

УДК 577.19+577.29+616-006.04

ГИПЕРСИАЛИРОВАННЫЕ ГЛИКАНЫ РАКОВЫХ КЛЕТОК КАК ЛИГАНДЫ ДЛЯ ИНГИБИТОРНЫХ РЕЦЕПТОРОВ ИМУННЫХ КЛЕТОК: ИССЛЕДОВАНИЕ *IN SILICO*

Лахвич Ф.Ф., Борисов Б.В., Дятко П.Г.

УО «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск, Республика Беларусь

В эксперимент *in silico* показано, что уникальные паттерны гиперсиалированных гликанов на поверхности раковых клеток служат лигандами для специфических ингибиторных рецепторов иммунных клеток. Проведена оценка взаимодействия панели опухоль-ассоциированных гликанов (sLe^x, sTn, GD2, PSA) с панелью ингибиторных рецепторов (Siglec-7,-8,-9, LILRB1, KIR2DL1). Показана высокая аффинность рецептора Siglec-8 к сиалированным лигандам с максимальными взаимодействиями с полисиаловой кислотой (PSA) – энергия связывания ($E_{св.}$) = –9.68 ккал/моль; дисаialogанглиозидом GD2 ($E_{св.}$ = –7.26 ккал/моль). Структурный анализ показал, что стабильность комплекса Siglec-8/PSA результат синергетического «бидентатного электростатического захвата», при котором гибкая цепь PSA одновременно связывается с двумя положительно заряженными сайтами рецептора (Arg109 и Arg56). Распознавание GD2 определяется его жесткой трехмерной архитектурой и ограничено моновалентным связыванием. Исследование впервые представляет структурное обоснование оси «PSA/GD2 – Siglec-8» как нового, потенциально значимого механизма иммунной супрессии и перспективной мишени для иммунотерапии.

Ключевые слова: гиперсиалирование; гликаны; иммунная толерантность; ингибиторные рецепторы; раковые клетки; NK-клетки; Т-лимфоциты; *in silico*; KIR; LILRB1; Siglec.

Введение. Гиперсиалирование гликанов изменяет профиль гликозилирования клеточной поверхности, что приводит к злокачественной трансформации, к подавлению противоопухолевого иммунного ответа, что коррелирует с метастатическим потенциалом опухоли, устойчивостью к терапии и неблагоприятным прогнозом для пациентов. Ключевую роль в уничтожении клеток злокачественной опухоли играют цитотоксические лимфоциты, в частности естественные киллеры (NK-клетки) и Т-лимфоциты. NK-клетки представляют собой первую линию врожденного иммунитета, способную распознавать и уничтожать злокачественные клетки без предварительной сенсibilизации. Их активность регулируется балансом сигналов от активирующих и ингибиторных рецепторов на их поверхности. Раковые клетки экспрессируют лиганды для ингибиторных рецепторов, что позволяет им «выключать» атакующие лимфоциты и избегать иммунного надзора.

Известно, что сиаловые кислоты на поверхности опухоли могут служить лигандами для известных ингибиторных рецепторов семейства Siglec (Sialic acid-binding immunoglobulin-like lectins), экспрессируемых на иммунных клетках, включая NK-клетки (например, Siglec-7 и Siglec-9). Связывание этих рецепторов подавляет цитотоксическую активность NK-клеток. Выделено большое число сиали-

рованных гликановых структур на раковых клетках [1; 3–5]. Тип гликозидной связи (α -2,3, α -2,6 или α -2,8), базовая структура гликана и пространственная организация молекул формируют сложные и уникальные «паттерны».

Однако до настоящего времени детально не изучалось взаимодействие всего спектра опухолевых сиалогликанов с менее известными членами семейства Siglec, такими как Siglec-8, а также с рецепторами других семейств (KIR, LILRB1).

Цель: Проверка в эксперименте *in silico* гипотезы о том, что уникальные паттерны гиперсиалированных гликанов на поверхности раковых клеток служат лигандами для специфических ингибиторных рецепторов NK-клеток и Т-лимфоцитов, что приводит к подавлению противоопухолевого иммунного ответа.

