

УДК 57.088

РАСТИТЕЛЬНОЙ ПОЛИСАХАРИДНЫЙ ЭРРЕЙ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ УГЛЕВОД-СВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ

© 2022 А.В. Никифорова^{1*}, В.В. Головченко², П.В. Микшина³, О.А. Патова²,
Т.А. Горшкова³, Н.В. Бовин¹, Н.В. Шилова¹

¹ ГНЦ Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117997 Москва, Россия; электронная почта: nikiforovaalica@gmail.com

² ИФ ФИЦ Коми НЦ УрО РАН,
167982 Сыктывкар, Россия

³ ФИЦ «Казанский научный центр РАН», Казанский институт биохимии и биофизики,
420111 Казань, Россия

Поступила в редакцию 02.06.2022

После доработки 20.06.2022

Принята к публикации 20.06.2022

Специфичность большинства углеводов-связывающих белков растений либо не изучалась, либо охарактеризована ограниченно, о многих из них известно лишь благодаря биоинформатическому анализу геномов. Задачу расшифровки углеводной специфичности белков позволяют решать гликоэрреи – систематические наборы большого количества гликанов, как правило, иммобилизованных на подложке (подложку с гликоэрреем называют гликочипом). Растительные углеводы являются наиболее естественными лигандами для изучения растительных белков. В представленной работе показано, что растительные полисахариды без дополнительной модификации иммобилизуются на поверхности, несущей активированные N-гидроксисукцинимидом карбоксильные группы. С использованием этого подхода был сконструирован эррей, состоящий из 113 хорошо охарактеризованных растительных полисахаридов, выделенных из клеточных стенок различных растений, 23 олиго-моносахарида, являющихся компонентами некоторых растительных полисахаридов и гликозилированных белков, а также ряда лигандов широко известных растительных лектинов. При химической иммобилизации полисахаридов их функциональная активность сохранялась, что следует из результатов взаимодействия с моноклональными и поликлональными антителами и растительным лектином – рицином. С помощью гликоэррея была найдена ранее неизвестная способность рицина связывать полисахариды клеточных стенок, что значительно расширяет представление о его специфичности. Также в периферической крови человека обнаружено наличие множества антител к пектинам и гемицеллюлозам.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: углевод-связывающие белки, растительные лектины, растительные полисахариды, пектины, полисахаридный гликоэррей, гликочип, INRA-RU2, антигликановые антитела человека.

DOI: 10.31857/S0320972522070077, EDN: AVWMQS

ВВЕДЕНИЕ

Углевод-связывающие белки (УСБ) и, в частности, лектины, широко представлены в растениях. Эти белки вовлечены во множество процессов, включая иммунные и другие защитные реакции, а также играют ключевые роли в развитии растений [1, 2]. Однако оста-

ётся слабо изученной реальная специфичность растительных УСБ, что связано в первую очередь с отсутствием подходящих методов её определения.

Гликоэррей (printed glycan array) является одним из эффективных инструментов, используемых для характеристики специфичности УСБ [3–6]. Известные гликоэрреи

Принятые сокращения: БСА – бычий сывороточный альбумин; ТФУ – трифторуксусная кислота; УСБ – углевод-связывающие белки; ФСБ – фосфатно-солевой буфер; АГА – апиогалактуронан; НГ – гомогалактуронан; М_w и М_n – средневесовая и среднечисловая относительные молекулярные массы соответственно; NHS – N-гидроксисукцинимид; RG-I – рамногалактуронан I-го типа; RG-II – рамногалактуронан II-го типа; XGA – ксилогалактуронан.

* Адресат для корреспонденции.

составлены из олигосахаридов разной природы и размеров — как синтетических, так и выделенных из природных источников, а также полисахаридов, в том числе и растительных [5, 7–9]. Олигосахариды обычно иммобилизуют на активированную (как правило N-гидроксисукцинимидом (NHS)) поверхность, для чего их необходимо предварительно функционализировать аминогруппой [5] либо превратить в неогликоконъюгаты, например, с бычьим сывороточным альбумином (БСА) [10]; подложку с нанесённым на неё гликоэрреем называют гликочипом. Несмотря на то что олигосахариды — фрагменты полисахаридов — не сохраняют конформацию последних, олигосахаридный эррей оказался весьма полезным для картирования эпитопов моноклональных антител к полисахаридам [7].

Растительные полисахариды можно иммобилизовать без функционализации, для чего используют слайды, покрытые нитроцеллюлозой [11]. Это позволяет избежать изменений в структуре, связанных с модификациями (порой критическими), с одной стороны, а с другой — делает невозможным детектировать слабые сигналы из-за высокого фона автофлуоресценции нитроцеллюлозы. Тем не менее такие эрреи стали основой для изучения полисахаридов методом детального профилирования полимеров на микрочипах (CoMPР, comprehensive microarray polymer profiling). Данная технология заключается в том, что полисахариды клеточной стенки растений в варьруемых условиях экстрагируют, затем иммобилизуют на подложке и исследуют их структурные особенности с помощью набора моноклональных антител [12]. Технология CoMPР позволяет изучать биологические процессы, происходящие в клеточной стенке, в частности на стадии роста клетки, а также при воздействии патогена [12–14]. По этой технологии структурная характеристика проводится лишь для некоторых фракций, выбранных благодаря данным гликоэррея [12, 15]. В литературе описан комбинированный вариант гликоэррея с одновременным присутствием различных олигосахаридов млекопитающих и *бактериальных* полисахаридов [16–18], однако аналога с *растительными* олиго- и полисахаридами в литературе нами не было найдено.

Целью данной работы было исследование потенциала использования гликочипа — активированного слайда с напечатанными на нём предварительно охарактеризованными растительными полисахаридами и олиго-моносахаридами — в определении профиля специфичности некоторых гликан-связывающих

белков, а именно: рицина — лектина, специфичность которого считается известной; пула антител периферической крови человека, гликан-связывающий потенциал которого также известен [19, 20], а также моноклонального антитела INRA-RU2, узнающего остов рамногалактуронана I (RG-I) [21].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Создание библиотеки полисахаридов. Подготовка полисахаридов из коммерческих источников. Образцы полисахаридов (пектины картофеля, люпина, цитрусовых, яблока, сахарной свёклы, арабиногалактаны лиственницы и акации, гемицеллюлозы ячменя, пшеницы, тамаринда и кэроба, «Megazyme», Ирландия) растворяли, согласно предоставляемым фирмой протоколам (основной растворитель — деионизованная вода). При очистке и анализе полисахаридов использовали 2 протокола. По первому протоколу определяли молекулярно-массовое распределение, степень полидисперсности и чистоты, затем образцы обессоливали, используя сефадекс G-25 и лиофильно высушивали. По второму протоколу образцы изначально трижды обессоливали на колонке с сефадексом G-25, затем характеризовали по аналогичным первому протоколу параметрам и также лиофильно высушивали. Кроме того, в работе использованы образцы коммерческих низко- и высокометилэтерифицированных яблочных и цитрусовых пектинов («Herbstreith & Fox KG», Германия), для которых предварительное обессоливание не проводилось.

Растительные полисахариды из природных источников. Фракции пектиновых полисахаридов получены последовательной экстракцией водой (при pH 5,6; 4,0 и 2,0), 0,7%-ным водным раствором оксалата аммония из листьев чемерицы Лобеля *Veratrum lobelianum* Bernh., бада-на толстолистного *Bergenia crassifolia* L., берёзы пушистой *Betula alba* L., берёзы повислой *Betula pendula* Roth., капусты огородной *Brassica oleracea* spp., борщевика Сосновского *Heracleum sosnowskyi* L., сабельника болотного *Comarum palustre* L., солодки голой *Glycyrrhiza glabra* L., ревеня волнистого *Rheum rhabarbarum* L., луковиц лука репчатого *Allium cepa* L., наземной части хвоща лесного *Equisetum sylvaticum* L., смолёвки обыкновенной *Oberna behen* L., стеблей и листьев рдеста плавающего *Potamogeton natans* L., побегов и листьев взморника морского *Zostera marina* L., целого растения ряски малой *Lemna minor* L., древесной зелени сосны сибирской кедровой (кедр сибирский)

