

УДК 577.124

ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МЕЖДУ РЕГУЛИРУЮЩИМ АДГЕЗИЮ/РОСТ ГАЛЕКТИНОМ-1 ЧЕЛОВЕКА И ЛИПИДНЫМ МОНОСЛОЕМ DPPE : GM1 НА ГРАНИЦЕ ФАЗ ВОЗДУХ/ВОДА С ПОМОЩЬЮ РЕНТГЕНОВСКОГО ОТРАЖЕНИЯ И ДИФРАКЦИИ ПОД СКОЛЬЗЯЩИМИ УГЛАМИ

© 2015 Я. Мажевски¹, С. Андрэ², Э. Джонс³,
Э. Чи³, Х.-Ж. Габюс^{2*}

¹ Центр нейтронного рассеивания им. Мануэля Лихуан (мл.),
Лос-Аламосский центр по изучению физики нейтронов,
Лос-Аламосская национальная лаборатория, Лос Аламос,
Нью-Мексико, США

² Университет Людвиг-Максимилиана, Институт физиологической химии,
факультет ветеринарной медицины, Мюнхен, Ветеринарштрассе, 13,
80539, Германия; электронная почта: gabius@tiph.vetmed.uni-muenchen.de,
gabius@lectins.de

³ Университет Нью-Мексико, Отдел химической и биологической инженерии,
Центр биомедицинской инженерии, Альбукерке, Нью-Мексико, США

Поступила в редакцию 26.10.14

После доработки 14.04.15

Специфическое взаимодействие ганглиозида GM1 с гомодимерным галектином-1 (лектин прото-типа) инициирует регуляцию роста в опухолях и активированных эффекторных Т-клетках. Эта доказанная биорелевантность привела к росту интереса к изучению ассоциации лектинов (в биоэффективной концентрации) с модельной поверхностью, а именно монослоем, построенным из 1,2-дигексадеканойл-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламина и ганглиозида GM1 (80 : 20 мол. %). При достижении давления 20 мН/м было зафиксировано поверхностное расширение, вызванное встраиванием лектина. Временное снижение доли упорядоченной фазы липида в монослое было выявлено с помощью сочетания методов дифракции под скользящими углами и рентгеновского отражения. Экспериментальные значения распределения электронной плотности указывают на то, что галектин-1 ориентирован своей длинной осью вдоль поверхности, что идеально подходит для *cis*-сшивки. Полученные данные выявили принципиальное отличие от того, как связывается с тем же монослоем другой GM1-специфический лектин – пентамер холерного токсина. Полученные данные говорят о необходимости изучения в тех же экспериментальных условиях других членов семейства галектинов, в частности галектина-3 «химерного» типа, который является биологическим антагонистом галектина-1.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: агглютинин, пики Брэгга, ганглиозид, лектин, рентгеновская дифракция/отражение.

Ганглиозиды, компоненты клеточных мембран, привлекают все больше внимания благодаря их многочисленным функциям, в частности в качестве партнеров лектинов, таких как пентамер холерного токсина (Ctx) [1–4]. Недавно было установлено, что ганглиозид GM1, противорецептор Ctx, является физиологической мишенью для регулирующих адгезию

Принятые сокращения: Ctx – пентамер холерного токсина, Gal – галектин, DPPE – 1,2-дигексадеканойл-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламин, GIXD – рентгеновская дифракция под скользящими углами, XR – рентгеновское отражение, LC-фаза – липидная конденсированная фаза, PSD – позиционно-чувствительный детектор.

* Адресат для корреспонденции.

и рост галектинов человека – семейства белков, для которых характерны β-сэндвич-складка и сигнатурная последовательность с центральным остатком триптофана, контактирующего с лигандом [5–8]. Пентасахарид GM1 имеет разветвленную структуру (рис. 1, б). Галектины связывают обе ветви, причем не тот конформер гликана, который взаимодействует с Ctx [9, 10]. Для количественной оценки стабильности комплексов с гликанами использовалась атомно-силовая микроскопия. Кинетика диссоциации под влиянием комплексов прото-типа (гомодимерного) галектина-1 (Gal-1) и типичных лигандов (лактоза, асиалофетuin) согласуется с транзитным *trans*-мостиковым взаимодействием и

цис-сшивкой [11]. Функционально Gal-1 осуществляет контроль роста через связывание GM1 на клетках нейробластомы человека (SK-N-MC) и активированных эффекторных Т-клетках *in vitro* [12–16]. В обоих случаях GM1 становится доступным в результате ферментативного действия сиалидазы на его предшественника GD1a. На примере бактериальных AB₅ токсинов и их проникновения в клетки [17, 18] было показано, что связывание с ганглиозидом также участвует в быстрой интернализации Gal-1, наб-

людаемой в Т-лейкозных клетках Jurkat [19]. Любопытно, что бактериальные лектины, специфичные к пентамерному GM1, по всей видимости, также способны облегчать течение аутоиммунных расстройств у модельных животных [20–22]. Однако способность мембраны реагировать на Stx и лектины человека не обязательно опосредована таким же механизмом постсвязывания: регуляторами роста для клеток нейробластомы являются только лектины человека [23]. Это функциональное различие позволяет предположить различия и в топологических свойствах комплекса, что навело нас на мысль о необходимости изучения связывания галектинов в биоэффективной концентрации с GM1-содержащими модельными поверхностями.

Помимо влияния на пролиферацию, а также клеточное поглощение и маршрутизацию изучение связи Gal-1 с поверхностью трипсинизированных эритроцитов выявило изменения в текучести мембран и их осмотической устойчивости [24]. Этот эффект может зависеть от изменений в четвертичной структуре Gal-1 при попадании в гидрофобную среду. Показано, что в апротонных растворителях (например, диметилсульфоксиде) лектин образует димеры из двух гомодимеров цилиндрической формы [25]. В совокупности эти доказательства навели нас на мысль начать наше исследование с изучения возможности встраивания этого сильного эффектора в липидный монослой.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалы. 1,2-Дигексадеcanoил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламин (DPPE) и ганглиозид GM1 (из овечьего мозга, аммонийная соль, порошок) были куплены у компании «Avanti Polar Lipids» (США) и использованы без дальнейшей очистки (структуры приведены на рис. 1). Стоковые растворы каждого из (глико)сфинголипидов (~5 мг/мл) были сначала приготовлены в хлороформе, содержащем 9% об. метанола и 1% об. воды. Затем был приготовлен раствор для образования липидного монослоя (0,3 мг/мл), содержащий 80% мол. DPPE и 20% мол. GM1 (8 : 2 DPPE : GM1), который до использования хранили при –20° в стеклянных пробирках. Рекombинантный Gal-1 человека был очищен аффинной хроматографией (ключевая стадия), и его чистота и биологическая активность контролировались с помощью двумерного гель-электрофореза, масс-спектрометрии, гемагглютинации и тестов на замедление роста [12, 26–28].

Тест встраивания в липидный монослой при постоянном давлении. Эксперименты по опреде-

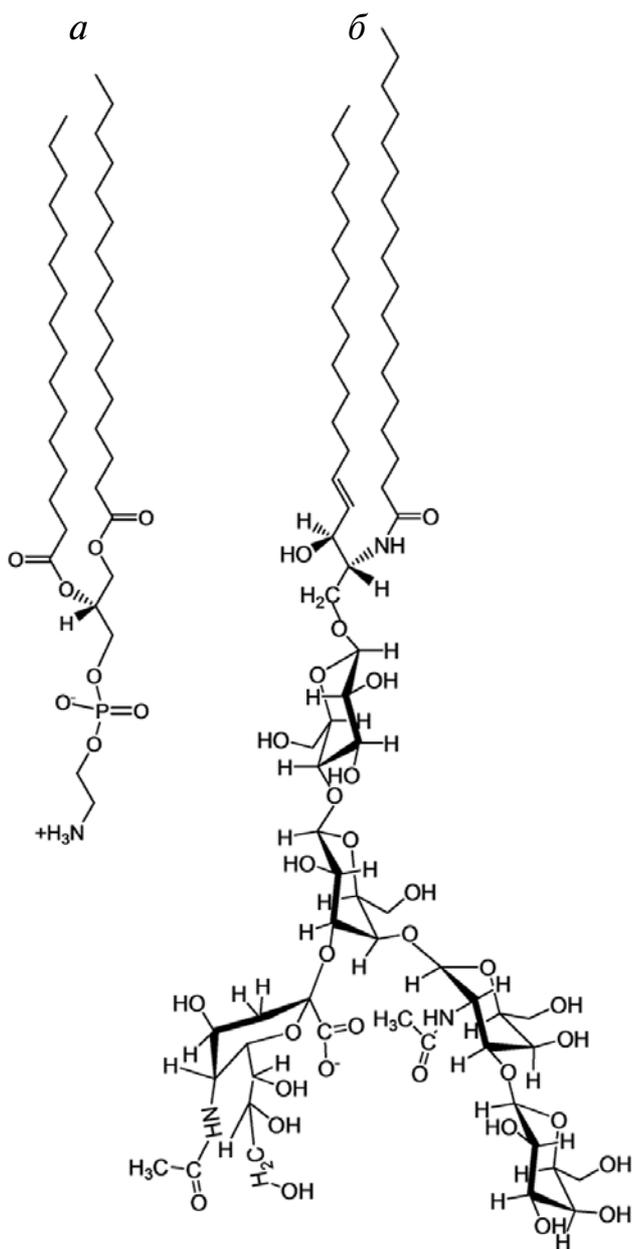


Рис. 1. Структуры (глико)сфинголипидов DPPE (а) и GM1 (б), компонентов липидной пленки

лению встраивания белка в монослой на границе фаз воздух/буфер при постоянном поверхностном давлении проводили в ленгмюровской ванне станции BW1 (ондулятор) в пучке синхротронного излучения из синхротрона «HASYLAB» (Германия), как описано ранее [29]. Схема экспериментальной установки для измерения встраивания белка при постоянном давлении и ход эксперимента приведены на рис. 2. Термостатируемая ванна при специальном дифрактометре для жидких поверхностей была оборудована пластиной Вильгельми, которая измеряет поверхностное давление на границе воздух/буфер, и подвижной гидрофобной тefлоновой загородкой, которая контролирует площадь поверхности ванны. Перед началом эксперимента ванну заполняли ~240 мл субфазового буфера (20 нМ фосфатно-солевого буфера (PBS), pH 7,2, содержащего 6,2 мМ Na_2HPO_4 , 4 мМ KH_2PO_4 , 154 мМ NaCl и 1% NaN_3) при 20°. Затем по границе воздух/буфер распределяли раствор смеси липидов (8 : 2 DPPE : GM1, 90 : 9 : 1 хлороформ : метанол : вода). Систему оставляли уравниваться на 15 мин для обеспечения полного упаривания органического растворителя, после чего липидный монослой сжимали до поверхностного давления 20 мН/м и с помощью петли обратной связи удерживали данное давление на постоянном уровне на протяжении оставшейся части эксперимента (рис. 2, а). Затем были получены данные рентгеновского рассеяния для липидной пленки при 20 мН/м и 20° (подробное описание эксперимента приведено ниже). Определив таким образом контрольное значение, проводили эксперименты в присутствии Gal-1. Аликвоту раствора, содержащего Gal-1 (5 мг, PBS), инжигировали в субфазовый буфер в ванне и оставляли уравниваться с липидным монослоем (рис. 2, б). Концентрация галектина в субфазе в ванной составляла ~21 мкг/мл. Поскольку поверхностное давление липидного монослоя удерживалось на одном уровне, встраивание Gal-1 в липидный монослой должно приводить к расширению площади поверхности (рис. 2, в). Таким образом, измеримое расширение поверхности монослоя считается показателем продуктивного взаимодействия галектин-мембрана. Данные рентгеновского рассеяния были получены через 5 (t_1) и 13 (t_2) ч после введения Gal-1-содержащего раствора.