Задачи:

1. Выявить и создать трехмерные модели потенциальных гиперсиалированных гликановых структур, характерных для раковых клеток, и малоизученных ингибиторных рецепторов NK-клеток и Т-лимфоцитов.

2. Провести молекулярный докинг для предсказания аффинности выбранных гликановых лигандов к ингибиторным рецепторам.

3. Определить наиболее вероятные пары «лиганд-рецептор» для дальнейшего экспериментального изучения.

Материалы и методы. Докинг проведен с использованием программного обеспечения AutoDock GPU (версия 1.2.0). Была сформирована панель из десяти молекулярных систем: четырех опухоль-ассоциированных гиперсигнализирующих гликанов и пяти релевантных ингибиторных рецепторов иммунных клеток. В качестве трехмерных (3D) структур белков-мишеней использовались кристаллические структуры, полученные из Protein Data Bank (PDB): для рецепторов Siglec-7, Siglec-8, LILRB1 и KIR2DL1 были загружены и очищены экспериментальные структуры из всемирного банка данных Protein Data Bank (PDB) [6]. Были выбраны следующие PDB-идентификаторы: 1O7S (Siglec-7, апо-форма), 4Q20 (Siglec-8, в комплексе с лигандом, что точно определяет сайт связывания), 1G0X (LILRB1, внеклеточные домены) и 1NKR (KIR2DL1, внеклеточные домены). Для Siglec-9, не имеющего экспериментальной структуры, была сгенерирована высокоточная гомологичная модель с помощью сервера SWISS-MODEL [7], используя структуру Siglec-7 (1O7S) в качестве шаблона ввиду высокой (>75 %) идентичности последовательностей их лиганд-связывающих доменов.

Выбор гликанов-кандидатов основывался на критериях: доказанная гиперэкспрессия в опухолях; наличие терминальных остатков сиаловой кислоты; подтвержденная роль в ключевых аспектах онкогенеза, таких как метастазирование и иммунное уклоне-

ние [2]. Антиген Сиалил-Льюис X (sLe^x) [Neu5Ac(α2-3)Gal(β1-4)[Fuc(α1-3)]GlcNAc-R]; Антиген Сиалил-Tn (sTn), [Neu5Ac(α2-6)GalNAc(α1)-O-Ser/Thr]; Дисиалоганглиозид GD2, [Neu5Ac(α2-8)Neu5Ac(α2-3)Gal(β1-4)Glc-Ceramide]; Полисиаловая кислота (PSA). Для всех четырех гликанов-лигандов, ввиду их высокой конформационной гибкости и отсутствия репрезентативных экспериментальных структур в свободном состоянии, сгенерированы энергетически корректные трехмерные модели *de novo*. Эта процедура была выполнена с помощью специализированного веб-сервера GLYCAM-Web Carbohydrate Builder, который использует параметризацию силового поля GLYCAM06, разработанного и валидированного специально для точного моделирования углеводов [8].

Для каждого лиганда проводилось 10 независимых запусков докинга, включающего по 500 прогонов для каждой пары лиганд*рецептор, для анализа отбирался комплекс с наименьшей энергией связывания. На первом, статистическом, уровне проанализированы распределения всех значений ΔG для каждого лиганда. Были построены гистограммы и диаграммы размаха (boxplots) для оценки общего характера взаимодействия, определения медианных значений и выявления низкоэнергетических поз-выбросов. На втором, структурном, уровне лидерные позы для комплексов Siglec-8: PSA и Siglec-8: GD2 были визуализированы

Таблица 1 – Характеристика выбранных рецепторов

№	Рецептор		Тип рецептора	Ключевая экспрессия	PDB ID	Механизм ингибирования (наличие ITIM)
1	Siglec-7	CD328	Лектин Ig-суперсемейство	Ig-подобный рецептор	1O7S	Да (2 ITIM-мотива)
2	Siglec-9	CD329	Лектин Ig-суперсемейство	NK-клетки, Т-клетки, моноциты	шаблон 1O7S/2N7A	Да (2 ITIM-мотива)
3	Siglec-8		Лектин Ig-суперсемейство		2N7A	Да (2 ITIM-мотива)
4	LILRB1	ILT2, CD85j	Ig-подобный рецептор	NK-клетки, Т-клетки	1G0X	Да (4 ITIM-мотива)
5	KIR2DL1	CD158a	Ig-подобный рецептор	NK-клетки, Т-клетки	1NKR	Да (2 ITIM-мотива)

