

На правах рукописи



Фильштейн Алина Петровна

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

1.4.9 – Биоорганическая химия

Автореферат
диссертации на соискание ученой
степени кандидата химических наук

Владивосток – 2022

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки
«Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова» Дальневосточного
отделения Российской академии наук

Научный руководитель:

кандидат химических наук, доцент
Чикаловец Ирина Владимировна

Официальные оппоненты:

Долматов Игорь Юрьевич

доктор биологических наук, Национальный
научный центр морской биологии им. А.В.
Жирмунского ДВО РАН, главный научный
сотрудник, руководитель лаборатории
сравнительной цитологии

Рогожин Евгений Александрович

кандидат химических наук, Институт
биоорганической химии им. академиков М.М.
Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
старший научный сотрудник лаборатории
нейрорецепторов и нейрорегуляторов

Ведущая организация:

Сибирский Федеральный университет,
г. Красноярск

Защита состоится «07» июля 2022 г. в 10 часов на заседании диссертационного совета
24.1.213.01 при Тихоокеанском институте биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО
РАН по адресу: 690022, г. Владивосток, проспект 100 лет Владивостоку, 159, ТИБОХ ДВО
РАН. Факс: (423) 231-40-50, e-mail: dissovet@piboc.dvo.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ТИБОХ ДВО РАН (г.
Владивосток, проспект 100 лет Владивостоку, 159, ТИБОХ ДВО РАН, www.piboc.dvo.ru).

Автореферат разослан « » 2022 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
к.б.н.



Чингизова Е.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Углевод – связывающие белки, известные как лектины, обнаружены в организмах, находящихся на разных ступенях эволюции, начиная от наиболее примитивных форм жизни – вирусов и бактерий – до представителей высших позвоночных, что свидетельствует об эволюционной преемственности и универсальности механизмов, основанных на углевод-белковом распознавании. Углевод-белковые взаимодействия составляют основу различных механизмов, которые необходимы как для внеклеточных, так и для внутриклеточных физиологических процессов, включающих клеточную адгезию, межклеточные коммуникации, передачу сигналов и транспорт, укладку гликопротеинов.

В настоящее время лектины широко применяют для очистки биологических жидкостей и для выделения определенного типа клеток, в частности, незрелых форм лимфоцитов при пересадке костного мозга. Кроме того, некоторые патологические процессы, такие как злокачественная трансформация, сопровождаются нарушением нормального процесса гликозилирования и экспозицией на поверхности опухолевых клеток углеводных маркеров малигнизации. Лектины способны выявлять углеводные детерминанты, специфические для гликоконъюгатов раковых клеток. Это позволяет использовать их не только в качестве модельных соединений для изучения механизмов малигнизации, но и как специфические маркеры в практической онкологии для ранней и дифференциальной диагностики рака. В последнее время возрос интерес к медицинскому потенциалу лектинов, например, для целевой доставки лекарственных препаратов к клеткам – мишеням, для лечения рака, а также в качестве модуляторов иммунных процессов и противовирусных агентов. Таким образом, лектины являются важными инструментами для исследований в таких областях как цитохимия, гистохимия, иммуногистохимия и гликомика.

Цели и задачи исследования. Целью настоящей работы являлось исследование структуры, физико-химических свойств, биологической активности и роли в защитных реакциях моллюска нового лектина, выделенного из мантии мидии *Mytilus trossulus* (MTL). Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи: 1) выделить MTL и охарактеризовать его основные физико-химические свойства; 2) установить аминокислотную последовательность и пространственную структуру MTL; 3) получить рекомбинантный аналог MTL; 4) исследовать роль MTL в защитных реакциях мидии *M. trossulus*; 5) установить принадлежность MTL к паттерн-распознающим рецепторам; 6) изучить биологическую активность лектина.

Научная новизна и практическая ценность работы. Впервые из мантии мидии *Mytilus trossulus* выделен и охарактеризован новый лектин (MTL). Установлена его первичная и вторичная структуры. Поиск и анализ гомологичных последовательностей выявил, что единственными известными на сегодняшний день структурными гомологами MTL являются лектины: CGL из мидии *Crenomytilus grayanus* (83 % идентичности и 89% гомологии), MytiLec из мидии *Mytilus galloprovincialis* (84% идентичности и 88% гомологии) и MCL из мидии *Mytilus californianus* (84 % идентичности и 88% гомологии), которые образуют семейство лектинов mytelectin. MTL имеет пространственную структуру «β-трилистника», которая характерна и для других членов семейства mytelectin.

На основании полученных данных доказано, что MTL является четвертым членом нового недавно открытого семейства mytelectin. Определение тонкой углеводной специфичности показало, что MTL, в отличие от CGL и MytiLec, проявляет аффинность к концевой галактозе с β -конфигурацией гликозидной связи. Установлена принадлежность MTL к паттерн-распознающим рецепторам, что предполагает его участие в реакциях врожденного иммунитета мидии. Впервые получены данные о наличии высокой цитокин-стимулирующей, бактериостатической, антифунгальной и противоопухолевой активности MTL. Разнообразие биологической активности MTL является предпосылкой для разработки на его основе различных тест-систем, в том числе для ранней дифференциальной диагностики рака. Полученные в работе данные расширяют представления о структуре и функциях лектинов беспозвоночных.

Методология и методы исследования. Марикультурная мидия вида *M. trossulus* была собрана на Морской экспериментальной станции ТИБОХ ДВО РАН. Выделение нуклеиновых кислот, получение рекомбинантных плазмид проводили методами классической и современной молекулярной биологии. Рекомбинантный MTL получали методом экспрессии в бактериальной системе *E. coli*. Выделение rMTL и nMTL проводили с помощью металл-аффинной хроматографии и аффинной хроматографии на гидролизованной сефарозе соответственно. Молекулярную массу лектина определяли методами MALDI – TOF масс-спектрометрии. Пространственную структуру оценивали с помощью спектроскопии КД. Теоретическую модель пространственной структуры MTL получали с использованием программы МОЕ и сервера SWISS-MODEL. Биологическую активность изучали методами иммуноферментного, лектин-ферментного анализа, проточной цитофлуориметрии и MTS-теста.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Лектин (MTL), выделенный из мантии мидии *M. trossulu*, является термолабильным, рН-стабильным и металлонеинзависимым белком, проявляющим специфичность к концевому остатку галактозы с β -конфигурацией гликозидной связи в разветвленных углеводных цепях.
2. MTL является представителем нового семейства лектинов mytelectin.
3. Пространственная структура MTL характеризуется типом укладки, называемой « β -трилистник».
4. MTL является паттерн-распознающим рецептором и участвует в реакциях врожденного иммунитета, стимулируя синтез цитокинов и проявляя противомикробную активность.
5. Лектин проявляет антипролиферативную активность, взаимодействуя с гликоконъюгатами, экспрессированными на поверхности опухолевых клеток линии Raji лимфомы Беркитта.

Апробация работы. Материалы диссертации были представлены на: Всероссийской конференции по «Фундаментальной гликобиологии» (Владивосток, 2016); III Международной научной конференции по биоорганической химии «XII чтения памяти академика Ю. А. Овчиникова» / «VII Российском симпозиуме белки и пептиды» (Москва, 2017); Всероссийской конференции по «Фундаментальной гликобиологии» (Киров, 2018); Научной конференции, посвященной 55-летию ТИБОХ ДВО РАН и 90-летию со дня рождения его основателя академика Г.Б. Елякова (Владивосток, 2019); II объединенном

научном форуме VI съезд биохимиков России / IX Российском симпозиуме «Белки и Пептиды» (Сочи, 2019); 25ом Международном симпозиуме «Glycoconjugates» (Италия, 2019). По теме диссертации опубликовано 6 статей в журналах, рекомендованных ВАК.

Личный вклад соискателя. Соискателем был выполнен анализ литературных данных по теме исследования. Автор лично участвовал в планировании экспериментов, обсуждении полученных результатов, формулировании выводов и подготовке публикаций. Эксперименты с применением биоинформатики проводились совместно с к.ф-м.н., с.н.с. Лихацкой Г. Н. Исследования с опухолевыми клетками проводились совместно н.с. Кузьмич А. С.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 24 работы, в том числе 3 статьи в зарубежных рецензируемых журналах, 3 статьи в российских рецензируемых журналах и 18 тезисов в материалах научных конференций.

Структура диссертации. Диссертационная работа содержит следующие разделы: Введение, Литературный обзор, Материалы и методы, Результаты и их обсуждение, Выводы и Список литературы. Список литературы включает 172 источника. Диссертация изложена на 127 страницах и содержит 28 рисунков, 11 таблиц.