Измерения рентгеновского рассеяния. Для установления структуры пленки липидного монослоя, содержащего Gal-1, на молекулярном уровне были дополнительно получены данные рентгеновской дифракции под скользящими углами (GIXD) и рентгеновского отражения (XR) до (только липидная мембрана) и в два момента

времени после (t_1 и t_2) добавления раствора Gal-1 под липидный монослой. Рентгеновский пучок, направленный на образец, имел длину волны $\lambda = 1,30 \pm 0,02 \text{ \AA}$ (9510 эВ) и мощность ~0,3 мВт. Для уменьшения фонового рассеяния и минимизации окисления белок-липидной пленки рентгеновским пучком ванну-контейнер предварительно продували гелием в течение 30–40 мин.

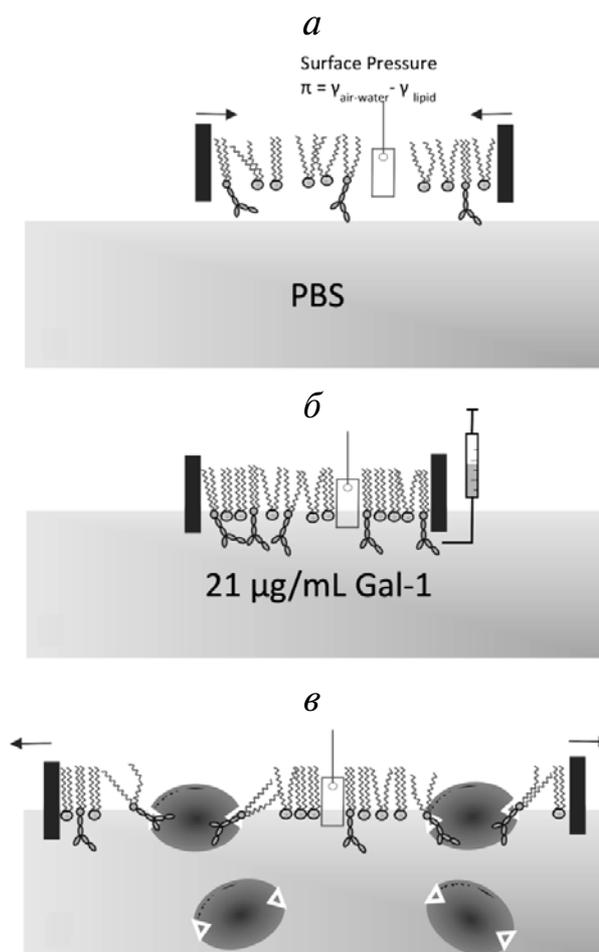


Рис. 2. а – Компрессия липидного монослоя до 20 мН/м. Для измерения поверхностного давления липидного монослоя использовалась пластина Вильгельми (π), которая связана с поверхностным натяжением пленки (γ) на границе воздух/вода; б – введение Gal-1 в субфазу. Белок вводили в субфазу под барьер, используя L-образную иглу шприца для минимизации нарушения липидного монослоя. Выбранная концентрация Gal-1 известна как биоэффективная в *in vitro* тестах GM1-зависимого роста клеток; в – расширение липидного монослоя в результате встраивания Gal-1. Гомодимерный лектин и его два сайта связывания изображены в масштабе и реальной форме, исходя из предположения о том, что оба сайта связаны с лигандами. Площадь поверхности монослоя и увеличение площади были рассчитаны как $\Delta A/A = (A - A_0)/A_0$, где A – площадь поверхности в момент времени t , а A_0 – площадь поверхности монослоя после первоначальной компрессии до 20 мН/м

В качестве дополнительной меры защиты от повреждения радиацией ванну сдвигали на 0,025 мм по горизонтали после каждого скана GIXD и на 2 мм во время XR-сканирования.

Данные GIXD предоставляют структурную информацию о кристаллическом фрагменте пленки в плоскости монослоя. Как правило, липидная конденсированная фаза (LC) в ленточных конденсированных фазах может быть описана с помощью двумерных мощностей с двумерными кристаллитами, которые азимутально и случайно ориентированы на поверхности субфазы. Обратное пространство GIXD рисунка кристаллитовой части монослоя возникает из двумерного набора стержней Брэгга, которые расположены параллельно вертикальному компоненту q_z вектора рассеивания q [30, 31]. Для максимизации поверхностной чувствительности GIXD измерений монохроматический рентгеновский луч был настроен так, чтобы падать на поверхность под углом скольжения $0,11^\circ$, что составляет 85% критического угла для полного внешнего отражения [32]. Размеры проекции зоны падения входящего рентгеновского луча на поверхность жидкости составляли $\sim 2 \times 50$ мм². Интенсивность дифракции измеряли с помощью одномерного позиционно-чувствительного детектора (PSD, OEM-100-M; «Braun», Германия) как функцию вертикального угла рассеивания с измерительным окном $q_z \approx 0,9 \text{ \AA}^{-1}$. Перед PSD был закреплен коллиматор Соллера, который обеспечивал горизонтальное разрешение детектора $\Delta q_{xy} = 0,0084 \text{ \AA}^{-1}$. Интенсивность рассеивания измеряли путем сканирования по диапазону горизонтального компонента вектора рассеивания:

$$q_{xy} \approx \frac{4\pi}{\lambda} \sin\left(\frac{2\theta_{xy}}{2}\right),$$

где $2\theta_{xy}$ — угол между падающим и отраженным лучом, спроецированный на горизонтальную плоскость, а λ — длина волны рентгеновского луча. Такой скан, проинтегрированный по всему окну PSD, дает пики Брэгга. Одновременно с этим интенсивность рассеивания, записанная в каналах вместе с PSD, но интегрированная по вектору рассеивания в горизонтальной плоскости поперек пиков Брэгга, дает q_z -разрешенные сканы, называемые профилем стержней Брэгга. Для получения информации о направлении и степени наклона молекул в кристаллической части амфифильной пленки распределение интенсивности по стержням Брэгга может анализироваться как модель конформации, ориентации и упаковки молекул. В данном исследовании липидные остатки моделировались цилинд-

рами с постоянным распределением электронной плотности. В этих условиях настраиваемыми параметрами являлись угол наклона цилиндра по отношению к вертикали, направление бокового наклона, длина (L_c) цилиндра (т.е. длина части молекулы с когерентным рассеянием) и вертикальное среднее квадратичное смещение σ_z (фактор Дебая–Валлера) в кристаллитах. Анализ пиков Брэгга позволяет вычислить межатомное расстояние и длину когерентности (т.е. средний размер) двумерных кристаллитов в пленке на границе воздух/буфер.

В то время как данные GIXD позволяют получить структурную информацию о части кристаллита, расположенной в плоскости пленки, данные XR дают информацию о поперечной (вертикальной) структуре монослоя с боковым усреднением как по кристаллической, так и по аморфной частям [33, 34]. Для измерения XR использовали дополнительную щель для исключения фона диффузионного рассеивания вокруг отраженного луча. Эта щель вместе со сцинтилляционным детектором, имеющим тонкое вертикальное измерительное окно ($\Delta q_z \approx 0,02 \text{ \AA}^{-1}$), устанавливались на лифт, присоединенный к «руке» дифрактометра, которая вращалась вокруг вертикальной оси, проходящей через центр образца. Подробная информация о вариациях электронной плотности в вертикальном направлении с боковым усреднением как по упорядоченной, так и по неупорядоченной частям пленки может быть рассчитана на основе отклонения экспериментального зеркального XR от закона Френеля [30, 31].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Встраивание Gal-1 в монослой DPPE : GM1. В тесте на встраивание в липидный монослой была измерена площадь поверхности монослоя и определено ее изменение; процент расширения ($\% \Delta A/A$) рассчитан с помощью уравнения:

$$\% \Delta A/A = 100(A - A_i)/A_i,$$

где A_i — первоначальная (исходная) площадь поверхности монослоя в ванне при 20 мН/м и 20° до введения Gal-1-содержащего раствора, а A — площадь ванны во время t после нанесения белка (рис. 2). Изотерма и данные по встраиванию приведены на рис. 3. Данные показывают встраивание лектина в липидный монослой в концентрации, соответствующей концентрации регуляции GM1-зависимого роста клеток [12, 13] (см. рис. 2, в).

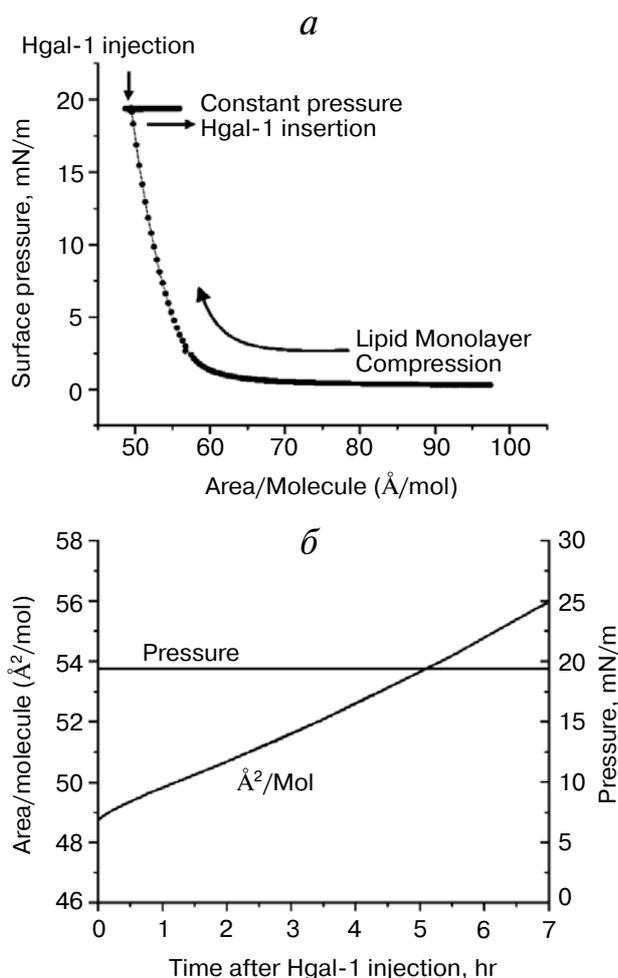


Рис. 3. Изотерма (а) и встраивание (б) Gal-1 в монослой DPPC : GM1, выдерживаемый при 20 мН/м и 20°

Как показано на рис. 3, б, Gal-1 встраивается в монослой сразу же после начала эксперимента и инъекции белоксодержащего раствора в буфер субфазы, что стабильно продолжается на протяжении 7 ч. Показанная площадь на молекулу отражает среднюю площадь на каждую молекулу липида с учетом как упорядоченной (LC), так и неупорядоченной (расширенной липидом) фазы. Примечательно, что «эквивалентное бислое поверхностное давление», т.е. давление, при котором плотность упаковки монослоя аналогична таковой в липидном бислое, по опубликованным данным находится в диапазоне 30–33 мН/м [35]. Поэтому первым тестом при постоянном поверхностном давлении был тест при давлении 30–33 мН/м. Поскольку до сих пор не было обнаружено встраивания лектина в липидный монослой при таком давлении, поверхностное давление было снижено до 20 мН/м.

