

На правах рукописи

ШАМШУРИНА
Екатерина Валерьевна

**Структурная и функциональная характеристика маннан-связывающего лектина
морского ежа *Strongylocentrotus nudus***

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

03.01.04 – биохимия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Владивосток – 2010

Работа выполнена в Учреждении Российской академии наук Институте биологии моря им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения РАН

Научные руководители:

кандидат биологических наук, старший научный сотрудник
Елисейкина Марина Геннадьевна

кандидат химических наук, старший научный сотрудник
Булгаков Александр Александрович

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор
Одинцова Нэлия Адольфовна

кандидат биологических наук, старший научный сотрудник.
Агафонова Ирина Григорьевна

Ведущая организация:

Учреждение Российской академии наук Институт цитологии РАН

Защита состоится “23” декабря 2010 года в 10 часов на заседании диссертационного совета Д 005.008.01 при Учреждении Российской академии наук Институте биологии моря им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения РАН по адресу: 690041, г. Владивосток, ул. Пальчевского, 17.

e-mail: inmmarbio@mail.primorye.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Учреждения Российской академии наук Института биологии моря им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения РАН (690041, г. Владивосток, ул. Пальчевского, 17).

Отзывы просим присылать на e-mail: mvaschenko@mail.ru

Автореферат разослан ___ ноября 2010 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Ващенко

М.А. Ващенко

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Лектины – это обширный класс белков, обладающих общим свойством обратимо и избирательно связывать углеводы и углеводные детерминанты биополимеров без изменения их ковалентной структуры (Королев, 1984). На данный момент лектины обнаружены у организмов, находящихся на разных ступенях эволюции, начиная от наиболее примитивных форм жизни – вирусов и бактерий – до представителей высших позвоночных, что свидетельствует об эволюционной древности и универсальности механизмов, основанных на белок-углеводном распознавании. Известно, что лектины принимают участие во многих биологических процессах, таких как – оплодотворение, развитие, миграция клеток, апоптоз и т.д., а биологическая значимость лектинов определяется значимостью их лигандов – углеводов (Ni, Tizard, 1996). Важную роль играют лектины в реакциях конститутивного или врожденного иммунитета. Являясь составной частью иммунитета позвоночных, лектины осуществляют немедленную, в отличие от системы адаптивного иммунитета, реакцию на инфекцию или повреждение. Наиболее изученными лектинами, выполняющими барьерную функцию, являются лектины С-типа, и, в частности, маннан-связывающие лектины (МСЛ), относящиеся к коллектинам. Исследована структура молекулы МСЛ и установлено наличие в ней консервативного участка, ответственного за связывание с углеводами (углевод-распознающего домена) и эффекторного коллагеноподобного домена. Установлено, что МСЛ в комплексе с сериновыми протеазами участвуют в активации системы комплемента по лектиновому пути (Theal et al., 1997), активизируют фагоцитоз, выступая в роли опсоинов (Kuhlman et al., 1989).

У представителей беспозвоночных животных структура и функции МСЛ исследованы значительно меньше, чем у позвоночных, несмотря на то, что данные лектины обнаружены как у первичноротых (коралловые полипы, моллюски, ракообразные, насекомые), так и у вторичноротых животных (иглокожие, низшие хордовые – асцидии, ланцетник). Вместе с тем, МСЛ – часть древней системы защиты, составляющей основу неспецифического иммунитета беспозвоночных и послужившей предшественником сложного иммунитета позвоночных животных. Поэтому, исследование системы неспецифического иммунитета беспозвоночных, в частности МСЛ, имеет большое значение для понимания процесса формирования и становления функций этого компонента защитной системы в эволюции Metazoa. Для развития эволюционных представлений актуальны исследования, выполненные на иглокожих – примитивных, близких к предковым формам, представителях вторичноротых животных. Иглокожие являются классическим экспериментальным объектом для работ в области биологии развития и сравнительной иммунологии. Ранее у двух представителей голотурий – *Cucumaria japonica* и *Apostichopus japonicus* – были обнаружены и охарактеризованы МСЛ, гомологичные МСЛ позвоночных (Булгаков и др., 2000; Bulgakov et al., 2007). Исследована биологическая активность этих лектинов, их роль в иммунной защите. Кроме того, показано, что МСЛ *A. japonicus* задействованы в процессе регенерации пищеварительного тракта после его эвисцерации, что является доказательством интегративной функции иммунной системы и участия ее компонентов в процессах поддержания структурного гомеостаза организма. В серии предварительных исследований показано наличие лектинной активности целомической жидкости морского ежа *Strongylocentrotus nudus* по отношению к маннанам – полисахаридам, построенным из остатков маннозы.

Цель и задачи работы. Целью работы явилось исследование структуры, физико-химических свойств, роли в защитных реакциях и эмбриогенезе нового лектина,

выделенного из целомической жидкости морского ежа *S. nudus* (МСЛ-SN) – вероятного гомолога маннан-связывающих лектинов позвоночных. В связи с этим были поставлены следующие задачи:

1. Изучить основные физико-химические свойства МСЛ-SN;
2. Определить аминокислотную последовательность молекулы МСЛ-SN;
3. Установить локализацию в организме морского ежа и возможные места биосинтеза МСЛ-SN;
4. Исследовать роль МСЛ-SN в защитных реакциях и в эмбриогенезе морского ежа *S. nudus*.

Научная новизна. Из целомической жидкости морского ежа *S. nudus* выделен и всесторонне охарактеризован новый лектин. Установлена его тонкая углеводная специфичность, определены основные физико-химические свойства и аминокислотная последовательность молекулы. На основании полученных данных лектин был отнесен к маннан-связывающим лектинам С-типа. Установлено наличие в организме морского ежа двух иммунохимически идентичных форм лектина: растворенной в целомической жидкости и связанной, входящей в состав компонентов внеклеточного матрикса. Определены вероятные источники биосинтеза МСЛ-SN. Показан широкий спектр биологической активности МСЛ-SN: являясь компонентом неспецифического иммунитета и выступая в роли опсонина, лектин задействован в процессе эмбрионального развития, способствуя миграции клеток первичной мезенхимы.

Личный вклад. Материал, положенный в основу диссертационной работы, в основном, получен, обработан и проанализирован автором самостоятельно. Выделение и определение свойств МСЛ-SN было выполнено под руководством ст.н.с., к.х.н. А.А. Булгакова и н.с., к.б.н. И.Ю. Петровой. Установление аминокислотной последовательности лектина было проведено совместно с н.с., к.б.н. С.Н. Ковальчук. Основная часть работ по проведению иммуноцитохимических и электронно-микроскопических исследований, а также по установлению функций МСЛ-SN в организме морского ежа выполнена при непосредственном участии автора.

Теоретическое и практическое значение работы. У представителя иглокожих обнаружен МСЛ-SN, выполняющий защитную функцию и гомологичный МСЛ позвоночных животных, что доказывает эволюционную преемственность этого компонента неспецифического иммунитета в ряду вторичноротых. Полученные данные вносят существенный вклад в теорию происхождения системы комплемента – одного из основных механизмов защиты позвоночных. Установлено участие МСЛ иглокожих в процессах эмбриогенеза и показана интегративная роль этого компонента врожденного иммунитета. Практическое значение результатов работы связано с возможностью применения нового лектина, функционально и структурно охарактеризованного, обладающего уникальной углеводной специфичностью, в биомедицинских исследованиях.

Апробация работы. Основные материалы диссертации были представлены на симпозиуме с международным участием «Клеточные, молекулярные и эволюционные аспекты морфогенеза» (Россия, Москва, 2007), на XI Международной молодежной конференции по актуальным проблемам химии и биологии (ТИБОХ ДВО РАН, МЭС, 2007), на XII Всероссийской школе конференции по актуальным проблемам химии и биологии (ТИБОХ ДВО РАН, МЭС, 2009) и на годовых конференциях ИБМ ДВО РАН (2008 – 2010)

Публикации. По теме диссертации опубликовано 6 работ, в том числе 2 статьи в журналах из списка, рекомендованного ВАК.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из 5 глав, выводов и списка литературы (167 источников, из которых 157 на английском языке). Работа изложена на 103 страницах, из них 61 машинописного текста, 24 иллюстрации (2 таблицы, 14 микрофотографий, 1 электроннограмма, 7 графиков).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объект исследования. Исследования выполнены на морском еже *Strongylocentrotus nudus* (Echinoidea, Regularia). Животных собирали в зал. Восток (зал. Петра Великого, Японское море) и содержали в аэрируемых аквариумах.

Биохимические методы. Для выделения МСЛ-SN использовали сочетание трех видов жидкостной хроматографии. На первом этапе применяли колоночную ионообменную хроматографию на сорбенте DEAE TSK 650M. На втором этапе – аффинную хроматографию на синтезированном нами сорбенте маннан-сефарозе, при этом в качестве лиганда использовали бактериальный α -D-маннан, (выделенный из культуральной жидкости *Vibrio fluvialis*, (штамм AQ-00010)). На последнем этапе выделения лектин-содержащий препарат дополнительно очищали с помощью гель-проникающей хроматографии. Наличие лектина в выделенных фракциях, эффективность очистки, а также изучение свойств лектина проводили с использованием реакции прямой гемагглютинации (РПГА). Для определения углеводной специфичности лектина применяли метод ингибирования РПГА различными углеводами. Определение гомогенности препаратов лектина, его молекулярной массы и субъединичный состав молекулы определяли с помощью электрофореза в денатурирующих условиях в 15% полиакриламидном геле (Laemmli, 1970) и вестерн-блот анализа (Towbin, 1984).

Иммунохимические методы. Для получения антисывороток к лектину проводили иммунизацию кроликов. Содержание антител к лектину и специфичность сывороток определяли методом радиальной иммунодиффузии по Оухтерлони в модифицированном варианте (Khrankova, Abelev, 1961). Иммуноглобулиновую фракцию получали осаждением сульфатом аммония, затем ее диализовали против дистиллированной воды, центрифугировали и супернатант лиофилизовали. Для прижизненного окрашивания эмбрионов *S. nudus* антителами к МСЛ-SN (АТ(МСЛ-SN)), получали конъюгат антител с FITC. К раствору АТ(МСЛ-SN) в ТБС (0.01 М Трис-НСl, рН 7.5 и 0.15 М NaCl), рН 8.0 (5 мг/мл) добавляли 400 мкл FITC в безводном диметилсульфоксиде (1 мг/мл) и инкубировали в течение 1 ч при 20°C в темноте при постоянном перемешивании. Затем проводили гель-фильтрацию меченых АТ(МСЛ-SN) на колонке (10×300 мм) с Сефадексом-G25, уравновешенной ТБС. Очищенные меченые АТ(МСЛ-SN) хранили при – 20°C в 50% глицерине.

