approx GlcA\beta 1-6Gal\beta \approx GlcNAc\beta$
Macrophage Gal-binding lectin (MGL)	GalNAc α 1-3Gal; LacdiNAc; GD2; A (type 2); GalNAc β 1-4(Fuc α 1-3)GlcNAc; GM2; GlcNAc β 1-6GalNAc α ; GalNAc α 1-3GalNAc α ; GalNAc α (Tn); 6SuGalNAc α ; SiaTn
MBP	Mannans, branched Man ₁₄
DCAL	Man-terminated glycans, LacdiNAc, LNnT
Dectin-1	$\beta 1-3Glc_n (n > 6)$; Chito-OS, su-OS, GlcNAc β 1-3GalNAc α , Sia ₃
CLec-1	3',6',6 Su ₃ LacNAc > Gal β 1-3GalNAc β 1-3GalNAc α 1-4Lac; LacNAc2Man α 3(Man α 6)Man β 4GlcNAc4GlcNAc; Glc β
CLec-2	su-OS, Sia ₃ , Glc β
CLec-6	Globo-H ~ 3',6',6Su ₃ LacNAc > Man ₃
CLec-15	Fuc α 1-4GlcNAc
CLec-18	Glc β , Neu5Ac α 2-6, Fuc α 1-2Gal
galectins	(Gal β 1-4GlcNAc) _n

Лектиновый рецептор DC-SIGN является интермедиатом межклеточной азгезии. Более того он распознает некоторые вирусы, например, гликопротеин gp120 вируса иммунодефицита человека.

Маннозный рецептор макрофагов (MMR, CD206)

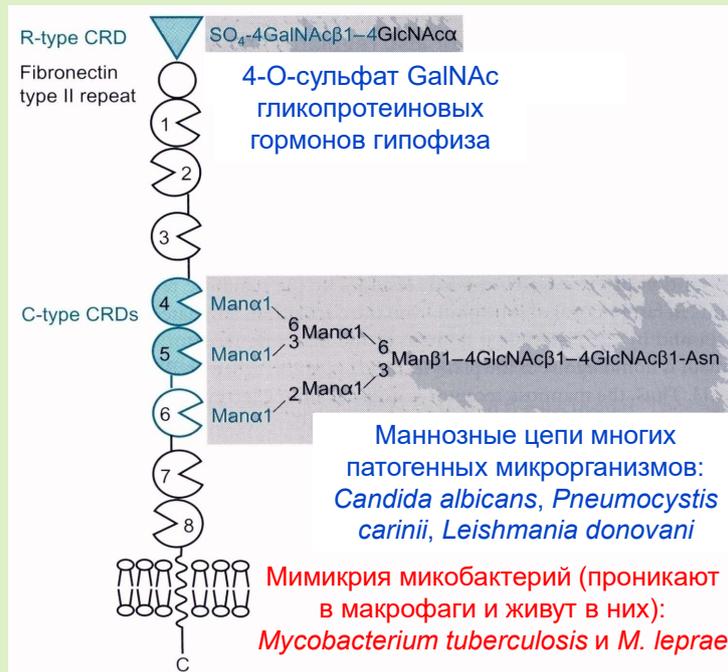
40

Лектин С-типа



Маннозо-связывающий рецептор на макрофагах, относится к лектинам С-типа, распознает углеводные цепи патогенов, богатые остатками маннозы, после чего патоген фагоцитируется в лизосоме макрофага.

Маннозный рецептор макрофагов (MMR), DC и лимфоцитов: два разных сайта связывания 41



У маннозного рецептора макрофагов есть несколько сайтов связывания: сайт С-типа распознает остатки маннозы в терминальном положении цепей гликоконъюгатов многих патогенных микроорганизмов. А также есть сайт R-типа, распознающий 4-О-сульфат GalNAc гликопротеиновых гормонов гипофиза.

Но есть редкое исключение, когда бактерия использует маннозный рецептор для своих целей – для инфицирования. Так, микобактерии *Mycobacterium tuberculosis* и *Mycobacterium leprae* связываются с маннозным рецептором и проникают в макрофаги, а затем живут в них в течение длительного периода времени, не вызывая симптомов болезни. В мире очень много людей инфицированы микобактериями. При изменении внешних условий – при ослаблении организма - микобактерии активизируются и болезнь проявляется.

Селектины

Лектины С-типа

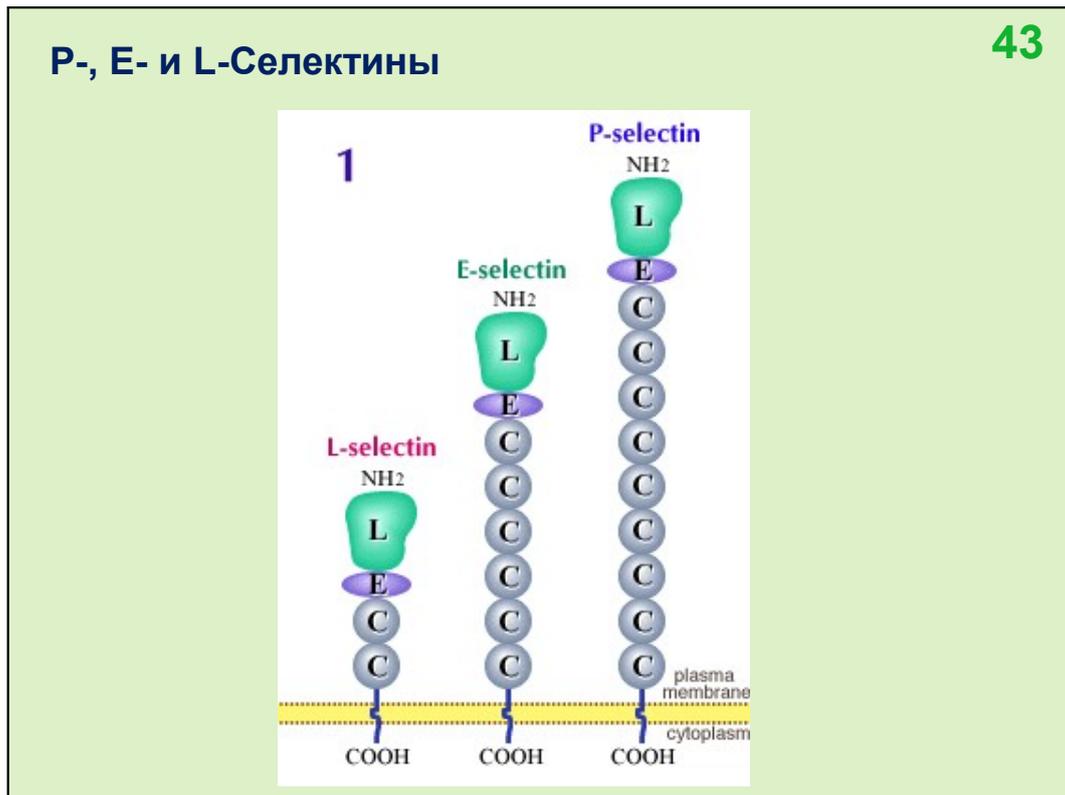
КРАТКОЕ ОБОБЩЕНИЕ НЕСКОЛЬКИХ ПОСЛЕДУЮЩИХ СЛАЙДОВ ЭТОГО РАЗДЕЛА:

Селектины являются представителями семейства лектинов С-типа (Ca²⁺-зависимые лектины), которые связывают углеводы только в присутствии ионов кальция и могут обнаруживаться как на поверхности клеток, так и в растворимой форме. Различают три вида селективов в соответствии с источником их происхождения. L-селектин постоянно присутствует на поверхности лейкоцитов, моноцитов и незрелых Т-лимфоцитов. Р-селектин содержится в α -гранулах тромбоцитов, эндотелиальных клетках и мегакариоцитах и экспрессируется на клеточной поверхности под действием тромбина и гистамина. Е-селектин образуется в эндотелиальных клетках при их стимуляции цитокинами (интерлейкин-1, фактор α некроза опухолей) и липополисахаридом (ЛПС). Общепринятым в настоящее время является представление о том, что начальная стадия прикрепления лейкоцитов к сосудистой стенке в условиях кровотока обеспечивается посредством таких эндогенных лектинов, как Р- и Е-селектины эндотелиальных клеток и L-селектин лейкоцитов. При этом происходит активация других адгезионных молекул, прочное прикрепление клеток к эндотелию посредством интегринов и миграция лейкоцитов в очаги воспаления. Показано, что Е-селектин и Р-селектин обеспечивают также процессы адгезии опухолевых клеток

соответственно к эндотелиальным клеткам и тромбоцитам. Предполагается, что опосредованное Р-селектином связывание активированных тромбоцитов с опухолевыми клетками мелкоклеточного рака легких, нейробластомы и тератокарциномы может играть важную роль на ранних стадиях метастазирования опухолей. Выявлены специфические иммунные заболевания, включая синдром нарушения адгезии лейкоцитов (leukocyte adhesion deficiency, LAD-синдром), молекулярная основа которых определяется отсутствием на поверхности клеток рецепторов к Р- и Е-селектинам. С другой стороны, важное патофизиологическое значение может иметь активация экспрессии селектинов на поверхности эффекторных клеток под действием различного рода эндогенных клеточных медиаторов. В частности, показано, что такие медиаторы, как гистамин, тромбин и С5а компонент комплемента, так же как и H₂O₂, вызывают появление на поверхности эндотелиальных клеток Р-селектина и последующую адгезию нейтрофилов к монослою активированных эндотелиоцитов. Среди активаторов экспрессии L-селектина на поверхности лейкоцитов можно назвать интерлейкины IL1, IL2, IL5, IL6, фитогемагглютинин, тогда как ингибиторами этого процесса являются интерлейкины IL3, IL4, гранулоцитарный/макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF) и ЛПС. Таким образом, экспрессия селектинов на поверхности клеток зависит от воздействия ряда иммуномодулирующих агентов естественного происхождения, включая цитокины.

P-, E- и L-Селектины

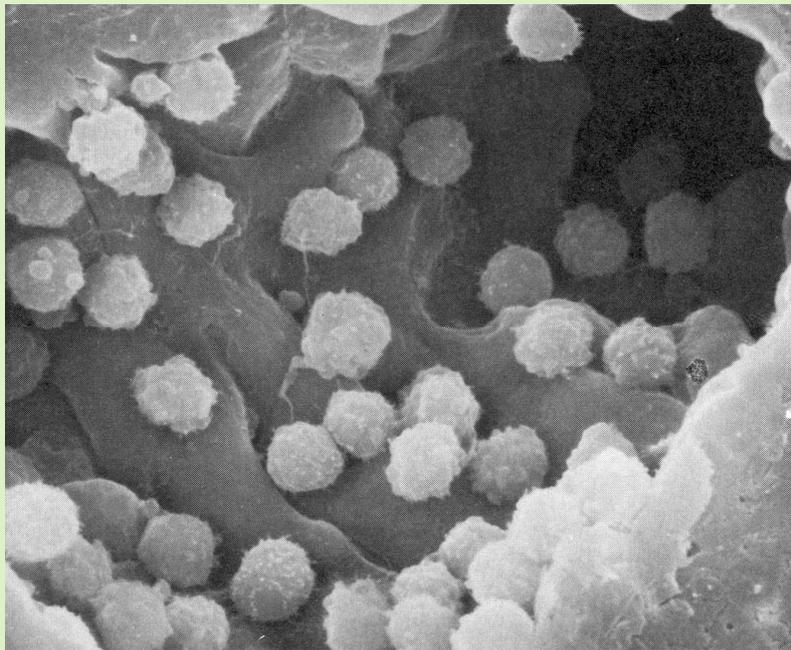
43



Различают селектины L-, E- и P-типа, расположенные на лимфоцитах (L), эндотелии (E) и тромбоцитах (P).

Роллинг лейкоцитов по кровеносным сосудам

44

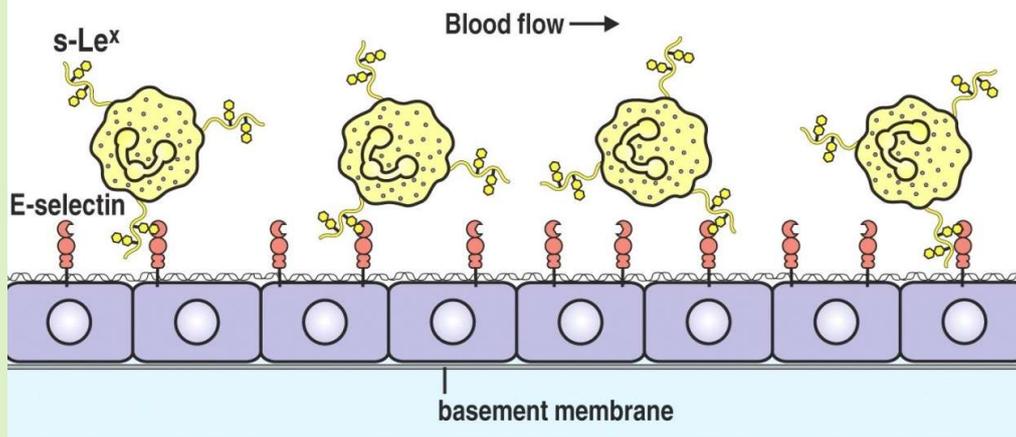


Эти лектины вовлечены в роллинг лейкоцитов по кровеносным сосудам. Эта микрофотография демонстрирует то, как лейкоциты «катятся» по стенкам кровеносного сосуда.

Роллинг лейкоцитов, опосредованный Е- и Р-селектинами

45

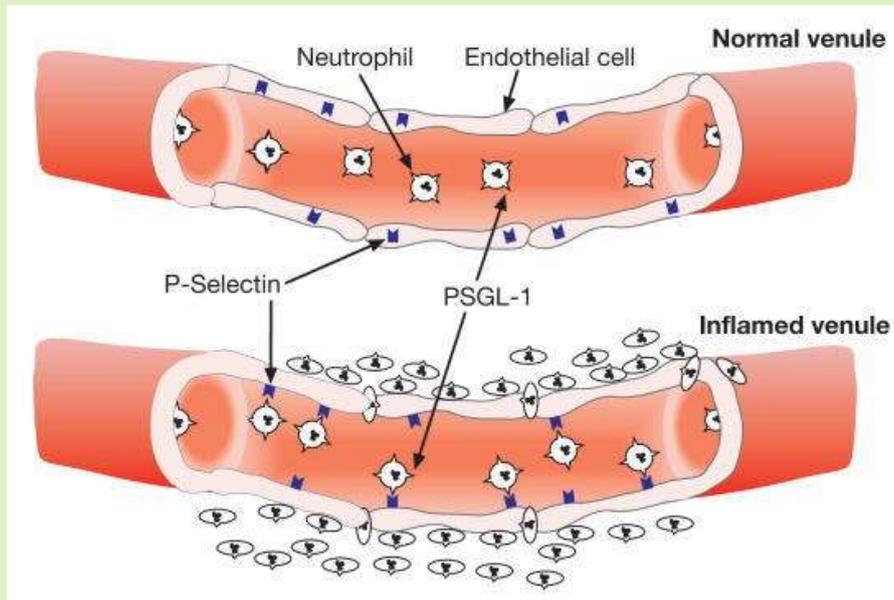
Selectin-mediated adhesion to leukocyte sialyl-Lewis^x is weak, and allows leukocytes to roll along the vascular endothelial surface



На поверхности эндотелиальных клеток имеются Е-селектины, которые распознают гликопротеины на поверхности лейкоцитов, содержащие олигосахарид сиалил-LewisX (s-LeX). Взаимодействие это не сильное, но достаточное для того, чтобы лейкоцит ненадолго прикрепился к эндотелию, а потом он отрывается под действием тока крови, в результате лейкоциты «катятся» по стенкам сосудов.

Tethering of circulating leukocytes to activated endothelium via interactions between selectins and their ligands. (a) In normal venules, leukocytes flow without adhesive interactions with the endothelium, but in inflamed vessels, selectins and integrin ligands are expressed on endothelial surfaces. This leads to tethering, rolling, and arrest of circulating leukocytes and their eventual extravasation from the circulation to the surrounding tissue. For example, P-selectin is normally expressed in Weibel–Palade bodies of endothelial cells, but within minutes after endothelial cell activation by thrombin, histamine, hypoxia, or injury, these bodies fuse with the plasma membrane, promoting the expression of P-selectin on the endothelial cell surface. Similarly, P-selectin stored in the α -granules of platelets becomes expressed on the surfaces of platelets within minutes after platelet activation. Leukocytes tether to and roll on activated endothelial cells and platelets. (b) The example shows neutrophils constitutively expressing PSGL-1 and L-selectin on their microvilli. These

cells interact by random contact with membrane P-selectin on endothelial cells through PSGL-1. E-Selectin may also participate in these interactions by binding to PSGL-1 or other ligands on these cells. These interactions enable leukocytes to tether to and roll along the endothelium. Leukocyte–leukocyte interactions involving L-selectin and PSGL-1 are also depicted. Adherent cells become activated by regionally presented chemokines or lipid autacoids. The activated leukocytes express integrins (e.g., LFA-1, CD11a/CD18 and Mac-1, CD11b/CD18) that interact with immunoglobulin-like counterreceptors on endothelial cells (ICAM-1, ICAM-2) to strengthen the adhesion and promote the transmigration of cells from the circulation into the underlying tissues.



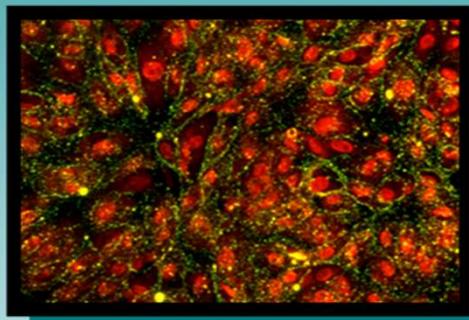
Интенсивность экспрессии селектинов на поверхности эндотелия определяется состоянием организма. Так в норме селектины практически не экспрессируются, поэтому лейкоциты свободно разносятся током крови. Однако при воспалении селектины мгновенно экспрессируются на поверхности сосудов, и лейкоциты начинают «цепляться» за них, обеспечивая тем самым роллинг.

Tethering of circulating leukocytes to activated endothelium via interactions between selectins and their ligands. (a) In normal venules, leukocytes flow without adhesive interactions with the endothelium, but in inflamed vessels, selectins and integrin ligands are expressed on endothelial surfaces. This leads to tethering, rolling, and arrest of circulating leukocytes and their eventual extravasation from the circulation to the surrounding tissue. For example, P-selectin is normally expressed in Weibel–Palade bodies of endothelial cells, but within minutes after endothelial cell activation by thrombin, histamine, hypoxia, or injury, these bodies fuse with the plasma membrane, promoting the expression of P-selectin on the endothelial cell surface. Similarly, P-selectin stored in the α -granules of platelets becomes expressed on the surfaces of platelets within minutes after platelet activation. Leukocytes tether to and roll on activated endothelial cells and platelets. (b) The example shows neutrophils constitutively expressing PSGL-1 and L-selectin on their microvilli. These

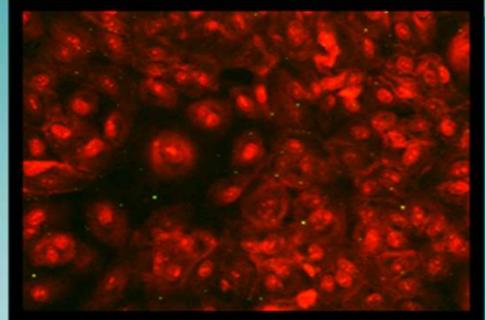
cells interact by random contact with membrane P-selectin on endothelial cells through PSGL-1. E-Selectin may also participate in these interactions by binding to PSGL-1 or other ligands on these cells. These interactions enable leukocytes to tether to and roll along the endothelium. Leukocyte–leukocyte interactions involving L-selectin and PSGL-1 are also depicted. Adherent cells become activated by regionally presented chemokines or lipid autacoids. The activated leukocytes express integrins (e.g., LFA-1, CD11a/CD18 and Mac-1, CD11b/CD18) that interact with immunoglobulin-like counterreceptors on endothelial cells (ICAM-1, ICAM-2) to strengthen the adhesion and promote the transmigration of cells from the circulation into the underlying tissues.