Таблица 2 – Характеристика выбранных гликанов

№	Гликан		Тип структуры	Ключевые ассоциированные опухоли
1	Антиген Сиалил-Льюис X	sLe ^x	Тетрасахарид (N/O-гликаны)	Аденокарциномы (легкие, поджелудочная, ЖКТ)
2	Антиген Сиалил-Tn	sTn	Дисахарид (O-гликаны)	Карциномы (яичники, молочная железа, ЖКТ)
3	Дисиалоганглиозид GD2	GD2	Гликофинголипид	Нейробластома, меланома
4	Полисиаловая кислота	PSA	Полисахарид (N-гликаны)	Нейроэндокринные опухоли (нейробластома, МРЛ)

и детально проанализированы с помощью программного обеспечения PyMOL.

Результаты и их обсуждение

На первом этапе исследования получена первичная карта взаимодействий между выбранными опухоль-ассоциированными гликанами и панелью ингибиторных рецепторов. Выявлены наиболее перспективные пары для последующего углубленного изучения и отсеяны малоперспективные комбинации.

Таблица 3 – Сводная таблица статистик энергий связывания

Рецептор	sTn	PSA	GD2	X
Siglec-7	-1.80	-1.88	-1.71	-1.84
Siglec-8	-6.25	-9.68	-7.26	-6.64
Siglec-9	-0.03	-0.11	-0.06	-0.03
LILRB1	-0.04	-0.16	-0.08	-0.04
KIR2DL1	0.00	0.02	0.01	0.00

Значения энергий визуализированную в виде «тепловой карты» (рис. 1), где каждой паре «рецептор-лиганд» соответствует ячейка, отражающая наиболее энергетически выгодную позу связывания (ΔG , ккал/моль).

Siglec-8 показал высокую активность. Вся строка карты, соответствующая этому рецептору, окрашена в интенсивные «холодные» тона, что указывает на стабильное и энергетически выгодное связывание со всеми тестируемыми гликанами. Наиболее сильное взаи-

модействие наблюдается с полисиаловой кислотой (PSA), где энергия связывания достигает выдающегося значения -9.68 ккал/моль. Это значение существенно превосходит все остальные в матрице и указывает на потенциально очень высокую аффинность и стабильность комплекса. Также отмечается сильное связывание с дисialogанглиозидом GD2 (-7.26 ккал/моль) и антигеном Сиалил-Льюис X (-6.64 ккал/моль).

Взаимодействия с участием Siglec-7 можно охарактеризовать как слабые, но специфичные. $E_{\text{св}}$ – в диапазоне от -1.71 до -1.88 ккал/моль. Это говорит о том, что возможный комплекс будет короткоживущим и быстро диссоциирующим.

Рецепторы Siglec-9 и LILRB1 демонстрируют очень слабые энергии связывания ($-0.03...-0.16$ ккал/моль), что указывает на нестабильные, транзистентные контакты, которые не способны сформировать устойчивый сигнальный комплекс, необходимый для ингибирования иммунной клетки.

Рецептор KIR2DL1, как рецептор, распознающий белковые эпитопы молекул HLA-C, показал нулевые или даже положительные значения ΔG , что дополнительно валидизирует предложенную модель. Его неспособность связывать гликановые лиганды полностью соответствует результатам предыдущих исследований [7].

Были проанализированы полные наборы данных для каждого рецептора.