Благодарности. Автор выражает благодарность своему научному руководителю к.х.н. Чикаловец Ирине Владимировне за помощь в выполнении диссертационной работы. Автор также благодарен д.б.н. Недашковой и д.б.н. Пивкину М. В. за выполнение некоторых микробиологических экспериментов, к.х.н. Дмитренку П. С. и н.с. Ким Н. Ю. за получение и помощь в обработке спектральных данных, к.б.н. Ковальчук С. Н., к.б.н. Голотину В. А. и к.ф-м. н. Лихацкой Г. Н. за помощь в проведении отдельных экспериментов в области молекулярной биологии и генной инженерии, н.с. Кузьмич А. Н. и к.б.н. Черникову О. В. за помощь в проведении экспериментов по биологической активности с использованием опухолевых клеток. Автор выражает искреннюю признательность всем сотрудникам лаборатории химии неинфекционного иммунитета ТИБОХ ДВО РАН за всестороннюю поддержку и обсуждение полученных результатов в ходе выполнения работы.

Сокращения и условные обозначения: ДТТ – дитиотреитол, ДСН – додецилсульфат натрия, ГА – гемагглютинация, КД – круговой дихроизм, кДНК – кодирующая дезоксирибонуклеиновая кислота, ИФА – иммуноферментный анализ, ПААГ – полиакриламидный гель, ПАМП – патоген-ассоциированные молекулярные паттерны, ПРР – паттерн-распознающий рецептор, ПЦР – полимеразная цепная реакция, ТЛФА – твердофазный лектин-ферментный анализ, CGL – лектин из мидии *Crenomytilus grayanus*, Gal – галактоза, GalNAc – N-ацетилгалактозамин, IL – интерлейкин, INF-γ – гамма-интерферон, LPS – липополисахарид из *Escherichia coli* Serotype 055:B5, MCL – лектин из мидии *Mytilus californianus*, MTL – лектин из мидии *Mytilus trossulus*, MytiLec – лектин из мидии *Mytilus galloprovincialis*, MTS – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолин бромид, PI – пропидия йодид, PSM – муцин желудка свиньи, TNF-α – фактор некроза опухоли.

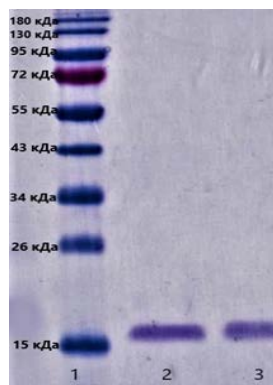
ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1 Выделение и характеристика физико-химических свойств лектина из мантии мидии *M. trossulus*

1.1 Выделение и очистка MTL

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

Поиск лектина в организме мидии проводили методом экстракции различных органов с последующим исследованием гемагглютинирующей активности (ГА) полученных экстрактов. В экстракте мантии мидии наблюдалась наибольшая лектинная активность, следовательно, для дальнейшего выделения лектина использовали мантию мидии. Для выбора аффинного сорбента методом ингибирования ГА изучали специфичность гемагглютининов экстракта к различным моносахаридам. Установлено, что в экстракте мантии мидии присутствуют лектины со специфичностью к Gal, GalNAc и гликопротеину муцинового типа PSM. Была разработана новая схема выделения MTL в одну стадию на аффинном сорбенте гидролизованной сефарозе 4В. Гомогенность полученного белка проверяли методом электрофореза в ПААГ в присутствии и отсутствии дитиотреитола (ДТТ).



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

Рисунок 1 – Электрофореграмма образца MTL после аффинной хроматографии на гидролизованной сефарозе 4В в ДСН – ПААГ

Из рисунка 1 следует, что после аффинной хроматографии был получен чистый белок с молекулярной массой около 17 кДа. Одинаковая подвижность полипептидных зон в образцах 2 и 3 свидетельствует об отсутствии дисульфидных связей в MTL. Анализ ГА показал, что лектин проявляет высокую активность (титр ГА 1:512). Таким образом, разработанный метод не только упрощает выделение лектина, но и увеличивает выход и активность белка по сравнению с ранее предложенной двухстадийной схемой.

1.2 Физико-химические свойства MTL

1.2.1 Определение точной молекулярной массы MTL

Согласно данным масс-спектра точная молекулярная масса мономера лектина составляет 16492 Да, помимо мономерной формы лектин может существовать и в форме димера, об этом свидетельствует пик однозарядного иона с массой 33468 Да (рисунок 2).

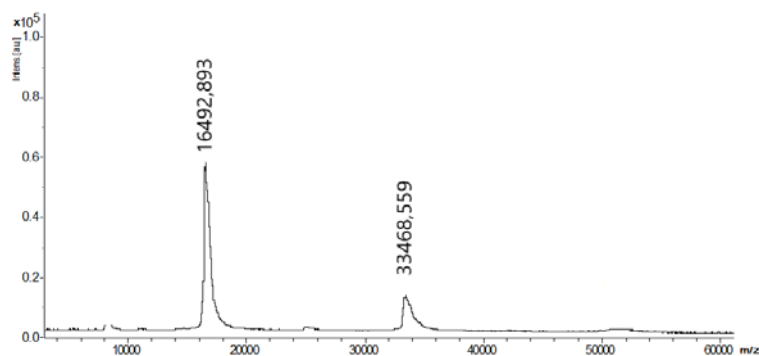


Рисунок 2 – МАЛДИ масс-спектр МТЛ

1.2.2 Термостабильность, рН- и металлозависимость активности МТЛ

Влияние температуры, рН среды и ионов металлов на активность лектина изучали методом ГА. Установлено, что МТЛ является термолабильным, его активность полностью теряется только после нагревания в течение 30 минут при 60 °С, рН-стабильным – лектин сохраняет свою активность диапазоне рН среды от 4 до 10, и металлонеинзависимым лектином.

1.2.3 Углеводная специфичность МТЛ

Важной характеристикой лектина является его углеводная специфичность. По результатам исследования установлено, что наибольшую аффинность МТЛ проявляет к Gal и GalNAc. Лучшими ингибиторами среди гликопротеинов являлись PSM и фетуин. Эти гликопротеины содержат О-связанные углеводные цепи муцинового типа с остатками Gal и GalNAc. Таким образом, согласно результатам ингибирования ГА МТЛ можно отнести к Gal/GalNAc-специфичным лектинам.

1.2.4 Тонкая углеводная специфичность МТЛ

Тонкую углеводную специфичность изучали в Консорциуме по функциональной гликомике (США) методом микрочипов, используя 609 природных и синтетических гликанов млекопитающих. Полученные данные были обработаны и сведены в таблицу, в которой представлены углеводные цепи, к которым лектин проявлял наибольшую специфичность (таблица 1).

Таблица 1 – Наиболее активные лиганды МТЛ

Структура лиганда	Флуоресценция (%) ¹
Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-6(Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-2)Mana1-6(Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-2Mana1-3)Manb1-4GlcNAcb1-4(Fuca1-6)GlcNAcb-Sp24	100
Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-6(Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-2Mana1-3)Manb1-4GlcNAcb1-4(Fuca1-6)GlcNAcb-Sp24	78,2
Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-6(Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-2)Mana1-6(Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4GlcNAcb1-2Mana1-3)Manb1-4GlcNAcb1-4(Fuca1-6)GlcNAcb-Sp24	70
Gala1-4Galb1-4GlcNAcb1-3Galb1-4Glc-Sp0	64,9
Galα1-4Galβ1-4Glcβ-Sp0	23,3

¹ Выражается в процентах от лиганда с самой высокой флуоресценцией

Установлено, что MTL способен связывать гликановые цепи как с α -, так и с β -галактозой на невосстанавливающих концах, но взаимодействие с углеводными цепями с терминальной β -галактозой в сильно разветвленных гликанах сильнее. Вероятно, на степень связывания MTL с лигандами влияет не только пространственная ориентация и вариабельность углеводов-связывающих сайтов лектина, в результате которых предпочтительней происходит связывание с β конфигурацией терминальной галактозы, но и разветвленность лиганда, которая приводит к мультифункциональному взаимодействию.