**Е-Селектин экспрессируется на
активированных эндотелиальных клетках**

47



Активированные клетки
+ SiaLe^x-флуоресцентная частица

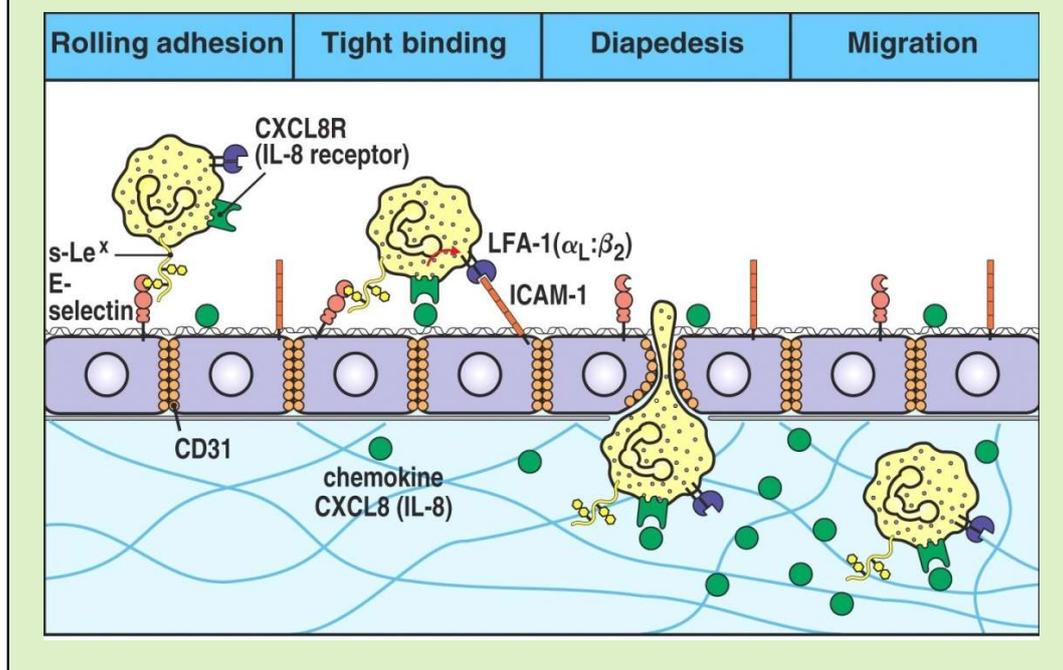


То же с неактивированными
клетками

Е-Селектин экспрессируется на активированных эндотелиальных клетках

Прикрепление лейкоцитов к эндотелиальным клеткам и экстравазация из сосуда в ткань

48

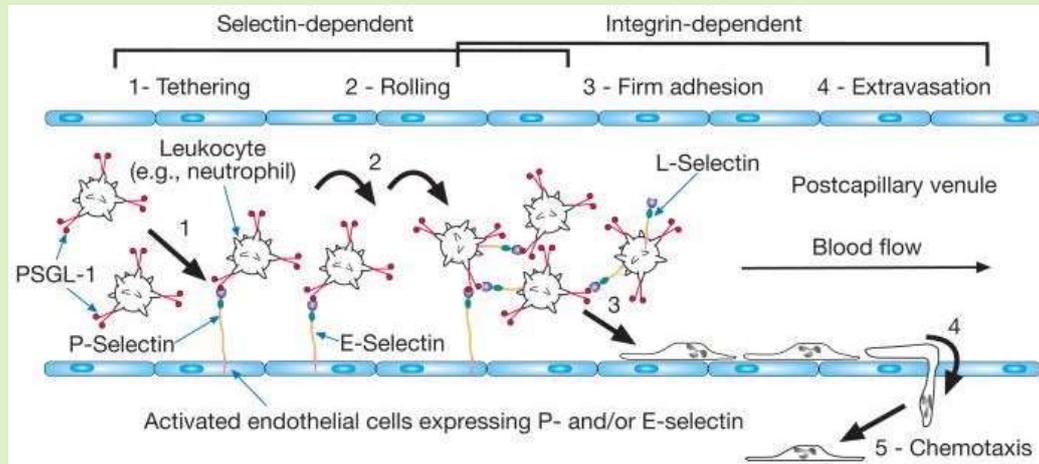


Такие «катящиеся» лейкоциты экспрессируют рецепторы, узнающие хемокины, взаимодействуют с хемокинами через белок-белковые взаимодействия, благодаря чему это «качение» останавливается. Далее взаимодействие с поверхностью сосуда усиливается интегринами, после чего лейкоцит проникает в ткань и мигрирует к очагу воспаления (хемотаксис).

Tethering of circulating leukocytes to activated endothelium via interactions between selectins and their ligands. (a) In normal venules, leukocytes flow without adhesive interactions with the endothelium, but in inflamed vessels, selectins and integrin ligands are expressed on endothelial surfaces. This leads to tethering, rolling, and arrest of circulating leukocytes and their eventual extravasation from the circulation to the surrounding tissue. For example, P-selectin is normally expressed in Weibel–Palade bodies of endothelial cells, but within minutes after endothelial cell activation by thrombin, histamine, hypoxia, or injury, these bodies fuse with the plasma membrane, promoting the expression of P-selectin on the endothelial cell surface. Similarly, P-selectin stored in the α -granules of platelets becomes expressed on the surfaces of platelets within minutes after platelet activation. Leukocytes tether to and roll on activated endothelial cells and platelets. (b) The example shows neutrophils constitutively expressing PSGL-1 and L-selectin on their microvilli. These

cells interact by random contact with membrane P-selectin on endothelial cells through PSGL-1. E-Selectin may also participate in these interactions by binding to PSGL-1 or other ligands on these cells. These interactions enable leukocytes to tether to and roll along the endothelium. Leukocyte–leukocyte interactions involving L-selectin and PSGL-1 are also depicted. Adherent cells become activated by regionally presented chemokines or lipid autacoids. The activated leukocytes express integrins (e.g., LFA-1, CD11a/CD18 and Mac-1, CD11b/CD18) that interact with immunoglobulin-like counterreceptors on endothelial cells (ICAM-1, ICAM-2) to strengthen the adhesion and promote the transmigration of cells from the circulation into the underlying tissues.

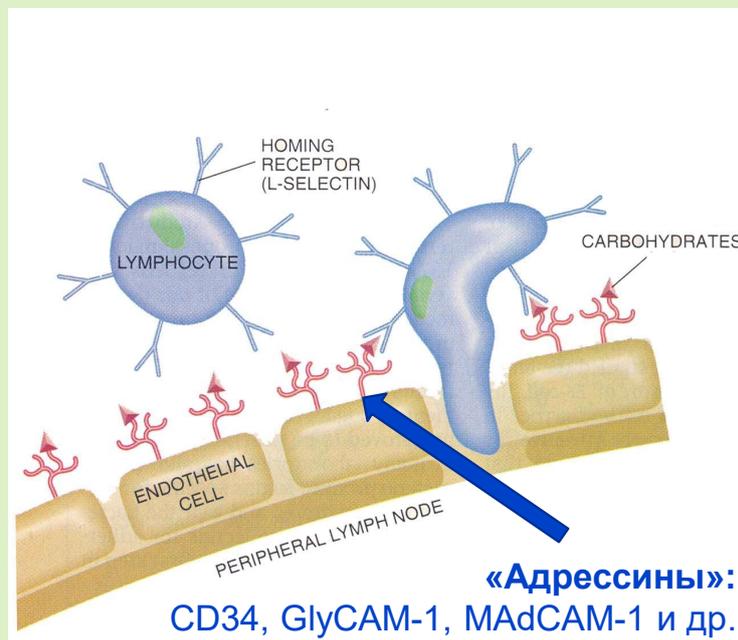
Мобилизация лейкоцитов к сайту воспаления: 49 этапы



На поверхности лейкоцитов есть L-селектины, которые распознают углеводные лиганды на поверхности соседних лейкоцитов, благодаря чему происходит агрегация лейкоцитов и еще большее их затормаживание и адгезия к поверхности сосуда.

L-Селектин-опосредованный роллинг: возвращение в лимфоидную ткань («хоминг»)

50



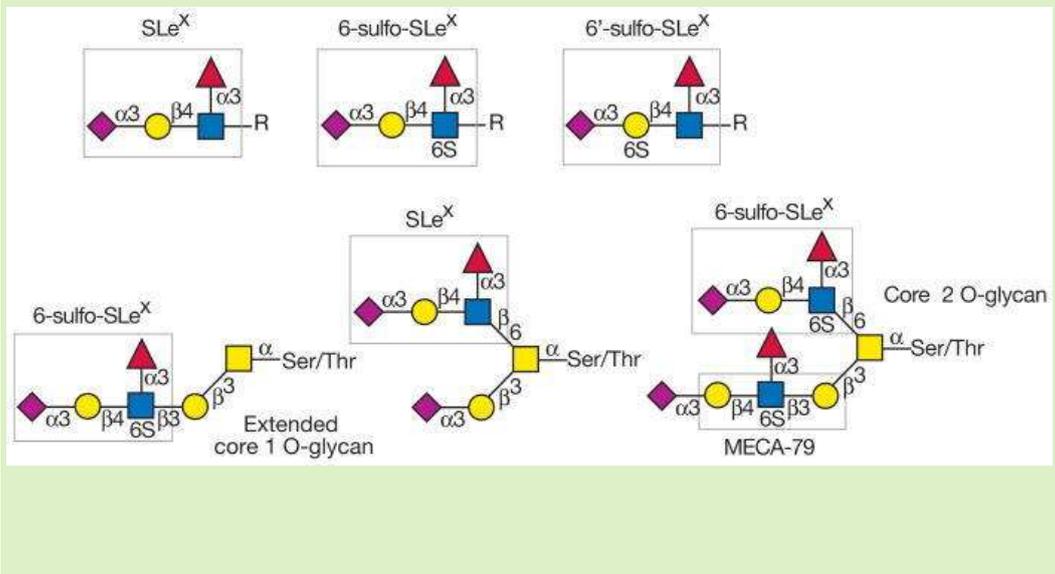
L-Селектины лимфоцитов также призваны направлять клетки в лимфоидную ткань («хоминг»). Для этого на поверхности эндотелиальных клеток экспрессируются их углеводные лиганды («адрессины»)

Лимфоциты вторичных лимфоидных органов находятся в постоянном движении, перемещаясь по маршруту «лимфоидная ткань—лимфа—кровь—лимфоидная ткань». Это единственная категория клеток, способная к рециркуляции в системе «кровь-ткани». Ежечасно в процесс вовлекается 1-2% лимфоцитов, которые меняют свои позиции на периферии, переходя из одного лимфоидного отсека в другие. Возвращение в лимфоидную ткань происходит через специализированные участки посткапиллярных венул вторичных лимфоидных органов. Они выстланы особым типом эндотелиальных клеток (кубический, или высокий эндотелий), который экспрессирует рецепторы («адрессины»), обеспечивающие адгезию и выход лимфоцитов из кровотока. Адрессины называют также молекулами «хоминга» (от англ. homing – возврат), так как они определяют избирательность тканевого распределения лимфоцитов.

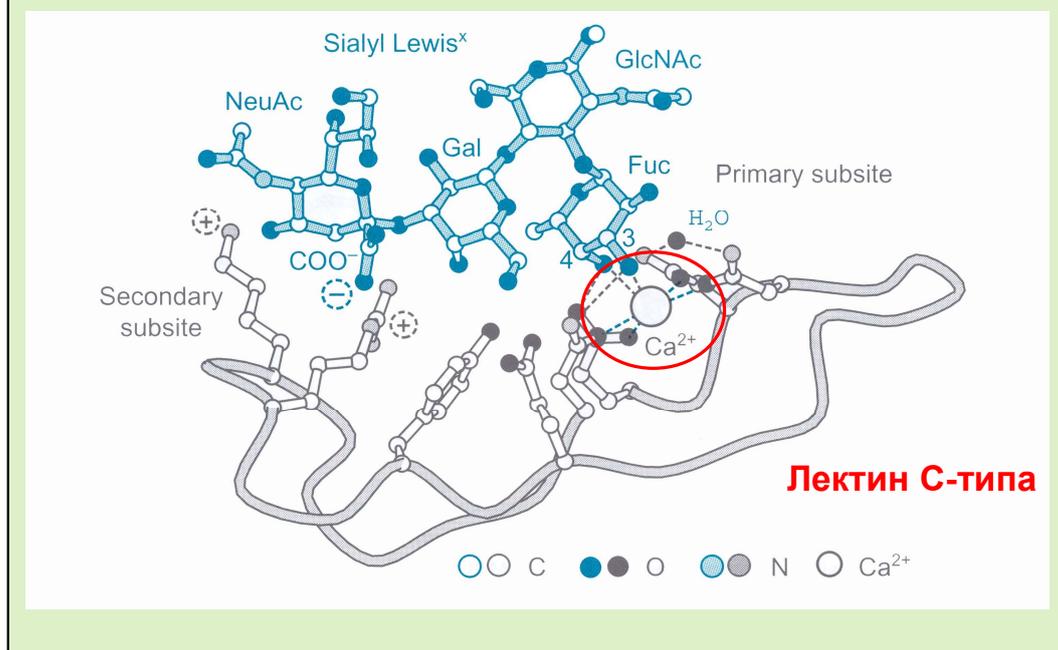
L-селектин на лимфоцитах и **адрессин** на эндотелиальных клетках обеспечивают направленную миграцию лимфоцитов в определенный

орган.

SiaLe^x – общий лиганд всех селектинов



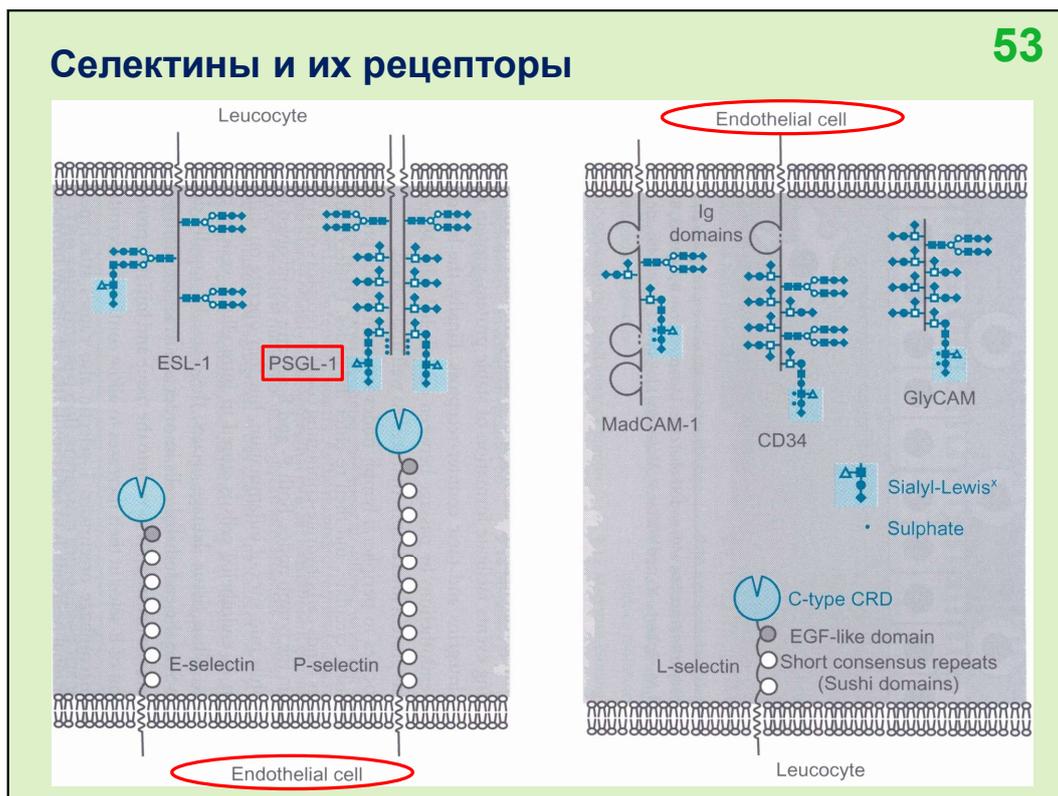
Такие углеводные лиганды, распознающиеся селектинами, являются медиаторами селектин-опосредованной адгезии клеток. Это гликаны, содержащие сialiл-LewisX или его сульфатированные производные.



Е-селектины образуют комплекс с сиалил-LewisX при участии ионов кальция. Первичное взаимодействие образуется с остатком фукозы, а вторичное с участием карбоксильной групп N-ацетилнейраминовой кислоты и положительно заряженных остатков аминокислотной последовательности.

Селектины и их рецепторы

53



На картинках слева и справа ПО ОТДЕЛЬНОСТИ показаны селектины и их углеводные лиганды (с названиями этих гликопротеинов) на клетках-партнерах (эндотелиальных клетках и лейкоцитах). Обратите внимание на то, что картинки «перевернуты» для того, чтобы сверху всегда были углеводные лиганды селективов. Терминальные детерминанты сиалил-LewisX (голубые прямоугольники) могут экспрессироваться как на O-цепях (муцины), так и на N-цепях гликопротеинов (обратите внимание на характерный кор N- цепей гликопротеинов).

Доменная структура Р-, Е-, L-селектинов и PSGL-1

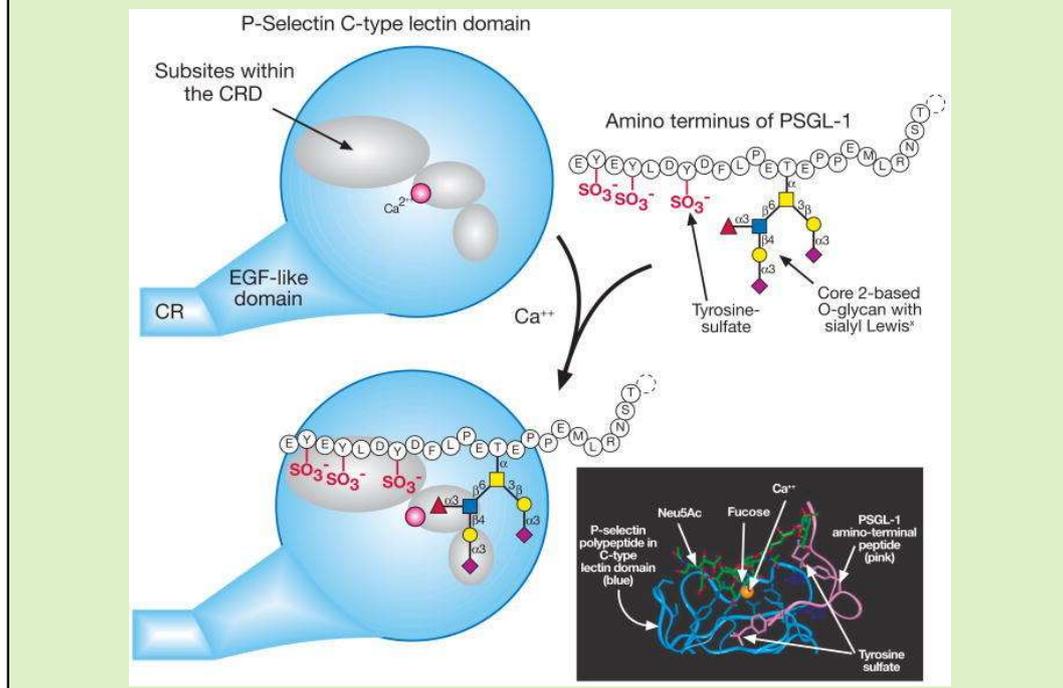
54



Анализ первичной аминокислотной последовательности приводит к выделению нескольких доменов в полипептидной цепи селектинов, которые имеют сходное строение. Все они на концах полипептидной цепи содержат лектиновый домен С-типа, который взаимодействует с гликановыми цепями гликопротеина, а также с остатками тирозинсульфата.