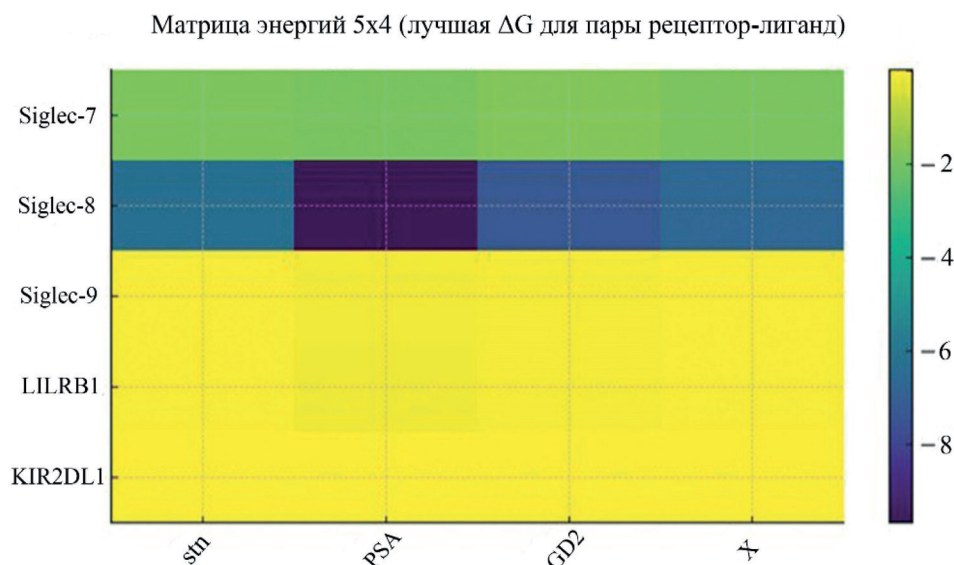


Рис. 1 «Тепловая карта» энергий связывания

Таблица 4 – Статистика энергий связывания

Рецептор	N	Среднее ΔG , ккал/моль	Медиана ΔG , ккал/моль	Min ΔG , ккал/моль	Max ΔG , ккал/моль	σ (stdev), ккал/моль
Siglec-7	1440	-0.677	-0.67	-1.88	-0.05	0.411
Siglec-8	1534	-4.599	-4.8	-9.68	-0.02	1.334
Siglec-9	1440	-0.052	-0.035	-0.11	-0.02	0.029
LILRB1	1440	-0.054	-0.04	-0.16	-0.02	0.033
KIR2DL1	3600	5.332	4.78	0.0	11.96	4.788

Данные коррелируют с предыдущими результатами. Средняя $E_{\text{св}}$ для Siglec-8 (-4.599 ккал/моль) значительно ниже, чем для других рецепторов. Широкий диапазон энергий (от -9.68 до -0.02) и высокое стандартное отклонение (1.334) указывают на то, что Siglec-8 эффективно связывает лиганды в различных конформациях; при этом существуют особенно выгодные позы.

На основе фильтрации по $E_{\text{св}}$ и биоподобности контактов составлен шорт-лист наиболее вероятных пар «лиганд–рецептор» (табл. 5).

нальных атомов азота (NH1/NH2) Arg109, что соответствует оптимальной геометрии для данного типа взаимодействия. Этот контакт служит «якорем», который прочно удерживает лиганд в активном центре.

2. Ориентирующая «сеть» водородных связей: правильная ориентация пиранозного кольца сиаловой кислоты, необходимая для формирования солевого мостика, дополнительно стабилизируется сетью водородных связей с окружающими аминокислотными остатками:

3. Амидная группа N-ацетильного фрагмента (-NH-C(O)CH₃) сиаловой кислоты

Таблица 5 – Ранжирование по энергии связывания

dG kcal/mol	Pose rank	Рецептор	Лиганд	dG kcal/mol	Pose rank	Рецептор	Лиганд
-9.68	5	Siglec 8	PSA	-7.26	16	Siglec 8	GD2
-9.68	14	Siglec 8	PSA	-7.14	9	Siglec 8	GD2
-7.81	5	Siglec 8	PSA	-7.14	18	Siglec 8	GD2
-7.81	14	Siglec 8	PSA	-7.14	7	Siglec 8	PSA
-7.26	7	Siglec 8	GD2	-7.14	16	Siglec 8	PSA

Комплекс, образованный рецептором Siglec-8 и фрагментом полисиаловой кислоты, продемонстрировал наименьшее значение $E_{\text{св}}$ ($\Delta G \ll -9$ ккал/моль), что свидетельствует о формировании стабильного высокоаффинного комплекса, и указывает на наличие уникального, синергетического механизма распознавания.