1.3 Установление структуры MTL

1.3.1 Аминокислотная последовательность лектина из мидии *M. trossulus*

Для амплификации кДНК MTL использовали пару праймеров, которую сконструировали на основе структуры кДНК лектина мидии *C. grayanus* (CGL). Выбор праймеров был основан на том, что оба моллюска являются близкородственными видами и относятся к одному подсемейству моллюсков Mytilinae. Кроме того, методом ИФА установлена высокая степень перекрестной реактивности между CGL и MTL. Это позволяет нам предположить, что гены, кодирующие одни и те же функциональные белковые молекулы, могут иметь высокую идентичность. Используемые праймеры амплифицируют высоко консервативный участок гена, кодирующего лектины структурного семейства mytilectin. Поэтому было принято решение использовать данные праймеры для амплификации кДНК мидии *Mytilus trossulus*. На основе установленной нуклеотидной последовательности фрагмента кДНК были сконструированы олигонуклеотидные праймеры для амплификации концевых фрагментов кДНК лектина. В результате ПЦР с использованием этих праймеров был получен фрагмент кДНК длиной 450 п.н., который был клонирован в векторе pTZ57R/T и секвенирован. Таким образом, была получена последовательность из 150 аминокислотных остатков (а.о.). Для подтверждения соответствия выведенной аминокислотной последовательности нативному белку был проведен сравнительный анализ молекулярных масс пептидных фрагментов, полученных в результате практического трипсинолиза нативного лектина (рисунок 3) и теоретического трипсинолиза выведенной аминокислотной последовательности с помощью сервера ExPASy (таблица 2).

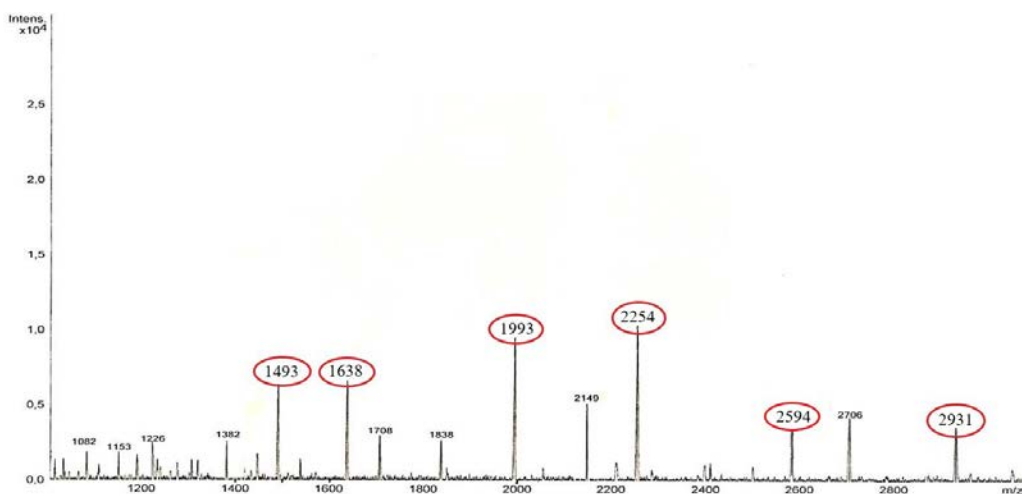


Рисунок 3 – МАЛДИ масс-спектр триптических пептидов MTL

Установлено, что выведенная аминокислотная последовательность соответствует нативному MTL. Поиск и анализ гомологичных последовательностей с использованием программы BLAST позволил определить, что единственными известными на сегодняшний день структурными гомологами MTL являются CGL (83% идентичности и 89% гомологии), MytiLec (84% идентичности и 88% гомологии) и MCL (84% идентичности и 88% гомологии) (рисунок 4).

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

Рисунок 4 – Сравнение аминокислотных последовательностей MTL (UniProt: A0A0G2UGT2), MCL (UniProt: A0A0P0E482), CGL (UniProt: H2FH31) и MytiLec (UniProt: B3EWR1)

Аналогично этим лектинам структура MTL содержит три аминокислотных tandemных повтора с высокой степенью идентичности между собой и три углевод-связывающих домена на молекулу. Согласно классификации, основанной на гомологии первичных структур, MTL наряду с CGL, MCL и MytiLec можно отнести к лектинам нового недавно образованного семейства mytilectin.

1.3.2 Вторичная структура MTL

Для дальнейшей характеристики МТЛ была изучена его пространственная организация с помощью спектроскопии КД. Расчет элементов вторичной структуры

лектина с помощью программы CONTIN/LL (пакет программ CDPPro) показал, что характерным признаком пространственной организации MTL является β -структура (таблица 3). Результаты спектроскопии КД согласуются с данными, полученными при расчете теоретически предсказанной структуры MTL с помощью сервера PROTEUS Structure Prediction Server 2.0 (<http://www.proteus2.ca/proteus2/index.jsp>) (таблица 3).

Таблица 3 – Содержание элементов вторичной структуры MTL, %

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

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

Преобладание β -структуры, показанное для MTL, характерно для лектинов семейства mytilectin. Аминокислотную последовательность лектина использовали для предсказания его третичной структуры методом компьютерного моделирования на основе структурной гомологии белков (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/>). Согласно результатам сервера PHYRE2, MTL имеет структуру β -трилистника, как и CGL, MytiLec, MCL.

1.3.3 Самоассоциация MTL

Способность лектинов к самоассоциации влечет за собой кластеризацию нескольких углеводов-связывающих доменов, что обеспечивает им высокую авидность по отношению к большим лигандам. Использование современных методов исследования позволило с уверенностью утверждать, что, как минимум, димеризация является необходимым условием для проявления биологической активности лектинов семейства mytilectin. Кроме того, CGL и MCL при увеличении концентрации образовывали высокомолекулярные олигомеры. При сравнении первичной структуры MTL со структурами лектинов семейства mytilectin обнаружено, что MTL имеет в своем составе аминокислоты, способствующие образованию димерной структуры и ее стабилизации (рисунок 5).

MTL	1	MTTFLIKHKASGKYFHPKGGTSNPPNGTNLVLHSDIHERMYFQFEVNE	WRYIKHVASE	60
MCL	1	MTTFLIKHKASGKFLHPKGGSSNPANDTNLVLHSDIHERMYFQFDVVD	WGYIKHAASG	60
MytiLec	1	TTFLIKHKASGKFLHPKGGSSNPANDTNLVLHSDIHERMYFQFDVVD	WGYIKHAASG	59
CGL	1	MTTFLIKHKASGKFLHPYGGSSNPANNTKLVLHSDIHERMYFQFDVVD	WGYIKHVASG	60
*****:*** **:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*				
MTL	61	KIVHPFGGKADPLNGTNMVLHQDRHDLALFAM	DFNDNIRHKGKGIHPKGGSKNPSNGN	120
MCL	61	KIVHPLGGKADPPNETKLVLHQDRHDLALFAM	DFNDNIHKAGKYVHPKGGSTNPPNET	120
MytiLec	60	KIVHPLGGKADPPNETKLVLHQDRHDLALFAM	DFNDNIHKAGKYVHPKGGSTNPPNET	119
CGL	61	KIVHPYGGQANPPNETNMVLHQDRHDLALFAM	DFNDNIMHKGKGIHPKGGSPNPPNNT	120
*:*** **:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*				
MTL	121	LTVMHGDEHGAMEFIFVSPKNKDKRVL	VYA	150
MCL	121	LTVMHGDKHGAMEFIFVSPKNKDKRVL	VYV	150
MytiLec	120	LTVMHGDKHGAMEFIFVSPKNKDKRVL	VYV	149
CGL	121	ETVINGDKHAAMEFIFVSPKNKDKRVL	VYA	150
:*:*:*:* ***				

Зеленым цветом выделены а. о., отвечающие за образование димерной структуры

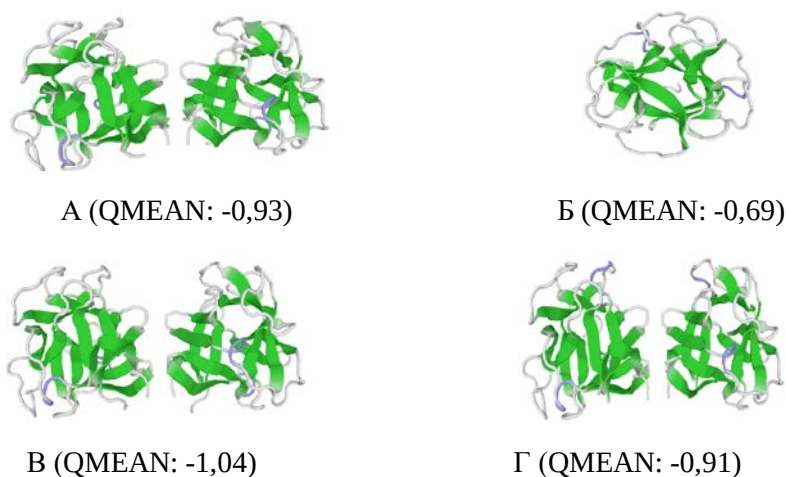
Рисунок 5 – Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей лектинов семейства mytilectin

Построение моделей пространственной структуры MTL проводили с использованием сервера SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/interactive>), содержащего библиотеку прототипов. Было найдено 6 наиболее подходящих прототипов с уже известной кристаллической структурой (таблица 4).