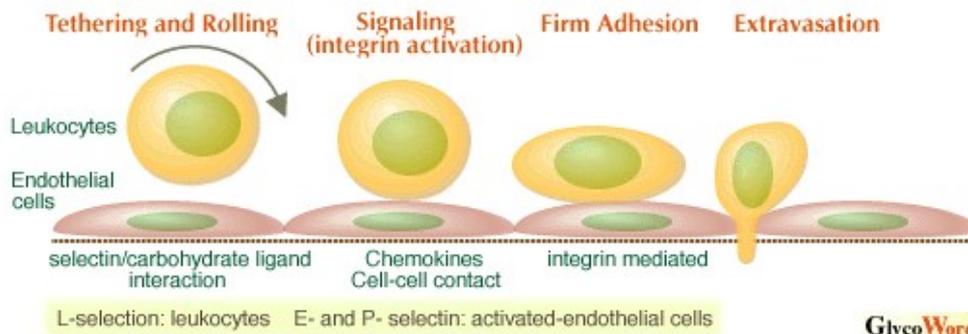
Взаимодействие между Р-селектином и амино-концом его лиганда – PSGL-1

55



Лектиновый домен С-типа Р-селектина взаимодействует не только с гликановыми цепями, но и с остатками тирозин-сульфата. На слайде показаны участки связывания этих фрагментов. Здесь уместно подчеркнуть, что природа не знает деления на химию углеводов, аминокислот или липидов. Это условное деление, придуманное людьми. Для адгезии к эпителию лейкоциты используют все доступные им способы взаимодействия с молекулами-партнерами. Важно, что селективность этой адгезии определяется углеводными структурами.

2 Multistep adhesive and signaling events during leukocyte extravasation: inflammation and lymphocyte homing



Роллинг лейкоцитов по кровеносным сосудам – это направленный транспорт лейкоцитов в очаг воспаления, где экспрессируются E- и P-селектины, либо в лимфоидную ткань, экспрессирующую углеводные лиганды L-селектинов. Первичные взаимодействия – углевод-белковые, а далее более прочные белок-белковые взаимодействия с участием интегринов.

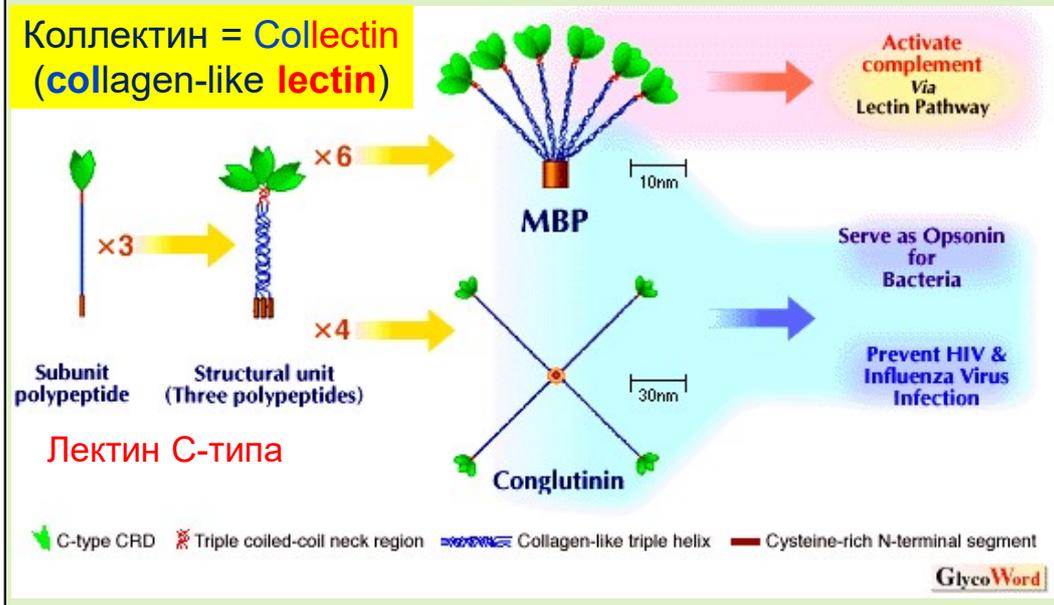
Коллектины и фиколины

Теперь рассмотрим особую группу лектинов, к которым относятся коллектины и родственные им фиколины.

Коллектины и родственные немембранные белки: МВР (MBL) и конглутинин

58

Сходство с белками системы комплемента

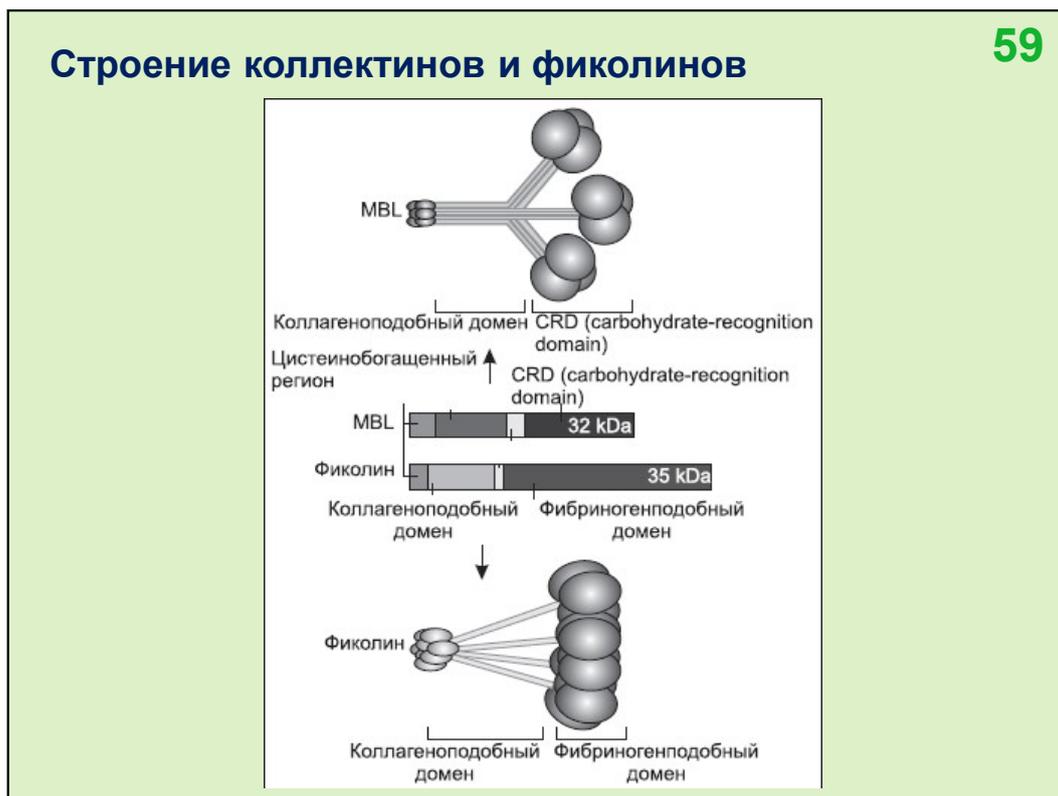


Это не мембранные, а растворимые белки. Название коллектины определяется тем, что их аминокислотная последовательность схожа с таковой у коллагена, поэтому это - КОЛлагеноподобные ЛЕКТИНЫ (КолЛектины). На слайде представлено строение полипептидной субъединицы, на конце которой расположен лектиновый домен С-типа. Три такие полипептидные цепи могут образовывать спирали, которые в свою очередь могут группироваться в более сложные структуры по четыре, как у конглутинина или по шесть, как у маннан-связывающего белка (МВР, другие названия – маннозо-связывающий белок, маннан-связывающий лектин (МВЛ)).

Эти лектины являются компонентами системы врожденного иммунитета (без участия антител), участвуя в активации системы комплемента. Коллектины предотвращают инфицирование некоторыми вирусами (вирус гриппа и ВИЧ), а для многих бактерий они выступают как опсоины. Присутствие коллектинов повышает устойчивость организма к инфекциям. Вот самый яркий пример. Двухлетняя девочка была очень больна и находилась в больнице с 4-месячного возраста. После нескольких инъекций МВЛ она выздоровела и не болела в течение трех лет. Эти данные указывают на то, что МВЛ в будущем может применяться в качестве лекарства для людей с иммуно-дефицитом и для повышения устойчивости к вирусной или бактериальной инфекции.

Строение коллектинов и фиколинов

59



Здесь показано строение коллектинов и родственное строение у фиколинов, выполняющих сходные функции.

Лектиновый путь активации комплемента: действие коллектинов и фиколинов

60

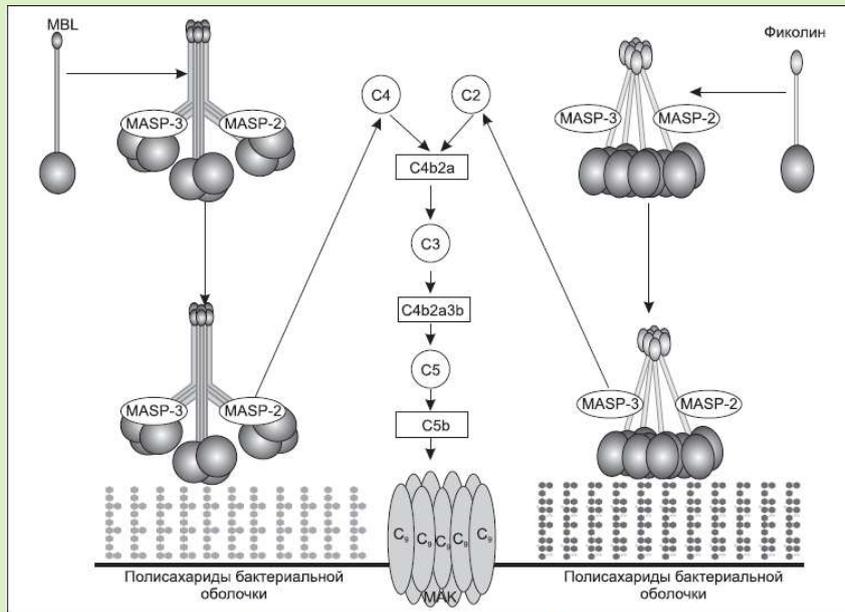


Рисунок 5. Механизм действия MBL и фиколинов

Примечание: С – компоненты комплемента, МАК – мембраноатакующий комплекс, MASP – MBL-ассоциированные сериновые протеазы.

При связывании этих лектинов с полисахаридами бактерий активируются белки системы комплемента, что приводит к формированию мембраноатакующего комплекса, который разрушает мембрану бактерий

Спектр микроорганизмов, распознающихся коллектином MBL

62

Группа микроорганизмов	Микроорганизмы
Бактерии	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>Enterococcus</i> spp., <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Neisseria meningitidis</i> , <i>Neisseria gonorrhoeae</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella</i> spp., <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Salmonella montevideo</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> , <i>H. pylori</i> , <i>Chlamydia trachomatis</i> , <i>Chlamydia pneumoniae</i> , <i>Propionibacterium acnes</i> , <i>Mycobacterium avium</i> , <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , <i>Mycobacterium leprae</i> , <i>Leishmania chagasi</i>
Вирусы	ВИЧ-1, -2, вирус простого герпеса, вирус гриппа А, вирус гепатита В, вирус гепатита С
Грибы	<i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Cryptococcus neoformans</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Простейшие	<i>Plasmodium falciparum</i> , <i>Cryptosporidium parvum</i> , <i>Trypanosoma cruzi</i>

Маннозо-связывающий белок распознает большое количество патогенов. Поэтому в норме, когда организм не ослаблен, система врожденного иммунитета благодаря этому белку защищает нас от широкого спектра инфекций.



Сиглеки

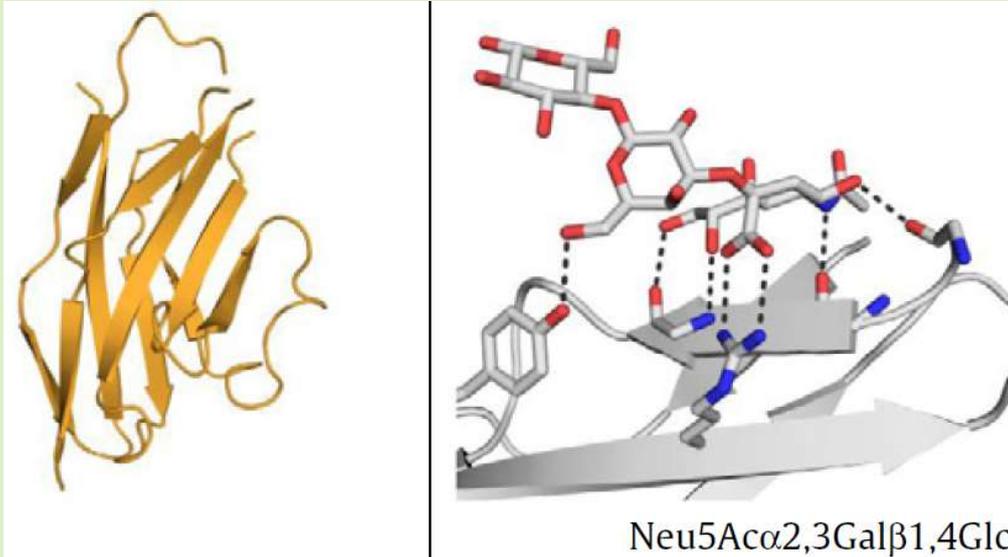
Лектины I-типа

Siglec (sialic acid-binding, immunoglobulin-like lectin)

Следующий тип лектинов по структуре полипептидной цепи напоминает иммуноглобулины, поэтому они относятся к лектинам I-типа, а сиглеками они называются из-за способности связывать сиаловые кислоты.

Типичная третичная структура лектинов I-
типа: Ig-подобный фолд

64

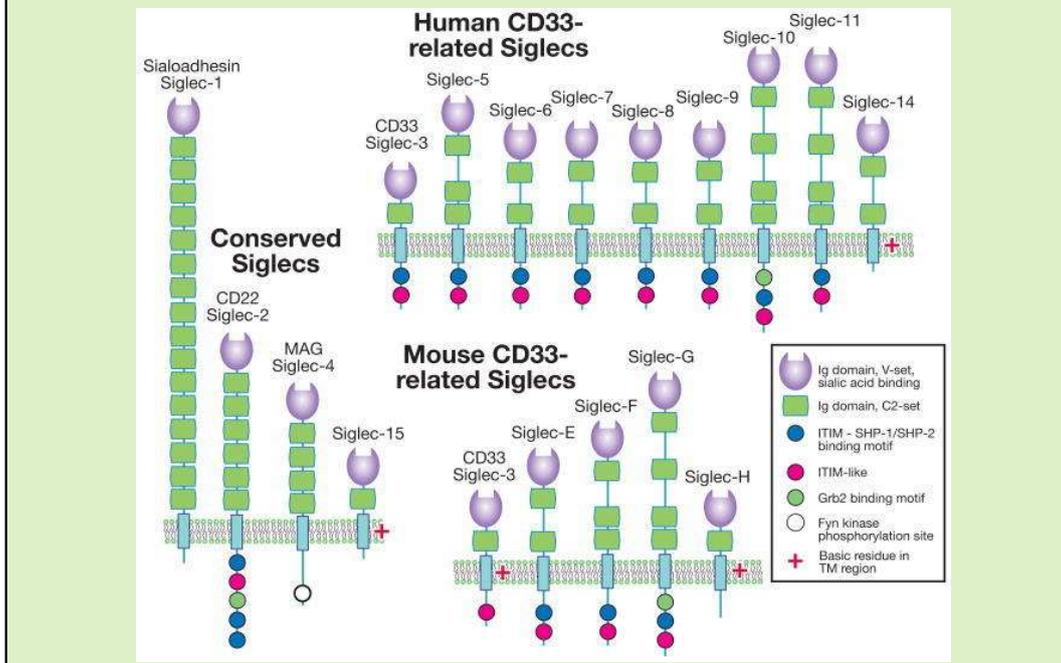


Сиглеки тоже имеют очень характерный иммуноглобулин-подобный фолд

Сиглеки

65

Siglec (sialic acid-binding, immunoglobulin-like lectin)

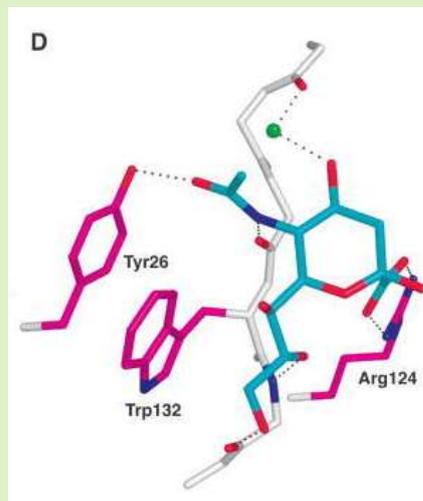
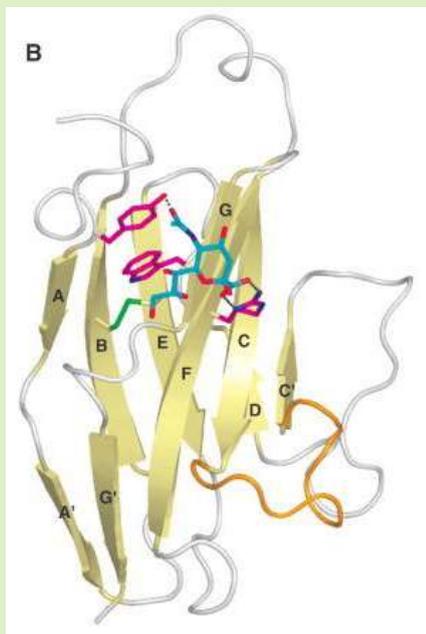


Сиглек = Siglec (sialic acid-binding, immunoglobulin-like lectin).

Известны несколько типов достаточно консервативных сиглеков, названия которых отличаются только номерами, но есть и другие названия, которые связаны с функциями этих лектинов (например, сиглек-1 или сиалоадгезин, сиглек-4 или миелин-ассоциированный гликопротеин).