Анализ лидерной докинг-суперпозиции привел к модели «бидентатного электростатического захвата», включающего несколько ключевых компонентов.

1. Первичный якорный контакт: Распознавание канонического сиалового эпитопа (Site 1). Ключевое взаимодействие имеет ионную природу: отрицательно заряженная карбоксилатная группа (-COO⁻) терминального фрагмента Neu5Ac из цепи PSA образует прочный бидентатный (двухцентровый) солевой мостик с положительно заряженной гуанидинеиновой группой боковой цепи Arg109. В суперпозиции атомы кислорода карбоксилата (O1A/O1B) находятся на расстоянии 2.8–3.0 Å от терми-

выступает донором водородной связи для карбонильного кислорода основной цепи Ser118.

4. Гидроксильная группа глицеринового хвоста (при C8) образует водородную связь с боковой цепью Gln122.

5. Вторичный контакт (Site 2). Исключительно высокая аффинность комплекса объясняется вовлечением второго сайта связывания, который уникален для Siglec-8 и в нативных условиях отвечает за распознавание сульфатной группы. Карбоксилатная мимикрия: полисиаловая кислота, не имея сульфатных групп, использует свою полианионную природу для имитации сульфатированного лиганда. Благодаря конформационной гибкости α 2-8 гликозидной связи полимерная цепь PSA изгибается, позволяя второму по счету остатку сиаловой кислоты достичь вторичного положительно заряженного сайта Siglec-8. 6. Формирование второго солевого мостика: карбоксилатная группа этого второго остатка Neu5Ac образует второй, независимый солевой мостик с боковой цепью Arg56, ключевой компо-

нент второго сайта. Эффект «молекулярного зажима»: одновременное связывание одного гибкого лиганда с двумя пространственно разнесенными сайтами (Arg109 и Arg56) создает эффект «молекулярного зажима», или «клещей». Рецептор бидентатно захватывает лиганд, что приводит к колоссальному выигрышу в энтальпии связывания (формирование двух солевых мостиков), что объясняет наблюдаемую исключительно низкую энергию ΔG .

6. Гидрофобная стабилизация и экранирование от растворителя. Помимо доминирующих электростатических взаимодействий в общую стабильность комплекса вносят вклад и более слабые, но важные контакты.

7. Гидрофобный карман: глицерольный хвост (атомы C7-C9) и метильная группа ацетамидного фрагмента терминальной сиаловой кислоты погружаются в неглубокую гидрофобную впадину, сформированную ароматическим кольцом Tyr7. Эти гидрофобные контакты и сопутствующие им CН- π взаимодействия выполняют две функции: во-первых, вносят дополнительный вклад в общую энергию связывания (гидрофобный эффект); во-вторых, что более важно, они экранируют первичный солевой мостик Arg109-Neu5Ac от молекул воды (растворителя). Такое экранирование предотвращает ослабление ионной связи диэлектрической проницаемостью воды, делая ее прочнее.

Анализ комплекса Siglec-8/PSA показывает, что его экстраординарная стабильность результат синергии нескольких факторов:

1. Мощное электростатическое притяжение, инициируемое каноническим солевым мостиком с Arg109.

2. Уникальный бидентатный захват, ставший возможным благодаря конформационной гибкости полимерной цепи PSA и наличию второго положительно заряженного сайта с Arg56 в Siglec-8.

3. Разветвленная «сеть» водородных связей, которая точно ориентирует и фиксирует лиганд в активном центре.

4. Гидрофобное экранирование, усиливающее прочность ключевых ионных взаимодействий.

Дисиалоганглиозид GD2, характерный маркер опухолей нейроэктодермального происхождения, идентифицирован как второй по

значимости лиганд для Siglec-8. Расчетное значение $\Delta G = -7.26$ ккал/моль указывает на формирование высокостабильного комплекса, аффинность которого сопоставима с экспериментально измеренной для канонических сульфатированных лигандов Siglec-8. Анализ наилучшей докинговой позы показывает, что, в отличие от гибкой PSA, распознавание GD2 в значительной степени определяется его предопределенной, более жесткой трехмерной архитектурой, в частности специфической геометрией дисиалового мотива [Neu5Ac(α 2-8)Neu5Ac].