Методы молекулярного клонирования и секвенирования. Выделение суммарной РНК из целоцитов *S. nudus* проводили при помощи метода кислой экстракции с использованием гуанидинизотиоцианата и кислого фенола (Chomczynski et al., 1987). кДНК синтезировали с тотальной РНК с помощью SMART cDNA Amplification Kit (Clontech, США). Для амплификации фрагментов кДНК МСЛ использовали вырожденные олигонуклеотидные праймеры (Sn1: 5'-GGNCATCTNGT(C/G)TCNAT(C/T)CA-3' и Sn2: 5'-TA(A/G)TT(G/A)TTNGG(T/C)TCNCC-3'). Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили в течение 37 циклов при следующих условиях: 95°C – 10 с, 58°C – 25 с, 72°C – 30 с, после чего продукты реакции были клонированы и секвенированы с помощью InsT/A clonePCR Product Cloning Kit (Fermentas, Lithuania) и ABI Prism 310 Genetic Analyzer, соответственно. 3'- и 5'- концевые участки МСЛ были установлены с помощью

метода RACE с применением специфических праймеров (Sn5: 5'-AACTCTTCCACAGGTCAAAG-3' и Sn3: 5'-GATGGGACCCGATGGACTAC-3') и адаптер-специфического праймера 5'-GTAАТАСGACTCACTАТАGGG CAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3' (Matz et al., 1999). Профиль реакции: (95°C – 10 с; 65°C – 20 с; 72°C – 1 мин) – 37 циклов. Анализ установленных последовательностей проводили с помощью веб-сайта NCBI-BLAST. Определение доменной организации белков проводили с помощью сервера SMART, множественное выравнивание аминокислотных и нуклеотидных последовательностей с помощью программы Clustal W 2.0, а вторичную структуру лектинов определяли с помощью программы PSIPRED.

Иммуноцитохимические методы. Методы прямого и непрямого иммуноцитохимического окрашивания использовали для выявления МСЛ-SN в эмбрионах и тканях *S. nudus*. Образцы тканей и суспензию эмбрионов на разных стадиях развития фиксировали в смеси 4% параформальдегида и 0.2% глутарового альдегида на фосфатном буфере (Пар-ФБ), 1 ч при 4°C, затем материал отмывали от фиксатора, обезвоживали в серии спиртов возрастающей концентрации и заливали в Парапласт (Sigma, США). Срезы толщиной 3 – 5 мкм изготавливали на ротационном микротоме НМ-360 (Carl Zeiss, Германия), депарафинировали, промывали фосфатно-солевым буфером (ФБС), обрабатывали 0.1% раствором Тритона X-100 на ФБС, после чего образцы отмывали ФБС и блокировали 10% раствором БСА на ФБС, содержащем 0.02 Тритона X-100 (ФБС-Т) в течение 2 ч. Затем срезы инкубировали 24 ч в растворе АТ(МСЛ-SN) (0.04 мкг/мл), приготовленных на 10% растворе БСА в ФБС-Т, промывали ФБС и на 2 ч наносили раствор вторичных антител к IgG кролика (0.02 мкг/мл), конъюгированных с Alexa 488 (Sigma), приготовленных на 1% растворе БСА в ФБС-Т. Затем срезы отмывали ФБС, наносили раствор DAPI (1/4000) (Sigma), промывали ФБС и заключали в Moviol (Sigma). В качестве контроля использовали срезы, обработанные вместо первичных антител 10% раствором БСА на ФБС.

Прижизненное окрашивание эмбрионов *S. nudus* АТ(МСЛ-SN), конъюгированными с FITC, проводили, помещая эмбрионы в среду, содержащую антитела в концентрации 0.04 мкг/мл, на 15 мин. Затем материал фиксировали 0.2% раствором глутаральдегида.

Локализацию МСЛ-SN в целомоцитах *S. nudus* определяли с использованием мазков клеток целомической жидкости, а также полутонких и ультратонких срезов ступка целомоцитов. Для приготовления мазков целомическую жидкость, разбавленную стерильной морской водой в соотношении 1:1, инкубировали при температуре 12°C на предметных стеклах, предварительно обработанных поли-L-лизин гидробромидом (м.м. 150 – 350 кДа, Sigma). Затем жидкость удаляли, добавляли на стекло стерильную морскую воду и инкубировали осевшие целомоциты в течение 30 мин при той же температуре, после чего мазки фиксировали Пар-ФБ и проводили иммуноцитохимическое окрашивание АТ(МСЛ-SN) согласно приведенной ранее схеме.

Препараты анализировали с использованием эпифлуоресцентного микроскопа AXIO IMEDGER (Carl Zeiss), снабженного системой COLIBRI, и лазерного сканирующего конфокального микроскопа LSM 510 (Carl Zeiss).

Для получения ступка целомоцитов целомическую жидкость отбирали в шприц, содержащий фиксатор Пар-ФБ, и центрифугировали. Образовавшийся ступок помещали в фиксатор на 4 ч при 4°C, отмывали ФБС, обезвоживали в серии растворов этанола возрастающей концентрации и заключали в среду LR White (Sigma) по общепринятой методике (Миронов и др., 1994). Полутонкие (1 мкм) и ультратонкие срезы изготавливали на ультрамикротоме Leica UC6 (Leica, Германия). Окрашивание полутонких срезов проводили по той же схеме, что и окрашивание мазков целомоцитов.

Ультратонкие срезы для электронной иммуноцитохимии промывали ФБС, содержащем 0.1% Тритона X-100, затем инкубировали в 10% БСА на ФБС и помещали в раствор АТ(МСЛ-SN) (0,02 мкг/мл), в 10% БСА на ФБС на 24 ч. После чего промывали в ФБС, содержащем 1% БСА и 0.01% Тритона X-100, и наносили раствор вторичных антикродличьих антител (0.01 мкг/мл), конъюгированных с коллоидным золотом. Время инкубации составляло 3 ч при 21°C. Затем срезы промывали ФБС, дофиксировали 1% раствором глутарового альдегида в течение 5 мин, отмывали от фиксатора и солей дистиллированной водой, контрастировали водным раствором уранилацетата и анализировали на трансмиссионном электронном микроскопе Libra 120 (Carl Zeiss).

Определение роли МСЛ-SN в защитных реакциях и эмбриогенезе.

Исследование влияния МСЛ-SN на фагоцитарную активность целомочитов *S. nudus* проводили в условиях *in vitro*. В лунки 24-луночного пластикового планшета для культивирования (TPP, Швейцария), помещали обработанные поли-L-лизинном стекла. Затем вносили суспензию целомочитов (5×10^5 кл/мл) в растворе CMFSS, содержащем 15 мМ ЭДТА. Планшеты центрифугировали (400g, в течение 5 мин) и оставляли на 30 мин в климатической камере при 18°C. Затем клетки однократно отмывали стерильной морской водой и инкубировали в стерильной морской воде в течение 2 ч при той же температуре. В качестве пищевых моделей использовали фиксированные Пар-ФБ бактерии *Yersinia pseudotuberculosis*, окрашенные флуоресцентным красителем FITC (Miliukiené et al., 2007). Поверхности бактериальных клеток дополнительно обрабатывали, инкубируя их в течение 2 ч при 18°C в растворе, содержащем 0.1 мг/мл очищенного препарата МСЛ-SN (первый вариант пищевой модели), а также в предварительно отцентрифугированной бесклеточной целомочической жидкости морского ежа *S. nudus* (второй вариант пищевой модели). Контролем послужили меченные FITC бактерии с необработанной лектином поверхностью. Суспензию бактерий (2×10^7 клеток/мл) вносили в культуру целомочитов и через 10, 20, 40 и 60 мин в культуральную среду добавляли раствор трипанового синего для гашения метки не поглощенных амебоцитами бактерий, отмывали три раза стерильной морской водой и фиксировали Пар-ФБ в течение 1 ч при 4°C. Затем культуру клеток промывали ФБС, интенсивность флуоресценции регистрировали при помощи планшетного флуориметра DTX 880 (Bekman Coulter, США) с возбуждающим светофильтром 485 нм и поглощающим 535 нм. Дополнительно препараты анализировали с использованием лазерного конфокального сканирующего микроскопа LSM 510 (Carl Zeiss).

Для изучения роли МСЛ-SN в эмбриогенезе было исследовано влияние МСЛ и АТ(МСЛ-SN) на ранние стадии развития морского ежа *S. nudus*. Конечная концентрация веществ в растворе составляла 0.2, 0.05 и 0.01 мг/мл. Контролем служили эмбрионы и личинки, развивающиеся в стерильной морской воде и в стерильной морской воде, содержащей БСА. Развитие проходило при 20°C. Материал фиксировали через 5 мин (оплодотворенная яйцеклетка), 1.5 ч (два бластомера), 8 ч (бластула), 20 ч (средняя гастрюла 1), 24 ч (поздняя гастрюла 1) и 48 ч (ранний плутеус) после оплодотворения, добавляя 25% глутаровый альдегид до конечной концентрации 0.4%. Материал анализировали с использованием микроскопа Leica DM4500 (Leica).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Физико-химические свойства МСЛ-SN

Из целомочической жидкости морского ежа *S. nudus* нами выделен белок, обладающий лектинной активностью – МСЛ-SN, с м.м. 32 кДа (по данным ДСН-ПААГ-электрофореза в невосстанавливающих условиях). Проведение ДСН-ПААГ-

электрофореза в восстанавливающих условиях приводит к исчезновению полосы с м.м. 32 кДа и появлению полосы 16 кДа (рис.1 А.). Для подтверждения субъединичного строения данного белка был проведен вестерн-блот анализ очищенного препарата лектина с использованием полученных к димеру лектина антител. Установлено, что антитела окрашивают две полосы – 32 кДа и 16 кДа, что свидетельствует о том, что полоса с м.м. 16 кДа соответствует субъединице молекулы в области полосы с м.м. 32 кДа (рис. 1. Б.).