Комплекс сиглека-7 с сиаловой кислотой

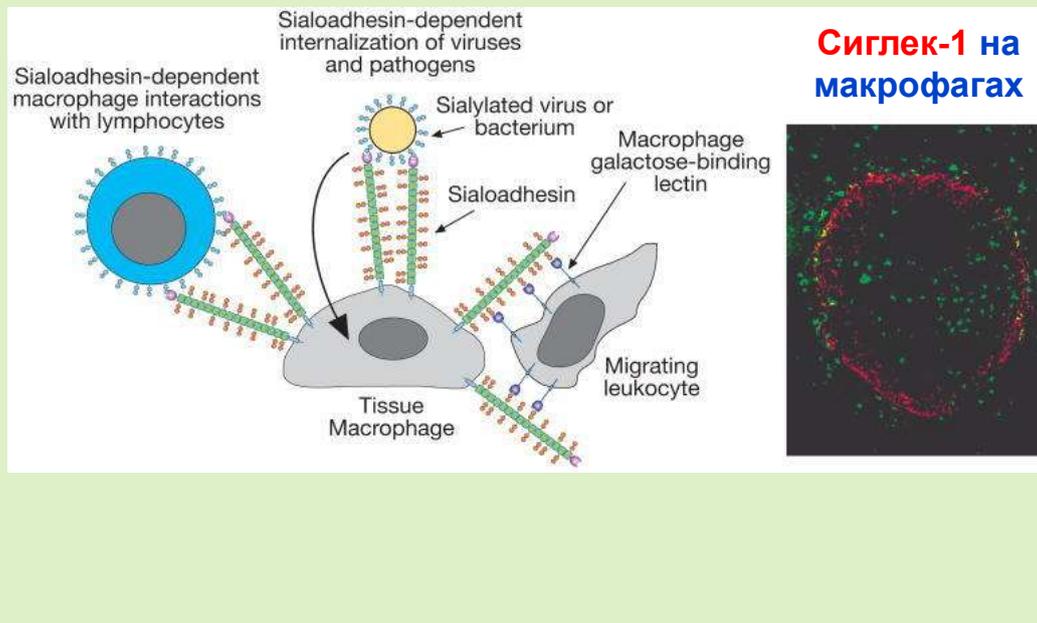
66



На слайде показан комплекс сиглека-7 с сиаловой кислотой

Биологические функции, медируемые сиглеком-1 (сиалоадгезин, Sn, CD169)

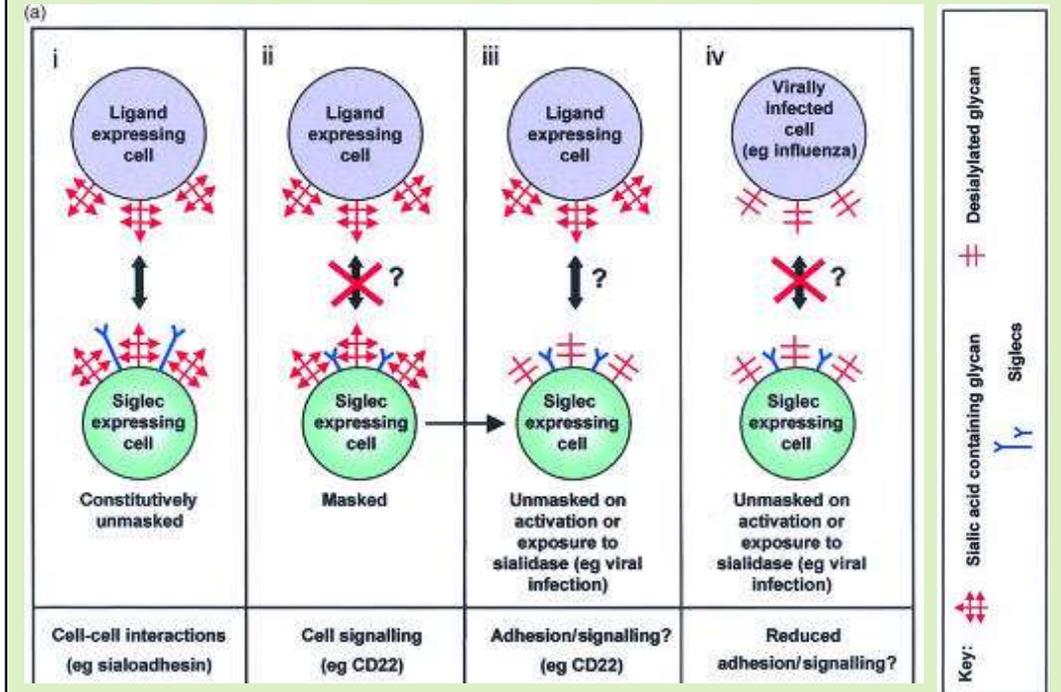
67



Сиглек-1 (сиалоадгезин, Sn, CD169), который экспрессируется на макрофагах, распознает гликаны, содержащие сиаловые кислоты, и является интермедиатом взаимодействия макрофагов и лимфоцитов, позволяет интернализировать вирусы и другие патогены, участвует в миграции лейкоцитов.

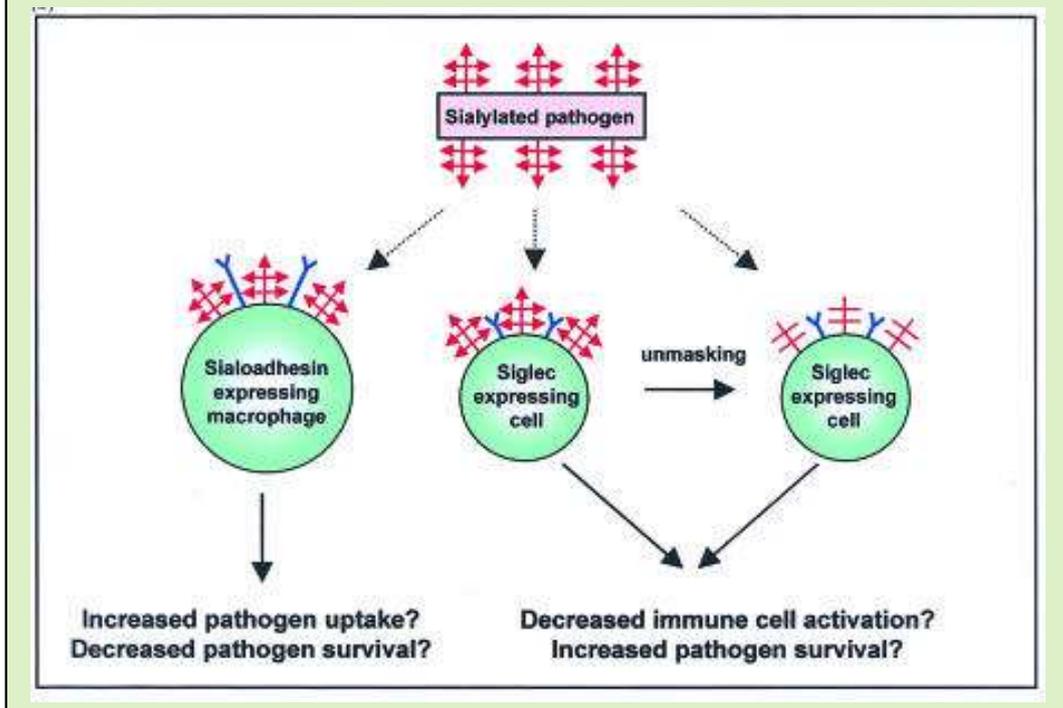
«Маскировка» сиглека вследствие цис-взаимодействий

68



Взаимодействие сиглека с сialiрированными гликанами может быть нивелировано, когда на клетке, экспрессирующей сиглеку, одновременно имеются и гликаны, содержащие остатки N-ацетилнейраминовой или N-гликолилнейраминовой кислоты, которые «маскируют» связывание с гликанами соседней (например, патогенной) клетки вследствие цис-взаимодействий. Десалилирование может ингибировать эффект маскировки, тогда взаимодействие сиглека с соседней клеткой, несущей сialiрированный лиганд, восстанавливается.

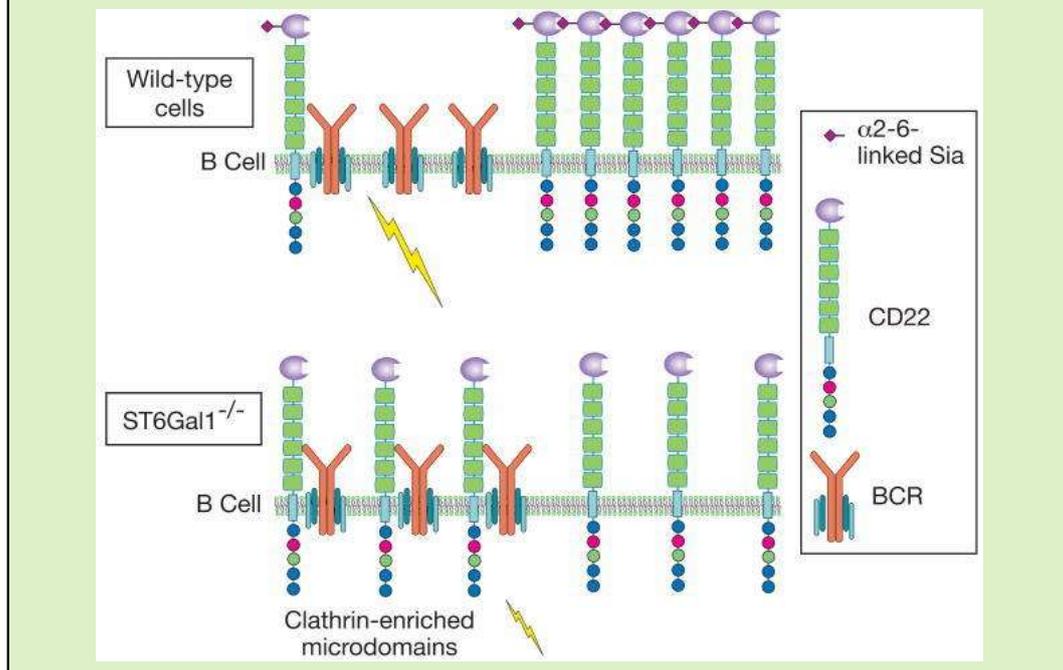
«Демаскирование» сиглека: десиаилирование 69



«Демаскирование» сиглека: десиаилирование

Сиглек-2 (CD22) на В-лимфоцитах: цис-взаимодействие модулирует сигнал BCR

70



Подобное цис-взаимодействие хорошо было изучено в случае сиглека-2, экспрессирующегося на В-лимфоцитах.

Сиглек-2 является ингибиторным ко-рецептором В-клеточного рецептора (BCR, мембрано-связанный иммуноглобулин IgM): он понижает его чувствительность и предотвращает гиперстимуляцию клетки антигеном. В клеточной мембране В-клеток сиглек-2 находится в контакте с В-клеточным рецептором и понижает его активность. Стимуляция В-клеточного рецептора антигеном приводит к фосфорилированию остатка тирозина в цитоплазматическом хвосте полипептидной цепи сиглека-2 и активации тирозин-фосфатазы, которая дефосфорилирует (то есть дезактивирует) многие молекулы, вовлечённые в передачу сигнала от В-клеточного рецептора. Это приводит к ингибированию передачи сигнала через В-клеточный рецептор.

Способность сиглека-2 ингибировать передачу сигнала в В-клетку, индуцированную связыванием В-клетки с антигеном, напрямую зависит от пространственной близости молекулы сиглека-2 и В-клеточного рецептора. В клеточной мембране нормальных (wild-type, на слайде сверху) В-клеток лишь малая доля молекул сиглека-2 находится в контакте с В-клеточным рецептором (на слайде сверху). Основная часть молекул сиглека-2 образует пространственно отделенные гомомультимеры вследствие цис-взаимодействий с $\alpha 2-6$ -сиалилированными

углеводными лигандами на поверхности В-клеток (на слайде вверху).

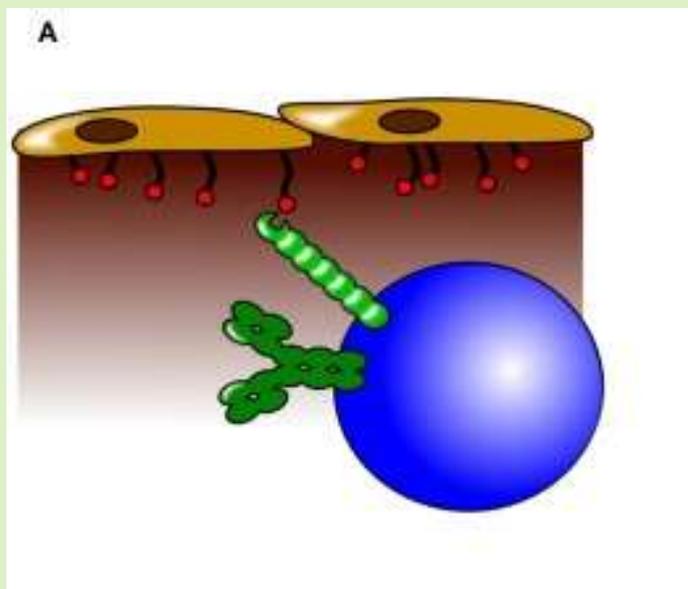
В мутантах, лишенных сиалил-трансферазы и, значит, лигандов сиглека-2, это цис-взаимодействие отсутствует (происходит демаскирование сиало-связывающего сайта сиглека-2). Это приводит к тому, что большая доля молекул сиглека-2 находится в контакте с В-клеточным рецептором (на слайде снизу). Как следствие передача сигнала снижается.

Изменение числа цис-контактов сиало-связывающего сайта сиглека-2 с $\alpha 2-6$ -сиалилированными углеводными лигандами на поверхности В-клеток (цис-взаимодействие) и, как следствие эффективность ингибирования передачи сигнала, может модулироваться степенью сиалилирования клеточной поверхности. Не случайно, передача сигнала через В-клеточный рецептор осуществляется только в лимфоидных тканях, где особенно много сиалилированных лигандов сиглека-2, экспрессирующихся на В-клетках.

И потому особенно ярко выражены цис-взаимодействия, что приводит к снижению порога активации В-клеток и делает возможной эффективный синтез этими клетками антител против чужеродных антигенов.

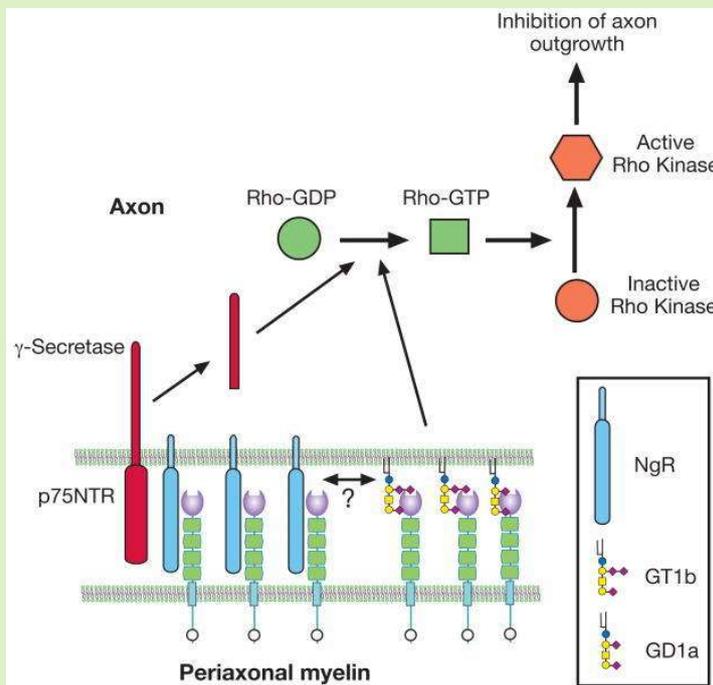
**Сиглек-2 («демаскированный»):
хоминг В-лимфоцитов в костный мозг**

71



Хоуминг В-лимфоцитов в костный мозг происходит при участии десилилированного сиглека-2.

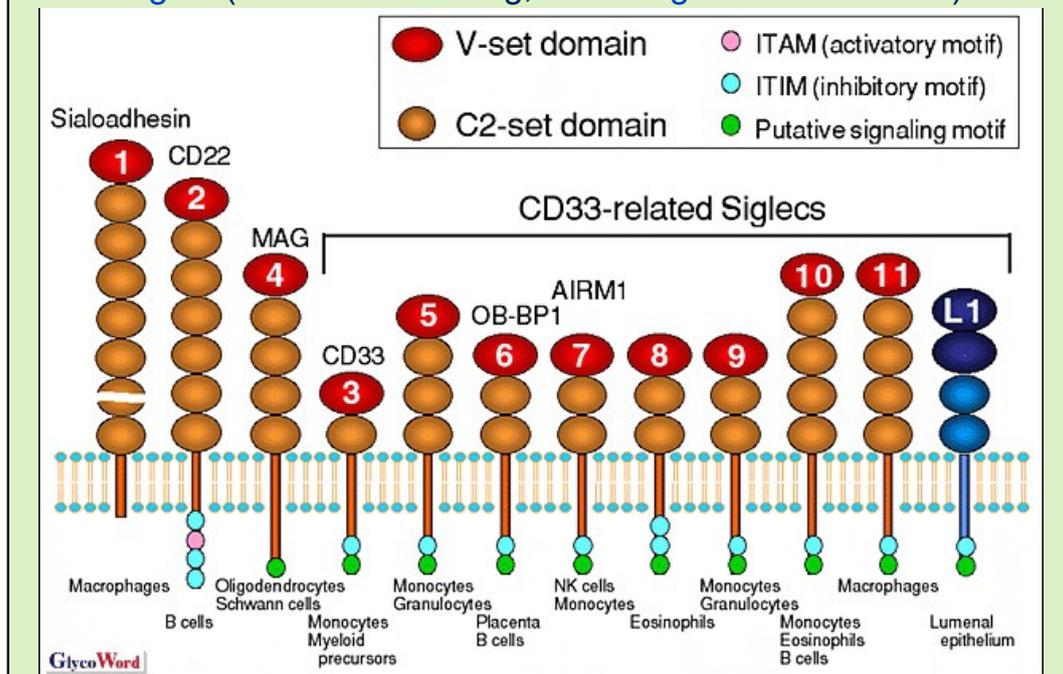
Ингибирование роста аксонов сиглеком-4 (MAG) 72



Известен пример ингибирования роста аксонов на нервных клетках, которое осуществляет другой лектин (миелин-ассоциированный гликопротеин, сиглек-4), способный распознавать углеводные структуры ганглиозидов на нейронах. На этом слайде представлена схема, демонстрирующая взаимодействие сиглека-4 с аксоном. Поэтому разработка лекарственного препарата, способного ингибировать это взаимодействие, повысит регенерацию аксонов после повреждения и позволит осуществлять передачу нервных импульсов. Это так называемая пластичность нейронов.

Сиглеки человека: экспрессия

Siglec (sialic acid-binding, immunoglobulin-like lectin)



На этом слайде показаны сиглеки человека и те клетки иммунной системы, в которых они экспрессируются.

Сиглеки человека: экспрессия на типах клеток

74



На этом слайде показаны сиглеки человека.

Другая классификация: какие сиглеки экспрессируются на конкретных клетках. Разнообразие поражает.

Углеводная специфичность сиглеков

75

Oligosaccharide	R1	R2	R3	Relative Recognition by Human Siglec											
				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
N-Glycan	+														
O-Glycan	+		+												
Glycolipid	+	+													
◆ = Sia ● = Gal ■ = GlcNAc ■ = GalNAc ▲ = Fuc															
◆ α6 ● β4 ■ β-R1				-	++	++	-	-	-	-	-	-	+	+	-
◆ α3 ● β4 ■ β-R1				++	-	+	+	++	-	-	-	+	++	++	+
◆ α8 ◆ α3 ● β4 ■ β-R1				+	-	+	-	-	-	-	++	+	+	-	++
◆ α3 ● β3 ■ β-R1				++	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-
◆ α3 ● β4 ■ β-R1 ▲ α3				+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-
◆ α3 ● β3 ■ β-R2/α-R3				+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
◆ α3 ● β3 ■ β-R2/α-R3 α6 ◆				?	?	?	++	-	-	+	-	+	?	?	
■ β-R2/α-R3 α6 ◆				+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	

Эта таблица показывает, что специфичность сиглеков довольно ограничена. Обнаружены углеводные лиганды, которые распознаются разными сиглеками.

Известные и предполагаемые функции сиглеков 76

With the exception of MAG and CD22, wherein biological roles in glial cells (maintenance of myelin organization and inhibition of neurite outgrowth) and B cells (dampening the response to BCR ligation), respectively, are well documented, we do not yet know the physiological functions of any other Siglec. The fact that Sn and CD33rSiglecs are found predominantly on cells of the innate immune system suggest that this is where their primary functions lie. Given the highly conserved preference of Sn for α 2-3-linked Neu5Ac and to a lesser extent for α 2-8-linked Neu5Ac, its presence on tissue macrophages, and the lack of cytosolic signaling motifs, it is reasonable to speculate that Sn's primary role may actually lie in recognition and phagocytosis of bacterial pathogens that express Sias. In keeping with this, α 2-3- and α 2-8-linked Neu5Ac (and not Neu5Gc) are the dominant sialylated motifs on bacterial pathogens studied to date. Of course, one cannot rule out an additional intrinsic role of Sn in interactions with other cell types within the hematopoietic or lymphoid systems. The CD33rSiglecs stand in striking contrast to Sn, having rapidly evolving Sia-binding preferences and expression patterns, and inhibitory cytosolic motifs. The best explanation for the findings to date is that these molecules serve to detect the host "sialome" as "self," thereby down-regulating innate immune cell reactivity via their ITIM motifs. In keeping with this notion, a very recent study using siRNA and other techniques has demonstrated a "constitutive repressor activity" of CD33 on human monocytes that involves phosphoinositide 3-kinase-mediated intracellular signaling and requires Sia recognition to function optimally. However, it was also reported that one CD33-related Siglec could be involved in bacterial uptake.