Детальный анализ докинговой позы суперпозиции для комплекса GD2/ Siglec-8 позволяет разложить это взаимодействие на несколько ключевых компонентов и предложить модель потенциально значимого механизма иммунной супрессии и перспективной мишени для иммунотерапии.

Как и в случае с PSA основой взаимодействия с первичным сайтом связывания является высококонсервативный механизм распознавания терминального остатка Neu5Ac. Нами выделены следующие компоненты модели.

1. ключевой солевой мостик (Site 1): Терминальная (внешняя) сиаловая кислота в дисиаловом мотиве GD2 позиционируется в каноническом кармане рецептора. Ее карбоксилатная группа ($-\text{COO}^-$) образует прочный и геометрически выверенный солевой мостик с гуанидиневой группой Arg109. Это взаимодействие доминирует по вкладу в общую энергию связывания и служит «молекулярным якорем» для всего комплекса.

2. Стабилизирующая «сеть» водородных связей: Ориентация терминального остатка Neu5Ac дополнительно фиксируется локальной сетью водородных связей. Гидроксильные группы глицеринового хвоста (C7-C9) и N-ацетильная группа формируют контакты с боковыми цепями Gln122 и Tyr7, а также с основной цепью Ser118. Ключевое отличие в механизме связывания GD2 от PSA заключается в поведении второй, субтерминальной (внутренней) сиаловой кислоты.

3. Конформационная жесткость: гликозидная связь α 2-8 между двумя остатками сиаловой кислоты в составе GD2 обладает значительно меньшей конформационной свободой по сравнению с полимерной цепью PSA. Это

придает дисиаловому мотиву жесткую пространственную структуру.

4. Невозможность «бидентатного» захвата. Вследствие этой жесткости субтерминальный остаток Neu5Ac не может изогнуться и достичь вторичного положительно заряженного сайта, образованного Arg56. Формирование второго солевого мостика, ключевого для экстраординарной стабильности комплекса с PSA, для GD2 оказывается стерически невозможным. Именно это структурное ограничение является основной причиной разницы в расчетных энергиях связывания (–7.26 ккал/моль для GD2 против –9.68 ккал/моль для PSA).

Если говорить об альтернативном механизме стабилизации, то несмотря на невозможность достичь Site 2, субтерминальный остаток Neu5Ac вносит существенный позитивный вклад в связывание. Его карбоксилатная и гидроксильные группы формируют дополнительную локальную сеть водородных связей с аминокислотами, фланкирующими первичный сайт связывания, в первую очередь с гидроксильной группой Tyr7 и амидной группой Gln122.

Анализ суперпозиции также учитывал остальную, более протяженную часть гликанового ядра GD2 ([GalNAc(β1-4)][Gal(β1-4)]Glc-). Важным результатом является то, что гликановое ядро GD2 не создает стерических столкновений с поверхностью рецептора. Активный центр Siglec-8 достаточно открыт и доступен, чтобы вместить такой объемный и разветвленный лиганд. Ван-дер-Ваальсовы взаимодействия: Остатки N-ацетилгалактозамина (GalNAc) и галактозы (Gal) располагаются на периферии сайта связывания и формируют множественные, хотя и слабые по отдельности, Ван-дер-Ваальсовы контакты с поверхностью V-set домена Siglec-8. Сумма этих неспецифических взаимодействий вносит дополнительный вклад в общую энергию связывания.

Связывание Siglec-8 с GD2 пример высокоспецифичного распознавания, основанного на балансе нескольких факторов:

1. Монодентатное «якорное» связывание: Взаимодействие прочно закреплено одним, но очень сильным солевым мостиком между терминальной Neu5Ac и Arg109.

2. Архитектурная комплементарность: Рецептор распознает не просто сиаловую кисло-

ту, а специфическую трехмерную архитектуру дисиалового мотива, стабилизируя ее через дополнительную сеть водородных связей.

3. Структурные ограничения: В отличие от PSA, GD2 не может полностью реализовать связывающий потенциал Siglec-8 из-за своей конформационной жесткости, что отражается в более высокой (менее выгодной) энергии ΔG.