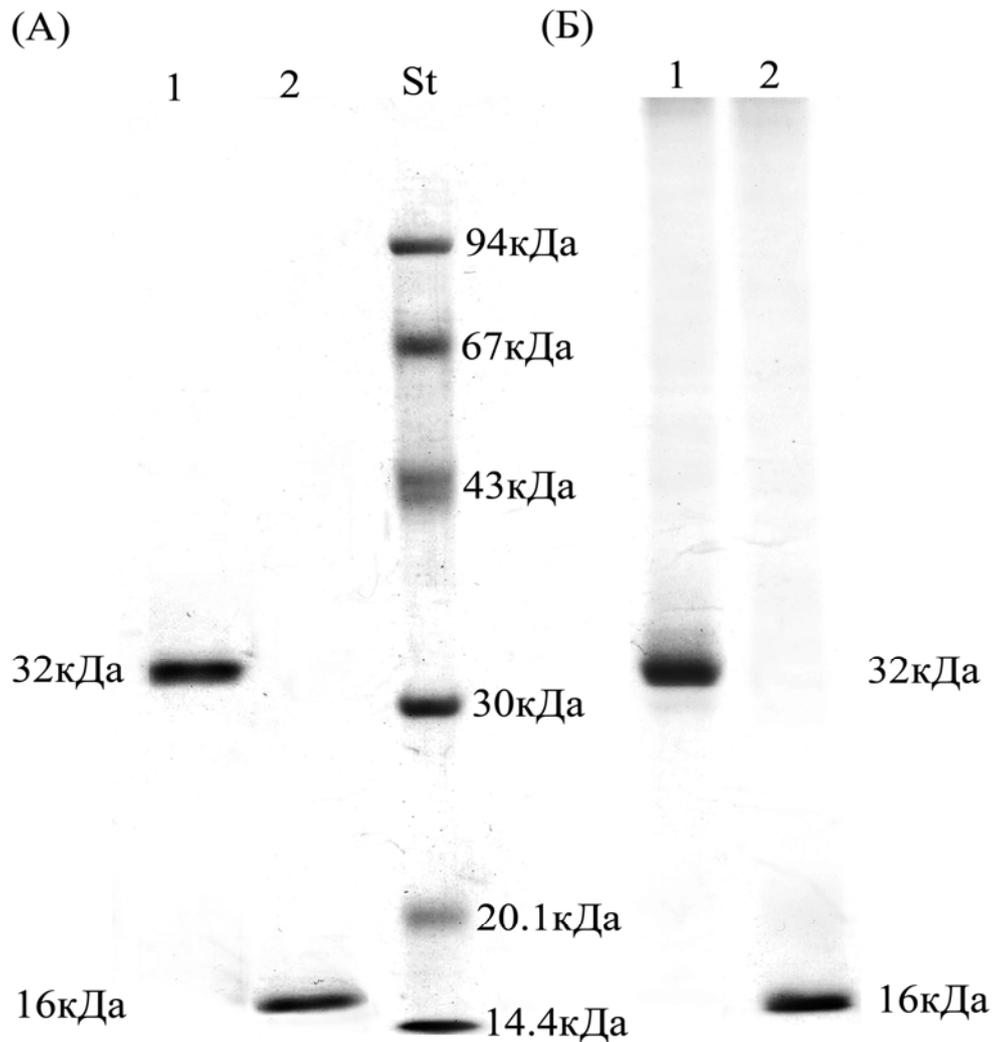


Рис. 1. ДСН-ПААГ-электрофорез (А) и вестерн-блот (Б) аффинно-очищенного препарата МСЛ-SN: 1 – в невосстанавливающих условиях, 2 – после восстановления β -меркаптоэтанолом.

Одной из характеристик, на основании которых строится классификация лектинов, является Ca^{2+} -зависимость их лектинной активности (Dricamer, 1988). Нами установлено, что МСЛ-SN является Ca^{2+} -зависимым лектином, а наибольшую углевод-связывающую активность он проявляет при концентрации ионов Ca^{2+} 30 мМ (рис. 2).

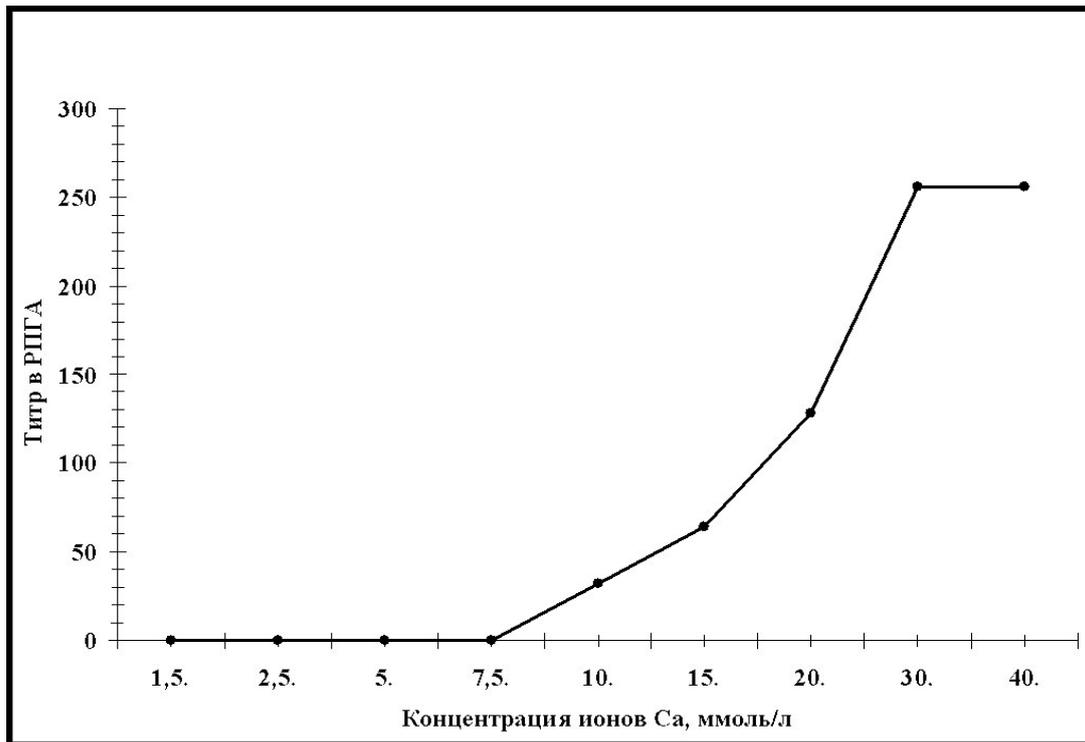


Рис. 2. Зависимость активности МСЛ-SN от концентрации ионов Ca^{2+} .

Исследование зависимости лектинной активности от pH среды показало, что оптимальным для данного лектина является диапазон значений pH 4.0–7.0. При pH 5.0 и ниже лектин полностью терял способность взаимодействовать с углеводными детерминантами эритроцитов и частично денатурировал (рис. 3).

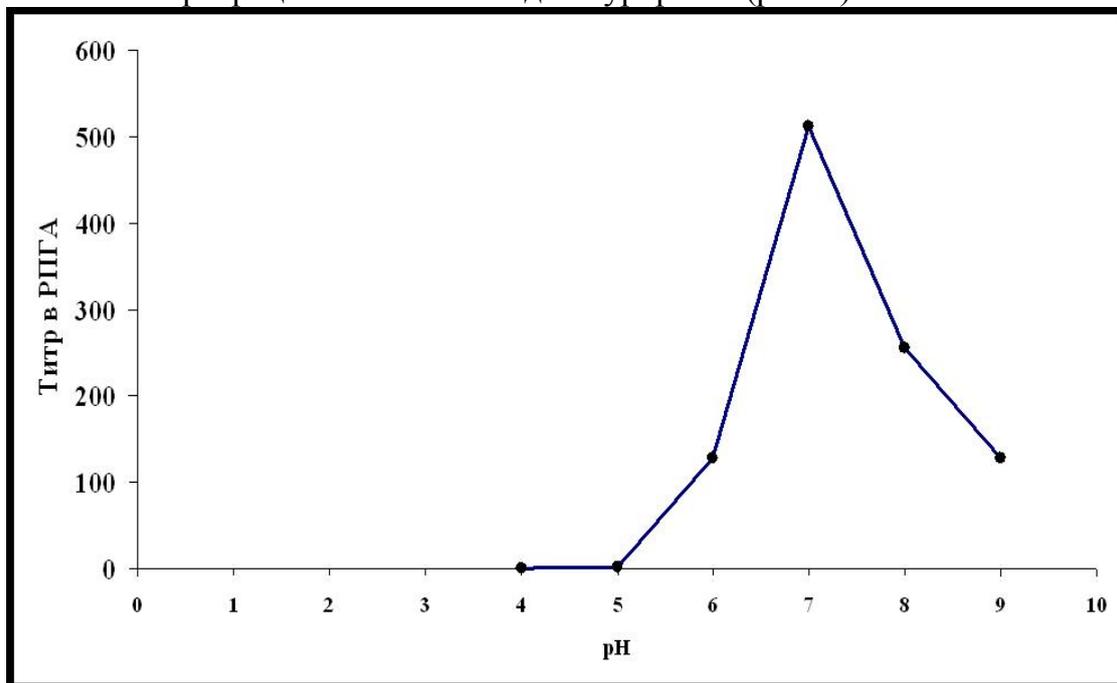


Рис. 3. Зависимость активности МСЛ-SN от pH

Результаты экспериментов, в которых оценивали зависимость активности МСЛ-SN от температуры, показали, что в процессе увеличения температуры раствора активность лектина, определенная в РПГА, постепенно снижается. При температуре 4°C наблюдаются наибольшие значения геммагглютинирующей активности, тогда как

дальнейшее нагревание раствора приводит к ее снижению. Причем при нагревании раствора лектина до температуры 60°C наблюдается его полная тепловая денатурация.

Для определения углеводной специфичности МСЛ-SN была изучена способность ряда моно-, олиго- и полисахаридов ингибировать взаимодействие данного лектина с углеводными детерминантами трипсинизированных эритроцитов 0-й группы крови человека. В результате проведенных экспериментов удалось установить, что вызванная данным лектином гемагглютинация не отменяется большинством использованных нами в экспериментах моно-, олиго- и полисахаридов. Вместе с тем, МСЛ-SN взаимодействует с разветвленными маннанами, выделенными из культуральной жидкости морских галофильных бактерий: *Vibrio fluvialis* (штамм AQ-0002B и AQ-00010A), *Alteromonas atlanticus* и *Pseudoalteromonas atlantica* (штамм IAM 14175). Данные маннаны представляют собой гомополисахариды, состоящие из $\alpha 1 \rightarrow 2$ и $\alpha 1 \rightarrow 6$ связанных остатков D-маннозы и отличаются степенью разветвленности и длиной боковых цепей.

Таким образом, лектин, выделенный нами из целомической жидкости морского ежа *S. nudus*, является лектином С-типа, а установленная углеводная специфичность позволяет отнести его к маннан-связывающим лектинам. Молекулярная масса молекулы МСЛ-SN, а также ее димерная организация из двух идентичных субъединиц, соединенных дисульфидными связями, демонстрируют сходство этого лектина с МСЛ, обнаруженными у других представителей беспозвоночных – кораллового полипа *Acrohora millehora*, (Kvennefors et al., 2008), двустворчатого моллюска *Codakia orbicularis* (Gourdine, Smith-Ravin, 2007) и голотурий – дальневосточного трепанга *A. japonicus* (Bulgakov et al., 2007) и японской кукумарии *C. japonica* (Булгаков и др., 2000). У представителей позвоночных животных, молекулярная масса субъединицы выше и составляет 25–67 кДа (Colley et al., 1988; Sekine et al., 2001; Takahashi et al., 2006). Отмеченные различия, вероятно, можно объяснить появлением в составе молекулы МСЛ позвоночных дополнительных доменов, отсутствующих в составе молекулы МСЛ-SN. Основные физико-химические свойства МСЛ-SN, такие как Ca^{2+} -, pH- и температурная зависимость, а также углеводная специфичность доказывают сходство данного лектина с МСЛ-SJ японской кукумарии (Булгаков и др., 2000) и МСЛ-AJ дальневосточного трепанга (Bulgakov et al., 2007) и, кроме того, позволяют рассматривать МСЛ-SN в качестве гомолога МСЛ позвоночных.