Pinus sibirica DuTour., лиственницы европейской *Larix decidua* Mill., пихты сибирской *Abies sibirica* Ldb., соцветий пижмы обыкновенной *Tanacetum vulgare* L., плодов винограда культурного *Vitis vinifera* L., баобаба *Adansonia digitata* L., корнеплодов моркови посевной *Daucus carota* subsp. *sativus* (Hoffm.) Schübl. & Martens, каллусной культуры пижмы обыкновенной *Tanacetum vulgare* L., смолёвки обыкновенной *Oberna behen* L., смолёвки татарской *Silene tatarica* (L.) Pers. и ряски малой *Lemna minor* L. Для получения гомогенных образцов пектиновых полисахаридов выделенные фракции разделяли последовательной ультрафильтрацией на мембранах с различным размером пор (300, 100, 50 ($\times 10^3$) г/моль), на ДЭАЭ-целлюлозе (ОН⁻) и на сефарозе CL-4В. Рамно-галактуронаны I (RG-I), несущие галактановые боковые цепи различной длины, а также арабиногалактан были выделены из волокон льна *Linum usitatissimum* L. на разных стадиях развития растений. Первый вариант RG-I и арабиногалактан были получены из волокон на стадии быстрого роста растений путём экстракции 10 мМ NaOAc-буфером, содержащим 0,02% NaN₃ (pH 5,0–5,2), и последующего разделения полимеров с помощью гель-фильтрации на сефарозе CL-4В. Второй вариант RG-I получен из зрелых волокон после растворения целлюлозы в обезвоженном N,N-диметилацетамиде, содержащем 8% LiCl, последующего её гидролиза целлюлазой «Cellusoft-L» («Novo Nordisk Bioindustri S.A.», Франция) и очистки высвобождаемой фракции полимеров с помощью диализа (MWCO 12 000) и гель-фильтрации на сефадексе G-25 и сефарозе CL-4В. Гетероксиланы из семян ржи *Secale cereale* L. (мука грубого помола) получали после обработки экстрагируемых водой и предварительно осаждённых 96%-ным спиртом полимеров лихеназой («Megazyme») и последующего разделения фрагментов на сефадексе G-25.

Конечная библиотека лигандов содержала 113 полисахаридов (см. таблицу в Приложении).

Характеристика состава и свойств образцов полисахаридов. Общее содержание углеводов в образцах определяли фенол-сернокислотным методом [22]. Содержание уроновых кислот в образцах полисахаридов определяли спектрофотометрическим методом с использованием гидроксифенила (калибровочный стандарт – галактуроновая кислота, фотоколориметрирование – при 400 и 450 нм) [23]. Содержание белка в образцах полисахаридов определяли по методу Лоури (калибровочный стандарт – БСА, фотоколориметрирование – при 750 нм) [24]; содержание метоксильных

групп определяли по реакции с пентан-2,4-дионом (калибровочный стандарт – метанол, фотоколориметрирование – при 412 нм) [25]. Стабильность полисахаридов в условиях печати эррея оценивали следующим образом: образцы растворяли в 300 мМ Na₂HPO₄ (pH 8,5) и выдерживали в течение 1–3 суток при комнатной температуре либо при –20 °С. Появление продуктов β-элиминирования, поглощающих при 235 нм, оценивали каждые 12 ч.

Измерение поглощения растворов проводили на спектрофотометре Ultrospec 3000 («Pharmacia Biotech», Великобритания) либо на ПЭ-5300ВИ («Экротхим», Россия).

Моносахаридный состав полисахаридов определяли методами газожидкостной и ионообменной хроматографии. В первом случае 2,5 мг образца полисахарида растворяли в 1 мл 2 М трифторуксусной кислоты (ТФУ), содержащей в качестве внутреннего стандарта миоинозит (0,5 мг/мл). Смесь термостатировали в запаянной ампуле (5 ч, 100 °С) и далее обрабатывали, как описано ранее [26]. Полученные ацетаты полиолов соответствующих моносахаридов анализировали на капиллярной колонке VF-5ms размером 0,25 мм Ø × 30 м («Varian», США), используя пламенно-ионизационный детектор («Varian»), газ-носитель – гелий. Во втором случае 20–50 мкг полисахарида гидролизовали в 400 мкл 2 М ТФУ (1 ч, 120 °С), избыток ТФУ удаляли упариванием, смесь полученных моносахаридов растворяли в деионизированной воде. Разделение моносахаридов проводили на колонке CarboPac PA-1 размером 4 × 250 мм («Thermo Fisher Scientific», США), используя импульсный амперометрический детектор PAD («Thermo Fisher Scientific»). Скорость элюирования – 1 мл/мин. Температура колонки 30 °С. Элюенты: А – 100 мМ NaOH в 1 М NaOAc, В – 15 мМ NaOH; элюирование по схеме: В – 100% (0–20 мин); В – 90%, А – 10% (20–21 мин); В – 50%, А – 50% (22–41 мин); А – 100% (42–55 мин); В – 100% (56–85 мин). Результаты анализировали с помощью программного обеспечения PeakNet версия 4.1 («Dionex», США).

Средневесовую (Mw), среднечисловую (Mn) относительные молекулярные массы образцов полисахаридов определяли методом высокоэффективной гель-проникающей хроматографии либо на колонке Shodex OHpak SB-806M HQ размером 8 × 300 мм («Showa Denko», США), температура колонки – 50 °С, скорость потока – 0,3 мл/мин, элюент – деионизированная вода (термостатирование), либо на колонке PSS SUPREMA 3000 Å размером 8 × 300 мм («PSS», Германия), температура ко-

лонки – 40 °С, скорость потока – 0,4 мл/мин, элюент – 0,15 М NaCl, используя рефрактометрический детектор («Agilent», США или «Shimadzu», Япония соответственно). Результаты анализировали с помощью программного обеспечения Agilent GPC/SEC или LCsolution версия 1.24 SP1.

Растворы полисахаридов концентрировали на роторном испарителе Laborota 4002-control («Heidolph», Германия) при 40 °С, лиофилизировали на приборе Freezemobile 3SL («VirTis», США). pH растворов определяли на pH-метре MP 225 («Mettler Toledo», Швейцария).

Печать растительного полисахаридного чипа. Растительные полисахариды (полученные как описано выше) и олиго-моносахариды в аминоспейсерированной форме («Синтавр», Россия) растворяли в буфере для печати (300 мМ Na₂HPO₄), отфильтрованном через 0,2 мкм-фильтр и содержащем 0,001% (v/v) Tween 20 или 0,005% CHAPS (pH 8,5), и переносили в лунки 384-луночного планшета для ПЦР («BIOPlastics», Нидерланды). С помощью робота SciFlexArrayer S5 («Scienion», Германия) производили печать лигандов бесконтактным способом при относительной влажности 50%, объём капель – ~0,9 пл. Использовали два типа подложек – эпоксид-активированные («Семиотик», Россия) и NHS-активированные слайды Н («Schott Nexterion», Германия). Концентрация олигосахаридов в наносимых на подложку растворах составляла 20 мкМ, полисахариды наносили в концентрации 100 мкг/мл. Каждый лиганд печатали в девяти повторах. После печати гликочипы инкубировали 1–3 ч при относительной влажности 75% и упаковывали под вакуумом.

Изучение взаимодействия УСБ с лигандами полисахаридного эррея. Гликочипы выдерживали в буфере для блокировки (25 мМ этаноламина («Sigma-Aldrich», США), 100 мМ борной кислоты («Люми», Россия), 0,2% (v/v) Tween 20 («Sigma-Aldrich»), pH 8,5) в течение 90 мин при постоянном помешивании при комнатной температуре, после чего 2 раза промывали фосфатно-солевым буфером («Эко-Сервис», Россия), содержащим 0,05% (v/v) Tween 20 (ФСБ-0,05%). Далее исследуемые образцы наносили на чип, как описано ниже.

1. 1 мл раствора моноклонального антитела INRA-RU2 (любезно предоставленного Мари-Кристин Рале и Фабьен Гийон (Французский национальный институт сельскохозяйственных исследований, Нант, Франция)) в разведении 1 : 10 в ФСБ, содержащем 0,1% (v/v) Tween 20 и 1% БСА (ФСБ-0,1%; «Sigma», США), инкубировали 1 ч при 37 °С

и повышенной влажности, после этого 2 раза промывали в ФСБ-0,05%. Затем наносили на гликочип 1 мл раствора биотинилированных антител козы, узнающих иммуноглобулины мыши («Thermo Scientific», США), разведённых 1 : 200 в ФСБ-0,1%, и инкубировали в течение 1 ч при 37 °С и повышенной влажности. Далее 2 раза промывали в ФСБ-0,05%. Затем наносили на чипы по 1 мл раствора стрептавидина, меченного флуоресцентной меткой Alexa 555 («Invitrogen», США), разведённого 1 : 1000 в ФСБ-0,1%, и инкубировали в течение 1 ч при 37 °С и повышенной влажности.

2. 1 мл раствора стандартной плазмы крови («Sigma», США) в разведении 1 : 15 в ФСБ-0,1% инкубировали в течение 1 ч при 37 °С и повышенной влажности. Далее промывали гликочип, как описано выше. Затем наносили раствор вторичных антител козы, узнающих человеческие IgG и IgM, меченные Alexa 555 и Alexa 647 соответственно («Invitrogen»), разведённых 1 : 250 в ФСБ-0,1%, и инкубировали в течение 1 ч при 37 °С и повышенной влажности.