Выводы:

На основании моделирования *in silico* и детального структурно-энергетического анализа взаимодействий между опухоль-ассоциированными гликанами и панелью ингибиторных рецепторов иммунных клеток сделаны следующие ключевые выводы:

1. Идентифицирована высокая и селективная аффинность Siglec-8 к гиперсиалированным гликанам. Из всей панели исследованных рецепторов (включая Siglec-7, -9, LILRB1, KIR2DL1), именно Siglec-8 продемонстрировал уникальную способность к формированию высокостабильных комплексов с сиалированными лигандами. Это подтверждено как наиболее отрицательными значениями $E_{\text{св}}$ для лидерных поз (ΔG до –9.68 ккал/моль для PSA и –7.26 ккал/моль для GD2), так и общим смещением распределения энергий в термодинамически выгодную область. Данная селективность, выявленная в ходе широкомасштабного скрининга, убедительно позиционирует Siglec-8 как приоритетный рецептор для распознавания гиперсиалированного фенотипа раковых клеток.

2. Расшифрован уникальный механизм «бидентатного электростатического захвата» для комплекса Siglec-8/PSA. Высокая аффинность полисиаловой кислоты к Siglec-8 объясняется не просто наличием сиаловых остатков, а уникальным синергетическим механизмом. Наше моделирование впервые показало, что конформационная гибкость полимерной цепи PSA позволяет ей одновременно взаимодействовать с двумя пространственно разнесенными положительно заряженными сайтами в активном центре Siglec-8: каноническим сайтом (с участием Arg109) и вторичным сайтом (с участием Arg56). Этот эффект «молекулярного зажима» или бидентатного захвата приводит к колоссальному выигрышу в энтальпии связывания за счет формирования двух мощных солевых мостиков, что и объясняет исключительно низкое значение ΔG.

3. Продемонстрирована роль архитектуры лиганда в модуляции аффинности на примере GD2. Связывание дисialogанглиозида GD2, ограниченное его более жесткой трехмерной структурой, происходит по монокататному механизму – только через первичный сайт (Arg109). Невозможность достичь второго сайта (Arg56) напрямую объясняет разницу в $E_{св}$ по сравнению с PSA. Это доказывает, что Siglec-8 распознает не просто наличие сиаловой кислоты, а тонкие особенности архитектуры и гибкости всего гликанового лиганда, что свидетельствует о высокой специфичности рецептора.

4. «Негативный контроль» подтвердил валидность модели: модель не предсказывает минимально значимое связывание гликанов с рецептором KIR2DL1, который, как известно, распознает исключительно белковые эпитопы. Это доказывает, что наблюдаемая высокая аффинность для Siglec-8 не является артефактом расчета, а отражает реальную физико-химическую комплементарность между рецептором и гликановыми лигандами.

Исследование *in silico* выявило возможную дополнительную архитектуру иммунной супрессии, многокомпонентную систему, работающую в микроокружении опухоли. Разрушение этой архитектуры может стать перспективной терапевтической стратегией, где новая мишень – процесс взаимодействия: [Опухолевая клетка, экспрессирующая PSA/GD2 на своей поверхности] ↔ [Рецептор Siglec-8 на поверхности эффекторных иммунных клеток (эозинофилов, тучных клеток)]. Терапевтическая задача – разорвать эту ингибиторную связь, чтобы «освободить» иммунные клетки и восстановить их противоопухолевую функцию.

Механизм можно разложить на несколько последовательных этапов, происходящих в микроокружении опухоли.

1. Создание «щита»: Опухолевая клетка (например, нейробластомы или мелкоклеточного рака легкого) гиперэкспрессирует ферменты-гликозилтрансферазы, которые «украшают» ее поверхность длинными полимерными цепями PSA или ганглиозидами GD2. Это создает плотный, отрицательно заряженный «гликановый щит».

2. Привлечение и контакт: В опухоль инфильтрируют иммунные клетки, в том числе эозинофилы и тучные клетки, несущие на своей поверхности рецептор Siglec-8.

3. Высокоаффинное связывание: При контакте иммунной и опухолевой клеток происходит то, что мы смоделировали: рецептор Siglec-8 с высочайшей аффинностью «прилипает» к PSA или GD2 на поверхности опухоли.