Таблица 4 – Прототипы для построения модели пространственной структуры MTL

Код прототипа PDB	Идентичность, %	Вид молекулы	Методика исследования структуры прототипа	Разрешение	Описание прототипа
6bfm.1.A	84,00	гомодимер	Рентгеноструктурный анализ	1,49Å	Лектин из мидии <i>Mytilus californianus</i>
6bfm.1.B	84,00	гомодимер	Рентгеноструктурный анализ	1,49Å	Лектин из мидии <i>Mytilus californianus</i>
3wmu.1.A	83,78	гомодимер	Рентгеноструктурный анализ	1,10Å	Лектин из мидии <i>Mytilus galloprovincialis</i>
3wmu.1.B	83,78	гомодимер	Рентгеноструктурный анализ	1,10Å	Лектин из мидии <i>Mytilus galloprovincialis</i>
5f8s.1.B	83.33	гомодимер	Рентгеноструктурный анализ	1.08Å	Лектин из мидии <i>Crenomytilus grayanus</i>
5duy.1.A	83.33	мономер	Рентгеноструктурный анализ	2.12Å	Лектин из мидии <i>Crenomytilus grayanus</i>

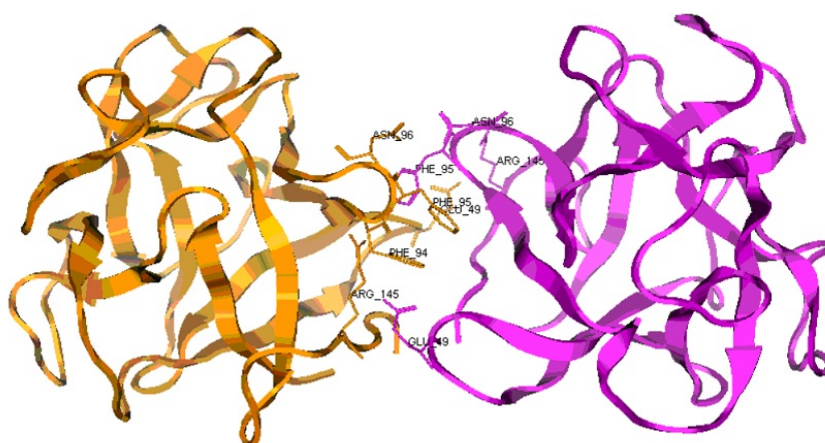
Большинство представленных прототипов, имеющих высокий процент идентичности по аминокислотной последовательности с MTL - это лектины семейства mytilectin. Поэтому для построения модели димерной структуры MTL были выбраны прототипы CGL, Mytilec и MCL (рисунок 6).



QMEAN - составная функция, с помощью которой можно оценить абсолютное качество искомой модели белка на основе выбранного прототипа: А – прототип гомодимер CGL (гомодимер - 5f8s.1.B), Б – прототип мономер CGL (мономер - 5duy.1.A), В – прототип гомодимер MCL (гомодимер - 6bfm.1.A), Г – прототип гомодимер Mytilec (гомодимер - 3wmu.1.A)

Рисунок 6 – Теоретические модели димерной структуры MTL, сконструированные на основе разных прототипов лектинов с использованием сервера SWISS-MODEL

По величине QMEAN для каждого прототипа можно определить качество построенной теоретической модели белка как на глобальном (для всей конструкции), так и на локальном уровне (для отдельных остатков). Иными словами, значение функции QMEAN показывает, насколько построенная модель сопоставима с экспериментальными структурами белков аналогичного размера. Величина, близкая к нулю, свидетельствует о хорошем соответствии между теоретической моделью и экспериментальными структурами. Судя по данным, представленным на рисунке 6, наиболее точными моделями димерной структуры MTL являются модели А и Г, для построения которых в качестве прототипов использовали димеры молекул CGL и Mytilec соответственно. Полученные результаты были подтверждены методом компьютерного моделирования в программе «MOE 2020.09» (<https://www.chemcomp.com/index.htm>) в качестве прототипа для моделирования димера MTL использовали CGL, результаты представлены на рисунке 7.



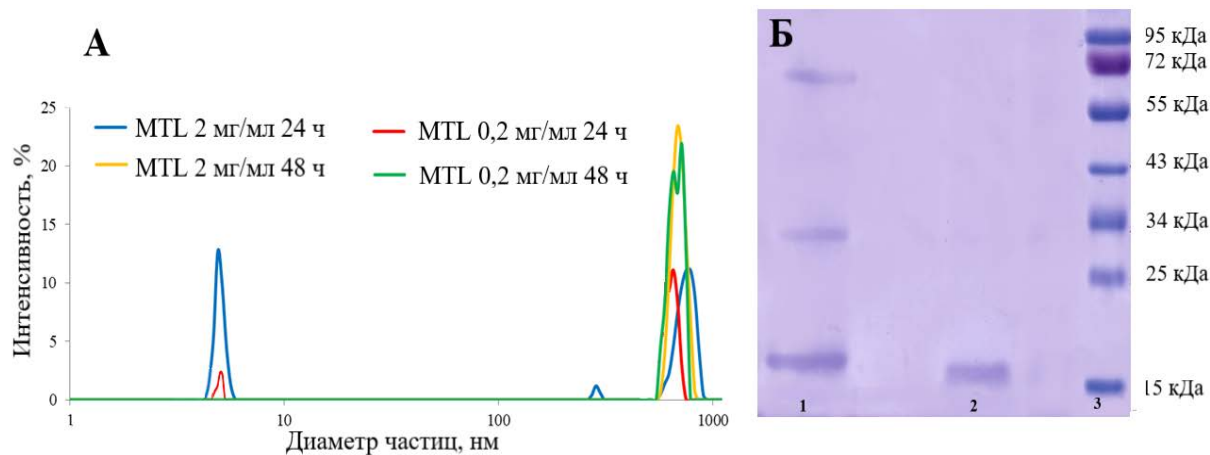
Структура димера белка показана в виде ленточной диаграммы, оранжевым и розовым цветами выделены мономеры MTL

Рисунок 7 – Теоретическая модель пространственной структуры димера MTL, сконструированная в программе «MOE 2020.09» с использованием прототипа CGL (5f8s.1.B)

Установлено, что димерная структура MTL образуется в результате укладки и интеркаляции ароматических боковых цепей Phe₉₄, Phe₉₅ и Tyr₁₄₉ с последующей стабилизацией структуры посредством водородных связей и гидрофобных взаимодействий следующих аминокислот: Glu₄₉, Arg₅₀, Asp₉₃, Asn₉₆ и Ala₁₅₀. Полученный результат коррелируется с результатами, полученными для кристаллических структур гомодимеров CGL и MCL. Данные были подтверждены на практике методами динамического рассеяния света (рисунок 8А) и электрофореза в ПААГ (рисунок 8Б).

На рисунке 8А представлено распределение частиц лектина по размеру в растворе в зависимости от концентрации белка. Показано, что первые 24 часа растворы MTL в обеих концентрациях содержат как мономерные частицы диаметром около 4,8 нм, так и большие агрегаты, в то время как через 48 часов наблюдаются только агрегаты. Высокая

склонность к олигомеризации обусловлена наличием большого числа аминокислот, способных образовывать и стабилизировать агрегаты.



А – распределение интенсивности по размеру частиц, полученное для растворов MTL с разной концентрацией в разные промежутки времени; Б - Электрофореграмма образцов MTL: 1 - MTL после экспозиции в течение 48 дней, 2 – свежeweделенный MTL, 3 - стандарты молекулярных масс

Рисунок 8 – Олигомеризация MTL

Полученные результаты согласуются с данными электрофореза в ПААГ. При увеличении концентрации MTL или времени его экспозиции происходит димеризация лектина, которая впоследствии приводит к его олигомеризации (рисунок 8Б). Важный вывод из нашего структурного исследования заключается в том, что димерная пространственная структура может дать в общей сложности шесть сайтов связывания лиганда в MTL. Это может придать поливалентность MTL, которая имеет решающее значение для нескольких биологических свойств лектина, например, для агглютинации.