3. 1 мл раствора биотинилированного рибина RCA120 («Vector Laboratories», США) с концентрацией 10 мкг/мл в ФСБ-0,1% инкубировали 1 ч при 37 °С и повышенной влажности. Далее промывали, как описано выше. Затем наносили раствор стрептавидина, меченного флуоресцентной меткой Alexa 555 («Invitrogen»), в разведении 1 : 1000 в ФСБ-0,1% и инкубировали 1 ч при 37 °С и повышенной влажности.

Подготовленные гликочипы промывали 2 раза ФСБ-0,05% и на конечном этапе – в бидистиллированной воде, а затем высушивали чипы центрифугированием и сканировали (разрешение – 10 мкм) с помощью флуоресцентного ридера InnoScan 1100 AL («Innopsys», Франция). Полученные изображения преобразовывали в таблицу Excel с помощью программного обеспечения ридера ScanArray Express 4.0 с использованием метода подстраивающихся колец («PerkinElmer», США) и GAL-файла. Результаты представляли в виде медианы относительных единиц флуоресценции (RFU), отражающей аффинность и количество УСБ. Сигналы, величины которых были ниже 5% от максимального значения RFU, считали незначимыми.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Создание библиотеки олиго- и полисахаридов. Полисахариды выделяли из клеточных стенок растений и каллусных культур, а также использовали коммерчески доступные полиса-

хариды («Megazyme» и «Herbstreith & Fox KG»), дополнительно очищенные от низкомолекулярных примесей и фракционированные с помощью ультрафильтрации, ионообменной и гель-проникающей хроматографий. Для полученных образцов полисахаридов определяли моносакхаридный состав, степень этерификации (СМ), средневесовую (Mw) и среднечисловую (Mn) относительные молекулярные массы, индекс полидисперсности (Mw/Mn) и содержание в них белковых примесей. Полная характеристика выделенных полисахаридов представлена в таблице в Приложении; большая часть из них относится к пектинам, ряд образцов был представлен гемицеллюлозами (рис. 1).

В пектинах выделяют следующие структурные домены: гомогалактуронан (HG), рамногалактуронан I-го типа (RG-I), замещённые галактуронаны, к которым относятся ксилогалактуронан (XGA), апиогалактуронан (AGA) и рамногалактуронан II-го типа (RG-II) [27, 28]. Для каждого из них характерно своё, специфическое соотношение моносакхаридных остатков.

Все использованные пектины были охарактеризованы по содержанию HG и RG-I. В соответствии с классическими представлениями остов RG-I сформирован повторяющимися дисахаридными звеньями $[\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap}\text{-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-GalpA}\text{-(1}\rightarrow]$ и содержит эквивалентное количество Rha и GalA; цепи HG построены из остатков GalA, связанных между собой 1,4-связями [25]. Исходя из этого, содержание HG в пектинах мы оценивали по доле остатков GalA от суммы всех моносакхаридов с учётом вычета остатков GalA, входящих в состав RG-I (определяли как разность (GalA – Rha)). Для характеристики пектинов по содержанию RG-I оценивали суммарную долю остатков Rha и GalA (Rha \times 2) от суммы всех моносакхаридов.

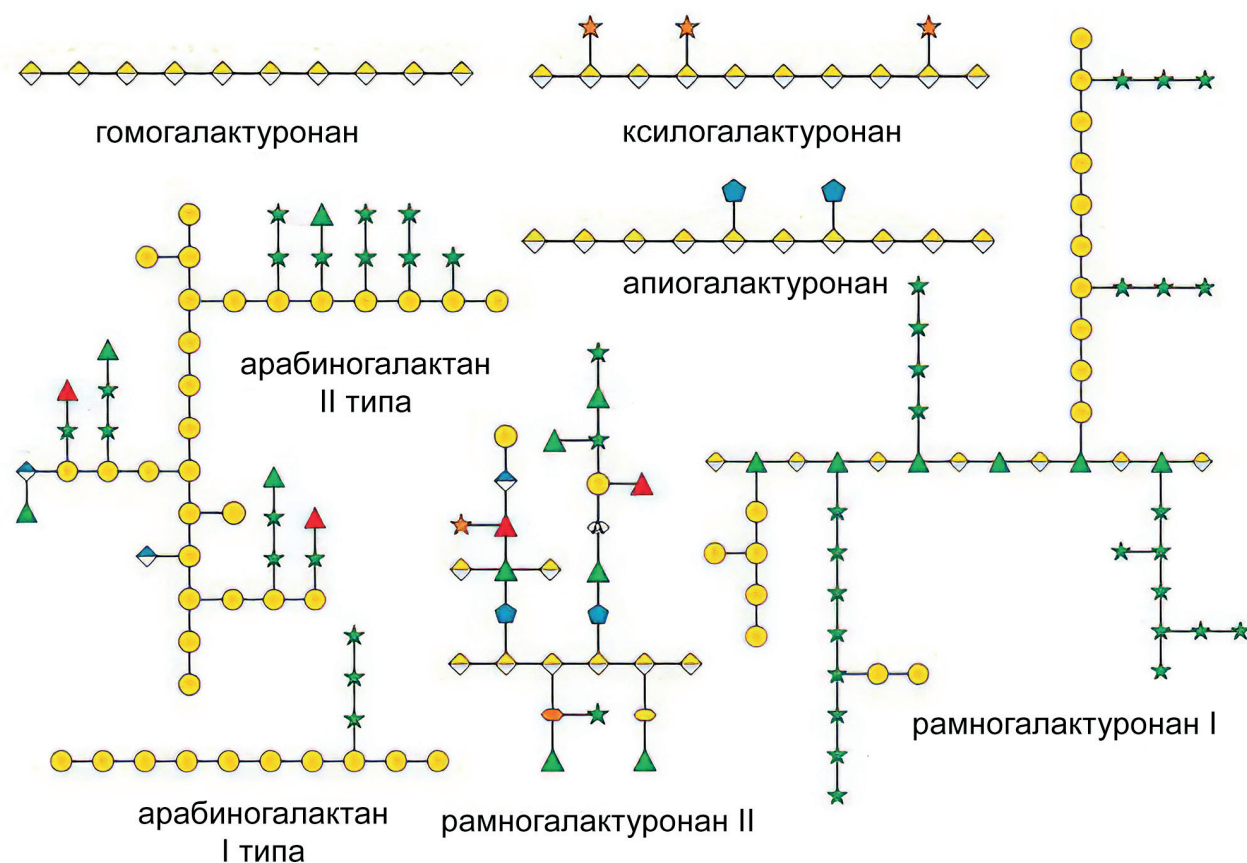
Важными структурными компонентами пектиновых полисахаридов являются остатки Gal и Ara. Они могут как входить в состав отдельных арабиногалактанов, так и формировать боковые углеводные цепи RG-I (рис. 1). В арабиногалактанах остатки Gal связаны между собой 1,3- и 1,6-связями; остатки Ara, как правило, имеют терминальное расположение; соотношение Ara/Gal варьирует от 30/70 до 40/60. Боковые цепи в RG-I формируют арабинаны с 1,5-связанными остатками Ara, доля которых в боковых цепях больше 50%, галактаны с 1,4-связанными остатками Gal, в которых доля остатков Ara незначительна [30]. Различия в составе этих полисахаридов мы характеризовали величиной суммы остатков Gal и Ara, а также соотношением Gal/Ara.

HG образует основную углеводную цепь в XGA и AGA. В XGA боковые цепи, образованные 1,2-, 1,3- и 1,4-связанными остатками Xyl, замещают остатки GalA по O-3 [31, 32]. В AGA остатки GalA могут быть замещены по O-2 и/или O-3 единичными, или несколькими 1,3-связанными остатками апиозы (Api) [33]. Степень замещения остатков GalA в AGA и XGA мы характеризовали соотношением Api(Xyl)/GalA .

По преобладанию тех или иных структурных элементов полисахариды для гликоэрея были разделены на несколько групп (таблица). В группу 1 были объединены пектины с высокой долей HG, в которых доля остатков GalA, образующих его основную углеводную цепь, составляет $\geq 86\%$ от суммы всех моносакхаридов, и невысоким содержанием участков RG-I, а также цепей из остатков Ara и Gal. В группу 2 мы объединили пектины, в которых HG также является преобладающим доменом (GalA $\geq 50\%$), но с большим содержанием Ara и Gal, чем в полисахаридах первой группы. Группа 3, в отличие от первой и второй групп, включает пектины, содержащие RG-I, в которых доля остатков GalA и Rha, образующих его главную углеводную цепь, составляет 10–40% от суммы всех моносакхаридов. Группа 4 включает пектины, в составе которых RG-I является доминирующим компонентом, доля остатков Gal и Ara в них составляет 10–40%. Группы 5–7 включают полисахариды, в составе которых преобладают остатки Ara и Gal (40–100%); в группе 5 объединены полисахариды с высоким содержанием и остатков Ara, и Gal; в группе 6 – полисахариды с преобладанием остатков Ara; в группе 7 – остатков Gal. Замещённые галактуронаны (XGA и AGA) объединены в группу 8. Остальные 13 полисахаридов, которые в качестве доминирующего компонента содержат или галактоманнан, или арабиноксилан, или ксилан, или глюкан, или ксилоглюкан, были объединены в группу 9 и обозначены как гемицеллюлозы. Кроме перечисленных выше полисахаридов, эррей содержал 14 моносакхаридов и 9 олигосахаридов – компонентов использованных полисахаридов и/или типичных лигандов известных растительных лектинов (таблица).