4. Запуск ингибиторного сигнала: Связывание лиганда вызывает кластеризацию рецепторов Siglec-8. Это приводит к фосфорилированию ингибиторных мотивов ITIM в их цитоплазматических хвостах.

5. «Паралич» иммунной клетки: Фосфорилированные ITIM-мотивы рекрутируют фосфатазы (SHP-1, SHP-2), которые дефосфорилируют ключевые белки активирующих сигнальных путей. В результате наступает прямой супрессивный эффект:

а) Для эозинофилов: Активация Siglec-8 является мощным про-апоптотическим сигналом. Эозинофил, который мог бы участвовать в уничтожении опухоли (например, через антитело-зависимую клеточную цитотоксичность), получает от опухоли приказ на самоуничтожение (апоптоз) и погибает.

б) Для тучных клеток: Сигнал от Siglec-8 блокирует их дегрануляцию. Тучная клетка, которая могла бы высвободить противоопухолевые цитокины и хемокины, остается инертной.

Список цитированных источников

1. Sialyl-Lewis X and related carbohydrate antigens: their roles in the selection of high-metastatic cancers and in the recruitment of inflammatory leukocytes / R. Kannagi [et al.] // The Journal of Biochemistry. – 2021. – Vol. 169. – № 1. – P. 1–13.
2. La-Beck, N. The «sweet» side of immune checkpoints: the role of glycans in tumor-immune interactions / N. La-Beck, G. Jean // Cancers. – 2020. – Vol. 12, № 7. – P. 1765.
3. Sialyl-Tn in cancer: (how) did we miss the target? / S. Julien [et al.] // Biomolecules. – 2020. – Vol. 10, № 2. – P. 305.
4. Barrow, F. The role of the sialyl-Tn antigen in cancer progression / F. Barrow [et al.] // International J of Molecular Sciences. – 2021. – Vol. 22, № 16. – P. 8593.
5. Guan, F. Gangliosides GD2 and GD3 in cancer / F. Guan, C. Zou, Y. Liu // Glycoconjugate Journal. – 2022. – Vol. 39, № 2. – P. 159–169.

6. The Protein Data Bank / H. M. Berman [et al.] // Nucleic Acids Research. – 2000. – Vol. 28, № 1. – P. 235–242. DOI: 10.1093/nar/28.1.235.
7. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes / A. Waterhouse [et al.] // Nucleic Acids Research. – 2018. – Vol. 46, № W1. – P. W296–W303.
8. N. GLYCAM06: a generalizable biomolecular force field for carbohydrates / K. N. Kirschner [et al.] // Journal of Computational Chemistry. – 2008. – Vol. 29, № 4. – P. 622–655.

HYPERSIALLYLATED GLYCANS OF CANCER CELLS AS LIGANDS FOR INHIBITORY RECEPTORS OF IMMUNE CELLS

Lakhvich T.T., Borisov B.V., Dyatko P.G.

Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

An experiment in silico proved the unique patterns of hypersialylated glycans on the surface of cancer cells serving as ligands for specific inhibitory receptors of immune cells. The interaction of a panel of tumor-associated glycans (sLe^x, sTn, GD2, PSA) with a panel of inhibitory receptors (Siglec –7, –8, –9, LILRB1, KIR2DL1) was assessed. The Siglec-8 receptor demonstrated a high affinity to sialylated ligands with maximum interactions with polysialic acid (PSA) - binding energy (E_b) = -9.68 kcal/mol; disialoganglioside GD2 (E_b = -7.26 kcal/mol). Structural analysis associates the extraordinary stability of the Siglec-8/PSA complex with synergistic «bidentate electrostatic trapping» in which the flexible PSA chain simultaneously binds to two positively charged sites on the receptor (Arg109 and Arg56). GD2 recognition, in turn, is determined by its rigid 3D architecture and is limited to monodentate binding. The study justifies the PSA/GD2–Siglec-8 axis as a novel potential mechanism of immune suppression and a promising target for immunotherapy.

Keywords: cancer cells; glycans; hypersialylation; immune tolerance; inhibitory receptors; in silico; KIR; LILRB1; NK cells; Siglec; T-lymphocytes.