2. Аминокислотная последовательность и предсказанная пространственная структура молекулы МСЛ-SN

Данные об аминокислотной последовательности белков позволяют судить о структурных особенностях молекулы лектина – в частности, о пространственной организации участков, ответственных за взаимодействие с углеводами, что позволяет отнести его к определенной группе углеводов-распознающих белков, а также установить степень его гомологии с лектинами других групп животных. На основании этих данных построена принятая в настоящее время классификация зоолектинов (Zelensky, Gready, 2005).

В результате клонирования кДНК, выделенной из целоцитов *S. nudus*, установлено наличие трех изоформ МСЛ-SN, обладающих высокой степенью гомологии/идентичности по отношению друг к другу. Учитывая, что отличия в нуклеотидных последовательностях были точечными, можно предположить, что изоформы белка образовались путем дупликации одного гена с последующими мутациями по отдельным парам нуклеотидов. Подобное явление отмечено в литературе. Так, для геномов мыши и крысы характерно наличие двух генов, расположенных на

разных хромосомах, кодирующих две изоформы МСЛ: МСЛ-А и МСЛ-С (White et al., 1994).

Анализ аминокислотных последовательностей показал, что, подобно МСЛ-А_J, молекула МСЛ-SN в своем составе содержит только углевод-распознающий домен С-типа и не имеет коллагеноподобного домена. Отсутствие коллагеноподобного домена характерно для всех известных МСЛ беспозвоночных и низших хордовых, и только начиная с круглоротых, этот домен появляется в составе молекулы. Появление эффекторного коллагеноподобного домена, вероятно, связано с возникновением в процессе эволюции системы комплимента как взаимосвязанного каскада реакций, приводящего к формированию лизирующего комплекса.

Вторичную структуру молекулы МСЛ-SN определяли с помощью программы PSIPRED. Установлено, что данный лектин является β -структурированным белком, что характерно для лектинов С-типа (Zelensky, Gready, 2005), и состоит из 8 β -тяжей и двух α -спиралей. Углевод-распознающий домен, исходя из предсказанной вторичной структуры, имеет строение, сходное с таковыми у МСЛ-А_J и МСЛ-С_J, а также у МСЛ позвоночных. В его состав входят последовательности "EPN" и "WND", характерные для всех МСЛ и определяющие возможность его взаимодействия с манноз-содержащими углеводами и ионами Ca^{2+} (Weis et al., 1992).

Сравнение первичной структуры МСЛ-SN с другими маннан-связывающими лектинами показало, что они имеют высокую степень гомологии к лектинам *S. purpuratus* (более 70%, GenBank XM_001191913 и XM_001175970) и пятнистого палтуса *Verasper variegates* (50%, GenBank AB274523, AB220916, AB274524). Гомология с маннан-связывающими лектинами иглокожих – голотурий *A. japonicus* (GenBank AAT42221) и *C. echinata* (GenBank AAB35250) – оказалась значительно ниже и составила около 36% (рис. 4).

Стоит отметить, что низкая степень сходства по аминокислотным последовательностям всей молекулы не является препятствием к тому, чтобы рассматривать данные белки как близкородственные и гомологичные. Например, степень гомологии между МСЛ человека (сывороточная форма) и МСЛ крысы составляет не более 50% (Colley et al., 1988). Вместе с тем, для МСЛ всех групп животных характерно наличие высококонсервативного углевод-распознающего домена и последовательностей "EPN" и "WND" в составе его молекулы. Так, замена хотя бы одной аминокислоты в составе "EPN" приводит к изменению углеводной специфичности белка. В частности, с использованием метода направленного мутагенеза показано, что мутации в "EPN" мотиве углевод-распознающего домена МСЛ приводят к изменению углеводной специфичности белка и появлению сродства к галактозе (Drickamer, 1992; Iobst, Drickamer, 1994).

В составе МСЛ-SN содержатся пять цистеиновых остатков, Cys¹, Cys³⁵, Cys¹¹¹, Cys¹³² и Cys¹⁴⁰, наличие которых характерно для всех известных МСЛ беспозвоночных (Hatakeyama et al. 1995; Bulgakov et al., 2007; Gourdine, Smith-Ravin, 2007). Согласно данным ДСН-ПААГ электрофореза, лектин, выделенный нами из целомической жидкости *S. nudus*, присутствует в организме морского ежа в виде димеров. В создании димерной структуры, вероятно, задействован остаток цистеина Cys¹, находящийся на N-конце молекулы. Так, согласно литературным данным, Cys¹ участвует в образовании межмолекулярных дисульфидных связей лектина CEL-IV, выделенного из целомической жидкости *C. echinata* (Hatakeyama et al., 1995).

| | | |
|-------------|---|-----|
| CEL-IV | -----CLT--SCPPLWTGFNGKCFRLFHNLNFDNAENACRQFGLASCSCGDELATGHLA | 52 |
| MCJ-AJ | -----CLT--ACPEFWTGFDFGKCYRLFHDHLLTFTEAEHACRAFKLRSKNGNDLATGHLA | 52 |
| MCJ-SN | -----CLSEGCCPERFMQVGDRCYYYNSDRVDWHDARNACNRLG-----AHLV | 43 |
| SL-Sp | -----CLSQGCCPDRFMKVGNRCCYYNSDKVDWHDARHACERLG-----AHLV | 43 |
| Coll-Sp | -----CLAKGCCPEKFMQVGDRCYHFSSYKKTWSDANRECEDLG-----AHLV | 43 |
| VVL-1 | -----QLQRGNCPMFWFSFNRCYKYVATQMNWADAELNCVSEG-----ANLV | 43 |
| Human_MCJ-A | -----TFSLGKQVGNKFFLTNGEIMTFEKVKALCVKFQ-----ASVA | 37 |
| Rat_MCJ-A | LKSKLELTNKLHAFSMGKKS GKFFVTNHERMPFSKVKALCSELR-----GTVA | 49 |
| | | |
| CEL-IV | SIHSAESQAFLELVKTSLPDLITG--GWAPQVYIGMKVGSTNSDQWTWDGSSVDYDGVV | 110 |
| MCJ-AJ | SIHSSEEQQFLIKLVKQSLPSLINSPSNWDQVLLGLKVGTTNSDQWTWDGSDVDYTAWF | 112 |
| MCJ-SN | SIHNWDSREVFDLWKS LADESHTN----DRTYWIGLHDLQ TENFFQWSDGTRMDYSLWY | 99 |
| SL-Sp | SIHNAEDSREVDLWKS LIDESFLVG--GQRTYWIGLHDVQENFFEWSDGTPMDYSMWC | 101 |
| Coll-Sp | SFHSSAESDVEDVYLWKSFTDVS YADD--GNRAYWIGLNDREYEGSFKWS DGTSDVYYHWQ | 101 |
| VVL-1 | SIHSLDEENFVKDLIKSTDQT-----EGRTWIGLIDIHKEGSMWSDGS AVNFTFWL | 95 |
| Human_MCJ-A | TPRNAENGAIQNLIK-----EEAFLGITDEKTEGQFVDLTGNRLTYTNWN | 83 |
| Rat_MCJ-A | IPRNAEENKAIQEVAK-----TSAFLGITDEVTEGQFMYVTGGRLTYSNWK | 95 |
| | | |
| CEL-IV | SGEPNNGPNSRGATAAGDYSRG-----FWADVYSNNNFKYICQLPCVHYTLE | 157 |
| MCJ-AJ | SGEPNNLPDSRAAIAAGSHSQG-----NWADVFASSSLKYLCLMLPCIEYHLE | 159 |
| MCJ-SN | PGEPNNAE-GEDCVAPYNHGSNDFDRQKWHDHGCELKPYFCRRSA-----144 | 144 |
| SL-Sp | SGEPNNSG-GEDCVSPLSRGNSNDFDRQKWNDFDCGTRKPYFCRRSATS-----148 | 148 |
| Coll-Sp | SGEPNNDR-GEDCVSPRNYGSSDYDRQKWNDFDCDENKSFICYKPFTS-----148 | 148 |
| VVL-1 | SGEPNNKPEKEDCVHN--NFRID---KKWNDEYCSVLI PSVCVSRKICPQ--140 | 140 |
| Human_MCJ-A | EGEPNNA GSEDCVLLKNG-----QWNVPCSTSHLAVCE-----119 | 119 |
| Rat_MCJ-A | KDEPNDHGSGEDCVTIVDNG-----LWNDISCQASH TAVCE-----131 | 131 |

Рис. 4. Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей маннан-связывающих лектинов из *Strongylocentrotus nudus* (MCJ-SN); *Strongylocentrotus purpuratus* (SL-Sp – serum lectin, GenBank XM_001191913 и Coll-Sp – коллектин подсемейства 12, GenBank XM_001175970), *Apostichopus japonicus* (MCJ-AJ, GenBank AAT42221), *Cucumaria echinata* (CEL-IV, GenBank AB35250), *Verasper variegates* (VVL-1, AB220916), *Homo sapiens* (Human_MCJ-A, GenBank AAN69338) и *Rattus norvegicus* MCJ-A (Rat_MBL-A, GenBank P19999). Идентичные и гомологичные аминокислотные остатки отмечены серым цветом, EPN мотив, ответственный за связывание с углеводами и ионами кальция Ca^{2+} – желтым, WND мотив, ответственный за связывания с ионами Ca^{2+} – зеленым.

3. Локализация MCJ-SN в органах и тканях *S. nudus*

Методом иммуноцитохимии с использованием АТ(MCJ-SN) показано, что этот лектин присутствует в организме невооруженного морского ежа в двух формах: растворенной и связанной (Шамшурина и др., 2010). Растворенная форма лектина входит в состав целомической и гемальной жидкостей. Связанная форма лектина обнаружена в зоне базальных мембран кишечного эпителия и эпителия, выстилающего полость амбулакральных каналов, в составе соединительно-тканной составляющей оболочки гонады и в цитоплазме ооцитов (рис. 5). Кроме того, антитела маркируют содержимое секреторных гранул морулоподобных целомочитов (рис. 6), очевидно, являющихся местом биосинтеза лектина в организме *S. nudus*.