Оптимизация условий иммобилизации гликанов. Для иммобилизации полисахаридов было использовано два типа активации поверхности слайда – эпоксидом или NHS-эфиром. Иммобилизацию на эпоксид-активированном слайде проводили в 300 мМ Na_2HPO_4 , содержащем неионогенный детергент Tween 20 (эти условия были рекомендованы производителем слайдов для иммобилизации олигосахаридов). Однако,

а



б

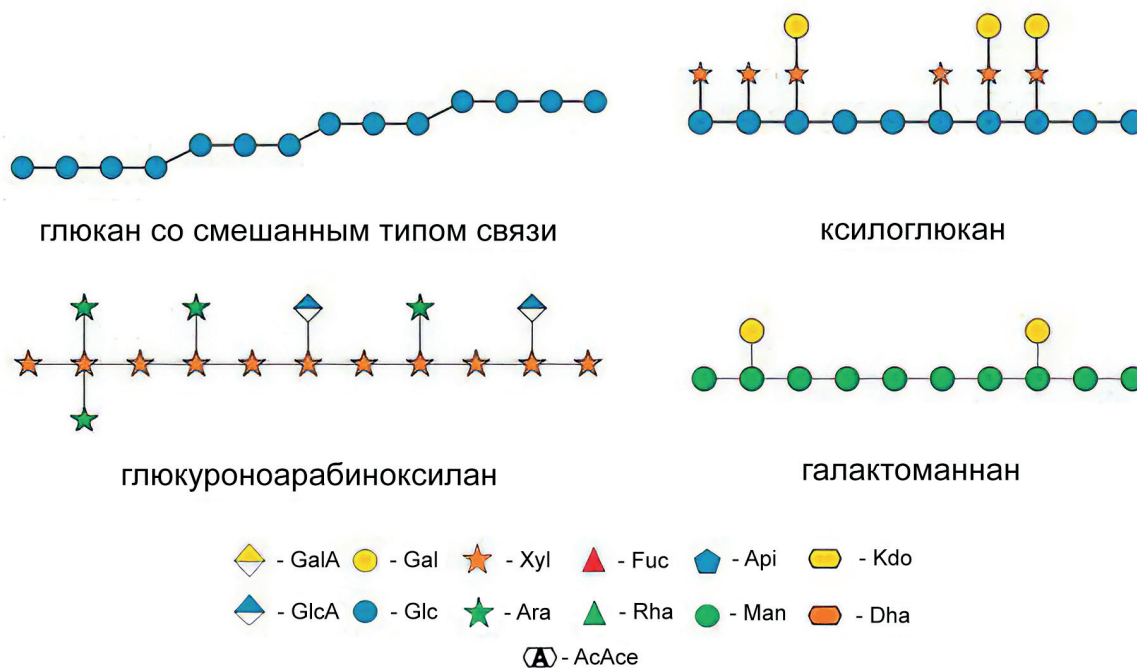


Рис. 1. Схематическое изображение фрагментов основных структурных компонентов полисахаридов клеточной стенки растений, которые вошли в состав гликоэррея: а – пектиновые полисахариды, б – гемицеллюлозы (создано с помощью ресурса DrawGlycan-SNFG [29]); более подробно символическую номенклатуру моносахаридов можно посмотреть на glycopedia.eu

Группы гликанов, составляющих гликоэпэрей

№ группы	Наименование группы полисахаридов
1	Гомогалактуронаны (HG)
2	Пектины с преобладанием HG
3	Пектины с преобладанием HG и значительной долей RG
4	Пектины с преобладанием RG
5	Полисахариды с преобладанием Ara и Gal
6	Полисахариды с преобладанием Ara
7	Полисахариды с преобладанием Gal
8	Замещённые галактуронаны (XGA, AGA)
9	Гемицеллюлозы: GAM, AX, XYL, GLC, XG

Моно- и олигосахариды

№	Структура	№	Структура
1-s	L-Fuca-sp*	39-s	Xylβ-sp
2-s	Galα-sp	40-s	Xylα-sp
3-s	Galβ-sp	97-s	Galβ1-4GlcNAcβ-sp
5-s	GalNAcα-sp	111-s	Glcβ1-4Glcβ-sp1
7-s	Glcα-sp	112-s	Glcβ1-6Glcβ-sp1
9-s	Glcβ-sp	116-s	GlcNAcβ1-4GlcNAcβ-sp
16-s	Manα-sp	504-s	(Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1) ₂ -3,6-Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAcβ-sp1
18-s	Manβ-sp	505-s	(GlcNAcβ1-2Manα1) ₂ -3,6-Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAcβ-sp1
20-s	L-Rhaα-sp1**	627-s	(Neu5Acα2-6Galβ1-4GlcNAcβ1-2Manα1) ₂ -3,6-Manβ1-4GlcNAcβ1-4GlcNAcβ-sp1
28-s	Xylβ-sp1	831-s	Galβ1-4Glcβ-sp
29-s	Fucβ-sp1	844-s	Xylβ1-2Manα-sp
31-s	L-Araα-sp1		

Примечание. Используемые сокращения: AGA – апиогалактуронан, AX – арабиноксиланы, GAM – галактоманнаны, GLC – глюканы, HG – гомогалактуронан, RG-I – рамногалактуронан I, XG – ксилоглюканы, XGA – ксилогалактуронан, XYL – ксиланы.

* sp – -OCH₂CH₂CH₂NH₂.

** sp1 – -NHCOCH₂NH₂. Все моносахариды являются D-пиранозами, если не указано иначе.

в отличие от олигосахаридов, для полисахаридов наблюдалось неравномерное распределение интенсивности флуоресценции (после проявки, см. раздел «Материалы и методы») внутри спота в виде «бубликов» (рис. 2). Похо-

жее явление, описанное ранее [8], объясняется неудачным сочетанием нескольких факторов, в частности скорости высыхания нанесённой капли и особенностями структуры наносимых на поверхность гликанов. Варьирование ус-

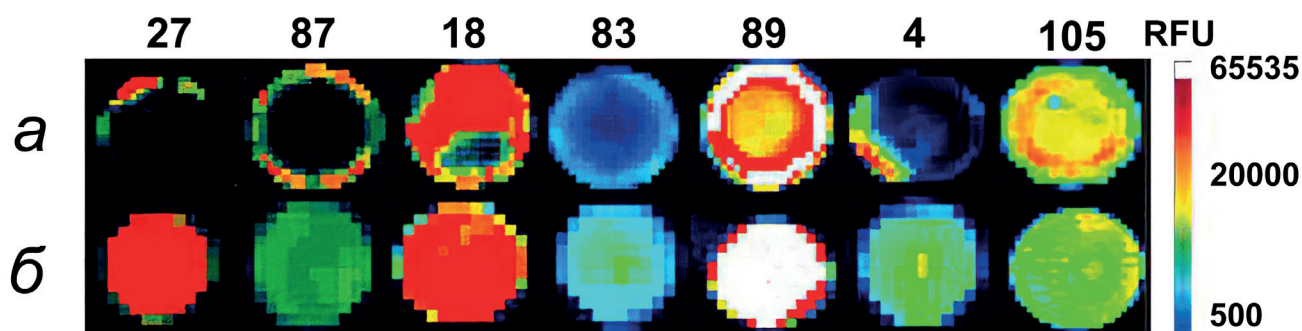


Рис. 2. Морфология спотов при различных условиях печати. *а* – Эпоксидная химия (0,001% (v/v) Tween 20), *б* – NHS-химия (0,005% CHAPS), 27–105 – номера гликанов (см. таблицу в Приложении). Представлено взаимодействие поликлональных антител человека с гликанами эррея (в радужной цветовой шкале). RFU – относительные единицы флуоресценции

ловий, в частности замена Tween 20 на цвитерионный детергент CHAPS, лишь отчасти помогло исправить ситуацию (данные не приведены). Поэтому была апробирована альтернативная химия иммобилизации – на NHS-активированных слайдах Slide H) производства «Schott Nexterion», которые более реакционно-способны, чем эпоксидные, а также содержат, как заявлено производителем, 3D-поверхностный слой полимера, который снижает скорость высыхания капли. Морфология спотов (рис. 2) при печати полисахаридов на этих слайдах оказалась приемлемой, хотя споты не всегда были одинакового диаметра, что пришлось нивелировать использованием метода подстраивающихся колец при обработке полученных изображений.