Структура пленки Gal-1—монослой на границе воздух/буфер. Структуры липидной пленки на плоскости и перпендикулярно ей и расположение лектина на границе фаз липид—пленка были установлены путем совмещения данных, полученных методами GIXD и XR. Сначала была построена контурная диаграмма по данным GIXD для монослоя, разрешенная по q_{xy} и q_z (рис. 4). Для монослоя после введения лектина была получена очень похожая по форме диаграмма, однако абсолютная интенсивность двух диаграмм отличалась (данные не приведены). Проекция данных GIXD на q_{xy} и ось q_z позволила идентифицировать пики Брэгга и стержни Брэгга соответственно, которые приведены на рис. 5 для трех временных точек. Контрольное измерение без добавления лектина (а) было затем дополнено данными, полученными через 5 и 13 ч по достижении ~14% (t_1) и 20% (t_2) расширения площади липидного монослоя. Скорость расширения поверхности из-за встраивания лектина составляла ~2% в час. Через 13 ч встраивание Gal-1 не достигло равновесного состояния, т.к. не наблюдалось выхода на плато для зависимости площадь/молекула по времени.

Рисунок дифракции, полученный для монослоя DPPC : GM1 при 20 мН/м и 20° до и после нанесения Gal-1, позволяет рассчитать набор структурных параметров, которые приведены в табл. 1 и 2.

Для каждой из измеренных систем наблюдалось три пика Брэгга: при $q_{xy} \sim 1,42, 1,45$ и $1,48 \text{ \AA}^{-1}$. Присутствие трех пиков Брэгга указывает на координатную двумерную ячейку. Интегральные интенсивности трех пиков Брэгга ($-0,05 \text{ \AA}^{-1} \leq q_z \leq 0,8 \text{ \AA}^{-1}$) были приблизительно одинаковыми (см. пунктирные линии на рис. 5), что согласуется с правилом мультиплетности. Три пика могут быть проиндексированы как $\{1,0\}$, $\{0,1\}$ и $\{1,-1\}$. Расчетные значения межатомного расстояния (d -расстояние = $2\pi/q_{xy}$), т.е. d_{10} , d_{01} и d_{1-1} , для примитивной двумерной элементарной ячейки с размерами векторов $|a|$, $|b|$ и углом γ между ними и площадь на две алкильные цепи приведены в табл. 1.

Если предположить, что монослой состоит из идеальных 2D кристаллитов со средним размером L_{xy} (боковая длина когерентности) с кристаллографической осью $\{h, k\}$ и отсутствием предпочтительной азимутальной ориентации, то для расчета длины когерентности по трем кристаллографическим осям может использоваться формула Шеррера [36] с уравнением $L_{xy} \approx 0,9[2\pi/FWHM_{intrinsic}(q_{xy})]\{h, k\}$. Поскольку полная ширина на полувысоте ($FWHM$) для трех пиков превышает разрешение прибора, равное $FWHM_{resol}(q_{xy}) = 0,0084 \text{ \AA}^{-1}$, реальное значе-

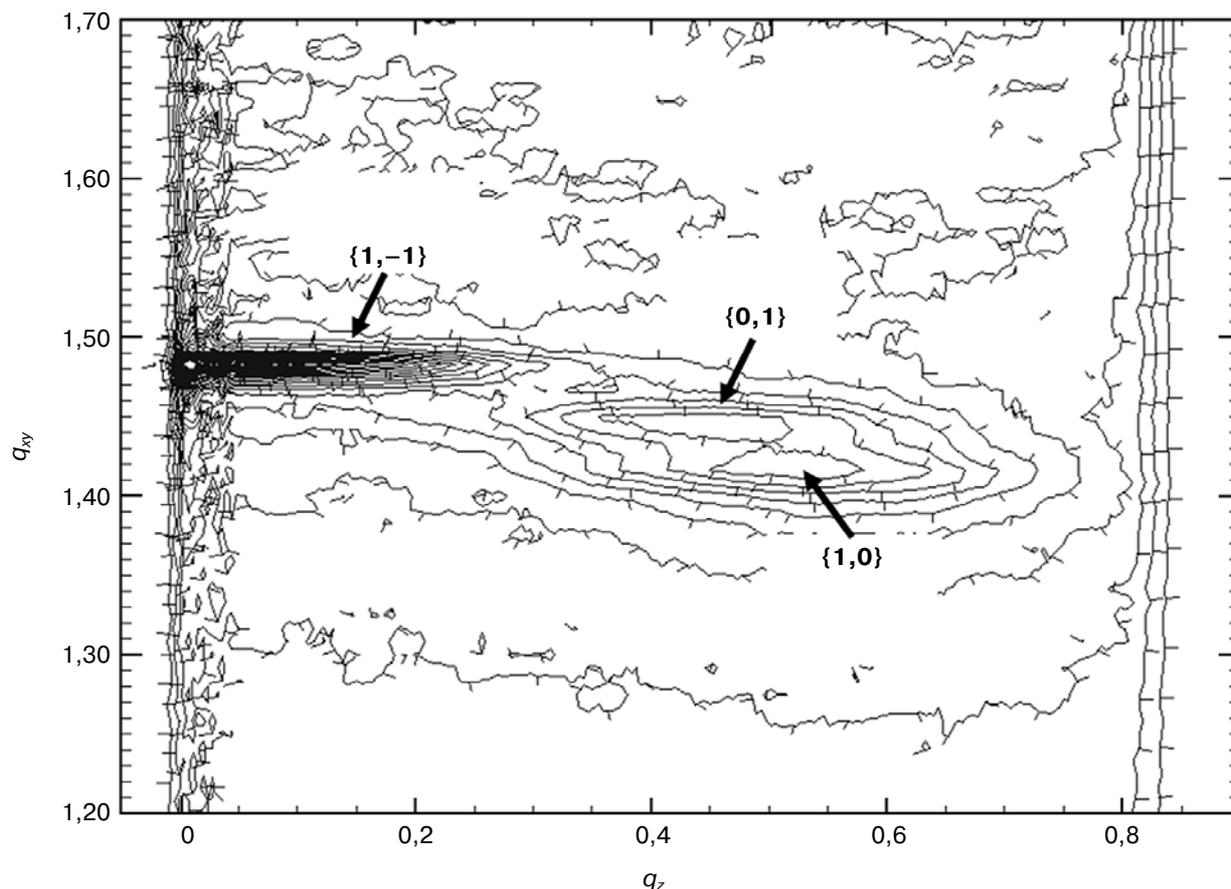


Рис. 4. Контурная диаграмма обратного пространства, $I(q_{xy}, q_z)$, монослоя DPPE : GM1 при 20 мН/м и 20°

ние FWHM может быть рассчитано по формуле $FWHM_{\text{intrinsic}}(q_{xy}) = [FWHM_{\text{meas}}(q_{xy})^2 - FWHM_{\text{resol}} \times (q_{xy})^2]^{1/2}$. На основании этого анализа была оценена боковая длина когерентности для трех пиков L_{10} , L_{01} и L_{1-1} (табл. 2). В качестве сравнения: расстояние в 500 Å вмещает ~100 алкильных цепей или кристаллический домен шириной в 50 липидных единиц.

Комбинированный профиль стержней Брэгга для отражений $\{0,1\}$, $\{1,0\}$ и $\{1,-1\}$, приведенный на рис. 5 a' , b' , v' , был получен путем интегрирования данных рассеивания по области $1,35 \text{ \AA}^{-1} \leq q_{xy} \leq 1,55 \text{ \AA}^{-1}$ для трех пиков. Анализ профиля стержней Брэгга был выполнен путем моделирования алкильных цепей липида как наклоненных цилиндров с постоянной электронной плотностью и длиной L_c [33]. Как показывают данные, приведенные в табл. 1 и проиллюстрированные на рис. 5, рисунки дифракции монослоев DPPE : GM1 и DPPE : GM1 + Gal-1 ($t_2 = 13$ ч) похожи, что говорит о том, что в упорядоченной области они обладают схожей плотностью на одну молекулу липида ($43,5 \text{ \AA}^2$), углом

наклона алкильной цепи ($\sim 21,45 \pm 0,15^\circ$ от перпендикуляра к поверхности) и азимутальным углом ($10,8 \pm 0,3^\circ$ от ближайшего соседа, определенного вектором $a + b$). Однако длина цилиндра с постоянной электронной плотностью, которая использовалась для моделирования распределения интенсивностей вдоль стержней Брэгга, L_c , составляла $18,9 \text{ \AA}$ для монослоя DPPE : GM1 без галектина в сравнении с $17,3 \text{ \AA}$ в момент времени t_2 . Это позволяет предположить, что воздействие Gal-1 на монослой вызывает небольшое ($1,5 \text{ \AA}$) вертикальное смещение липидной упаковки. Кроме того, длина когерентности L_{1-1} увеличилась к моменту времени t_2 с 500 до 760 \AA , что позволяет предположить изменения в упаковке липидных хвостов вдоль этой кристаллографической оси (табл. 2).

Дифракция в системе DPPE : GM1 + Gal-1 в момент времени t_1 (5 ч) отличалась от таковой для описанных ранее образцов чистых липидов (без белка) или полученной через 13 ч после введения лектина. Хотя длина цилиндра L_c была такой же, как и в случае монослоя DPPE : GM1 до