Как известно, морулоподобные клетки иглокожих осуществляют синтез компонентов целомической жидкости и основного вещества соединительной ткани (Burne, 1896; Chia, Hing, 1994; Елисейкина, Магарламов, 2002; Магарламов, 2004). На основании данных ультраструктурных исследований среди морулоподобных целомочитов морского ежа *S. nudus* выделены два основных типа клеток: 1 тип – с

гетерогенными гранулами, имеющими электронно-плотное ядро и рыхлую фибриллярную оболочку; 2 тип – с секреторными вакуолями, заполненными рыхлым фибриллярным содержимым (рис. 7. А, Б). Совокупность данных, полученных в результате иммуноцитохимического окрашивания мазков клеток целомической жидкости, гистологических и ультратонких срезов сгустка целомоцитов, позволяет утверждать, что синтез МСЛ-SN в организме *S. nudus* осуществляют морулоподобные целомоциты 2 типа (рис. 7. В). Лектин входит в состав их секрета, выделяясь по голокриновому типу в целомическую жидкость. Благодаря сети гемальных лакун он доставляется в соединительную ткань и в эпителии различных органов морского ежа.

Наличие МСЛ-SN в составе структур базальных мембран выстилающего эпителия кишечника и амбулакральной системы может обеспечивать избирательную проницаемость этих мембран для углеводсодержащих биополимеров и способствовать предотвращению проникновения чужеродных частиц в полость организма. Так, для мембранно-связанной формы МСЛ человека установлена его способность осуществлять клиренс «дефектных» гликопротеинов из кровеносного русла (Ashwell, Harford, 1982; Drickamer, 1988). Присутствие МСЛ-SN в составе компонентов соединительной ткани оболочки гонад также может способствовать осуществлению избирательной проницаемости.

4. Участие МСЛ-SN в защитных реакциях

Хорошо известна роль МСЛ млекопитающих в процессах фагоцитоза (Neth et al., 2002; Bonar et al. 2005; Jack et al., 2005; Ono et al., 2006; Shiratsuchi et al., 2008). Установленная нами на основании физико-химических свойств и структуры молекулы гомология МСЛ-SN и МСЛ позвоночных предполагает функциональное сходство этих лектинов. Для подтверждения этого предположения, была исследована роль МСЛ-SN в процессах фагоцитоза целомоцитами *S. nudus* различных пищевых моделей. В экспериментах была использована временная культура амебоцитов –клеток целомической жидкости, ответственных за фагоцитоз. В качестве пищевых моделей применяли FITC-меченные бактерии *Y. pseudotuberculosis*, поверхность которых дополнительно обрабатывали препаратом МСЛ-SN и бесклеточной целомической жидкостью *S. nudus*. Бактерии с не обработанной дополнительно поверхностью были использованы в качестве контроля. Показано, что обработка бактерий препаратами МСЛ-SN способствует увеличению фагоцитарной активности целомоцитов, причем данный эффект наблюдается уже на первых этапах эксперимента (рис. 8). Обработка *Y. pseudotuberculosis* бесклеточной целомической жидкостью оказывает большее воздействие на фагоциты, чем чистый препарат МСЛ-SN, что можно объяснить наличием в целомической жидкости, наряду с лектинами, других факторов, активирующих процессы фагоцитоза. Согласно данным литературы, механизм участия МСЛ млекопитающих в активации фагоцитоза связан с их опсонизирующим действием, при этом углевод-распознающий домен лектина взаимодействует с углеводными детерминантами поверхности патогенных микроорганизмов и грибов, а поверхностные рецепторы макрофагов C1q распознают функциональные коллагенноподобные домены МСЛ, активизируя процессы опсофагоцитоза (Kuheman et al., 1989). Для лектинов иглокожих было показано, что МСЛ-AJ способствует агглютинации бактерий *Y. pseudotuberculosis*, существенно ускоряя процессы их поглощения целомоцитами (Eliseikina et al., 2004). Одновременно ускоряются процессы адгезии бактериальных клеток к поверхности

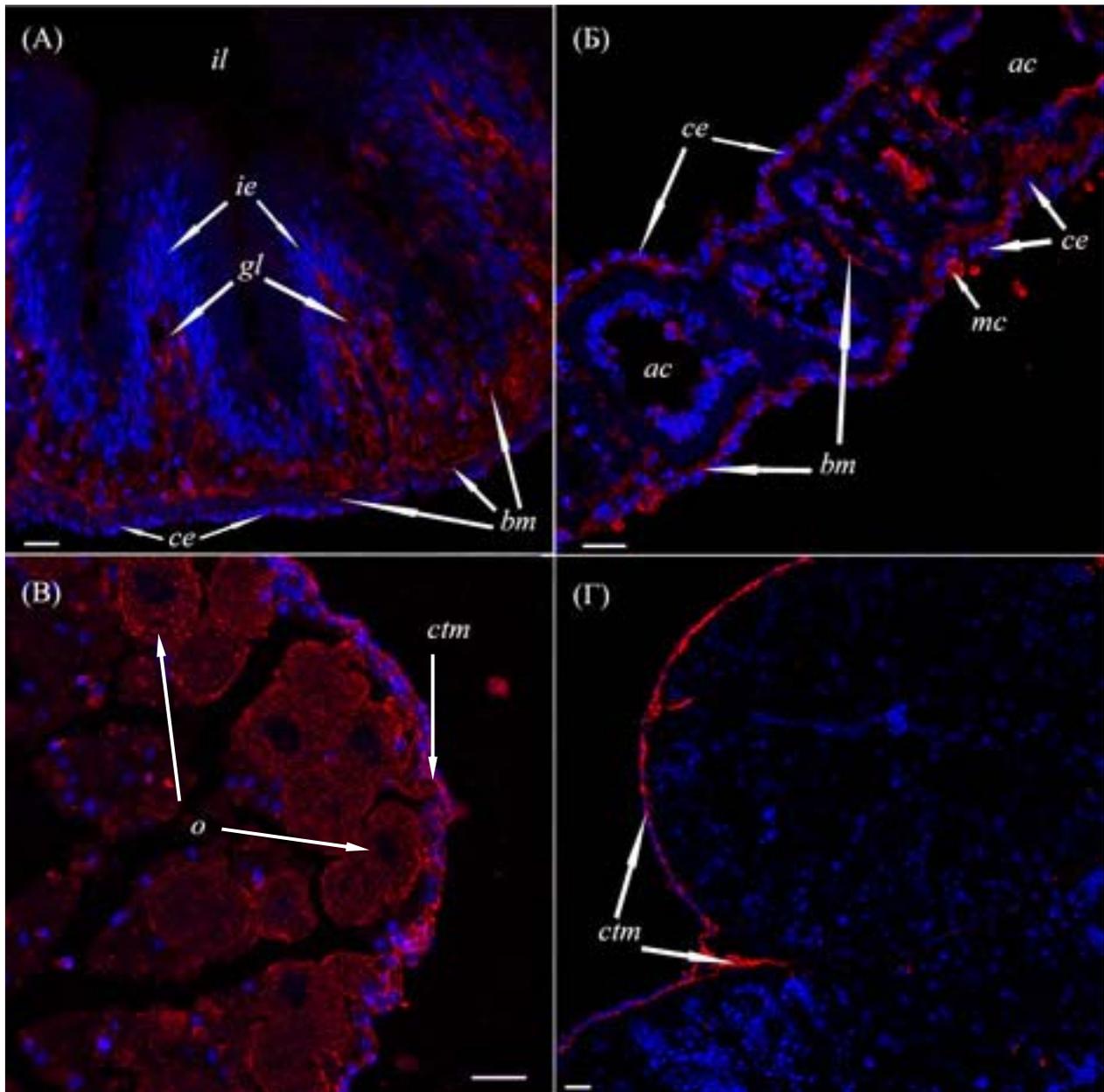


Рис. 5. Иммуноцитохимическое окрашивание МСЛ в тканях *Strongylocentrotus nudus* АТ (МСЛ) (красная флуоресценция) и ядерной ДНК DAPI (синяя флуоресценция). (А) – кишечник, (Б) – амбулакральный канал, (В) – яичник, (Г) – семенник. Масштаб - 10 мкм. Условные обозначения: *ac* – полость амбулакального канала, *bm* – базальная мембрана, *ce* – ядра клеток целомического эпителия, *ctm* – соединительно-тканная составляющая оболочки гонад, *gl* – гемальная лакуна, *mc* – морулоподобная клетка, *o* – ооцит, *ie* – ядра клеток кишечного эпителия, *il* – полость кишки. Фотографии получены с использованием лазерного конфокального сканирующего микроскопа LSM 510 (Carl Zeiss).

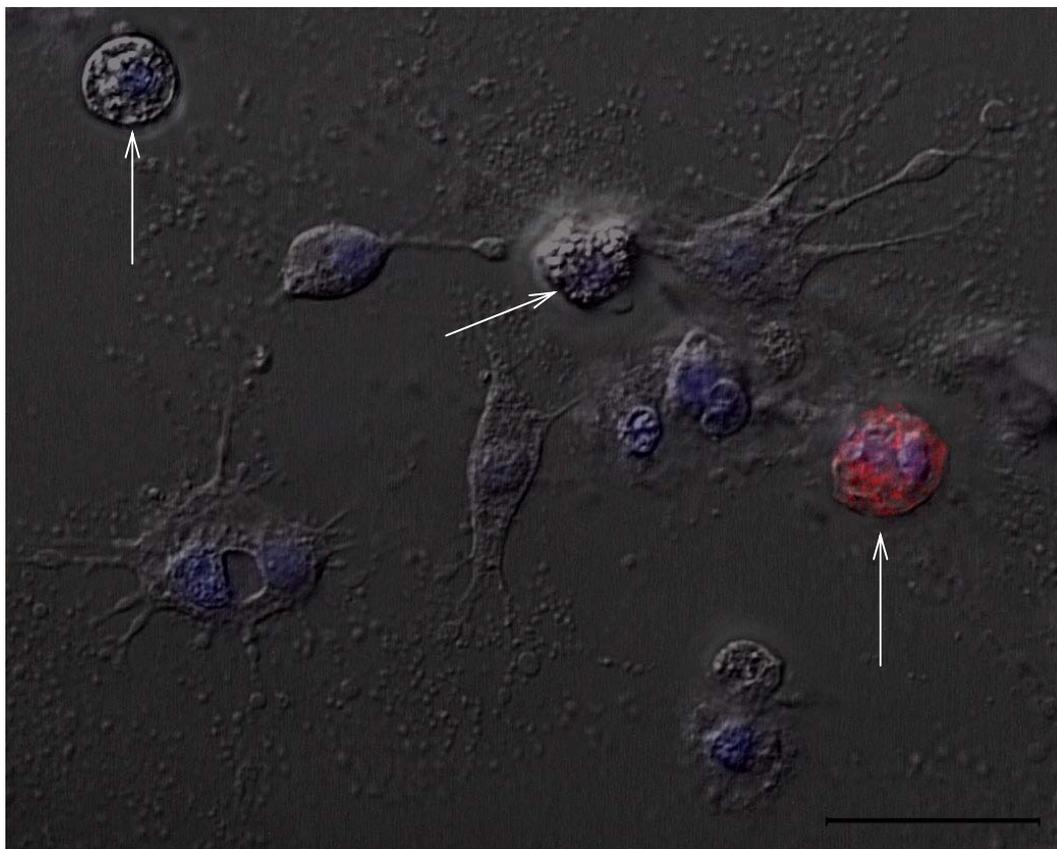


Рис. 6. Иммуноцитохимическое окрашивание мазков целоцитов морского ежа *Strongylocentrotus nudus* АТ (МСЛ-SN) (красная флуоресценция) и ядерной ДНК DAPI (синяя флуоресценция). Масштаб – 10 мкм. Стрелками обозначены морулоподобные целоциты. Фотографии получены с использованием лазерного конфокального сканирующего микроскопа LSM 510 (Carl Zeiss).