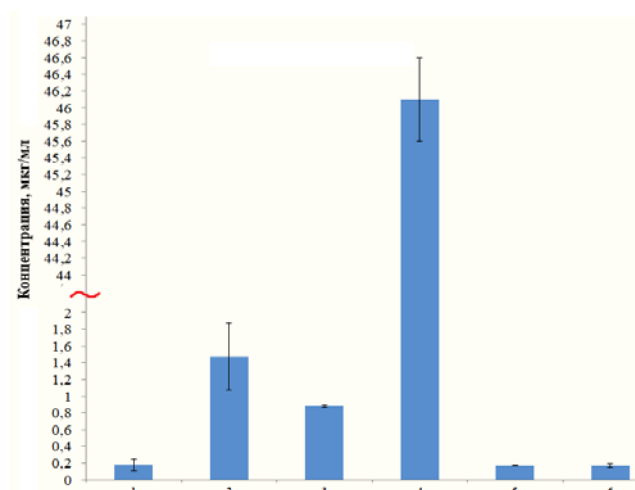
1.4 Получение рекомбинантного MTL

Последовательность гена, кодирующая зрелый лектин, была субклонирована в экспрессионный вектор pET-40b (+) по сайтам рестрикции SacI и SalI под T7-контролируемый промотор. Гетерологичная экспрессия химерного MTL проведена в бактериальной системе *E. coli* штамма BL21 (DE3). После разрушения клеток ультразвуком гибридный лектин, имеющий дополнительную последовательность из 8 остатков His, был выделен с помощью металл-аффинной хроматографии. Вторичная структура rMTL была проанализирована с помощью спектров КД. Расчет содержания элементов вторичной структуры свидетельствует о схожести укладки нативного и химерного лектинов с преобладанием β -структуры. Активность полученного rMTL определяли методом ИФА. Установлено, что взаимодействие rMTL с адсорбированными на планшете IgG_{MTL} сопоставимо с нативным лектином. Результаты ГА также указывают на отсутствие разницы в активности рекомбинантного и нативного лектинов.

2 Биологическая активность MTL

2.1 Распределения MTL по органам мидии

Для выяснения роли MTL в организме мидии определяли содержание лектина в различных органах моллюска методом ИФА (рисунок 9).



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

Рисунок 9 – Распределение MTL по органам мидии

MTL был обнаружен во всех исследуемых тканях взрослых мидий. Высокий уровень MTL в мантии (в 33 раза больше, чем в гонадах и в 55 раз больше чем в гемоцитах) может быть связан с частыми контактами с патогенами, что индуцирует постоянный повышенный синтез лектина, обусловленный необходимостью защиты организма животного от агрессивной окружающей среды. Для дальнейшего выяснения роли лектина в организме мидии было изучено изменение синтеза MTL в ответ на заражение моллюска патогенными микроорганизмами.

2.2 Заражение мидии *M. trossulus* дрожжами *Pichia pastoris* и бактериями *Vibrio proteolyticus*

Изменение уровня лектина в экстрактах мантии после заражения мидий дрожжами *P. pastoris* и бактериями *V. proteolyticus* показало участие MTL в реакциях врожденного иммунитета моллюска (рисунок 10).

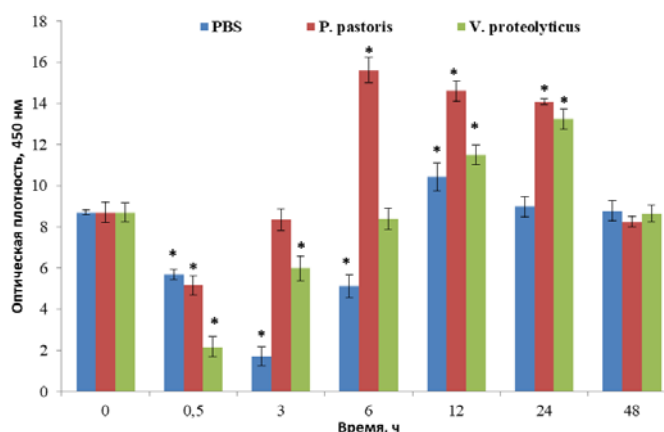


Рисунок 10 – Изменение уровня MTL в ответ на заражение моллюска *M. trossulus* дрожжами *P. pastoris* и бактериями *V. proteolyticus* (По последним данным филогенетического анализа род *Pichia* был разделен на *Pichia* и *Komagataella*. *Pichia pastoris* сейчас переименованы в *Komagataella pastoris*)

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

Установлено, что в ответ на введение патогенов в организм мидии через 30 минут после иммунизации уровень лектина резко снижался. По всей вероятности, это связано с быстрым расходом молекул лектина на удаление антигена из организма мидии. Через 24 часа после заражения бактериями и через 6 часов после контакта с дрожжами концентрация лектина достигала максимального значения, что может свидетельствовать об активации процесса синтеза лектинов. По мере удаления патогена из организма, концентрация лектина уменьшалась и постепенно возвращалась к исходному уровню. На основании полученных результатов можно предположить, что исследуемый лектин является компонентом иммунной системы мидии и участвует в защите организма беспозвоночного от внешнего воздействия.

2.3 MTL как паттерн-распознающий рецептор

Методом твердофазного лектин-ферментного анализа установлено, что лектин взаимодействует с исследуемыми ПАМП в следующей зависимости: пептидогликан > β -1,3-глюкан > LPS. Несмотря на то, что MTL напрямую слабо связывается с LPS - ПАМП, входящим, преимущественно, в состав клеточной стенки грамотрицательных бактерий, его экспрессия существенно индуцируется при заражении моллюска грамотрицательной бактерией *V. proteolyticus*. Вероятно, распознавание и связывание лектина с ПАМП, экспрессированными на клеточной поверхности бактерии *V. proteolyticus*, обусловлено, главным образом, взаимодействием с пептидогликаном - ПАМП, входящим в состав клеточной стенки грамположительных и грамотрицательных бактерий.

2.4 Противомикробная активность MTL

Противомикробную активность лектина изучали уже не на компонентах клеточных стенок бактерий, а на самих бактериях. Методом электрофореза в ПААГ с последующим Вестерн-блоттингом показано, что MTL взаимодействует как с грамположительными (*S. aureus* и *B. subtilis*), так и с грамотрицательными бактериями (*E. coli* и *V. proteolyticus*), а также с дрожжевыми грибами (*P. pastoris*) (рисунок 11).



Рисунок 11 – Взаимодействие лектина с бактериями и дрожжевыми грибами

Агглютинация микроорганизмов лектином свидетельствует о возможной микробостатической активности (рисунок 12), а ингибирование агглютинации специфическим моносахаридом – галактозой (данные не представлены), доказывает участие углевод-связывающего домена лектина во взаимодействии с углеводами клеточных стенок бактерий.

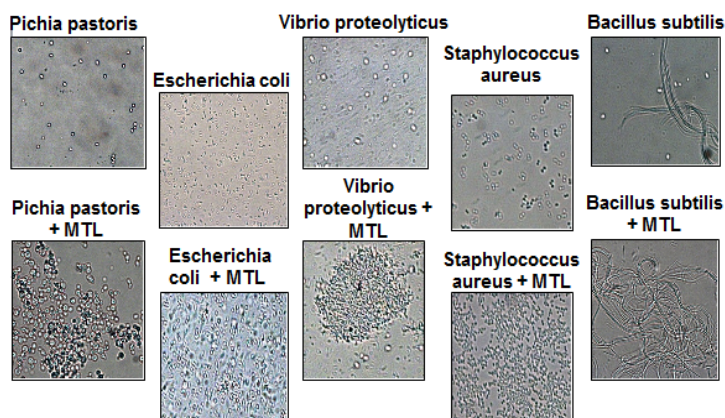
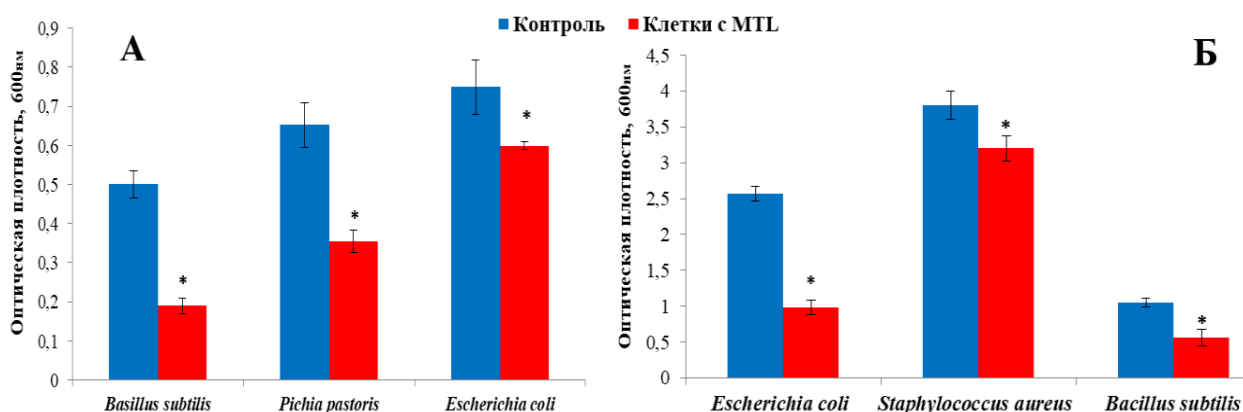


Рисунок 12 – Агглютинация бактерий и дрожжей MTL

Действуя как опсоины для усиления фагоцитоза или индуцируя бактериальную агглютинацию, лектины морских беспозвоночных участвуют во врожденном иммунном ответе. Микробостатические свойства были подтверждены действием лектина на рост клеток. Методом турбидиметрии установлено, что MTL ингибирует рост грамположительной бактерии *B. subtilis* на 62%, дрожжей *P. pastoris* на 44,6 % и грамотрицательной бактерии *E. coli* всего на 10,6 %, но не ингибирует рост бактерий *V. proteolyticus* и *S. aureus* (рисунок 13А).