In further exploring Siglec functions, we must remember that potential ligands could be formed not only by Sias on the same cell surface (or on the Siglec itself), but also on other cell surfaces or on soluble glycoproteins. Direct cell-cell interactions could thus potentially occur among Siglec-positive cells or between Siglec-positive cells and another other cell type. Soluble sialylated glycoprotein ligands could also interact directly with Siglec-positive cells, bridge between two such cells, or serve to inhibit cell-cell interactions involving Siglecs.

Здесь перечислены известные и предполагаемые функции сиглеков.
Практически все они обсуждались на предыдущих слайдах.



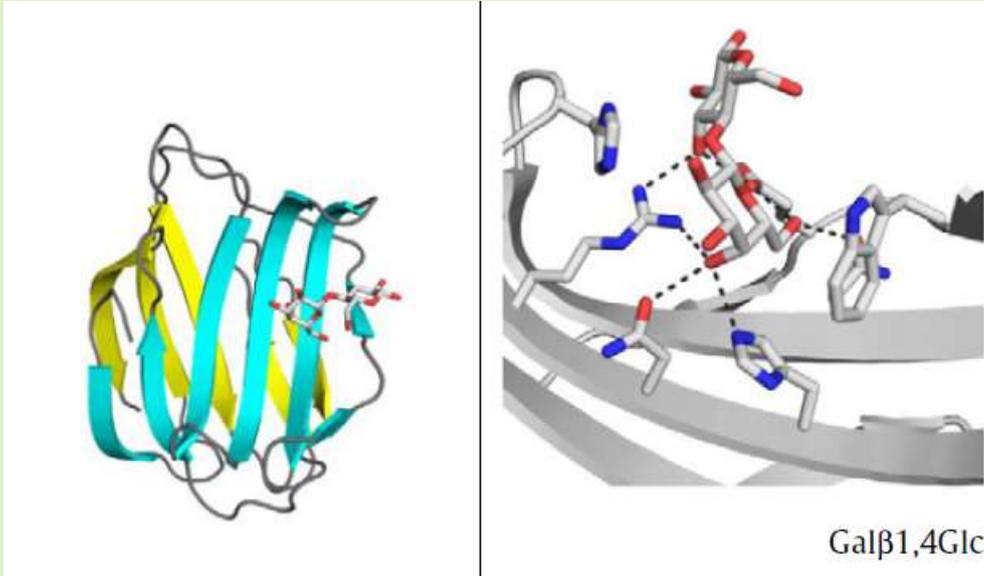
Галектины

Лектины S-типа

Галектины – лектины S-типа. Название выдает их специфичность. Это – галактоза-связывающие белки

Типичная третичная структура галектинов:
 β -сэндвич

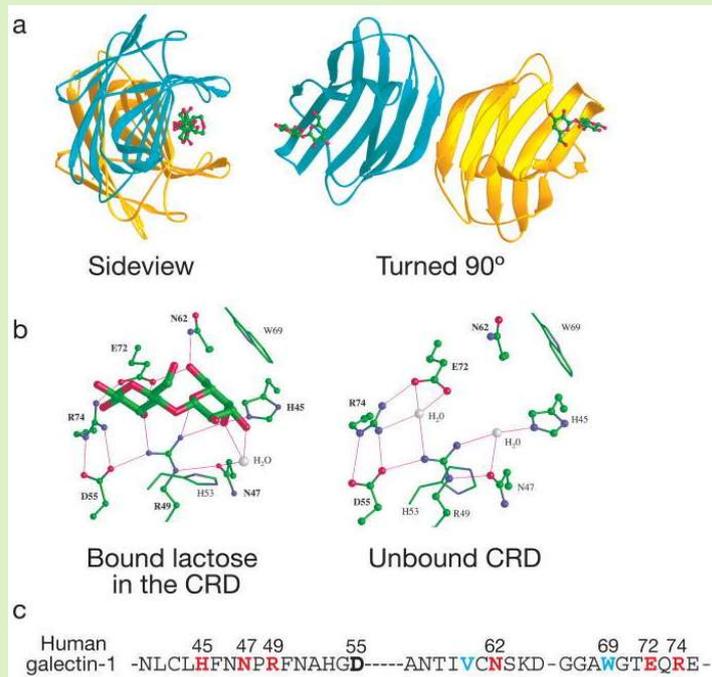
78



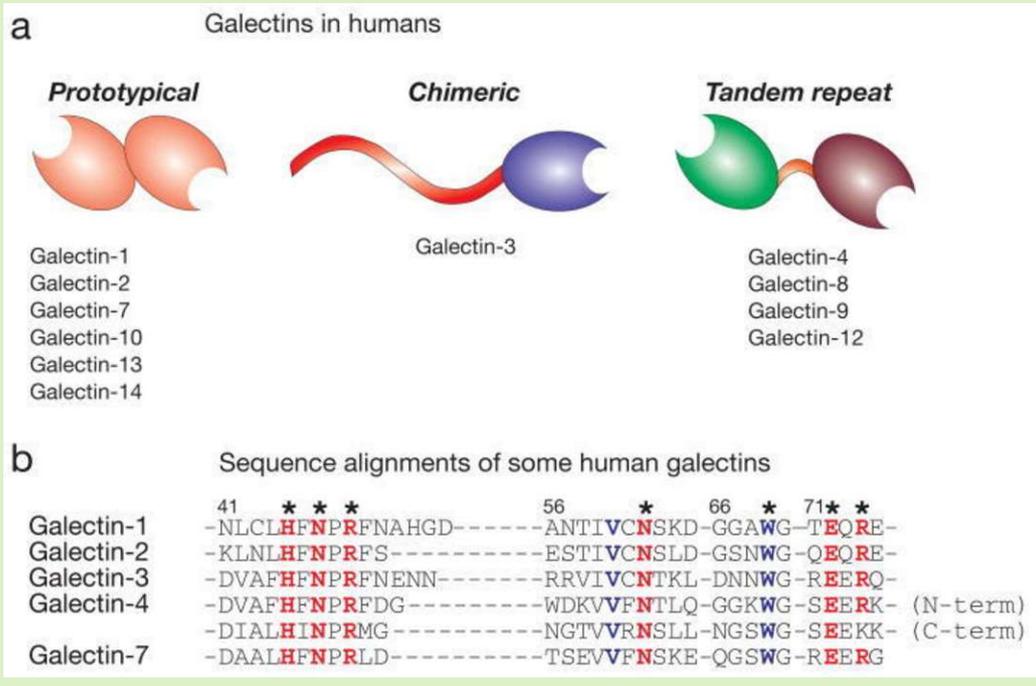
Фолд галектинов, называемый [бета]-сэндвичем, представлен на слайде.

Третьичная структура галектинов: галектин-1

79



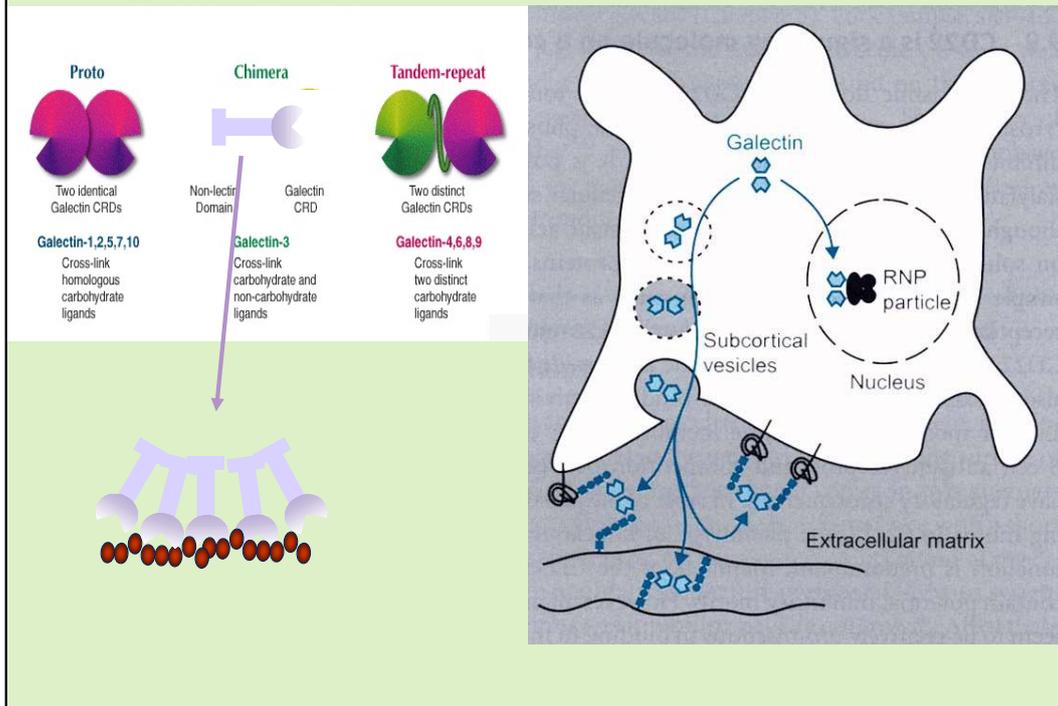
На слайде показан комплекс галектина-1 с лактозой



Известны галектины нескольких типов:

- протогалектины, которых довольно много, существующие в виде гомодимеров, имеют два ИДЕНТИЧНЫХ сайта связывания;
- химерные галектины содержат один сайт связывания и фрагмент, не участвующий во взаимодействии с углеводной цепью;
- тандемные галектины содержат два сайта связывания, разделенные доменом, не участвующим во взаимодействии с углеводной цепью. Специфичность этих сайтов различна.

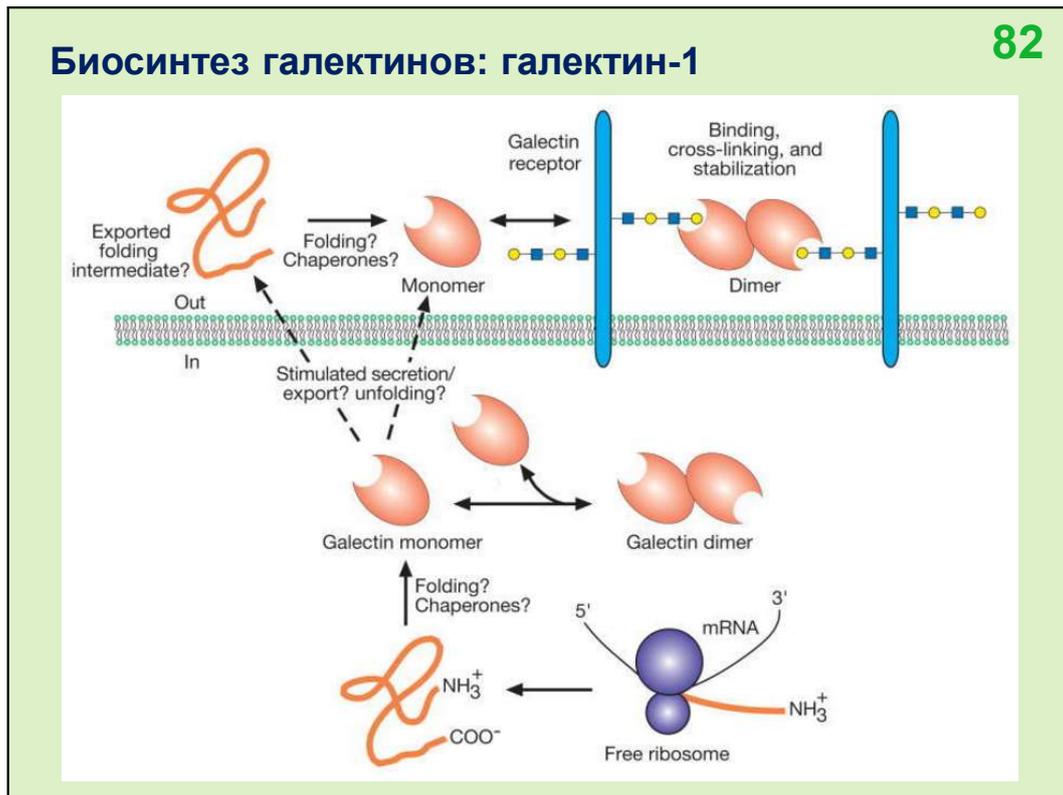
Эти лектины характеризуются некоторой гомологией аминокислотных остатков, поэтому их объединяют в один класс лектинов.



Протогалектины участвуют в распознавании одинаковых углеводных лигандов, а тандемные галектины могут связывать разные углеводные лиганды благодаря разной специфичности своих доменов. Химерные галектины могут приводить к кросс-связыванию углеводных и неуглеводных лигандов.

Биосинтез галектинов: галектин-1

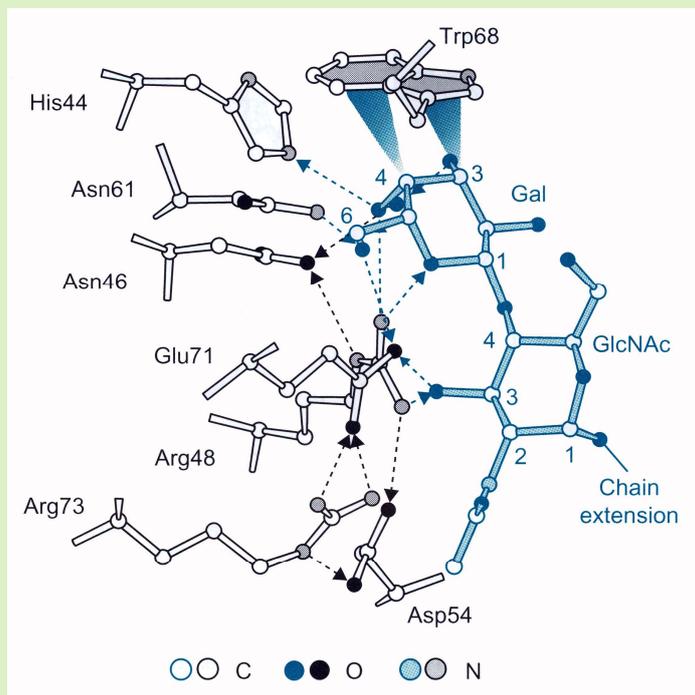
82



Биосинтез галектинов осуществляется в цитоплазме, где синтезируется полипептидная цепь, которая затем сворачивается и транспортируется на внешнюю сторону мембраны. Мономерная форма нестабильна. Димеры дополнительно стабилизируются образованием комплексов с углеводными лигандами.

Комплекс галектина-1 с Gal β 1-4GlcNAc

83



Здесь представлен комплекс галектина-1 с Gal β 1-4GlcNAc

Галектины могут узнавать больше,
чем терминальный остаток Gal β 1-4GlcNAc

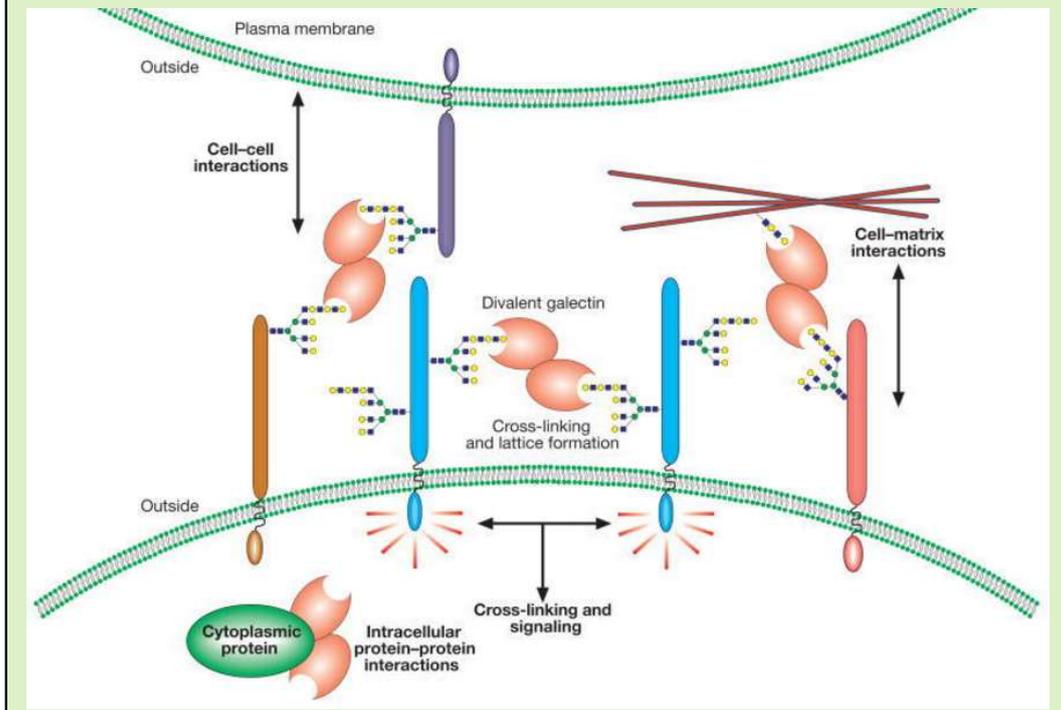
84

(Gal, GalNAc, Fuc, Sia, Su)-Gal β 1-4GlcNAc-X-X-X

Исторически галектинами называли лектины, узнающие терминальные остатки галактозы или галактозамина. Однако теперь установлено, что этот дисахарид не обязательно должен быть терминальным. Все как обычно, оказалось сложнее.