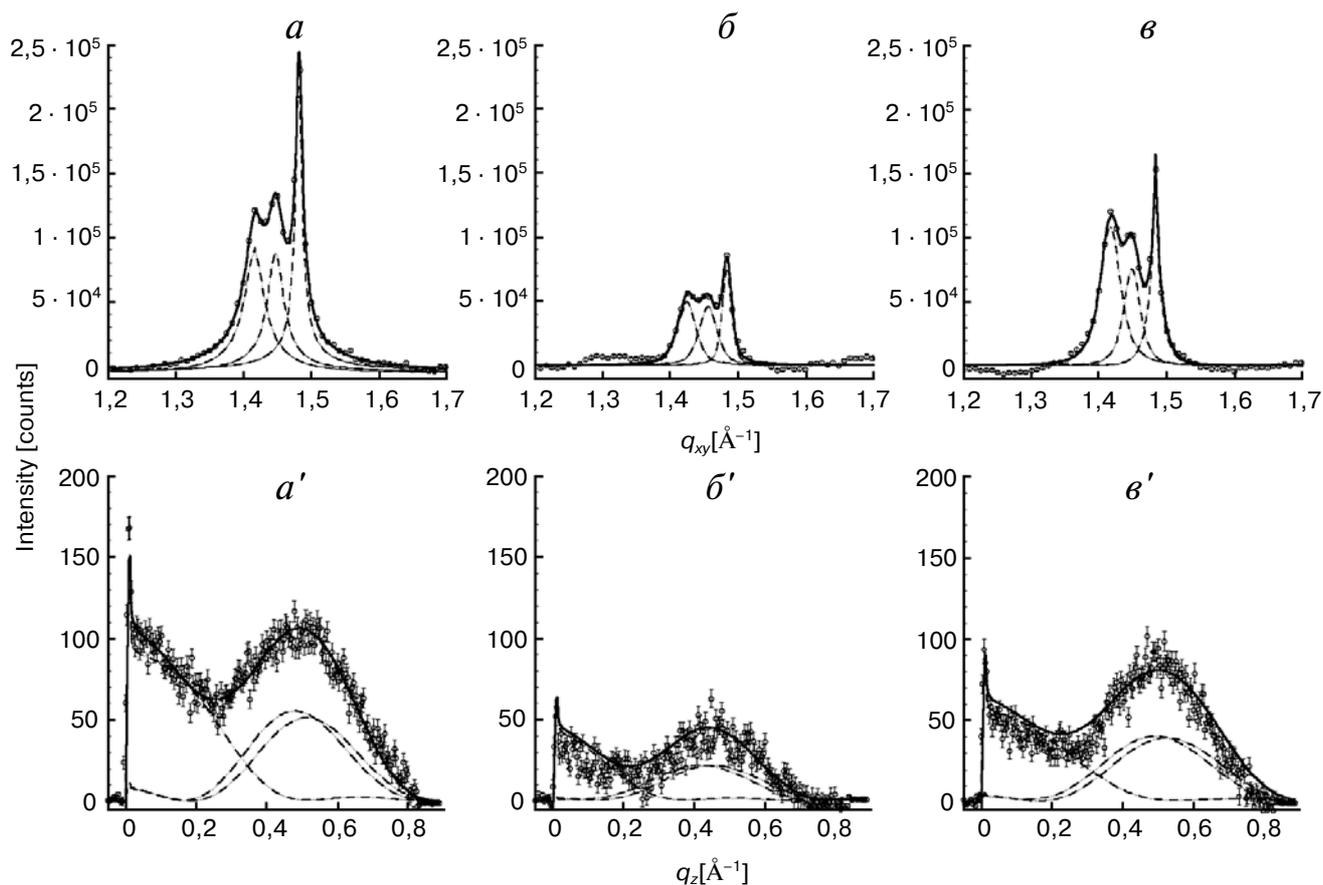


Рис. 5. Интегрированные данные GIXD (пики Брэгга) для пленки липида до нанесения (а), через 5 (б) и 13 ч (в) после нанесения Gal-1. Рисунок дифракции аппроксимирован с использованием суммы трех профилей Войта (сплошная линия), подвергнутых деконволюции в отдельные пики (пунктирные линии), соответствующие каждому из пиков Брэгга $\{1,0\}$, $\{0,1\}$ и $\{1,-1\}$. Пики Брэгга получены интегрированием по области $(-0,05 \text{ \AA}^{-1} \leq q_z \leq 0,8 \text{ \AA}^{-1})$; а', б', в' – сумма трех стержней Брэгга $\{1,0\}$, $\{0,1\}$, $\{1,-1\}$, соответствующая DPPE : GM1, $t_1 = 5$ ч и $t_2 = 13$ ч после введения Gal-1. Пики Брэгга были подогнаны (сплошная линия) путем интегрирования по области $(1,35 \text{ \AA}^{-1} \leq q_{xy} \leq 1,55 \text{ \AA}^{-1})$ и аппроксимации области когерентного рассеяния алкильных хвостов цилиндрами с постоянной электронной плотностью. Каждый отдельный стержень Брэгга показан пунктирной линией

введения Gal-1 ($18,9 \text{ \AA}$), скорее всего, исключая поперечное смещение липида, площадь на одну молекулу снизилась до $43,1 \text{ \AA}^2$, а угол наклона алкильной цепи и азимутальный угол снизились до $19,4$ и $2,6^\circ$ соответственно. Длина когерентности L_{1-1} также понизилась с 500 до 380 \AA , что позволяет предположить снижение фиксации расположения липидных хвостов вдоль этой кристаллографической оси (табл. 2).

В результате внедрения Gal-1 интенсивность пиков дифракции снизилась до $\sim 35\%$ в момент времени t_1 по сравнению с чистым липидом, что указывает на то, что кристаллический порядок расположения липидных остатков был частично нарушен. Любопытно, что это явление, похоже, носило временный характер: в дальнейшем наблюдалось частичное восстановление относительного содержания упорядоченной фазы, пос-

кольку к отметке $t_2 = 13$ ч интегральные интенсивности повысились до 70% . Интересно, что в других системах белок–мембрана, изученных нами к настоящему времени, такого характера измерений этого параметра не наблюдалось. Хотя причины подобного восстановления доли упорядоченной фазы неясны, очевидно, что за первоначальной стадией связывания Gal-1 с фазой LC модельной липидной мембраны последовала стадия реорганизации и/или релаксации системы, которая позволила вновь образовать жидкоконденсированную фазу. Этот процесс может, по крайней мере частично, являться следствием кластеризации и/или *in situ* олигомеризации связанного с мембраной Gal-1. Увеличение доли LC-фазы по мере увеличения времени инкубации может также быть вызвано значительной гетерогенностью, которая возникает в

Таблица 1. Сводные параметры, полученные при анализе данных GIXD

20 мН/м 20°	Элементарная ячейка a, b, γ (Å, Å, град)			Площадь на одну молекулу (Å ²)	Инте- граль- ная ин- тенсив- ность, %	Длина когерент- ности L_c , Å	Угол наклона t , град	Направ- ление наклона от БС, асиммет- рия, град	σ , Å
DPPE : GM1	4,91 ± 0,01	5,01 ± 0,01	117,1 ± 0,4	43,5 ± 0,1	100	18,9 ± 0,5	21,6 ± 1,0	11,1 ± 1,0	0,9 ± 0,2
DPPE : GM1 Gal-1, $t_1 = 5$ ч	4,89 ± 0,01	5,00 ± 0,01	118,0 ± 0,4	43,1 ± 0,1	35	18,9 ± 0,5	19,4 ± 1,0	2,6 ± 2,0	0,94 ± 0,2
DPPE : GM1 Gal-1, $t_2 = 13$ ч	4,90 ± 0,01	5,01 ± 0,01	117,7 ± 0,4	43,5 ± 0,1	70	17,3 ± 0,5	21,3 ± 1,0	10,5 ± 1,0	0,84 ± 0,2

Примечание. L_c – длина фрагмента алкильной цепи с когерентным рассеянием, измеренная вдоль его оси. Угол наклона измерен относительно перпендикуляра к поверхности. Угол наклона измеряется между направлением ближайшего соседа и проекцией алкильной цепи на поверхность субфазы. Ближайший сосед (БС) вдоль $a + b$, где a и b – векторы двумерной клеточной ячейки; σ – вертикальный коэффициент Дебая–Валлера или корень среднеквадратичного молекулярного смещения, перпендикулярного поверхности.

результате того, что липидная фаза и белок распределены в пленке неравномерно. Однако это маловероятно, т.к. мы никогда не наблюдали такого эффекта.

Любопытно, что в области низких q_{xy} (0,05–1,0 Å⁻¹, 120 Å > d -расстояние > 6 Å) не наблюдалось сигналов дифракции, соответствующих увеличению межатомного расстояния в полученном спектре (данные не приведены). Таким образом, можно заключить, что ни Gal-1, ни пентасахаридная голова GM1 не образуют регулярных массивов достаточного размера для обнаружения методом GIXD.

В то время как данные GIXD позволяют измерить кристаллическую часть углеводородных цепей в проекции рентгеновского луча, XR позволяет получить усредненную структурную информацию как о 2D кристалле, так и об аморфной части монослоя вдоль оси, перпендикулярной липидной пленке. Данные отражения были проанализированы оптическим матричным методом (StochFit) [37], основанным на предположении, что смешанные монослои образуют тонкие гомогенные пленки. Это предположение было обоснованным, т.к. предыдущие исследования методами измерения угла Брюстера и флуоресцентной микроскопии показали, что компоненты скорее смешиваются, чем разделяются по фазам [38–41]. После выполнения процедуры StochFit [37] распределение электронной плотности вдоль перпендикуляра к поверхности субфазы, нормализованное по таковому для воды, было аппроксимировано большим количеством плиток, каждая из которых имела постоянную электронную плотность, и которые

были взаимосвязаны интегралом вероятности ошибок. В этой не зависящей от модели процедуре аппроксимации электронная плотность каждой плитки варьировалась с целью оптимизации математической конструкции для получения гладкой функции распределения электронной плотности, которая наилучшим образом (самые низкие значения χ^2) описывала бы экспериментальные данные XR. Для адекватного моделирования профилей XR, полученных в данном исследовании, было достаточно 12 плиток. В верхнем ряду на рис. 6 приведены данные XR (круги) вместе с наилучшим результатом аппроксимации (сплошные и пунктирные черные линии), основанной на распределении электрон-

Таблица 2. Длина когерентности в плоскости по данным GIXD

20 мН/м, 20°	Пики Брэгга в плоскости. Длина когерентности, L_{xy} (Å) ± 10 Å		
	L_{01}	L_{10}	L_{1-1}
DPPE : GM1	160	190	500
DPPE : GM1 + Gal-1, $t_1 = 5$ ч	180	180	380
DPPE : GM1 + Gal-1, $t_2 = 13$ ч	160	200	760

Примечание. L_{xy} представляет собой длину когерентности в плоскости, средний размер двумерного «кристаллического» островка.

ной плотности, показанной в нижней части рисунка сплошными серыми линиями.

Как показано на рис. 6, включение лектина приводит к существенным изменениям в профиле отражения липидного монослоя (рис. 6, *a–в*). Неудивительно, что профиль электронной плотности для независимой от модели аппроксимации данных XR также претерпевает существенные изменения при включении лектина (сплошные серые профили на рис. 6, *a' б' и в'*). Для более глубокого понимания физической природы структурных изменений в монослое DPPE : GM1 при контакте с Gal-1 профили электронной плотности, полученные в результате использования независимой от модели процедуры StochFit, были подвергнуты деконволюции в три ящика (или плитки) с постоянной электронной плотностью (пунктирное ступенчатое распределение электронной плотности, показанное в нижнем ряду рис. 6). Этот подход

является модель-зависимой аппроксимацией данных XR. Применение к ступенчатому модель-зависимому профилю смазывания (smearing) приводит к получению распределения электронной плотности (сплошные черные линии в нижнем ряду), практически неотличимого от оригинального распределения в аппроксимации, не зависящей от модели (сплошные серые линии). Новые профили электронной плотности могут быть использованы для расчета XR (пунктирные линии, верхний ряд). Эти новые профили, основанные только на трех плитках, отличаются от таковых, полученных для независимой от модели аппроксимации, только высоким вектором передачи импульса q_z . Такие простые, но физически обоснованные модели позволяют лучше понять эволюцию системы и дают возможность приблизительно оценить пространственные параметры Gal-1 на границе фаз. Как показано на рис. 6, *a'* и в соответствии с ранее