А – влияние MTL на рост клеток; Б – влияние MTL на образование биопленок

Рисунок 13 – Бактериостатическая активность MTL

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

В настоящее время основной формой существования бактерий в естественных условиях являются связанные с поверхностью сообщества, получившие название биопленок, а не отдельные планктонные клетки. При исследовании влияния MTL на образование биопленок установлено, что лектин уменьшает их биомассу на 61,5% в случае с *E. coli*, на 13,0% - *S. aureus*, 52,3% - *B. subtilis* (рисунок 13Б). Высокая степень ингибирования роста бактерий *B. subtilis* и их биопленок объясняется тем, что множество полисахаридов клеточных стенок бактерий семейства Bacillaceae в местах разветвления углеводной цепи имеют свободные остатки как α -, так и β -Gal/GalNAc. Микробостатические свойства MTL позволяют сделать вывод, что лектин действует как паттерн-распознающий рецептор аналогично другим членам семейства mytilectin.

2.5 Антифунгальная активность

2.5.1 Связывание MTL с грибами

Изучение антифунгальной активности MTL проводили, используя грибы, ассоциированные с моллюском в естественных условиях (таблица 5, рисунок 14).

Таблица 5 – Грибы, ассоциированные с мидией *M. trossulus*

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

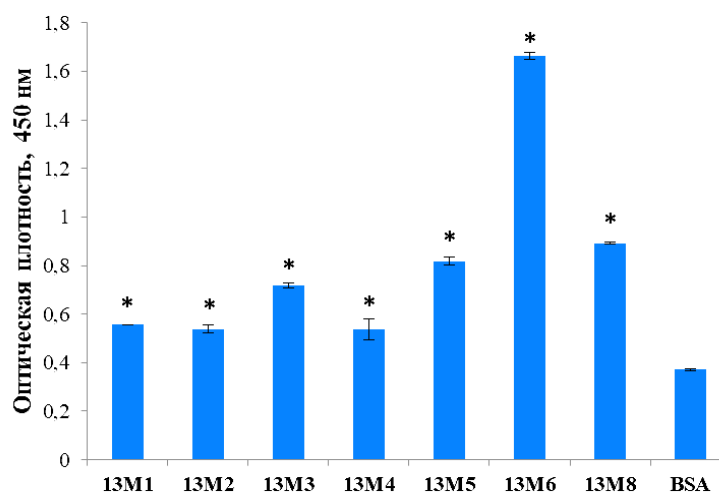


Рисунок 14 – Данные ТЛФА взаимодействия MTL с грибами, ассоциированными с мидией *M. trossulus*. BSA – отрицательный контроль

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

Методом ТЛФА установлено, что лучше всего MTL взаимодействует со штаммом 13M6 (*Aspergillus awamori* Nakaz.). Это объясняется тем, что грибы рода *Aspergillus* продуцируют внеклеточный матрикс, включающий моносахариды, α -1-3-глюканы, галактоманнаны и галактозаминогалактаны, состоящие из вариабельных галактопиранозных повторов, связанных с N-ацетилгалактозамином. По результатам ингибирования связывания лектина с грибами галактозой установлено, что взаимодействие идет по углевод-белковому пути за счет гликоконъюгатов, в том числе гликопротеинов, экспонированных на клеточной мембране (таблица 6).

Таблица 6 – Ингибирование связывания MTL с грибами галактозой

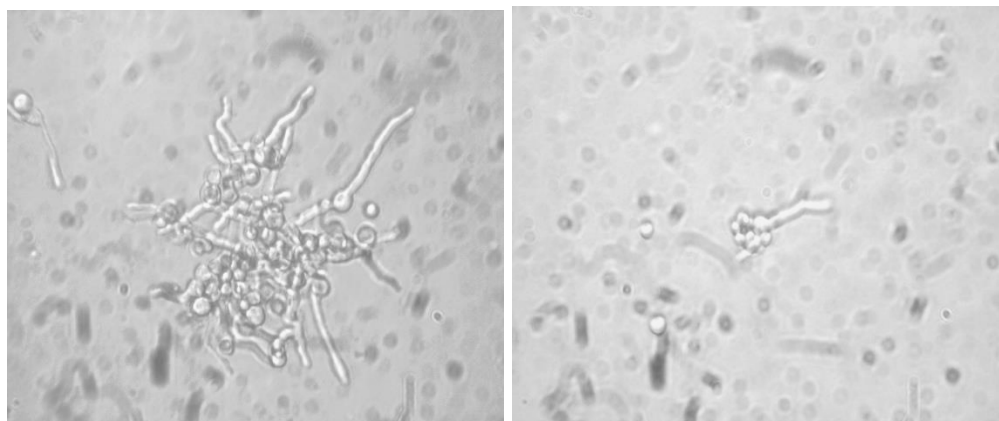
Штамм гриба	13M1	13M2	13M3	13M4	13M5	13M6	13M8
IC ₅₀ (Gal), mM	Не ингибирует	4	1,6	4	3,9	4,4	2,05

IC₅₀ – концентрация, необходимая для 50 % ингибирования связывания MTL с грибами

Известно, что антифунгальная активность лектинов связана с их способностью ингибировать рост и развитие грибов и дрожжей. Ингибирование роста грибов происходит в результате связывания лектина с гифами, вызывающего плохое поглощение питательных веществ. Связавшись с гифами, лектин препятствует процессу прорастания спор:

2.5.2 Изучение действия MTL на рост конидий грибов

Механизм фунгиостатической активности изучали, определяя действие лектина на прорастание конидий («спор») грибов. Конидии 3 штаммов выращивали в присутствии лектина и без него. Результат оценивался по длинам проростковых гиф, измеренных как в контроле, так и в опытном образце под микроскопом. О влиянии лектина на прорастание конидий судили по ингибированию гифального роста по сравнению с контролем (рисунок 15, таблица 7).



А

Б

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

Рисунок 15 – Прорастание конидий штамма 13M2

Таблица 7 - Длина конидий грибов при добавлении лектина и без него

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

Таким образом, можно сделать вывод, что MTL обладает выраженным фунгиостатическим действием. В организме мидии лектин, прежде всего, препятствует прорастанию конидий грибов.

2.6 Цитокин-стимулирующая активность

В последнее десятилетие было продемонстрировано немало доказательств участия лектинов в иммунологических реакциях. Транскрипты мРНК почти всех лектинов морских беспозвоночных увеличиваются после контакта с патогенами или ПАМПС, что указывает на их участие в процессе иммунной регуляции. Влияние MTL на спонтанную и индуцированную продукцию провоспалительных (TNF- α и IFN- γ) и противовоспалительного (IL-10) цитокинов клетками крови человека было изучено методом ИФА (рисунок 16).