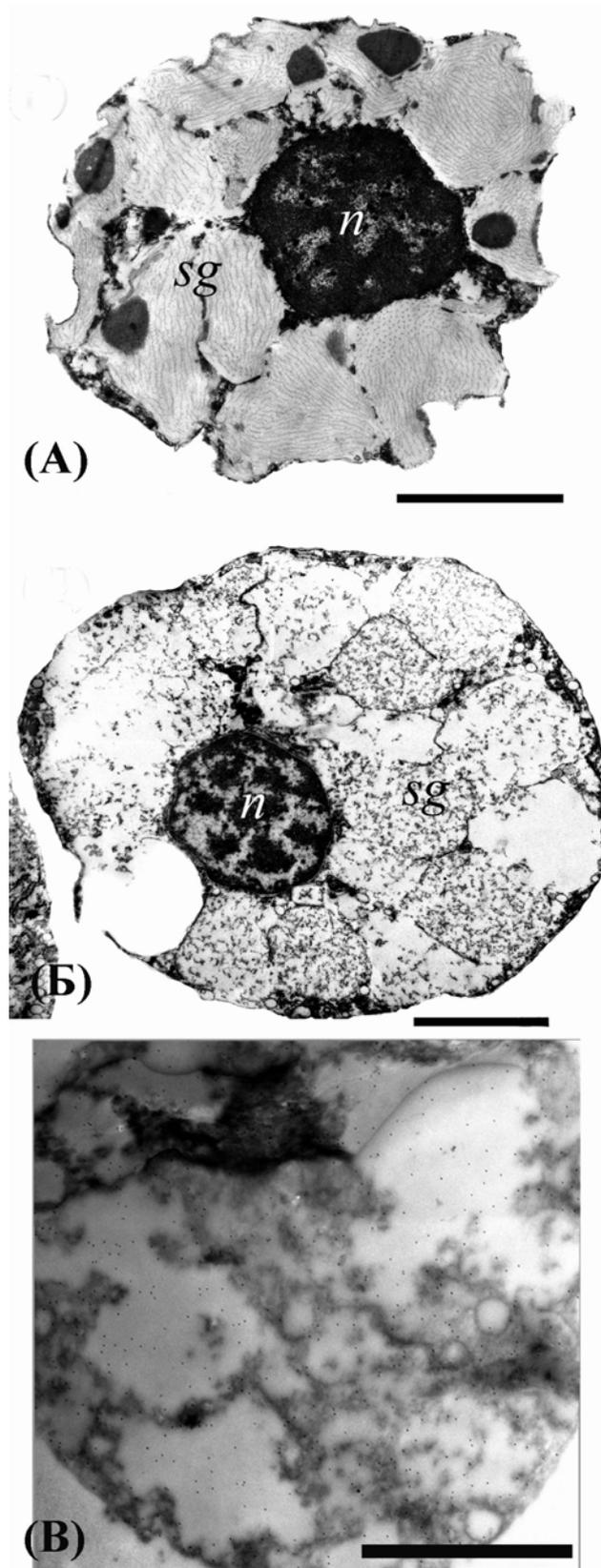


Рис. 7. Морулоподобные целоциты морского ежа *Strongylocentrotus nudus*. (A) – клетки 1 типа; (Б) – клетки 2 типа; (В) – выявление МСЛ-SN в составе секрета морулоподобных целоцитов 2 типа с помощью АТ (МСЛ-SN), вторичные антитела мечены коллоидным золотом с размером частиц 10 нм. Масштаб 2 мкм. Фотографии получены с использованием трансмиссионного электронного микроскопа Libra 120 (Carl Zeiss).

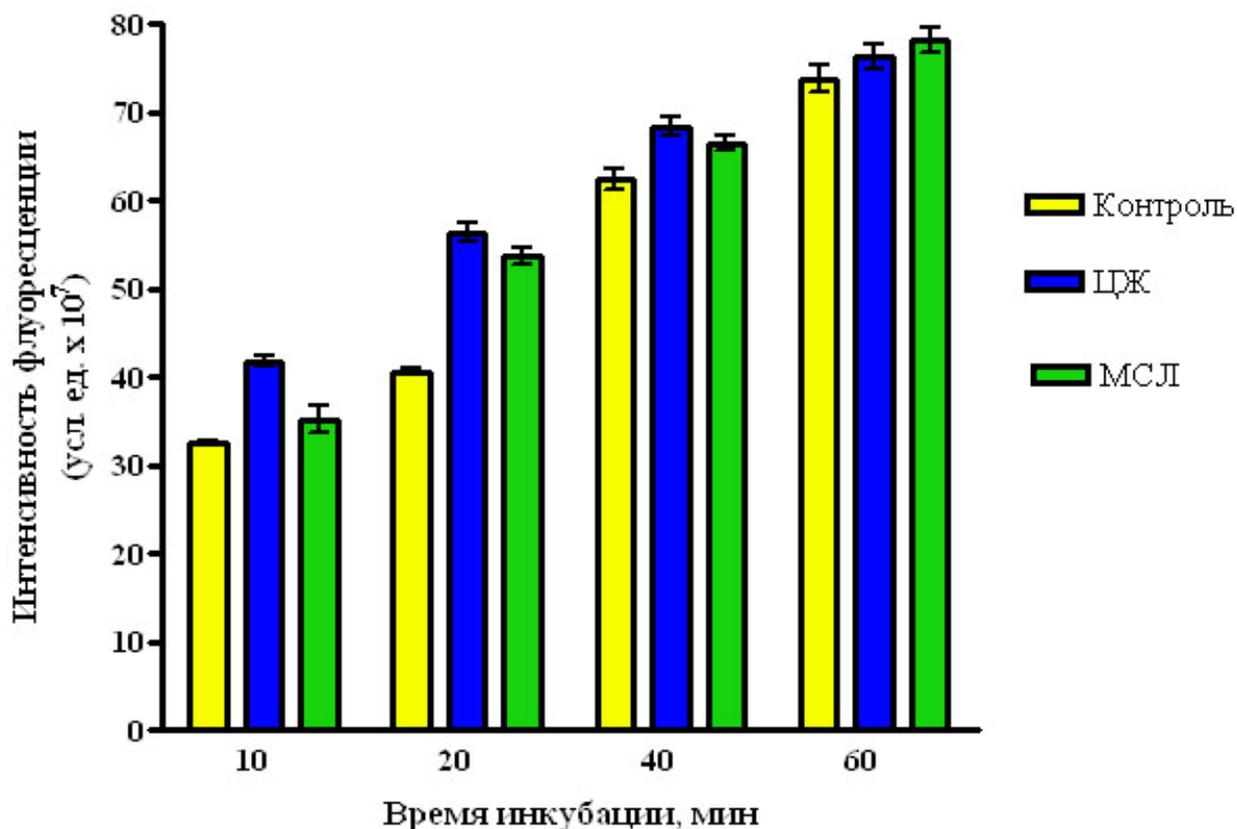


Рис. 8. Фагоцитарная активность временной культуры целомацитов *Strongylocentrotus nudus*, оцениваемая по изменению интенсивности флуоресценции в ходе фагоцитоза амебоцитами бактерий *Yersinia pseudotuberculosis*, меченных FITC (контроль), и меченных FITC бактерий *Y. pseudotuberculosis*, с дополнительно обработанной МСЛ-SN и бесклеточной целомической жидкостью поверхностью (варианты опыта).

фагоцитов, что указывает на опсонизирующий эффект МСЛ-AJ. Сходный механизм, очевидно, лежит и в основе активизации фагоцитоза МСЛ-SN. Можно предположить наличие на поверхности амебоцитов рецепторов к МСЛ-SN, которые задействованы в активации клеточных защитных реакций, однако, взаимодействие лектина с рецептором происходит с участием иных, отличных от молекул МСЛ позвоночных, структур, что связано с отсутствием в составе лектина морского ежа *S. nudus* молекулы коллагеноподобного домена.

5. Влияние МСЛ-SN на ранний онтогенез морского ежа *S. nudus*.

Методами ДСН-ПААГ-электрофореза и вестерн-блоттинга показано, что МСЛ-SN присутствует в цитоплазме неоплодотворенных яйцеклеток, в развивающихся эмбрионах и личинках (рис. 9). Наличие МСЛ-SN в яйцеклетках, эмбрионах и личинках морского ежа предполагает его возможное участие в процессах оплодотворения и эмбриогенеза.

Для исследования роли МСЛ-SN и его лигандов в раннем развитии *S. nudus* проведена серия экспериментов с блокировкой МСЛ-SN специфическими антителами, а также с блокировкой лектином его эндогенных лигандов. В качестве положительного контроля использовали вариант развития эмбрионов в среде, содержащей БСА, а в качестве отрицательного контроля использовали развитие в стерильной морской воде.

Показано, что МСЛ-SN и его лиганды не задействованы в процессах оплодотворения и не являются компонентом углевод-распознающих центров, осуществляющих процесс адгезии сперматозоида и яйцеклетки у данного вида.