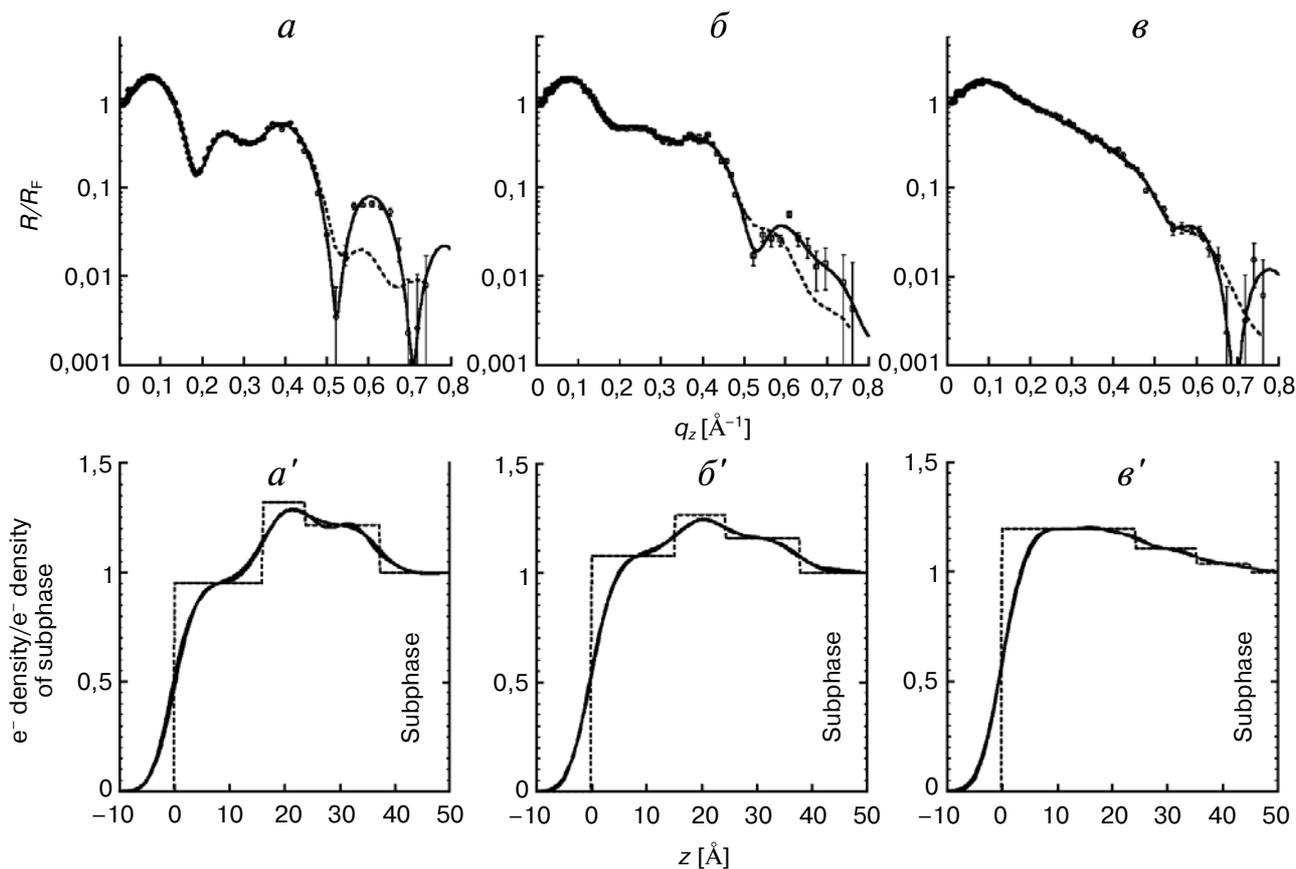


Рис. 6. Рентгеновское отражение, нормализованное по Френелю (верхний ряд), и нормализованное распределение электронной плотности (нижний ряд) липидной пленки DPPE : GM1 до (*a* и *a'*) и спустя $t_1 = 5$ ч (*б*, *б'*) и $t_2 = 13$ ч (*в*, *в'*) после введения Gal-1. Экспериментальные данные представлены символами, а линии (сплошные и пунктирные) относятся к соответствующим подобранным профилям электронной плотности, показанным на *a'*, *б'* и *в'*. Электронные плотности $\rho(z)$ нормализованы по электронной плотности буферной субфазы ($c_{\text{субфаза}} = 0,335 \text{ e}^-/\text{\AA}^{-3}$). Границы диапазона для данных по отражению соответствуют статистической погрешности этих измерений

опубликованными исследованиями [38–41], смешанный монослой DPPE : GM1 может быть адекватно смоделирован тремя плитками: одной для области головы GM1 и воды, одной для области смешивания DPPE и головы GM1 и третьей для ацильных цепей обоих (глико)сфинголипидов. Было показано, что одна и та же схема плиток является адекватной моделью XR-данных в оба момента времени после введения Gal-1 в субфазу (рис. 6, b' и b'').

Непосредственный анализ профилей отражения, приведенных на рис. 6, позволяет качественно оценить то, что в присутствии в субфазе лектина границы XR-интерференции становятся более размытыми. Это указывает на увеличение неупорядоченности (вдоль перпендикуляра к поверхности) в ранее идеально выровненном монослое DPPE : GM1, которое возникает в результате присутствия лектина. Профили электронной плотности мембраны до и после встраивания лектина наложены друг на друга и приведены на рис. 7, a для прямого сравнения. Очевидно, что контакт с молекулой Gal-1 приводит к заметным изменениям в распределении электронной плотности через границу вода/жидкость. Три первоначальных отдельных плитки, состоящих из углеводородных цепей/DPE : GM1 голов/GM1 голов, становятся менее четко стратифицированными, и около границы с воздухом после добавления Gal-1 находится больше электронов. Увеличение продолжительности инкубации и, таким образом, степени внедрения Gal-1 привело к монотонному увеличению электронной плотности в липидной области (от 0 до 20 Å по границе фаз) и ее снижению в области головы (от ~20 до 40 Å в сторону жидкой субфазы). Эти изменения становятся еще более явными, если рассчитать разницу между профилями электронной плотности в моменты времени t_1 и t_2 и таковую для чистого липида и нанести ее на график (рис. 7, b).

Интегрирование площади под ступенчатым профилем (пунктирные линии на рис. 6, a' , b' , b'') дает информацию об общем числе электронов на Å² в области проекции рентгеновского луча. Несмотря на увеличение площади на одну молекулу (рис. 3, b) и, соответственно, снижение числа единиц DPPE : GM1, число электронов увеличивается с 14,0 e⁻/Å² для DPPE : GM1 до 14,5 и 17,2 e⁻/Å² в моменты времени $t_1 = 5$ ч и $t_2 = 13$ ч соответственно. Эти изменения соответствуют 4- и 23%-ному увеличению числа электронов. Такое усиление может быть объяснено только присутствием лектина в липидном монослое. При введении поправки на 14- и 20%-ное увеличение площади на одну молекулу из-за встраивания лектина увеличение электронной

плотности в моменты времени t_1 и t_2 составляет 19 и 48% соответственно. Таким образом, на заключительных стадиях измерения ($t = 13$ ч) ~50%-ное увеличение электронной плотности может быть объяснено присутствием Gal-1 в монослое.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В работе представлены данные рентгеновского рассеяния для монослоев DPPE : GM1 на границе воздух/буфер до и после добавления многофункционального лектина человека, который участвует в модулировании клеточной активности, включая профили экспрессии генов [16, 42, 43]. Мы изучили монослой DPPE : GM1 (80 : 20 мол. %) до и после добавления Gal-1-содержащего раствора в субфазу при постоянном поверхностном давлении 20 мН/м и температуре 20° (итоговая концентрация 21 мкг/мл). Как и в ранее опубликованных данных [43], в таких смесях не обнаружено разделения фаз компонентов DPPE и GM1 или образования боковых доменов. Данные GIXD указывают, что встраивание лектина в липидный монослой влияет на LC-фазу монослоя и делает это очень своеобразным образом. При контакте с Gal-1 упаковка алкильных цепей в фазе LC изменяется незначительно. Со временем, после 5 ч инкубации, доля LC-фазы снижается до 35% оригинальной величины, но затем увеличивается до 70% по результатам измерений, сделанных через 13 ч инкубации (табл. 1). Размеры косоугольной двумерной ячейки, а также размер кристаллического домена в монослое DPPE : GM1 до введения лектина и в момент времени $t_2 = 13$ ч после введения Gal-1 в резервуар с буфером оставались приблизительно одинаковыми. Примечательно, что в промежуточный момент времени $t_1 = 5$ ч изменения в упаковке алкильных цепей (и общей интенсивности рассеяния) были очевидными. На первоначальной стадии могло иметь место сильное межмолекулярное взаимодействие, после которого молекулы Gal-1 могли олигомеризоваться, стать более растворимыми и покинуть фазу геля или же поменять свое расположение относительно упорядоченных липидов, приводя к восстановлению упаковки алкильных цепей. Изменения в рисунке GIXD указывают на то, что молекулы Gal-1 имеют тенденцию взаимодействовать с упорядоченной фазой монослоя. Среднее расстояние между головами липида в фазе LC составляет ~10 Å (что в 2 раза выше, чем размеры 2D ячейки, табл. 1), а среднее расстояние между головами GM1 в смеси 80 : 20 DPPE : GM1 составляет ~30 Å. Таким образом, ожида-

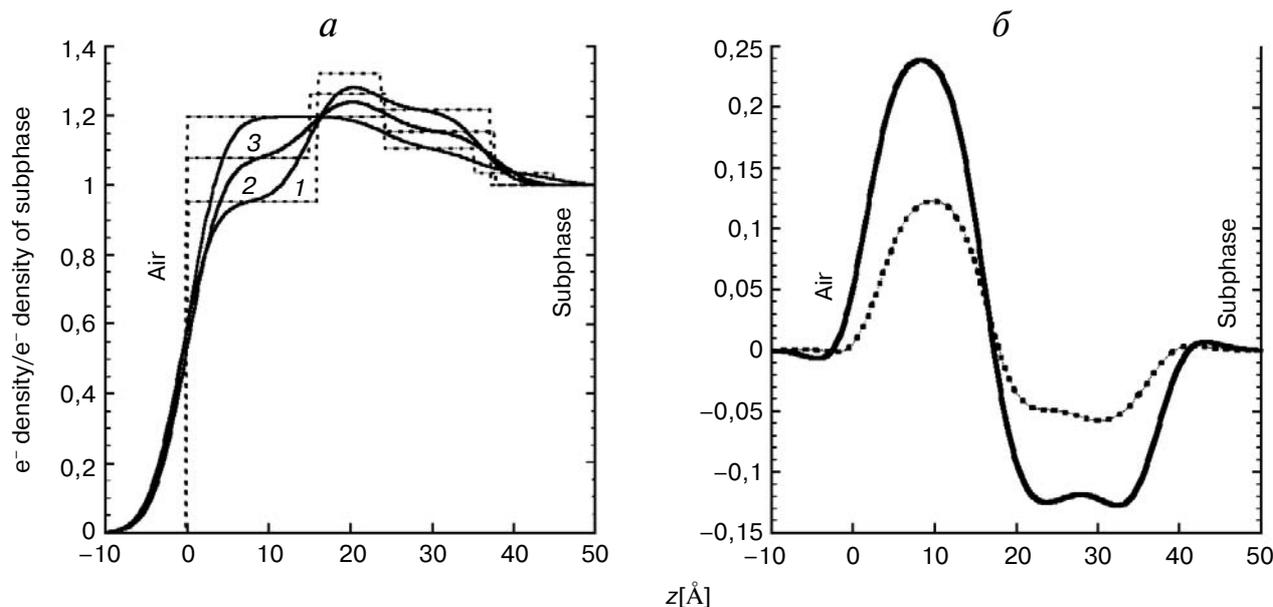


Рис. 7. *a* – Сравнение нормализованного распределения электронной плотности для монослоя DPPE : GM1 (1) и спустя $t_1 = 5$ ч (2) и $t_2 = 13$ ч (3) после введения Gal-1. Пунктирные и сплошные линии обозначают электронную плотность, полученную в модели с тремя плитками, которые являются неразмазанными и размазанными соответственно. Электронные плотности $\rho(z)$ нормализованы по электронной плотности буферной субфазы ($\rho_{\text{субфаза}} = 0,335 \text{ e}^-/\text{\AA}^{-3}$); *б* – разница между профилями электронной плотности монослоя DPPE : GM1 без Gal-1 и монослоя DPPE : GM1, содержащего Gal-1 через $t_1 = 5$ ч (пунктирная линия) и $t_2 = 13$ ч (сплошная линия) после введения Gal-1

ется, что остатки белка, разделенные такими расстояниями, могут влиять на эти взаимодействия.