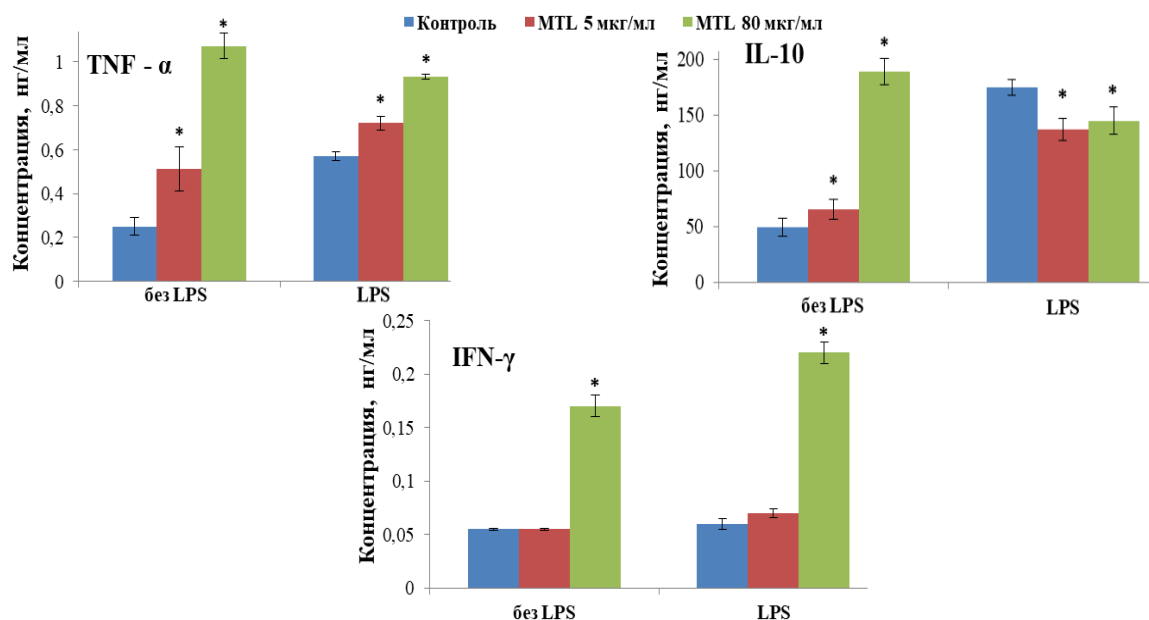


Рисунок 16 - Цитокин-стимулирующая активность MTL на цельной крови человека
Данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение ($n=3$), $*p<0,05$

Установлено, что MTL оказывает стимулирующее действие на спонтанную продукцию как провоспалительных, так и противовоспалительного цитокинов. В случае индукции клеток LPS лектин проявляет иммуномодулирующую активность, уменьшая сверхэкспрессию уровня IL-10, особенно при небольшой концентрации. Известно, что у морских беспозвоночных в организме присутствуют цитокиноподобные молекулы, которые гомологичны по морфологии и функциональности цитокинам млекопитающих. Действуя не только как ПРР, агглютинируя или опсонизируя патоген, MTL опосредовано влияет на синтез цитокинов, таким образом, еще раз подтверждая участие в реакциях врожденного иммунитета мидии.

2.7 Антипролиферативная активность

2.7.1 Взаимодействие MTL с глоботриозой *in silico*

Опираясь на полученные нами экспериментальные данные о значительном аффинитете MTL к мотиву Gal α 1-4Gal β 1-4GlcNAc, схожему со структурой глоботриозы

(Gb3) (Gal α 1-4Gal β 1-4Glc), высокоэкспрессируемой на мембране опухолевых клеток, была предпринята попытка *in silico* анализа связывания MTL с Gb3. Анализ контактов в углевод-связывающих сайтах лектина показал, что MTL связывается только терминальным моносахаридным остатком Gb3. Суммарная энергия связи трех углевод-связывающих сайтов MTL с глоботриозой ΔG равна -56,456 ккал/моль (-236,4 кДж/моль), что свидетельствует о энергетически выгодном состоянии лектина в комплексе с этим лигандом.

2.7.2 Антипролиферативное действие MTL на клетки линии лимфомы Беркитта

Клетки лимфомы Беркитта (линии Raji, EB-1 и Daudi) обрабатывали различными концентрациями MTL и через 48 часов регистрировали действие лектина на жизнедеятельность клеток по редукции реагента MTS (рисунок 17).

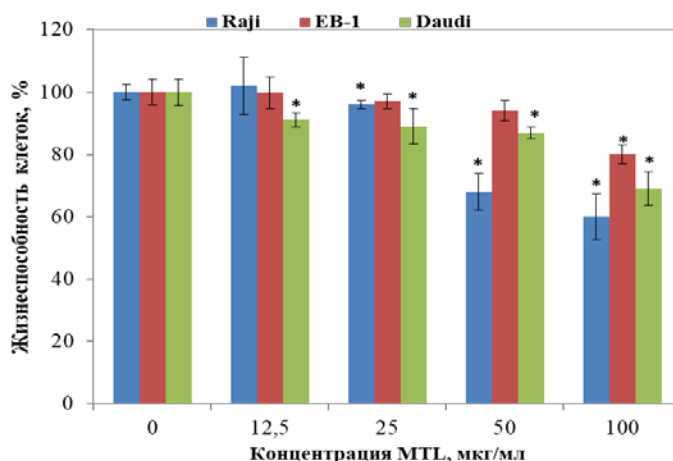


Рисунок 17 – Антипролиферативное действие MTL в отношении клеток лимфомы Беркитта, установленное с помощью MTS-метода

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

В результате исследования установлено, что лектин проявляет прямое дозозависимое антипролиферативное действие в отношении всех исследуемых клеток линий лимфомы Беркитта. Наибольшая активность MTL наблюдается в отношении клеток линии Raji, что дает основание для более глубокого изучения его антипролиферативной активности на этой линии клеток. В отношении нормальных эпителиальных мышечных клеток (JB-6) цитотоксическая активность MTL не наблюдалась.

2.7.3 Влияние MTL на клеточный цикл клеток линии Raji лимфомы Беркитта

Влияние MTL на клеточный цикл определяли методом проточной цитометрии. Клетки Raji линии лимфомы Беркитта инкубировали в присутствии различных концентраций MTL. После добавления красителя PI клетки анализировали на проточном цитофлуориметре (рисунок 18).

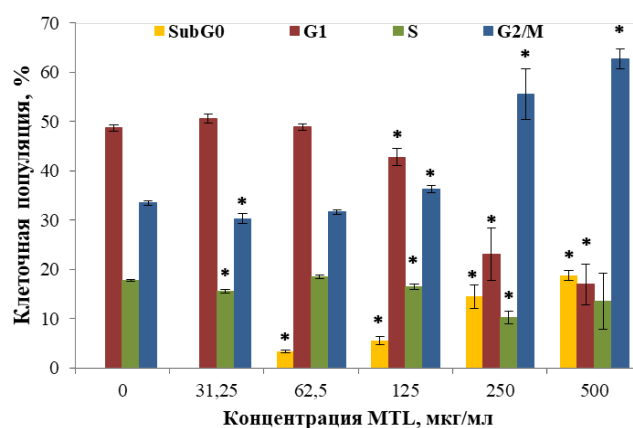


Рисунок 18 - Влияние MTL на клеточный цикл клеток линии Raji лимфомы Беркитта, установленное методом проточной цитофлуориметрии после окраски PI
Данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение ($n=3$), $*p<0,05$

Установлено, что MTL вызывает дозозависимое увеличение популяции клеток в фазе G2/M от 33 % до 64 %. Аналогичные результаты были показаны для CGL, который является структурным гомологом MTL. Стоит отметить небольшое, но концентрационно-зависимое увеличение клеточной популяции в фазе SubG0, позволяющее сделать предположение, что после ареста клеточного цикла, возможно, происходит апоптотическая гибель клеток. Ингибирование прогрессии цикла в фазе G2/M наблюдается также в случае ряда химиотерапевтических препаратов, используемых для борьбы с различными типами рака. Полученные результаты указывают на возможность применения MTL в качестве антипролиферативного агента для терапии онкологических заболеваний. Благодаря высокой специфичности взаимодействия с опухолевыми клетками, MTL может быть использован для диагностики и дифференцировки онкопатологий.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Лектины представляют собой биологически универсальные биомолекулы с антимикробным действием, особенно против бактерий, грибов и простейших, в дополнение к модуляции иммунитета хозяина. Для проявления своих свойств лектины связываются с углеводами на поверхности возбудителя, что приводит к повреждению клеточной стенки и препятствует прикреплению микроорганизмов к клеткам-хозяевам.

Проведенные исследования позволили получить представления о структурной организации MTL и его принадлежности к новому семейству лектинов – mytilectin. Важной особенностью пространственной организации MTL является способность к димеризации, которая влечет за собой увеличение числа углеводов-связывающих сайтов и обеспечивает высокую авидность по отношению к большим лигандам. Биологическая активность MTL свидетельствует о принадлежности лектина к группе паттерн-распознающих рецепторов и о непосредственном участии в реакциях врожденного иммунитета моллюска. Таким образом, многочисленные биологические свойства лектинов семейства mytilectin делают их интересными молекулами в контексте научных исследований, особенно в области разработки противомикробных, противоопухолевых и иммуностимулирующих препаратов.