Поскольку процесс печати и иммобилизации на NHS-активированные слайды проходит при pH 8,5, была проверена устойчивость полисахаридов, содержащих остатки уроновых кислот, к деградации при таком значении pH. Для этого полисахариды растворяли в буфере для печати, выдерживали в течение 1–3 суток и оценивали содержание возможных продуктов распада спектрофотометрически. Значимой деградации полисахаридов обнаружено не было. Кроме того, из одних и тех же растворов, которые хранили при -20°C , печать производили несколько раз в течение 6 месяцев, проверяя устойчивость полисахаридов в растворе при пониженной температуре за данный промежуток времени. Во всех случаях коэффициент межслайдовой корреляции ССС (согласованный коэффициент корреляции Лина, рассчитанный как описано ранее [34]) между ними превышал 0,85, что также свидетельствует о том, что полисахариды не претерпевают значительных изменений при длительном хранении в описанных выше условиях.

Взаимодействие моноклонального антитела INRA-RU2 с полисахаридами эррея. Большинство полисахаридов эррея содержит фрагменты RG-I, поэтому для проверки факта иммобилизации полисахаридов, а также их функциональной активности было использовано моноклональное IgG-антитело INRA-RU2, узнающее неразветвлённые или частично разветвлённые области RG-I, а именно: два дисахаридных повтора остова; оно демонстрирует максимальное связывание с полисахаридами, в структуре которых есть семь таких повторов [21].

На нашем эррее антитело INRA-RU2 взаимодействовало с 68 из 113 напечатанных полисахаридов, в то же время, не проявляя активности по отношению к моно- и олигосахаридам (рис. 3).

Все пектины групп 3 и 4, отличающиеся значительной долей RG-I (10–55% от суммы всех моносахаридов в образцах), продемонстрировали сильное взаимодействие с антителом. Исключением являлись два пектина из картофеля (47 и 46, см. таблицу в Приложении), которые отличаются низкой молекулярной массой ($M_w = 14–16$ кДа), что, вероятно, и явилось причиной отсутствия взаимодействия. Более того, антитело взаимодействовало с большинством пектинов из групп 1 и 2, в которых RG-I идентифицирован в качестве минорного компонента (<10%); в то же время полисахариды из этих же групп, выделенные из рдеста плавающего (11), хвоща лесного (12), древесной зелени сосны сибирской (15, 16, 87) и каллусной культуры ряски малой (80, 86), в которых данный эпигенот низко представлен, с антителом не взаимодействовали, рационального объяснения чему у нас пока нет.

Корреляции между наличием взаимодействия с INRA-RU2 и содержанием RG-I в полисахаридах групп 5–7 установлено не было.

Несмотря на то что полисахариды этих групп сравнимы по содержанию Rha с группой 2, взаимодействие с антителом продемонстрировали лишь немногие из них. Наибольшее связывание с антителом выявлено для полисахаридов солодки (26, 35), сахарной свёклы (48–50) и льна (69). Тогда как для полисахаридов хвойных (104, 105) и смолёвки обыкновенной (109), сравнимых по содержанию RG-I и Mw с некоторыми полисахаридами солодки и сахарной свёклы (26, 48–50), взаимодействия с антителом не установлено. Вероятно, это обусловлено недоступностью эпитопа из-за высокой плотности боковых углеводных цепей, образованных остатками Ara и Gal, что является отличительной особенностью полисахаридов групп 5–7.

Из группы 8, объединяющей замещённые галактуронаны, доля RG-I в которых незначительна, только пектин баобаба (32) взаимодействовал с INRA-RU2, хотя среди пектинов этой группы он отличается наименьшим содержанием RG-I. Вероятно, это обусловлено низкой степенью замещения главной углеводной цепи боковыми цепями (таблица в Приложении). В пектинах из ряски и взморника (28, 30, 31) – других представителей этой группы – связывания с антителом INRA-RU2 не отмечалось, хотя доля RG-I была существенно выше, чем в пектине баобаба, а суммарное замещение остатков GalA главной углеводной цепи боковыми цепями, образованными остатками Xyl и Api, достигало 75%.

С полисахаридами группы 9, представленной гемицеллюлозами, связывания ожидаемо не наблюдалось.

Взаимодействие антител крови человека с гликанами эррея. Ещё одним способом подтверждения факта иммобилизации моно- и олигосахаридов было взаимодействие с антителами крови человека. Образец сыворотки крови условно здорового донора ожидаемо взаимодействовал с GalNAc α , L-Rha α , дисахаридами Glc β 1-6Glc β и GlcNAc β 1-4GlcNAc β [19, 20], которые (кроме рамнозы) не являются компонентами использованных полисахаридов. Изучение взаимодействия антител крови человека с растительными полисахаридами, в том числе с пектинами, ранее систематически не проводилось. Согласно полученным в нашем исследовании результатам, 74 полисахарида из 113 продемонстрировали связывание при инкубации образца сыворотки крови с эрреем (рис. 3). Профиль IgM был гораздо шире, чем IgG, однако распознаваемые этими классами иммуноглобулинов полисахариды принадлежат к одним и тем же группам пектинов, а именно:

к группам 1 и 2, содержащим HG; группам 3 и 4, содержащим RG-I; группам 5–7 со значительной долей остатков Ara и/или Gal (>45%), а также группе 9, объединяющей непектиновые полисахариды. Из группы 8 антитела обоих классов распознавали только пектин из ряски малой (29), обладающий большей молекулярной массой, чем пектин (28) из того же источника, связывания с которым не наблюдали. В топ-список самых активных взаимодействий с IgG человека попали полисахариды из групп 5 и 7, выделенные из каллусных культур смолёвки и пижмы (108–112), а максимальное связывание показал пектин (20, группа 3), выделенный из листьев сабельника болотного, со значительной долей RG-I. Максимальное взаимодействие с IgM показали полисахариды (103, 104, 106 и 107; группа 5), выделенные из древесной зелени пихты и лиственницы, со значительной долей остатков Ara и Gal, а также пектины, содержащие RG-I (группа 3 и 4), выделенные из листьев берёзы пушистой и берёзы обыкновенной (23, 25, 90, 92–94). Структурных особенностей, резко выделяющих эти полисахариды на фоне родственных, мы не идентифицировали.

Взаимодействие рицина с гликанами эррея. В качестве представителя растительных углевод-связывающих белков был взят рицин, известный как β -галактозосвязывающий лектин, который активно используют в гликобиологии для характеристики гликозилирования в первую очередь в тканях млекопитающих. Он ожидаемо провзаимодействовал с β Gal-терминированными гликанами, а также с двухантенной N-цепью комплексного типа (Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1) $_2$ -3,6Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc β), что было найдено ранее (<http://functionalglycomics.com/>). Рицин показал значимое связывание с 23 из 113 полисахаридов (рис. 3), самые интенсивные сигналы относятся к ксилоглюканам (60, 61; группа 9) из тамаринда, содержащим остатки Gal (до 15%), входящие в состав боковых цепей (Gal β 1-2Xyl α 1-), замещающие остатки Glc глюканового остова по положению O-6 [35], а также полисахаридам со значительным содержанием остатков Ara и Gal группы 5 из акации (58), лиственницы (55) и полисахариду со значительным содержанием остатков Gal группы 7 из льна (69). Интересно, что интенсивность взаимодействия этого лектина с полисахаридами не коррелирует с содержанием остатков Gal – у топовых ксилоглюканов из тамаринда содержание остатков Gal было одним из самых низких среди 23 провзаимодействовавших полисахаридов, что свидетель-