Данные XR показывают очень существенные изменения в распределении электронной плотности вдоль линии, перпендикулярной монослою. До введения Gal-1-содержащего раствора распределение электронной плотности, полученное с помощью измерения XR, показывает, что головы DPPE и ближайшие к ним головы ганглиозида GM1 выравниваются в 2D плоскости монослоя. Разветвленная часть пентасакхаридной головы может углубляться дальше в водную субфазу, минимизируя боковые взаимодействия. Моделирование конформации GM1 в среде с фосфатидилхолиновыми головами позволяет предположить две возможные конформации, получившие названия «выпирающая» и «встроенная» [44, 45]. Углеводная голова ганглиозида легко опознается на профилях отражения для $t_0 = 0$ и $t_1 = 5$ ч.

Измерение распределения электронной плотности (рис. 7) предоставляет явное доказательство проникновения Gal-1 в область гидрофобных остатков липидного монослоя и/или расшатывания голов. Данные XR указывают на существенное увеличение числа электронов в монослое, несмотря на увеличение площади на

одну молекулу из-за его расширения. Избыток электронов может быть объяснен только присутствием молекул Gal-1 на границе раздела фаз. Итоговое распределение электронной плотности (рис. 7, *a*, *б*) указывает, что вдоль оси, перпендикулярной поверхности, влияние белка сказывается на протяжении $\sim 40 \text{ \AA}$, что соответствует длине короткой оси белка. При этом вероятно связывание с длиной осью, параллельной границе воздух/субфаза. Также существуют явные доказательства того, что встраивание Gal-1 влияет на гидрофобную (алкилы) область монослоя. Несмотря на серьезное влияние контакта с Gal-1 на распределение электронной плотности в монослое DPPE : GM1, явных доказательств расположения молекул в регулярном слое под монослоем не наблюдалось. Измерение GIXD в области низких q_{xy} не выявило никаких упорядоченных структур в плоскости с межатомным расстоянием менее 120 \AA . Эти данные согласуются с теорией об отсутствии организации Gal-1 в регулярные двумерные массивы в плоскости. Взаимодействие Gal-1 и монослоя DPPE : GM1 зависит от поверхностного давления. Примечательно, что при 30 мН/м мы не наблюдали внедрения белка в монослой.

Вопреки результатам XR, данные GIXD, полученные через 13 ч инкубации с Gal-1, выяви-

ли только незначительные изменения в гелевой фазе монослоя. Таким образом, можно предположить, что молекулы белка преимущественно контактируют с расширенной жидкой фазой. Этот вывод также подтверждается тем фактом, что при повышении поверхностного давления (при котором происходит увеличение доли упорядоченной фазы) не наблюдается признаков внедрения.

Сравнение с предыдущими работами с Ctx показывает, что модель взаимодействия монослоя DPPE : GM1 (80 : 20) с Gal-1 отличается от таковой для Ctx (B₅ и AB₅) [38–40]. Ctx (мягко) присоединяется к монослою снизу, в гораздо меньшей степени перемешивая структуры в плоскости и поперечно ей (алкилы), чем Gal-1. На первоначальной стадии взаимодействия Ctx образует довольно гомогенный монослой под головами PE/GM1. Кроме того, молекулы Ctx самоорганизуются в двумерные кристаллиты с высокой степенью когерентности в плоскости. Для Gal-1 не наблюдается ничего подобного. Вытянутый гомодимерный Gal-1 (эллипсоид с длинами в двух направлениях ~40 и 56 Å; измерение скорости осаждения показало коэффициент трения ~1,3 [46]) с расстоянием между двумя сайтами лектина ~40–45 Å и их характерной ориентацией (почти параллельно длинной оси молекулы [47]) вызывает существенное нарушение порядка расположения алкилов монослоя, как схематически показано на рис. 2, в. Для смеси DPPE : GM1 (80 : 20) среднее расстояние между головами GM1 в одном направлении составляет ~30 Å. Несоизмеримость расстояний (между сайтами связывания Gal-1 и средним расстоянием между головами GM1) приводит к увеличению уровня неупорядоченности упаковки алкильных цепей, если оказываются задействованы оба сайта связывания. В целом представленные результаты иллюстрируют то, что два типа рецепторов влияют на свойства мембраны в разной степени.

Кроме специфических гликан-лектиновых взаимодействий следует рассмотреть также возможность того, что углеводраспознающий домен галектина может участвовать в контакте с липидным монослоем, как это было показано, например, для аннексинов [48, 49]. Предыдущие исследования галектина-3 показали, что лектин может взаимодействовать с фосфатидилсеринном, галактозилцерамидом и холестерином и быстро проникать и пересекать липидный бислой (молярное соотношение 2,1 : 5,0 : 0,1 холестерин : димиристоил-L-α-фосфатидилхолин : дицетилфосфат) [50], но оставили открытым вопрос о возможности объяснения этих свойств хвостовыми областями коллагенподобных пов-

торов и N-терминального белка галектина химерного типа.

Поскольку галектины синтезируются на свободных цитоплазматических рибосомах и секретируются нетрадиционным путем [51, 52], а ганглиозид GM1 также является компонентом ядерной мембраны [53, 54], эти данные могут иметь дополнительное значение для понимания секреции и внутриклеточного трафика Gal-1, локализованного в клеточном ядре [55–58]. С учетом топологической презентации сайтов связывания, способности реагировать на гликокластеры/клеточные поверхности и функциональных последствий различий в связывании разных галектинов [16, 23, 59–67], которые в отдельных случаях даже являются антагонистами [12, 68], а также рационального дизайна, способного предлагать варианты для целенаправленного тестирования свойств структура–активность [66, 69], использование данного метода для установления профилей связывания гликановых структур с лектинами представляется обоснованным [7, 70]. Примечательно, что *in vivo* галектины присутствуют в виде сети, что создает условия для функциональной конкуренции. Переход на модельные бислои [71] и добавление холестерина поможет повысить уровень биологической релевантности. Однако было показано, что стероиды снижают доступность гликанов, наклоняя углеводные цепи гликофинголипидов в сторону мембранной фазы и образуя композиционную асимметрию в случае GM1 [72–74]. В результате демаскирование ранее «невидимых» гликофинголипидов возможно с помощью метил-β-циклодекстрина [73, 75]. Проведение такого эксперимента для клеток нейробластомы (SK-N-MC) снизило значение V_{max} для связывания Gal-1 с 300 до почти 170 фмоль с ~10-кратным увеличением константы диссоциации [14]. Параллельно с этим связывание с поверхностью и его значение для *транс*-взаимодействия могут быть оценены с помощью специально синтезированных гликодендимеров в тестах на агрегацию [76, 77], что дополняет анализ структурных аспектов *цис*-ассоциатов.

Центр нейтронного рассеивания Лос-Аламосской национальной лаборатории финансируется Департаментом энергетики США по контракту W-7405-ENG-36.

Э. Чи и Э. Джонс выражают благодарность за финансирование Премии Ральфа Э. Пауэра для поддержки младшего преподавательского состава Окриджского объединенного университета и Комитету по финансированию исследований

Университета Нью-Мексико за поддержку экспериментов по рентгеновскому рассеянию. Авторы также выражают благодарность Европейской Комиссии за финансовую поддержку (GlysoPharm, контракт 317297), NasyLab за при-