Функциональные взаимодействия галектинов

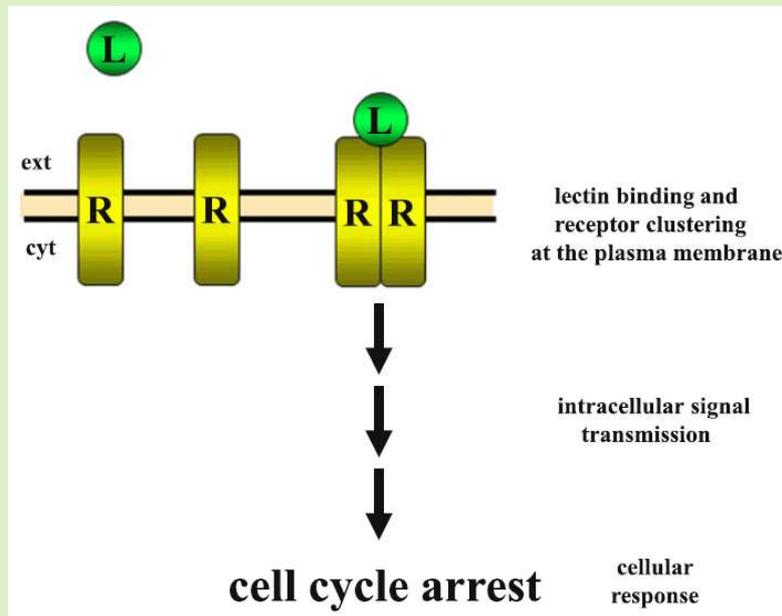
85



Галектины участвуют в межклеточных взаимодействиях, во взаимодействии с межклеточным матриксом, также они могут взаимодействовать со структурами, расположенными на поверхности одной и той же клетки, запуская агрегацию, кластеризацию или сигнальный каскад, в результате которого активируются клеточные рецепторы

**Транслирование «углеводной информации» в
эффекты: связывание лектина – сигнал**

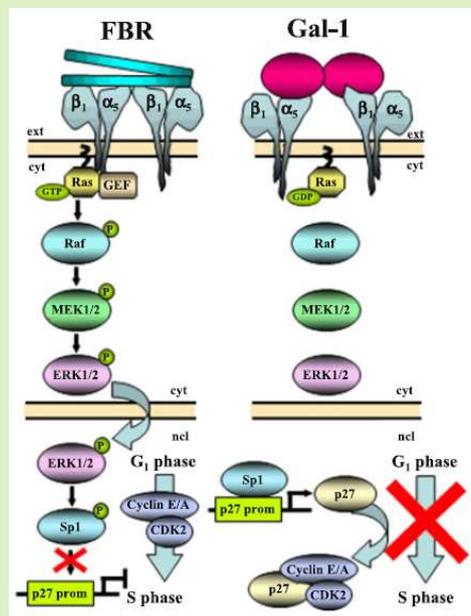
86



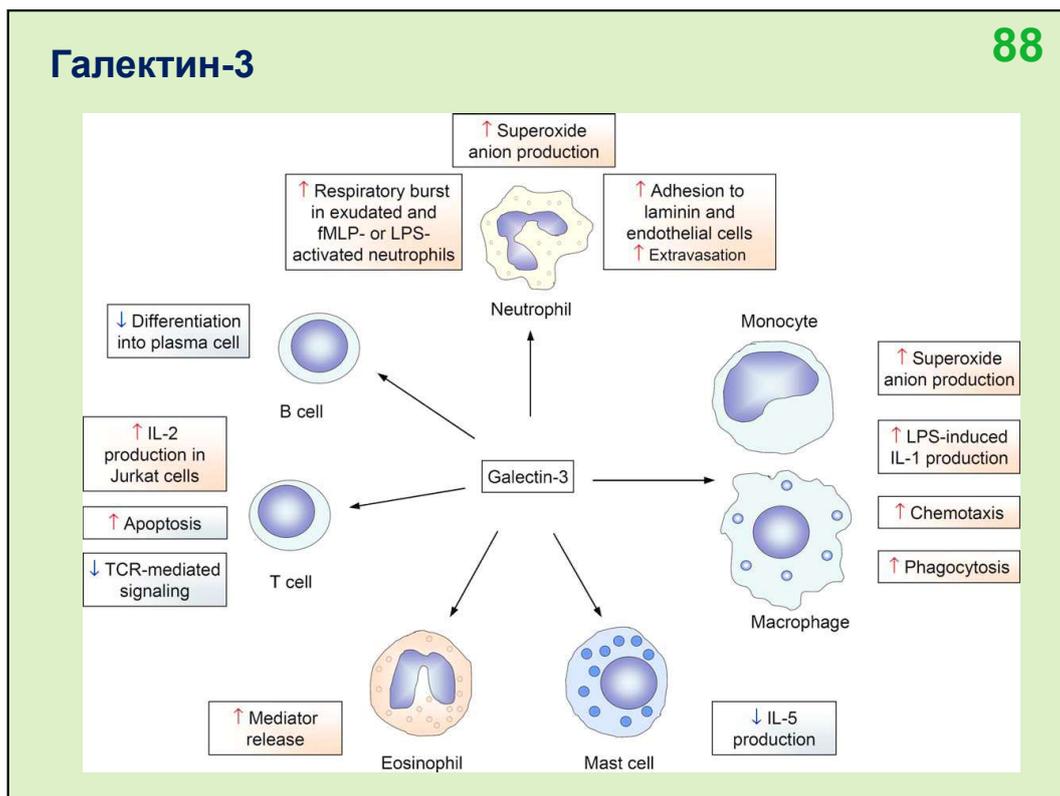
На слайде схематично представлен пример, когда лектин вовлечен в кластеризацию рецепторов, что влияет на передачу сигнала

Связывание галектина-1 с фибронектиновым рецептором – сигнал к остановке клеточного цикла

87



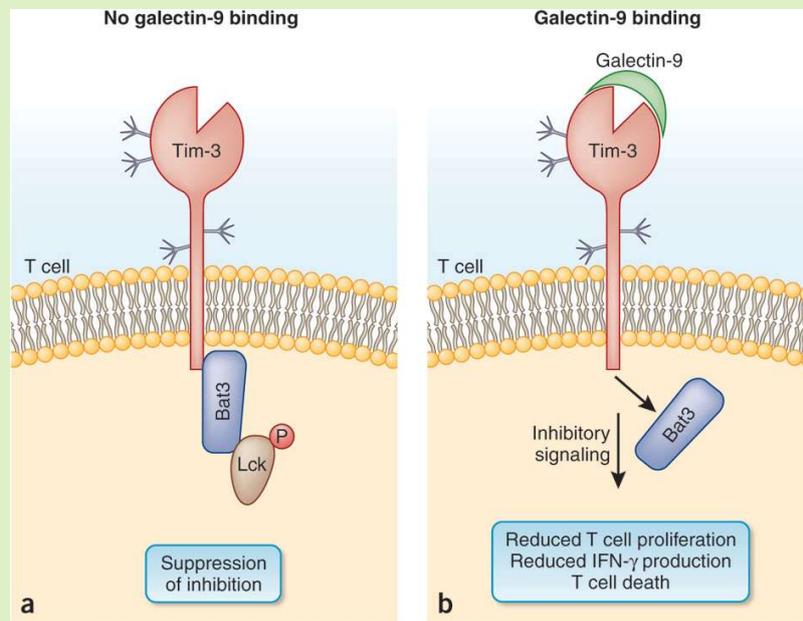
Этот процесс показан на примере связывания галектина-1 с фибронектиновым рецептором. В норме фибронектин связывается с фибронектиновым рецептором, и клетка делится. В случае, когда галектин-1 связывается с рецептором, запускается сигнальный каскад, приводящий к остановке клеточного цикла.



Галектин-3 вовлечен в выполнение различных функций иммунными клетками: участие в клеточной адгезии, продукции супероксид-аниона и цитокинов, хемотаксисе, фагоцитозе, апоптозе.

Апоптоз Т-лимфоцита, вызванный связыванием с галектином-9

89



Связывание лиганда с галектином-9 приводит к апоптозу Т-лимфоцитов.

Биологические роли галектинов: апоптоз, рак, иммунный ответ и воспалительные процессы

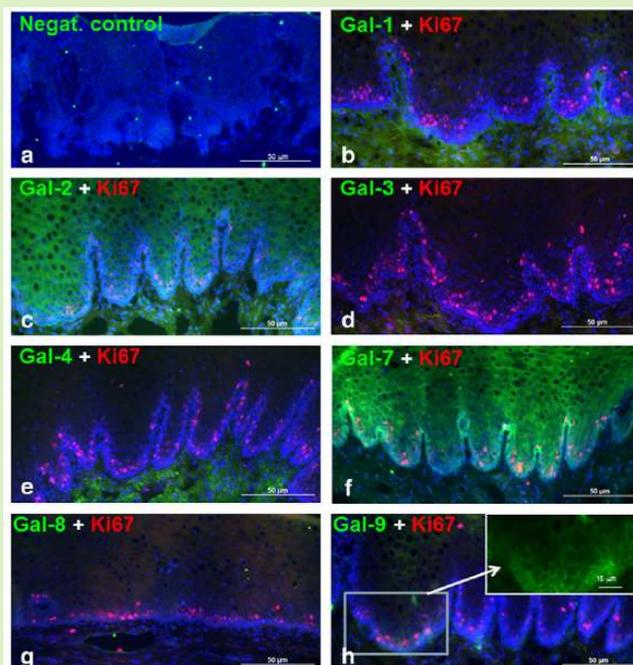
90

 <p>Galectin-1 involved in Treg cell function and enhances Treg formation conflicting results on effects on T-cell viability mediates adhesion of thymocytes to thymic epithelium induces apoptosis in CD4⁺CD8⁺ double positive thymocytes induces shift in Th1 response to Th2 (decreases IFNγ; increases IL-5) reduces TNFα, IL-1β, IL-12, IL-2 and IFNγ; increases IL-10 production in both naive and activated T cells inhibits mast cell degranulation reduces pathology-associated graft-versus-host disease, Con A-induced hepatitis, experimental allergic encephalomyelitis, myasthenia gravis and rheumatoid arthritis reduces acute inflammatory responses expression in endothelial cells up-regulated by activation induces apoptosis-independent phosphatidylserine (PS) exposure (Ca⁺⁺-dependent) in neutrophils inhibits chemotaxis of neutrophils inhibits extravasation of neutrophils activates NADPH-dependent respiratory burst in neutrophils induces maturation of dendritic cells</p>	 <p>Galectin-3 blocks apoptosis of T cells when overexpressed intracellularly endogenously involved in T-cell viability extracellularly induces apoptosis of T cells promotes adhesion of thymocytes to thymic epithelium enhances Th2 immune responses enhances adhesion of naive T cells to DCs binds TCR, reducing TCR mediated T cell activation inhibits IL-5 production in eosinophils induces mast cell degranulation independent of antigen- mediated IgE stimulation exacerbates Th2 immune responses (asthma) expressed on surface of macrophages (also called Mac-2 antigen) enhances phagocytosis of macrophages enhances respiratory burst of macrophages enhances LPS-induced IL-1β secretion of macrophages inhibits apoptosis (intracellularly) blocks IL-4-induced survival of activated B cells favors plasma cell differentiation exhibits an anti-apoptotic role in B-cell lymphomas expression induced in dendritic cells by <i>T. cruzi</i> infection enhances pro-inflammatory cytokine release in endothelial cells expression up-regulated in tumor endothelial cells induces chemotaxis of neutrophils enhances extravasation of neutrophils activates NADPH-dependent respiratory burst of neutrophils induces activation of neutrophils induces release of IL-8 of neutrophils mediates interaction of neutrophils with laminin and fibronectin (both directly and indirectly) enhances leukocyte adhesion to endothelium</p>
 <p>Galectin-2 induces T-cell apoptosis under some conditions decreases IFNγ and TNFα while increasing IL-10 and IL-5 involved in the pathogenesis of atheroma formation induces apoptosis-independent PS exposure (Ca⁺⁺-dependent) of neutrophils</p>	
 <p>Galectin-4 induces IL-6 production in T cells induces apoptosis-independent PS exposure (Ca⁺⁺-independent) of neutrophils</p>	
 <p>Galectin-7 intracellular expression induces apoptosis of tumor cells extracellularly can inhibit growth of cells</p>	
 <p>Galectin-8 activates Rac-1 in T cells activates NADPH-dependent respiratory burst of neutrophils modulates integrin-mediated neutrophil adhesion of neutrophils</p>	
 <p>Galectin-10 highly expressed in eosinophils (Charcot-Leyden crystal protein) involved in Treg function</p>	
	 <p>Galectin-9 induces apoptosis in thymocytes and T cells induces selective loss of CD4⁺ Th1 cells induces selective loss of CD8⁺ T cells induces eosinophil chemotaxis, activation, superoxide generation induces moderate degranulation of eosinophil expression in endothelial cells induced by virus infection induces maturation of dendritic cells</p>
	 <p>Galectin-12 intracellular expression induces apoptosis of tumor cells can cause cell cycle arrest and growth suppression</p>

Здесь перечислены различные биологические роли галектинов, которые вовлечены в апоптоз, онкотрансформацию, иммунный ответ и воспалительные процессы.

Галектины в эпителиальных клетках

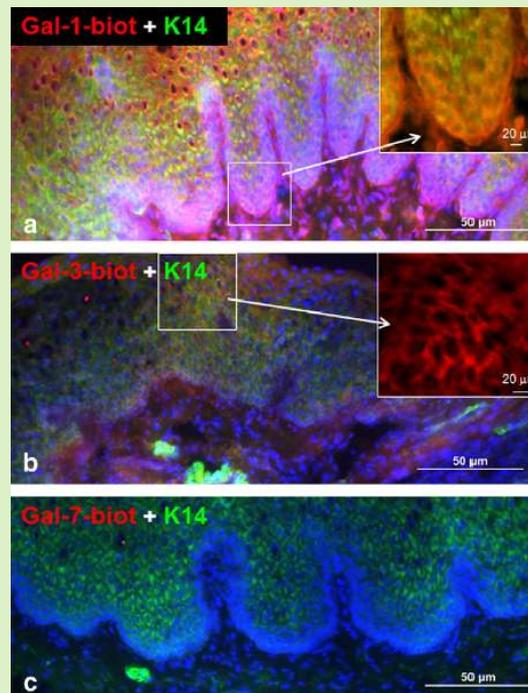
91



Этот слайд демонстрирует распределение разных галектинов на эпителиальных клетках

Сайты связывания галектинов в эпителии

92



Методы иммуногистохимии позволяют локализовать сайты связывания галектинов в эпителии.

Бактериальные токсины

Бактериальные токсины – это еще один большой класс лектинов.

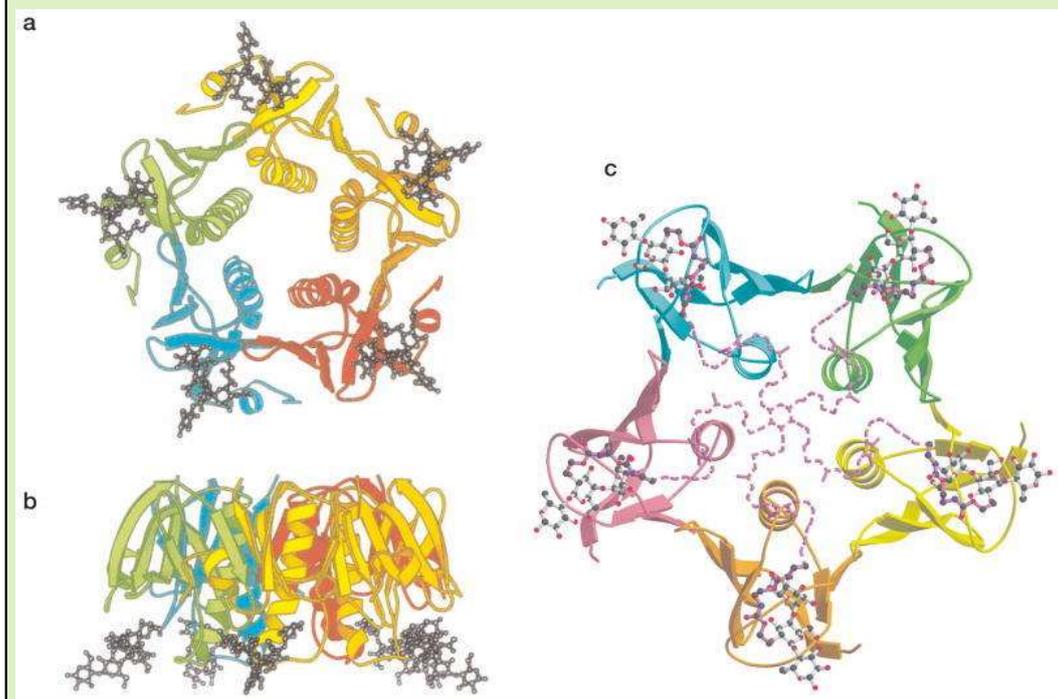
Бактериальные токсины

94

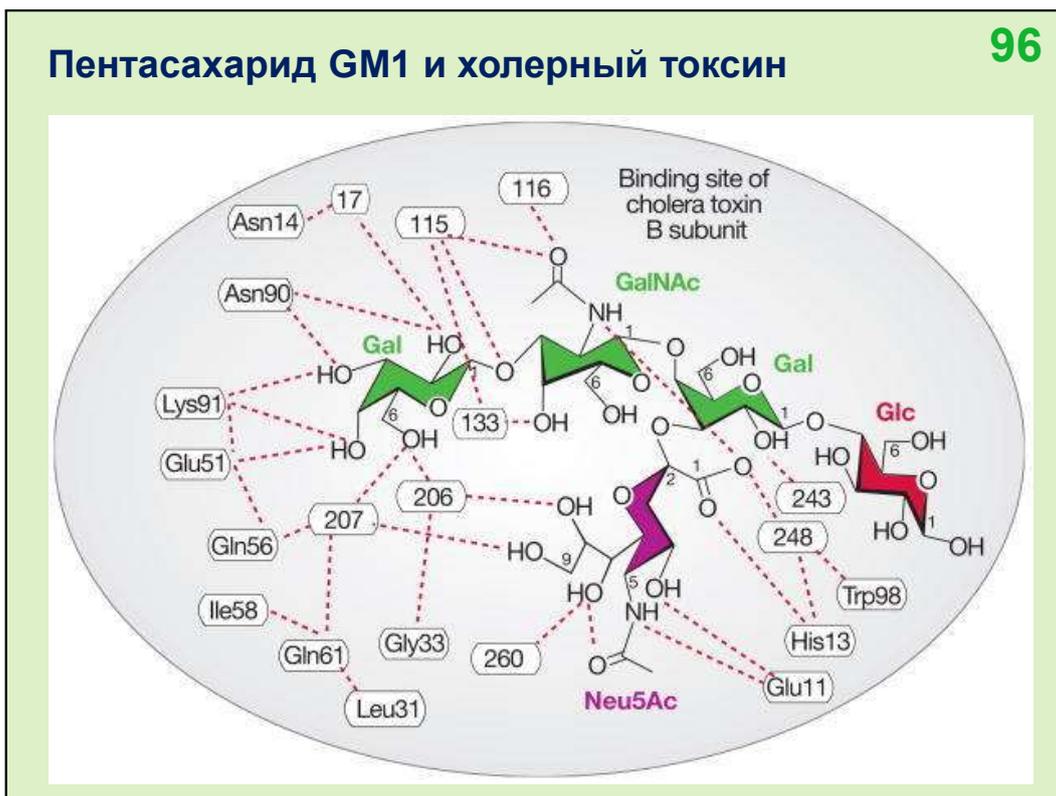
<i>Clostridium tetani</i> (tetanus toxin)	GD1b, GT1b
<i>Clostridium botulinum</i> (neurotoxin, type A-F)	GQ1b, GT1b, GD1a
<i>Clostridium perfringens</i> ($\delta\delta$ toxin)	GM2
<i>Clostridium perfringens</i> (ϵ toxin)	Neu5Ac
<i>Vibrio cholera</i> (cholera toxin)	GM1
<i>Vibrio mimicus</i> (hemolysin) ,	GD1a, GT1b
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (thermostable direct hemolysin)	GT1
<i>E. coli</i> (heat-labile enterotoxin)	GM1
<i>E. coli</i> (heat-stable enterotoxin <i>b</i>)	sulfatide
<i>Bordetella pertussis</i> (pertussis toxin)	GD1a; Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4GlcNAc
<i>Staphylococcus aureus</i> (<i>a</i> toxin)	Neu5AcGalGlcNAcGalGlc
<i>Staphylococcus aureus</i> (γ hemolysin, leucocidin)	GM1

На слайде представлены токсины патогенов - лектины, которые связываются с ганглиозидами на поверхности клеток хозяина.

Пентасахарид GM1 и холерный токсин (пентамер) ⁹⁵



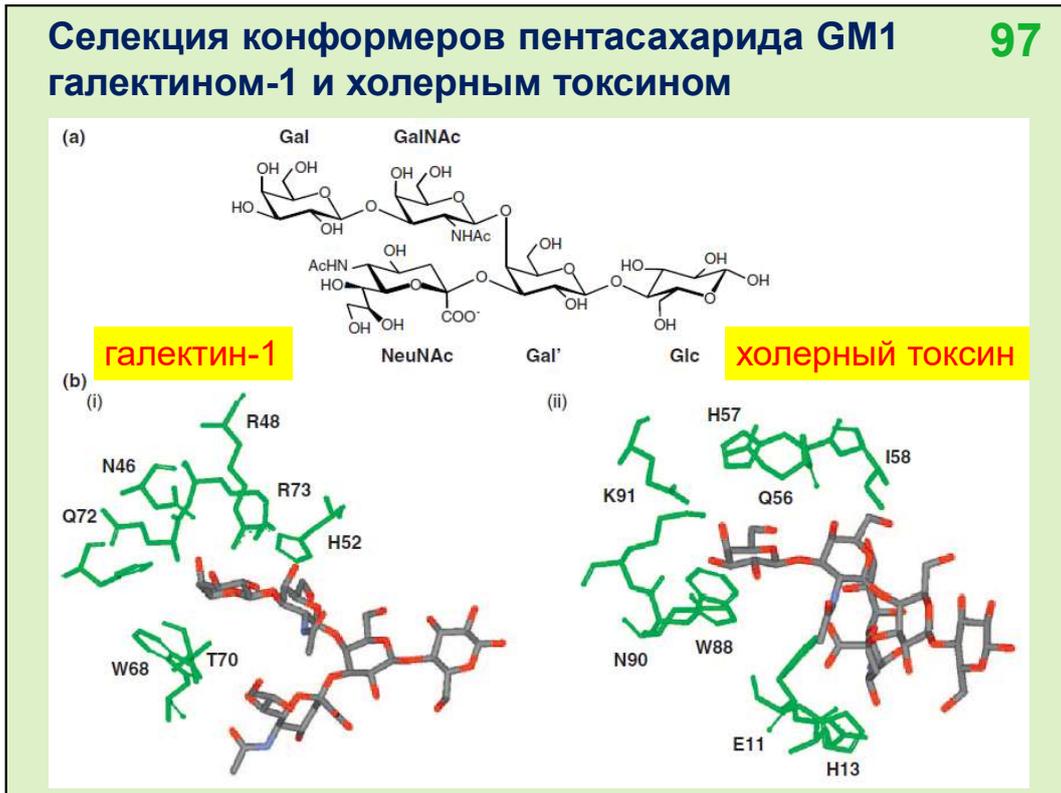
Хорошо изучено связывание холерного токсина (это пентамер с пятью идентичными сайтами связывания) и пентасахарида GM1, несущего остаток N-ацетилнейраминовой кислоты.