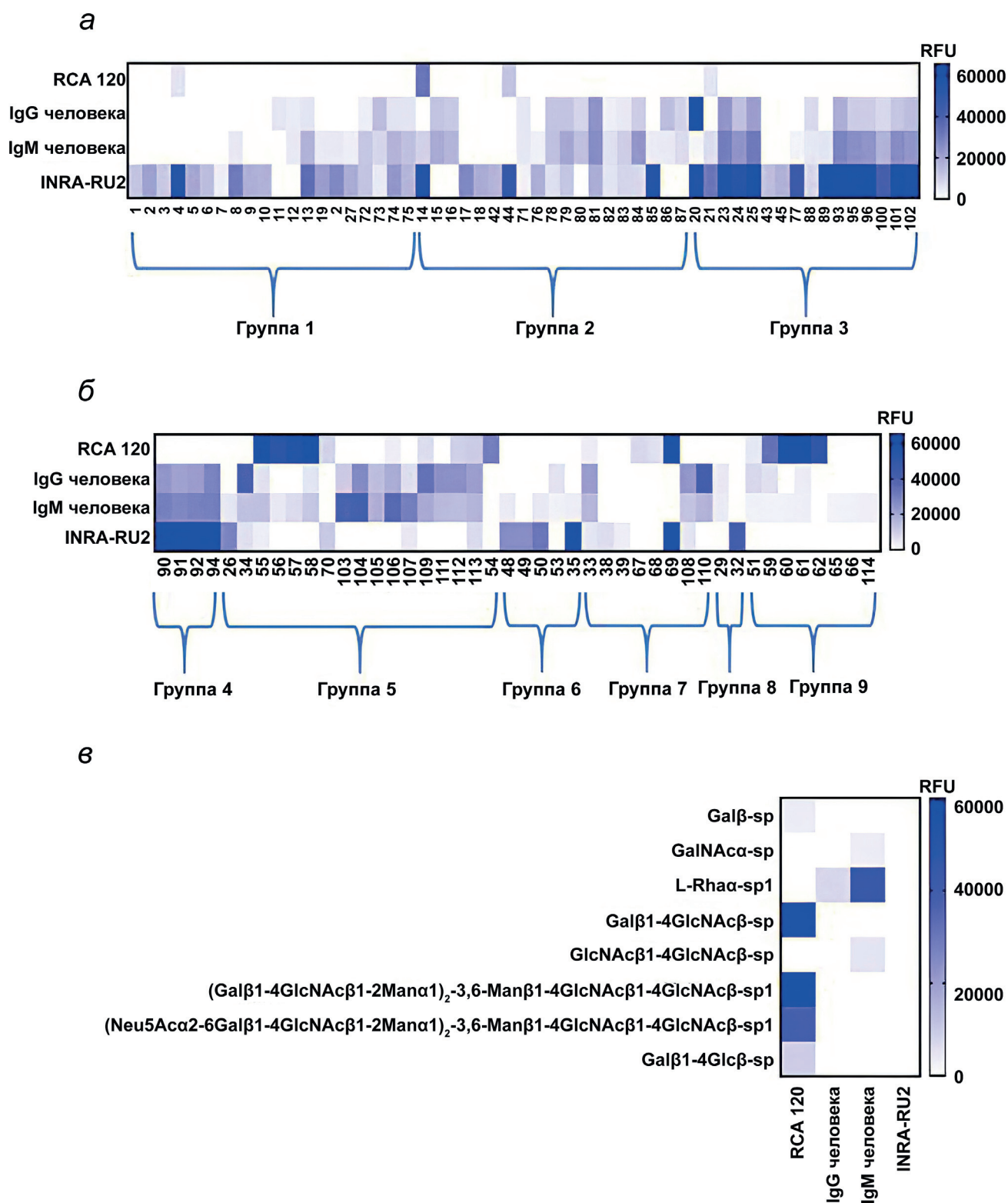


Рис. 3. Взаимодействие моноклонального антитела INRA-RU2, антител (IgG и IgM) плазмы крови человека, а также рицина (RCA 120) с гликанами эррея. *а* – Взаимодействие с пектинами групп 1–3. *б* – Взаимодействие с пектинами групп 4–8 и гемицеллюлозами группы 9. *в* – Взаимодействие с моно- и олигосахаридами (приведены только значимые взаимодействия). Приведённые по оси X номера – идентификационные номера полисахаридов. Подробное описание приведено в таблице в Приложении

ствует в пользу того, что для специфического связывания анализируемого лектина необходимо не столько количественное преобладание этого типа мономера, сколько структурные и конформационные особенности содержащего его гликтопа. Отметим, что остатки Gal полностью отсутствовали только в структуре глюкана ячменя, взаимодействия с которым мы не наблюдали (116).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Углеводы и взаимодействующие с ними белки вовлечены в большинство протекающих в растительной клетке процессов. Выяснение механизмов функционирования растительных УСБ напрямую сопряжено с необходимостью изучения их специфичности. Лидирующие позиции среди инструментов для оценки взаимодействий УСБ со специфическими гликанами занимают гликановые эрреи, успешно зарекомендовавшие себя при исследованиях УСБ животных и человека [5, 35–37], но до сих пор практически не использовавшиеся при изучении УСБ растений. В представленной работе впервые был сконструирован гликочип, одновременно содержащий охарактеризованные растительные полисахариды нескольких классов, а также ряд моно- и олигосахаридов, и изучено его взаимодействие с несколькими видами белков: 1) моноклональным антителом INRA-RU2, специфически распознающим остов RG-I; 2) растительным лектином, рицином; 3) поликлональными антителами крови человека. Указанные белки значимо взаимодействовали с 99 из 113 полисахаридов (88%). Гарантированная иммобилизация полисахаридных компонентов принципиальна — отсутствие сигнала изучаемого УСБ на эррее должно однозначно интерпретироваться как отсутствие связывания. И если для тех гликанов, которые иммобилизовали в этом формате раньше (то есть олигосахаридов и бактериальных полисахаридов, имеющих аминокгруппу), проблемы доказательства иммобилизации не стояло, то для растительных полисахаридов оно необходимо. К сожалению, универсального реагента, взаимодействующего с любым растительным полисахаридом, не существует. Тем не менее представленные данные подтверждают наличие большинства полисахаридов на поверхности использованного слайда. Каждый из тех полисахаридов, связывание УСБ с которыми мы не увидели, имеет близкого «родственника» с точки зрения химической структуры среди связавшихся, поэтому у нас нет основа-

ний опасаться, что «молчащие» полисахариды не иммобилизовались. Тем не менее мы пока не можем утверждать, что в предложенных условиях будет иммобилизоваться любой полисахарид — в природе есть такие, в структуре которых полностью отсутствуют первичные (наиболее реакционноспособные) гидроксильные, а вторичные — слабо нуклеофильны или затруднены из-за экранирования соседними молекулярными фрагментами; поэтому в дальнейшем мы будем уделять особенное внимание такого рода молекулам.

Приведённые выше экспериментальные данные по связыванию изученных белков с растительными полисахаридами важны не только как доказательство факта иммобилизации последних, но, безусловно, имеют самостоятельное значение в плане характеристики или более детального (чем раньше) изучения этих белков. Ниже полученные результаты обсуждены именно с точки зрения изучения специфичности этих УСБ.

Рицин состоит из двух полипептидных цепей, одна из которых является токсином, а вторая — галактозосвязывающим лектином [38]. Биологические функции рицина как целого, так и его лектинового домена до сих пор лишь предполагаются. В самом общем виде лектиновому домену отводят функцию вектора, доставляющего токсинную активность в нужное место, а в целом роль рицина связывают с защитой от насекомых и других патогенов [2, 38]. С другой стороны, для лектинового домена не исключена роль якоря для депонирования и транспорта всего белка за счёт взаимодействия с собственными полисахаридами растительной клетки. До настоящего исследования такая вспомогательная («технологическая») функция оставалась лишь гипотетической, однако теперь, когда показано связывание рицина с растительными полисахаридами, приобретает смысл развитие этой гипотезы.

Антитела крови человека. Известно, что в крови человека детектируются антитела к полисахаридам бактериального происхождения, что можно объяснить двумя факторами. Во-первых, тем, что это адаптивные иммуноглобулины, которые генерируются В2-лимфоцитами под действием попадающих в организм инфекционных бактерий, либо под действием вакцин [39, 40]. Во-вторых, тем, что это естественные (врождённые) антитела, имеющие паратоп для узнавания комменсальной микробиоты, необходимый для начала функционирования (прайминга) В1-лимфоцитов в первые месяцы жизни [41]. Обнаруженное в данной работе широко представленное (то есть, оче-

видно, неслучайное) взаимодействие с растительными полисахаридами не укладывается ни в одно из этих двух объяснений; также, не представляется убедительным и перекрёстное взаимодействие бактериальных полисахаридов с пектинами растений, особенно в свете того, что исследуемые антитела не способны взаимодействовать даже с фрагментами использованных полисахаридов (также присутствующих в эррее). В то же время в литературе описаны так называемые пектин-полисахарид-реактивные антитела человека (принадлежащие к классам M, G и A, особенно IgM и IgG) [42–44], способные узнавать, например, арабинан свёклы, арабиногалактан из сои и гуммиарабика, полигалактуроновою кислоту из цитрусовых, а также некоторые разветвлённые рамногалактуронаны I. С одной стороны, постоянный контакт человека с растительными полисахаридами пищи предполагает возможность узнавания их как антигенов, с другой стороны, смысл формирования таких антител неясен. Отметим, однако, что пектины рассматривают как триггеры аллергических реакций на орехи и фрукты [45, 46]. Так или иначе, обнаруженное взаимодействие антител крови человека с разнообразными пектинами требует дальнейшего изучения.