Начиная со стадии средней бластулы 1, в среде, содержащей антитела к МСЛ-SN и МСЛ-SN, большое количество эмбрионов формируется с задержкой в развитии, причем, по мере увеличения времени инкубации в этой среде, отставание в развитии

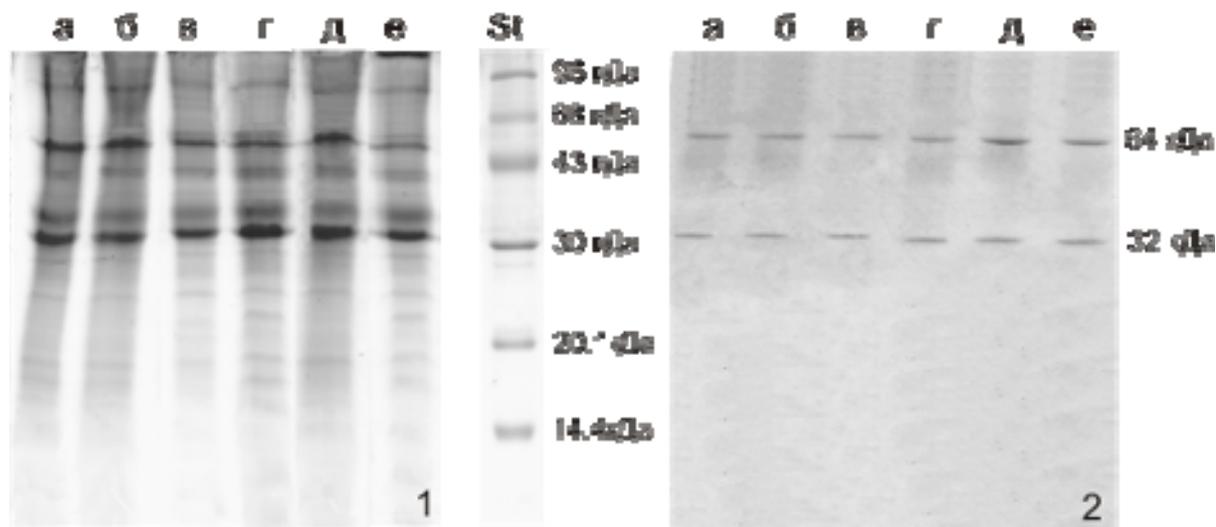


Рис. 9. ДСН-ПААГ-электрофорез (1) и вестерн-блот (2) яйцеклеток, эмбрионов и личинок *Strongylocentrotus nudus*: а – неоплодотворенная яйцеклетка, б – оплодотворенная яйцеклетка, в – два бластомера, г – бластула, д – поздняя гастрюла, е – плутеус. St – стандарты молекулярных масс.

становится все более значительным (рис. 10). У эмбрионов в среде, содержащей высокие концентрации веществ (2 мг/мл), блокирующих лектин или его лиганд, полностью прекращается процесс гастрюляции.

Известно, что морфогенетические движения, такие как миграция мезенхимных клеток и гастрюляция, регулируются взаимодействиями "клетка – клетка" и "клетка – субстрат", которые опосредованы различными углеводными детерминантами и адгезионными молекулами клеток, в том числе и лектинами (Ozeki et al., 1995). Исходя из этого, можно предположить, что МСЛ-SN являются структурами, воспринимающими информацию, заложенную в углеводных маркерах делящихся клеток. Этим объясняется торможение процессов дробления при блокировании МСЛ-SN поликлональными антителами. Практически полное торможение гастрюляции также является следствием нарушения взаимодействий клеток между собой и с субстратом, в результате чего изменяется не только характер миграции клеток первичной мезенхимы, но и нарушается процесс инвагинации.

С использованием прижизненного окрашивания гастрюл морского ежа *S. nudus* антителами к МСЛ-SN установлено, что лектин локализуется на поверхности клеток, выселяющихся в бластоцель (рис. 11). Кроме того, иммуноцитохимическое окрашивание срезов эмбрионов показало, что, помимо поверхностных структур мигрирующих клеток, МСЛ-SN входит в состав фибриллярного матрикса, образующего сетчатую структуру в полости эмбриона (рис. 12). Очевидно, лиганды МСЛ-SN, маннан-содержащие поверхностные гликопротеины, образуют скопления (кластеры) на участках поверхности мигрирующих клеток.

Как известно, огромная роль в процессе формирования личинки морского ежа принадлежит структурам внеклеточного матрикса. Имеется большое количество фактических данных об участии содержащихся в нем белков не только в миграции отдельных клеточных типов и их адгезии, но и в передаче сигналов в цитоплазму клеток. Эти сигналы обеспечивают дальнейшую миграцию, пролиферацию и дифференцировку клеток (Spiegel et al., 1980; McCarthy, et al. 1987; Bisgrove, Raff, 1993; Katow, 1995; Wessel, 1998; Katow, Washio, 2000; Yamasu et al., 2000; Katow, Sofuku, 2001). Возможно, благодаря наличию сетчатой структуры в бластоцеле, в состав которой входит МСЛ-SN, происходит активация и миграция клеток вторичной мезенхимы. На более поздних этапах формирования архентерона сетчатая структура может выполнять функцию направляющих "балок", обеспечивая строго детерминированную миграцию клеток.

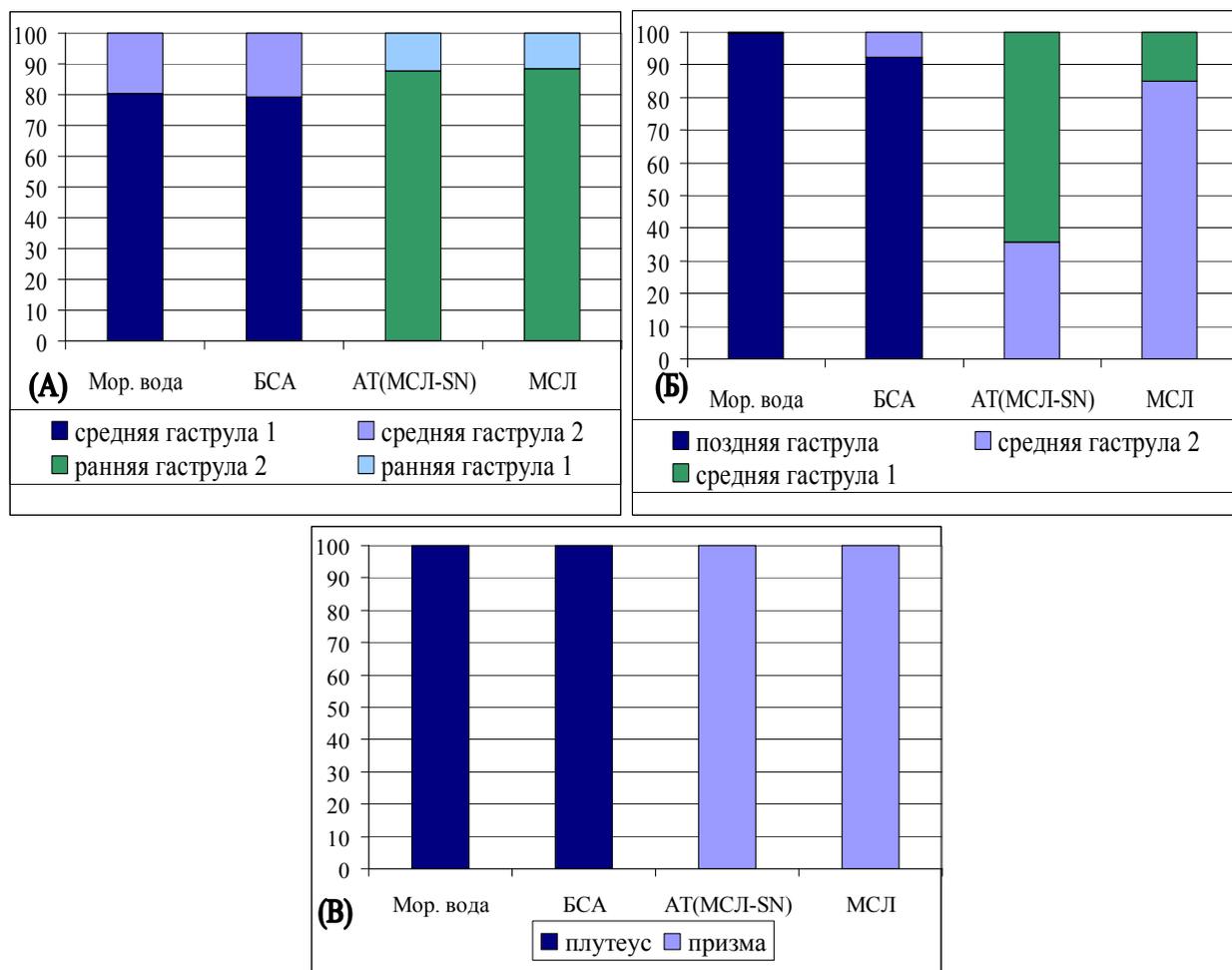


Рис. 10. Влияние поликлональных антител к МСЛ-SN (0.05 мг/мл) и МСЛ-SN (0.05 мг/мл) на развитие личинок *Strongylocentrotus nudus*: (А) – средняя гастрюла, (Б) – поздняя гастрюла, (Б) – плутеус. По оси ординат – доля личинок, %.