Практически все группы олигосахаридной цепи вовлечены во взаимодействия с токсином.

Селекция конформеров пентасахарида GM1 галектином-1 и холерным токсином

97



Здесь приведен селекция конформеров пентасахарида GM1 галектином-1 и холерным токсином.

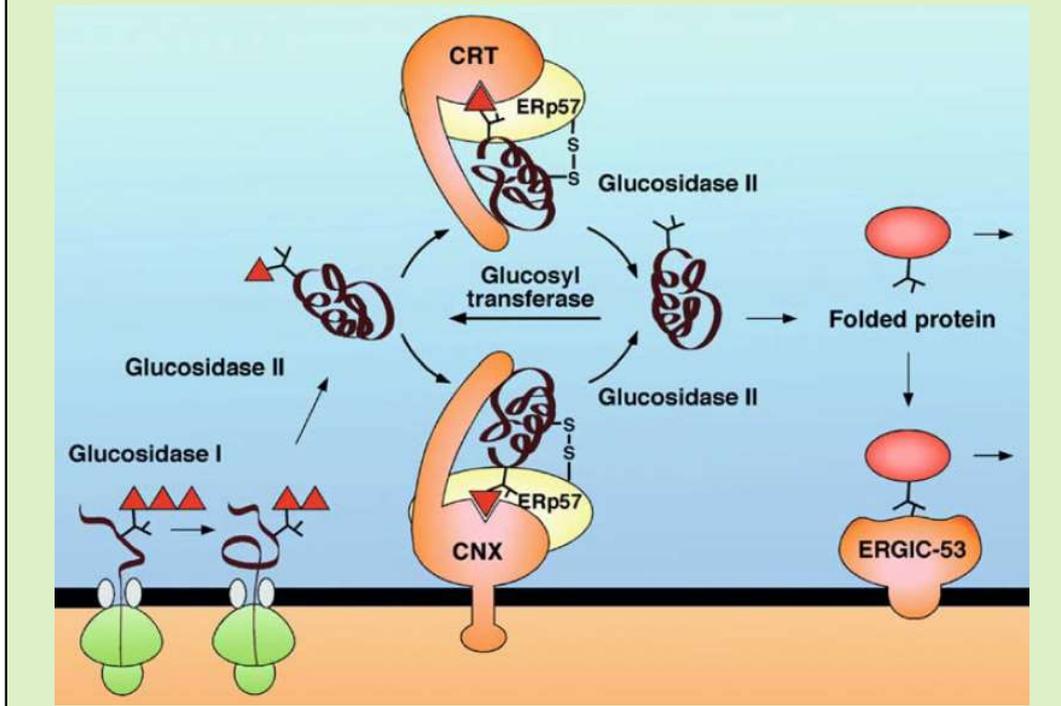
Один и тот же лиганд связывается с разными лектинами в разных «биоактивных» конформациях. При этом во взаимодействие могут быть вовлечены различные моносахаридные остатки.

Лектины-шапероны

Лектины L-типа

К лектинам L-типа относятся лектины-шапероны

Сворачивание белков в ЭПР: лектины-шапероны 99



Примером таких лектинов могут служить калнексин и калретикулин, распознающие гликозилированный полипептид, что необходимо для правильного фолдинга полипептидной цепи в процессе биосинтеза N-гликанов.

Другие лектины

Цитокины связываются с углеводами

101

примеры	углеводная специфичность
IL-1 α	(Neu5Ac-Gal-GlcNAc-Man) ₂ Man-GlcNAc ₂
IL-1 β	GPI якорь, GM4
IL-2	Man ₅ /Man ₆
IL-4	Neu5Ac-1,7-лактон
IL-7	Neu5Ac α 2-6GalNAc α
TNF α	Man ₃ /GlcNAc β 1-4GlcNAc

Дефензины тоже связываются с углеводами...

Цитокины и дефензины связываются с углеводами и потому относятся к лектинам.

Межклеточная адгезия,
опосредованная углеводами

Число гликан-связывающих рецепторов с потенциальной ролью в адгезии клеток

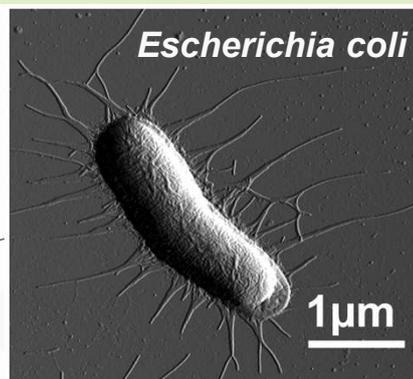
103

Receptor family	Number of human receptors	Receptors with proposed roles in cell-cell adhesion
C-type lectin	24	L, E and P-selectin DC-SIGN Scavenger receptor C-type lectin?
Galectins	9	Several possible
Siglecs	13	Myelin-associated glycoprotein (MAG)

В межклеточной адгезии участвуют и лектины С-типа, и галектины и сиглеки.

В настоящее время выявлено большое число таких гликан-связывающих рецепторов с потенциальной ролью в адгезии клеток

Р-Фимбрии – PapG: галабиоза
Фимбрии типа 1 – FimH: манноза



7. *Comprehensive Glycoscience. From Chemistry to System Biology*, 2007, Ch. 3.28.3.1, p. 636 (2346).
22. *Glycoscience and Microbial Adhesion*. K. Lindhorst, S. Oscarson (Eds.), 2009, 186 pp.
61. A. Bernardi, *et al.* Multivalent glycoconjugates as anti-pathogenic agents. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 4709.

К настоящему времени накопилось достаточно много весьма убедительных данных в пользу того, что всякая бактериальная инфекция начинается со связывания бактерии с поверхностными углеводсодержащими молекулами клеток хозяина.

Распознавание углеводов поверхности клетки-хозяина лектином бактерии является первым этапом бактериальной адгезии и последующей инвазии.

На концах фимбрий (другое название – пили) бактерий расположены адгезины – белки, специфично связывающиеся с определенными углеводсодержащими структурами на поверхности животной клетки. Так, например, адгезины фимбрий типа 1 уропатогенных штаммов кишечной палочки способны узнавать гликопротеины, содержащие маннозу, а адгезины Р-фимбрий – гликолипиды глобо-серии, содержащие дисахарид галабиозу. При этом штаммы бактерии, вырабатывающие адгезин PapG, вызывают заболевания почек (пиелонефрит), в то время как другие штаммы бактерий, вырабатывающие адгезин FimH, вызывают воспаления нижних отделов мочевых путей.

У тех редко встречающихся людей, в крови которых нет фактора Р, эпителиальные клетки мочевых путей не связывают бактерии кишечной палочки, несущие Р-фимбрии. Такие индивиды значительно меньше подвержены инфекциям этой бактерии по сравнению с другими людьми. Однако экспериментально установлено, что если их эпителиальные

клетки покрыть синтетическим гликолипидом, содержащим галабиозу , то эти клетки приобретают способность связываться с *E. coli*.

Углеводы поверхности клеток – сайты присоединения бактериальных патогенов

105

Organism	Target tissue	Carbohydrate	Structure
<i>E. coli</i> Type 1	Urinary	Man α 3Man α 6Man	GP
<i>E. coli</i> P	Urinary	Gal α 4Gal	GL
<i>E. coli</i> S	Neural	NeuAc (α 2-3)Gal β 3GalNAc	GL
<i>E. coli</i> CFA/1	Intestinal	NeuAc (α 2-8)	GP
<i>E. coli</i> F1C	Urinary	GalNAc β 4Gal β	GL
<i>E. coli</i> F17	Urinary	GlcNAc	GP
<i>E. coli</i> K1	Endothelial	GlcNAc β 4GlcNAc	GP
<i>E. coli</i> K99	Intestinal	NeuAc(α 2-3)Gal β 4Glc	GL
<i>C. jejuni</i>	Intestinal	Fuc α 2Gal β 3GlcNAc	GP
<i>H. pylori</i>	Stomach	NeuAc(α 2-3)Gal β 4GlcNAc	GP
		Fuc α 2Gal β 3(Fuc α 4)Gal	GP
<i>K. pneumoniae</i>	Respiratory	Man	GP
<i>N. gonorrhoea</i>	Genital	Gal β 4Glc(NAc)	GL
<i>N. meningitidis</i>	Respiratory	[NeuAc(α 2-3)] Gal β 4GlcNAc β 3Gal β 4GlcNAc	GL
<i>P. aeruginosa</i>	Respiratory	L-Fuc	GP
	Respiratory	Gal β 3Glc(NAc) β 3Gal β 4Glc	GL
<i>S. typhimurium</i>	Intestinal	Man	GP
<i>S. pneumoniae</i>	Respiratory	NeuAc α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc	GL
<i>S. suis</i>	Respiratory	Gal α 4Gal β 4Glc	GL

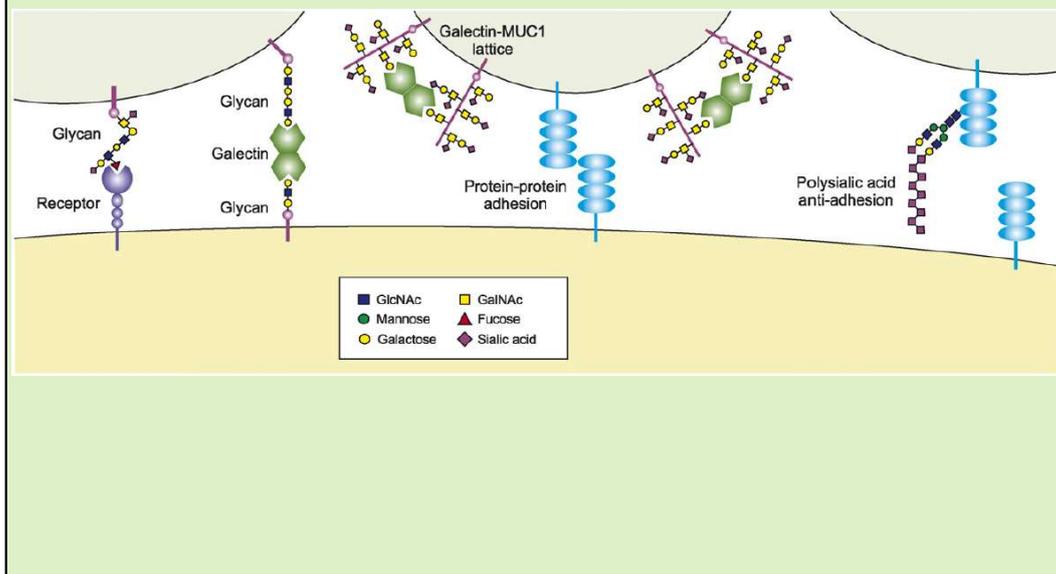
GP = glycoprotein, GL = glycolipids

На этом слайде перечислены структуры углеводов поверхности клеток – сайты присоединения различных бактериальных патогенов. Он призван проиллюстрировать разнообразие углеводных структур, узнаваемых бактериям.

О важности этих процессов углевод-белкового узнавания свидетельствует только один факт.

Было установлено, что многим известные гастрит и язва желудка связаны с инфицированием бактерией *Helicobacter pylori*, живущей в кислом содержимом желудка и в его слизистой оболочке. “За открытие бактерии *Helicobacter pylori* и ее роли при гастрите и язвенной болезни” в 2005 г. была присуждена Нобелевская премия по медицине и физиологии.

Интересен фактически философский вопрос, зачем клетки животных создают на своей поверхности весьма специфичные сайты для присоединения патогенных бактерий. Т.е. создают в мощной системе защиты лазейки для врага. В литературе даже сравнивают этот феномен с предательством.



Это более современная схема, иллюстрирующая то, как может осуществляться адгезия клеток с участием углеводов.

- 1) Долгое время считалось, что взаимодействие клеток осуществляется между гликановым лигандом, расположенным на поверхности одной клетки, и его лектиновым рецептором на другой клетке.
- 2) Считалось, что аналогично осуществляется взаимодействие клеток при участии галектина, имеющего два сайта связывания и сшивающего два гликановых лиганда на поверхностях разных клеток. Однако позже оказалось, что галектины, вероятнее всего, вовлечены в цис-взаимодействия на поверхности одной клетки. Эти цис-взаимодействия сшивают углеводные структуры муцинов на поверхности клеток, благодаря чему становится возможна адгезия клеток, опосредованная белок-белковыми взаимодействиями.
- 3) Адгезия, опосредованная белок-белковыми взаимодействиями также может быть затруднена, когда на поверхности одной из клеток экспрессируется гликопротеин, содержащий отрицательно заряженный углеводный фрагмент, представленный полисиаловой кислотой. Поэтому взаимодействие между клетками становится возможно, если этот фрагмент удастся отщепить от полипептидной цепи.

Механизм углевод-белкового
связывания

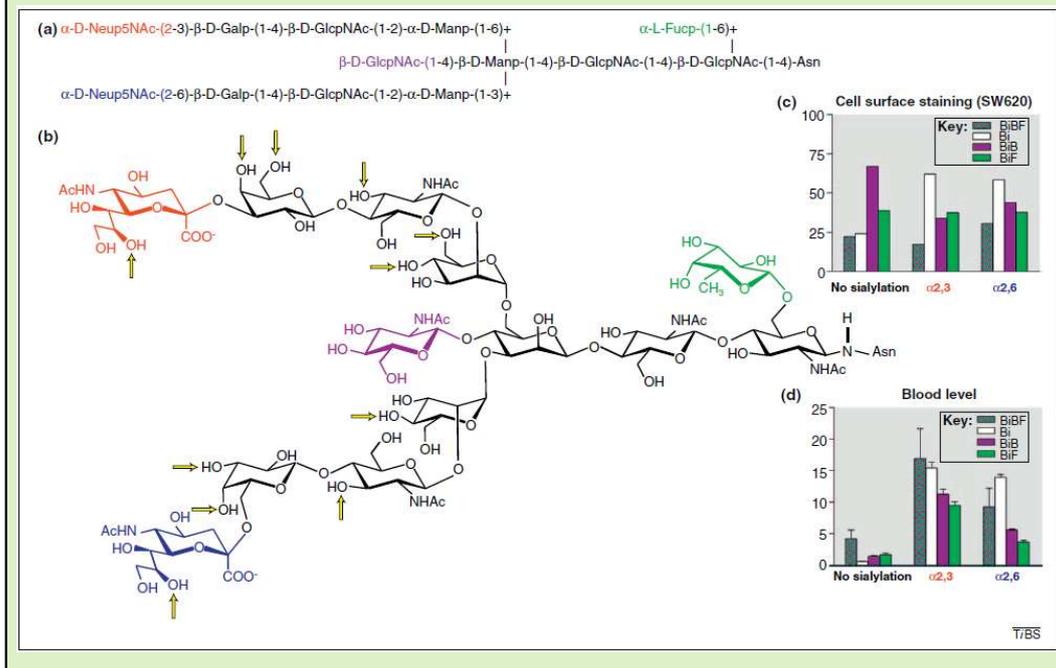
Шесть уровней регуляции аффинности связывания гликана с лектином

108

- ▶ 1. Mono- and disaccharides (including anomeric position and substitutions)
- ▶ 2. Oligosaccharides (including branching and substitutions)
- ▶ 3. Spatial parameters of oligosaccharides
 - ▶ a. Shape of oligosaccharide (differential conformer selection)
 - ▶ b. Conformational flexibility differences between isomers
- ▶ 4. Spatial parameters of glycans in natural glycoconjugates
 - ▶ a. Shape of glycan chain (examples: modulation of conformation by substitutions not acting as lectin ligand, such as core fucosylation or introduction of bisecting GlcNAc in N-glycans, influence of protein part)
 - ▶ b. Cluster effect with bi- to pentaantennary N-glycans or branched O-glycans (including modulation by substitutions, please see a.)
- ▶ 5. Cluster effect with different, but neighboring, glycan chains on the same glycoprotein (e.g. in mucins) or a glycoprotein–glycolipid complex (e.g. integrin–ganglioside complexes)
- ▶ 6. Cluster effect with different glycoconjugates on the cell surface in spatial vicinity forming microdomains

Аффинность связывания гликана с лектином будет определяться следующим:

- 1) моно- или дисахаридами, взаимодействующими с лектином;
- 2) олигосахаридами, различающимися степенью разветвленности и заместителями;
- 3) пространственной конформацией олигосахаридов;
- 4) не только первичной последовательностью гликанов, ведь малые замещения в местах, далеких от сайтов связывания далеких заместителей, могут влиять на пространственную презентацию природных гликоконъюгатов;
- 5) кластерные эффекты соседних гликановых цепей

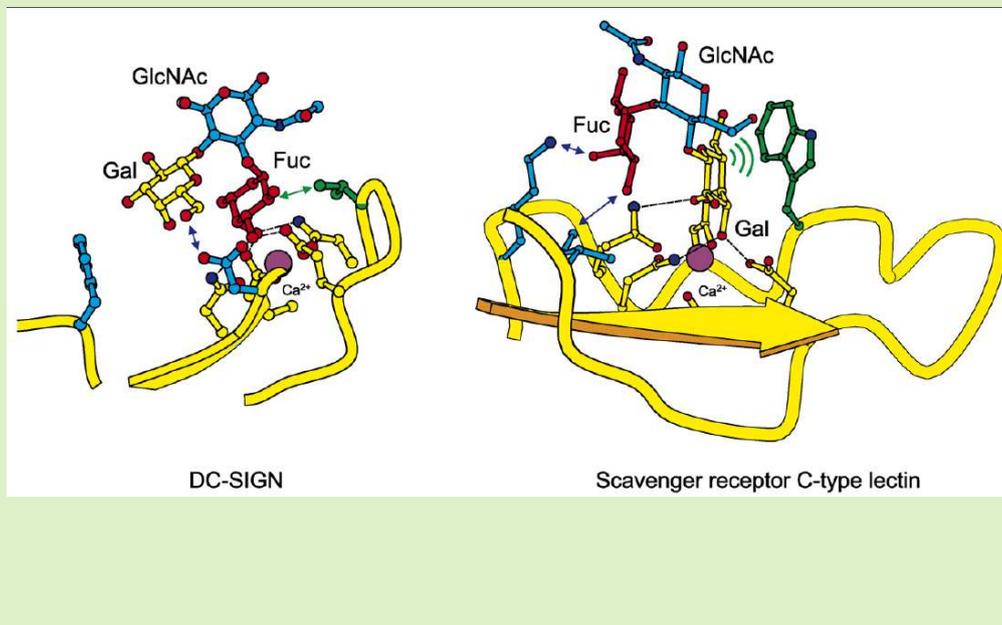


Здесь представлен пример того, как замещение в разных положениях влияет на взаимодействие с лектинами

Complex-type biantennary N-glycan bearing α 2,3/6-sialylation. Shown are α 2,6-sialylation (blue) in the α 1,3-arm, α 2,3-sialylation (red) in the α 1,6-arm, and the two core substitutions, i.e. core fucosylation (in α 1,6-linkage, green) and bisecting N-acetylglucosamine moiety (purple) at the central b-linked mannose unit, as a carbohydrate sequence (a) and in a conformational formula (b). Positions for further branching/elongation are indicated by arrows (note that some types of substitutions are mutually exclusive owing to restrictions imposed by the enzymatic assembly line). Surface staining of colon adenocarcinoma (SW620) cells by labeled neoglycoproteins [Bi: biantennary N-glycan, with additional core fucosylation (F) and/or bisecting N-acetylglucosamine moiety (B), without/with α 2,3- or α 2,6-sialylation] given as a percentage of positive cells (c) and level of each neoglycoprotein in circulation 6 h after i.v. injection (% injected dose/ml blood) (d), revealing the influence of the type of core substitutions and sialylation on cell binding and serum clearance.