борное время, д-ру В. Страту за помощь с экспериментами по отражению и дифракции под скользящими углами и д-рам Ж. Доминику-Экарку и Б. Фрайдей за вдохновляющее обсуждение.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Kopitz, J. (2009) in *The sugar code. Fundamentals of glycosciences* (Gabijs, H.-J., ed.), Wiley-VCH, Weinheim, pp. 177–198.
- Ledeen, R.W., and Wu, G. (2009) in *The sugar code. Fundamentals of glycosciences* (Gabijs, H.-J., ed.), Wiley-VCH, Weinheim, pp. 495–516.
- Wennekes, T., van den Berg, R.J., Boot, R.G., van der Marel, G.A., Overkleeft, H.S., and Aerts, J.M. (2009) Glycosphingolipids: nature, function, and pharmacological modulation, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **48**, 848–869.
- Pontier, S.M., and Schweisguth, F. (2012) Glycosphingolipids in signaling and development: from liposomes to model organisms, *Dev. Dyn.*, **241**, 92–106.
- Gabijs, H.-J. (2001) Probing the cons and pros of lectin-induced immunomodulation: case studies for the mistletoe lectin and galectin-1, *Biochimie*, **83**, 659–666.
- Rapoport, E.M., Kurmyshkina, O.V., and Bovin, N.V. (2008) Mammalian galectins: structure, carbohydrate specificity, and functions, *Biochemistry (Moscow)*, **73**, 393–405.
- Kaltner, H., and Gabiys, H.-J. (2012) A toolbox of lectins for translating the sugar code: the galectin network in phylogenesis and tumors, *Histol. Histopathol.*, **27**, 397–416.
- Solis, D., Bovin, N.V., Davis, A.P., Jimenez-Barbero, J., Romero, A., Roy, R., Smetana, K., Jr., and Gabiys, H.-J. (2014) A guide into glycosciences: how chemistry, biochemistry and biology cooperate to crack the sugar code, *Biochim. Biophys. Acta*, in press.
- Siebert, H.-C., Andre, S., Lu, S.-Y., Frank, M., Kaltner, H., van Kuik, J.A., Korchagina, E.Y., Bovin N.V., Tajkhorshid, E., Kaptein, R., Vliegthart, J.F.G., von der Lieth, C.-W., Jimenez-Barbero, J., Kopitz, J., and Gabiys, H.-J. (2003) Unique conformer selection of human growth-regulatory lectin galectin-1 for ganglioside GM1 versus bacterial toxins, *Biochemistry*, **42**, 14762–14773.
- Andre, S., Kaltner, H., Lensch, M., Russwurm, R., Siebert, H.-C., Fallsehr, C., Tajkhorshid, E., Heck, A.J.R., von Knebel Doeberitz, M., Gabiys, H.-J., and Kopitz, J. (2005) Determination of structural and functional overlap/divergence of five proto-type galectins by analysis of the growth-regulatory interaction with ganglioside GM1 *in silico* and *in vitro* on human neuroblastoma cells, *Int. J. Cancer*, **114**, 46–57.
- Dettmann, W., Grandbois, M., Andre, S., Benoit, M., Wehle, A.K., Kaltner, H., Gabiys, H.-J., and Gaub, H.E. (2000) Differences in zero-force and force-driven kinetics of ligand dissociation from β -galactoside-specific proteins (plant and animal lectins, immunoglobulin G) monitored by plasmon resonance and dynamic single molecule force microscopy, *Arch. Biochem. Biophys.*, **383**, 157–170.
- Kopitz, J., von Reitzenstein, C., Andre, S., Kaltner, H., Uhl, J., Ehemann, V., Cantz, M., and Gabiys, H.-J. (2001) Negative regulation of neuroblastoma cell growth by carbohydrate-dependent surface binding of galectin-1 and functional divergence from galectin-3, *J. Biol. Chem.*, **276**, 35917–35923.
- Wang, J., Lu, Z.-H., Gabiys, H.-J., Rohowsky-Kochan, C., Ledeen, R.W., and Wu, G. (2009) Cross-linking of GM1 ganglioside by galectin-1 mediates regulatory T-cell activity involving TRPC5 channel activation: possible role in suppressing experimental autoimmune encephalomyelitis, *J. Immunol.*, **182**, 4036–4045.
- Kopitz, J., Bergmann, M., and Gabiys, H.-J. (2010) How adhesion/growth-regulatory galectins-1 and -3 attain cell specificity: case study defining their target on neuroblastoma cells (SK-N-MC) and marked affinity regulation by affecting microdomain organization of the membrane, *IUBMB Life*, **62**, 624–628.
- Wu, G., Lu, Z.-H., Gabiys, H.-J., Ledeen, R.W., and Bleich, D. (2011) Ganglioside GM1 deficiency in effector T-cells from NOD mice induces resistance to regulatory T-cell suppression, *Diabetes*, **60**, 2341–2349.
- Ledeen, R.W., Wu, G., Andre, S., Bleich, D., Huet, G., Kaltner, H., Kopitz, J., and Gabiys, H.-J. (2012) Beyond glycoproteins as galectin counterreceptors: tumor/effector T-cell growth control via ganglioside GM1, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **1253**, 206–221.
- Lencer, W.I., and Saslowsky, D. (2005) Raft trafficking of AB₅ subunit bacterial toxins, *Biochim. Biophys. Acta*, **1746**, 314–321.
- Beddoe, T., Paton, A.W., Le Nours, J., Rossjohn, J., and Paton, J.C. (2010) Structure, biological functions and applications of the AB₅ toxins, *Trends Biochem. Sci.*, **35**, 411–418.
- Fajka-Boja, R., Blasko, A., Kovacs-Solyom, F., Szebeni, G.J., Toth, G.K., and Monostori, E. (2008) Co-localization of galectin-1 with GM1 ganglioside in the course of its clathrin- and raft-dependent endocytosis, *Cell. Mol. Life Sci.*, **65**, 2586–2593.
- Sobel, D.O., Yankelevich, B., Goyal, D., Nelson, D., and Mazumder, A. (1998) The B-subunit of cholera toxin induces immunoregulatory cells and prevents diabetes in the NOD mouse, *Diabetes*, **47**, 186–191.
- Williams, N.A., Hirst, T.R., and Nashar, T.O. (1999) Immune modulation by the cholera-like enterotoxins: from adjuvant to therapeutic, *Immunol. Today*, **20**, 95–101.
- Salmond, R.J., Luross, J.A., and Williams, N.A. (2002) Immune modulation by the cholera-like enterotoxins, *Expert Rev. Mol. Med.*, **4**, 1–16.
- Kopitz, J., Ballikaya, S., Andre, S., and Gabiys, H.-J. (2012) Ganglioside GM1/galectin-dependent growth regulation in human neuroblastoma cells: special properties of bivalent galectin-4 and significance of linker length for ligand selection, *Neurochem. Res.*, **37**, 1267–1276.
- Gupta, R.K., Pande, A.H., Gulla, K.C., Gabiys, H.-J., and Hajela, K. (2006) Carbohydrate-induced modulation of cell membrane. VIII. Agglutination with mammalian lectin galectin-1 increases osmofragility and membrane fluidity of trypsinized erythrocytes, *FEBS Lett.*, **580**, 1691–1695.
- He, L., Andre, S., Siebert, H.-C., Helmholz, H., Niemeyer, B., and Gabiys, H.-J. (2003) Detection of ligand- and solvent-induced shape alterations of cell-growth-regulatory human lectin galectin-1 in solution by small angle neutron and X-ray scattering, *Biophys. J.*, **85**, 511–524.

26. Purkrabkova, T., Smetana, K., Jr., Dvorankova, B., Holikova, Z., Bock, C., Lensch, M., Andre, S., Pytlik, R., Liu, F.-T., Klima, J., Smetana, K., Motlik, J., and Gabius, H.-J. (2003) New aspects of galectin functionality in nuclei of cultured bone marrow stromal and epidermal cells: biotinylated galectins as tool to detect specific binding sites, *Biol. Cell*, **95**, 535–545.
27. Andre, S., Sanchez-Ruderisch, H., Nakagawa, H., Buchholz, M., Kopitz, J., Forberich, P., Kemmer, W., Bock, C., Deguchi, K., Detjen, K.M., Wiedenmann, B., von Knebel Doeberitz, M., Gress, T.M., Nishimura, S.-I., Rosewicz, S., and Gabius, H.-J. (2007) Tumor suppressor p16^{INK4a}: modulator of glycomic profile and galectin-1 expression to increase susceptibility to carbohydrate-dependent induction of anoikis in pancreatic carcinoma cells, *FEBS J.*, **274**, 3233–3256.
28. Amano, M., Eriksson, H., Manning, J.C., Detjen, K.M., Andre, S., Nishimura, S.-I., Lehtio, J., and Gabius, H.-J. (2012) Tumor suppressor p16^{INK4a}: anoikis-favouring decrease in N/O-glycan/cell surface sialylation by down-regulation of enzymes in sialic acid biosynthesis in tandem in a pancreatic carcinoma model, *FEBS J.*, **279**, 4062–4080.
29. Majewski, J., Popovitz-Biro, R., Bouwman, W.G., Kjaer, K., Als-Nielsen, J., Lahav, M., and Leiserowitz, L. (1995) The structural properties of uncompressed crystalline monolayers of alcohols $C_nH_{2n} + 1 OH$ ($n = 13–31$) on water and their role as ice nucleators, *Chem. Eur. J.*, **1**, 304–311.
30. Als-Nielsen, J., and Kjaer, K. (1999) in *Phase transitions in soft condensed matter* (Riste, T., and Sherrington, D., eds), Springer, N.Y., pp. 113–138.
31. Kjaer, K. (1994) Some simple ideas on X-ray reflection and grazing-incidence diffraction from thin surfactant films, *Physica B: Condensed Matter*, **198**, 100–109.
32. Eisenberger, P., and Marra, W.C. (1981) X-ray diffraction study of the Ge(001) reconstructed surface, *Phys. Rev. Lett.*, **46**, 1081–1084.
33. Als-Nielsen, J., Jacquemain, D., Kjaer, K., Leveiller, F., Lahav, M., and Leiserowitz, L. (1994) Principles and applications of grazing incidence X-ray and neutron scattering from ordered molecular monolayers at the air-water interface, *Phys. Rep.*, **246**, 251–313.
34. Jensen, T.R., Balashev, K., Bjornholm, T., and Kjaer, K. (2001) Novel methods for studying lipids and lipases and their mutual interaction at interfaces. Part II. Surface sensitive synchrotron X-ray scattering, *Biochimie*, **83**, 399–408.
35. Seelig, A. (1987) Local anesthetics and pressure: a comparison of dibucaine binding to lipid monolayers and bilayers, *Biochim. Biophys. Acta*, **899**, 196–204.
36. Guinier, A. (1963) X-ray diffraction in crystals, imperfect crystals, and amorphous bodies, W.H. Freeman, San Francisco.
37. Danauskas, S.M., Li, D., Meron, M., Lin, B., and Lee, K.Y.C. (2008) Stochastic fitting of specular X-ray reflectivity data using StochFit, *J. Appl. Crystallogr.*, **41**, 1187–1193.
38. Miller, C.E., Majewski, J., Watkins, E.B., and Kuhl, T.L. (2008) An X-ray scattering study of cholera toxin penetration and induced phase transformations in lipid membranes, *Biophys. J.*, **95**, 629–640.
39. Miller, C.E., Majewski, J., Watkins, E.B., Weygand, M., and Kuhl, T.L. (2008) Diffraction from two-dimensional cholera toxin crystals bound to their receptors in a lipid monolayer, *Biophys. J.*, **95**, 641–647.
40. Watkins, E.B., Miller, C.E., Majewski, J., and Kuhl, T.L. (2011) Membrane texture induced by specific protein binding and receptor clustering: active roles for lipids in cellular function, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 6975–6980.
41. Majewski, J., Kuhl, T.L., Kjaer, K., and Smith, G.S. (2001) Packing of ganglioside-phospholipid monolayers: an X-ray diffraction and reflectivity study, *Biophys. J.*, **81**, 2707–2715.
42. Smetana, K., Jr., Andre, S., Kaltner, H., Kopitz, J., and Gabius, H.-J. (2013) Context-dependent multifunctionality of galectin-1: a challenge for defining the lectin as therapeutic target, *Expert Opin. Ther. Targets*, **17**, 379–392.
43. Martinez-Bosch, N., Fernandez-Barrena, M.G., Moreno, M., Ortiz-Zapater, E., Munne-Collado, J., Iglesias, M., Andre, S., Gabius, H.-J., Hwang, R.F., Poirier, F., Navas, C., Guerra, C., Fernandez-Zapico, M.E., and Navarro, P. (2014) Galectin-1 drives pancreatic carcinogenesis through stroma remodeling and Hedgehog signaling activation, *Cancer Res.*, **74**, 3512–3524.
44. Patel, R.Y., and Balaji, P.V. (2007) Characterization of the conformational and orientational dynamics of ganglioside GM1 in a dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer by molecular dynamics simulations, *Biochim. Biophys. Acta*, **1768**, 1628–1640.
45. Jedlowszky, P., Sega, M., and Vallauri, R. (2009) GM1 ganglioside embedded in a hydrated DOPC membrane: a molecular dynamics simulation study, *J. Phys. Chem. B*, **113**, 4876–4886.
46. Kaltner, H., Solis, D., Kopitz, J., Lensch, M., Lohr, M., Manning, J.C., Murnseer, M., Schnolzer, M., Andre, S., Saiz, J.L., and Gabius, H.-J. (2008) Prototype chicken galectins revisited: characterization of a third protein with distinctive hydrodynamic behaviour and expression pattern in organs of adult animals, *Biochem. J.*, **409**, 591–599.
47. Lopez-Lucendo, M.F., Solis, D., Andre, S., Hirabayashi, J., Kasai, K.-I., Kaltner, H., Gabius, H.-J., and Romero, A. (2004) Growth-regulatory human galectin-1: crystallographic characterisation of the structural changes induced by single-site mutations and their impact on the thermodynamics of ligand binding, *J. Mol. Biol.*, **343**, 957–970.
48. Zeng, F.-Y., Gerke, V., and Gabius, H.-J. (1993) Identification of annexin II, annexin VI and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as calyculin-binding proteins in bovine heart, *Int. J. Biochem.*, **25**, 1019–1027.
49. Gerke, V., and Moss, S.E. (2002) Annexins: from structure to function, *Physiol. Rev.*, **82**, 331–371.
50. Lukyanov, P., Furtak, V., and Ochieng, J. (2005) Galectin-3 interacts with membrane lipids and penetrates the lipid bilayer, *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **338**, 1031–1036.
51. Wilson, T.J.G., Firth, M.N., Powell, J.T., and Harrison, F.L. (1989) The sequence of the mouse 14 kDa β -galactoside-binding lectin and evidence for its synthesis on free cytoplasmic ribosomes, *Biochem. J.*, **261**, 847–852.
52. Hughes, R.C. (1999) Secretion of the galectin family of mammalian carbohydrate-binding proteins, *Biochim. Biophys. Acta*, **1473**, 172–185.
53. Ledeen, R.W., and Wu, G. (2006) Sphingolipids of the nucleus and their role in nuclear signaling, *Biochim. Biophys. Acta*, **1761**, 588–598.
54. Ledeen, R., and Wu, G. (2011) New findings on nuclear gangliosides: overview on metabolism and function, *J. Neurochem.*, **116**, 714–720.
55. Saussez, S., Decaestecker, C., Lorfèvre, F., Chevalier, D., Mortuaire, G., Kaltner, H., Andre, S., Toubeau, G., Gabius, H.-J., and Leroy, X. (2008) Increased expression and altered intracellular distribution of adhesion/growth-regulatory lectins galectins-1 and during tumour progression in hypopharyngeal and laryngeal squamous cell carcinomas, *Histopathology*, **52**, 483–493.
56. Nasrabadi, D., Larijani, M.R., Fathi, A., Gourabi, H., Dizaj, A.V., Baharvand, H., and Salekdeh, G.H. (2010)