Моноклональное антитело INRA-RU2 узнаёт остов RG-I, сформированный как минимум из двух повторяющихся дисахаридных звеньев Rha-GalA [21]. Полученное против RG-I слизи семян *Arabidopsis thaliana* антитело способно распознавать свой эпитоп и в других растительных объектах. Полученные с помощью эррея результаты подтвердили эту способность. Кроме того, было обнаружено, что на взаимодействие антитела с полисахаридами влияет не только количество доменов RG-I, но и присутствие в полисахаридах других структурных элементов, таких как замещённые галактуронаны, а также присутствие полисахаридов с остатками Ara и Gal, характерными для боковых цепей RG-I (группы 5–8). Это может свидетельствовать о том, что для взаимодействия INRA-RU2 критичны тонкие нюансы в строении боковых цепей полисахаридов и/или их расположение, а также, возможно, и пространственное расположение различных структурных элементов пектиновых макромолекул относительно друг друга. В то же время нельзя исключить и конформационных изменений некоторых из пектиновых макромолекул при их иммобилизации. Обнаруженные факты предполагают необходимость более детального изучения структуры и конформационных особенностей пектинов.

Таким образом, гликоэррей, сочетающий в себе гликаны разного размера — от моно- до полисахаридов — позволяет шире взглянуть на специфичность УСБ из совершенно различных источников, изучать потенциальные мишени уже известных лектинов, а также, как мы ожидаем, исследовать специфичность новых белков, идентифицированных пока только *in silico*.

Вклад авторов. Т.А. Горшкова, Н.В. Бовин — постановка проблемы и руководство работой; Н.В. Шилова — разработка концепции статьи, формирование и обсуждение результатов исследования; А.Н. Никифорова — проведение экспериментов, описание и графическое представление результатов, оформление статьи; В.В. Головченко, О.А. Патова, П.В. Микшина — получение, очистка, фракционирование и характеристика образцов полисахаридов, оформление результатов в этой части исследования, обсуждение и редактирование текста.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (гранты № 20-63-47110 (печать и работа с гликоэрреями) и № 20-64-47036 (очистка, разделение и характеристика полисахаридов)), а также Госзадания № АААА-А18-118022790083-9 (подбор базы коммерческих полисахаридов).

Благодарности. Авторы выражают благодарность за помощь в обсуждении результатов и подготовке материалов статьи Л.В. Козловой (Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ КазНЦ РАН), а также А.Ф. Ахметгалиевой (Казанский институт биохимии и биофизики ФИЦ КазНЦ РАН) за техническое сопровождение работ по подготовке отдельных коммерческих полисахаридов. Мы хотели бы выразить благодарность доктору Мари-Кристин Рале и доктору Фабьен Гийон (Французский национальный институт сельскохозяйственных исследований, Нант, Франция) за любезно предоставленный образец антитела INRA-RU2, а также доктору Е.А. Гюнтер (ИФ ФИЦ Коми НЦ УрО РАН) за любезно предоставленные образцы полисахаридов, выделенных из каллусных культур.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследований.

Дополнительные материалы. Приложение к статье опубликовано на сайте журнала «Биохимия» (<https://biochemistry.moscow.com>).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. De Coninck, T., and Van Damme, E. J. M. (2021) Review: the multiple roles of plant lectins, *Plant Sci.*, **313**, 111096, doi: 10.1016/j.plantsci.2021.111096.
2. Vandenborre, G., Smagghe, G., and Van Damme, E. J. M. (2011) Plant lectins as defense proteins against phytophagous insects, *Phytochemistry*, **72**, 1538-1550, doi: 10.1016/j.phytochem.2011.02.024.
3. De Paz, J. L., and Seeberger, P. H. (2012) In *Carbohydrate Microarrays: Methods and Protocols* (Chevolot, Y., eds) Humana Press, NJ, pp. 1-12.
4. Ratner, D. M., Adams, E. W., Disney, M. D., and Seeberger, P. H. (2004) Tools for glycomics: Mapping interactions of carbohydrates in biological systems, *ChemBioChem*, **5**, 1375-1383, doi: 10.1002/cbic.200400106.
5. Blixt, O., Head, S., Mondala, T., Scanlan, C., Huflejt, M. E., Alvarez, R., et al. (2004) Printed covalent glycan array for ligand profiling of diverse glycan binding proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 17033-17038, doi: 10.1073/pnas.0407902101.
6. Shilova, N., Huflejt, M. E., Vuskovic, M., Obukhova, P., et al. (2013) In *SialoGlyco Chemistry and Biology I. Topics in Current Chemistry* (Gerardy-Schahn, R., Philippe Delannoy, P., von Itzstein, M., eds) Springer Berlin, Heidelberg, pp. 169-181.
7. Ribeiro, D. O., Pinheiro, B. A., Carvalho, A. L., and Palma, A. S. (2017) In *Carbohydrate Chemistry: Chemical and Biological Approaches* (Rauter, A., Lindhorst, T., Queneau, Y., eds) CPI Group Ltd, UK, pp. 159-176.
8. Song, X., Heimburg-Molinaro, J., Cummings, R. D., and Smith, D. F. (2014) Chemistry of natural glycan microarrays, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **18**, 70-77, doi: 10.1016/j.cbpa.2014.01.001.
9. Sørensen, I., Pedersen, H. L., and Willats, W. G. T. (2009) An array of possibilities for pectin, *Carbohydr. Res.*, **344**, 1872-1878, doi: 10.1016/j.carres.2008.12.008.
10. Pedersen, H. L., Fangel, J. U., McCleary, B., Ruzanski, C., Rydahl, M. G., et al. (2012) Versatile high resolution oligosaccharide microarrays for plant glycobiology and cell wall research, *J. Biol. Chem.*, **287**, 39429-39438, doi: 10.1074/jbc.M112.396598.
11. Øbro, J., Sørensen, I., Møller, I., Skjøt, M., Mikkelsen, J. D., et al. (2007) High-throughput microarray analysis of pectic polymers by enzymatic epitope deletion, *Carbohydr. Polymers*, **70**, 77-81, doi: 10.1016/j.carbpol.2007.03.008.
12. Moore, J. P., Nguema-Ona, E., Fangel, J. U., Willats, W. G. T., Hugo, A., et al. (2014) Profiling the main cell wall polysaccharides of grapevine leaves using high-throughput and fractionation methods, *Carbohydr. Polymers*, **99**, 190-198, doi: 10.1016/j.carbpol.2013.08.013.
13. Kračun, S. K., Fangel, J. U., Rydahl, M. G., Pedersen, H. L., Vidal-Melgosa, S., et al. (2017) In *High-Throughput Glycomics and Glycoproteomics* (Lauc, G., Wuhler, M., eds) Humana Press, NY, pp. 147-165.
14. Sillo, F., Fangel, J. U., Henrissat, B., Faccio, A., Bonfante, P., et al. (2016) Understanding plant cell-wall remodelling during the symbiotic interaction between *Tuber melanosporum* and *Corylus avellana* using a carbohydrate microarray, *Planta*, **244**, 347-359, doi: 10.1007/s00425-016-2507-5.
15. Salmeán, A. A., Guillouzo, A., Duffieux, D., Jam, M., Matard-Mann, M., et al. (2018) Double blind microarray-based polysaccharide profiling enables parallel identification of uncharacterized polysaccharides and carbohydrate-binding proteins with unknown specificities, *Sci. Rep.*, **8**, 2500, doi: 10.1038/s41598-018-20605-9.
16. García Caballero, G., Beckwith, D., Shilova, N. V., Gabba, A., Kutzner, T. J., et al. (2020) Influence of protein (human galectin-3) design on aspects of lectin activity, *Histochem. Cell Biol.*, **154**, 135-153, doi: 10.1007/s00418-020-01859-9.
17. Dobrochaeva, K., Khasbiullina, N., Shilova, N., Knirel, Y., Obukhova, P., et al. (2021) Specificity profile of α Gal antibodies in α GalT KO mice as probed with comprehensive printed glycan array: comparison with human anti-Galili antibodies, *Xenotransplantation*, **28**, e12672, doi: 10.1111/xen.12672.
18. Dobrochaeva, K., Khasbiullina, N., Shilova, N., Antipova, N., Obukhova, P., et al. (2020) Human natural antibodies recognizing glycan Gal β 1-3GlcNAc (LeC), *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 6511, doi: 10.3390/ijms21186511.
19. Huflejt, M. E., Vuskovic, M., Vasiliu, D., Xu, H., Obukhova, P., et al. (2009) Anti-carbohydrate antibodies of normal sera: findings, surprises and challenges, *Mol. Immunol.*, **46**, 3037-3049, doi: 10.1016/j.molimm.2009.06.010.
20. Bovin, N. V. (2013) Natural antibodies to glycans, *Biochemistry (Moscow)*, **78**, 786-797, doi: 10.1134/S0006297913070109.
21. Ralet, M.-C., Tranquet, O., Poulain, D., Moïse, A., and Guillon, F. (2010) Monoclonal antibodies to rhamnogalacturonan I backbone, *Planta*, **231**, 1373-1383, doi: 10.1007/s00425-010-1116-y.
22. DuBois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., Smith, F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances, *Anal. Chem.*, **28**, 350-356, doi: 10.1021/ac60111a017.
23. Usov, A. I., Bilan, M. I., and Klochkova, N. G. (1995) Polysaccharide composition of several calcareous red algae: isolation of alginate from *Corallina pilulifera* P. et R. (Rhodophyta, Corallinaceae), *Bot. Marina*, **38**, 43-51, doi: 10.1515/botm.1995.38.1-6.43.

24. Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A. L., and Randall, R. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275, doi: 10.1016/S0021-9258(19)52451-6.
25. Wood, P. J., and Siddiqui, I. R. (1971) Determination of methanol and its application to measurement of pectin ester content and pectin methyl esterase activity, *Anal. Biochem.*, **39**, 418-428, doi: 10.1016/0003-2697(71)90432-5.
26. Golovchenko, V. V., Khramova, D. S., Shashkov, A. S., Otgonbayar, D., Chimidsogzol, A., et al. (2012) Structural characterisation of the polysaccharides from endemic Mongolian desert plants and their effect on the intestinal absorption of ovalbumin, *Carbohydr. Res.*, **356**, 265-272, doi: 10.1016/j.carres.2012.03.023.
27. Ridley, B. L., O'Neill, M. A., and Mohnen, D. (2001) Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling, *Phytochemistry*, **57**, 929-967, doi: 10.1016/S0031-9422(01)00113-3.
28. Voragen, A. G. J., Coenen, G. J., Verhoef, R. P., and Schols, H. A. (2009) Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls, *Struct. Chem.*, **20**, 263, doi: 10.1007/s11224-009-9442-z.
29. Cheng, K., Zhou, Y., and Neelamegham, S. (2016) DrawGlycan-SNFG: a robust tool to render glycans and glycopeptides with fragmentation information, *Glycobiology*, **27**, 200-205, doi: 10.1093/glycob/cww115.
30. Горшкова Т. А. (2007) *Растительная клеточная стенка как динамичная система*, Наука, Москва.
31. Zandleven, J., Beldman, G., Bosveld, M., Schols, H. A., and Voragen, A. G. J. (2006) Enzymatic degradation studies of xylogalacturonans from apple and potato, using xylogalacturonan hydrolase, *Carbohydr. Polymers*, **65**, 495-503, doi: 10.1016/j.carbpol.2006.02.015.
32. Patova, O. A., Luanda, A., Paderin, N. M., Popov, S. V., Makangara, J. J., et al. (2021) Xylogalacturonan-enriched pectin from the fruit pulp of *Adansonia digitata*: structural characterization and antidepressant-like effect, *Carbohydr. Polymers*, **262**, 117946, doi: 10.1016/j.carbpol.2021.117946.
33. Golovchenko, V. V., Ovodova, R. G., Shashkov, A. S., and Ovodov, Y. S. (2002) Structural studies of the pectic polysaccharide from duckweed *Lemna minor* L., *Phytochemistry*, **60**, 89-97, doi: 10.1016/S0031-9422(02)00040-7.
34. Lin, L. I.-K. (1989) A concordance correlation coefficient to evaluate reproducibility, *Biometrics*, **45**, 255-268, doi: 10.2307/2532051.
35. Flannery, A., Gerlach, J., Joshi, L., and Kilcoyne, M. (2015) Assessing bacterial interactions using carbohydrate-based microarrays, *Microarrays*, **4**, 690-713, doi: 10.3390/microarrays4040690.
36. Laurent, N., Voglmeir, J., and Flitsch, S. L. (2008) Glycoarrays – tools for determining protein-carbohydrate interactions and glycoenzyme specificity, *Chem. Commun.*, **37**, 4400-4412, doi: 10.1039/b806983m.
37. Puvirajesinghe, T., and Turnbull, J. (2016) Glycoarray technologies: deciphering interactions from proteins to live cell responses, *Microarrays*, **5**, 3, doi: 10.3390/microarrays5010003.
38. Polito, L., Bortolotti, M., Battelli, M., Calafato, G., and Bolognesi, A. (2019) Ricin: an ancient story for a timeless plant toxin, *Toxins*, **11**, 324, doi: 10.3390/toxins11060324.
39. Janssen, L. M. A., Heron, M., Murk, J.-L., Leenders, A. C. A. P., Rijkers, G. T., et al. (2021) The clinical relevance of IgM and IgA anti-pneumococcal polysaccharide ELISA assays in patients with suspected antibody deficiency, *Clin. Exp. Immunol.*, **205**, 213-221, doi: 10.1111/cei.13605.
40. Campanero-Rhodes, M. A., Palma, A. S., Menéndez, M., and Solís, D. (2020) Microarray strategies for exploring bacterial surface glycans and their interactions with glycan-binding proteins, *Front. Microbiol.*, **10**, 2909, doi: 10.3389/fmicb.2019.02909.
41. Khasbiullina, N. R., Shilova, N. V., Navakouski, M. J., Nokel, A. Y., Blixt, O., et al. (2019) The repertoire of human antiglycan antibodies and its dynamics in the first year of life, *Biochemistry (Moscow)*, **84**, 608-616, doi: 10.1134/S0006297919060038.
42. Yamada, H., Kiyohara, H., and Matsumoto, T. (2003) In *Advances in Pectin and Pectinase Research* (Voragen, F., Schols, H., Visser, R., eds) Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 481-490.
43. Paulsen, B. S., and Barsett, H. (2005) In *Polysaccharides I* (Heinze, T., eds) Springer Berlin, Heidelberg, pp. 69-101.
44. Kiyohara, H., Matsumoto, T., Nagai, T., Kim, S.-J., and Yamada, H. (2006) The presence of natural human antibodies reactive against pharmacologically active pectic polysaccharides from herbal medicines, *Phytomedicine*, **13**, 494-500, doi: 10.1016/j.phymed.2005.09.004.
45. Washio, K., Nakamura, M., Sato, N., Hori, M., Matsubara, K., et al. (2022) Anaphylaxis in a pectin- and cashew nut-allergic child caused by a citrus bath, *Allergol. Int.*, **71**, 155-157, doi: 10.1016/j.alit.2021.07.006.
46. Capucilli, P., Kennedy, K., Kazatsky, A. M., Cianferoni, A., and Spergel, J. M. (2019) Fruit for thought: anaphylaxis to fruit pectin in foods, *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.*, **7**, 719-720, doi: 10.1016/j.jaip.2018.11.047.

PLANT POLYSACCHARIDE ARRAY FOR STUDYING OF CARBOHYDRATE-BINDING PROTEINS

A. V. Nikiforova^{1*}, V. V. Golovchenko², P. V. Mikshina³, O. A. Patova²,
T. A. Gorshkova³, N. V. Bovin¹, and N. V. Shilova¹

¹ *Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
117997 Moscow, Russia; e-mail: nikiforovaalica@gmail.com*

² *Institute of Physiology, Komi Science Center, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences,
167982 Syktyvkar, Russia*

³ *Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics,
Federal Research Center Kazan Scientific Center of Russian Academy of Sciences,
420111 Kazan, Russia*

The specificity of the most plant carbohydrate-binding proteins has either not been studied or characterized to a limited extent, many of which are known only through bioinformatic analysis of the genome. The task of deciphering the carbohydrate specificity of proteins can be solved by glycoarrays composed of many tens or even hundreds of glycans deposited on a surface the size of an microscope glass. Plant polysaccharides are the most natural ligands for studying plant proteins; the present work shows that plant polysaccharides without additional modification are immobilized on the surface, the carboxyl groups of which are activated with N-hydroxysuccinimide. As a result, an array was constructed consisting of 113 well-characterized polysaccharides isolated from the cell walls of various plants, 23 mono- and oligosaccharides – components of the studied polysaccharides, as well as glycans – ligands of widely known plant lectins. Upon chemical immobilization of polysaccharides, their functional activity was preserved, which follows from the results of interaction with antibodies and the plant lectin ricin. Using the proposed array, a previously unknown ability of ricin to bind polysaccharides was found, which significantly expands the idea of its specificity, and it was also found that antibodies to plant polysaccharides are present in human peripheral blood.

Keywords: carbohydrate-binding proteins, plant lectins, plant polysaccharides, pectins, polysaccharide chip, glycoarray, INRA-RU2, anti-glycan human antibodies