ВЫВОДЫ

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

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах

1. **Литовченко А.П.**, Чикаловец И.В., Мизгина Т.О., Молчанова В.И., Черников О.В. Лектин MTL как фактор системы защиты мидии *Mytilus trossulus* // Российский иммунологический журнал. 2015. Т. 9(18). № 2-1. С. 696-697.
2. Chikalovets I.V., Kovalchuk S.N., Molchanova V.I., Pivkin M.V., Chernikov O.V., **Litovchenko A.P.** A new Gal/GalNAc-specific lectin from the mussel *Mytilus trossulus*: structure, tissue specificity, antimicrobial and antifungal activity // Fish & Shellfish Immunology. 2016. Т. 50. С. 27-33.
3. **Фильштейн А.П.** Исследование функциональной роли лектина из мидии *Mytilus trossulus* как фактора иммунной системы моллюска // Вестник Дальневосточного отделения Российской академии наук. 2018. № 2 (198). С. 154-158.
4. Чикаловец И.В., Молчанова В.И., Мизгина Т.О., **Фильштейн А.П.**, Лукьянов П.А., Черников О.В. Углеводсвязывающие белки и полисахариды морских гидробионтов // Вестник Дальневосточного отделения Российской академии наук. 2019. № 5 (207). С. 115-122.
5. Golotin V.A*, **Filshtein A.P***, Chikalovets I.V., Yu K.N., Molchanova V.I., Chernikov O.V. Expression and purification of a new lectin from mussel *Mytilus trossulus* // Protein Expression and Purification. 2019. Т. 154. С. 62-65.
6. Chikalovets I., **Filshtein A.**, Molchanova V., Mizgina T., Lukyanov P., Nedashkovskaya O., Chernikov O., Hua K.-F. Activity dependence of a novel lectin family on structure and carbohydrate-binding properties // Molecules. 2020. Т. 25. № 1. С. 150.

Материалы конференций

1. **Литовченко А.П.**, Мизгина Т.О., Козловский С.А., Чикаловец И.В. Антибактериальная и фунгицидная активности лектина из мидии *Mytilus trossulus* // XV Всероссийская молодежная

школа-конференция по актуальным проблемам химии и биологии. Владивосток. 2014: Тезисы докладов. С. 28-29.

2. **Литовченко А.П.**, Чикаловец И.В., Молчанова В.И. Доменная организация лектина из мидии *Mytilus trossulus* // VII Российский симпозиум "Белки и пептиды". Новосибирск, 12–17 июня 2015: Тезисы докладов. С. 391.

3. **Фильштейн А.П.**, Чикаловец И.В., Молчанова В.И. Цитокин-стимулирующая активность лектина из мидии *Mytilus trossulus* // III Всероссийская конференция «Фундаментальная гликобиология». Владивосток, 2016: Тезисы докладов. С. 116.

4. **Литовченко А.П.**, Чикаловец И.В., Черников О.В., Ковальчук С.Н., Молчанова В.И. Структура и функции лектина из мидии *Mytilus trossulus* // 6-й Международный симпозиум «Химия и химическое образование». Владивосток. ДВФУ. 2014: Тезисы докладов. С. 39-40.

5. Chikalovets I. V., Molchanova V. I., **Filshtein A. P.**, Chernikov O. V. Studies of the lectins from the mussels *Crenomytilus grayanus* and *Mytilus trossulus* // 2nd International symposium: Marine Enzyme and Polysaccharides, Nha Trang, Vietnam, Dec. 1–6, 2017. : abstrs book and sci. progr. – Vladivostok : Publ. House of the Far Eastern Federal University, 2017. P. 18.

6. Cherepanova A. V., Chikalovets I. V., Molchanova V. I., **Filshtein A. P.**, Mizgina T. O., Ovcharenko Y. S., Filenko A. D., Chernikov O. V. Influence of anthropogenic factors on the level of lectins from marine bivalve // 2nd International symposium: Marine Enzyme and Polysaccharides, Nha Trang, Vietnam, Dec. 1–6, 2017. : abstrs book and sci. progr. – Vladivostok : Publ. House of the Far Eastern Federal University, 2017. P. 41.

7. **Фильштейн А.П.**, Чикаловец И.В. Изучение лектина из мидии *Mytilus trossulus* // Актуальные проблемы химии и биологии: Материалы конференции / XVI Всероссийская молодёжная школа-конференция памяти В.Е. Васьковского. Владивосток, 4-9 сентября 2017. Владивосток. 2017: Тезисы докладов. С.66

8. **Фильштейн А.П.**, Чикаловец И.В., Молчанова В.И. Черников О. В. Влияние олигомеризации на углевод-связывающие свойства лектина из мидии *Mytilus trossulus* // Международная научная конференция по биоорганической химии «XII чтения памяти академика Ю. А. Овчинникова» и «VII Российский симпозиум белки и пептиды»: Москва, ИБХ РАН, 18-22 сентября 2017: Тезисы докладов. С. 116.

9. **Фильштейн А.П.**, Чикаловец И.В. ПАМП-связывающая активность лектина из мидии *Mytilus trossulus* // IV Всероссийская конференция «Фундаментальная гликобиология». Киров. 23-28 сентября 2018: Тезисы докладов. С. 131-132.

10. Mizgina T., Chikalovets I., **Filshtein A.**, Ovcharenko Y., Molchanova V., Chernikov O. The dose-dependent pamps binding activity of lectins from sea invertebrates // 43rd FEBS Congress. Biochemistry Forever, Prague. Czech Republic. July 7-12 2018. Supplement: T. 8. № S1. С. 387.

11. **Filshtein A.P.**, Chikalovets I.V., Molchanova V.I., Chernikov O.V. Study of PAMP - binding activity of the lectin from the mussel *Mytilus trossulus* // 25th International Symposium on Glycoconjugates , August 25-31, 2019, Milano, Italy. Glycoco. J. 2019. T. 36. № S. С. 317.

12. Mizgina T.O., **Filshtein A.P.**, Chikalovets I.V., Molchanova V.I., Hua K., Chernikov O.V. Comparative study of the structure-function of the relationship of a new family lectins from mytilus genus // 25th International Symposium on Glycoconjugates , August 25-31, 2019, Milano, Italy. Glycocon. J. 2019. T. 36. № S. С. 348.

13. Чикаловец И.В., **Фильштейн А.П.**, Молчанова В.И., Черников О.В. Структура углевод-связывающих доменов и противоопухолевая активность лектинов нового семейства // II объединенный научный форум. VI съезд физиологов СНГ. VI съезд биохимиков России. IX Российский симпозиум "Белки и Пептиды". Сочи. Дагомыс. 1 – 6 октября 2019: Acta Naturae (русскоязычная версия). Т. 11. № S2. С. 279.

14. **Фильштейн А.П.**, Молчанова В.И., Чикаловец И.В. Сравнительное исследование активности нативного и рекомбинантного лектинов из мантии мидии *Mytilus trossulus* // II объединенный научный форум. VI съезд физиологов СНГ. VI съезд биохимиков России. IX Российский симпозиум "Белки и Пептиды". Сочи. Дагомыс. 1 – 6 октября 2019: Acta Naturae (русскоязычная версия). Т. 11. № S2. С. 281.
15. **Фильштейн А.П.**, Чикаловец И.В., Молчанова В.И. Бактериостатическая и цитотоксическая активности лектина из мидии *Mytilus trossulus* // Научная конференция, посвященная 55-летию ТИБОХ ДВО РАН и 90-летию со дня рождения его основателя академика Г.Б. Еякова. Владивосток. 2019: Тезисы докладов. С. 53.
16. **Фильштейн А.П.**, Чикаловец И.В., Кузьмич А.С., Черников О.В. Влияние лектинов из нового семейства mytilectin на пролиферацию опухолевых клеток // XVII Всероссийской молодежной онлайн школы-конференции. Актуальные проблемы химии и биологии. ТИБОХ ДВО РАН. Владивосток. 7-10 сентября 2020: Тезисы докладов. С. 31.
17. Черников О.В., Кузьмич А.С., Молчанова В.И., Мизгина Т.О., **Фильштейн А.П.**, Чикаловец И.В. Противоопухолевый потенциал лектинов морских беспозвоночных // V Всероссийская конференция «Фундаментальная гликобиология». Гатчина. 21 – 24 сентября 2021: Тезисы докладов. С. 100.
18. **Фильштейн А.П.**, Чикаловец И.В., Молчанова В.И., Черников О.В. Пространственная структура лектина из мантии мидии *Mytilus trossulus* // V Всероссийская конференция «Фундаментальная гликобиология». Гатчина. 21 – 24 сентября 2021: Тезисы докладов. С. 100. С. 97-98.