- Nuclear proteome analysis of monkey embryonic stem cells during differentiation, *Stem Cell Rev.*, **6**, 50–61.
57. Kodet, O., Dvorankova, B., Lacina, L., Andre, S., Kaltner, H., Gabius, H.-J., and Smetana, K., Jr. (2011) Comparative analysis of the nuclear presence of adhesion/growth-regulatory galectins and reactivity in the nuclei of interphasic and mitotic cells, *Folia Biol.*, **57**, 125–132.
 58. R Emmelink, M., de Leval, L., Decaestecker, C., Duray, A., Crompot, E., Sirtaine, N., Andre, S., Kaltner, H., Leroy, X., Gabius, H.-J., and Saussez, S. (2011) Quantitative immunohistochemical fingerprinting of adhesion/growth-regulatory galectins in salivary gland tumours: divergent profiles with diagnostic potential, *Histopathology*, **58**, 543–556.
 59. Villalobo, A., Nogales-Gonzalez, A., and Gabius, H.-J. (2006) A guide to signaling pathways connecting protein-glycan interaction with the emerging versatile effector functionality of mammalian lectins, *Trends Glycosci. Glycotechnol.*, **99**, 1–37.
 60. Rapoport, E.M., Andre, S., Kurmyshkina, O.V., Pochechueva, T.V., Severov, V.V., Pazynina, G.V., Gabius, H.-J., and Bovin, N.V. (2008) Galectin-loaded cells as a platform for the profiling of lectin specificity by fluorescent neoglycoconjugates: a case study on galectins-1 and -3 and the impact of assay setting, *Glycobiology*, **18**, 315–324.
 61. Chernyy, E.S., Rapoport, E.M., Andre, S., Kaltner, H., Gabius, H.-J., and Bovin, N.V. (2011) Galectins promote the interaction of influenza virus with its target cell, *Biochemistry (Moscow)*, **76**, 958–967.
 62. Dvorankova, B., Szabo, P., Lacina, L., Gal, P., Uhrova, J., Zima, T., Kaltner, H., Andre, S., Gabius, H.-J., Sykova, E., and Smetana, K., Jr. (2011) Human galectins induce conversion of dermal fibroblasts into myofibroblasts and production of extracellular matrix: potential application in tissue engineering and wound repair, *Cells Tissues Organs*, **194**, 469–480.
 63. Vokhmyanina, O.A., Rapoport, E.M., Ryzhov, I.M., Korchagina, E.Y., Pazynina, G.V., Severov, V.V., Kaltner, H., Andre, S., Gabius, H.-J., and Bovin, N.V. (2011) Carbohydrate specificity of chicken and human tandem-repeat-type galectins-8 in composition of cells, *Biochemistry (Moscow)*, **76**, 1185–1192.
 64. Vokhmyanina, O.A., Rapoport, E.M., Andre, S., Severov, V.V., Ryzhov, I., Pazynina, G.V., Korchagina, E., Gabius, H.-J., and Bovin, N.V. (2012) Comparative study of the glycan specificities of cell-bound human tandem-repeat-type galectins-4, -8 and -9, *Glycobiology*, **22**, 1207–1217.
 65. Murphy, P.V., Andre, S., and Gabius, H.-J. (2013) The third dimension of reading the sugar code by lectins: design of glycoclusters with cyclic scaffolds as tools with the aim to define correlations between spatial presentation and activity, *Molecules*, **18**, 4026–4053.
 66. Andre, S., Wang, G.N., Gabius, H.-J., and Murphy, P.V. (2014) Combining glycocluster synthesis with protein engineering: an approach to probe into the significance of linker length in a tandem-repeat-type lectin (galectin-4), *Carbohydr. Res.*, **389**, 25–38.
 67. Ruiz, F.M., Scholz, B.A., Buzamet, E., Kopitz, J., Andre, S., Menendez, M., Romero, A., Solis, D., and Gabius, H.-J. (2014) Natural single amino acid polymorphism (F19Y) in human galectin-8: detection of structural alterations and increased growth-regulatory activity on tumor cells, *FEBS J.*, **281**, 1446–1464.
 68. Sanchez-Ruderisch, H., Fischer, C., Detjen, K.M., Welzel, M., Wimmel, A., Manning, J.C., Andre, S., and Gabius, H.-J. (2010) Tumor suppressor p16^{INK4a}: downregulation of galectin-3, an endogenous competitor of the pro-apoptosis effector galectin-1, in a pancreatic carcinoma model, *FEBS J.*, **277**, 3552–3563.
 69. Kopitz, J., Vertesy, S., Andre, S., Fiedler, S., Schnolzer, M., and Gabius, H.-J. (2014) Human chimera-type galectin-3: defining the critical tail length for high-affinity glycoprotein/cell surface binding and functional competition with galectin-1 in neuroblastoma cell growth regulation, *Biochimie*, **104**, 90–99.
 70. Dawson, H., Andre, S., Karamitopoulou, E., Zlobec, I., and Gabius, H.-J. (2013) The growing galectin network in colon cancer and clinical relevance of cytoplasmic galectin-3 reactivity, *Anticancer Res.*, **33**, 3053–3059.
 71. Jose, B., Mallon, C.T., Forster, R.J., Blackledge, C., and Keyes, T.E. (2011) Lipid bilayer assembly at a gold nanocavity array, *Chem. Commun.*, **47**, 12530–12532.
 72. Mahfoud, R., Manis, A., Binnington, B., Ackerley, C., and Lingwood, C.A. (2010) A major fraction of glycosphingolipids in model and cellular cholesterol-containing membranes is undetectable by their binding proteins, *J. Biol. Chem.*, **285**, 36049–36059.
 73. Lingwood, D., Binnington, B., Rog, T., Vattulainen, I., Grzybek, M., Coskun, U., Lingwood, C.A., and Simons, K. (2011) Cholesterol modulates glycolipid conformation and receptor activity, *Nature Chem. Biol.*, **7**, 260–262.
 74. Rondelli, V., Fragneto, G., Motta, S., Del Favero, E., Brocca, P., Sonnino, S., and Cantu, L. (2012) Ganglioside GM1 forces the redistribution of cholesterol in a biomimetic membrane, *Biochim. Biophys. Acta*, **1818**, 2860–2867.
 75. Novak, A., Binnington, B., Ngan, B., Chadwick, K., Fleshner, N., and Lingwood, C.A. (2013) Cholesterol masks membrane glycosphingolipid tumor-associated antigens to reduce their immunodetection in human cancer biopsies, *Glycobiology*, **23**, 1230–1239.
 76. Percec, V., Leowanawat, P., Sun, H.J., Kulikov, O., Nusbaum, C.D., Tran, T.M., Bertin, A., Wilson, D.A., Peterca, M., Zhang, S., Kamat, N.P., Vargo, K., Mook, D., Johnston, E.D., Hammer, D.A., Pochan, D.J., Chen, Y., Chabre, Y.M., Shiao, T.C., Bergeron-Brlek, M., Andre, S., Roy, R., Gabius, H.-J., and Heiney, P.A. (2013) Modular synthesis of amphiphilic Janus glycodendrimers and their self-assembly into glycodendrimersomes and other complex architectures with bioactivity to biomedically relevant lectins, *J. Am. Chem. Soc.*, **135**, 9055–9077.
 77. Zhang, S., Moussodia, R.O., Sun, H.J., Leowanawat, P., Muncan, A., Nusbaum, C.D., Chelling, K.M., Heiney, P.A., Klein, M.L., Andre, S., Roy, R., Gabius, H.-J., and Percec, V. (2014) Mimicking biological membranes with programmable glycan ligands self-assembled from amphiphilic Janus glycodendrimers, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **53**, 10899–10903.

**X-RAY REFLECTIVITY AND GRAZING INCIDENCE
DIFFRACTION STUDIES OF INTERACTION BETWEEN
HUMAN ADHESION/GROWTH-REGULATORY
GALECTIN-1 AND DPPE : GM1 LIPID MONOLAYER
AT AN AIR/WATER INTERFACE**

**J. Majewski¹, S. Andre², E. Jones³,
E. Chi³, H.-J. Gabius^{2*}**

¹ Manuel Lujan Jr. Neutron Scattering Center, Los Alamos
Neutron Science Center, Los Alamos National Laboratory,
Los Alamos, NM, USA

² Ludwig-Maximilians-University Munich, Institute of Physiological
Chemistry, Faculty of Veterinary Medicine, Veterinarstr. 13,
80539 Munchen, Germany; E-mail: gabius@tiph.vetmed.uni-muenchen.de,
gabius@lectins.de

³ University of New Mexico, Department of Chemical and Biological
Engineering, Center for Biomedical Engineering,
Albuquerque, NM, USA

Received October 26, 2014

Revision received April 14, 2015

The specific interaction of ganglioside GM1 with homodimeric (proto-type) endogenous lectin galectin-1 triggers growth regulation in tumor and activated effector T cells. This proven biorelevance directed interest to studying association of the lectin to a model surface, i.e. a 1,2-dihexadecanoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine/ganglioside GM1 (80 : 20 mol%) monolayer, at a bioeffective concentration. Surface expansion by the insertion of the lectin was detected at surface pressure of 20 mN/m. Combining the methods of grazing incidence X-ray diffraction and X-ray reflectivity, a transient decrease in lipid-ordered phase of the monolayer was observed. The measured electron density distribution indicated that galectin-1 is oriented with its long axis in the surface plane, ideal for *cis*-crosslinking. The reported data reveal a conspicuous difference to the way the pentameric lectin part of cholera toxin, another GM1-specific lectin, is bound to the monolayer. They also encourage further efforts to monitor effects of structurally different members of the galectin family such as the functionally antagonistic chimera-type galectin-3.

Key words: agglutinin, Bragg peaks, ganglioside, lectin, X-ray diffraction/reflectivity