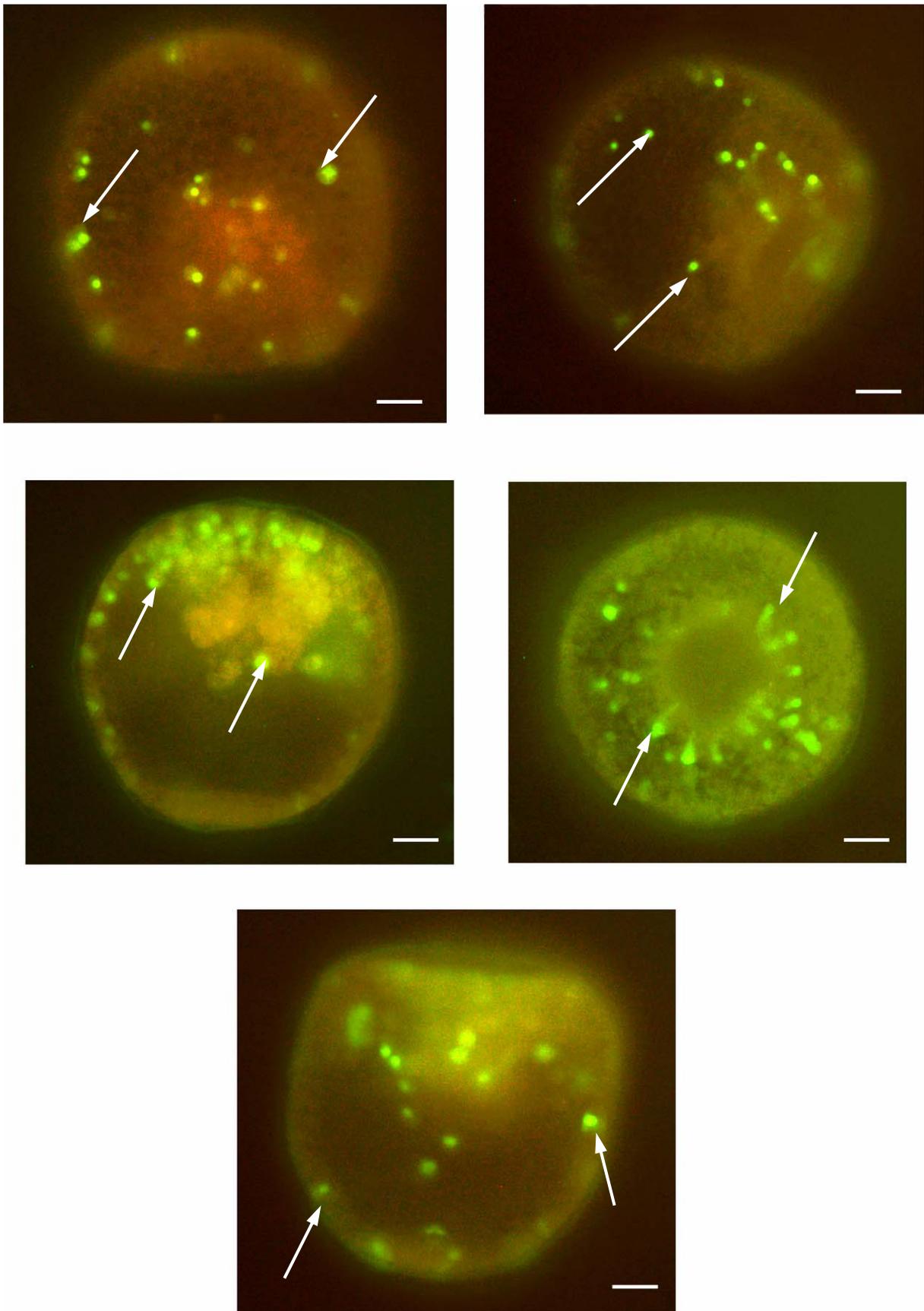


Рис. 11. Локализация МСЛ-SN (стрелки) в гастралах морского ежа *Strongylocentrotus nudus*. Прижизненная окраска АТ (МСЛ-SN), конъюгированными с FITC. Масштаб 20 мкм. Фотографии получены с использованием эпифлуоресцентного микроскопа Leica 4500 (Leica).

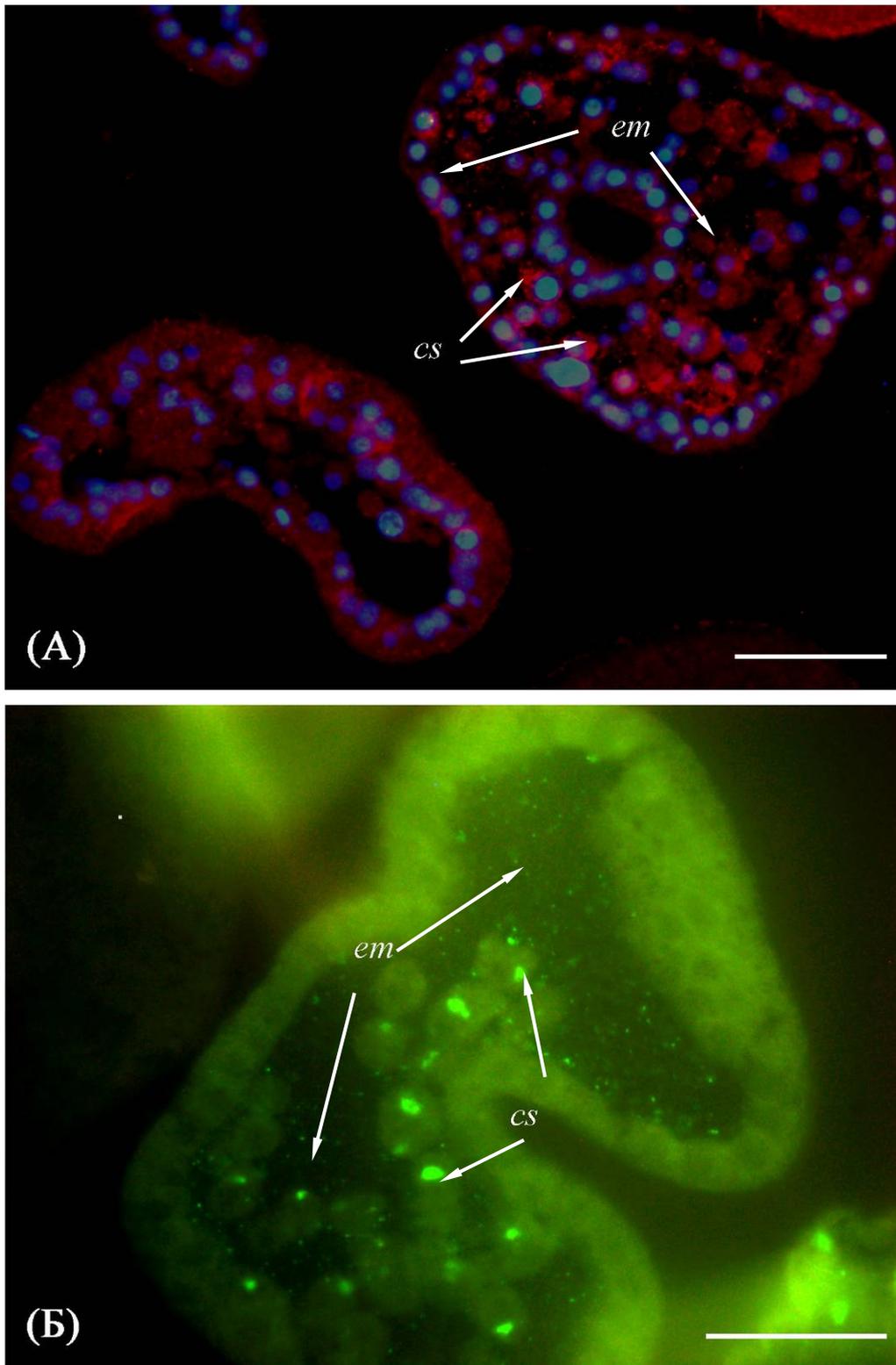


Рис. 12. Иммуноцитохимическое окрашивание срезов личинок морского ежа *Strongylocentrotus nudus* AT (МСЛ-SN) (красная и зеленая флуоресценция) и ядерной ДНК DAPI (синяя флуоресценция), стадия гастрюлы. Стрелками указаны флуоресцентно-меченные сайты связывания антител. Условные обозначения: *em* –внеклеточный матрикс, *cs* – клетки первичной мезенхимы. Масштаб 50 мкм. Фотографии получены с использованием эпифлуоресцентных микроскопов AXIO IMEDGER, оснащенного системой COLIBRI (Carl Zeiss) (А) и Leica 4500 (Leica) (Б).

ВЫВОДЫ

1. Из целомической жидкости морского ежа *Strongylocentrotus nudus* выделен новый белок, обладающий лектинной активностью. На основании установленных физико-химических свойств (способность образовывать гомодимеры, Ca^{2+} -зависимость, углеводная специфичность к разветвленным α -D-маннанам) лектин отнесен к группе маннан-связывающих лектинов С-типа.

2. Определена аминокислотная последовательность маннан-связывающего лектина *S. nudus* и установлено, что молекула лектина состоит только из углевод-распознающего домена, включающего 2 α -спиральных участка и 8 β -тяжей. Лектин представлен в организме *S. nudus* как минимум тремя высокомолекулярными изоформами, различающимися единичными аминокислотными заменами. Степень гомологии маннан-связывающего лектина *S. nudus* и МСЛ других групп животных высока в участке, отвечающем за связывание с лигандом и ионами Ca^{2+} (“EPN” и “WND” мотивы), консервативным является и положение остатков цистеина.

3. Маннан-связывающий лектин присутствует в организме *S. nudus* в двух формах: растворенной в целомической жидкости и в связанной, ассоциированной со структурами соединительнотканного внеклеточного матрикса. Биосинтез лектина осуществляют клетки целомической жидкости – морулоподобные целоциты 2 типа.

4. Маннан-связывающий лектин *S. nudus* задействован в осуществлении защитных реакций. Он способствует агглютинации и опсонизации чужеродных частиц, активизируя процессы их фагоцитоза клетками целомической жидкости.

5. Маннан-связывающий лектин обнаружен в цитоплазме яйцеклеток, в эмбрионах (зигота, два бластомера) и личинках на стадиях плавающей бластулы, поздней гастрюлы и плутеуса морского ежа *S. nudus*. Показано, что лектин не влияет на процессы оплодотворения, а механизм его участия в эмбриогенезе связан с осуществлением миграции клеток в ходе гастрюляции: являясь компонентом внеклеточного матрикса, заполняющего бластоцель, лектин взаимодействует с лигандами – углеводными составляющими поверхностных рецепторов эмбриональных клеток, обеспечивая их направленную миграцию.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**Публикации в рецензируемых журналах из списка рекомендованного ВАК:**

1. Петрова И.Ю., Булгаков А.А., Назаренко Е.Л., Шамшурина Е.В., Кобелев С.С., Елисейкина М.Г. Маннан-связывающие лектины в целомической жидкости у представителей разных видов дальневосточных иглокожих // Биол. моря. 2009. Т. 35, № 2. С. 147–152.
2. Шамшурина Е.В., Елисейкина М.Г., Петрова И.Ю., Булгаков А.А. Обнаружение двух иммунохимически идентичных форм маннан-связывающих лектинов морского ежа *Strongylocentrotus nudus* // Биол. моря. 2010. Т. 36, № 4. С. 293–299.

Публикации в материалах конференций:

1. Шамшурина Е.В. Исследование защитных реакций целоцитов иглокожих в условиях временной культуры // Конференция студентов, аспирантов и молодых ученых НОЦ ДВГУ “Морская биота”. сборник трудов. Владивосток: ДВГУ, 2006. С. 12-14.
2. Шамшурина Е.В., Елисейкина М.Г., Петрова И.Ю., Булгаков А.А. Маннан-связывающие лектины морского ежа *Strongylocentrotus nudus* и их роль в эмбриогенезе // XI Международная молодежная школа-конференция по актуальным проблемам химии и биологии, МЭС ТИБОХ, Владивосток 11–18 сентября 2007: сборник трудов. Владивосток: ДВО РАН, 2007. С. 43.
3. Елисейкина М.Г., Булгаков А.А., Петрова И.Ю., Шамшурина Е.В., Ламаш Н.Е. Маннан-связывающие лектины иглокожих и их роль в морфогенезах // Клеточные, молекулярные и эволюционные аспекты морфогенеза. Симпозиум с международным участием, Москва, 9–11 октября 2007 г. М: Т-во научных изданий КМК, 2007. С. 58–59.
4. Шамшурина Е.В., Ковальчук С.Н., Елисейкина М.Г., Булгаков А.А. Определение первичной аминокислотной последовательности маннан-связывающих лектинов морского ежа *Strongylocentrotus nudus* // XII Всероссийская молодежная школа-конференция по актуальным проблемам химии и биологии, МЭС ТИБОХ, Владивосток 7–14 сентября 2009 г.: сборник трудов. Владивосток: ДВО РАН, 2009. С. 82.

ШАМШУРИНА
Екатерина Валерьевна

**Структурная и функциональная характеристика маннан-связывающего лектина
морского ежа *Strongylocentrotus nudus***

АВТОРЕФЕРАТ