Два различных механизма связывания трисахарида Le^x с рецептором

110



На слайде показаны два различных механизма связывания трисахарида Le^x с двумя различными лектинами. Примечательно, что оба они относятся к одному классу С-лектинов, т.е. (казалось бы) имеют сходную структуру углевод-связывающего домена. В обоих случаях в образовании комплекса участвует ион кальция. Только в одном случае (слева на слайде) в комплексообразовании с кальцием вовлечен остаток L-фукозы (6-дезоксид-альфа-L-галактозы), а в другом – остаток бета-D-галактозы. Со стороны белков также принимают участие различные аминокислотные остатки.

Стратегическая роль Ca^{2+} в активности лектинов

111

Function	Lectin type
Structural role in stabilizing the lectin domain or organizing the site for ligand binding (no direct contact to ligand), oligomerization of subunits	Leguminous lectins homologous to concanavalin A, lectin chaperones involved in quality control (calnexin, calreticulin), animal lectin-type cargo receptors (i.e. ERGIC53b and VIP36c), <i>Anguilla anguilla</i> agglutinin, discoidin I
Structural role and direct contact to anionic group(s) of ligand or neutralization of repulsive forces between anionic charges in ligand and lectin	Pentraxins, laminin G-like module, annexin A2, cation-dependent mannose-6-phosphate receptor
Direct contact to neutral group(s) of ligand with/without structural role	Most C-type lectins, <i>Cucumaria echinata</i> lectin III (β -trefoil fold), <i>Pseudomonas aeruginosa</i> lectin I (two coordination bonds) and lectin II (four coordination bonds)

Стратегическая роль Ca^{2+} в активности лектинов различна и сводится к тому, что:

- 1) ионы кальция могут стабилизировать конформацию лектинового домена или предорганизацию сайта для связывания с лигандом, при этом ионы кальция напрямую не взаимодействуют с лигандом;
- 2) в то же время ионы кальция могут непосредственно реагировать с анионными группами углеводного лиганда, нейтрализуя его отрицательный заряд;
- 3) также возможны непосредственные взаимодействия ионов кальция с нейтральными группами лиганда.

Как установить факт связывания
белка с гликаном?

Box 1. Experimental approaches to determine lectin structure and complex formation^a

Atomic force microscopy: measurement of binding strength under force for surface-presented lectin/ligand pairs indicates lectin potential to engage in transient or firm contacts.

Biodistribution: determination of clearance from serum and organ uptake of radiiodinated lectin after i.v. injection.

Chemical mapping: analysis of inhibitory potency of ligand derivatives (mostly deoxy, fluoro or *O*-methyl) in a binding assay yields information on hydrogen bonding contribution and steric aspects at each position.

Circular dichroism: monitoring yields insights into secondary structure elements; ellipticity changes at distinct wavelengths reflect involvement of aromatic amino acid residues in ligand binding.

Fluorescence-activated cell scanning (cytofluorometry): binding of labeled lectin to cell surfaces (measuring mean fluorescence intensity and percentage of positive cells) characterizes the glyco-phenotype; when performed with a panel of lectins (Table 3), this is termed glyco-phenotyping.

Fluorescence correlation spectroscopy: monitoring of translational diffusion of a fluorescent protein in solution indicates shape properties and detects ligand-induced changes.

Fluorescence titration: quenching of intrinsic protein fluorescence (from Tyr and especially Trp residues) by ligand presence indicates alterations in their microenvironment/surface presentation and/or direct ligand contact.

Gel filtration: elution profile yields information on hydrodynamic behavior as an indication of quaternary structure and respective influence of the ligand.

Hemagglutination: erythrocyte agglutination to determine inhibitory potential by saccharides (classical assay for lectin activity). Note: the glycomic profile on erythrocytes varies.

Isothermal titration calorimetry: measurement of heat released or absorbed by ligand binding enables determination of association constant (K_a), stoichiometry (n) and enthalpy of binding (ΔH°), thereby facilitating calculation of entropy (ΔS°).

Lectin cyto- and histochemistry: localization of lectin-reactive sites in cell preparations and frozen/fixed tissue sections.

Saturation transfer difference NMR spectroscopy: magnetization transfer (spin diffusion) from, in this example, saturated protein to ligand protons maps spatial vicinity (below 5 Å).

Small angle neutron/X-ray scattering: spectrum yields information on quaternary structure and shape and detects ligand-induced changes.

Surface plasmon resonance: measurement of changes in refractive index near a planar surface presenting lectin/ligand in resonance units (RUs; 1000 RUs equal 1 ng of mass per mm²) leads to equilibrium and kinetic constants.

Transferred nuclear Overhauser effect spectroscopy: signal generation by through-space dipolar interaction between two ligand protons, preferably separated by a glycosidic bond, helps to define bound-state topology.

Ultracentrifugation: relative protein sedimentation reflects average molecular mass (equilibrium analysis) and hydrodynamic parameters (velocity analysis).

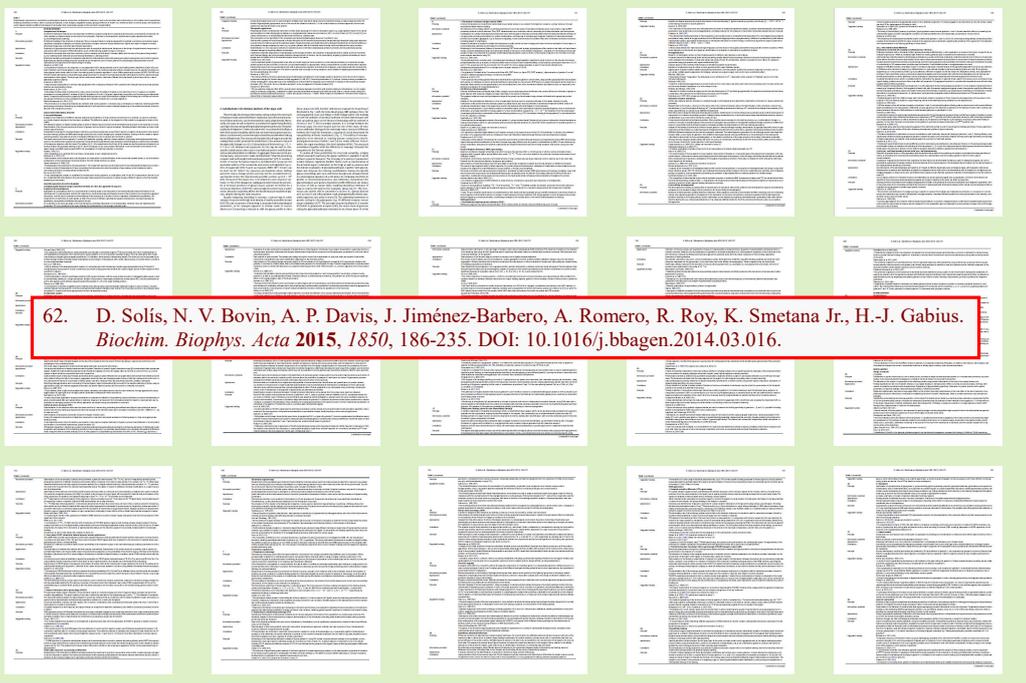
X-ray crystallography: diffraction pattern yields electron density map; crystallization might require unphysiological conditions, packing can cause artifacts and will preclude the separation of static from dynamic disorder.

^aSee also Figure 4, where experimental data for these techniques are presented.

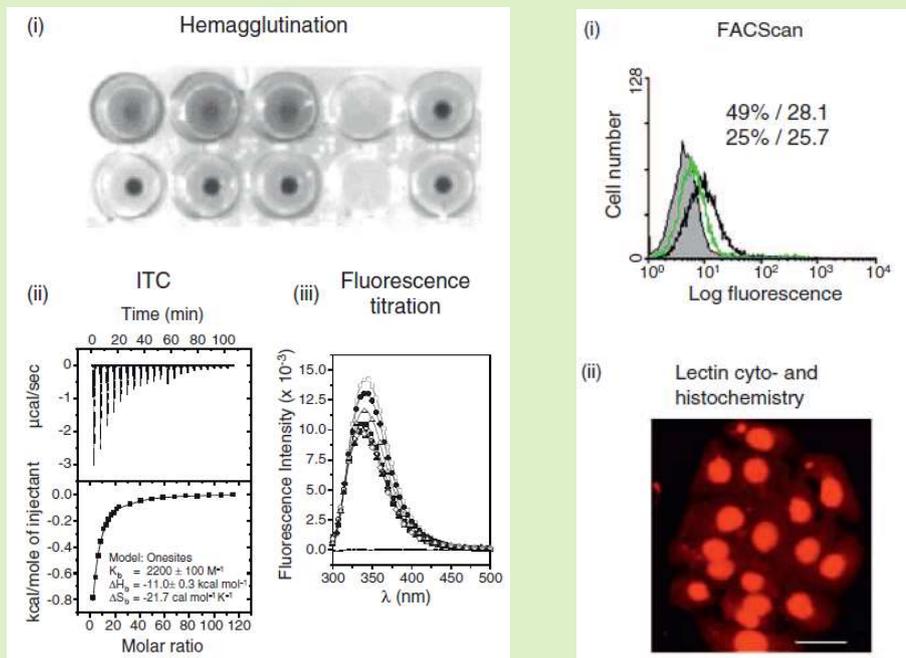
На слайде перечислены все физические методы, позволяющие установить структуры и взаимодействия, могут подтвердить или опровергнуть факт связывания лектина с гликаном.

Экспериментальные методы изучения углевод-белковых взаимодействий

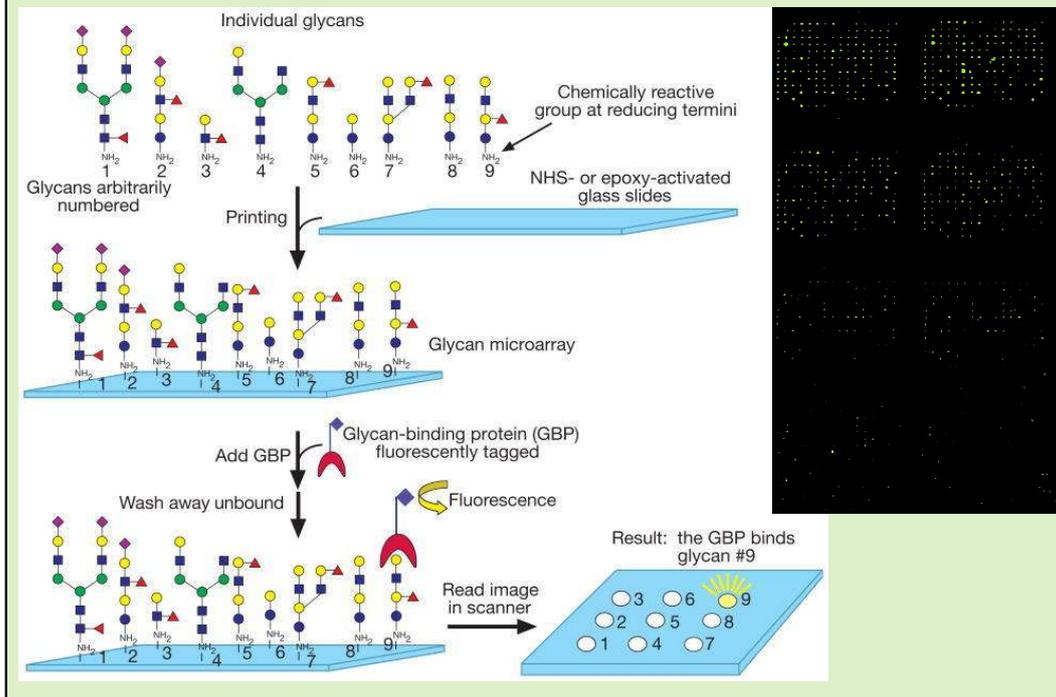
114



Полный список известных экспериментальных методов изучения углевод-белковых взаимодействий приведен в представленной на слайде ссылке.



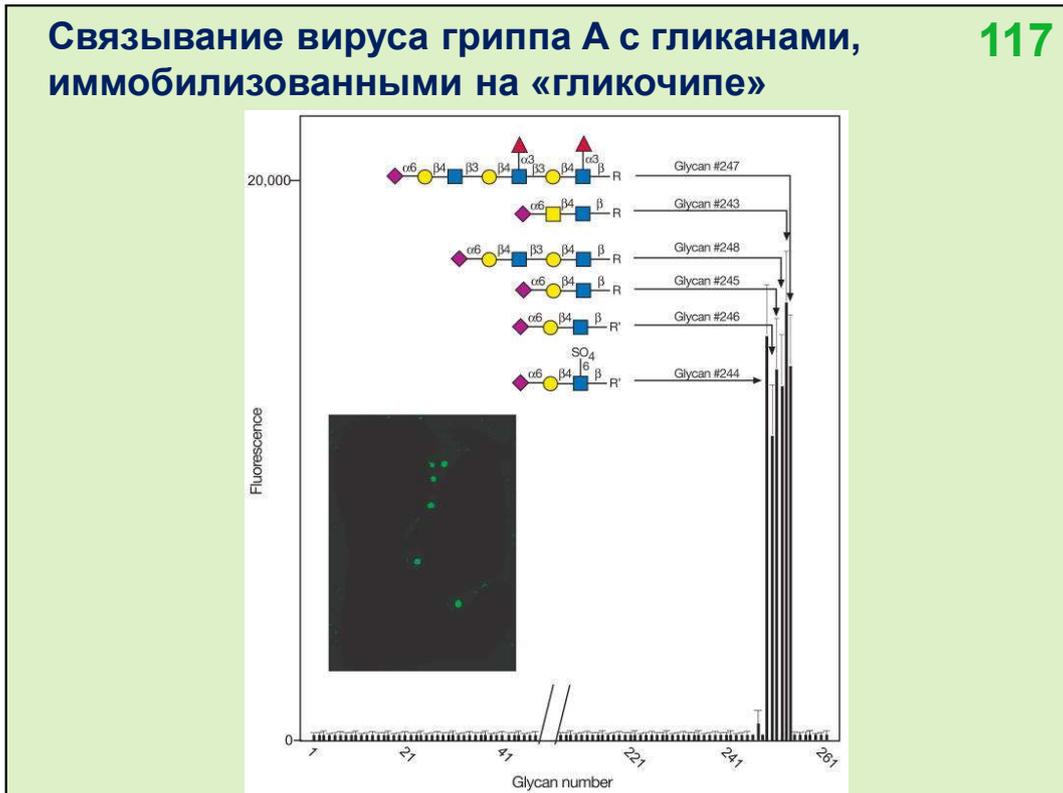
Гемагглютинация, изотермическая микрокалориметрия, цитофлуориметрия и гистохимические методы позволяют выявлять взаимодействие лектина с его лигандом



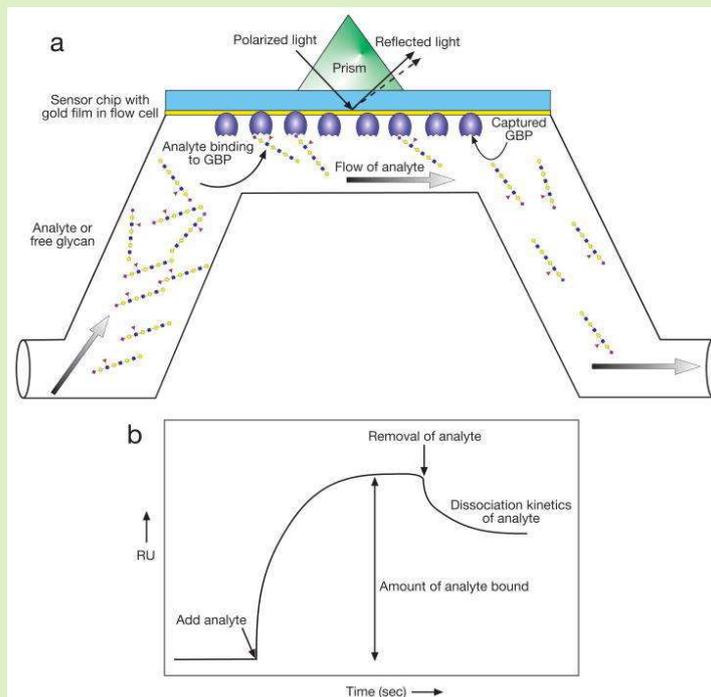
В последние годы основным инструментом изучения углевод-белковых взаимодействий является «гликочип», когда на поверхности мобилизуют набор гликанов, с которыми связываются антитела. О факте связывания свидетельствует флуоресценция в соответствующей области слайда.

Связывание вируса гриппа А с гликанами, иммобилизованными на «гликочипе»

117



Это пример взаимодействия вируса гриппа А с гликанами, иммобилизованными на «гликочипе», в результате чего выявлено, что вирус связывается с гликанами, содержащими трисахаридные фрагменты сиалил-N-ацетиллактозамина

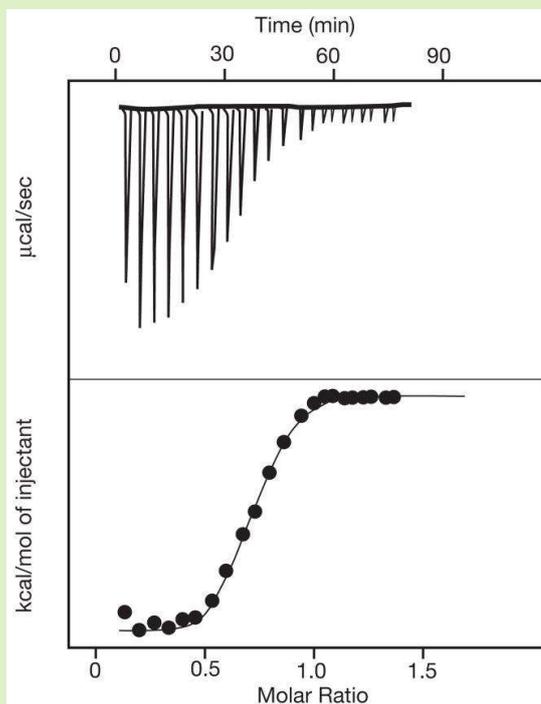


Поверхностный плазмонный резонанс (SPR) позволяет изучать взаимодействие иммобилизованных лектинов с их лигандами в динамических условиях (в потоке). Можно измерять кинетику сорбции и десорбции лиганда.

SPR-диагностика (от Surface plasmon resonance) — метод определения констант связывания макромолекул, основанный на явлении поверхностного плазмонного резонанса.

Электроны на поверхности золотых частиц коллективно осциллируют в ответ на облучение светом с определённой длиной волны. При этом в спектре отражённого света появляются пики, которых не было в спектре возбуждающего света. Если на поверхности наночастицы иммобилизован белок, который может поглощать свет, и его частота поглощения перекрывается с частотой плазмонного резонанса, то в пике рассеяния появляется провал в той области спектра, где поглощает белок. Метод SPR-диагностики основан на сравнении спектров рассеяния наночастиц и наночастиц с иммобилизованным белком. Этот эффект, возникая на поверхности металлической пленки, распространяется вглубь раствора, затухая экспоненциально как функция расстояния. Взаимодействия между молекулами изменяют затухающую волну, что приводит к изменению характеристик поверхностного плазмона, которые выражаются в изменении резонансного угла и показателя преломления в

поверхностном слое. По изменению показателя преломления судят о взаимодействии биомолекул. Этот метод позволяет наблюдать за реакцией в реальном времени.



$$K_a = [\text{LG}]/[\text{L}][\text{G}] = k_1/k_2$$

$$K_d = [\text{L}][\text{G}]/[\text{LG}] = 1/K_a = k_2/k_1$$

$$\Delta G_o = RT \ln K = \Delta H - T\Delta S$$

Микрокалориметрия измеряет тепло, выделяемое при образовании комплекса. Можно определить термодинамические параметры этого комплексообразования.

Конец лекции 6

<https://углеводы.su>